



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

**AVALIAÇÃO QUÍMICA E FARMACOLÓGICA DE EXTRATOS SECOS
DAS FOLHAS DE ESPÉCIES DE PEDRA-UME-CAÁ**

EDINILZE SOUZA COELHO OLIVEIRA
DOUTORADO

MANAUS-AM
2022

EDINILZE SOUZA COELHO OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO QUÍMICA E FARMACOLÓGICA DE EXTRATOS SECOS
DAS FOLHAS DE ESPÉCIES DE PEDRA-UME-CAÁ**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Química da Universidade Federal do Amazonas
como parte dos requisitos para a obtenção do título
de Doutora em Química, com ênfase na linha de
pesquisa em Produtos Naturais e Biomoléculas.

Prof. Dr. Marcos Batista Machado
Orientador

Prof. Dr. Emerson Silva Lima
Coorientador

MANAUS-AM

2022

Ficha Catalográfica

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

O48a Oliveira, Edinilze Souza Coelho
Avaliação química e farmacológica de extratos secos das folhas
de espécies de pedra-ume-caá / Edinilze Souza Coelho Oliveira .
2022
358 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Marcos Batista Machado
Coorientador: Emerson Silva Lima
Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal do
Amazonas.

1. Myrcia. 2. Eugenia. 3. Compostos fenólicos. 4. Inibição
enzimática. 5. Hipoglicêmico. I. Machado, Marcos Batista. II.
Universidade Federal do Amazonas III. Título

Avaliação química e farmacológica de extratos secos
das folhas de espécies de pedra-ume-caá

EDINILZE SOUZA COELHO OLIVEIRA

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química,
do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal do Amazonas como
requisito parcial para a obtenção do Grau de Doutor (a) em Química.

Aprovada em, 25 de maio de 2022.



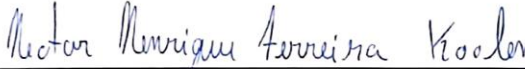
MARCOS BATISTA MACHADO (PPGQ/UFAM)
Presidente/Orientador



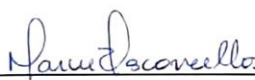
SERGIO MASSAYOSHI NUNOMURA (PPGQ/UFAM)
Membro Interno



ELENILSON DE GODOY ALVES FILHO (UFC)
Membro Externo



HECTOR HENRIQUE FERREIRA KOOLEN (PPGQ/UFAM)
Membro Interno



MARNE CARVALHO DE VASCONCELLOS (FCF/UFAM)
Membro Externo

Universidade Federal do Amazonas
Manaus, 25 de maio de 2022.

*Com amor dedico esta tese aos meus pais
Edimilson e Dulcinalva,
Às minhas irmãs Ednalva, Eliziane e Elinalva,
e ao meu amado esposo Hilquias Trindade.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu eterno Deus pelo amor e graça concedidos para a conclusão de mais esta etapa.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Marcos Batista Machado pelos ensinamentos, paciência, confiança, idealização e por todas as contribuições científicas a esta pesquisa.

Agradeço ao meu coorientador Prof. Dr. Emerson Silva Lima (UFAM) pela orientação, confiança, contribuições científicas e ensaios farmacológicos.

Ao Prof. Dr. Francisco Célio M. Chaves (Embrapa-AM) e Prof. Dr. Alessandro S. do Rosário (UFRA) pelas coletas e identificação das espécies vegetais.

Meus agradecimentos à Profa. Dra. Francinete R. Campos e Dra. Flávia L. D. Pontes (UFPR) por todas as análises de CLAE-EMAR.

Agradeço à Profa. Dra. Jaqueline de A. Bezerra pelas contribuições nos testes antioxidantes, *in vitro*, aquisição de software quimiométrico e por todas as contribuições a esta pesquisa.

Agradeço ao Prof. Dr. José Fernando M. Barcellos (UFAM) e ao doutorando Ruben Dario Morales-Gamba pelas contribuições no estudo histopatológico.

Aos doutorandos Leonard D. R. Acho e Bárbara Janaína P. da Silva pelas contribuições nos ensaios farmacológicos.

À Universidade Federal do Amazonas e ao Programa de Pós-graduação em Química pela oportunidade de realização desta tese.

Meus agradecimentos à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida e financiamento parcial do Programa PRÓ-AMAZÔNIA.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) (Programa POSGRAD), à Financiadora de Estudos e Programas (FINEP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro.

Agradeço à Central Analítica da UFAM por toda infraestrutura para a realização deste estudo, bem como aos Profs. coordenadores dos laboratórios, em especial, à Profa. Dra. Rita Nunomura, Prof. Dr. Afonso Duarte, Profa. Dra. Cristine Machado, Profa.

Dra. Teresa Cristina Souza e ao Prof. Dr. Paulo Couceiro. Também, agradeço aos técnicos Msc Kidney Neves e Dr. Felipe Moura. Obrigada pelo apoio.

Meus agradecimentos à Profa. Dra. Tatiane Pereira (UFAM) pela estrutura fornecida para a secagem dos chás.

Aos meus pais Edimilson Veloso Coelho e Dulcinalva Souza Coelho por tanto amor e dedicação. Nossa ligação e amor são eternos.

Ao meu amado esposo Hilquias Trindade. O seu amor, compreensão e companheirismo foram o meu alicerce para a realização desta pesquisa.

Às minhas irmãs Ednalva, Eliziane e Elinalva e aos meus sobrinhos que mesmo de longe sempre torceram por mim.

À família do meu esposo, obrigada pelas orações e incentivo.

Agradeço a todos os integrantes do grupo de pesquisa NEQUIMA, em especial, ao Prof. Dr. Alan Diego, Dra. Andrezza Ramos, ao Msc Leonardo Cavalcante e à doutoranda Ingridy Suelen, pelas discussões científicas e amizade.

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

OBRIGADA.

*“Nossos sonhos, a gente é quem constrói
É vencendo os limites
Escalando as fortalezas
Conquistando o impossível pela fé”.*

(Ebenezer Cesar De Souza/Solange Cesar De Souza)

RESUMO

Espécies vegetais conhecidas popularmente como pedra-ume-caá são utilizadas na medicina popular no Brasil para o tratamento do diabetes, e a matéria-prima vegetal é comercializada em todo o país. Portanto, as folhas de diferentes espécies de pedra-ume-caá foram coletadas em três locais: Embrapa Amazônia Ocidental-AM [*Myrcia multiflora* (MmEAO) e *Eugenia punicifolia* (EpEAO)]; na Reserva Florestal Adolpho Ducke-AM [*M. sylvatica* (MsylRAD) e *E. punicifolia* (EpRAD)] e na Área de Proteção Ambiental-PA [*M. multiflora* (MmAPA), *M. sylvatica* (MsylAPA), *M. guianensis* (MguAPA), *M. amazonica* (MamAPA), *E. punicifolia* (EpAPA) e *E. biflora* (EbAPA)]. Os extratos dessas espécies e de 17 amostras comerciais adquiridas em Manaus, Belém e Goiânia foram preparados por infusão. Todos os extratos foram analisados por CLAE-EMAR e RMN, submetidos à análise quimiométrica (PCA e HCA) e por RMNq (amostras nativas). O efeito antidiabético dos extratos secos das espécies nativas foi avaliado de acordo com a sua inibição de α -glucosidase, α -amilase e lipase, bem como seu teor de fenóis totais, viabilidade celular *in vitro* e atividades de eliminação de radicais livres e antiglicação. Os testes de tolerância oral a maltose (EbAPA e EpEAO) e de dose múltipla crônica (EbAPA e MmAPA) em camundongos diabéticos induzidos por estreptozotocina (STZ) foram realizados em 28 dias. Posteriormente, parâmetros bioquímicos, hemólise, nível de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico no fígado e análises histopatológicas dos rins e fígado foram investigados. No total, 22 substâncias fenólicas, 1 ácido orgânico e 3 carboidratos foram caracterizados. Este estudo demonstrou, por RMNq, que quercitrina, hiperosídeo e corilagina estão em altas concentrações no extrato seco de MmAPA, bem como, a catequina no extrato de EbAPA. Na análise dos gráficos de *loadings* das 3 componentes principais (68,01%), foi possível concluir que ácido quínico, ácido gálico, catequina, miricitrina e quercitrina são principais marcadores químicos dessas espécies. Além disso, esses marcadores foram identificados em 15 amostras comerciais. MmAPA, MmEAO, EpEAO, EpAPA, EpRAD e EbAPA apresentaram inibição da enzima α -glucosidase. Contudo, não foi observada inibição frente as demais enzimas. A administração crônica de MmAPA (25 mg/kg e 50 mg/kg de pc) e EbAPA (50 mg/kg pc) resultou na redução dos níveis de glicose em animais diabéticos, semelhante à acarbose. Esses resultados são associados à catequina, miricitrina, quercitrina, procianidina tipo-B e

corilagina, as quais são presentes nesses extratos. No entanto, EbAPA (100 e 200 mg/kg pc) causou morte prematura de camundongos até 22 dias de tratamento. Os resultados sugerem que o mecanismo de toxicidade desse extrato pode estar relacionado ao agravamento do estresse oxidativo no fígado. O estudo histopatológico indicou que EbAPA não reduziu a progressão da toxicidade do diabetes causada por STZ. Portanto, este estudo possibilitou a autenticação de matérias-primas vegetais comercializadas como pedra-ume-caá, uma vez que os resultados identificaram os principais marcadores químicos dessas espécies. Além disso, demonstrou o potencial hipoglicemiante das folhas de *E. biflora* e *M. multiflora*. No entanto, o uso do chá de EbAPA por período prolongado pode ser prejudicial a seus usuários devido à sua considerável toxicidade, a qual necessita ser melhor investigada.

Palavras-chaves: *Myrcia*, *Eugenia*, Compostos fenólicos, Inibição enzimática, Hipoglicêmico.

ABSTRACT

The plant species that popularly known as pedra-ume-caá are used in popular medicine in Brazil for the treatment of diabetes, and the plant raw material is sold throughout the country. Therefore, the leaves of different pedra-ume-caá species were collected in three locations: Embrapa Amazônia Ocidental - Amazonas state [*Myrcia multiflora* (MmEAO) and *Eugenia punicifolia* (EpEAO)]; in the Adolpho Ducke Forest Reserve - Amazonas state [*M. sylvatica* (MsylRAD) and *E. punicifolia* (EpRAD)], and in an environmental protection area - Pará state [*M. multiflora* (MmAPA), *M. sylvatica* (MsylAPA), *M. guianensis* (MguAPA), *M. amazonica* (MamAPA), *E. punicifolia* (EpAPA) and *E. biflora* (EbAPA)]. The dry extracts of these species and 17 commercial samples acquired in Manaus, Belém and Goiânia were prepared by infusion. All extracts were analysed using HPLC-HRMS and NMR, then subjected to chemometric analysis (PCA and HCA) and NMRq (native samples). The antidiabetic effect of dry extracts was evaluated according to their inhibition of α -glucosidase, α -amylase and lipase, as well as to their content of total phenols, *in vitro* cell viability, free radical scavenging and antiglycation activities. Oral maltose tolerance (EbAPA and EpEAO) and chronic multiple dose tests (EbAPA and MmAPA) in streptozotocin-induced diabetic mice (STZ) were performed over 28 days. Subsequently, biochemical parameters, hemolysis, and levels of the thiobarbituric acid reactive species in the liver were investigated and histopathological analyses of the kidneys and liver were performed. In total, 22 phenolic compounds, 1 organic acid and 3 carbohydrates were characterized. By using qNMR, this study demonstrated that quercitrin, hyperoside and corilagin have high concentrations in the dry extract of the sample MmAPA, as well as catechin in the dry extract of the sample EbAPA. In the analysis of the loadings graphs of the three main components (68.01%), we were able to conclude that quinic acid, gallic acid, catechin, myricitrin and quercitrin are the main chemical markers of these species. Furthermore, these markers were identified in 15 commercial samples. MmAPA, MmEAO, EpEAO, EpAPA, EpRAD and EbAPA showed inhibition activity of the enzyme α -glucosidase. However, no inhibition was observed against the other enzymes. Chronic administration of EbAPA (50 mg/kg of body weight) and MmAPA (25 mg/kg and 50 mg/kg bw) reduced glucose levels in diabetic animals similar to acarbose. These results are associated with catechin, myricitrin, quercitrin, B-type

procyanidin and corilagin, which are present in these extracts. However, EbAPA (100 and 200 mg/kg bw) caused premature death of mice up to 22 days of treatment. Our data indicate that one of the mechanisms of toxicity of EbAPA may be related to the aggravation of oxidative stress in the liver. This histopathological study indicated that EbAPA failed to minimize the progression of the toxicity of diabetes caused by STZ. Therefore, this study enabled the identification of plant raw materials sold as pedra-ume-caá, since the results showed the main chemical markers of these species. In addition, we demonstrated the hypoglycemic potential of *E. biflora* and *M. multiflora* leaves. However, the use of the infusion of EbAPA for a prolonged period can be harmful to its users due to its considerable toxicity, which needs to be better investigated.

Keywords: *Myrcia*, *Eugenia*, Phenolic compound, Enzyme inhibition, Hypoglycemic.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1D	Unidimensional
2D	Bidimensional
ABTS ^{•+}	Ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)
AGEs	<i>Advanced glycation end-products</i> (Produtos finais da glicação avançada)
ALT	Alanina aminotransferase
AQ	<i>Acquisition Time</i> (Tempo de Aquisição)
AST	Aspartato aminotransferase
CD ₃ OD	Metanol deuterado
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-EMAR	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência-Espectrometria de Massas de Alta Resolução
COSY	<i>Homonuclear Correlation Spectroscopy</i> (Espectroscopia de correlação homonuclear)
D1	<i>Delay</i> (Tempo de espera antes de cada aquisição)
<i>d</i>	Dupleto
<i>dd</i>	Duplo dupleto
DMSO- <i>d</i> ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
DPPH [•]	Radical 2,2-Difenil-1-picrilhidrazila
EM	Espectrometria de Massas
ESI	<i>ElectroSpray Ionization</i> (Ionização por eletrospray)
ERETIC2	Electronic Referencing to Access <i>In Vivo</i> Concentrations 2
FID	<i>Free induction decay</i> (Decaimento de Indução livre)
HCA	<i>Hierarchical Cluster Analysis</i> (Análises de Agrupamentos Hierárquicos)
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Quantum Correlation</i> (Correlação Heteronuclear a Longa Distância)
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i> (Correlação Heteronuclear a Ligação Direta)
<i>J</i>	Constante de acoplamento em Hertz (Hz)
LB	<i>Line Broadening</i> (função matemática empregada no FID).

<i>m</i>	Multiplete
MHz	Megahertz
MRC-5	Linhagem de célula de fibroblasto de pulmão humano
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
NS	<i>Number of Scans</i> (Número de varreduras)
P1	<i>Hard pulse</i> (Tempo do Pulso de 90° com alta potência)
PCA	<i>Principal Component Analysis</i> (Análise de Componentes Principais)
PULCON	Pulse Length-based CONcentration determination methodology
<i>R</i> ²	Coeficiente de regressão
RDA	<i>retro</i> Diels-Alder
RG	<i>Receiver Gain</i> (Ganho do receptor)
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMNq de ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear quantitativa de Hidrogênio
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> (Espécies reativas de oxigênio)
<i>s</i>	Simpleto
<i>sl</i>	Simpleto largo
SW	<i>Spectral Width</i> (Janela spectral)
T ₁	Constante de tempo de relaxação longitudinal
TBARS	<i>Thiobarbituric acid reactive species</i> (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico)
TD	<i>Time Domain</i> (número de pontos para a digitalização do FID)
TMS	TetraMetilSilano
TMSP- <i>d</i> ₄	TriMetilSilil-2,2,3,3- <i>d</i> ₄ -Propionato de sódio
TOF	<i>Time-Of-Flight</i> (Espectrômetro de massas por tempo de voo)
zg	Sequência de pulso de 90° convencional
zgpr	Sequência de pulso de 90° com supressão de um sinal

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Complicações mais frequentes do diabetes mellitus.....	25
Figura 2 – Estruturas de alguns AGEs.....	28
Figura 3 – Estruturas de constituintes presentes em extratos vegetais com atividade de inibição enzimática, antiglicante e antioxidante.....	31
Figura 4 – Espécies vegetais de pedra-ume-caá.....	35
Figura 5 – Estruturas dos constituintes identificados em <i>Myrcia multiflora</i>	37
Figura 6 – Estruturas de alguns constituintes identificados em <i>E. puniceifolia</i> e <i>E. biflora</i>	41
Figura 7 – Sequência de pulso de inversão-recuperação.....	47
Figura 8 – Amostras comerciais de pedra-ume-caá adquiridas em Manaus-AM e Belém-PA.....	57
Figura 9 – Espectros de RMN de ^1H dos extratos secos das espécies de pedra-ume-caá (DMSO- d_6 , 500 MHz). A: região alifática (δ_{H} 0,9 a 3,0), B: região carbinólica (δ_{H} 3,0 a 5,5) e C: região aromática e vinílica (δ_{H} 5,7 a 8,0).....	75
Figura 10 – Matriz de similaridade química das espécies de pedra-ume-caá nativas.....	76
Figura 11 – Cromatogramas de íons totais dos extratos secos das folhas de <i>E. biflora</i> (EbAPA), <i>E. puniceifolia</i> (EpEAO) e <i>M. multiflora</i> (MmAPA) por CLAE-ESI-EMAR.....	77
Figura 12 – Estruturas dos carboidratos 1 , 2 e 3	78
Figura 13 – Estrutura do ácido quínico.....	78
Figura 14 – Estrutura do ácido gálico.....	79
Figura 15 – Proposta de fragmentação do íon de m/z 577,13 $[\text{M}-\text{H}]^-$	81
Figura 16 – Espectro de ESI-MS modo negativo e MS^2 do íon de m/z 577,1386.....	82
Figura 17 – Estruturas dos ácidos hidroxicinâmicos 7 e 9	83
Figura 18 – Estrutura do flavonoide 8	84
Figura 19 – Proposta de fragmentação do íon de m/z 291,0880 $[\text{M}+\text{H}]^+$	85
Figura 20 – Estrutura do elagitanino 10	86
Figura 21 – Estrutura do elagitanino 11	87
Figura 22 – Estrutura dos flavonoides 12 e 15	88
Figura 23 – Proposta de fragmentação dos flavonoides 12 e 15	89
Figura 24 – Proposta de fragmentação da substância ácido quebulágico (13).....	91
Figura 25 – Estrutura do elagitanino 13	92
Figura 26 – Proposta de fragmentação e espectro ESI-MS/MS modo positivo do íon de m/z 785,0820.....	93
Figura 27 – Espectro ESI-MS/MS modo negativo do íon de m/z 479,0876.....	94
Figura 28 – Estrutura do flavonoide 16	94
Figura 29 – Proposta de fragmentação das substâncias 18 e 19	95
Figura 30 – Estrutura do flavonoide 19	96

Figura 31 – Estrutura do flavonoide 17	97
Figura 32 – Estrutura do flavonoide hiperosídeo.....	98
Figura 33 – Estrutura do flavonoide guaijaverina.....	99
Figura 34 – Estrutura do flavonoide 23	100
Figura 35 – Proposta de fragmentação dos flavonoides 17 , 20 , 21 e 23	101
Figura 36 – Estrutura da substância 22	102
Figura 37 – Proposta de fragmentação do flavonoide 24	103
Figura 38 – Proposta de fragmentação dos íons produtos observados no espectro de ESI-MS/MS do íon m/z 461,0753 no modo negativo (EbAPA).....	104
Figura 39 – Estrutura do flavonoide 26	105
Figura 40 – Espectro ESI-MS/MS modo negativo do íon de m/z 431,1014 (MmAPA) e proposta de fragmentação da substância 26	105
Figura 41 – Estruturas de constituintes identificados nos extratos secos das espécies de pedra-ume-caá.....	116
Figura 42 – Ampliação dos espectros de RMN de ^1H na região de 4,18 – 8,20 ppm referente aos sinais das substâncias identificadas nos extratos secos de pedra-ume-caá (DMSO- d_6 , 500 MHz).....	119
Figura 43 – Ampliação dos espectros de RMN de ^1H na região C (5,2-8,0 ppm) referente aos sinais dos constituintes identificados nos extratos secos de MmAPA em duas temperaturas onde ocorreu maior homogeneidade do campo magnético (CD $_3$ OD) (500 MHz, CD $_3$ OD).....	121
Figura 44 – Sinais dos hidrogênios e ambiente químico dos constituintes quantificados em DMSO- d_6 nos extratos de <i>M. multiflora</i> (8 , MmEAO), <i>E. biflora</i> (8 , EbAPA) e <i>E. puniceifolia</i> (23 , EpEAO).....	124
Figura 45 – Sinais dos hidrogênios e ambiente químico dos constituintes quantificados em <i>M. multiflora</i> (MmAPA).....	125
Figura 46 – Dendograma representando similaridade de composição química entre os extratos de pedra-ume-caá.....	127
Figura 47 – Gráfico de variância explicada <i>versus</i> número de PCs.....	127
Figura 48 – Gráfico de <i>scores</i> de PC1 x PC2 dos extratos secos das espécies de pedra-ume-caá.....	129
Figura 49 – Gráfico de <i>loadings</i> positivo e negativo de PC1.....	129
Figura 50 – Gráfico de <i>loadings</i> positivo e negativo de PC2.....	130
Figura 51 – Gráfico de PC1 x PC3 dos extratos secos das espécies pedra-ume-caá.....	131
Figura 52 – Gráfico de <i>loadings</i> de PC3.....	131
Figura 53 – Espectros de RMN de ^1H dos extratos secos de amostras comerciais de pedra-ume-caá (DMSO- d_6 , 500 MHz). A: região alifática (δ_{H} 0,9 a 3,0), B: região carbinólica (δ_{H} 3,0 a 5,5) e C: região aromática (δ_{H} 5,7 a 10,0).....	132

Figura 54 – Espectros de RMN de ^1H das amostras comerciais C13-GO e C14-GO (DMSO- d_6 , 500 MHz).....	133
Figura 55 – Dendograma representando similaridade de composição química entre os extratos de pedra-ume-caá nativas e das amostras comerciais.....	134
Figura 56 – Análise comparativa dos espectros de RMN de ^1H das amostras comerciais C2-AM, C5-PA, C7-PA, C10-PA, C12-PA e extratos secos de EbAPA, MsyIAPA e MmEAO (DMSO- d_6 , 500 MHz).....	135
Figura 57 – Análise comparativa dos espectros de RMN de ^1H dos subgrupos Ib e Ic (DMSO- d_6 , 500 MHz).....	136
Figura 58 – Comparação dos espectros de RMN de ^1H do agrupamento II (EpEAO e C17-AM em DMSO- d_6 , 500 MHz).....	137
Figura 59 – Comparação dos espectros de RMN de ^1H do agrupamento III (C15-AM, C16-AM e MamAPA em DMSO- d_6 , 500 MHz).....	138
Figura 60 – Viabilidade de células MRC-5 tratadas com extratos secos das folhas de pedra-ume-caá por 24 h do gênero <i>Eugenia</i>	142
Figura 61 – Viabilidade de células MRC-5 tratadas com extratos secos das folhas de pedra-ume-caá por 24 h do gênero <i>Myrcia</i>	143
Figura 62 – Porcentagem de inibição de ROS dos extratos EbAPA, MmAPA e EpEO em comparação ao padrão quercetina.....	147
Figura 63 – Efeitos da administração oral dos extratos secos de <i>E. biflora</i> (EbAPA), <i>E. puniceifolia</i> (EpEAO) e fármaco acarbose em camundongos com alta dose de maltose.....	149
Figura 64 – Percentual de sobrevivência dos animais do grupo controle normal (CN), grupo controle diabético (CD) e grupos tratados com extrato de <i>E. biflora</i> (EbAPA50, EbAPA100 e EbAPA200) e acarbose (Acarbose200) (n=6) até 28 dias.....	150
Figura 65 – Efeitos da administração oral do extrato seco das folhas de <i>E. biflora</i> (EbAPA), <i>M. multiflora</i> (MmAPA) e fármaco acarbose sobre a concentração de glicose no sangue de camundongos diabéticos.....	152
Figura 66 – Níveis de peroxidação lipídica em homogenatos de fígado de camundongos.....	153
Figura 67 – Efeito do extrato seco das folhas de <i>E. biflora</i> e <i>M. multiflora</i> (EbAPA e MmAPA) em camundongos diabéticos induzidos por estreptozotocina (STZ) na histopatologia dos rins (A) e fígado (B) determinada via H & E (ampliação de 40X, barra de escala de 50 μm). CD: controle normal; CD: controle diabético induzido por STZ.....	157
Esquema 1 – Formação de AGEs através da reação de Maillard.....	27
Esquema 2 – Formação de triazinas a partir da reação da aminoguanidina com compostos dicarbonílicos.....	29
Quadro 1 – Constituintes químicos e atividades comprovadas em espécies vegetais dos gêneros <i>Eugenia</i> e <i>Myrcia</i>	32

Quadro 2 – Otimização dos parâmetros de aquisição recomendados para a RMNq de ^1H	48
Esquema 3 – Delineamento experimental das atividades desenvolvidas no estudo com as espécies de pedra-ume-caá e amostras comerciais.....	53
Esquema 4 – Sequência metodológica empregada para a análise multivariada dos dados de RMN de ^1H dos extratos secos das matrizes nativas e comerciais de pedra-ume-caá.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Espécies vegetais, local de coleta, número da exsicata e códigos utilizados para o estudo.....	55
Tabela 2 – Amostras comerciais de pedra-ume-caá, informação no rótulo e origem da aquisição.....	56
Tabela 3 – Preparo amostral e parâmetros de aquisição das análises quantitativas por RMNq de ¹ H.....	61
Tabela 4 – Rendimento dos extratos secos das folhas das espécies de pedra-ume-caá.....	74
Tabela 5 – Identificação dos constituintes químicos nos extratos secos das folhas de espécies vegetais pedra-ume-caá por CLAE-EMAR e RMN.....	106
Tabela 6 – Dados quantitativos dos constituintes fenólicos dos extratos secos de <i>M. multiflora</i> por RMNq de ¹ H em duas temperaturas (15 °C e 27,5 °C) onde ocorreu maior homogeneidade do campo magnético (CD ₃ OD).....	123
Tabela 7 – Atividades de inibição, concentração inibitória dos extratos secos das espécies vegetais frente as enzimas lipase, α-amilase e α-glucosidase.....	139
Tabela 8 – Conteúdo de Fenóis Totais, atividades de sequestro de radicais e antiglicante dos extratos secos das espécies vegetais de pedra-ume-caá.....	146
Tabela 9 – Efeito do extrato seco das folhas de <i>E. biflora</i> e <i>M. multiflora</i> no perfil lipídico e nas enzimas dos rins e fígado.....	155

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	22
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	24
2.1 Diabetes mellitus.....	24
2.2 A Química de glicação.....	25
2.3 Produtos naturais bioativos para o tratamento do diabetes.....	30
2.4 Grupo de espécies de pedra-ume-caá.....	34
2.4.1 Composição química e propriedades biológicas de espécies de pedra-ume-caá do gênero <i>Myrcia</i>	35
2.4.2 Composição química e atividades biológicas de espécies de pedra-ume-caá do gênero <i>Eugenia</i>	39
2.5 <i>Fingerprinting</i> e análise exploratória de dados.....	41
2.6 Determinação qualitativa e quantitativa de compostos orgânicos por RMN de ¹H.....	45
3 OBJETIVOS.....	50
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	51
4.1 Reagentes, padrões, solventes e equipamentos.....	51
4.1.1 Análises químicas.....	51
4.1.2 Ensaios experimentais <i>in vitro</i>	51
4.1.3 Ensaios experimentais <i>in vivo</i>	52
4.2 Delineamento experimental.....	53
4.3 Coleta e identificação do material botânico.....	54
4.4 Preparação dos extratos secos das espécies vegetais coletadas.....	54
4.5 Amostras comerciais.....	56
4.6 Análises por CLAE-EMAR.....	56
4.7 Análise semipreparativa por CLAE.....	58
4.8 Análises por RMN.....	59
4.8.1 Análise qualitativa por RMN.....	59
4.8.2 Análise quantitativa por RMN de ¹ H.....	59
4.9 Análise exploratória dos dados.....	61
4.9.1 Aquisição dos espectros de RMN de ¹ H.....	61
4.9.2 Obtenção da Matriz de Dados.....	62
4.9.3 Análises estatísticas multivariadas.....	62
4.10 Avaliação das atividades enzimáticas <i>in vitro</i>.....	64
4.10.1 Atividade inibitória α -glucosidase.....	64
4.10.2 Atividade inibitória α -amilase.....	65
4.10.3 Atividade inibitória lipase pancreática.....	65
4.11 Avaliação da atividade antiglicante.....	66

4.11.1 Modelo glioxal e albumina sérica bovina (BSA/GO).....	66
4.11.2 Modelo frutose e albumina sérica bovina (BSA/frutose).....	66
4.12 Fenois totais	66
4.13 Avaliação da atividade antioxidante	67
4.13.1 Radical livre DPPH*.....	67
4.13.2 Cátion radical ABTS* ⁺	67
4.14 Ensaios em culturas de células	68
4.14.1 Ensaio de viabilidade celular.....	68
4.14.2 Atividade antioxidante celular (CAA).....	68
4.15 Estudo <i>in vivo</i>	69
4.15.1 Animais.....	69
4.15.2 Curva de tolerância oral a maltose.....	69
4.15.3 Experimento crônico de dose múltipla.....	70
4.16 Coleta de amostras de sangue e órgãos	71
4.17 Medições dos parâmetros bioquímicos	71
4.18 Avaliação do potencial hemolítico	71
4.19 Estimativa de peroxidação lipídica	72
4.20 Análises histológicas	72
4.21 Análises estatísticas univariadas	72
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	74
5.1 Análise do perfil espectral por RMN de ¹H	74
5.2 Identificação dos constituintes químicos	77
5.2.1 Identificação dos carboidratos.....	78
5.2.2 Identificação do ácido quínico (4)	78
5.2.3 Identificação dos compostos fenólicos.....	79
5.3 Quantificação por RMNq de ¹H	120
5.4 Análise exploratória dos dados de RMN de ¹H	126
5.5 Análise química dos extratos das amostras comerciais por RMN de ¹H	132
5.6 Análises das respostas farmacológicas <i>in vitro</i>	139
5.6.1 Efeito de inibição enzimática.....	139
5.6.2 Efeito de citotoxicidade em células MRC-5.....	141
5.6.3 Atividades antiglicante e sequestro de radicais livres.....	144
5.7 Análises das respostas farmacológicas <i>in vivo</i>	148
5.7.1 Curva de tolerância oral a maltose.....	148
5.7.2 Efeito hipoglicemiante de EbAPA e MmAPA.....	149
5.7.3 Efeito de EbAPA e MmAPA na peroxidação lipídica.....	153
5.7.4 Análise dos parâmetros bioquímicos.....	155
5.7.5 Exames histopatológicos de rins e fígado.....	156
6 CONCLUSÃO	159

REFERÊNCIAS.....	161
ANEXO.....	182

1 INTRODUÇÃO

Diabetes mellitus é uma doença metabólica caracterizada pela hiperglicemia. Dentre as classificações existentes, destaca-se o Diabetes mellitus tipo 2 (DM2) que é responsável por cerca de 90% a 95% do total de pacientes diabéticos no mundo (WHO, 2019). DM2 evoluiu com a urbanização crescente, que alterou o estilo de vida, levando a adoção de padrões de comportamento não saudáveis (redução de atividade física e dieta hipercalórica). Essa alteração de comportamento social contribuiu com o aumento dos casos de DM2 (WHO, 2016), que tem sido considerado um problema de saúde pública global. O regime terapêutico inclui medicamentos, dieta e mudança no estilo de vida (NAVEEN *et al.*, 2021). Contudo, o consumo regular de agentes antidiabéticos orais causam efeitos colaterais, e alternativas a esses medicamentos tem sido exploradas pela população mundial (NAVEEN *et al.*, 2021; SHORI, 2015).

A medicina tradicional (não convencional) utilizada por diversos povos como alternativa à medicina convencional para a manutenção da saúde, é empregada na prevenção e no tratamento de doenças crônicas (WHO, 2013). Diversos estudos científicos comprovam a eficácia terapêutica de drogas vegetais para o tratamento do diabetes, o que tem ocasionado a popularização de algumas plantas medicinais (RAVI *et al.*, 2004; SALES *et al.*, 2014; TONELLI *et al.*, 2022). Apesar de diversos relatos da potencialidade de plantas medicinais e seus produtos, uma das principais preocupações tem sido o consumo em quantidades seguras (CLEMEN-PASCUAL *et al.*, 2022). Diante disso, estudos farmacológicos e toxicológicos a partir de extratos de plantas medicinais demonstram uma grande relevância para a sociedade (CLEMEN-PASCUAL *et al.*, 2022; GALENO *et al.*, 2014; MAZUMDER *et al.*, 2021). Alguns destes estudos envolvendo ervas medicinais fornecem dados úteis sobre a dosagem e seus efeitos adversos, o que tem contribuído para determinar sua toxicidade após o uso prolongado (DOAN *et al.*, 2022; MOREIRA *et al.*, 2019).

Estudos com extratos orgânicos e aquosos de *Eugenia* spp. e *Myrcia* spp. (Myrtaceae) demonstraram inibir as enzimas α -glucosidase e α -amilase, e possuem atividades antioxidante e antiglicante, *in vitro* (ARAUJO *et al.*, 2021; FIGUEIREDO-GONZÁLEZ *et al.* 2016; RAMOS *et al.* 2019; YOSHIKAWA *et al.*, 1998). Além disso, foram capazes de diminuir o nível de glicose sanguínea em animais diabéticos

induzidos por estreptozotocina e aloxana (ARAUJO *et al.*, 2021; YOSHIKAWA *et al.*, 1998). Os constituintes presentes nesses extratos, tais como flavonoides, procianidinas e elagitaninos, são responsáveis por essas atividades farmacológicas e podem prevenir a superprodução de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS) durante a hiperglicemia, evitando complicações crônicas a longo prazo (HOSSAIN *et al.*, 2020; ULLAH *et al.*, 2016).

Nesse contexto, um grupo de espécies de Myrtaceae denominadas popularmente de “pedra-ume-caá” são utilizadas tradicionalmente para o tratamento do diabetes. Nesse grupo estão incluídas as espécies vegetais, *Myrcia multiflora* (Lam.) DC., *Myrcia guianensis* (Aubl.) DC., *M. salicifolia* DC., *M. sylvatica* (G. Mey) DC., *M. speciosa* (Amsh.) Mc Vaugh, *M. amazonica* DC., *M. citrifolia* (Aubl.) Urb., *M. uniflora* DC., *Eugenia punicifolia* (Kunth) DC., *E. uniflora* L. e *E. biflora* (L.) DC. (CASCAES *et al.*, 2015; DA SILVA *et al.*, 2015 e JORGE *et al.*, 2000). Essas espécies têm sido utilizadas há algum tempo como planta medicinal, principalmente na Amazônia brasileira (Acre, Amazonas, Pará e Tocantins) (CASCAES *et al.*, 2015; SOBRAL *et al.*, 2015a, 2015b). No entanto, a matéria-prima vegetal de pedra-ume-caá tem sido comercializada em feiras e ervanarias brasileiras sem nenhum controle de procedência ou de princípios ativos/marcadores. Assim, abordagens científicas visando a determinação de um método analítico para a descrição química, determinação do teor de marcadores químicos (princípios ativos) e discriminação de amostras são imprescindíveis para garantir a eficácia, a segurança e autenticação desses produtos (DUTRA *et al.*, 2020; RIVERA-PÉREZ *et al.*, 2022).

Nesse sentido, o presente estudo visou a caracterização química qualitativa e quantitativa de constituintes dos extratos secos das folhas de espécies de pedra-ume-caá. Além disso, a análise qualitativa visando a autenticação de amostras comerciais de pedra-ume-cá foi realizada, bem como a avaliação da atividade antidiabética dos extratos das espécies nativas em modelos *in vitro* e *in vivo*.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Diabetes mellitus

O termo diabetes mellitus (DM) se refere a um grupo de doenças metabólicas caracterizada pela hiperglicemia prolongada e com ausência de tratamento. É encontrado na população de todos os países, independente da renda per capita. Há uma estimativa que se não houver intervenções para o aumento crescente da doença, haverá pelo menos 629 milhões de pessoas vivendo com o diabetes até 2045 (WHO, 2019).

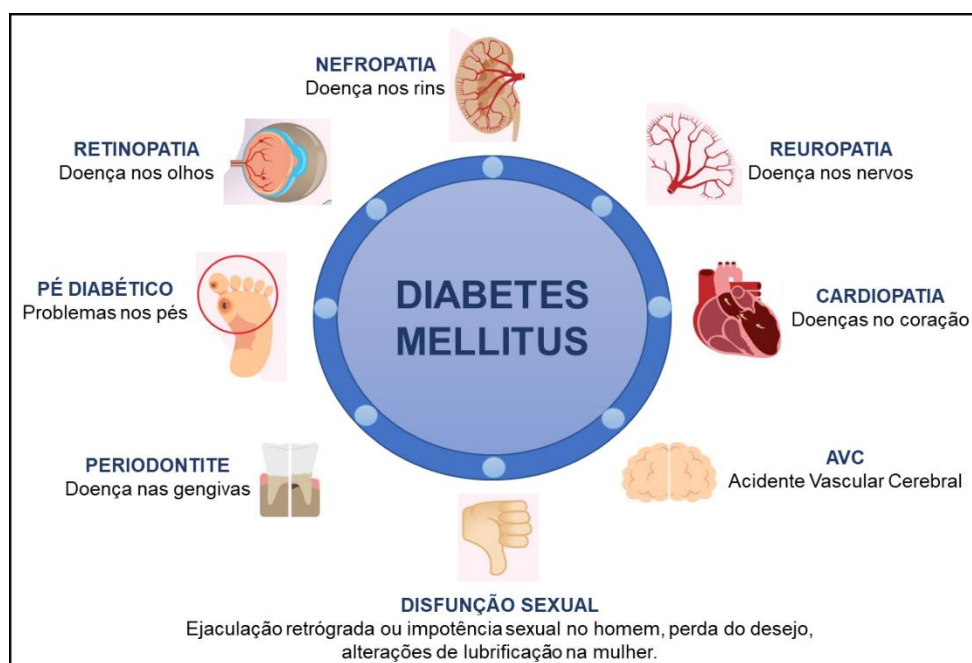
Atualmente, existem quatro categorias gerais para os tipos de DM, as quais são importantes para determinação da terapia. Entretanto, o DM tipo 2 é o mais comum e resulta da perda progressiva da secreção adequada de insulina das células- β pancreáticas, com ou sem resistência à insulina. Esse tipo da doença é responsável por cerca de 90 a 95% de todos os pacientes diabéticos (ADA, 2021; WHO, 2019). O diagnóstico de DM e sua categoria é baseado na identificação e quantificação de biomarcadores, como hemoglobina glicada e glicose no sangue e na urina. Como também, parâmetros de glicose plasmática em jejum, tolerância oral a glicose e glicose plasmática pós-prandial, dentre outros (RAMACHANDRA BHAT *et al.*, 2019).

Pessoas portadoras do DM necessitam de cuidados médicos contínuos que tornam o seu tratamento oneroso tanto para os indivíduos quanto para o Sistema Único de Saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013). A doença tem sido considerada um problema de saúde pública, pois está associada com a perda da qualidade de vida, produtividade e sobrevida dos seus portadores (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2019). O tratamento, além de medicamentoso, inclui estratégias como a reeducação alimentar, atividades físicas regulares e suspensão do fumo (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2019).

A insulina e os inibidores das enzimas α -amilase e α -glucosidase são prescritos para o controle do DM. Pois, a inibição das suas atividades catalíticas levam ao retardo da absorção de glicose e diminuição no nível de glicose sérica pós-prandial (GUNAWAN-PUTERI & KAWABATA, 2010; SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2000). Os agentes hipoglicemiantes como a acarbose, miglitol e voglibose podem causar efeitos colaterais como diarreia, flatulências e inchado abdominal. No entanto, esses medicamentos não impedem o desenvolvimento das complicações diabéticas (SHORI, 2015). Durante a hiperglicemia, em órgãos onde as células não

requerem insulina para a captação de glicose, ocorre alta concentração de glicose intracelular, como no sistema nervoso, coração, olhos, rins e pequenos vasos sanguíneos (AHMED, 2005; WHO, 2019). Ainda não está totalmente definido o papel da hiperglicemia nas múltiplas complicações do diabetes (Figura 1). No entanto, várias evidências têm identificado a formação dos produtos finais da glicação avançada (AGEs, do inglês advanced glycation end-products) mediante a um estresse oxidativo, como a principal ligação patogênica entre a hiperglicemia e complicações relacionadas ao diabetes (HO, 2006). A modificação de proteínas por glicação não enzimática, os altos níveis e permanência crônica aumentados de AGEs, no DM, têm sido associados para o desenvolvimento de danos aos órgãos (VLASSARA & STRIKER, 2013).

Figura 1 – Complicações mais frequentes do diabetes mellitus



Adaptado de: <https://wiselife.pt/doencas/doencas-endocrinas-e-metabolicas/diabetesmellitus/complicacoes-da-diabetes-mellitus/>. Acesso em: 09 Mar 2022.

2.2 A Química de glicação

A reação não enzimática da glicose no sangue com as proteínas do corpo (glicação) leva a modificações químicas cumulativas das proteínas glicadas do tecido em todo o organismo. Essas mudanças químicas, chamadas de Reação de Maillard,

são aceleradas durante a hiperglicemia no diabetes gerando os AGEs (REQUENA *et al.*, 1997).

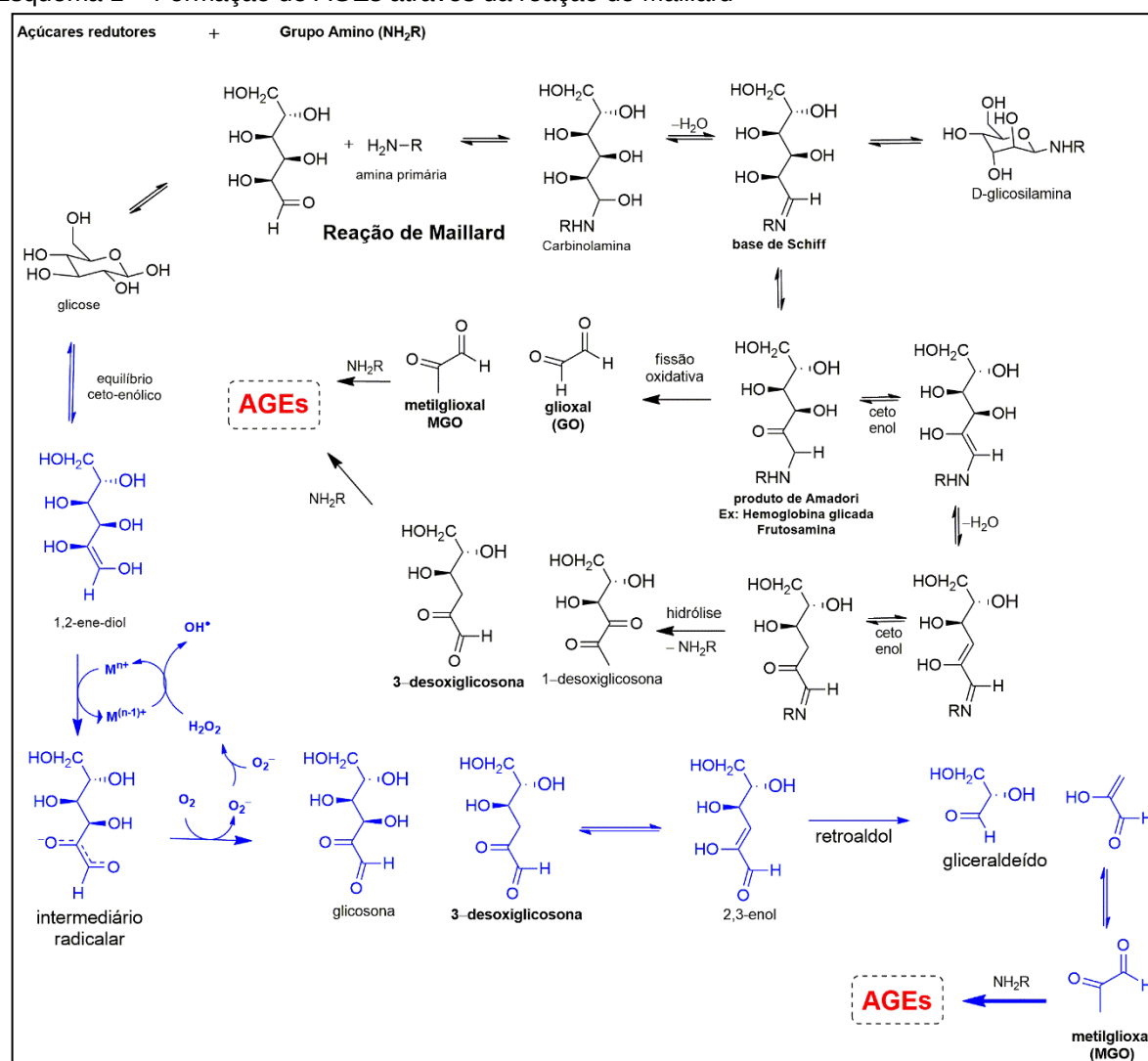
A reação de Maillard foi descrita pela primeira vez para a ciência alimentar, onde seus produtos foram descobertos para conferir mudanças na textura, biodisponibilidade, sabor e preservação dos alimentos (STITT, 2005). Hoje, tem grande relevância *in vivo* devido às suas implicações para a saúde e doença (STITT, 2005). A glicação ou reação de Maillard é dividida em três etapas (Esquema 1).

A primeira etapa é iniciada por uma reação de adição nucleofílica, através da condensação da cadeia lateral de um aminoácido (exemplo, lisina ou arginina) presente em uma proteína, com um grupo carbonila presente em um carboidrato (glicose ou outros açúcares) ou em produtos de oxidação de lipídeos, resultando em uma carbinolamina intermediária. Esta sofre desidratação formando um aduto de imina instável (base de Schiff), uma glicosilamina *N*-substituída (BARBOSA *et al.*, 2016; VAN NGUYEN, 2006). Na segunda etapa, a base de Schiff sofre rearranjo, levando a compostos mais estáveis denominados de produtos de Amadori, cuja característica é a geração da função α -amino-carbonila nos açúcares. São exemplos de produtos de Amadori, a hemoglobina glicada (HbA1c) e as frutosaminas séricas (albumina glicada) (BARBOSA *et al.*, 2008). Até esta etapa é classificada como glicação precoce (RABBANI & THORNALLEY, 2021). Na última etapa, os produtos de Amadori podem sofrer rearranjos irreversíveis. Em condições não oxidativa, estes produtos em várias etapas de reações de desidratação e hidrólise levam a formação de compostos α,β -dicarbonílicos altamente reativos, 1-desoxiglicosona (1DG) e 3-desoxiglicosona (3DG). Estes compostos reagem com o grupo amino de aminoácidos para a formação dos AGEs (TORRES *et al.*, 2018). Além disso, os produtos de Amadori podem sofrer fissão oxidativa (glicoxidação) gerando agentes glicantes importantes, os compostos dicarbonílicos reativos, α -oxoaldeído, particularmente o glicoxal e metilglicoxal (RABBANI & THORNALLEY, 2021). Estes, modificam facilmente resíduos das proteínas lisina e arginina formando AGEs (HO, 2006; VAN NGUYEN, 2006).

Outro processo de glicação de proteínas e formação dos AGEs é acompanhado por um aumento dos radicais livres que contribui para o dano biomolecular no diabetes (AHMED, 2005). A oxidação radicalar catalisada por metais na forma enólica da glicose, forma um intermediário (Esquema 1 – em azul). Este

reage com o oxigênio formando compostos dicarbonílicos, glicosona ou a 3-desoxiglicosona. A forma enólica da 3-desoxiglicosona por reação de retroaldolização forma gliceraldeído e um ceto-enol, que está em equilíbrio com o metilglioxal. Na reação, o catalisador metálico é regenerado ao reagir com peróxido de hidrogênio, o qual é formado na reação entre duas moléculas de ânion radical superóxido, processo que pode resultar em radicais hidroxila (reação de Fenton) (AHMED, 2005; TORRES *et al.*, 2018).

Esquema 1 – Formação de AGEs através da reação de Maillard



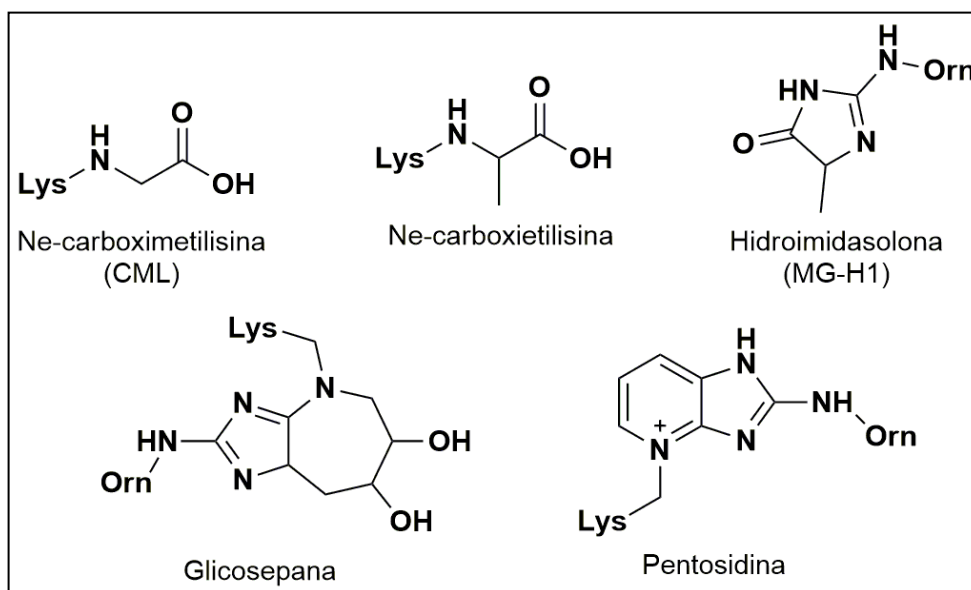
Fonte: TORRES *et al.*, 2018.

O glioxal (GO) e o metilglioxal (MGO) são os compostos principais dicarbonílicos detectados em humanos (HO, 2006). Pacientes diabéticos apresentam altos níveis de GO e MGO em comparação com não diabéticos (TAN *et al.*, 2008).

Atualmente, poucos AGEs foram estudados e identificados, sendo os mais comuns derivados do GO, MGO e 3-desoxiglicosona (TORRES *et al.*, 2018). A Figura 2 apresenta alguns exemplos de AGEs já identificados.

O GO está envolvido na formação de Ne-carboximetilisina (CML), o qual é o mais abundante AGE envolvido na fisiopatologia do diabetes e outras doenças (ROCK *et al.*, 2021). Níveis séricos de CML já foram detectados em pacientes com DM tipo 1 no estágio inicial de retinopatia diabética e em pacientes com DM tipo 2 com microalbuminúrica (MIURA *et al.*, 2003; WAUTIER *et al.*, 2003). Já os AGEs hidroimidazolona derivado do metilglioxal (MG-H1), CML e glicosepana contribuem para a doença renal crônica (RABBANI & THORNALLEY, 2018).

Figura 2 – Estruturas de alguns AGEs



Fonte: Barbosa *et al.*, 2016. Lys: lisina. Orn: Ornitina.

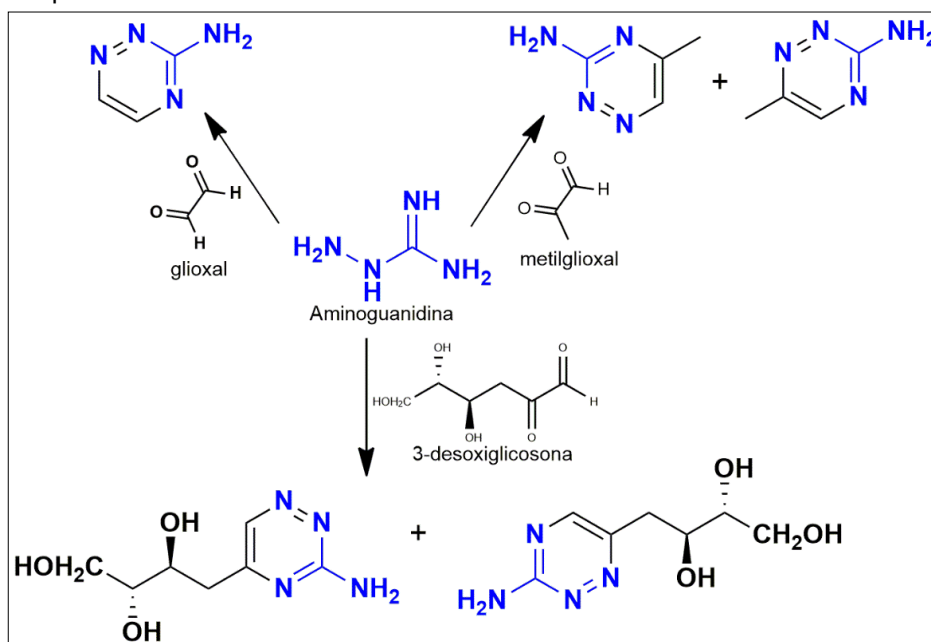
O metilglioxal tem emergido como um novo biomarcador de DM, pois além da glicação de proteínas tem sido relacionado a ser o responsável por causar a resistência insulínica, disfunção das células β e obesidade (RAMACHANDRA BHAT *et al.*, 2019). PI e colaboradores (2007) relatam que as células β pancreáticas expostas a estressores oxidativos, como o metilglioxal, promove a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e levou a diminuição da secreção de insulina.

Em condições patológicas, ocorre a produção excessiva de ROS que ultrapassa a defesa antioxidante. O estresse oxidativo pode modificar irreversivelmente macromoléculas biológicas, o DNA, além das proteínas,

carboidratos e lipídeos (REIS *et al.*, 2008). O organismo possui mecanismos de proteção contra glicação e os AGEs, como aminas plasmáticas, macrófagos e antioxidantes que protegem contra os radicais livres derivados da glicação. No entanto, a eficiência dessas defesas naturais ainda não são totalmente esclarecidas (BHATTACHERJEE & DATTA, 2015).

A literatura tem reportado metodologias de combate a formação dos AGEs analisando a capacidade de agentes sintéticos e naturais em atuarem como antioxidante e capturadores dos compostos dicarbonílicos. A aminoguanidina (também chamado de pimagedina) é um composto hidrazina nucleofílico que impede a formação de AGEs a partir dos precursores α , β -dicarbonilas, como GO, formando triazinas (Esquema 2) (THORNALLEY, 2003). BROWNLEE e colaboradores (1986) já relataram a prevenção na formação de AGEs por aminoguanidina na parede arterial de ratos. Além da atividade antioxidante, já demonstrou inibir o estresse oxidativo pulmonar, prevenir o desenvolvimento da retinopatia e nefropatia diabética (DI NASO *et al.*, 2010; IHM *et al.*, 1999; THORNALLEY, 2003). No entanto, o composto apresentou efeitos colaterais quando administrado em pacientes diabéticos, como distúrbios gastrointestinais, anormalidades nos testes de função hepática e sintomas semelhantes aos da gripe e vasculite (THORNALLEY, 2003).

Esquema 2 – Formação de triazinas a partir da reação da aminoguanidina com compostos dicarbonílicos



Fonte: TORRES *et al.*, 2018.

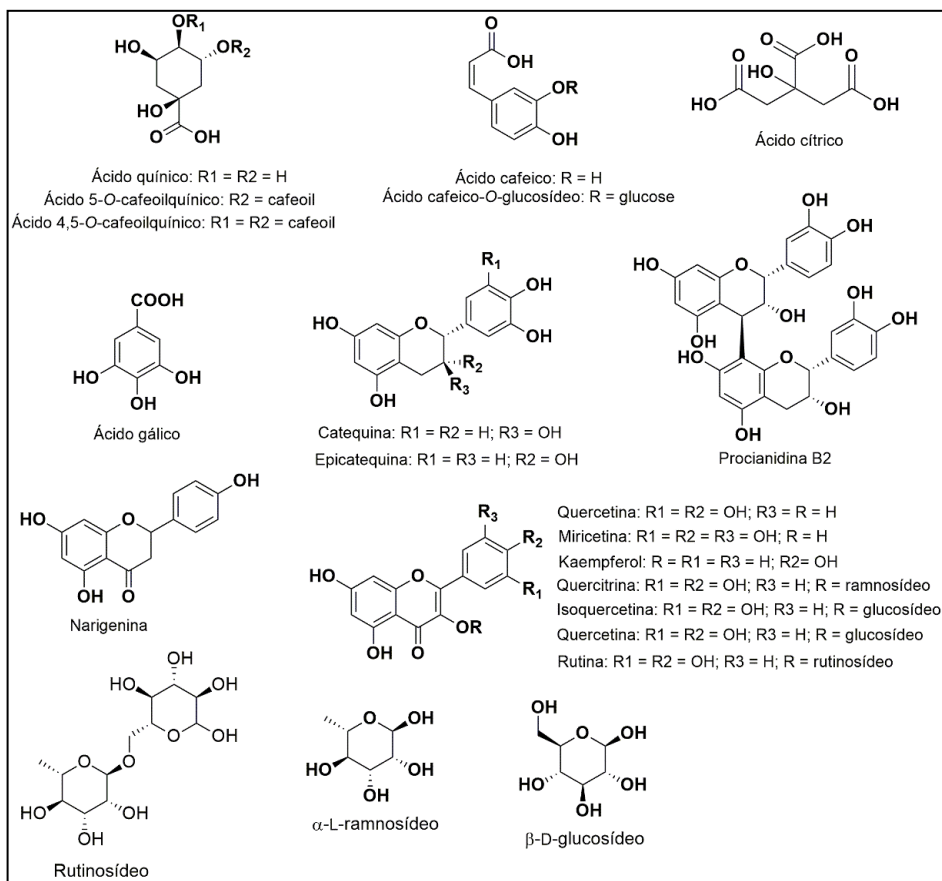
Os medicamentos fitoterápicos devido à ausência ou efeitos colaterais minimizados se tornaram populares (ARAUJO *et al.*, 2021). Inúmeros estudos têm sido desenvolvidos para a descoberta de extratos vegetais e compostos naturais derivados de plantas que sejam eficazes, seguros e não tóxicos. Extratos naturais e compostos purificados com propriedades antioxidantes têm sido considerados agentes promissores contra a formação de AGEs, *in vitro* (PENG *et al.*, 2008).

2.3 Produtos naturais bioativos para o tratamento do diabetes

No Brasil, o uso de plantas medicinais e fitoterápicos, muitas vezes, tem sido a única fonte alternativa de tratamento do DM, devido aos menores custos em relação aos medicamentos convencionais, principalmente por populações mais pobres (PEDRETE *et al.*, 2019). As plantas medicinais são fontes de metabólitos secundários com bioatividades benéficas para a saúde que são resultantes de compostos fitoquímicos (ARAUJO *et al.*, 2021; BASTOS *et al.*, 2019).

A atividade de inibição de AGEs e a capacidade antioxidante de 62 flavonoides foram demonstradas (MATSUDA *et al.*, 2003). Dentre esses constituintes, as flavan-3-ol catequina e epicatequina, os flavonóis miricetina, quercetina, kaempferol, isoquercetina e rutina apresentaram resultados mais promissores (Figura 3). Além disso, esses flavonoides já apresentaram atividade de inibição frente a enzima aldose redutase (MATSUDA *et al.*, 2002). Também, foi observado que a catequina, epicatequina e o tanino condensado procianidina B2 são agentes naturais antiglicantes mediante a captura da espécie reativa MGO em comparação com a aminoguanidina (PENG *et al.*, 2008). O flavonol quercetina já apresentou eficiência na inibição de glicação do DNA (SENGUPTA *et al.*, 2006) mediante a captura direta dos compostos reativos GO e MGO no sistema de albumina sérica bovina (BSA/GO e BSA/MGO) (LI *et al.*, 2014). Além disso, reduziu a hiperglicemia e o estresse oxidativo pela atenuação da toxicidade induzida por radicais livres em animais com DM tipo 2 (ALAM *et al.*, 2014).

Figura 3 – Estruturas de constituintes presentes em extratos vegetais com atividade de inibição enzimática, antiglicante e antioxidante



Estudos científicos têm demonstrado que espécies vegetais, da família Myrtaceae, contêm constituintes terapêuticos que podem ser eficazes para o tratamento do diabetes. Como exemplo, o trabalho desenvolvido com os extratos naturais obtidos de *Eugenia dysenterica* DC. (cagaita) demonstrou resultados promissores contra a enzima α -glucosidase, bem como atividades antioxidante e antiglicante. A análise por HPLC-ESI-MS mostrou a presença de constituintes como os ácidos cítrico e gálico, quercitrina e quercetina-glucosídeo, dentre outros polifenóis (JUSTINO *et al.*, 2020). Também, já foi demonstrado que o extrato hidroalcolólico das folhas de *E. florida* DC. (pitanga preta) apresentou capacidade antioxidante, diminuiu os níveis séricos de glicose, frutossamina, triglicerídeos, colesterol e melhorou lesões hepáticas e renais de camundongos diabéticos. Os constituintes químicos presentes nesse extrato são os ácidos quínico, gálico, cafeico-glucosídeo, clorogênico, digaloilquínico e os flavonoides naringenina, kaempferol, catequina, quercetina-O-

arabinosídeo, quercitrina e miricetina-*O*-glucosídeo (BASTOS et al., 2019). A melhora no perfil glicêmico dos animais diabéticos tratados com esse extrato foi relacionada a sua composição química enriquecida por polifenóis (BASTOS et al., 2019).

O Quadro 1 apresenta resultados demonstrando a potencialidade antidiabética de extratos de espécies de *Eugenia* spp. e *Myrcia* spp. em estudos *in vitro* e *in vivo* e os respectivos constituintes químicos identificados.

Quadro 1 – Constituintes químicos e atividades comprovadas em espécies vegetais dos gêneros *Eugenia* e *Myrcia*

(Quadro 1)

Espécies (nome popular)	Amostra (parte utilizada)	Constituintes químicos	Atividades	Referências
<i>E. dysenterica</i> DC. (cagaita)	Suco (fruto)	Ácido siríngico, Derivado de quercetina, Derivado de kaempferol, Ácido elágico.	Inibição das enzimas α -glucosidase e α -amilase. Redução da glicemia pós- prandial.	(BALISTEIRO et al., 2017)
<i>E. dysenterica</i> DC. (cagaita)	Extrato seco preparado com goma arábica e extrato liofilizado (fruto)	Quercetina e derivados, Procianidinas.	Alto teor de fenóis totais. Capacidade antioxidante. Inibição da enzima α -amilase.	(DAZA et al., 2017)
<i>E. jambolana</i> Lam. (ameixa preta)	Extrato acetato de etila (fruto)	Ácido oleanólico, ácido maslínico, ácido ursólico, ácido arjunólico, 2- <i>O</i> -cis- <i>p</i> -coumaroil ácido maslínico e seu isômero.	Redução do teor de glicose no sangue de camundongos após sobrecarga de sacarose.	(LI et al., 2017)
	Extrato aquoso e frações (polpa do fruto)	–	Redução da glicose e aumento dos níveis de insulina em coelhos diabéticos.	(SHARMA et al., 2006)
<i>E. brasiliensis</i> Lam. (grumixama)	Extrato hidroetanólico (fruto)	Catequina/epicatequina, ácido elágico pentosídeo, quercetina-hexosídeo, cinanidina-3-arabinosídeo, cianidina-3-galactosídeo, malvidina-3-glucosídeo.	Atividade anti- inflamatória e antibiofilme. Não apresentou toxicidade em macrófagos.	(LAZARINI et al., 2018)
<i>E. stipitata</i> McVaugh (araçá-boi)	Extrato seco (fruto e semente)	Ácidos málico, quínico, gálico, glucogálico. galocatequina, apigenina-hexosídeo, catequina-hexosídeo, kaempferol-hexosídeo.	Capacidade antioxidante. Alto teor de fenóis totais nas sementes.	(DE ARAÚJO et al., 2021)

(Quadro 1)

Espécies (nome popular)	Amostra (parte utilizada)	Constituintes químicos	Atividades	Referências
	Bebida alcoólica (fruto)	Carboidratos, ácido málico, ácido succínico, tirosol, ácido gálico.	Alto teor de fenóis totais, Capacidade antioxidante.	(SOUZA <i>et al.</i> , 2020)
<i>E. floccose</i> Bedd. (pitanga preta)	Extrato etanólico (folhas)	Alcaloide, flavonoides, taninos, esteroide.	Redução de glicose no sangue, nos parâmetros lipídicos, aumento de enzimas antioxidantes e insulina plasmática.	(KALA <i>et al.</i> , 2012)
<i>E. uniflora</i> L. (pitanga- vermelha)	Extrato aquoso (folhas)	(+) (3 α , 4 α , 5 α)-1- metilpiperidina-3,4,5-triol, uniflorina A e B.	Inibição da enzima α -amilase, redução do teor de glicose no ensaio de tolerância de sacarose em camundongos.	(MATSUMURA <i>et al.</i> , 2000)
	Extrato etanólico (folhas)	—	Alto teor de fenóis totais, atividade antioxidante e inibição da enzima α -glucosidase.	(VINHOLES & VIZZOTTO, 2017)
	Extrato aquoso (folhas)	Ácidos gálico e elágico, rutina.	Redução do estresse oxidativo, potencial hipoglicemiante em animais diabéticos DM1.	(SCHUMACHER <i>et al.</i> , 2015)
<i>E. uniflora</i> L. (pitanga- vermelha)	Extrato etanólico (folhas)	Ácidos gálico, clorogênico, cafeico e elágico, cianidina, delfinidina-3-O-glicosídeo, rutina, quercitrina, Isoquercitrina, kaempferol, luteolina.	Não apresentou toxicidade e genotoxicidade em leucócitos humanos em concentrações altas. Capacidade antioxidante contra a peroxidação lipídica induzida por Fe ²⁺ em homogenatos de cérebro e fígado de ratos.	(DA CUNHA <i>et al.</i> , 2016)
<i>Myrcia palustris</i> DC.	Extrato acetato de etila (folhas)	Casuarinina, miricetina, quercetina, miricetina-3-O- β -D-(6"-galoi)- galactopiranosídeo, kaempferol-3-O- β -D- galactopiranosídeo.	Inibidores da enzima α - glucosidase	(WUBSHET <i>et al.</i> , 2015)

(Quadro 1)

Espécies (nome popular)	Amostra (parte utilizada)	Constituintes químicos	Atividades	Referências
<i>Myrcia bella</i> Cambess. (mercurinho)	Extrato hidroetanólico (folhas)	Ácidos fenólicos, flavonoides-O-glicosídeos e acilados.	Potencial hipolipemiante e hipoglicemiante em animais diabéticos.	(VAREDA <i>et al.</i> , 2014)
<i>Myrcia rubella</i> Cambess (pitanga-miúda)	Extrato metanólico (folhas)	Ácido 4,5-dicafeoilquínico, Isoquercetina, quercetina-3-O-β-D- glucoronídeo, kaempferol-3-O-(6"-galoil)-β-D- glucopiranosídeo, quercetina-3-O-(6"-malonil)- glucopiranosídeo, quercetina-3-O-(6"-O-E-p- feruloil)-β-D-glucopiranosídeo, quercetina-3-(2-E-sinapoil)- glucopiranosídeo.	Inibidores da enzima α- glucosidase	(LIMA <i>et al.</i> , 2018)

Myrtaceae inclui espécies dos gêneros *Myrcia* e *Eugenia* que são conhecidas popularmente como pedra-ume-caá que possuem ação hipoglicemiante, antioxidante e antiglicante já comprovadas (MALHEIROS *et al.*, 2010; RAMOS *et al.*, 2019; YOSHIKAWA *et al.*, 1998).

2.4 Grupo de espécies de pedra-ume-caá

Um grupo de espécies vegetais de *Eugenia* e *Myrcia* são conhecidas popularmente como “pedra-ume-caá”, crescem em toda região Amazônica e em outras partes do Brasil (SOBRAL *et al.*, 2015a, 2015b). Este grupo é constituído pelas espécies vegetais, *Myrcia speciosa* (Amsh.) McVaugh, *M. amazonica* DC., *M. citrifolia* (Aubl.) Urb., *M. guianensis* (Aubl.) DC., *M. multiflora* (Lam.) DC. (sinonímia: *M. sphaerocarpa* DC.), *M. salicifolia* DC., *M. sylvatica* (G. Mey) DC., além de *Eugenia puniceifolia* (Kunth) DC. e *E. biflora* (L.) DC. (CASCAES *et al.*, 2015; DA SILVA *et al.*, 2015). A Figura 4 apresenta as espécies utilizadas neste trabalho.

Figura 4 – Espécies vegetais de pedra-ume-caá



Fonte: Colaborador da pesquisa, Prof. Dr. Alessandro Silva do Rosário (UFRA).

Tradicionalmente, as folhas ou infusões inteiras dessas plantas são utilizadas para o controle do diabetes, diarreia, hemorragia, febre, reumatismo, colesterol alto, leucemia, herpes e úlcera bucal (CASCAES *et al.*, 2015; CRUZ & KAPLAN, 2006).

2.4.1 Composição química e propriedades biológicas de espécies de pedra-ume-caá do gênero *Myrcia*.

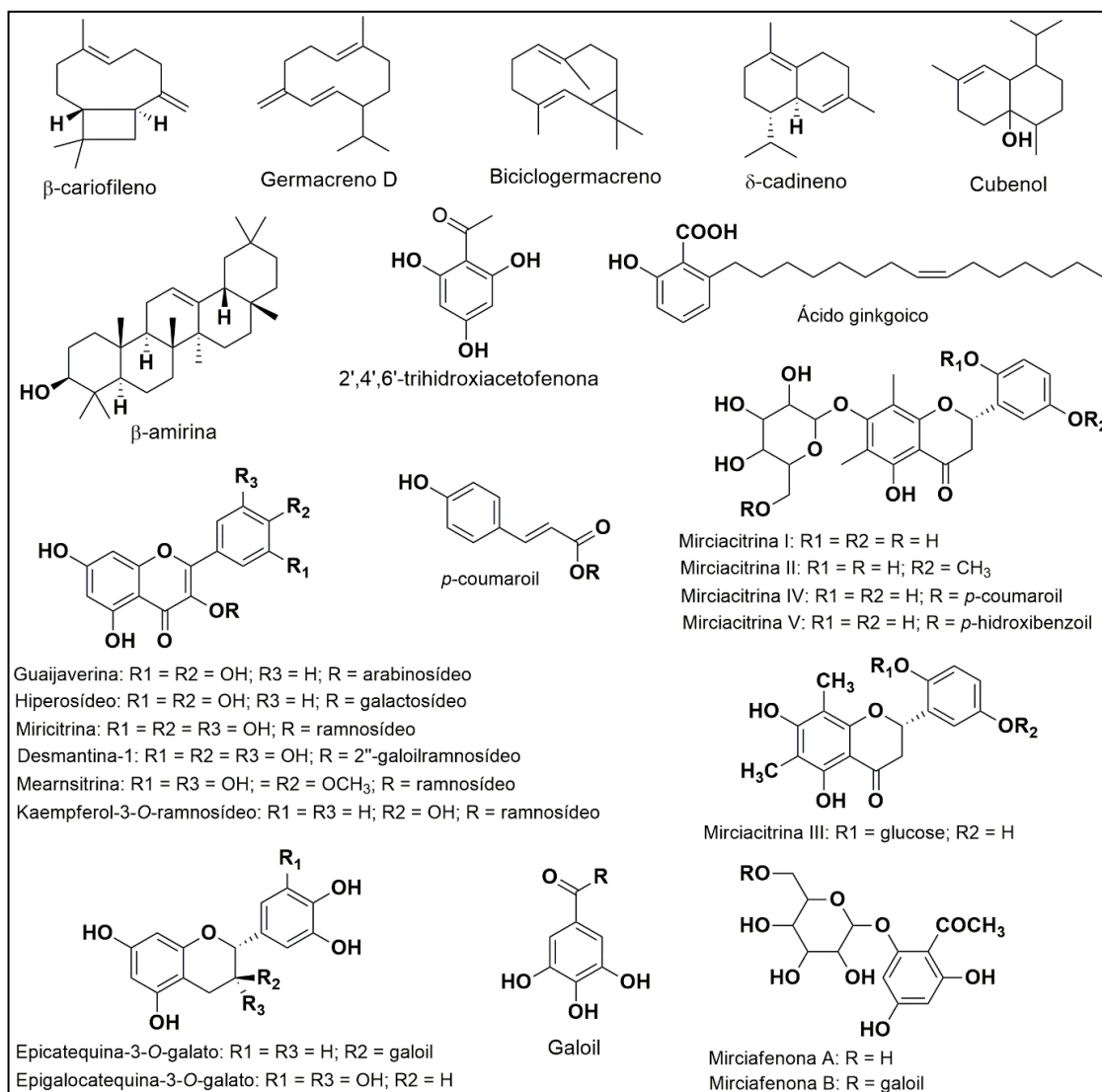
Myrcia é um gênero com importância econômica, o qual possui espécies produtoras de óleos essenciais e algumas são usadas na medicina popular (CASCAES *et al.*, 2015; PEREIRA *et al.*, 2010). Em todo o Brasil, é comercializada a planta medicinal “pedra-ume-caá” constando, em alguns rótulos de embalagens, o nome científico *Myrcia sphaerocarpa* DC, o qual é sinônimo de *M. multiflora* DC.

O primeiro estudo com as folhas de *M. multiflora* foi a identificação dos constituintes químicos do óleo essencial, o qual possui sesquiterpenos como

compostos majoritários, β -cariofileno, germacreno D, biciclogermacreno, δ -cadineno e cubenol (HENRIQUES *et al.*, 1997). Esta espécie vegetal ganhou destaque a partir do trabalho desenvolvido por Yoshikawa e colaboradores (1998). Os pesquisadores obtiveram o material vegetal (folhas) da empresa Albano Ferreira Martins LTDA (São Paulo, SP). Através do fracionamento bioguiado do extrato acetato de etila foram isolados os compostos, β -amirina, os ácidos ginkgólico e gálico, e os flavonoides catequina, miricitrina, mearnsitrina, quercitrina, guaijaverina e desmantina-1. Além de duas novas flavonas glicosiladas mirciacitrina I e mirciacitrina II e acetofenonas glicosiladas mirciafenona A e B. As frações acetato de etila e aquosa, bem como os compostos fenólicos isolados demonstraram atividade de inibição frente as enzimas aldose redutase e α -glucosidase. Essas frações também inibiram o aumento de glicose após o tratamento em dose única (1000 mg/kg de pc) em ratos Wistar diabéticos (YOSHIKAWA *et al.*, 1998). O mesmo grupo de pesquisa, em 2002, isolou três novas flavonas glicosiladas mirciacitrina III, IV e V, as quais apresentaram atividade de inibição contra a enzima aldose redutase (MATSUDA *et al.*, 2002).

Outro estudo foi desenvolvido com as folhas de *M. multiflora* adquiridas da mesma empresa citada no parágrafo anterior. Através do fracionamento do extrato foi obtida a acetofenona 4,6-dihidroxi-2-O-(β -D-glicopiranosil), que após sofrer hidrólise obteve-se o composto 2',4',6'-trihidroxiacetofenona. Esse constituinte apresentou efeito antiobesidade e hipolipemiante *in vivo*, podendo futuramente ser utilizado como um coadjuvante no tratamento da obesidade (FERREIRA *et al.*, 2011). As estruturas dos constituintes detectados em *M. multiflora* constam na Figura 5.

Figura 5 – Estruturas dos constituintes identificados em *Myrcia multiflora*



De Oliveira e Pereira (2015) adquiriram de drogarias e lojas especializadas em fitoterapia, cinco amostras comerciais com a descrição “insulina vegetal” (*M. sphaerocarpa* DC). Extratos das folhas foram obtidos pelos métodos de infusão, decocção, maceração e tisana. O estudo demonstrou que o extrato obtido pelo método de decocção foi o mais ativo em inibir a enzima α -amilase, e todos os extratos tiveram suas atividades de inibição diminuída após a exposição ao suco gástrico.

Extratos secos das folhas das espécies vegetais *M. multiflora*, *M. speciosa* e *M. salicifolia* adquiridas de Moraes e Costa & CA. Lda (Porto, Portugal), foram testados frente as enzimas α -amilase e α -glucosidase. Os compostos fenólicos, ácido gálico, catequina, miricitrina, quercitrina, miricetina, epicatequina, epicatequina-3-O-galato, epigallocatequina-3-O-galato, quercetina, quercetina-3-O-glucosídeo,

hiperosídeo, isoramnetina-3-O-glucosídeo e isoramnetina-3-O-rutinosídeo foram identificados e quantificados por HPLC-DAD. Os flavonoides miricitrina, quercitrina e o ácido gálico são os constituintes majoritários. Além disso, todos os extratos apresentaram atividade de inibição significativa contra as enzimas digestivas (FIGUEIREDO-GONZÁLEZ *et al.*, 2016).

Outro estudo realizado com o extrato seco hidroetanólico das folhas da espécie *M. speciosa* demonstrou que a dose administrada (500 mg/kg de pc) reduziu o nível de glicose no sangue no teste de tolerância oral a glicose em camundongos com DM tipo 2 (MIURA *et al.*, 2006).

Os efeitos da infusão das folhas da espécie *M. guianensis* foram investigados em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina. O chá (1,3% m/v) foi administrado durante 15 dias. Os resultados demonstraram que a espécie apresenta potencial hipoglicemiante, hipotrigliceridemiante, além de causar baixa toxicidade hepática (MALHEIROS *et al.*, 2010). Ademais, o extrato acetato de etila das folhas da espécie apresentou alta atividade inibitória da enzima α -glucosidase (LIMA *et al.*, 2018). Os compostos ácidos gálico e protocatecuico já foram isolados das folhas de *M. guianensis* (SOUZA FILHO *et al.*, 2006). Além disso, já foi demonstrado que a fração aquosa das folhas da espécie, rica em taninos, tem potencial anti-hemorrágico em lesão provocada por veneno de *Bothrops jararaca* (jararaca-da-mata) (DE SOUZA *et al.*, 2013).

O óleo essencial das folhas da espécie *M. amazonica* apresentou os constituintes majoritários Germacreno D, Germacreno B e 1-Epi-Cubenol. A atividade antioxidante foi determinada pelos métodos ORAC (Capacidade de Absorção do Radical Oxigênio) e pelo método cátion radical ABTS^{•+} [2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico]. O método ORAC foi o mais adequado para determinar a capacidade antioxidante do óleo essencial ($1310,0 \pm 11,0$ μ mol Trolox/g de substância), que apresentou maior atividade do que as substâncias utilizadas como referência, BHT e α -tocoferol ($330,0 \pm 28,0$ e $530,0 \pm 17,0$ μ mol Trolox/g substância) (CALAO, 2014).

O trabalho desenvolvido por da Silva e colaboradores (2015) incluíram *M. sylvatica* dentro do grupo de espécies de *Myrcia* conhecidas como pedra-ume-caá. A espécie é conhecida popularmente como vassourinha ou murta e a infusão das folhas é utilizada no controle de disenteria e doenças estomacais (DA SILVA *et al.*, 2015). O

estudo com o óleo essencial da espécie apresentou a predominância de sesquiterpenos como constituintes majoritários, o 1-epi-cubenol, β -selineno, cadaleno e β -calacoreno. O uso popular de *M. sylvatica* foi comprovado mediante a atividade antimicrobiana do óleo essencial das folhas contra as bactérias Gram-positivas, como *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* e *S. epidermidis* (DA SILVA *et al.*, 2016).

2.4.2 Composição química e atividades biológicas de espécies de pedra-ume-caá do gênero *Eugenia*

O gênero *Eugenia* é um dos maiores gêneros de Myrtaceae contendo cerca de 2000 espécies, sendo 388 identificadas no Brasil, das quais 302 são endêmicas (DE SOUZA, 2015). As espécies do gênero possuem um potencial econômico evidenciado pela exploração comercial de frutos comestíveis, madeira, óleos essenciais e o uso como plantas ornamentais (SARDI *et al.*, 2017).

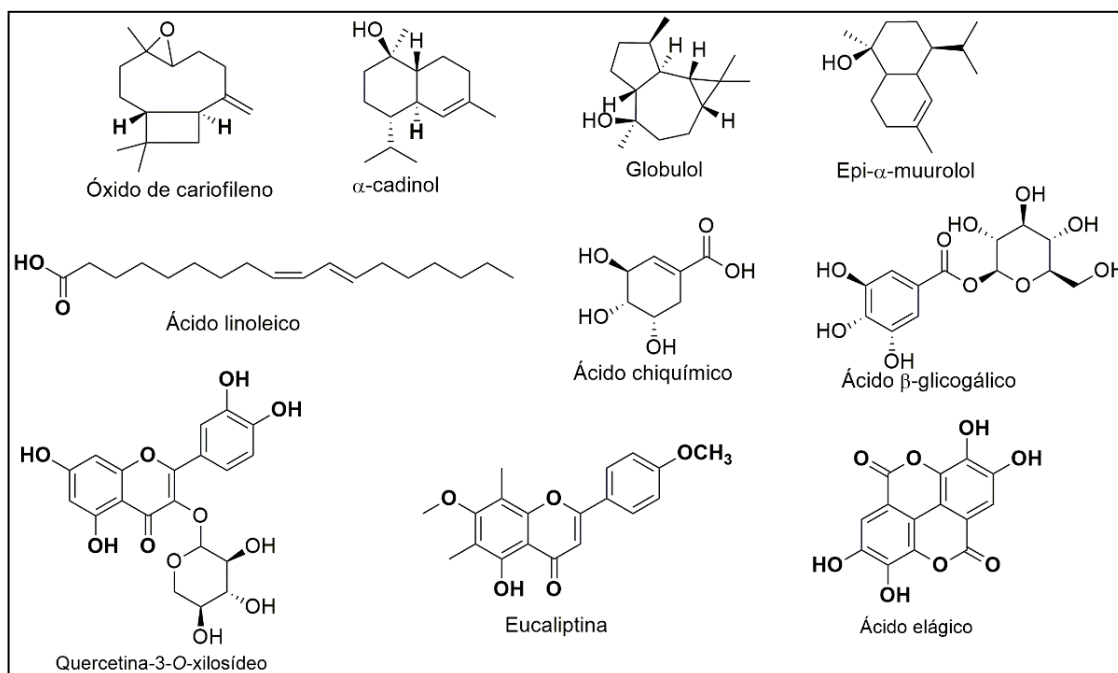
A espécie *E. puniceifolia* (Kunth) DC., conhecida popularmente como pedra-ume-caá, é um arbusto a arvoreta de até 8 metros de altura, com frutos que se assemelham a uma pequena cereja suculenta, com polpa adocicada e com diferentes cores de acordo com o estágio fenológico (DA COSTA *et al.*, 2010; RAMOS *et al.*, 2019). Tradicionalmente a infusão das folhas é utilizada para tratar o diabetes e no combate à febre (BRUNETTI *et al.*, 2006; CHAVES & BARROS, 2012).

O primeiro relato para avaliar o potencial antidiabético de *E. puniceifolia* foi realizado por Brunetti e colaboradores (2006). Animais diabéticos foram tratados por até 29 dias com os extratos aquoso, butanol e metanol das folhas da espécie vegetal nativa. Os autores concluíram que o extrato metanol teve um efeito benéfico reduzindo os sintomas do diabetes sem apresentar toxicidade (BRUNETTI *et al.*, 2006). A conclusão deste trabalho incentivou um estudo piloto não-controlado com 15 pacientes diabéticos, em que foi observada a diminuição da insulina basal, hemoglobina glicada, dentre outros parâmetros (SALES *et al.*, 2014). Os compostos fenólicos identificados no estudo foram o ácido gálico, miricitrina, hiperosídeo, quercitrina, quercetina-3-O-xilosídeo e kaempferol-3-O-ramnosídeo (SALES *et al.*, 2014). Outro estudo demonstrou que o extrato aquoso obtido da infusão das folhas de *E. puniceifolia* é um antioxidante natural e inibidor das enzimas α -glucosidase, α -

amilase e xantina oxidase, e possui o ácido gálico como principal constituinte identificado (GALENO *et al.*, 2014). Além disso, o extrato metanólico dos frutos da espécie apresentaram propriedades antiglicante e antioxidante e a polpa verde apresenta alto teor de fenóis totais. Os frutos possuem constituintes como, os ácidos elágico, gálico, linoleico, chiquímico e β -glicogálico, como também os flavonoides glicosilados miricitrina, quercitrina e kaempferol-3-O-ramnosídeo (RAMOS *et al.*, 2019). Também, já foi relatado a cicatrização de úlcera gástrica, o efeito gastroprotetor e anti-inflamatório em animais tratados com o extrato hidroetanólico das folhas da espécie. O perfil químico apresentou principalmente flavonoides glicosilados, galotaninos e procianidinas (BASTING *et al.*, 2014; DOS SANTOS *et al.*, 2020; PÉRICO *et al.*, 2019).

A espécie vegetal *E. biflora* é popularmente conhecida como vassourinha, e comercializada na cidade de Belém (Pará, Brasil). As folhas da espécie é utilizada popularmente em forma de chá para tratar o diabetes, diarreia, aftas, hemorragias, no pós-parto, inflamação intestinal e uterina (DA SILVA *et al.*, 2015; YAZBEK *et al.*, 2016). Um levantamento etnofarmacológico em comunidades caboclas do baixo Amazonas (região situada às margens da Baía de Marajó, PA, Brasil) cita o uso do chá das folhas dessa espécie para banho de asseio para tratar doença venérea (AMOROZO & GÉLY, 1988). Esta espécie foi incluída como pedra-ume-caá e é predominante em ambiente de campina, formando pomares naturais (DA SILVA *et al.*, 2015). Apesar do uso dessa espécie na medicina popular, seus estudos químicos e farmacológicos ainda são escassos. Até o presente momento, a composição química das folhas de *E. biflora* se limita a flavona eucaliptina, ao triterpeno β -amirina (FIGUEIREDO *et al.*, 2019; GOTTLIEB *et al.*, 1972), e 78 constituintes químicos dos óleos essenciais de 4 espécimes nativas da Ilha de Caratateua (Pará, Brasil), as quais apresentaram composições distintas. Em todos os óleos foram identificados sesquiterpenos hidrocarbonetos e oxigenados, com predominância dos constituintes β -cariofileno, óxido de cariofileno, α -cadinol, globulol, epi- α -muurolol (FIGUEIREDO *et al.*, 2019). As estruturas de alguns flavonoides identificados em *E. puniceifolia* estão apresentados Figura 5, p. 37. Assim como na Figura 6 que apresenta as estruturas de alguns constituintes identificados nas espécies *E. puniceifolia* e *E. biflora*.

Figura 6 – Estruturas de alguns constituintes identificados em *E. puniceifolia* e *E. biflora*



2.5 *Fingerprinting* e análise exploratória de dados

Com o uso da medicina alternativa em expansão tem sido cada vez mais importante o desenvolvimento de metodologias analíticas visando o controle de qualidade da matéria-prima vegetal a fim de garantir a sua identidade, segurança e eficácia (ANVISA, 2004a, 2014b). As análises qualitativa e quantitativa de princípios ativos e/ou marcadores, prospecção fitoquímica ou a análise de *fingerprint* são indicadas para o controle de qualidade de drogas vegetais ou produtos derivados de plantas (ANVISA, 2004a, 2014b). A análise de *fingerprint* tem ganhado mais atenção devido à sua capacidade de identificar determinada espécie vegetal e, distingui-la de espécies relacionadas (SOARES & SCARMINIO, 2008). Três diferentes abordagens podem ser realizadas visando essa análise (STILO *et al.*, 2021):

1. O *fingerprinting* pode ser obtido diretamente da amostra, exceto, se aplicável dissolução;
2. O *fingerprinting* é registrado após a uma etapa de fracionamento, tornando-o específico de determinada classe de compostos;
3. O *fingerprinting* é obtido após uma etapa de reação química (por exemplo, derivatização), para que ocorra uma alteração da composição química inicial da amostra e novos compostos sejam produzidos.

Dentre essas metodologias, o conceito de perfil químico pode ser englobado na primeira abordagem. Em um sentido mais amplo, o perfil químico pode ser definido como a identificação e/ou quantificação de inúmeros compostos em uma matriz complexa (HUBERT *et al.*, 2017). Quando necessário, a purificação ou o fracionamento pode reduzir a complexidade amostral (LOUIE *et al.*, 2020). Consequentemente, a desreplicação que se refere a identificação rápida de metabólitos secundários, pode acontecer mais rapidamente e a identificação do(s) constituinte(s) pode ser relatada pela primeira vez em nível de gênero ou espécie (HUBERT *et al.*, 2017).

Atualmente, as análises de *fingerprinting* e perfil químico de produtos naturais são realizadas por técnicas avançadas como a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas (CLAE-EM) e a RMN. Essas técnicas têm sido primordiais para a descoberta de novas drogas terapêuticas através da identificação precisa de constituintes ativos (LOUIE *et al.*, 2020).

A Espectrometria de Massas é uma técnica sensível, rápida, e a identificação dos compostos é estabelecida com base nos padrões de fragmentação, massa exata, composição elementar e por comparação dos espectros de massas dos bancos de dados (HUBERT *et al.*, 2017). A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao Espectrômetro de Massas de Alta Resolução (CLAE-EMAR) tem sido usada para a identificação de inúmeros compostos (SALDANHA *et al.*, 2013). Uma das vantagens da hifenação das técnicas, é a adição de um parâmetro importante ao espectro de massas que é o tempo de retenção de cada analito. Desta maneira, possibilita a identificação de isômeros, os quais terão tempos de retenções específicos para cada um (VAZ *et al.*, 2018). Além disso, na espectrometria de massas em sequência (MSⁿ) que gera íons fragmentos do íon “principal”, pode fornecer muitas informações estruturais de uma substância (SILVERSTEIN *et al.*, 2007). No entanto, nem sempre essas informações são o suficiente para a identificação estrutural completa, tornando a RMN uma ferramenta analítica essencial na elucidação de compostos (PAULI *et al.*, 2005). Além de baixo consumo de solvente na análise, essa técnica permite a obtenção de informações de constituintes químicos em matrizes complexas em um curto período de tempo, sem a necessidade prévia de procedimento de purificação de substância (PINTO *et al.*, 2019; SANTOS & COLNAGO, 2013).

Tanto a análise de perfil químico quanto *fingerprinting* por RMN associada à quimiometria tem demonstrado grande aplicabilidade como método em potencial que está em ascendência. Alves Filho e colaboradores (2018a) descreveram um método não – alvo e confiável para o controle de qualidade de xaropes pediátricos, acoplando a análise quantitativa por RMN de ^1H à quimiometria (ALVES FILHO *et al.*, 2018a). Também, já foi demonstrada a aplicabilidade para a determinação da autenticidade e qualidade de amostras comerciais de plantas medicinais (DUTRA *et al.*, 2020; SANTOS *et al.*, 2012), produtos lácteos (BALTHAZAR *et al.*, 2021), determinação de constituintes químicos responsáveis pela cor indesejada no processamento térmico da água de coco (CUNHA *et al.*, 2020), e pelas mudanças fisiológicas em resposta ao estresse hídrico em espécies de *Phyllanthus* (ALVES FILHO *et al.*, 2018b).

Na análise exploratória de dados (método não supervisionado) e classificação de amostras (método supervisionado) é possível a interpretação dos resultados de uma grande matriz de dados (FERREIRA, 2015). Os métodos não-supervisionados extraem o máximo de informação dos dados, visando verificar a presença de agrupamentos naturais de amostras, reduzir as dimensões dos dados e descobrir objetos anômalos (*outliers*) (BARROS NETO *et al.*, 2006, TIBOLA *et al.*, 2018).

O pré-processamento é a etapa inicial para a análise quimiométrica, pois visa extrair informações com foco na variância que realmente interessa aos objetivos da análise (TIBOLA *et al.*, 2018). Para espectros de RMN de ^1H podem ser utilizados os pré-processamentos: algoritmo para alinhamento de espectros pelo método de *Correlation Optimized Warping* (COW), correção de linha de base usando algoritmo de ajuste linear, normalização, centralização em torno da média, autoescalonamento e escala de Pareto (ALVES FILHO *et al.*, 2018b; DUTRA *et al.*, 2020). A correção da linha de base e o processamento de normalização são aplicados sobre os espectros para reduzir erros analíticos e ruído de espectro (ALVES FILHO *et al.*, 2018b). Já o processamento de centralização em torno da média é aplicado sobre as variáveis (sinal de um composto) para fornecer melhores diferenças entre as amostras (ALVES FILHO *et al.*, 2018b). Nesse processamento é calculado o valor médio de cada coluna da matriz de dados e esse valor é subtraído de cada um dos valores da respectiva coluna (FERREIRA, 2015). A distribuição de cada variável passa a ter média zero,

com isso é ajustado as diferenças no deslocamento entre metabólitos de alta e baixa abundância (espectro médio) (TIBOLA *et al.*, 2018; VAN DEN BERG *et al.*, 2006). Por sua vez, o autoescalamento inclui a “centragem na média”, e em seguida, cada elemento é dividido pelo desvio-padrão da respectiva coluna. Consequentemente, todas as variáveis terão média zero e variância um, o que dará a elas pesos iguais, independentes de suas escalas naturais (DUTRA *et al.*, 2020). Por outro lado, a escala de Pareto é semelhante ao autoescalamento, mas em vez do desvio padrão, é utilizada a raiz quadrada do desvio padrão como o fator de escala (VAN DEN BERG *et al.*, 2006). Assim, os sinais de maior intensidade são diminuídos mais do que os sinais de menor intensidade em relação aos dados centrados na média (DUTRA *et al.*, 2020; VAN DEN BERG *et al.*, 2006).

Os mais importantes métodos exploratórios são a Análise de Componentes Principais (PCA) e Análise de Agrupamentos Hierárquicos (HCA) (BARROS NETO *et al.*, 2006). A PCA reduz a dimensionalidade de um conjunto de dados, preservando o máximo de variabilidade possível (FERREIRA, 2015). Isso significa em encontrar novas variáveis que são funções lineares daquelas no conjunto de dados original, as quais maximizam sucessivamente variância e que não são correlacionadas entre si (ortogonais) (JOLLIFFE & CADIMA, 2016).

No método de PCA, a matriz de dados $\mathbf{X}_{(n,m)}$ (espectros) formada por n linhas (amostras) e m colunas (deslocamento químico) é decomposta por algoritmos matemáticos em um produto de duas matrizes: matriz de escores $\mathbf{T}_{(n,A)}$ e matriz de *loadings* (pesos) $\mathbf{P}_{(m,A)}$ (JOLLIFFE & CADIMA, 2016). O cálculo dessas matrizes pode ser realizado por 3 métodos diferentes: **1)** Decomposição por Valores Singulares (SVD); **2)** Diagonalização da matriz de correlação (ou variância-covariância) e **3)** Algoritmo NIPALS (*Non-linear Iterative Partial Least-Squares*). Considera-se que o método SVD seja a técnica mais precisa e estável para o cálculo das componentes principais (FERREIRA, 2015). A decomposição em valor singular das matrizes de escores e pesos ocorrem simultaneamente de acordo com a equação 1:

$$\mathbf{X} = \mathbf{t}_1 \mathbf{p}_1^T + \mathbf{t}_2 \mathbf{p}_2^T + \dots + \mathbf{t}_A \mathbf{p}_A^T + \mathbf{E} = \mathbf{TP}^T + \mathbf{E} \quad (1)$$

Sendo $\mathbf{t}_1$ e $\mathbf{p}_1$ os vetores de escores e pesos da primeira PC, respectivamente. A é o número de PCs e $\mathbf{E}$ a matriz de resíduos contendo a variância não explicada incluídos no modelo PCA (TIBOLA *et al.*, 2018).

Portanto, a primeira componente principal (PC1) é a combinação linear de máxima variância (isto é, de máxima informação). A segunda componente (PC2) é de máxima variância ortogonal a PC1. A terceira componente é de máxima variância e ortogonal às duas primeiras PCs, e assim por diante. As PCs são sempre modeladas em ordem decrescente de variância explicada e, por vezes, a informação fica concentrada nas 2 ou 3 primeiras PCs (BARROS NETO *et al.*, 2006, TIBOLA *et al.*, 2018).

Por outro lado, a HCA não envolve uma etapa de redução da dimensionalidade dos dados. Esse método é usado para analisar agrupamento de amostras (*clusters*) de maneira hierárquica de acordo com a similaridade entre amostras em forma de dendograma (TIBOLA *et al.*, 2018). Por isso, não informa as variáveis relacionadas à discriminação das amostras (BALTHAZAR *et al.*, 2021).

2.6 Determinação qualitativa e quantitativa de compostos orgânicos por RMN de ^1H

A espectroscopia de RMN é amplamente utilizada para a elucidação estrutural de substâncias orgânicas e sintéticas (WATANABE *et al.*, 2016). A RMN de ^1H detecta os diferentes tipos de hidrogênios em uma molécula através do deslocamento químico (δ) e acoplamento spin - spin (J), como também determina a quantidade de H contido na mesma. Essa informação é obtida pela área sob cada sinal, o qual é proporcional ao número de núcleos que absorvem energia de radiofrequência referente a este sinal (PAVIA *et al.*, 2010). Uma vez que a intensidade integrada é proporcional ao número de hidrogênios, o Comitê Consultivo de Quantidade de Matéria (CCQM), o qual é responsável pela metrologia química em todo o mundo, avaliou a RMN quantitativa de Hidrogênio (RMNq de ^1H) como um método de medição primária. Esse método fornece resultados diretamente rastreáveis ao Sistema Internacional de Unidades (SI) sem precisar de padrões ou materiais de referência intermediários, nem de fatores de correção empíricos (GARRIDO & CARVALHO, 2015; WOLLINGER & GARRIDO, 2019). Para que esta propriedade seja mantida, há requisitos necessários a serem seguidos como o manuseio correto dos equipamentos, calibração adequada e uso de padrões com rastreabilidade ao SI

capazes de serem usados para produzir resultados comparáveis com aqueles obtidos em qualquer ponto do Globo (WOLLINGER & GARRIDO, 2019).

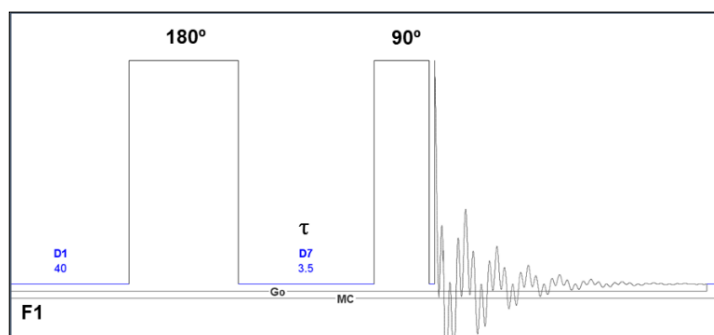
Nesse contexto, para a realização da análise quantitativa é desnecessária a construção de uma curva de calibração, como também o emprego de padrões de referência idênticos aos analitos (SANTOS & COLNAGO, 2013), desde que essa substância contenha o núcleo utilizado na análise, como por exemplo, o ^1H (WOLLINGER & GARRIDO, 2019). Outra vantagem, é que não há a necessidade de utilizar um padrão interno, eliminando a possibilidade de interação entre padrão e amostra (GARRIDO & CARVALHO, 2015). Por isso, a utilização de um padrão externo tem sido mais adequado para a quantificação de substâncias em matrizes complexas (RAMOS *et al.*, 2019; SOUZA *et al.*, 2020). Além disso, a RMN é uma técnica não destrutiva e possibilita a medição em mistura de vários analitos simultaneamente, sem a necessidade prévia de isolamento (HOHMANN *et al.*, 2014; SANTOS & COLNAGO, 2013). Estudos têm demonstrado que a RMNq de ^1H fornece concentrações consistentes e confiáveis quando comparado com o CLAE-DAD em extratos de espécies vegetais (LUND *et al.*, 2020).

Para uma quantificação precisa e reprodutível, primeiramente é importante a identificação da substância utilizando a RMN qualitativa e/ou outras técnicas, por exemplo a Espectrometria de Massas. Posteriormente, confirmar a massa molar (M) e o número de hidrogênio (s) envolvido (s) ao sinal que será integrado. Em seguida, adquirir um espectro com o solvente deuterado que solubilize toda a amostra, a fim de verificar que o referido sinal que será integrado esteja livre de interferentes (HOLZGRABE, 2010; WOLLINGER & GARRIDO, 2019).

A ferramenta ERETIC 2 (Electronic Referencing to Access *In Vivo* Concentrations) é um nome comercial da marca Bruker® para a quantificação por RMNq de ^1H e é baseada no método PULCON (Pulse Length-based CONcentration determination methodology) (TYBURN & COUTANT, 2016). Esse método correlaciona as intensidades absolutas em dois espectros de RMN unidimensionais (1D) pelo princípio da reciprocidade, o qual afirma que a intensidade do sinal de RMN é inversamente proporcional ao comprimento do pulso de 90° (GARRIDO & CARVALHO, 2015; WATANABE *et al.*, 2016). Após a sintonização da sonda e homogeneização do campo magnético com a amostra a ser determinada, o pulso de radiofrequência de 360° é medido. Para resultados quantitativos após o pulso de 90° ,

é necessária a relaxação completa de todos os spins e um tempo de espera (D1) de no mínimo cinco vezes a constante de tempo de relaxação longitudinal (T_1) (CLARIDGE, 2009; COLNAGO & ANDRADE, 2017). Esse tempo de espera corresponde a recuperação da magnetização em 99,33% para que os spins estejam na condição de equilíbrio térmico antes do próximo pulso e a informação quantitativa no espectro seja mantida (CLARIDGE, 2009). A medida de T_1 depende de fatores como concentração da amostra, solvente, temperatura e ambiente químico dos spins nucleares (WOLLINGER & GARRIDO, 2019). A sequência de pulso inversão-recuperação é a mais usada para medir T_1 (Figura 7). Essa sequência consiste em um pulso de 180° , que inverte a magnetização, seguida por um pulso de 90° para medir a intensidade do FID ($180^\circ - \tau - 90^\circ$) (COLNAGO & ANDRADE, 2017). Normalmente, é necessária a supressão de água através de sequências de pulso como WATERGATE, zgpr, dentre outras. Tendo medido a amostra de referência de concentração conhecida, centenas de substâncias podem ser quantificadas (HOLZGRABE, 2010).

Figura 7 – Sequência de pulso de inversão-recuperação



Fonte: a autora.

O quadro 2 apresenta os parâmetros de aquisição que precisam ser otimizados para a análise quantitativa, segundo (HOLZGRABE, 2010; PAULI *et al.*, 2005; WOLLINGER & GARRIDO, 2019).

Quadro 2 – Otimização dos parâmetros de aquisição recomendados para a RMNq de ^1H

(Quadro 2)

Parâmetros	Valor/recomendação	Referência
Janela espectral (SW [ppm])	≥ 20 ppm	WOLLINGER & GARRIDO, 2019.

(Quadro 2)

Parâmetros	Valor/recomendação	Referência
Pontos no Domínio do Tempo (TD)	32 k	HOLZGRABE, 2010.
	64 k	PAULI <i>et al.</i> , 2005.
Rotação do tudo	Sem rotação	WOLLINGER & GARRIDO, 2019.
Shimming (homogeneidade do campo magnético)	largura < 1Hz (na metade da altura do sinal)	
Experimento de supressão de solvente (PULPROG)	Sequências de pulsos zgpr ou zgcprr ou noesypr1d ou WATERGATE ou NOESYGPPR1D	SOUZA <i>et al.</i> , 2020; TAVARES & FERREIRA, 2006; TYBURN & COUTANT, 2016.
Tempo de aquisição (AQ)	$\geq 2,5 - 4$ (s)	HOLZGRABE, 2010; PAULI <i>et al.</i> , 2005; WOLLINGER & GARRIDO, 2019.
Largura do pulso [μ s]	$15^\circ - 45^\circ$	PAULI <i>et al.</i> , 2005.
	30°	HOLZGRABE, 2010.
	90°	WOLLINGER & GARRIDO, 2019.
Centralização do pulso (<i>offset</i>)	Na frequência média dos sinais integrados	HOLZGRABE, 2010; WOLLINGER & GARRIDO, 2019.
Intervalo de relaxação (D1 [s]) (intervalo entre os pulsos)	$5 \times T_1$ (recuperação de 99,33% da magnetização).	CLARIDGE, 2009.
	$10 \times T_1$ (recupera mais de 99,995% da magnetização). (Considerar T_1 mais longo do espectro) T_1 (constante de relaxação longitudinal). Para valores de T_1 utilizar a sequência de pulso de inversão- recuperação.	WOLLINGER & GARRIDO, 2019.
Número de transientes (NS)	Relação S/R mais apropriado	HOLZGRABE, 2010.
	128 – 1024	PAULI <i>et al.</i> , 2005.
	Relação S/R > 1000	WOLLINGER & GARRIDO, 2019.
Função de apodização (LB [Hz])	0,1 – 0,3	HOLZGRABE, 2010; PAULI <i>et al.</i> , 2005.
Faseamento	Manual	PAULI <i>et al.</i> , 2005.

(Quadro 2)

Parâmetros	Valor/recomendação	Referência
Correção de linha de base	Função polinomial (Otimizado manualmente)	PAULI <i>et al.</i> , 2005.
Aquisição do mesmo tubo	>3 (Medidas independentes)	GARRIDO & CARVALHO, 2015.

3 OBJETIVOS

Objetivo Geral

Identificar e quantificar os principais constituintes dos extratos secos das folhas de espécies vegetais conhecidas como pedra-ume-caá e avaliar a atividade antidiabética em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*.

Objetivos Específicos

- Caracterizar os principais compostos presentes nos extratos secos das folhas das espécies vegetais *Myrcia multiflora* (Lam.) DC., *M. amazonica* DC., *M. guianensis* (Aubl.) DC., *M. sylvatica* (G. Mey) DC., *Eugenia punicifolia* (Kunth) DC. e *E. biflora* (L.) DC.;
- Quantificar as substâncias identificadas nesses extratos por RMNq de ^1H ;
- Construir um modelo quimiométrico exploratório a partir dos dados de RMN de ^1H ;
- Verificar com base nos marcadores químicos previamente selecionados se as amostras comerciais adquiridas se assemelham quimicamente às espécies de pedra-ume-caá;
- Determinar a atividade antiglicante e inibitória desses extratos frente as enzimas α -glucosidase, α -amilase e lipase;
- Avaliar a propriedade antioxidante e determinar o teor de fenóis totais;
- Avaliar a citotoxicidade desses extratos;
- Determinar o efeito inibitório da enzima α -glucosidase dos extratos secos das folhas das espécies *E. punicifolia* e *E. biflora* em modelo experimental *in vivo*;
- Estudar o efeito hipoglicemiante dos extratos secos das espécies *M. multiflora* e *E. biflora* em modelo experimental *in vivo*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Reagentes, padrões, solventes e equipamentos

4.1.1 Análises químicas

As análises cromatográficas foram realizadas no cromatógrafo analítico modelo Surveyor Plus®, com detector DAD (Thermo Scientific®, Waltham, MA, EUA) acoplado ao Espectrômetro de massas, modelo LCQ Fleet, com fonte APCI e ESI (Thermo Scientific®). O fracionamento cromatográfico foi realizado no cromatógrafo líquido semipreparativo, com detector UV/VIS (LC-6AD, Shimadzu®). O solvente metanol de alta pureza foi adquirido de Tedia (Fairfield, OH, USA).

Os experimentos de RMN 1D e 2D foram realizados no espectrômetro equipado com sonda multinuclear de observação direta de 5 mm (Bruker® Avance III HD 11,74 T, BBFO Plus SmartProbe™) (New York, NY, USA) a 25,0 °C. Os solventes deuterados metanol, dimetilsulfóxido, tetrametilsilano (TMS) e trimetilsilil-2,2,3,3-*d*₄ propionato de sódio (TMSP-*d*₄, D, 98,0%) foram adquiridos de Cambridge Isotope Laboratories Inc. (CIL, Andover, Massachusetts, USA). As análises por RMN, CLAE-EM e CLAE semipreparativo foram realizadas na Central Analítica da Universidade Federal do Amazonas.

As análises por CLAE-EMAR foram realizadas no CLAE (Shimadzu®, Tokyo, JP) acoplado ao espectrômetro de massas micrOTOF-Q II (Bruker Daltonics®, Fremont, CA, USA) do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná, em colaboração com a profa. Dra. Francinete R. Campos e Dra. Flávia L. D. Pontes.

4.1.2 Ensaios experimentais *in vitro*

Os ensaios experimentais *in vitro* foram realizados na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UFAM sob a coordenação do prof. Dr. Emerson S. Lima. Esses experimentos foram realizados juntamente com o doutorando Leonard D. R. Acho e o ensaio de citotoxicidade e antioxidante celular em célula MRC-5 foi realizado pela MSc. Bárbara Janaína P. da Silva.

Os reagentes, padrões e solventes utilizados foram: quercetina, 4-nitrofenil α -D-glucopiranosídeo, acarbose, orlistate, glioxal, solução salina tamponada com fosfato (PBS), albumina de soro bovina (BSA), aminoguanidina, frutose, pós de acetona intestinal de rato, lipase pancreática, α -amilase isolada de *Aspergillus oryzae*,

resazurin, penicilina-estreptomicina, 2',7'-diclorofluoresceína diacetate, Triton-X, ácido tiobarbitúrio e 1,1,3,3-tetraetoxipropano foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St Louis, MO, EUA). A linhagem celular MRC-5 (cultura de fibroblasto de pulmão humano) foi obtida do Banco de Célula do Rio de Janeiro (RJ, Brasil). Os kits diagnósticos de ureia, ácido úrico, colesterol, triglicerídeos, creatinina, aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) foram adquiridos de Wiener Lab. (Rosario, Argentina). Os equipamentos utilizados foram: leitor de microplacas (DTX 800, Beckman Coulter), analisador automatizado de Química Clínica ChemWell® 2902 (Awareness Technology, Inc., FL, USA) e espectrômetro T70 UV/VIS (PG Instruments Ltd, Lutterworth, GB).

Os ensaios dos extratos para as atividades de sequestro dos radicais DPPH• e ABTS•+ e o ensaio de teor de fenóis totais foram realizadas na Central Analítica da UFAM sob a supervisão da profa. Dra. Jaqueline de A. Bezerra (IFAM). Os reagentes utilizados foram: Folin Ciocalteu, ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico, 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH•), ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico), sal de diamônio (ABTS•+) e carbonato de sódio foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Esses ensaios foram realizados utilizando um leitor de microplaca Elx800 (Biotek Instruments, Winooski, VT, USA).

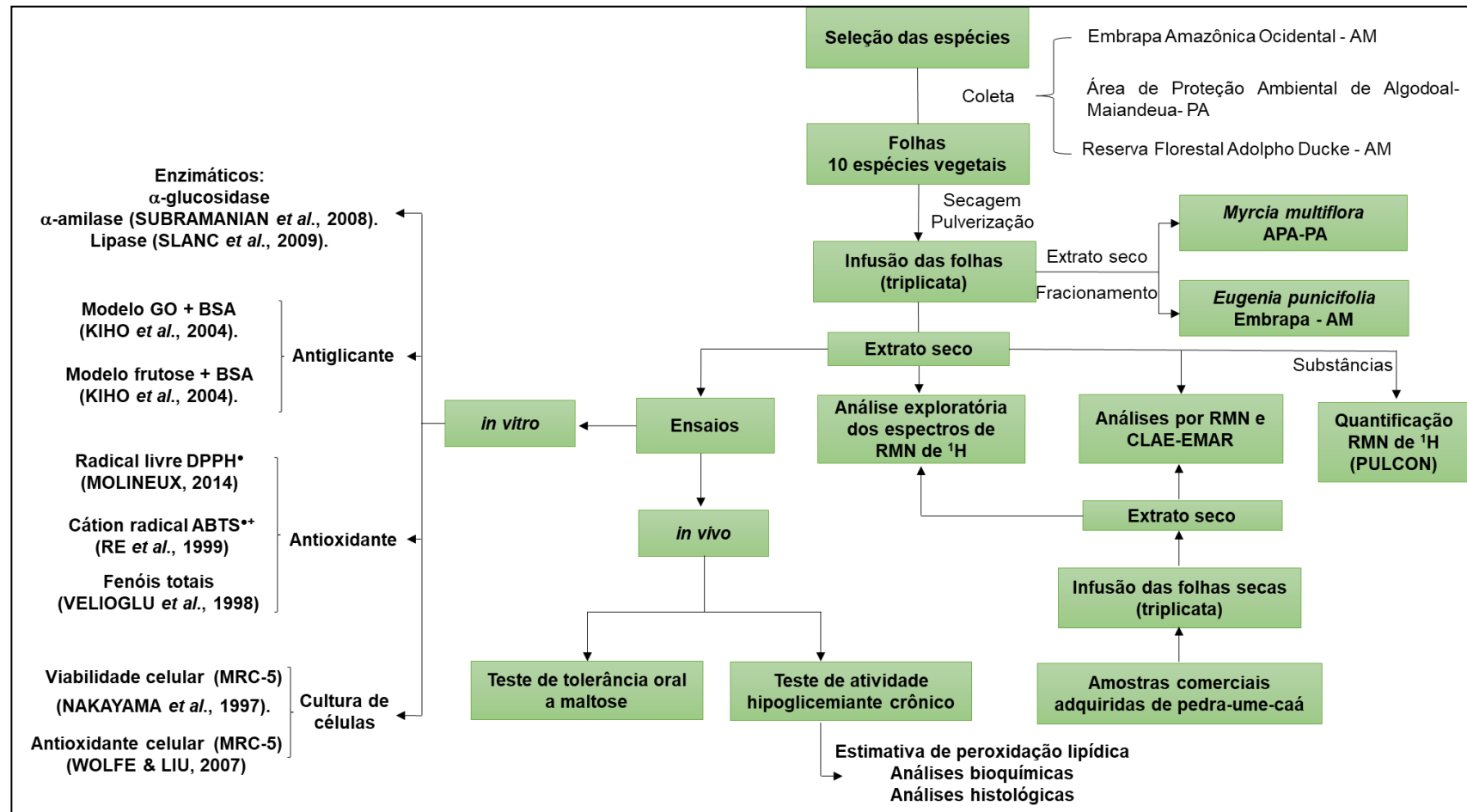
4.1.3 Ensaios experimentais *in vivo*

Os ensaios experimentais *in vivo* foram realizados no laboratório experimental do Biotério Central da UFAM juntamente com o doutorando Leonard D. R. Acho e supervisão do prof. Dr. Emerson S. Lima. Os reagentes utilizados nos experimentos foram: estreptozotocina, nicotinamida, acarbose e maltose adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

4.2 Delineamento experimental

O Esquema 3 representa a metodologia empregada no trabalho de pesquisa.

Esquema 3 – Delineamento experimental das atividades desenvolvidas no estudo com as espécies de pedra-ume-caá e amostras comerciais



4.3 Coleta e identificação do material botânico

A coleta foi registrada junto ao Ministério de Meio Ambiente (MMA), plataforma SisGen (Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado) sob o N°. A65FDED de 17 de outubro de 2018. Além disso, esse projeto foi registrado junto ao Ministério de Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações (MCTI), plataforma SisBio (Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade) sob o N°. 63.975-1 de 29 de junho de 2018.

As espécies vegetais foram selecionadas a partir do levantamento bibliográfico sobre as espécies de pedra-ume-caá (Figura 4, p. 35), segundo (CASCAS *et al.*, 2015; DA SILVA *et al.*, 2015; JORGE *et al.*, 2000).

A coleta das folhas de *Myrcia multiflora* e *Eugenia puniceifolia* (junho/2018) foram realizadas pelo Dr. Francisco Célio Maia Chaves na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Amazônia Ocidental, localizada na Rodovia AM-010, Km 29 (2° 53' 23"S 59° 58' 26"O). As exsiccatas foram depositadas no Herbário HUAM da UFAM pela curadora Maria Rosalba da Costa Bilby (Tabela 1).

Em julho de 2018 foi realizada a coleta das folhas de *Myrcia sylvatica*, *M. amazonica*, *Eugenia puniceifolia*, *M. multiflora*, *E. biflora* e *M. guianensis*. Todas as plantas foram identificadas e coletadas pelo prof. Dr. Alessandro Silva do Rosário na Ilha Algodão/Maiandeuá (Área de Proteção Ambiental), localizada no município de Maracanã, Pará (0° 45' 55"S 47° 27' 00"O), e depositadas no Herbário Profa. Dra. Marlene Freitas da Silva (MFS), da Universidade Estadual do Pará (UEPA) (Tabela 1).

A coleta das folhas de *Eugenia puniceifolia* e *Myrcia sylvatica* foi realizada na Reserva Florestal Adolpho Ducke (RFAD), localizada na rodovia Manaus/Itacoatiara – AM-010 (janeiro/2019). Os materiais vegetais foram obtidos do mesmo indivíduo e coletados pelo parataxonomista José Edmilson da Costa Souza. Essas espécies vegetais foram identificadas no Projeto Flora da Reserva Ducke e possuem exsiccatas depositadas no Herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) (Tabela 1).

A Tabela 1 apresenta as informações sobre as espécies vegetais coletadas com seus respectivos códigos utilizados neste estudo.

Tabela 1 – Espécies vegetais, local de coleta, números das exsicatas e códigos utilizados para o estudo

Espécies	Mês/ano de coleta	Local de coleta	Nº da exsicata	Código
<i>M. multiflora</i>	Junho/2018	Embrapa Amazônia Ocidental	11454	MmEAO
<i>E. punicifolia</i>		Manaus-AM	11455	EpEAO
<i>M. sylvatica</i>	Julho/2018	Área de Proteção Ambiental Maracanã-PA	MFS008199	MsylAPA
<i>M. amazônica</i>			MFS008200	MamAPA
<i>E. punicifolia</i>			MFS008201	EpAPA
<i>M. multiflora</i>			MFS008202	MmAPA
<i>E. biflora</i>			MFS008203	EbAPA
<i>M. guianensis</i>			MFS008204	MguAPA
<i>E. punicifolia</i>	Janeiro/2019	Reserva Florestal Adolpho	177693	EpRAD
<i>M. sylvatica</i>		Ducke Manaus-AM	191789	MsylRAD

4.4 Preparação dos extratos secos das espécies vegetais coletadas

As folhas das espécies foram secas em estufa de ar circulante por 120 h a 40,0 °C (DeLeo Equipamentos Laboratoriais, Porto Alegre, RS, BR). As folhas foram trituradas no liquidificador industrial Oster®. A obtenção do chá foi realizada por infusão com um litro de água destilada (90,0 °C ± 2 °C) sobre 20 g de folhas trituradas (2,0%, m/v), mantido repouso por 30 min a temperatura ambiente (25,0 °C) (COMMITTEE ON HERBAL MEDICINAL PRODUCTS, 2010). Esse processo foi realizado em triplicata. Após a filtração, os chás foram secos por atomização empregando spray dryer (LabMaq, LM-MSD 1.0), com os seguintes parâmetros: vazão do ar comprimido para atomização de 30,0 L min⁻¹, vazão do ar de secagem: 3,80 L min⁻¹, fluxo de alimentação: 0,41 L h⁻¹, temperatura de entrada do ar 90,0 °C e temperatura de saída do ar da câmara de secagem 70,0 °C, empregando um diâmetro do atomizador de 0,70 mm. A preparação dos chás e a secagem foram realizados no mesmo dia. Os extratos secos foram armazenados em frascos de vidro lacrados a -20,0 °C.

4.5 Amostras comerciais

As amostras comerciais foram adquiridas em dois mercados em Manaus (Mercado Adolpho Lisboa e Feira Modelo da Compensa), no mercado Ver-o-Peso (Belém-PA), em duas lojas de produtos naturais em Belém-Pará e no Mercado Municipal em Goiania-GO. A Tabela 2 apresenta as codificações, informações no rótulo da embalagem e origem da aquisição das 17 amostras comerciais adquiridas.

Tabela 2 – Amostras comerciais de pedra-ume-caá, informação no rótulo e origem da aquisição

Código	Informações no rótulo	Origem da aquisição
C1-AM C2-AM	Pedra-ume-caá (<i>Myrcia sphaerocarpa</i>)	Feira Modelo da Compensa (Manaus-AM)
C3-PA	Pedra-ume-caá (Informação dada pelo lojista)	
C4-PA	Folhas secas de pedra-uma-caá à venda por quilo	Estabelecimento comercial de fitoterápicos (Belém-PA)
C5-PA C6-PA C7-PA		
C8-PA	Pedra-ume-caá	Mercado Ver-o-Peso (Belém-PA)
C9-PA	(Identificação a caneta esferográfica em papel comum)	
C10-PA C11-PA C12-PA		
Chá da Vida		
C13-GO	Ervas Naturais	Mercado Municipal de Goiania (Goiania-GO)
	(insulina, pata de vaca, pau ferro, pau tenente, graviola, cana do brejo e berinjela)	
C14-GO	Produto Natural	
	(7 sangria, jurubeba, pedra-ume-caá, carqueja, cajueiro, pau de ferro, jambolão, ypê roxo, alcachofra, salsaparrilha, erva de burgrem chapéu de couro).	
C15-AM	Pedra-ume-caá (<i>Myrcia sphaerocarpa</i>)	Mercado Municipal Adolpho Lisboa (Manaus-AM)
C16-AM	Pedra-ume-caá (Insulina vegetal)	Mercado Municipal Adolpho Lisboa (Manaus-AM)
C17-AM	Informação dada pelo vendedor (folhas secas com galhos finos)	

As amostras adquiridas em Goiânia são misturas de plantas capsuladas e as demais são folhas secas embaladas. As amostras adquiridas nas bancas do Mercado Ver-o-Peso foram embaladas adequadamente e as amostras com rótulo foram mantidas em suas embalagens originais (Figura 8). Essas amostras ficaram mantidas na temperatura de 18,0 °C – 20,0 °C e sob controle de umidade de 50%. Os chás foram preparados de acordo com protocolo das matrizes vegetais nativas (2,0 %, m/v) descrito em 4.4. Esse processo foi realizado em triplicata. Após a filtração os chás foram secos por liofilização (Alpha 1-2 LD Plus, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, Alemanha).

Figura 8 – Amostras comerciais de pedra-ume-caá adquiridas em Manaus-AM e Belém-PA



Fonte: A autora.

4.6 Análises por CLAE-EMAR

As análises por CLAE-EMAR dos extratos secos das dez espécies de pedra-ume-caá e dos dezessete extratos secos das amostras comerciais foram realizadas em um Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE), com um amostrador automático mantido a 10 °C, acoplado ao Espectrômetro de Massa de Alta Resolução qTOF/MS-MS. A separação dos compostos foi realizada em coluna de 150 x 4,6 mm (Phenomenex®, Synergi Fusion-RP 80, tamanho de partícula 4 µm) mantida a 40 °C. Para o modo positivo, o gradiente de eluição consistiu na fase binária água

(A) e metanol (B), ambos contendo ácido fórmico 0,1%: 0 – 28 min (20% – 100% B), 28 min – 38 min (100% B), 38 min – 48 min (100% – 20% B), 48 min – 55 min (20 % B). Para o modo negativo, o gradiente de eluição consistiu na fase binária água (A) e metanol (B), ambos contendo ácido fórmico 0,1% e formiato de amônio 3 mM. O modo de eluição foi o seguinte: 0 – 28 min (20% – 90% B), 28 min – 38 min (90% B), 38 min – 48 min (90% – 20% B), 48 min – 55 min (20% B). Para ambas as condições, o fluxo foi de 200 $\mu\text{L min}^{-1}$ e o volume de injeção da amostra foi de 2,0 μL . As análises de EMAR foram realizadas em uma fonte de íons ESI usando as seguintes configurações do instrumento: nitrogênio como gás nebulizador a 2,0 bar; nitrogênio como o gás de secagem (fluxo de 6,0 L min^{-1}) a 180 °C; o potencial capilar foi de 3,5 kV para o modo negativo; e 4,5 kV para o modo positivo. A faixa de aquisição foi de m/z 100 – 1000. O instrumento foi calibrado com formiato de sódio. A aquisição de dados foi realizada usando o software Compass Data Analysis 4.1 (Bruker®).

4.7 Análise semipreparativa por CLAE

Os extratos secos de *M. multiflora* (MmAPA) e *E. puniceifolia* (EpEAO) foram selecionados para o fracionamento, visando ter como referência para a identificação dos metabólitos nos extratos secos das demais espécies de pedra-ume-cáa.

O extrato seco de *M. multiflora* (MmAPA) (30,0 mg) foi solubilizado em 200 μL de MeOH:H₂O (1:1). Posteriormente, foi submetido a cromatografia líquida semipreparativa de fase reversa (LC-6AD, Shimadzu®) com uma coluna C18 Luna (5 μm ; 250 x 15 mm, Phenomenex®) e um detector UV-VIS (SPD-20AV, Shimadzu®). O volume de injeção foi de 150 μL e a taxa de fluxo foi fixada em 3,5 mL min^{-1} . O sistema de solvente usado foi iniciado com 20% de MeOH:H₂O (ácido fórmico a 0,1%, v/v) e aumentou para 100,0% de MeOH ao longo de um período de 46 min, e foi então mantido a 100,0% de MeOH durante 10 min. RP-HPLC-UV semipreparativa (260 nm e 350 nm) foi realizada três vezes seguidas. Doze compostos foram identificados por RMN em nove frações coletadas após a separação cromatográfica [**7** (t_R 9,16 – 9,98 min, 5,2 mg), **9** e **10** (t_R 11,0 – 13,4 min, 4,5 mg), **13** (t_R 16,3 – 17,7 min, 7,9 mg), **16** (t_R 20,9 – 21,8 min, 3,6 mg), **17** (t_R 21,8 – 22,8 min, 1,0 mg), **19** (t_R 22,8 – 23,7 min, 2,6 mg), **20** e **21** (t_R 23,7 – 24,6 min, 3,6 mg), **22** e **23** (t_R 25,8 – 27,0 min, 4,3 mg) e **26** (t_R 27,5 – 29,7 min, 4,3 mg)] (Tabela 5).

O extrato seco de *Eugenia punicifolia* (EpEAO) (30,0 mg), também foi solubilizado em 200 μL de MeOH:H₂O (1:1) e submetido ao fracionamento cromatográfico. O volume de injeção foi de 150 μL e a taxa de fluxo foi fixada em 3,5 mL min⁻¹. O sistema de solvente usado iniciou com 50% de MeOH:H₂O (ácido fórmico a 0,1%, v/v) e aumentou para 100% de MeOH ao longo de um período de 33 min, e foi então mantido a 100% de MeOH durante 10 min. RP-HPLC-UV semipreparativa (260 nm e 350 nm) foi realizada dez vezes seguidas. Seis compostos foram identificados por RMN em cinco frações **17** (t_R 7,5 – 8,5 min, 2,9 mg), **19** (t_R 8,5 – 9,5 min, 4,5 mg), **21** (t_R 12,5 – 14,0 min, 1,7 mg), **22** e **23** (t_R 14,0 – 17,0 min, 1,5 mg) e **26** (t_R 18,6 – 22,0 min, 1,8 mg)]. A fração 1 (143,0 mg) coletada no t_R 2,5 – 5,0 min foi submetida ao fracionamento, com a mesma taxa de fluxo, e o mesmo sistema de solvente, sendo que de 0 – 13 min (10% – 50% B), 13 min – 27 min (100% B), mantido por mais 10 min. Os compostos **5** (t_R 10,0 – 11,0 min, 1,8 mg) e **11** (t_R 13,0 – 13,5 min, 3,0 mg) foram identificados por RMN de 1D e 2D (Tabela 5).

4.8 Análises por RMN

4.8.1 Análise qualitativa por RMN

Os extratos secos das espécies vegetais de pedra-ume-caá e os dezessete extratos secos das amostras comerciais (10,0 mg) foram analisados por RMN 1D (¹H) e 2D (COSY, HSQC e HMBC) utilizando um espectrômetro Bruker® Avance III HD 500 MHz para ¹H e 125 MHz para ¹³C em DMSO-*d*₆ (530,0 μL), a 25,0 °C. Adicionalmente, foram realizados experimentos bidimensionais dos extratos secos de pedra-ume-caá em CD₃OD (530,0 μL). As frações obtidas do fracionamento cromatográfico de MmAPA e EpEAO foram analisadas em 530 μL CD₃OD (Figuras S34-S63, p. 206-235; Figuras S67-S84, p. 239-256). Para todos os espectros de ¹H foi realizada supressão de sinal residual de água (sequência de pulso zgpr) e os experimentos bidimensionais foram realizados utilizando a sequência de pulso padrão do espectrômetro. O TMS foi utilizado como referência interna (δ 0,00). Os espectros foram processados no software TopSpin™ 4.0.6.

4.8.2 Análise quantitativa por RMN de ^1H

Para a análise quantitativa por RMN de ^1H foi utilizada a ferramenta ERETIC 2 (Electronic Referencing to Access *In Vivo* Concentrations) do software TopSpin™ 4.0.6., que está baseada no método PULCON (TYBURN & COUTANT, 2016).

O padrão externo tereftalato de dimetila (TDM) foi emitido pela Divisão de Metrologia Química e Térmica (Inmetro, RJ, Brasil) sob o número DIMCI1507/2019 (pureza certificada, $99,988 \pm 0,060\%$). Este padrão foi preparado em CD_3OD com $\text{TMS-}d_4$ (1,23 mM, D, 98,0%), e também em $\text{DMSO-}d_6$ (TMS, $\geq 99,0\%$ de pureza) ($n=3$). Os espectros de ^1H foram adquiridos utilizando a sequência de pulso zgpr (supressão de sinal residual de água), sem rotação de amostra. A calibração do pulso de 90° foi realizada para todas as amostras utilizando a sequência de pulso de 90° (zg). A constante de tempo de relaxação longitudinal (T_1) foi determinada pelo experimento Inversão-Recuperação (t1ir1d). Os parâmetros de aquisição de RMN de ^1H foram padronizados como tempo de aquisição (AQ) de 3,27 s, digitalização de ponto de dados no domínio do tempo (TD) de 64 k e uma janela espectral de 19,99 ppm.

As amostras dos extratos secos de *M. multiflora* (MmAPA/MmEAO), *E. puniceifolia* (EpEAO) e *E. biflora* (EbAPA) foram preparadas em quadruplicata. A solução foi submetida ao ultrassom por 5 min ($25,0^\circ\text{C}$) e, em seguida, transferida para o tubo de RMN de 5 mm de diâmetro. Os espectros de RMN das amostras de ^1H foram adquiridos utilizando a sequência de pulso zgpr em temperaturas nas quais foi observado melhor *shimming* de campo. A calibração do pulso de 90° (experimento zg) e a medida de T_1 dos hidrogênios de cada composto foi determinada pelo experimento Inversão-Recuperação (t1ir1d). Os parâmetros de aquisição de RMN de ^1H foram padronizados com AQ de 3,27 s, TD de 64 k, NS de 128 e uma janela espectral de 19,99 ppm. Os demais parâmetros de aquisição das análises quantitativas estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3 – Preparo amostral e parâmetros de aquisição das análises quantitativas por RMNq de ^1H

Padrão/ Extrato	Sinal (ppm)	D1 (s)	RG	Concentração		T (°C)
				(mM)/ Massa (mg)	Solvente	
TDM	δ_{H} 3,94; δ_{H} 8,10	40,0	144	24,95 mM	CD ₃ OD (600 μ L)	25,0
	δ_{H} 3,89	25,0	128	28,66 mM	DMSO- <i>d</i> ₆ (530 μ L)	
EpEAO	δ_{H} 5,25	17,0	128	10,0 mg	DMSO- <i>d</i> ₆ (530 μ L)	25,0
EbAPA/MmEAO	δ_{H} 4,47	15,0				
MmAPA	δ_{H} 5,29; δ_{H} 5,32;	34,0	80,6	20,0 mg	CD ₃ OD (600 μ L)	15,0
	δ_{H} 6,66; δ_{H} 7,69;					
	δ_{H} 7,83.	30,0				27,5
	δ_{H} 5,30; δ_{H} 5,33;					
	δ_{H} 6,64; δ_{H} 6,67;					
	δ_{H} 7,69; δ_{H} 7,82					

TDM: padrão tereftalato de dimetila; EAO (coleta realizada na Embrapa-AM), APA (coleta realizada na APA-Pará), Eb (*E. biflora*), Ep (*E. puniceifolia*) e Mm (*M. multiflora*).

Em todas as aquisições experimentais, a calibração do pulso de 90° foi realizada até que um sinal nulo (pulso de 360°) fosse obtido (GARRIDO & CARVALHO, 2015) (Figuras S1-S14, p. 183-193 e Tabela S1, p. 185). Todos os experimentos foram realizados sem rotação de amostra, e o ganho do receptor, *tunning*, *maching* e *shimming* de campo foram automaticamente otimizados antes de cada aquisição (GARRIDO & CARVALHO, 2015). Para todos os espectros os ajustes de fase e correção de linha de base foram realizados de forma manual, como também, as integrações dos sinais. O software TopSpin™ 4.0.6 foi usado para o processamento dos espectros de RMN.

4.9 Análise exploratória dos dados

4.9.1 Aquisição dos espectros de RMN de ^1H

Os extratos secos das espécies de pedra-ume-caá e das amostras comerciais foram obtidos em triplicata de extração e analisados por RMN (10,0 mg) em 530 μL de $\text{DMSO}-d_6$ tendo o TMS como uma referência interna (0,0 ppm). As soluções (81) foram submetidas ao ultrassom por 5 min ($25,0^\circ\text{C}$) e, em seguida, foram

transferidas para o seu respectivo tubo de RMN (5 mm). A calibração do pulso de 90° foi realizada para todas as amostras utilizando a sequência de pulso de 90° (zg). Os espectros de RMN de ^1H das amostras foram adquiridos usando a sequência de pulso zgpr para a supressão do sinal de água residual. Os parâmetros de aquisição foram padronizados: AQ 3,27 s, D1 18,2 s, TD 64 k, NS 128, RG 128. Para todos os espectros, os ajustes de fase e correção de linha de base foram manualmente. O software TopSpin™ 4.0.6 foi usado para o processamento dos espectros de RMN.

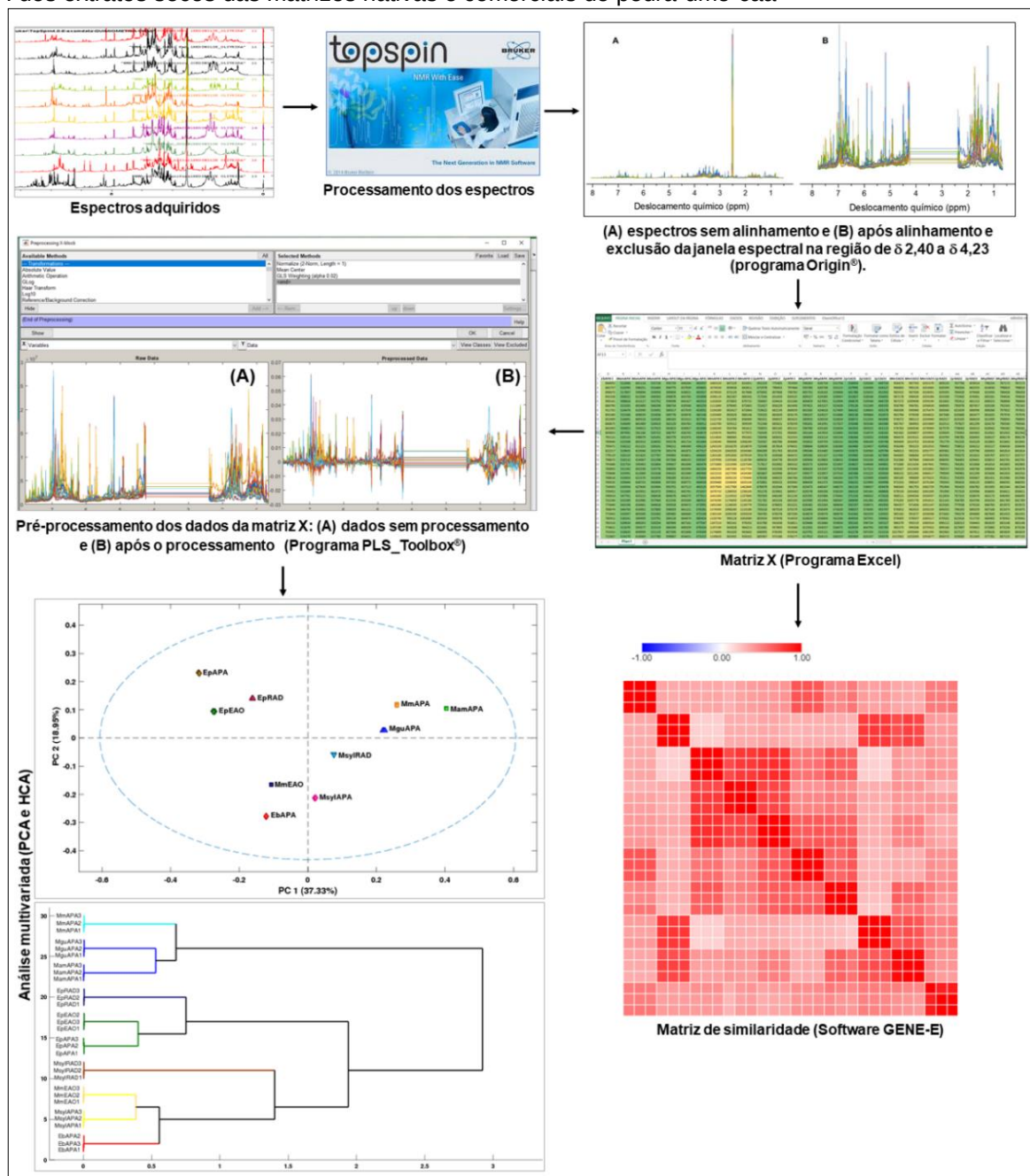
4.9.2 Obtenção da Matriz de Dados

Os espectros de RMN de ^1H dos extratos secos foram convertidos em arquivos .csv no Software Excel® 2013 através do comando convbin2csv no software TopSpin™ 4.0.6. Esses dados foram importados para o programa Origin® 2018 para a construção de matrizes numéricas. Duas matrizes de dados foram obtidas, a primeira foi construída considerando os 10 extratos secos das espécies nativas (Tabela 1, p. 55) (matriz **N**) (δ 0,65 a δ 7,78). A segunda matriz foi construída com os 10 extratos secos das espécies nativas e 15 amostras comerciais (C1-AM, C2-AM, C3-PA a C12-PA, C15-AM a C17-AM) (matriz **NC**) (δ 0,65 a δ 8,02). Para as duas matrizes, os sinais na região de δ 2,40 a δ 4,23 correspondentes ao sinal do solvente em 2,52 ppm (DMSO- d_6) e parte da região dos açúcares com grande sobreposição de sinais foram excluídos. Além disso, um alinhamento prévio dos sinais foi realizado.

4.9.3 Análises estatísticas multivariadas

As matrizes construídas (**N** e **NC**) foram importadas para o Software Excel® 2013 em arquivo.xlsx. Para reduzir a dimensionalidade dos dados originais, essas matrizes foram importadas para análise quimiométrica não supervisionada por Análise de Componentes Principais (PCA) e Análise de Agrupamentos por Métodos Hierárquicos (HCA) usando o Software PLS_Toolbox 8.9.2 (Eigenvector Research Incorporated, Manson, WA, EUA) com MATLAB® R2018a (MathWorks, Natick, EUA). O Esquema 4 apresenta a sequência metodológica empregada para a análise exploratória dos dados de RMN de ^1H .

Esquema 4 – Sequência metodológica empregada para a análise multivariada dos dados de RMN de ^1H dos extratos secos das matrizes nativas e comerciais de pedra-ume-caá



A PCA foi aplicada para a matriz **N** com pré-processamento normalização (2-Norm), centralização dos dados em torno da média e utilização do filtro matemático GLSW ($\alpha = 0,02$) usando o algoritmo SVD (*Single Value Decomposition*). O método *venetian blinds* foi aplicado para validação cruzada com 6 splits e *blind thickness* igual a 1. Os agrupamentos e discriminação das amostras foram avaliados pelos gráficos de *scores* e os *loadings* para verificar quais constituintes químicos foram responsáveis

por esses agrupamentos e variância dos dados. A qualidade dos dados quimiométricos foi avaliada observando os limites de confiança de 95% do gráfico de resíduos (Q) *versus* Hotelling (T^2) usando as três primeiras PCs. Os valores de erro padrão de calibração (RMSEC) e erro padrão de validação (RMSECV) foram 0,0022 e 0,0028, respectivamente. Posteriormente, a HCA foi desenvolvida utilizando o Método de Ward para 3 PCs. Para a matriz **NC** foi aplicada HCA com pré-tratamento normalização (1-Norm) e centralização dos dados em torno da média. O conjunto de dados foi avaliado na forma de dendograma de acordo com a dissimilaridade representada pela distância do Método de Ward.

Além disso, a matriz **N** foi importada para o programa GENE-E (<https://software.broadinstitute.org/morpheus/>), onde foi construída a matriz de similaridade por correlação de Pearson.

4.10 Avaliação das atividades enzimáticas *in vitro*

4.10.1 Atividade inibitória α -glucosidase

A atividade inibitória da α -glucosidase foi determinada de acordo com Koh *et al.* 2018, com modificações, por medição da liberação de 4-nitrofenol do 4-nitrofenil α -D-glucopiranosídeo (4-NPGP). Inicialmente, 170 μ L da enzima α -glucosidase extraída de pós de acetona intestinal de rato (3,0 mg mL⁻¹ em tampão fosfato 10 mM, pH 6,9) foi adicionada a 30,0 μ L dos extratos secos das espécies de pedra-ume-caá (1,0 mg mL⁻¹ DMSO). Após 2 min de incubação a 37 °C, as absorbâncias iniciais das amostras foram lidas (A1), e a reação foi iniciada pela adição de 100 μ L do reagente de cor 4-NPGP (5,0 mg mL⁻¹ em tampão fosfato 10 mM, pH 6,9) e foram mantidas por mais de 2 h a 37 °C, e as absorbâncias finais (A2) foram lidas. O controle positivo (acarbose) foi utilizado como referência e DMSO foi usado como controle negativo (branco). As leituras foram feitas no leitor de microplaca a 450 nm em um espectrofotômetro (DTX 800, Beckman Coulter). A porcentagem de inibição foi calculada usando a equação:

$$[\% \text{ de inibição} = 100 - (A2_{\text{amostra}} - A1_{\text{amostra(branco)}}) / (A2_{\text{controle}} - A1_{\text{controle(branco)}}) \times 100] \quad (2)$$

Onde A1 é a absorbância da leitura inicial e A2 é a absorbância da leitura final. O Cl₅₀ foi determinado por meio de diluições seriadas dos extratos secos (6,2 a 100,0 μ g mL⁻¹) em DMSO. O ensaio foi realizado em triplicata.

4.10.2 Atividade inibitória α -amilase

A atividade inibitória da α -amilase seguiu o protocolo previamente descrito por (SUBRAMANIAN *et al.*, 2008). Neste teste colorimétrico, 100,0 μ L da enzima α -amilase e 30 μ L dos extratos secos das espécies de pedra-ume-caá e padrão acarbose (1,0 mg mL⁻¹ em DMSO) foram incubados por 5 min a 37 °C. Então, foram adicionados 170,0 μ L de α -amilase, e a reação foi medida a 405 nm (A1) no leitor de microplaca (DTX 800, Beckman Coulter). Então, foi realizada a leitura inicial (A1) e a microplaca foi incubada a 37 °C por 40 min. Posteriormente, foram realizadas as leituras finais das amostras (A2). A acarbose foi utilizada como controle positivo e DMSO como controle negativo. O ensaio foi realizado em triplicata. A porcentagem de inibição foi calculada usando a equação (2) descrita em 4.10.1.

4.10.3 Atividade inibitória lipase pancreática

Um método para medir a atividade inibitória da lipase pancreática descrito por (SLANC *et al.*, 2009) foi empregado, com algumas modificações. A lipase do pâncreas suíno tipo II foi diluída em tampão TRIS-HCl 75 mM pH 8,5. O reagente de cor 4-nitrofenil palmitato (PNP) foi preparado em etanol, e uma alíquota de 30 μ L dos extratos secos das espécies de pedra-ume-caá foi incubada (1,0 mg mL⁻¹ em DMSO) com 250,0 μ L da solução de enzima (0,80 mg mL⁻¹), por 5 min a 37 °C no escuro, e as absorbâncias das amostras foram lidas (A1). Posteriormente, foram adicionados 20,0 μ L PNP (4,0 mg mL⁻¹) e após 10 min de incubação, realizou-se a leitura final (A2). As medições foram feitas no leitor de microplaca a 450 nm com um espectrofotômetro (DTX 800, Beckman Coulter). O padrão utilizado foi o orlistat e o ensaio foi realizado em triplicata. A porcentagem de inibição foi calculada usando a equação (2) descrita em 4.10.1.

4.11 Avaliação da atividade antiglicante

4.11.1 Modelo glioxal e albumina sérica bovina (BSA/GO)

Um método para medir a atividade antiglicante por meio da via oxidativa foi empregado com algumas modificações (KIHO *et al.*, 2004). Os extratos secos das espécies de pedra-ume-caá foram preparados em DMSO (1,0 mg mL⁻¹). A solução de glioxal (30 mM) e BSA (albumina de soro bovino) (10 mg mL⁻¹) foi preparada em

tampão de fosfato (0,2 M, pH 7,4) contendo azida de sódio 3,0 mM como agente antimicrobiano. As reações foram realizadas com 300,0 µL da mistura de reação total [BSA (135,0 µL), glioxal (135,0 µL) e DMSO ou amostra (30,0 µL)] e incubadas a 37 °C. Após 120h de incubação, as amostras foram analisadas quanto à intensidade de fluorescência usando um leitor de microplaca (excitação em 330 nm e emissão em 420 nm) (DTX 800, Beckman Coulter). DMSO foi usado como controle negativo e a quercetina (100,0 µg mL⁻¹) foi usada como padrão. O experimento foi realizado em triplicata. A porcentagem de inibição foi calculada usando a equação:

$$[\% \text{ de inibição} = 100 - (\text{amostra F2} - \text{amostra F1} / \text{controle F2} - \text{controle F1}) \times 100] \quad (3)$$

Onde F1 é a fluorescência da leitura inicial e F2 é a fluorescência da leitura final.

4.11.2 Modelo frutose e albumina sérica bovina (BSA/frutose)

A atividade antiglicante foi avaliada pelo método BSA/frutose (via não oxidativa) e determinada de acordo com o método descrito por (KIHIO *et al.*, 2004), com algumas modificações. Utilizando a mesma metodologia descrita em 4.11.1, o tempo de incubação foi fixado em 120h e utilizada frutose (0,10 mM) em vez de glioxal. Aminoguanidina foi usada como padrão. A porcentagem de inibição foi calculada usando a equação (3). O Cl₅₀ foi determinado usando diluições em série dos extratos secos das espécies de pedra-ume-caá (1,6 – 100,0 µg mL⁻¹) em DMSO. O ensaio foi realizado em triplicata.

4.12 Fenóis totais

A determinação do teor de fenóis totais (TPC) dos extratos secos das espécies de pedra-ume-caá seguiu o método de Folin Ciocalteu (VELIOGLU *et al.*, 1998), com adaptações. Uma alíquota de 20,0 µL da solução de cada extrato (1000 µg mL⁻¹) reagiu com 150 µL de reagente Folin Ciocalteu (1:10) por 5 min, e 150 µL de bicarbonato de sódio (60 g L⁻¹) foi subsequentemente adicionado. Após 90 min de incubação sob proteção da luz, as medições foram realizadas em leitor de microplacas a 750 nm. A curva padrão do ácido gálico foi obtida em diferentes concentrações (31,2; 62,5; 125; 250; 500 e 1000 µg mL⁻¹). A curva de calibração ($y = 0,0029x + 0,2395$) foi usada para avaliação dos resultados. O coeficiente de linearidade foi de $R^2 = 0,998$.

Este ensaio foi realizado em triplicata. Os resultados foram expressos em miligramas de ácido gálico equivalente por grama do extrato seco (mg GAEq g⁻¹). Todas as análises foram realizadas usando o leitor de microplaca (Elx800, Biotek Instruments).

4.13 Avaliação da atividade antioxidante

4.13.1 Radical livre DPPH•

Os extratos secos das espécies de pedra-ume-caá foram avaliados quanto à sua capacidade antioxidante pelo método de sequestro do radical livre DPPH•, com algumas modificações (MOLYNEUX, 2004). As medições, em triplicata, foram realizadas em leitor de microplaca a 515 nm (Elx800, Biotek Instruments). Uma alíquota de 10,0 µL de cada extrato das espécies de pedra-ume-caá (200,0 µg mL⁻¹ em DMSO) foram adicionadas a uma placa de 96 poços. Em seguida, foram adicionados 190 µL de DPPH• (60 µM) e a mistura foi incubada por 30 min à temperatura ambiente sob proteção da luz. Os resultados foram avaliados a partir da curva de calibração ($y = -0,003x + 0,7025$) preparada com seis concentrações diferentes de solução padrão trolox (125, 250, 500, 1000, 1500 e 2000 µg mL⁻¹). O valor de R^2 foi 0,9901. Os resultados foram expressos em micromoles de equivalente de trolox por grama do extrato seco (µmol TEq g⁻¹).

4.13.2 Cátion radical ABTS•+

O método ABTS•+ (RE *et al.*, 1999), com modificações, foi utilizado pela adição de 200 µL de solução de ABTS•+ (absorbância de 0,70 a 750 nm) e 2,0 µL de cada extrato das espécies de pedra-ume-caá (500,0 µg mL⁻¹, em DMSO) em uma microplaca de 96 poços. As medições foram realizadas em triplicata após o período de reação de 6 min, sob proteção da luz (Elx800, Biotek Instruments). A curva de calibração do padrão Trolox foi obtida nas mesmas concentrações descritas em 4.13.1 ($y = -0,0003x + 0,6796$). O valor R^2 foi de 0,9998. Os resultados foram expressos em micromoles de equivalente de Trolox por grama do extrato seco (µmol TEq g⁻¹).

4.14 Ensaios em cultura de células

4.14.1 Ensaio de viabilidade celular

A viabilidade celular dos extratos secos das espécies de pedra-ume-caá na cultura da linha celular de fibroblastos de pulmão humano MRC-5 foi determinada usando o método Alamar Blue (NAKAYAMA *et al.*, 1997). As células MRC-5 foram incubadas (37 °C, 5 % de CO₂) e suplementadas com soro fetal bovino (10 %), penicilina (50 U mL⁻¹) e estreptomicina (50,0 µg mL⁻¹). Em seguida, as células aderentes (0,5 × 10⁴ células/poço) foram cultivadas em placas de cultura de tecidos de 96 poços por 24 h. Posteriormente, as células foram expostas a cada extrato em diferentes concentrações (3,1–100,0 µg mL⁻¹, em triplicata) por 24 h. Após a incubação, as células foram lavadas com PBS e incubadas em solução Alamar Blue (10,0 µL de 0,4%) por 3 h a 37 °C. A fluorescência foi medida em leitor de microplacas (DTX 800, Beckman Coulter) com excitação a 545 nm e emissão a 595 nm. A viabilidade foi calculada usando a equação:

$$\% \text{ viabilidade} = (\text{Abs}_{\text{amostra}} / \text{Abs}_{\text{controle}}) * 100 \quad (4)$$

O CI₅₀ foi determinado por meio de diluições seriadas de cada extrato de pedra-ume-caá.

4.14.2 Atividade antioxidante celular (CAA)

A avaliação da atividade antioxidante celular foi realizada pela medição de ROS usando o composto 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA) adaptada de (WOLFE & LIU, 2007). Neste ensaio, utilizou-se cultura de células de fibroblastos de pulmão humano MRC-5, as quais foram plaqueadas na concentração de 6x10⁴ (células/poço), em 100 µL de DMEM alta glicose, e incubadas por 24 horas. Após esse período, os poços foram lavados com tampão fosfato-salino (PBS). Adicionou-se, na microplaca, uma alíquota de 100 µL da solução DCFH-DA (25 µM), dissolvida em tampão Hank's, contendo os extratos na concentração de 100 µg mL⁻¹. A microplaca foi incubada durante 60 min a 37°C e 5% CO₂. Após esse período, os poços foram novamente lavados com PBS. Em seguida, tratou-se com 600 µM de 2,2'-azobis(2-amidinopropano) dihidrocloreto (AAPH). A fluorescência foi mensurada utilizando leitor de microplaca nos comprimentos de onda de 485 nm (excitação) e 520 nm (emissão) em intervalos de 5 min durante 60 min (DTX 800, Beckman Coulter, CA,

USA). A quercetina ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) foi usada como controle positivo e preparada em DCFH-DA e tampão Hank's. Já o controle negativo (DMSO) foi preparado em PBS. Os resultados foram calculados segundo a equação:

$$[\% \text{ CAA} = 100 - (\text{ABS amostra}/\text{ABS média controle}) * 100] \quad (5)$$

O ensaio foi realizado em triplicata e sob proteção da luz.

4.15 Estudo *in vivo*

4.15.1 Animais

Os protocolos experimentais *in vivo* foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) (nº 036/2018). Trinta camundongos machos Swiss (Unib:SW) com quatro (4) semanas de idade (pesando 21 – 27 g) foram adquiridos no Biotério Central da UFAM para a realização do teste de tolerância oral. Também, quarenta e oito camundongos machos da mesma espécie com 4 semanas de idade (pesando 24 – 32 g) foram adquiridos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas (São Paulo, Brasil) para a realização de ensaio crônico de dose múltipla. Todos os camundongos foram alojados em sala climatizada sob controle de temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), umidade ($55 \pm 10\%$) e um ciclo de claro/escuro de 12 h. Esses animais foram aclimatados por sete dias antes do início de cada experimento, e alimentados com ração padrão para roedores e água *ad libitum* durante todo o período experimental.

4.15.2 Curva de tolerância oral a maltose

O teste de tolerância oral a maltose foi realizado conforme descrito por (ANDRADE-CETTO *et al.*, 2008) com adaptações. Nas vésperas do experimento, os animais permaneceram em jejum noturno de 12 h para evitar quaisquer interferências experimentais. Os camundongos foram divididos aleatoriamente em seis grupos de cinco animais. Um grupo foi usado como controle negativo e recebeu solução salina 0,9% (Controle, grupo 1). Outro grupo recebeu tratamento com acarbose na dose de 100 mg/kg de peso corporal (pc) (acarbose100, grupo 2). Dois grupos foram tratados com *E. biflora* (EbAPA) nas doses de 100 mg/kg (EbAPA100, grupo 3) e 200 mg/kg de pc (EbAPA200, grupo 4). Além disso, dois grupos foram tratados com *E. puniciolia*

(EpEAO) nas doses de 100 mg/kg (EpEAO100, grupo 5) e 200 mg/kg de pc (EpEAO200, grupo 6). Inicialmente, os níveis de glicose foram avaliados em tempo zero, e posteriormente foram administrados o respectivo tratamento de acordo com cada grupo. Após 20 min, todos os animais receberam sobrecarga de maltose (3g/kg de pc), e os níveis de glicose no sangue foram avaliados em amostras de sangue coletadas na veia da cauda do animal em 15 min, 30 min, 60 min e 90 min, utilizando um glicosímetro portátil (On Call® Plus - ACON Laboratories, San Diego, CA, EUA). Todos os tratamentos foram solubilizados em água destilada nas doses estabelecidas e administradas por gavagem.

4.15.3 Experimento crônico de dose múltipla

O DM2 foi induzido em camundongos em jejum noturno, conforme ARYA *et al.*, 2015, com alterações. Um grupo de 6 animais saudáveis foram separados como grupo de controle normal (CN, grupo 1). Outros 7 grupos de 6 animais foram submetidos a indução da hiperglicemia por uma única injeção intraperitoneal de estreptozotocina (STZ) na dose de 150 mg/kg de pc (0,1 M tampão citrato, pH 4,5). Após 20 min, 50 mg/kg de nicotinamida foram injetados por via intraperitoneal. O DM2 foi confirmado após 96 h pela medição do nível de glicose no sangue acima de 200 mg/dL. Os camundongos diabéticos foram randomizados em 7 grupos de 6 animais: grupo de controle diabético (CD, grupo 2), grupo padrão tratado com acarbose na dose de 200 mg/kg de pc (Acarbose 200, grupo 3), três grupos de tratamento com o extrato de *E. biflora* (EbAPA) nas doses de 200 mg/kg (EbAPA200, grupo 4), 100 mg/kg (EbAPA100, grupo 5) e 50 mg/kg de pc (EbAPA50, grupo 6). Dois grupos foram tratados com o extrato de *M. multiflora* (MmAPA) nas doses de 50 mg/kg (MmAPA50, grupo 7) e 25 mg/kg de pc (MmAPA25, grupo 8). Os extratos secos e o padrão foram solubilizados em água destilada. O tratamento foi administrado por gavagem uma vez ao dia durante 28 dias, conforme a descrição anterior. O nível de glicose no sangue em jejum foi determinado utilizando um glicosímetro portátil (On Call® Plus - ACON Laboratories, San Diego, CA, EUA). A medição da glicemia de todos os grupos ocorreu nos dias D7, D15, D21 e D28.

4.16 Coleta de amostras de sangue e órgãos

Após o fim do experimento, os animais foram submetidos à eutanásia com uma mistura de cetamina/xilazina (100/10 mg/kg pc) por via intraperitoneal. Amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca. Fígados e rins foram retirados e previamente preservados em solução formalina a 10% para análises histológicas. Paralelamente, alíquotas de 1 g de cada fígado foram congelados a -80°C e, posteriormente, submetidas ao ensaio de peroxidação lipídica.

4.17 Medições dos parâmetros bioquímicos

O plasma foi isolado da amostra de sangue por centrifugação a 3000 rpm por 10 min em temperatura ambiente. Em seguida, os níveis aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), colesterol total, triglicerídeos, creatinina, ureia e ácido úrico foram analisados nessas amostras de acordo com os protocolos do fabricante (kits Wiener Lab.) utilizando um analisador automatizado de Química Clínica ChemWell® 2902 (Awareness Technology, Inc., FL, USA).

4.18 Avaliação do potencial hemolítico

O teste do potencial hemolítico dos extratos secos das espécies *M. multiflora* (MmAPA), *E. biflora* (EbAPA) e *E. puniceifolia* (EpEAO) foi realizado seguindo o método descrito por JIMENEZ *et al.*, 2003; adaptado por ARANHA, 2014. O sangue de um camundongo da espécie *Mus musculus* Swiss foi coletado e diluído em solução salina contendo NaCl 0,85 % e CaCl_2 10 mM. Posteriormente, o sangue foi centrifugado a 1500 rpm/10min e um *pellet* de eritrócitos formado foi ressuspensionado em solução salina e, uma solução eritrocitária (SE) a 2% foi preparada. Em uma microplaca de 96 poços foram adicionados 100 μL de cada extrato na concentração de 2 mg mL^{-1} e 100 μL de SE, que foram incubados por 1h sob agitação constante a $26,0^{\circ}\text{C}$. Após esse período, as amostras foram centrifugadas (1500 rpm/10 min) e o sobrenadante foi transferido para outra microplaca para a leitura da absorbância no espectrofotômetro a 540 nm. Como controle positivo foi utilizado Triton-X (0,2%) para obter 100% de hemólise e controle negativo DMSO (0,2%). O ensaio foi realizado em triplicata.

4.19 Estimativa de peroxidação lipídica

O nível de peroxidação lipídica foi mensurado com base na reação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em amostras de tecido de fígado (1 g) (OHKAWA *et al.*, 1979). Essas amostras foram homogeneizadas em 10 mL de NaCl 150 mM. Em seguida, foram adicionados 100 µL desse homogenato em 1,5 mL do complexo reacional (ácido tiobarbitúrio 0,1%, ácido clorídrico 0,25 M e ácido tricloroacético 10%). Esse meio foi agitado por 30 s em vortex e incubado em banho-maria a 100 °C por 45 min. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 3500 rpm por 5 min e a leitura da absorbância do sobrenadante a 535 nm foi mensurada no espectrômetro T70 UV/VIS (PG Instruments Ltd, Lutterworth, GB). A quantificação de TBARS foi realizada a partir da curva de calibração construída com concentrações de 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 e 8,0 µmol de 1,1,3,3-tetraetoxipropano. Os resultados foram expressos em µmol/g de TBARS.

4.20 Análises histológicas

Amostras de tecido do fígado e rim de cada animal foram desidratadas sequencialmente com 70 – 100% de álcool etílico e diafanizadas com xilol (100%). As amostras foram montadas em blocos de parafina a 60 °C, e mantidas sob refrigeração. Posteriormente, seções de 3 – 5 µm foram preparadas usando um micrótomo Leica RM 2125RT (Leica Microsystems-Wetlar, Germany). Essas seções foram coradas com hematoxilina e eosina (H & E) e montadas com bálsamo do Canadá e lamínula para posterior análise. Com um microscópio óptico Leica DM500 e câmera integrada Leica ICC50W (Leica Microsystems-Wetlar, Germany) foram realizadas as análises e documentação fotográfica.

4.21 Análises estatísticas univariadas

Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão. Os valores obtidos da análise quantitativa por RMNq de ¹H foram avaliados usando o Microsoft Excel® 2013. Os dados dos ensaios de atividade antioxidante celular, fenóis totais e de sequestro dos radicais livres DPPH•/ABTS•⁺ foram analisados no Microsoft Excel® 2013. Os resultados de citotoxicidade, peroxidação lipídica, parâmetros bioquímicos e os experimentos *in vivo* foram analisados no programa GraphPad Prism 6.0 (San

Diego, CA, USA). A significância estatística foi analisada usando ANOVA (one-way) seguido por comparação múltipla com teste de Tukey (95% de confiança). Para o estudo *in vivo*, as diferenças estatísticas entre os grupos de animais foram determinadas por ANOVA de dois fatores seguido do teste de comparação múltipla por Dunnett. A curva Kaplan-Meier foi construída pelo teste log-rank (Mantel-Cox) para análise de sobrevivência. Valores de $p < 0,05$ foram considerados para o limite de significância.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise do perfil espectral por RMN de ^1H

As infusões das folhas secas das espécies de pedra-ume-caá foram realizadas em triplicata amostral. A Tabela 4 apresenta o rendimento dos extratos secos, dentre os quais o extrato de *E. puniceifolia* (EpEAO) apresentou um rendimento médio de $2,07 \pm 0,10$ g, bem superior ao extrato de *M. amazonica* ($0,85 \pm 0,18$ g) e *E. biflora* ($0,58 \pm 0,02$ g) ($p < 0,05$).

Tabela 4 – Massa dos extratos secos das folhas das espécies de pedra-ume-caá

AMOSTRAS	Massa dos extratos (20 g de folhas)
MmEAO	$1,37 \pm 0,24$ ^{a,b,c}
MmAPA	$1,40 \pm 0,33$ ^{a,b,c}
MamAPA	$0,85 \pm 0,18$ ^{b,c}
MguAPA	$1,44 \pm 0,50$ ^{a,b,c}
MsylAPA	$1,62 \pm 0,17$ ^{a,b}
MsylRAD	$1,20 \pm 0,22$ ^{b,c}
EbAPA	$0,58 \pm 0,02$ ^c
EpEAO	$2,07 \pm 0,10$ ^a
EpAPA	$1,23 \pm 0,17$ ^{a,b,c}
EpRAD	$1,31 \pm 0,23$ ^{a,b,c}

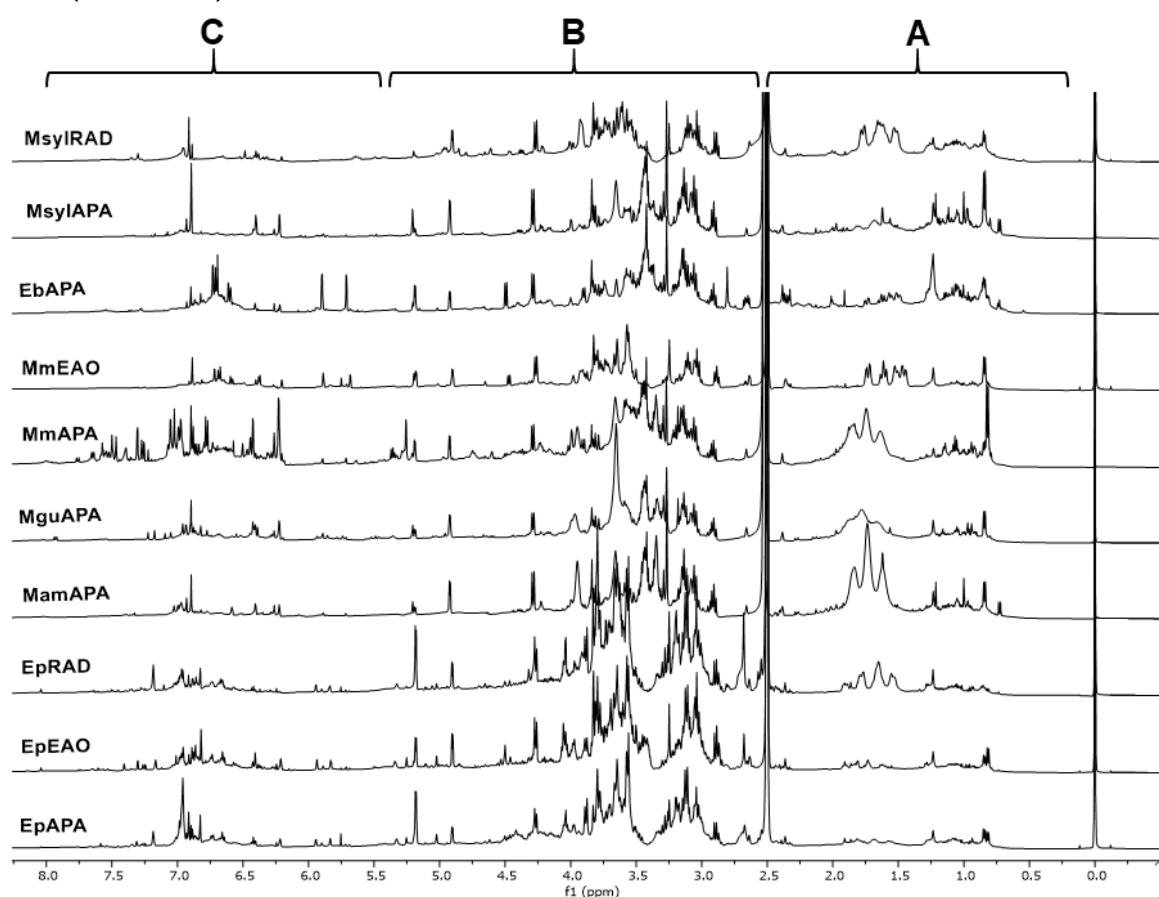
EAO (coleta realizada na Embrapa-AM), APA (coleta realizada na APA-Pará), RAD (coleta realizada na Reserva Florestal Adolpho Ducke-AM). Ep (*E. puniceifolia*); Eb (*E. biflora*); Mam (*M. amazonica*); Mgu (*M. guianensis*); Mm (*M. multiflora*); Msyl (*M. sylvatica*).

Inicialmente, a análise preliminar dos espectros de RMN de ^1H (DMSO- d_6) de cada extrato foi realizada e são apresentados na Figura 9. É possível observar que existe maior complexidade de sinais nos extratos de espécimes de *E. puniceifolia* (EpEAO, EpAPA e EpRAD) e no extrato de *M. multiflora* (MmAPA). De um modo geral, foram observados sinais nas três diferentes regiões: sinais tipicamente alifáticos (δ_{H} 0,9 a 3,0, região **A**), seguido por sinais majoritariamente carbinólicos (δ_{H} 3,0 a 5,5, região **B**) e sinais típicos de hidrogênios aromáticos ou vinílicos (δ_{H} 5,7 a 8,0, região **C**).

Em todos os espectros de RMN de ^1H desses extratos, há sinais característicos de hexoses com grupo metila terminal na região **A**, e, também, foi observado multipletos entre 1,52 ppm – 1,77 ppm de maior intensidade nos extratos

de *Myrcia sylvatica* (MsylRAD), *M. multiflora* (MmAPA e MmEAO), *M. amazonica* (MamAPA) e *Eugenia punicifolia* (EpAPA). Na região carbinólica, há maior variabilidade de sinais, como dupletos ou simpletos largos característicos de hidrogênio anomérico. Na região **C**, há a presença de sinais compatíveis com o padrão de substituição aromático tetrassubstituídos com acoplamento de *spins* do tipo *meta* (anel A), bem como sinais compatíveis com o padrão de acoplamento *orto*, *orto-meta* e *meta* em anéis dissusbtuídos ou trissusbtutídos (anel B) típicos de estruturas flavonoídicas.

Figura 9 – Espectros de RMN de ^1H dos extratos secos das espécies de pedra-ume-caá (DMSO- d_6 , 500 MHz). **A**: região alifática (δ_{H} 0,9 a 3,0), **B**: região carbinólica (δ_{H} 3,0 a 5,5) e **C**: região aromática e vinílica (δ_{H} 5,7 a 8,0)

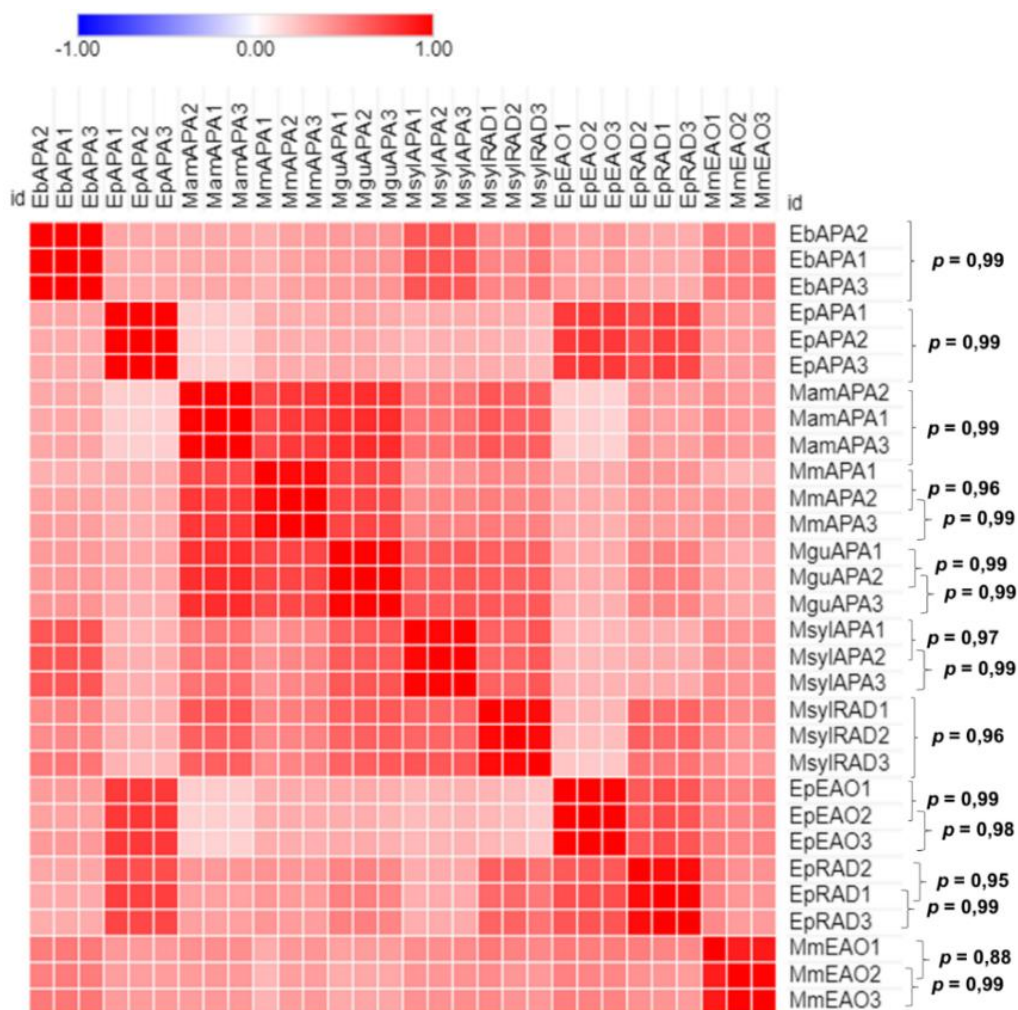


EAO (coleta realizada na Embrapa-AM), APA (coleta realizada na APA-Pará), RAD (coleta realizada na Reserva Florestal Adolpho Ducke-AM). Ep (*E. punicifolia*); Eb (*E. biflora*); Mam (*M. amazonica*); Mgu (*M. guianensis*); Mm (*M. multiflora*); Msyl (*M. sylvatica*).

Diante da importância de verificar a confiabilidade da extração para estudos químicos e biológicos, foi avaliada a reprodutibilidade do processo extrativo. Para isso,

foi construída uma matriz de similaridade a partir da matriz **N** de dados espectrais de RMN de ^1H (Figura 10).

Figura 10 – Matriz de similaridade química das espécies de pedra-ume-caá nativas



EAO (coleta realizada na Embrapa-AM), APA (coleta realizada na APA-Pará), RAD (coleta realizada na Reserva Florestal Adolpho Ducke – AM). Ep (*E. punicifolia*); Eb (*E. biflora*); Mam (*M. amazonica*); Mgu (*M. guianensis*); Mm (*M. multiflora*); Msyl (*M. sylvatica*). A ausência de dados azuis corresponde elevada similaridade química intra e interespecífica entre as espécies vegetais

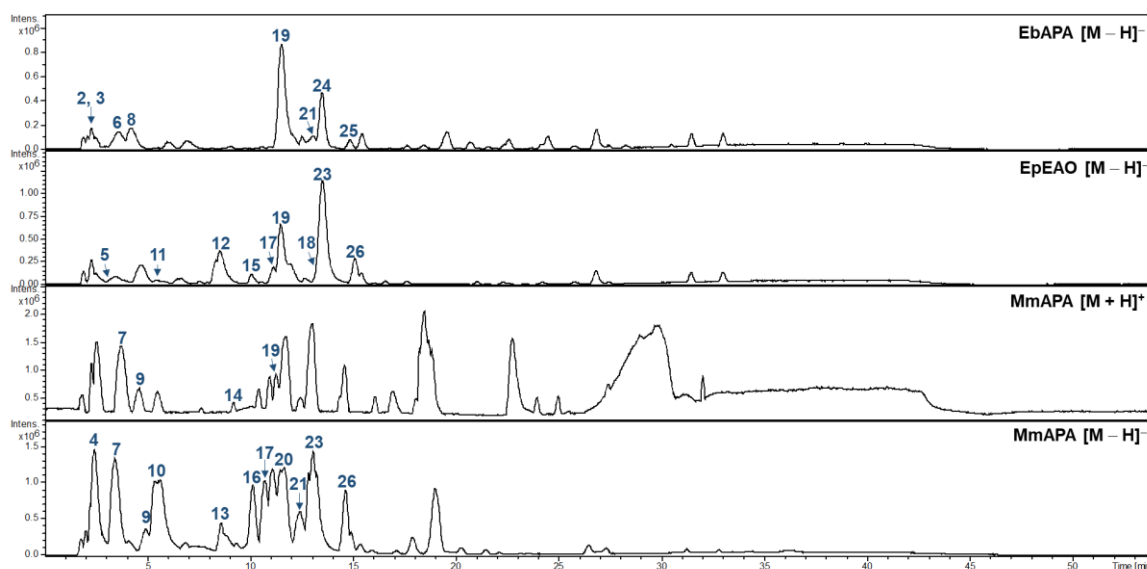
Essa análise permitiu observar a existência de semelhança espectral na triplicata amostral, os quais apresentaram forte correlação entre si (Pearson $\geq 0,88$), indicando boa repetibilidade do processo extrativo e da análise experimental. Além disso, foi observada elevada similaridade entre espécies de *Myrcia amazonica* (MamAPA), *M. multiflora* (MmAPA) e *M. guianensis* (MguAPA). Como também, uma semelhança química intraespecífica para *M. sylvatica* (MsylAPA e MsylRAD), e entre *Eugenia punicifolia* (EpEAO, EpAPA e EpRAD) coletadas em diferentes localidades.

No entanto, a variação da cor vermelha com tendência para o branco confirma que há diferenças nos perfis espectrais entre os extratos das espécies de pedra-ume-caá, os quais são possíveis de serem observados e que podem auxiliar na discriminação entre espécies e gêneros. Como pode ser observado, há moderada similaridade entre os extratos secos de *Myrcia* (MamAPA, MmAPA, MguAPA, MsylAPA) e *Eugenia* (EpAPA e EpEAO).

5.2 Identificação dos constituintes químicos

As análises por CLAE-EMAR e RMN 1D e 2D dos extratos secos das espécies de pedra-ume-caá e das frações obtidas dos extratos de *M. multiflora* (MmAPA) e *E. puniceifolia* (EpEAO) permitiram identificar 26 substâncias (Figura 41, p. 116). A análise dos constituintes entre os tempos de retenção de 2,2 min a 15,0 min foi realizada de forma comparativa entre os extratos e dados espectrais descritos na literatura (Figura 11). Portanto, os constituintes são apresentados de acordo com a ordem de eluição associada ao respectivo tempo de retenção, padrão de fragmentação e espécie vegetal em que foram identificados (Tabela 5).

Figura 11 – Cromatogramas de íons totais dos extratos secos das folhas de *E. biflora* (EbAPA), *E. puniceifolia* (EpEAO) e *M. multiflora* (MmAPA) por CLAE-ESI-EMAR



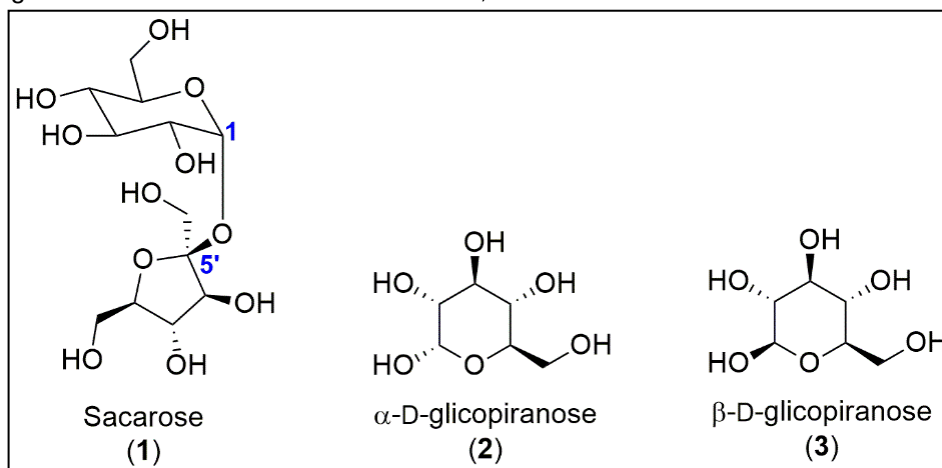
(2): α -D-glicopirranose, (3): β -D-glicopirranose, (4): ácido quínico, (5): ácido gálico, (6): procianidina dimérica tipo-B, (7): ácido clorogênico, (8): catequina, (9): ácido 4-O-cafeoilquínico, (10): corilagina, (11): casuarictina, (12): catequina-3-O-galato, (13): ácido quebulágico, (14): pedunculagina, (15): epicatequina-3-O-(3"-O-metilgalato), (16): miricetina-3-O-glucosídeo, (17): quercetina-3-O- β -2"-galoilglucosídeo, (18): miricetina-3-O-(2"-galoil)- α -ramnosídeo, (19): miricitrina, (20): hiperosídeo, (21): guaijaverina, (23): quercitrina, (24): isoramnetina-3-O-glucosídeo, (25): ácido metil elágico, (26): kaempferol-3-O-ramnosídeo.

5.2.1 Identificação dos carboidratos

Na região carbinólica dos espectros de RMN de ^1H dos extratos secos das espécies de pedra-ume-caá foram observados dupletos em elevada intensidade em δ_{H} 5,18 - 5,20 ppm (H-1) característicos da sacarose (Figura 12) (Tabela 5).

Em todos os extratos foi observado dupletos entre δ_{H} 4,90 - 4,92 e δ_{H} 4,26 - 4,29 (H-1) que foram atribuídos aos isômeros α - e β -glicopirranose (**2** e **3**), respectivamente (Figura 12). Na análise por CLAE-EM, foi observado o pico em 2,2 min de m/z 179,0567 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (erro, 3,28), correspondente a fórmula molecular $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_6^-$. Esses carboidratos já foram relatados nos frutos de *E. puniceifolia* (RAMOS *et al.*, 2019).

Figura 12 – Estruturas dos carboidratos **1**, **2** e **3**



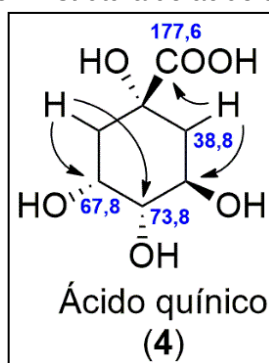
5.2.2 Identificação do ácido quínico (**4**)

Na região alifática do espectro de RMN de ^1H do extrato seco de *E. puniceifolia* (EpRAD) foram observados os sinais de hidrogênios metilênicos em δ_{H} 1,77 (*dd*, $J=13,7$; 3,8, H-6_{ax}), δ_{H} 1,56 (*dd*, $J=13,7$; 5,3, H-6_{eq}) e o multiplete em δ_{H} 1,63 - 1,66 (H-2_{eq}). Os sinais em δ_{H} 1,77 e δ_{H} 1,56 possuem correlações diretas (HSQC) com o carbono em δ_{C} 37,1; bem como os sinais em δ_{H} 1,63-1,66 com o carbono em δ_{C} 38,8. Também, foram observadas as correlações a longa distância (HMBC) dos hidrogênios em δ_{H} 1,56 e 1,77 (H-6) com os carbonos em δ_{C} 67,8 (C-5), δ_{C} 73,8 (C-4) e δ_{C} 177,6 (C-7), como também o H-2 com os carbonos em δ_{C} 67,3 (C-5), δ_{C} 73,8 (C-4) e δ_{C} 177,6 (C-7). Na análise em CLAE-EM foi observado o íon de m/z 191,0578

[M-H]⁻ (t_R 2,4 min) correspondente a fórmula molecular C₅H₁₁O₆⁻ (Tabela 5). A análise conjunta desses dados em comparação com a literatura permitiu identificar o ácido quínico (4) (Figura 13) (KELLEY *et al.*, 1976).

Os sinais referentes ao ácido quínico foram observados nos espectros de RMN de ¹H dos extratos secos das espécies de *Myrcia multiflora* (MmAPA e MmEAO), *M. sylvatica* (MsylRAD), *Eugenia biflora* (EbAPA) e *E. punicifolia* (EpEAO e EpAPA). Também, já foi previamente relatado nas espécies de *E. stipitata* McVaugh, *E. chorophylla* O. Berg., *E. pyriformis* Cambess., *M. obtecta* (O. Berg) Kiaersk., *M. laruotteana* Cambess. e *M. bella* Cambess. (DE ARAÚJO *et al.*, 2021; SALDANHA *et al.*, 2013; SALVADOR *et al.*, 2011).

Figura 13 – Estrutura do ácido quínico



5.2.3 Identificação dos compostos fenólicos

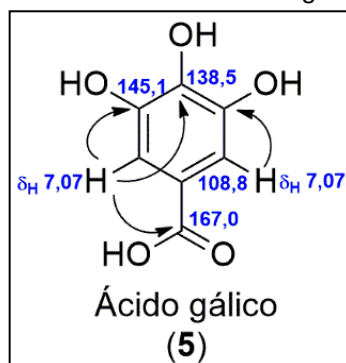
5.2.3.1 Ácido gálico (5)

O espectro de RMN de ¹H da fração 1_6 obtida do fracionamento do extrato de *E. punicifolia* (EpEAO) apresentou um simpleto em δ_H 7,07 (s, H-2, H-6), que mostrou correlação direta ao carbono δ_C 108,8 (C-2 e C-6). As correlações a longa distância de δ_H 7,07 foram observadas com C-1 (δ_C 120,1), C-3 e C-5 (δ_C 145,1), C-4 (δ_C 138,5) e C-7 (δ_C 167,0). Este último confirma a presença de uma carboxila. No espectro de CLAE-EMAR, este constituinte apresentou t_R 2,9 min de m/z 169,0151 [M-H]⁻. A análise dos dados permitiu identificar o ácido 3,4,5-tri-hidroxibenzóico, conhecido como ácido gálico (5) (Figura 14) (SANTANA *et al.*, 2012).

A Tabela 5 apresenta os dados de RMN de 1D e 2D do constituinte (5), também identificado nos extratos secos de *M. multiflora* (MmAPA), *M. guianensis*

(MguAPA), *M. sylvatica* (MsylAPA e MsylRDA), *M. amazonica* (MamAPA) e nos extratos de *E. puniceifolia* (EpEAO, EpAPA e EpRAD). A substância **5** já foi anteriormente reportado nos extratos das folhas de *M. multiflora*, como também de *E. puniceifolia* e *E. uniflora* (GALENO *et al.*, 2014; SCHUMACHER *et al.*, 2015; YOSHIKAWA *et al.*, 1998).

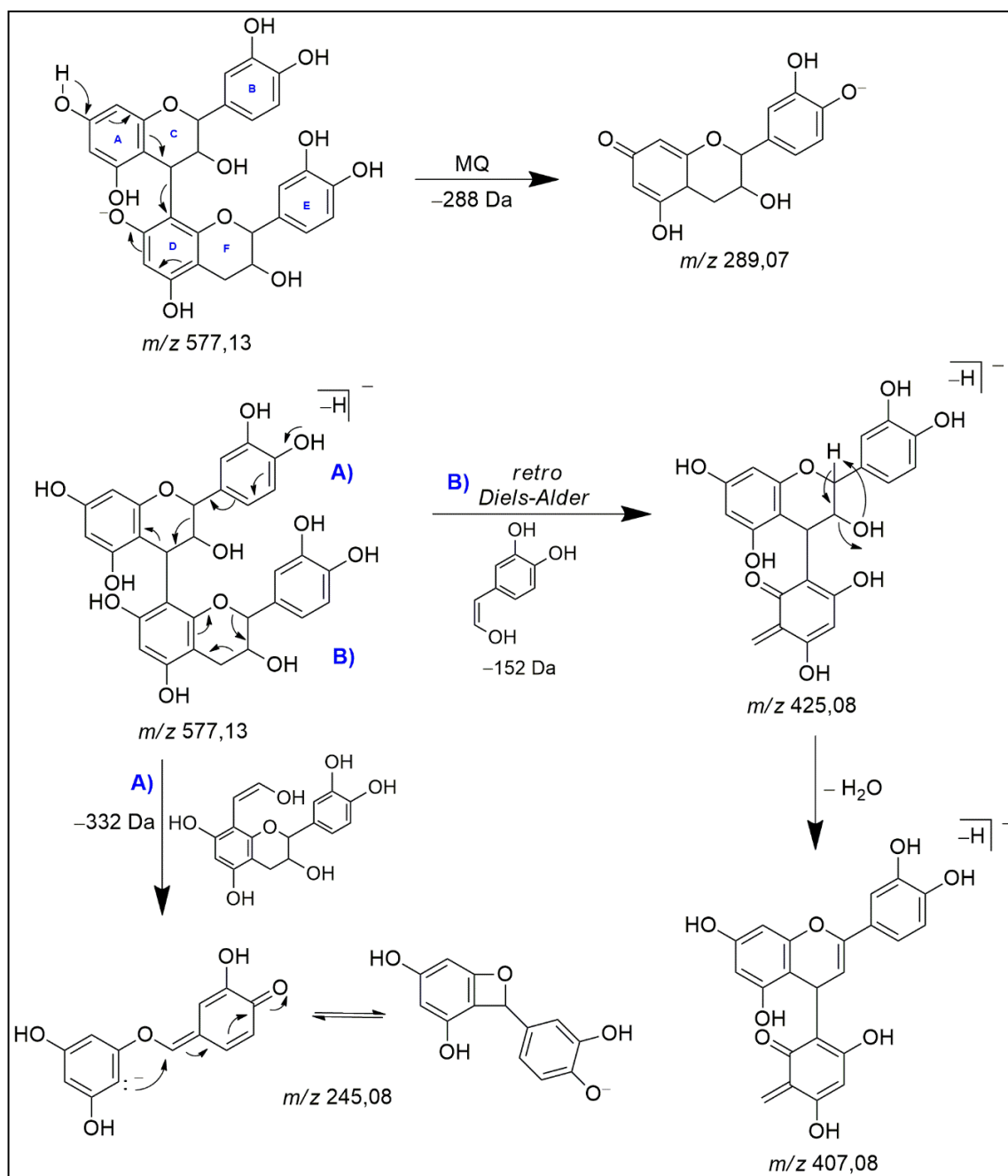
Figura 14 – Estrutura do ácido gálico



5.2.3.2 Procianidina Tipo-B (6)

As análises por CLAE-EMAR evidenciaram para as amostras de *M. multiflora* (MmEAO) e *E. biflora* (EbAPA) que o pico em 3,6 min apresentou os íons de m/z 577,1376 e m/z 577,1386 $[M-H]^-$, respectivamente (Figs. S98 e S129, pgs. 265 e 290). Os dados obtidos dos espectros MS e MS² em comparação com a literatura são correspondentes a procianidina do tipo B (**6**) (C₃₀H₂₅O₁₂). Este constituinte é formado pela condensação de unidades de flavan-3-ol ligadas por C-4 do anel pirano com o C-8 do anel aromático (ligação C4 → C8) (HEMINGWAY & FOO, 1983). A Figura 15 apresenta uma proposta de fragmentação baseada na literatura (HEMINGWAY & FOO, 1983; RUSH *et al.*, 2018). O íon de pico base de m/z 289,07 $[M-H]^-$ observado no espectro de MS² pode ser formado pela clivagem de MQ (Metideto de Quinona) da ligação interflavonoide inferior (RUSH *et al.*, 2018). Além disso, a fragmentação por *retro* Diels-Alder produz o íon de m/z 425,08 $[M-H]^-$, com perda subsequente de água gerando o íon de m/z 407,08 $[M-H]^-$. Já o íon de m/z 245,08 $[M-H]^-$ pode ser gerado pela perda de 332 Da por segmentação α no anel C. Este composto já foi previamente relatado em espécies dos gêneros *Eugenia*, *Psidium*, *Plinia* e *Myrciaria* (ARAUJO *et al.*, 2020; SANTOS, *et al.*, 2020).

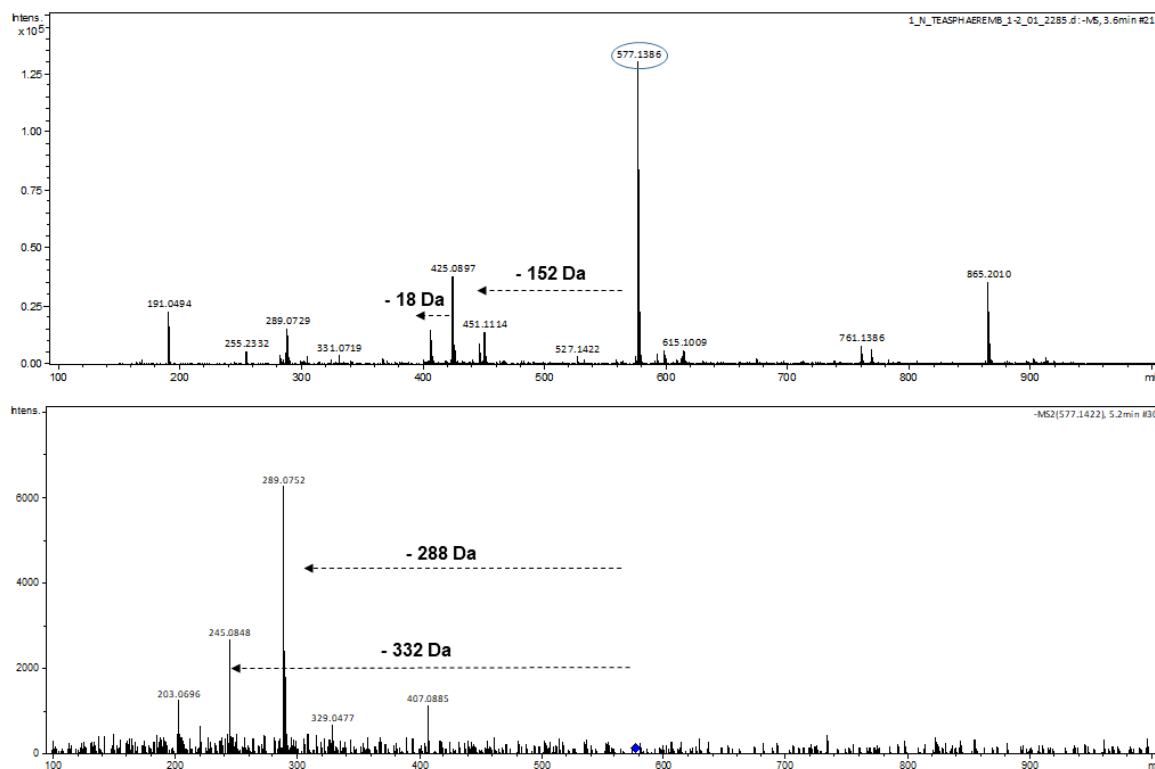
Figura 15 – Proposta de fragmentação do íon de m/z 577,13 $[M-H]^-$



MQ: Metideto de Quinona.

Proposta de fragmentação adaptada de HEMINGWAY; FOO, 1983; RUSH *et al.*, 2018.

Figura 16 – Espectro de ESI-MS modo negativo e MS² do íon de m/z 577,1386



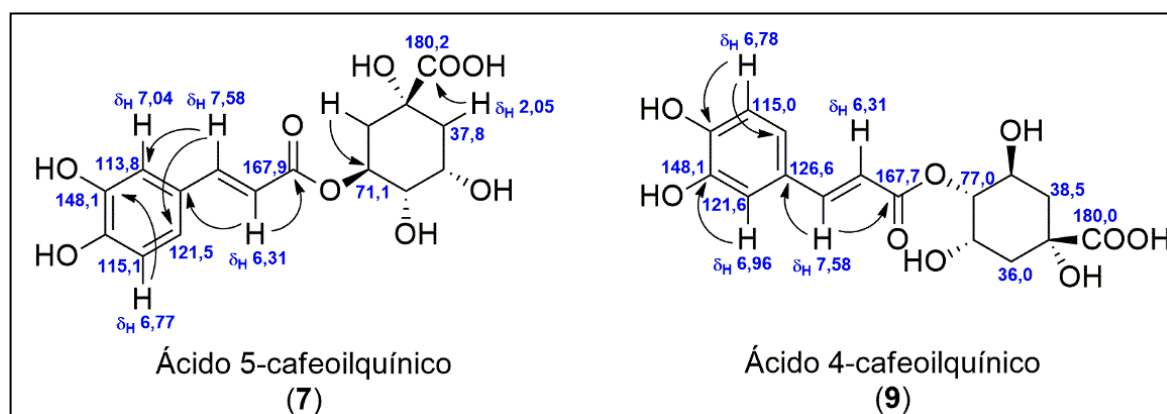
5.2.3.3 Ácido 5-cafeoilquínico (7) e ácido 4-cafeoilquínico (9)

Na análise por CLAE-EMAR o extrato seco das folhas de *M. multiflora* (MmAPA) revelou dois picos de m/z 355,1018 $[M + H]^+$ (t_R 3,7 min) e m/z 355,1013 $[M + H]^+$ (t_R 5,3 min). Os isômeros apresentaram íons fragmentos de pico base de m/z 163,04 $[M + H]^+$, correspondente perda de 192 Da (Figs. S16 e S18, pgs. 194 - 195). Este extrato foi fracionado e as amostras obtidas no t_R 9,16 - 9,98 min (fração 5) e t_R 11,0 - 13,4 min (fração 7) foram analisadas por RMN 1D e 2D.

O espectro de RMN de ^1H da fração 5 apresentou sinais característicos de hidrogênios vinílicos em δ 7,58 (d , $J = 15,9$ Hz; H-7') e δ 6,31 (d , $J = 15,9$ Hz; H-8'). Também, foram observados sinais de hidrogênios em δ 7,04 (d , $J = 2,0$ Hz; H-2'), δ 6,77 (d , $J = 8,0$ Hz; H-5') e δ 6,94 (dd , $J = 8,0$; 2,0 Hz; H-6') característicos de anel aromático trissubstituído dioxigenado. Também, foram observados sinais característicos do ácido quínico em δ 2,05 e δ 2,09 (H-2), δ 4,00 (H-3), δ 3,78 (H-4), δ 1,91 e δ 2,05 (H-6) e em δ 5,40 (H-5), sugerindo uma substituição da hidroxila correspondente. O ácido quínico (4) substituído foi confirmado pela correlação a longa distancia dos hidrogênios em δ 1,91 e δ 2,05 (H-6) com os carbonos em δ_c 74,4 (C-1),

δ_c 36,0 (C-2), δ_c 68,6 (C-3), δ_c 72,2 (C-4), δ_c 71,1 (C-5) e δ_c 37,8 (C-6) e δ_c 180,2 (C-7). Também, os hidrogênios aromáticos em δ 7,04, δ 6,77 e δ 6,94 apresentaram correlação a longa distância com os carbonos em δ_c 148,1 (C-3 e C-4) e δ_c 167,9 (C-9'). Também, foi possível observar por HMBC as correlações dos hidrogênios vinílicos em δ 7,58 e δ 6,31 com o sinal em δ_c 167,9 (C-9') (Figs. S34-36, pgs. 206-208). As análises conjuntas dos dados foram comparadas com a literatura e confirma a estrutura do ácido 5-cafeoilquínico (ácido clorogênico, **7**) (LIU *et al.*, 2020). Já o seu isômero ácido 4-*O*-cafeoilquínico (**9**) foi identificado pelo sinal em δ 77,9 (C-4) em comparação com a literatura (Figura 17) (Figs. S37-38, pgs. 209-211) (ESTORK *et al.*, 2014). Essas substâncias estão sendo relatadas pela primeira vez nessa espécie. O ácido clorogênico já foi descrito em *M. obtecta*, *M. laruttea* e *Eugenia flavescens* DC. (CANTANHEDE FILHO *et al.*, 2017; SALVADOR *et al.*, 2011).

Figura 17 – Estruturas dos ácidos hidroxicinâmicos **7** e **9**



5.2.3.4 Catequina (**8**)

As análises de RMN de 1D e 2D dos extratos secos de MmAPA, MmEAO e EbAPA apresentaram sinais característicos da catequina (**8**). O extrato de MmEAO revelou a presença de um duplete em δ_H 4,55 (*d*, $J = 7,4$ Hz) atribuído ao H-2 do anel C. Também, foram observados dois duplos dupletos referentes ao H-4 em δ_H 2,50 (*dd*, $J = 16,1; 8,2$ Hz) e δ_H 2,84 (*dd*, $J = 16,1; 5,5$ Hz). Além disso, dois dupletos em δ_H 5,92 (*d*, $J = 2,3$ Hz, H-6) e δ_H 5,84 (*d*, $J = 2,3$ Hz, H-8) são condizentes com acoplamento meta do sistema A de um flavanol. Em adição, verificou-se a presença de dois dupletos em δ_H 6,83 (*d*, $J = 1,9$ Hz, H-2'), δ_H 6,75 (*d*, $J = 8,3$ Hz, H-5') e um multipletos

em δ_H 6,71 (H-6') característicos de sistema trissubstituído dioxigenado. Esses sinais apresentaram acoplamento a uma ligação com os sinais em δ_C 113,8 (C-2'), δ_C 114,9 (C-5') e δ_C 118,7 (C-6'), respectivamente. As demais correlações encontram-se na Tabela 5. A identificação estrutural de (8) foi consistente com Ayres e colaboradores (2010), os quais indicaram que se trata da (2*R*, 3*S*)-2,3-*trans*-(+)-catequina (Figura 18). Este é o terceiro relato dessa substância nas folhas de *M. multiflora* (FIGUEIREDO-GONZÁLEZ *et al.*, 2016; YOSHIKAWA *et al.*, 1998).

Figura 18 – Estrutura do flavonoide 8

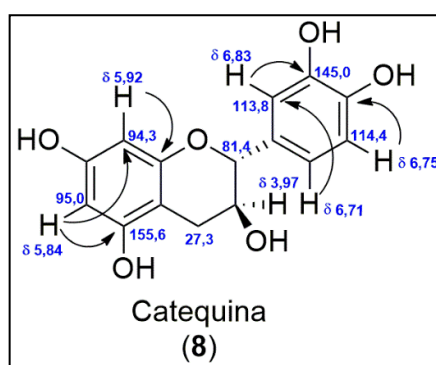
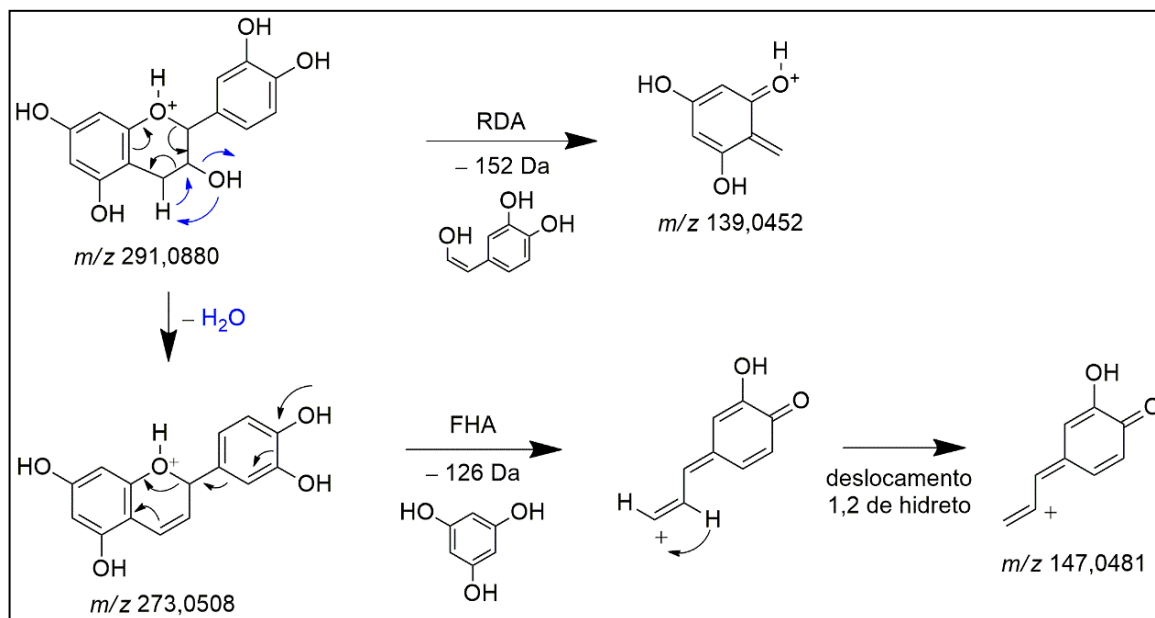


Figura 19 – Proposta de fragmentação do íon de m/z 291,0880 $[M+H]^+$



FHA: Fissão Heterolítica do Anel C; RDA: *retro* Diels-Alder.
Proposta de fragmentação adaptada de FLAMINI, 2013.

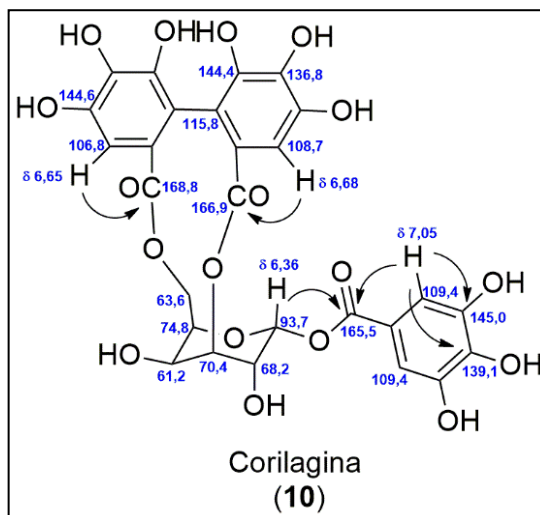
5.2.3.5 Corilagina (**10**)

No espectro de RMN de ^1H da fração 7 do extrato seco de *M. multiflora* (MmAPA) foi possível verificar em mistura sinais característicos da substância corilagina (**10**) (Figura 20). A presença dos simpletos em δ_H 6,65 (H-3) e δ_H 6,68 (H-3') com correlação direta com os sinais em δ_C 106,8 (C-3) e δ_C 108,7 (C-3'), confirma o grupo HHDP (hexahidroxidifenóila). O grupo galoil foi confirmado pelo simpleto em δ_H 7,05 (H-2, H-6) diretamente ligado ao sinal em δ_C 109,4 (C-2, C-6). Também, foi observado um duplete em δ_H 6,36 (*d*, $J = 2,2$ Hz, H-1) ligado a um sinal característico de carbono carbinólico em δ_C 93,7 (C-1). A análise do experimento HMBC permitiu observar as correlações dos hidrogênios em δ_H 7,05 com os sinais em δ_C 119,1 (C-1), δ_C 145,0 (C-3, C-5), δ_C 139,1 (C-4) e com sinal típico de carbonila em δ_C 165,5 (C-7) (Figs. S37-38, pgs. 209-211). As demais correlações encontram-se na Tabela 5.

O espectro de massas de alta resolução de MmAPA apresentou o pico em 5,3 min correspondente ao íon de m/z 633,0726 $[M-H]^-$ (Fig. S19, pg. 196). A estrutura de **10** é confirmada pelo fragmento de m/z 463,06 $[M-170-H]^-$, resultante da perda de ácido gálico ($C_7H_6O_5$, 170 Da). O fragmento observado de m/z 301,00 $[M-463-162-H]^-$, é característico de formação de ácido elágico por lactonização

espontânea da unidade HHDP, o qual confirma que a substância é um elagitanino (YISIMAYILI *et al.*, 2019).

Figura 20 – Estrutura do elagitanino **10**

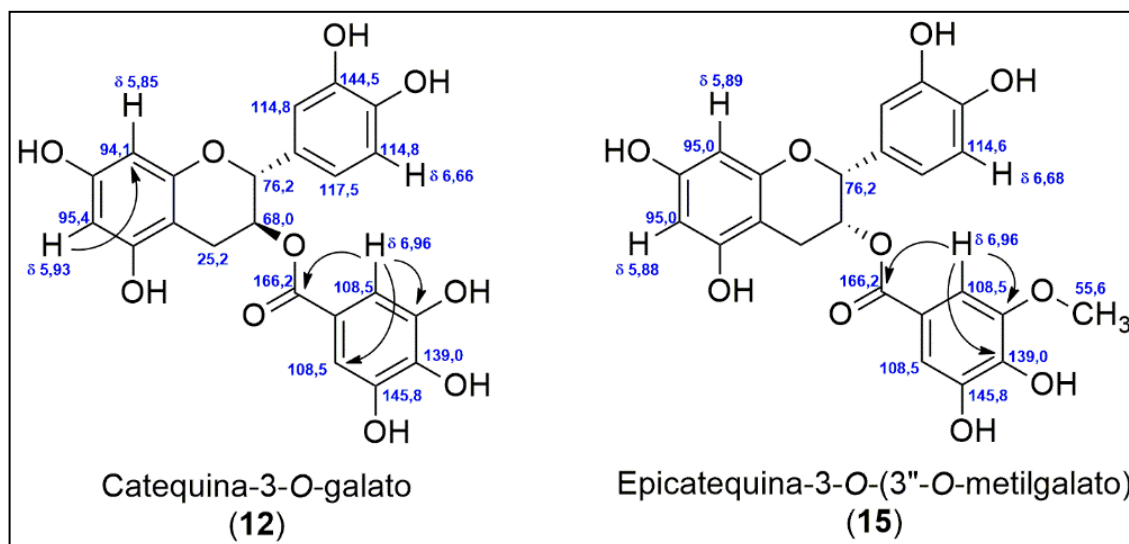


5.2.3.6 Casuarictina (**11**)

No espectro de massas de alta resolução do extrato seco de *E. puniceifolia* (EpEAO) foi observado o pico de m/z 935,0822 $[M-H]^-$ em 5,3 min (Fig. S86, pg. 257), referente à fórmula molecular $C_{41}H_{27}O_{26}$.

O fracionamento do extrato seco de EpEAO permitiu a obtenção da fração1_11 no t_R 13,0 – 13,5 min. Na análise por RMN de ^1H foram observados na região aromática quatro simpletos em sequência em δ_H 6,39 (s, H-3'''), δ_H 6,42 (s, H-3'''), δ_H 6,52 (s, H-3''), δ_H 6,62 (s, H-3'''), característicos de grupo HHDP. Além disso, foi observado um simpleto em δ_H 7,11 (s, H-2', 6'), como também um duplete em δ_H 6,13 (d, $J = 8,8$ Hz, H-1). No HSQC foram observadas as correlações de H-1 (δ_H 6,13) com o carbono carbinólico em δ_C 91,4, de H-3''' (δ_H 6,39) e H-3'''' (δ_H 6,42) com os sinais em δ_C 106,3 (C-3''' e C-3'''), de H-3'' (δ_H 6,52) com C-3'' (δ_C 106,5), de H-3'''' com o carbono em δ_C 107,2 (C-3''') e dos hidrogênios em δ_H 7,11 (H-2', H-6') com o carbono em δ_C 109,1 (H-2', 6'). O simpleto em δ_H 7,11 apresentou correlação a longa distância (^3J) com o carbono em δ_C 164,5 que foi atribuído ao C-7. Verificou-se que o duplete em δ_H 6,13, também possui a mesma correlação em ^3J , confirmando que o grupo galoi está conectado ao carbono anomérico da glucose. A análise conjunta dos dados obtidos por RMN de 1D e 2D (Figs. S70-72, pgs. 242-244) que estão

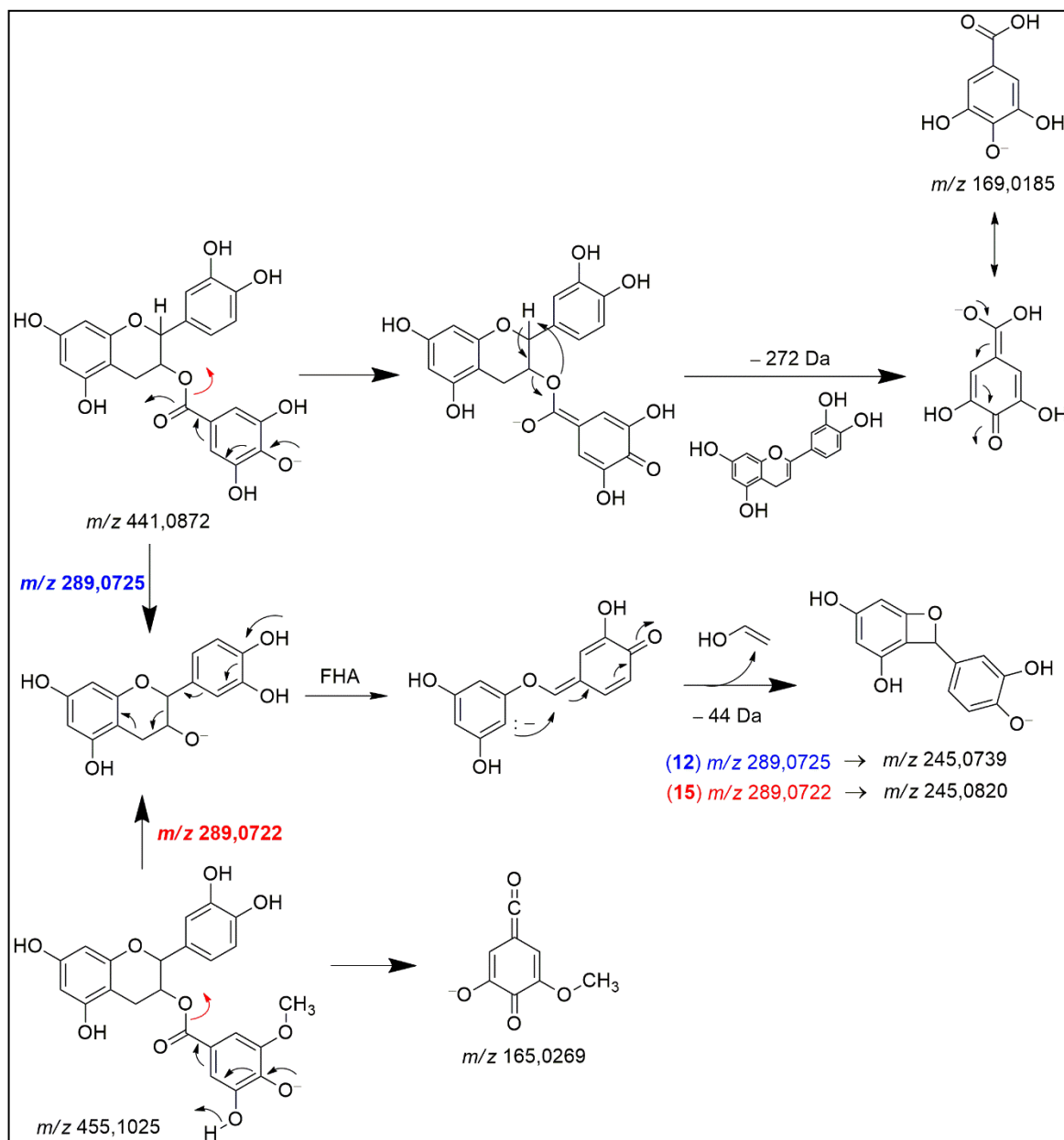
Figura 22 – Estruturas dos flavonoides **12** e **15**



O flavonoide epicatequina 3-O-(3''-O-metilgalato) (**15**) foi identificado nos extratos secos de EpEAO, EpAPA e EpRAD. No espectro de RMN de ¹H de EpEAO foram observados os sinais em δ_H 5,07 (*m*, H-2), e dupletos de acoplamento meta em δ_H 5,88 (*d*, *J* = 1,8 Hz, H-6), δ_H 5,89 (*d*, *J* = 1,8 Hz, H-8). Como também, os sinais em δ_H 6,76 (*m*, H-5') e o duplo duplete em δ_H 6,82 (*dd*, *J* = 8,2; 1,9 Hz, H-6') correspondente ao sistema B flavonoídico. Além disso, foi observado um simpleto largo em 6,96 (*s*, H-2'', 6'') indicando a presença de dois grupos galoil. Os espectros ESI-MS apresentaram os íons de *m/z* 455,1016 (EpAPA), 455,1029 (EpRAD) e 455,1025 (EpEAO) [M-H]⁻ (Figs. S88, S142, S154, pgs. 258, 298, 306, respectivamente). No espectro de segunda ordem de EpEAO foi observado o íon de pico base de *m/z* 289,0722 [M-H]⁻ correspondente a perda de 165 Da. A substância **15** já foi identificada nos frutos de *E. calycina* (ARAUJO *et al.*, 2020) e nos extratos secos de *M. multiflora*, *M. speciosa* e *M. salicifolia* (FIGUEIREDO-GONZÁLEZ *et al.*, 2016).

A Tabela 5 apresenta as correlações diretas obtidas pelo experimento de HSQC e as correlações a longa distância (HMBC) dos sinais de hidrogênios identificados anteriormente. Além disso, foi proposta a fragmentação dos íons de *m/z* 441 e *m/z* 455 que estão apresentados na Figura 23.

Figura 23 – Proposta de fragmentação dos flavonoides **12** e **15**



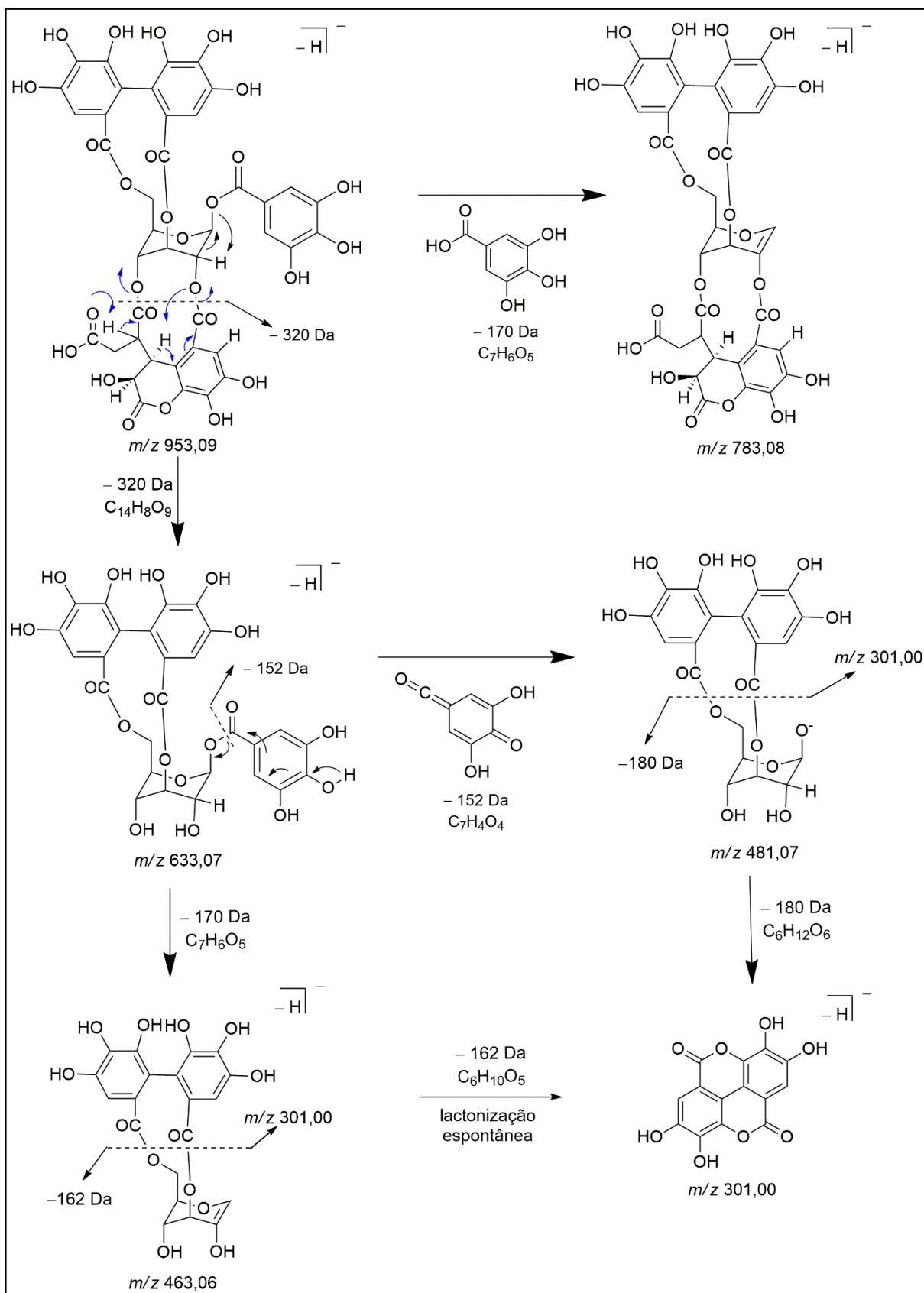
5.2.3.8 Ácido quebulágico (**13**)

No espectro de RMN de ^1H da fração 10 obtida no fracionamento do extrato seco de *M. multiflora* (MmAPA) foi possível observar sinal de hidrogênio anomérico em δ_{H} 6,50 (*m*, H-1). Como também, dois simpletos em δ_{H} 6,62 (H-3'') e δ_{H} 6,84 (H-3'') que confirmam a presença do grupo HHDP (hexahidroxidifenóila). O grupo galoyl foi confirmado pelo sinal em δ_{H} 7,07 (*s*, H-2, H-6) e o simpleto em δ_{H} 7,47 foi atribuído

ao (H-3') do grupo quebuloil. A análise do experimento de HSQC permitiu verificar a correlação direta do hidrogênio H-1 (δ_H 6,50) com o carbono anomérico em δ_C 91,2 (C-1); H-3''' (δ_H 6,62) com o carbono em δ_C 106,8 (C-3'''); de H-3'' (δ_H 6,84) com o carbono em δ_C 109,1 (C-3''); dos hidrogênios do grupo galoil H-2, H-6 (δ_H 7,07) com o carbono em δ_C 109,8; como também o H-3' (δ_H 7,47) com o carbono em δ_C 116,1 (C-3'). O simpleto em δ_H 7,07 apresenta correlação a longa distância com o carbono em δ_C 164,9 (C-7), bem como, o sinal em δ_H 6,50, confirmando que o grupo galoil está ligado ao carbono anomérico da glucose. Além disso, no grupo quebuloil o simpleto em δ_H 7,47 apresentou correlação por HMBC com o carbono em δ_C 165,2 que foi atribuído ao C-7' característico de grupo carbonila, bem como o duplete em δ_H 5,02 apresentou correlação a ^3J com o carbono em δ_C 173,0 (C-7). Em adição, os simpletos do grupo HHDP em δ_H 6,62 e δ_H 6,84 apresentam correlação por HMBC com as carbonilas em δ_C 168,7 e δ_C 166,1, respectivamente (Figs. S40-42, pgs. 212 - 214).

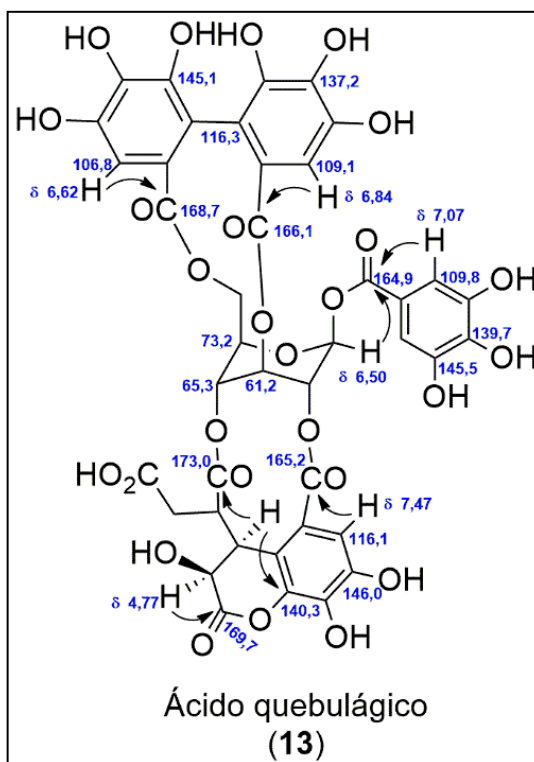
O íon de m/z 953,0940 $[M-H]^-$ ($C_{41}H_{29}O_{27}$) (Fig. S20, pg. 196) foi observado somente em MmAPA no t_R 8,5 min. A Figura 24 apresenta uma proposta de fragmentação dos dados obtidos pelo espectro de massas de alta resolução. O pico de m/z 783,08 $[M-H]^-$ é resultante da perda do ácido gálico (170 Da). Já o pico de m/z 633,07 $[M-H]^-$ foi atribuído à perda da unidade quebuloil (320 Da). Também, foi possível verificar a perda do grupo galoil (152 Da) no pico de m/z 481,07 $[M-633-152-H]^-$. A eliminação da unidade de hexose (180 Da) seguido da lactonização espontânea é possível a formação do ácido elágico, observado no pico base de m/z 301,00 $[M-H]^-$. A análise conjunta dos dados de RMN e CLAE-EMAR em comparação com a literatura possibilitou confirmar a substância **13** como sendo ácido quebulágico (Figura 25) (GUNAWAN-PUTERI & KAWABATA, 2010). Este é o primeiro relato desse constituinte na espécie e no gênero.

Figura 24 – Proposta de fragmentação da substância ácido quebulágico (**13**)



Fragmentação adaptada de CHANG *et al.*, 2019; TAN *et al.*, 2011; YISIMAYILI *et al.*, 2019.

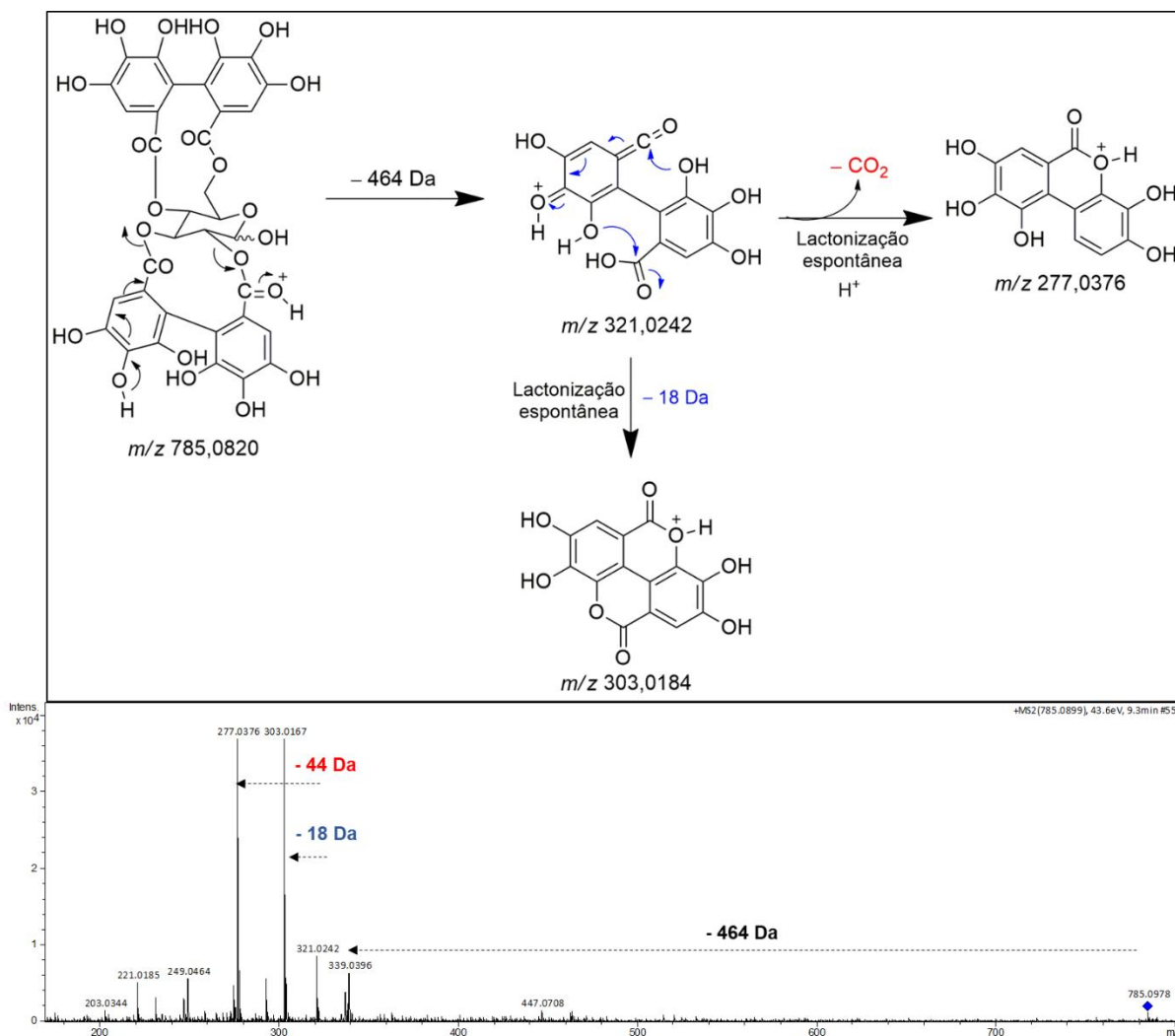
Figura 25 – Estrutura do elagitanino **13**



5.2.3.9 Pedunculagina (**14**)

A substância presente no t_R 9,2 min no extrato seco de *M. multiflora* (MmAPA) apresentou o íon protonado de m/z 785,0820 $[M+H]^+$ (Fig. S21, pg. 197), correspondente a fórmula molecular $C_{34}H_{25}O_{22}$ (erro, -1,53). O espectro de segunda ordem possibilitou observar a perda do grupo HHDP $[M-464+H]^+$ fornecendo o íon de m/z 321,0242. Além disso, sugere-se que ocorre lactonização espontânea com a formação de ácido elágico originando o íon de m/z 303,0184 $[M+H]^+$, conforme demonstrado na Figura 26. Já o pico base de m/z 277,0376 $[M+H]^+$ foi originado por descarboxilação com perda de 44 Da $[M-321-44+H]^+$. A análise do espectro de RMN de ^1H de MmAPA em CD_3OD foram observados os sinais em δ_H 6,50 (s, H-3) e δ_H 6,63 (s, H-3') que possuem correlação direta com os carbonos em δ_C 105,7 (C-3) e δ_C 106,9 (C-3'). Os dados de ESI-MS/MS e RMN são característicos do elagitanino pedunculagina (**14**) (GAO *et al.*, 2010).

Figura 26 – Proposta de fragmentação e espectro ESI-MS/MS modo positivo íon de m/z 785,0820



Fragmentação adaptada de TAN *et al.*, 2011.

5.2.3.10 Miricetina-3-O-glucosídeo (**16**)

A análise da fração 12 de MmAPA por RMN de 1 D e 2D apresenta sinais de hidrogênios aromáticos em δ_H 6,21 (*d*, $J = 2,0$ Hz, H-6), δ_H 6,40 (*d*, $J = 2,0$ Hz, H-8) e δ_H 7,38 (*s*, H-2', 6'), além de um duplete em δ_H 5,20 (*d*, $J = 7,8$ Hz, H-1"). Também, foram observadas as correlações diretas dos sinais δ_H 5,20 (H-1") com ao carbono anomérico em δ_C 104,3 (C-1"), δ_H 6,21 (H-6) com o carbono em δ_C 98,6 (C-6), δ_H 6,40 (H-8) com o carbono em δ_C 93,4 (C-8). Já os sinais de H-2' e H-6' estão ligados diretamente ao carbono em δ_C 108,5 (C-2', 6'). Os dados do experimento HMBC constam na Tabela 5.

O espectro de massas de alta resolução do extrato de MmAPA, apresentou íon de m/z 479,0876 $[M-H]^-$ (Fig. S22, pg. 197). No espectro de segunda ordem, o fragmento $[M-163-H]^-$, referente ao pico base de m/z 316,0287 $[M-H]^-$ comprova a perda de uma glicose por clivagem homolítica (Figura 27). Essas informações e comparação com dados da literatura (REN *et al.*, 2012) permitiu identificar a miricetina-3-O-glucosídeo (**16**) (Figura 28). Esse constituinte também foi identificado nos extratos secos de *M. multiflora* (MmEAO), *E. biflora* (EbAPA) e *E. puniceifolia* (EpAPA e EpEAO).

Figura 27 – Espectro ESI-MS/MS modo negativo do íon de m/z 479,0876

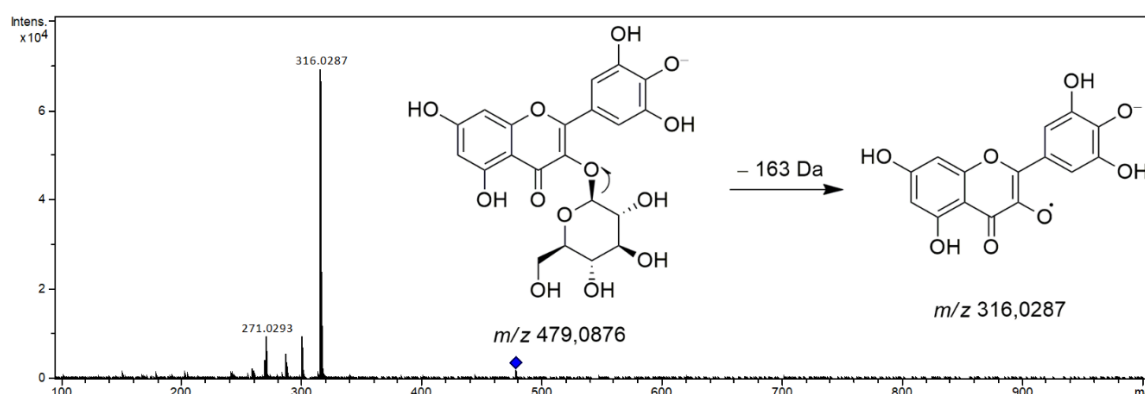
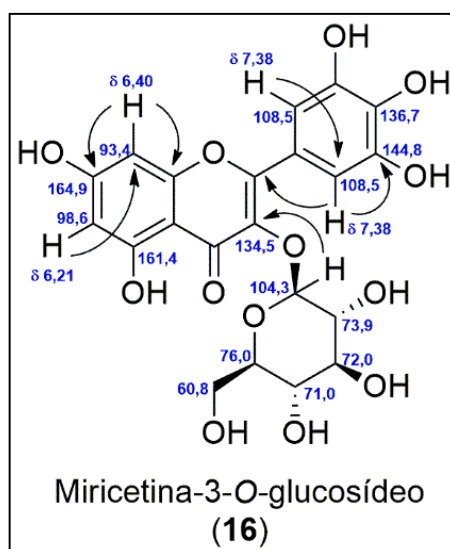


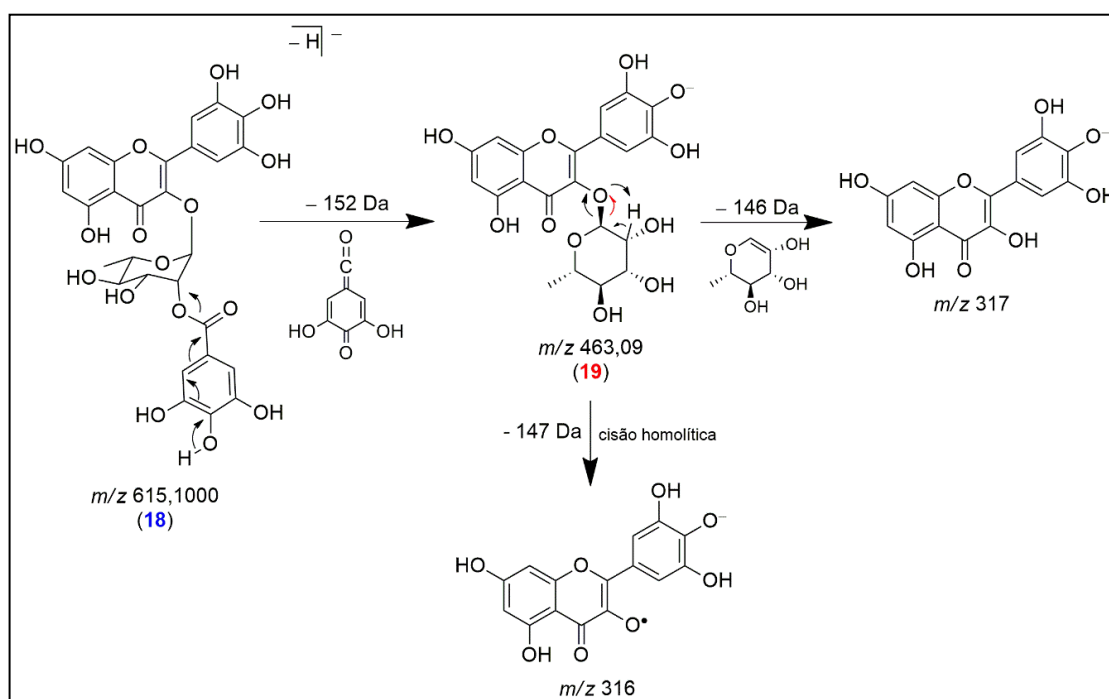
Figura 28 – Estrutura do flavonoide **16**



5.2.3.11 Miricitrina-3-O-(2"-O-galoil)- α -L-ramnosídeo (**18**) e Miricitrina (**19**)

A substância **18** (t_R 11,2 min) presente no extrato de *E. biflora* (EbAPA), apresentou íon de m/z 615,1000 $[M-H]^-$ (Fig. S132, pg. 291) correspondente a fórmula molecular $C_{28}H_{24}O_{16}$ (erro, 1,37). No espectro de segunda ordem foi observado a perda de uma unidade do grupo galoil $[M-152-H]^-$ resultando no íon de m/z 463,0975 $[M-H]^-$. O fragmento referente ao pico base de m/z 316,0232 $[M-463-147]^-$ sugere a perda de uma ramnose (147 Da) por clivagem heterolítica. Já a perda de 146 Da é resultante da clivagem homolítica gerando o íon de m/z 317,0334 $[M-H]^-$ (Figura 29). A substância miricitrina-3-O-(2"-O-galoil)- α -L-ramnosídeo (**18**) já foi anteriormente reportada nas folhas de *E. pyrifolmis* Cambess e *E. uniflora* L. (SANTOS *et al.*, 2020).

Figura 29 – Proposta de fragmentação das substâncias **18** e **19**

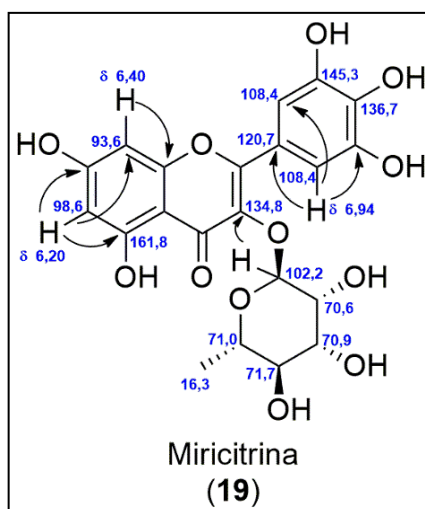


Fonte: MARTINS, 2017.

O mesmo padrão de fragmentação (Figura 29) foi observado para a substância **19** que apresentou íon de m/z 463,0932 $[M-H]^-$ (Fig. S91, pg. 260). Este constituinte foi isolado no fracionamento dos extratos de EpEAO (Fração 8) e MmAPA (fração 14). No espectro de RMN de ^1H da fração 14 foram observados os dupletos em δ_H 6,20 (d , $J = 2,0$ Hz, H-6) e δ_H 6,36 (d , $J = 2,0$ Hz, H-8) referente ao acoplamento

meta do sistema A. Também, foi observado o simpleto em δ_H 6,94 correspondentes aos H-2' e H-6' do anel B tetrassubstituído. Além disso, foram observados os dupletos em δ_H 0,96 (d , $J = 6,1$ Hz, H-6'') característico de hidrogênios metílicos de ramnose e δ_H 5,20 (d , $J = 1,3$ Hz, H-1'') correspondente ao hidrogênio do carbono anomérico em 102,2 ppm. Os dados obtidos do espectro de massas e RMN de 1D e 2D (Figs. S76-S78, pgs. 248-250) em comparação com os dados da literatura confirmam a substância miricitrina (**19**) (Figura 30) (ADEROGBA *et al.*, 2013). A substância **19** foi identificada em todos os extratos secos das espécies de pedra-ume-caá. Também, já foi anteriormente identificado nas folhas de *M. multiflora* (FIGUEIREDO-GONZÁLEZ *et al.*, 2016; YOSHIKAWA *et al.*, 1998), *M. speciosa* e *M. salicifolia* (FIGUEIREDO-GONZÁLEZ *et al.*, 2016). Como também, já foi previamente relatado em *E. puniceifolia* (DOS SANTOS *et al.*, 2020; RAMOS *et al.*, 2019), e nas folhas de *E. brasiliensis* Lam., *E. involucrata* DC., *E. luschnathiana* (O.Berg) Klotzsch ex B.D.Jacks., *E. pyriformis* Cambess., *E. stipata* McVaugh, *E. uniflora* L. e *E. victoriana* Cuatrec. (SANTOS *et al.*, 2020).

Figura 30 – Estrutura do flavonoide **19**

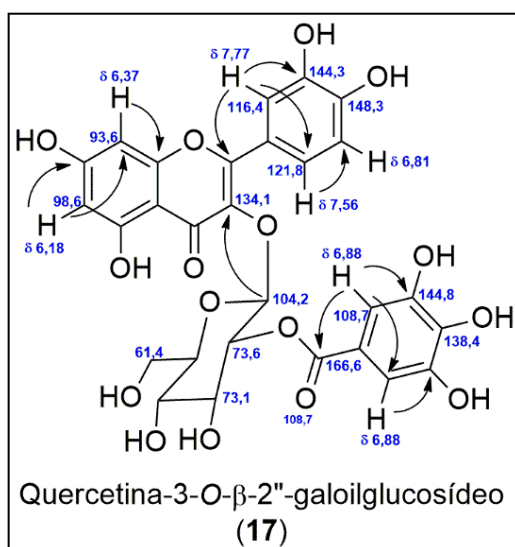


5.2.3.12 Quercetina-3-O- β -2''-galoilglucosídeo (**17**), quercetina-3-O-galactosídeo (**20**), quercetina-3-O-arabinosídeo (**21**) e quercetina-3-O-ramnosídeo (**23**).

O espectro de RMN de ^1H da fração 13 (MmAPA) apresentou dois dupletos referentes aos hidrogênios do sistema A com acoplamento meta em δ 6,18 (d , $J = 2,0$ Hz, H-6) e δ 6,37 (d , $J = 2,0$ Hz, H-8). Também, foi possível observar sinais do sistema

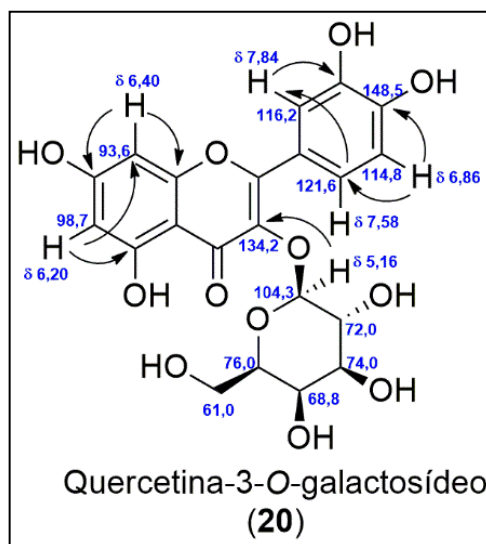
aromático trissubstituído dioxigenado (anel B) em δ 7,77 (*d*, $J = 2,1$ Hz, H-2'), δ 6,81 (*d*, $J = 8,5$ Hz, H-5') e δ 7,56 (*dd*, $J = 8,5$; $2,1$ Hz, H-6'). Além disso, foi observado um simpleto em δ 6,88 (*s*, H-2, H-6) atribuído aos hidrogênios do grupo galoil. Na região dos açúcares foi observado um duplete de hidrogênio anomérico com valor de constante de acoplamento característico de β -glucosídeo em δ 5,10 (*d*, $J = 7,8$ Hz, H-1"). O espectro de massas de alta resolução de MmAPA apresentou o íon precursor de m/z 615,1037 (Fig. S23, pg. 198). Os padrões de fragmentações observados nos espectros de segunda ordem, sugerem a perda de uma unidade do grupo galoil fornecendo o íon de m/z 463,09 $[M-H-152]^-$. O íon de pico base de m/z 300,0 $[M-463-163-H]^-$ foi atribuído a perda de uma hexose por clivagem homolítica (Figura 33). Esses dados corroboram o que já observado nos espectros de RMN de 1D e 2D. Todas as atribuições dos sinais de H e C estão apresentadas na Tabela 5. Em comparação aos dados da literatura a estrutura da quercetina-3-O- β -2"-galoilglucosídeo (**17**) foi confirmada (Figura 31) (ISOBE *et al.*, 1979). Em adição, o constituinte 17 foi identificado na fração 4 de EpEAO. Esse constituinte já foi anteriormente identificado nas folhas de *E. puniceifolia* (DOS SANTOS *et al.*, 2020) e está sendo relatado pela primeira vez em *M. multiflora*.

Figura 31 – Estrutura do flavonoide **17**



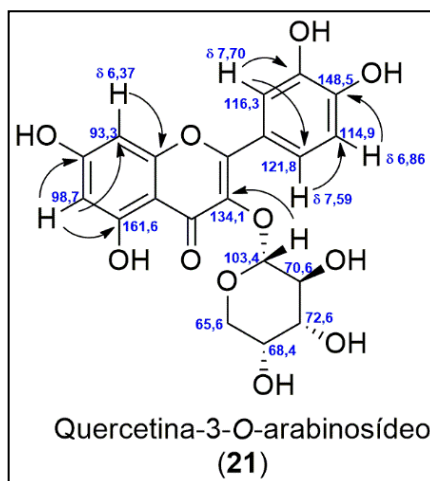
Na análise de RMN ^1H da fração 15 (t_R 23,7 – 24,6 min) de MmAPA foram observados sinais de hidrogênios com acoplamento meta em δ_H 6,20 (d , $J = 2,0$ Hz, H-6) e δ_H 6,40 (d , $J = 2,0$ Hz, H-8) no anel tetrassubstituído no sistema A de flavonoide. Também, foram observados sinais relativos a um sistema trissubstituído dioxigenado (anel B) em δ_H 7,84 (d , $J = 2,2$ Hz, H-2'), δ_H 6,86 (d , $J = 8,5$ Hz, H-5') e δ_H 7,58 (dd , $J = 8,5$; $2,2$ Hz, H-6'). O duplete em δ_H 5,16 (d , $J = 7,7$ Hz, H-1'') foi atribuído ao hidrogênio anomérico. O mapa de HSQC permitiu correlacionar diretamente H-6 (δ_H 6,20) com o carbono em δ_C 98,7 (C-6), o H-8 (δ_H 6,40) com o carbono em δ_C 93,6 (C-8), como também os H-2' com C-2' (δ_C 116,6), H-5' com C-5' (δ_C 114,8) e H-6' com C-6' (δ_C 121,7). As demais correlações observadas no mapa de correlação HMBC constam na Tabela 5. O espectro de massas relativo ao pico em 11,5 min revela o íon precursor de m/z 463,0889 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (Fig. S25, pg. 199) correspondente a fórmula molecular $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{O}_{12}$. No espectro de segunda ordem foi observado o íon de pico base de m/z 300,0328 $[\text{M}-\text{H}]^-$ resultante da perda de 163 Da por clivagem homolítica (Figura 35). Essas informações em comparação com a literatura corroboram a substância quercetina-3-O-galactosídeo (hiperosídeo, **20**) (Figura 32) (WANG *et al.*, 2010). O flavonoide hiperosídeo já foi reportado nas folhas em *M. multiflora*, *M. speciosa* e *M. salicifolia* (FIGUEIREDO-GONZÁLEZ *et al.*, 2016).

Figura 32 – Estrutura do flavonoide hiperosídeo



Nos espectros de RMN de ^1H das frações 15 e 16 (MmAPA) foram observados sinais compatíveis de acoplamento meta em δ 6,20 (*d*, $J = 2,0$ Hz, H-6) e δ 6,37 (*d*, $J = 2,0$ Hz, H-8). Como também, os sinais em δ 7,84 (*d*, $J = 2,1$ Hz, H-2'), δ 6,86 (*d*, $J = 8,5$ Hz, H-5') e δ 7,58 (*dd*, $J = 8,5; 2,1$ Hz, H-6'). O sinal característico de hidrogênio anomérico foi observado em δ_{H} 5,16 (*d*, $J = 6,5$ Hz, H-1''). Os espectros de massas de alta resolução no modo negativo dos extratos secos apresentaram o íon de m/z 433,0799 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (Fig. S26, pg. 199) (MmAPA). O fragmento observado no espectro de MS^2 de pico base de m/z 300,0345 $[\text{M}-133-\text{H}]^-$ é resultante da perda de 133 Da, o qual corrobora a uma unidade arabinose (Figura 35). Os sinais de correlações das análises de HSQC e HMBC são consistentes com os dados da literatura referentes a substância guaijaverina (**21**) (Figura 33) (WANG *et al.*, 2010) (Tabela 5). Esse constituinte também foi identificado na fração 7 de EpEAO (t_{R} 12,5 – 14,0 min), como também nos extratos de MmEAO, EpAPA e EbAPA.

Figura 33 – Estrutura do flavonoide guaijaverina



O espectro de RMN de ^1H da fração 17 de MmAPA foram observados os sinais da aglicona do sistema A de flavonoides com acoplamento meta em δ 6,20 (*d*, $J = 2,0$ Hz, H-6) e δ 6,37 (*d*, $J = 2,0$ Hz, H-8). Outros três sinais foram observados, os quais são característicos do sistema trissubstituído dioxigenado (anel B) em δ 7,33 (*d*, $J = 2,0$ Hz, H-2'), δ 6,91 (*d*, $J = 8,2$ Hz, H-5') e δ 7,30 (*dd*, $J = 8,0; 2,0$ Hz, H-6'). Além disso, foi observado o duplete com deslocamento químico em δ 0,94 (*d*, $J = 6,1$ Hz, H-6'') que evidencia a presença de um grupo metila e a presença de hidrogênio

anomérico atribuído a unidade de uma ramnose em δ 5,34 (*d*, $J = 1,4$ Hz, H-1''). O experimento HSQC possibilitou atribuir a correlação direta de H-1'' com o sinal em δ_c 102,3 (C-1'') e H-6'' com o sinal em δ_c 16,3 (C-6''). A correlação a longa distância de H-1'' com o sinal em δ_c 134,8 (C-3) do anel C, comprova a ligação da unidade ramnose ao oxigênio da aglicona do flavonoide. As demais correlações de HSQC e HMBC constam na Tabela 5. Concernente a análise do espectro de alta resolução de MmAPA revelou a presença do íon de m/z 447,0925 $[M-H]^-$ (t_R 13,1 min) (Fig. S27, pg. 200). O espectro de MS/MS apresentou o íon de pico base de m/z 300,0320 $[M-147-H]^-$ resultante da perda de 147 Da (ramnose) por clivagem homolítica (Figura 35). Portanto, o constituinte quercetina-3-O-ramnosídeo ou quercitrina (**23**) foi confirmado em comparação com a literatura (ADEROGBA *et al.*, 2013). Além disso, a quercitrina (Figura 34) foi identificada na fração 8 de EpEAO e nos extratos de MmEAO, MamAPA, EbAPA, EpAPA e EpRAD. Esse constituinte já foi descrito anteriormente nas folhas de *M. multiflora* (FIGUEIREDO-GONZÁLEZ *et al.*, 2016; YOSHIKAWA *et al.*, 1998), nas folhas e frutos de *E. puniceifolia* (RAMOS *et al.*, 2019; SALES *et al.*, 2014) e nas folhas de *E. uniflora* (SCHUMACHER *et al.*, 2015).

Figura 34 – Estrutura do flavonoide **23**

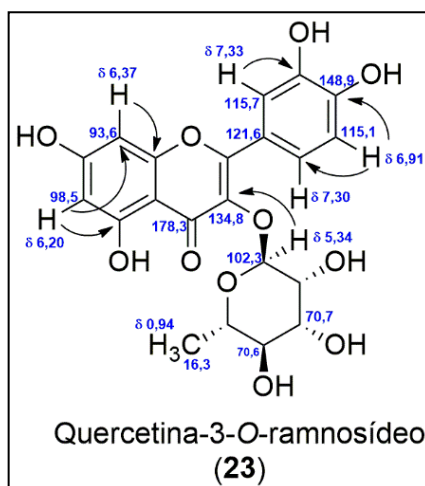
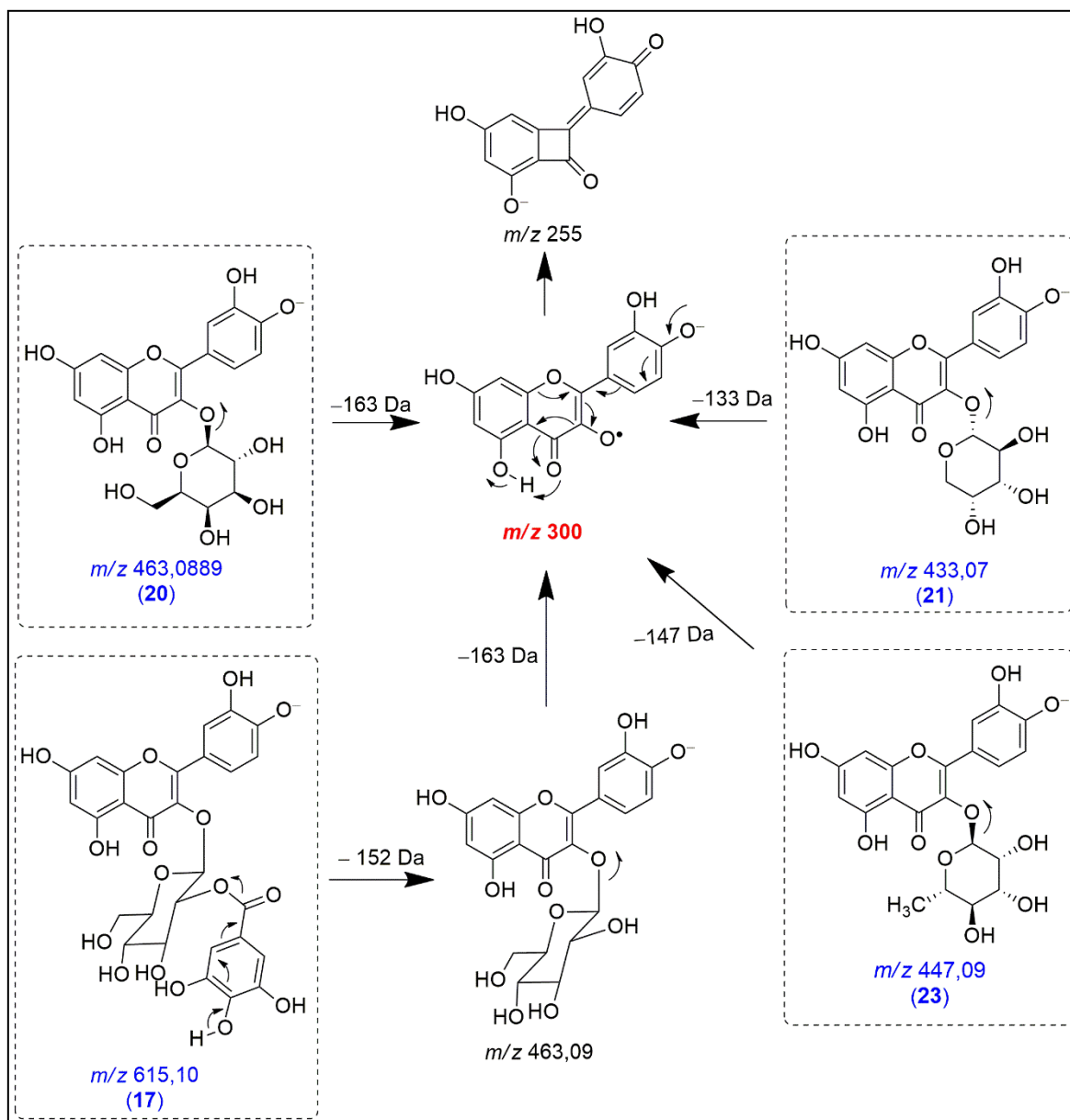


Figura 35 – Proposta de fragmentação dos flavonoides **17**, **20**, **21** e **23**



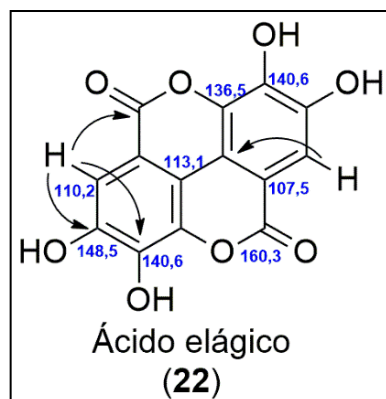
Proposta de fragmentação adaptada de FABRE *et al.*, 2001.

5.2.3.13 Ácido elágico (**22**)

A análise de RMN de ^1H da fração 17 de MmAPA foi observado o simpleto em δ_{H} 7,51 (H-5, 5'), o qual apresentou correlação direta com o carbono em δ_{H} 110,2 (C-5, 5'). No experimento HMBC o hidrogênio em δ 7,51 apresentou correlações com os sinais em δ_{C} 113,1 (C-1, 1'), δ_{C} 136,5 (C-2, 2'), δ_{C} 140,6 (C-3, 3'), δ_{C} 148,2 (C-4, 4'), δ_{C} 107,5 (C-6, 6') e δ_{C} 160,3 (C-7, 7'). Esses dados corroboram aos da literatura referente a substância ácido elágico (**22**) (Figura 36) (LI *et al.*, 1999) e estão

apresentados na Tabela 5. Esse constituinte foi identificado em mistura na fração 8 (t_R 14,0 – 17,0 min) de *E. puniceifolia* (EpEAO) (Figs S79-S81, pgs. 251-253). O ácido elágico já foi identificado em frutos de *E. puniceifolia* e nas folhas de *E. uniflora* (DA CUNHA et al., 2016; RAMOS et al., 2019; SCHUMACHER et al., 2015) e está sendo relatado pela primeira vez em *M. multiflora*.

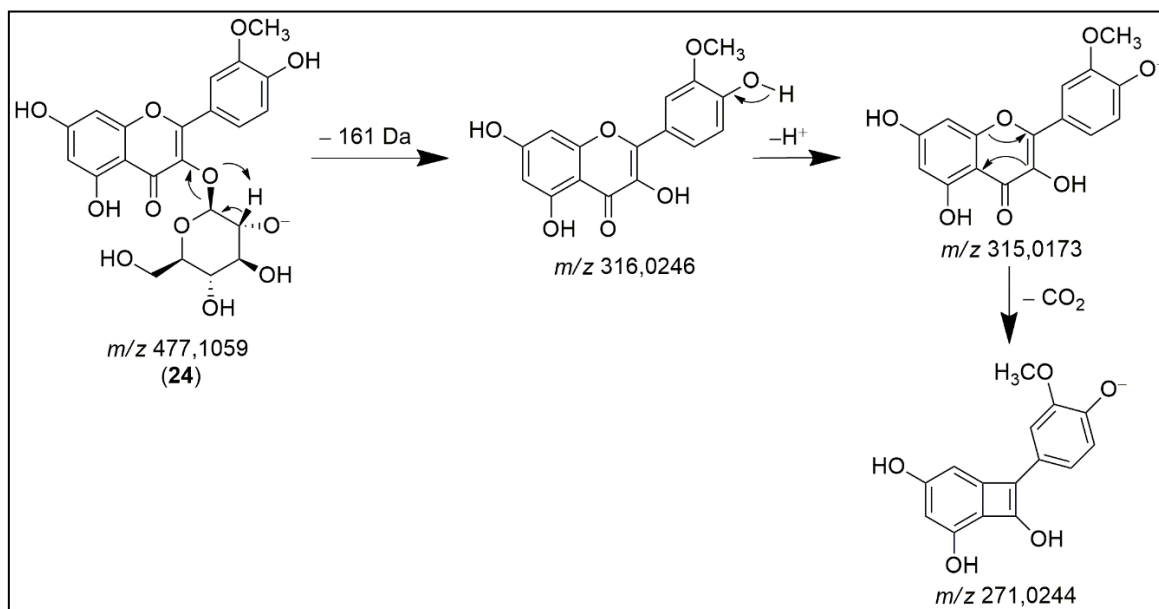
Figura 36 – Estrutura da substância **22**



5.2.3.14 Isoramnetina-3-O-glucosídeo (**24**)

No extrato seco de EbAPA no t_R 13,5 min foi observado o pico do íon de m/z 477,1059 $[M-H]^-$ (Fig. S136, pg. 293) que corresponde a fórmula molecular $C_{22}H_{21}O_{12}$. A fragmentação de segunda ordem levou ao íon de pico base de m/z 316,0246 $[M-161-H]^-$ resultante da perda de hexose (161 Da) por clivagem heterolítica, seguido da perda de um próton fornecendo o íon de m/z 315,0173 $[M-316-H]^-$. Também, foi observado o íon de m/z 271,0244 $[M-315-44-H]^-$ que foi atribuída a perda de CO_2 (44 Da) (Figura 37) levando a propor a substância isoramnetina-3-O-glucosídeo (**24**) em comparação com a literatura (ZHENG et al., 2019). Esse constituinte já foi previamente reportado nas folhas de *M. multiflora*, *M. speciosa* e *M. salicifolia* (FIGUEIREDO-GONZÁLEZ et al., 2016).

Figura 37 – Proposta de fragmentação do flavonoide **24**

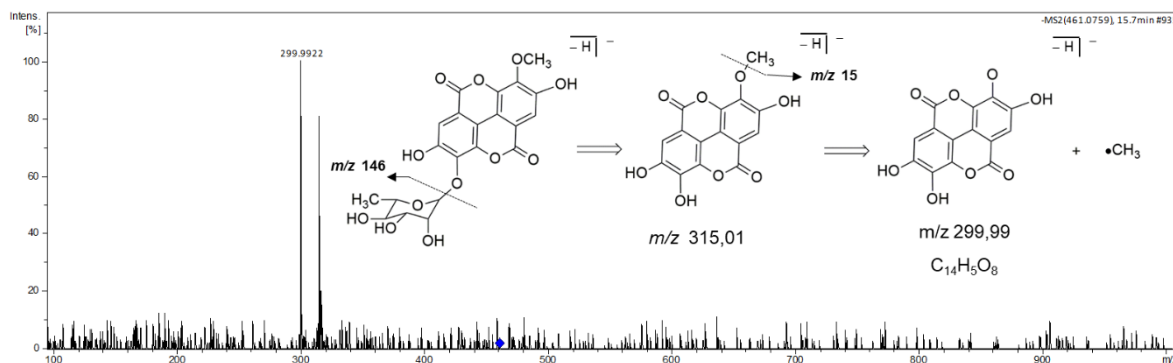


Proposta de fragmentação adaptada de FABRE *et al.*, 2001.

5.2.3.15 Ácido metil elágico ramnosídeo (**25**)

Os extratos secos de *E. biflora* (EbAPA) e *M. sylvatica* (MsylRAD) apresentaram (t_R 14,9 min) os íons precursores de m/z 461,0753 $[\text{M}-\text{H}]^-$ e m/z 461,0774 $[\text{M}-\text{H}]^-$ ($\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{O}_{12}$), respectivamente (Figs. S124 e S137, pgs 286 e 294). O espectro de MS^2 apresentou a fragmentação de m/z 315,0 $[\text{M}-\text{H}]^-$, sugerindo a perda de hexose (146 Da) por clivagem heterolítica ($-\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_4$) (m/z 461,0753 $\rightarrow$ 315,0166). O íon de pico base de m/z 299,99 $[\text{M}-315,0-15-\text{H}]^-$, é resultante da perda do grupo metila (15 Da) por clivagem homolítica (Figura 38). O padrão de fragmentação observado é consistente com a substância ácido metil elágico ramnosídeo (**25**), previamente identificado por Singh *et al.* (2016). O constituinte **25** já foi relatado nos frutos e cascas do caule de *Eucalyptus globulus* Labill (GUO & YANG, 2005; KIM *et al.*, 2001) e em *Syzygium guineense* (Myrtaceae) (DJOUKENG *et al.*, 2007).

Figura 38 – Proposta de fragmentação dos íons produtos observados no espectro de ESI-MS/MS do íon m/z 461,0753 no modo negativo (EbAPA)



Proposta de fragmentação adaptada de SINGH et al., 2016.

5.2.3.16 Kaempferol-3-O-ramnosídeo (**26**)

O flavonol glicosilado **26** foi isolado do extrato seco de MmAPA (fração 18). Sua estrutura (Figura 39) foi determinada por RMN de ^1H , HSQC e HMBC (Figuras S61-S63, p. 233-235). Na região aromática foram observados quatro sinais, o par de dupletos de acoplamento meta em δ 6,21 (d , $J = 2,0$ Hz, H-6) e δ 6,38 (d , $J = 2,0$ Hz, H-8). Como também o par de dupletos quimicamente equivalentes presentes no anel B, em δ 7,77 (d , $J = 8,7$ Hz) correspondentes ao H-2'/H-6' e δ 6,94 (d , $J = 8,7$ Hz) atribuído aos hidrogênios H-3' e H-5'. A unidade ramnosídeo foi identificada pelos dupletos em δ 5,34 (d , $J = 1,6$ Hz, H-1'') e δ 0,92 (d , $J = 5,6$ Hz, H-6'') que evidencia o acoplamento do grupo metila terminal. Os dados do espectro de MS² do íon de m/z 431,1014 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (Fig. S28, pg. 200) e proposta de fragmentação corroboram com essas informações (Figura 40). As demais atribuições estão descritas na Tabela 5. O kaempferol-3-O-ramnosídeo (**26**) também foi identificado nos extratos de *M. multiflora* (MmEAO) e *E. puniceifolia* (EpEAO, EpAPA e EpRAD). Este é o primeiro relato nas folhas de *M. multiflora* e já havia sido reportado anteriormente em *E. puniceifolia* (SALES et al., 2014).

Figura 39 – Estrutura do flavonoide **26**

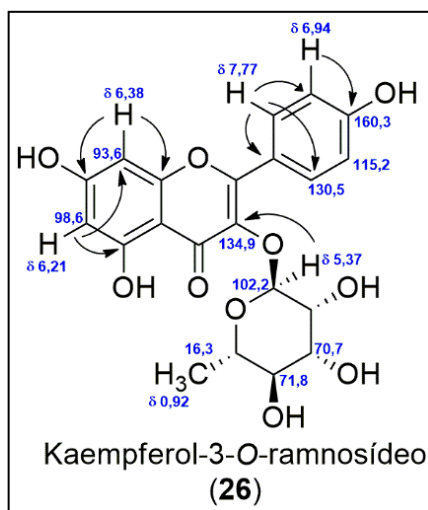
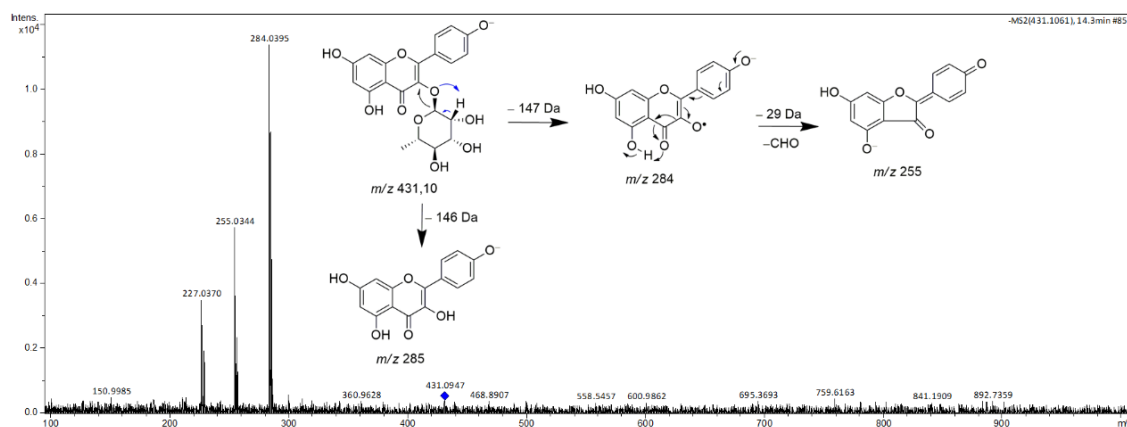


Figura 40 – Espectro ESI-MS/MS modo negativo do íon de m/z 431,1014 (MmAPA) e proposta de fragmentação da substância **26**



Proposta de fragmentação adaptada de LI *et al.*, 2016.

Tabela 5 – Identificação dos constituintes químicos nos extratos secos das folhas de espécies vegetais pedra-ume-caá por CLAE-EMAR e RMN

Tabela 5

Nº	TR (min)	Compostos propostos	m/z observado/teórico [M-H] ⁻ /[M+H] ⁺ (Fórmula empírica, erro, ppm)	MS/MS	δ ¹ H em ppm (J, Hz)	δ ¹³ C em ppm	Extrato/fração (Observações)	Referências
1	—	Sacarose	—	—	5,18 – 5,20 (d; J=3,75 Hz, H-1)	91,5 – 92,7 (C-1) 104,4 – 105,8 (C-5').	Presente nos 10 extratos ¹ .	RAMOS <i>et al.</i> , 2019.
2	2,2	α-D-glicopirranose	179,0567/ 179,056112 (C ₆ H ₁₁ O ₆)	—	4,92 (d; J=3,53 Hz, H-1).	92,7 (C-1); 73,5 (C-2).	EpAPA ¹ (Também presentes nos demais extratos) ¹ .	RAMOS <i>et al.</i> , 2019.
3		β-D-glicopirranose	(3,28)	—	4,28 (d; J=7,70 Hz, H-1).	98,7 (C-1).		
4	2,4	Ácido quínico	191,0578/ 191,056112 (C ₇ H ₁₁ O ₆) (8,84)	—	1,63-1,66 (m, H-2a, H-2b) 1,54 (dd, J=13,8; 5,3; H-6a); 1,78 (dd, J=13,8; 3,8; H-6b).	38,8 (C-2), 67,3 (C-3), 73,8 (C-4), 67,8 (C-5), 37,1 (C-6), 177,6 (C-7).	EpRAD ¹ (Presente em MmAPA, EpAPA, EbAPA, MmEAO, EpEAO, MsylRAD) ¹ .	KELLEY <i>et al.</i> , 1976.
5	2,9	Ácido gálico	169,0159/ 169,014247 (C ₇ H ₅ O ₅) (9,78)	—	7,07 (s, H-2,6)	120,1 (C-1), 108,8 (C-2, 6), 145,1 (C-3,5), 138,5 (C-4), 167,0 (C-7).	EpEAO ² (fração1_6) (Presente em EpAPA, EpRAD, MmAPA ² , MsylAPA, MsylRAD, MamAPA, MguAPA, MmEAO) ¹ .	SANTANA <i>et al.</i> , 2012.
6	3,6	Procianidina tipo B dimérica	577,1376/ 577,135150 (C ₃₀ H ₂₅ O ₁₂) (4,25)	289,0734 (100%), 407,0854 (91,5%), 245,0886 (33,9%).	—	—	EbAPA (Presente MmEAO).	SANTOS <i>et al.</i> , 2020.

Tabela 5

Nº	TR (min)	Compostos propostos	m/z observado/teórico	MS/MS	δ ¹ H em ppm (J, Hz)	δ ¹³ C em ppm	Extrato/fração (Observações)	Referências
			[M–H] [–] /[M+H] ⁺ (Fórmula empírica, erro, ppm)					
7	3,7	Ácido clorogênico	355,1018/ 355,102359 [M+H] ⁺ (C ₁₆ H ₁₉ O ₉) (–1,57)	163,0454 (100%).	2,05 (<i>m</i> , H-2), 2,09 (<i>m</i> , H-2), 4,00 (<i>m</i> , H-3); 3,78 (<i>m</i> , H- 4), 5,40 (<i>m</i> , H-5); 1,91 (<i>dd</i> , <i>J</i> =14,0; 6,3 Hz, H-6), 2,05 (<i>m</i> , H-6), 7,04 (<i>d</i> , <i>J</i> =2,0 Hz, H-2'); 6,77 (<i>d</i> , <i>J</i> =8,0 Hz, H-5'); 6,94 (<i>dd</i> , <i>J</i> =8,0; 2,0 Hz, H- 6'); 7,58 (<i>d</i> , <i>J</i> =15,9; H-7'); 6,31 (<i>d</i> , <i>J</i> =15,9; H-8').	74,4 (C-1), 36,0 (C-2), 68,6 (C-3), 72,2 (C-4), 71,1 (C-5), 37,8 (C-6), 180,2 (C-7), 126,5 (C-1'), 113,8 (C-2'), 148,1 (C-3', 4'), 115,1 (C-5'), 121,5 (C-6'); 145,4 (C-7'), 114,5 (C-8'), 167,5 (C-9').	MmAPA ² (fração 5)	LIU; NISAR; WAN, 2020; SINGH et al., 2016b.
8	4,2	Catequina	289,0732/ 289,071762 (C ₁₅ H ₁₃ O ₆) (4,97)	—	4,56 (<i>d</i> , <i>J</i> =7,5 Hz, H-2); 3,97 (<i>m</i> , H-3); 2,50 (<i>dd</i> , <i>J</i> =16,1; 8,2 Hz, H-4); 2,84 (<i>dd</i> , <i>J</i> =16,1; 5,4 Hz, H- 4); 5,85 (<i>d</i> , <i>J</i> =2,3 Hz, H-6); 5,92 (<i>d</i> , <i>J</i> =2,3 Hz, H-8); 6,83 (<i>d</i> , <i>J</i> =1,9 Hz, H-2'); 6,76 (<i>d</i> , <i>J</i> =8,1 Hz, H-5'); 6,71 (<i>m</i> , H-6').	81,4 (C-2); 67,4 (C-3); 27,1 (C-4); 94,1 (C-6); 155,9 (C-5); 156,6 (C-7) 94,8 (C-8); 155,7 (C-9), 99,8 (C-10); 130,9 (C-1'); 113,8 (C-2'); 144,8 (C-3'); 144,8 (C-4'); 114,6 (C-5'); 118,4 (C-6').	EbAPA ² (Presente em MmEAO e MmAPA) ² .	AYRES et al., 2010; FLAMINI, 2013.

Tabela 5

Nº	TR (min)	Compostos propostos	m/z	MS/MS	δ ¹ H em ppm (J, Hz)	δ ¹³ C em ppm	Extrato/fração (Observações)	Referências
			observado/teórico					
			[M–H] ⁻ /[M+H] ⁺ (Fórmula empírica, erro, ppm)					
9	5,3	Ácido 4-O- cafeoilquínico	355,1013/ 355,102359	163,0445 (100%).	2,04 (<i>m</i> , H-2), 4,28 (<i>m</i> , H-3),4,91 (H-4), 3,98 (<i>m</i> , H-5), 1,96 (<i>m</i> , H-6), 2,10 (<i>m</i> , H-6), 7,02 (<i>d</i> , J=2,0 Hz, H-2'); 6,78 (<i>d</i> , J=8,1 Hz, H-5'); 6,96 (<i>dd</i> , J=8,1; 2,0 Hz, H-6'); 7,62 (<i>d</i> , J=15,9; H-7'); 6,35 (<i>d</i> , J=15,9; H-8').	75,4 (C-1), 36,0 (C-2), 67,3 (C-3), 77,9 (C-4), 68,2 (C-5); 38,5 (C-6), 180,0 (C-7), 126,6 (C-1'), 114,2 (C-2'); 148,1 (C-3', 4'); 115,0 (C-5'), 121,6 (C-6'); 145,6 (C-7'), 114,2 (C-8'); 167,7 (C-9').	MmAPA ² (fração 7)	ESTORK <i>et al.</i> , 2014.
			[M+H] ⁺ (C ₁₆ H ₁₉ O ₉) (–2,98)					
10	5,3	Corilagina	633,0726/ 633,072240	301,0055 (100%), 275,0263 (17,8%), 463,0618 (15,0%).	Glucose: 6,36 (<i>d</i> ; J=2,2 Hz, H-1), 3,98 (<i>m</i> , H-2), 4,80 (<i>m</i> , H3), 4,46 (<i>m</i> , H-4), 4,51 (<i>m</i> , H-5), 4,95 (<i>d</i> ; J=10,9 Hz, H-6), 4,16 (<i>dd</i> ; J=10,9, 8,0 Hz, H-6); Galoil: 7,05 (s; H-2, 6); HHDP: 6,68 (s; H-3'); 6,65 (s; H-3).	Glucose: 93,7 (C-1), 68,2 (C-2), 70,4 (C-3), 61,2 (C-4), 74,8 (C-5), 63,6 (C-6); Galoil: 119,1 (C-1), 109,4 (C-2,6), 145,0 (C-3,5), 139,1 (C-4), 165,5 (C-7); HHDP: 115,8 (C-1'), 108,7 (C-3'), 144,4 (C-4',6'), 136,8 (C-5'), 166,9 (C-7'), 115,3 (C-1), 106,8 (C-3), 144,6 (C-4,6), 136,3 (C-5), 168,8 (C-7).	MmAPA ² (fração 7)	GUNAWAN- PUTERI & KAWABATA, 2010.
			(C ₂₇ H ₂₁ O ₁₈) (0,57)					

Tabela 5

Nº	TR (min)	Compostos propostos	m/z observado/teórico	MS/MS	δ ¹ H em ppm (J, Hz)	δ ¹³ C em ppm	Extrato/fração (Observações)	Referências
			[M-H] ⁻ /[M+H] ⁺ (Fórmula empírica, erro, ppm)					
11	5,3	Casuarictina	935,0822/ 935,079605 (C ₄₁ H ₂₇ O ₂₆) (2,78)	—	Glucose: 6,13 (<i>d</i> , <i>J</i> =8,8 Hz, H-1), 5,20 (<i>dd</i> , <i>J</i> =10,0; 0,75 Hz, H-2), 5,45 (<i>dd</i> , <i>J</i> =10,0; 9,1 Hz, H-3), 5,17 (<i>dd</i> , <i>J</i> =10,0; 6,5 Hz, H-4), 4,37 (<i>m</i> , H-5), 3,91 (<i>m</i>)/5,37 (<i>dd</i> , <i>J</i> =13,3; 6,5 Hz, H _a -6/H _b -6). Galoi: 7,11 (<i>s</i> , H-2', 6'). 2 – HHDP: 6,52 (<i>s</i> , H-3''). 3 – HHDP: 6,39 (<i>s</i> , H-3'''). 4 – HHDP: 6,42 (<i>s</i> , H-3'''). 6 – HHDP: 6,62 (<i>s</i> , H-3''').	Glucose: 91,4 (C-1), 75,0 (C-2), 76,6 (C-3), 68,2 (C-4), 72,6 (C-5), 62,3 (C-6). Galoi: 109,1 (C-2', 6'), 145,3 (C-3', 5'), 139,7 (C-4'), 164,5 (C-7'). 2 – HHDP: 114,5 (C-1''), 106,5 (C-3''), 144,6 (C-4'', 6''), 136,2 (C-5''), 167,4 (C-7''). 3 – HHDP: 113,5 (C-1'''), 106,3 (C-3'''), 144,5 (C-4''', 6'''), 136,2 (C-5'''), 169,3 (C-7'''). 4 – HHDP: 114,3 (C-1'''), 106,3 (C-3'''), 144,8 (C-4''', 6'''), 136,3 (C-5'''), 168,4 (C-7'''). 6 – HHDP: 115,1 (C-1'''), 107,2 (C-3'''), 144,5 (C-4''', 6'''), 136,2 (C-5'''), 168,1 (C-7''').	EpEAO ² (fração01_11)	SERNA & MARTÍNEZ, 2015.

Tabela 5

Nº	TR (min)	Compostos propostos	m/z observado/teórico	MS/MS	δ ¹ H em ppm (J, Hz)	δ ¹³ C em ppm	Extrato/fração (Observações)	Referências
			[M–H] [–] /[M+H] ⁺ (Fórmula empírica, erro, ppm)					
12	8,5	Catequina 3-O- galato	441,0860/ 441,082720 (C ₂₂ H ₁₇ O ₁₀) (7,44)	169,0216 (100%), 289,0731 (99,7%), 245,0799 (67,9%).	Aglicona: 5,04 (<i>m</i> , H-2); 5,35 (<i>m</i> , H-3), 6,66 (<i>d</i> ; J=8,0 Hz; H-5'); 6,76 (<i>dd</i> ; J=8,0; 2,0 Hz, H-6'). Galoil: 6,97 (<i>s</i> ; H-2", 6").	Aglicona: 76,3 (C-2), 67,9 (C- 3), 114,8 (C-5'), 117,3 (C-6'). Galoil: 108,5 (C-2", 6"), 119,4 (C-1"), 145,6 (C-3", 5"), 138,5 (C-4"), 165,8 (C- 7").	EpAPA ¹ (Presente em EpEAO, EpRAD) ¹ .	DAVIS <i>et al.</i> , 1996; YUZUAK <i>et al.</i> , 2018.
						Glucose: 91,2 (C-1), 71,0 (C- 2), 61,2 (C-3), 65,3 (C-4), 73,2 (C-5); 63,3 (C-6). Galoil: 119,1 (C-1'), 109,8 (C- 2',6'), 145,5 (C-3',5'), 139,7 (C-4'), 164,9 (C-7'). 3" – HHDP: 116,3 (C-1"), 109,1 (C-3"), 144,0 (C-4",6"), 137,2 (C-5"), 166,1 (C-7"). 3" – HHDP: 115,0 (C-1"), 106,8 (C-3"), 144,9 (C- 4",6"), 136,2 (C-5"), 168,7 (C-7"). Quebuloil: 169,7 (C- 1), 65,9 (C-2), 40,4 (C-3), 39,5 (C-4), 30,9 (C-5), 175,5 (C-6), 173,0 (C-7), 115,2 (C- 1'), 116,1 (C-3'), 146,0 (C-4'), 139,3 (C-5'), 140,3 (C-6'), 165,2 (C-7').		
13	8,5	Ácido quebulágico	953,0940/ 953,090169 (C ₄₁ H ₂₉ O ₂₇) (4,02)	301,0003 (100%), 275,0209 (30,0%), 481,0717 (23,0%), 633,0756 (22,4%).	Glucose: 6,50 (<i>sl</i> , H-1), 5,38 (<i>m</i> , H-2), 5,87 (<i>m</i> , H-3), 5,22 (<i>d</i> , J=3,2 Hz, H-4), 5,82* (H- 5); 4,38 (<i>dd</i> ; J=10,2; 7,2 Hz, H-6), 4,87* (H-6); Galoil: 7,07 (<i>s</i> ; H2',6'); HHDP: 6,62 (<i>s</i> , H-3"); 6,84 (<i>s</i> , H-3"); Quebuloil: 4,77 (<i>d</i> , J=7,2, H- 2); 5,02 (<i>dd</i> ; J=7,2; 1,6 Hz, H-3); 3,78 (<i>m</i> , H-4); 2,14 (<i>m</i> , H-5); 7,47 (<i>s</i> , H-3'). *sobreposição com sinal residual de H ₂ O.		MmAPA ² (fração 10)	GUNAWAN- PUTERI & KAWABATA, 2010.

Tabela 5

Nº	TR (min)	Compostos propostos	m/z	MS/MS	δ ¹ H em ppm (J, Hz)	δ ¹³ C em ppm	Extrato/fração (Observações)	Referências
			[M–H] [–] /[M+H] ⁺ (Fórmula empírica, erro, ppm)					
14	9,2	Pedunculagina	785,0820/ 785,083199	277,0376 (100,0%),	HHDP: 6,63 (<i>sl</i> , H-3'); 6,50 (<i>sl</i> , H-3).	HHDP: 106,9 (C-3'), 105,7 (C-3).	MmAPA ²	GAO <i>et al.</i> , 2010.
			[M+H] ⁺ (C ₃₄ H ₂₅ O ₂₂) (–1,53)	303,0167 (99,8 %), 321,0242 (23,1%).				
15	10,0	Epicatequina 3-O- (3"-O-metilgalato)	455,1029/ 455,098370	—	Aglicona: 5,05 (<i>m</i> , H-2); 5,89 (<i>d</i> , J= 2,3, H-8), 5,90 (<i>d</i> , J= 2,3, H-6), 6,66 (<i>m</i> , H-5'); 6,73 (<i>m</i> , H-6'). Galoil: 6,96 (<i>s</i> ; H-2", 6").	Aglicona: 76,3 (C-2), 95,1 (C-6), 95,1 (C-8), 129,3 (C-1'), 144,7 (C-3',4'), 114,6 (C-5'), 118,0 (C-6'). Galoil: 108,8 (C-2", 6"), 147,8 (C-3", 5"), 138,5 (C-4"), 166,1 (C-7"). Grupo metoxi: 55,6 (C-3").	EpRAD ¹ (Presente em EpEAO e EpAPA) ¹ .	DAVIS <i>et al.</i> , 1996.
			(C ₂₃ H ₁₉ O ₁₀) (9,95)					
16	10,1	Miricetina-3-O- glucosídeo	479,0876/ 479,083114	316,0287 (100%), 271,0923 (13,9%).	Aglicona: 6,21 (<i>d</i> ; J=2,0 Hz, H-6); 6,40 (<i>d</i> ; J=2,0 Hz; H-8); 7,38 (<i>s</i> ; H-2', 6'). Glicose: 5,20 (<i>d</i> , J=7,8 Hz, H-1"), 3,49 – 3,85 (<i>m</i> , H2" – 6").	Aglicona: 157,4 (C-2), 134,5 (C-3), 161,4 (C-5), 98,6 (C- 6), 164,9 (C-7), 93,4 (C-8), 157,0 (C-9), 104,0 (C-10), 120,4 (C-1'), 108,5 (C-2', 6'), 144,8 (C-3', 5'), 136,7 (C-4'). Glucose: 104,3 (C-1"), 73,9 (C-2"), 72,0 (C-3"), 71,0 (C-4"), 76,0 (C-5"), 60,8 (C-6").	MmAPA ² (fração 12) (Presente em MmEAO, EpEAO, EpAPA).	REN <i>et al.</i> , 2012.
			(C ₂₁ H ₁₉ O ₁₃) (9,36)					

Tabela 5

Nº	TR (min)	Compostos propostos	m/z	MS/MS	δ ¹ H em ppm (J, Hz)	δ ¹³ C em ppm	Extrato/fração (Observações)	Referências	
			observado/teórico						
			[M–H] [–] /[M+H] ⁺ (Fórmula empírica, erro, ppm)						
17	10,7	Quercetina-3-O- β -2"- galoilglucosídeo			Aglicona: 6,18 (<i>d</i> ; J=2,0 Hz, H-6); 6,37 (<i>d</i> ; J=2,0 Hz; H-8); 7,77 (<i>d</i> ; J=2,1 Hz, H-2'), 6,81 (<i>d</i> ; J=8,5 Hz, H-5'), 7,56 (<i>dd</i> ; J=8,5; 2,1 Hz, H-6'). Glucose: 5,10 (<i>d</i> , J=7,8 Hz, H-1"), 3,58 (<i>m</i> , H-2"), 3,79 (<i>m</i> , H-3"), 3,85 (<i>dd</i> ; J=9,6; 7,7 Hz, H-4"), 3,45 (<i>m</i> , H-5"), 3,75/3,88 (<i>m</i> , H-6"). Galoil: 6,88 (<i>s</i> , C-2, 6).	Aglicona: 157,3 (C-2), 134,1 (C-3), 98,6 (C-6), 164,2 (C-7), 93,6 (C-8), 157,0 (C-9), 104,1 (C-10), 116,4 (C-2'), 144,3 (C-3'), 148,3 (C-4'), 114,8 (C-5'), 121,8 (C-6'). Glucose: 104,2 (C-1"), 73,6 (C-2"), 73,1 (C-3"), 71,7 (C-4"), 76,5 (C-5"), 61,4 (C-6"). Galoil: 108,7 (C-2, 6), 144,8 (C-3, 5), 138,4 (C-4), 166,6 (C-7).	MmAPA ² (fração 13) EpEAO ² (fração 4)	ISOBE <i>et al.</i> , 1979.	
			615,1037/	300,0332					
			615,099158	(100%),					
			(C ₂₈ H ₂₄ O ₁₆)	463,0968					
			(7,38)	(83,7),					
				301,0389					
				(64,4%).					
18	11,2	Miricetina-3-O- (2"-O-galoil)- α - ramnosídeo	615,1000/	316,0232 (100%),	—	—	EbAPA	SANTOS <i>et al.</i> , 2020.	
			615,099158	463,0975 (67,7%),					
			(C ₂₈ H ₂₄ O ₁₆)	317,0334 (24,9%).					
			(1,37)						
19	11,2	Miricitrina			Aglicona: 6,20 (<i>d</i> ; J=2,0 Hz, H-6); 6,36 (<i>d</i> ; J=2,0 Hz; H-8); 6,94 (<i>s</i> ; H-2', 6').	Aglicona: 158,1 (C-2), 134,8 (C-3), 161,8 (C-5), 98,6 (C-6), 164,6 (C-7), 93,6 (C-8), 157,0 (C-9), 104,3 (C-10), 120,7 (C-1'), 108,4 (C-2', 6'), 145,3 (C-3', 5'), 136,7 (C-4').	MmAPA ² (Fração 14) (Presente em	ADEROGBA <i>et al.</i> , 2013.	
			465,1030/	319,0494	Ramnose: 5,30 (<i>d</i> , J=1,3 Hz, H-1"), 4,22 (<i>dd</i> , J= 3,2; 1,3 Hz, H-2"), 3,78 (<i>dd</i> , J= 9,5; 3,2 Hz, H-3"), 3,34 (<i>m</i> , H-4"),		MmEAO, MamAPA,		
			465,102753	(100,0%).			MguAPA MsylAPA e		
			[M+H] ⁺				MsylRAD) ¹ .		
			(C ₂₁ H ₂₁ O ₁₂)					EpEAO ²	
			(0,51)						

Tabela 5

Nº	TR (min)	Compostos propostos	m/z observado/teórico [M–H] ⁻ /[M+H] ⁺ (Fórmula empírica, erro, ppm)	MS/MS	δ ¹ H em ppm (J, Hz)	δ ¹³ C em ppm	Extrato/fração (Observações)	Referências
					3,51 (<i>dd</i> , J=9,5; 6,1, H-5"), 0,96 (<i>d</i> , J= 6,1, H-6").	Ramnose: 102,2 (C-1"), 70,6 (C-2"), 70,9 (C-3"), 71,7 (C- 4"), 71,0 (C-5"), 16,3 (C-6").	(Fração 8) (Presente EpRAD, EpAPA e EbAPA) ¹ .	
20	11,5	Quercetina-3-O- galactosídeo (Hiperosídeo)	463,0889/ 463,088200 (C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂) (1,51)	300,0324 (100%), 301,0385 (39,3%), 271,0319 (25,5%), 255,0353 (12,8%).	Aglicona: 6,20 (<i>d</i> ; J=2,0 Hz, H-6); 6,40 (<i>d</i> ; J=2,0 Hz; H-8); 7,84 (<i>d</i> ; J=2,2 Hz, H-2'), 6,86 (<i>d</i> ; J=8,5 Hz, H-5'), 7,58 (<i>dd</i> ; J=8,5; 2,2 Hz, H- 6'). Galactose: 5,16 (<i>d</i> , J=7,7 Hz, H-1"), 3,81 (<i>dd</i> , J=9,7; 7,9 Hz H-2"), 3,54 (<i>d</i> , J=7,9 Hz, H- 3"), 3,85 (<i>br dd</i> , J=3,4; 0,8 Hz, H-4"), 3,47 (<i>d</i> , J=0,8, H- 5"), 3,61 (<i>dd</i> , J=12,9; 6,4 Hz, H-6"), 3,56 (<i>d</i> , J=6,4 Hz, H- 6").	Aglicona: 157,4 (C-2), 134,2 (C-3), 161,7 (C-5), 98,7 (C-6), 164,9 (C-7), 93,6 (C-8), 157,1 (C-9), 104,1 (C-10), 116,6 (C-2'), 144,4 (C-3'), 148,5 (C-4'), 114,8 (C-5'), 121,7 (C-6'). Galactose: 104,3 (C-1"), 72,0 (C-2"), 74,0 (C-3"), 68,8 (C-4"), 76,0 (C-5"), 61,0 (C-6").	MmAPA ² (Fração 15)	WANG <i>et al.</i> , 2010.
21	12,7	Guaijaverina	433,0799/ 433,077635 (C ₂₀ H ₁₇ O ₁₁) (5,23)	300,0345 (100%), 271,0298 (38,7%), 301,0376 (35,6%), 255,0351	Aglicona: 6,20 (<i>d</i> ; J=2,1 Hz, H-6); 6,37 (<i>d</i> ; J=2,0 Hz; H-8); 7,70 (<i>d</i> ; J=2,1 Hz, H-2'), 6,86 (<i>d</i> ; J=8,5 Hz, H-5'), 7,59 (<i>dd</i> ; J=8,5; 2,1 Hz, H- 6'). Arabinose: 5,16 (<i>d</i> , J=6,5 Hz, H-1"), 3,41 (<i>m</i> , H-2"),	Aglicona: 157,6 (C-2), 134,1 (C-3), 161,6 (C-5), 98,7 (C-6), 164,7 (C-7), 93,3 (C-8), 157,1 (C-9), 104,2 (C-10), 116,3 (C-2'), 144,6 (C-3'), 148,5 (C-4'), 114,9 (C-5'), 121,8 (C-6').	MmAPA ² (Frações 15 e 16) (Presente em MmEAO) ¹ . EpEAO ² (Fração 7)	WANG <i>et al.</i> , 2010.

Tabela 5

Nº	TR (min)	Compostos propostos	m/z	MS/MS	δ ¹ H em ppm (J, Hz)	δ ¹³ C em ppm	Extrato/fração (Observações)	Referências	
			observado/teórico						
			[M–H] [–] /[M+H] ⁺ (Fórmula empírica, erro, ppm)						
				(13,9%).	3,64 (<i>m</i> , H-3"), 3,85 (<i>m</i> , H-4"), 3,09/3,41 (<i>m</i> , H-5").	Arabinose: 103,4 (C-1"), 70,6 (C-2"), 72,6 (C-3"), 68,7 (C-4"), 65,6 (C-5").	(Presente em EpAPA e EbAPA).		
22	-	Ácido elágico	–	–	7,51 (<i>s</i> , H-5, H-5').	113,1 (C-1, 1'), 136,5 (C-2, 2'), 140,6 (C-3, 3'), 148,2 (C-4, 4'), 110,2 (C-5, 5'), 107,5 (C-6, 6"), 160,3 (C-7, 7').	MmAPA ² (Fração 17) EpEAO ² (Fração 8)	LI <i>et al.</i> , 1999	
23	13,1	Quercitrina		300,0320	Aglicona: 6,20 (<i>d</i> , J=2,0 Hz H-6); 6,37 (<i>d</i> ; J=2,0 Hz; H-8); 7,33 (<i>d</i> ; J=2,0 Hz; H-2'); 6,91 (<i>d</i> ; J=8,2 Hz; H-5');	Aglicona: 157,8 (C-2), 134,8 (C-3), 178,3 (C-4), 162,2 (C-5), 98,5 (C-6), 164,6 (C-7), 93,6 (C-8),	MmAPA ² (fração 17) (Presente em MmEAO e MamAPA) ¹ EpEAO ² (fração 8) (Presente em EpAPA, EpRAD ¹ e EbAPA ¹).	ADEROGBA <i>et al.</i> , 2013.	
			447,0925/	301,0389	7,30 (<i>dd</i> ; J=8,2, 2,0 Hz; H-6').	Ramnose: 5,34 (<i>d</i> ; J=1,4 Hz; H-1"); 4,21 (<i>dd</i> ; J=3,3; 1,4 Hz; H-2"), 3,74 (<i>dd</i> ; J=9,5; 3,3 Hz; H-3"),			157,2 (C-9), 104,4 (C-10), 121,6 (C-1'), 115,7 (C-2'), 145,1 (C-3'), 148,9 (C-4'), 115,1 (C-5'), 121,6 (C-6').
			447,092188	(49,5%),					
			(C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁)	271,0304					
			(0,70)	(42,6%),					
				255,0365					
	(24,5%).		3,35 (<i>d</i> ; J=9,5 Hz; H-4"), 3,42 (<i>dd</i> ; J=9,5; 6,1 Hz; H-5"); 0,94 (<i>d</i> ; J=6,1 Hz; H-6").	70,6 (C-2"), 70,7 (C-3"), 72,1 (C-4"), 70,6 (C-5"), 16,3 (C-6").					
24	13,5	Isoramnetina-3-O-glucosídeo	477,1059/ 477,103850 (C ₂₂ H ₂₁ O ₁₂) (4,30)	316,0246 (100%), 315,0173 (49,6%), 317,0250 (19,6%), 271,0244 (17,8%).	–	–	EbAPA	ZHENG <i>et al.</i> , 2019	

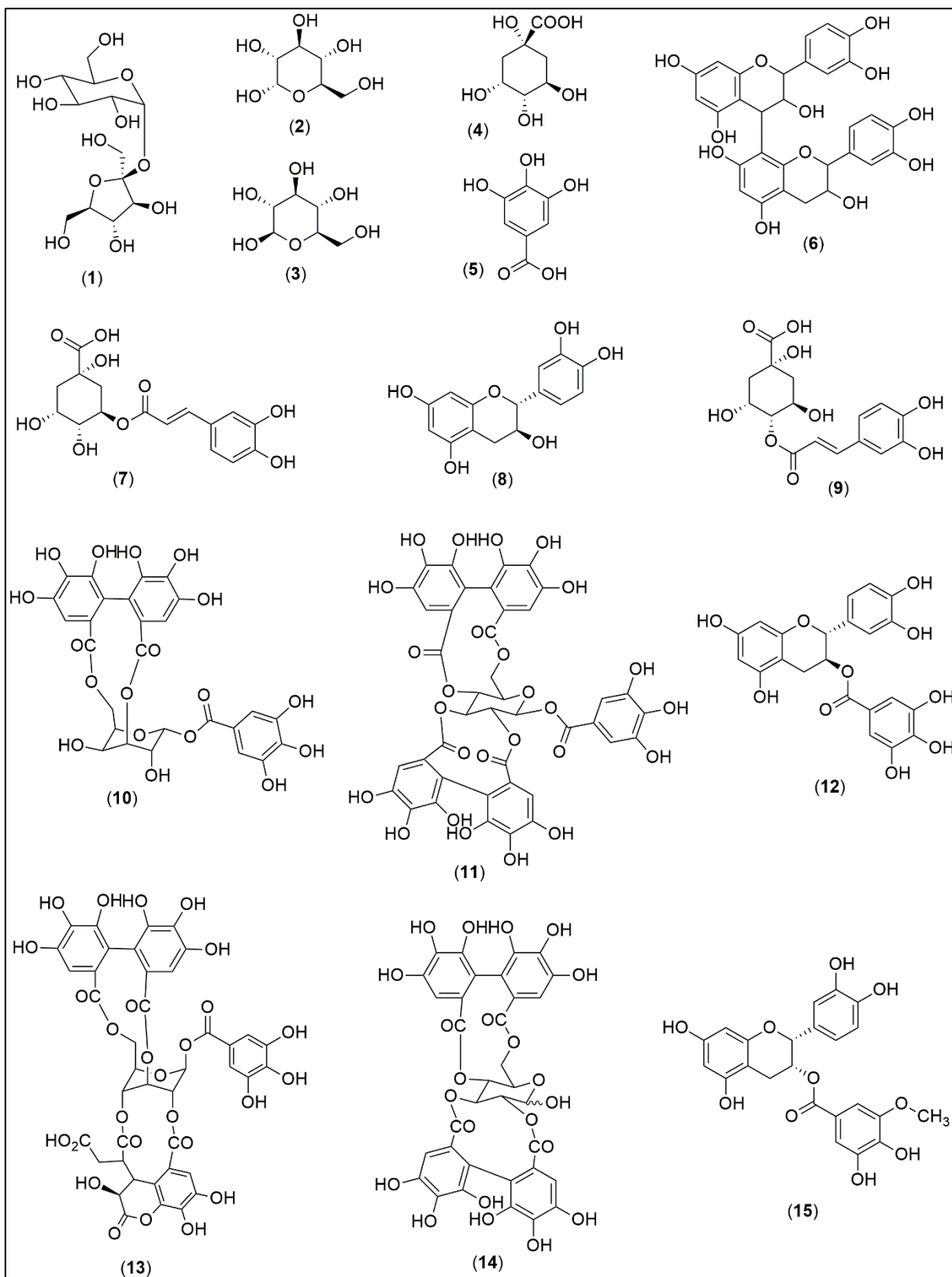
Tabela 5

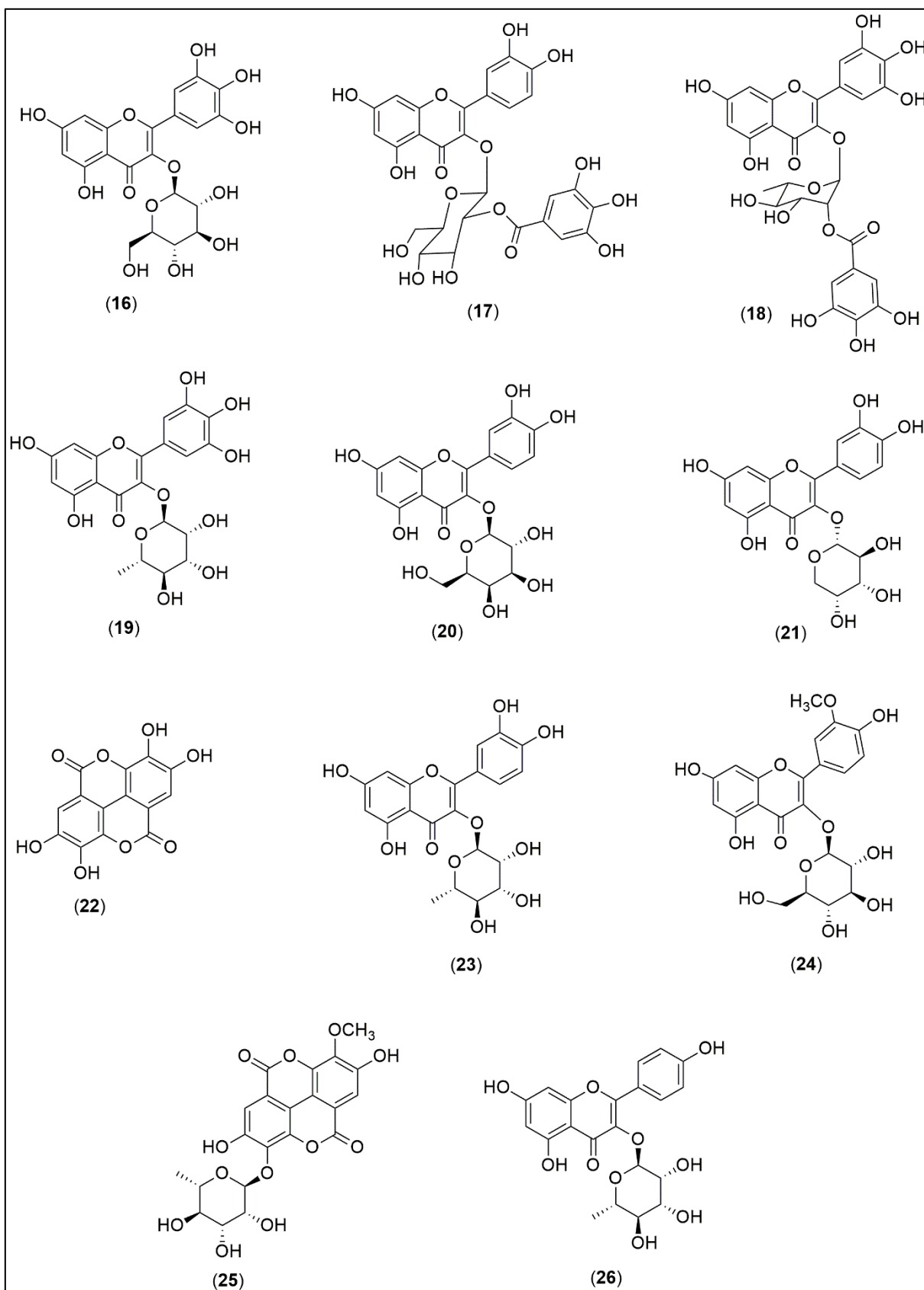
Nº	TR (min)	Compostos propostos	m/z	MS/MS	δ ¹ H em ppm (J, Hz)	δ ¹³ C em ppm	Extrato/fração (Observações)	Referências
			observado/teórico					
			[M–H] ⁻ /[M+H] ⁺ (Fórmula empírica, erro, ppm)					
25	14,9	Ácido metil elágico ramnosídeo	461,0753/ 461,072550 (C ₂₁ H ₁₇ O ₁₂) (5,96)	299,9922 (100%), 315,0166 (80,9%).	—	—	EbAPA (Presente em MsylRAD)	SINGH <i>et al.</i> , 2016a
26	15,0	Kaempferol-3-O- ramnosídeo	431,1014/ 431,098370 (C ₂₁ H ₁₉ O ₁₀) (7,03)	284,0395 (100%),	Aglicona: 6,21 (<i>d</i> , J=2,0 Hz H-6); 6,38 (<i>d</i> ; J=2,0 Hz; H-8); 7,77 (<i>d</i> ; J=8,7 Hz; H-2', 6'); 6,94 (<i>d</i> ; J=8,7 Hz; H-3'; H-5'); Ramnose: 5,37 (<i>d</i> ; J=1,6 Hz; H-1"); 4,21 (<i>dd</i> ; J=3,2; 1,6 Hz; H-2"), 3,70 (<i>dd</i> ; J=9,1; 3,2 Hz; H-3"), 3,32 (<i>m</i> ; H-4", 5"); 0,92 (<i>d</i> ; J=5,6 Hz; H-6").	Aglicona: 158,1 (C-2), 134,9 (C-3), 161,7 (C-5), 98,6 (C- 6), 164,6 (C-7), 93,6 (C-8), 157,1 (C-9), 104,5 (C-10), 121,2 (C-1'), 130,5 (C-2'), 115,2 (C-3'), 160,3 (C-4'), 115,2 (C-5'), 130,5 (C-6'). Rhamnose: 102,2 (C-1"), 70,6 (C-2"), 70,7 (C-3"), 71,8 (C-4"), 70,7 (C-5"), 16,3 (C-6").	MmAPA ² (fração 18) (Presente em MmEAO) ¹	CORREIA <i>et al.</i> , 2008
				285,0444 (76,6%), 255,0344 (50,5%).		(Presente em EpAPA e EpRAD) ¹ .		

EAO (coleta realizada na Embrapa-AM), APA (coleta realizada na APA-Pará), RAD (coleta realizada na Reserva Florestal Adolpho Ducke-AM). Ep (*E. puniceifolia*); Eb (*E. biflora*); Mam (*M. amazonica*); Mgu (*M. guianensis*); Mm (*M. multiflora*); Msyl (*M. sylvatica*).

1: DMSO-*d*₆, 2: CD₃OD.

Figura 41 – Estruturas dos constituintes identificados nos extratos secos das espécies de pedra-ume-caá



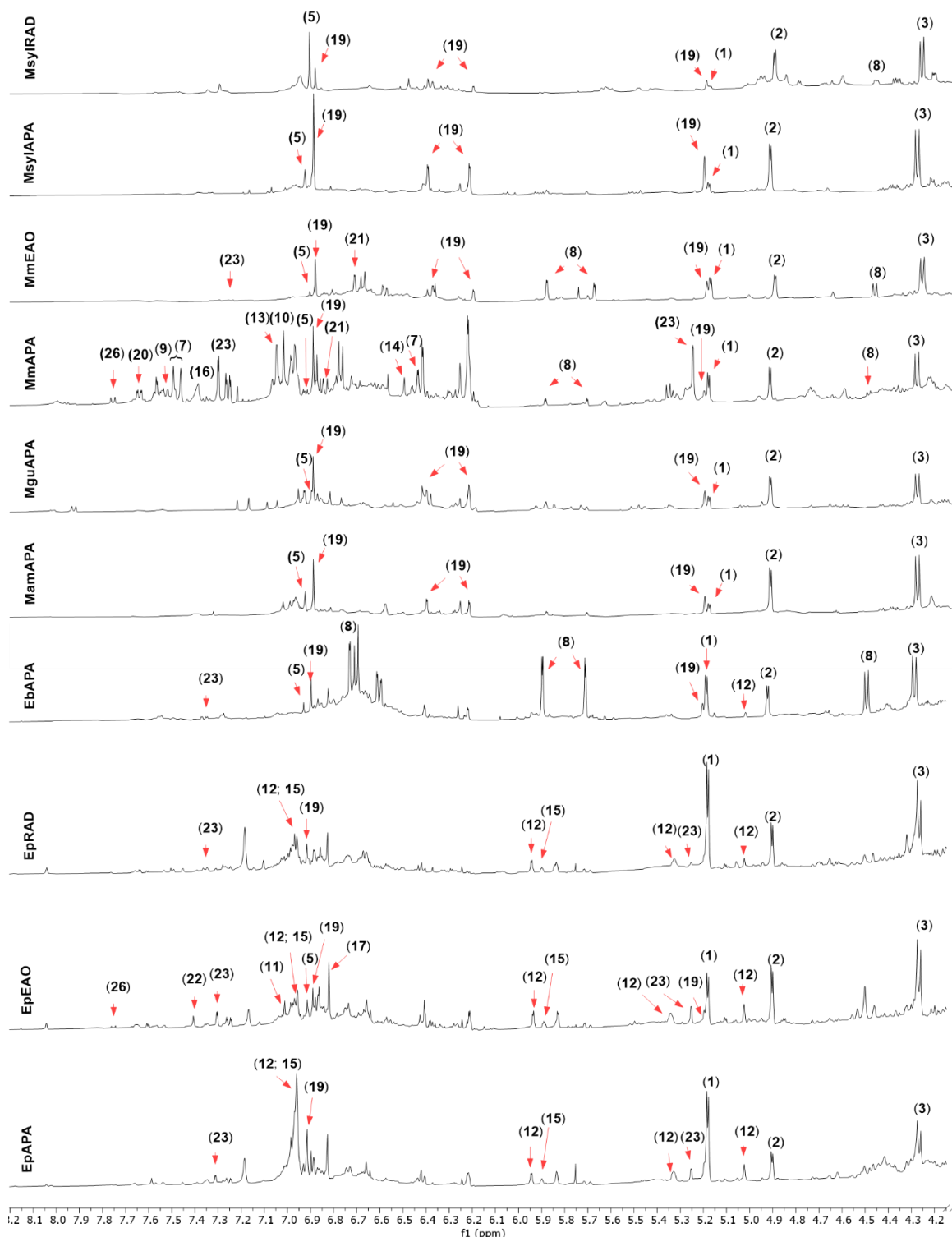


A Figura 42 apresenta a ampliação dos espectros de RMN de ^1H ($\text{DMSO-}d_6$) com os respectivos constituintes enumerados (δ_{H} 4,18 – 8,20 ppm) nos dez extratos secos das espécies de pedra-ume-caá.

O constituinte miricitrina (**19**), presente em todos os extratos, apresentou diferença na magnitude do sinal (δ_{H} 6,88 – 6,90) nos extratos de *Myrcia multiflora* (MmAPA e MmEAO), *M. guianensis* (MguAPA), *M. amazonica* (MamAPA) e *M. sylvatica* (MsylAPA). Além disso, é possível verificar que o ácido gálico (δ_{H} 6,91 – 6,93) e o flavonoide quercitrina (δ_{H} 7,30) podem ser um diferencial importante a ser considerado entre as espécies. Por outro lado, os constituintes **12** (δ_{H} 5,02 – 5,04) e **15** (δ_{H} 5,05 – 5,07) foram identificados somente nos extratos secos das espécies de *E. punicifolia*. Além disso, o flavonoide **26** pode ser identificado no espectro de RMN ^1H pelo duplete em torno de δ_{H} 7,75, nos extratos de MmAPA, EpEAO e EpAPA.

Em geral, a análise conjunta dos dados de massas de alta resolução e RMN de 1D e 2D demonstrou que o método analítico utilizado foi eficaz para a identificação dos metabólitos nos extratos secos deste estudo. Como também permitiu verificar que os espectros de RMN de ^1H podem ser utilizados para análise de *fingerprinting* de metabólitos nesses extratos. Conforme demonstrado, os metabólitos são possíveis de serem reconhecidos em uma análise qualitativa por RMN de ^1H . Em especial, a região aromática que pode ser usada para a identificação dos marcadores químicos, a fim de verificar a autenticidade dessas espécies. Mediante essa análise, foi desenvolvido um método quantitativo e exploratório dos dados de RMN de ^1H , visando a necessidade do controle de qualidade de matérias-primas vegetais comercializadas como pedra-ume-caá.

Figura 42 – Ampliação dos espectros de RMN de ^1H na região de 4,18 – 8,20 ppm referente aos sinais das substâncias identificadas nos extratos secos de pedra-ume-caá (DMSO- d_6 , 500 MHz)



(1): sacarose, (2): α -D-glicopiranoose, (3): β -D-glicopiranoose, (5): ácido gálico, (7): ácido clorogênico, (8): catequina, (9): ácido 4-O-cafeoilquínico, (10): corilagina, (11): casuarictina, (12): catequina-3-O-galato, (13): ácido quebulágico, (14): pedunculagina, (15): epicatequina-3-O-(3"-O-metilgalato), (16): miricetina-3-O-glucosídeo, (17): quercetina-3-O- β -2"-galoilglucosídeo, (19): miricitrina, (20): hiperosídeo, (21): guaijaverina, (22): ácido elágico, (23): quercitrina, (26): kaempferol-3-O-ramnosídeo.

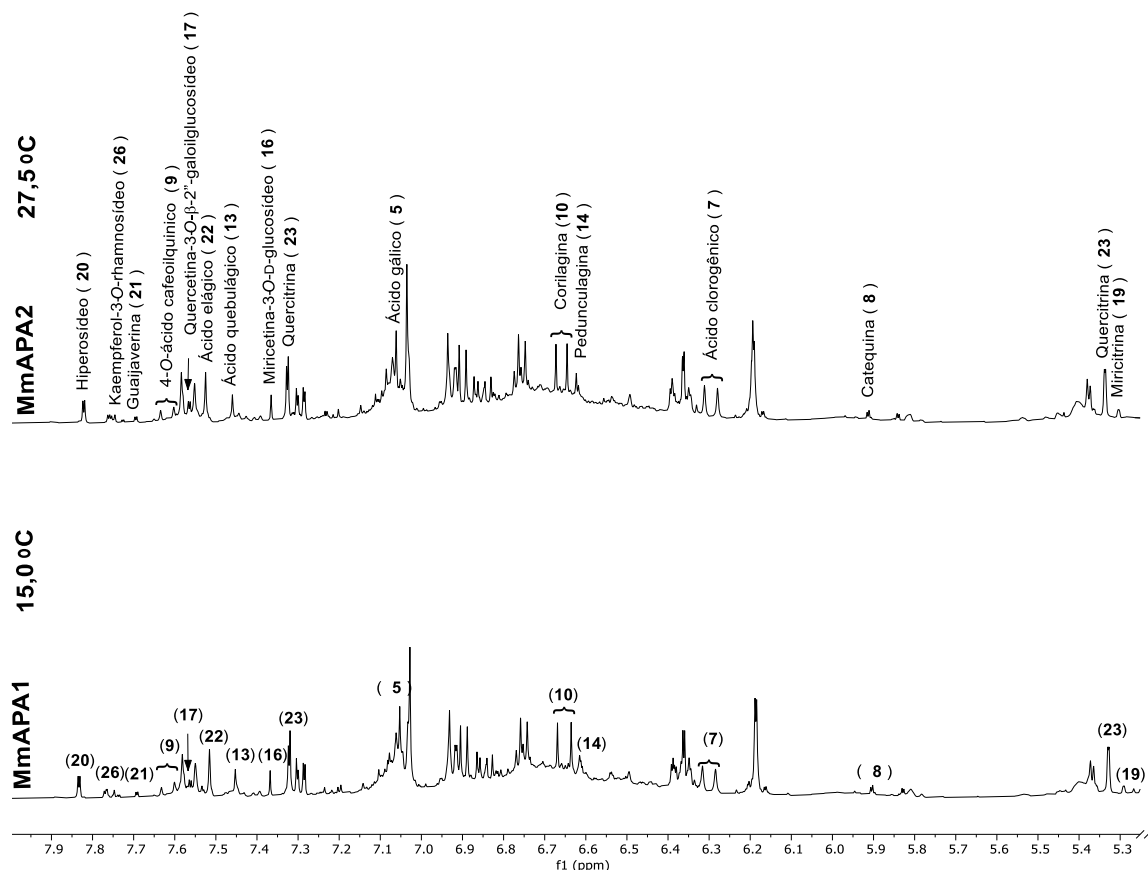
5.3 Quantificação por RMNq de ^1H

A aplicação da RMNq é desafiadora quando aplicada a misturas complexas, tais como extratos brutos e frações provindos de produtos naturais. Porém, a quantificação por RMN é possível quando, pelo menos, um sinal do constituinte alvo não apresenta coalescência de sinais (IMAI *et al.*, 2020). Há diversos exemplos de aplicações dessa técnica quantitativa. Dentre os quais se pode destacar o trabalho de Lund e colaboradores (LUND *et al.*, 2020), no qual utilizaram a RMNq para quantificar quatro flavonoides (naringenina, hiperosídeo, rutina, e vitexina-2"-O-rhamnosídeo) e o ácido clorogênico em extratos das folhas de *Crataegus* spp.. Outros dois trabalhos com RMNq que também merecem destaque foram desenvolvidos pelo grupo NEQUIMA. O primeiro apresenta a quantificação de três compostos fenólicos presentes no suco dos frutos de *Eugenia punicifolia* utilizando o método PULCON (RAMOS *et al.*, 2019). O outro trabalho resultou na quantificação de dez compostos presentes em bebidas alcoólicas com propriedades antioxidantes obtidas a partir de frutos de *Eugenia stipitata* (araça-boi) (SOUZA *et al.*, 2020).

Diante dessa possibilidade, uma análise espectral minuciosa por RMN de ^1H dos extratos secos das espécies de pedra-ume-caá selecionadas neste estudo foi realizada. No total, 7 constituintes químicos presentes nos extratos de *M. multiflora* (MmAPA e MmEAO), *E. punicifolia* (EpEAO) e *E. biflora* (EbAPA) foram quantificados pelo método PULCON. Neste estudo, os sinais de referência eletrônicos em δ_{H} 8,10 (s, 4 H) e δ_{H} 3,94 (s, 6 H) do padrão tereftalato de dimetila foram empregados para calibrar as medições de RMN.

Na Figura 43 é apresentada a ampliação dos espectros de RMN de ^1H do extrato de MmAPA com a sinalização dos constituintes identificados na região espectral de δ_{H} 5,2 a 8,0. Os espectros foram adquiridos em duas temperaturas (15 °C e 27,5 °C) em que ocorreu maior homogeneidade do campo magnético e possibilitou a quantificação das substâncias **10**, **16**, **19**, **20**, **21** e **23** nesse extrato.

Figura 43 – Ampliação dos espectros de RMN de ^1H na região C (5,2-8,0 ppm) referente aos sinais dos constituintes identificados nos extratos secos de MmAPA em duas temperaturas onde ocorreu maior homogeneidade do campo magnético (CD_3OD) (500 MHz, CD_3OD)



Os resultados quantitativos estão apresentados na Tabela 6. Os sinais dos hidrogênios e ambientes químicos dos constituintes quantificados neste estudo estão apresentados na Figura 44 e 45.

O flavonoide quercitrina (**23**) foi detectado nos extratos aquoso, acetato de etila e hidrometanol, assim como no chá das folhas de *M. multiflora* (FIGUEIREDO-GONZÁLEZ *et al.*, 2016; YOSHIKAWA *et al.*, 1998), e em outros chás de pedra-ume-caá (*M. salicifolia* e *M. speciosa*) (FIGUEIREDO-GONZÁLEZ *et al.*, 2016). O potencial terapêutico do flavonoide quercitrina foi confirmado através da diminuição da glicose plasmática, do aumento dos níveis de insulina e da prevenção do estresse oxidativo em ratos diabéticos (BABUJANARTHANAM *et al.*, 2011). Além disso, esse flavonoide foi capaz de inibir a enzima aldose redutase envolvida nas complicações crônicas no diabetes mellitus tipo 2 (MATSUDA *et al.*, 2002). Neste estudo, a quercitrina é o constituinte majoritário nos extratos secos das folhas de *M. multiflora* e os dados

médios quantitativos adquiridos por RMNq de ^1H foram significativamente diferentes ($p < 0,05$) em relação aos demais compostos. Em adição, nos extratos secos de *E. puniceifolia* (EpEAO1 e EpEAO2) a quercitrina está na concentração de $7,2 \pm 0,5$ e $7,7 \pm 0,5 \text{ mg g}^{-1}$ de extrato seco ($p > 0,05$), respectivamente.

O flavonol hiperosídeo (**20**), também encontrado em *M. salicifolia*, *M. speciosa* e *M. bela* (FIGUEIREDO-GONZÁLEZ *et al.*, 2016; SALDANHA *et al.*, 2013), apresenta potencial antioxidante e anti-inflamatório em inflamação induzida por glicose elevada. Além de apresentar efeito preventivo para adiar o início da nefropatia diabética (AN *et al.*, 2017; KU *et al.*, 2014; PARK *et al.*, 2016). Este flavonoide está entre os principais compostos das folhas de *M. multiflora*. As quantidades aqui determinadas não mostraram diferença significativa ($p > 0,05$) em relação às concentrações médias do elagitanino corilagina (**10**). Nandini e Naik (2019) relataram que esse elagitanino melhora a hiperglicemia, hiperlipidemia e estresse oxidativo em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina.

Os flavonoides miricitrina (**19**) e guaijaverina (**21**), anteriormente identificados em *M. multiflora*, já demonstraram efeito inibitório contra α -glucosidase (YOSHIKAWA *et al.*, 1998). Estatisticamente, as concentrações médias dos compostos **16**, **19** e **21** não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$), o que também foi observado entre as concentrações dos constituintes quantificados nesses dois extratos secos.

A análise detalhada do perfil espectral por RMN de ^1H dos extratos de EbAPA e MmEAO permitiu observar que na região carbinólica, o sinal em δ_{H} 4,47 (d , $J=7,4 \text{ Hz}$) correspondente ao H-2 do anel C do flavonoide catequina (**8**) estava livre de interferentes. Os valores da catequina em EbAPA foram de $15,5 \pm 1,73 \text{ mg g}^{-1}$ (EbAPA1) e $18,2 \pm 1,5 \text{ mg g}^{-1}$ de extrato seco (EbAPA2) ($p > 0,05$), respectivamente. Esses resultados nos levam a sugerir que esse flavonoide é um dos principais constituintes presentes no extrato seco das folhas de *E. biflora*. Já nos extratos secos das folhas de *M. multiflora* apresentou valores de $7,7 \pm 0,5 \text{ mg g}^{-1}$ (MmEAO1) e $10,0 \pm 0,0 \text{ mg g}^{-1}$ de extrato seco (MmEAO2) ($p < 0,05$), respectivamente. Essa diferença significativa da catequina nos extratos de MmEAO corrobora com a correlação de Pearson de 0,88 entre esses extratos (Figura 10, p. 76).

Tabela 6 – Dados quantitativos dos constituintes fenólicos dos extratos secos de *M. multiflora* por RMNq de ^1H em duas temperaturas (15 °C e 27,5 °C) onde ocorreu maior homogeneidade do campo magnético (CD_3OD)

Constituintes	MmAPA1		MmAPA2	
	Média $\pm$ DP		Média $\pm$ DP	
	(mg g ⁻¹ de extrato seco)		(mg g ⁻¹ de extrato seco)	
	δ ^1H em ppm		δ ^1H em ppm	
	15,0 °C	27,5 °C	15,0 °C	27,5 °C
Corilagina (10)	–	12,3 $\pm$ 0,5 ^{b,c}	–	10,0 $\pm$ 0,8 ^{b,c}
		δ 6,64		δ 6,64
		(s, 1H)		(s, 1H)
	10,1 $\pm$ 1,6 ^{b,c}	10,8 $\pm$ 1,6 ^{b,c}	10,0 $\pm$ 0,5 ^{b,c}	10,1 $\pm$ 0,7 ^{b,c}
	δ 6,66	δ 6,67	δ 6,66	δ 6,67
	(s, 1H)	(s, 1H)	(s, 1H)	(s, 1H)
Miricetina-3-O-glucosídeo (16)	2,5 $\pm$ 0,0 ^d	2,3 $\pm$ 0,2 ^d	2,3 $\pm$ 0,2 ^d	2,1 $\pm$ 0,2 ^d
	δ 7,36	δ 7,36	δ 7,36	δ 7,36
	(s, 2H)	(s, 2H)	(s, 2H)	(s, 2H)
Miricitrina (19)	3,5 $\pm$ 0,5 ^d	4,0 $\pm$ 0,5 ^d	4,1 $\pm$ 0,2 ^d	4,3 $\pm$ 0,5 ^d
	δ 5,29	δ 5,30	δ 5,29	δ 5,30
	(d, 1H)	(d, 1H)	(d, 1H)	(d, 1H)
Hiperosídeo (20)	9,6 $\pm$ 0,6 ^c	9,6 $\pm$ 0,5 ^c	9,1 $\pm$ 0,2 ^c	9,5 $\pm$ 0,5 ^c
	δ 7,83	δ 7,82	δ 7,83	δ 7,82
	(d, 1H)	(d, 1H)	(d, 1H)	(d, 1H)
Guaijaverina (21)	2,1 $\pm$ 0,2 ^d	2,1 $\pm$ 0,2 ^d	2,0 $\pm$ 0,5 ^d	2,0 $\pm$ 0,5 ^d
	δ 7,69	δ 7,69	δ 7,69	δ 7,69
	(d, 1H)	(d, 1H)	(d, 1H)	(d, 1H)
Quercitrina (23)	–	20,6 $\pm$ 0,2 ^a	–	19,6 $\pm$ 2,0 ^a
		δ 7,32		δ 7,32
		(d, 1H)		(d, 1H)
	21,0 $\pm$ 0,2 ^a	20,6 $\pm$ 0,2 ^a	20,0 $\pm$ 0,8 ^a	19,1 $\pm$ 1,6 ^a
	δ 5,29	δ 5,30	δ 5,29	δ 5,30
	(d, 1H)	(d, 1H)	(d, 1H)	(d, 1H)

Informações de agrupamento usando o método de Tukey e intervalo de confiança de 95% (IC). Os valores seguidos pela mesma letra não são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Este estudo nos leva sugerir que os constituintes corilagina (**10**), miricetina-3-O-glucosídeo (**16**), miricitrina (**19**), guaijaverina (**21**) e quercitrina (**23**) também podem ser usados como marcadores químicos para a autenticação de espécies de *Myrcia multiflora*, **23** para *E. puniceifolia* e cate8 para *E. biflora*, uma vez que estão presentes em concentrações consideráveis nesses extratos em relação às outras espécies de pedra-ume-caá previamente quantificado (FIGUEIREDO-GONZÁLEZ *et al.*, 2016). Portanto, pode-se afirmar que o método extrativo dessas substâncias se

mostra reprodutível nos extratos de MmAPA, EpEAO e EbAPA, características importantes para o controle de qualidade na produção de extrato seco dessas espécies (ALARA *et al.*, 2021). Além disso, o método PULCON é considerado confiável para quantificar esses compostos.

Figura 44 – Sinais dos hidrogênios e ambiente químico dos constituintes quantificados em DMSO- d_6 nos extratos de *M. multiflora* (**8**, MmEAO), *E. biflora* (**8**, EbAPA) e *E. punicifolia* (**23**, EpEAO)

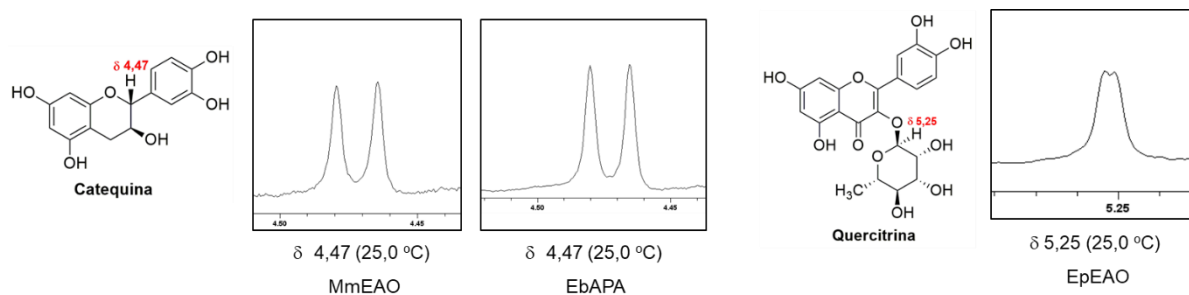
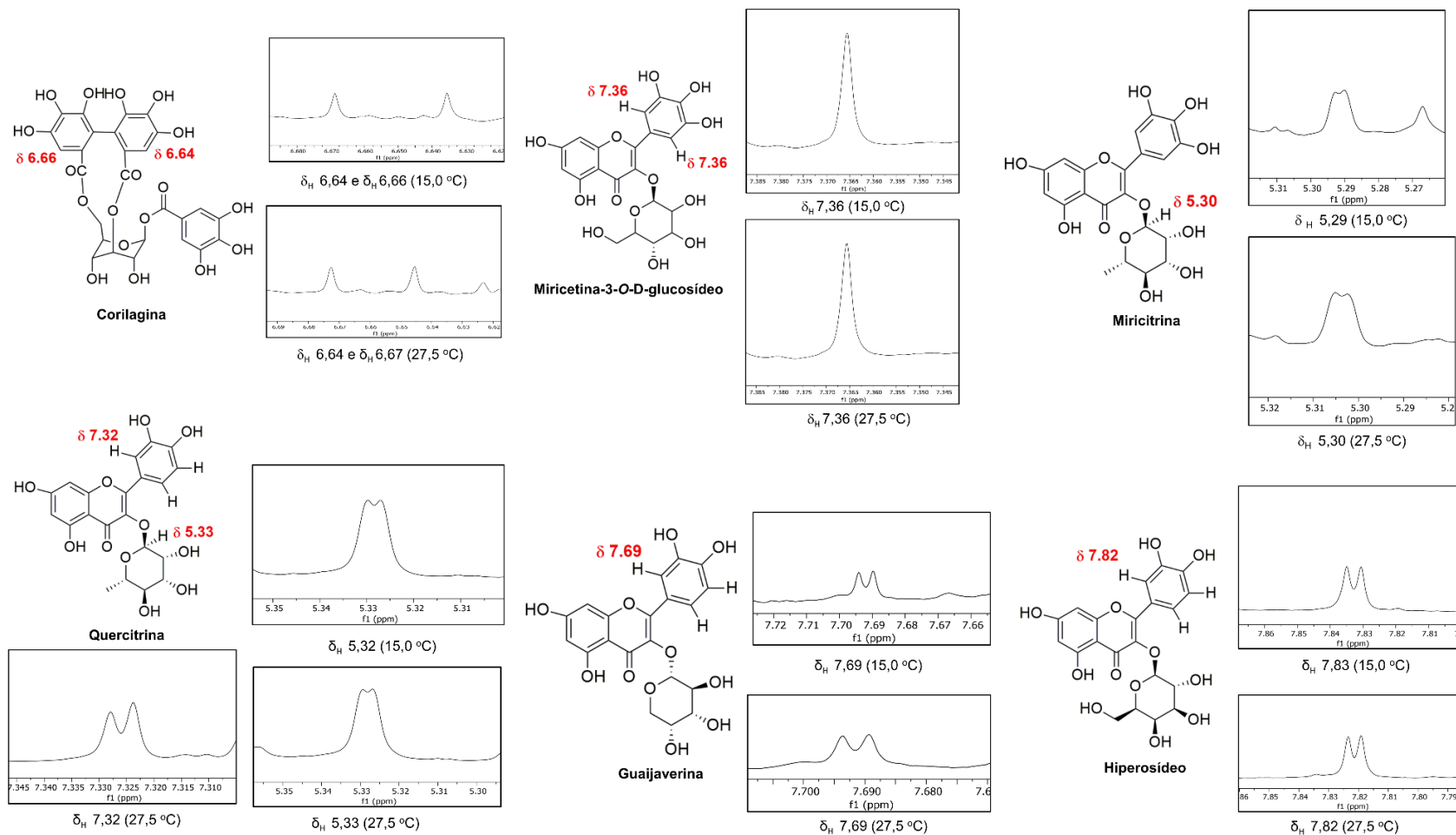


Figura 45 – Sinais dos hidrogênios e ambiente químico dos constituintes quantificados em *M. multiflora* (MmAPA, CD₃OD)



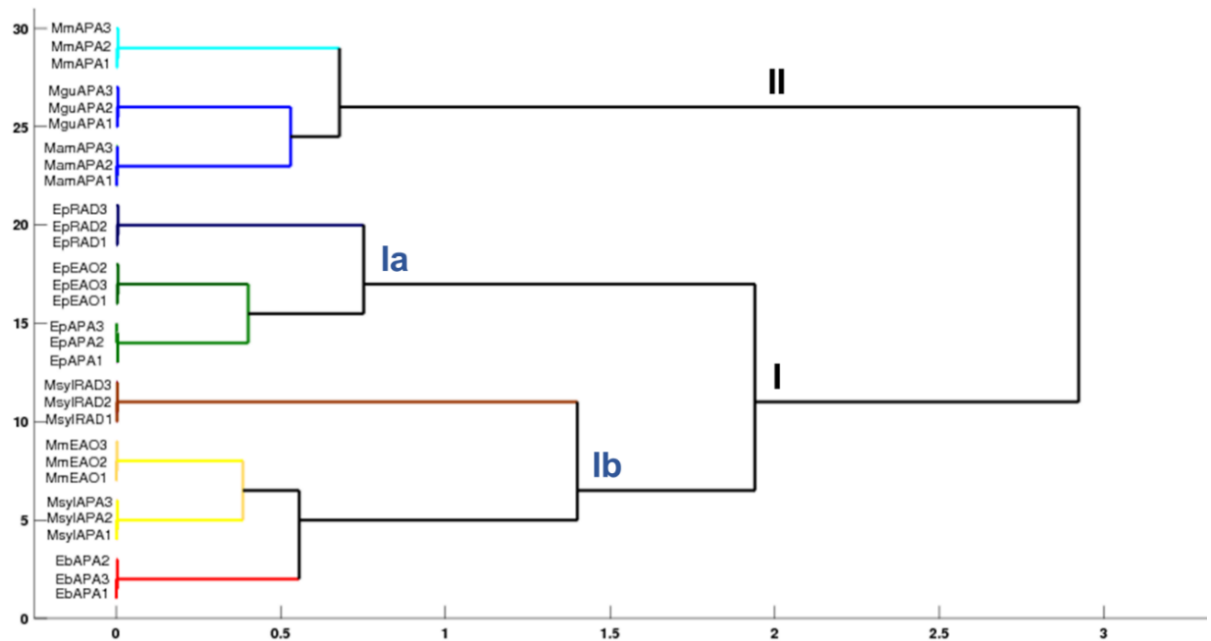
5.4 Análise exploratória dos dados de RMN de ^1H

A análise exploratória da composição química não direcionada por PCA e HCA foi realizada. A matriz numérica dos extratos secos das espécies de pedra-ume-caá representou 259.380 pontos de dados (30 espectros x 8646 variáveis em cada espectro). Primeiramente foi aplicado o método não supervisionado de Análise por Agrupamentos Hierárquicos (HCA). Os grupos foram formados pelos extratos mais próximos em composição (menos dissimilar) em um índice de dissimilaridade próximo de zero, e extratos distantes (mais dissimilar) com índice de dissimilaridade próximo de 3. Os resultados estão apresentados na forma de dendograma onde se verificou dois agrupamentos principais, que se subdividiram pela medida de dissimilaridade química pelo Método de Ward (Figura 46). Dois importantes agrupamentos podem ser observados, o aglomerado **I** é formado por espécies dos dois gêneros, incluindo *E. puniceifolia* (EpEAO, EpAPA e EpRAD), *E. biflora* (EbAPA), *M. multiflora* (MmEAO) e *M. sylvatica* (MsylRAD e MsylAPA). Por outro lado, o aglomerado **II**, com o índice de dissimilaridade de 0,67, é formado somente por espécies de *Myrcia* coletadas no Pará (MamAPA, MguAPA e MmAPA), sendo que MamAPA e MguAPA são mais semelhantes quimicamente do que MmAPA. O aglomerado **I** se subdividiu em dois subgrupos particulares: no subgrupo **Ia**, os extratos EpAPA e EpEAO apresentaram composição química menos dissimilares entre si quando comparados a EpRAD. Também, o mesmo foi observado no subgrupo **Ib**, MmEAO e MsylAPA (índice de 0,38) são menos dissimilares em relação ao extrato de EbAPA (índice de 0,52), enquanto que MsylRAD apresenta maior dissimilaridade em relação aos demais extratos (índice de 1,40). Um dos fatores que pode ter contribuído para a dissimilaridade química entre as espécies de *E. puniceifolia* (EpEAO, EpAPA e EpRAD) e *M. sylvatica* (MsylAPA e MsylRAD) é o período da época da coleta, pois as folhas de EpRAD e MsylRAD foram coletadas em um período de índice pluviométrico elevado em Manaus (INMET, 2018).

A Análise de Componentes Principais (PCA) foi aplicada com a finalidade de verificar quais os constituintes responsáveis pela discriminação e similaridade química entre as espécies e identificar os marcadores químicos. Os aglomerados na HCA serviram para auxiliar no entendimento dos agrupamentos amostrais no gráfico de scores. O resultado da PCA apresentou separação amostral em três Componentes Principais (PC1 x PC2, PC1 x PC3). As três PCs foram determinadas com base no gráfico da variância total explicada (68,01%) devido a obtenção de maiores

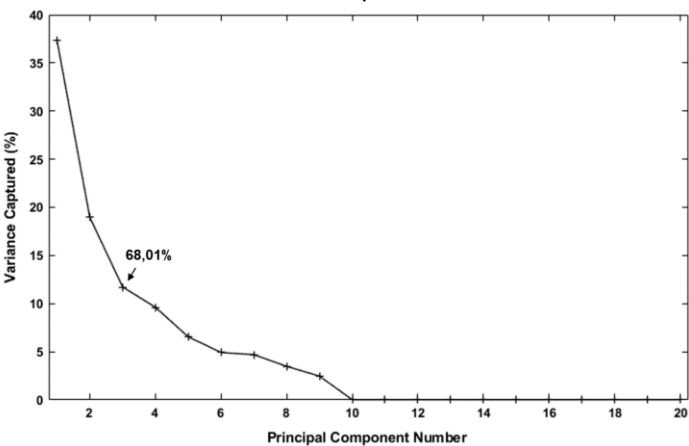
informações dos dados químicos, e após a terceira PC não houve variância relevante de acordo com o objetivo (Figura 47).

Figura 46 – Dendograma representando similaridade de composição química entre os extratos de pedra-ume-caá



EAO (coleta realizada na Embrapa-AM), APA (coleta realizada na APA-Pará), RAD (coleta realizada na Reserva Florestal Adolpho Ducke – AM). Ep (*E. punicifolia*); Eb (*E. biflora*); Mam (*M. amazonica*); Mgu (*M. guianensis*); Mm (*M. multiflora*); Msyl (*M. sylvatica*).

Figura 47 – Gráfico de variância explicada versus número de PCs



A Figura 48 apresenta o gráfico de *scores* PC1 *versus* PC2 que acumulam 56,28% do total da variância explicada. PC1 descreve 37,33% da variância do conjunto de dados, enquanto PC2 descreve 18,95%. Três principais aglomerados puderam ser observados e corrobora com a análise de HCA (Figura 46, p. 127). Nos *scores* positivos de PC1 foi observado o agrupamento **II** (MmAPA, MamAPA, MguAPA). Os *loadings* positivos de PC1 revelaram que as variáveis responsáveis por esse agrupamento são os sinais em δ_H 1,53 – 1,83 (ácido quínico, **4**) e δ_H 6,89 (miricitrina, **19**) (Figura 49). A avaliação espectral qualitativa demonstra que a substância **19** está em proporções equivalentes nesses extratos podendo ser a principal variável responsável pela distinção desse agrupamento. Além disso, os sinais em δ_H 7,30 (quercitrina, **23**), δ_H 7,48 (ácido clorogênico, **7**) podem ser as variáveis responsáveis pela atribuição na variabilidade entre o extrato MmAPA em relação aos extratos de MamAPA e MguAPA.

Nos *scores* negativos de PC1 foi observado o subgrupo **Ia** (EpEAO, EpAPA e EpRAD). Os *loadings* negativos de PC1 revelaram que os sinais em δ_H 5,18 (sacarose, **1**), δ_H 4,90 (α -glicopiranosídeo, **2**), δ_H 4,25 (β -glicopiranosídeo, **3**), δ_H 6,91-6,93 (ácido gálico, **5**), δ_H 5,93-5,94 (catequina-3-O-galato, **12**), δ_H 5,89-5,90 (epicatequina-3-O-(3"-O-metilgalato), **15**), δ_H 7,46 (ácido elágico, **22**) e δ_H 7,18 (NI) são as variáveis responsáveis pelo agrupamento dos extratos de *E. puniceifolia* (Figura 49). As substâncias catequina-3-O-galato (**12**) e epicatequina-3-O-(3"-O-metilgalato) (**15**) (δ_H 6,95 – 6,97) estão presentes somente nos extratos de EpEAO, EpAPA e EpRAD. Essa informação nos leva a sugerir que **12** e **15** possuem grande relevância para o agrupamento de espécimes de *E. puniceifolia* e diferenciando-as das demais pedra-ume-caá.

Nos *scores* negativos de PC2 foi observado o subgrupo **Ib** (MmEAO, MsylAPA, MsylRAD e EbAPA). Os *loadings* negativos de PC2 apresentam que as altas intensidades dos constituintes sacarose (δ_H 5,18, **1**), α -glicopiranosídeo (δ_H 4,90, **2**), catequina (δ_H 5,89, **8**) e miricitrina (δ_H 0,84 e 6,89, **19**) foram os principais pesos responsáveis por esse agrupamento (Figura 50). Já os *loadings* positivos de PC2 corroboram que a catequina-3-O-galato (δ_H 5,02) e um composto desconhecido com sinal em δ_H 7,18 (NI) são as variáveis responsáveis pelo agrupamento dos extratos de *E. puniceifolia*, anteriormente observado em valores negativos de PC1.

Figura 48 – Gráfico de *scores* de PC1 x PC2 dos extratos secos das espécies de pedra-ume-caá

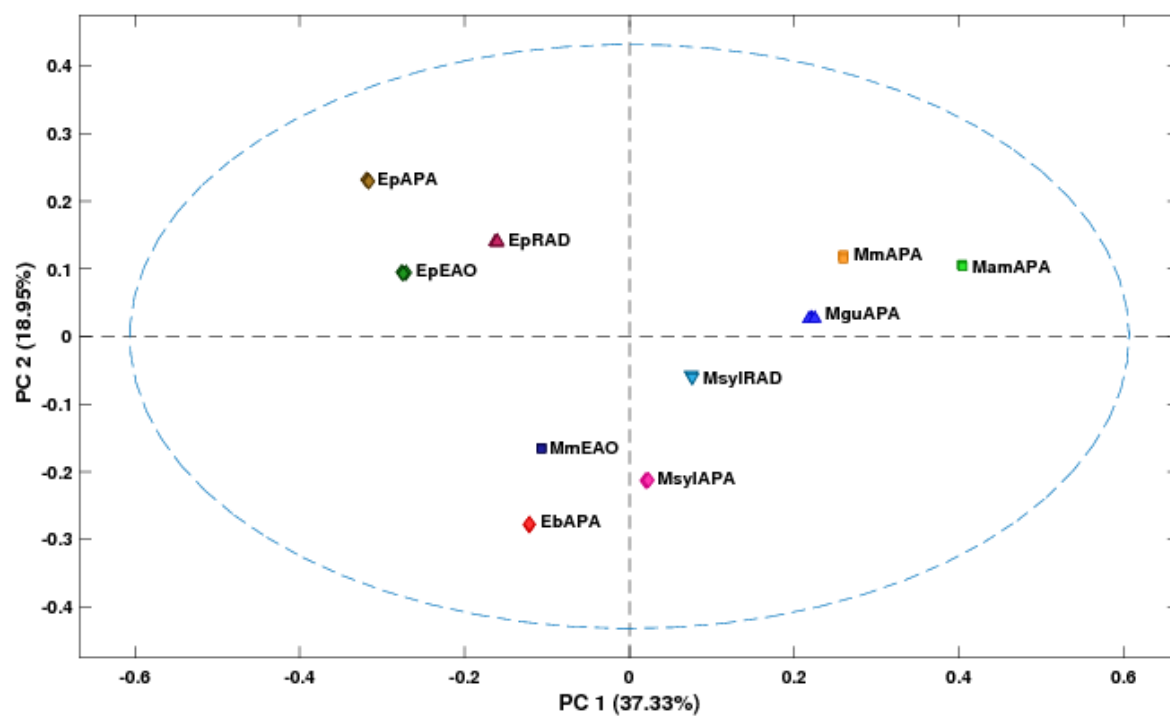
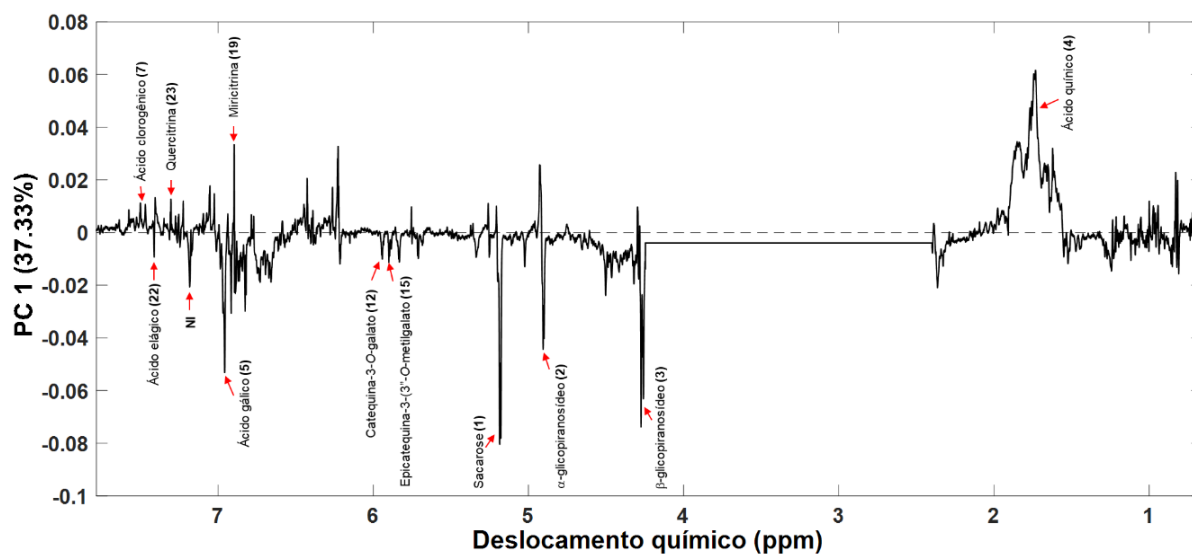
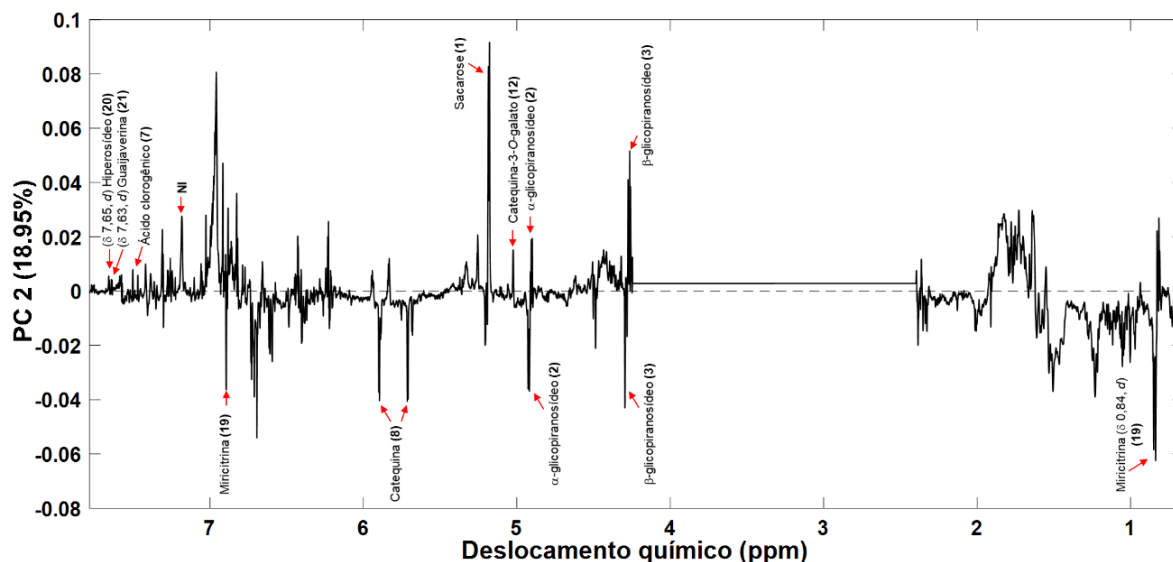


Figura 49 – Gráfico de *loadings* positivo e negativo de PC1.



Ni: não identificado.

Figura 50 – Gráfico de *loadings* positivo e negativo de PC2



A Figura 51 apresenta o gráfico de *scores* PC1 *versus* PC3 que demonstra a separação observada na HCA entre os aglomerados I e II (*Eugenia* e *Myrcia*). O constituinte ácido gálico (δ_H 6,91) é o principal peso responsável pelo agrupamento das espécies de *Myrcia* (MsylRAD, MsylAPA, MguAPA) e *E. puniceifolia* (EpRAD) em scores positivos de PC3 (Figura 52). Já os *loadings* negativos de PC3 demonstram que os constituintes químicos majoritários como catequina, miricitrina e quercitrina presentes nas espécies de *E. puniceifolia* (EpEAO e EpAPA), *E. biflora* (EbAPA) e *M. multiflora* (MmEAO) são as variáveis responsáveis por esse agrupamento. Além disso, os sinais em δ_H 7,48 (ácido clorogênico, **7**) e δ_H 7,02 (corilagina, **10**), presentes somente no extrato de *M. multiflora* (MmAPA), justificam a maior dissimilaridade química desse extrato em relação às demais espécies corroborando a análise por HCA.

Portanto, a análise exploratória dos dados de RMN de ^1H foi útil e permitiu identificar os principais marcadores químicos das espécies de pedra-ume-caá, os constituintes ácido quínico (**4**), ácido gálico (**5**), catequina (**8**), miricitrina (**19**) e quercitrina (**23**).

Figura 51 – Gráfico de PC1 x PC3 dos extratos secos das espécies pedra-ume-caá

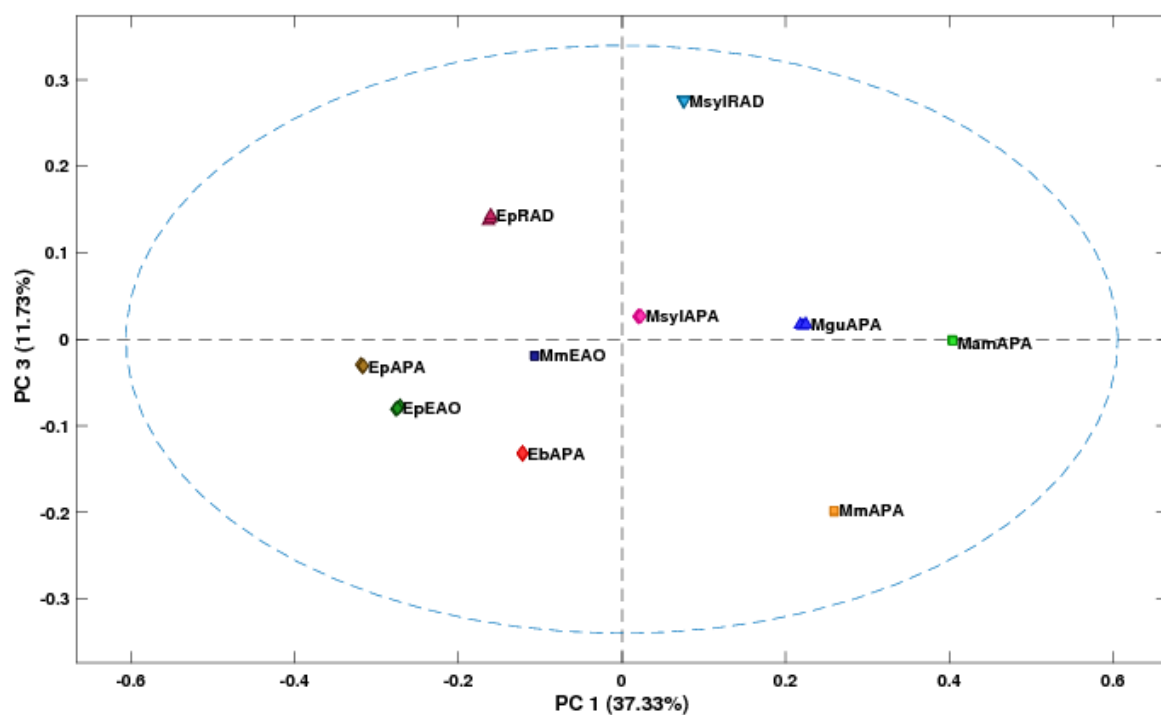
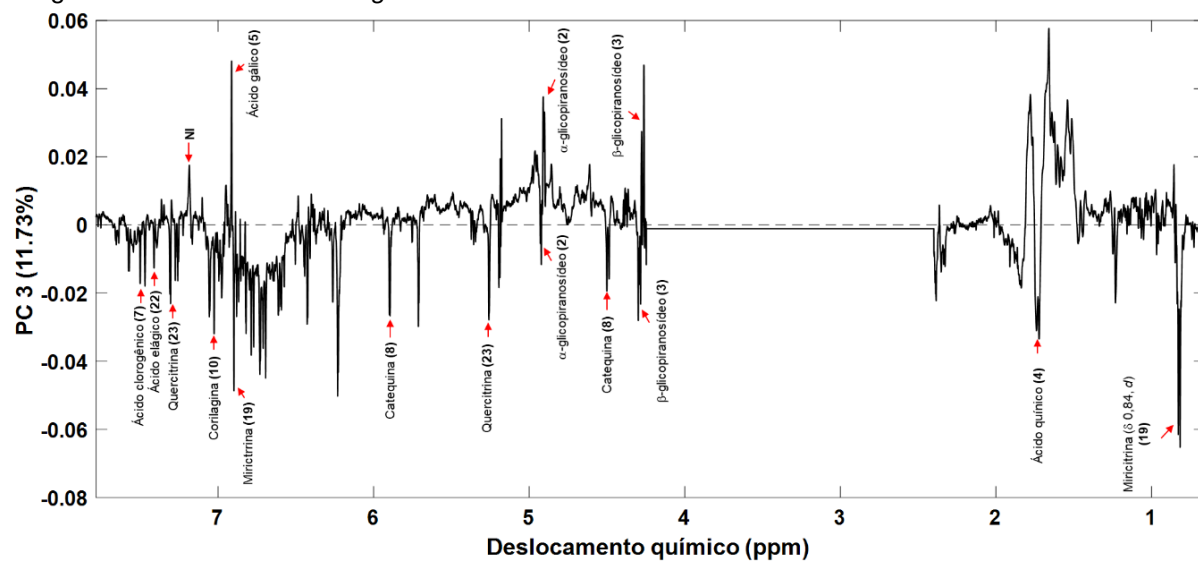


Figura 52 – Gráfico de *loadings* de PC3

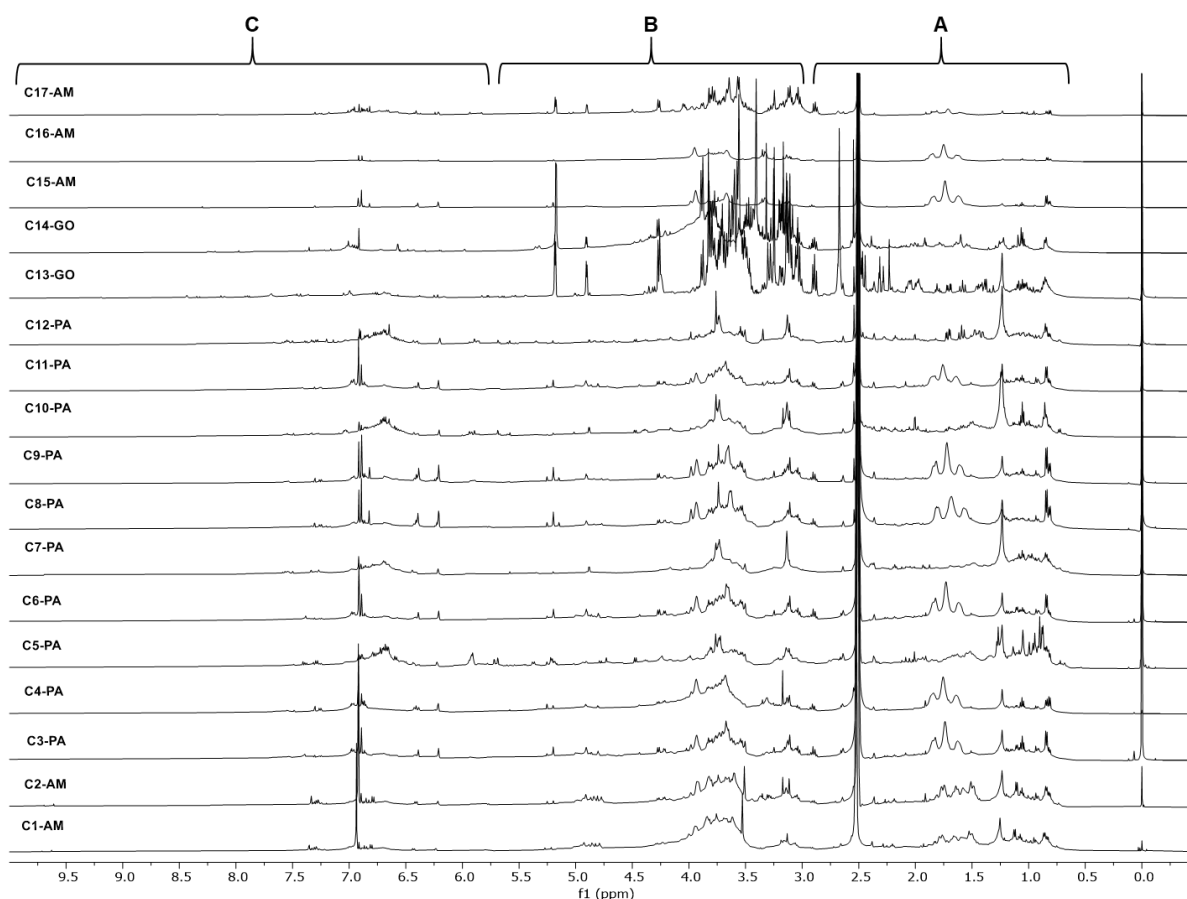


NI: não identificado.

5.5 Análise química dos extratos das amostras comerciais por RMN de ^1H

As amostras comerciais adquiridas como pedra-ume-caá foram codificadas de C1-C17 para fins de comparação química por RMN de ^1H , visando verificar a autenticidade da planta medicinal comercializada. Inicialmente, a análise preliminar dos espectros de RMN de ^1H adquiridos em $\text{DMSO-}d_6$ dos extratos secos de C1-C17 foi realizada e estão apresentados na Figura 53. Uma análise geral nos permitiu verificar sinais nas três diferentes regiões: sinais alifáticos (δ_{H} 0,9 a 3,0, região A), seguido por sinais carbinólicos (δ_{H} 3,0 a 5,5, região B) e sinais de hidrogênios aromáticos (δ_{H} 5,7 a 10,0, região C).

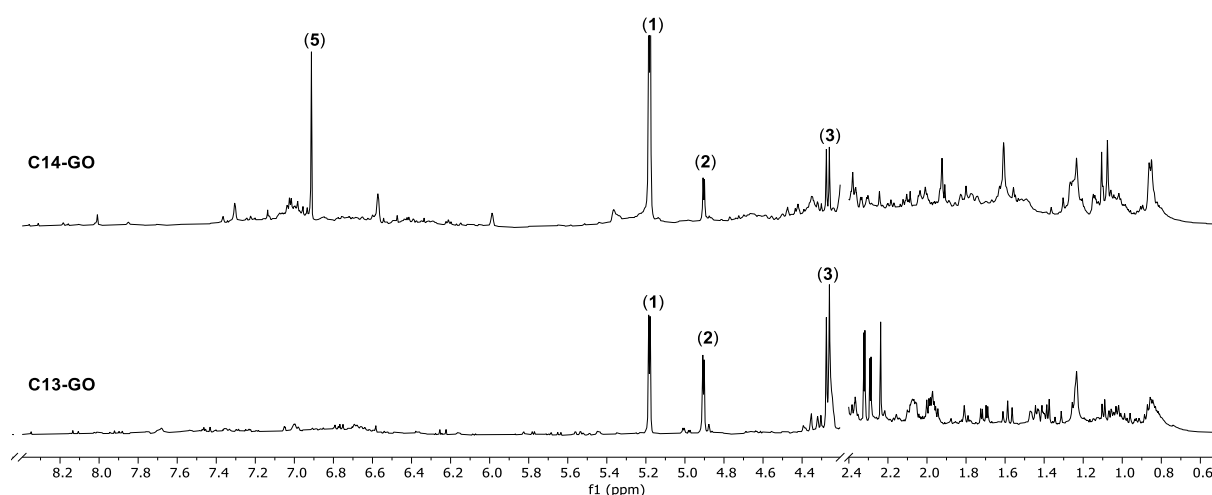
Figura 53 – Espectros de RMN de ^1H dos extratos secos de amostras comerciais de pedra-ume-caá ($\text{DMSO-}d_6$, 500 MHz). A: região alifática (δ_{H} 0,9 a 3,0), B: região carbinólica (δ_{H} 3,0 a 5,5) e C: região aromática (δ_{H} 5,7 a 10,0)



Os extratos C13-GO e C14-GO foram obtidos de amostras comercializadas como fitoterápicos para o controle do diabetes. Na descrição do rótulo das embalagens constava o nome popular “insulina” e “pedra-ume-caá”, respectivamente,

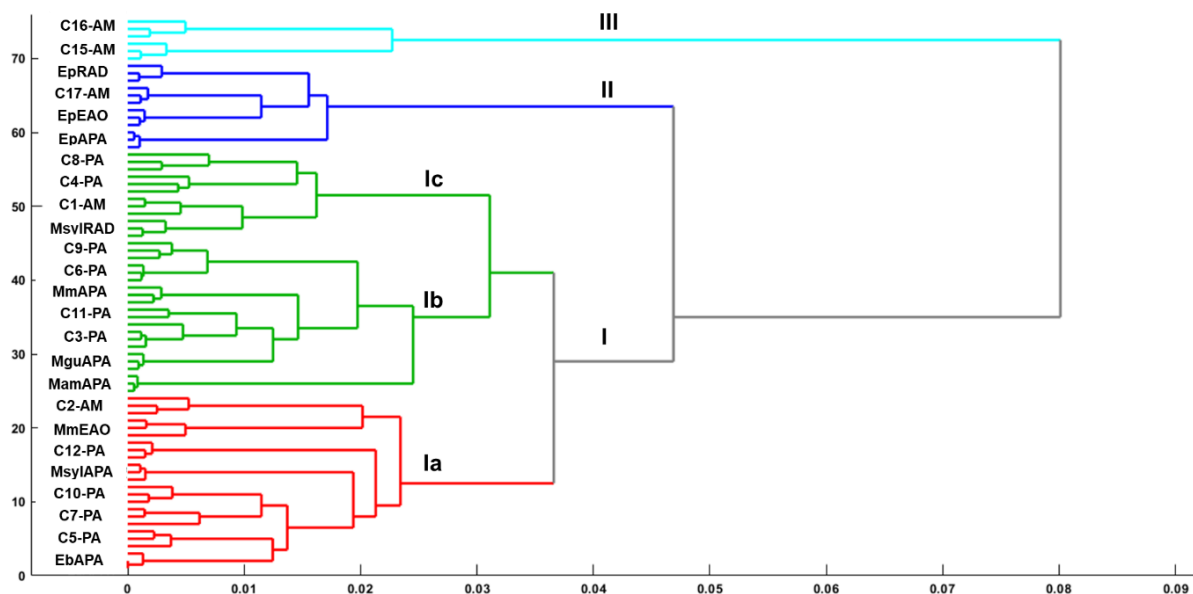
dentre outras espécies vegetais. Uma análise qualitativa preliminar desses extratos foi realizada por RMN de 1D e 2D tendo como referência os principais marcadores observados na análise não supervisionada dos dados das matrizes nativas. No espectro de RMN de ^1H do extrato C13-GO não foi possível identificar os sinais dos marcadores químicos que pudesse dar indício de que continha uma pedra-ume-caá na mistura. Já na análise espectral de C14-GO foi observado o sinal em δ_{H} 6,91 (2H), que possui correlação direta com o carbono em δ_{C} 109,2 (C-2, C6). No mapa de HMBC, o sinal em δ_{H} 6,91 possui correlação a longa distância com os carbonos em δ_{C} 109,2 (C-6); 138,3 (C-4); 145,7 (C-3,5) e 168,0 (C-7). Em comparação com a Tabela 5, a substância ácido gálico (**5**) está presente nesse extrato (Figura 54). No entanto, não é possível afirmar que em C14-GO contém uma pedra-ume-caá.

Figura 54 – Espectros de RMN de ^1H das amostras comerciais C13-GO e C14-GO (DMSO- d_6 , 500 MHz)



As amostras C13-GO e C14-GO foram excluídas da análise exploratória de dados não direcionada por se tratar de mistura de diferentes espécies vegetais, cuja composição química não se assemelha ao de uma pedra-ume-caá. Portanto, a análise por HCA dos espectros de RMN de ^1H dos extratos secos das espécies de pedra-ume-caá nativas (10 amostras) e comerciais (15 amostras) foi realizada a fim de verificar dissimilaridade química pelo Método de Ward. A matriz numérica **NC** apresentou dimensionalidade de 622.500 pontos de dados (75 espectros x 8300 variáveis em cada espectro). Os resultados na forma de dendograma estão apresentados na Figura 55 onde se verificou três aglomerados principais.

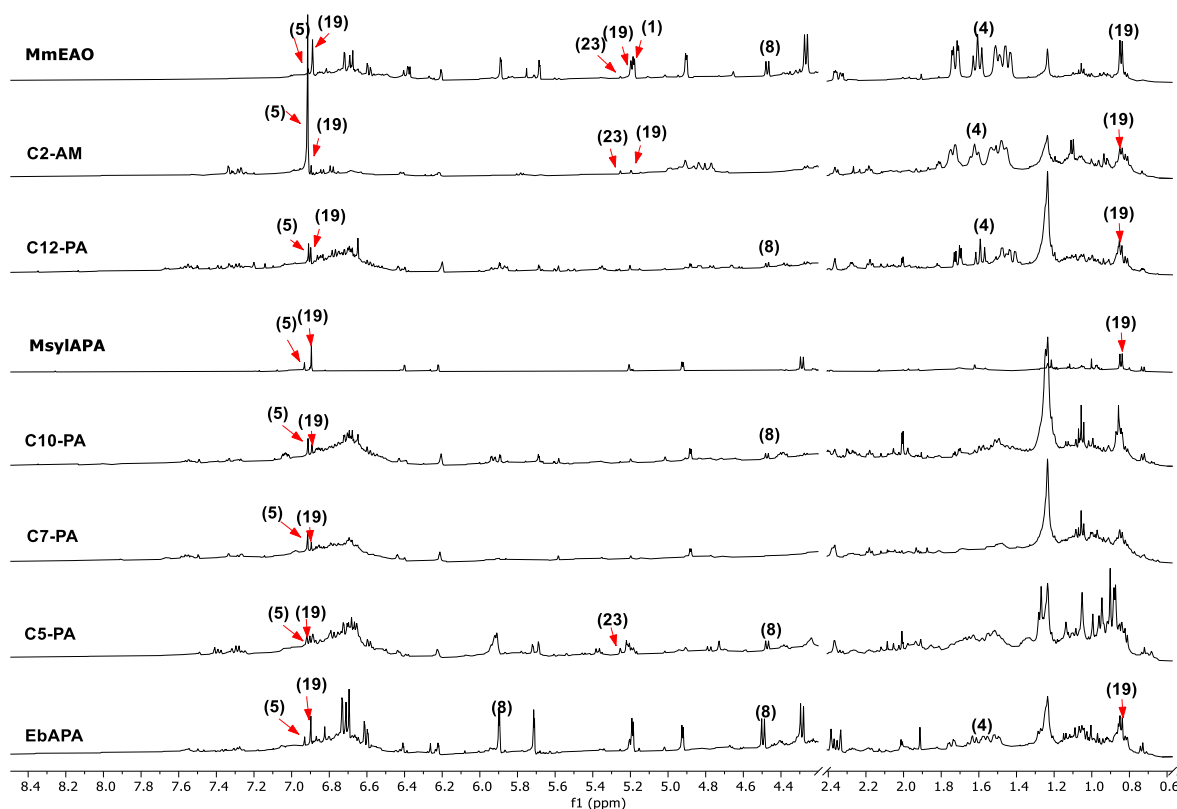
Figura 55 – Dendrograma representando similaridade de composição química entre os extratos de pedra-ume-caá nativas e das amostras comerciais



EAO (coleta realizada na Embrapa-AM), APA (coleta realizada na APA-Pará), RAD (coleta realizada na Reserva Florestal Adolpho Ducke – AM). Ep (*E. punicifolia*); Eb (*E. biflora*); Mam (*M. amazonica*); Mgu (*M. guianensis*); Mm (*M. multiflora*); Msyl (*M. sylvatica*).

O aglomerado I se subdividiu em 3 subgrupos: **Ia**, **Ib** e **Ic**. O subgrupo **Ia** é formado pelos extratos de MmEAO, MsylAPA e EbAPA e pelas amostras C5-PA, C7-PA, C10-PA e C12-PA adquiridas no mercado Ver-o-Peso (PA), C2-AM adquirida na Feira Modelo da Compensa (AM). A análise aprofundada do dendrograma e dos espectros de RMN de 1D e 2D dessas amostras comerciais foi possível identificar sinais característicos do ácido quínico (**4**) (δ_H 1,51 - δ 1,77), ácido gálico (**5**) (δ_H 6,90- δ 6,91), catequina (**8**) (δ_H 4,47), miricitrina (**19**) (δ_H 0,84; δ_H 5,19; δ_H 6,89) e quercitrina (**23**) (δ_H 0,81; δ_H 5,25; δ_H 7,33) (Figuras S160-S162, p. 311-313; S169-S171, p.320-322; S175-S177, p. 326-328; S184-S186, p. 335-337; S190-S192, p. 341-343). A análise espectral qualitativa nos leva a sugerir que as amostras C5-PA, C10-PA e C12-PA podem ser a mesma matéria-prima vegetal. Além disso, pode se tratar de misturas das folhas de *E. biflora* (EbAPA) e *M. sylvatica* (MsylAPA) devido à menor dissimilaridade química apresentada. Por outro lado, a amostra C2-AM apresenta um perfil químico semelhante a *M. multiflora* (MmEAO), pois possui o ácido quínico (**4**) em intensidade considerável, assim como o ácido gálico (**5**) (Figura 56).

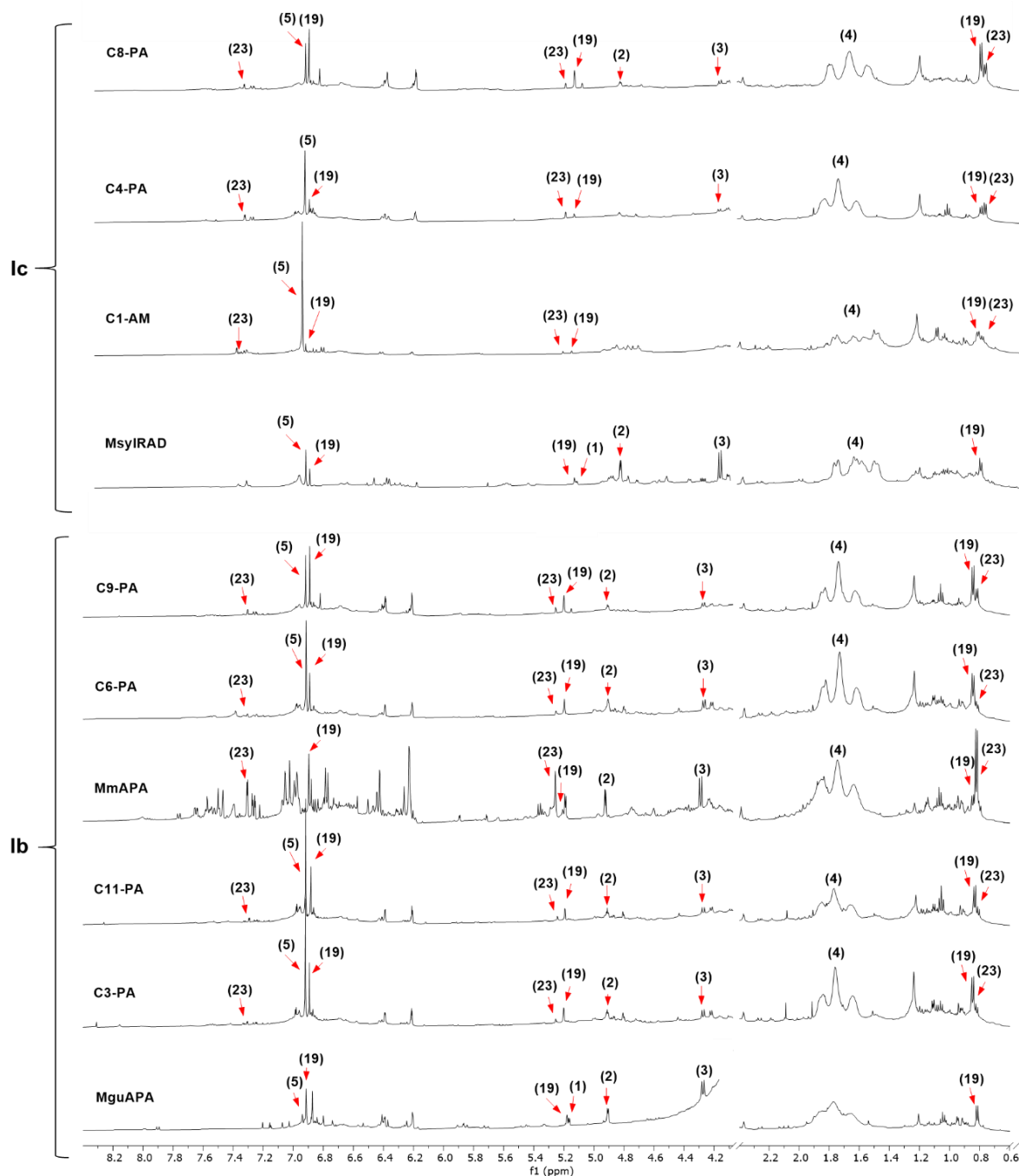
Figura 56 – Análise comparativa dos espectros de RMN de ^1H das amostras comerciais C2-AM, C5-PA, C7-PA, C10-PA, C12-PA e extratos secos de EbAPA, MsylAPA e MmEAO (DMSO- d_6 , 500 MHz)



(1): sacarose; (4): ácido quínico; (5): ácido gálico; (8): catequina; (19): miricitrina; (23): quercitrina. EAO (coleta realizada na Embrapa-AM), APA (coleta realizada na APA-Pará), Eb (*E. biflora*); Mm (*M. multiflora*); Msyl (*M. sylvatica*).

No subgrupo **Ib**, os extratos de *M. guianensis* (MguAPA) e *M. multiflora* (MmAPA) possuem menor dissimilaridade química com os extratos de C3-PA e C11-PA. Além disso, os extratos C6-APA e C9-APA são mais similares entre si e foram agrupadas nesse mesmo subgrupo. Concernente ao subgrupo **Ic**, o extrato comercial C1-AM possui maior semelhança química com *M. sylvatica* (MsylRAD) do que os extratos C4-PA e C8-PA. Tanto o subgrupo **Ib** e **Ic** possuem os marcadores químicos das espécies de pedra-ume-caá nativas. Contudo, a formação de subgrupos pode ser devido às quantidades desses constituintes. Por exemplo, no subgrupo **Ib**, os sinais dos constituintes ácido quínico (4), ácido gálico (5) e miricitrina (19) estão em intensidades equivalentes. Assim como, os sinais dos flavonoides (19) e quercitrina (23) no subgrupo **Ic** (Figura 57).

Figura 57 – Análise comparativa dos espectros de RMN de ^1H dos subgrupos **Ib** e **Ic** (DMSO- d_6 , 500 MHz)

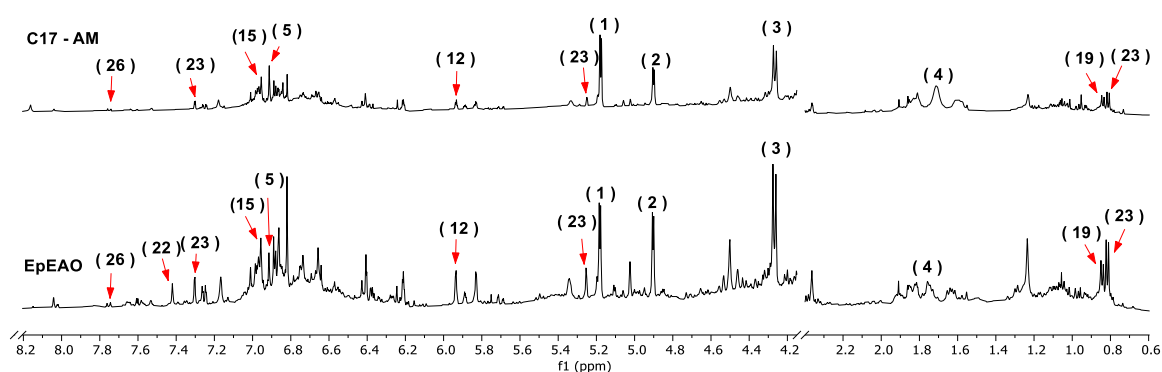


(1): sacarose; (2): α -D-glicopirranose; (3): β -D-glicopirranose; (4): ácido quínico; (5): ácido gálico; (8): catequina; (19): miricitrina; (23): quercitrina. APA (coleta realizada na APA-Pará), RAD (coleta realizada na Reserva Florestal Adolpho Ducke – AM). Mgu (*M. guianensis*); Mm (*M. multiflora*); MsyI (*M. sylvatica*).

O aglomerado **II** é formado pelos extratos de *E. puniceifolia* (EpEAO, EpAPA EpRAD) e extrato C17-AM, adquirida no Mercado Municipal Adolpho Lisboa em Manaus (AM). No dendograma, C17-AM apresentou menor dissimilaridade com

EpEAO. A análise espectral por RMN de 1D e 2D de C17-AM apresentou os constituintes químicos identificados nos extratos das espécies nativas, como os flavonoides catequina-3-O-galato (**12**), epicatequina-3-O-(3"-O-metilgalato) (**15**), além de ácido quínico (**4**), ácido gálico (**5**), miricitrina (**19**), quercitrina (**23**) e kaempferol-3-O-ramnosídeo (**26**) (Figuras S205-S207, p. 356-358). Portanto, a análise por RMN sugere que a amostra C17-AM foi obtido da pedra-ume-caá oriunda de *E. puniceifolia* (Figura 58).

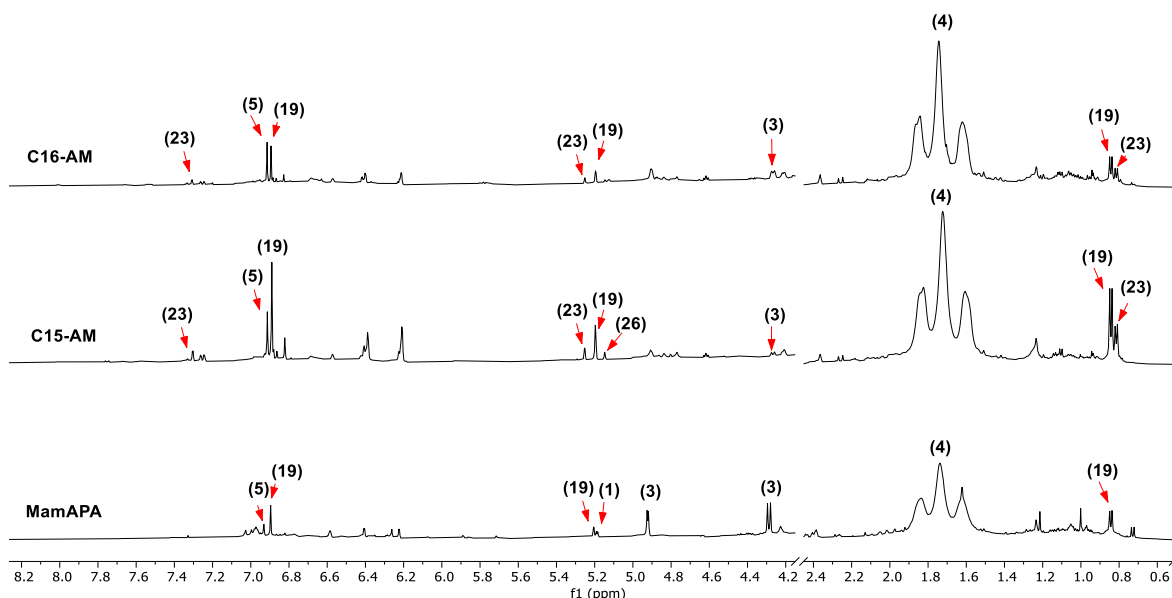
Figura 58 – Comparação dos espectros de RMN de ^1H do agrupamento II (EpEAO e C17-AM em DMSO- d_6 , 500 MHz)



EpEAO: *E. puniceifolia* coletada na Embrapa-AM. (1): sacarose, (2): α -D-glicopirranose, (3): β -D-glicopirranose, (4): ácido quínico, (5): ácido gálico, (12): catequina-3-O-galato, (15): epicatequina-3-O-(3"-O-metilgalato), (19): miricitrina, (22): ácido elágico, (23): quercitrina, (26): kaempferol-3-O-ramnosídeo.

O agrupamento III formado pelos extratos comerciais C15-AM e C16-AM apresentou maior índice de dissimilaridade química (0,08) em relação aos agrupamentos I e II. Por outro lado, nas análises espectrais por RMN de 1D e 2D foram identificados os marcadores químicos de pedra-ume-caá. Essa maior dissimilaridade pode está relacionada ao marcador ácido quínico (**4**), o qual está em maior quantidade nesses dois extratos em relação aos demais (Figura 59).

Figura 59 – Comparação dos espectros de RMN de ^1H do agrupamento III (C15-AM, C16-AM e MamAPA em DMSO- d_6 , 500 MHz)



APA (coleta realizada na APA-Pará), Mam: *Myrcia amazonica*. (3): β -D-glicopiranoze, (4): ácido quínico, (5): ácido gálico, (19): miricitrina, (23): quercitrina.

Este estudo demonstra que a RMN de ^1H é uma importante ferramenta para fornecer o perfil químico informativo para identificação dessas espécies, como também irá contribuir para futuros estudos para o controle de qualidade das matérias-primas vegetais de pedra-ume-caá. Portanto, a metodologia proposta se mostrou eficiente na identificação da composição química e análise de similaridade química das 15 amostras comerciais de pedra-ume-caá. Dentre essas, 4 amostras (C5-PA, C7-PA, C10-PA e C12-PA) são misturas de plantas, mas possuem uma pedra-ume-caá. As amostras C1-AM a C4-PA, C6-PA, C8-PA, C9-PA, C11-PA, C15-PA e C16-PA assemelham-se quimicamente com os extratos das espécies de *Myrcia*. Por outro lado, pode-se sugerir que a amostra C17-AM é uma pedra-ume-caá (*E. punicifolia*).

5.6 Análise das respostas farmacológicas *in vitro*

5.6.1 Efeito de inibição enzimática

Uma abordagem terapêutica para o tratamento do diabetes em fase inicial consiste na redução da glicemia pós-prandial (TUNDIS *et al.*, 2010). Essa terapia antidiabética é realizada retardando a absorção da glicose por meio da inibição das enzimas hidrolizantes de carboidratos (α -glucosidase e α -amilase) (TUNDIS *et al.*, 2010). Neste contexto, espécies de pedra-ume-caá são fontes promissoras para o controle da glicemia, mediante a via de inibição dessas enzimas (FIGUEIREDO-GONZÁLEZ *et al.*, 2016; GALENO *et al.*, 2014; YOSHIKAWA *et al.*, 1998). Diante disso, os extratos secos foram submetidos a avaliação de inibição enzimática, *in vitro*, frente a α -glucosidase e α -amilase. Também, os ensaios foram realizados frente a enzima lipase pancreática e os resultados estão apresentados na Tabela 7. Devido à elevada correlação espectral qualitativa usando RMN de ^1H , optou-se por realizar os bioensaios da primeira réplica de cada extrato seco obtido de cada espécie vegetal.

Tabela 7 – Atividades de inibição, concentração inibitória dos extratos secos das espécies vegetais frente as enzimas lipase, α -amilase e α -glucosidase

AMOSTRAS	Lipase	α -amilase	α -glucosidase	
	% inibição		% inibição	CI ₅₀ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
MmEAO	15,2 $\pm$ 1,5 ^{d,e}	16,4 $\pm$ 0,58 ^{d,e}	72,6 $\pm$ 0,61 ^c	64,70 $\pm$ 0,7 ^b
MmAPA	15,8 $\pm$ 0,7 ^{d,e}	14,8 $\pm$ 1,6 ^{d,e}	56,9 $\pm$ 2,1 ^d	79,90 $\pm$ 1,7 ^a
MamAPA	17,3 $\pm$ 1,0 ^{d,e}	Nd	3,2 $\pm$ 2,9 ^g	–
MguAPA	29,3 $\pm$ 2,0 ^c	27,1 $\pm$ 5,8 ^c	8,5 $\pm$ 1,4 ^f	–
MsylAPA	13,1 $\pm$ 0,9 ^e	Nd	12,1 $\pm$ 2,3 ^f	–
MsylRAD	13,9 $\pm$ 1,3 ^{d,e}	13,2 $\pm$ 2,9 ^e	32,0 $\pm$ 2,3 ^e	–
EbAPA	29,9 $\pm$ 2,0 ^c	Nd	73,2 $\pm$ 0,3 ^c	22,00 $\pm$ 0,1 ^c
EpEAO	18,5 $\pm$ 2,4 ^d	38,3 $\pm$ 3,5 ^b	83,0 $\pm$ 0,8 ^{a,b}	< 1
EpAPA	35,3 $\pm$ 2,2 ^b	24,1 $\pm$ 4,3 ^{c,d}	83,8 $\pm$ 0,3 ^a	< 1
EpRAD	26,3 $\pm$ 1,6 ^c	23,07 $\pm$ 2,7 ^{c,d}	85,9 $\pm$ 0,6 ^a	< 1
Orlistate	96,6 $\pm$ 0,8 ^a	Nd	–	–
Acarbose	–	70,0 $\pm$ 2,6 ^a	78,4 $\pm$ 0,9 ^b	62,20 $\pm$ 1,2 ^b

EAO – Coleta realizada na Embrapa-AM, APA - Coleta realizada na APA-Pará, RAD - Coleta realizada na Reserva Ducke - AM. Resultados em média $\pm$ desvio padrão em triplicata. Nd: não detectado. CI₅₀ < 1: concentração inibitória abaixo de 1,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Os extratos de *E. puniceifolia* (EpEAO, EpAPA e EpRAD), *M. multiflora* (MmEAO e MmAPA) e *E. biflora* (EbAPA) foram capazes de inibir a enzima α -glucosidase superior a 50%. Os percentuais inibitórios de MmEAO e EbAPA não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$). No entanto, são significativamente diferentes de MmAPA, EpEAO, EpAPA e EpRAD ($p < 0,05$). O estudo de GALENO e colaboradores (2014), também demonstrou que o extrato seco a 7,5% (m/v) de *E. puniceifolia* (Embrapa – AM) inibiu a enzima α -glucosidase (*Saccharomyces cerevisiae*) acima de 50%. Concernente a avaliação de inibição da enzima α -amilase, os extratos MmAPA, MmEAO, MguAPA, MsylRAD, EpEAO, EpAPA e EpRAD apresentaram atividade de inibição inferior a 50%. Além disso, todos os extratos foram positivos para atividade antilipase ($< 50\%$), e não inibiram significativamente a enzima em comparação ao padrão orlistate ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$). Contudo, Malheiros e colaboradores (2010) demonstraram que animais diabéticos induzidos por STZ tratados com a infusão das folhas de *M. guianensis* (Mgu) apresentaram alteração no metabolismo de lipídeos com redução dos níveis de triglicerídeos nesses animais.

O extrato seco de MmEAO não apresentou diferença significativa na concentração de inibição da enzima α -glucosidase (Cl_{50} de $64,70 \pm 0,7 \mu\text{g mL}^{-1}$) em relação ao padrão acarbose (Cl_{50} de $62,2 \pm 1,2 \mu\text{g mL}^{-1}$). Mas, apresentou diferença significativa em relação ao extrato seco de MmAPA (Cl_{50} de $79,9 \pm 1,7 \mu\text{g mL}^{-1}$). Este resultado diverge do valor apresentado por (FIGUEIREDO-GONZÁLEZ *et al.*, 2016), cujo constituinte químico majoritário foi miricitrina. Entretanto, esses resultados contribuem para entender o possível mecanismo de ação desses extratos. Os constituintes presentes em MmAPA e MmEAO, como ácido clorogênico (**7**), corilagina (**10**), ácido quebulágico (**13**), miricitrina (**19**), hiperosídeo (**20**) guaijaverina (**21**), já mostraram inibição da enzima α -glucosidase (OBOH *et al.*, 2015; SLANC *et al.*, 2009; TRINH *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2010; YOSHIKAWA *et al.*, 1998). Além disso os compostos, previamente quantificados na matriz MmAPA, **10**, **20** e **23** apresentam relatos do seu potencial hipoglicemiante, já antes descritos (BABUJANARTHANAM *et al.*, 2011; KU *et al.*, 2014; NANDINI *et al.*, 2019).

Além disso, EbAPA foi capaz de inibir a enzima α -glucosidase (IC_{50} de $22,0 \pm 0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$), apresentando um efeito promissor em relação ao medicamento acarbose ($\text{IC}_{50} = 62,2 \pm 1,2 \mu\text{g mL}^{-1}$) ($p < 0,05$). Contudo, esse extrato não apresentou efeito de inibição da α -amilase. Estudos prévios *in vitro* envolvendo os constituintes

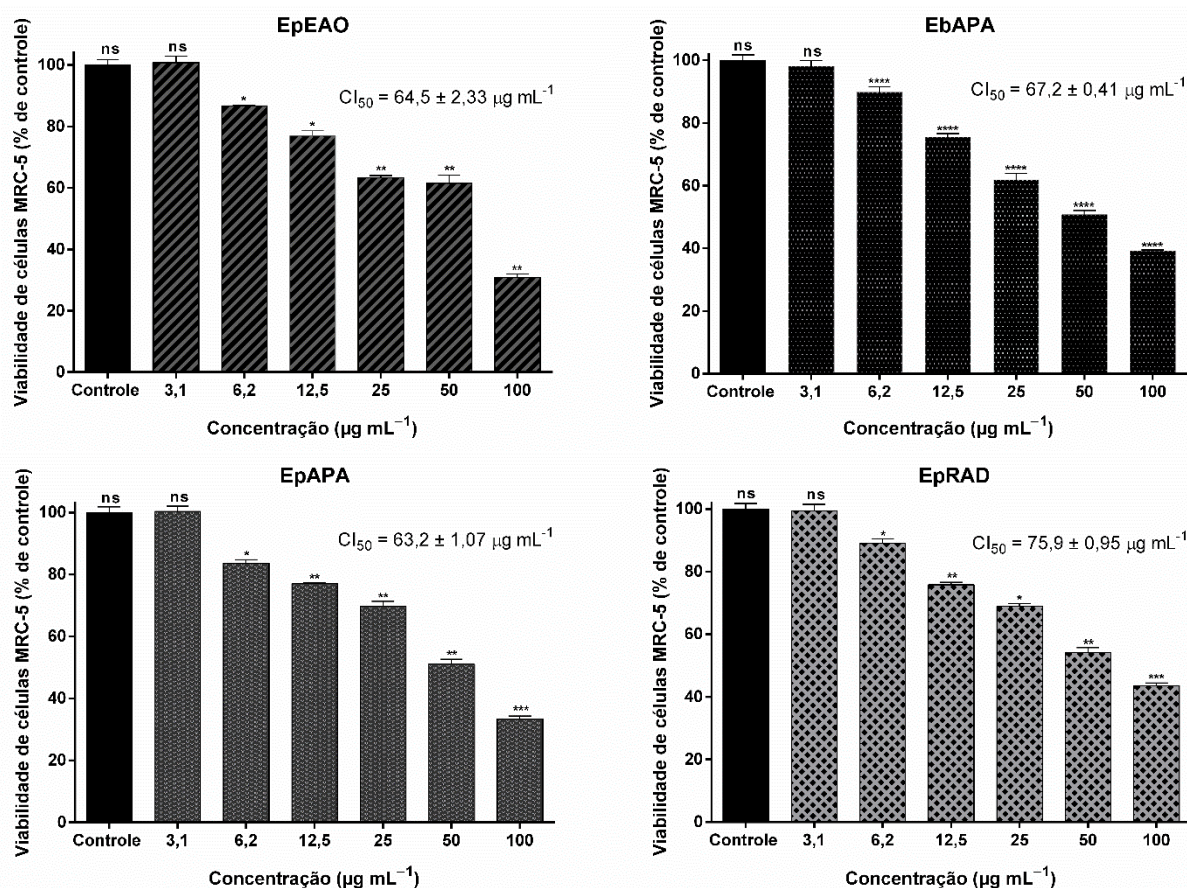
químicos identificados nesse extrato, tais como procianidina tipo-B (6) e catequina (8) revelaram elevada capacidade inibitória frente a enzima α -glucosidase (DAI *et al.*, 2019; FU *et al.*, 2021).

O mecanismo de inibição enzimático dos flavonoides catequina, quercitrina e miricitrina já foram reportados, cujas interações com os sítios ativos dessa enzima estão, principalmente, associadas as posições 2, 3 e 4 do anel C (FU *et al.*, 2021). Também, a procianidina tipo-B se liga a um dos sítios dessa enzima por meio de ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas (DAI *et al.*, 2019). Portanto, essas informações são importantes para compreender o mecanismo de ação desses constituintes sobre a atividade inibitória mais alta (CI₅₀) dos extratos EbAPA, MmAPA e MmEAO frente a enzima α -glucosidase.

5.6.2 Efeito de citotoxicidade em células MRC-5

Concernente ao estudo de citotoxicidade, os dez extratos secos de pedra-ume-caá nativas foram testadas *in vitro* frente às células de fibroblastos de pulmão humano saudável (MRC-5). Esse método experimental tem sido útil para prever a citotoxicidade celular de extratos de espécies vegetais, sendo um fator importante quando se visa atestar o potencial terapêutico de uma planta medicinal (LOBINE *et al.*, 2018). As representações gráficas a seguir apresentam a viabilidade celular de MRC-5 após serem expostas aos extratos secos em seis diferentes concentrações (3,1-100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) por 24h. De acordo com os nossos dados, os extratos quando testados na concentração de 3,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ não apresentaram diferença significativa em relação ao controle ($p > 0,05$). No entanto, os extratos secos de *Eugenia*, reduziram a viabilidade celular entre 75 - 39 % (EbPA); 77 - 33 % (EpAPA); e 75 - 43 % (EpRAD) nas concentrações de 12,5 a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente (Figura 60). Esses extratos apresentaram valores de CI₅₀ variando entre $63,2 \pm 1,07 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $75,92 \pm 0,95 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Figura 60 – Viabilidade de células MRC-5 tratadas com extratos secos das folhas de pedra-ume-caá por 24 h do gênero *Eugenia*.

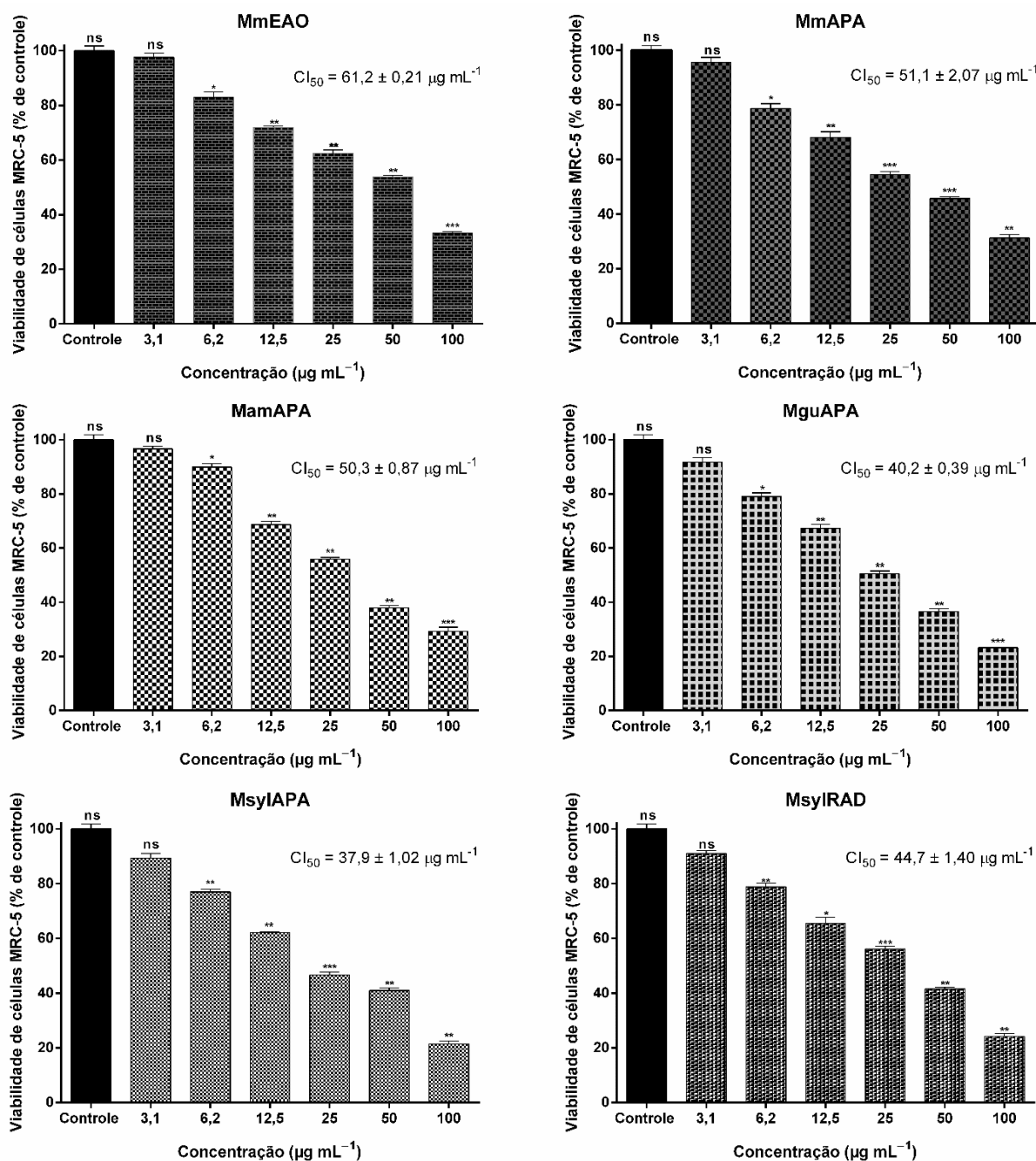


EAO (coleta realizada na Embrapa-AM), APA (coleta realizada na APA-Pará), RAD (coleta realizada na Reserva Florestal Adolpho Ducke-AM). Ep (*E. punicifolia*); Eb (*E. biflora*). * $p < 0,03$; ** $p < 0,005$; *** $p \leq 0,0007$; **** $p < 0,0001$, ns = não significativo, comparado ao grupo de controle (células não tratadas) (ANOVA – Teste Dunnett com múltipla comparação).

Os extratos das espécies de *Myrcia* reduziram a proliferação celular entre 71 - 33 % (MmEAO); 68 - 31 % (MmAPA); 68 - 29 % (MamAPA); 67 - 23 % (MguAPA); 62 - 21 % (MsylAPA), 67 - 23 % (MguAPA) e 65 - 24 % (MsylRAD) nas concentrações de 12,5 a 100 µg mL⁻¹, respectivamente (Figura 61). Esses extratos apresentaram valores de CI₅₀ variando entre 37,9 ± 1,02 µg mL⁻¹ a 61,2 ± 0,21 µg mL⁻¹. A redução em mais de 30% da viabilidade celular é considerada efeito citotóxico de acordo com a ISO 10993-5 (2009). Portanto, os resultados obtidos indicam um grau significativo de citotoxicidade dos extratos nas concentrações de 12,5 a 100 µg mL⁻¹ ($p < 0,05$). Além disso, foi avaliado *in vitro* a capacidade hemolítica dos extratos de EpEAO, EbAPA e MmAPA. Esses extratos não causaram hemólise em eritrócitos de camundongos quando testados na concentração de 2 mg mL⁻¹. Isso pode sugerir a

exclusão do mecanismo de citotoxicidade por danos à membrana celular das hemácias (JIMENEZ *et al.*, 2003).

Figura 61 – Viabilidade de células MRC-5 tratadas com extratos secos das folhas de pedra-ume-caá por 24 h do gênero *Myrcia*



EAO (coleta realizada na Embrapa-AM), APA (coleta realizada na APA-Pará), RAD (coleta realizada na Reserva Florestal Adolpho Ducke – AM). Mam (*M. amazonica*); Mgu (*M. guianensis*); Mm (*M. multiflora*); Msyl (*M. sylvatica*). * $p < 0,03$; ** $p < 0,005$; *** $p \leq 0,0005$; **** $p < 0,0001$, ns = não significativo, comparado ao grupo de controle (células não tratadas) (ANOVA – Teste Dunnett com múltipla comparação). Valores são expressos como média $\pm$ DP, $n = 3$.

5.6.3 Atividades antiglicante e sequestro de radicais livres

Os efeitos inibitórios na glicação da albumina sérica bovina (BSA) de extratos vegetais enriquecidos com compostos fenólicos, tais como procianidina B2 e flavonoides, demonstraram serem agentes promissores contra a formação de AGES (MATSUDA *et al.*, 2003; PENG *et al.*, 2008; RAMOS *et al.*, 2019). Diante disso, o presente estudo avaliou o efeito antiglicante dos extratos secos de pedra-ume-caá utilizando dois modelos de albumina sérica bovina (BSA/glioxal and BSA/frutose) (Tabela 8). Os extratos apresentaram eficácia de inibição pela via BSA/frutose. Os valores de CI_{50} são de $4,3 \pm 0,03 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $14,6 \pm 0,05 \mu\text{g mL}^{-1}$, com respostas superiores ao padrão aminoguanidina ($CI_{50} 37,6 \pm 0,03 \mu\text{g mL}^{-1}$). No entanto, esses extratos apresentaram percentual de inibição inferiores a $49,0 \pm 2,5\%$ no ensaio do modelo BSA/Glioxal. Esse resultado corrobora com a atividade antiglicante, pela mesma via, dos extratos de *E. puniceifolia*, *E. dysenterica*, *Myrcia multiflora* e *Syzygium cumini* (FRANCO *et al.*, 2020; JUSTINO *et al.*, 2020; RAMOS *et al.*, 2019).

A relação estrutura-atividade dos flavonoides como catequina (**8**) e miricitrina (**19**) para inibir a formação de AGEs já foi demonstrada (MATSUDA *et al.*, 2003; NAKAGAWA *et al.*, 2002). Os anéis B do tipo catecol e pirogalol desses constituintes são responsáveis por essa interação, respectivamente. Já a hidroxila na posição C-3 do anel C da catequina contribui fortemente com essa interação, tornando ainda mais eficaz sua atividade antiglicante (MATSUDA *et al.*, 2003; NAKAGAWA *et al.*, 2002). Portanto, esses dados sugerem que esses extratos podem ser considerados potentes inibidores de glicação em pacientes diabéticos.

Em adição, os extratos apresentaram alto teores de fenóis totais (FT) que variaram de $243,7 \pm 1,2$ a $486,7 \pm 1,9$ (mg GAEq por grama de extrato), associado às elevadas atividades de sequestro de radicais indicados pelos métodos DPPH• e ABTS•+ (Tabela 8). Esses resultados corroboram os constituintes identificados nos extratos, como também as substâncias quantificadas nos extratos de MmAPA, MmEAO, EpEAO e EbAPA. Esses valores atestam com estudos anteriores, pois espécies da família Myrtaceae tem apresentado alto teor de compostos fenólicos com propriedades antioxidante, como o extrato seco de *E. puniceifolia* (GALENO *et al.*, 2014) e o extrato dos frutos de *E. puniceifolia* (RAMOS *et al.*, 2019). Além disso, bebidas alcoólicas preparadas a partir dos frutos de araçá-boi (*E. stipitata*) (SOUZA *et al.*, 2020) e em extrato etanólico de frutos maduros de pitanga (*E. uniflora*) (VINHOLES

et al., 2017) também já apresentaram atividade de sequestro de radicais livres. De acordo com esses estudos, essas espécies também possuem em sua composição química: ácidos orgânicos, flavonoides e elagitaninos. Alguns estudos têm demonstrado que flavonoides e outros compostos fenólicos apresentam potencial inibitório em relação à glicação, estando a resposta associada positivamente às suas propriedades antioxidantes, entre outros mecanismos (YEH *et al.*, 2003).

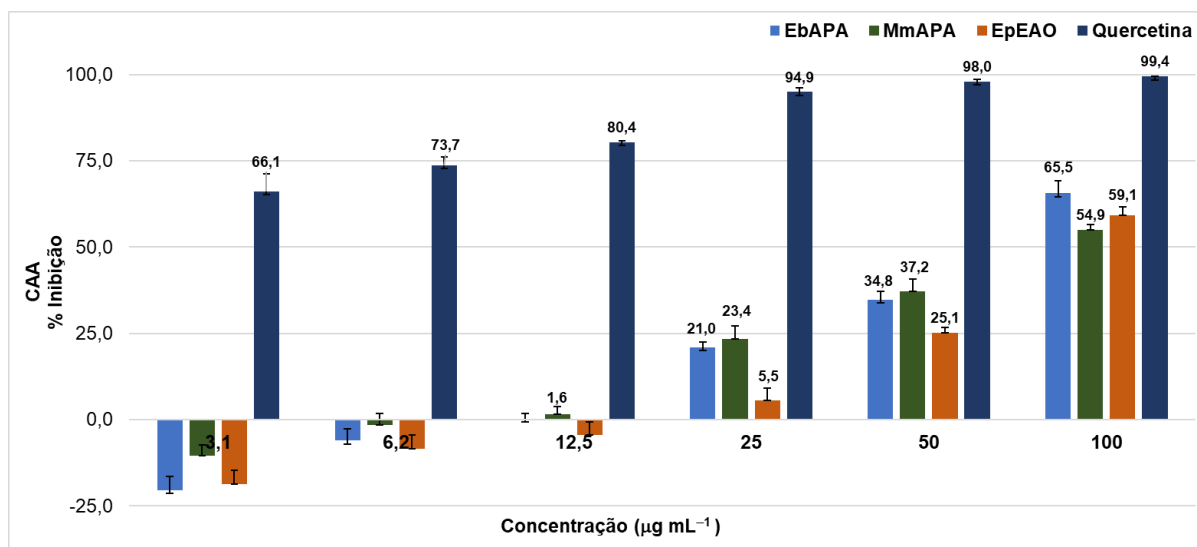
Tabela 8 – Conteúdo de fenóis totais, atividades de sequestro de radicais e antiglicante dos extratos secos das espécies vegetais de pedra-ume-caá

AMOSTRAS	FT	ABTS	DPPH		BSA/frutose		BSA/GO
	(mg GAEq g ⁻¹)	(μmol TEq g ⁻¹)	(μmol TEq g ⁻¹)	Cl ₅₀ (μg mL ⁻¹)	% inibição	Cl ₅₀ (μg mL ⁻¹)	% inibição
MmEAO	300,0 ± 0,7 ^g	1092,0 ± 28,3 ^a	1633,3 ± 11,7 ^{e,f}	19,9 ± 0,1 ^a	86,6 ± 3,5 ^{c,d,e}	8,6 ± 0,02 ^d	24,8 ± 0,7 ^d
MmAPA	486,7 ± 1,9 ^a	1032,0 ± 4,7 ^{a,b}	1856,7 ± 11,7 ^c	11,2 ± 0,5 ^{c,d}	85,5 ± 2,3 ^{c,d,e,f}	10,2 ± 0,09 ^{c,d}	49,0 ± 2,5 ^b
MamAPA	331,0 ± 2,1 ^f	803,7 ± 7,0 ^{d,e}	1693,3 ± 35,4 ^{d,e}	11,4 ± 0,4 ^{c,d}	98,3 ± 1,8 ^{a,b}	10,0 ± 0,05 ^{c,d}	27,8 ± 2,0 ^{c,d}
MguAPA	396,0 ± 4,3 ^c	963,7 ± 30,6 ^{b,c}	1961,7 ± 28,3 ^b	10,2 ± 0,4 ^d	81,3 ± 1,8 ^{d,e,f}	14,6 ± 0,05 ^b	14,2 ± 1,4 ^f
MsylAPA	383,2 ± 3,9 ^d	1022,0 ± 14,1 ^{a,b}	1593,3 ± 2,3 ^{f,g}	13,6 ± 2,3 ^b	89,0 ± 2,6 ^{c,d}	9,15 ± 0,06 ^{c,d}	27,3 ± 1,5 ^{c,d}
MsylRAD	425,6 ± 1,9 ^b	1123,7 ± 2,3 ^a	2055,0 ± 4,7 ^a	16,4 ± 1,8 ^{b,c}	100,6 ± 1,6 ^a	10,1 ± 0,10 ^{c,d}	5,0 ± 0,5 ^g
EbAPA	263,2 ± 1,9 ^h	982,0 ± 23,6 ^{b,c}	1475,0 ± 4,7 ^h	20,3 ± 1,1 ^a	80,8 ± 3,7 ^{e,f}	15,7 ± 0,07 ^b	30,4 ± 1,2 ^c
EpEAO	352,7 ± 0,2 ^e	882,0 ± 61,3 ^{d,e}	1855,0 ± 0,0 ^c	11,1 ± 0,8 ^{c,d}	92,2 ± 3,9 ^{c,d}	4,3 ± 0,03 ^e	29,8 ± 2,0 ^c
EpAPA	303,6 ± 0,9 ^g	830,3 ± 16,5 ^{d,e}	1740,0 ± 7,1 ^d	11,9 ± 0,1 ^{c,d}	84,1 ± 3,2 ^{c,d,e,f}	10,1 ± 0,07 ^{c,d}	29,4 ± 1,5 ^c
EpRAD	243,7 ± 1,2 ⁱ	740,3 ± 2,3 ^e	1561,7 ± 0,0 ^g	21,5 ± 1,6 ^a	86,4 ± 2,5 ^{c,d,e}	12,5 ± 0,09 ^{b,c}	20,0 ± 1,1 ^e
Aminoguanidina	–	–	–	–	77,4 ± 2,1 ^f	37,6 ± 0,03 ^a	–
Quercetina	–	–	–	–	–	–	84,9 ± 0,2 ^a
Ácido gálico	–	–	–	2,87 ± 0,06 ^e	–	–	–

EAO - Coleta realizada na Embrapa-AM, APA - Coleta realizada na APA-Pará, RAD - Coleta realizada na Reserva Ducke - AM. Resultados em média ± desvio padrão em triplicata. GAEq g⁻¹ = miligrama de ácido gálico por equivalente grama de extrato seco. μmol TEq g⁻¹ = micromol de equivalente grama de trolox por grama de extrato seco. BSA/frutose: atividade antiglicante pela via não oxidativa e BSA/GO: atividade antiglicante pela via oxidativa. Os valores estão apresentados com intervalo de confiança de 95%. Os valores seguidos pela mesma letra não são significativamente diferentes (Teste T, $p < 0,05$).

Além disso, a atividade antioxidante celular dos extratos na concentração de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foi determinada em culturas de células de fibroblastos humanos MRC-5. Os extratos EpAPA (75 $\pm$ 1,3%), MamAPA (55 $\pm$ 1,6%), MmEAO (75 $\pm$ 1,3%) e MsylRAD (70 $\pm$ 3,5%) foram capazes de prevenir a geração de ROS (espécies reativas de oxigênio). Assim também, os extratos EbAPA, MmAPA e EpEAO inibiram ROS acima de 50% em comparação ao padrão quercetina (Figura 62). Contudo, esses extratos apresentam citotoxicidade em células MRC-5 considerável nessa concentração. Esses extratos quando testados nas concentrações de 3,1 a 6,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$, faixa ausente de citotoxicidade, não apresentaram atividade antioxidante celular. Nesta faixa de concentração, a quercetina inibiu o estresse oxidativo celular de 66 $\pm$ 4,9% a 73 $\pm$ 2,3% e não mostrou efeito citotóxico nas células MRC-5.

Figura 62 – Porcentagem de inibição de ROS dos extratos EbAPA, MmAPA e EpEAO em comparação ao padrão quercetina



APA - Coleta realizada na APA-Pará, EAO - Coleta realizada na Embrapa-AM. EbAPA: *Eugenia biflora*; EpEAO: *E. punicifolia* e MmAPA: *Myrcia multiflora*.

Estudos anteriores demonstraram que a quercetina inibe a produção de ROS em hepatócitos induzida por glioxal (SHANGARI & O'BRIEN, 2004). Além disso, não mostrou efeito citotóxico em células MRC-5, mesmo em altas concentrações (DA SILVA *et al.*, 2021). Já os extratos MguAPA, MsylAPA e EpRAD apresentaram atividade antioxidante abaixo de 50% (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

5.7 Análise das respostas farmacológicas *in vivo*

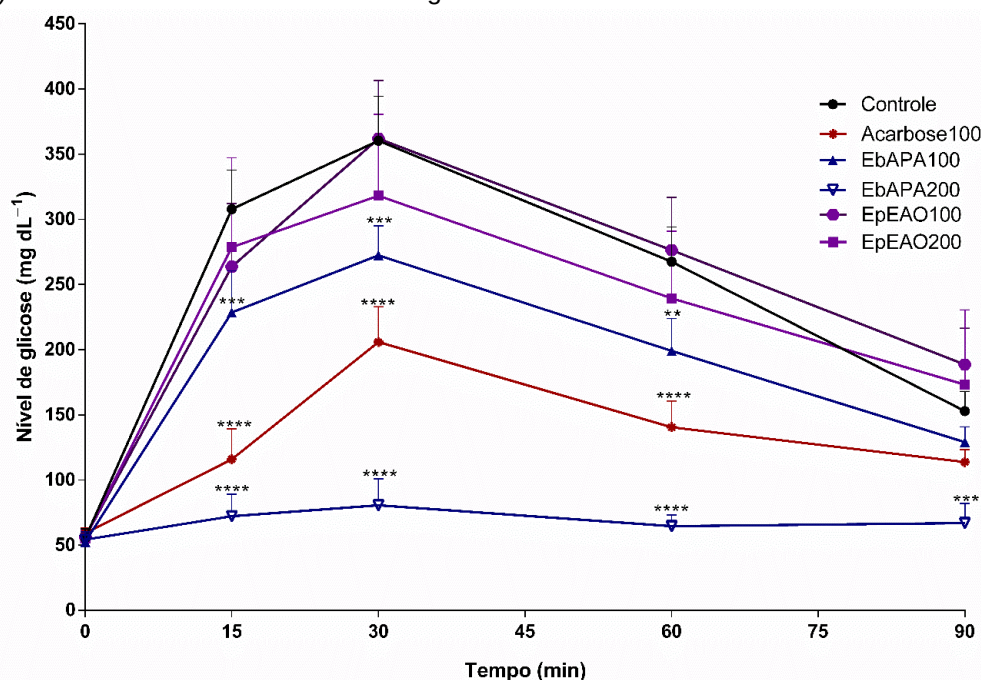
5.7.1 Curva de tolerância oral a maltose

Os extratos de *E. biflora* (EbAPA) e *E. punicifolia* (EpEAO) foram selecionados para o teste de tolerância oral a maltose diante da elevada capacidade de inibição da enzima α -glucosidase, *in vitro* (Tabela 7, p. 139).

Inicialmente, camundongos saudáveis foram submetidos a sobrecarga de maltose, gerando níveis elevados de glicose no sangue. Esse grupo controle hiperglicêmico (grupo 1) permaneceu com níveis de glicose acima de 150 mg/dL durante os 90 min de experimento (Figura 63). Quando a acarbose foi administrada na dose de 100 mg/kg pc (grupo 2), o pico pós-prandial foi significativamente reduzido a partir de 30 min. Esse mesmo comportamento foi observado quando EbAPA foi administrado na dose de 100 mg/kg pc (grupo 3). Após 90 min, não foi observada diferença significativa no nível de glicose desse grupo em relação ao grupo de controle. Por outro lado, os animais que receberam EbAPA na dose de 200 mg/kg pc (grupo 4), o pico glicêmico atingiu $80,6 \pm 20,3$ mg/dL (30 min) e foi reduzido para $67,0 \pm 14,9$ mg/dL em 90 min. Logo, esses resultados evidenciaram atividade hipoglicemiante superior à observada para o grupo de animais tratados com a acarbose. Portanto, esses resultados corroboram com o estudo de inibição enzimática *in vitro* (previamente descrito), sugerindo o efeito de inibição da enzima α -glucosidase intestinal por EbAPA.

Por outro lado, o extrato de EpEAO nas concentrações testadas (100 mg/kg pc e 200 mg/kg pc) não inibiu a enzima α -glucosidase quando comparada grupo controle hiperglicêmico (grupo 1) ($p > 0,05$). Também, não apresentou toxicidade em eritrócitos de camundongos quando testado na concentração de 2 mg mL^{-1} . Portanto, esse resultado corrobora com a literatura indicando que o mecanismo de ação antidiabética da espécie *E. punicifolia* não está relacionado a inibição da enzima α -glucosidase intestinal (BRUNETTI *et al.*, 2006; SALES *et al.*, 2014).

Figura 63 – Efeitos da administração oral dos extratos secos de *E. biflora* (EbAPA), *E. punicifolia* (EpEAO) e fármaco acarbose em camundongos com alta dose de maltose



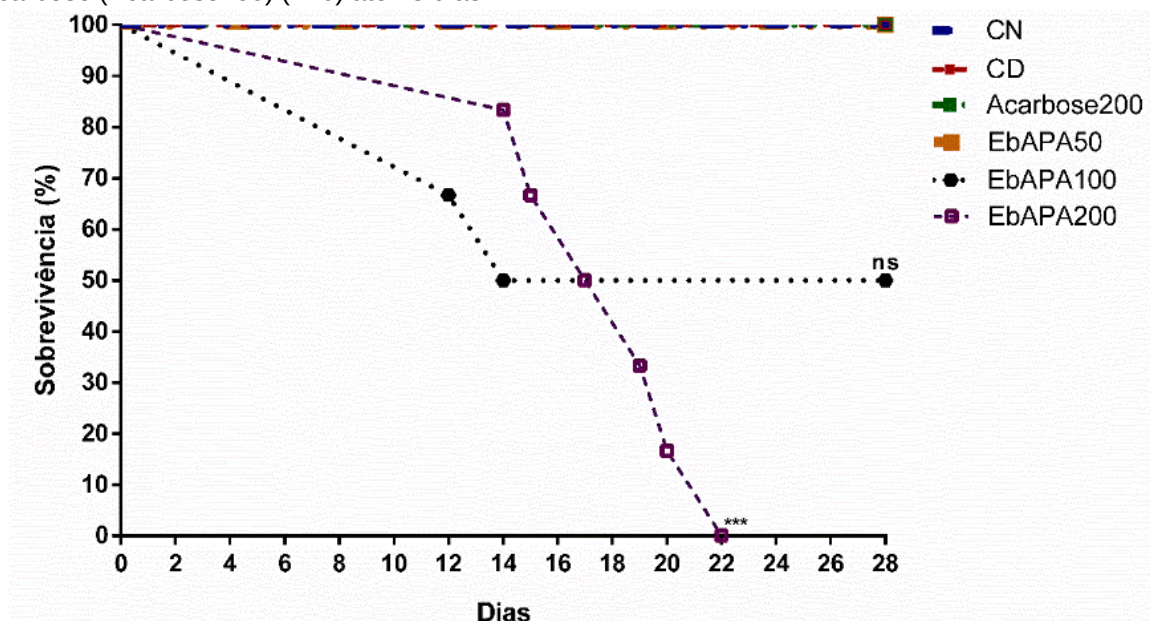
Os valores são expressos como média $\pm$ DP, $n = 5$. $*p = 0,05$; $**p = 0,002$; $****p < 0,0001$ comparado ao controle normal. (ANOVA seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunnett). Acarbose100: acarbose 100 mg/kg pc (controle positivo); EbAPA100 e EbAPA200: extrato seco de folhas de *E. biflora* (100 mg/kg e 200 mg/kg pc) e EpEAO100 e EpEAO200: extrato seco de folhas de *E. punicifolia* (100 mg/kg e 200 mg/kg pc).

5.7.2 Efeito hipoglicemiante de EbAPA e MmAPA

Diante do potencial de inibição dos níveis de glicose em animais hiperglicêmicos de extratos de *Eugenia biflora* e *M. multiflora* (YOSHIKAWA *et al.*, 1998), foi simulado um efeito cumulativo no consumo de extratos de EbAPA e MmAPA por 28 dias em animais diabéticos induzidos por STZ.

Os camundongos foram divididos em grupos e tratados em dose única diária de 50, 100 e 200 mg/kg pc de EbAPA e acarbose (200 mg/kg pc). Os animais diabéticos que receberam as dosagens de 100 mg/kg e 200 mg/kg pc de EbAPA apresentaram diarreia e alteração no comportamento, como letargia e diminuição na ingestão de alimento. Esses dois grupos apresentaram mortalidade prematura de 100% (200 mg/kg pc) e 50% (100 mg/kg pc) em até vinte e dois dias de tratamento (Figura 64). A toxicidade observada de EbAPA não deve estar relacionada à membrana celular das hemácias, visto que esse extrato não causou hemólise em eritrócitos de camundongo quando testado na concentração de 2 mg mL^{-1} .

Figura 64 – Percentual de sobrevivência dos animais do grupo controle normal (CN), grupo controle diabético (CD) e grupos tratados com extrato de *E. biflora* (EbAPA50, EbAPA100 e EbAPA200) e acarbose (Acarbose200) (n=6) até 28 dias



Cada ponto representa as proporções de sobrevivência de camundongos em um número específico de dias. Os animais tratados oralmente com EbAPA100 e EbAPA200 (100 mg/kg e 200 mg/kg pc, respectivamente) foram comparados ao grupo controle normal (CN) e grupo controle diabético (CD). A comparação das curvas de sobrevivência foi realizada pelo teste log-rank (Mantel-Cox). *** $p = 0,005$; ns: não significativo ($p > 0,05$).

As medições da glicose sanguínea nos camundongos diabéticos tratados na dosagem de 200 mg/kg pc de EbAPA não revelaram redução da glicemia.

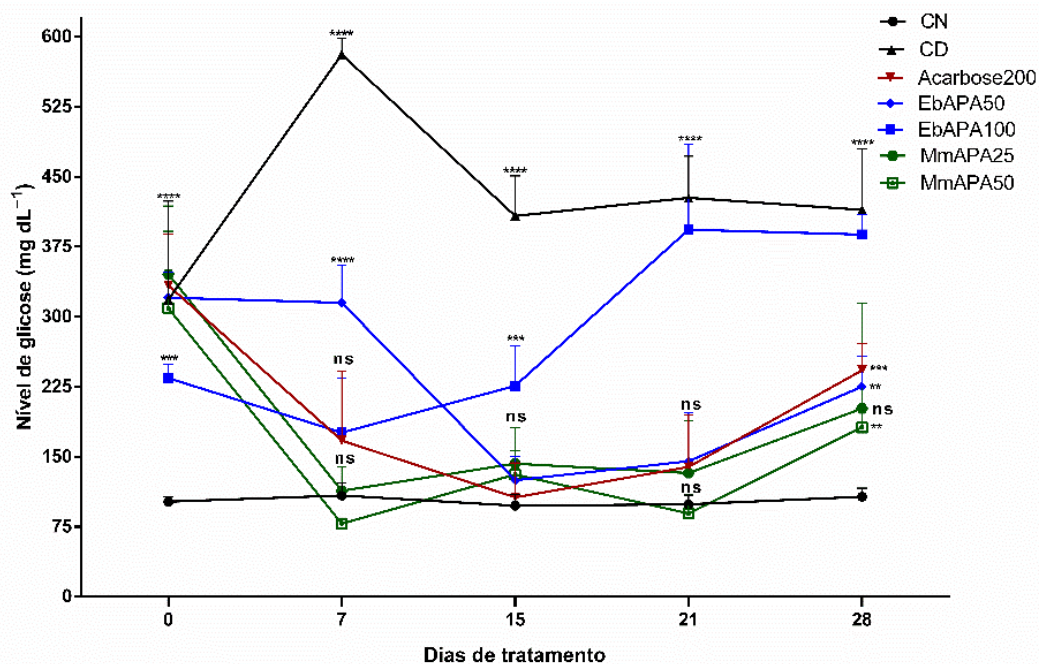
Os resultados apresentados na Figura 65 são dos grupos de animais sobreviventes que receberam EbAPA nas doses de 100 mg/kg pc e 50 mg/kg pc por 28 dias. Para o grupo de animais tratados na dosagem de 100 mg/kg pc (EbAPA100) foi observada uma redução de 24,8% no nível de glicose plasmática no D7, quando comparado aos seus níveis anteriores ao início do tratamento (D0). Ao realizar uma análise comparativa com os animais saudáveis (grupo controle normal) não houve diferença significativa no nível de glicose ($p > 0,05$). No entanto, a partir do D15, EbAPA100 perdeu seu efeito hipoglicemiante, pois os níveis glicêmicos dos animais diabéticos aumentaram em 120,7% (D28) e não apresentaram diferença significativa em relação ao grupo de controle diabético ($p > 0,05$). Já no grupo de animais administrados na dose de 50 mg/kg pc (EbAPA50), ocorreu redução nos níveis de glicose semelhante a acarbose sem apresentar mortalidade dos animais. No D15, EbAPA50 foi eficaz na redução da glicose em 60,6% em relação ao início do tratamento. Os níveis foram comparáveis ao grupo de controle e não apresentou

diferença significativa até o D21 ($p < 0,05$). Já no D28, houve uma elevação de 54,9% no nível de glicose, mas não foi estatisticamente diferente em relação a acarbose ($p > 0,05$). Em comparação ao grupo de controle diabético, os níveis de glicose do grupo EbAPA50 foram significativamente inferiores ($p < 0,0001$). A análise conjunta desses resultados evidenciou efeito hipoglicemiante de EbAPA na concentração de 50 mg/kg pc, porém efeito tóxico nas concentrações de 100 mg/kg pc e 200 mg/kg pc.

O efeito do extrato de MmAPA também estão apresentados na Figura 64. ANOVA de comparações múltiplas revelou um efeito significativo do tratamento nas duas doses administradas nos camundongos diabéticos (25 mg/kg pc e 50 mg/kg pc). A dosagem de 50 mg/kg pc foi eficaz na redução de 74,7% no nível de glicose no grupo de animais tratados (D7), quando comparado aos níveis anteriores ao início do tratamento (D0). Além disso, foi significativamente diferente em comparação ao medicamento acarbose ($p = 0,02$). Já no D15 ocorreu um aumento de 67,5% nos níveis em comparação a D7. No D21, o extrato foi eficaz na redução da glicose em 71,1% e 32% em relação D0 e D15, respectivamente. Já no D28 ocorreu um aumento (103,3%) nos níveis de glicose em relação D21, mas em relação ao início do tratamento MmAPA50 reduziu os níveis a 11%, mantendo ainda seu efeito hipoglicemiante. Em comparação ao grupo de controle normal não foi encontrada diferença significativa na redução dos níveis de glicose nos animais tratados com MmAPA50 ao longo dos 28 dias ($p > 0,05$). Também, não foi observada diferença significativa nos níveis entre as duas dosagens administradas com o medicamento acarbose ao longo do tempo ($p > 0,05$). Em comparação ao grupo de controle diabético, os níveis de glicose dos grupos tratados com MmAPA50 e MmAPA25 foram significativamente inferiores durante todo o experimento ($p < 0,0001$).

A análise de variância seguida do teste de Dunnett mostrou que não há diferença significativa entre os extratos administrados de EbAPA50, MmAPA25 e MmAPA50 após o D15 ($p > 0,005$). Além disso, os extratos de *E. biflora* e *M. multiflora* apresentaram comportamento anti-hiperglicêmico semelhante a acarbose. Essa atividade pode ser atribuída aos flavonoides catequina (8) e miricitrina (19), pois o mecanismo de inibição da enzima α -glucosidase desses flavonoides é do tipo competitiva reversível, o mesmo mecanismo da acarbose (FU *et al.* 2021). Ademais, o efeito antidiabético da miricitrina já foi demonstrado em estudo anterior (KIM *et al.*, 2020).

Figura 65 – Efeitos da administração oral do extrato seco das folhas de *E. biflora* (EbAPA), *M. multiflora* (MmAPA) e fármaco acarbose sobre a concentração de glicose no sangue de camundongos diabéticos



Os valores são expressos como média $\pm$ DP. $**p = 0,006$, $***p < 0,0006$; $****p < 0,0001$ comparado ao grupo de controle normal. ns = não significativo ($p > 0,05$) versus grupo controle normal (ANOVA seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunnett). CN: grupo controle normal; CD: grupo controle diabético; Acarbose200 (controle positivo): acarbose 200 mg/kg pc; EbAPA50 e EbAPA100: extrato seco de folhas de *E. biflora* (50 mg/kg e 100 mg/kg pc); MmAPA25 e MmAPA50: extrato seco de folhas de *M. multiflora* (25 mg/kg e 50 mg/kg pc), respectivamente.

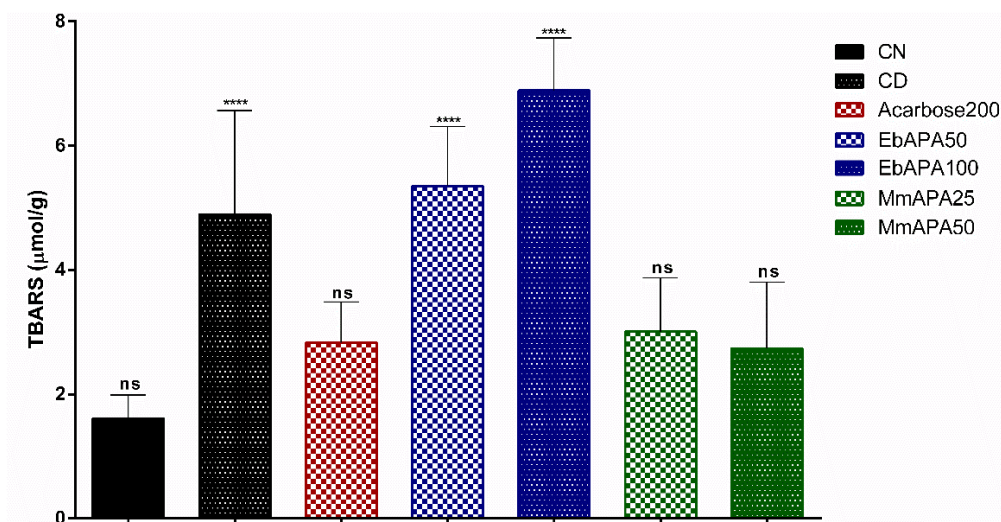
Outro aspecto a ser considerado nesse experimento, foi observado efeito colateral gastrointestinal (fezes moles) para os animais tratados com acarbose e EbAPA. Esse efeito colateral do medicamento acarbose já era prevista, pois ocorre em cerca de 20% dos pacientes (BRIETZKE, 2015). Este estudo revelou o potencial hipoglicemiante do extrato das folhas de *E. biflora* (EbAPA50) e *M. multiflora* (MmAPA25 e MmAPA50) para retardar a absorção de carboidratos. Além disso, corrobora outros experimentos com animais diabéticos induzidos por STZ que foram submetidos a extratos de folhas enriquecidos com flavonóides, e cujos resultados demonstraram efeitos anti-hiperglicêmicos (MOLLICA *et al.*, 2017a; 2017b; VAREDA *et al.*, 2014).

5.7.3 Efeito de EbAPA e MmAPA na peroxidação lipídica

O aumento de ROS e a diminuição das defesas antioxidantes endógenos gera o estresse oxidativo, que tem sido considerado como um dos fatores patogênicos comuns das complicações diabéticas (ARAKI & NISHIKAWA, 2010). A peroxidação lipídica pode formar adutos de proteínas, a partir de aldeídos tóxicos, tais como malondialdeído, acetaldeído e 4-hidroxi-2-nonenal. Esses compostos podem também contribuir para os efeitos deletérios do estresse oxidativo no diabetes, levando a danos celulares e disfunção orgânica (PICAZO *et al.*, 2017). Os níveis de espécies reativas, tais como do ácido tiobarbitúrico (TBARS), têm sido utilizados como marcador do estresse oxidativo em pacientes diabéticos do tipo 1 e 2 (PICAZO *et al.*, 2017; TURK *et al.*, 2002).

Neste estudo, o dano induzido por ROS no fígado pelo conteúdo de TBARS foi investigado. Elevações significativas (3,0 vezes) na quantidade de TBARS no fígado foram observadas no grupo de controle diabético em comparação com o grupo de controle normal (Figura 66).

Figura 66 – Níveis de peroxidação lipídica em homogenatos de fígado de camundongos



O conteúdo de TBARS são expressos em $\mu\text{mol/g}$ de fígado. **** $p < 0,0001$ versus grupo controle normal. ns = não significativo ($p > 0,05$) (ANOVA seguido pelo teste de Tukey com múltiplas comparações).

O tratamento com o medicamento acarbose reduziu o dano oxidativo para os níveis do grupo de controle normal ($p > 0,05$). Esses dados estão de acordo com um estudo anterior, o qual relatou a diminuição no índice de malondialdeído em glândulas salivares de animais diabéticos induzido por STZ quando submetido a

acarbose (DECONTE *et al.*, 2011). No grupo de animais tratados com MmAPA25 e MmAPA50, os índices de TBARS foram reduzidos aos níveis normais ($p > 0,05$). Esse resultado corrobora com a atividade de eliminação dos radicais livres DPPH e ABTS, bem como a atividade antioxidante celular em MRC-5 desse extrato, anteriormente descritos. Um dos constituintes majoritários presente nesse extrato, a quercitrina (**23**) já preveniu a peroxidação lipídica em homogenatos cerebrais induzida por diferentes agentes indutores (WAGNER *et al.*, 2006). Também, os compostos corilagina (**10**) e ácido quebulágico (**13**) inibiram a geração de ROS e peroxidação lipídica (KINOSHITA *et al.*, 2007). Além disso, a corilagina apresenta efeito protetor contra toxicidade hepática (KINOSHITA *et al.*, 2007). Já a miricitrina (**19**) reduz o estresse oxidativo e acelera a recuperação do fígado após lesão hepática induzida por CCl_4 (DOMITROVIC' *et al.*, 2015). Assim, pode-se sugerir que esses compostos contribuem para a ação antioxidante de MmAPA resultando na prevenção da lesão hepática.

No entanto, os índices de TBARS nos grupos de animais tratados com EbAPA50 e EbAPA100 não foram significativamente diferentes em relação ao grupo de controle diabético ($p > 0,05$). A análise desses dados sugere que a toxicidade em concentrações elevadas (100 mg/kg pc) pode estar relacionado ao efeito pró-oxidante dos constituintes fenólicos presentes nesse extrato, quando administrado por um tempo prolongado, agravando o estresse oxidativo (VARATHARAJAN *et al.*, 2013).

Embora, a intervenção terapêutica dos flavonoides na redução do estresse oxidativo já tenha sido relatada (HUSSAIN *et al.*, 2020), esses constituintes podem exibir atividade pró-oxidante quando utilizados em determinadas condições. Por exemplo, a administração crônica de uma dose elevada do extrato etanólico enriquecido de catequinas em modelo de animais com nefropatia diabética mostrou o aumento de marcadores de estresse oxidativo. Consequentemente, isso levou ao agravamento da disfunção renal em comparação com doses mais baixas (VARATHARAJAN *et al.*, 2013). Dentre os compostos fenólicos com atividade pró-oxidante destaca-se a catequina (**8**), a qual já apresentou efeito no dano oxidativo da hemoglobina (LU *et al.*, 2011). Outro composto flavonoídico com efeito pró-oxidante é a quercetina (**23**), que dependendo da concentração, diminuiu a viabilidade celular e a capacidade antioxidante total (ROBASZKIEWICZ *et al.*, 2007). A análise desses dados sugere um possível mecanismo que pode acarretar a perda do efeito

hipoglicemiante de EbAPA por um período de uso prolongado. Portanto, a continuidade dos estudos pré-clínicos é necessária a fim de investigar a hipótese do extrato das folhas de *E. biflora* causar efeito deletério sobre as funções hepáticas.

5.7.4 Análise dos parâmetros bioquímicos

Os parâmetros bioquímicos foram medidos após os 28 dias de tratamento dos camundongos diabéticos com os extratos secos EbAPA e MmAPA em comparação aos grupos de controle (Tabela 9). O efeito de EbAPA e MmAPA no perfil lipídico foram avaliados sob os níveis de colesterol e triglicerídeos em comparação ao grupo de controle diabético. Os resultados mostraram que não houve diferenças significativas em relação aos grupos que receberam tratamento com EbAPA e MmAPA e o grupo de controle normal ($p > 0,05$), indicando que a indução do diabetes por estreptozotocina não alterou esse perfil.

Tabela 9 – Efeito do extrato seco das folhas de *E. biflora* e *M. multiflora* no perfil lipídico e nas enzimas dos rins e fígado

Parâmetros	CN	CD	Acarbose200	EbAPA50	EbAPA100	MmAPA25	MmAPA50
Colesterol (mg dL ⁻¹)	87,1 ± 9,1 ^a	85,9 ± 12,1 ^a	92,1 ± 18,9 ^a	82,1 ± 15,9 ^a	97,5 ± 6,3 ^a	73,0 ± 9,0 ^a	72,8 ± 19,8 ^a
Triglicerídeos (mg dL ⁻¹)	44,8 ± 16,0 ^{a,b}	68,3 ± 16,5 ^a	38,9 ± 13,9 ^{a,b}	44,4 ± 30,5 ^{a,b}	31,3 ± 12,4 ^{a,b}	43,9 ± 21,4 ^a	56,1 ± 19,2 ^a
Ureia (mg dL ⁻¹)	43,9 ± 5,8 ^b	79,2 ± 15,2 ^a	54,7 ± 2,3 ^b	64,7 ± 21,0 ^{a,b}	86,0 ± 12,2 ^a	46,8 ± 16,6 ^b	59,5 ± 8,8 ^b
Creatinina (mg dL ⁻¹)	0,3 ± 0,08 ^b	1,0 ± 0,2 ^a	0,9 ± 0,05 ^a	0,8 ± 0,4 ^a	1,1 ± 0,3 ^a	1,0 ± 0,4 ^a	1,4 ± 0,3 ^a
Ácido úrico (mg dL ⁻¹)	2,9 ± 0,5 ^{b,c}	6,3 ± 2,1 ^a	1,2 ± 0,6 ^c	2,3 ± 1,3 ^{b,c}	4,3 ± 1,9 ^{a,b}	1,9 ± 0,6 ^b	1,4 ± 0,4 ^b
AST (U L ⁻¹)	15,3 ± 7,6 ^c	50,5 ± 21,6 ^{a,b}	59,5 ± 23,3 ^a	25,9 ± 9,5 ^{b,c}	19,2 ± 7,2 ^c	18,5 ± 6,3 ^c	12,1 ± 6,3 ^c
ALT (U L ⁻¹)	18,2 ± 12,4 ^b	52,6 ± 14,1 ^a	10,8 ± 5,5 ^b	17,2 ± 7,6 ^b	22,2 ± 10,8 ^b	nd	nd

Resultados em média ± desvio padrão em triplicata. nd: não detectado. Os valores seguidos pela mesma letra não são significativamente diferente (teste T, $p < 0,05$). CN: grupo controle normal; DC: grupo de controle diabético; Acarbose200: acarbose 200 mg/kg pc; EbAPA50 e EbAPA100: extrato seco das folhas de *E. biflora* 50 mg/kg e 100 mg/kg pc, respectivamente. MmAPA25 e MmAPA50: extrato seco das folhas de *M. multiflora* 25 mg/kg e 50 mg/kg pc, respectivamente.

Por outro lado, os níveis de ácido úrico se tornaram elevados no grupo de controle diabético (2,1 vezes) em relação ao grupo de controle normal. Isso pode ser

consequência dos distúrbios metabólicos do diabetes que aumenta a atividade da xantina oxidase e peroxidação lipídica (EIDI *et al.*, 2006). Além disso, a glicação das proteínas pode resultar na perda muscular e aumento da liberação de purina, principal fonte de ácido úrico (EIDI *et al.*, 2006). Contudo, os níveis de ácido úrico para os grupos tratados com EbAPA50, MmAPA25, MmAPA50 e acarbose foram reduzidos.

Quanto aos níveis de ureia e creatinina, observou-se aumento significativo de 1,8 e 3,3 vezes, respectivamente, para o grupo de controle diabético em comparação com o grupo de controle normal. Por outro lado, o grupo de animais tratados com a acarbose e MmAPA apresentaram uma redução significativa no nível de ureia ($p < 0,05$). No entanto, os grupos de animais tratados com EbAPA não apresentaram diferença significativa em relação ao grupo controle diabético ($p > 0,05$). Todos os grupos de animais diabéticos apresentaram elevação nos níveis de creatinina, independente do tratamento. A elevação desse parâmetro bioquímico pode indicar uma disfunção na filtração glomerular (AMADI *et al.*, 2018).

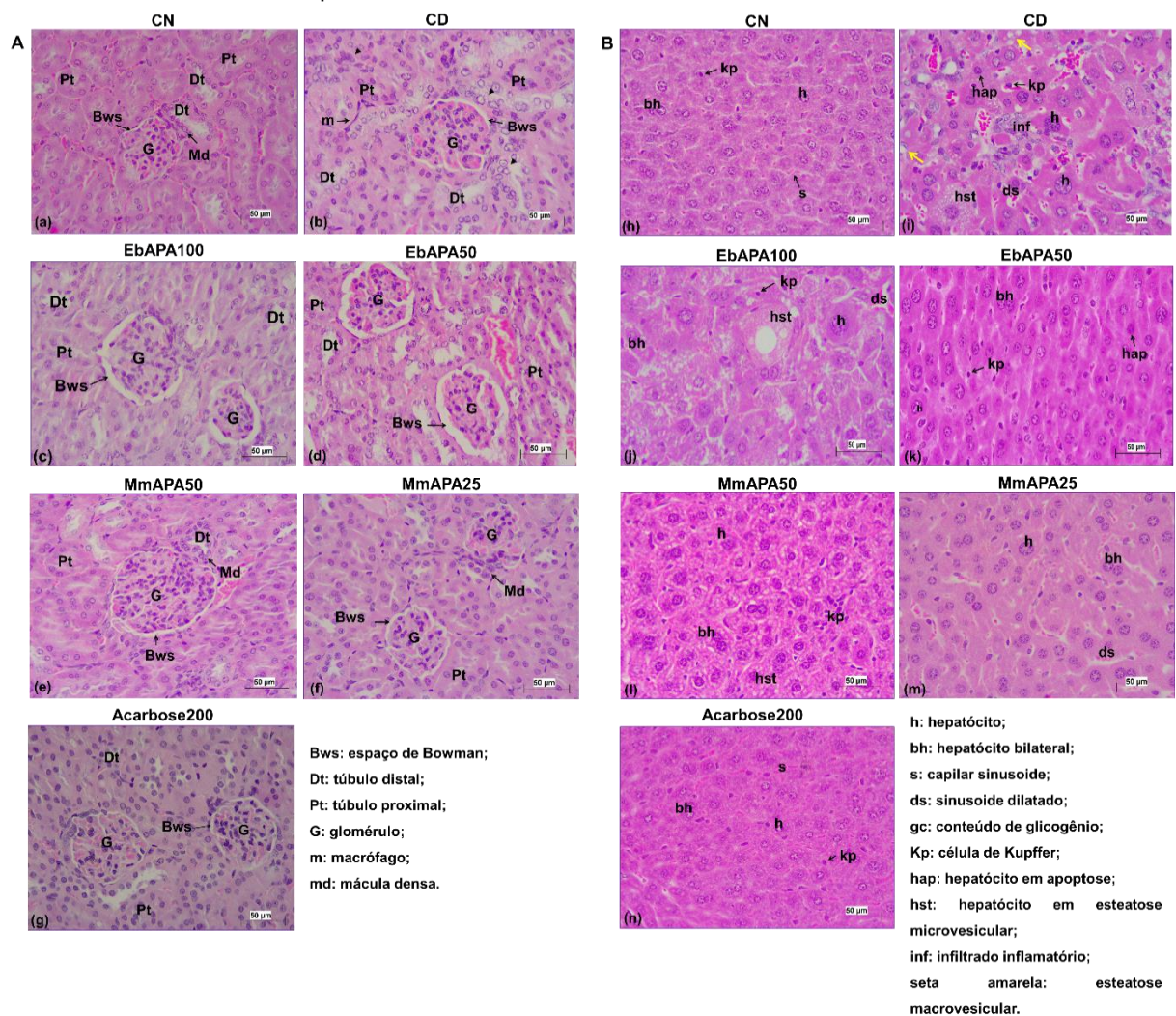
Em relação aos níveis enzimáticos de AST e ALT, observou-se que estes se mostraram elevados nos animais do grupo de controle diabético ($p < 0,05$), podendo indicar dano hepático ativo (EIDI *et al.*, 2006). Por outro lado, os grupos de animais tratados com EbAPA, MmAPA e acarbose apresentaram níveis enzimáticos normais ($p > 0,05$).

5.7.5 Exames histopatológicos de rins e fígado

Os órgãos (rins e fígado) foram cuidadosamente analisados visando verificar sinais de toxicidade e eficácia terapêutica nos animais que receberam tratamento com os extratos de EbAPA e MmAPA. A análise histológica dos rins demonstrou parênquima renal com histoarquitetura preservada e regular no grupo de controle normal (Figura 67, a). Por outro lado, em animais do grupo de controle diabético, o parênquima do córtex renal exibiu perda do padrão da arquitetura dos túbulos renais (Dt e Pt), bem como alterações como hiperplasia e hipertrofia celular (cabeça de seta). Além disso, o aumento de células fagocitárias (macrófagos) circundando os túbulos foram observados (Figura 67, b). Essas alterações corroboram os indicadores bioquímicos da função renal, os quais apresentaram níveis elevados nesses camundongos indicando o dano celular. Embora, os níveis desses indicadores

se apresentem reduzidos no grupo de animais tratados com EbAPA100 e EbAPA50 e na micrografia do tecido renal exibir glomérulos preservados, nota-se uma desorganização tubular evidente (Figura 67, c-d). Em contrapartida, observou-se redução nos níveis de alterações histopatológicas nos animais diabéticos tratados com MmAPA50, MmAPA25 e acarbose em comparação ao grupo de controle diabético (Figura 67, e-g).

Figura 67 – Efeito do extrato seco das folhas de *E. biflora* e *M. multiflora* (EbAPA e MmAPA) em camundongos diabéticos induzidos por estreptozotocina (STZ) na histopatologia dos rins (A) e fígado (B) determinada via H & E (ampliação de 40X, barra de escala de 50 µm). CN: controle normal; CD: controle diabético induzido por STZ



A análise histopatológica do fígado do grupo de controle normal apresentou parênquima hepático preservado mostrando cordões de hepatócitos (h) com conteúdo de glicogênio (gc), além de alguns hepatócitos binucleados (bh) com capilares sinusóides (s) estreitos (Figura 67, h). No grupo de controle diabético, os hepatócitos se mostram mais volumosos apresentando aspecto de esteatose microvesicular (hst) (HAZEM *et al.*, 2022). Também foram observadas gotículas bem definidas e únicas (seta amarela) com aspecto morfológico de esteatose macrovesicular (HARB *et al.*, 2020). Além de hepatócitos em apoptose, aumento das células de Kupffer, infiltrado inflamatório (inf) e dilatação sinusoidal hepática (ds) (Figura 67, i). Isso se correlaciona com os níveis elevados das enzimas AST e ALT, confirmando dano hepatológico nesses animais. Embora, os níveis dessas enzimas se apresentaram normais no grupo de animais tratados com EbAPA100 e EbAPA50, observa-se que as alterações na morfologia hepática não foram reduzidas (Figura 67, j-k). Já as seções do tecido do grupo de animais tratados com MmAPA50, MmAPA25 e acarbose exibiram histoarquitetura hepática mais preservada em comparação ao grupo de controle diabético (Figura 67, l-n).

6 CONCLUSÃO

O presente trabalho apresentou a identificação de vinte e seis compostos a partir dos extratos secos das espécies de pedra-ume-caá nativas. Dentre os constituintes, destacam-se carboidratos, ácidos orgânicos e compostos fenólicos do tipo taninos condensados, elagitaninos e flavonoides glicosilados. RMNq de ^1H mostrou que os constituintes quercitrina, hiperosídeo e corilagina estão em altas concentrações no extrato seco de *Myrcia multiflora* (APA), bem como a catequina no extrato de *E. biflora*.

A aplicação de métodos quimiométricos nos dados espectrais de RMN de ^1H dos extratos secos de pedra-ume-caá possibilitou verificar que os principais marcadores químicos dessas espécies são ácido quínico, ácido gálico, catequina, miricitrina e quercitrina. Catequina-3-O-galato e epicatequina-3-O-(3"-O-metilgalato) foram identificados somente nos extratos de *E. puniceifolia*. Além disso, esses marcadores foram identificados em 15 amostras comercializadas como pedra-ume-caá. Dentre essas, através da análise por HCA e identificação desses marcadores químicos, foi comprovado que a espécie *E. puniceifolia* é comercializada no Mercado Municipal Adolpho Lisboa (Manaus). Esses resultados demonstram que a metodologia adotada nesse estudo químico se mostrou eficaz na descrição do perfil químico das espécies de pedra-ume-caá e de amostras comerciais.

Concernente aos estudos, *in vitro*, os extratos secos das espécies de pedra-ume-caá nativas apresentaram atividades de sequestro de radicais livres e antiglicante pela via não oxidativa. Os extratos de MmAPA, MmEAO, EpEAO, EpAPA, EpRAD e EbAPA apresentaram a capacidade de inibir a enzima α -glucosidase, sugerindo um possível mecanismo de ação. Contudo, não foi observado a mesma capacidade frente as enzimas α -amilase e lipase. Além disso, observou-se uma citotoxicidade em células MRC-5 desses extratos.

No estudo, *in vivo*, foi demonstrado o potencial hipoglicemiante dos extratos de *E. biflora* e *M. multiflora* para retardar a absorção de carboidratos. Esses resultados são associados aos constituintes catequina, miricitrina, quercitrina, procianidina tipo-B e corilagina, presentes nesses extratos. Além disso, os resultados mostraram que as dosagens administradas do extrato de *E. biflora* (100 mg/kg e 200 mg/kg de peso corporal) causaram efeitos colaterais e mortalidade nos animais diabéticos tratados. Esses efeitos podem estar relacionados ao agravamento do estresse oxidativo no

fígado durante um período de uso prolongado. No entanto, a continuidade dos estudos pré-clínicos é necessária para validar essa hipótese, pois o uso prolongado deste chá pode ser prejudicial aos seus usuários devido à sua considerável toxicidade. Logo, novas investigações se fazem necessárias.

Portanto, esta tese poderá alicerçar futuros estudos químicos e farmacológicos dessas espécies de pedra-ume-caá. Além disso, possibilitará a identificação de matérias-primas vegetais comercializadas como pedra-ume-caá, uma vez que este trabalho revelou os principais marcadores químicos dessas matrizes vegetais amazônicas.

REFERÊNCIAS

- ADEROGBA, M. A.; NDHLALA, A. R.; RENGASAMY, R. R.; STADEN, J.V. Antimicrobial and Selected *in vitro* Enzyme Inhibitory Effects of Leaf Extracts, Flavonols and Indole Alkaloids Isolated from *Croton menyharthii*. *Molecules*, v. 18, n. 10, p. 12633–12644, 2013.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução RDC Nº 48. 2004. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2004/rdc0048_16_03_2004.html. Acesso em: 14 Abr 2022.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução RDC Nº 26. 2014. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2014/rdc0026_13_05_2014.pdf. Acesso em: 14 Abr 2022.
- AHMED. N. Advanced Glycation endproducts – role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Research and Clinical Practice*, v. 67, p. 3–21, 2005.
- ALAM, M. M.; MEERZA, D.; NASEEM, I. Protective effect of quercetin on hyperglycemia, oxidative stress and DNA damage in alloxan induced type 2 diabetic mice. *Life Sciences*, v. 109, n. 1, p. 8–14, 2014.
- ALARA, O. R.; ABDURAHMAN, N. H.; UKAEGBU, C. H. Extraction of phenolic compound: A review. *Current Research in Food Science*, v. 4, p. 200–214, 2021.
- ALVES FILHO, E. G.; SILVA, L. M. A.; ARAÚJO, N. V. P.; ALVES, E. G.; LIÃO, L. M.; ALCANTARA, G. B. Qualitative and quantitative control of pediatric syrups using Nuclear Magnetic Resonance and chemometrics. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 153, p. 29–36, 2018a.
- ALVES FILHO, E. G.; BRAGA, L. N.; SILVA, L. M. A.; MIRANDA, F. R.; SILVA, E. O.; CANUTO, K. M.; MIRANDA, M. R.; DE BRITO, E. S.; ZOCCOLO, G. J. Physiological changes for drought resistance in different species of *Phyllanthus*. *Scientific Reports*, v. 8, n. 1, p. 1–13, 2018b.
- AMADI, P.U., AGOMUO, E.N., BOB-CHILE AGADA, A.I., NJOKU, U.C., IFEANACHO, M.O., OKEREKE, J.C., IHEKA, C.U., OSUOHA, J.O. Toxicities of selected medicinal plants and floras of lower phyla. *Alexandria Journal of Medicine*, v. 54, p. 587–596, 2018.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION (ADA). 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2021. *Diabetes Care*, v. 44, supplement 1, p. S15–S33, 2021.
- AMOROZO, M. C. de M., GÉLY, A. Uso de plantas medicinais por caboclos do baixo Amazonas. Barcarena, PA, Brasil. *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi*, vol. 4, p. 47–131, 1988.

AN, X.; ZHANG, L.; YUAN, Y.; WANG, B.; YAO, Q.; LI, L.; ZHANG, J.; HE, M.; ZHANG, J. Hyperoside pre-treatment prevents glomerular basement membrane damage in diabetic nephropathy by inhibiting podocyte heparanase expression. *Scientific Reports*, v. 7, p. 1–12, 2017.

ANDRADE-CETTO, A.; BECERRA-JIMÉNEZ, J.; CÁRDENAS-VÁZQUEZ, R. Alfa-glucosidase-inhibiting activity of some Mexican plants used in the treatment of type 2 diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 116, n. 1, p. 27–32, 2008.

ARANHA, E. S. P. Avaliação do potencial anticâncer *in vitro* de óleos essenciais de plantas do gênero *Eugenia*. Dissertação de mestrado, Programa de Pós-Graduação em Ciências farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Brasil, 2014.

ARAKI, E., NISHIKAWA, T. Oxidative stress: A cause and therapeutic target of diabetic complications. *Journal of Diabetes Investigation*, v. 1, p. 90–96, 2010.

ARAUJO, N. M. P.; ARRUDA, H. S.; FARIAS, D. de P.; MOLINA, G.; PEREIRA, G. A.; PASTORE, G. M. Plants from the genus *Eugenia* as promising therapeutic agents for the management of diabetes mellitus: A review. *Food Research International*, v. 142, n. 110182, p. 1–16, 2021.

ARAUJO, N. M. P.; ARRUDA, H. S.; DOS SANTOS, F. N.; DE MORAIS, D. R.; PEREIRA, G. A.; PASTORE, G. M. LC-MS/MS screening and identification of bioactive compounds in leaves, pulp and seed from *Eugenia calycina* Cambess. *Food Research International*, v. 137, n. 109556, p. 1–10, 2020.

ARYA, A., AL-OBAIDI, M. M. J., KARIM, R. B., TAHA, H., KHAN, A. K., SHAHID, N., SAYEM, A. S., LOOI, C. Y., MUSTAFA, M. R., MOHD, M. A., ALI, H. M., 2015. Extract of *Woodfordia fruticosa* flowers ameliorates hyperglycemia, oxidative stress and improves β -cell function in streptozotocin-nicotinamide induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 175, p. 229–240, 2015.

ASGARY, S.; NADERI, GH.; SARRAFZADEGAN, N.; GHASSEMI, N.; BOSHTAM, M.; RAFIE, M.; AREFIAM, A. Anti-oxidant effect of flavonoids on hemoglobin glycosylation. *Pharmaceutical Acta Helvetiae*, v. 73, n. 5, p. 223–226, 1999.

AYRES, M. C. C.; CHAVES, M. H.; RINALDO, D.; VILEGAS, W.; VIEIRA JUNIOR, G. M. Constituintes químicos e atividade antioxidante de extratos das folhas de *Terminalia fagifolia* Mart. et Zucc. *Química Nova*, v. 32, n. 6, p. 1509–1512, 2010.

BABUJANARTHANAM, R.; KAVITHA, P.; RAO, U. S.; PANDIAN, M. R. Quercitrin a bioflavonoid improves the antioxidant status in streptozotocin: induced diabetic rat tissues. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v. 358, p. 121–129, 2011.

BALISTEIRO, D. M.; DE ARAUJO, R. L.; GIACAGLIAB, L. R.; GENOVESE, M. I. Effect of clarified Brazilian native fruit juices on postprandial glycemia in healthy subjects. *Food Research International*, v. 100, p. 196–203, 2017.

BALTHAZAR, C. F.; GUIMARÃES, J. T.; ROCHA, R. S.; PIMENTEL, T. C.; NETO, R. P. C.; TAVARES, M. I. B.; GRAÇA, J. S.; ALVES FILHO, E. G.; FREITAS, M. Q.;

ESMERINO, E. A.; GRANATO, D.; RODRIGUES, S.; RAICES, R. S. L.; SILVA, M. C.; SANT'ANA, A. S. CRUZ, A. G. Nuclear magnetic resonance as an analytical tool for monitoring the quality and authenticity of dairy foods. *Trends in Food Science and Technology*, v. 108, p. 84–91, 2021.

BARBOSA, J. H. P.; SOUZA, I. T.; SANTANA, A. E. G.; GOULART, M. O .F. Determinação dos produtos avançados de glicação (AGEs) e de lipoxidação (ALEs) em alimentos e em sistemas biológicos: avanços, desafios e perspectivas. *Química Nova*, v. 39, n. 5, p. 608–620, 2016.

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

BARROS NETO, B. DE; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. 25 anos de quimiometria no Brasil. *Química Nova*, v. 29, n. 6, p. 1401–1406, 2006.

BASTING, R. T.; NISHIJIMA, C. M.; LOPES, J. A.; SANTOS, R. C.; PÉRICO, L. L.; LAUFER, S.; BAUER, S.; COSTA, M. F.; SANTOS, L. C.; ROCHA, L. R. M.; VILEGAS, W.; SANTOS, A. R. S.; DOS SANTOS, C.; HIRUMA-LIMA, C. A. Antinociceptive, anti-inflammatory and gastroprotective effects of a hydroalcoholic extract from the leaves of *Eugenia punicifolia* (Kunth) DC. in rodents. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 157, p. 257–267, 2014.

BASTOS, R. G.; SALLES, B. C. C.; BINI, I. F.; CASTALDINI, L. P.; SILVA, L. C. D.; VILELA, A. A.; MICHELONI, A. L. C.; DA SILVA, G. M.; DA SILVA, P. H. C.; MAURE, A. K.; SANTOS, L. L.; ROSA, C. P.; AMORIM, A. F. S.; DA ROCHA, C. Q.; VILEGAS, W.; PAULA, F. B. A.; DA SILVA, G. A.; DA SILVA, M. A. Phytochemical composition, antioxidant and in vivo antidiabetic activities of the hydroethanolic extract of *Eugenia florida* DC. (Myrtaceae) leaves. *South African Journal of Botany*, v. 123, p. 317–332, 2019.

BHATTACHERJEE, A.; DATTA, A. Mechanism of antiglycating properties of syringic and chlorogenic acids *in vitro* glycation system. *Food Research International*, v. 77, p. 540–548, 2015.

BRIETZKE, S.A. Oral Antihyperglycemic Treatment Options for Type 2 Diabetes Mellitus. *Medical Clinics of North America*, v. 99, p. 87–106, 2015.

BROWNLEE, M.; VLISSARA, L.; KOONEY, A. Aminoguanidine Prevents Diabetes-Induced Arterial Wall Protein Cross-Linking. *Science*, v. 232, n. 4758, p. 1629–1632, 1986.

BRUNETTI, I. L.; VENDRAMINI, R. C.; JANUÁRIO, A. H.; FRANÇA, S. C.; PEPATO, M. T. Effects and toxicity of *Eugenia punicifolia* extracts in streptozotocin-diabetic rats. *Pharmaceutical Biology*, v. 44, n. 1, p. 35–43, 2006.

CALÃO, V. Y. P. Caracterização físico-química, composição e capacidade antioxidante do óleo essencial de *Myrcia amazonica* DC. (Myrtaceae). Dissertação de

mestrado, Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais da Amazônia, Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA), Brasil, 2014.

CANTANHEDE FILHO, A. J.; SANTOS, L. S.; GUILHONA, G. M. S. P.; ZOGHBI, M. DAS G. B.; PORTS, P. S.; RODRIGUES, I. C. S. Triterpenoides, fenólicos e efeito fitotóxico das folhas de *Eugenia flavescens* DC (Myrtaceae). *Quimica Nova*, v. 40, n. 3, 2017.

CANUTO, G. A. B.; DA COSTA, J. L.; DA CRUZ, P. L. R.; DE SOUZA, A. R. L.; FACCIO, A. T.; KLASSEN, A.; RODRIGUES, K. T.; TAVARES, M. F. M. Metabolômica: Definições, Estado-da-Arte E Aplicações Representativas. *Quimica Nova*, v. 41, n. 1, p. 75–91, 2018.

CASCAES, M. M.; GUILHON, G. M. S. P.; ANDRADE, E. H. A.; ZOGHBI, M. DAS G. B.; SANTOS, L. S. 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.

CHANG, Z.; ZHANG, Q.; LIANG, W.; ZHOU, K.; JIAN, P.; SHE, G.; ZHANG, L. Comprehensive Review of the Structure Elucidation of Tannins from *Terminalia* Linn. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2019, p. 1–26, 2019.

CHAVES, E. M. F.; BARROS, R. F. M. Diversidade e uso de recursos medicinais do carrasco na APA da Serra da Ibiapaba, Piauí, Nordeste do Brasil. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, v. 14, n. 3, p. 476–486, 2012.

CLARIDGE, T. D. W. High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry. 2^a ed. Oxford: Tetrahedron Organic Chemistry Series. 2009. 383p.

CLEMEN-PASCUAL, L. M., MACAHIG, R. A. S., ROJAS, N. R. L. Comparative toxicity, phytochemistry, and use of 53 Philippine medicinal plants. *Toxicology Reports*, v. 9, p. 22–35, 2022.

COLNAGO, L. A.; ANDRADE, F. D. de. RMN NO c In: *Biotecnologia aplicada à Agro&Indústria*. 1^a ed. São Paulo: Brucher, 2017, p. 439–470.

COMMITTEE ON HERBAL MEDICINAL PRODUCTS (HMPC). Glossary on herbal teas. European Medicines Agency, 2010.

CORREIA, S. DE J.; DAVID, J. M.; DA SILVA, E. P.; DAVID, J. P.; LOPES, L. M. X.; GUEDES, M. L. S. Flavonóides, norisoprenóides e outros terpenos das folhas de *Tapirira guianensis*. *Quimica Nova*, v. 31, n. 8, p. 2056–2059, 2008.

CRUZ, A. V. DE M.; KAPLAN, M. A. C. Uso Medicinal De Espécies Das Famílias Myrtaceae e Melastomataceae no Brasil. *Floresta e Ambiente*, v. 11, n. 1, p. 47–52, 2006.

CUNHA, A. L.; ALVES FILHO, E. G.; SILVA, L. M. A.; RIBEIRO, P. R. V.; RODRIGUES, T. H. S.; DE BRITO, E. S.; DE MIRANDA, M. R. A. Chemical composition of thermally processed coconut water evaluated by GC–MS, UPLC–

HRMS, and NMR. Food Chemistry, v. 324, n. 186874, p. 1–9, 2020.

DA COSTA, M. P. F.; FERNANDES, L. D. R. S.; PIMENTEL, R. R. Análise da anatomia floral da *Eugenia punicifolia* (Humb., Bonpl. & Kunth) DC. Saúde & Ambiente em revista, v. 5, n. 2, p. 12–17, 2010.

DA CUNHA, F. A. B.; WACZUK, E. P.; DUARTE, A. E.; BARROS, L. M.; ELEKOFEHINTI, O. O.; MATIAS, E. F. F.; DA COSTA, J. G. M.; SANMI, A. A.; BOLIGON, A. A.; DA ROCHA, J. B. T.; SOUZA, D. O.; POSSER, T.; COUTINHO, H. D. M.; FRANCO, J. L.; KAMDEM, J. P. Cytotoxic and antioxidative potentials of ethanolic extract of *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) leaves on human blood cells. Biomedicine & Pharmacotherapy, v. 84, p. 614–621, 2016.

DAI, T., CHEN, J., MCCLEMENTS, D.J., LI, T., LIU, C. Investigation the interaction between procyanidin dimer and α -glucosidase: Spectroscopic analyses and molecular docking simulation. International Journal of Biological Macromolecules, v. 130, p. 315–322, 2019.

DA SILVA, F. K. S.; DO ROSÁRIO, A. S.; SECCO, R. DE. S.; ZOGHBI, M. DAS G. B. Levantamento das espécies conhecidas como pedra-ume-caá (Myrtaceae), com ênfase nas comercializadas na cidade de Belém, Pará, Brasil. Biota Amazônia, v. 5, n. 1, p. 7–15, 2015.

DA SILVA, L. A.; SARRAZIN, S. L. F.; OLIVEIRA, R. B.; SUEMITSU, C.; MAIA, J. G. S.; MOURÃO, R. S. V. Composition and Antimicrobial Activity of Leaf Essential Oils of *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. European Journal of Medicinal Plants, v. 13, n. 3, p. 1–9, 2016.

DA SILVA, S. V. S., BARBOZA, O. M., SOUZA, J. T., SOARES, É. N., DOS SANTOS, C. C., PACHECO, L. V., SANTOS, I. P., MAGALHÃES, T. B. D. S., SOARES, M. B. P., GUIMARÃES, E. T., MEIRA, C. S., COSTA, S. L., DA SILVA, V. D. A., DE SANTANA, L. L. B., SANTOS JÚNIOR, A. D. F. Structural Design, Synthesis and Antioxidant, Antileishmania, Anti-Inflammatory and Anticancer Activities of a Novel Quercetin Acetylated Derivative. Molecules, v. 26(22), p. 6923, 2021.

DAVIS, A. L.; CAI, Y.; DAVIES, A. P.; LEWIS, J. R. ^1H and ^{13}C NMR Assignments of Some Green Tea Polyphenols. Magnetic Resonance in Chemistry, v. 34, n. 11, p. 887–890, 1996.

DAZA, L. D.; FUJITA, A.; GRANATO, D.; FÁVARO-TRINDADE, C. S.; GENOVESE, M. I. Functional properties of encapsulated Cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.) fruit extract. Food Bioscience, v. 18, p. 15–21, 2017.

DE ARAÚJO, F. F.; FARIAS, D. DE P.; NERI-NUMA, I. A.; DIAS-AUDIBERT, F. L.; DELAFIORI, J.; DE SOUZA, F. G.; CATHARINO, R. R.; DO SACRAMENTO, C. K.; PASTORE, G. M. Chemical characterization of *Eugenia stipitata*: A native fruit from the Amazon rich in nutrients and source of bioactive compounds. Food Research International, v. 139, n.109904, 2021.

DE OLIVEIRA, A. R.; PEREIRA, C. A.; Inhibition of alpha-amylase by “insulin plant”

(*M. sphaerocarpha* DC) extracts: an alternative for the treatment of diabetes mellitus?. Journal of Applied Pharmaceutical Science, v. 5, p. 89-93, 2015.

DE SOUZA, L. A. F.; DE MOURA, V. M.; RAPOSO, J. D.; A.; DE SOUZA, L. F.; DE OLIVEIRA, R. B.; SANTOS, L. S.; ARAÚJO, R. N. M.; DA SILVA, A. M. M.; ARANHA, E. P.; SUEMITSU, C.; GUERRA, C. E.; CHALKIDIS, H. DE M.; PACHECO, S.; MOURÃO, R.H.V. 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.

DE SOUZA, M. A. D. Estudos em *Eugenia* L. (Myrtaceae) na Amazônia Central: Taxonomia com o uso de ferramentas morfoanatômicas. Tese de doutorado, Programa de Pós-Graduação em Botânica, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Brasil, 2015.

DE SOUZA, M. A. D.; KAWASAKI, M. L.; HOLST, B. K. Myrtaceae. In: RIBEIRO, J. E. L. S.; HOPKINS, M. J. G.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C. A.; COSTA, M. A. S.; BRITO, J. M.; MARTINS, L. H. P.; LOHMANN, L. G.; ASSUNÇÃO, P. A. C. L.; PEREIRA, E. C.; SILVA, C. F.; MESQUITA, M. R.; PROCÓPIO, L. C. (Orgs.). Flora da Reserva Ducke: Guia de Identificação de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central. INPA-DFID, 1999, p. 417–436.

DE SOUZA, M. A. D.; SOBRAL, M. Six new Amazonian Myrtaceae. Phytotaxa, v. 425, n. 3, p. 113–126, 2019.

DECONTE, S.R., OLIVEIRA, R.J.S., CALÁBRIA, L.K., OLIVEIRA, V.N. DE, GOUVEIA, N.M. DE, MORAES, A.S., ESPINDOLA, F.S. Alterations of antioxidant biomarkers and type I collagen deposition in the parotid gland of streptozotocin-induced diabetic rats. Archives of Oral Biology, v. 56, p. 744–751, 2011.

DI NASO, F. C.; FORGIARINI JUNIOR, L. A.; FORGIARINI, L. F.; PORAWSKI, M.; DIAS, A. S.; MARRONI, N. A. P. Aminoguanidine reduces oxidative stress and structural lung changes in experimental diabetes mellitus. Jornal Brasileiro de Pneumologia, v. 36, n. 4, p. 485–489, 2010.

DJOUKENG, J. D.; ABOU-MANSOUR, E.; TAPONDJOU, L. A.; LONTSI, D.; TABACCHI, R. Identification of Ellagic Acid Derivatives from Stem Bark of *Syzygium guineense* (Myrtaceae). Natural Product Communications, v. 2, n. 3, p. 261–266, 2007.

DOAN, C. C.; LE, T. L.; HO, N. Q. C.; LA, T. H. L.; NGUYEN, V. C.; LE, V. D.; NGUYEN, T. P. T.; HOANG, N. S. Bioactive chemical constituents, *in vitro* anti-proliferative activity and *in vivo* toxicity of the extract of *Curcuma singularis* Gagnep rhizomes. Journal of Ethnopharmacology, v. 284, 114803, 2022.

DOMITROVIC´, R.; RASHED, K.; CVIJANOVIC´, O.; VLADIMIR- KNEŽEVIC´, S.; ŠKODA, M.; VIŠNIC´, A. Myricitrin exhibits antioxidant, anti-inflammatory and antifibrotic activity in carbon tetrachloride-intoxicated mice. Chemico-Biological Interactions, v. 230, p. 21–29, 2015.

DOS SANTOS, C.; MIZOBUCCHI, A. L.; ESCARAMBONI, B.; LOPES, B. P.;

ANGOLINI, C. F. F.; EBERLIN, M. N.; TOLEDO, K. A. DE.; NÚÑEZ, E. G. F. Optimization of *Eugenia punicifolia* (Kunth) D. C. leaf extraction using a simplex centroid design focused on extracting phenolics with antioxidant and antiproliferative activities. BMC Chemistry, v. 14, n. 1, p. 1–13, 2020.

DUTRA, L. M.; SANTOS, A. D. DA C.; LOURENÇO, A. V. F.; NAGATA, N.; HEIDEN, G.; CAMPOS, F. R.; BARISON, A. ¹H HR-MAS NMR and chemometric methods for discrimination and classification of *Baccharis* (Asteraceae): A proposal for quality control of *Baccharis trimera*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v. 184, p. 1–9, 2020.

EIDI, A., EIDI, M., ESMAEILI, E. Antidiabetic effect of garlic (*Allium sativum* L.) in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. Phytomedicine, v. 13, p. 624–629, 2006.

ESTORK, D. M.; GUSMÃO, D. F.; PACIENCIA, M. L. B.; DÍAZ, I. E. C.; VARELLA, A. D.; YOUNES, R. N.; REIS, L. F. L.; MONTERO, E. F. S.; BERNADI, M. M.; SUFFREDINI, I. B. First chemical evaluation and toxicity of *Casinga-cheirosa* to balb-c male mice. Molecules, v. 19, n. 1, p. 3973–3987, 2014.

FABRE, N.; RUSTAN, I.; DE HOFFMAN, E.; QUETIN-LECLERCQ, J. Determination of Flavone, Flavonol, and Flavanone Aglycones by Negative Ion Liquid Chromatography Electrospray Ion Trap Mass Spectrometry. Journal of American Society for Mass Spectrometry, v. 12, n. 1, p. 707–715, 2001.

FERREIRA, E. A.; GRIS, E. F.; REBELLO, J. M.; CORREIA, J. F.; DE OLIVEIRA, L. F.; WILHELM FILHO, D.; PEDROSA, R. C. The 2',4',6'-Trihydroxyacetophenone isolated from *Myrcia multiflora* has antiobesity and mixed hypolipidemic effects with the reduction of lipid intestinal absorption. Planta Medica, v. 77, n. 14, p. 1569–1574, 2011.

FERREIRA, M. M. C. Quimiometria - Conceitos, Métodos e Aplicações. Campinas, São Paulo: Editora Unicamp, 2015, 496p.

FIGUEIREDO, P. L. B.; FERNANDES, H. A.; DA SILVA, A. R. C.; ALVES, N. S. F.; SETZER, W. N.; DA SILVA, J. K. R.; MAIA, J. G. S. Variability in the chemical composition of *Eugenia biflora* essential oils from the Brazilian Amazon. Natural Product Communications, v. 15, n. 12, p. 1–6, 2019.

FIGUEIREDO-GONZÁLEZ, M.; GROSSO, C.; VALENTÃO, P.; ANDRADE, P. B. α -glucosidade and α -amylase inhibitors from *Myrcia* spp.: a stronger alternative to acarbose?. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v. 118, p. 322–327, 2016.

FLAMINI, R. Recent Applications of Mass Spectrometry in the Study of Grape and Wine Polyphenols. ISRN Spectroscopy, v. 2013, p. 1–45, 2013.

FRANCO, R. R.; ZABISKY, L. F. R.; LIMA JÚNIOR, J. P. DE.; ALVES, V. H. M.; JUSTINO, A. B.; SARAIVA, A. L.; GOULART, L. R.; ESPINDOLA, F. S. Antidiabetic effects of *Syzygium cumini* leaves: A non-hemolytic plant with potential against

process of oxidation, glycation, inflammation and digestive enzymes catalysis. Journal of Ethnopharmacology, v. 261, 113132, p. 1–15, 2020.

FU, M., SHEN, W., GAO, W., NAMUJIA, L., YANG, X., CAO, J., SUN, L. Essential moieties of myricetins, quercetins and catechins for binding and inhibitory activity against α -Glucosidase. Bioorganic Chemistry, v. 115, 105235, 2021.

GALENO, D. M. L.; CARVALHO, R. P.; BOLETI, A. P. DE A.; LIMA, A. S.; DE ALMEIDA, P. D. O.; PACHECO, C. C.; DE SOUZA, T. P.; LIMA, E. S. Extract from *Eugenia punicifolia* is an antioxidant and inhibits enzymes related to metabolic syndrome. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 172, n. 1, p. 311–324, 2014.

GAO, D.-F.; XU, M.; YANG, C.-R.; XU, M.; ZHANG, Y.-J. Phenolic antioxidants from the leaves of *Camellia pachyandra* Hu. Journal of Agricultural and Food Chemistry. v. 58, n. 15, p. 8820–8824, 2010.

GARRIDO, B. C.; CARVALHO, L. J. DE. Nuclear magnetic resonance using electronic referencing: method validation and evaluation of the measurement uncertainties for the quantification of benzoic acid in orange juice. Magnetic Resonance in Chemistry, v. 53, p. 135–141, 2015.

GOTTLIEB, O. R.; da SILVA, M. L.; MAIA, J. G. S. Eucalyptin from *Eugenia* and *Myrcia* species. Phytochemical Reports, v. 11, n. 1234, p. 1185, 1972.

GUNAWAN-PUTERI, M. D. P. T.; KAWABATA, J. Novel α -glucosidase inhibitors from *Macaranga tanarius* leaves. Food Chemistry., v. 123, n. 2, p. 384–389, 2010.

GUO, Q. M.; YANG, X. W. A new ellagic acid derivative from the fruits of *Eucalyptus globulus* Labill. Pharmazie, v. 60, n. 9, p. 708–710, 2005.

HEMINGWAY, R. W.; FOO, L. Y. Condensed Tannins: Quinone Methide Intermediates in Procyanidin Synthesis. Journal of The Chemical Society, Chemical Communications, p. 4–6, 1983.

HENRIQUES, A. T.; SOBRAL, M.; BRIDI, R.; VÉRIN, P.; MENUT, C.; LAMATY, G.; BESSIÈRI, M. Essential oils from Five Southern Brazilian Species of *Myrcia* (myrtaceae). Journal of Essential Oil Research, v. 9, n. 1, p. 13–18, 1997.

HO, C.-T. Maillard Reaction and Health Aspects. Molecular Nutrition & Food Research, v. 50, p. 1099–1100, 2006.

HO, G. T. T.; KASE, E. T.; WANGENSTEEN, H.; BARSETT, H. Phenolic Elderberry Extracts, Anthocyanins, Procyanidins, and Metabolites Influence Glucose and Fatty Acid Uptake in Human Skeletal Muscle Cells. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 65, n. 13, p. 2677–2685, 2017.

HOHMANN, M.; FELBINGER, C.; CHRISTOPH, N.; WACHTER, H.; WIEST, J.; HOLZGRABE, U. Quantification of taurine in energy drinks using ^1H NMR. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v. 93, p. 156–160, 2014.

HOLZGRABE, U. Quantitative NMR spectroscopy in pharmaceutical applications. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, v. 57, n. 2, p. 229–240, 2010.

HOSSAIN, U.; DAS, A. K.; GHOSH, S.; SIL, P.C. An overview on the role of bioactive α -glucosidase inhibitors in ameliorating diabetic complications. *Food and Chemical Toxicology*, v. 145, 111738, 2020.

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

HUSSAIN, T., TAN, B., MURTAZA, G., LIU, G., RAHU, N., KALHORO, M.S., KALHORO, D.H., ADEBOWALE, T.O., MAZHAR, M.U., REHMAN, Z. UR, MARTÍNEZ, Y., KHAN, S.A., YIN, Y. Flavonoids and type 2 diabetes: Evidence of efficacy in clinical and animal studies and delivery strategies to enhance their therapeutic efficacy. *Pharmacological Research*, v. 152, 104629, 2020.

IHM, S.-H.; YOO, H. J.; PARK, S. W.; IHM, J. Effect of aminoguanidine on lipid peroxidation in streptozotocin-induced diabetic rats. *Metabolism: Clinical and Experimental*, v. 48, n. 9, p. 1141–1145, 1999.

IMAI, A.; LANKIN, D. C.; GÖDECKE, T.; CHEN, S.-H.; PAULI, G. F. NMR based quantitation of cycloartane triterpenes in black cohosh extracts. *Fitoterapia*, v. 141, n. 104467, p. 1–9, 2020.

INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA (INMET). Principais Condições Meteorológicas do Clima e do Tempo observadas em 2018. Disponível em: <https://portal.inmet.gov.br/uploads/notastecnicas/Condicoes-Meteorologicas-Tempo-Clima-Observadas-2018-INMET.pdf>. Chuva acumulada mensal//Estação Manaus (A101) – 01/2018. Disponível em: <https://tempo.inmet.gov.br/Graficos/A001>. Acesso em: 25 Abr 2022.

ISO 10993-5. Biological evaluation of medical devices – Part 5: Tests for *in vitro* cytotoxicity. International Organization for Standardization, 3 ed., 2009.

ISOBE, T.; FUKUSHIGE, T.; NODA, Y. A new flavonoid glycoside from *Polygonum nodosum*. *Chem. Lett.*, p. 27–30, 1979.

JIMENEZ, P. C.; FORTIER, S. C.; LOTUFO, T. M. C.; PESSOA, C.; MORAES, M. E. A.; DE MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V. Biological activity in extracts of ascidians (Tunicata, Ascidiacea) from the northeastern Brazilian coast. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v. 287, n. 1, p. 93–101, 2003.

JOLLIFFE, I. T.; CADIMA, J. Principal component analysis: a review and recente developments. *Philosophical Transactions A*, v. 374, 20150202, 2016.

JORGE, L. I. F.; AGUIAR, J. P. L.; SILVA, M. DE L. P. Anatomia foliar de pedra-hume-caá (*Myrcia sphaerocarpa*, *Myrcia guianensis*, *Eugenia punicifolia* - Myrtaceae). *Acta Amazonica*, v. 30, n. 1, p. 49–57, 2000.

JUSTINO, A. B.; DE MOURA, F. R. B.; FRANCO, R. R.; ESPINDOLA, F. S. α -Glucosidase and non-enzymatic glycation inhibitory potential of *Eugenia dysenterica* fruit pulp extracts. Food Bioscience, v. 35, n. May 2019, 100573, 2020.

KALA; M. J. S.; P. S. TRESINA; V. R. MOHAN. Antioxidant, antihyperlipidaemic and antidiabetic activity of *Eugenia floccosa* bedd leaves in alloxan induced diabetic rats. Journal of basic and clinical pharmacy, v. 3, n. 1, p. 235–40, 2012.

KELLEY, C. J.; HARRUFF, R. C.; CARMACK, M. The Polyphenolic Acids of *Lithospermum ruderale*. II. Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance of Lithospermic and Rosmarinic Acids. Journal of Organic Chemistry, v. 41, n. 3, p. 449–455, 1976.

KIHO, T.; USUI, S.; HIRANO, K.; AIZAWA, K.; INAKUMA, T. Tomato paste fraction inhibiting the formation of advanced glycation end-products. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, v. 68, n. 1, p. 200–205, 2004.

KIM, J.-P.; LEE, I.-K.; YUN, B.-S.; CHUNG, S.-H.; SHIM, G.-S.; KOSHINO, H.; YOO, I.-D. Ellagic acid rhamnosides from the stem bark of *Eucalyptus globulus*. Phytochemistry, v. 57, n. 4, p. 587–591, 2001.

KIM, D. Y., KIM, S. R., JUNG, U. J. Myricitrin Ameliorates Hyperglycemia, Glucose Intolerance, Hepatic Steatosis, and Inflammation in High-Fat Diet/Streptozotocin-Induced Diabetic Mice. Internacional Journal of Molecular Sciences, v. 21(5), 1870, 2020.

KINOSHITA, S.; INOUE, Y.; NAKAMA, S.; ICHIBA, T.; ANIYA, Y. Antioxidant and hepatoprotective actions of medicinal herb, *Terminalia catappa* L. from Okinawa Island and its tannin corilagin. Phytomedicine, v. 14, p. 755 – 762, 2007.

KOH, W. Y.; UTRA, U.; AHMAD, R.; RATHER, I. A.; PARK, Y.-H. Evaluation of probiotic potential and anti-hyperglycemic properties of a novel *Lactobacillus* strain isolated from water kefir grains. Food Science and Biotechnology, v. 27, n. 5, p. 1369–1376, 2018.

KU, S.-K.; KWAK, S.; KWON, O.-J.; BAE, J.-S. Hyperoside inhibits high-glucose-induced vascular inflammation in vitro and in vivo. Inflammation, v. 37, p. 1389–1400, 2014.

LAZARINI, J. G.; SARDI, J. DE C. O.; FRANCHIN, M.; NANI, B. D.; FREIRES, I. A.; INFANTE, J.; PASCHOAL, J. A. R.; DE ALENCAR, S. M.; ROSALEN, P. L. Bioprospection of *Eugenia brasiliensis*, a Brazilian native fruit, as a source of anti-inflammatory and antibiofilm compounds. Biomedicine and Pharmacotherapy, v. 102, p. 132–139, 2018.

LI, X.-C.; ELSOHL, H. N.; HUFFORD, C. D.; CLARK, A. M. NMR assignments of ellagic acid derivatives. Magnetic Resonance in Chemistry, v. 37, n. 11, p. 856–859, 1999.

LI, X.; ZHENG, T.; SANG, S.; LV, L. Quercetin inhibits advanced glycation end product formation by trapping methylglyoxal and glyoxal. Journal of Agricultural and Food

Chemistry, v. 62, n. 50, p. 12152–12158, 2014.

LI, Y.; XU, J.; YUAN, C.; MA, H.; LIU, T.; LIU, F.; SEERAMN, N. P.; MU, Y.; HUANG, X.; LI, L. Chemical composition and anti-hyperglycaemic effects of triterpenoid enriched *Eugenia jambolana* Lam. berry extract. *Journal of Functional Foods*, v. 28, p. 1–10, 2017.

LI, Z.-H.; GUO, H.; XU, W.-B.; GE, J.; ALIMU, M.; HE, DA-J. Rapid Identification of Flavonoid Constituents Directly from PTP1B Inhibitive Extract of Raspberry (*Rubus idaeus* L.) Leaves by HPLC-ESI-QTOF-MS-MS. *Journal of Chromatographic Science*, v. 54, n. 5, p. 805–810, 2016.

LIMA, R. DE C. L.; KATO, L.; KONGSTAD, K. T.; STAERK, D. 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, p. 444–451, 2018.

LIU, W.; NISAR, M. F.; WAN, C. Characterization of phenolic constituents from *Prunus cerasifera* Ldb leaves. *Journal of Chemistry*, v. 2020, p. 1–5, 2020.

LOBINE, D.; CUMMINS, I.; GOVINDEN-SOULANGE, J.; RANGHOO-SANMKHIYAA, M.; LINDSEYB, K.; CHAZOTB, P. L.; GRELLSCHEIDB, A. S.; SHARPLESB, G.; LALLC, N.; LAMBRECHTSC, I. A.; LAVERGNED, C.; HOWES, M.-J. R. Medicinal Mascarene Aloes: An audit of their phytotherapeutic potential. *Fitoterapia*, v. 124, p. 120–126, 2018.

LOUIE, K. B.; KOSINA, S. M.; HU, Y.; OTANI, H.; DE RAAD, M.; KUFTIN, A. N.; MOUNCEY, N. J.; BOWEN, B. P.; NORTHEN, T. R. Mass Spectrometry for Natural Product Discovery. *Comprehensive Natural Products III, Chemistry and Biology*, third edition, v. 6, p. 263–306, 2020.

LU, N.; CHEN, P.; YANG, Q.; PENG, Y.-Y. Anti- and pro-oxidant effects of (+)-catechin on hemoglobin-induced protein oxidative damage. *Toxicology. in Vitro*, v. 25, p. 833–838, 2011.

LUND, J. A.; BROWN, P. N.; SHIPLEY, P. R. Quantification of North American and European *Crataegus* flavonoids by nuclear magnetic resonance spectrometry. *Fitoterapia*, v. 143, n. 104537, P. 1–7, 2020.

MALHEIROS, S. V. P.; REGAZZINI, R. V.; SEGURA, R. A. P.; OLIVO, L. P.; STELLA, H. J.; BREDA-STELLA, M. Effect of *Myrcia guianensis* (Pedra-ume-caa) infusion on Wistar rat glycemia and lipidemia. *Perspectivas Médicas*, v. 21, p. 17–23, 2010.

MARTINS, C. de M. Prospecção fitoquímica e caracterização dos compostos bioativos de *Ingra laurina* (Sw.) Willd (Fabaceae). Tese de doutorado, Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Brasil, 2017.

MATSUDA, H.; WANG, T.; MANAGI, H.; YOSHIKAWA, M. Structural requirements of flavonoids for inhibition of protein glycation and radical scavenging activities.

Bioorganic & Medical Chemistry, v. 11, p. 5317–5323, 2003.

MATSUDA, H.; MORIKAWA, T.; YOSHIKAWA, M. Antidiabetogenic constituents from several natural medicines*. Pure and Applied Chemistry, v. 74, n. 7, p. 1301–1308, 2002.

MATSUDA, H.; NISHIDA, N.; YOSHIKAWA, M. Antidiabetic Principles of Natural Medicines V. 1) 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.

MATSUMURA, T.; KASAI, M.; HAYASHI, T.; ARISAWA, M.; MOMOSE, Y.; ARAI, I.; AMAGAYA, S.; KOMATSU, Y. α -Glucosidase inhibitors from Paraguayan natural medicine, Nangapiry, the leaves of *Eugenia uniflora*. Pharmaceutical Biology, v. 38, n. 4, p. 302–307, 2000.

MAZUMDER, K., SUMI, T.S., GOLDBER, M., BISWAS, B., MAKNOON, KERR, P.G., 2021. Antidiabetic profiling, cytotoxicity and acute toxicity evaluation of aerial parts of *Phragmites karka* (Retz.). Journal of Ethnopharmacology, v. 270, 113781, 2021.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Estratégias para o cuidado da pessoa com doença crônica: Diabetes mellitus. Cadernos de Atenção Básica, n. 36, 1 ed., Brasília – DF, p. 1-160, 2013.

MIURA, J.; YAMAGISHI, S.-I.; UCHIGATA, Y.; TAKEUCHI, M.; YAMAMOTO, H.; MAKITA, Z.; IWAMOTO, Y. Serum levels of non-carboxymethyllysine advanced glycation endproducts are correlated to severity of microvascular complications in patients with Type 1 diabetes. Journal of Diabetes and its Complications, v. 17, n. 1, p. 16–21, 2003.

MIURA, T.; MIZUTANI, Y.; ISHIDA, T. Antidiabetic effect of the herb *Myrcia speciosa* in KK-Ay diabetic mice. Journal of Traditional Medicines, v. 23, p. 16–18, 2006.

MOLLIKA, A., ZENGİN, G., LOCATELLI, M., STEFANUCCI, A., MACEDONIO, G., BELLAGAMBA, G., ONAOLAPO, O., ONAOLAPO, A., AZEEZ, F., AYILEKA, A., NOVELLINO, E. An assessment of the nutraceutical potential of *Juglans regia* L. leaf powder in diabetic rats. Food and Chemical Toxicology, v. 107, p. 554–564, 2017a.

MOLLIKA, A., ZENGİN, G., LOCATELLI, M., STEFANUCCI, A., MOCAN, A., MACEDONIO, G., CARRADORI, S., ONAOLAPO, O., ONAOLAPO, A., ADEGOKE, J., OLANIYAN, M., AKTUMSEK, A., NOVELLINO, E. Anti-diabetic and anti-hyperlipidemic properties of *Capparis spinosa* L.: *In vivo* and *in vitro* evaluation of its nutraceutical potential. Journal of Functional Foods, v. 35, p. 32–42, 2017b.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicryl- hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. Songklanakarin Journal of Science and Technology, v. 26, n. 2, p. 211–219, 2004.

MORAIS, L. M. F. DE; CONCEIÇÃO, G. M. DA; NASCIMENTO, J. DE M. Família Myrtaceae: Análise Morfológica e Distribuição Geográfica de uma Coleção Botânica.

Agrarian academy, v. 1, n. 1, p. 317–346, 2014.

MOREIRA, S. da S., TAMASHIRO, L. K., JORGE, B. C., BALIN, P. da S., HEREDIA-VIEIRA, S. C., ALMEIDA, G.L., CARDOSO, C. A. L., KASSUYA, C.A.L., ARENA, A. C. Toxicological safety evaluation in acute and 28-day studies of aqueous extract from *Serjania marginata* Casar. (Sapindaceae) leaves in rats. Journal of Ethnopharmacology, v. 231, p. 197–204, 2019.

NAKAGAWA, T., YOKOZAWA, T., TERASAWA, K., SHU, S., JUNEJA, L. R. Protective Activity of Green Tea against Free Radical- and Glucose-Mediated Protein Damage. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 50, p. 2418–2422, 2002.

NAKAYAMA, G. R.; CATON, M. C.; NOVA, M. P.; PARANDOOSH, Z. Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability in vitro. Journal of Immunological Methods, v. 204, p. 205–208, 1997.

NANDINI, H. S.; NAIK, P. R. Action of corilagin on hyperglycemia, hyperlipidemia and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. Chemico-Biological Interactions, v. 299, p. 186–193, 2019.

NAVEEN, Y. P., UROOJ, A., BYRAPPA, K., 2021. A review on medicinal plants evaluated for anti-diabetic potential in clinical trials: Present status and future perspective. J. Herb. Med., v. 28, 100436, 2021.

OBOH, G.; AGUNLOYE, O. M.; ADEFEGHA, S. A.; AKINYEMI, A. J.; ADEMILUYI, A. O. Caffeic and chlorogenic acids inhibit key enzymes linked to type 2 diabetes (in vitro): a comparative study. Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology, v. 26, n. 2, p. 165–170, 2015.

OHKAWA, H., OHISHI, N., YAGI, K., 1979. Assay for Lipid Peroxides in Animal Tissues by Thiobarbituric Acid Reaction. Analytical Biochemistry, v. 95, p. 351–358, 1979.

PARK, J. Y.; HAN, X.; PIAO, M. J.; OH, M. C.; FERNANDO, P. M. D. J.; KANG, K. A.; RYU, Y. S.; JUNG, U.; KIM, I. G.; HYUN, J. W. Hyperoside Induces Endogenous Antioxidant System to Alleviate Oxidative Stress. Journal of Cancer Prevention, v. 21, n. 1, p. 41–47, 2016.

PAULI, G. F.; JAKI, B. U.; LANKIN, D. C. Quantitative ¹H NMR: Development and Potential of a Method for Natural Products Analysis. Journal of Natural Products, v. 68, p. 133–149, 2005.

PAVIA, D. L.; KRIZ, G. S.; LAMPMAM, G. M.; VYVYAN, J. R. Introduction to Spectroscopy, 4 ed., Cengage Learning, 2010, 700 p.

PEDRETE, T.A., HAUSER-DAVIS, R.A., MOREIRA, J.C. Proteomic characterization of medicinal plants used in the treatment of diabetes. International Journal of Biological Macromolecules, v. 140, p. 294–302, 2019.

PENG, X.; CHENG, KA-W.; MA, J.; CHEN, B.; HO, CHI-T.; LO, C.; CHEN, F.; WANG,

M. Cinnamon bark proanthocyanidins as reactive carbonyl scavengers to prevent the formation of advanced glycation endproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 56, n. 6, p. 1907–1911, 2008.

PEREIRA, R. A.; ZOGHBI, M. DAS G. B.; BASTOS, M. DE N. DO C. Essential Oils of Twelve Species of Myrtaceae Growing Wild in the Sandbank of the Resex Maracanã, State of Pará, Brazil. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, v. 13, n. 4, p. 440–450, 2010.

PÉRICO, L. L.; RODRIGUES, V. P.; OHARA, R.; NUNES, V. V. A.; DA ROCHA, L. R. M. VILEGAS, W.; DOS SANTOS, C.; HIRUMA-LIMA, C. A. Can the gastric healing effect of *Eugenia punicifolia* be the same in male and female rats? *Journal of Ethnopharmacology*, v. 235, 2019.

PI, J.; BAI, Y.; ZHANG, Q.; WONG, V. FLOERING, L. M.; DANIEL, K.; REECE, J. M.; DEENEY, J. T.; ANDERSEN, M. E.; CORKEY, B. E.; COLLINS, S. Reactive oxygen species as a signal in glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes*, v. 56, n. 7, p. 1783–1791, 2007.

PICAZO, A., JIMÉNEZ-OSORIO, A. S., ZÚÑIGA-MEJÍA, P., PEDRAZA-CHAVERRI, J., MONROY, A., RODRÍGUEZ-ARELLANO, M. E., BARRERA-OVIEDO, D., 2017. Hypoglycemic drugs induce antioxidant aldehyde dehydrogenase activity and remain high in patients with glycemic control in type 2 diabetes. *European Journal of Pharmacology*, v. 800, p. 57–62, 2017.

PINTO, V. S.; NERY, A. K.; LIÃO, L. M. Foodômica por RMN de ¹H para monitoramento da estabilidade oxidativa de margarinas submetidas ao tratamento térmico. *Química Nova*, v. 42, n. 8, p. 866–873, 2019.

RABBANI, N.; THORNALLEY, P. J. Advanced glycation end products in the pathogenesis of chronic kidney disease. *Kidney International*, v. 93, n. 4, p. 803–813, 2018.

RABBANI, N.; THORNALLEY, P. J. Protein glycation – biomarkers of metabolic dysfunction and early-stage decline in health in the era of precision medicine. *Redox Biology*, v. 42, 2021.

RAMACHANDRA BHAT, L.; VEDANTHAM, S.; KRISHNAN, U. M.; RAYAPPAN, J. B. B. Methylglyoxal – An emerging biomarker for diabetes mellitus diagnosis and its detection methods. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 133, p. 107–124, 2019.

RAMOS, A. S.; MAR, J. M.; DA SILVA, L. S.; ACHO, L. D. R.; DA SILVA, B. J. P.; LIMA, E. S.; CAMPELO, P. H.; SANCHES, E. A.; BEZERRA, J. DE A.; CHAVES, F. C. M.; CAMPOS, F. R.; MACHADO, M. B. Pedra-ume caá fruit: An Amazon cherry rich in phenolic compounds with antiglycant and antioxidant properties. *Food Research International*, v. 123, p. 674–683, 2019.

RAVI, K., RAMACHANDRAN, B., SUBRAMANIAN, S. Effect of *Eugenia Jambolana* seed kernel on antioxidant defense system in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Life Sciences*, v. 75, p. 2717–2731, 2004.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Free Radical Biology & Medicine, v. 26, p. 1231–1237, 1999.

REIS, J. S.; VELOSO, C. A.; MATTOS, R. T.; PURISH, S.; NOGUEIRA-MACHADO, J. A. Oxidative stress: A review on metabolic signaling in type 1 diabetes. Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia, v. 52, n. 7, p. 1096–1105, 2008.

REN, G.; HOU, J.; FANG, Q.; SUN, H.; LIU, X.; ZHANG, L.; WANG, P. G. Synthesis of flavonol 3-O-glycoside by UGT78D1. Glycoconjugate Journal, v. 29, p. 425–432, 2012.

REQUENA, J. R.; AHMED, M. U.; FOUNTAIN, C. W.; DEGENHARDT, T. P.; REDDY, S.; PEREZ, C.; LYONS, T. J.; JENKINS, A. J.; BAYNES, J. W.; THORPE, S. R. Carboxymethylethanolamine, a biomarker of phospholipid modification during the Maillard reaction *in vivo*. Journal of Biological Chemistry, v. 272, n. 28, p. 17473–17479, 1997.

RIVERA-PÉREZ, A.; ROMERO-GONZÁLEZ, R.; FRENICH, A. G. A metabolomics approach based on ¹H NMR fingerprinting and chemometrics for quality control and geographical discrimination of black pepper. Journal of Food Composition and Analysis, v. 115, n. 104235, p. 1–10, 2022.

ROBASZKIEWICZ, A.; BALCERCZYK, A.; BARTOSZ, G. Antioxidative and prooxidative effects of quercetin on A549 cells. Cell Biology International, v. 31, p. 1245–1250, 2007.

ROCK, C. A.; KEENEY, S.; ZAKHARCHENKO, A.; TAKANO, H.; SPIEGEL, D. A.; KRIEGER, A. M.; FERRARI, G.; LEVY, R. J. Model studies of advanced glycation end product modification of heterograft biomaterials: The effects of *in vitro* glucose, glyoxal, and serum albumin on collagen structure and mechanical properties. Acta Biomaterialia, v. 123, p. 275–285, 2021.

RUBERT, J.; LACINA, O.; FAUHL-HASSEK, C.; HAJLSLOVA, J. Metabolic fingerprinting based on high-resolution tandem mass spectrometry: A reliable tool for wine authentication? Analytical and Bioanalytical Chemistry, v. 406, n. 27, p. 6791–6803, 2014.

RUSH, M. D.; RUE, E. A.; WONG, A.; KOWALSKI, P.; GLINSKI, J. A.; BREEMEN, R. B. v. Rapid Determination of Procyanidins Using MALDI-ToF/ToF Mass Spectrometry. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 66, n. 43, p. 11355–11361, 2018.

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

SALES, D. S.; CARMONA, F.; DE AZEVEDO, B. C.; TALEB-CONTINI, S. H.; BARTOLOMEU, A. C. D.; HONORATO, F. B.; MARTINEZ, E. Z.; PEREIRA, A. M. S. *Eugenia punicifolia* (Kunth) DC. as an adjuvant treatment for type-2 diabetes mellitus: A non-controlled, pilot study. Phytotherapy Research, v. 28, n. 12, p. 1816–1821, 2014.

SALVADOR, M. J.; DE LOURENÇO, C. C.; ANDREAZZA, N. L.; PASCOAL, A. C. R. F.; STEFANELLO, M. E. A. 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.

SHANGARI, N., O'BRIEN, P. J. The cytotoxic mechanism of glyoxal involves oxidative stress. *Biochemical Pharmacology*, v. 68, p. 1433–1442, 2004.

SANTANA, E. C. Atividade antioxidante, antimicrobiana e caracterização de compostos bioativos da casca interna de *Kielmeyera coriacea* Mart. & Zucc. Dissertação de mestrado, Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Uberlândia, Brasil, 2017.

SANTANA, J. S.; SARTORELLI, P.; LAGO, J. H. G.; MATSUO, A. L. Isolamento e avaliação do potencial citotóxico de derivados fenólicos de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). *Quimica Nova*, v. 35, n. 11, p. 2245–2248, 2012.

SANTOS, L. S.; ALVES FILHO, E. G.; RIBEIRO, P. R. V.; ZOCCOLO, G. J.; SILVA, S. M.; DE LUCENA, E. M. P.; ALVES, R. E. DE BRITO, E. S. Chemotaxonomic evaluation of different species from the Myrtaceae family by UPLC-qToF/MS-MS coupled to supervised classification based on genus. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 90, n. 104028, p. 1–10, 2020.

SANTOS, M. S. PEREIRA-FILHO, E. R.; FERREIRA, A. G.; BOFFO, E. F.; FIGUEIRA, G. M. Authenticity study of *Phyllanthus* species by NMR and FT-IR techniques coupled with chemometric methods. *Quimica Nova*, v. 35, n. 11, p. 2210–2217, 2012.

SANTOS, M. S.; COLNAGO, L. A. Validação de método quantitativo por RMN de ¹H para análises de formulações farmacêuticas. *Quimica Nova*, v. 36, n. 2, p. 324–330, 2013.

SARDI, J. DE. C. O.; FREIRES, I. A.; LAZARINI, J. B.; INFANTE, J.; DE ALENCAR, S. M.; ROSALEN, P. L. Unexplored endemic fruit species from Brazil: Antibiofilm properties, insights into mode of action, and systemic toxicity of four *Eugenia* spp. *Microbial Pathogenesis*, v. 105, p. 280–287, 2017.

SCHUMACHER, N. S. G.; COLOMEU, T. C.; DE FIGUEIREDO, D.; CARVALHO, V. DE C.; CAZARIN, C. B. B.; PRADO, M. A.; MELETTI, L. M. M.; ZOLLNER, R. DE. L. Identification and antioxidant activity of the extracts of *Eugenia uniflora* leaves. Characterization of the anti-inflammatory properties of aqueous extract on diabetes expression in an experimental model of spontaneous type 1 diabetes (NOD mice). *Antioxidants*, v. 4, n. 4, p. 662–680, 2015.

SENGUPTA, B.; UEMATSU, T.; JACOBSSON, P.; SWENSON, J. Exploring the antioxidant property of bioflavonoid quercetin in preventing DNA glycation: A calorimetric and spectroscopic study. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 339, n. 1, p. 355–361, 2006.

SERNA, D. M. O.; MARTÍNEZ, J. H. I. Phenolics and polyphenolics from

melastomataceae species. *Molecules*, v. 20, n. 10, p. 17818–17847, 2015.

SHARMA, S. B.; NASIR, A.; PRABHU, K. M.; MURTHY, P. S. Antihyperglycemic effect of the fruit-pulp of *Eugenia jambolana* in experimental diabetes mellitus. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 104, n. 3, p. 367–373, 2006.

SHORI, A. B. Screening of antidiabetic and antioxidant activities of medicinal plants. *Journal of Integrative Medicine*, v. 13, n. 5, p. 297–305, 2015.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos. 7 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2007, 490 p.

SINGH, A.; BAJPAI, V.; KUMAR, S.; SHARMA, K. R.; KUMAR, B. Profiling of Gallic and Ellagic Acid Derivatives in Different Plant Parts of *Terminalia arjuna* by HPLC-ESI-QTOF-MS/MS. *Natural Product Communications*, v. 11, n. 2, p. 239–244, 2016a.

SINGH, A.; BAJPAI, V.; KUMAR, S.; KUMAR, B.; SRIVASTAVA, M.; ARYA, K. R.; SHARMA, K. R. Distribution and discrimination study of bioactive compounds from berberis species using HPLC-ESI-QTOF-MS/MS with principle component analysis. *Natural Product Communications*, v. 11, n. 12, p. 1807–1812, 2016b.

SLANC, P.; DOLJAK, B.; KREFT, S.; LUNDER, M.; JANES, D.; STRUKELJ, B. Screening of selected food and medicinal plant extracts for pancreatic lipase inhibition. *Phytotherapy Research*, v. 23, n. 4, p. 874–877, 2009.

SOARES, P. K.; SCARMINIO, I. P. Multivariate Chromatographic Fingerprint Preparation and Authentication of Plant Material from the Genus *Bauhinia*. *Phytochemical Analysis*, v. 19, p. 78–85, 2008.

SOBRAL M.; PROENÇA, C.; SOUZA, M.; MAZINE, F.; LUCAS, E. Myrtaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2015. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB10338>>. Acesso em: 19 jul. 2020a.

SOBRAL M.; PROENÇA, C.; SOUZA, M.; MAZINE, F.; LUCAS, E. Myrtaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2015. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB10660>>. Acesso em: 19 jul. 2020b.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Diretrizes Sociedade Brasileira de diabetes 2019-2020. Editora Clannad, 2019, 491p.

SOUZA, A. C. L.; RAMOS, A. S.; MAR, J. M.; BOEIRA, L. S.; DE BEZERRA, J. A.; MACHADO, M. B. Alcoholic beverages from araçá-boi fruit: quantification of antioxidant compounds by NMR ERETIC2. *Journal of Food Science and Technology*, v. 57, p. 4733–4738, 2020.

SOUZA FILHO, A. P. S.; SANTOS, R. A.; SANTOS, L. S.; GUILHON, G. M. P.; SANTOS, A. S.; ARRUDA, M. S. P.; MULLER, A. H.; ARRUDA, A. C. Allelopathic potential of *Myrcia guianensis*. *Planta Daninha*, v. 24, n. 4, p. 649–656, 2006.

STILO, F.; BICCHI, C.; JIMENEZ-CARVELO, A. M.; CUADROS-RODRIGUEZ, L.; REICHENBACH, S. E.; CORDERO, C. Chromatographic fingerprinting by comprehensive two-dimensional chromatography: Fundamentals and tools. Trends in Analytical Chemistry, v. 134, 116133, 2021.

STITT, A. W. The Maillard Reaction in Eye Diseases. Annals of the New York Academy of Sciences, v. 1043, p. 582–597, 2005.

SUBRAMANIAN, R.; ASMAWI, M. Z.; SADIKUN, A. *In vitro* α -glucosidase and α -amylase enzyme inhibitory effects of *Andrographis paniculata* extract and andrographolide. Acta Biochim. Pol., v. 55, n. 2, p. 391–398, 2008.

TAN, D.; WANG, Y.; LO, C.-L.; HO, C.-T. Methylglyoxal: its presence and potential scavengers. Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition, v. 17 (S1), p. 261–264, 2008.

TAN, H. P.; LING, S. K.; CHUAH, C. H. Characterisation of Galloylated Cyanogenic Glucosides and Hydrolysable Tannins from Leaves of *Phyllagathis rotundifolia* by LC-ESI-MS/MS. Phytochemical Analysis, v. 22, n. 6, p. 516–525, 2011.

TAVARES, L. A.; FERREIRA, A. G. Análises quali- e quantitativa de cafés comerciais via Ressonância Magnética Nuclear. Química Nova, v. 29, n. 5, p. 911–915, 2006.

THORNALLEY, P. J. Use of aminoguanidine (Pimagedine) to prevent the formation of advanced glycation endproducts. Archives of Biochemistry and Biophysics, v. 419, n. 1, p. 31–40, 2003.

TIBOLA, C. S.; de MEDEIROS, E. P.; SIMEONE, M. L. F.; de OLIVEIRA, M. A. Espectroscopia no Infravermelho Próximo para Avaliar Indicadores de Qualidade Tecnológica e Contaminante em Grãos. Brasília, DF: Embrapa, 2018, 200p.

TONELLI, C.A., OLIVEIRA, S.Q., VIEIRA, A.A. DA S., BIAVATTI, M.W., RITTER, C., REGINATTO, F.H., CAMPOS, A.M. DE, DAL-PIZZOL, F. Clinical efficacy of capsules containing standardized extract of *Bauhinia forficata* Link (pata-de-vaca) as adjuvant treatment in type 2 diabetes patients: A randomized, double blind clinical trial. Journal of Ethnopharmacology, v. 282, 114616, 2022.

TORRES, N. M. P. O.; XAVIER, J. A.; GOULART, M. O. F.; ALVES, R. B.; FREITAS, R. P. A Química dos Produtos Finais de Glicação Avançada. Revista Virtual de Química, v. 10, n. 2, p. 375–392, 2018.

TRINH, B. T. D.; STAERK, D.; JÄGER, A. K. Screening for potential α -glucosidase and α -amylase inhibitory constituents from selected Vietnamese plants used to treat type 2 diabetes. Journal of Ethnopharmacology, v. 186, p. 189–195, 2016.

TURK, H.M., SEVINC, A., CAMCI, C., CIGLI, A., BUYUKBERBER, S., SAVLI, H., BAYRAKTAR, N. Plasma lipid peroxidation products and antioxidant enzyme activities in patients with type 2 diabetes mellitus. Acta Diabetologica, v. 39, p. 117–122, 2002.

TYBURN, J.-M.; COUTANT, J. TopSpin ERETIC 2 - Electronic to access in-vivo

concentration User Manual, Bruker Corporation, Rheinstetten, Germany, 2016.

ULLAH, A.; KHAN A.; KHAN, I. Diabetes mellitus and oxidative stress—A concise review. *Saudi Pharmaceutical Journal*, v. 24, 547–553, 2016.

VAN DEN BERG, R. A.; HOEFSLOOT, H. C. J.; WESTERHUIS, J. A.; SMILDE, A. K.; VAN DER WERF, M. J. Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data. *BMC Gemonics*, v. 7:142, p. 1–15, 2006.

VAN DE LAAR, F. A.; LUCASSEN, P. L.; AKKERMANS, R. P.; VAN DE LISDONK, E. H.; RUTTEN, G. E.; WELL, C. V. α -Glucosidase inhibitors for patients results with type 2 diabetes. *Diabetes care*, v. 28, n. 1, p. 154–163, 2005.

VAN NGUYEN, C. Toxicity of the AGEs generated from the Maillard reaction: On the relationship of food-AGEs and biological-AGEs. *Molecular Nutrition and Food Research*, v. 50, n. 12, p. 1140–1149, 2006.

VARATHARAJAN, R., SATTAR, M.Z.A., CHUNG, I., ABDULLA, M.A., KASSIM, N.M., ABDULLAH, N.A. Antioxidant and pro-oxidant effects of oil palm (*Elaeis guineensis*) leaves extract in experimental diabetic nephropathy: A duration-dependent outcome. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, v.13, 242, 2013.

VAREDA, P. M. P.; SALDANHA, L. L.; CAMAFORTE, N. A. DE P.; VIOLATO, N. M.; DOKKEDAL, A. L.; BOSQUEIRO, J. R. *Myrcia bella* leaf extract presents hypoglycemic activity via PI3k/Akt insulin signaling pathway. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2014, p. 1–11, 2014.

VASCONCELOS, T. N. C.; PROENÇA, C. E. B.; AHMAD, B.; AGUILAR, D. S.; AGUILAR, R.; AMORIM, B. S.; CAMPBELL, K.; COSTA, I. R.; DE CARVALHO, P. S.; FARIA, J. E. Q.; GIARETTA, A.; KOOIJ, P. W.; LIMAM, D. F.; MAZINE, F. F.; PEGUERO, B.; PRENNER, G.; SANTOS, M. F.; SOEWARTO, J.; WINGLER, A.; LUCAS, E. J. Myrteae phylogeny, calibration, biogeography and diversification patterns: Increased understanding in the most species rich tribe of Myrtaceae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 109, p. 113–137, 2017.

VAZ, B. G.; DE MORAIS, L. A. B.; ROMÃO, W. Fundamentos da Espectrometria de Massas e Aplicações. 1 ed., Rio de Janeiro: Editora Atheneu, 2018, 302 p.

VELIOGLU, Y. S.; MAZZA, G.; GAO, L.; OOMAH, B. D. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 46, p. 4113–4117, 1998.

VINHOLES, J.; LEMOS, G.; BARBIERI, R. L.; FRANZON, R. C.; VIZZOTTO, M. *In vitro* assessment of the antihyperglycemic and antioxidant properties of araçá, butiá and pitanga. *Food Bioscience*, v. 19, p. 92–100, 2017.

VINHOLES, J.; VIZZOTTO, M. Synergisms in alpha-glucosidase inhibition and antioxidant activity of *Camellia sinensis* L. Kuntze and *Eugenia uniflora* L. Ethanolic Extracts. *Pharmacognosy Research*, v. 9, n. 1, p. 101–107, 2017.

VLASSARA, H.; STRIKER, G. E. Advanced Glycation Endproducts in Diabetes and Diabetic Complications. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, v. 42, n. 4, p. 697–719, 2013.

WAGNER, C.; FACHINETTO, R.; CORTE, C. L. D.; BRITO, V. B.; SEVERO, D.; DIAS, G. de O. C.; MOREL, A. F. NOGUEIRA, C. W.; ROCHA, J. B. T. Quercitrin, a glycoside form of quercetin, prevents lipid peroxidation *in vitro*. *Brain Research*, v. 1107, p. 192–198, 2006.

WANG, H.; DU, Y.; SONG, H. α -Glucosidase and α -amylase inhibitory activities of guava leaves. *Food Chemistry*, v. 123, n. 1, p. 6–13, 2010.

WATANABE, R.; SUGAI, C.; YAMAZAKI, T.; MATSUSHIMA, R.; UCHIDA, H.; MATSUMIYA, M.; TAKATSU, A.; SUZUKI, T. Quantitative nuclear magnetic resonance spectroscopy based on PULCON methodology: Application to quantification of invaluable marine toxin, okadaic acid. *Toxins*, v. 8, n. 10, p. 1–9, 2016.

WAUTIER, M.P.; MASSIN, P.; GUILLAUSSÉAU, P. J.; HUIJBERTS, M.; LEVY, B.; BOULANGER, E.; LALOI-MICHELIN, M.; WAUTIER, J. L. N(carboxymethyl)lysine as a biomarker for microvascular complications in type 2 diabetic patients. *Diabetes and Metabolism*, v. 29, n. 1, p. 44–52, 2003.

WOLFE, K. L., LIU, R. H. Cellular Antioxidant Activity (CAA) Assay for Assessing Antioxidants, Foods, and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 55, p. 8896–8907, 2007.

WOLLINGER, W.; GARRIDO, B. Calibração em RMNq: Guia para obter resultados rastreáveis ao Sistema Nacional de Unidades (SI)INMETRO, , 2019. Disponível em: <https://www.gov.br/inmetro/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/calibracao-rmnq-guia-inmetro-2019.pdf>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Classification of diabetes mellitus. 2019, v. 21, 36 p. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/325182>. Acesso em 19 jul 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Global Report on Diabetes. 2016, 83 p. <https://www.who.int/publications/i/item/9789241565257> (Acesso em 12 Dez 2021).

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). WHO traditional medicine strategy: 2014-2023. 2013. 76 p. <https://www.who.int/publications/i/item/9789241506096> (Acesso em 12 Dez 2021).

WUBSHET, S. G.; MORESCO, H. H.; TAHTAH, Y.; BRIGHENTE, I. M. C.; STAERK, D. High-resolution bioactivity profiling combined with HPLC-HRMS-SPE-NMR: α -Glucosidase inhibitors and acetylated ellagic acid rhamnosides from *Myrcia palustris* DC. (Myrtaceae). *Phytochemistry*, v. 116, n. 1, p. 246–252, 2015.

YAZBEK, P. B.; TEZOTO, J.; CASSAS, F.; RODRIGUES, E. Plants used during maternity, menstrual cycle and other women's health conditions among Brazilian

cultures. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 179, p. 310–331, 2016.

YEH, G. Y.; EISENBERG, D. M.; KAPTCHUK, T. J.; PHILLIPS, R. S. Systematic review of herbs and dietary supplements for glycemic control in diabetes. *Diabetes Care*, v. 26, n. 4, p. 1277–1294, 2003.

YISIMAYILI, Z.; GUO, X.; LIU, H.; XUC, Z.; ABDULLA, R.; AISA, H. A.; HUANG, C. Metabolic profiling analysis of corilagin in vivo and in vitro using high-performance liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 165, p. 251–260, 2019.

YOSHIKAWA, M.; SHIMADA, H.; NISHIDA, N.; LI, Y.; TOGUCHIDA, I.; YAMAHARA, J.; MATSUDA, H. Antidiabetic Principles of Natural Medicines. II.1) 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. *Chem. Pharm. Bull.*, v. 46, n. 1, p. 113–119, 1998.

YUZUAK, S.; BALLINGTON, J.; XIE, D. Y. HPLC-qTOF-MS/MS-based profiling of flavan-3-ols and dimeric proanthocyanidins in berries of two muscadine grape hybrids FLH 13-11 and FLH 17-66. *Metabolites*, v. 8, n. 4, 2018.

ZHENG, W.-H.; BAI, H.-Y.; HAN, S.; BAO, F.; ZHANG, K.-X.; SUN, L.-L.; DU, H.; YANG, Z.-G. Analysis on the Constituents of Branches, Berries, and Leaves of *Hippophae rhamnoides* L. by UHPLC-ESI-QTOF-MS and Their Anti-Inflammatory Activities. *Natural Product Communications*, v. 14, n. 8, p. 1–10, 2019.

ANEXO

Artigos publicados em revistas indexadas

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 201 (2021) 114109

Contents lists available at [ScienceDirect](#)

 **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jpba



qNMR quantification of phenolic compounds in dry extract of *Myrcia multiflora* leaves and its antioxidant, anti-AGE, and enzymatic inhibition activities



Edinilze S.C. Oliveira^a, Flávia L.D. Pontes^b, Leonard D.R. Acho^c, Alessandro S. do Rosário^d, Bárbara Janaína P. da Silva^c, Jaqueline de A. Bezerra^{a,e}, Francinete R. Campos^{a,f}, Emerson S. Lima^c, Marcos B. Machado^{a,*}

Journal of Ethnopharmacology 293 (2022) 115276

Contents lists available at [ScienceDirect](#)

 **Journal of Ethnopharmacology**

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jethpharm



Hypoglycemic effect and toxicity of the dry extract of *Eugenia biflora* (L.) DC. leaves



Edinilze S.C. Oliveira^a, Leonard D.R. Acho^b, Bárbara Janaína P. da Silva^b, Ruben Dario Morales-Gamba^c, Flávia L.D. Pontes^d, Alessandro S. do Rosário^e, Jaqueline de A. Bezerra^{a,f}, Francinete R. Campos^{a,g}, José Fernando M. Barcellos^h, Emerson S. Lima^b, Marcos B. Machado^{a,*}

Dados de aquisição da análise quantitativa por RMN de ^1H do extrato seco de *M. multiflora* (MmAPA)

Figura S1

Experimento de calibração de pulso 90° (zg) do sinal em δ 3,94 (s, 6H) do padrão tereftalato de dimetila (pulso 360°) em CD_3OD .

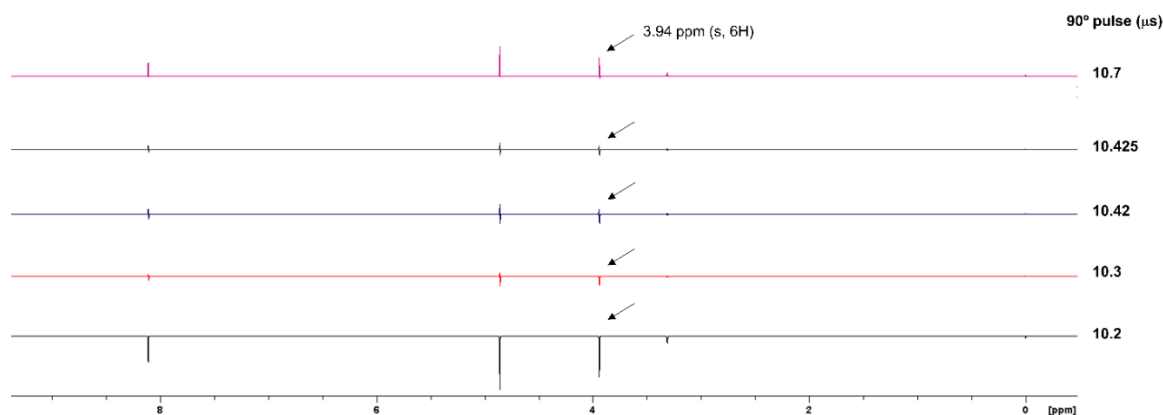


Figura S2

Experimento de inversão-recuperação ($t_{1\rho}$) do sinal em δ 3,94 (s, 6H) do padrão tereftalato de dimetila ($d_1=40\text{s}$) em CD_3OD .

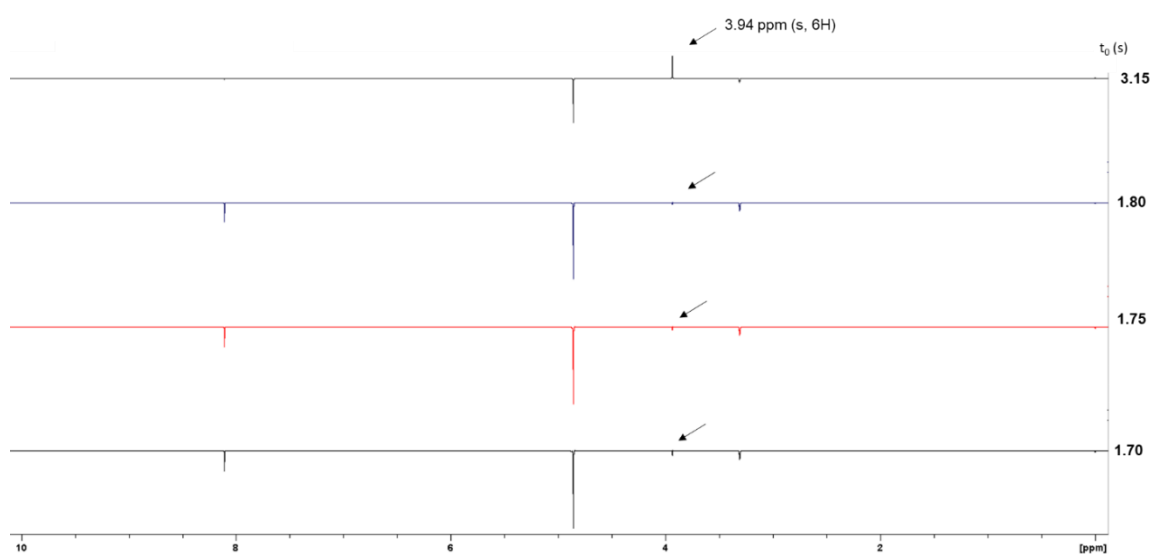


Figura S3

Experimento de calibração de pulso 90° (zg) do sinal em δ 8,10 (s, 4H) do padrão tereftalato de dimetila (pulso 360°) em CD_3OD .

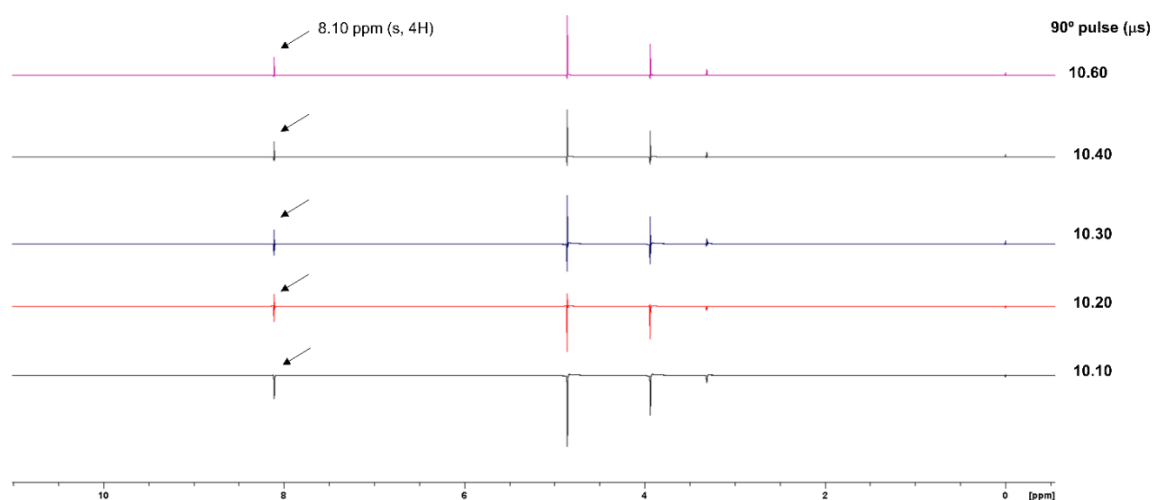


Figura S4

Experimento de inversão-recuperação ($t_{1\rho}$) do sinal em δ 8,10 (s, 4H) do padrão tereftalato de dimetila ($d_1=40\text{s}$) em CD_3OD .

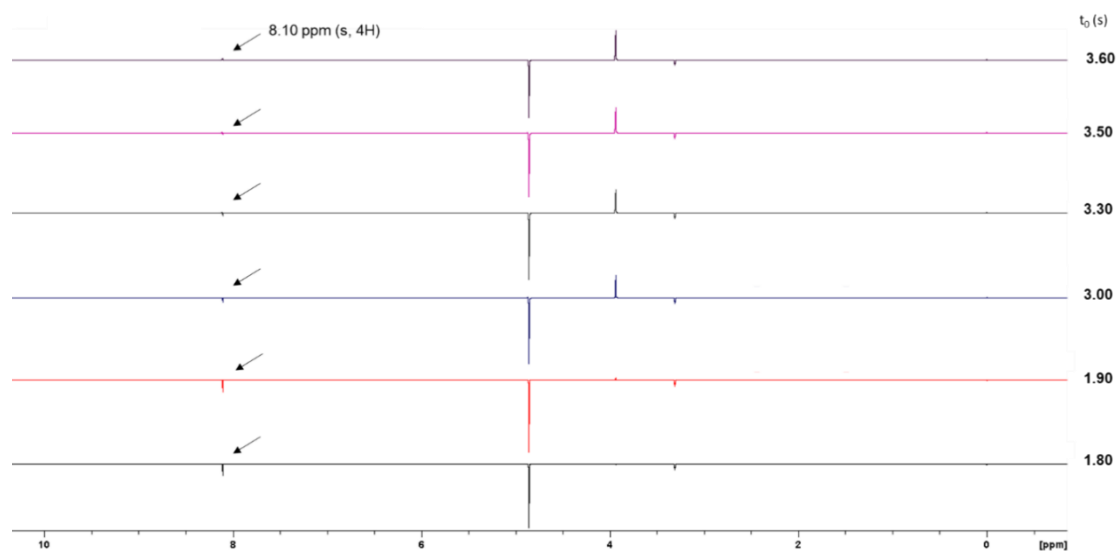


Tabela S1 – Dados da calibração de pulso de 90° até um sinal nulo (pulso de 360°) e tempo delay (s) do experimento Inversão-Recuperação (t1ir1d) dos sinais quantitativos das substâncias **(10)**, **(16)**, **(19)**, **(20)**, **(21)** e **(23)** em CD₃OD

Replicatas	Compostos	MmAPA1A		MmAPA1B		MmAPA2A		MmAPA2B	
		Pulso 90° (μs)				τ ₀ (s)			
		δ _H em ppm				(Experimento de Inversão-Recuperação)			
		δ _H em ppm				δ _H em ppm			
		15.0 °C	27.5 °C	15.0 °C	27.5 °C	15.0 °C	27.5 °C	15.0 °C	27.5 °C
1	Corilagina (10)	-	10.50	-	10.50	-	2.3	-	2.5
		(6.64, s, 1H)	(6.64, s, 1H)	(6.64, s, 1H)	(6.64, s, 1H)				
-		10.48	-	10.58	-	2.5	-	2.5	
(6.64, s, 1H)		(6.64, s, 1H)	(6.64, s, 1H)	(6.64, s, 1H)					
-		10.25	-	10.58	-	2.5	-	2.5	
(6.64, s, 1H)		(6.64, s, 1H)	(6.64, s, 1H)	(6.64, s, 1H)					
10.34		10.50	10.23	10.50	1.95	1.95	1.95	1.95	
(6.66, s, 1H)		(6.67, s, 1H)	(6.66, s, 1H)	(6.67, s, 1H)	(6.66, s, 1H)	(6.67, s, 1H)	(6.66, s, 1H)	(6.67, s, 1H)	
10.42		10.48	10.48	10.58	1.95	1.95	1.95	1.95	
(6.66, s, 1H)		(6.67, s, 1H)	6.66, s, 1H)	(6.67, s, 1H)	(6.66, s, 1H)	(6.67, s, 1H)	(6.66, s, 1H)	(6.67, s, 1H)	
3	10.42	10.25	10.22	10.58	1.95	2.3	1.95	1.95	
	(6.66, s, 1H)	(6.67, s, 1H)	(6.66, s, 1H)	(6.67, s, 1H)	(6.66, s, 1H)	(6.67, s, 1H)	(6.66, s, 1H)	(6.67, s, 1H)	

Replicatas	Compostos	MmAPA1		MmAPA2		MmAPA1		MmAPA2	
		Pulso 90° (μs) δ _H em ppm				τ ₀ (s) (Experimento de Inversão-Recuperação) δ _H em ppm			
		15,0 °C	27,5 °C	15,0 °C	27,5 °C	15,0 °C	27,5 °C	15,0 °C	27,5 °C
1	Miricetina-3-O-D-glucosídeo (16)	10,34	10,50	10,23	10,50	1,95	2,5	1,95	1,95
		(7,36, d, 2H)	(7,36, d, 2H)	(7,36, d, 2H)	(7,36, d, 2H)	(7,36, d, 2H)	(7,36, d, 2H)	(7,36, d, 2H)	(7,36, d, 2H)
2		10,42	10,48	10,48	10,58	1,95	1,95	1,95	1,95
		(7,36, d, 2H)	(7,36, d, 2H)	(7,36, d, 2H)	(7,36, d, 2H)	(7,36, d, 2H)	(7,36, d, 2H)	(7,36, d, 2H)	(7,36, d, 2H)
3		10,42	10,25	10,22	10,58	1,95	2,5	1,95	1,95
		(7,36, d, 2H)	(7,36, d, 2H)	(7,36, d, 2H)	(7,36, d, 2H)	(7,36, d, 2H)	(7,36, d, 2H)	(7,36, d, 2H)	(7,36, d, 2H)
1	Miricitrina (19)	10,34	10,50	10,23	10,50	1,40	1,40	1,30	1,40
		(5,29, d, 1H)	(5,30, d, 1H)	(5,29, d, 1H)	(5,30, d, 1H)	(5,29, d, 1H)	(5,30, d, 1H)	(5,29, d, 1H)	(5,30, d, 1H)
2		10,42	10,48	10,48	10,58	1,30	1,40	1,30	1,40
		(5,29, d, 1H)	(5,30, d, 1H)	(5,29, d, 1H)	(5,30, d, 1H)	(5,29, d, 1H)	(5,30, d, 1H)	(5,29, d, 1H)	(5,30, d, 1H)
3	Miricitrina	10,42	10,25	10,22	10,58	1,30	1,40	1,40	1,40
		(5,29, d, 1H)	(5,30, d, 1H)	(5,29, d, 1H)	(5,30, d, 1H)	(5,29, d, 1H)	(5,30, d, 1H)	(5,29, d, 1H)	(5,30, d, 1H)

Replicatas	Compostos	MmAPA1		MmAPA2		MmAPA1		MmAPA2	
		Pulso 90° (μs)				τ ₀ (s)			
		δ _H em ppm				(Experimento de Inversão-Recuperação)			
		δ _H em ppm							
		15,0 °C	27,5 °C	15,0 °C	27,5 °C	15,0 °C	27,5 °C	15,0 °C	27,5 °C
1	Hiperosídeo (20)	10,34	10,50	10,23	10,50	1,95	2,5	1,95	2,5
		(7,83, d, 1H)	(7,82, d, 1H)	(7,83, d, 1H)	(7,82, d, 1H)	(7,83, d, 1H)	(7,82, d, 1H)	(7,83, d, 1H)	(7,82, d, 1H)
		10,42	10,48	10,48	10,58	1,95	1,95	1,95	2,5
		(7,83, d, 1H)	(7,82, d, 1H)	(7,82, d, 1H)	(7,82, d, 1H)	(7,83, d, 1H)	(7,82, d, 1H)	(7,83, d, 1H)	(7,82, d, 1H)
		10,42	10,25	10,22	10,58	1,95	2,5	1,95	2,5
		(7,83, d, 1H)	(7,82, d, 1H)	(7,83, d, 1H)	(7,82, d, 1H)	(7,83, d, 1H)	(7,82, d, 1H)	(7,83, d, 1H)	(7,82, d, 1H)
1	Guajaverina (21)	10,34	10,50	10,23	10,50	1,95	2,5	1,95	2,5
		(7,69, d, 1H)	(7,69, d, 1H)	(7,69, d, 1H)	(7,69, d, 1H)	(7,69, d, 1H)	(7,69, d, 1H)	(7,69, d, 1H)	(7,69, d, 1H)
2	Guajaverina	10,42	10,48	10,48	10,58	1,95	1,95	1,95	2,5
		(7,69, d, 1H)	(7,69, d, 1H)	(7,69, d, 1H)	(7,69, d, 1H)	(7,69, d, 1H)	(7,69, d, 1H)	(7,69, d, 1H)	(7,69, d, 1H)
10,42		10,25	10,22	10,58	1,95	2,5	1,95	2,5	
(7,69, d, 1H)		(7,69, d, 1H)	(7,69, d, 1H)	(7,69, d, 1H)	(7,69, d, 1H)	(7,69, d, 1H)	(7,69, d, 1H)	(7,69, d, 1H)	
1	Quercitrina	-	10,50	-	10,50	-	1,75	-	1,92

Replicatas	Compostos	MmAPA1		MmAPA2		MmAPA1		MmAPA2	
		Pulso 90° (μs) δ _H em ppm				τ ₀ (s) (Experimento de Inversão-Recuperação) δ _H em ppm			
		15,0 °C	27,5 °C	15,0 °C	27,5 °C	15,0 °C	27,5 °C	15,0 °C	27,5 °C
	(23)	(7,32, d, 1H)		(7,32, d, 1H)		(7,32, d, 1H)		(7,32, d, 1H)	
2	Quercitrina	-	10,48	-	10,58	-	1,75	-	1,92
		(7,32, d, 1H)		(7,32, d, 1H)		(7,32, d, 1H)		(7,32, d, 1H)	
3		-	10,25	-	10,58	-	2,3	-	1,92
		(7,32, d, 1H)		(7,32, d, 1H)		(7,32, d, 1H)		(7,32, d, 1H)	
1		10,34	10,25	10,23	10,50	1,40	1,40	1,30	1,40
		(5,32, d, 1H)	(5,33, d, 1H)	(5,32, d, 1H)	(5,33, d, 1H)	(5,32, d, 1H)	(5,33, d, 1H)	(5,32, d, 1H)	(5,33, d, 1H)
2		10,42	10,48	10,48	10,58	1,30	1,40	1,30	1,40
		(5,32, d, 1H)	(5,33, d, 1H)	(5,32, d, 1H)	(5,33, d, 1H)	(5,32, d, 1H)	(5,33, d, 1H)	(5,32, d, 1H)	(5,33, d, 1H)
3		10,42	10,25	10,22	10,58	1,30	1,40	1,40	1,40
		(5,32, d, 1H)	(5,33, d, 1H)	(5,32, d, 1H)	(5,33, d, 1H)	(5,32, d, 1H)	(5,33, d, 1H)	(5,32, d, 1H)	(5,33, d, 1H)

Figura S5

Experimento de calibração de pulso 90° (zg) para o sinal em δ 7,83 (s, 1H) do composto hiperosídeo (pulso 360°) na amostra MmAPA2 (15,0 $^\circ\text{C}$) em CD_3OD .

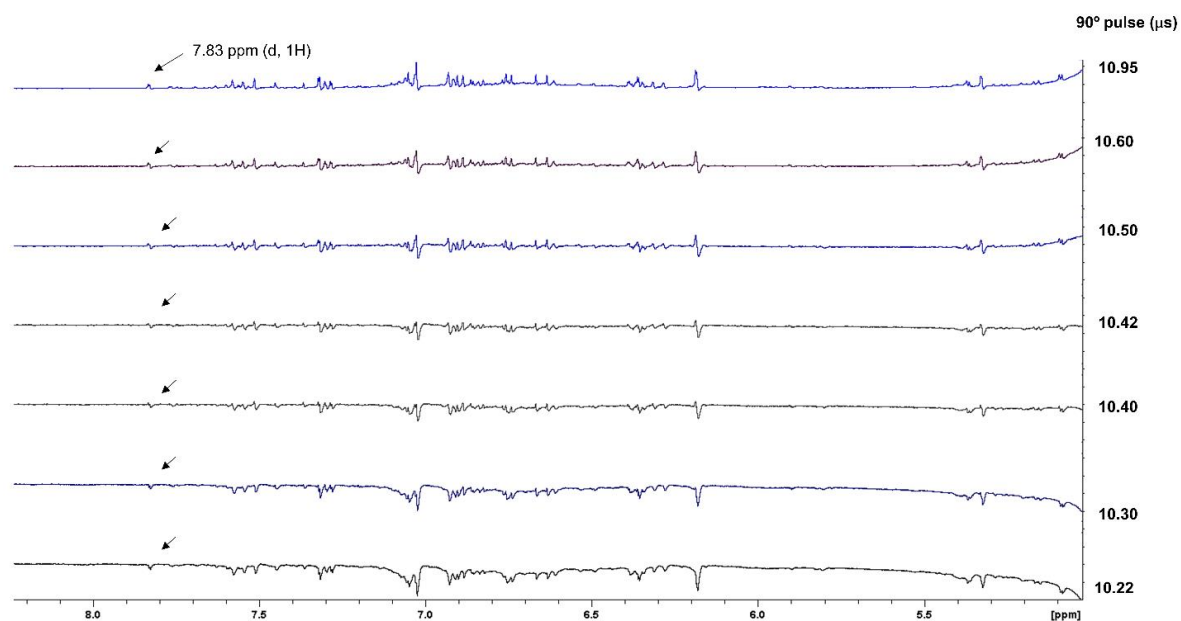


Figura S6

Experimento de calibração de pulso 90° (zg) para o sinal em δ 7,82 (s, 1H) do composto hiperosídeo (pulso 360°) na amostra MmAPA2 (27,5 $^\circ\text{C}$) em CD_3OD .

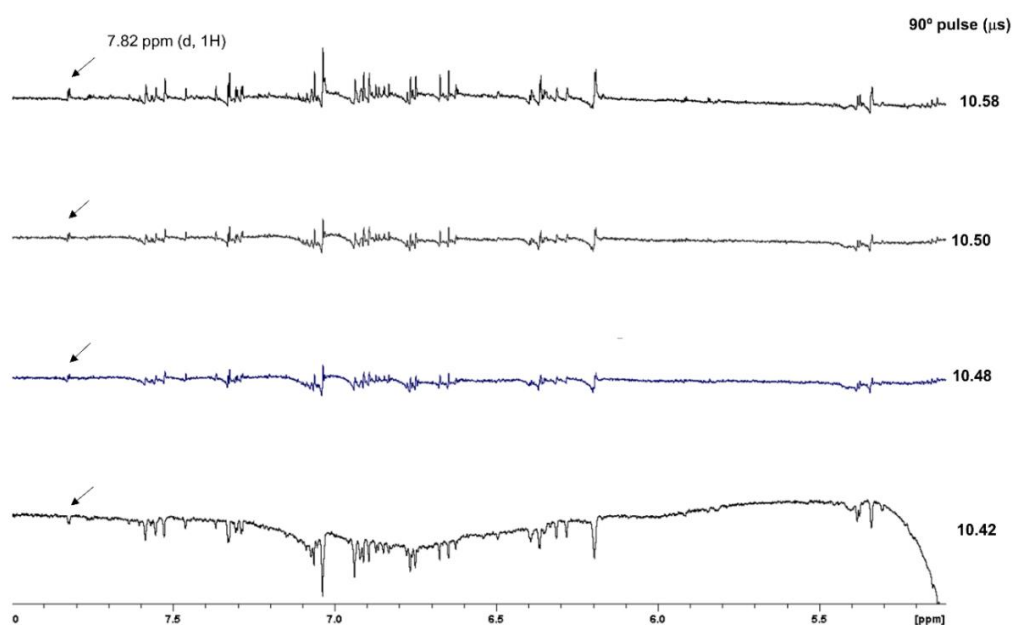


Figura S7

Experimento de inversão-recuperação (t1ir1d) do sinal em δ 7,83 (s, 1H) do composto hiperosídeo da amostra MmAPA2 (15,0 °C).

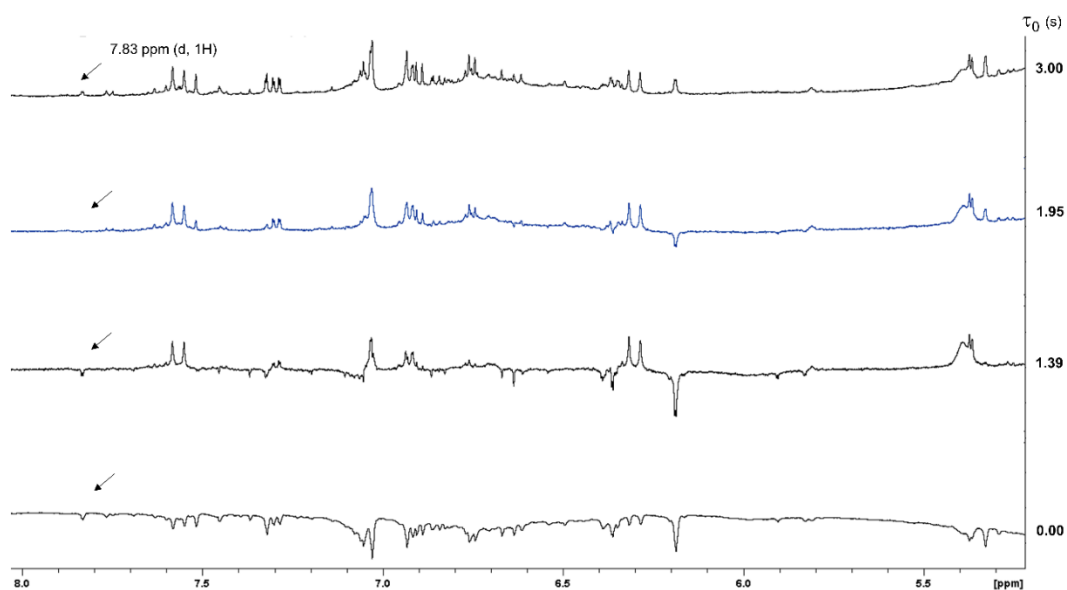
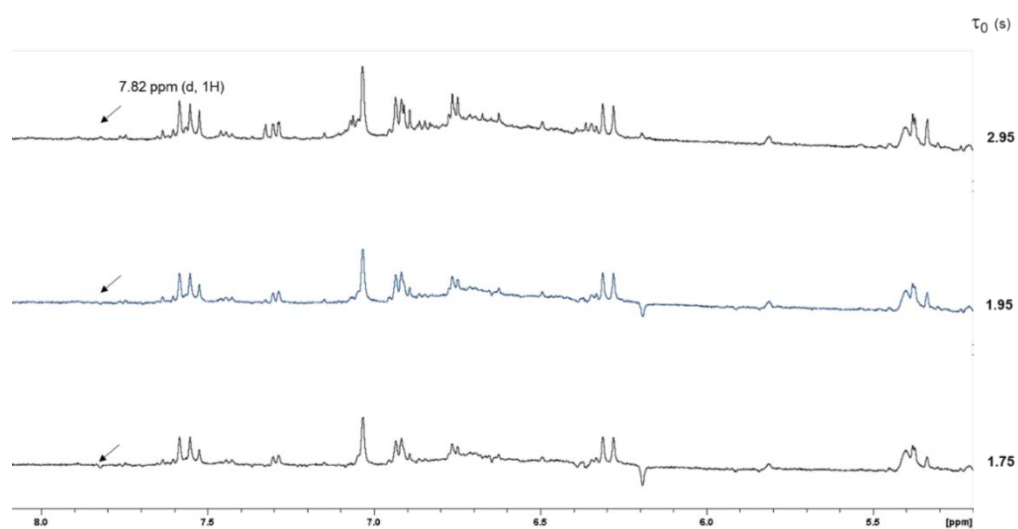


Figura S8

Experimento de inversão-recuperação (t1ir1d) do sinal em δ 7,82 (s, 1H) do composto hiperosídeo da amostra MmAPA2 (27,5 °C).



Dados de aquisição da análise quantitativa por RMN de ^1H do extrato seco de *M. multiflora* (MmEAO), *E. biflora* (EbAPA) e *E. punicifolia* (EpEAO)

Figura S9

Experimento de calibração de pulso 90° (zg) do sinal em δ 3,94 (s, 6H) do padrão tereftalato de dimetila (pulso 360°) em $\text{DMSO}-d_6$.

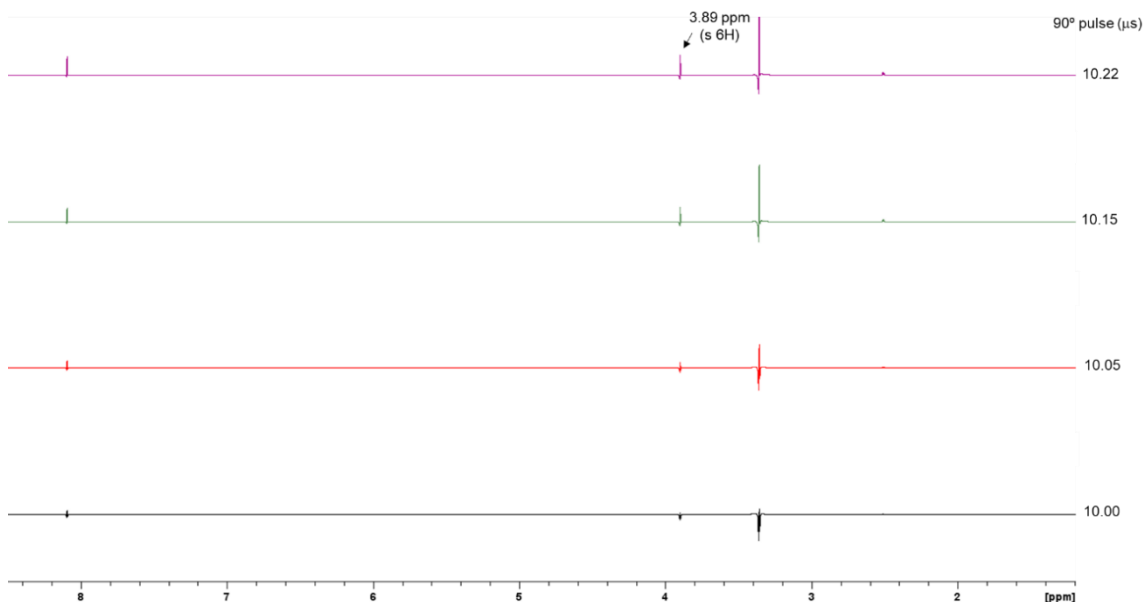


Figura S10

Experimento de inversão-recuperação (t1ir1d) do sinal em δ 3,94 (s, 6H) do padrão tereftalato de dimetila (d1=25s) em $\text{DMSO}-d_6$.

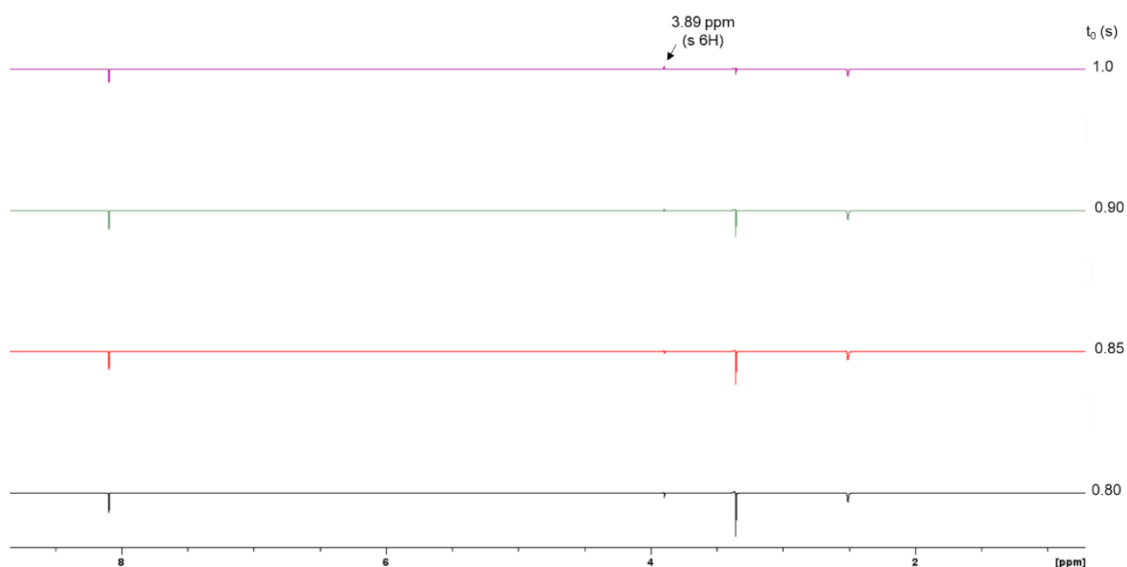


Figure S11

Experimento de calibração de pulso 90° (zg) do sinal em δ 4,47 (d, 1H) da substância catequina (pulso 360°) em DMSO- d_6 .

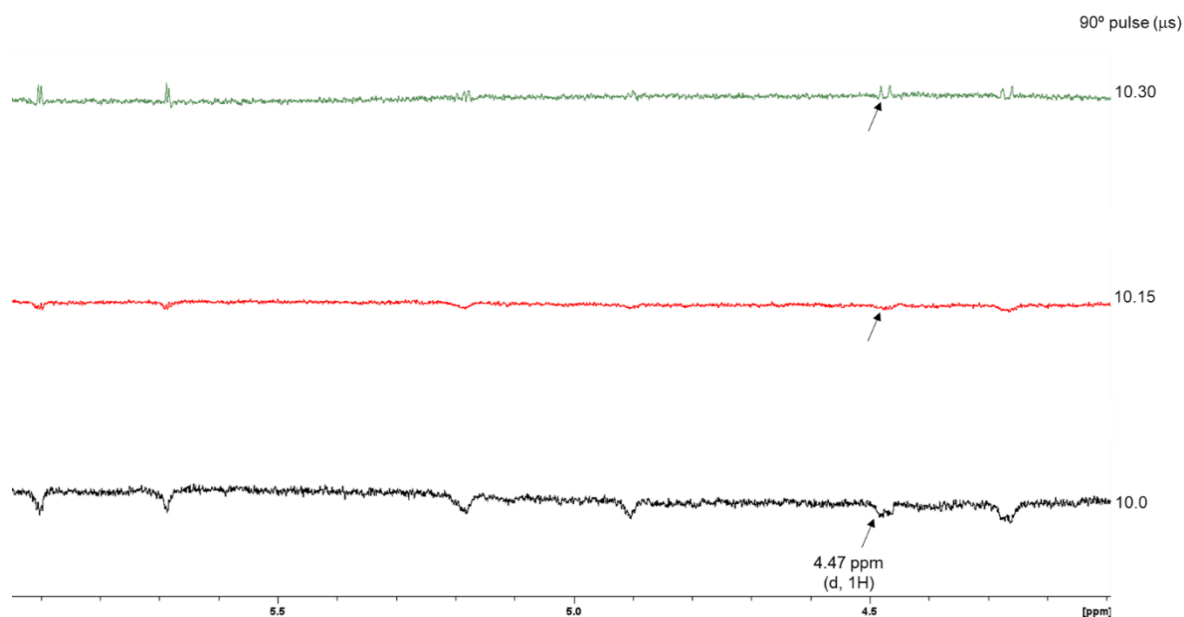


Figure S12

Experimento de inversão-recuperação ($t_{1\rho}$) do sinal em δ 4,47 (d, 1H) da substância catequina ($d_1=15\text{s}$) em DMSO- d_6 .

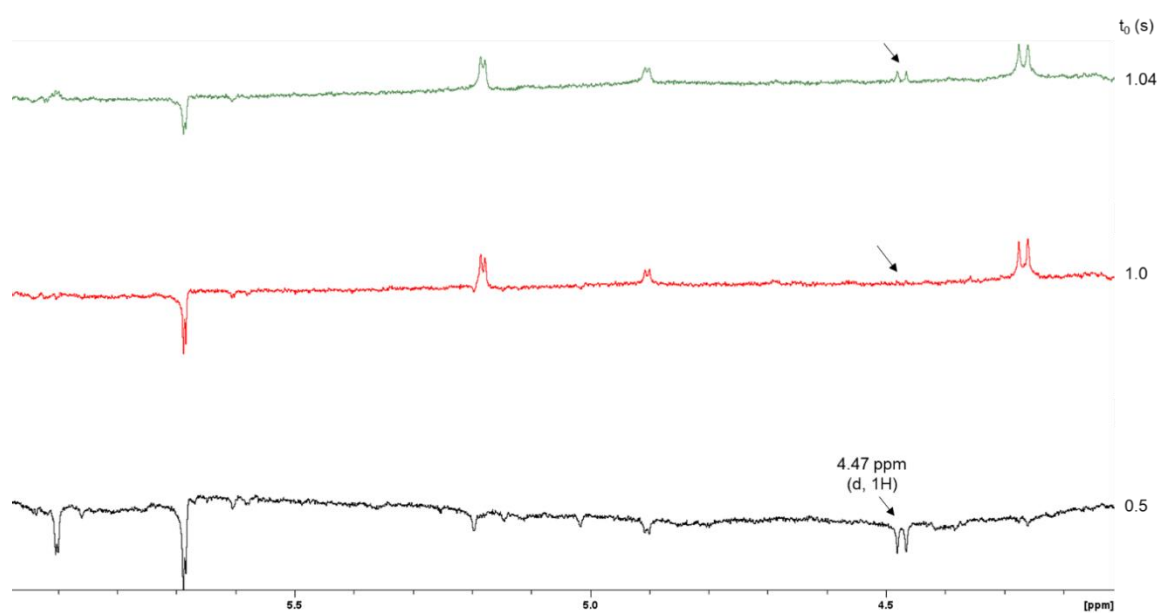


Figure S13

Experimento de calibração de pulso 90° (zg) do sinal em δ 5,25 (d, 1H) da substância miricitrina (pulso 360°) em DMSO- d_6 .

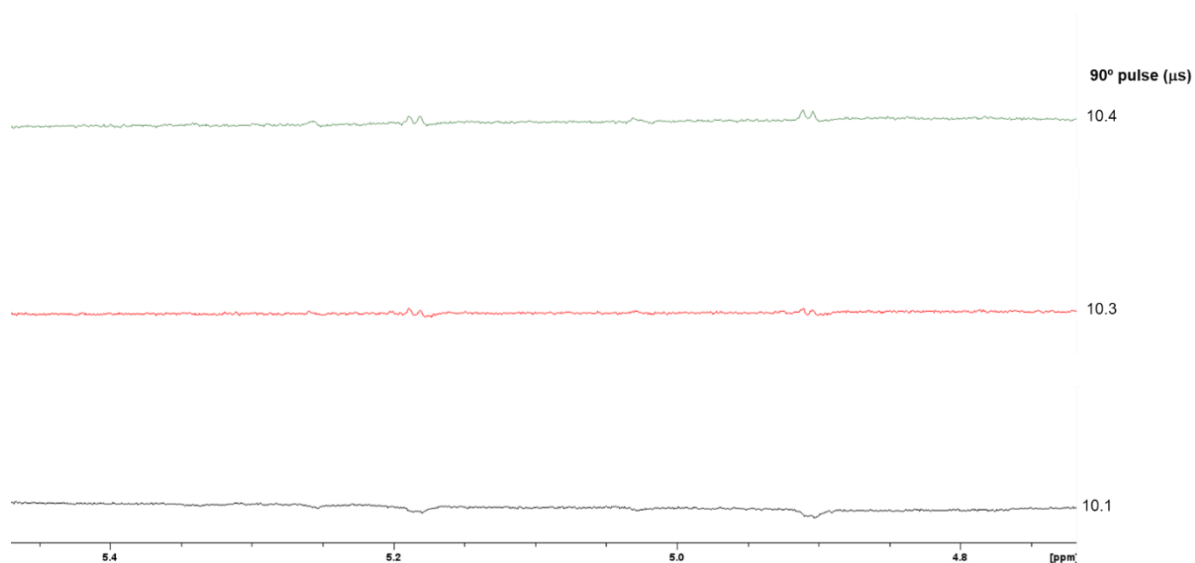
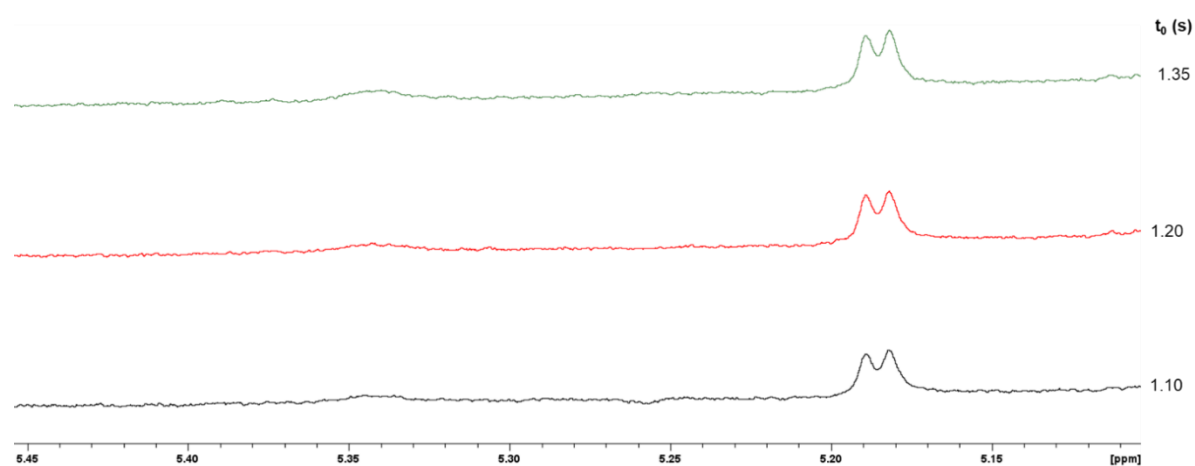


Figure S14

Experimento de inversão-recuperação (t1r1d) do sinal em δ 5,25 (d, 1H) da substância miricitrina (d1=17s) em DMSO- d_6 .



Dados espectrométricos dos compostos por CLAE-EMAR do extrato seco das folhas de *Myrcia multiflora* (MmAPA)

Figura S15

Cromatogramas de íons totais do extrato seco das folhas *M. multiflora* (MmAPA) por CLAE-IES-EMAR no modo negativo (A) e modo positivo (B).

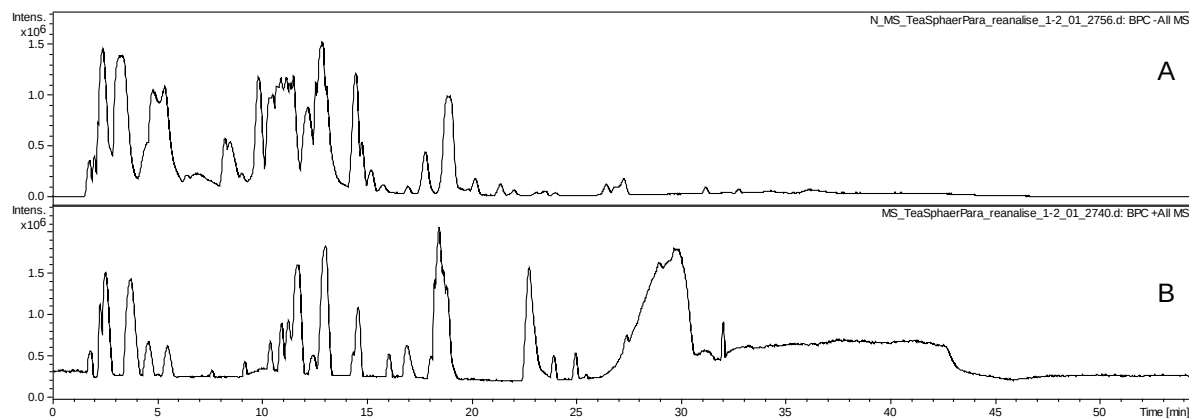


Figura S16

Pico no t_R 3,7 min, espectro de íon modo negativo e MS^2 de m/z 355,1018 (ácido clorogênico, 7).

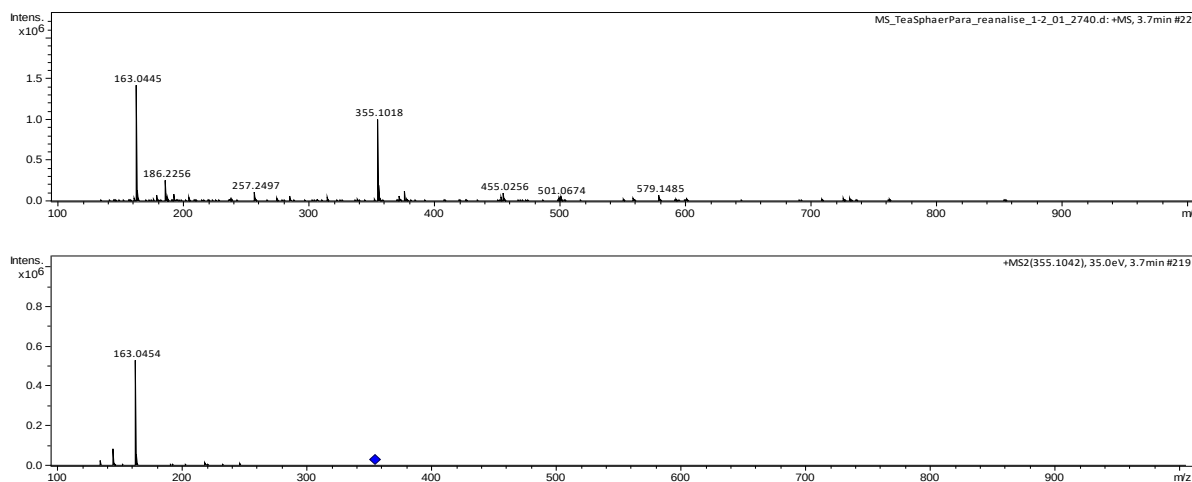


Figura S17

Pico no t_R 4,5 min, espectro de íon modo positivo e MS^2 de m/z 291,0880 (catequina, 8)

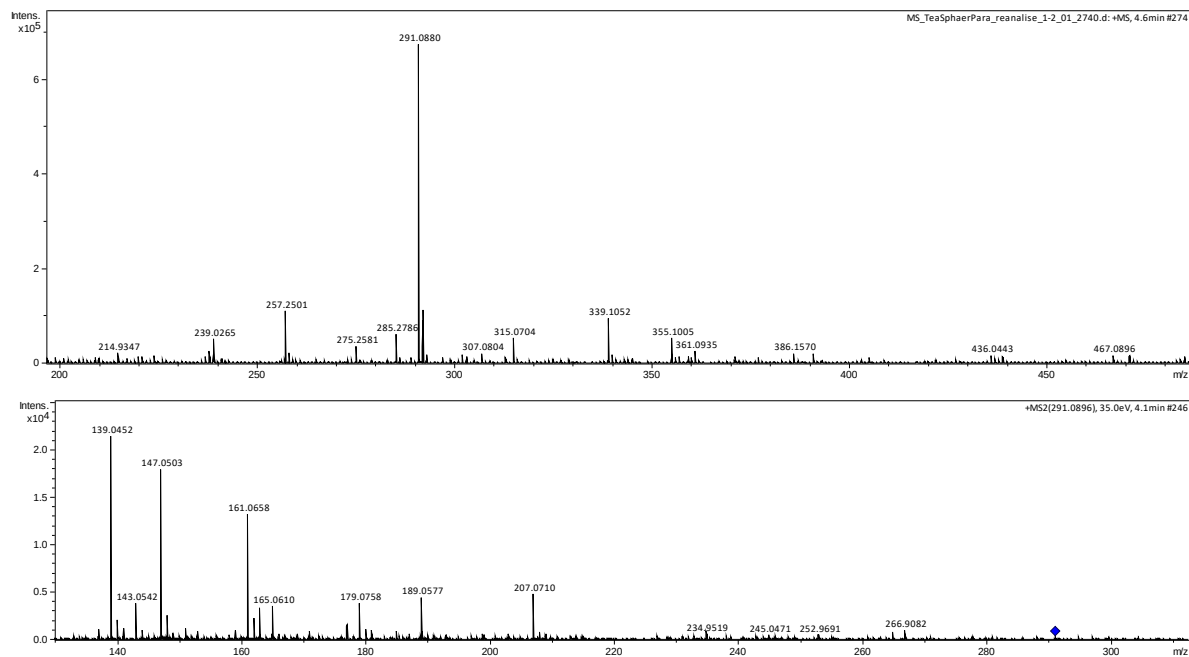


Figura S18

Pico no t_R 5,3 min, espectro de íon modo negativo e MS^2 de m/z 355,1013 (ácido 4-O-cafeoilquinico, 9)

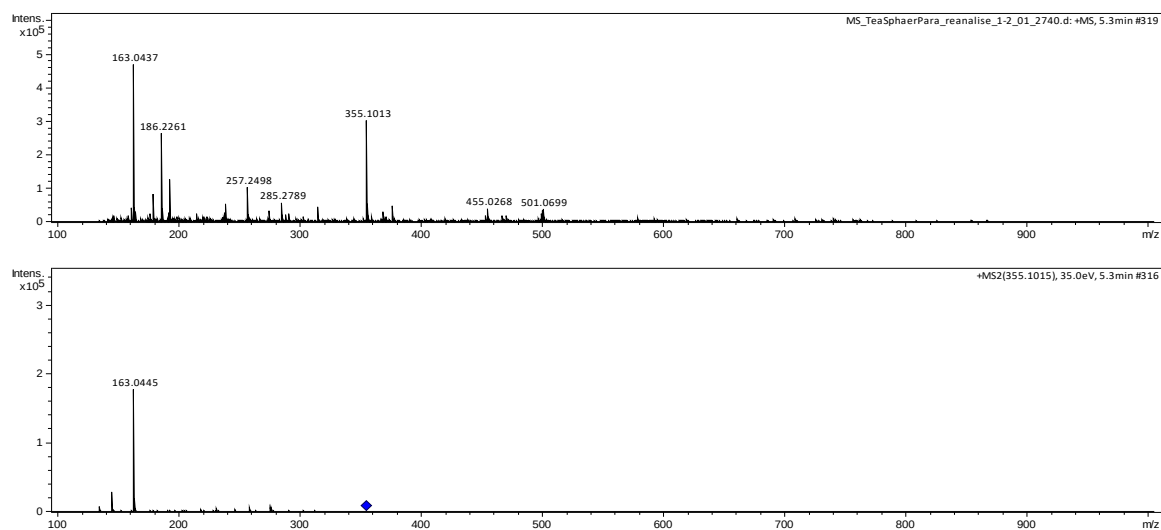


Figura S19

Pico no t_R 5,3 min, espectro de íon modo negativo ESI-MS e MS² de m/z 633,0726 (corilagina, **10**).

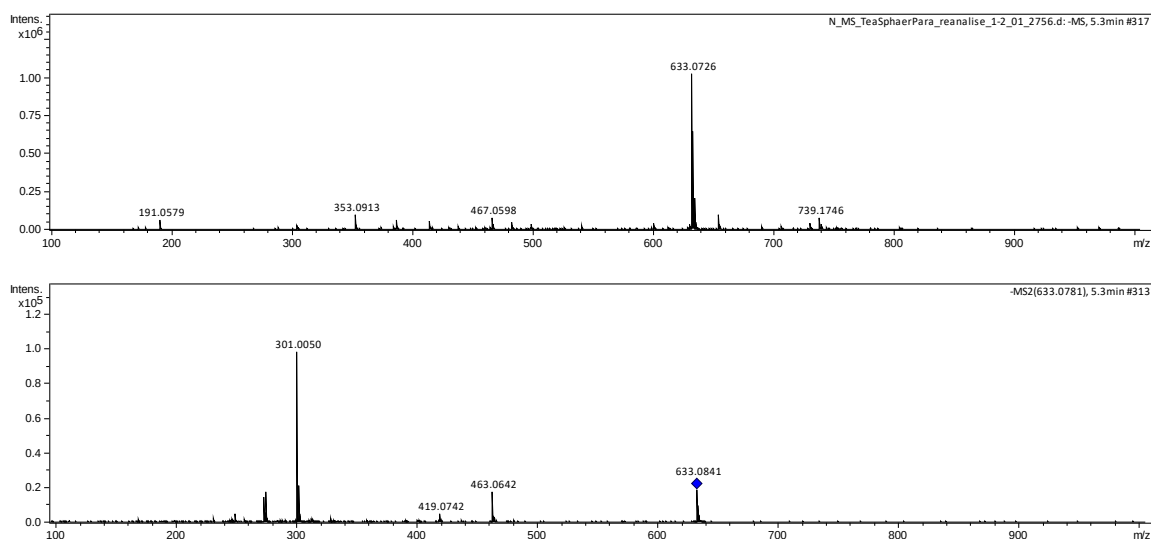


Figura S20

Pico no t_R 8,5 min, espectro de íon modo negativo e MS² de m/z 953,0940 (ácido quebulágico, **13**).

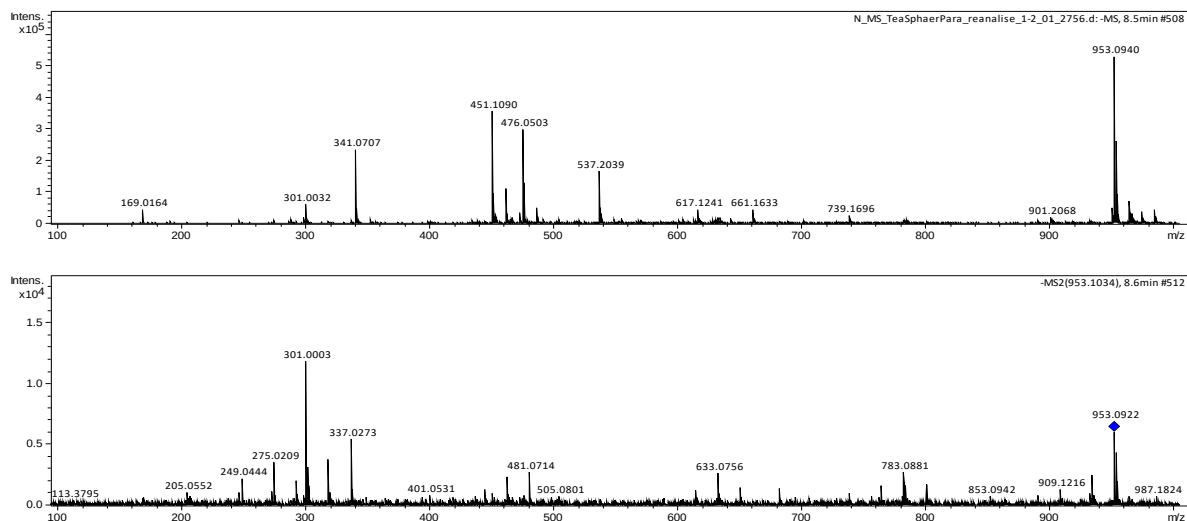


Figura S21

Pico no t_R 9,2 min, espectro de íon modo positivo e MS^2 de m/z 785,0820 (pedunculagina, **14**).

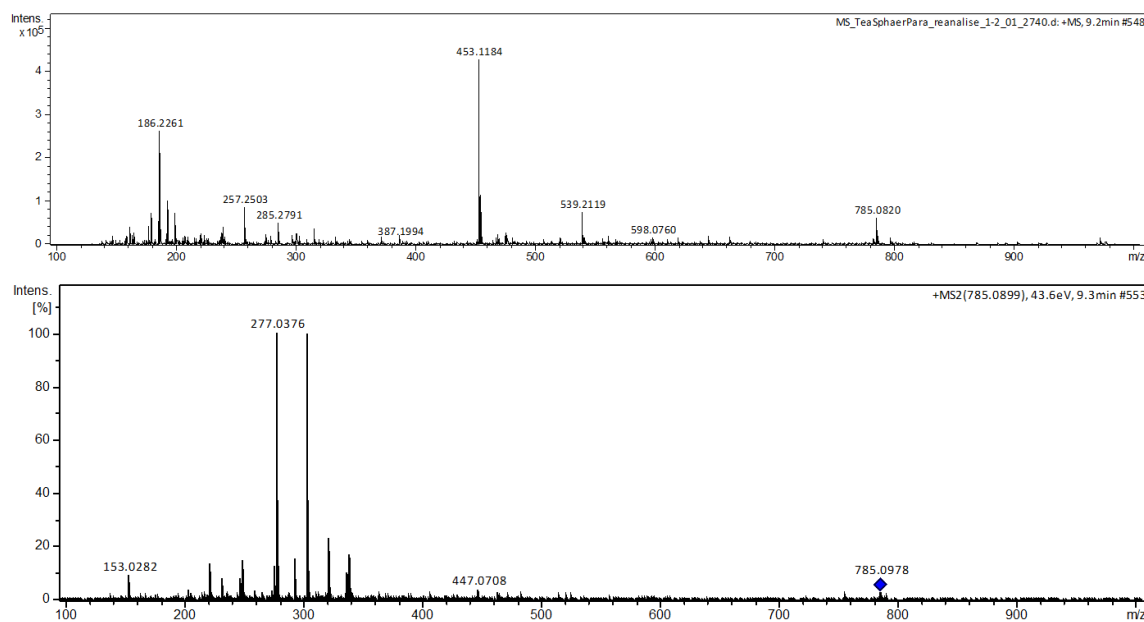


Figura S22

Pico no T_R 10,1 min, espectro de íon modo negativo e MS^2 de m/z 479,0876 (miricetin-3-O-D-glucosídeo, **16**).

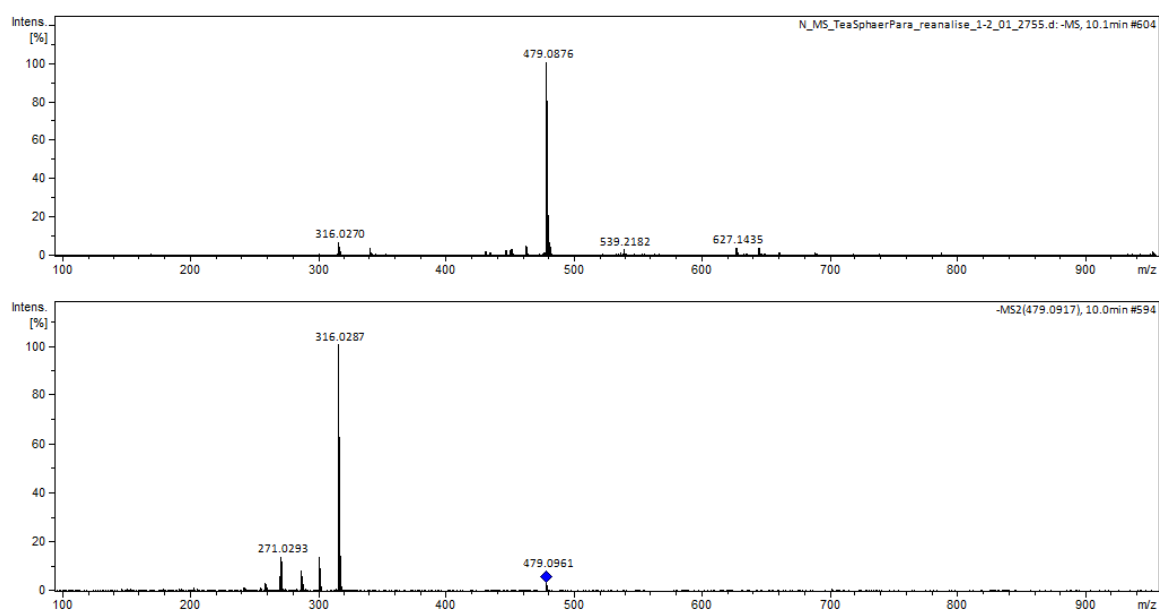


Figura S23

Pico no t_R 10,7 min, espectro de íon modo negativo e MS^2 de m/z 615,1037 (quercetina-3-*O*- β -2"-galoilglucosídeo, **17**).

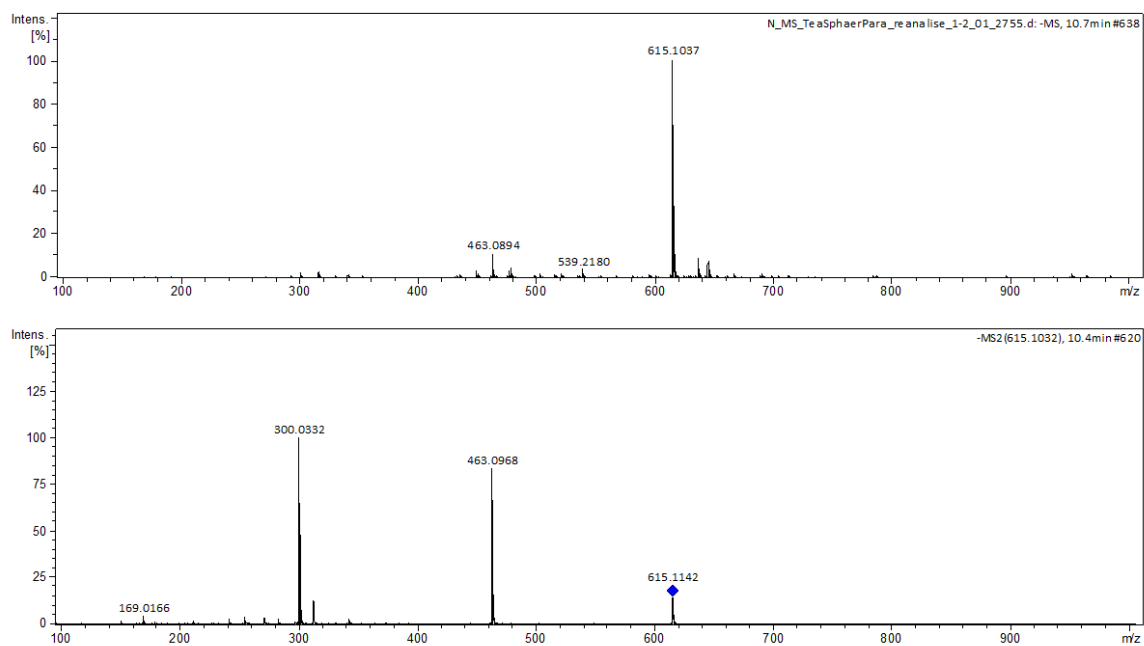


Figura S24

Pico no t_R 11,2 min, espectro de íon modo positivo ESI-MS e MS^2 de m/z 465,1030 (miricitrina, **19**).

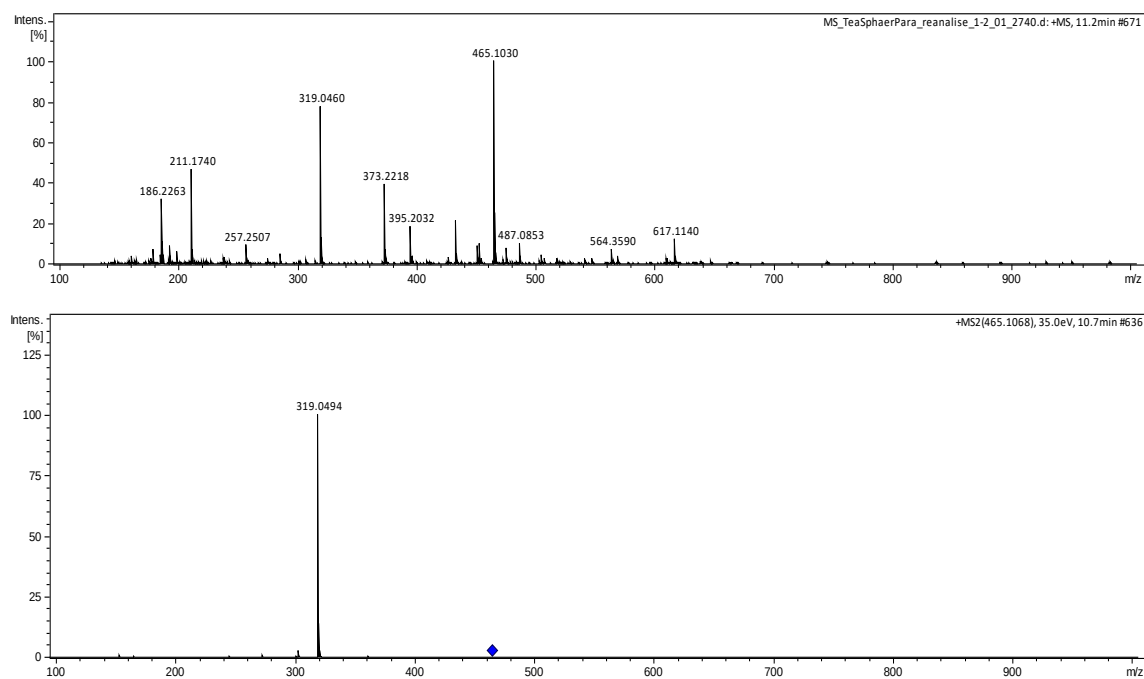


Figura S25

Pico no t_R 11,5 min, espectro de íon modo negativo ESI-MS e MS² de m/z 463,0889 (hiperosídeo, **20**).

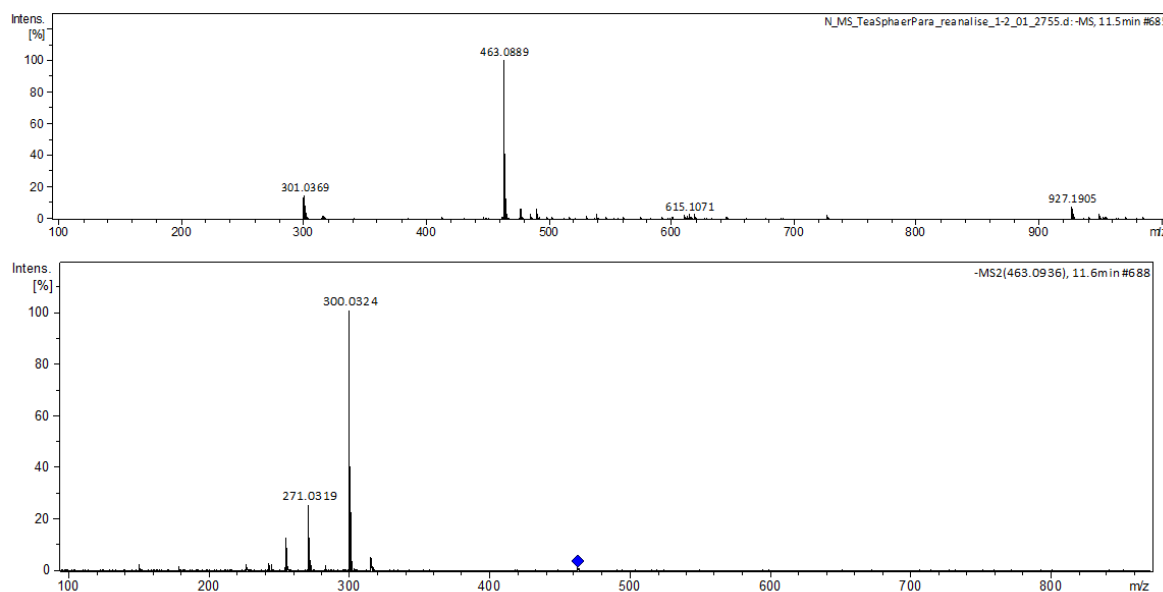


Figura S26

Pico no t_R 12,7 min, espectro de íon modo negativo ESI-MS e MS² de m/z 433,0799 (guaijaverina, **21**).

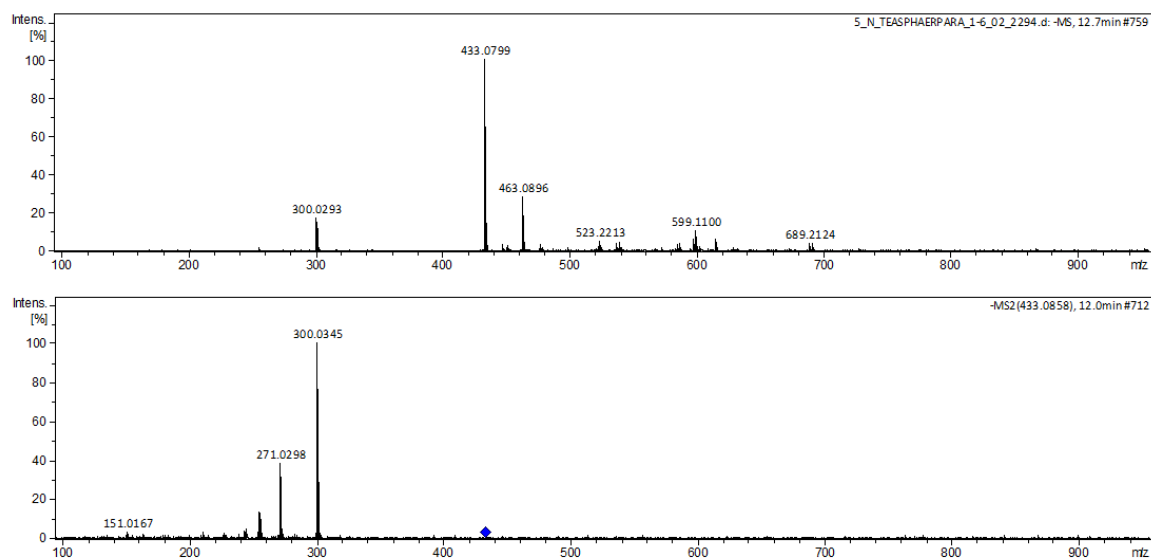


Figura S27

Pico no t_R 13,1 min, espectro do íon negativo ESI-MS e MS² de m/z 447,0925 (quercitrina, **23**).

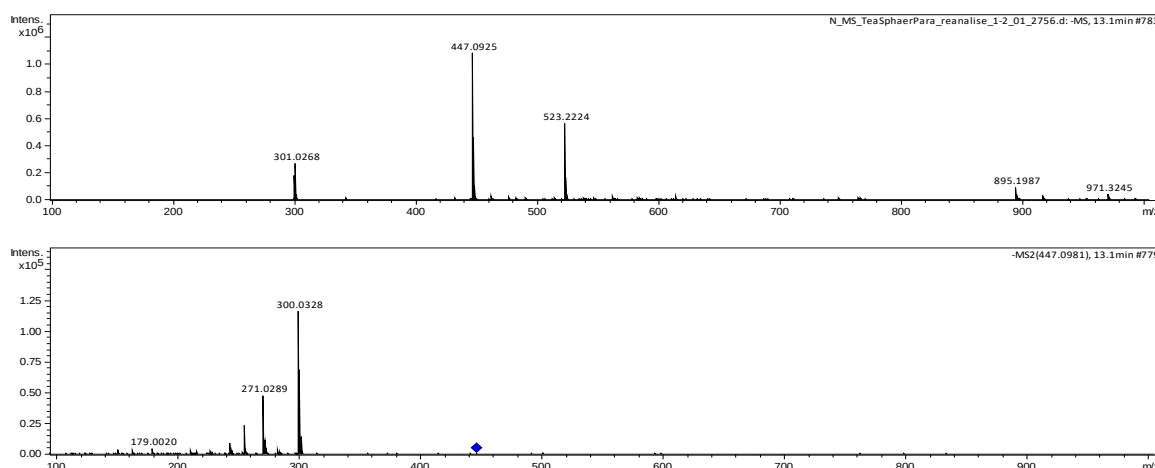
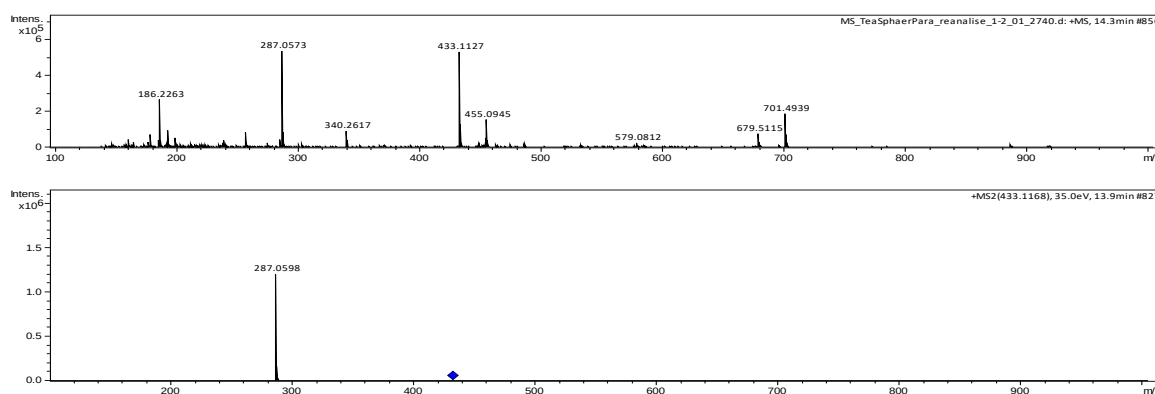


Figura S28

Pico no t_R 15,0 min, espectro do íon positivo ESI-MS e MS² de m/z 433,1014 (kaempferol-3-O-ramnosídeo, **26**).



Análise por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear 1D e 2D

Myrcia multiflora (MmAPA)

Figura S29

Espectros de RMN de ^1H do extrato seco de *Myrcia multiflora* em duas temperaturas (15 °C e 27,5 °C) onde ocorreu melhor homogeneidade do campo magnético (500 MHz, CD_3OD). A: região alifática (δ 0,5 a 3,0), B: região carbinólica (δ 3,0 a 5,5) e C: região aromática e vinílica (δ 5,8 a 8,0).

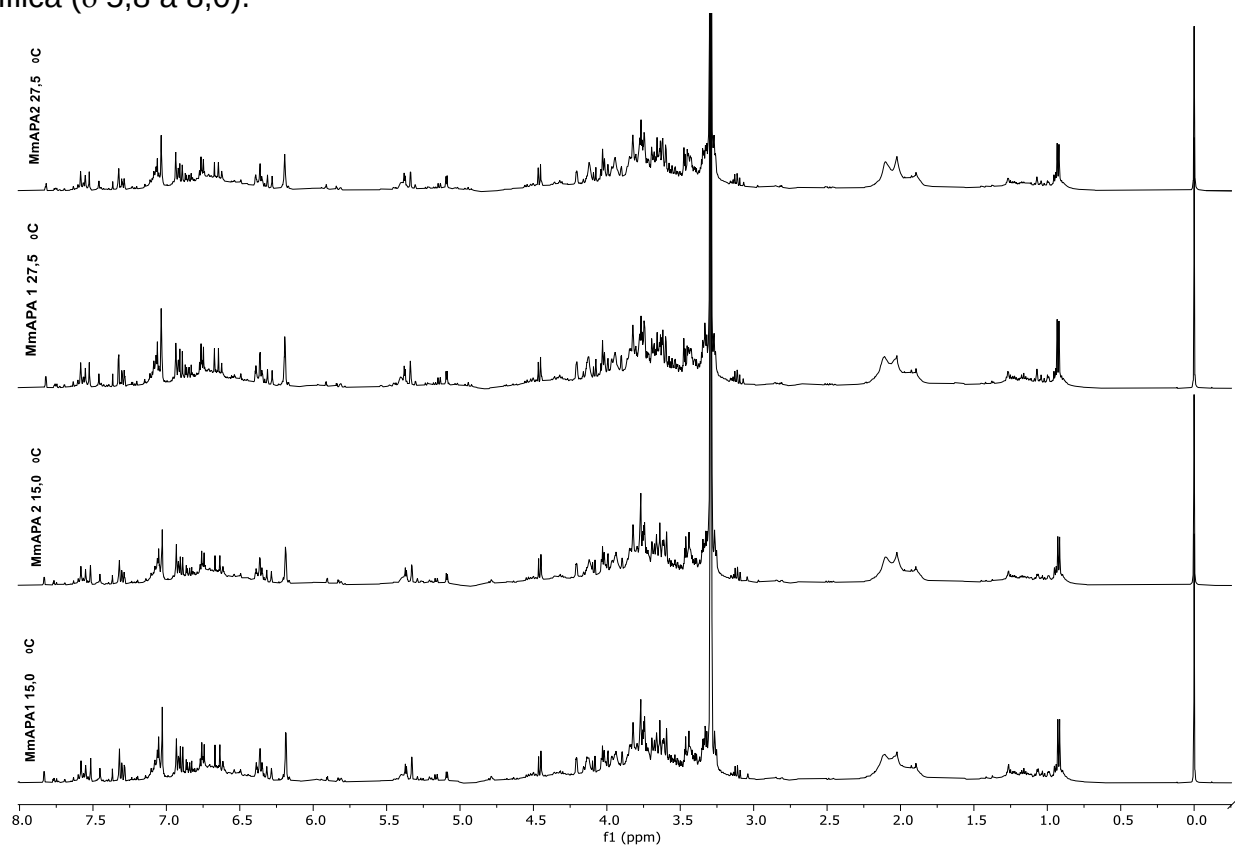


Figura S30

Espectro de RMN de ^1H do extrato seco das folhas de *M. multiflora* (MmAPA) (15,0 °C) (500 MHz, CD_3OD)

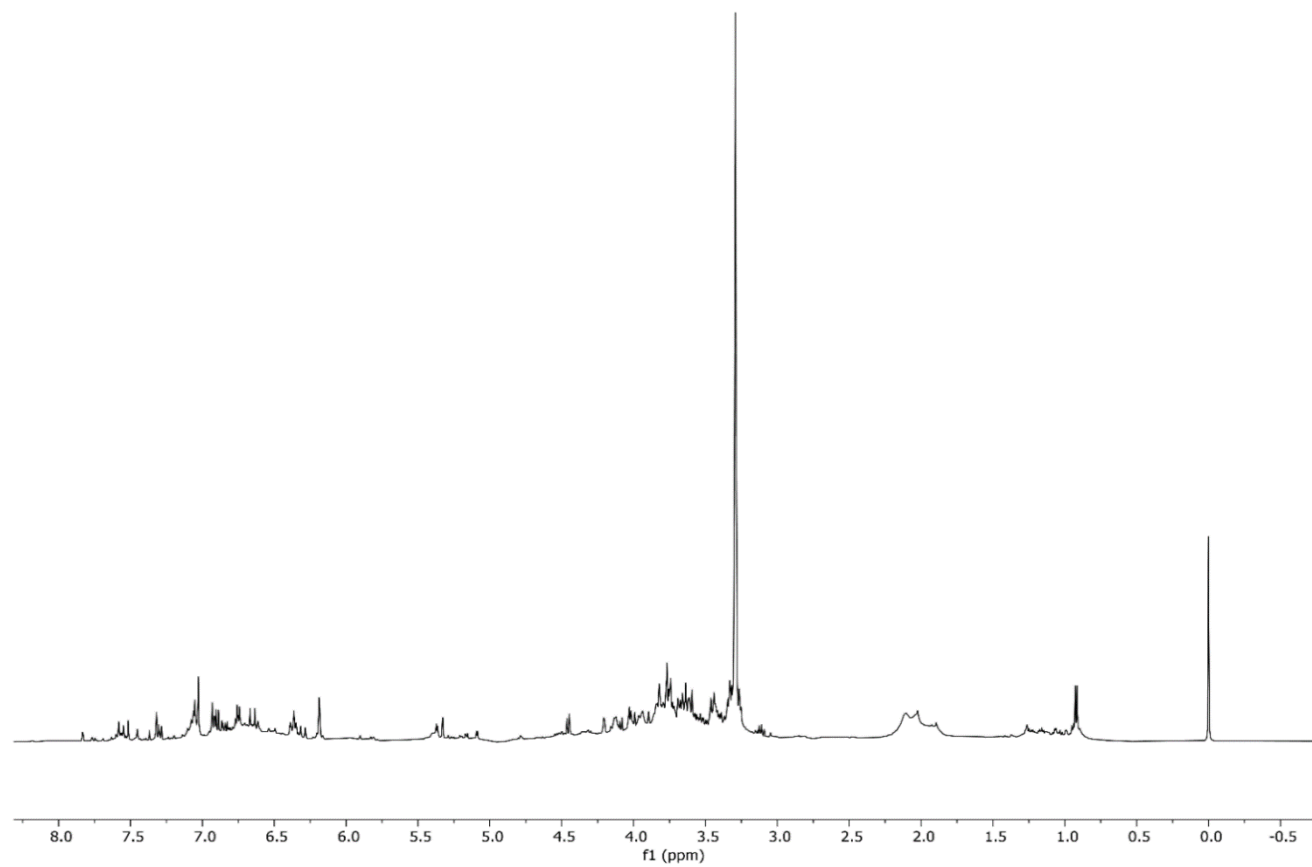


Figura S31

^1H - ^{13}H HSQC do extrato seco das folhas de *M. multiflora* (MmAPA) (15,0 °C) (11,74 T, CD_3OD)

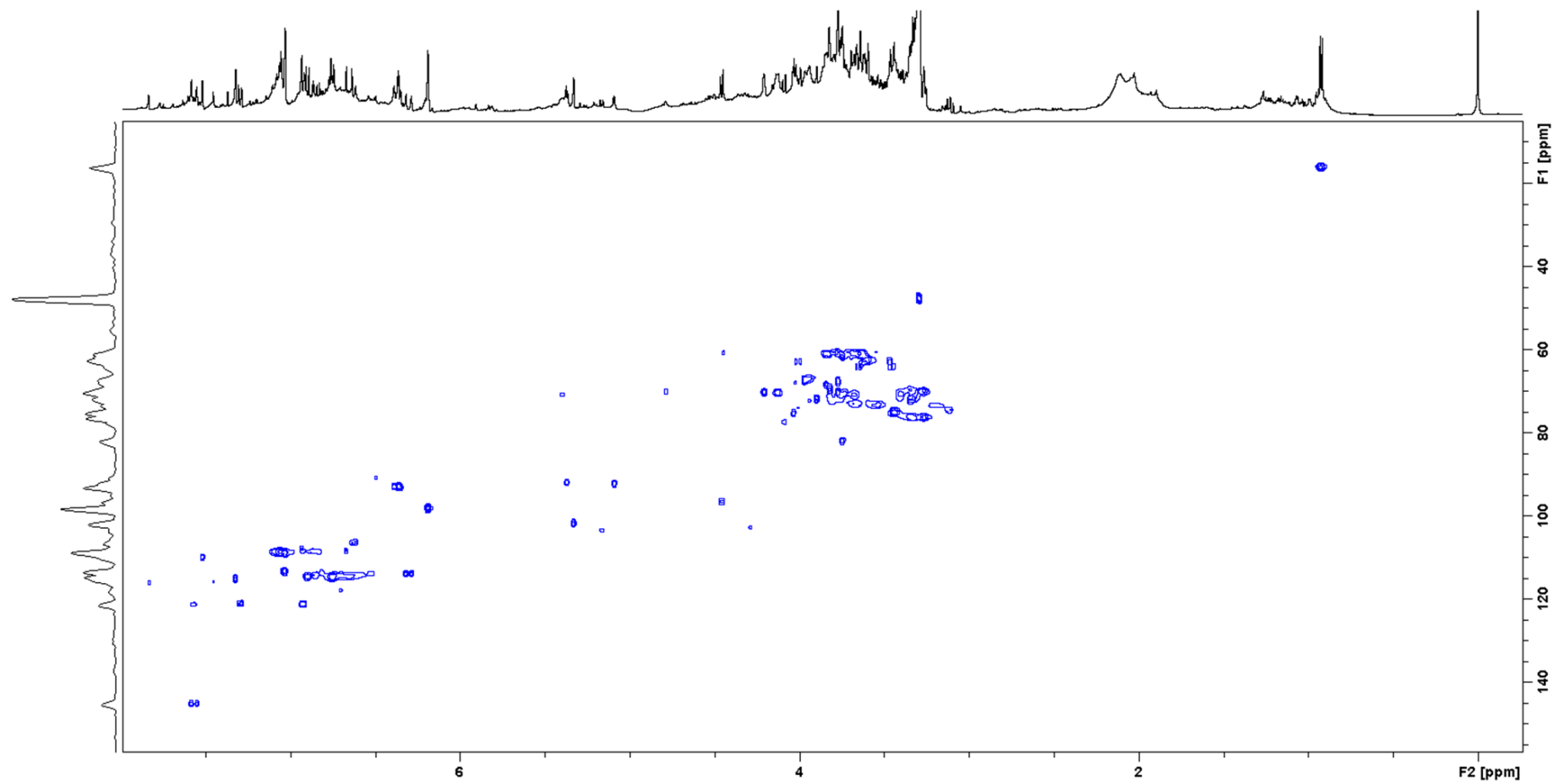


Figura S32

Espectro de RMN de ^1H do extrato seco das folhas de *M. multiflora* (MmAPA) (27,0 °C) (500 MHz, CD_3OD)

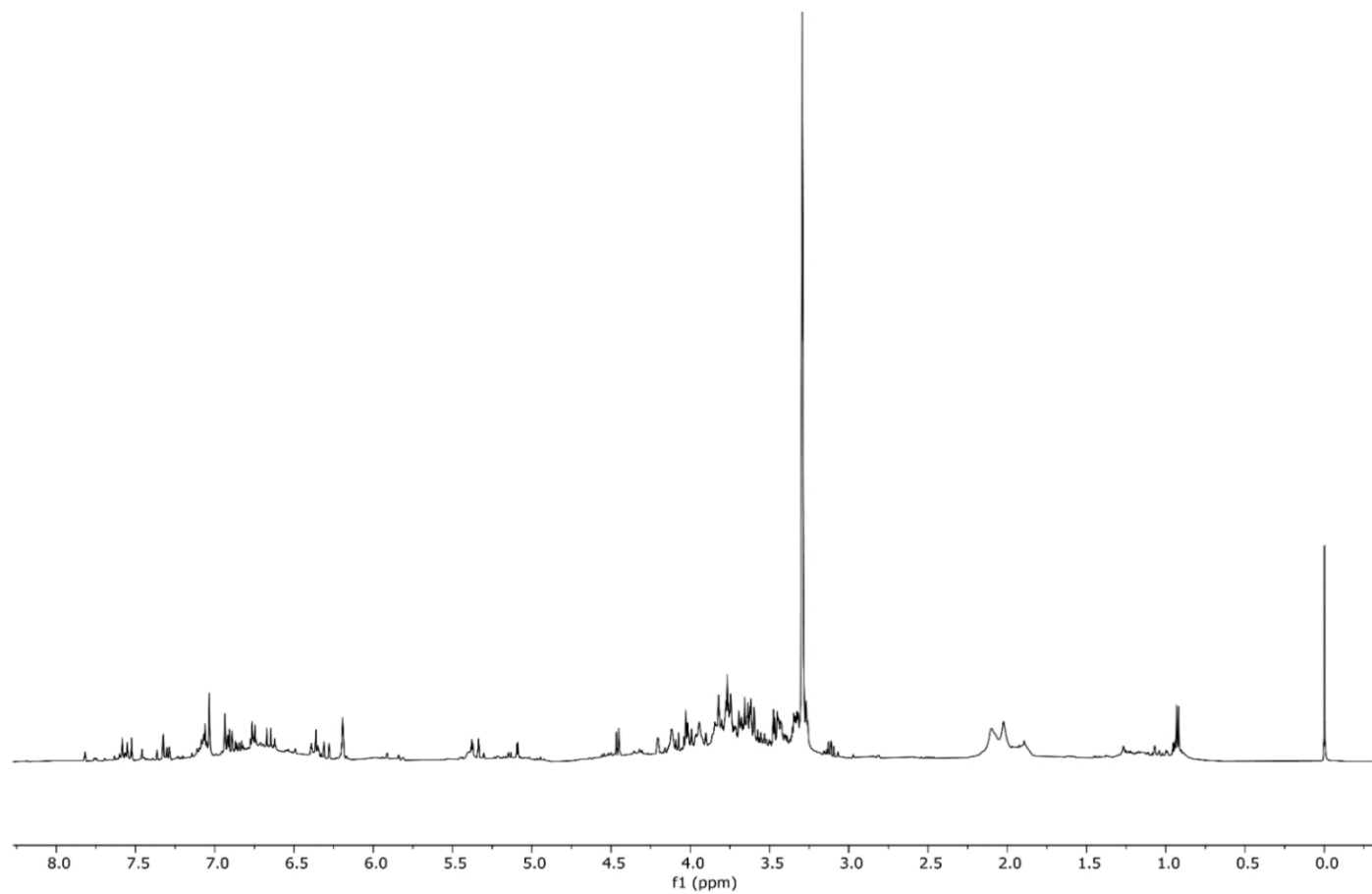


Figura S33

^1H - ^{13}H HSQC do extrato seco das folhas de *M. multiflora* (MmAPA) (27,5 °C) (11,74 T, CD_3OD)

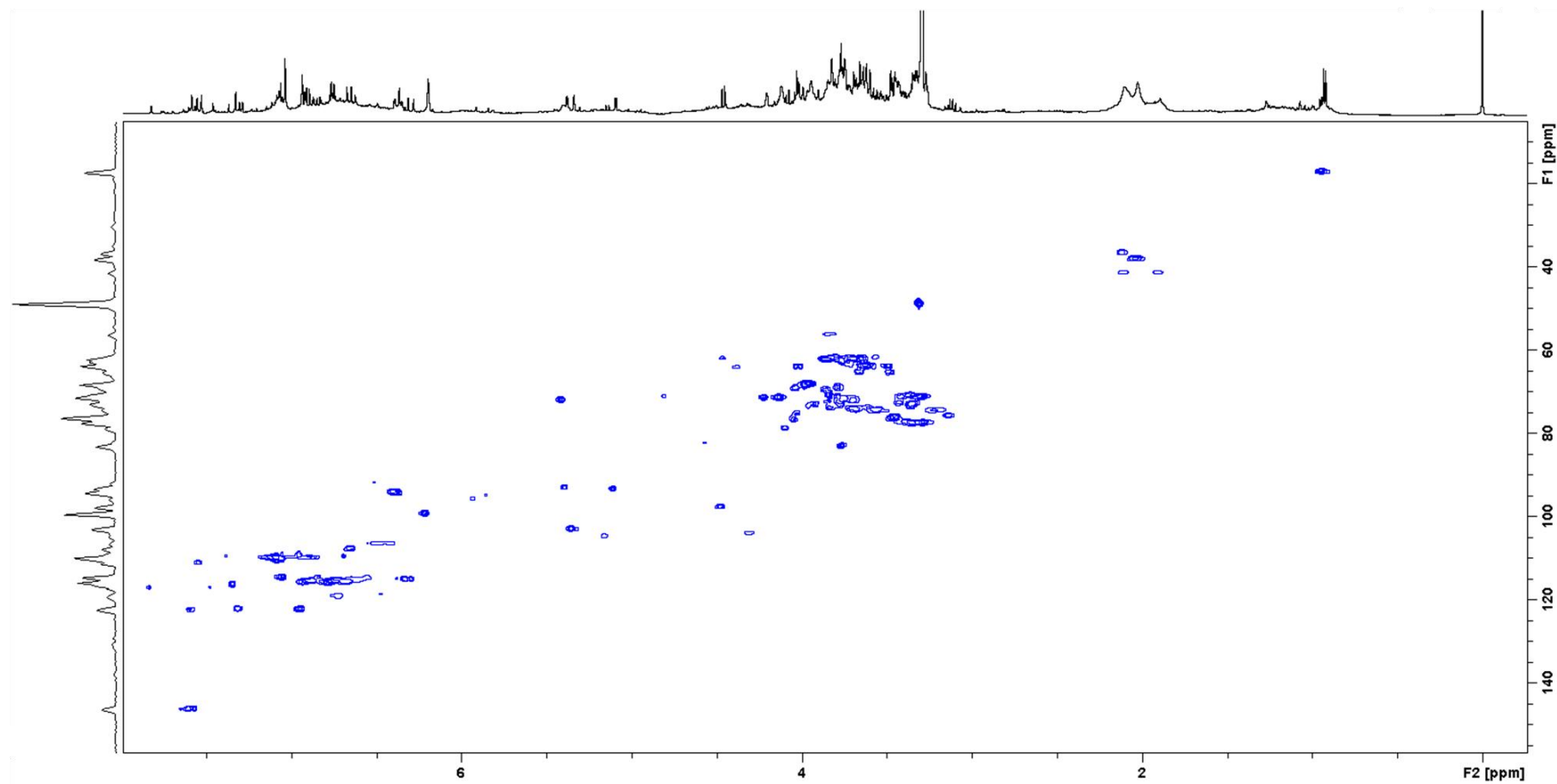


Figura S34

Espectro de RMN de ^1H com assinalamento dos sinais da substância ácido clorogênico (**7**) (500 MHz, CD_3OD)

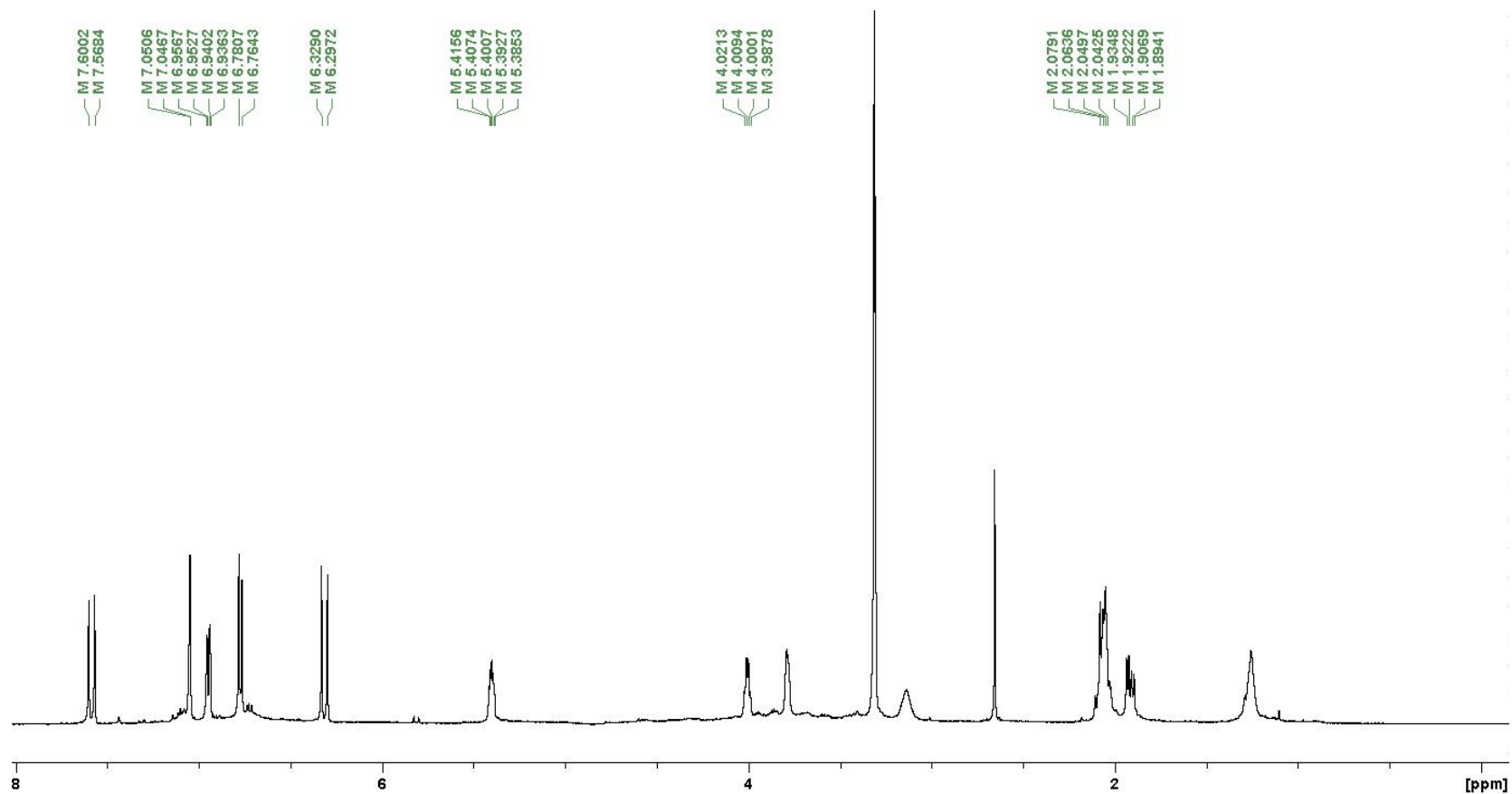


Figure S35

^1H - ^{13}H HSQC da substância ácido clorogênico (**7**) (11,74 T, CD_3OD)

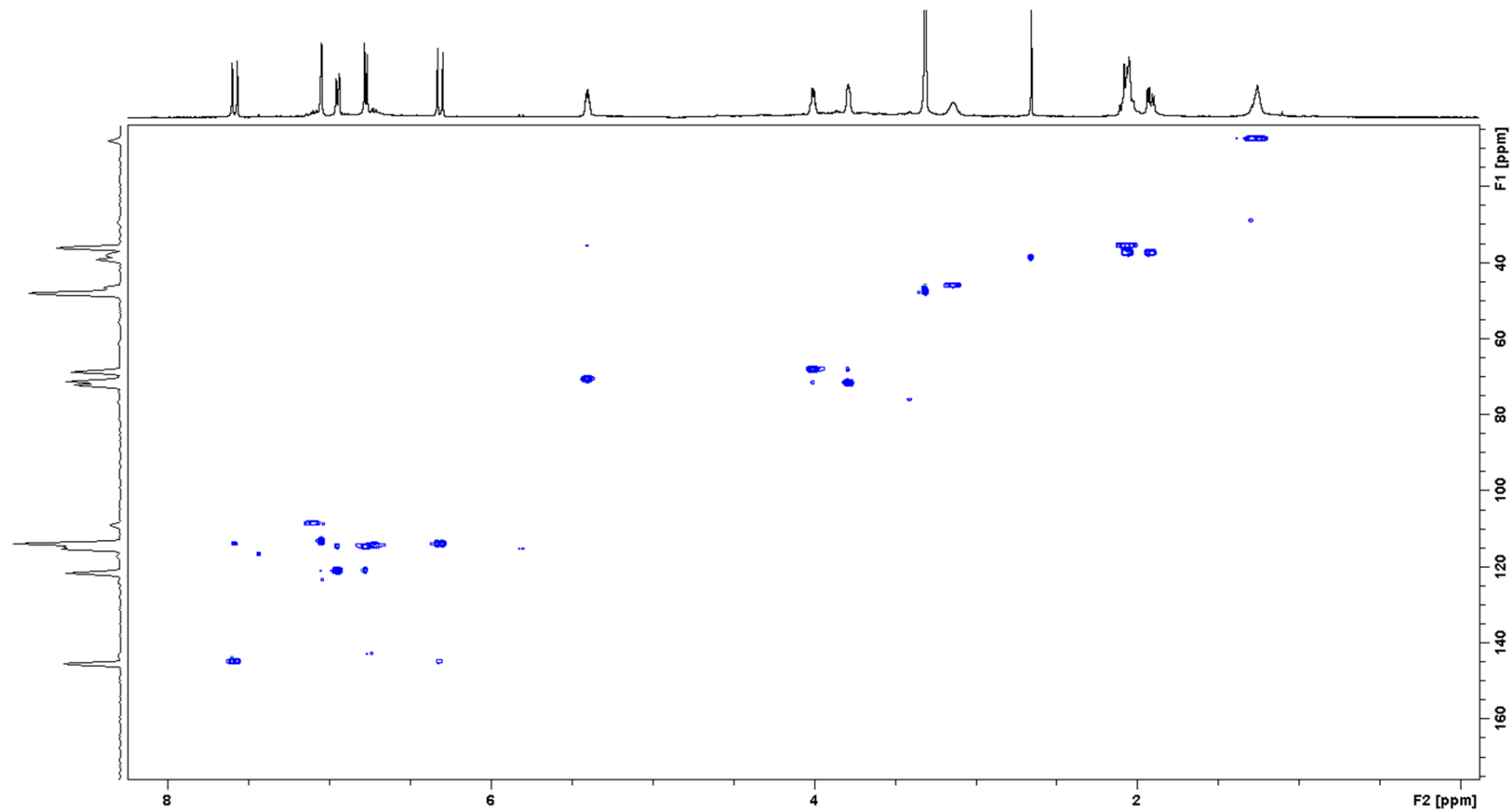


Figure S36

^1H - ^{13}H HMBC da substância ácido clorogênico (**7**) (11,74 T, CD_3OD)

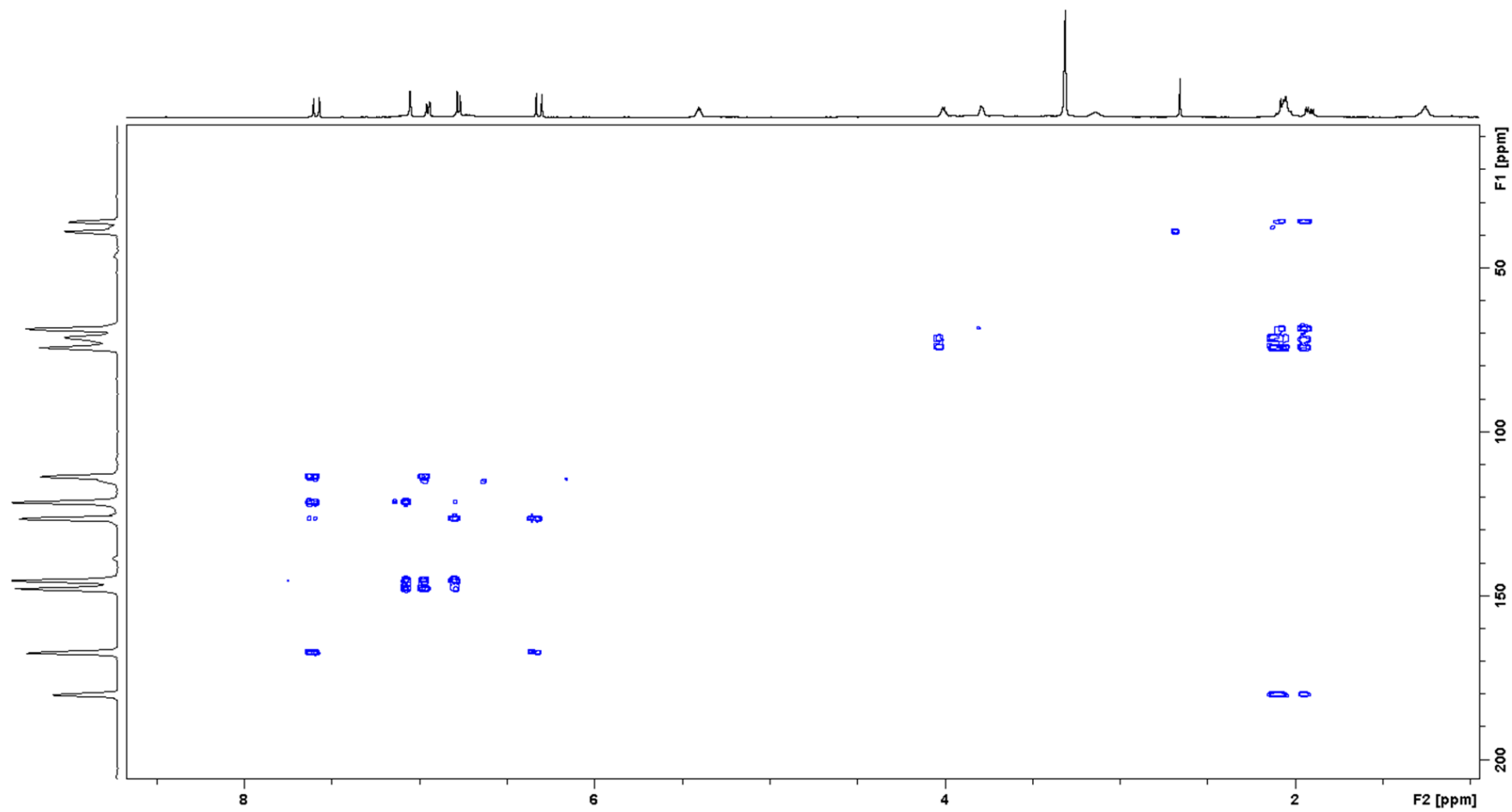


Figura S37

Espectro de RMN de ^1H com assinalamento dos sinais das substâncias 4-O-cafeoilquinico (**9**) e corilagina (**10**) e corilagina (500 MHz, CD_3OD).

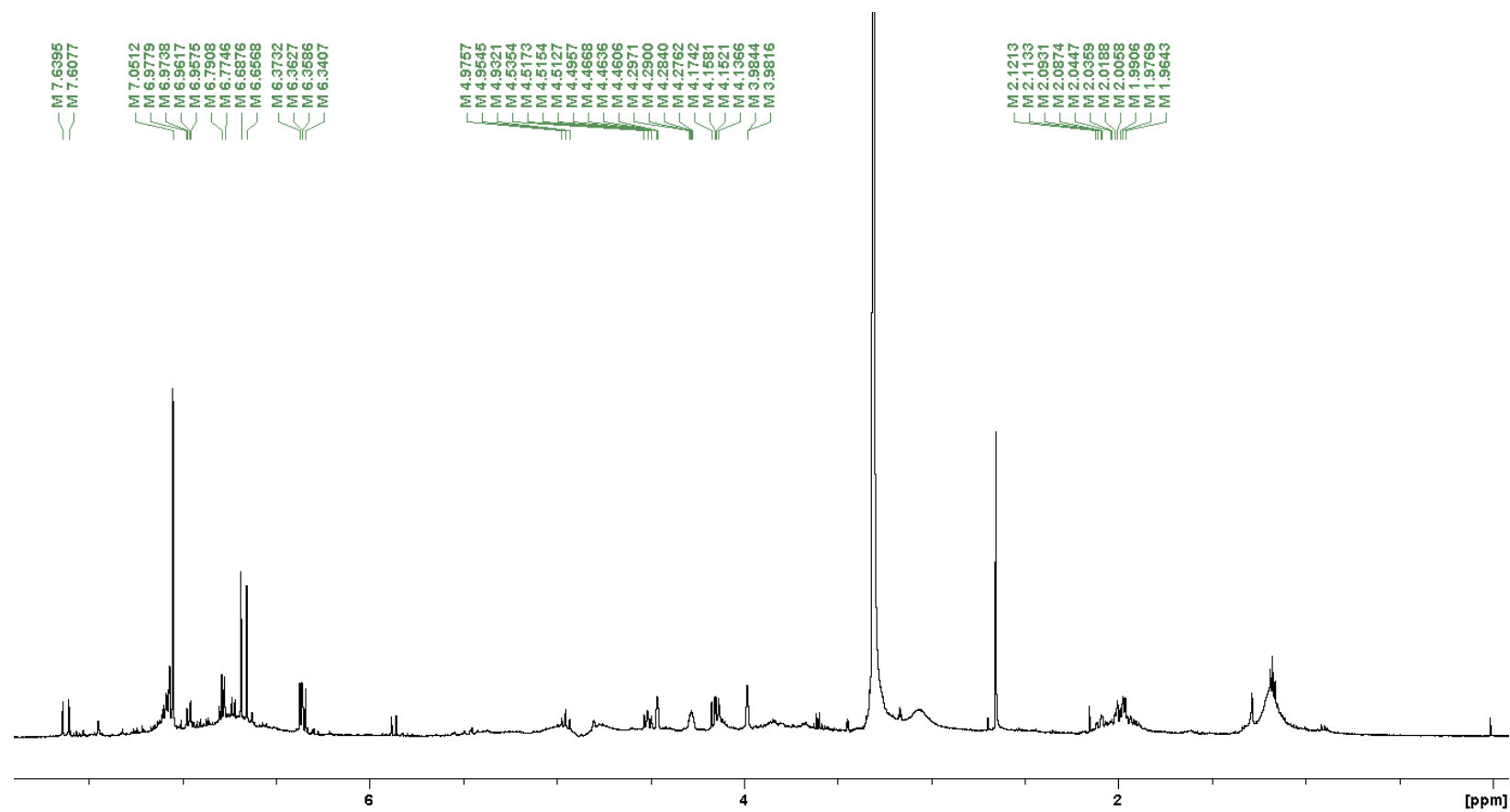


Figura S38

^1H - ^{13}H HSQC das substâncias 4-O-cafeoilquinico (**9**) e corilagina (**10**) (11,74 T, CD_3OD)

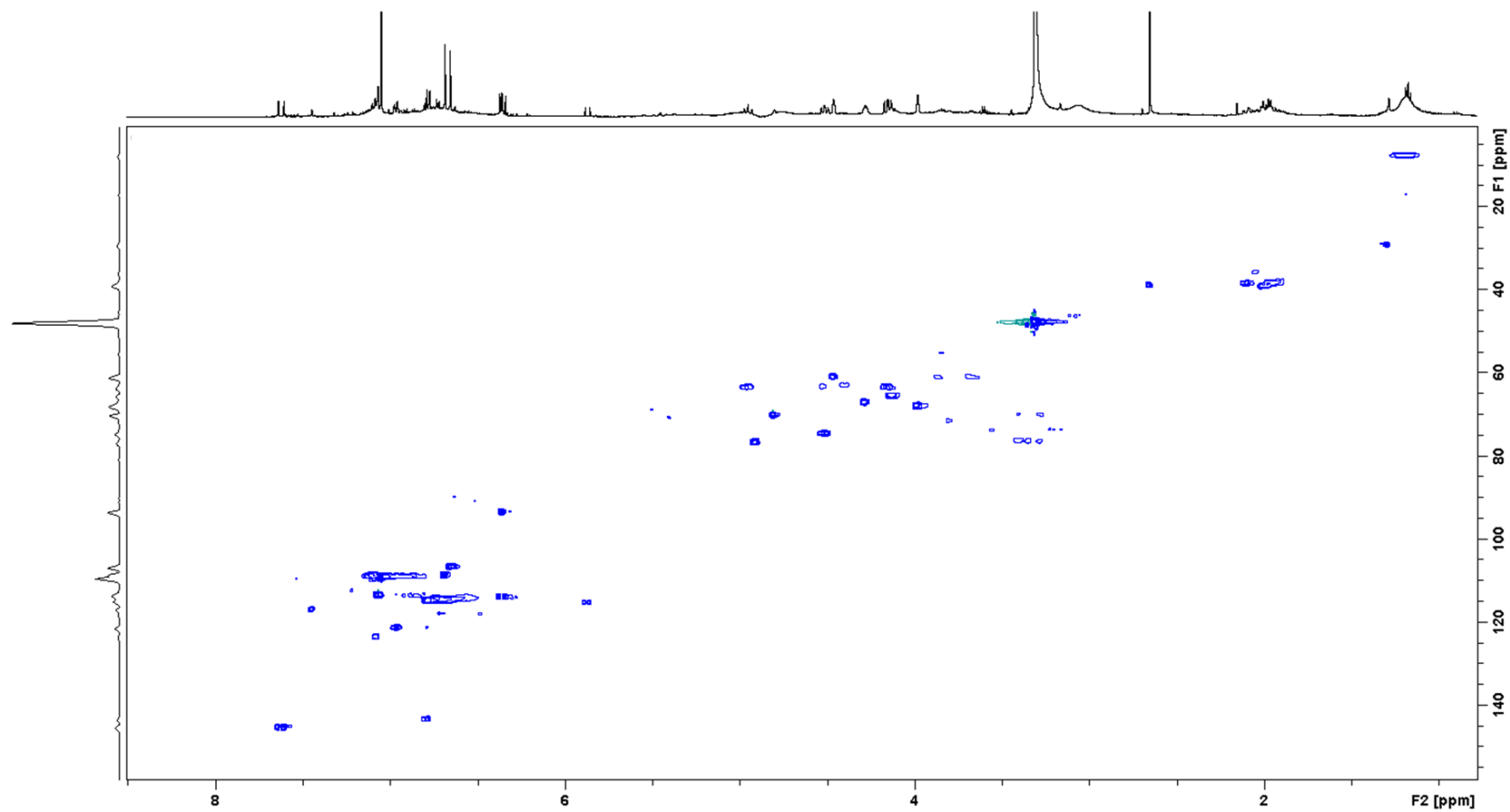


Figure S39

^1H - ^{13}H HMBC das substâncias 4-O-cafeoilquinico (**9**) e corilagina (**10**) (11,74 T, CD_3OD)

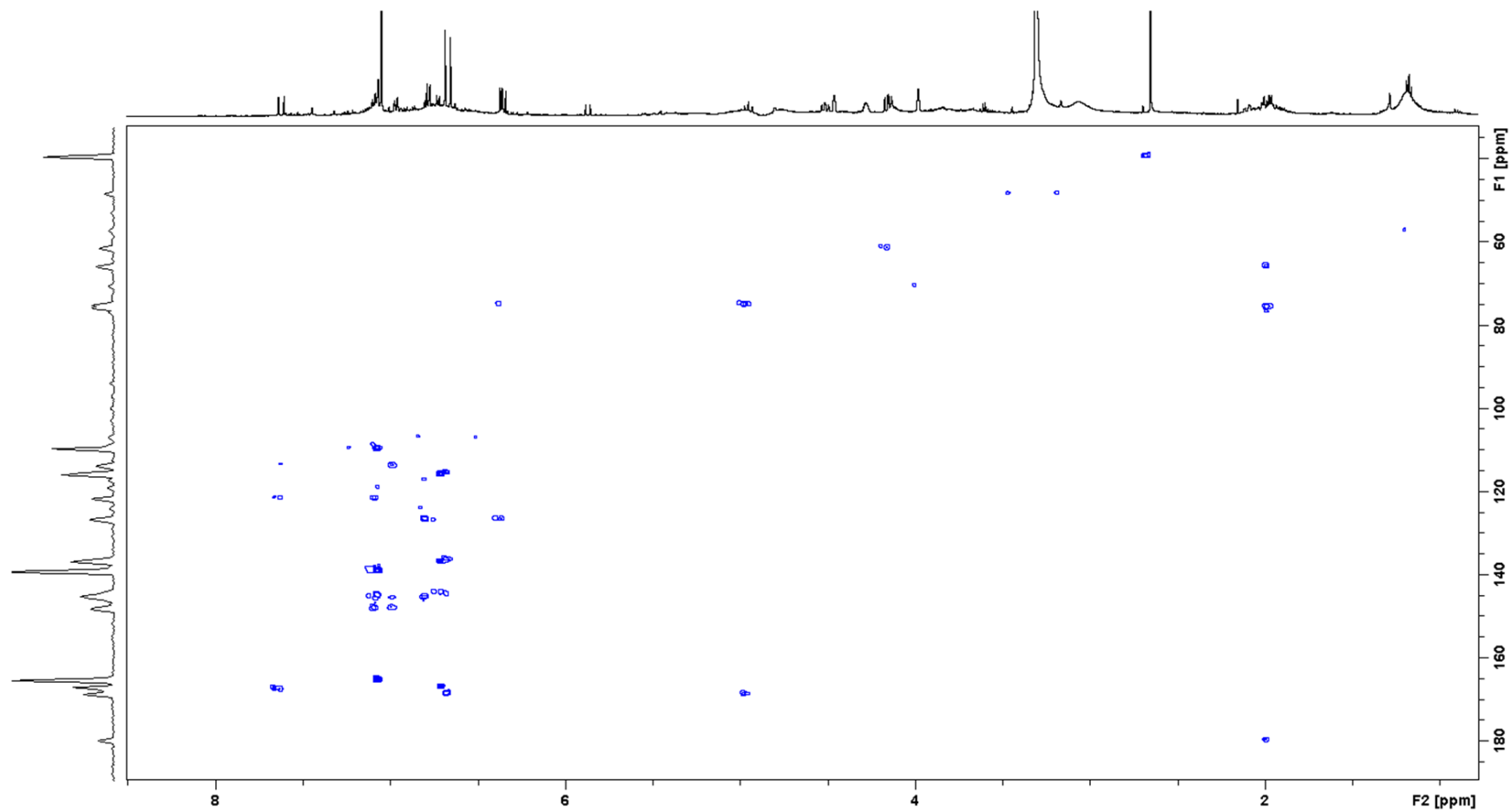


Figura S40

Espectro de RMN de ^1H com assinalamento dos sinais da substância ácido quebulágico (**13**) (500 MHz, CD_3OD)

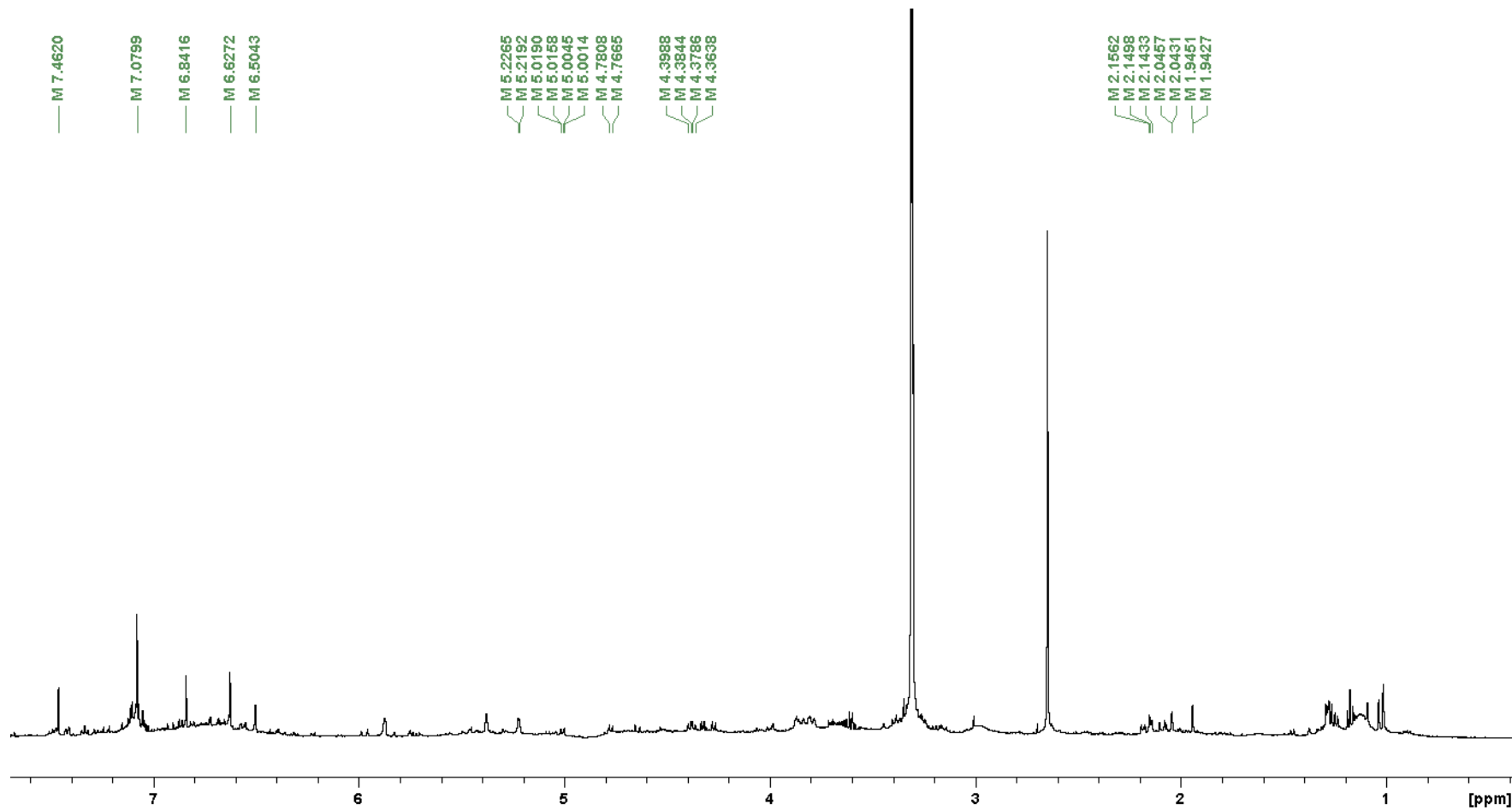


Figura S41

^1H - ^{13}H HSQC da substância ácido quebulágico (**13**) (11,74 T, CD_3OD)

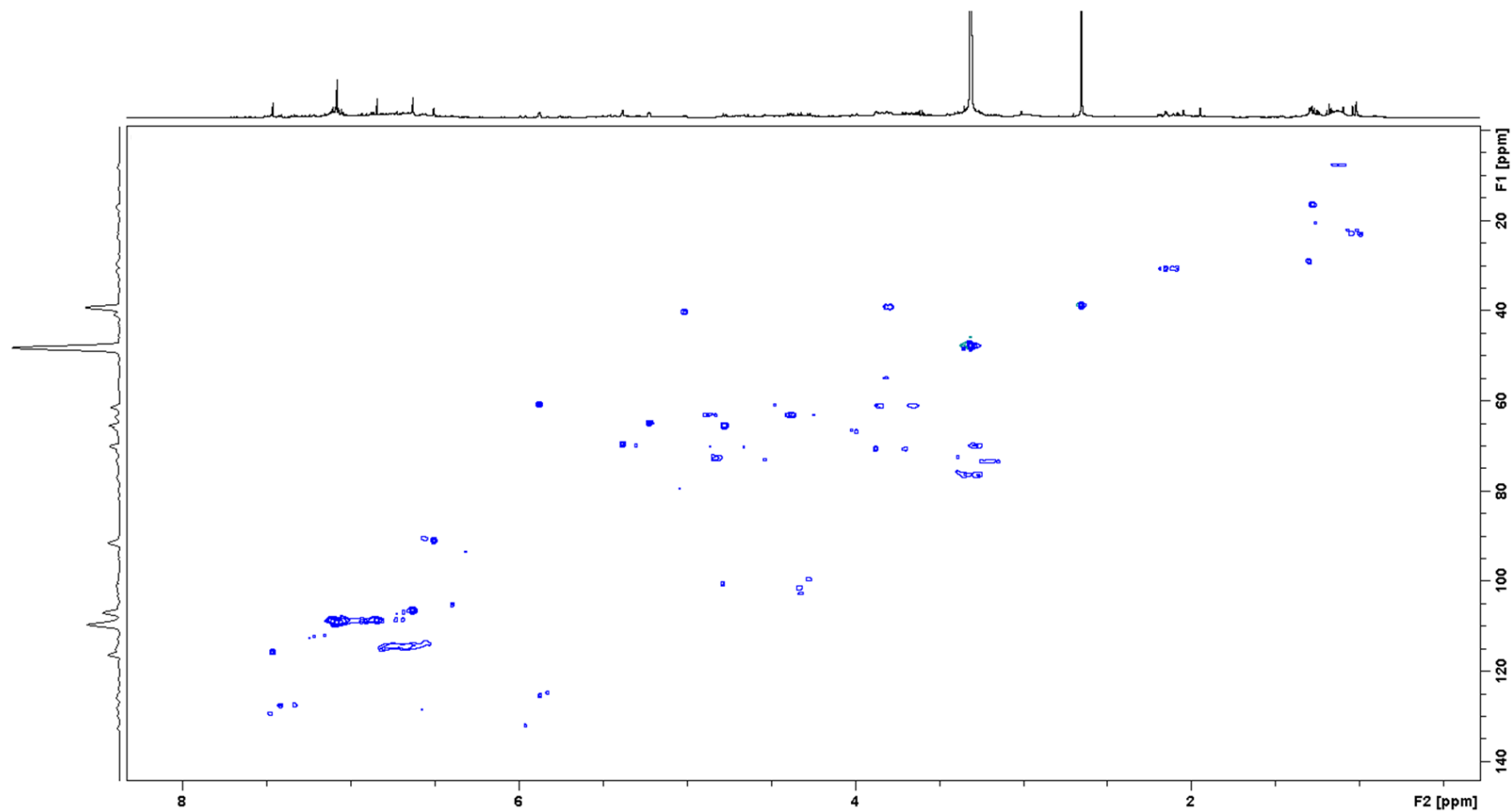


Figura S42

^1H - ^{13}H HMBC da substância ácido quebulágico (**13**) (11,74 T, CD_3OD)

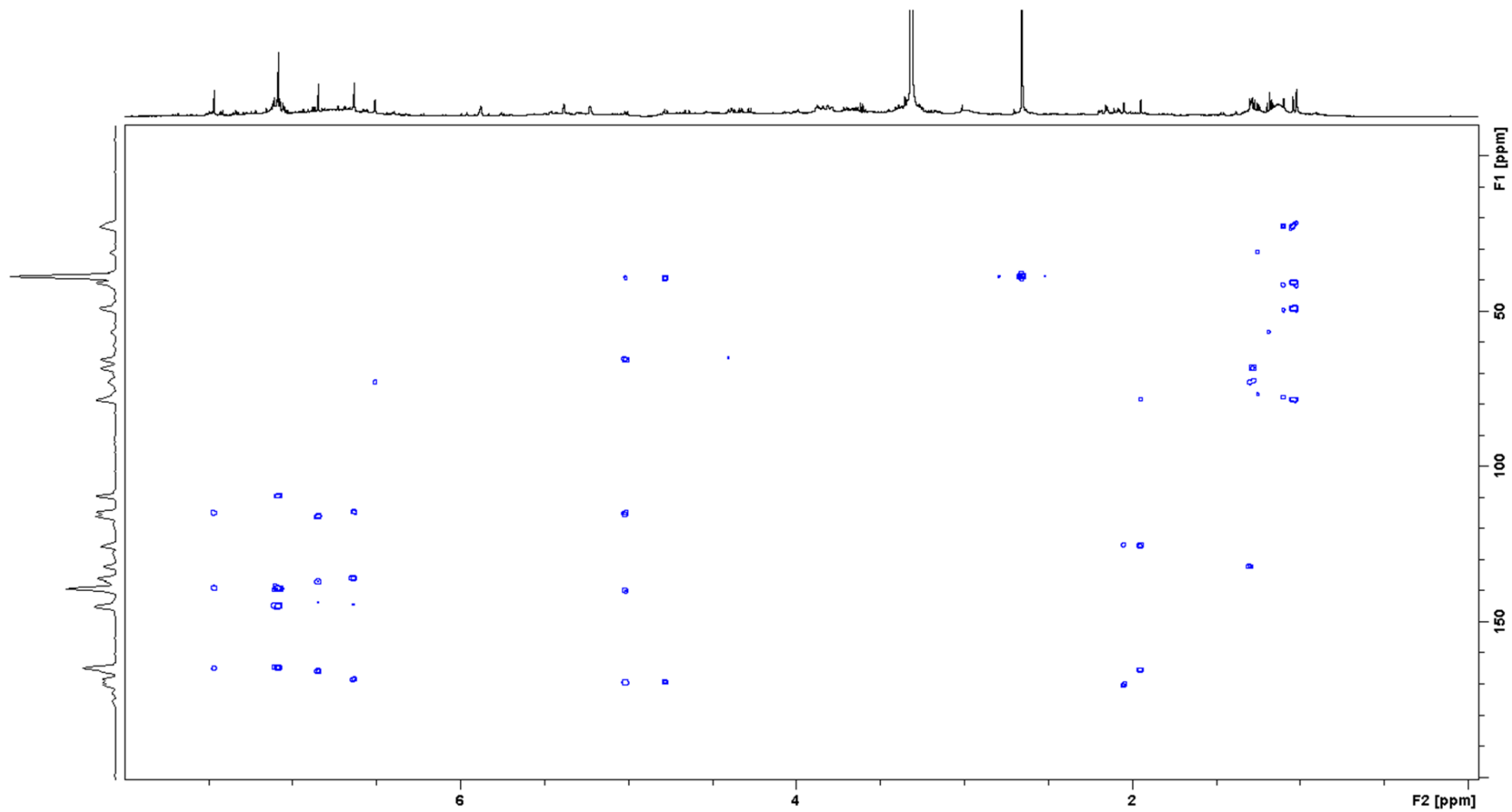


Figura S43

Espectro de RMN de ^1H com assinalamento dos sinais da substância miricetina-3-O-D-glucosídeo (**16**) (500 MHz, CD_3OD)

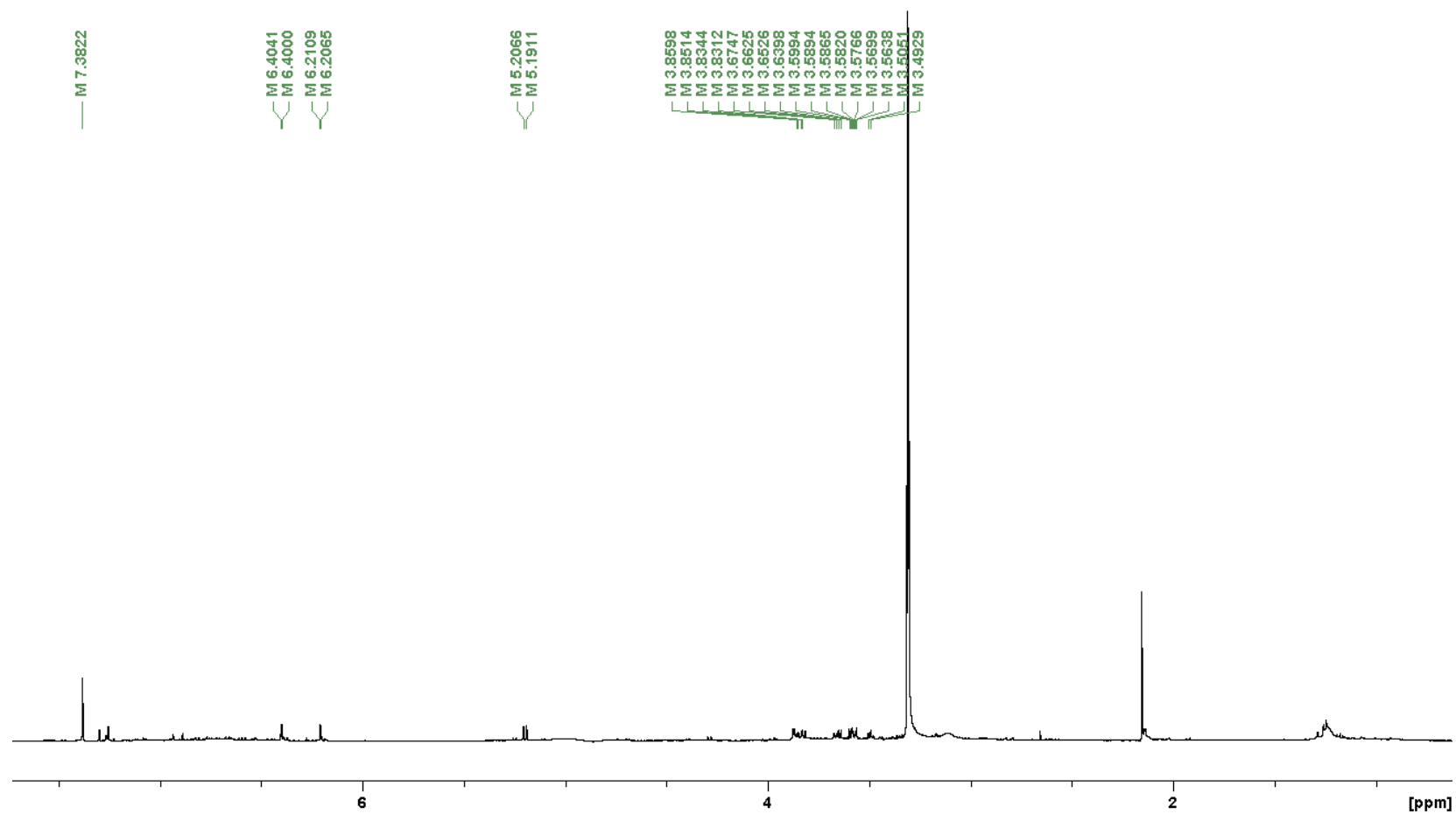


Figura S44

^1H - ^{13}H HSQC da substância miricetina-3-O-D-glucosídeo (**16**) (11,74 T, CD_3OD)

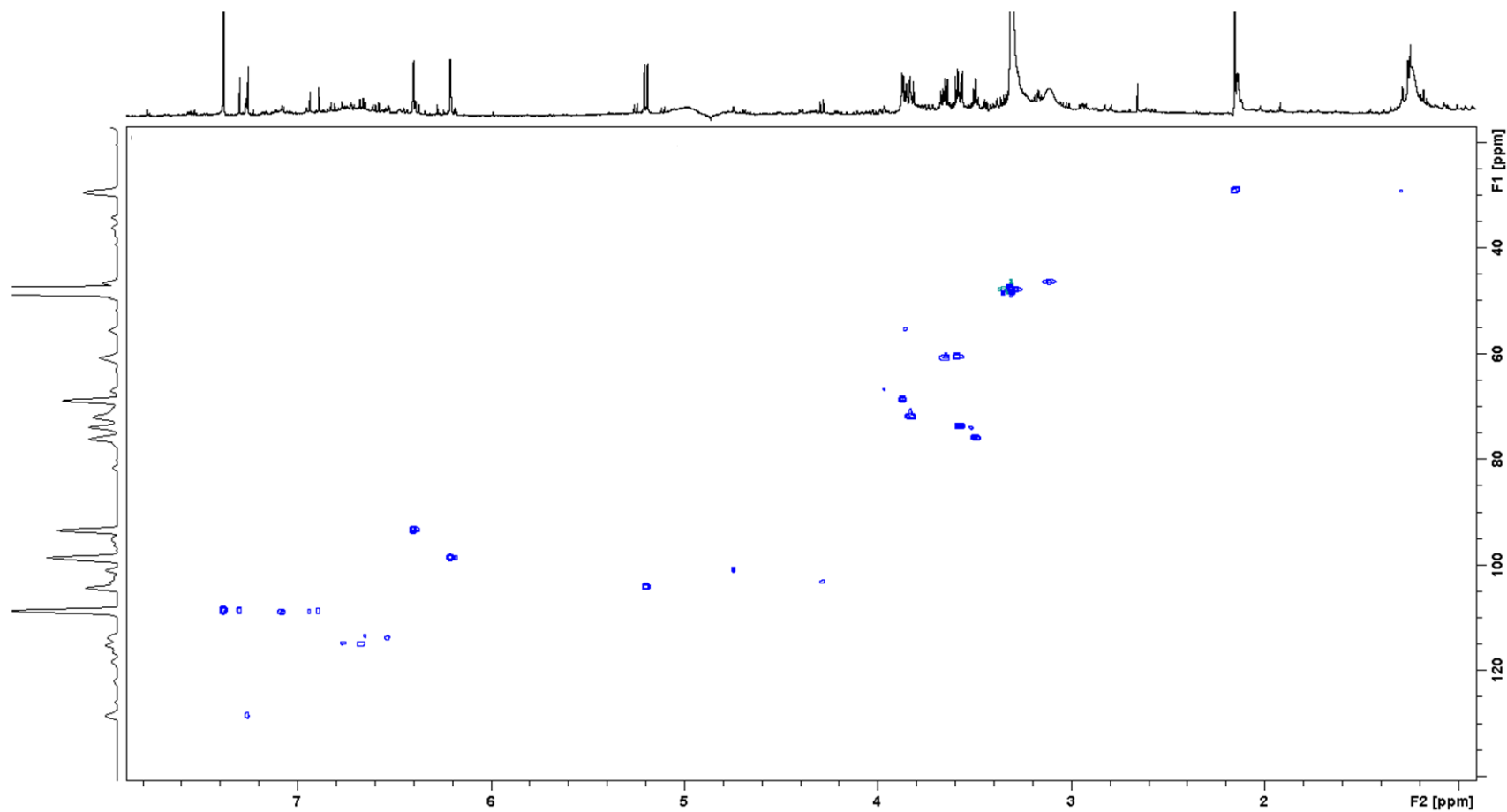


Figura S45

^1H - ^{13}H HMBC da substância miricetina-3-O-D-glucosídeo (**16**) (11,74 T, CD_3OD)

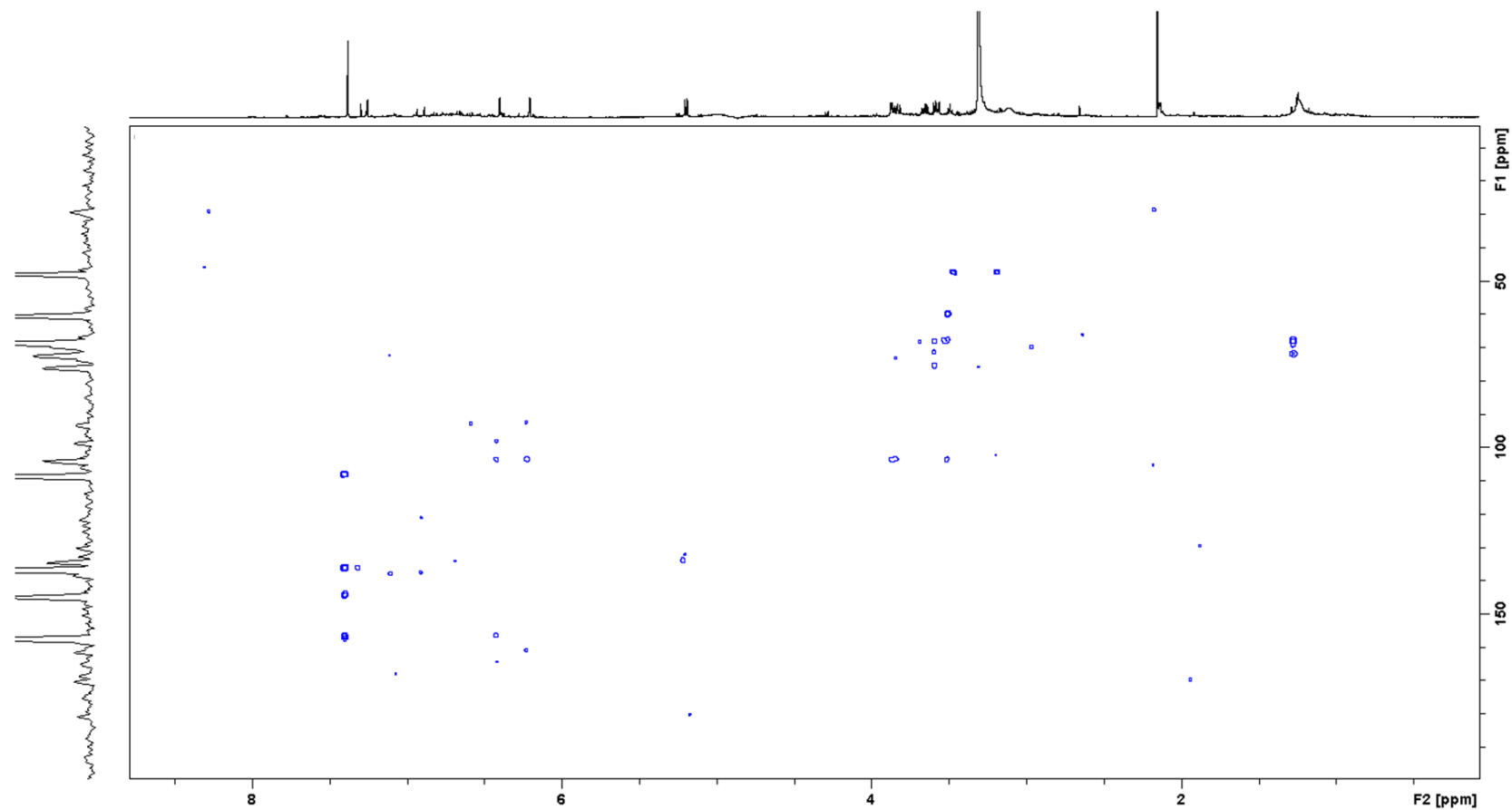


Figura S46

Espectro de RMN de ^1H com assinalamento dos sinais da substância quercetina-3-O- β -2"-galoilglucosídeo (**17**) (500 MHz, CD_3OD)

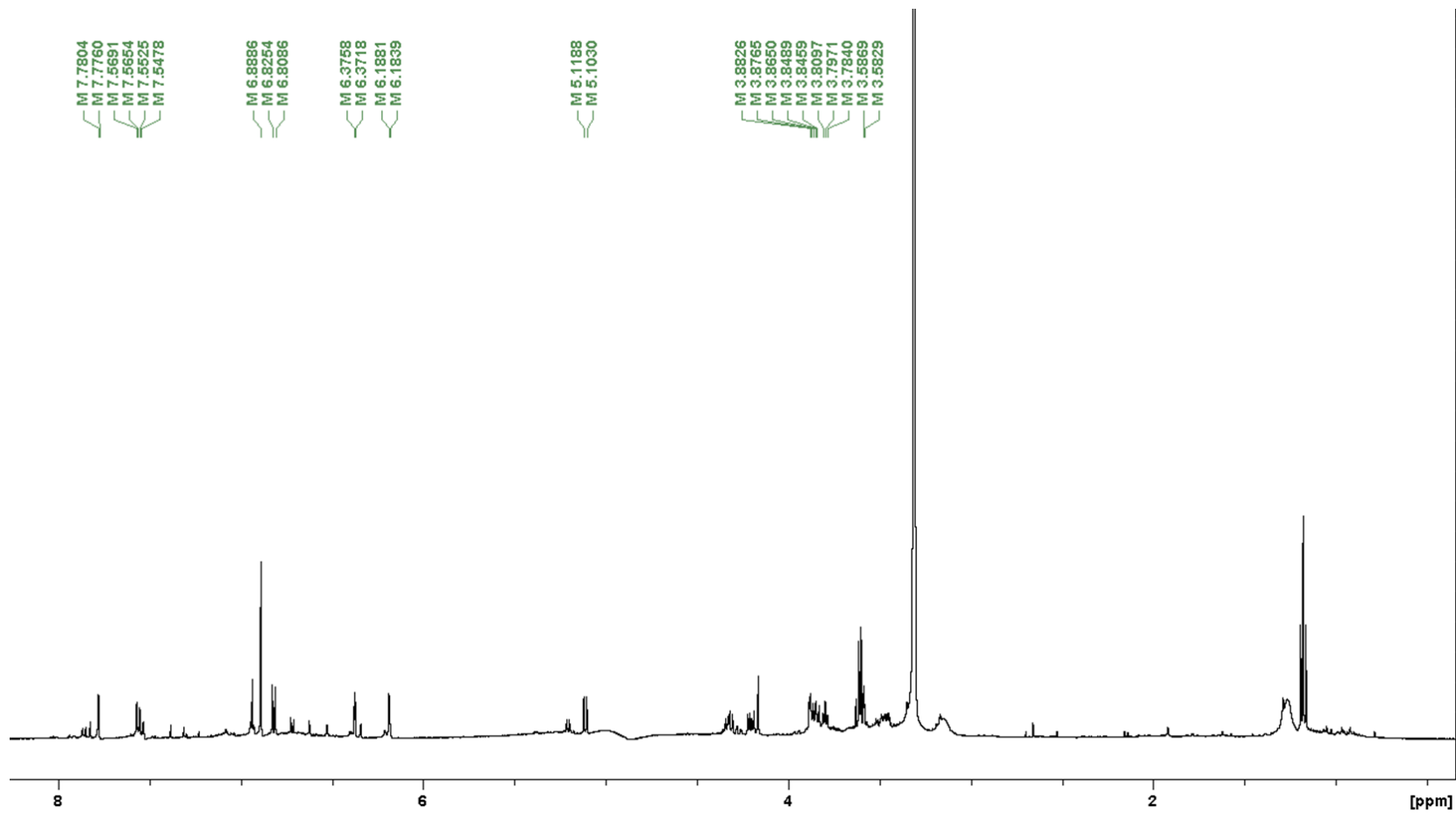


Figura S47

^1H - ^{13}H HSQC da substância quercetina-3-O- β -2''-galoilglucosídeo (**17**) (11,74 T, CD_3OD)

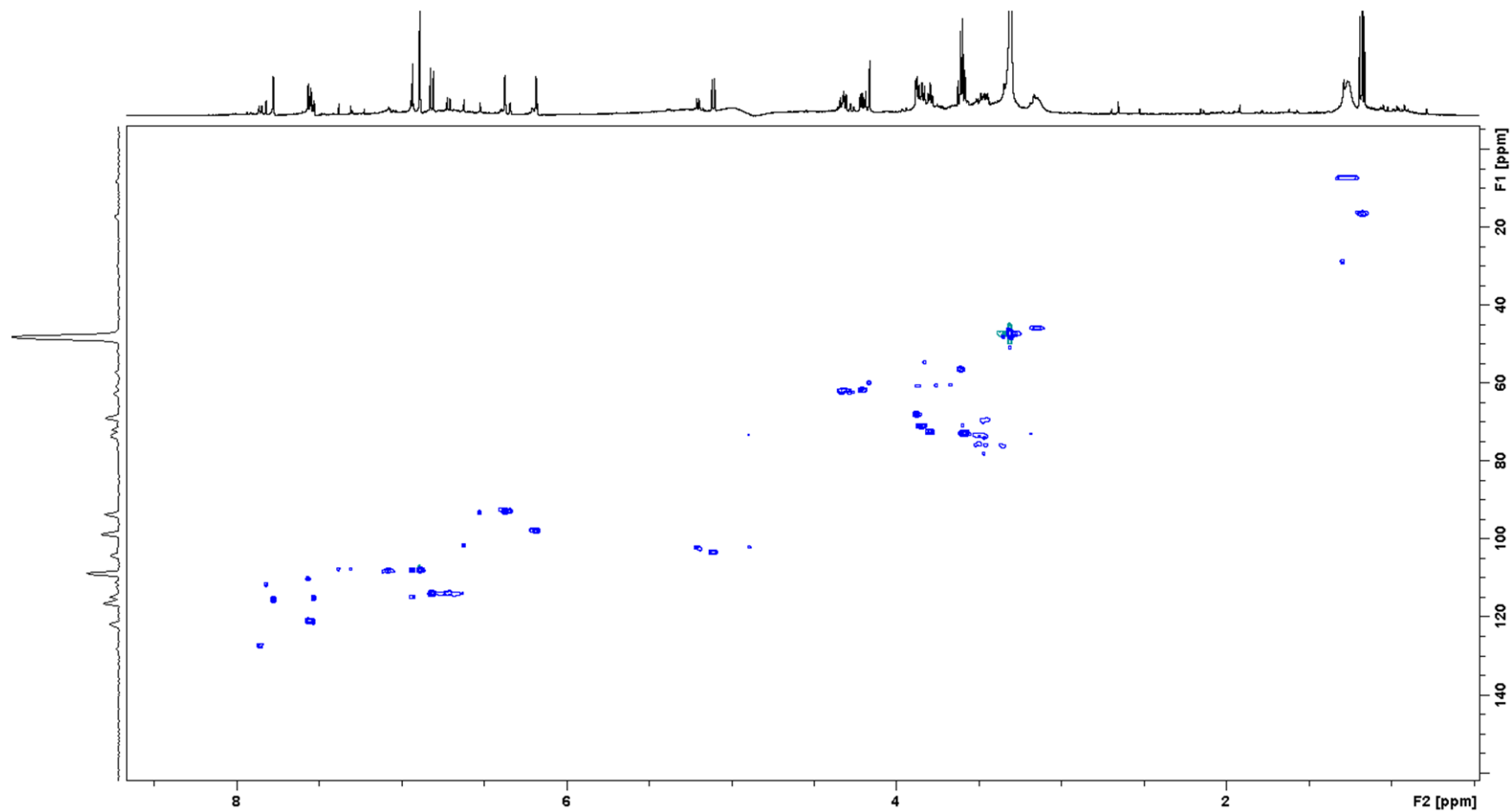


Figura S48

^1H - ^{13}H HMBC da substância quercetina-3-O- β -2''-galoilglucosídeo (**17**) (11.74 T, CD_3OD)

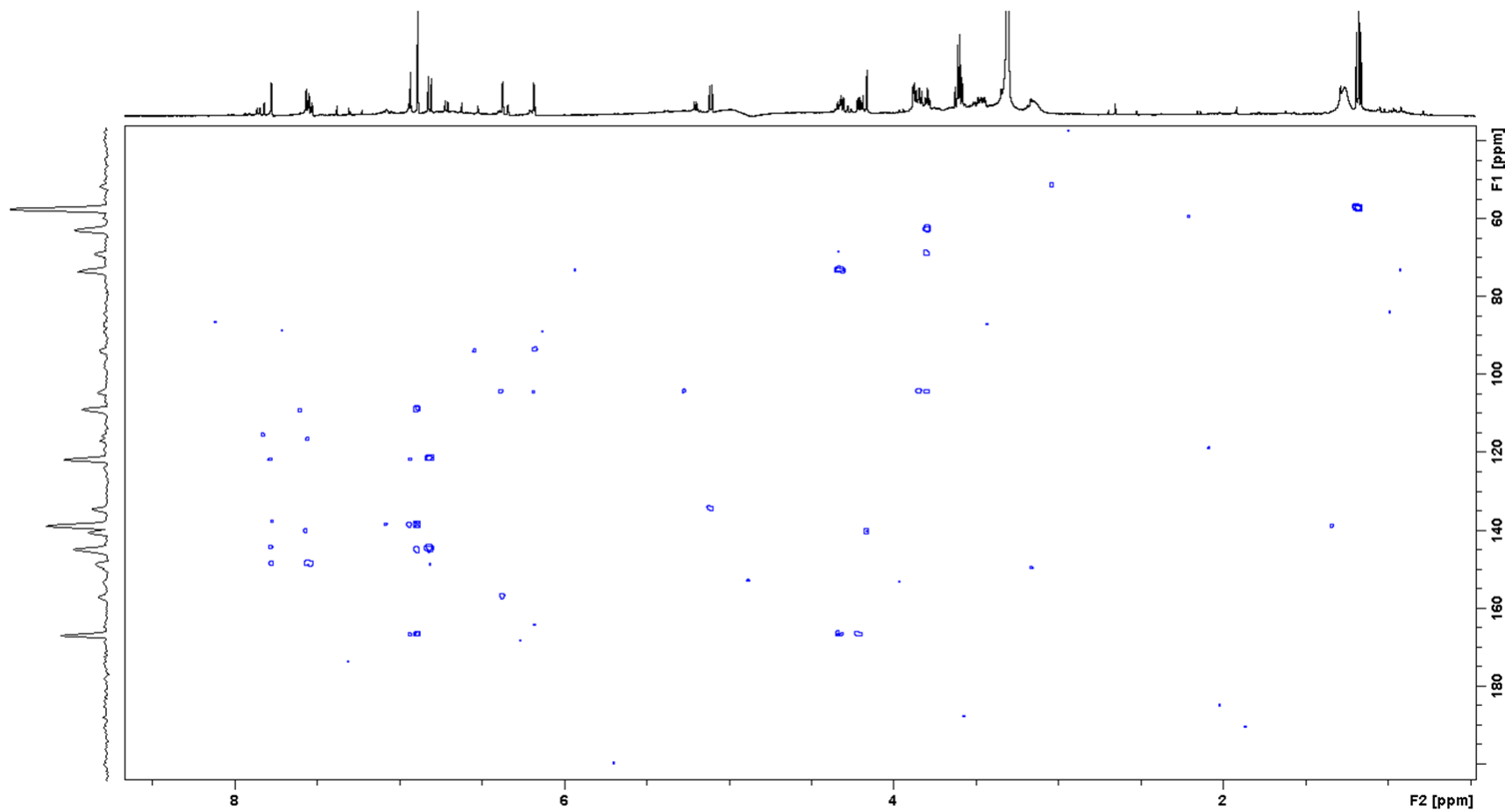


Figura S49

Espectro de RMN de ^1H com assinalamento dos sinais da substância miricitrina (**19**) (500 MHz, CD_3OD)

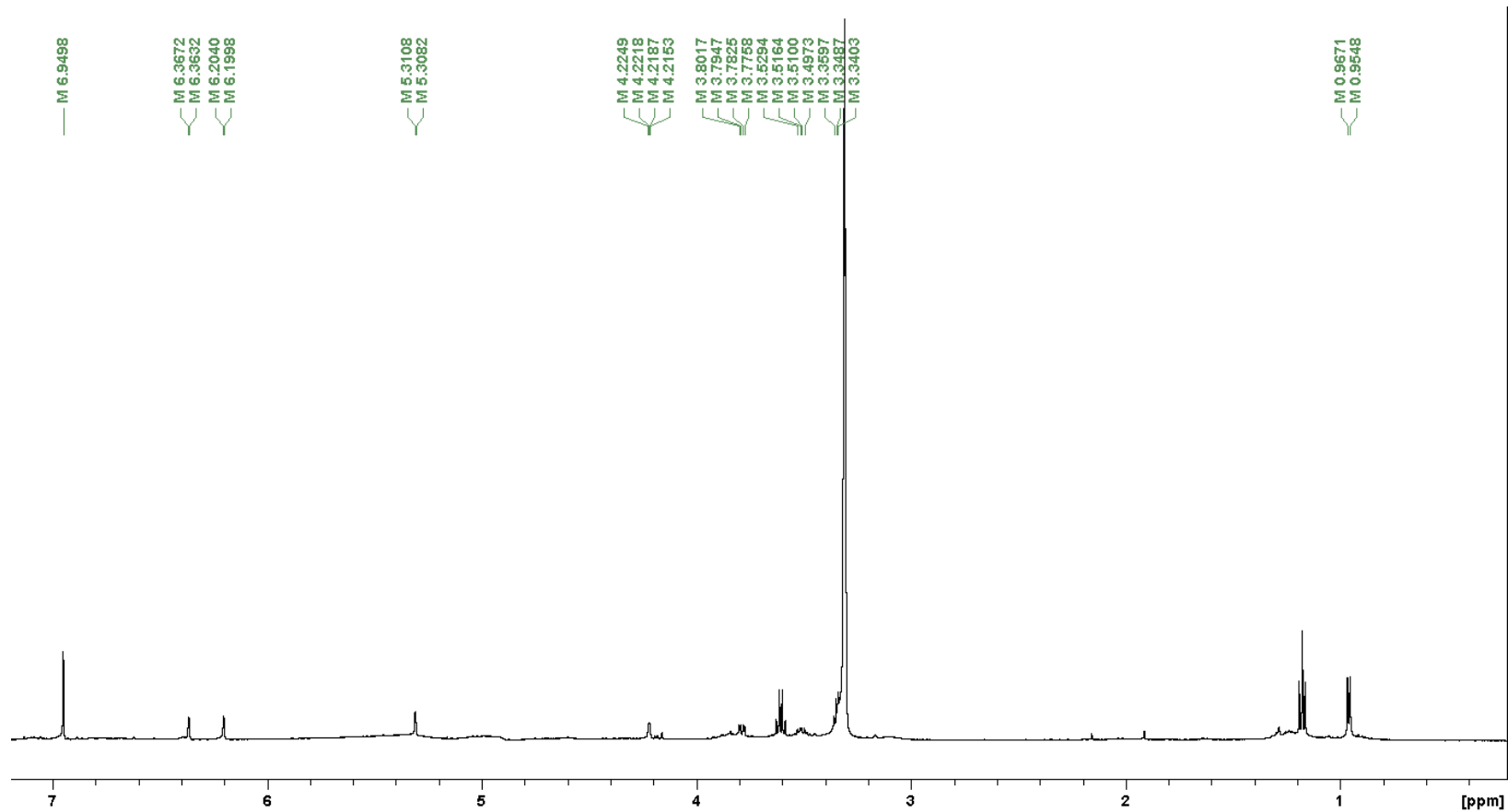


Figura S50

^1H - ^{13}H HSQC da substância miricitrina (**19**) (11,74 T, CD_3OD)

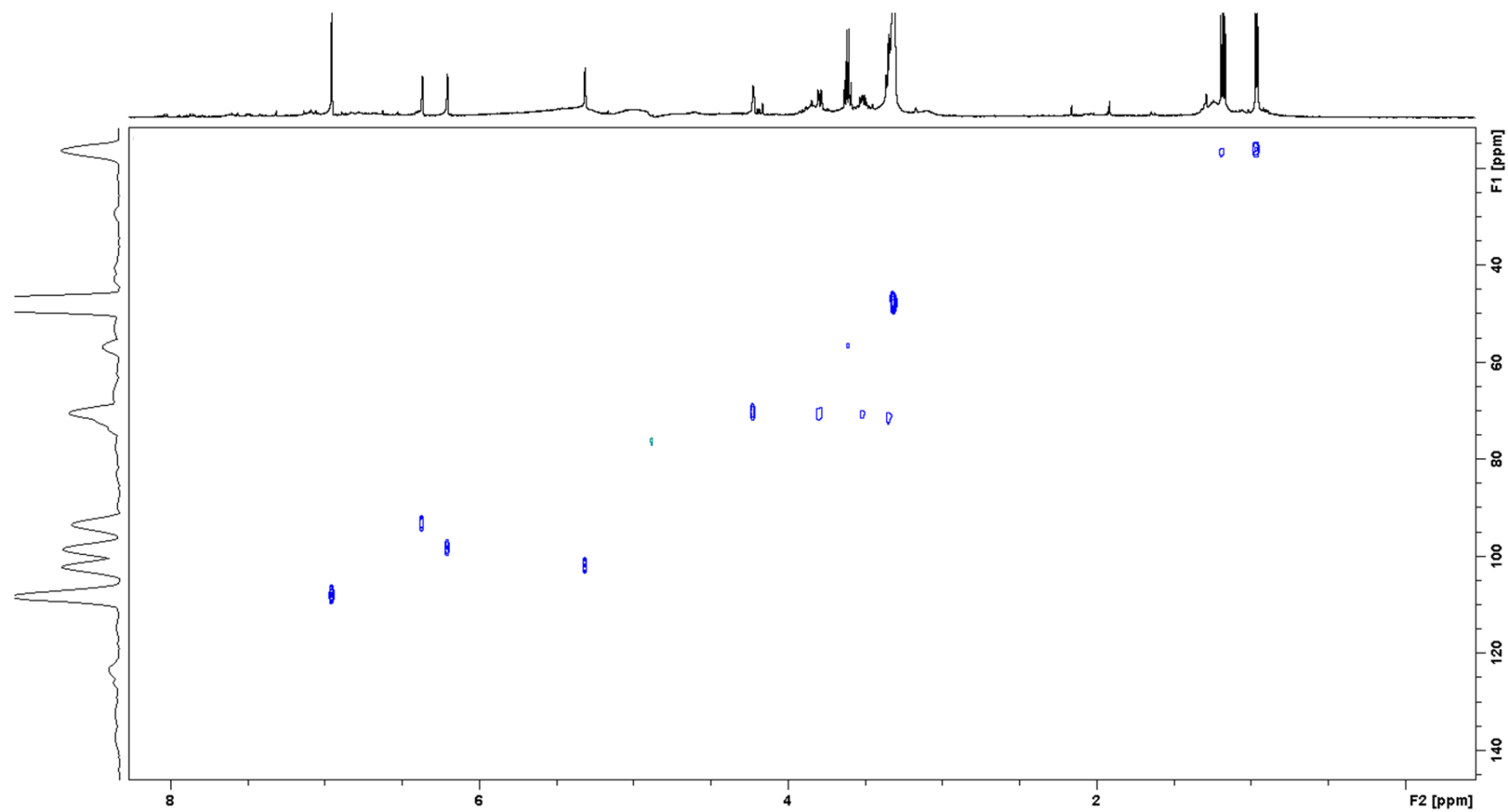


Figura S51

^1H - ^{13}H HMBC da substância miricitrina (**19**) (11,74 T, CD_3OD)

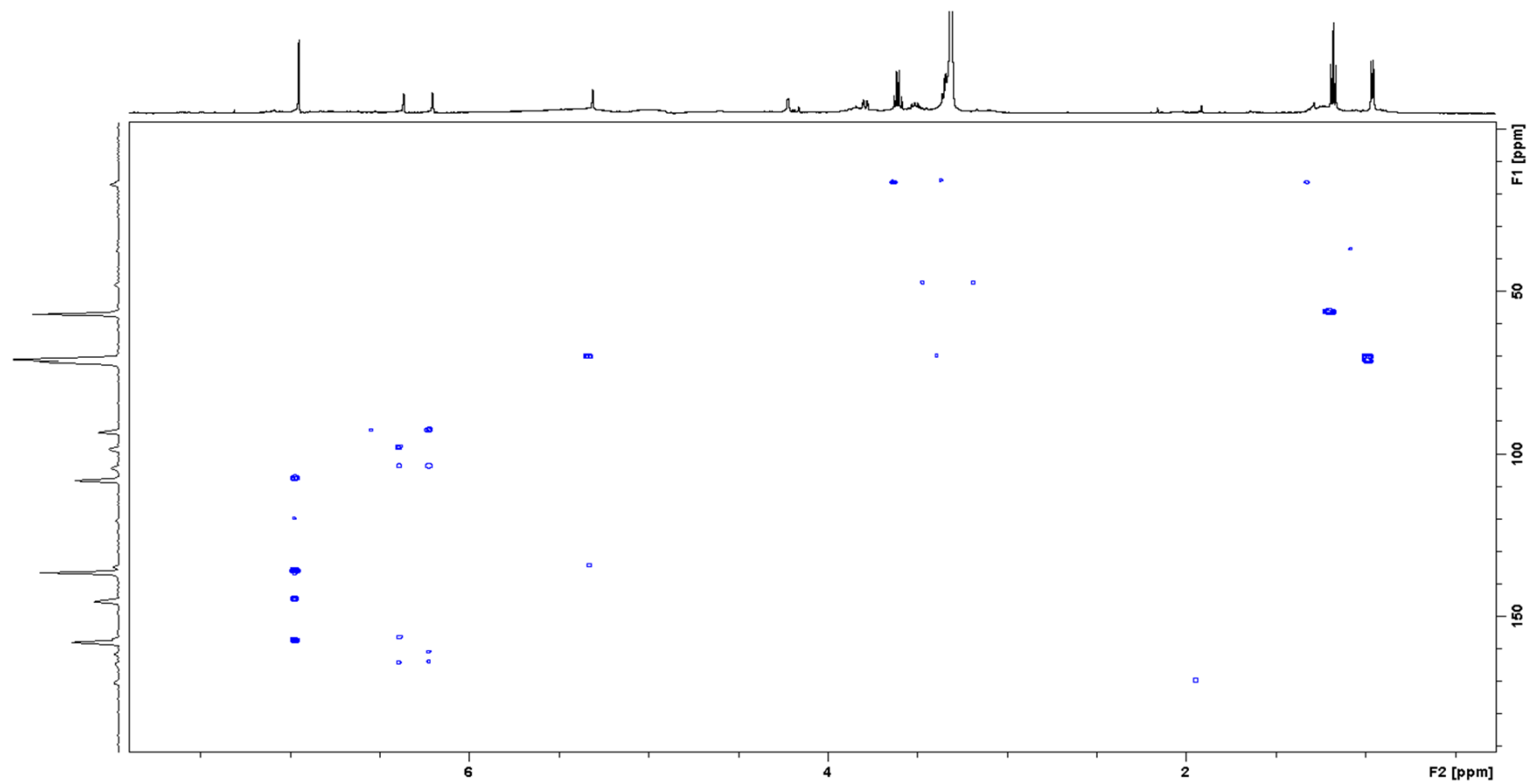


Figura S52

Espectro de RMN de ^1H com assinalamento dos sinais das substâncias hiperosídeo (**20**) e guajaverina (**21**) (500 MHz, CD_3OD)

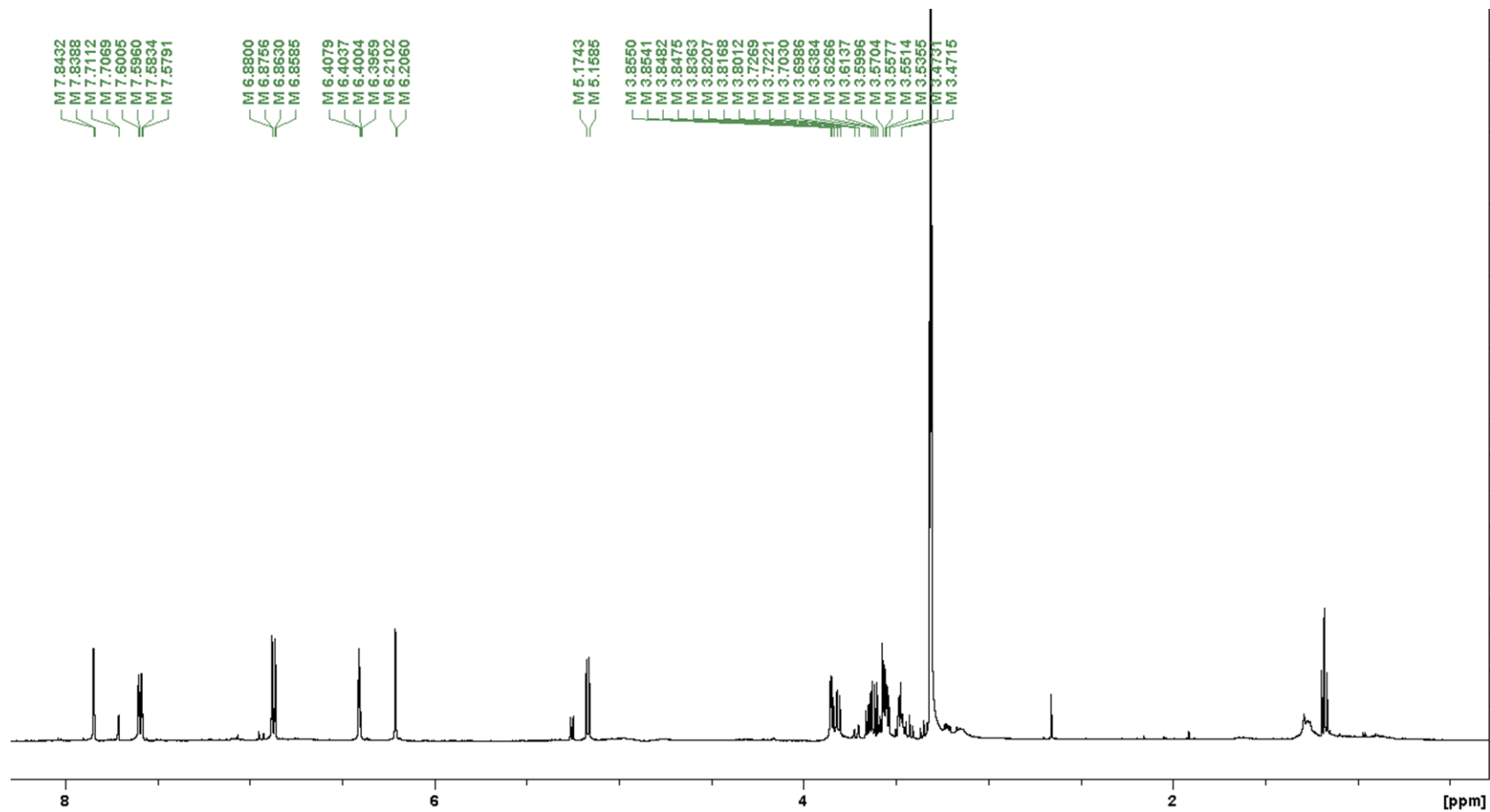


Figura S53

^1H - ^{13}H HSQC das substâncias hiperosídeo (**20**) e guajaverina (**21**) (11,74 T, CD_3OD)

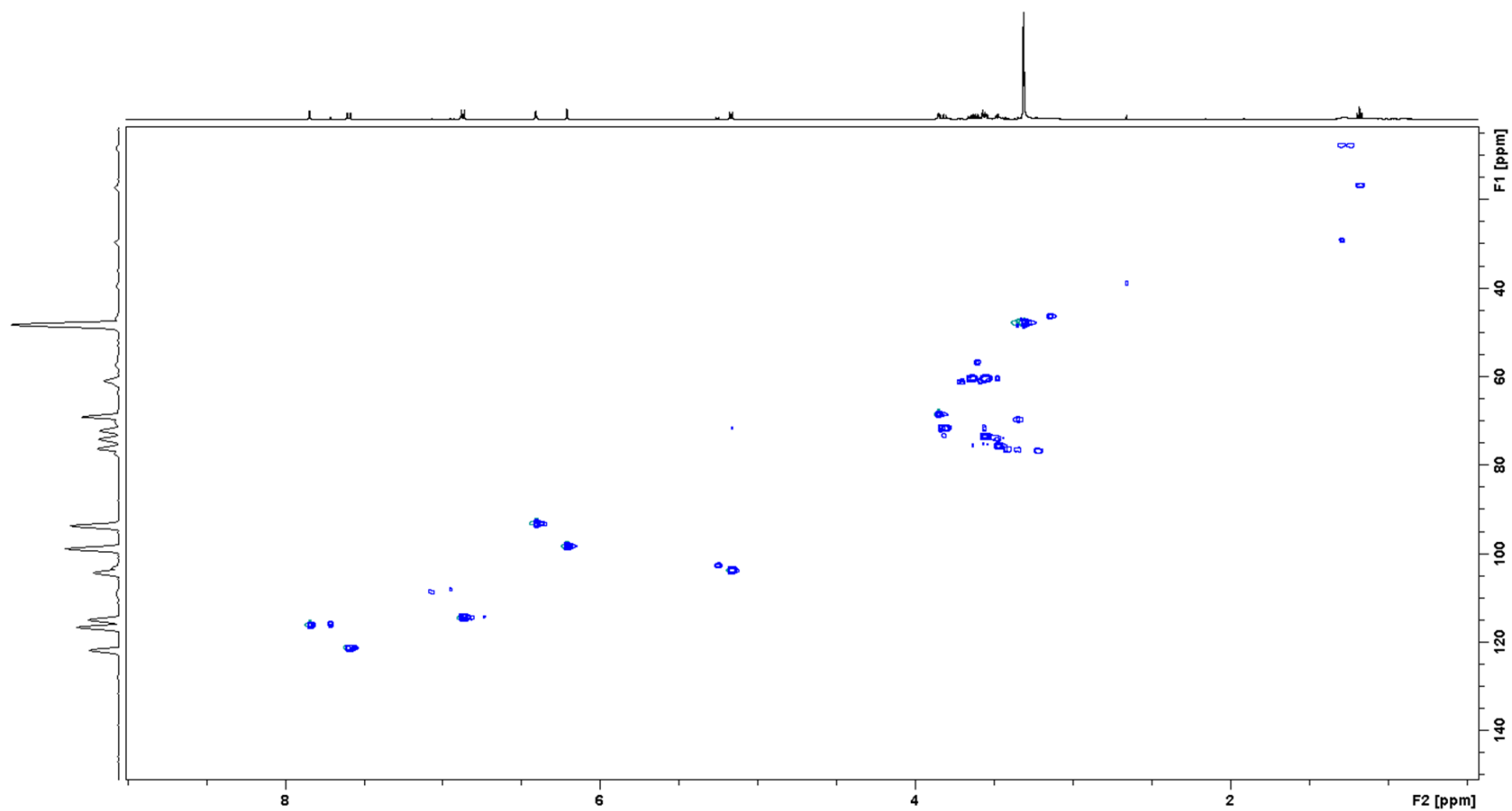


Figura S54

^1H - ^{13}H HMBC das substâncias hiperosídeo (**20**) e guajaverina (**21**) (11,74 T, CD_3OD)

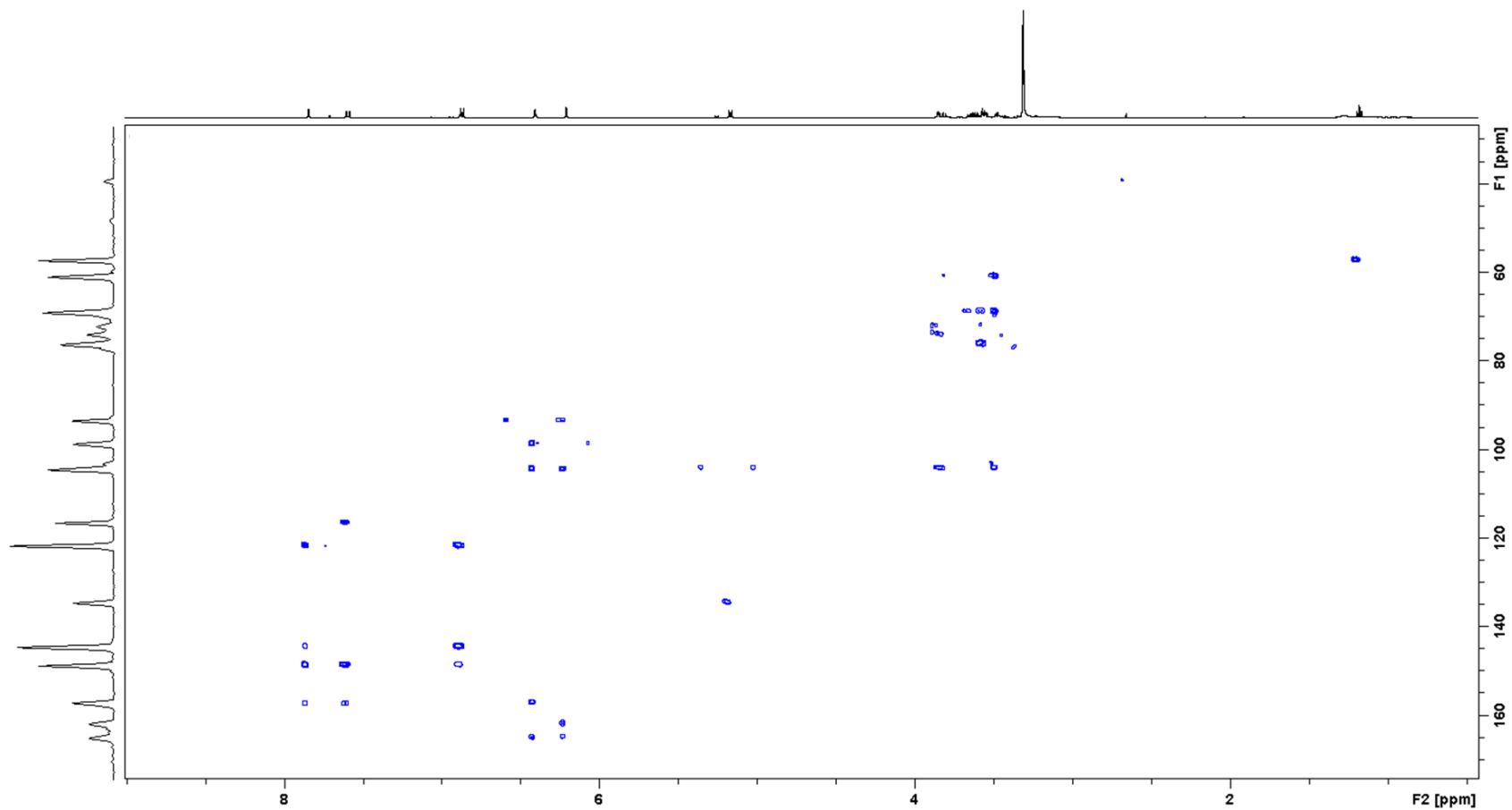


Figura S55

Espectro de RMN de ^1H com assinalamento dos sinais da substância guajaverina (**21**) (em mistura) (500 MHz, CD_3OD).

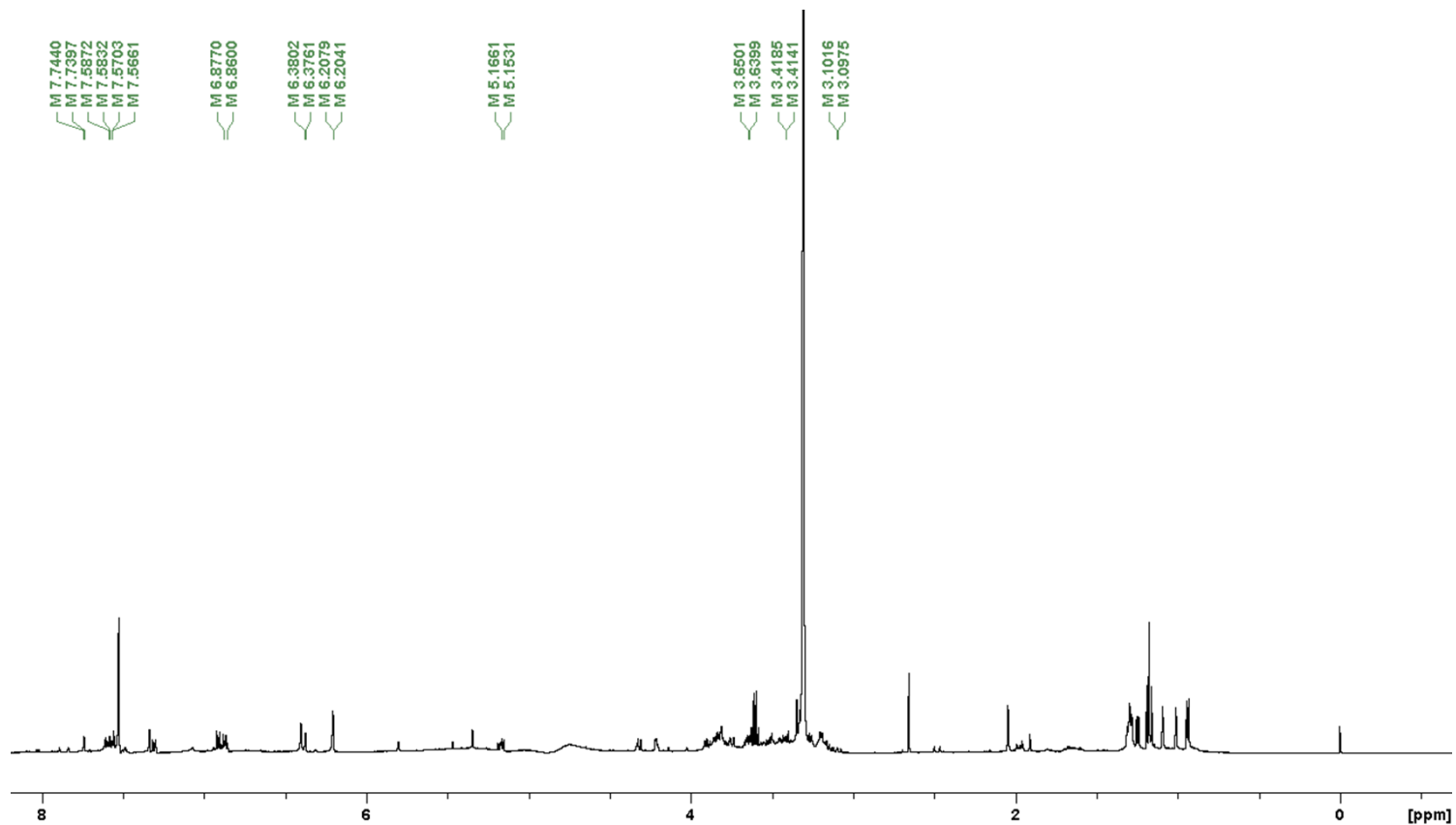


Figura S56

^1H - ^{13}H HSQC da substância guajaverina (**21**) (em mistura) (11,74 T, CD_3OD)

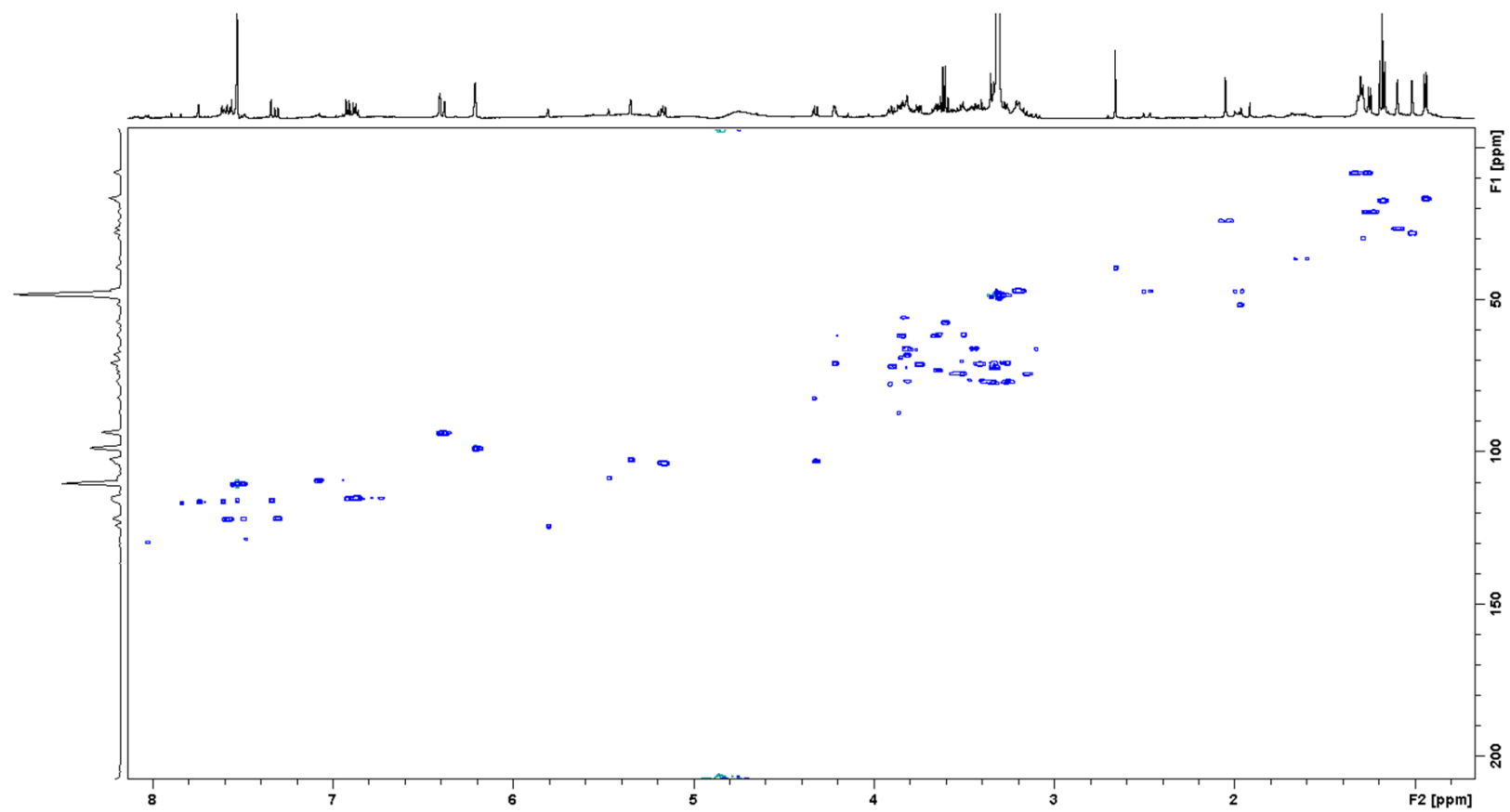


Figure S57

^1H - ^{13}H HMBC da substância guajaverina (**21**) (em mistura) (11,74 T, CD_3OD)

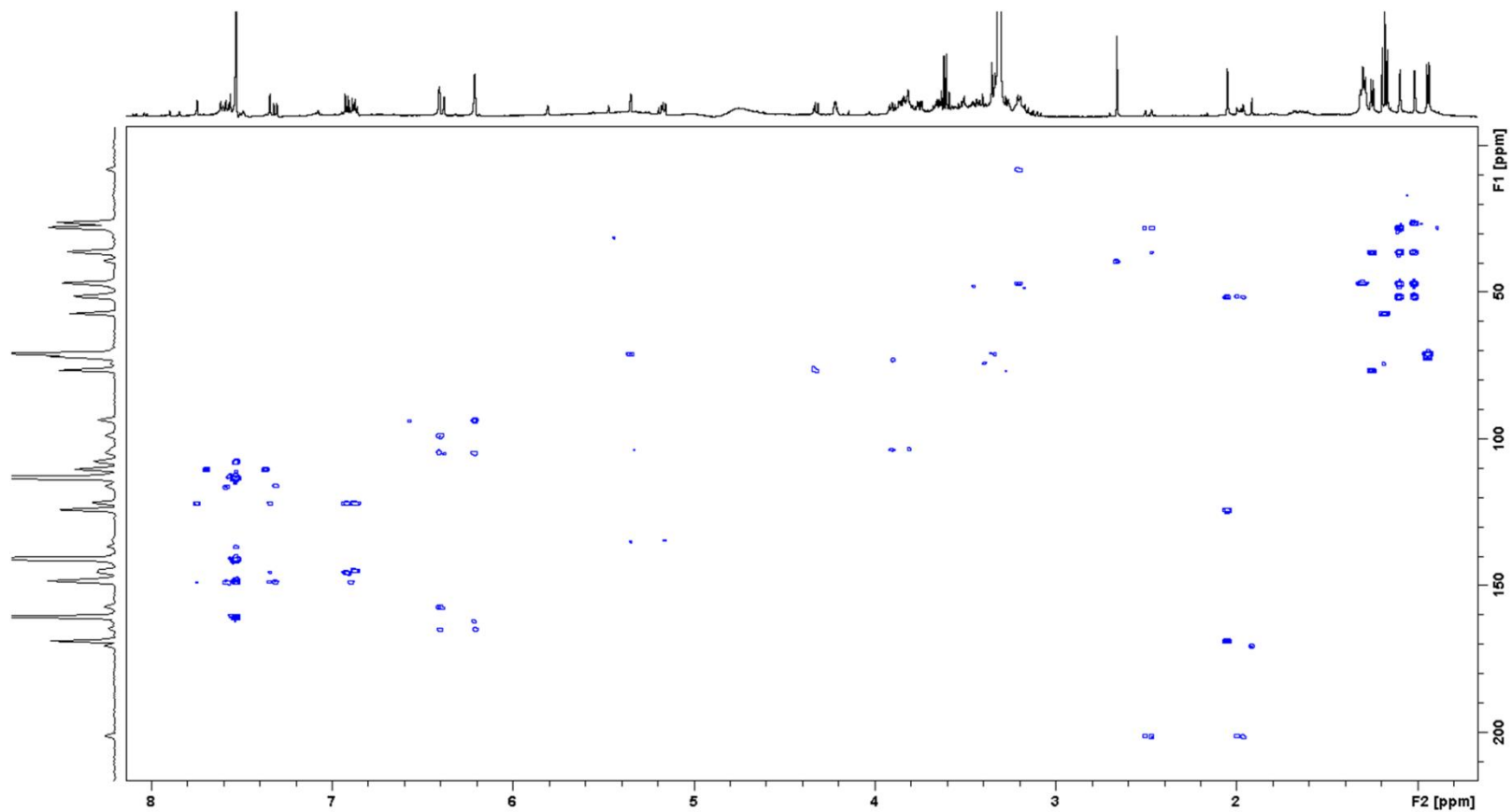


Figure S58

Espectro de RMN de ^1H com assinalamento dos sinais da substância quercitrina (**23**) (500 MHz, CD_3OD)

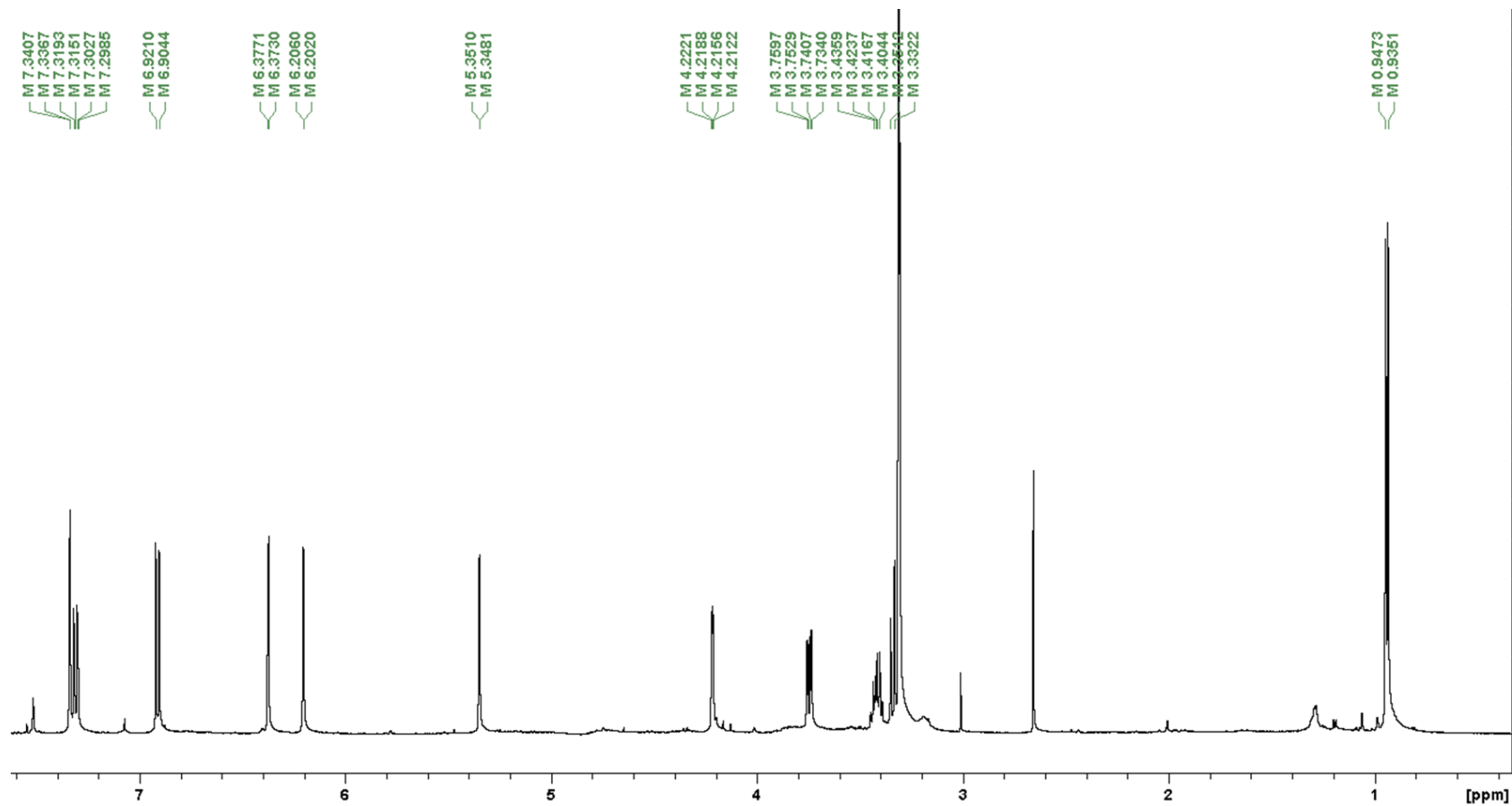


Figura S59

^1H - ^{13}H HSQC da substância quercitrina (**23**) (11,74 T, CD_3OD)

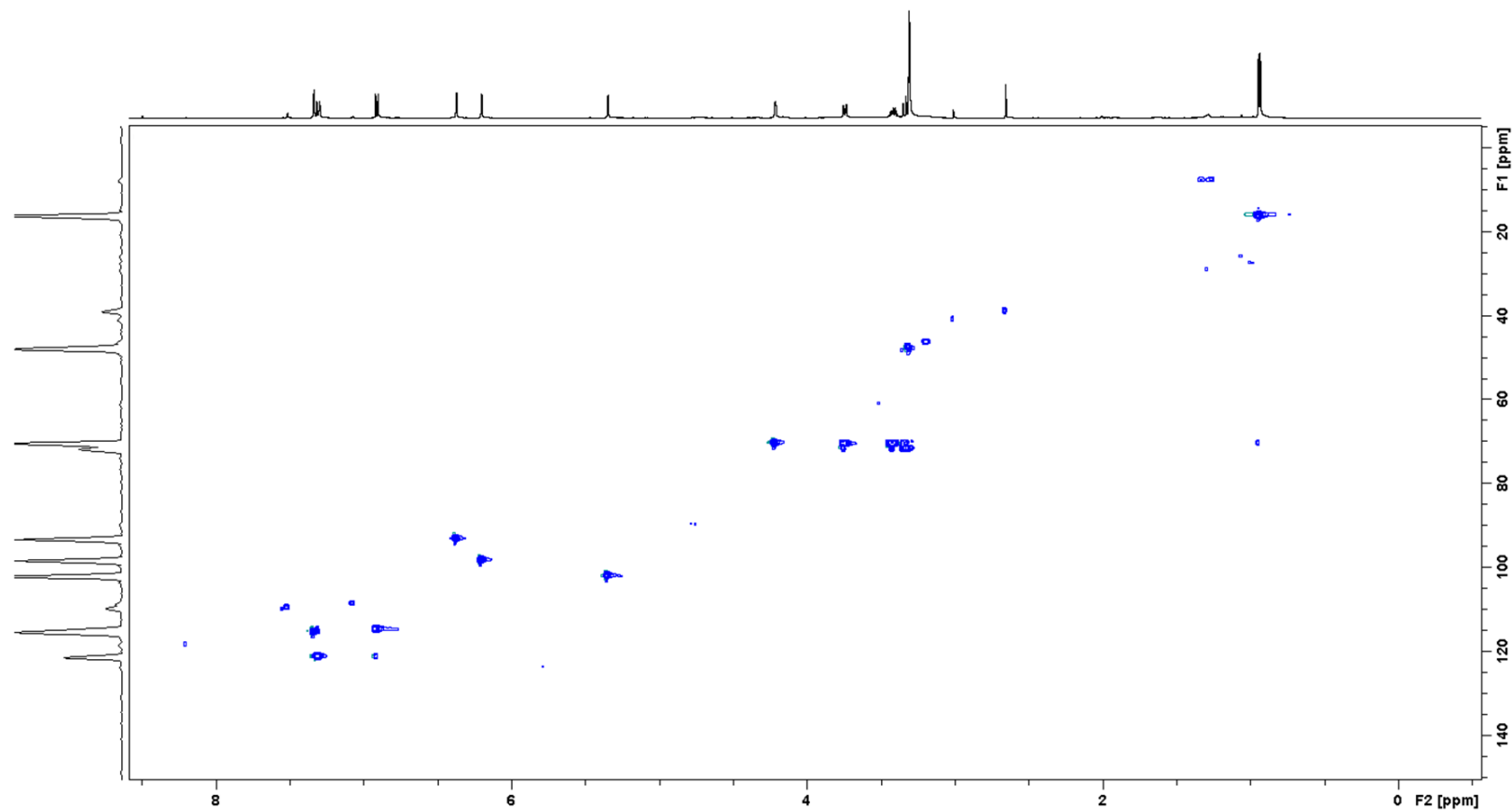


Figura S60

^1H - ^{13}H HMBC da substância quercitrina (**23**) (11,74 T, CD_3OD)

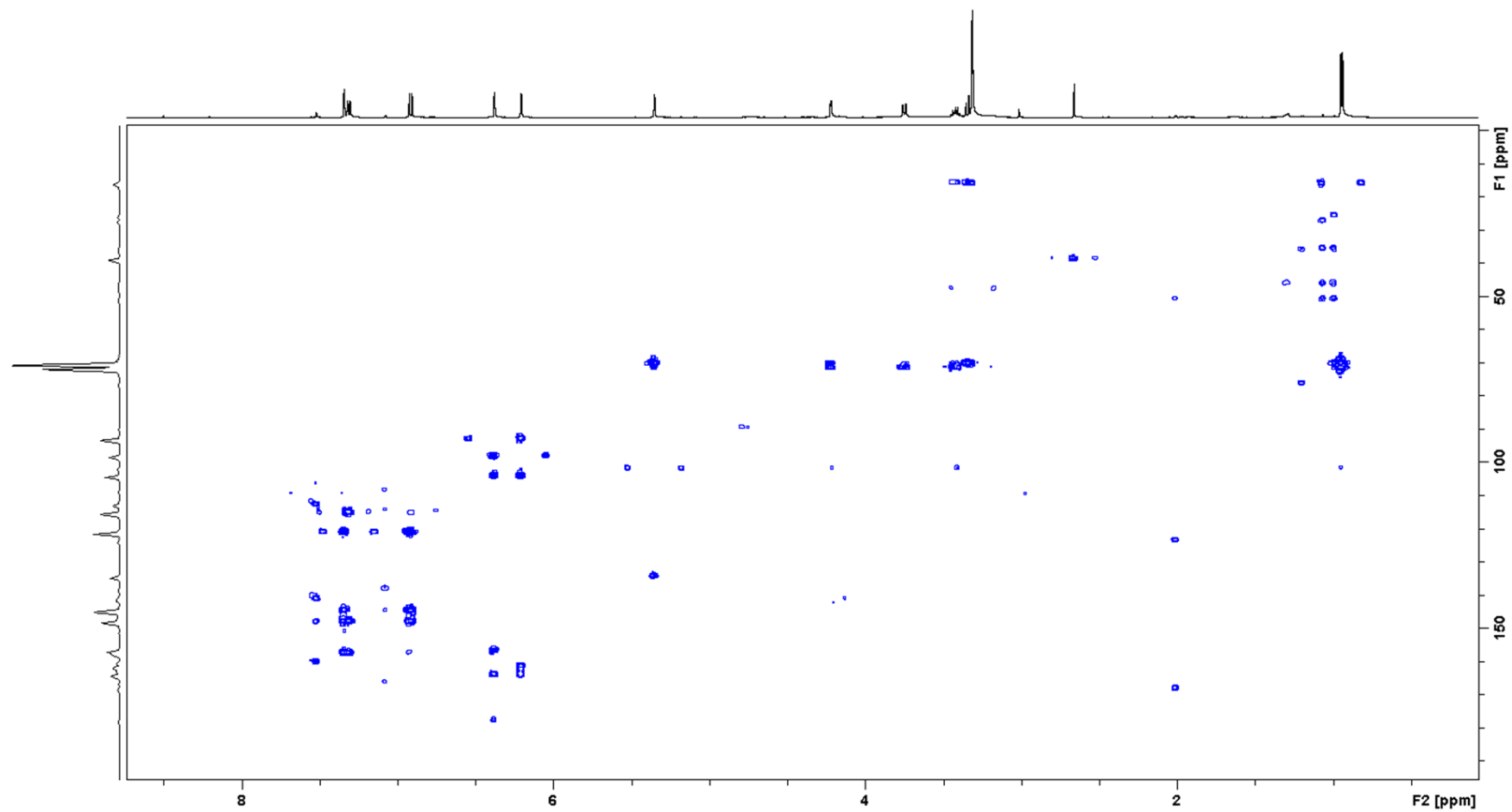


Figura S61

Espectro de RMN de ^1H com assinalamento dos sinais da substância kaempferol-3-O-ramnosídeo (**26**) (500 MHz, CD_3OD)

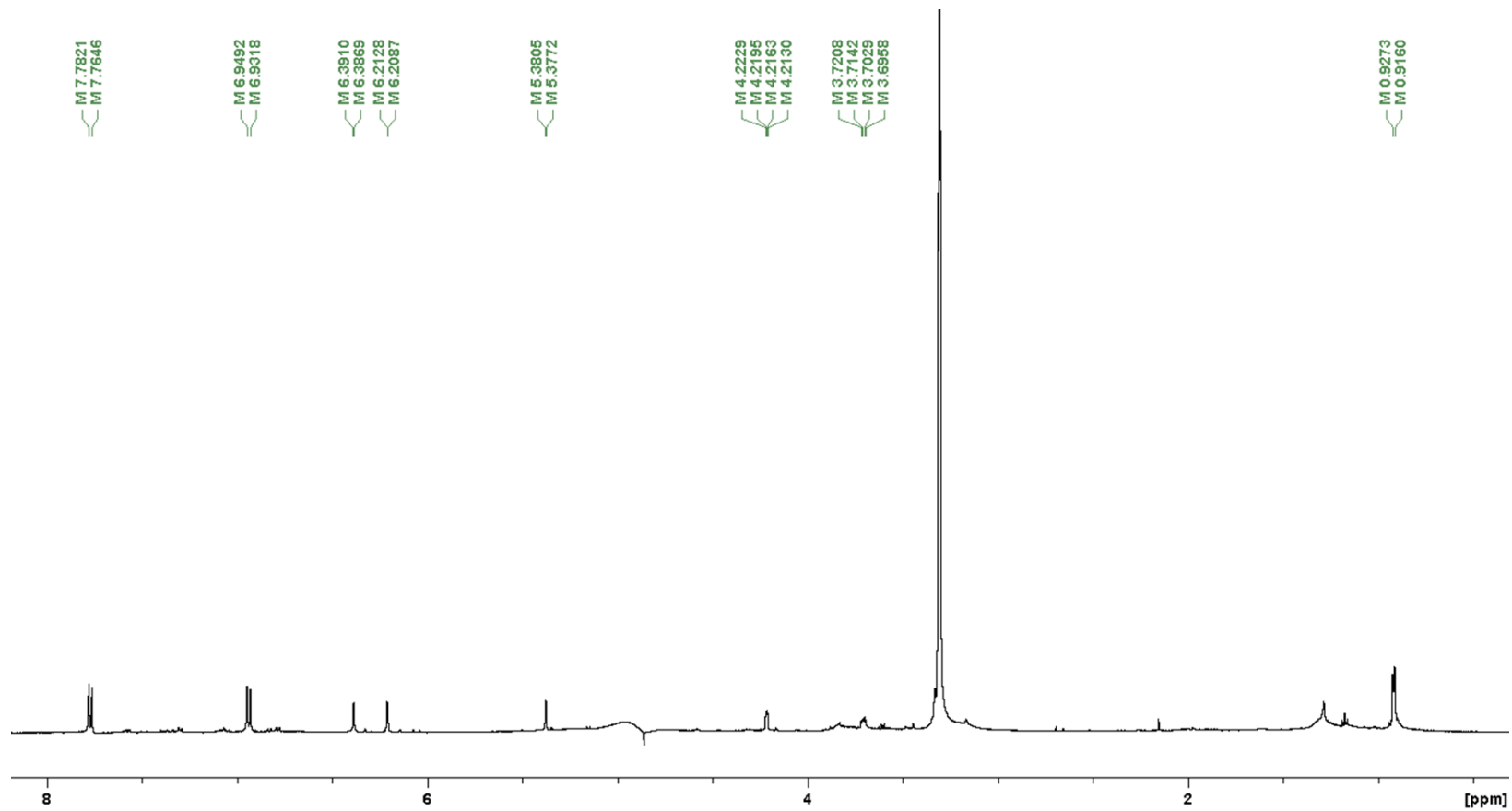


Figura S62

^1H - ^{13}H HSQC da substância kaempferol-3-O-ramnosídeo (**26**) (11,74 T, CD_3OD)

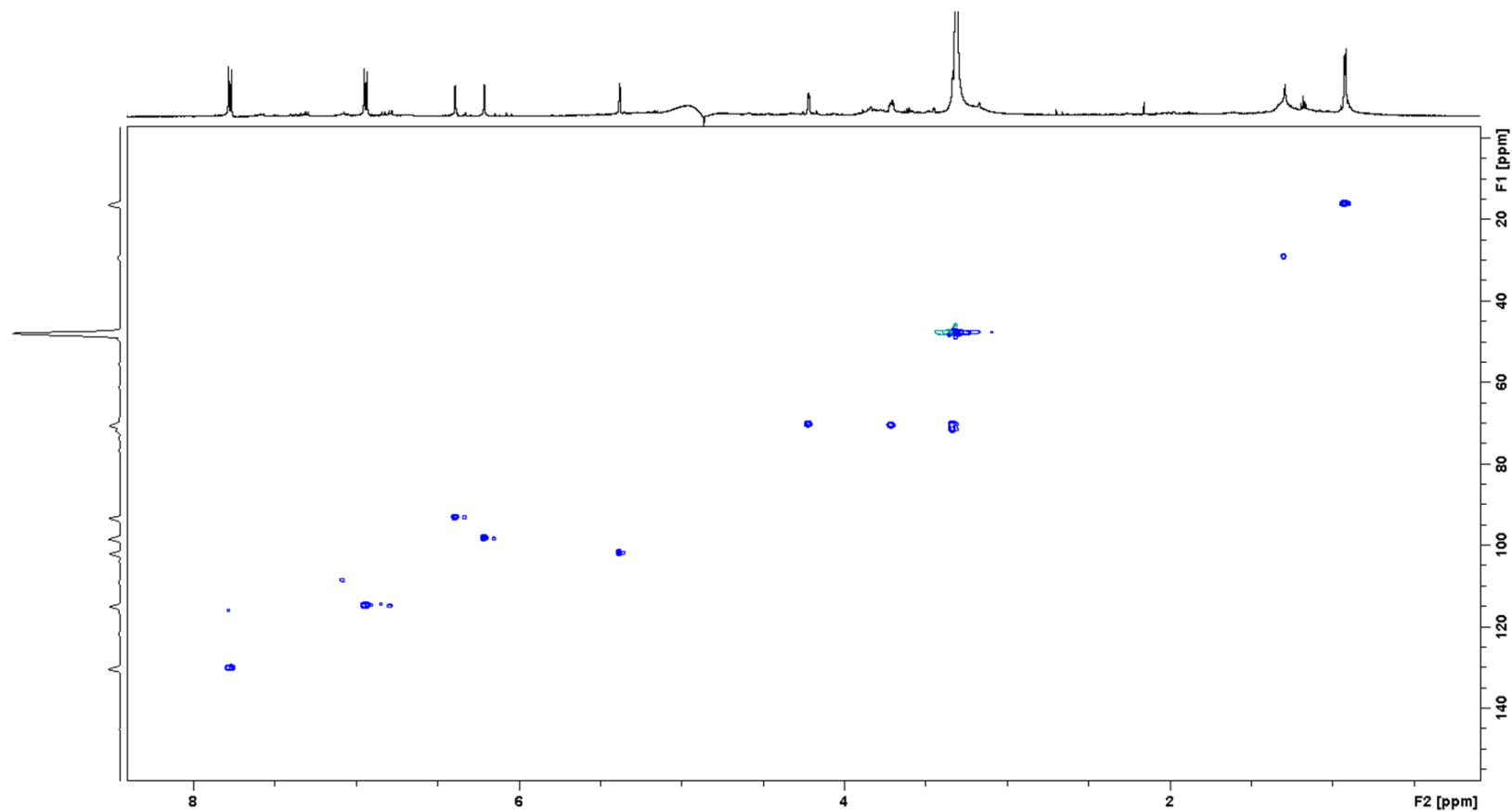
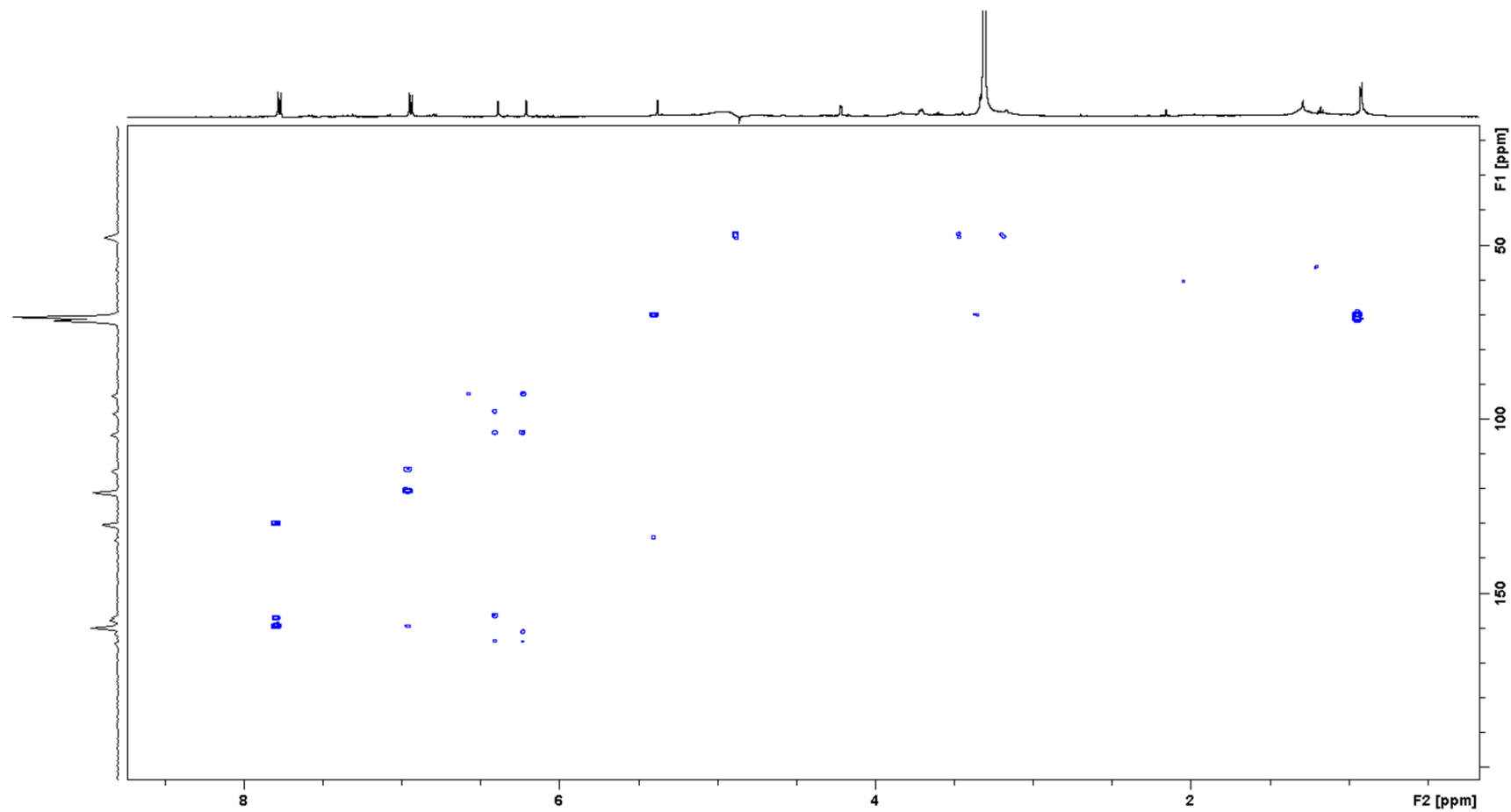


Figura S63

^1H - ^{13}H HMBC da substância kaempferol-3-O-ramnosídeo (**26**) (11,74 T, CD_3OD)



Análise por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear 1D e 2D

E. punicifolia (EpEAO)

Figura S64

Espectro de RMN de ^1H do extrato seco das folhas de *E. punicifolia* (EpEAO) (500 MHz, DMSO)

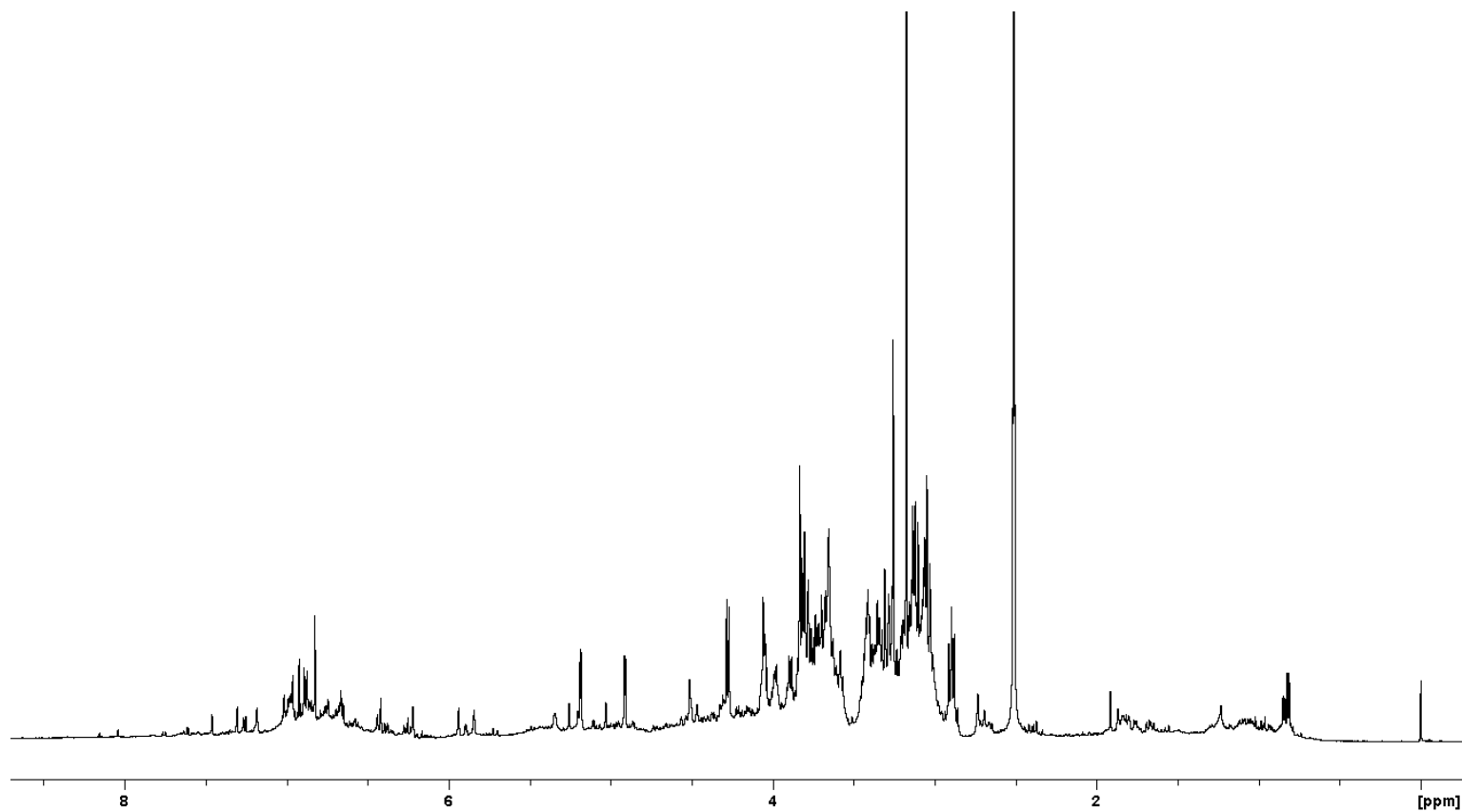


Figura S65

^1H - ^{13}H HSQC do extrato seco das folhas de *E. punicifolia* (EpEAO) (11,74 T, DMSO)

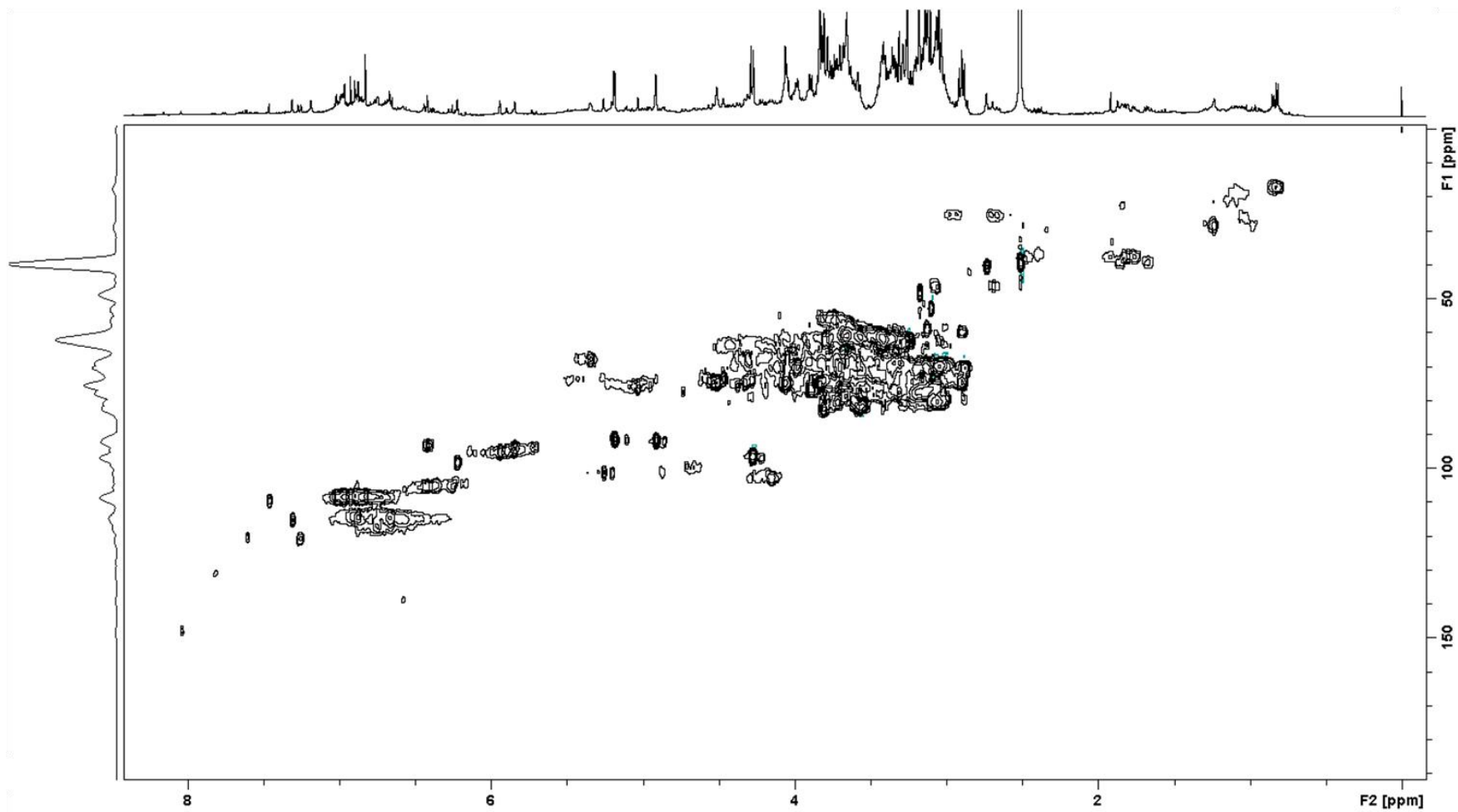


Figura S66

^1H - ^{13}H HMBC do extrato seco das folhas de *E. puniceifolia* (EpEAO) (11,74 T, DMSO)

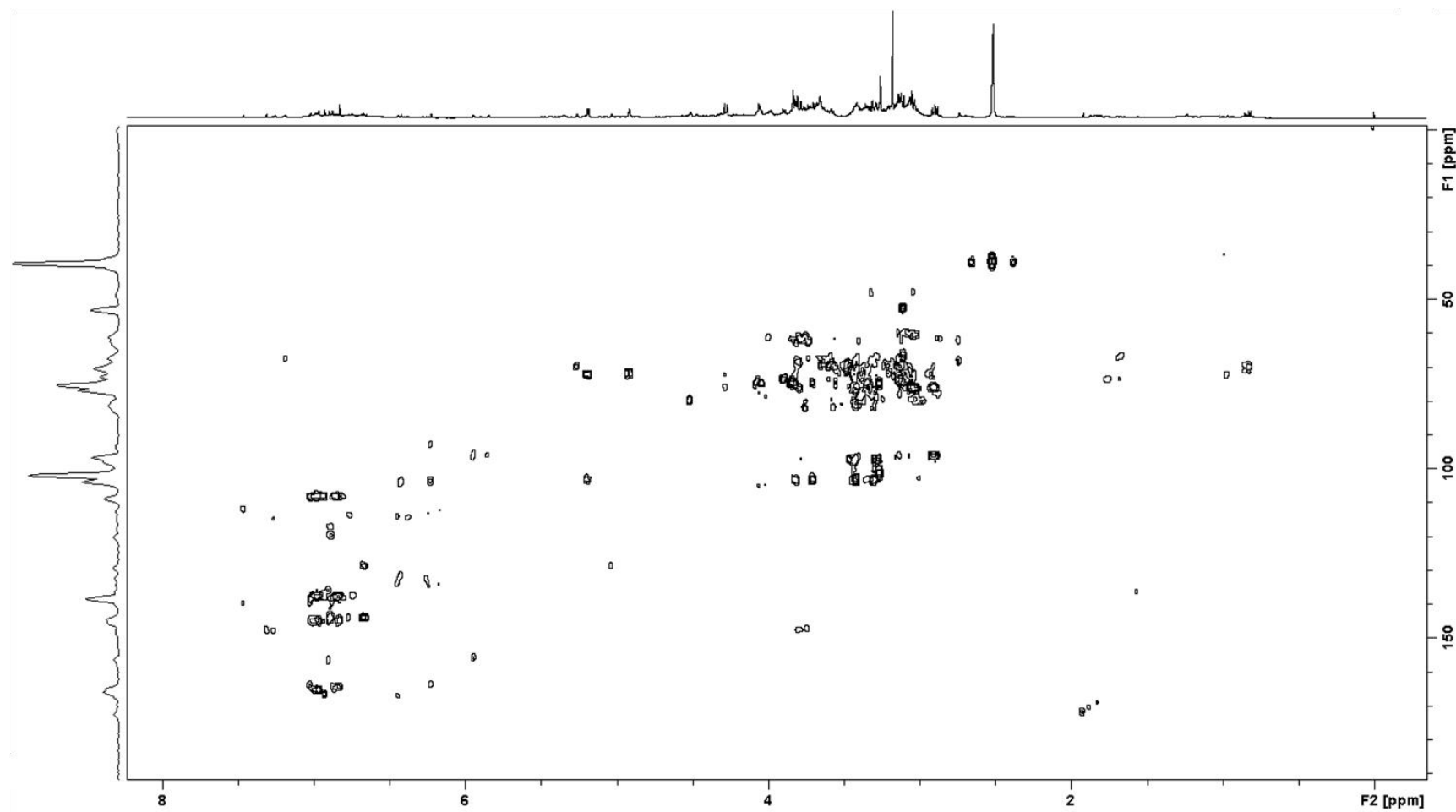


Figura S67

Espectro de RMN de ^1H com assinalamento do sinal da substância ácido gálico (**5**) (EpEAO) (500 MHz, CD_3OD)

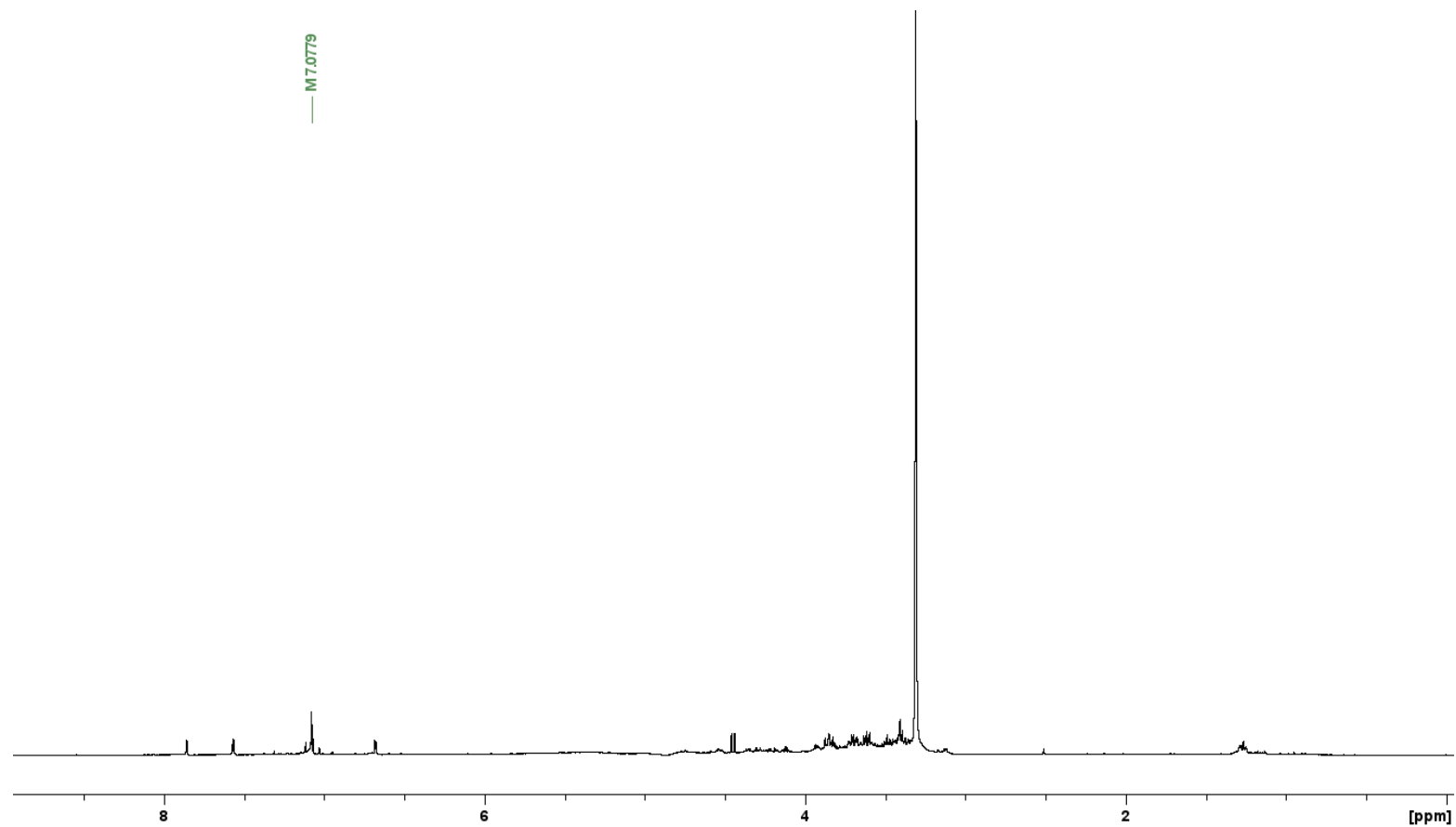


Figura S68

^1H - ^{13}H HSQC da substância ácido gálico (**5**) (EpEAO) (11,74 T, CD_3OD)

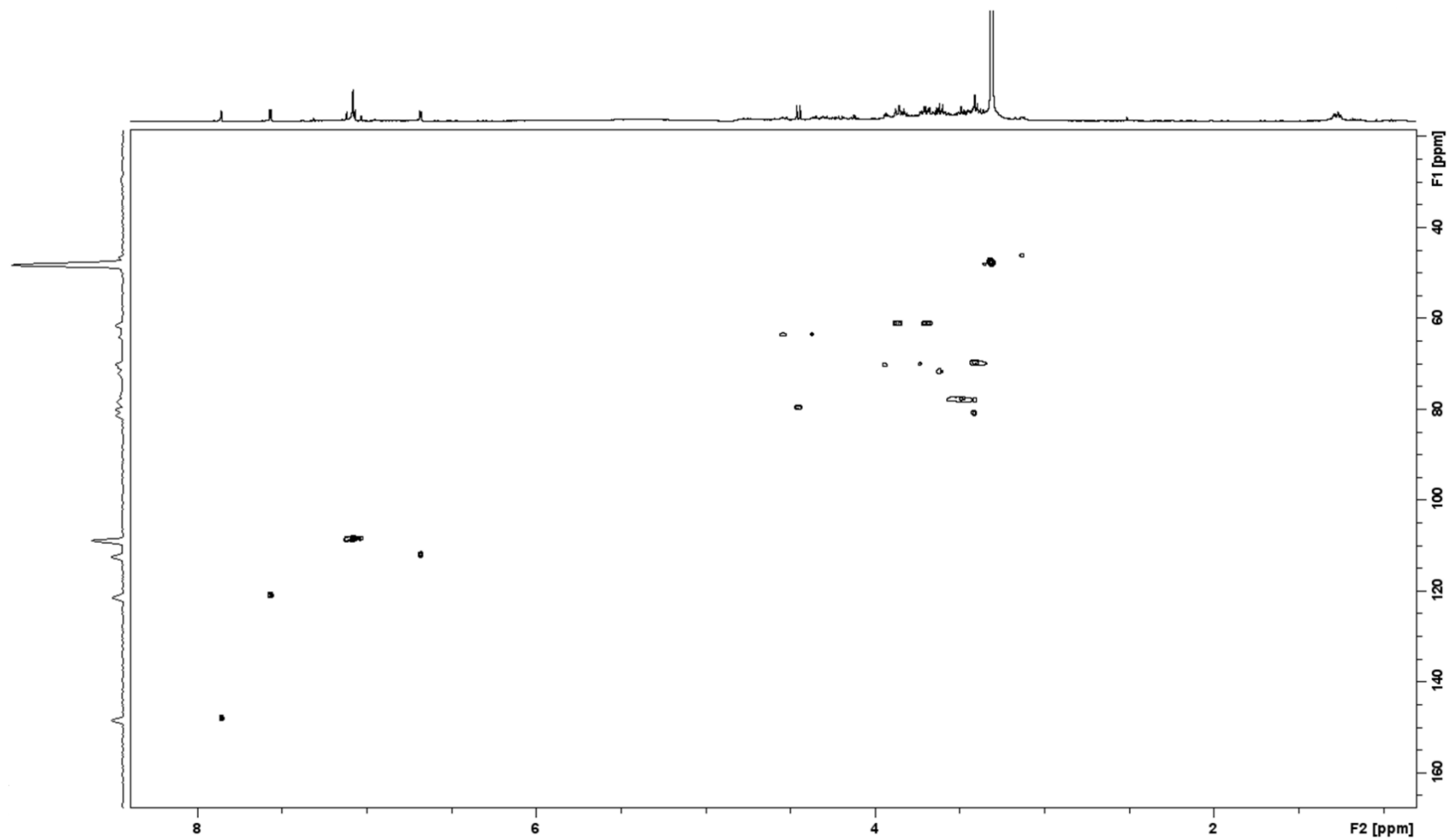


Figura S69

^1H - ^{13}H HMBC da substância ácido gálico (**5**) (EpEAO) (11,74 T, CD_3OD)

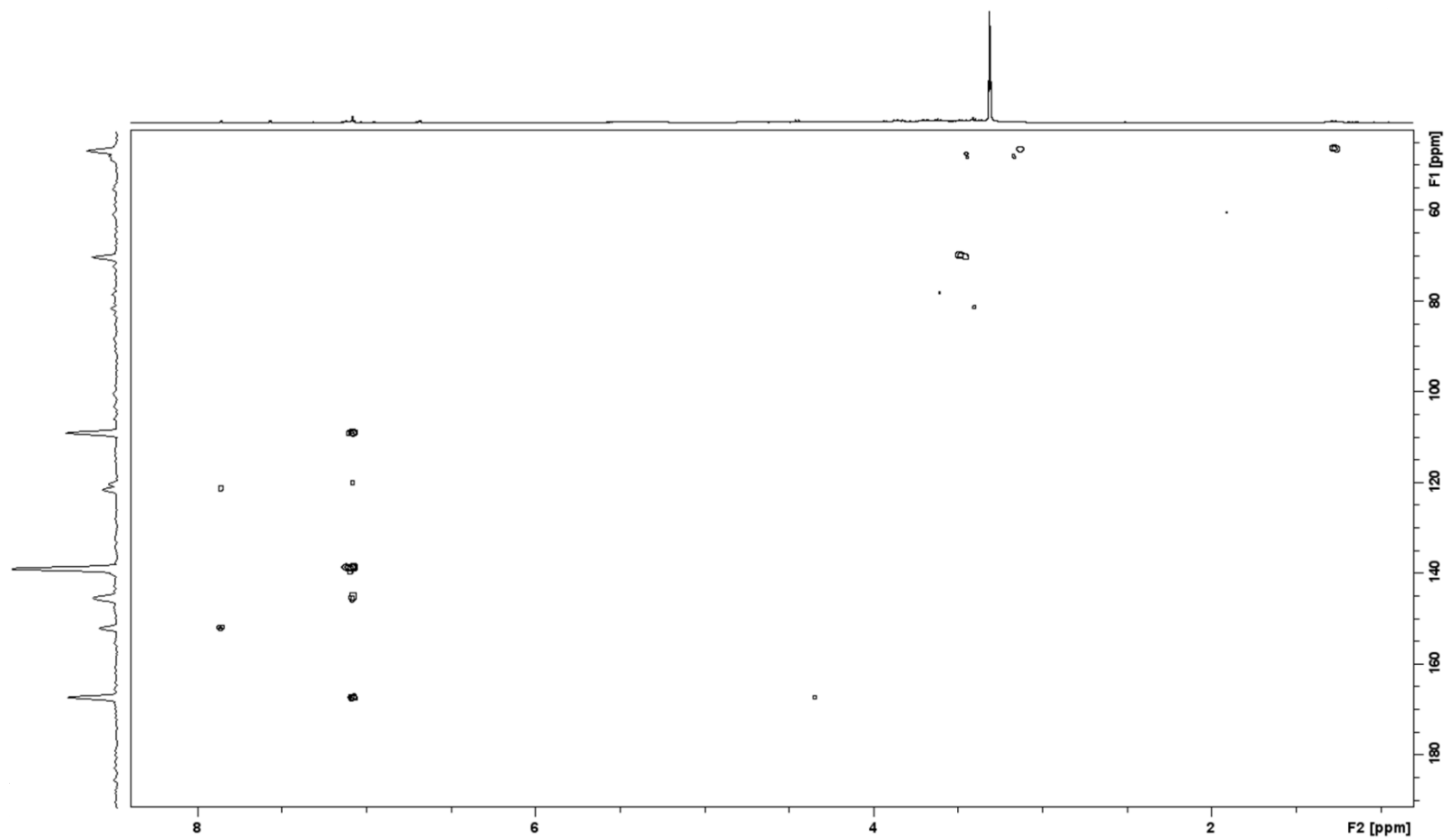


Figura S70

Espectro de RMN de ^1H com assinalamento dos sinais da substância casuarictina (**11**) (EpEAO) (500 MHz, CD_3OD)

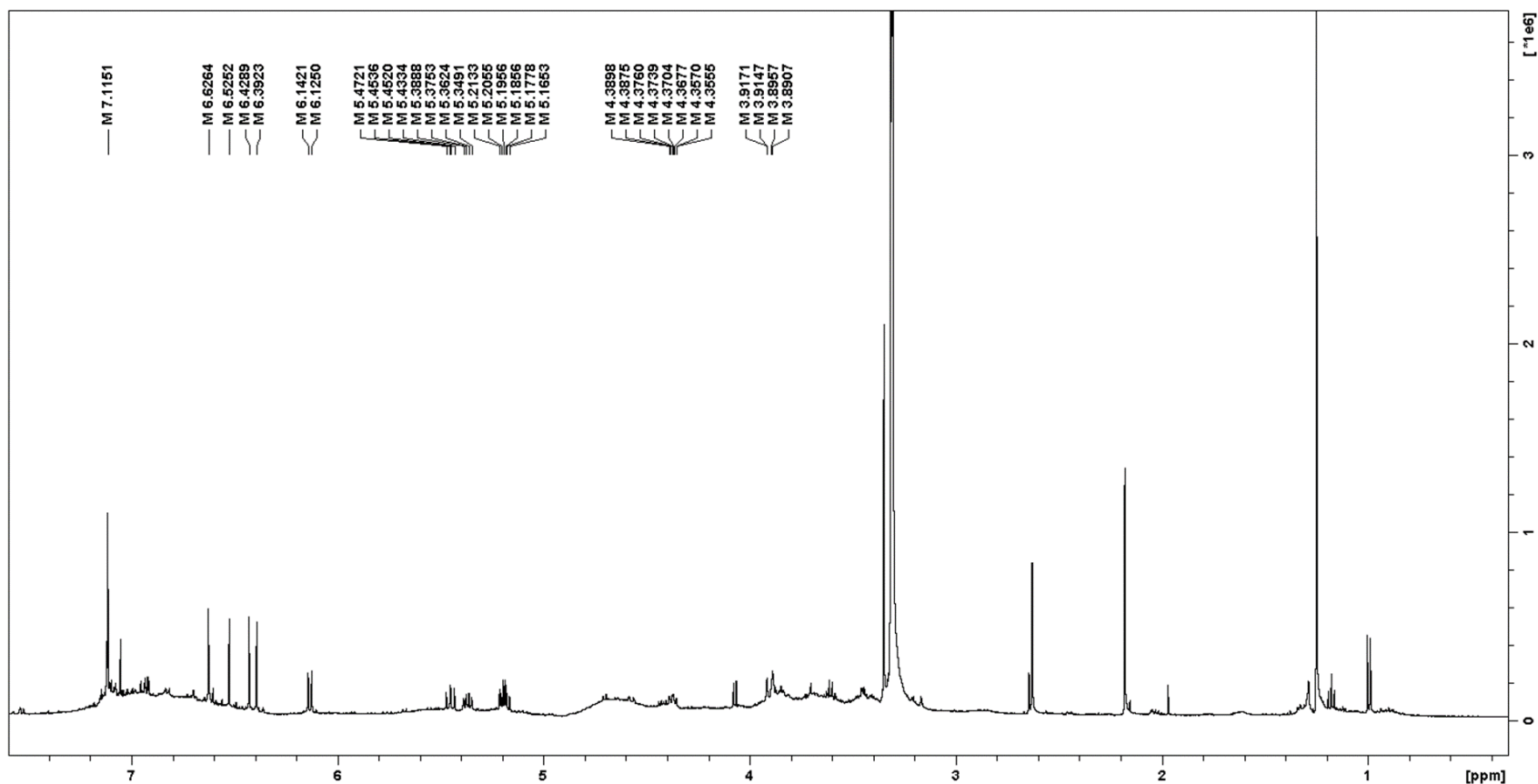


Figura S71

^1H - ^{13}H HSQC da substância casuarictina (**11**) (EpEAO) (11,74 T, CD_3OD)

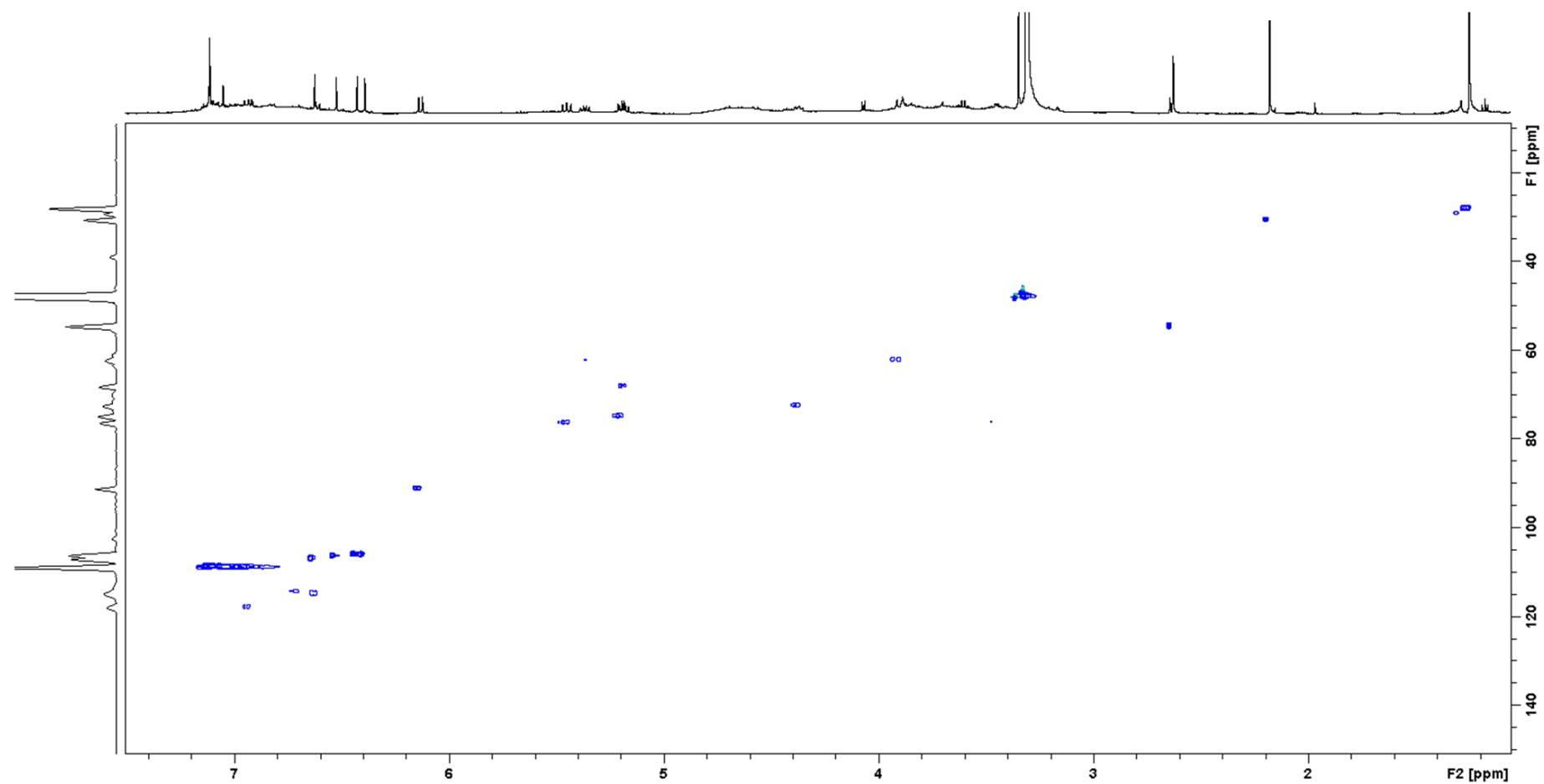


Figura S72

^1H - ^{13}H HMBC da substância casuarictina (**11**) (EpEAO) (11,74 T, CD_3OD)

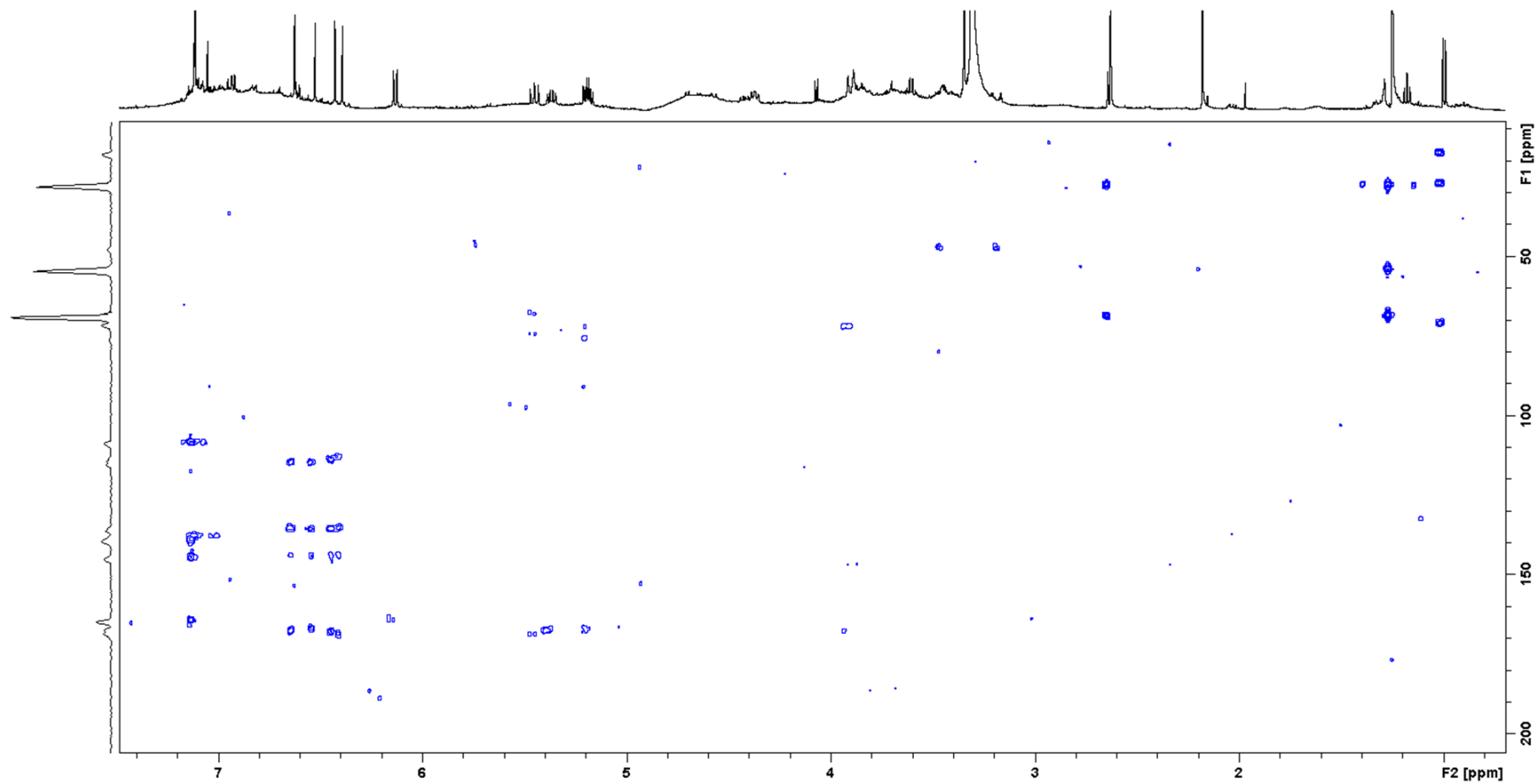


Figura S73

Espectro de RMN de ^1H com assinalamento dos sinais da substância quercetina-3-O- β -2"-galoilglucosídeo (**17**) (EpEAO) (500 MHz, CD_3OD)

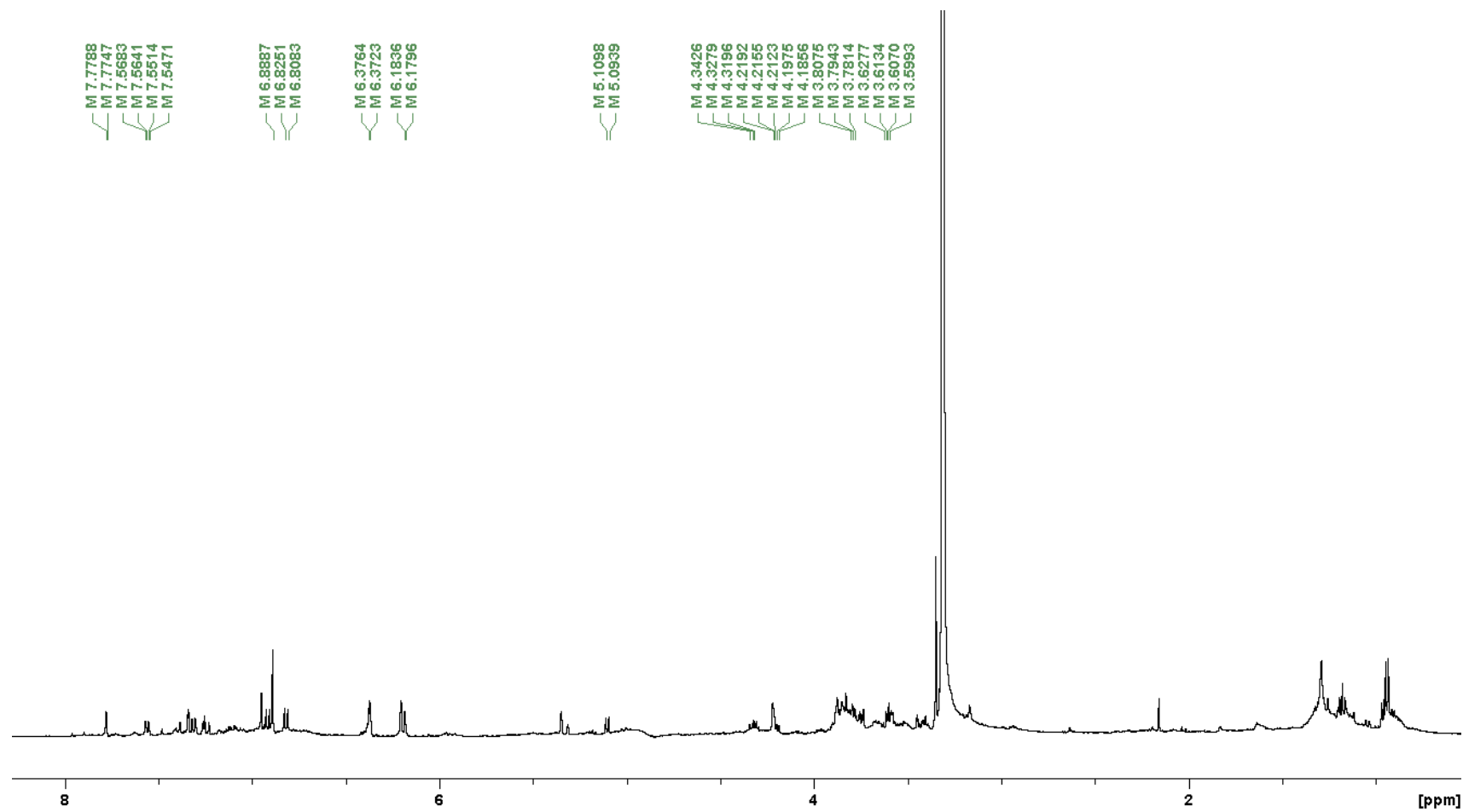


Figura S74

^1H - ^{13}H HSQC da substância quercetina-3-O- β -2''-galoilglucosídeo (**17**) (EpEAO) (11,74 T, CD_3OD)

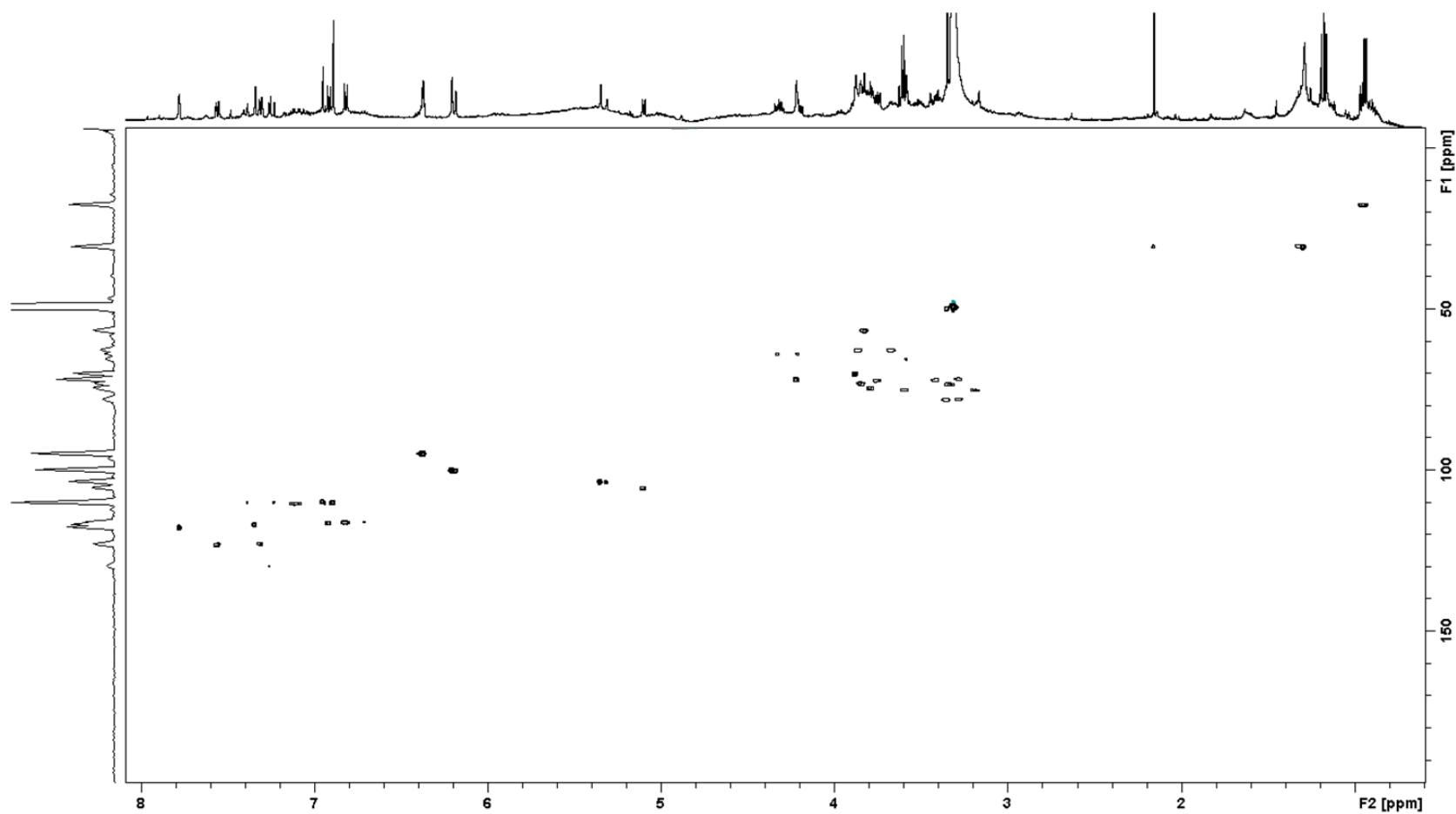


Figura S75

^1H - ^{13}H HMBC da substância quercetina-3-O- β -2''-galoilglucosídeo (**17**) (EpEAO) (11,74 T, CD_3OD)

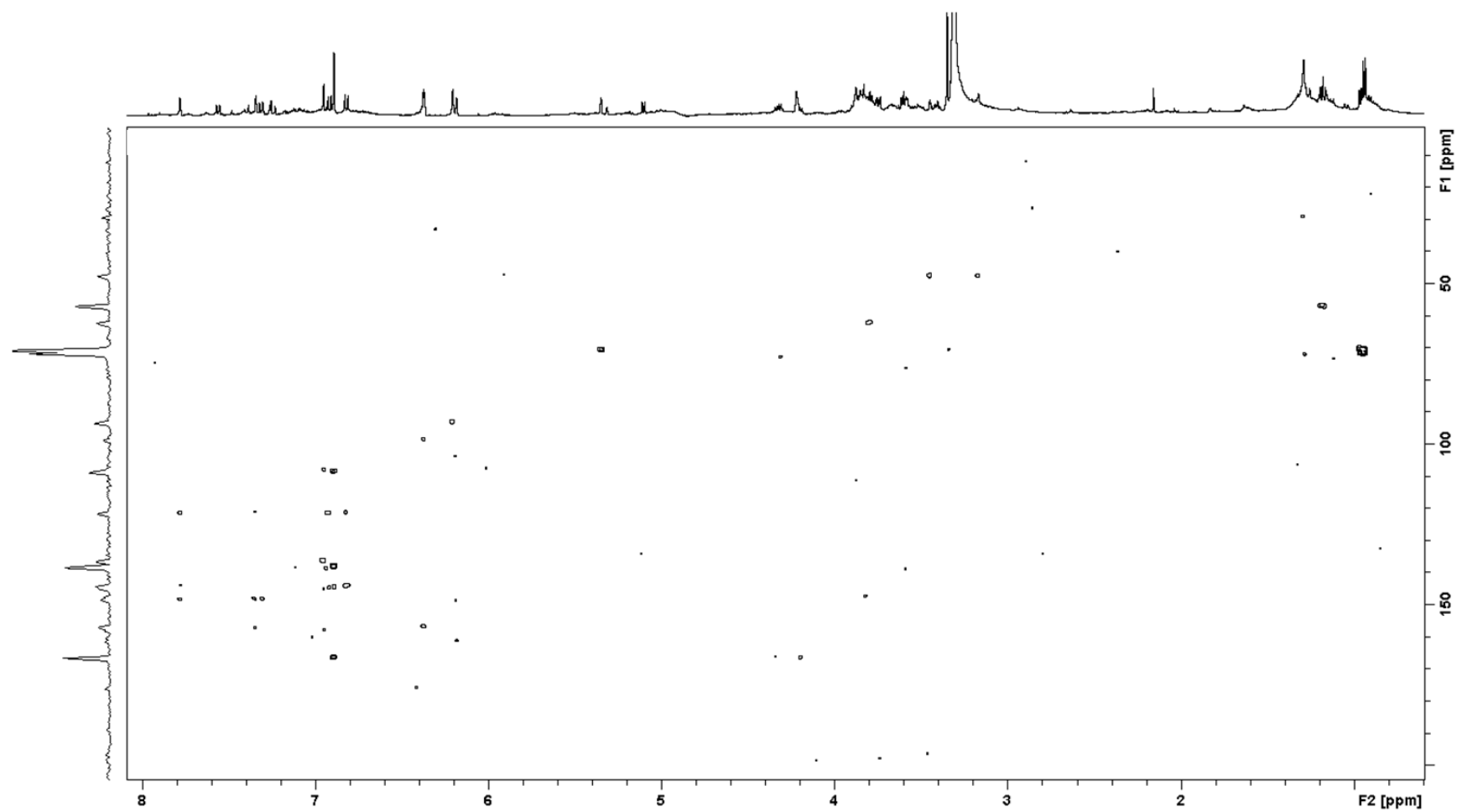


Figura S76

Espectro de RMN de ^1H com assinalamento dos sinais da substância miricitrina (**19**) (EpEAO) (500 MHz, CD_3OD)

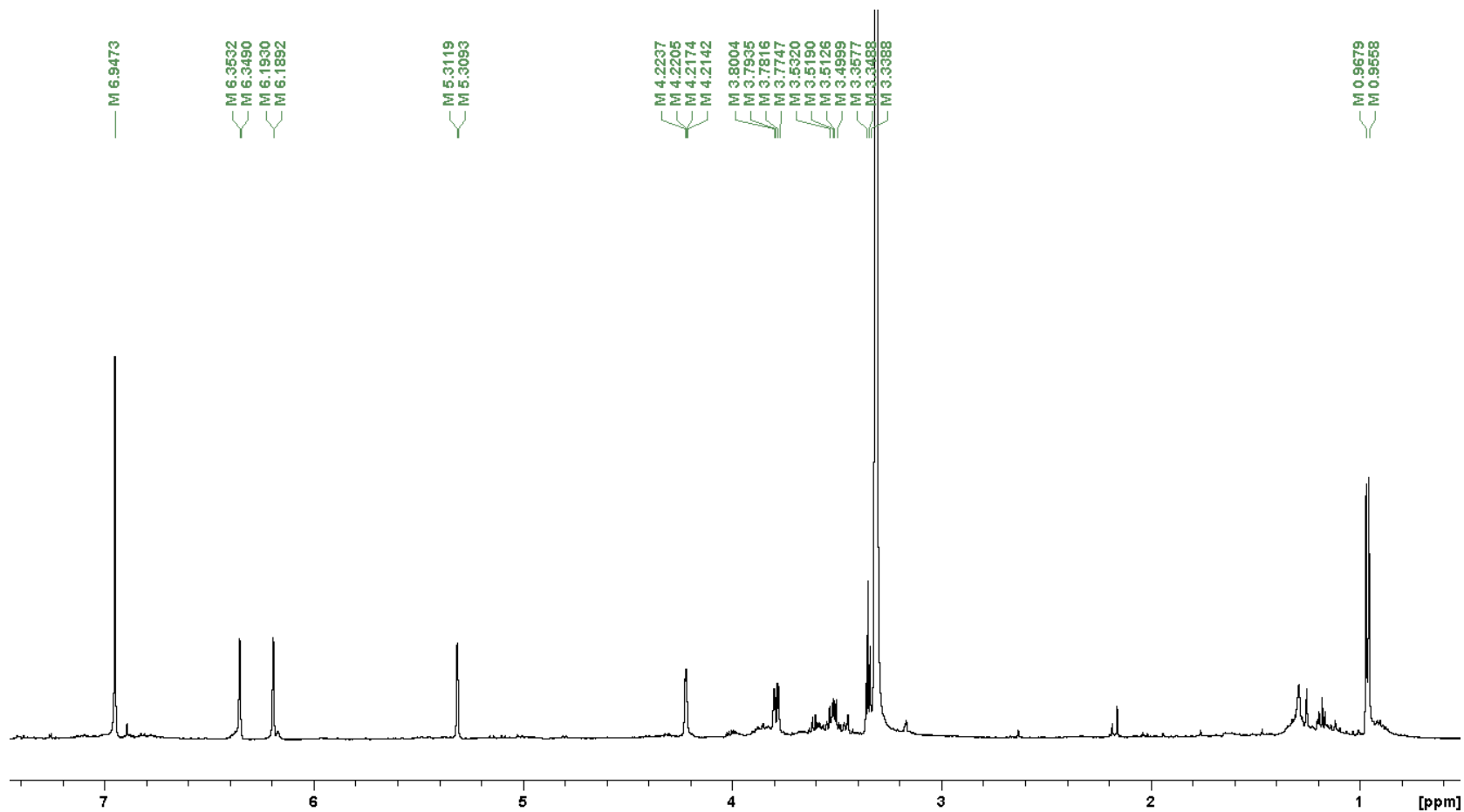


Figura S77

^1H - ^{13}H HSQC da substância miricitrina (**19**) (EpEAO) (11,74 T, CD_3OD)

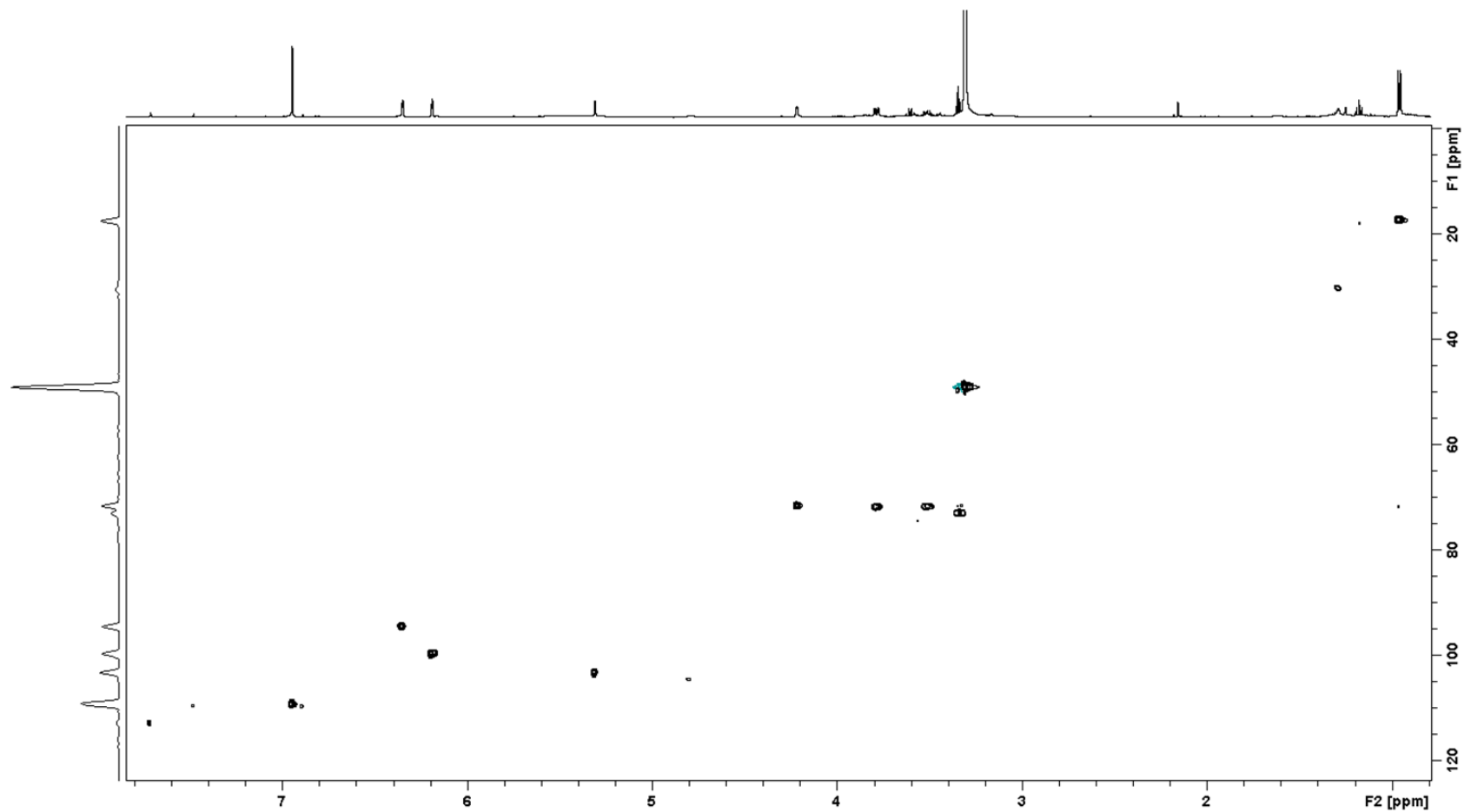


Figura S78

^1H - ^{13}H HMBC da substância miricitrina (**19**) (EpEAO) (11,74 T, CD_3OD)

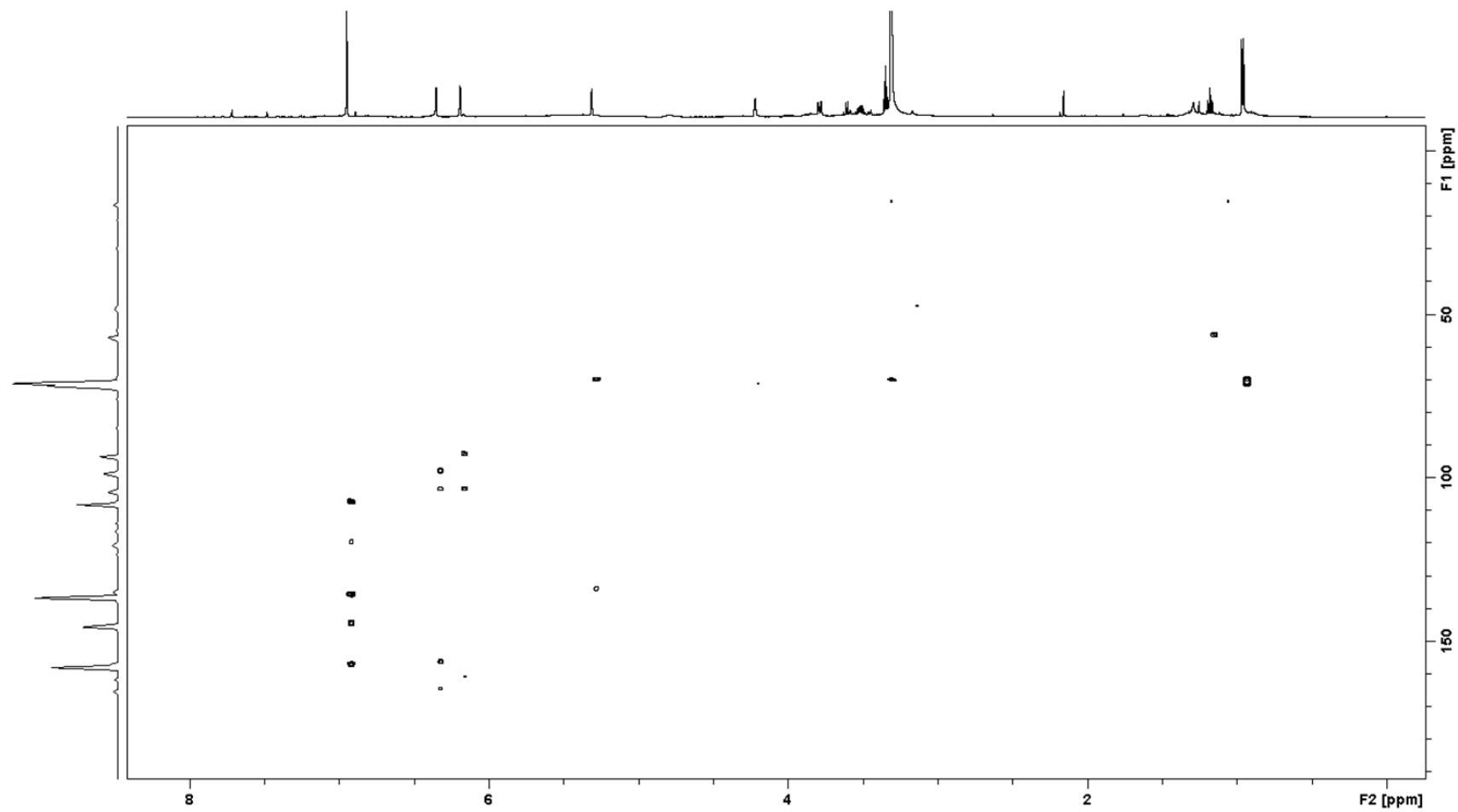


Figura S79

Espectro de RMN ^1H com assinalamento dos sinais das substâncias ácido elágico (**22**) e quercitrina (**23**) (EpEAO) (500 MHz, CD_3OD)

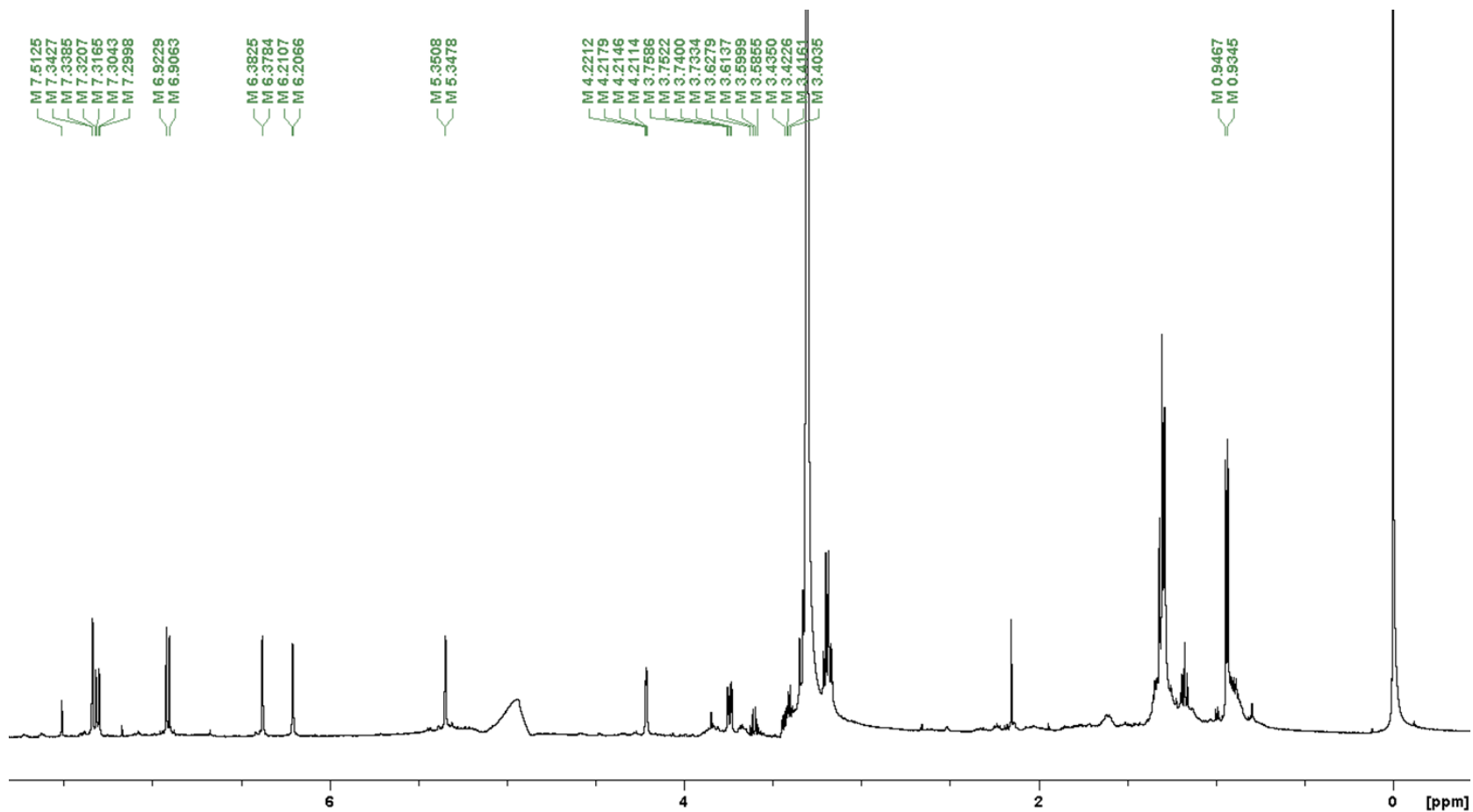


Figura S80

^1H - ^{13}H HSQC das substâncias ácido elágico (**22**) e quercitrina (**23**) (EpEAO) (11,74 T, CD_3OD)

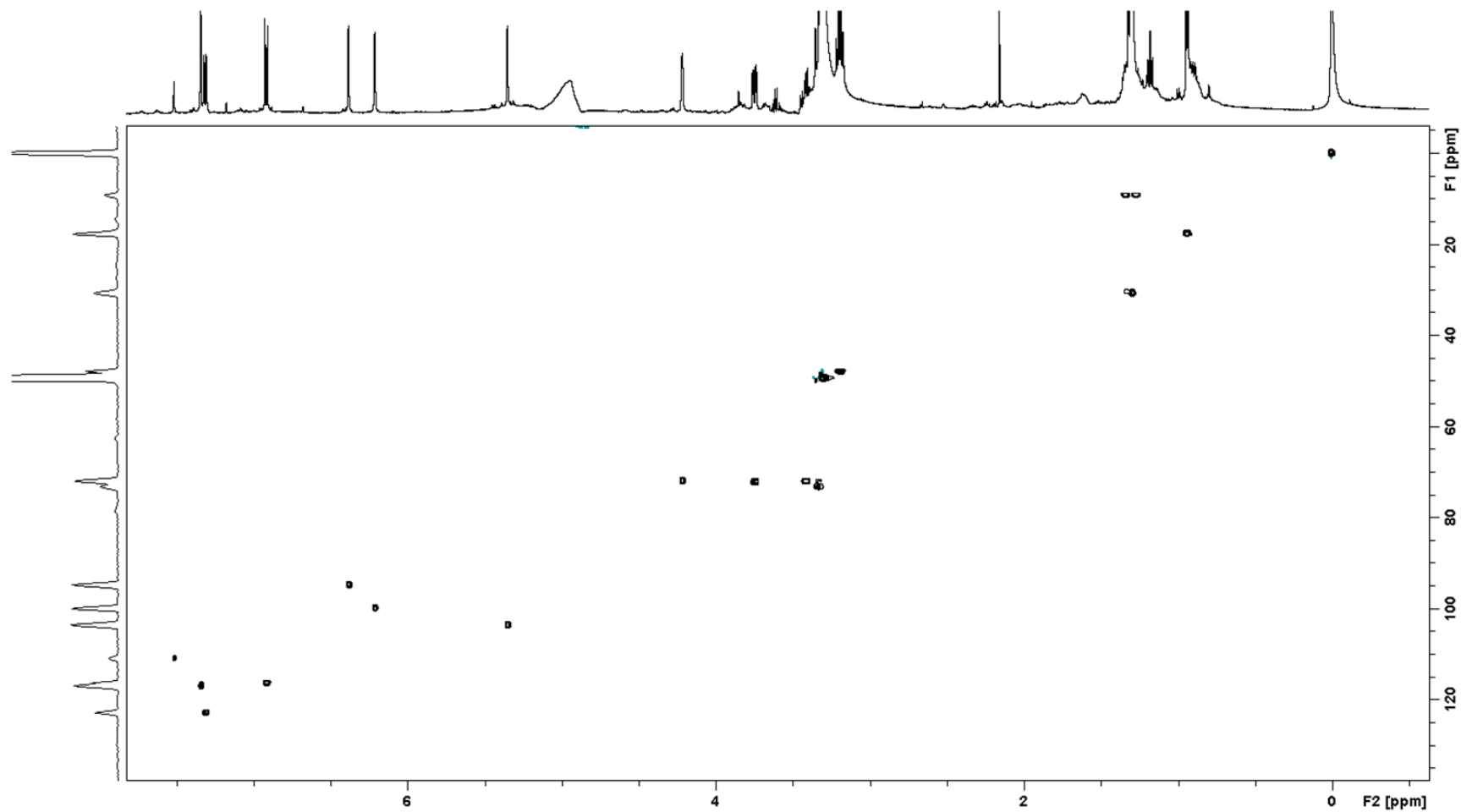


Figura S81

^1H - ^{13}H HMBC das substâncias ácido elágico (**22**) e quercitrina (**23**) (EpEAO) (11,74 T, CD_3OD)

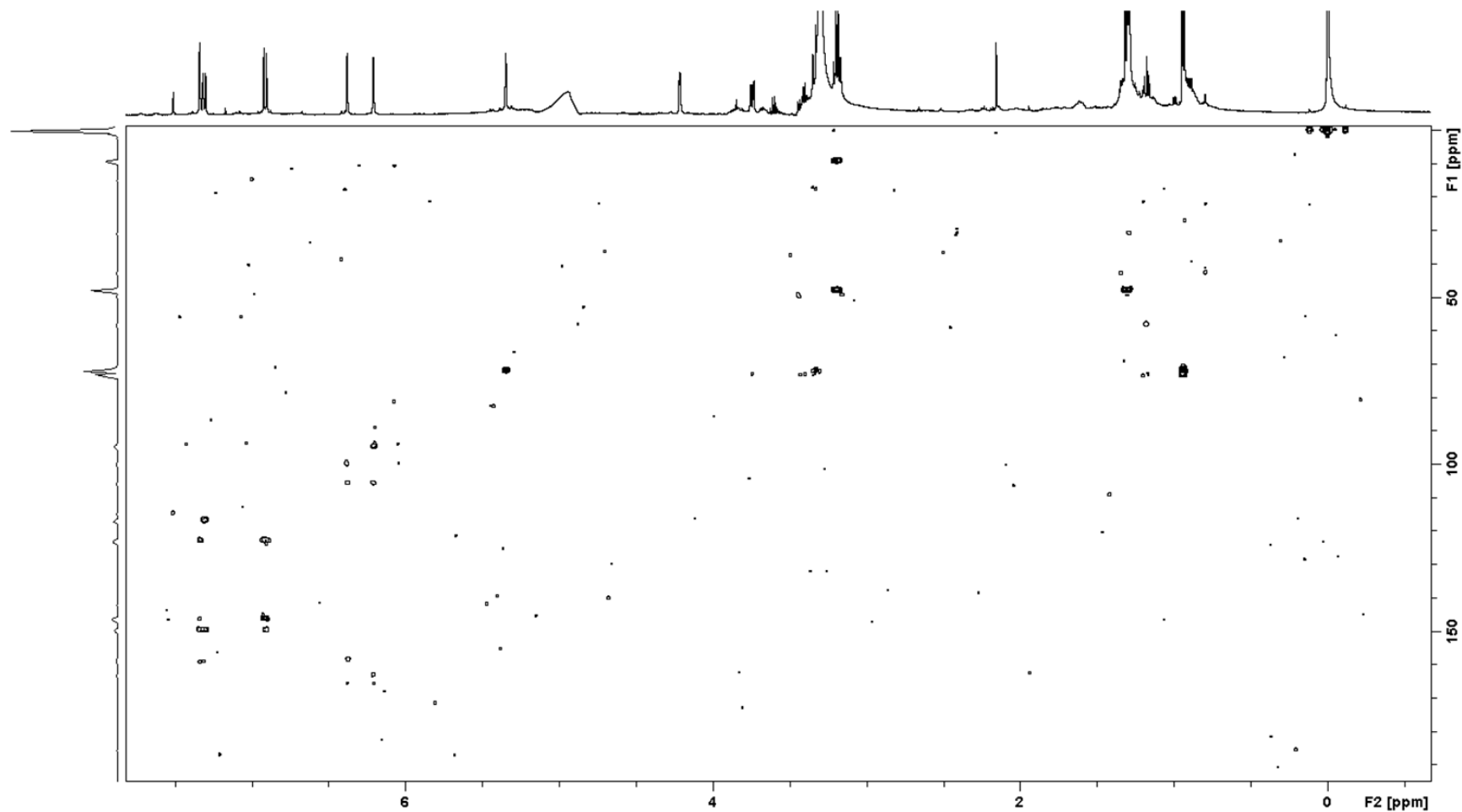


Figura S82

Espectro de RMN de ^1H com assinalamento dos sinais da substância kaempferol-3-O-ramnosídeo (**26**) (EpEAO) (500 MHz, CD_3OD)

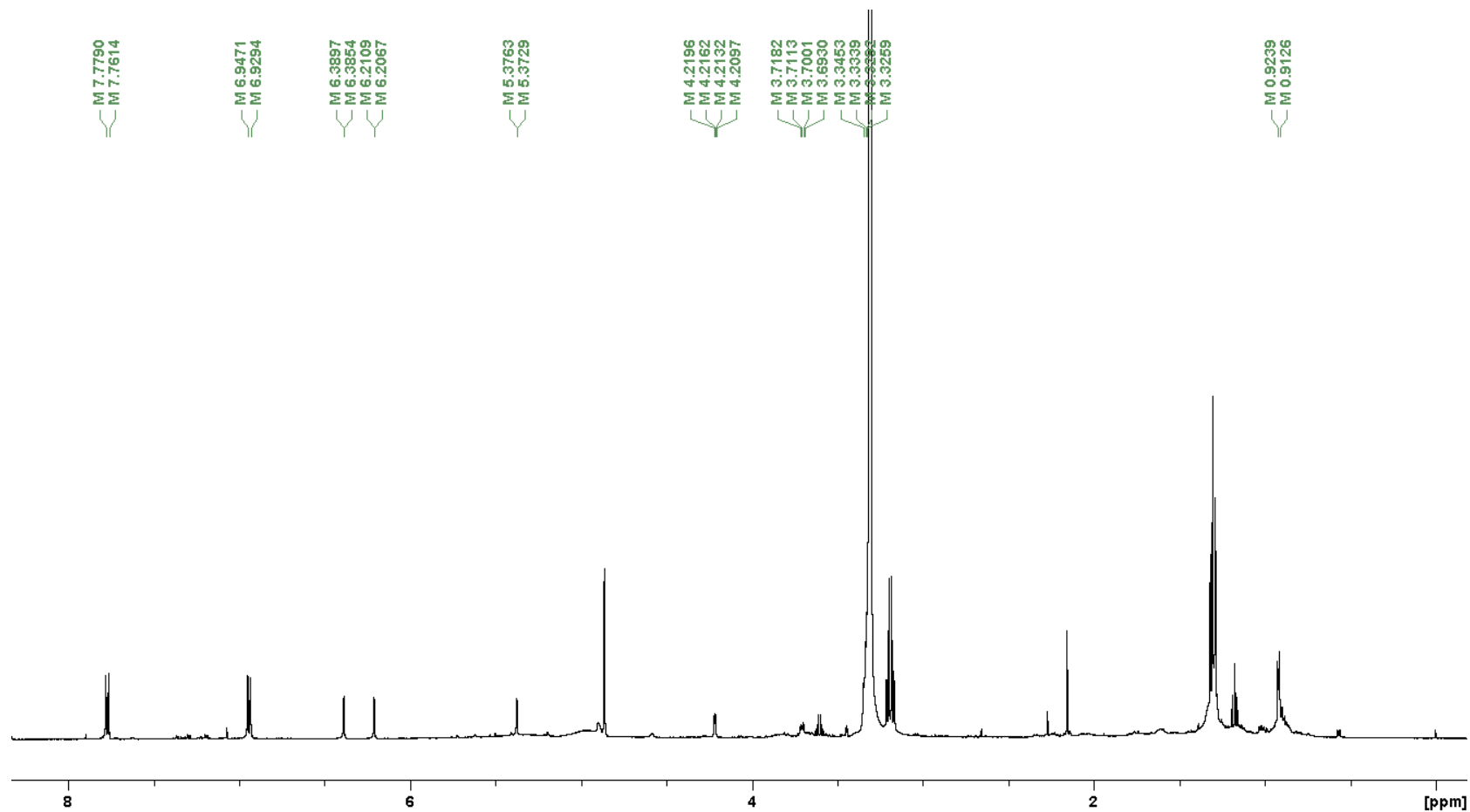


Figura S83

^1H - ^{13}H HSQC da substância kaempferol-3-*O*-ramnosídeo (**26**) (EpEAO) (11,74 T, CD_3OD)

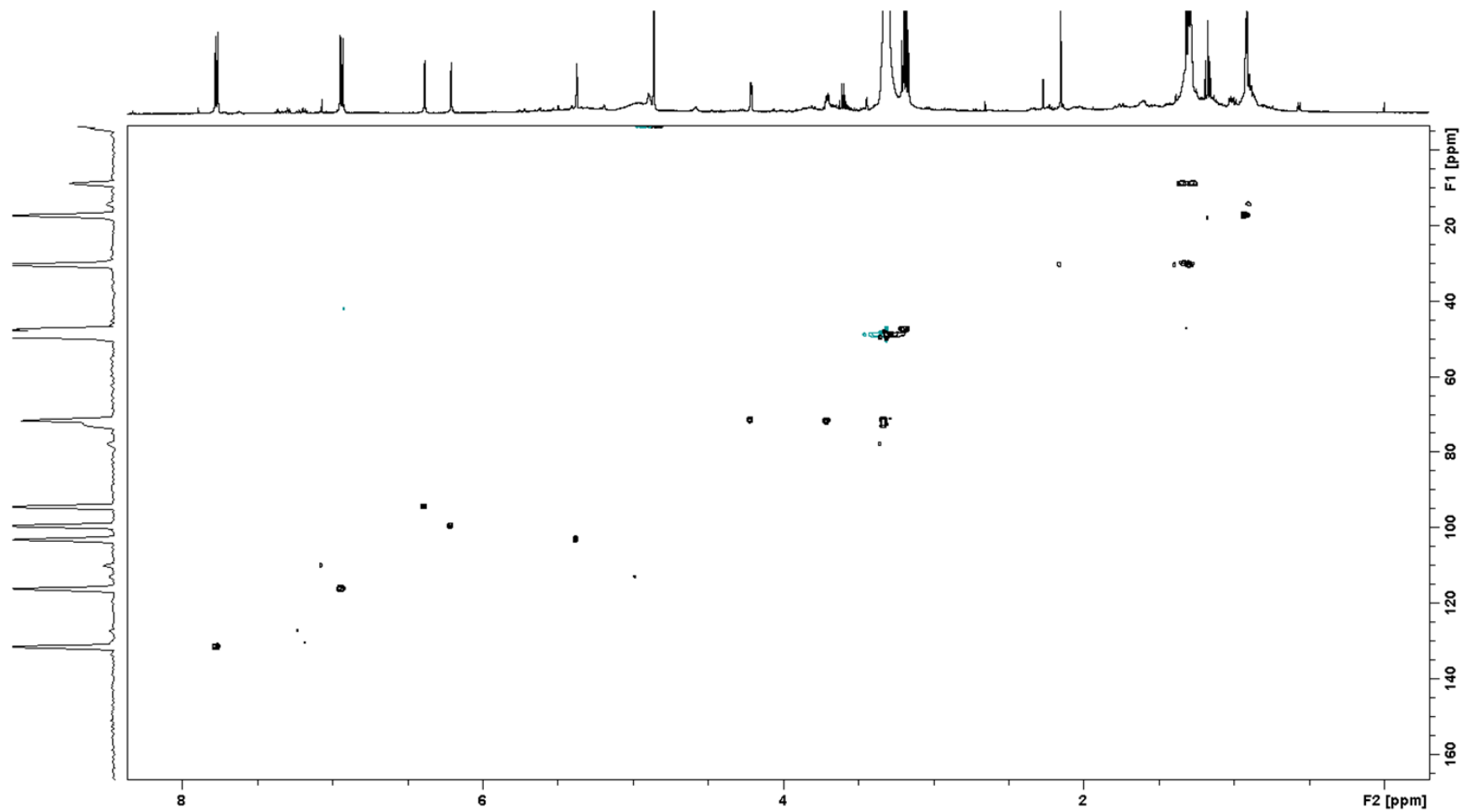
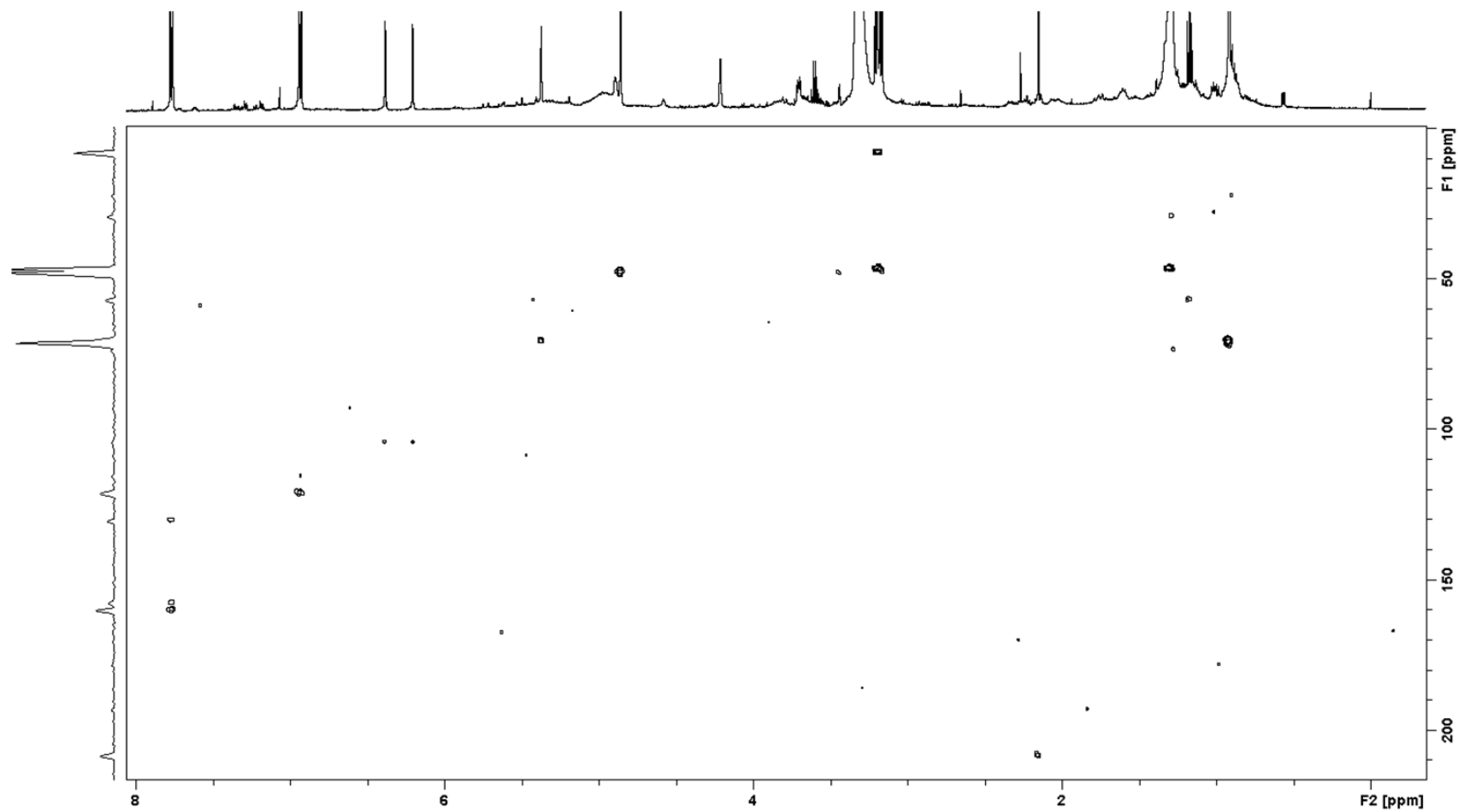


Figura S84

^1H - ^{13}H HMBC da substância kaempferol-3-*O*-ramnosídeo (**26**) (EpEAO) (11,74 T, CD_3OD)



Dados espectrométricos dos compostos por CLAE-EMAR do extrato seco das folhas de *Eugenia punicifolia* (EpEAO)

Figura S85

Cromatograma de íons totais do extrato seco das folhas *E. punicifolia* (EpEAO) por CLAE-IES-EMAR no modo negativo

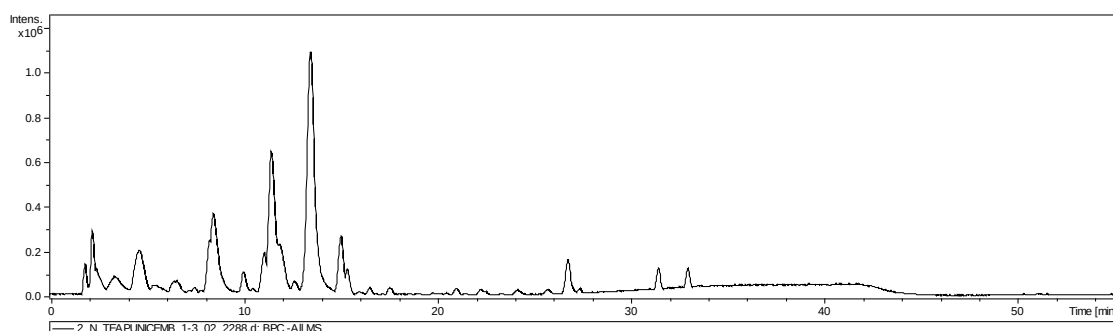


Figura S86

Pico no t_R 5,3 min, espectro de íon modo negativo m/z 935,0822 (casuarictina, **11**)

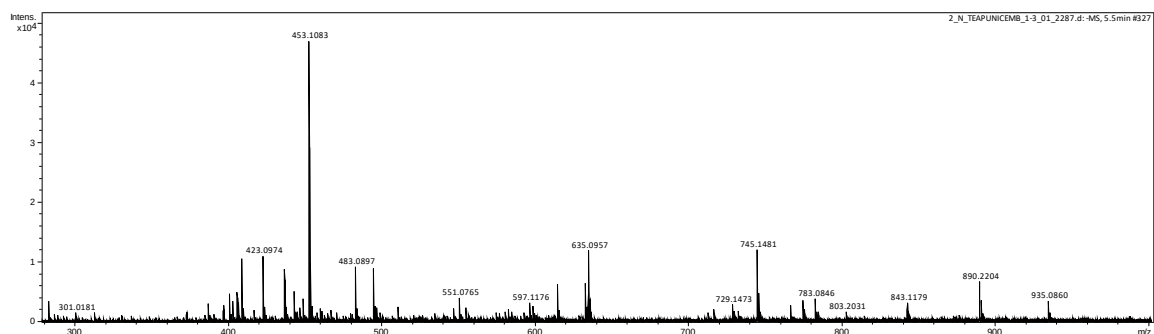


Figura S87

Pico no t_R 8,5 min, espectro de íon modo negativo e MS^2 de m/z 441,0875 (catequina-3-*O*-galato, **12**)

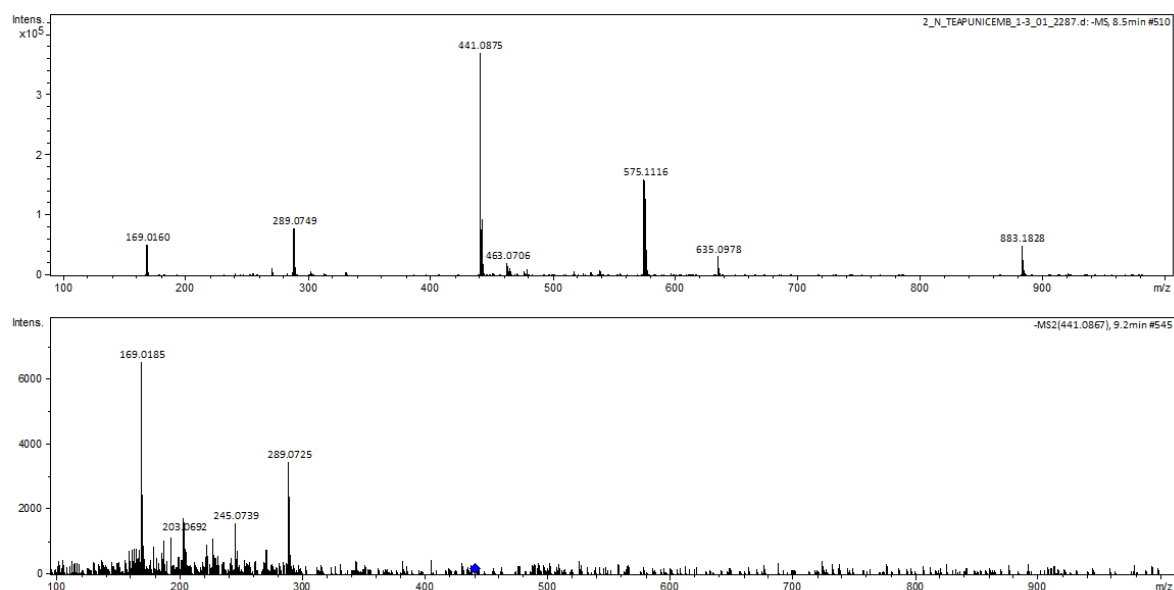


Figura S88

Pico no t_R 10,2 min, espectro de íon modo negativo e MS^2 de m/z 455,1016 (epicatequina-3-*O*-(3''-*O*-metilgalato) (**15**).

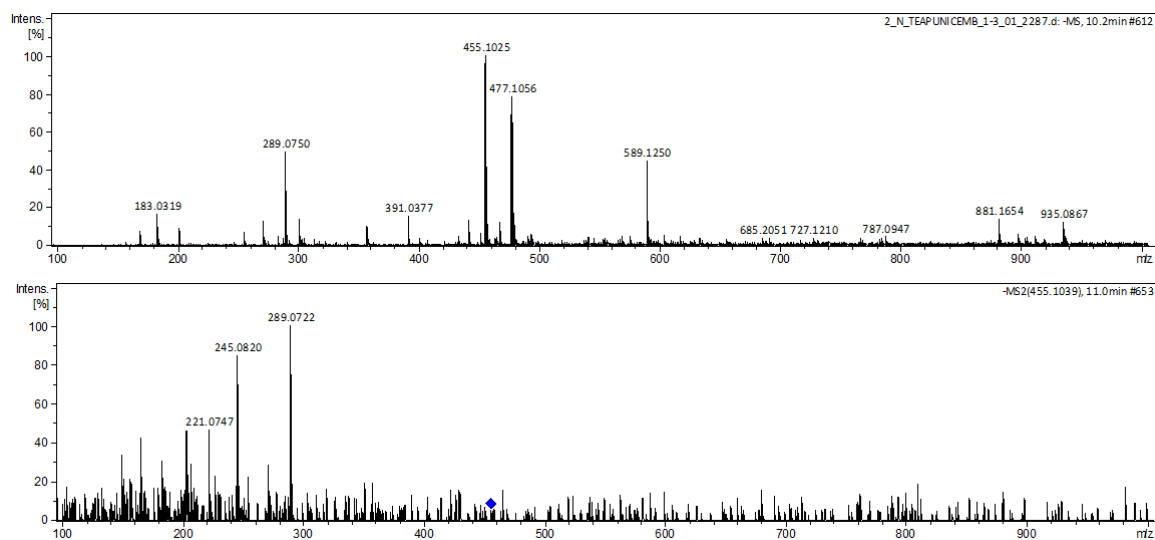


Figura S89

Pico no t_R 10,5 min, espectro de íon modo negativo de m/z 479,0879 (miricetina-3-O-glucosídeo, **16**)

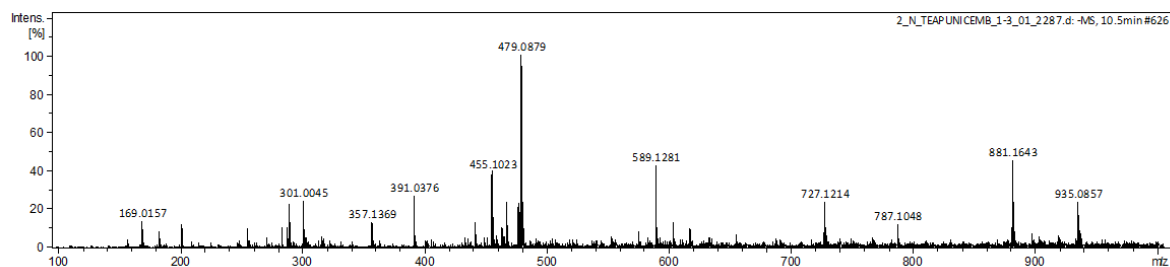


Figura S90

Pico no t_R 11,0 min, espectro de íon modo negativo e MS^2 de m/z 615,1060 (Quercetina-3-O- β -2"-galoilglucosídeo, **17**).

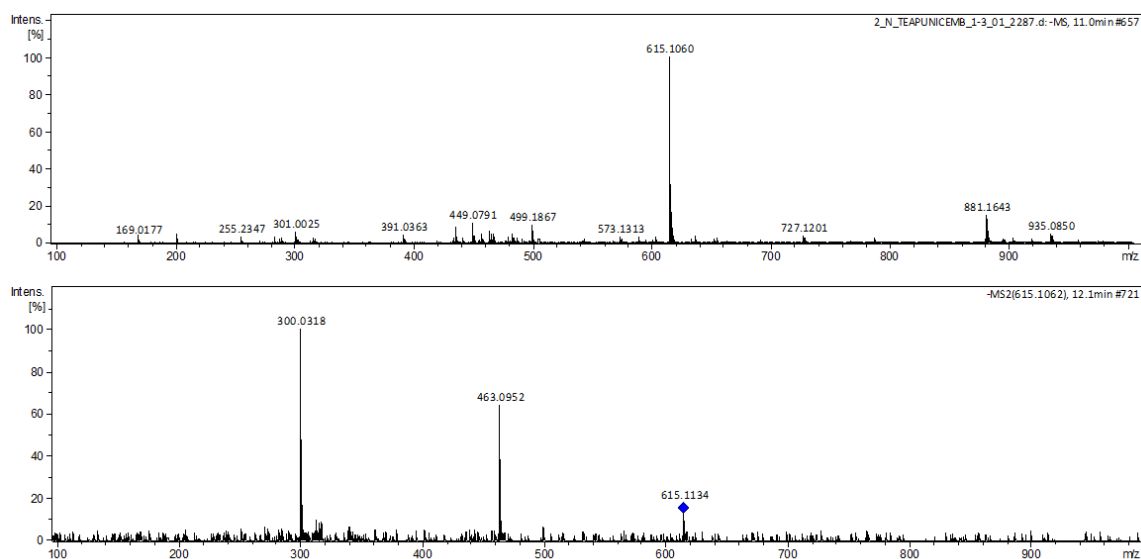


Figura S91

Pico no t_R 11,5 min, espectro de íon modo negativo e MS^2 de m/z 463,0931 (miricitrina, **19**).

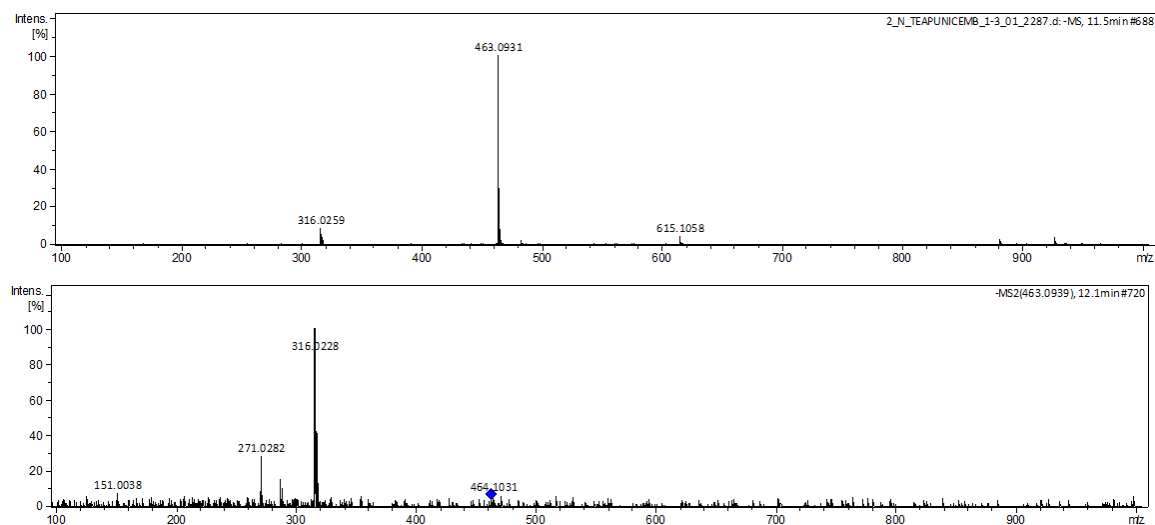


Figura S92

Pico no t_R 12,7 min, espectro de íon modo negativo e MS^2 de m/z 433,0796 (guaijaverina, **21**).

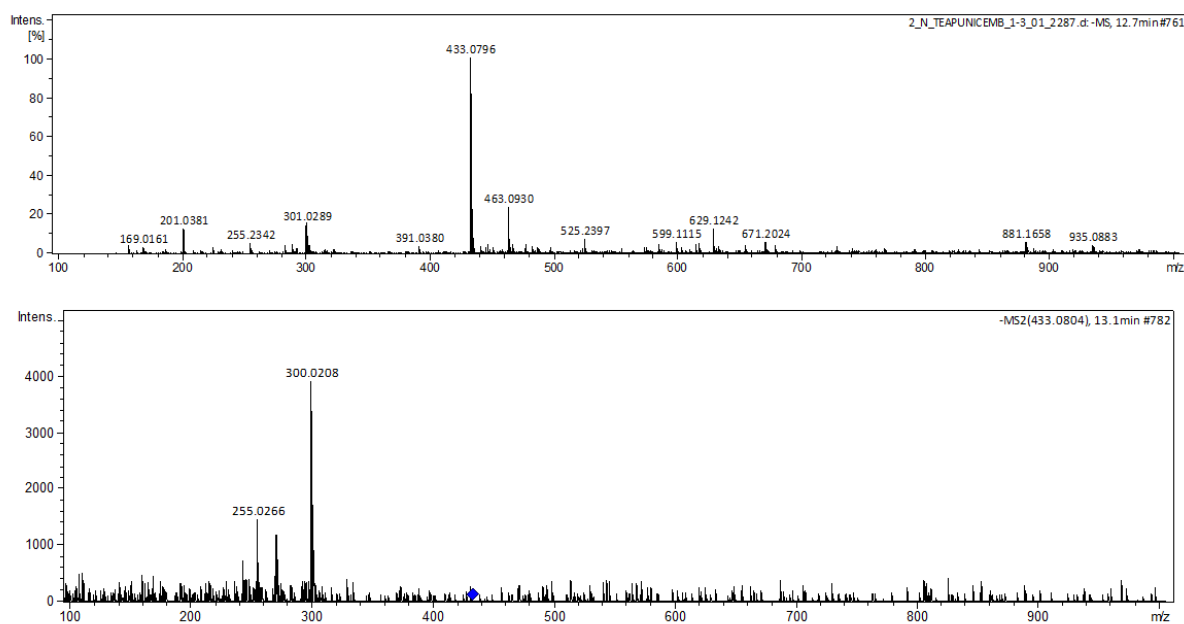


Figura S93

Pico no t_R 13,5 min, espectro de íon modo negativo e MS^2 de m/z 447,0971 (quercitrina, **23**).

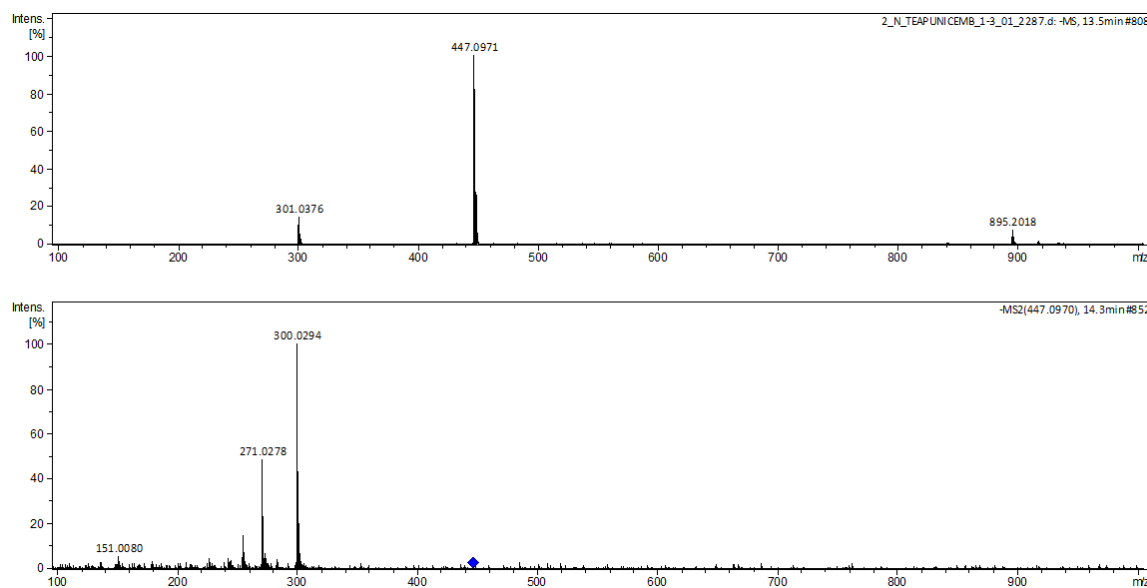
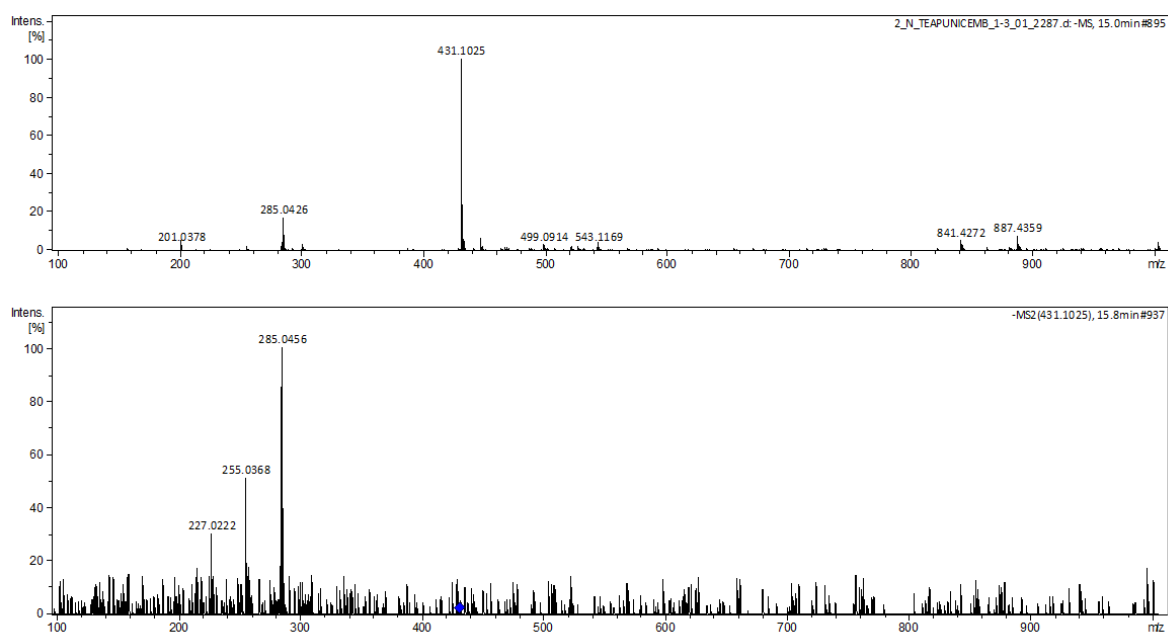


Figura S94

Pico no t_R 15,0 min, espectro de íon modo negativo e MS^2 de m/z 431,1025 (kaempferol-3-*O*-ramnosídeo, **26**).



Análise por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear 1D e 2D
***Myrcia multiflora* (MmEAO)**

Figura S95

Espectro de RMN de ^1H do extrato seco das folhas de *M. multiflora* (MmEAO) (500 MHz, DMSO- d_6).

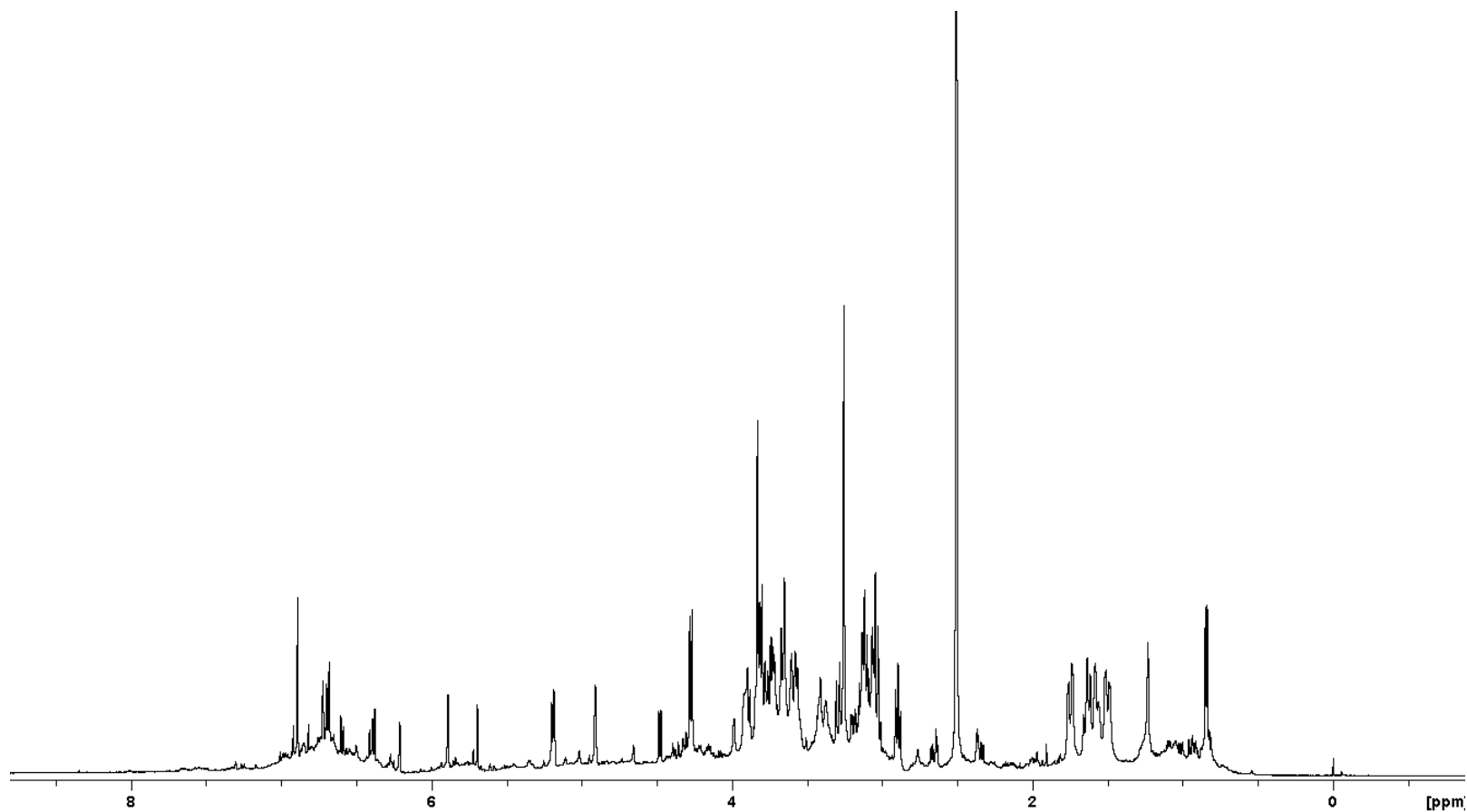


Figura S96

^1H - ^{13}H HSQC do extrato seco das folhas de *M. multiflora* (MmEAO) (11,74 T, $\text{DMSO}-d_6$)

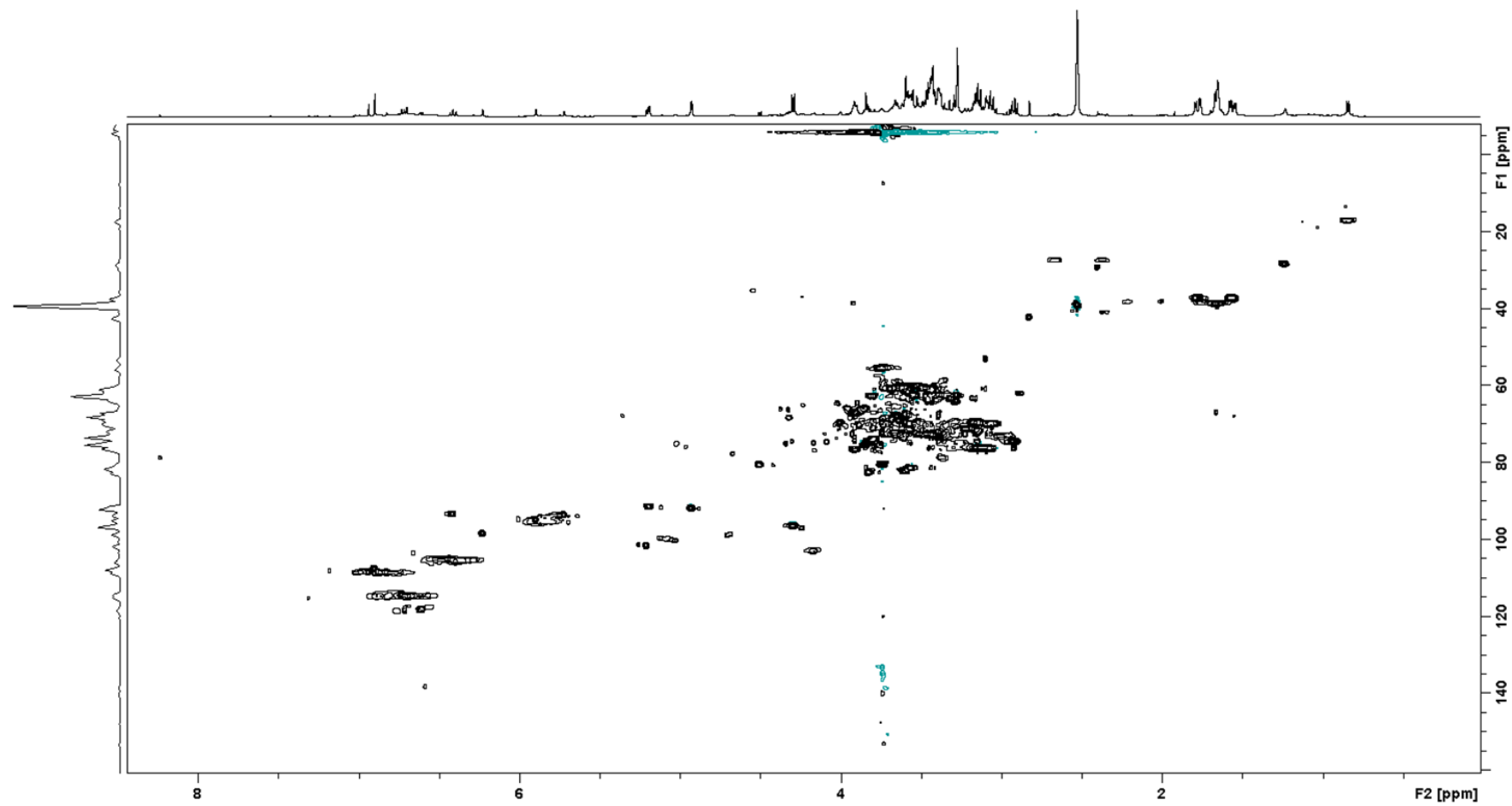
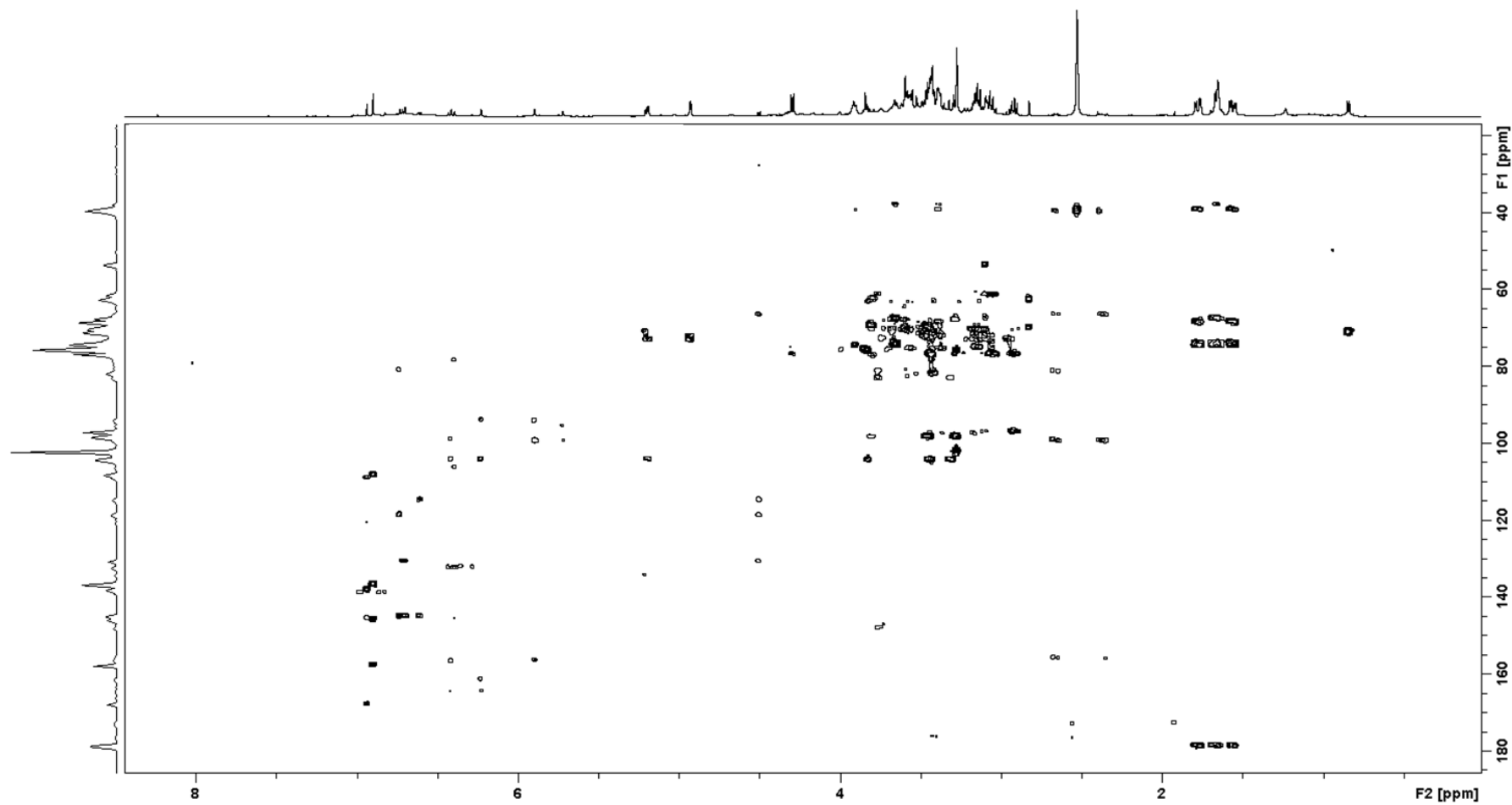


Figura S97

^1H - ^{13}H HMBC do extrato seco das folhas de *M. multiflora* (MmEAO) (11,74 T, $\text{DMSO}-d_6$).



Dados espectrométricos dos compostos por CLAE-EMAR do extrato seco das folhas de *Myrcia multiflora* (MmEAO)

Figura S98

Cromatograma de íons totais do extrato seco das folhas *M. multiflora* (MmEAO) por CLAE-IES-EMAR no modo negativo.

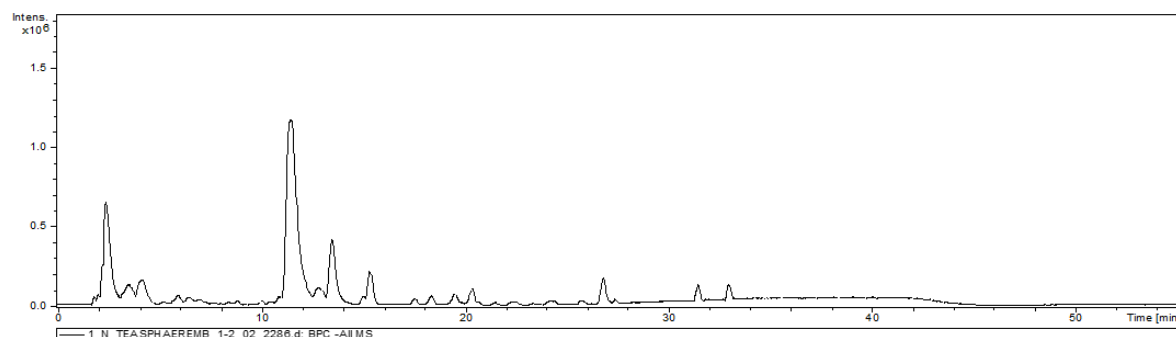


Figura S99

Pico no t_R 3,6 min, espectro de íon modo negativo e MS² de m/z 577,1386 (Procianidina tipo B, **6**).

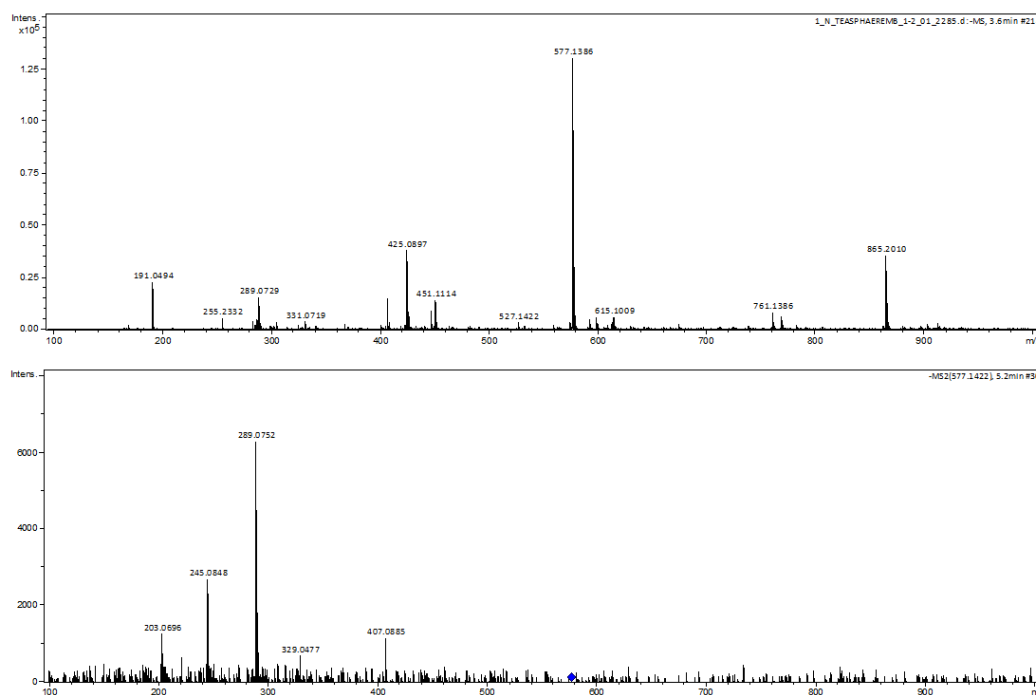


Figura S100

Pico no t_R 4,2 min, espectro de íon modo negativo de m/z 289,0733 (catequina, **8**).

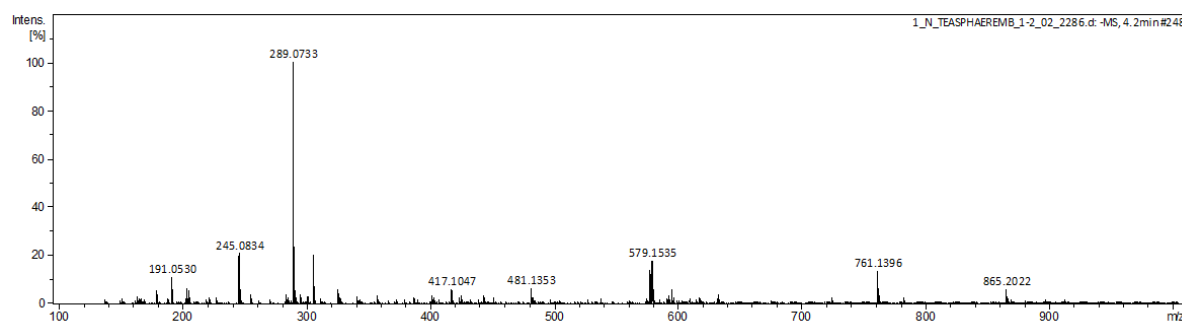


Figura S101

Pico no t_R 10,6 min, espectro de íon modo negativo e MS^2 de m/z 479,0857 (miricetina-3-*O*-glucosídeo, **16**).

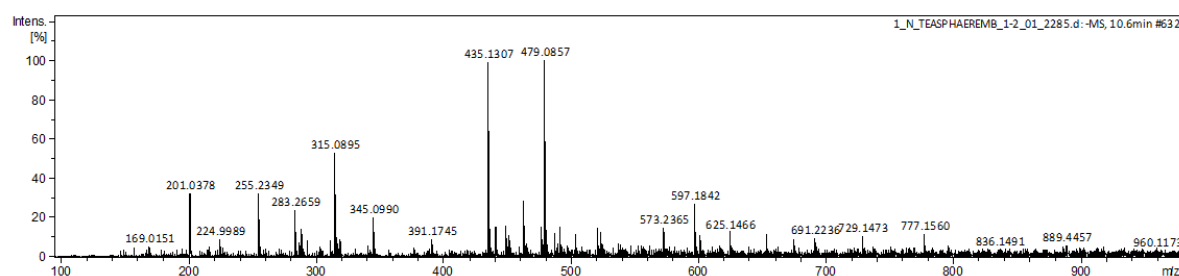


Figura S102

Pico no t_R 11,5 min, espectro de íon modo negativo e MS^2 de m/z 463,0893 (miricitrina, **19**).

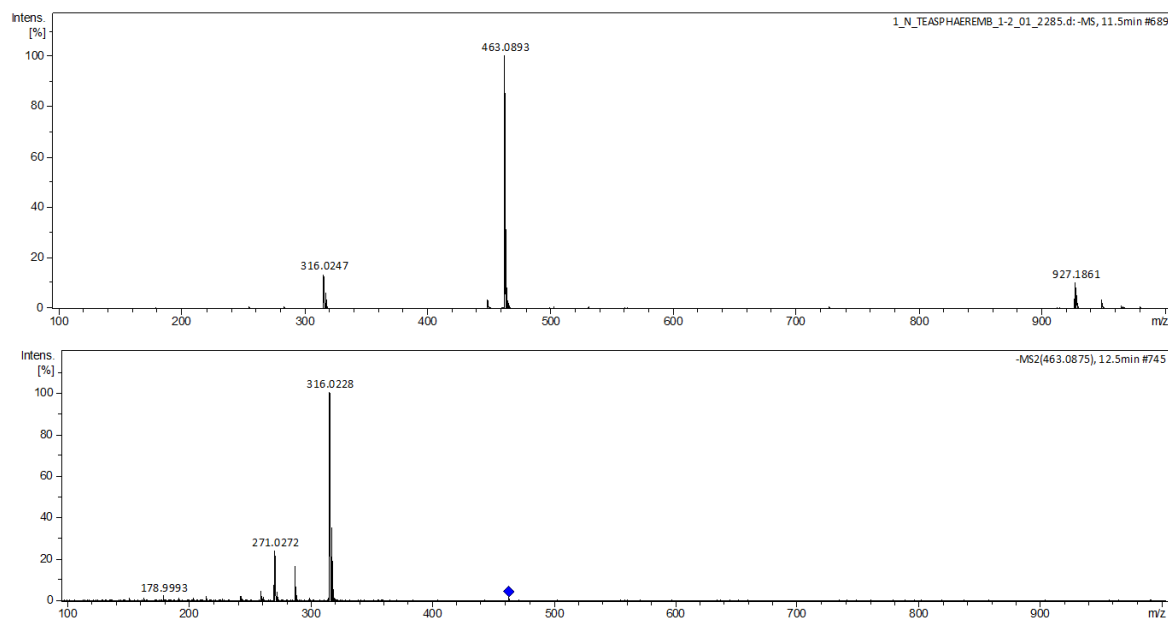


Figura S103

Pico no t_R 12,7 min, espectro de íon modo negativo e e MS^2 de m/z 433,0805 (guaijaverina, **21**).

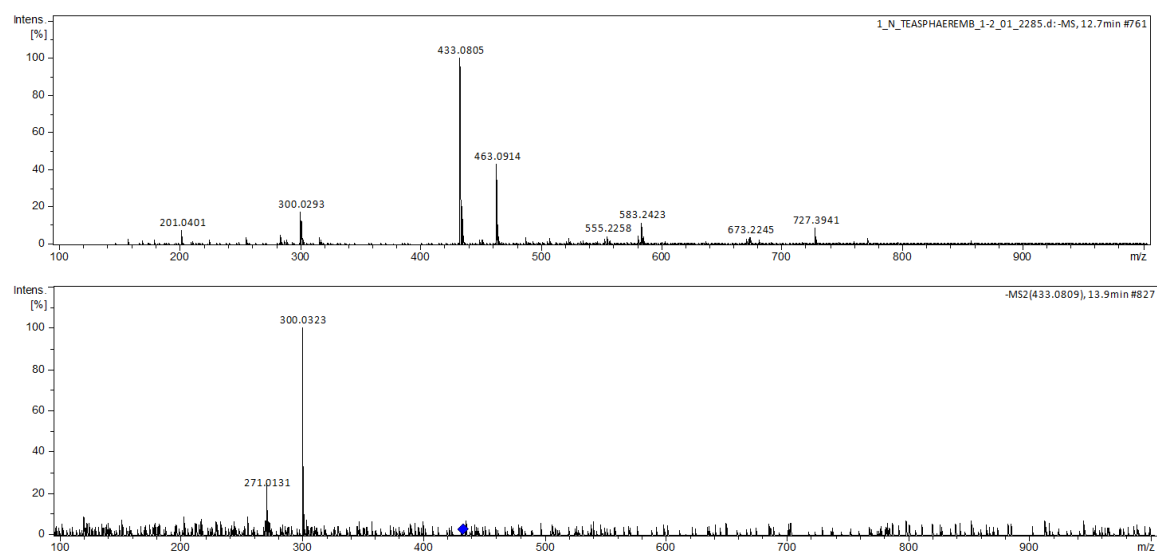


Figura S104

Pico no t_R 13,5 min, espectro de íon modo negativo e e MS^2 de m/z 447,0964 (quercitrina, **23**).

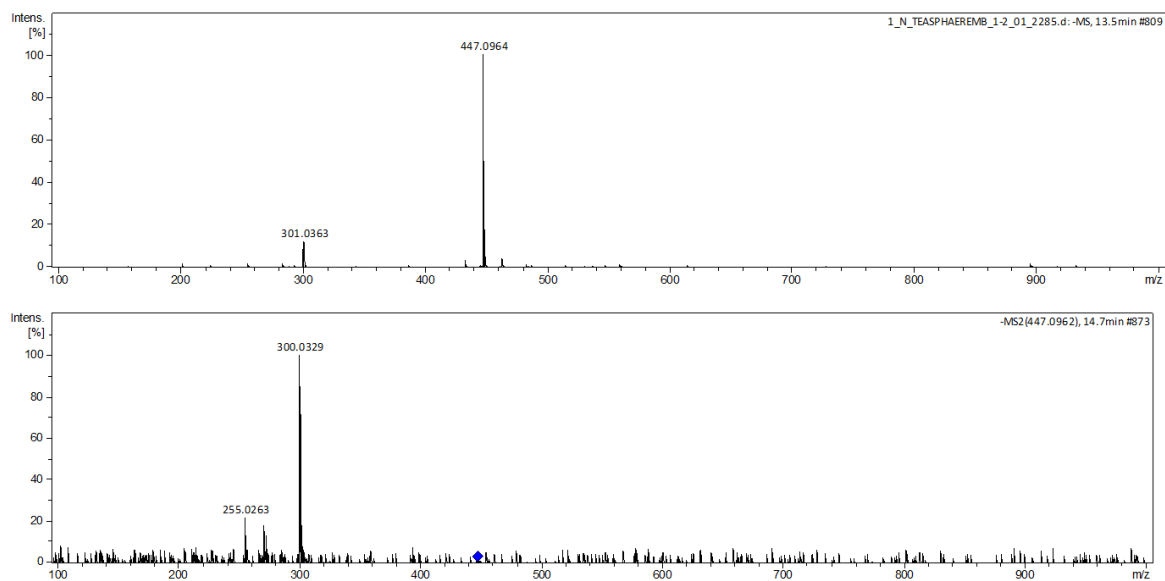
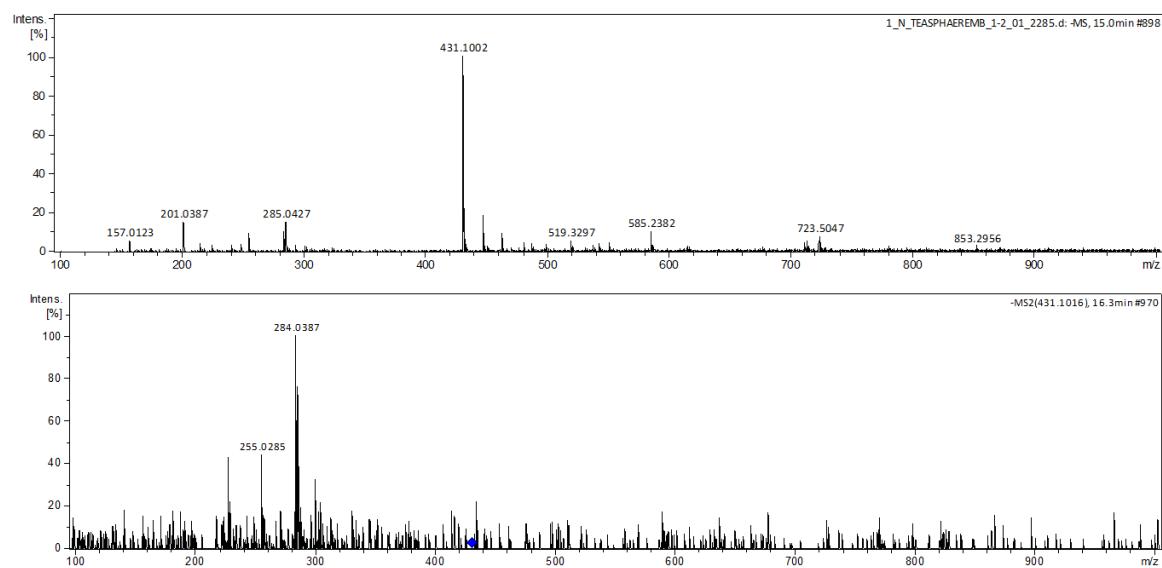


Figura S105

Pico no t_R 15,0 min, espectro de íon modo negativo e e MS^2 de m/z 431,1002 (kaempferol-3-*O*-ramnosídeo, **26**).



Análise por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear 1D e 2D
***Myrcia amazonica* (MamAPA)**

Figura S106

Espectro de RMN de ^1H do extrato seco das folhas de *M. amazonica* (MamAPA) (500 MHz, DMSO- d_6)

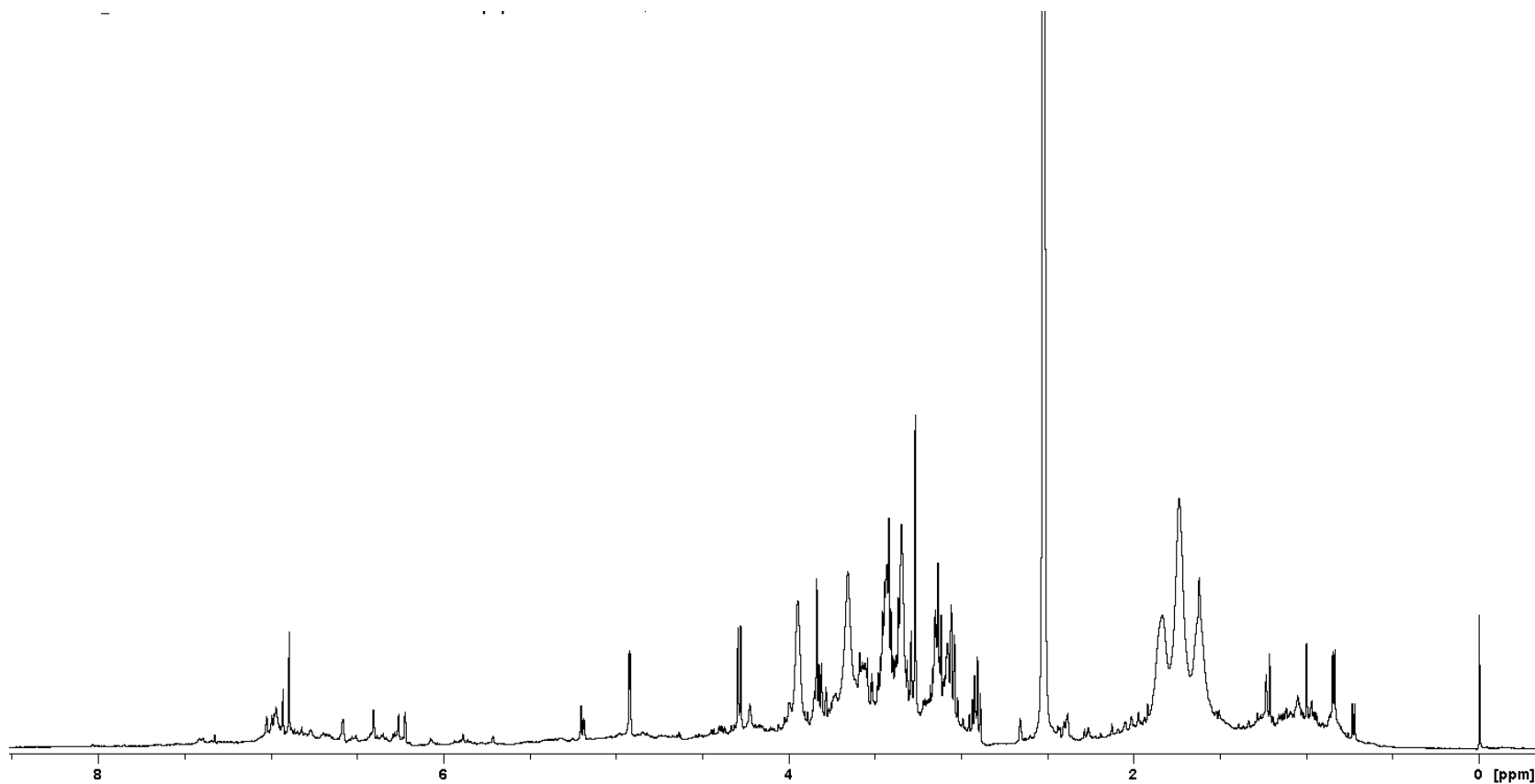


Figura S107

^1H - ^{13}H HSQC do extrato seco das folhas de *M. amazonica* (MamAPA) (11,74 T, $\text{DMSO}-d_6$)

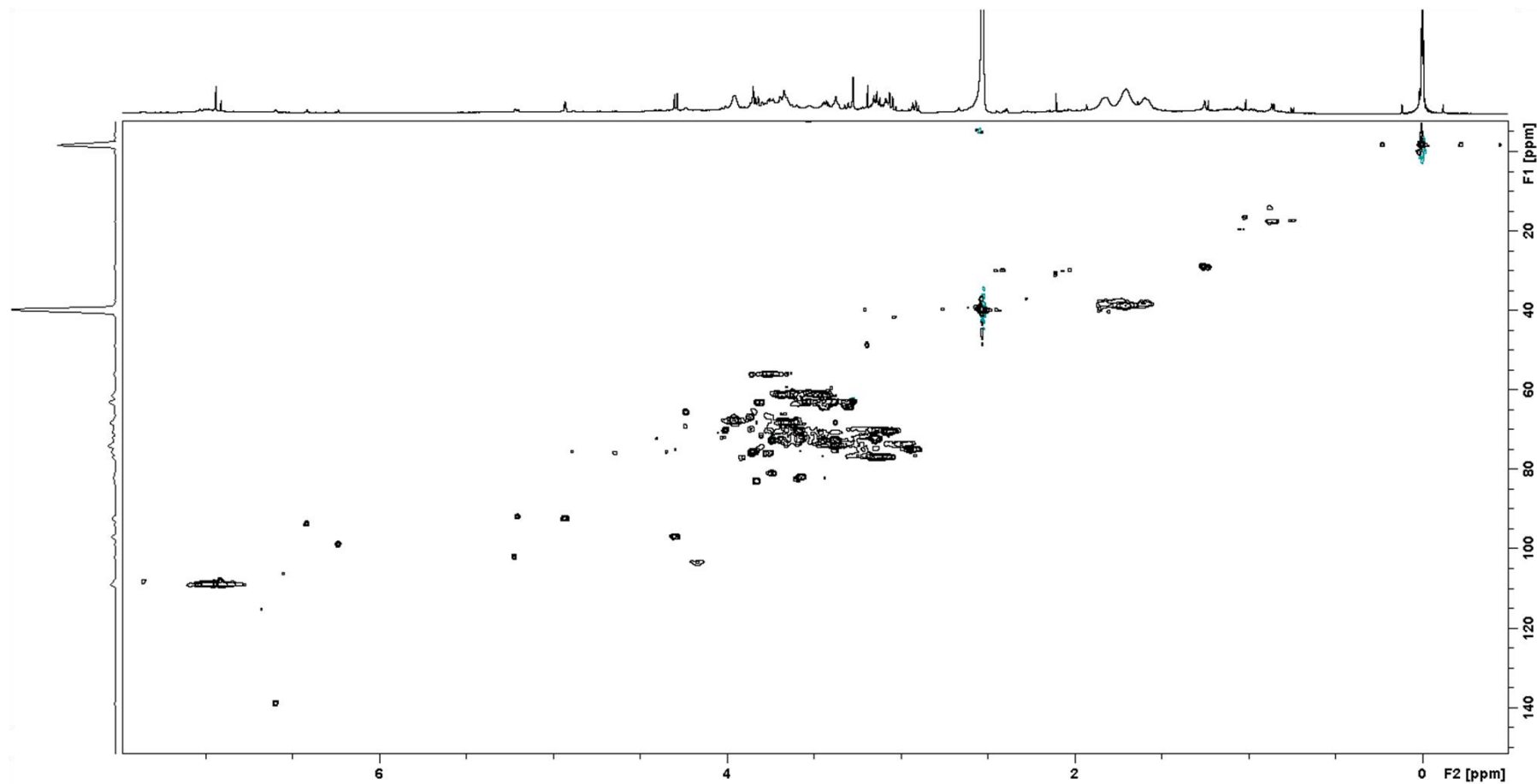
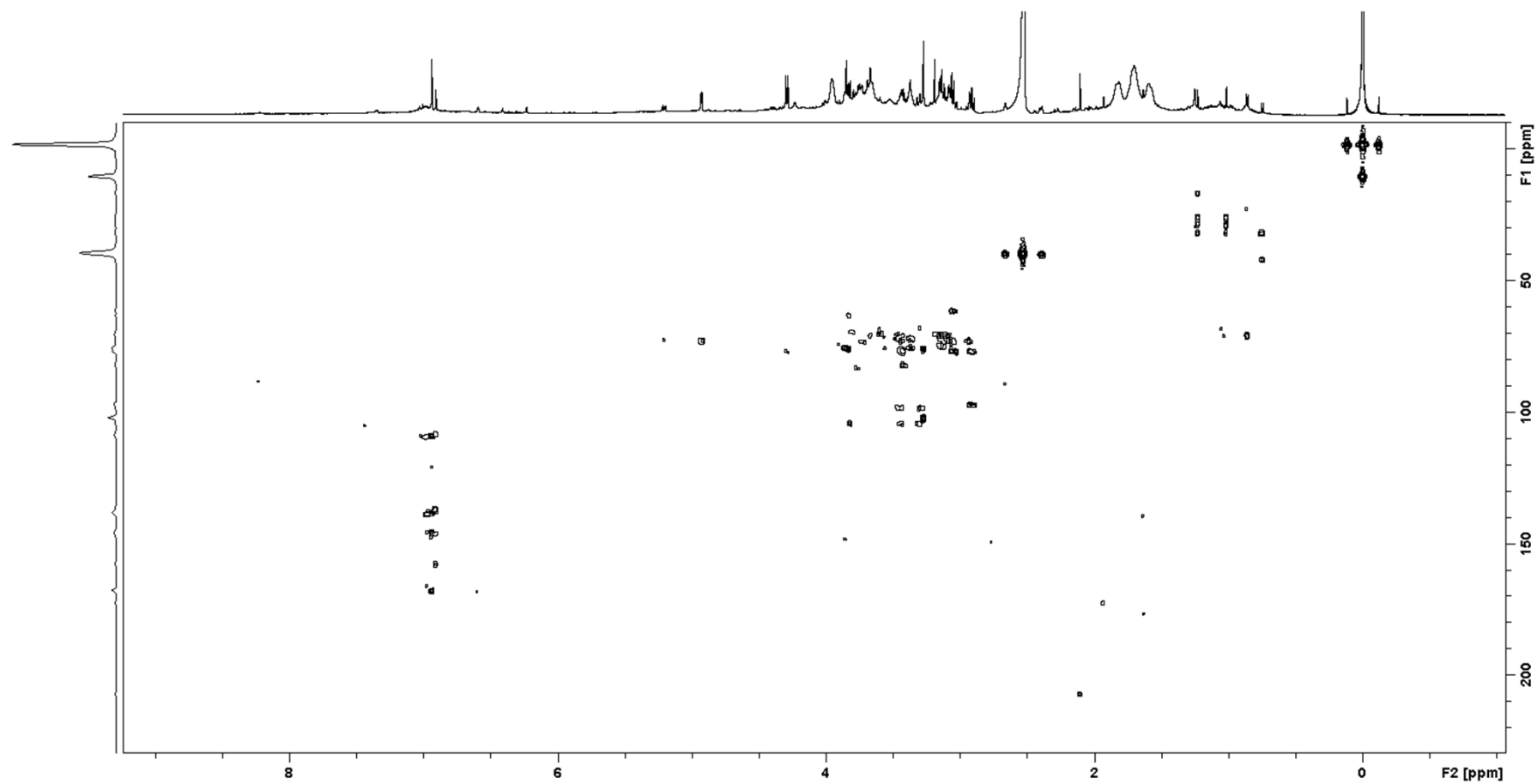


Figura S108

^1H - ^{13}H HMBC do extrato seco das folhas de *M. amazonica* (MamAPA) (11,74 T, DMSO- d_6)



Dados espectrométricos dos compostos por CLAE-EMAR do extrato seco das folhas de *Myrcia amazonica* (MamAPA)

Figura S109

Cromatograma de íons totais do extrato seco das folhas *M. amazonica* (MamAPA) por CLAE-IES-EMAR no modo negativo.

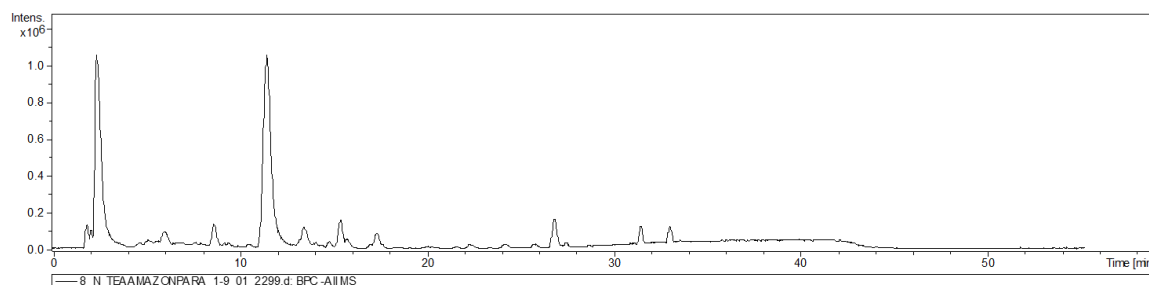


Figura S110

Pico no t_R 11,5 min, espectro de íon modo negativo e MS² de *m/z* 463,0925 (miricitrina, 19).

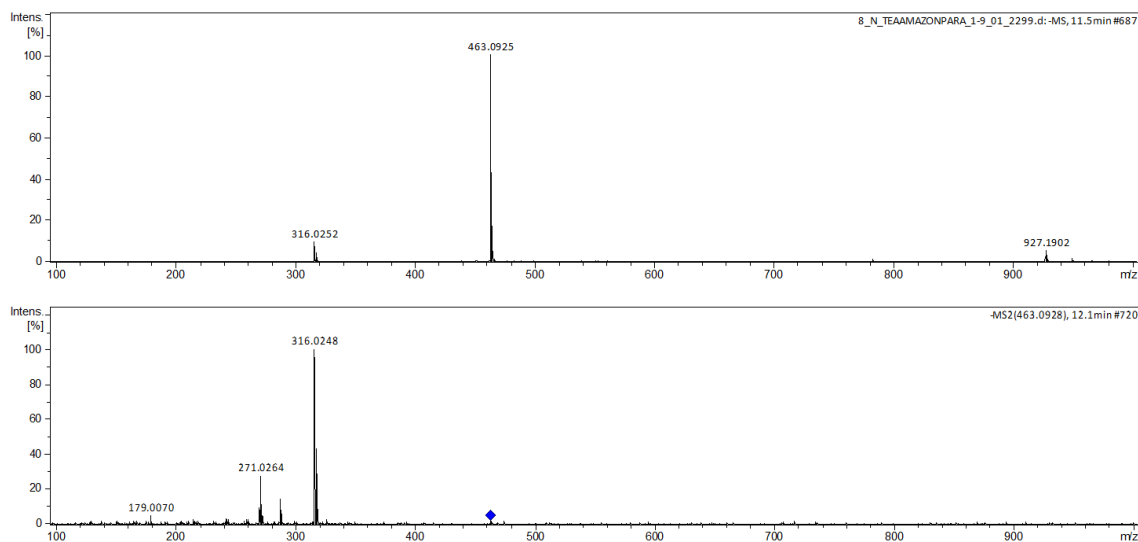
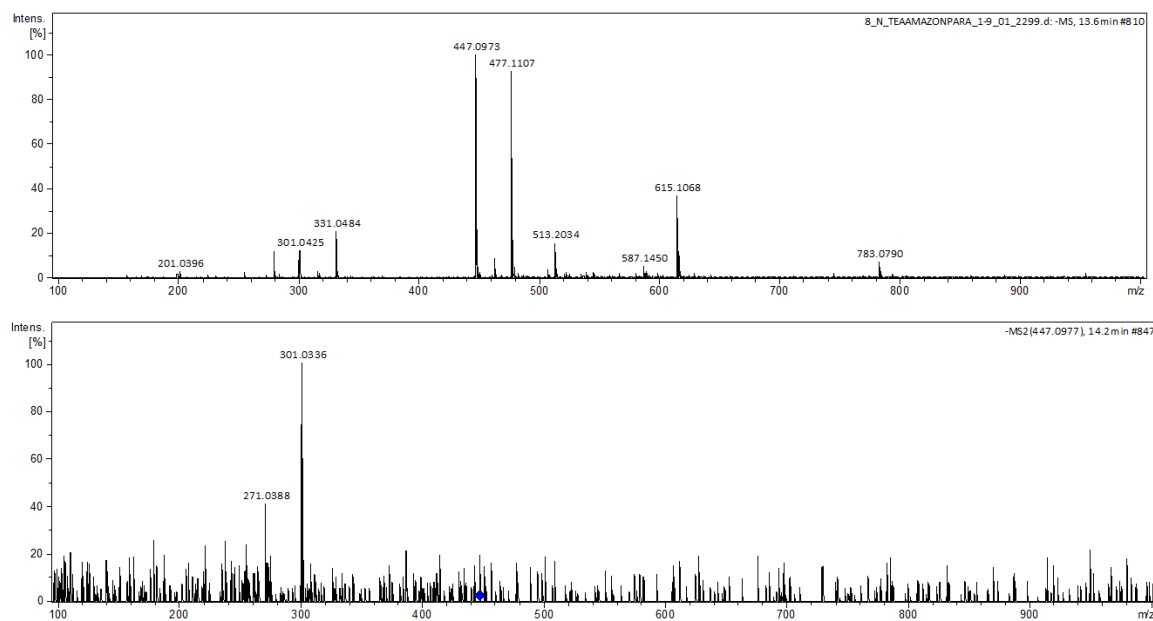


Figura S111

Pico no t_R 15,0 min, espectro de íon modo negativo e MS^2 de m/z 447,0973 (quercitrina, **23**).



Análise por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear 1D e 2D
***Myrcia guianensis* (MguAPA)**

Figura S112

Espectro de RMN de ^1H do extrato seco das folhas de *M. guianensis* (MguAPA) (500 MHz, DMSO- d_6).

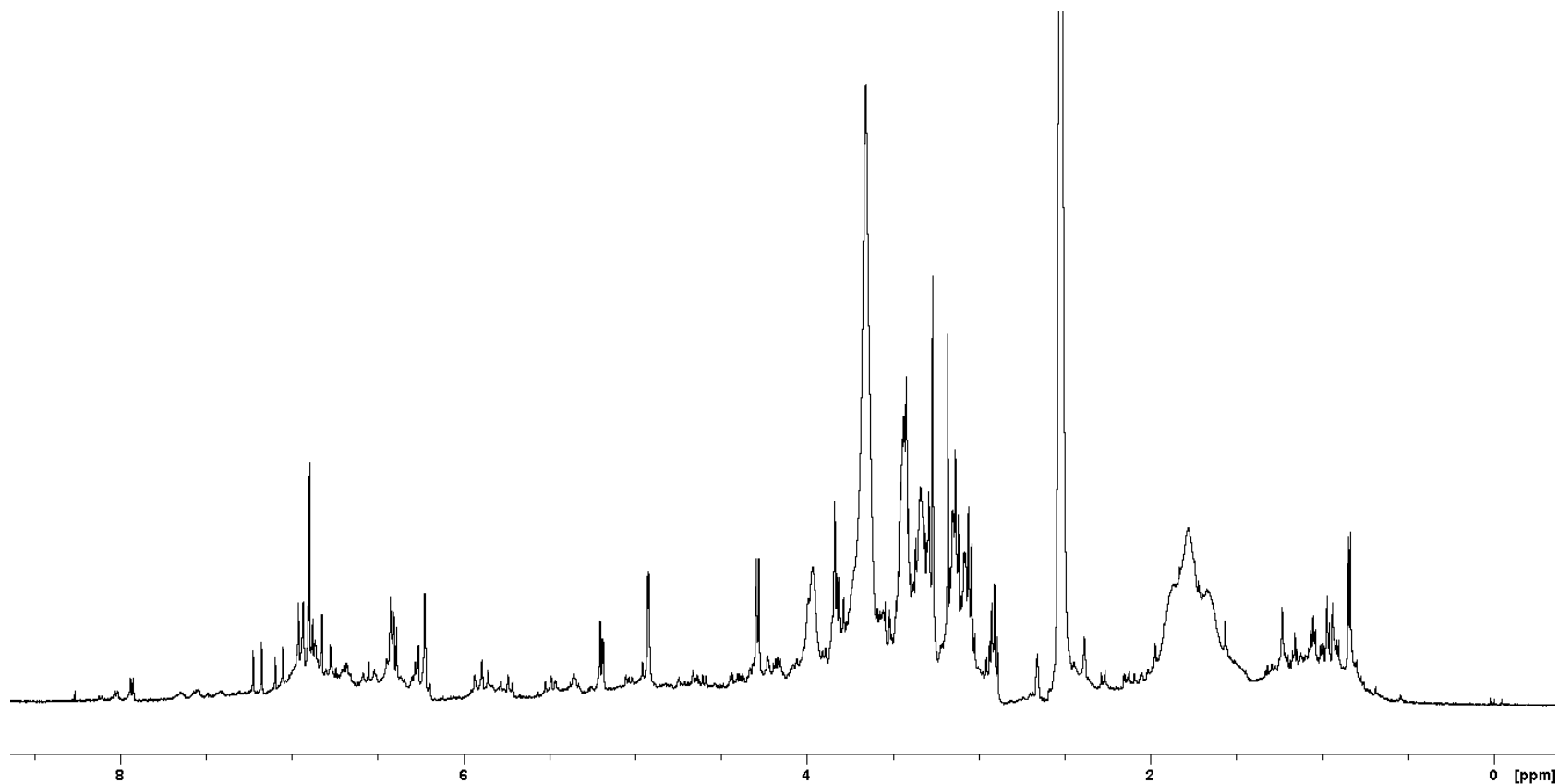


Figura S113

^1H - ^{13}H HSQC do extrato seco das folhas de *M. guianensis* (MguAPA) (11,74 T, $\text{DMSO}-d_6$).

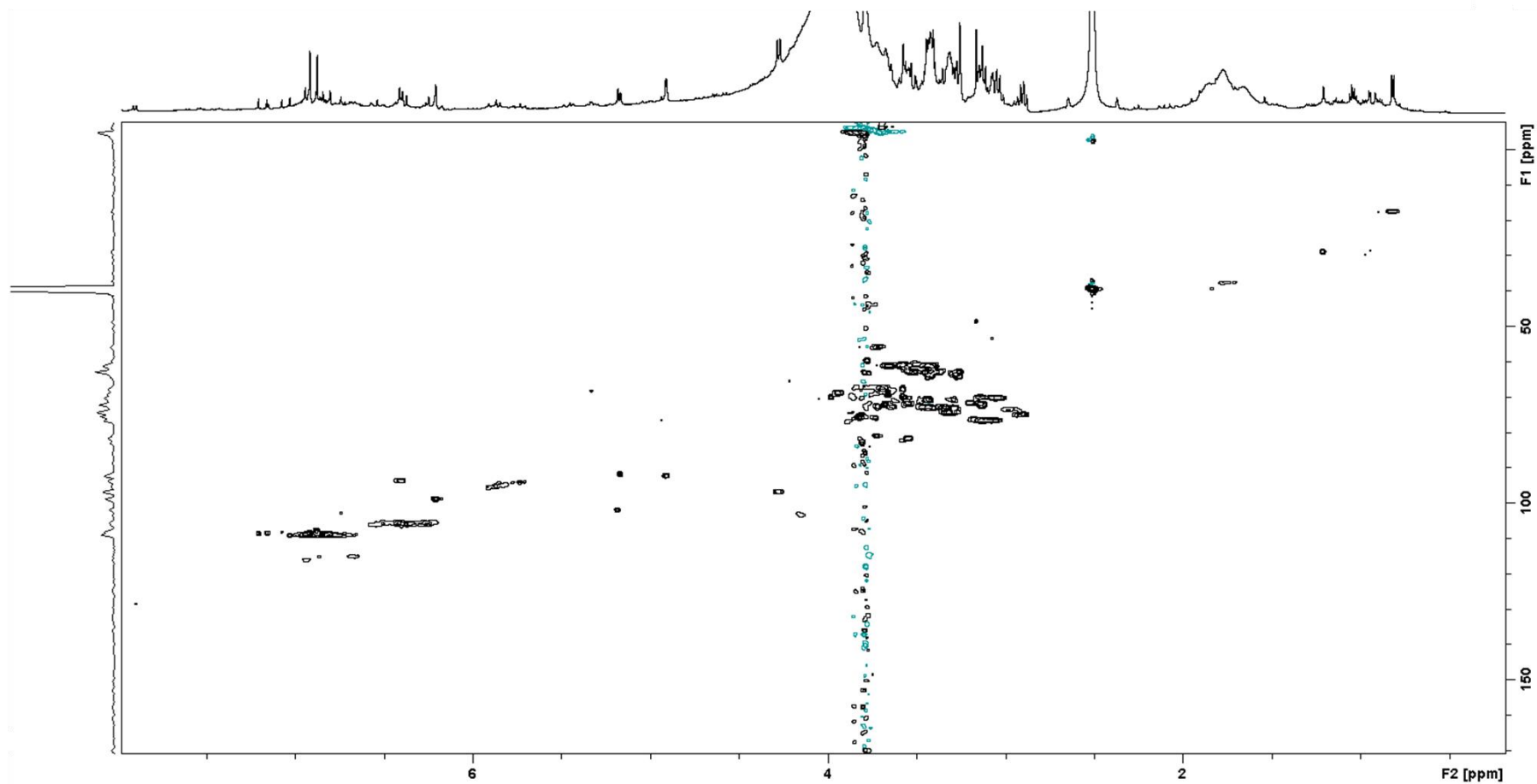
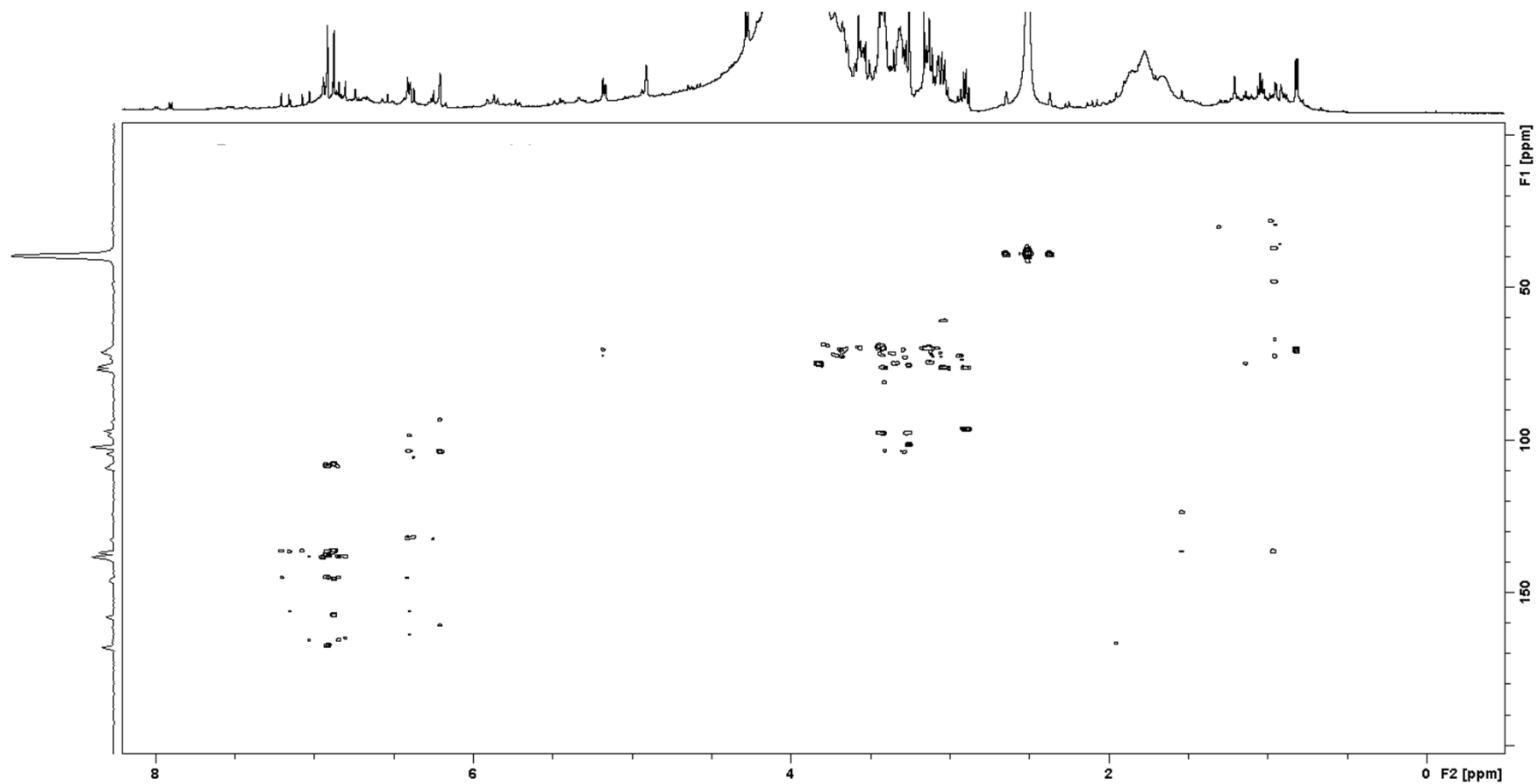


Figura S114

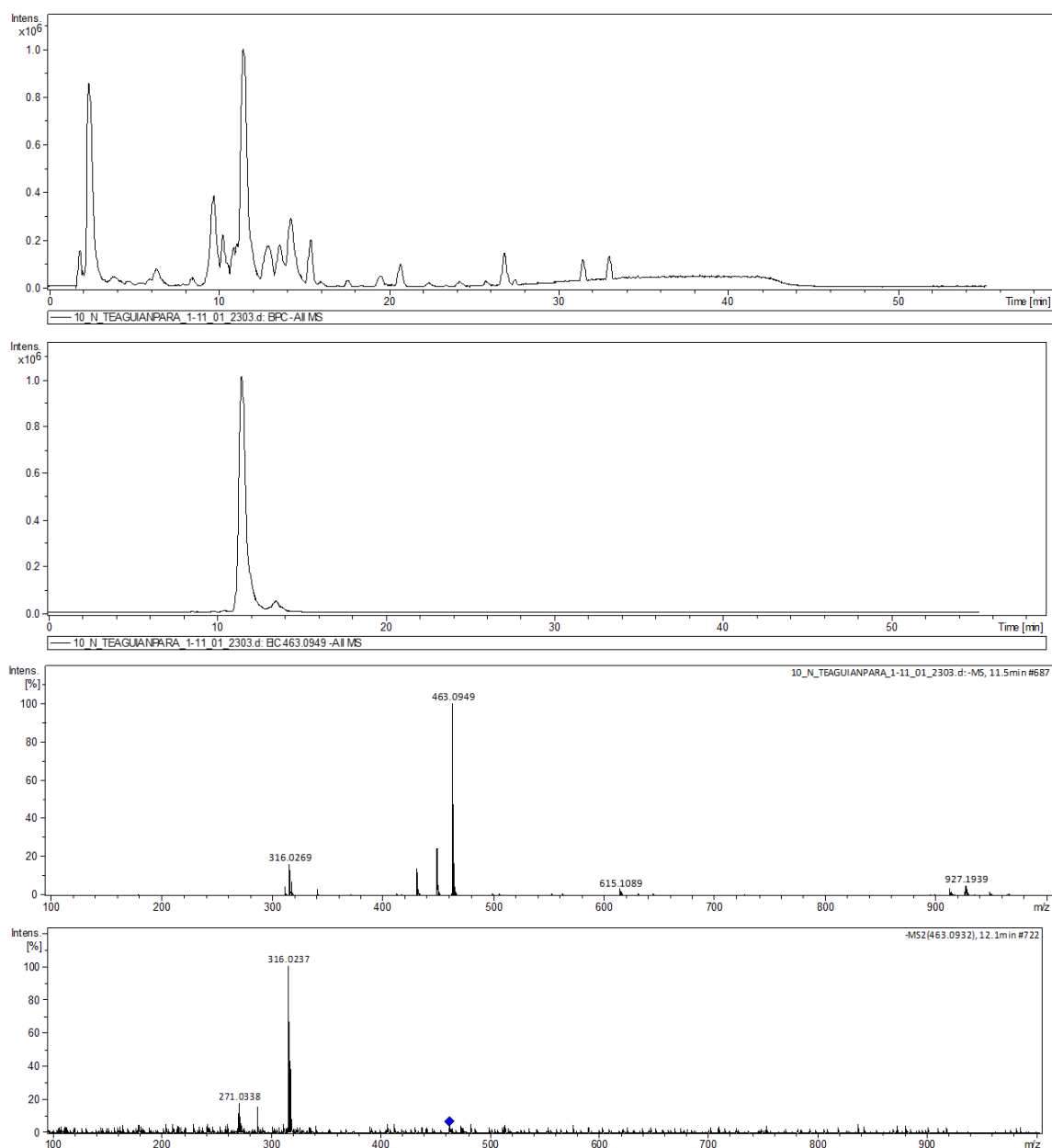
^1H - ^{13}H HMBC do extrato seco das folhas de *M. guianensis* (MguAPA) (11,74 T, $\text{DMSO}-d_6$)



Dados espectrométricos dos compostos por CLAE-EMAR do extrato seco das folhas de *Myrcia guianensis* (MguAPA)

Figura S115

Cromatograma de íons totais do extrato seco das folhas *M. guianensis* (MguAPA) por CLAE-IES-EMAR no modo negativo e pico no t_R 11,5 min, espectro de íon modo negativo e MS^2 de m/z 463,0949 (miricitrina, **19**).



Análise por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear 1D e 2D
***Myrcia sylvatica* (MsylAPA)**

Figura S116

Espectro de RMN de ^1H do extrato seco das folhas de *M. sylvatica* (MsylAPA) (500 MHz, DMSO- d_6).

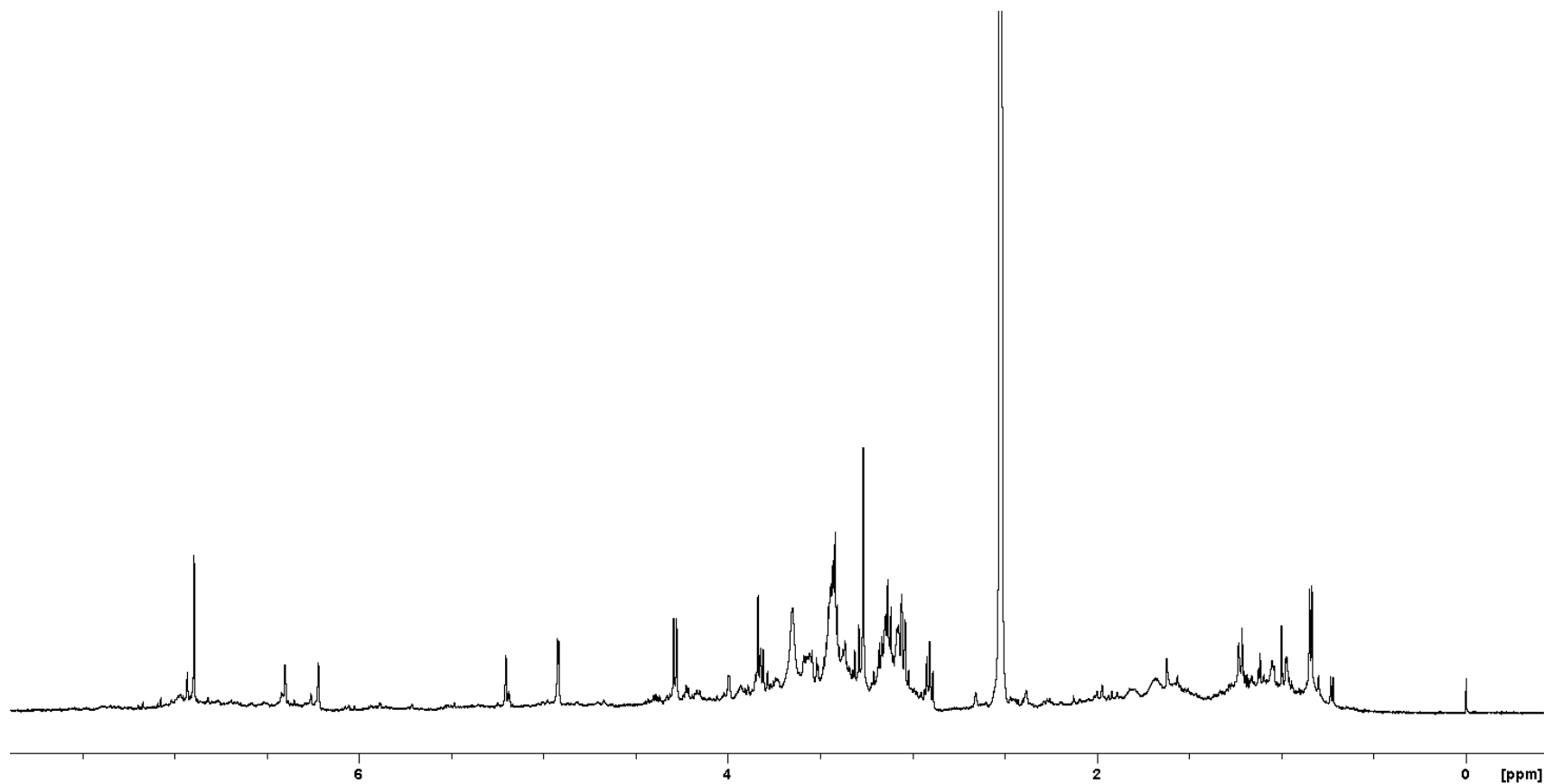


Figura S117

^1H - ^{13}H HSQC do extrato seco das folhas de *M. sylvatica* (MsylAPA) (11,74 T, $\text{DMSO}-d_6$)

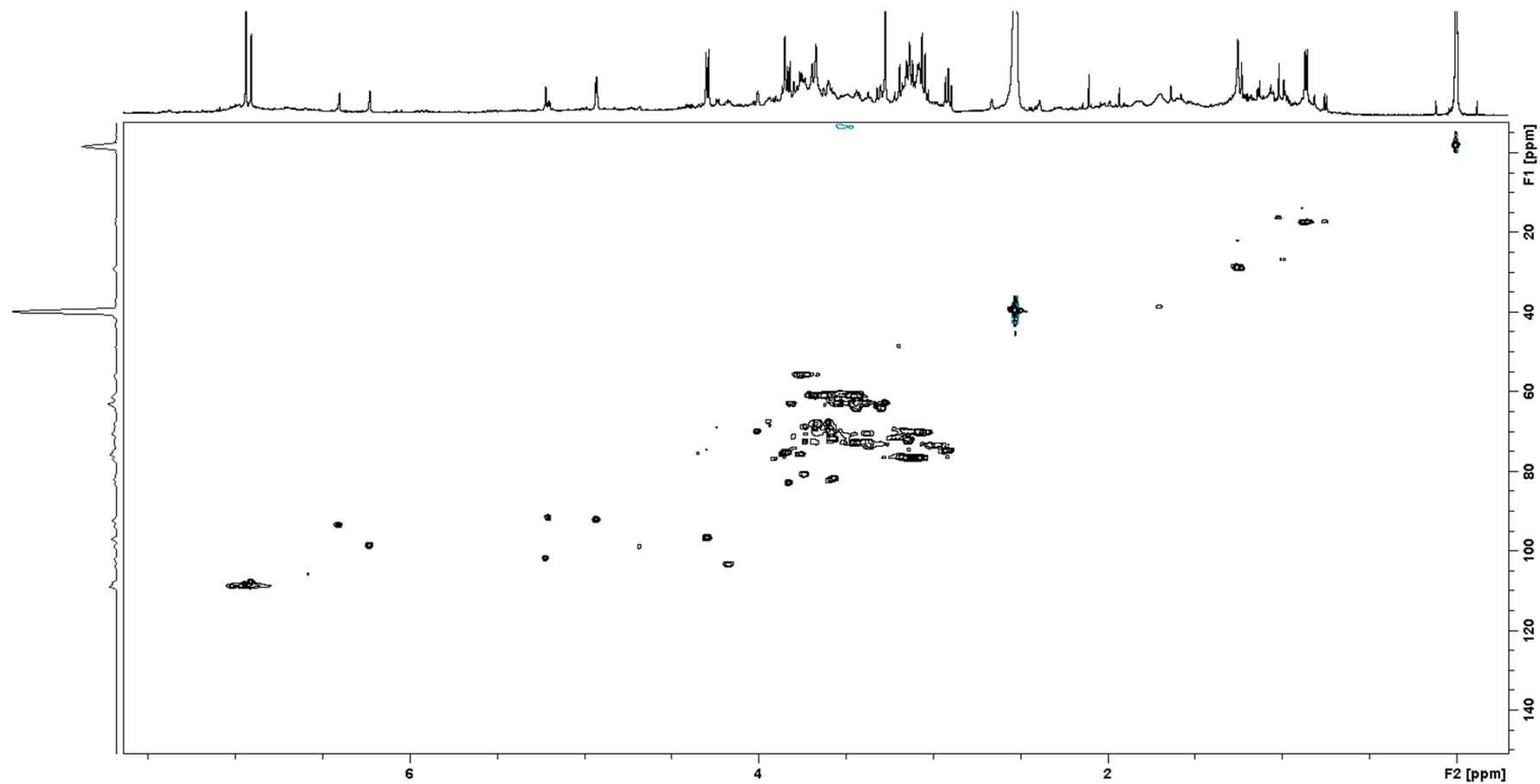
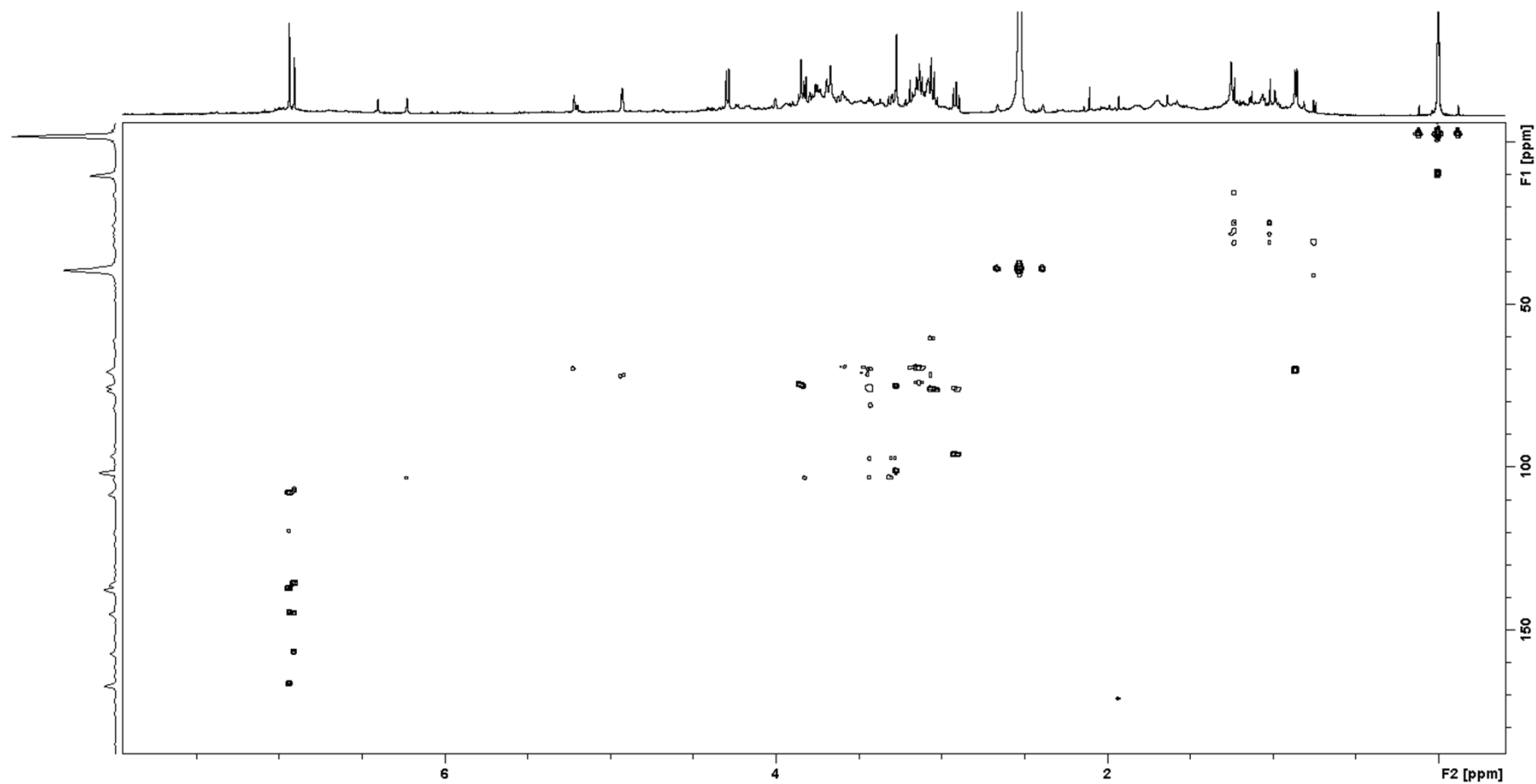


Figura S118

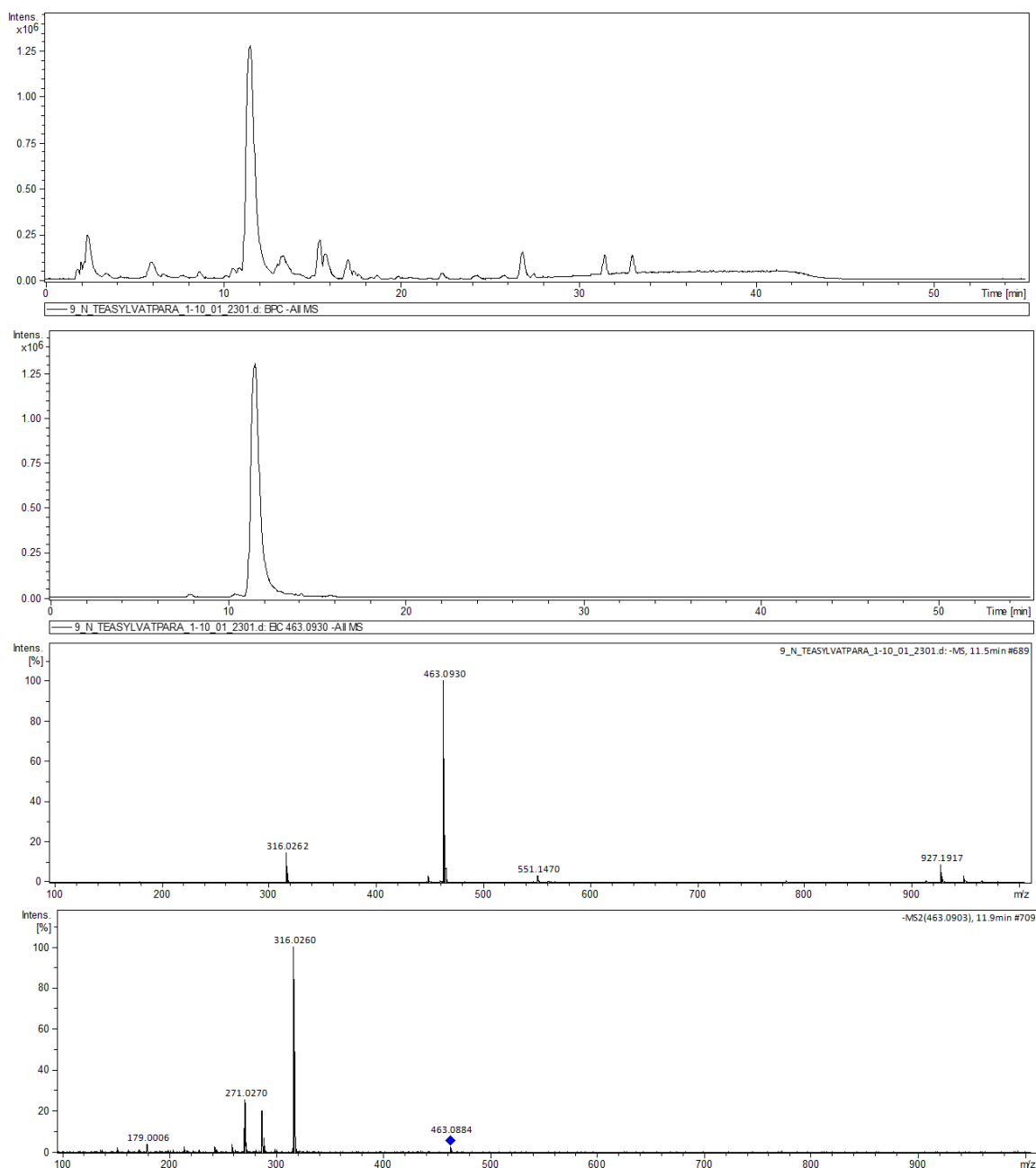
^1H - ^{13}H HMBC do extrato seco das folhas de *M. sylvatica* (MsylAPA) (11,74 T, $\text{DMSO}-d_6$)



Dados espectrométricos dos compostos por CLAE-EMAR do extrato seco das folhas de *Myrcia sylvatica* (MsylAPA)

Figura S119

Cromatograma de íons totais do extrato seco das folhas *M. sylvatica* (MsylAPA) por CLAE-IES-EMAR no modo negativo e pico no t_R 11,5 min, espectro de íon modo negativo e MS^2 de m/z 463,0930 (miricitrina, **19**).



Análise por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear 1D e 2D

Myrcia sylvatica (MsylRAD)

Figura S120

Espectro de RMN de ^1H do extrato seco das folhas de *M. sylvatica* (MsylRAD) (500 MHz, DMSO- d_6).

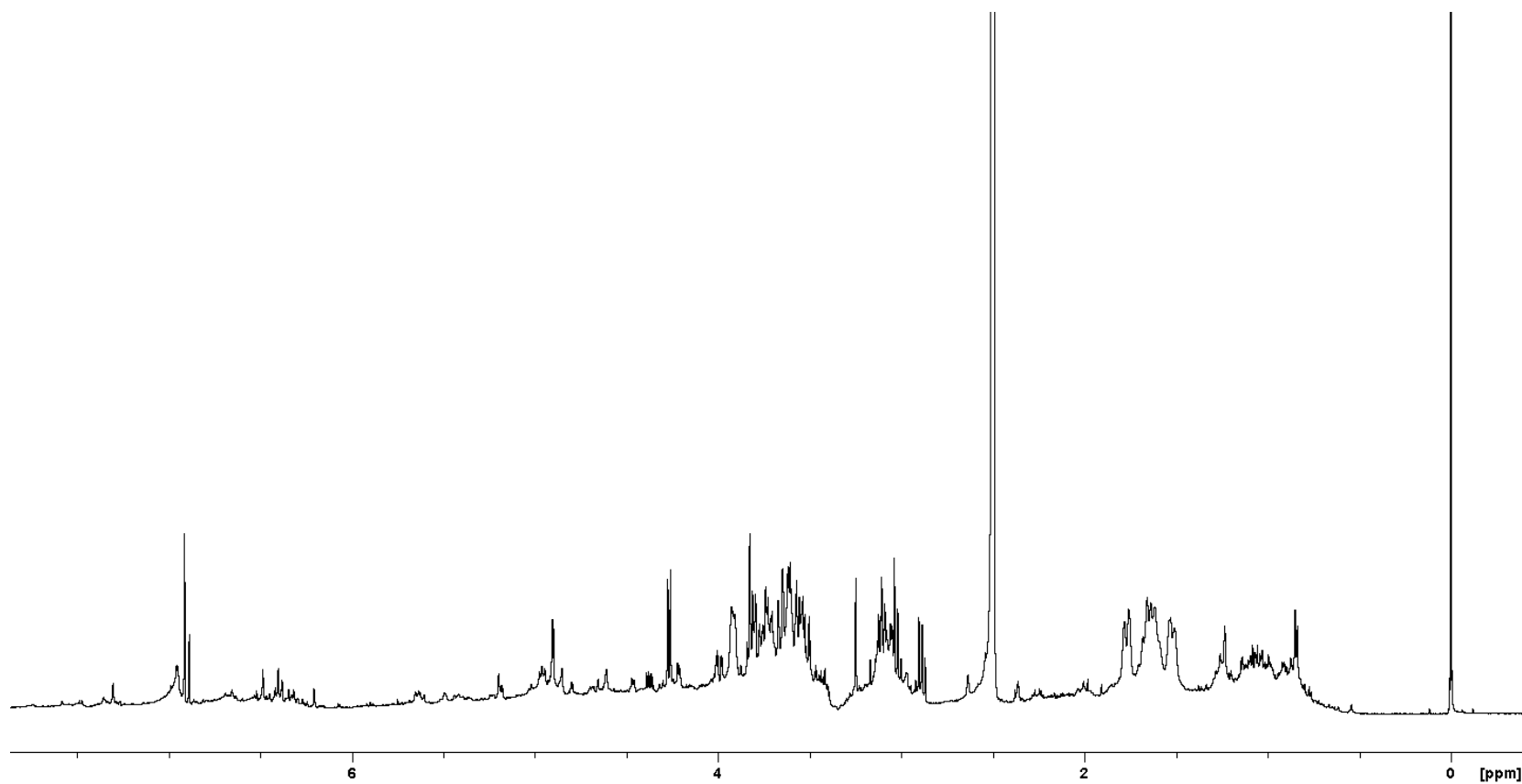


Figura S121

^1H - ^{13}H HSQC do extrato seco das folhas de *M. sylvatica* (MsylRAD) (11,74 T, DMSO- d_6)

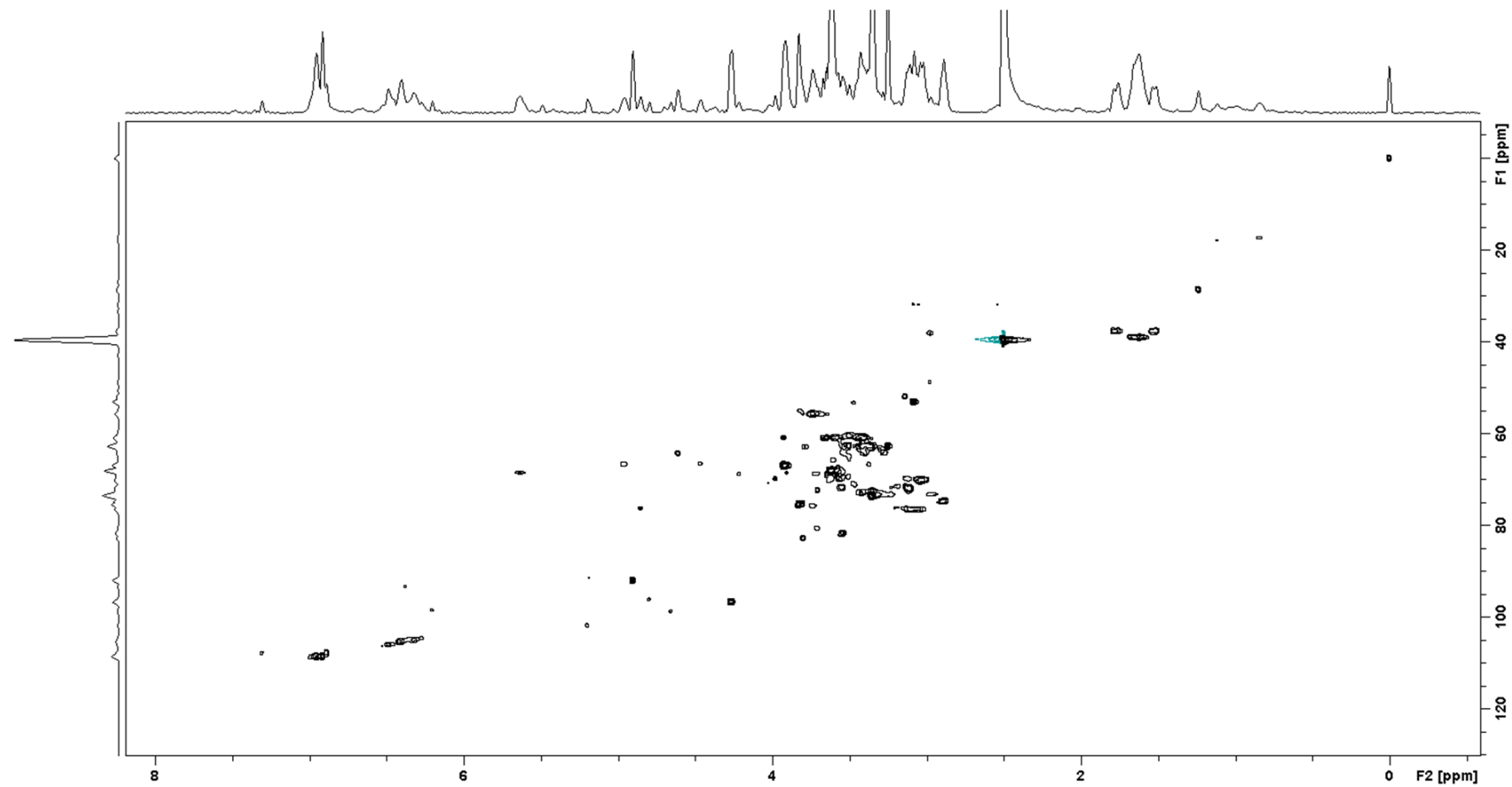
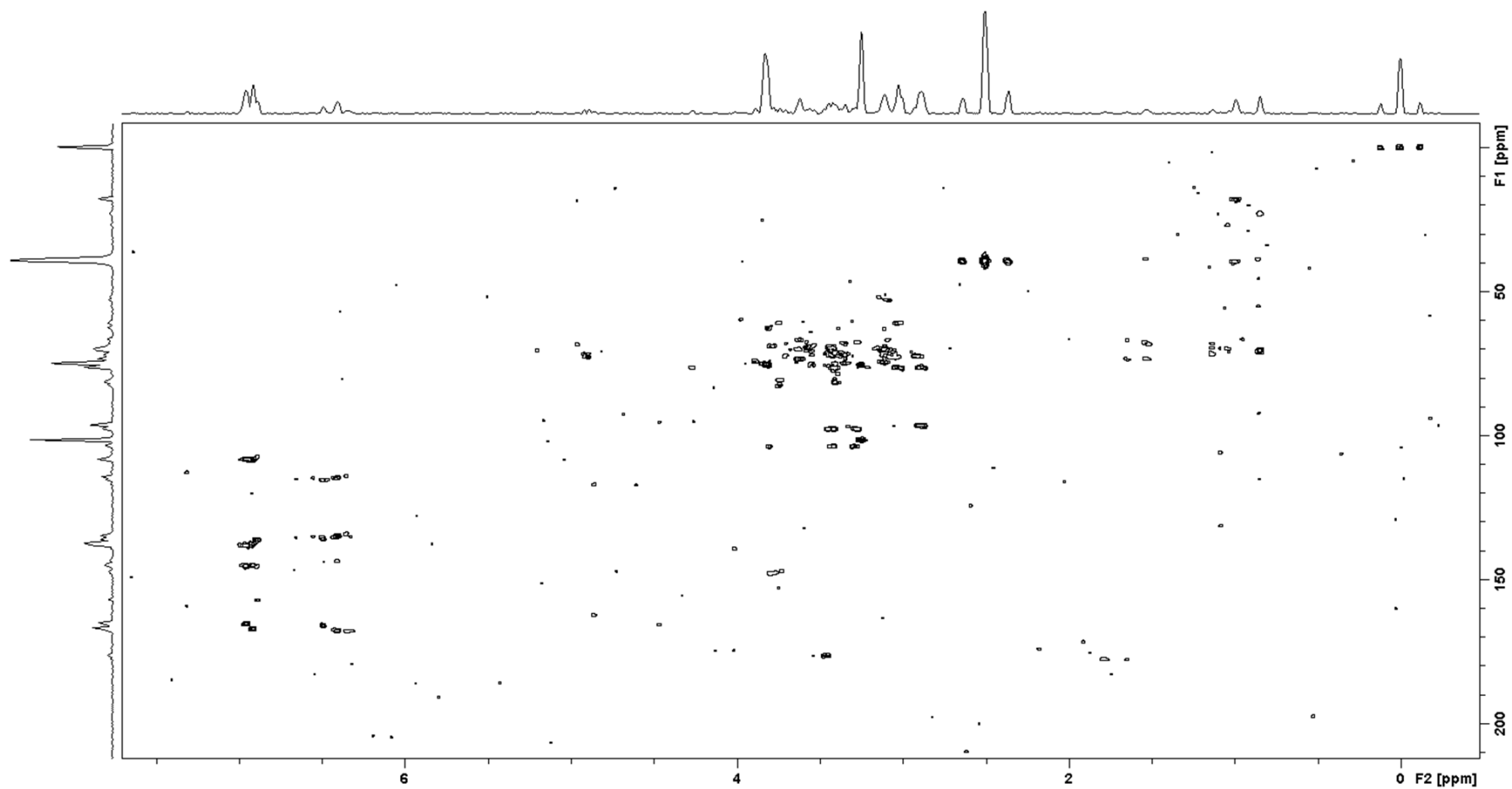


Figura S122

^1H - ^{13}H HMBC do extrato seco das folhas de *M. sylvatica* (MsysRAD) (11,74 T, $\text{DMSO}-d_6$)



Dados espectrométricos dos compostos por CLAE-EMAR do extrato seco das folhas de *Myrcia sylvatica* (MsylRAD)

Figura S123

Cromatograma de íons totais do extrato seco das folhas *M. sylvatica* (MsylRAD) por CLAE-IES-EMAR no modo negativo e pico no t_R 11,5 min, espectro de íon modo negativo e MS² de m/z 463,0930 (miricitrina, **19**).

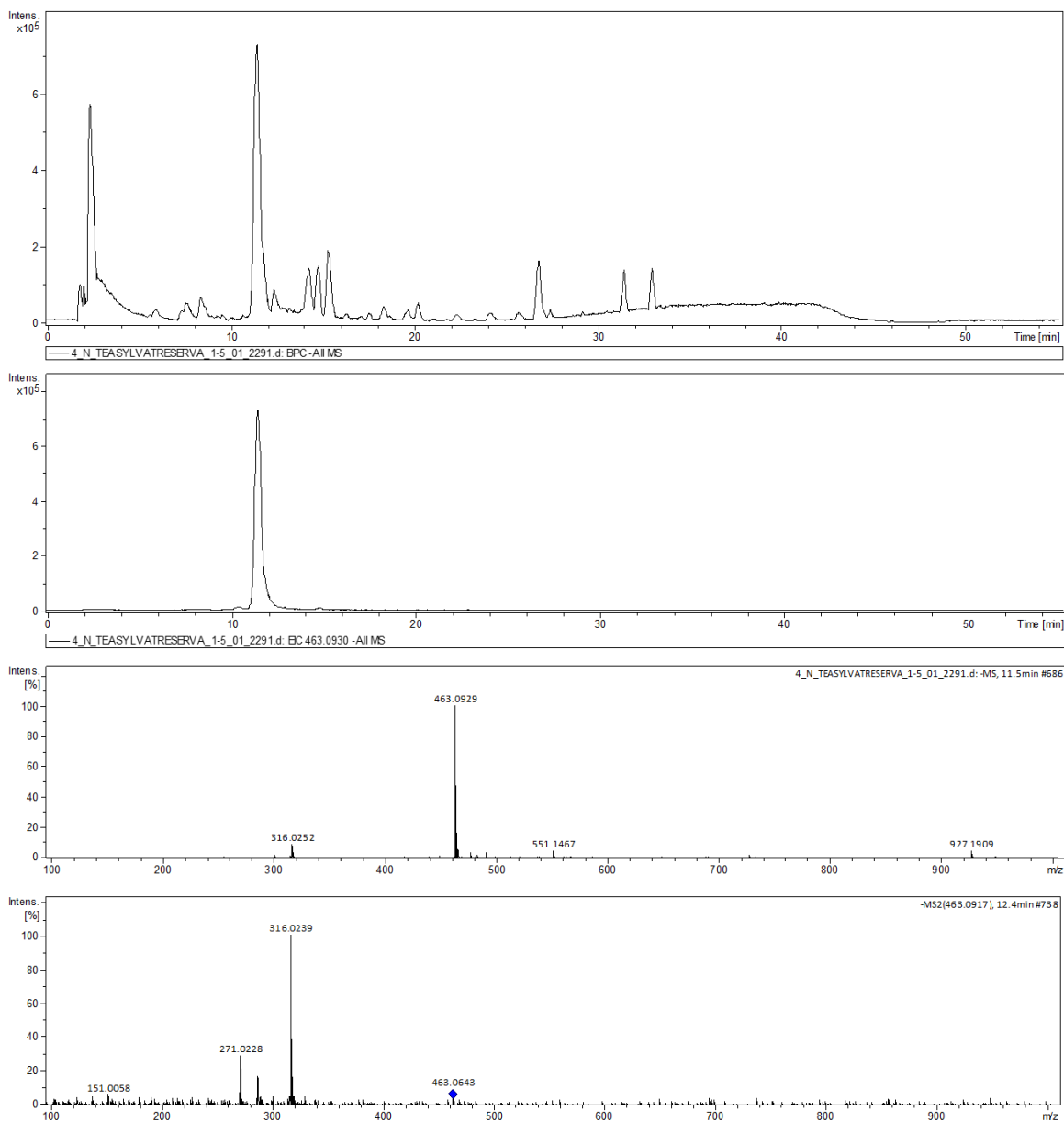
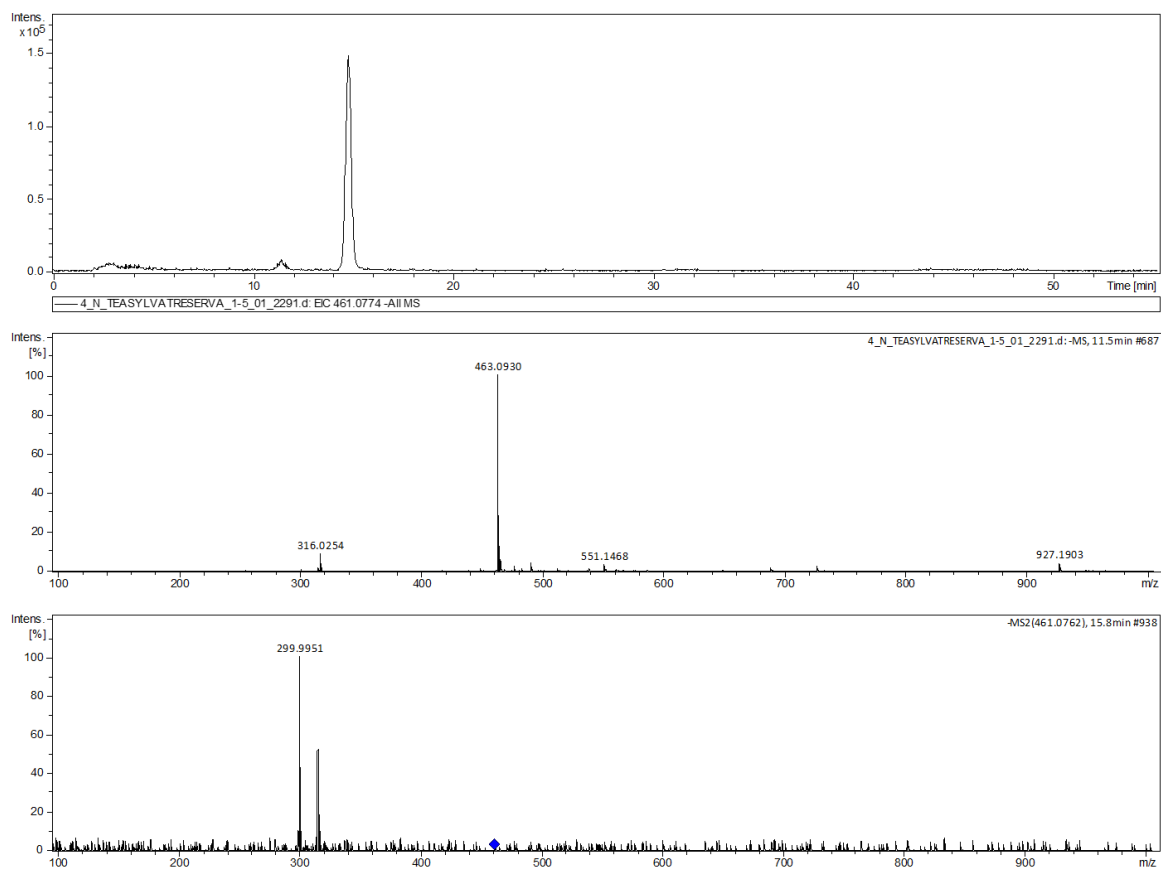


Figura S124

Pico no t_R 14,9 min, espectro de íon modo negativo e MS^2 de m/z 461,0774 (ácido metil elágico ramnosídeo, **25**).



Análise por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear 1D e 2D

Eugenia biflora (EbAPA)

Figura S125

Espectro de RMN de ^1H do extrato seco das folhas de *E. biflora* (EbAPA) (500 MHz, DMSO- d_6)

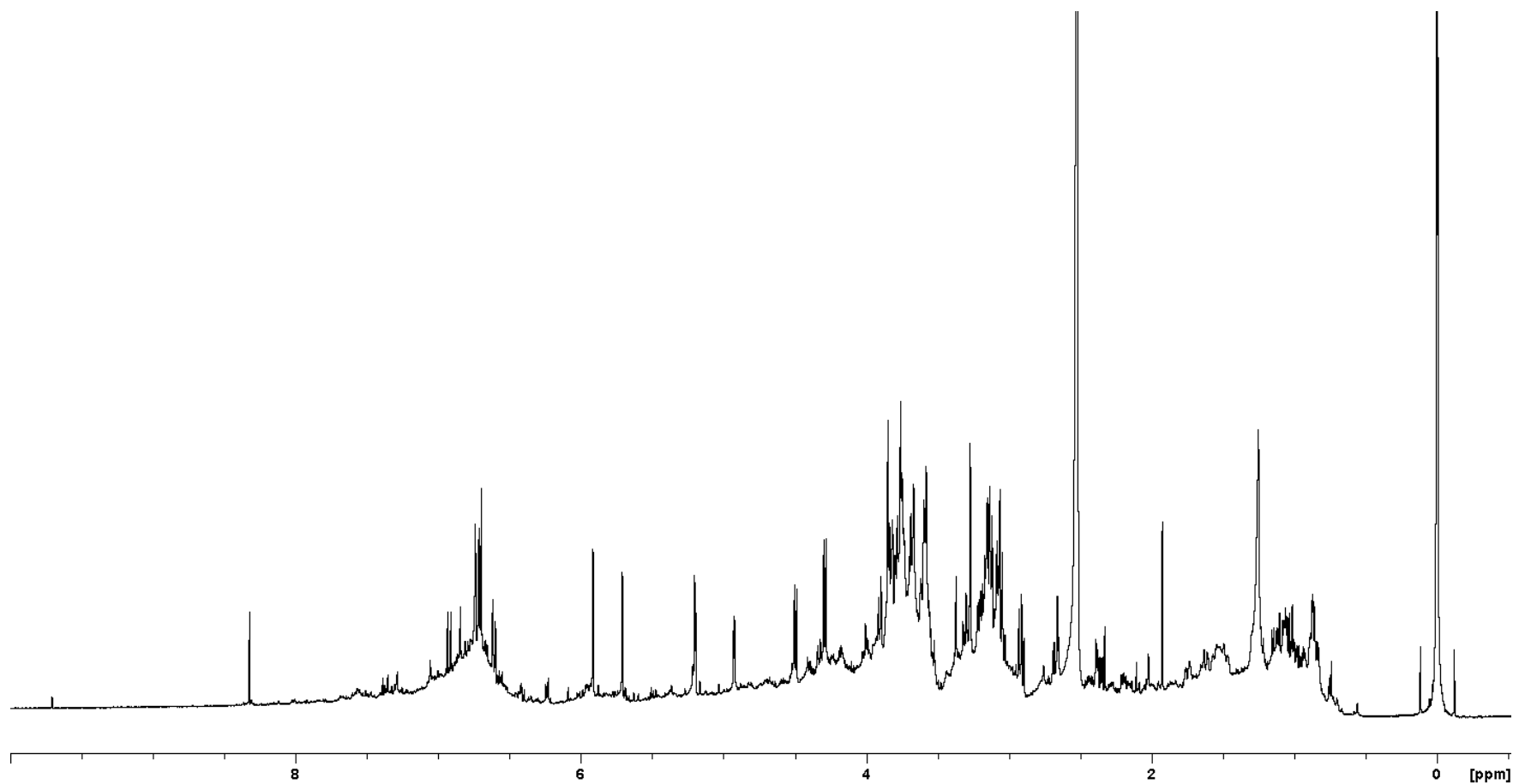


Figura S126

^1H - ^{13}H HSQC do extrato seco das folhas de *E. biflora* (EbAPA) (11,74 T, DMSO- d_6)

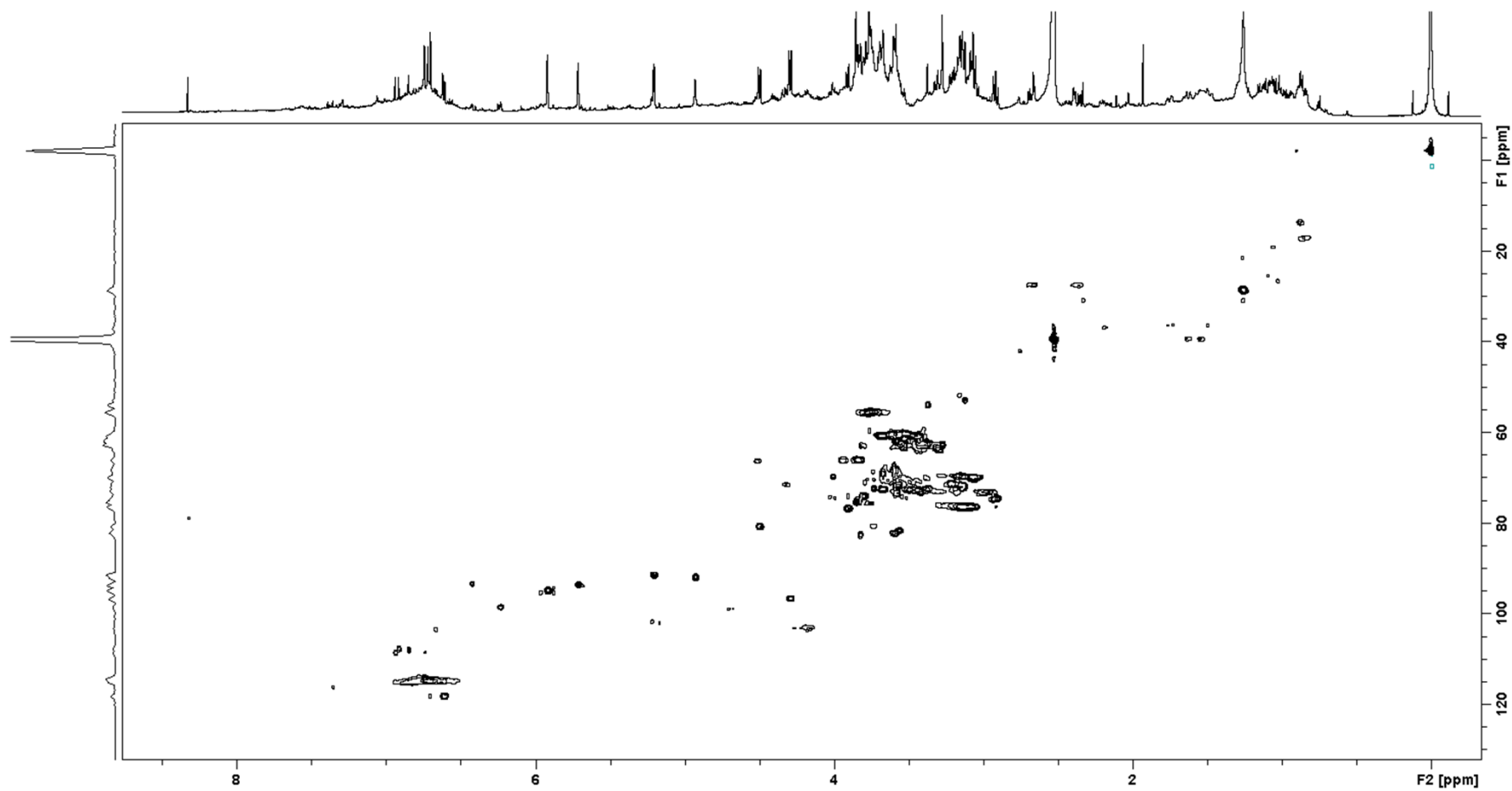
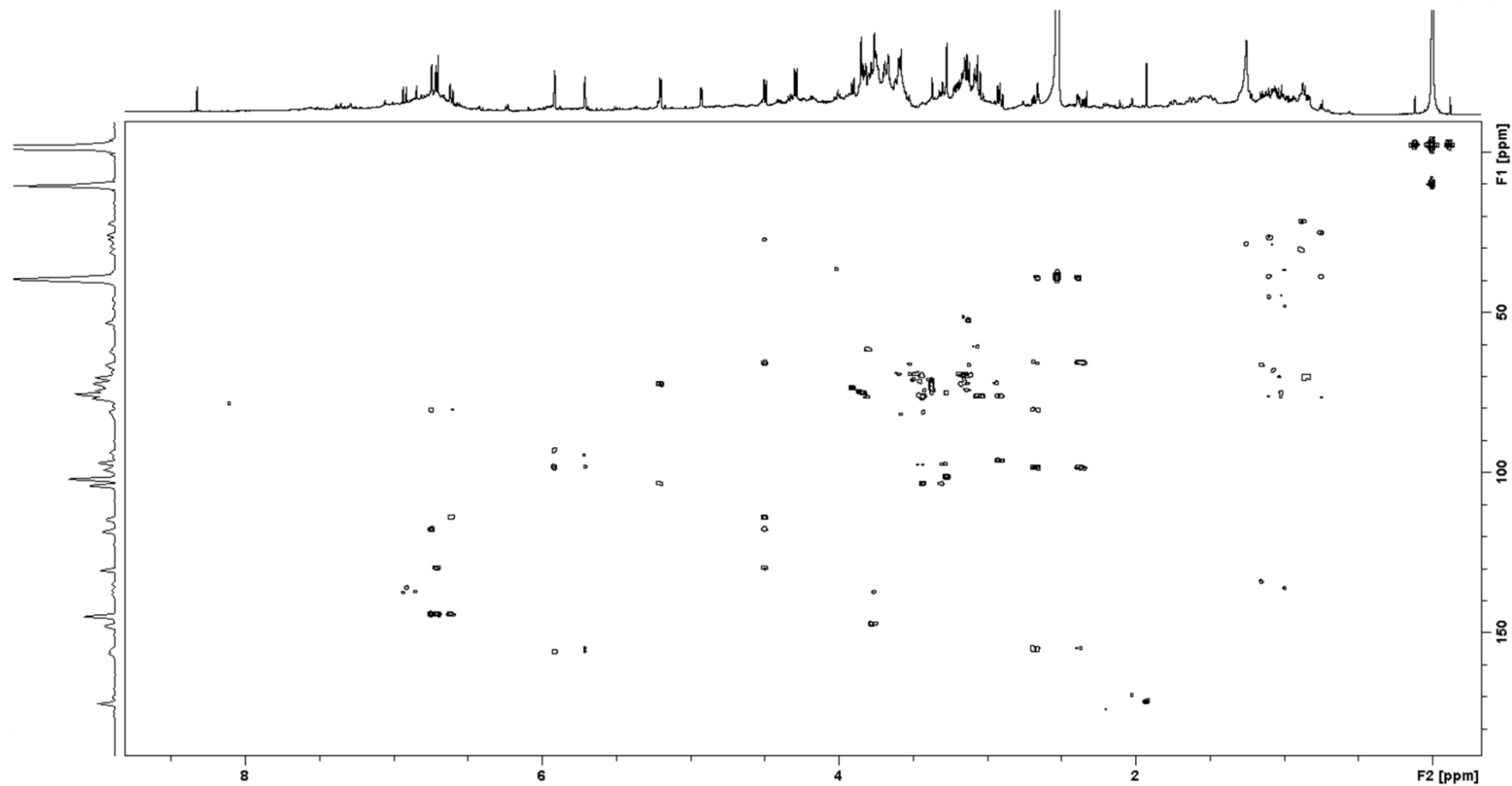


Figura S127

^1H - ^{13}H HMBC do extrato seco das folhas de *E. biflora* (EbAPA) (11,74 T, $\text{DMSO}-d_6$)



Dados espectrométricos dos compostos por CLAE-EMAR do extrato seco das folhas de *Eugenia biflora* (EbAPA)

Figura S128

Cromatograma de íons totais do extrato seco das folhas *E. biflora* (EbAPA) por CLAE-IES-EMAR

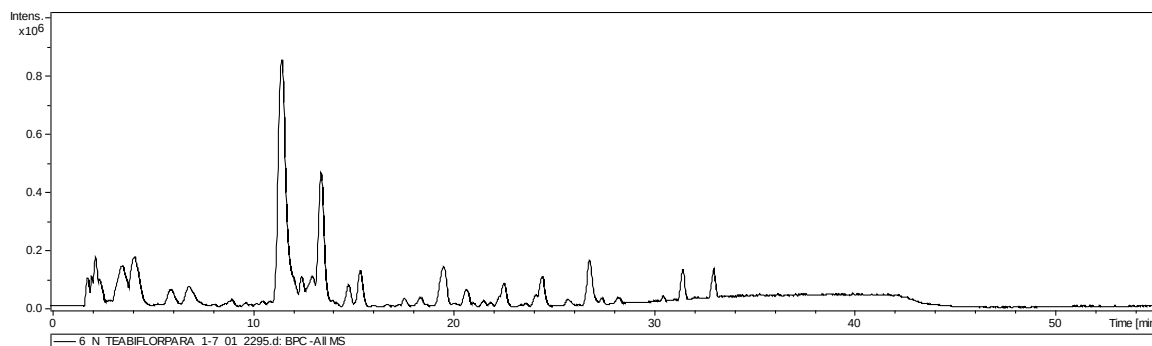


Figura S129

Pico no t_R 3,6 min, espectro de íon modo negativo e MS^2 de m/z 577,1376 (procianidina tipo B, **6**)

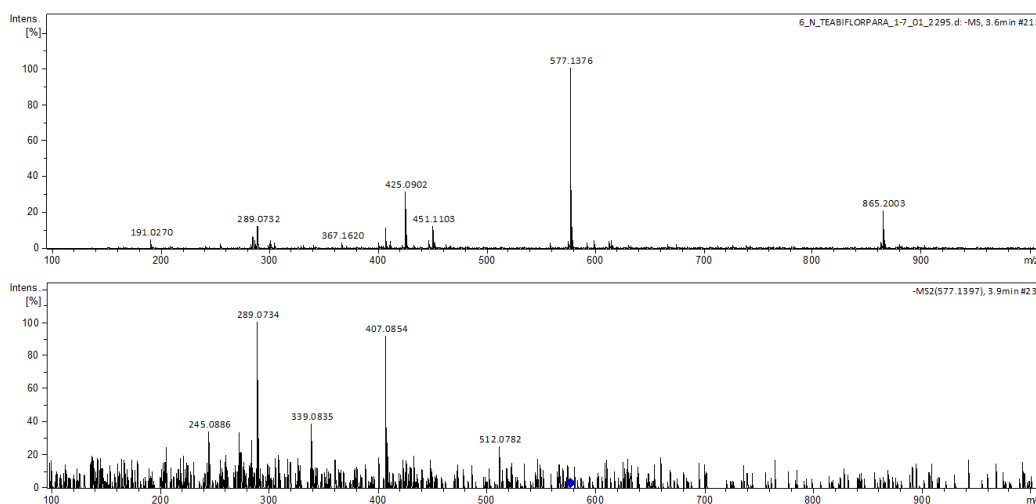


Figura S130

Pico no t_R 4,2 min, espectro de íon modo negativo m/z 289,0732 (catequina, **8**).

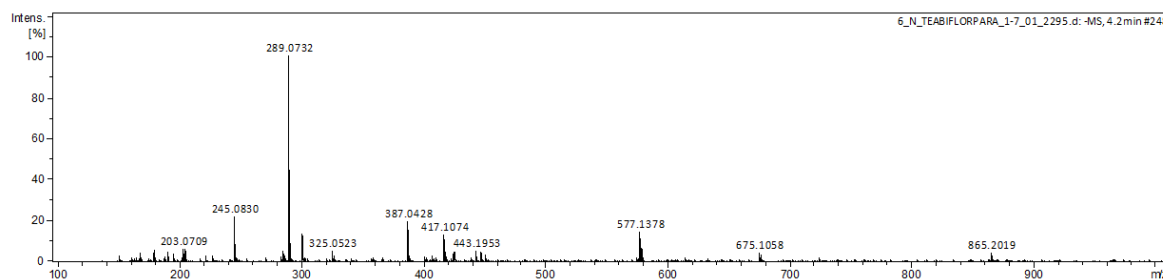


Figura S131

Espectro de íon modo negativo no t_R 10,5 min (miricetina-3-*O*-glucosídeo, **16**).

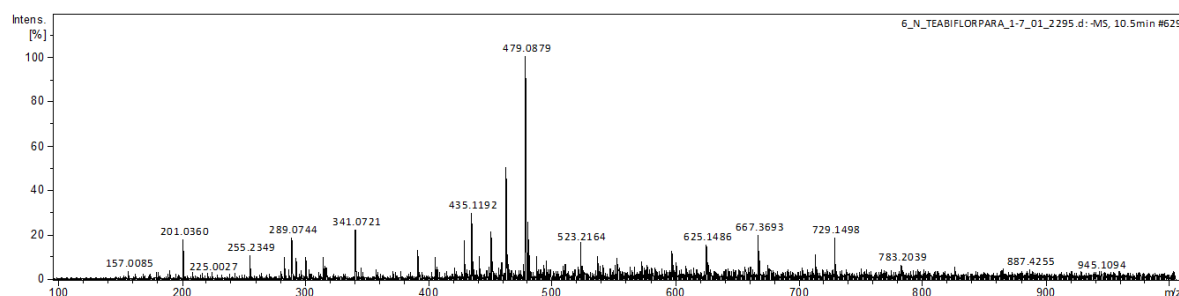


Figura S132 - Espectro de íon modo negativo no t_R 11,2 min e MS^2 de m/z 615,1000 (miricetina-3-*O*-(2''-*O*-galoil)- α -ramnosídeo, **18**)

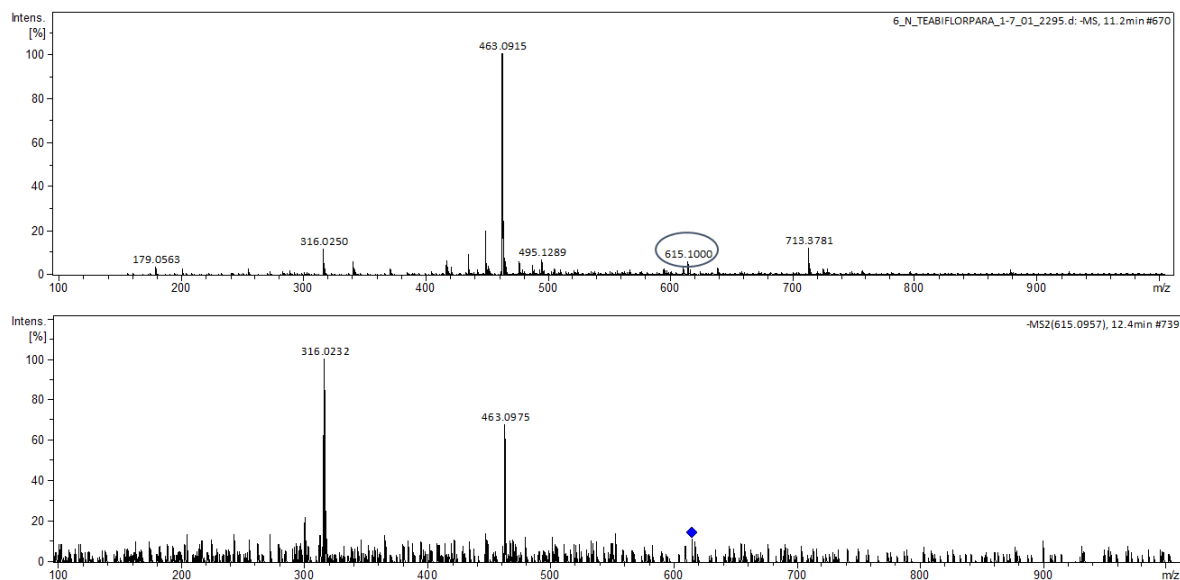


Figura S133

Pico no t_R 11,5 min, espectro de íon modo negativo e MS^2 de m/z 463,0909 (miricitrina, **19**).

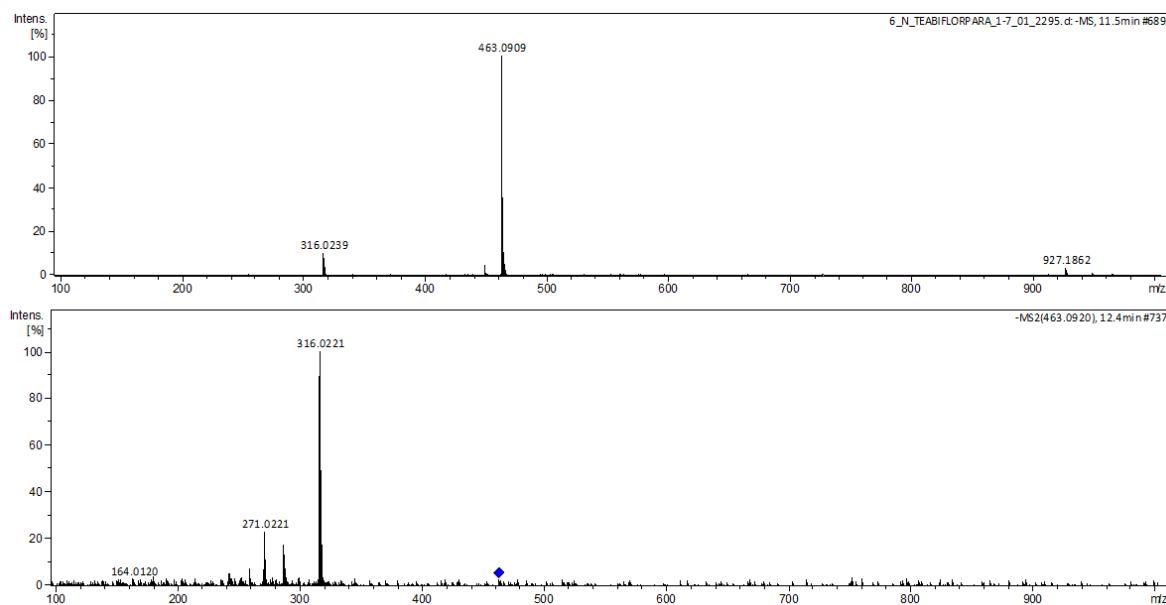


Figura S134

Pico no t_R 12,7 min, espectro de íon modo negativo e MS^2 de m/z 433,0798 (guaijaverina, **21**).

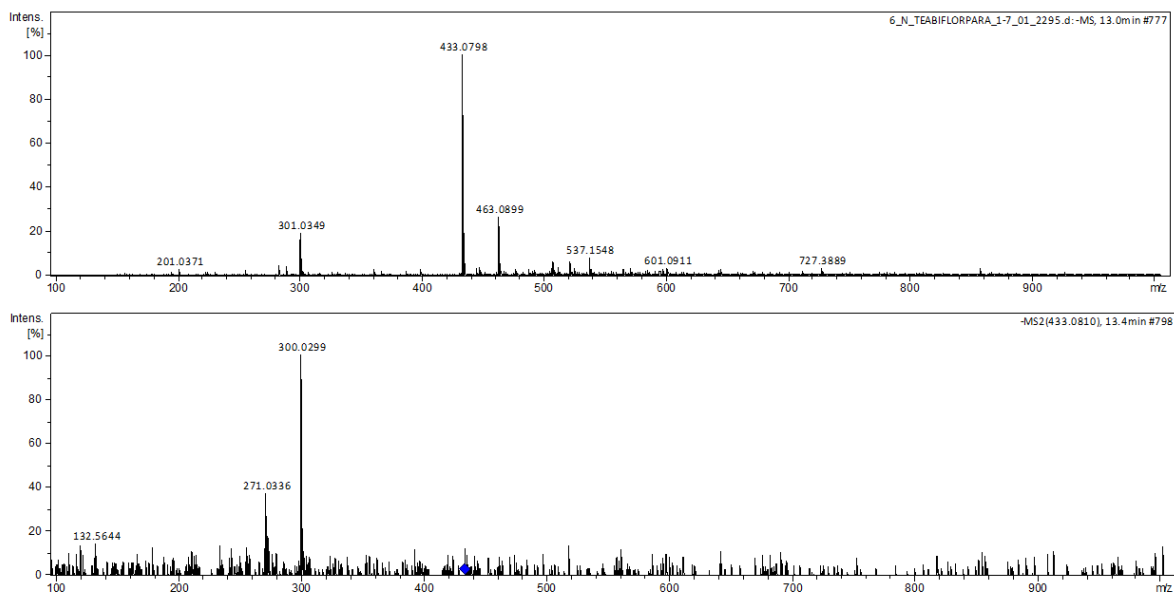


Figura S135

Pico no t_R 13,5 min, espectro de íon modo negativo e MS^2 de m/z 447,0950 (quercitrina, **23**).

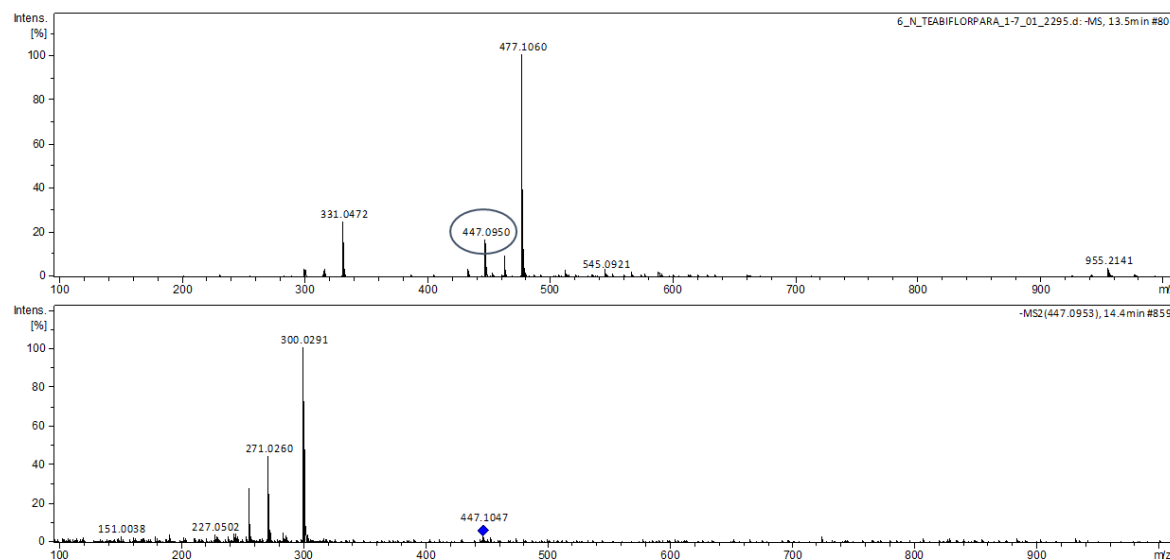


Figura S136

Pico no t_R 13,5 min, espectro de íon modo negativo e MS^2 de m/z 477,1059 (isoramnetina-3-*O*-glucosídeo, **24**).

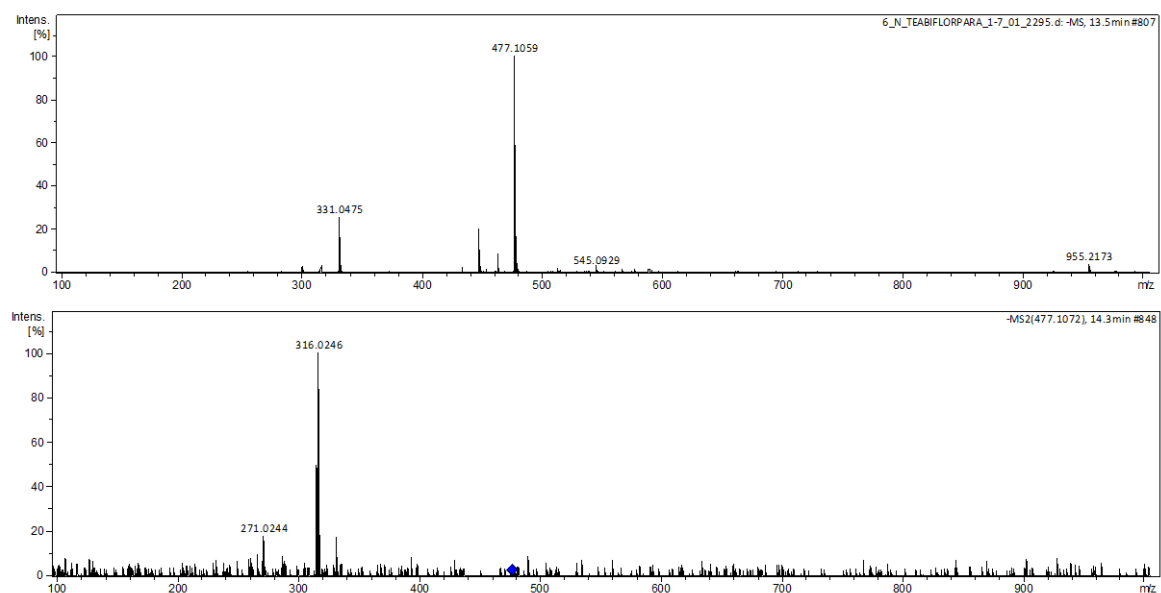
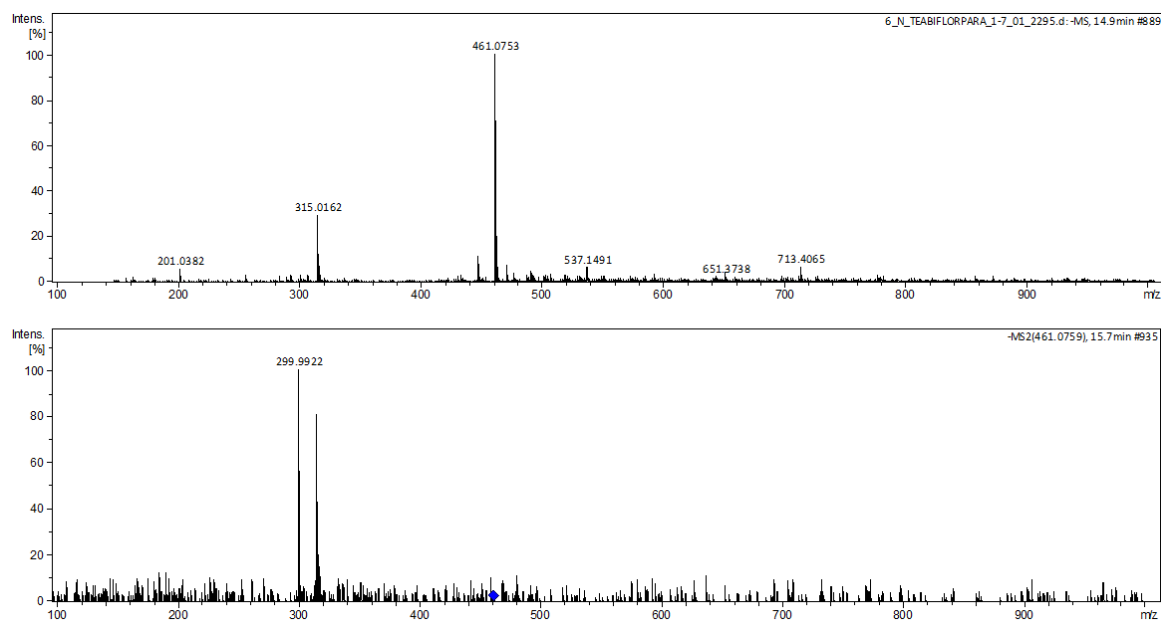


Figura S137

Pico no t_R 14,9 min, espectro de íon modo negativo e MS^2 de m/z 461,0753 (ácido metil elágico ramnosídeo, **25**).



Análise por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear 1D e 2D

Eugenia punicifolia (EpAPA)

Figura S138

Espectro de RMN de ^1H do extrato seco das folhas de *E. punicifolia* (EpAPA) (500 MHz, DMSO- d_6).

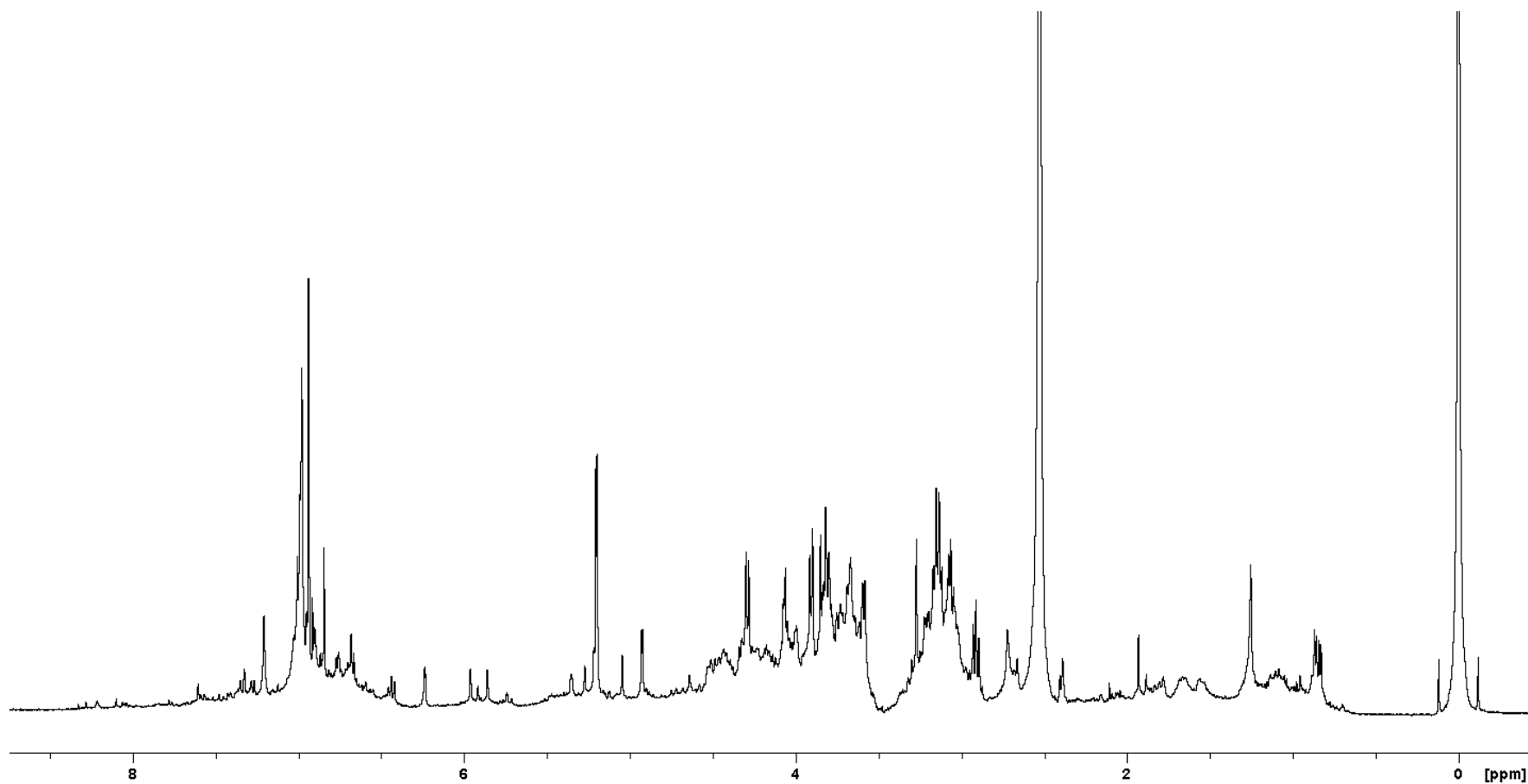


Figura S139

^1H - ^{13}H HSQC do extrato seco das folhas de *E. puniceifolia* (EpAPA) (11,74 T, DMSO- d_6)

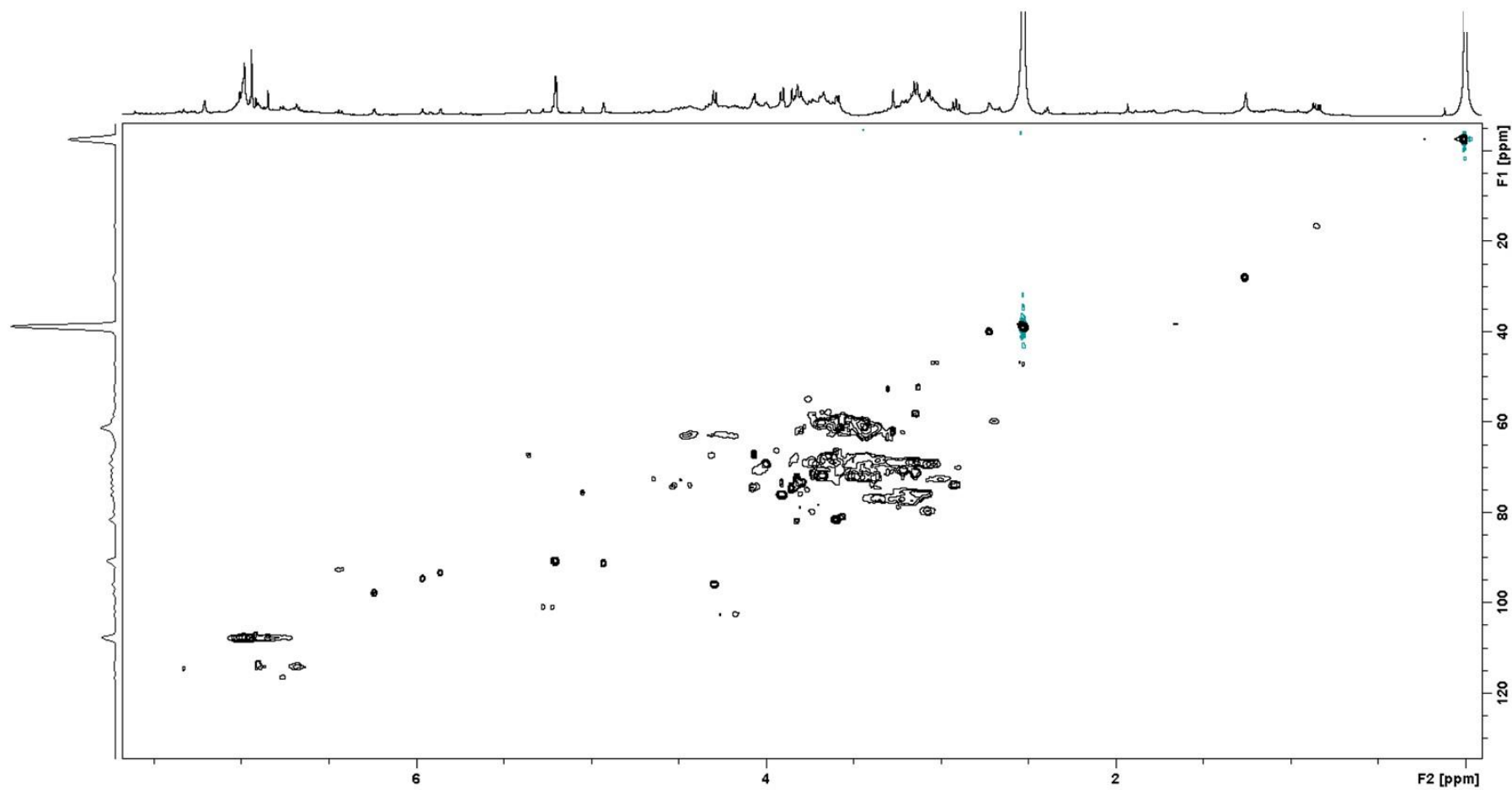
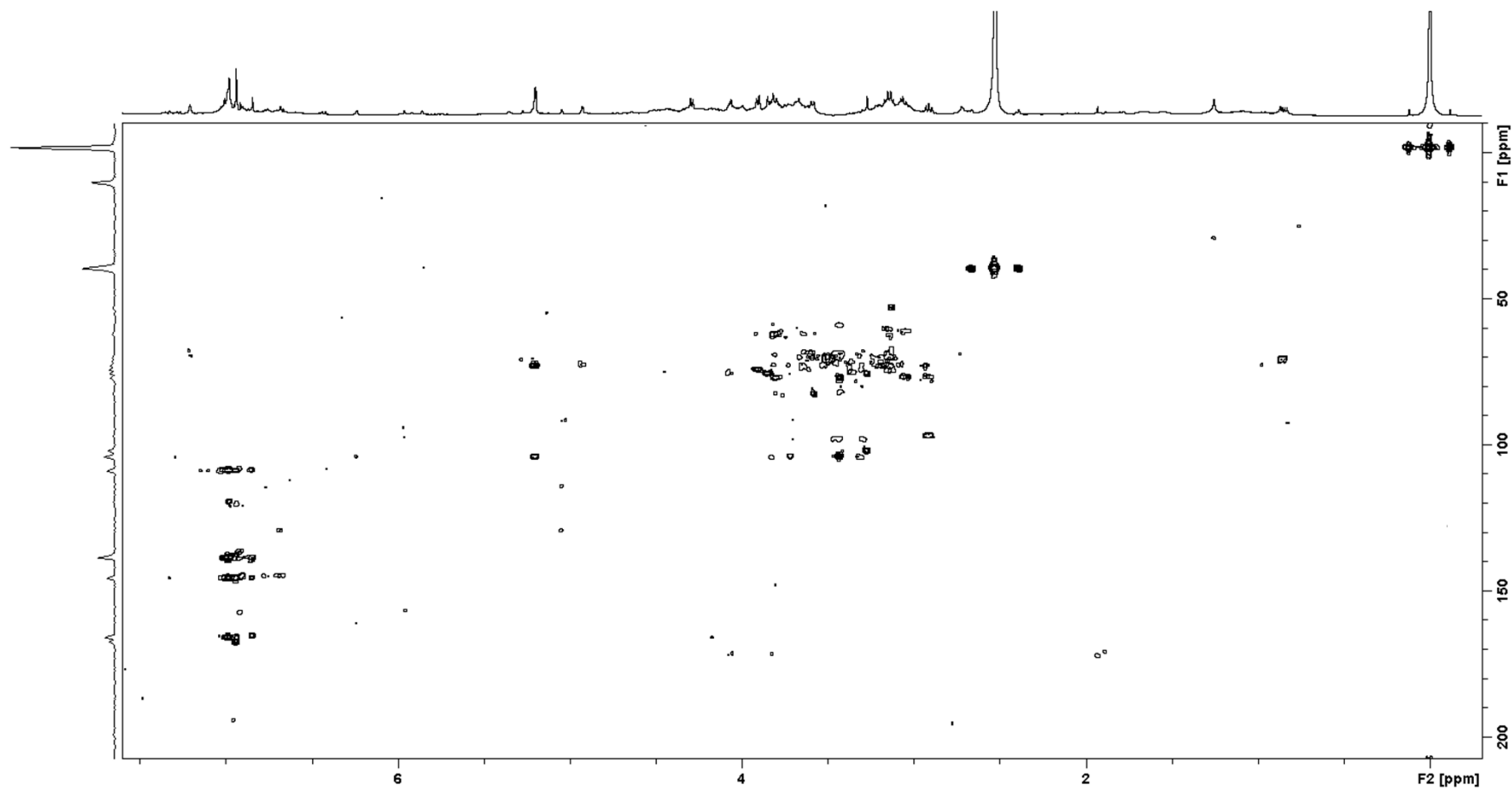


Figura S140

^1H - ^{13}H HMBC do extrato seco das folhas de *E. punicifolia* (EpAPA) (11,74 T, DMSO- d_6)



Dados espectrométricos dos compostos por CLAE-EMAR do extrato seco das folhas de *Eugenia punicifolia* (EpAPA)

Figura S141

Cromatograma de íons totais do extrato seco das folhas *E. punicifolia* (EpAPA) por CLAE-IES-EMAR

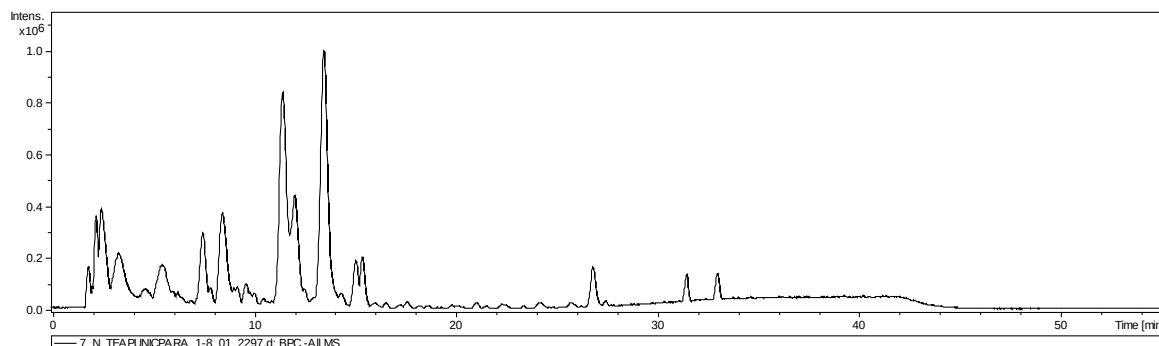


Figura S142

Pico no t_R 8,6 min, espectro de íon modo negativo e MS² de m/z 441,0860 [catequina-(3-*O*-metilgalato)] (**12**).

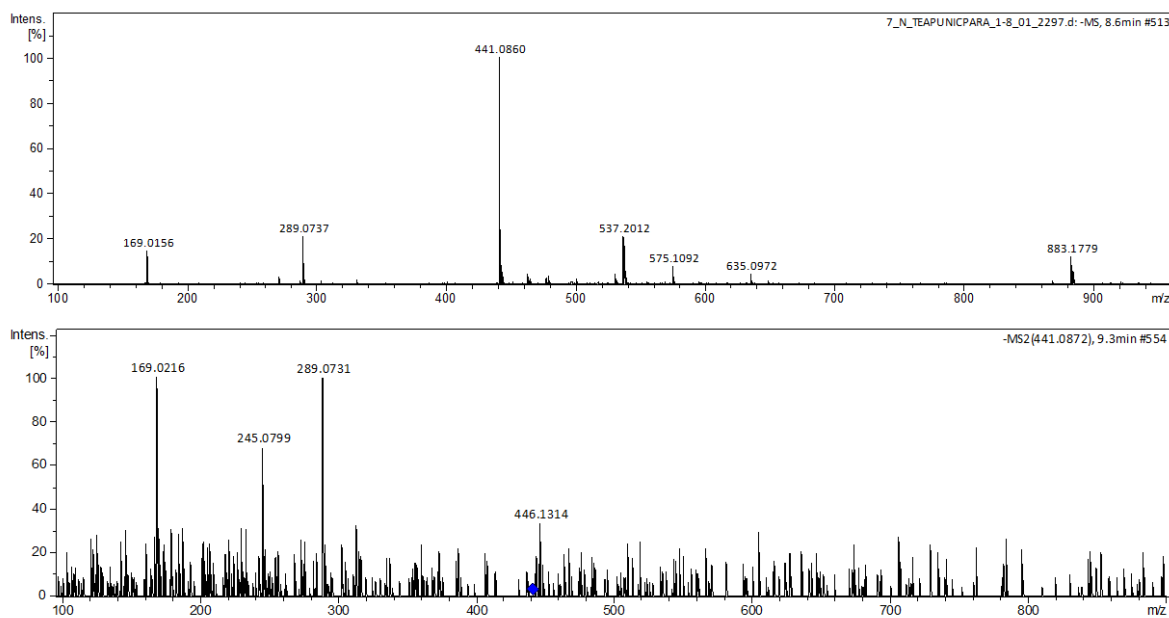


Figura S143

Pico no t_R 10,2 min, espectro de íon modo negativo m/z 455,1016 [epicatequina-3-O-(3"-O-metilgalato)] (15).

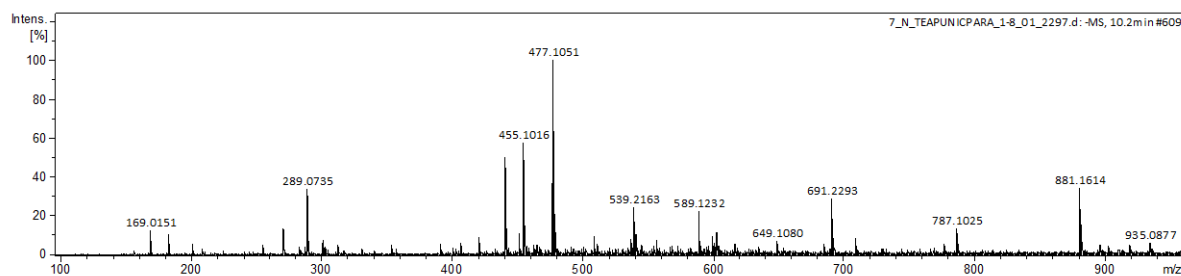


Figura S144

Pico no t_R 10,5 min, espectro de íon modo negativo e MS^2 de m/z 479,0855 (miricetina-3-O-glucosídeo, 16).

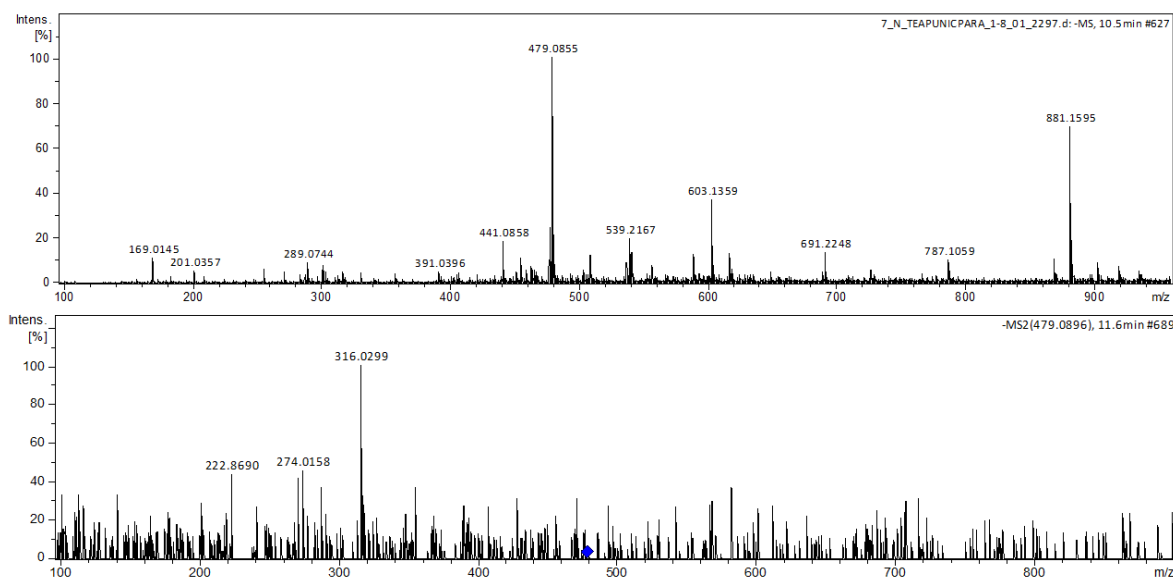


Figura S145

Pico no t_R 11,5 min, espectro de íon modo negativo e MS^2 de m/z 463,0913 (miricitrina, **19**).

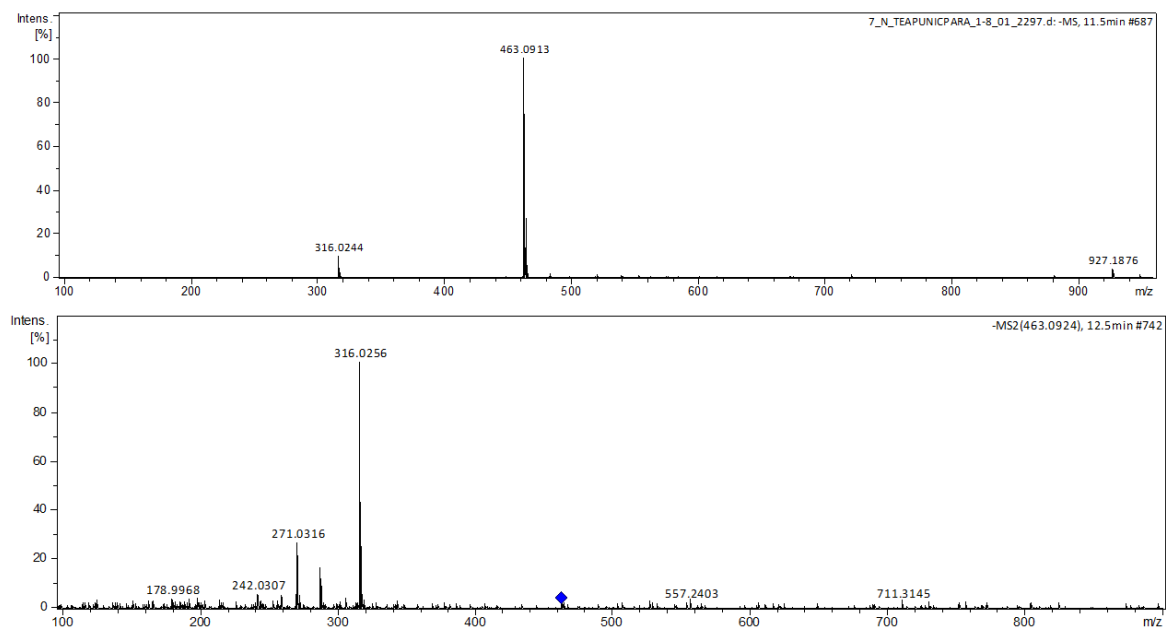


Figura S146

Pico no t_R 12,7 min, espectro de íon modo negativo e MS^2 de m/z 433,0744 (Guajaverina, **21**).

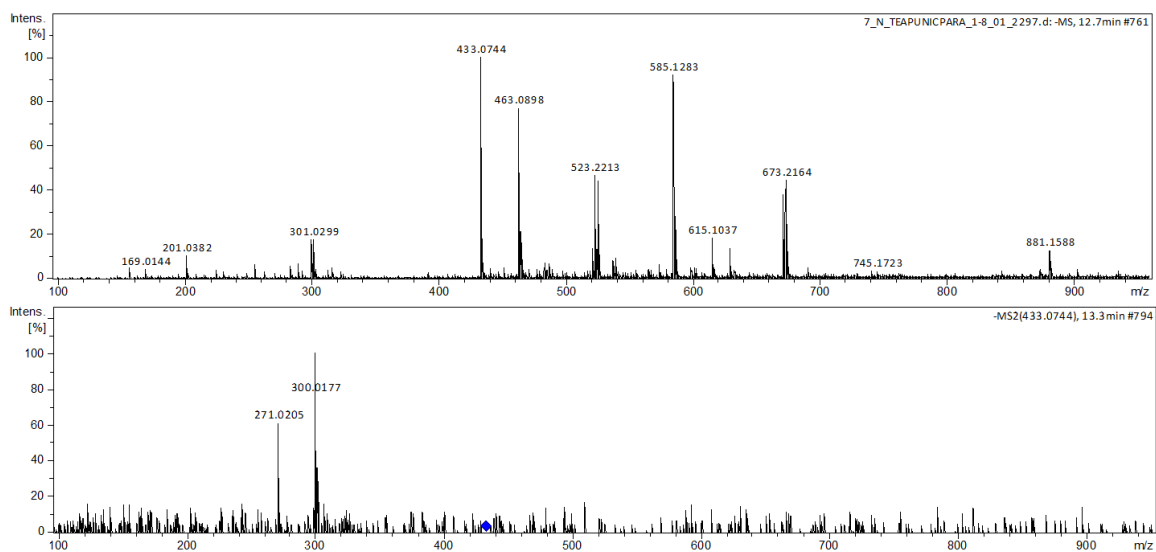


Figura S147

Pico no t_R 13,5 min, espectro de íon modo negativo e MS^2 de m/z 447,0958 (Quercitrina, **23**).

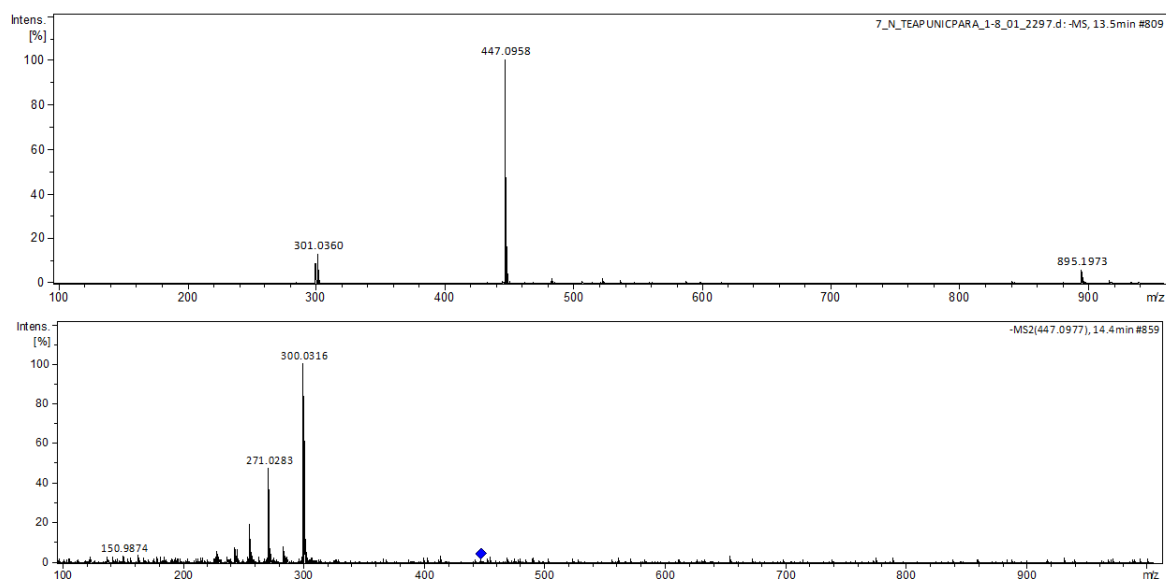
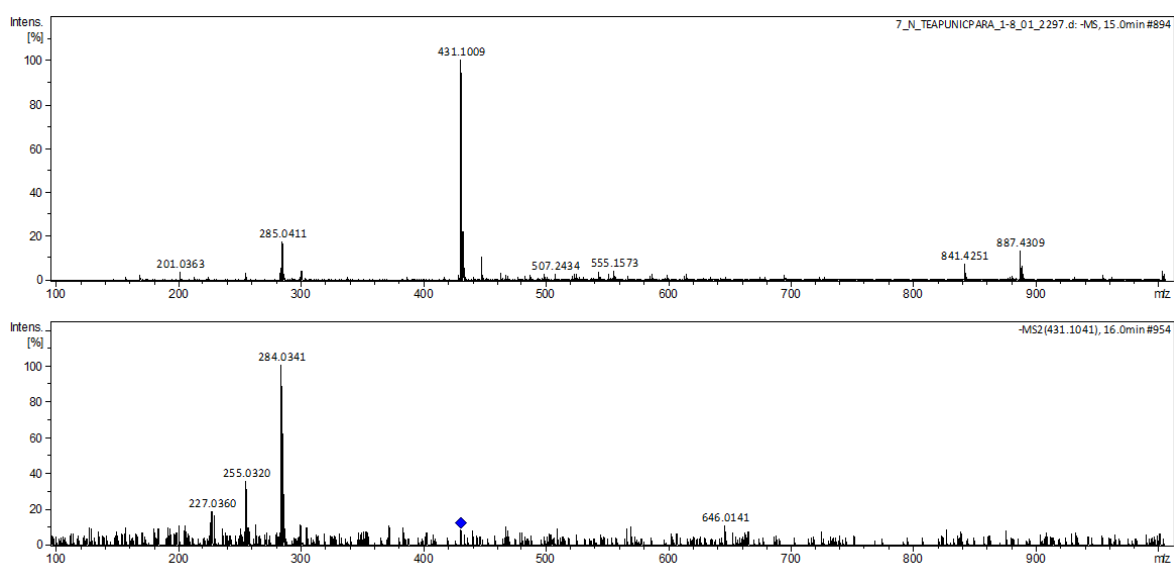


Figura S148

Pico no t_R 13,5 min, espectro de íon modo negativo e MS^2 de m/z 431,1009 (Kaempferol-3-*O*-ramnosídeo, **26**).



Análise por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear 1D e 2D
***Eugenia punicifolia* (EpRAD)**

Figura S149

Espectro de RMN de ^1H do extrato seco das folhas de *E. punicifolia* (EpRAD) (500 MHz, DMSO- d_6)

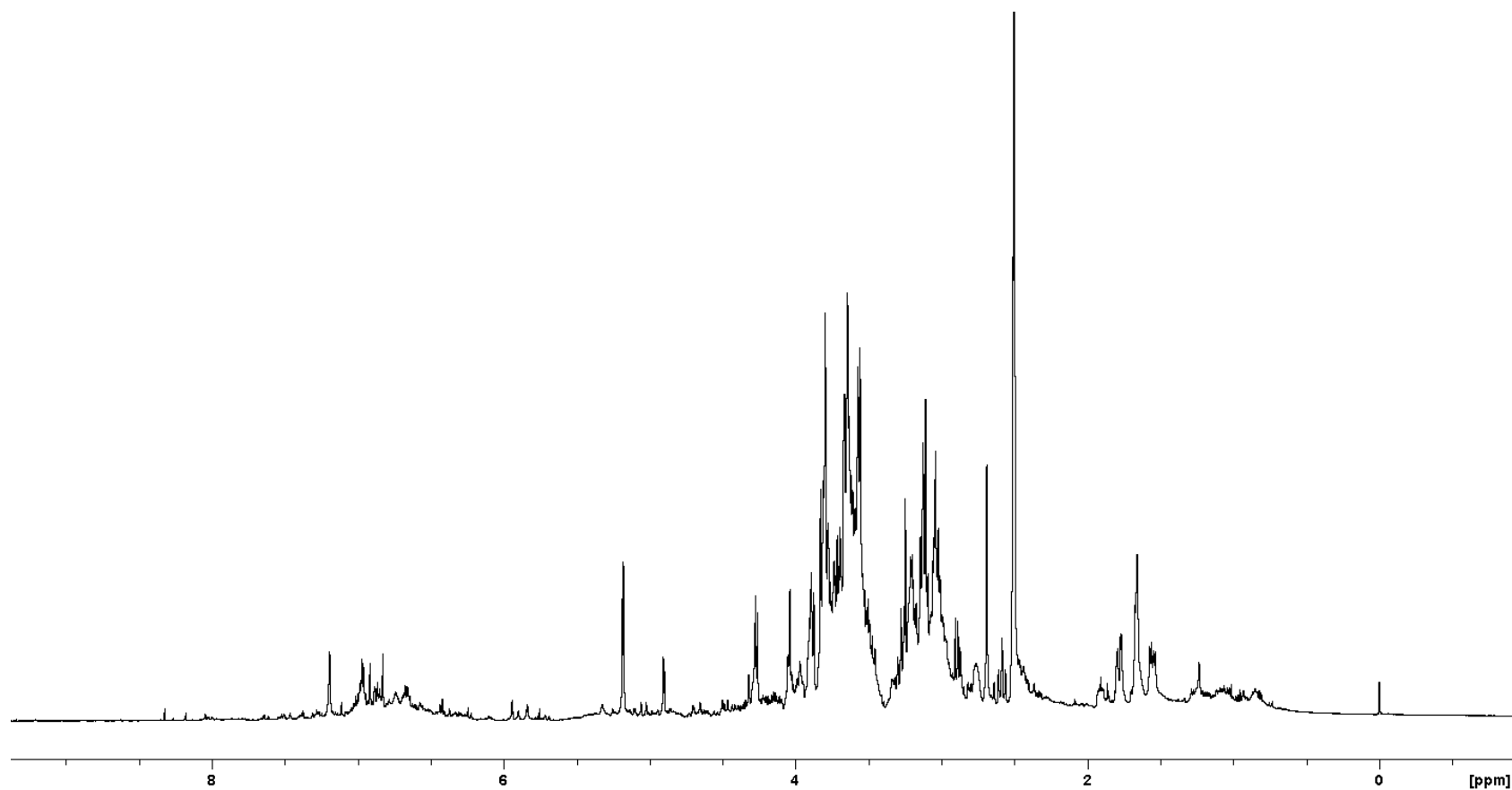


Figura S150

^1H - ^{13}H HSQC do extrato seco das folhas de *E. punicifolia* (EpRAD) (11,74 T, DMSO- d_6)

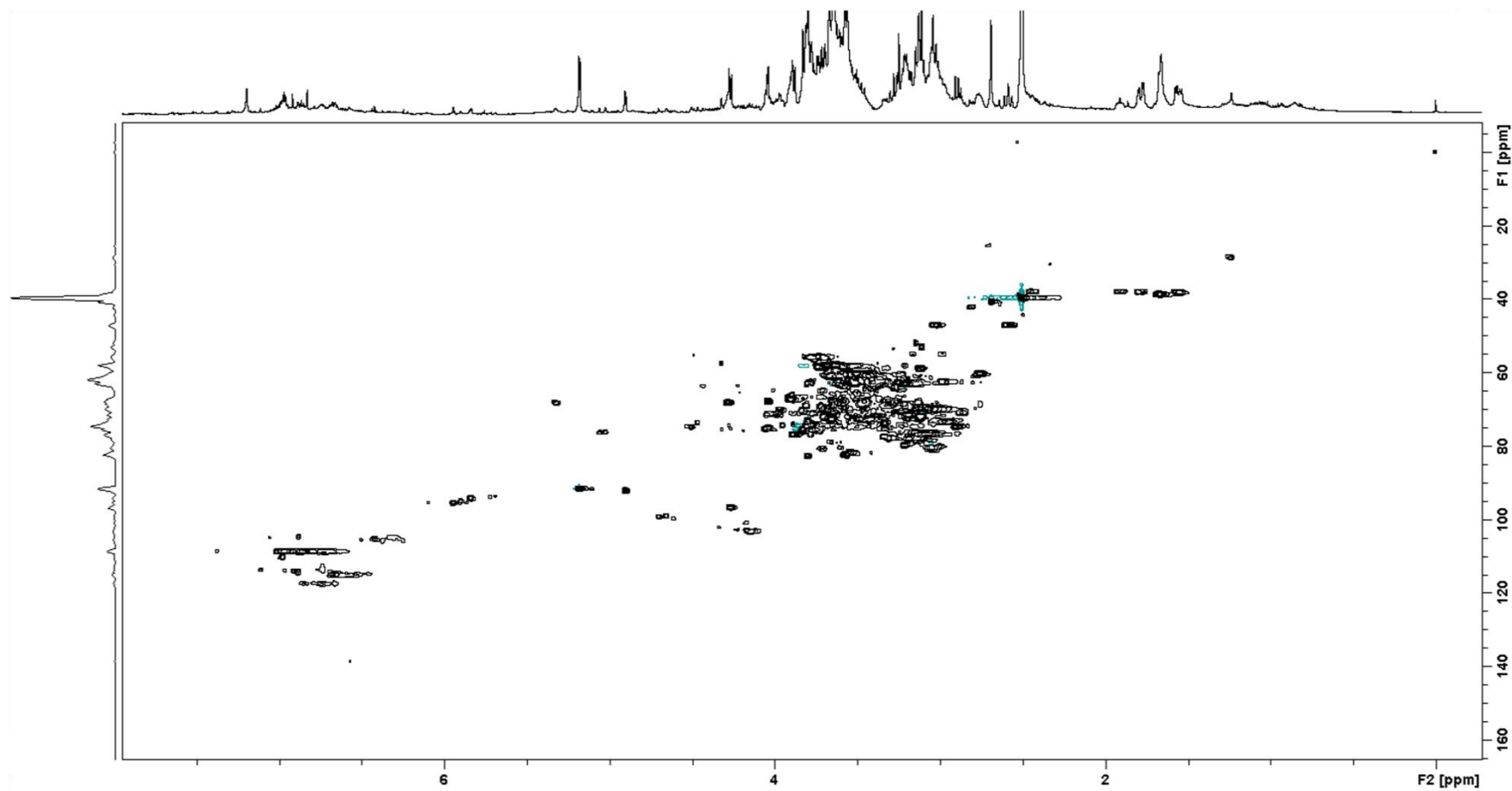
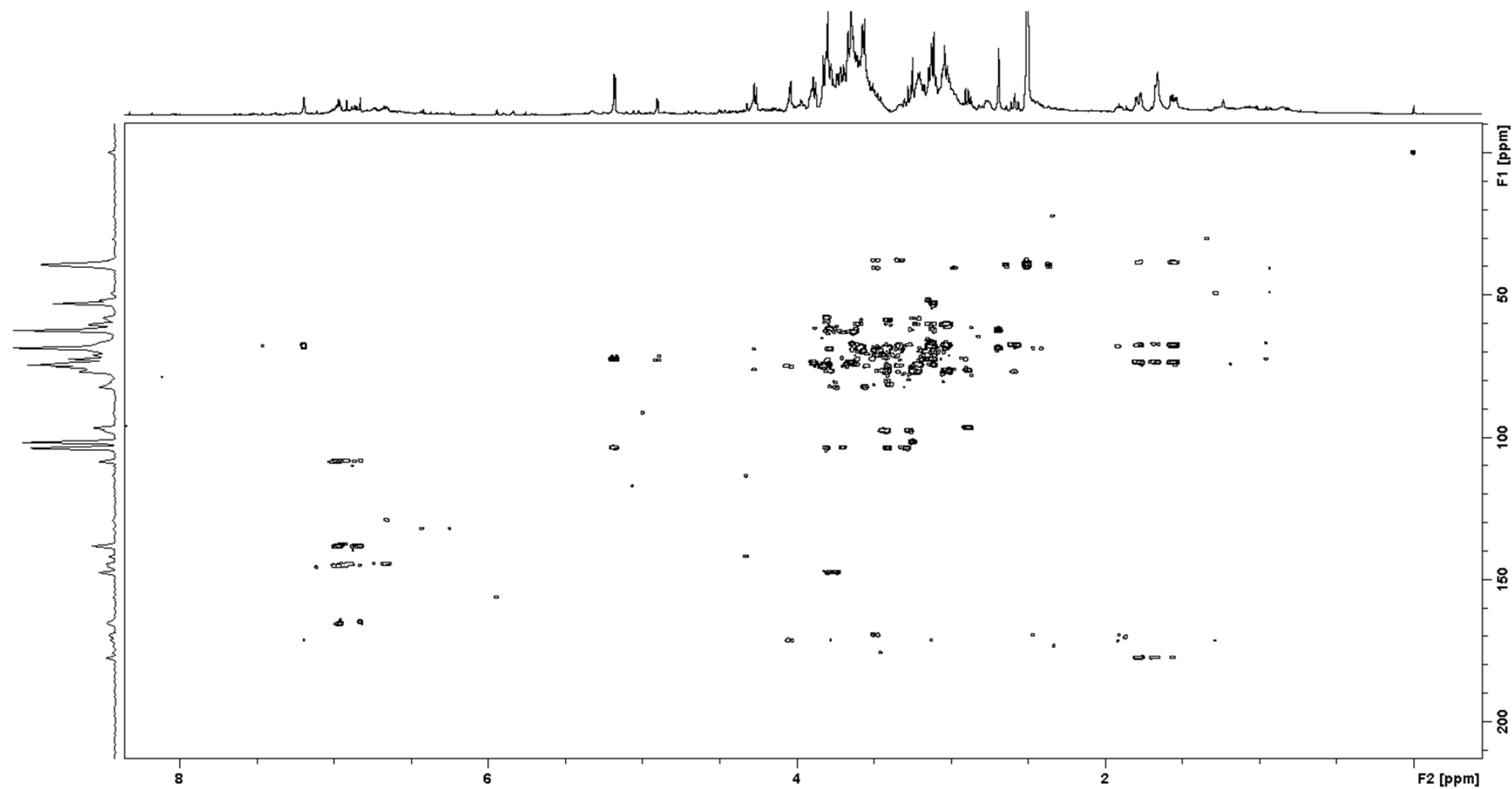


Figura S151

^1H - ^{13}H HMBC do extrato seco das folhas de *E. punicifolia* (EpRAD) (11,74 T, $\text{DMSO}-d_6$)



Dados espectrométricos dos compostos por CLAE-EMAR do extrato seco das folhas de *Eugenia punicifolia* (EpRAD)

Figura S152

Cromatograma de íons totais do extrato seco das folhas *E. punicifolia* (EpRAD) por CLAE-IES-EMAR

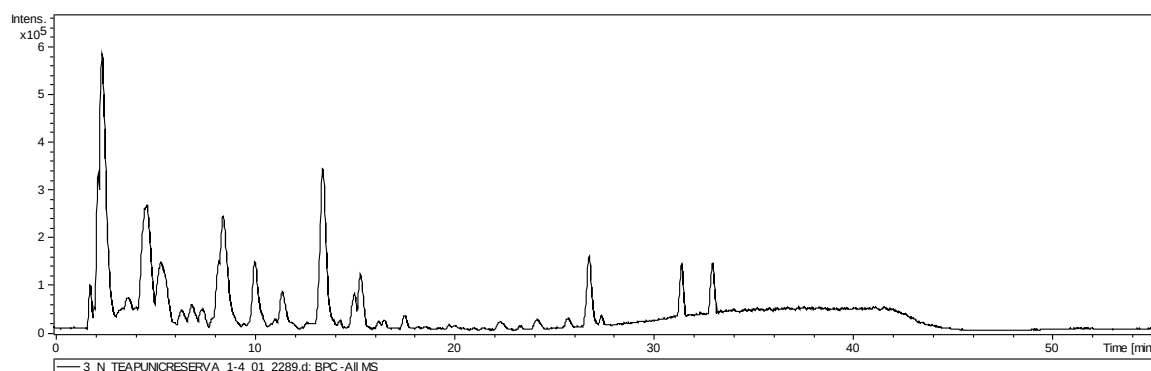


Figura S153

Pico no t_R 8,5 min, espectro de íon modo negativo e MS² de m/z 441,0872 (catequina-3-*O*-galato, **12**).

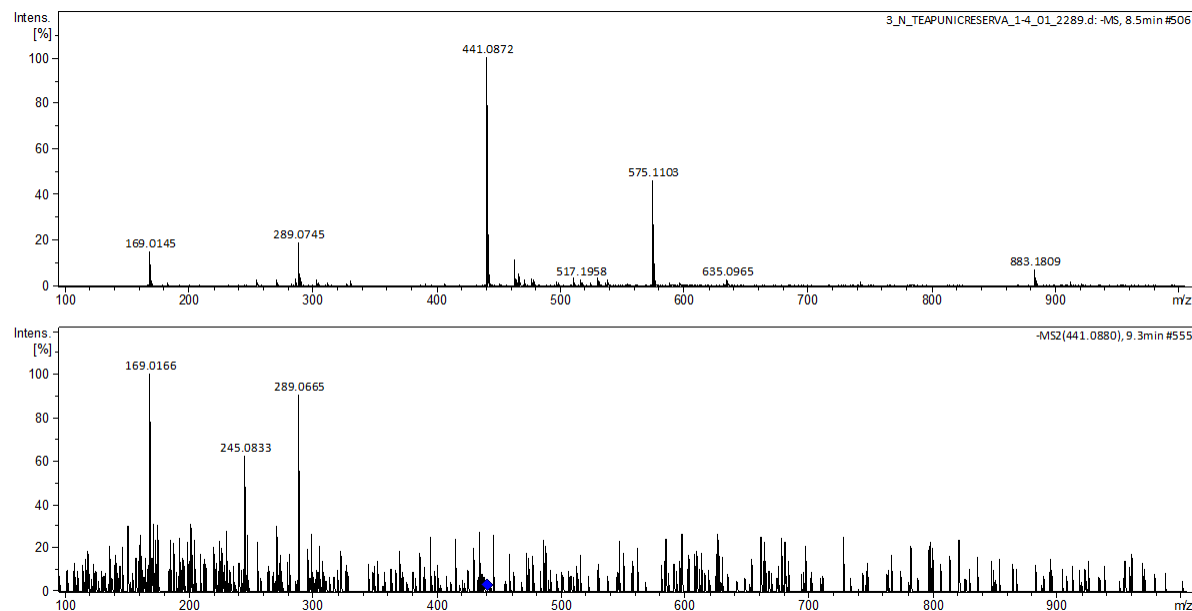


Figura S154

Pico no t_R 10,2 min, espectro de íon modo negativo de m/z 455,1029 [epicatequina-3-O-(3"-O-metilgalato)] (**15**).

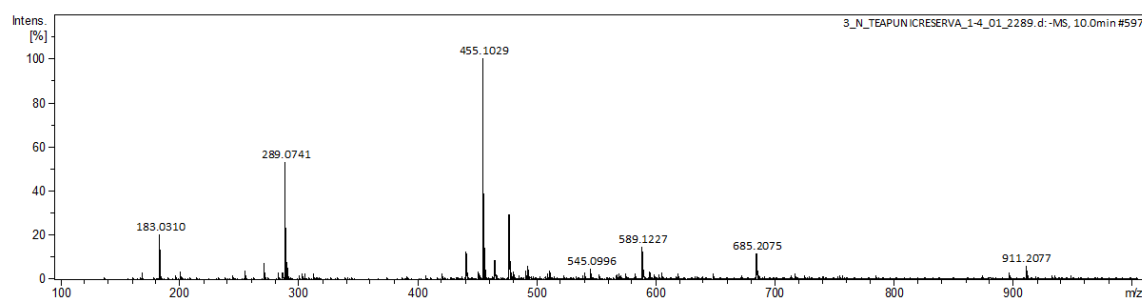


Figura S155

Pico no t_R 11,5 min, espectro de íon modo negativo e MS^2 de m/z 463,0932 (miricitrina, **19**).

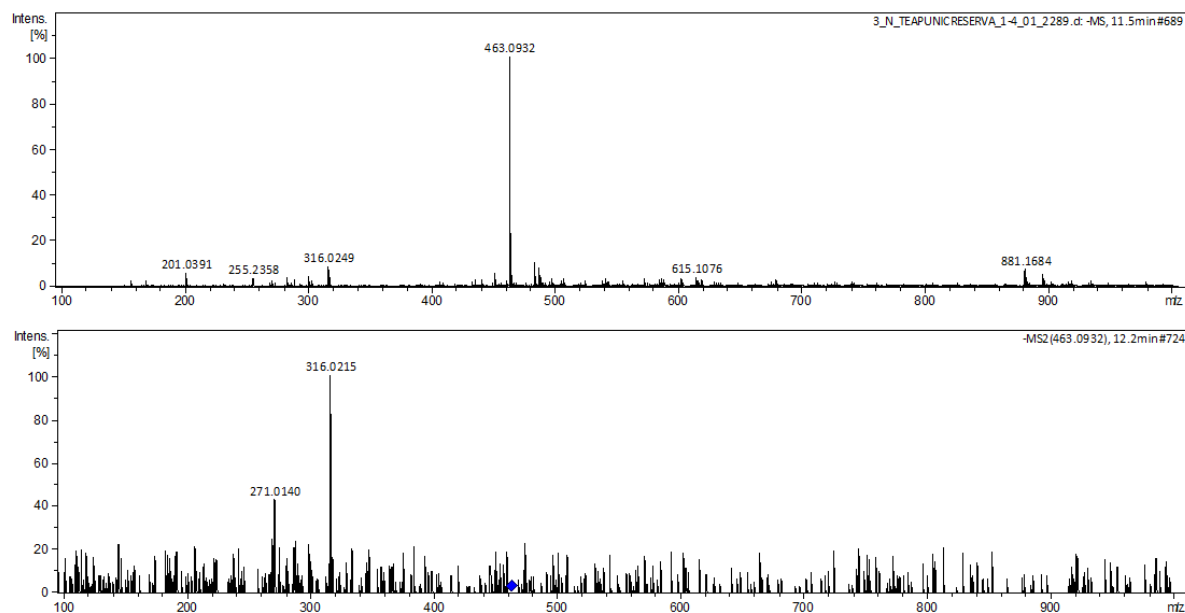
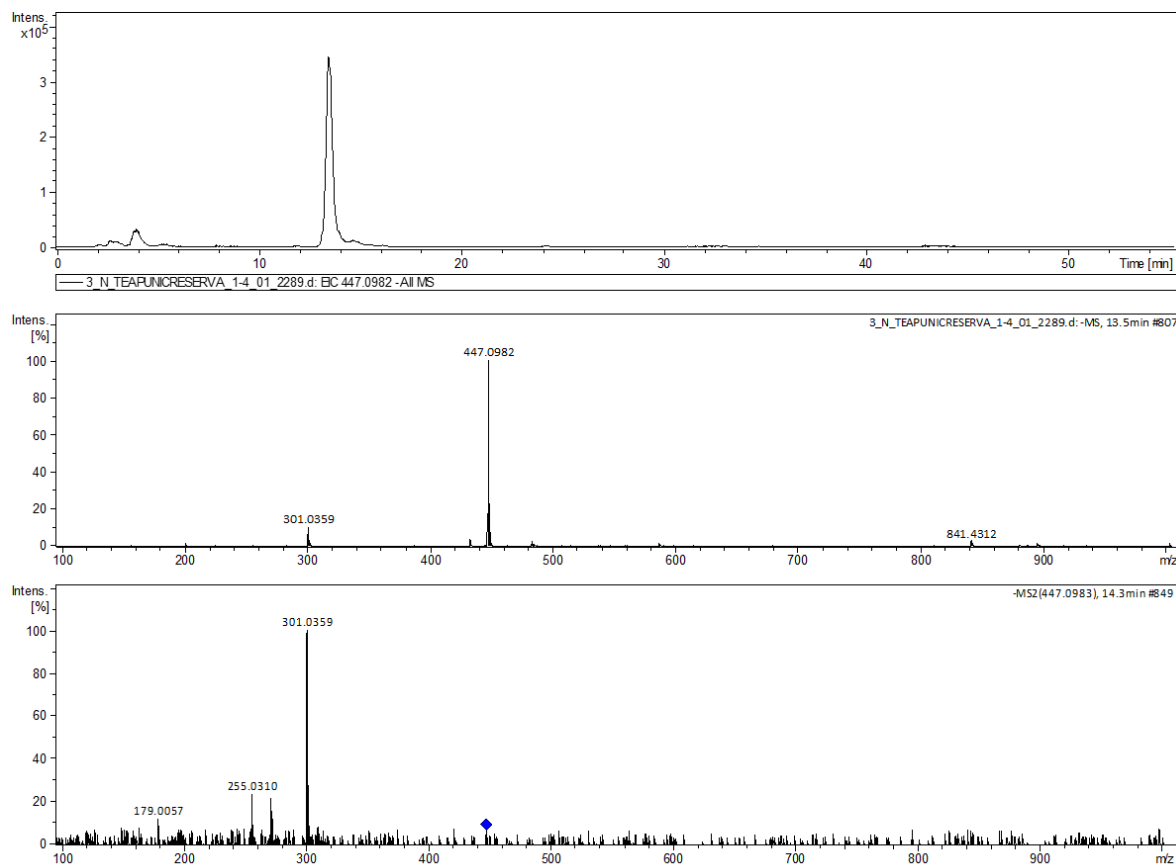


Figura S156

Pico no t_R 13,5 min, espectro de íon modo negativo e MS^2 de m/z 447,0958 (Quercitrina, **23**).



Análise por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear 1D e 2D
AMOSTRAS COMERCIAIS

Figura S157

Espectro de RMN de ^1H do extrato seco de C1-AM (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)

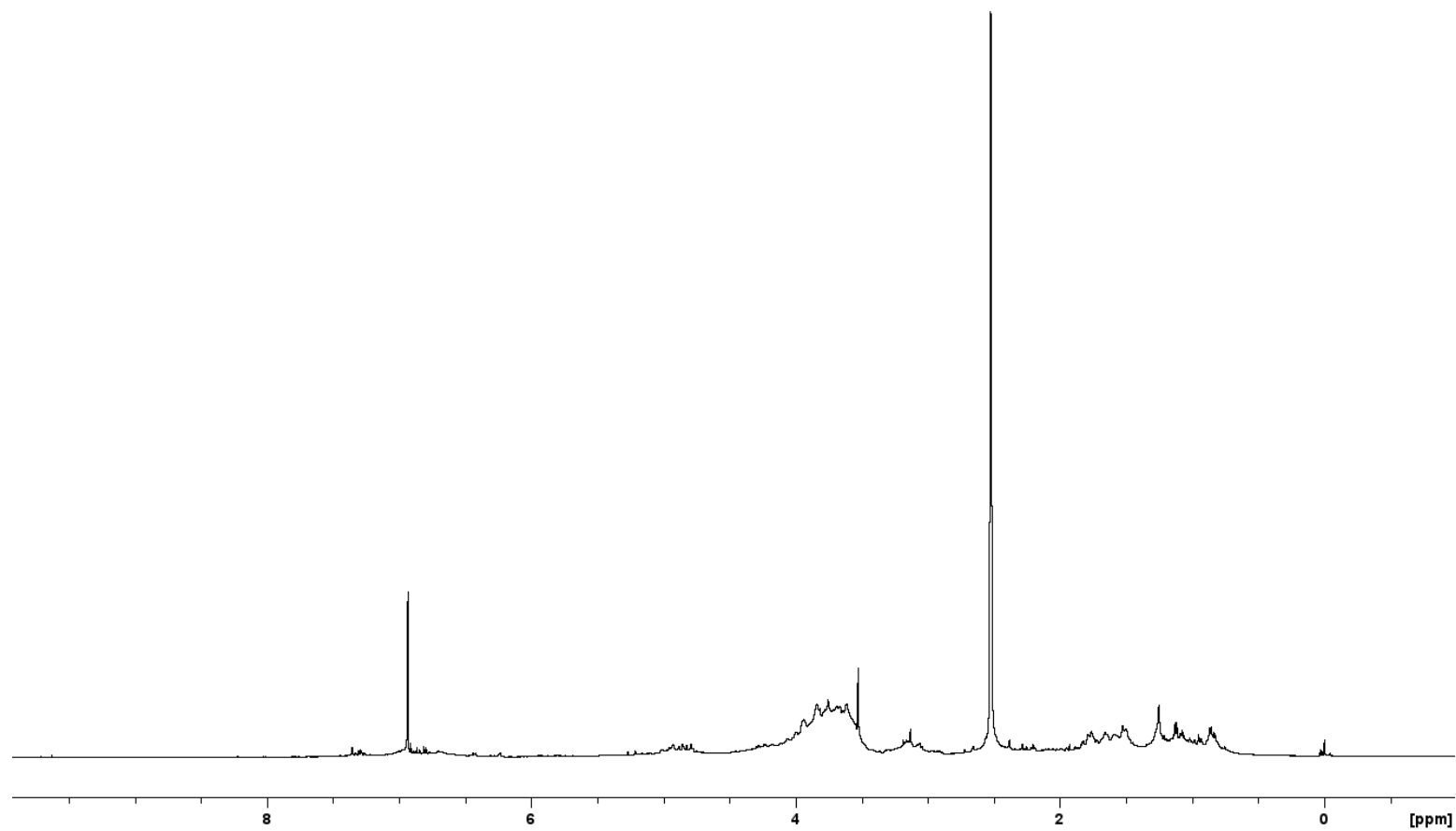


Figura S158

^1H - ^{13}H HSQC do extrato seco do extrato seco de C1-AM (11,74 T, $\text{DMSO-}d_6$).

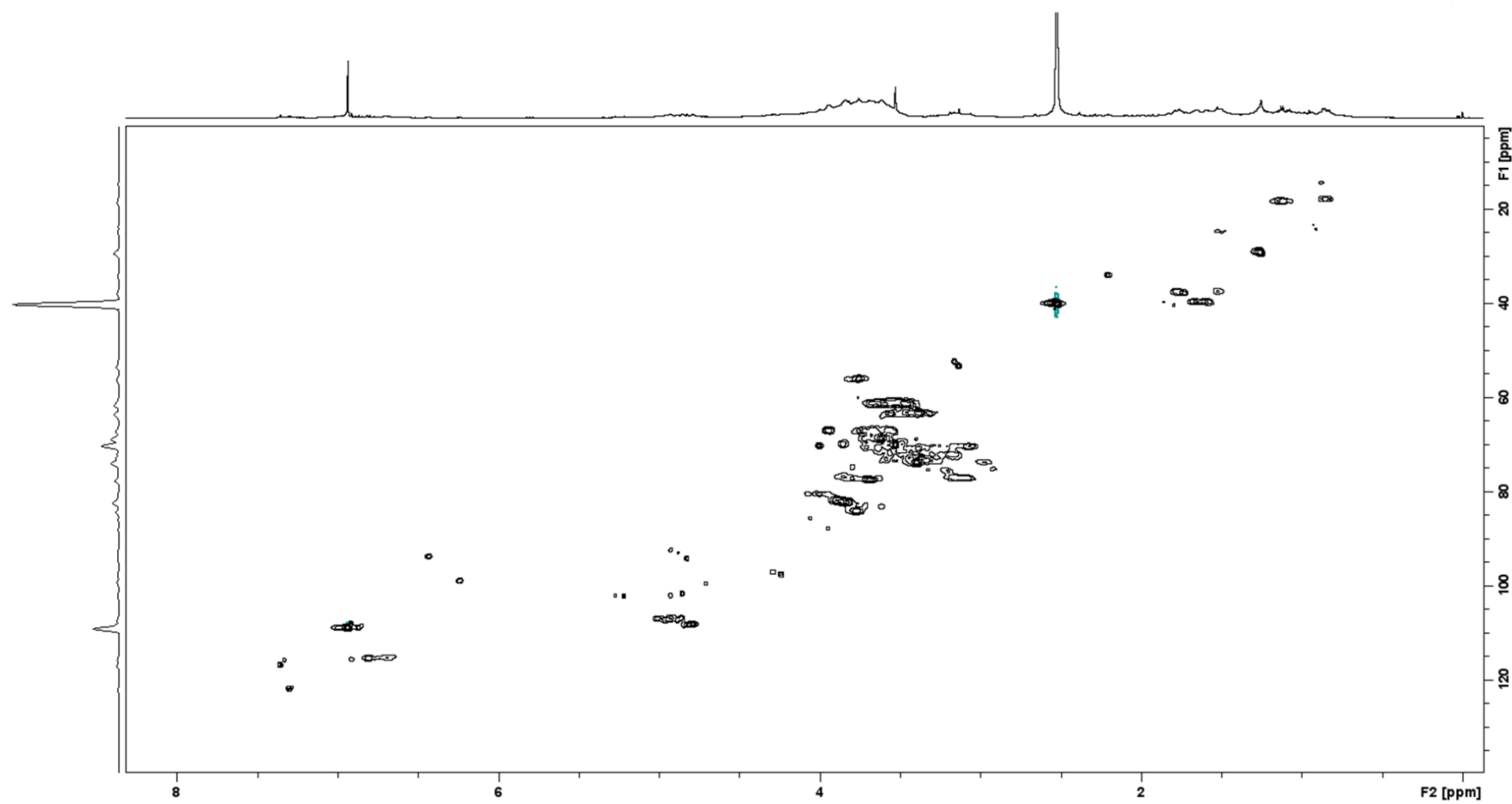


Figura S159

^1H - ^{13}H HMBC do extrato seco do extrato seco de C1-AM (11,74 T, $\text{DMSO}-d_6$).

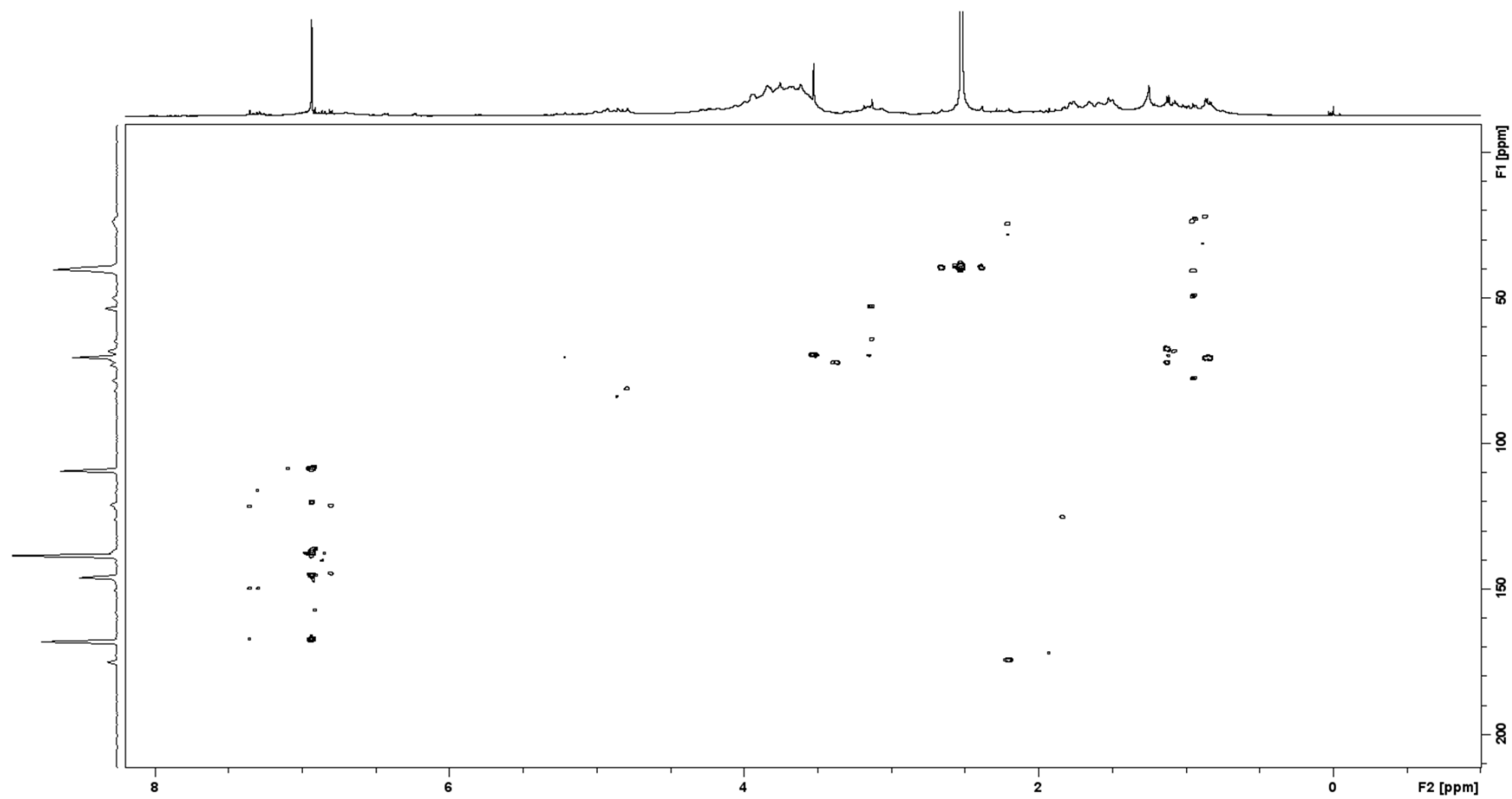


Figura S160

Espectro de RMN de ^1H do extrato seco de C2-AM (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)

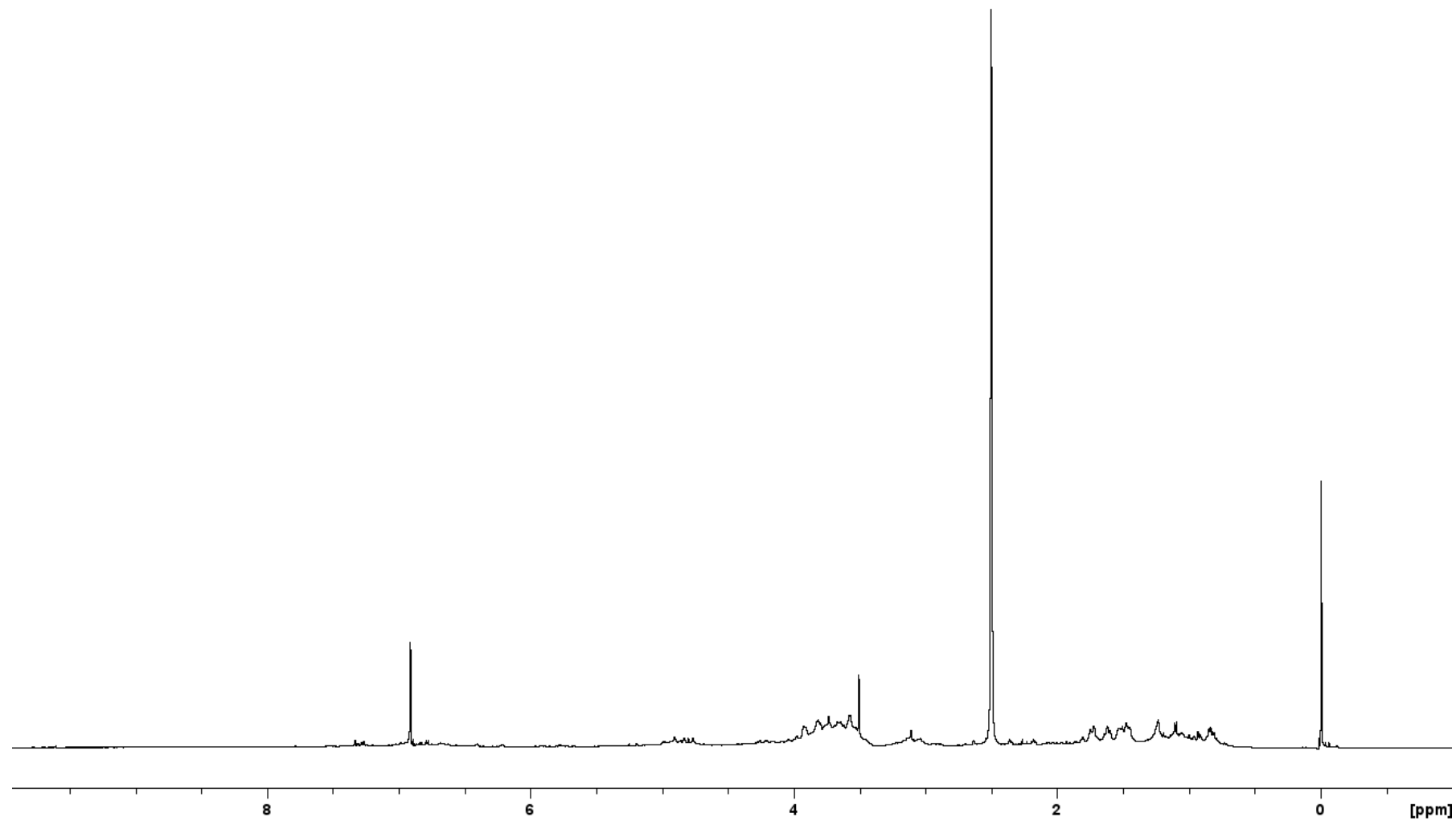


Figura S161

^1H - ^{13}H HSQC do extrato seco do extrato seco de C2-AM (11,74 T, $\text{DMSO}-d_6$).

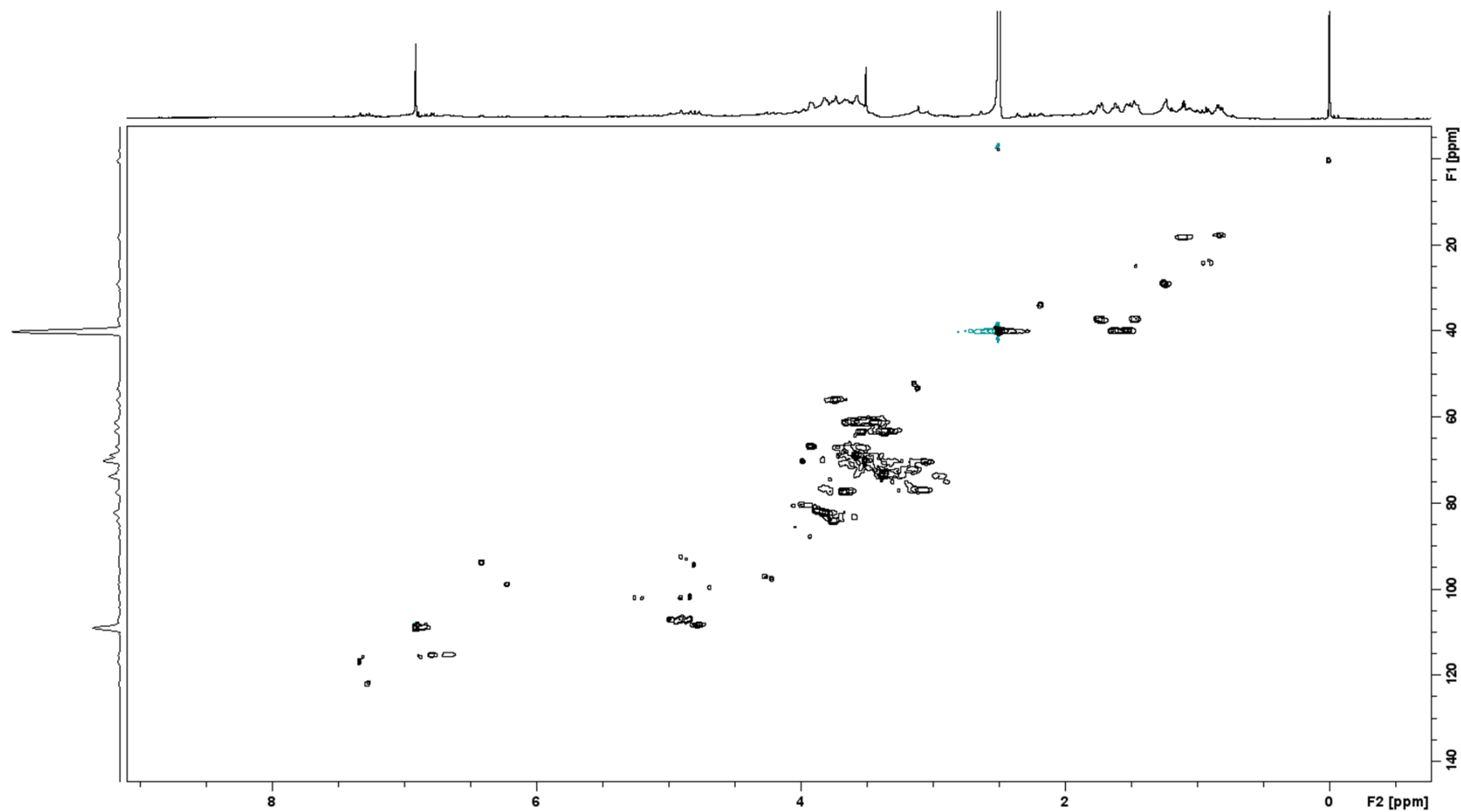


Figura S162

^1H - ^{13}H HMBC do extrato seco do extrato seco de C2-AM (11,74 T, $\text{DMSO}-d_6$).

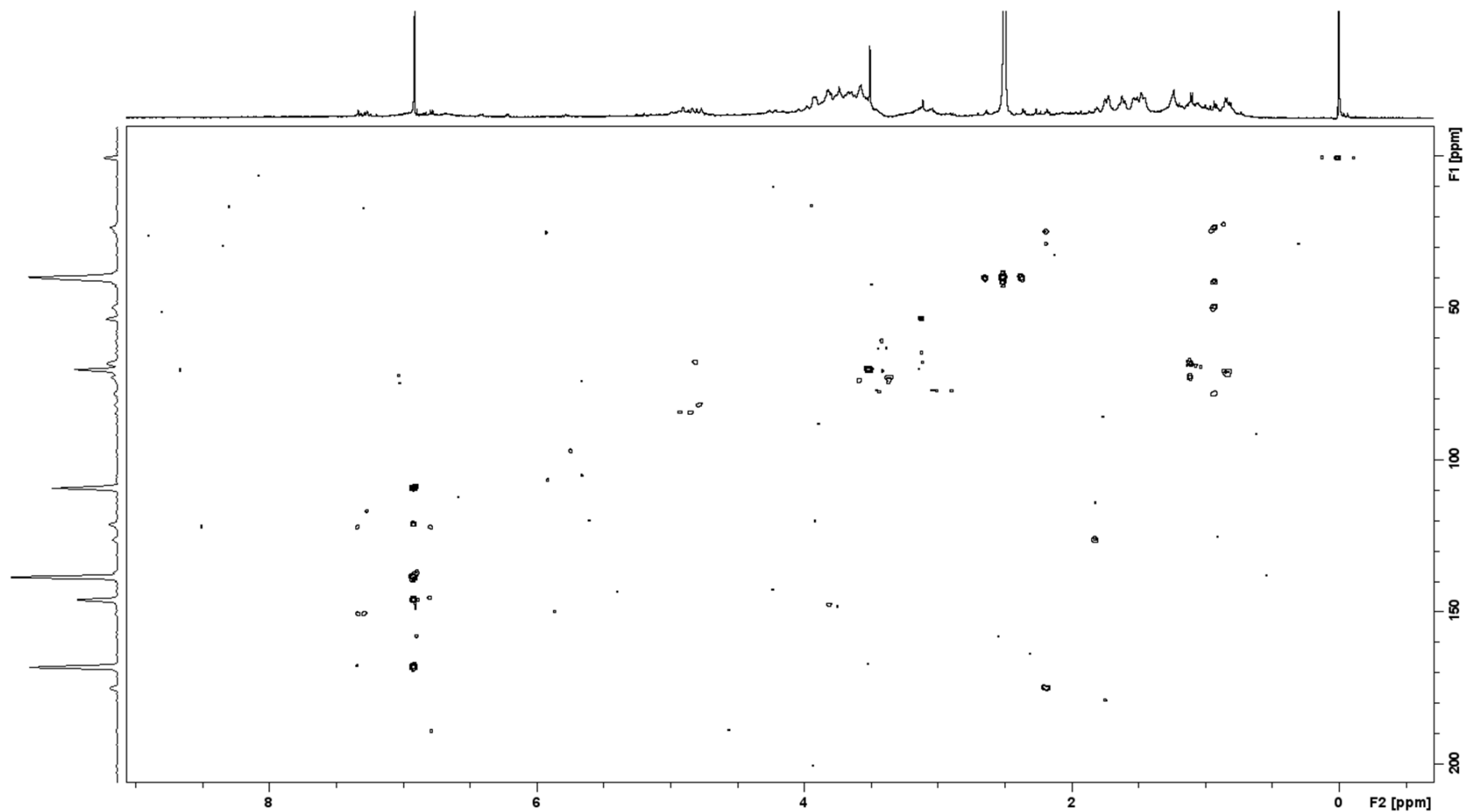


Figura S163

Espectro de RMN de ^1H do extrato seco de C3-PA (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).

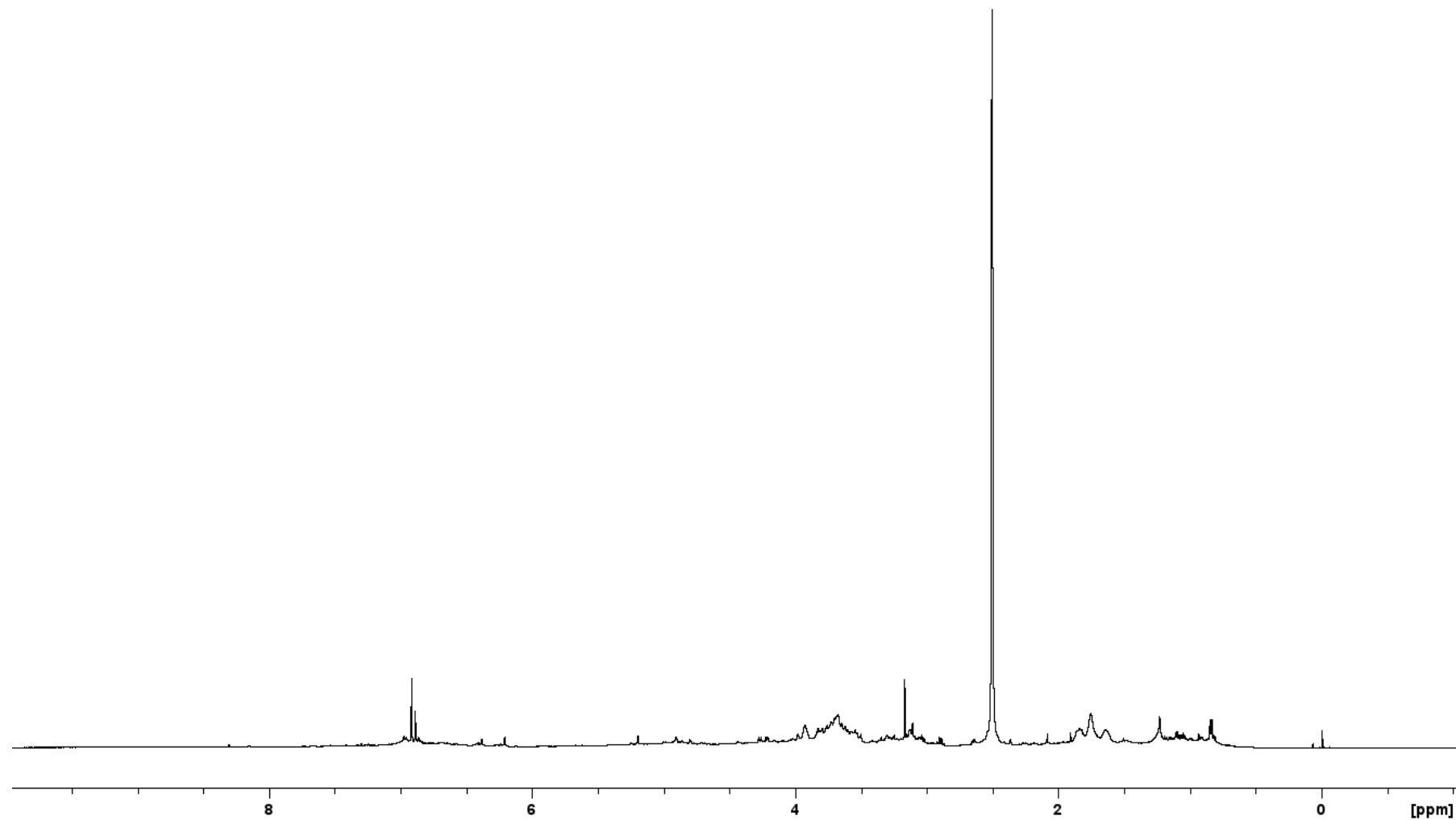


Figura S164

^1H - ^{13}H HSQC do extrato seco do extrato seco de C3-PA (11,74 T, $\text{DMSO}-d_6$).

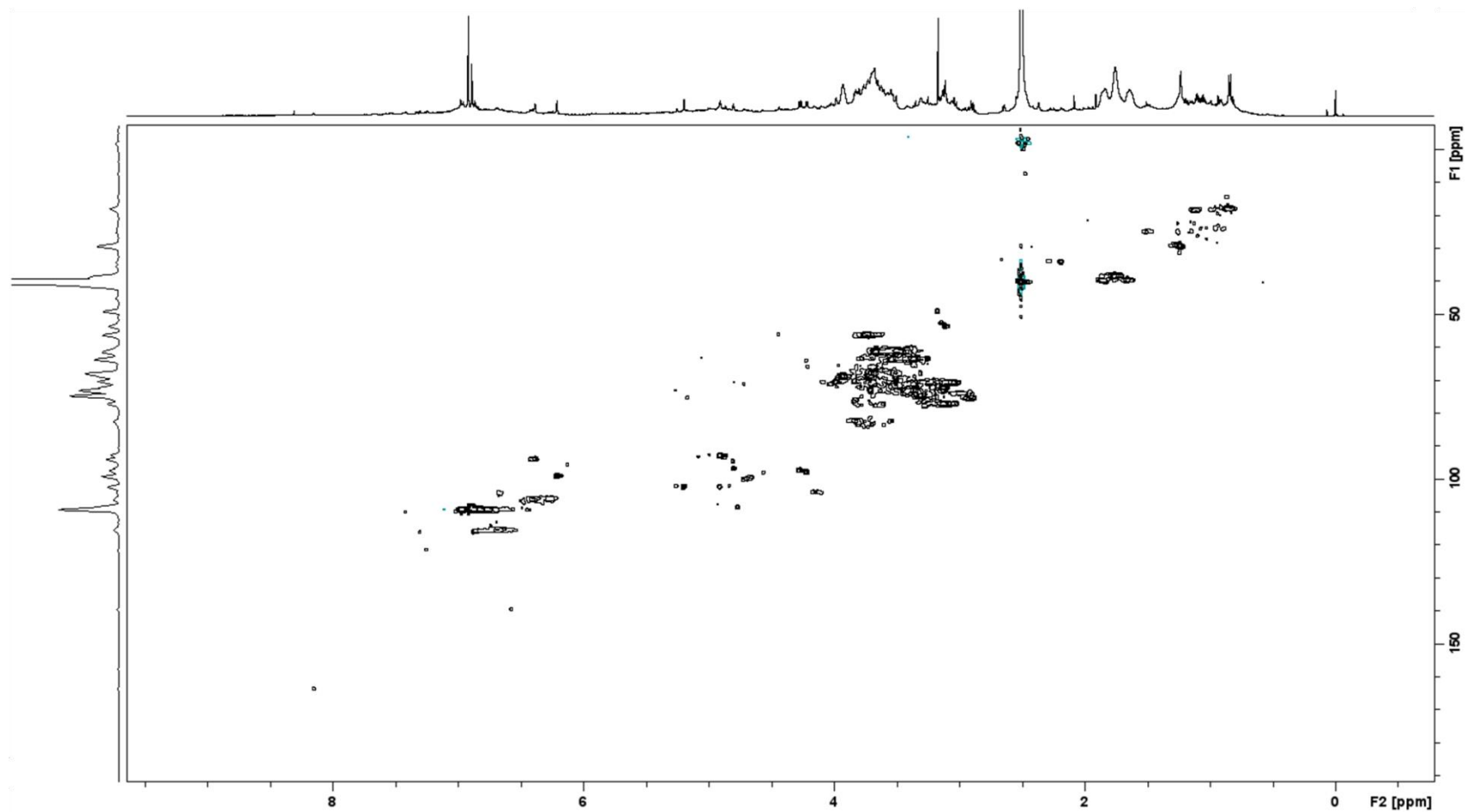


Figura S165

^1H - ^{13}H HMBC do extrato seco do extrato seco de C3-PA (11,74 T, $\text{DMSO}-d_6$).

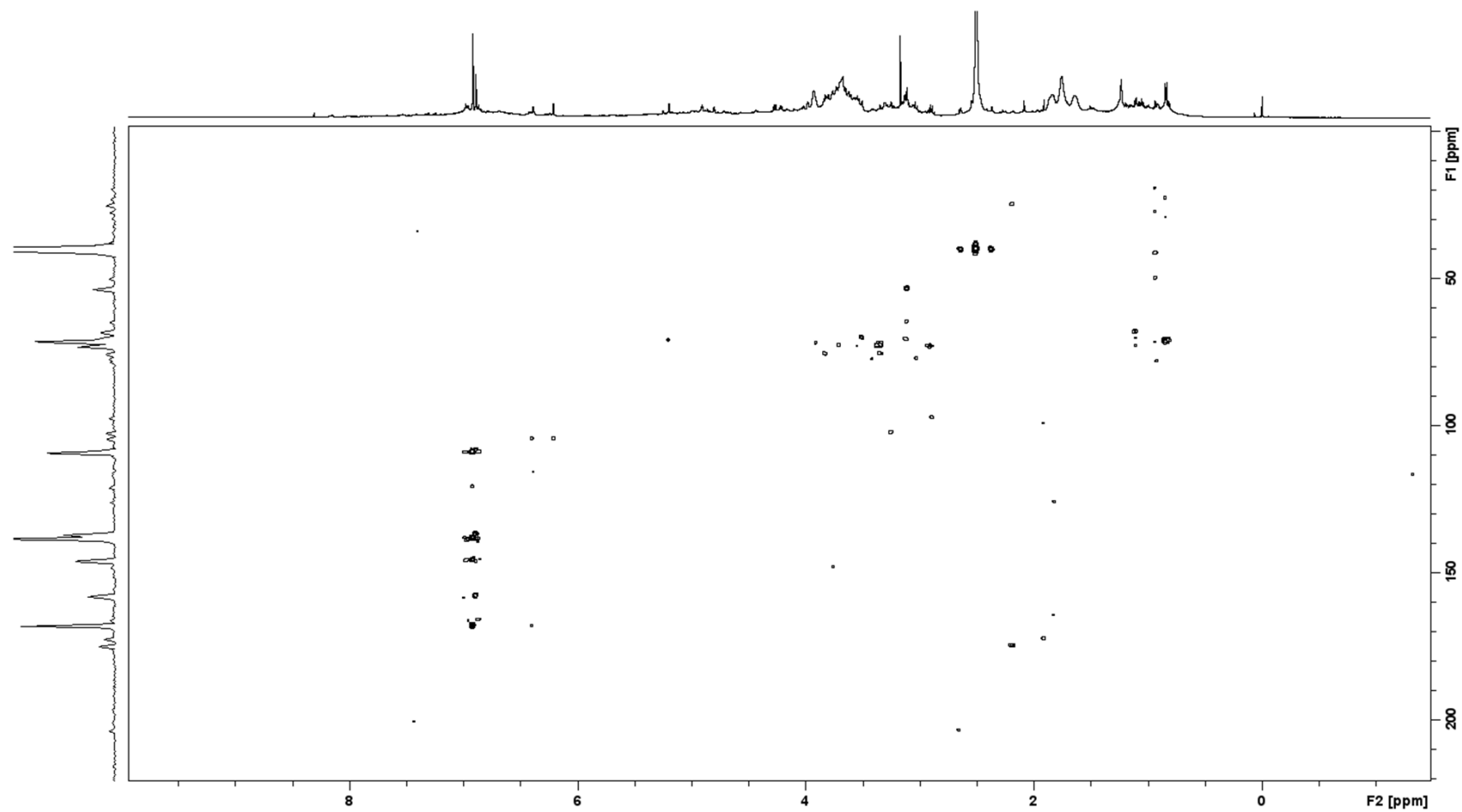


Figura S166

Espectro de RMN de ^1H do extrato seco de C4-PA (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$).

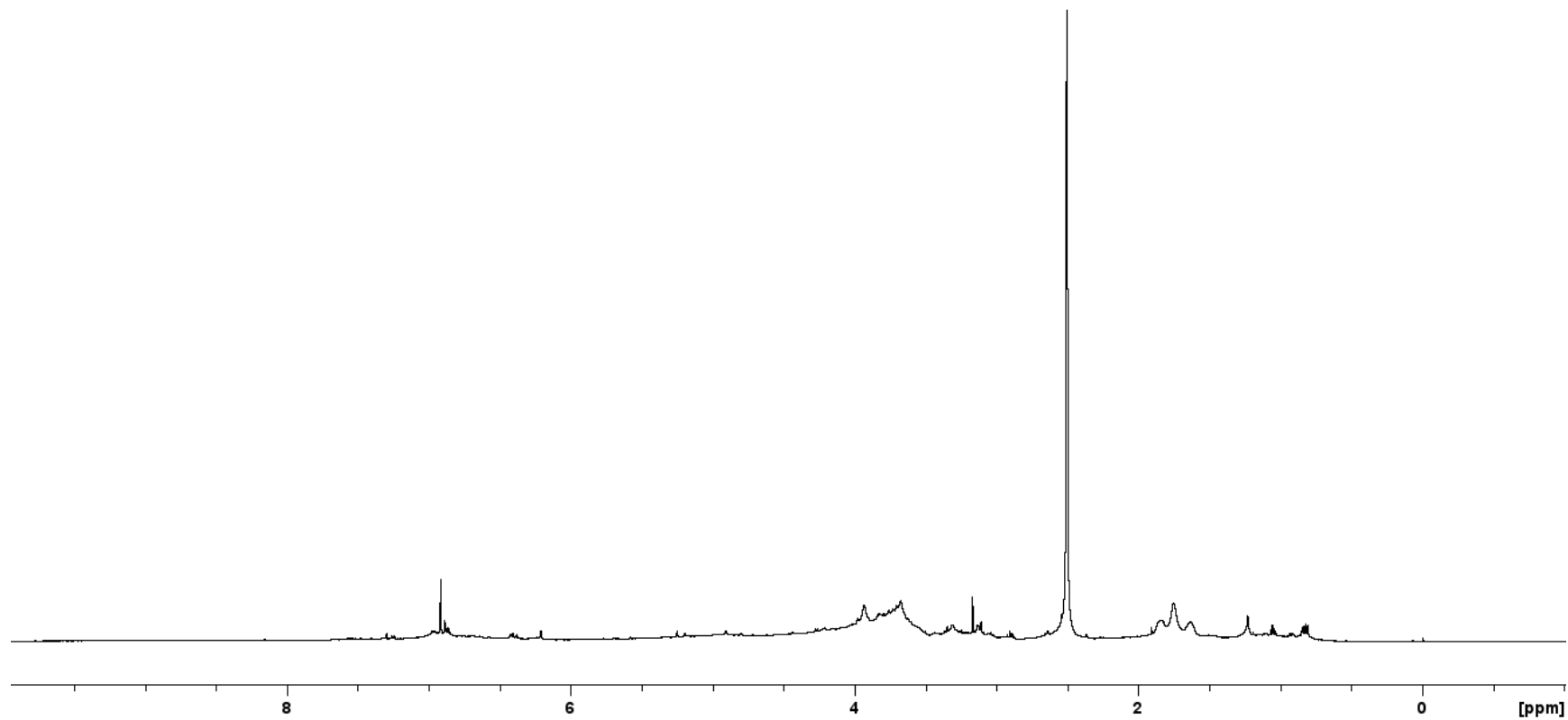


Figura S167

^1H - ^{13}H HSQC do extrato seco do extrato seco de C4-PA (11,74 T, $\text{DMSO}-d_6$).

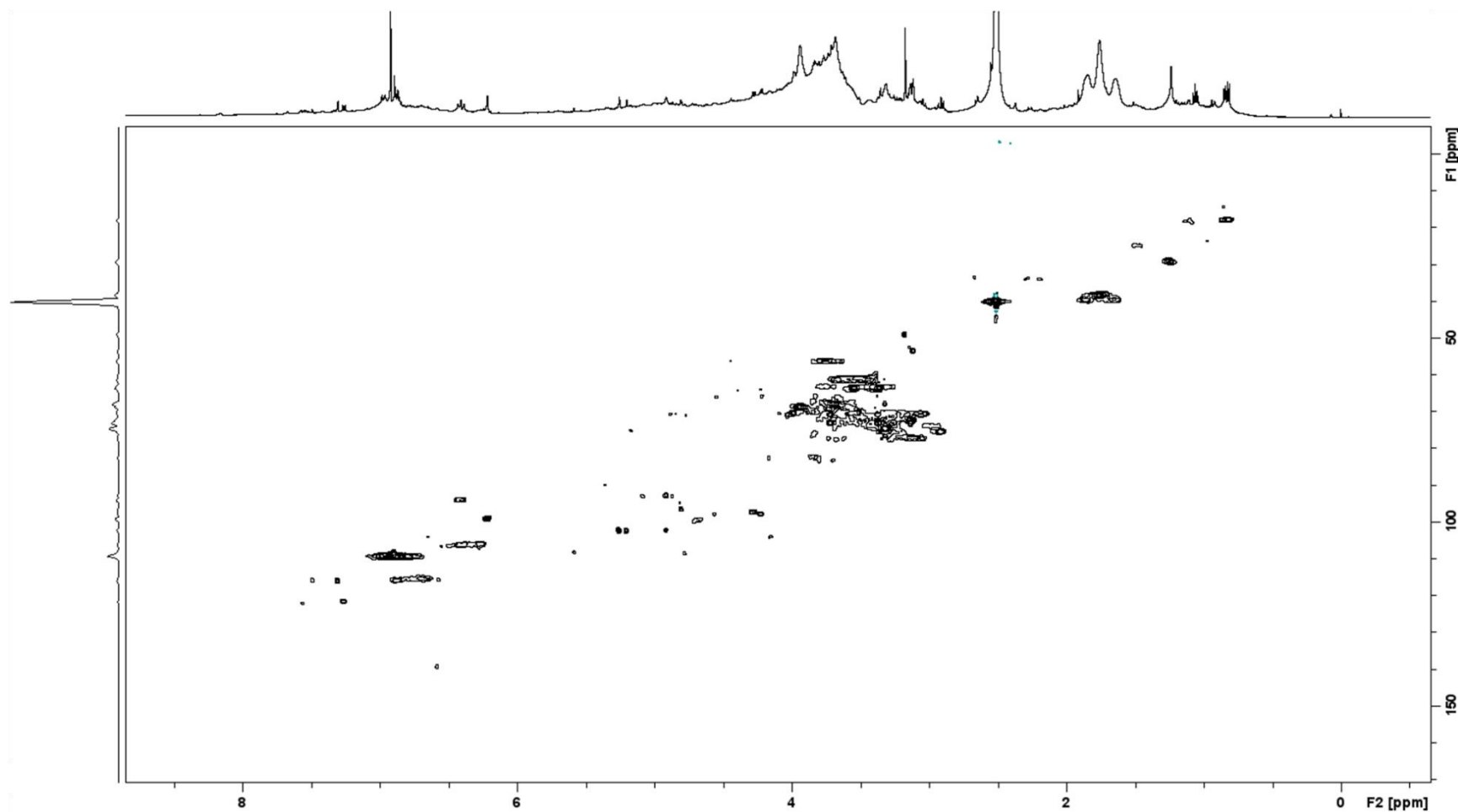


Figura S168

^1H - ^{13}H HMBC do extrato seco do extrato seco de C4-PA (11,74 T, $\text{DMSO}-d_6$).

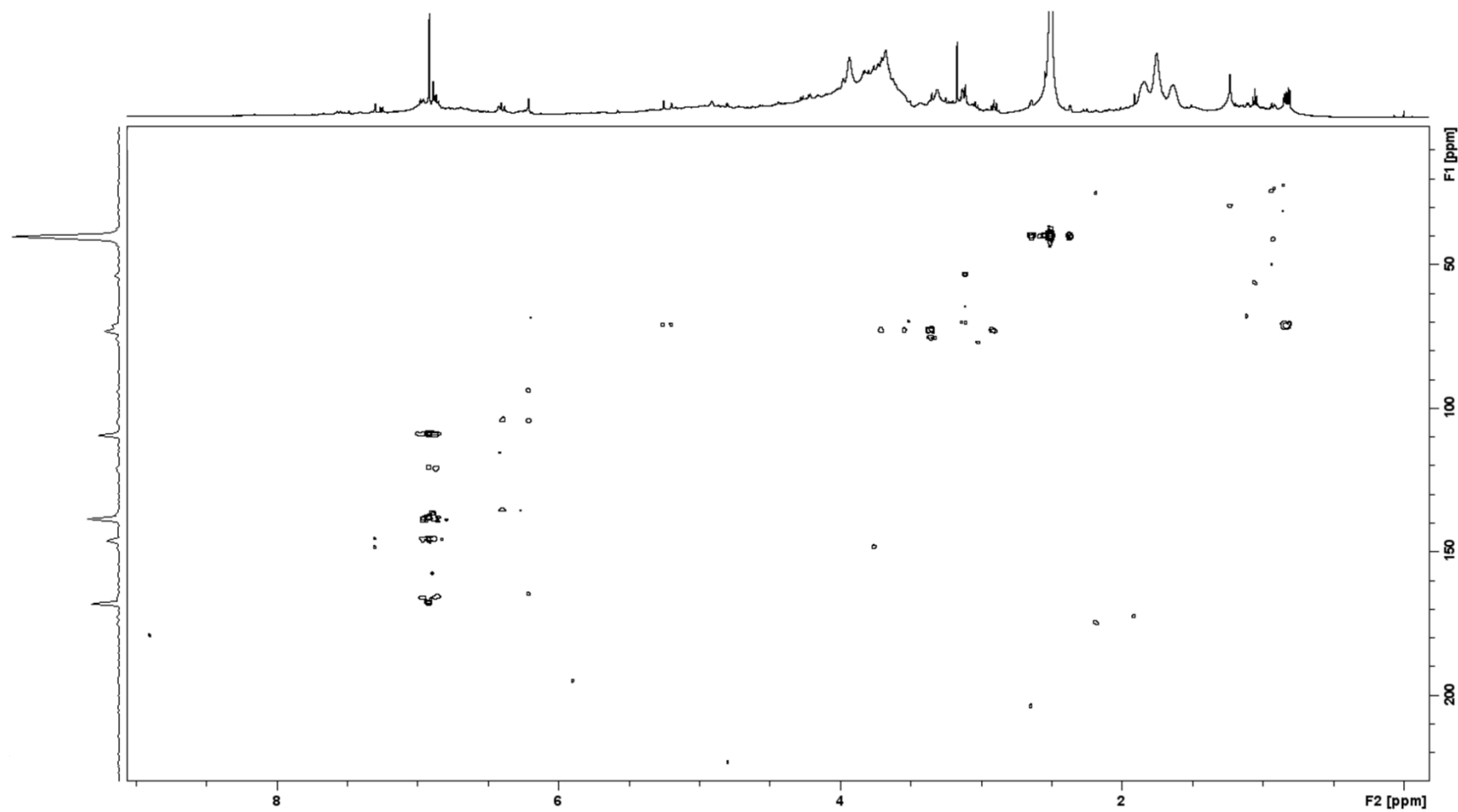


Figura S169

Espectro de RMN de ^1H do extrato seco de C5-PA (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).

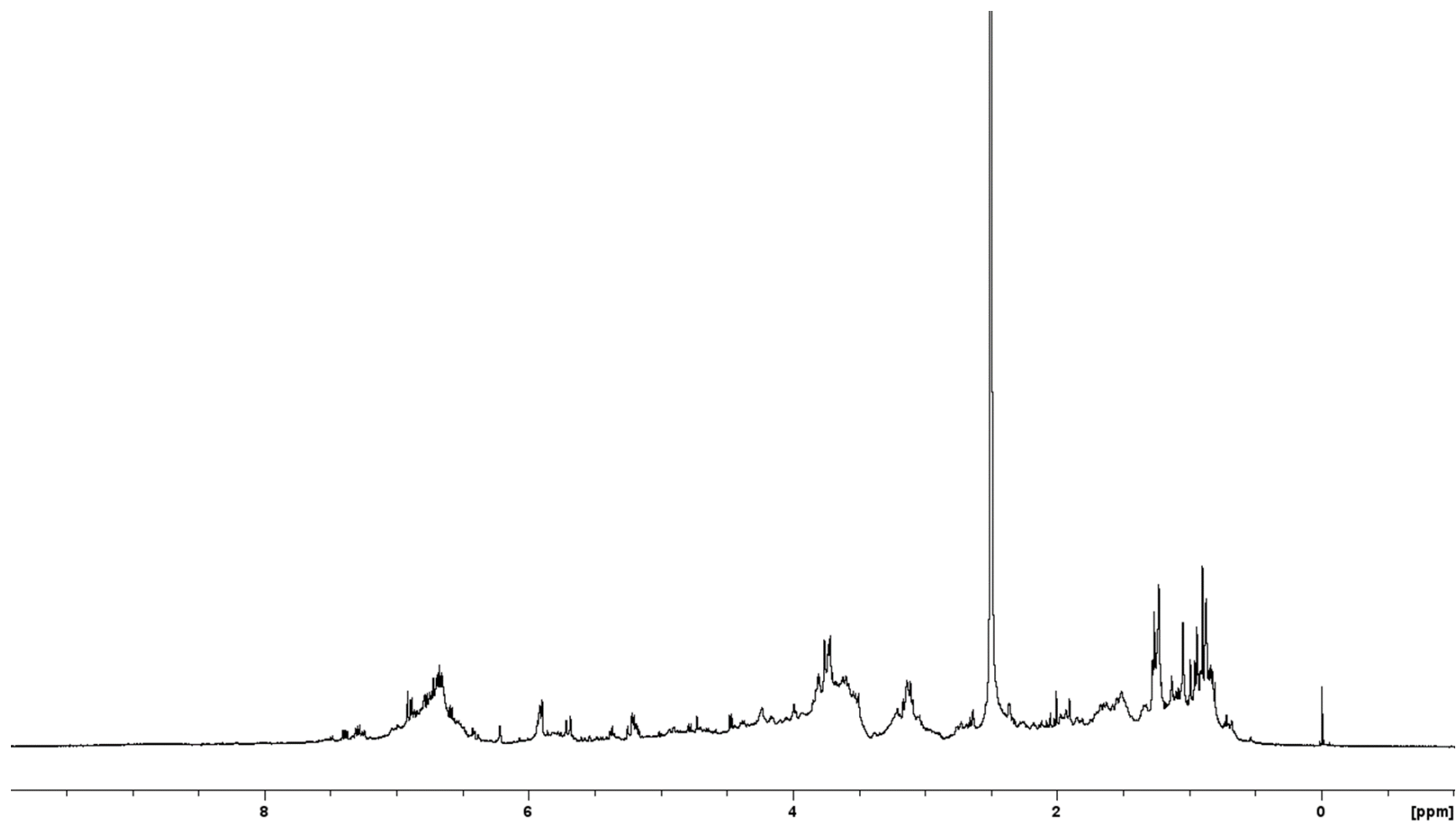


Figura S170

^1H - ^{13}H HSQC do extrato seco do extrato seco de C5-PA (11,74 T, $\text{DMSO}-d_6$).

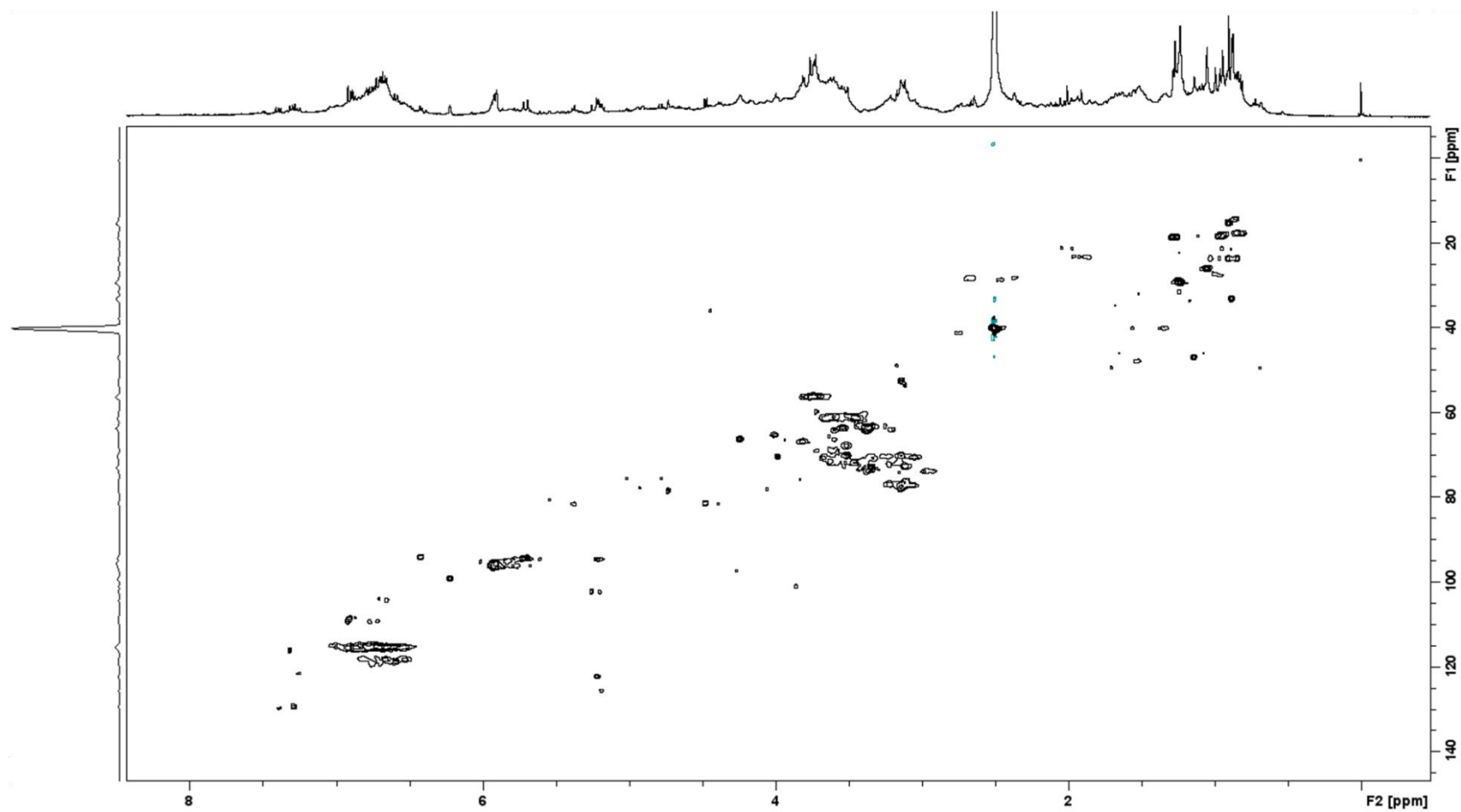


Figura S171

^1H - ^{13}H HMBC do extrato seco do extrato seco de C5-PA (11,74 T, $\text{DMSO-}d_6$).

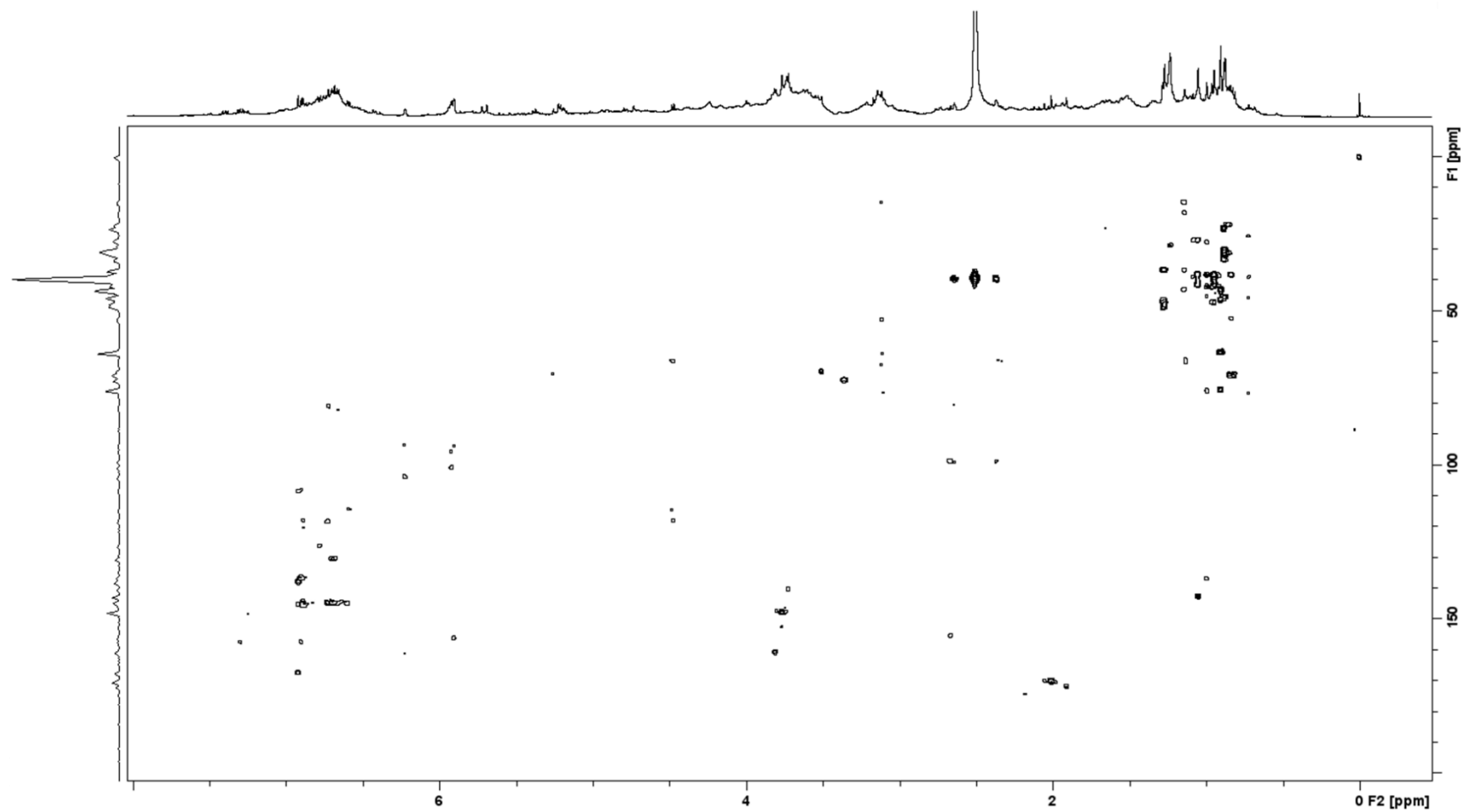


Figura S172

Espectro de RMN de ^1H do extrato seco de C6-PA (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)

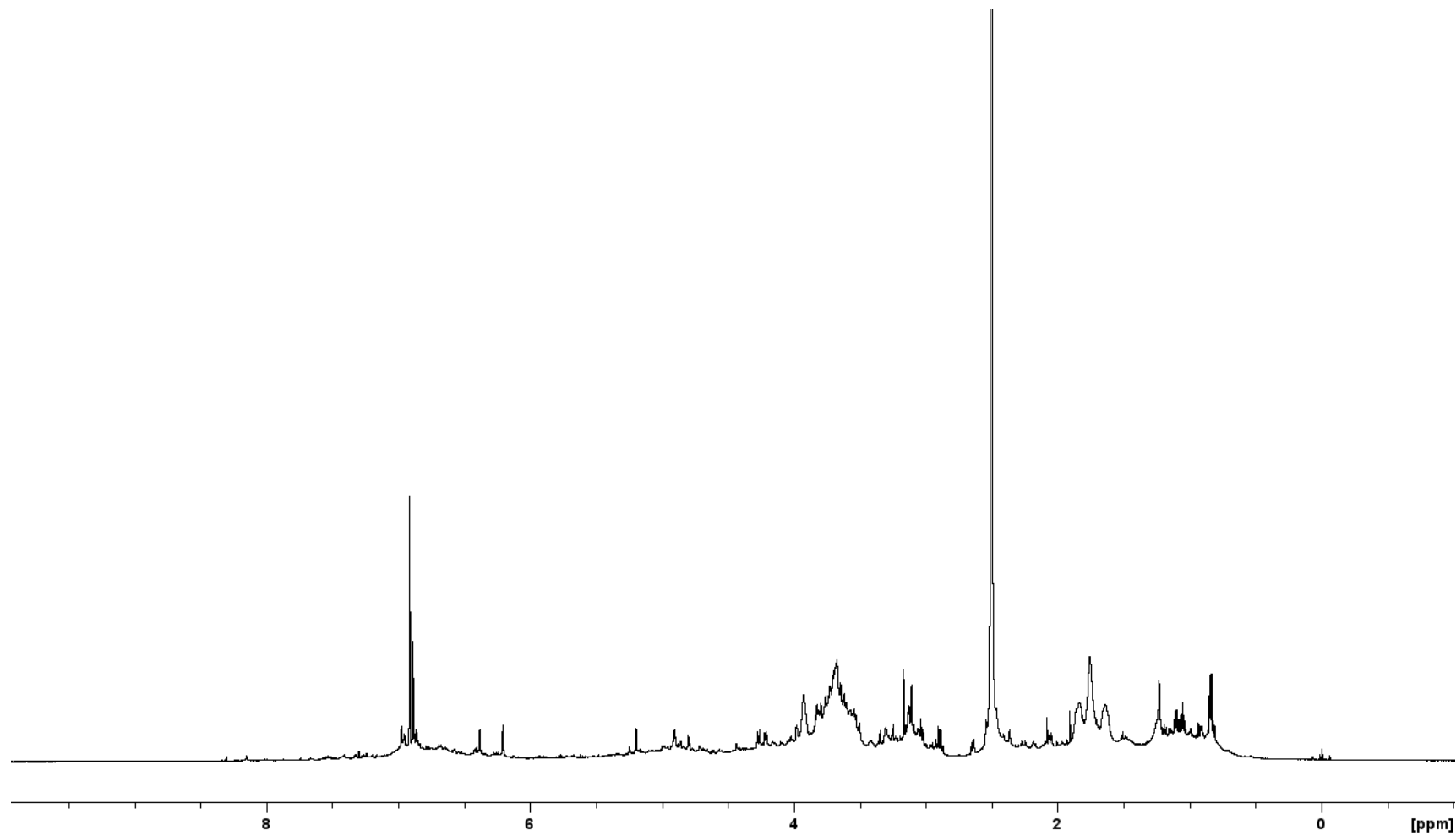


Figura S173

^1H - ^{13}H HSQC do extrato seco do extrato seco de C6-PA (11,74 T, $\text{DMSO}-d_6$).

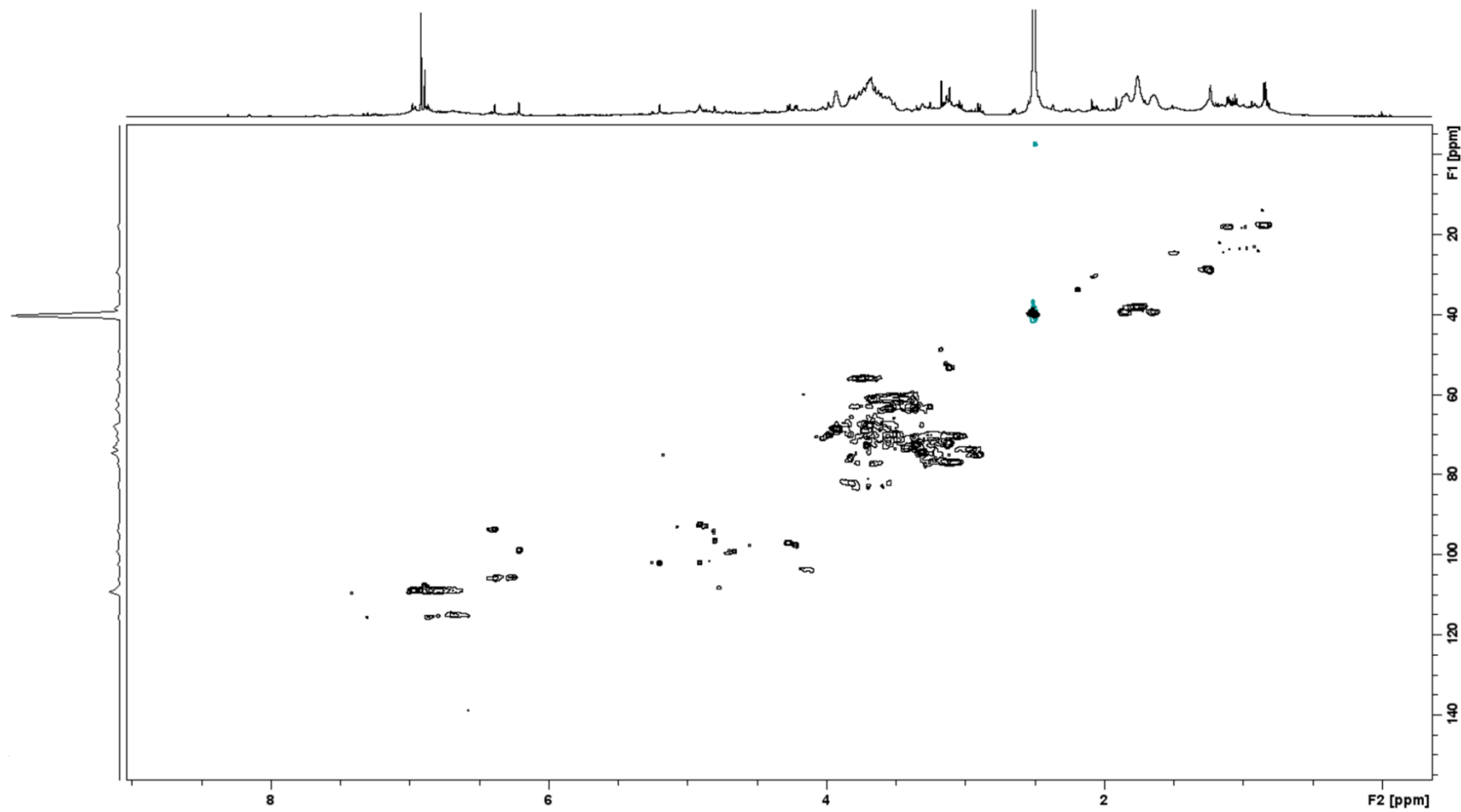


Figura S174

^1H - ^{13}H HMBC do extrato seco do extrato seco de C6-PA (11,74 T, $\text{DMSO-}d_6$).

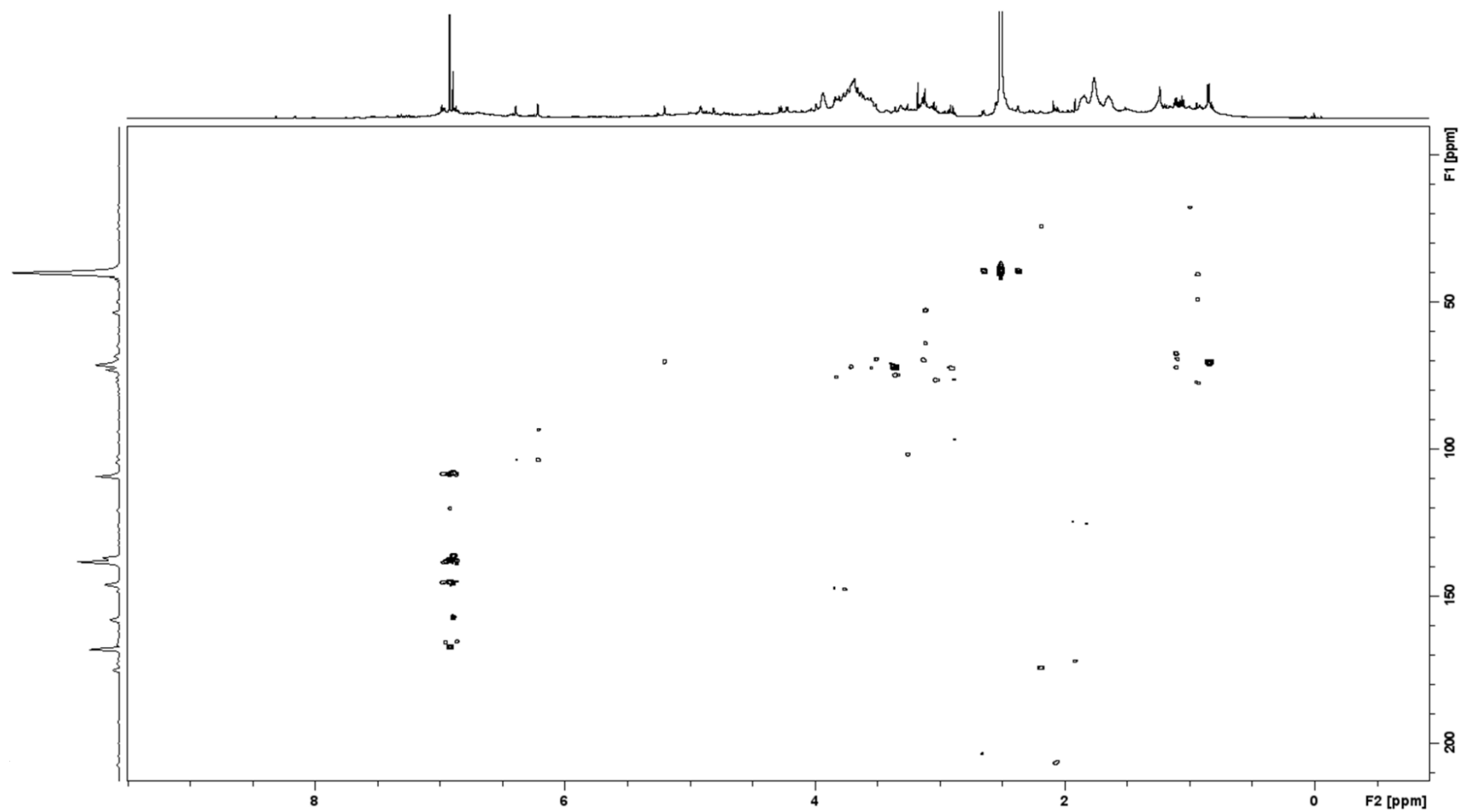


Figura S175

Espectro de RMN de ^1H do extrato seco de C7-PA (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)

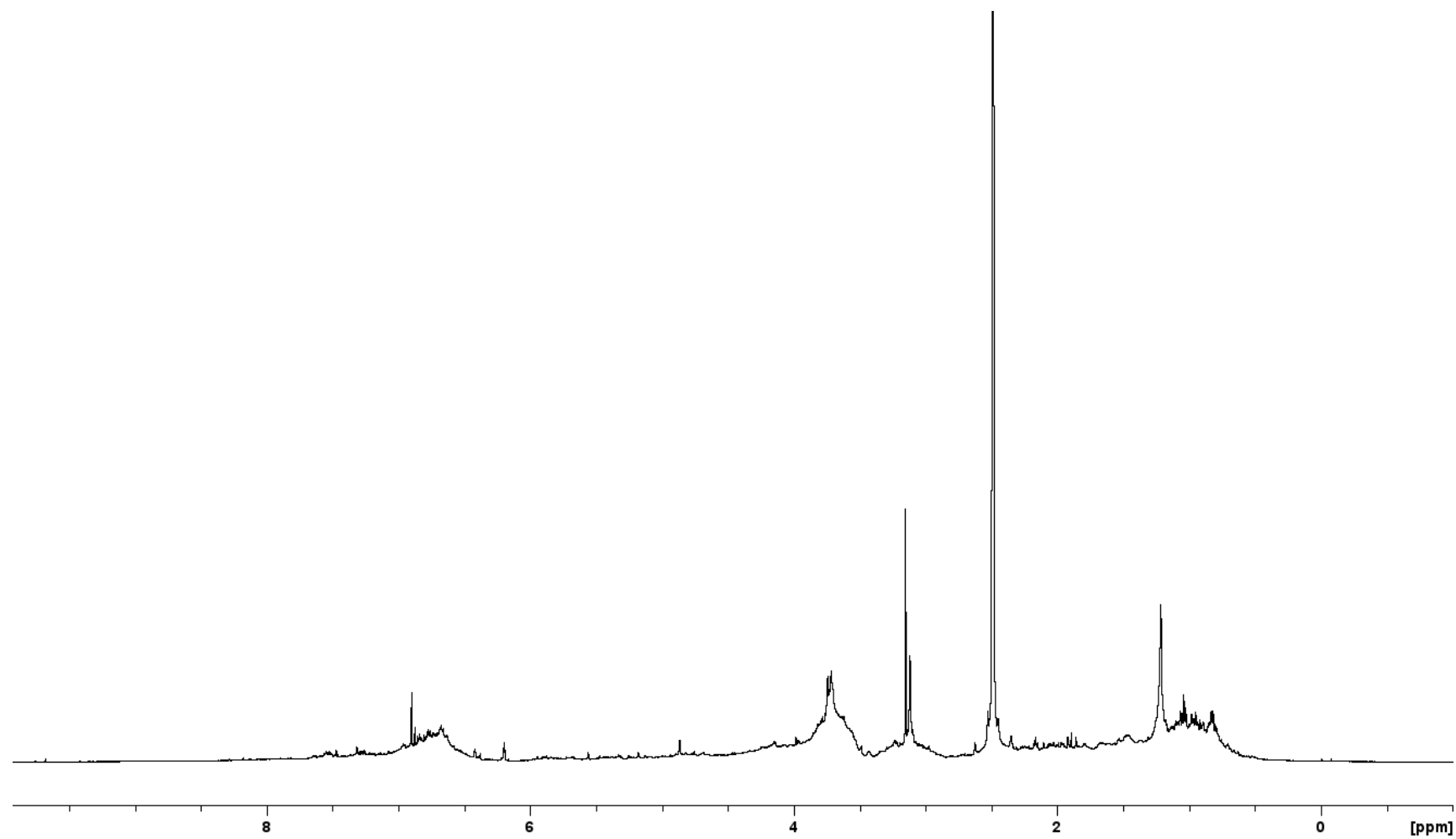


Figura S176

^1H - ^{13}H HSQC do extrato seco do extrato seco de C7-PA (11,74 T, $\text{DMSO}-d_6$).

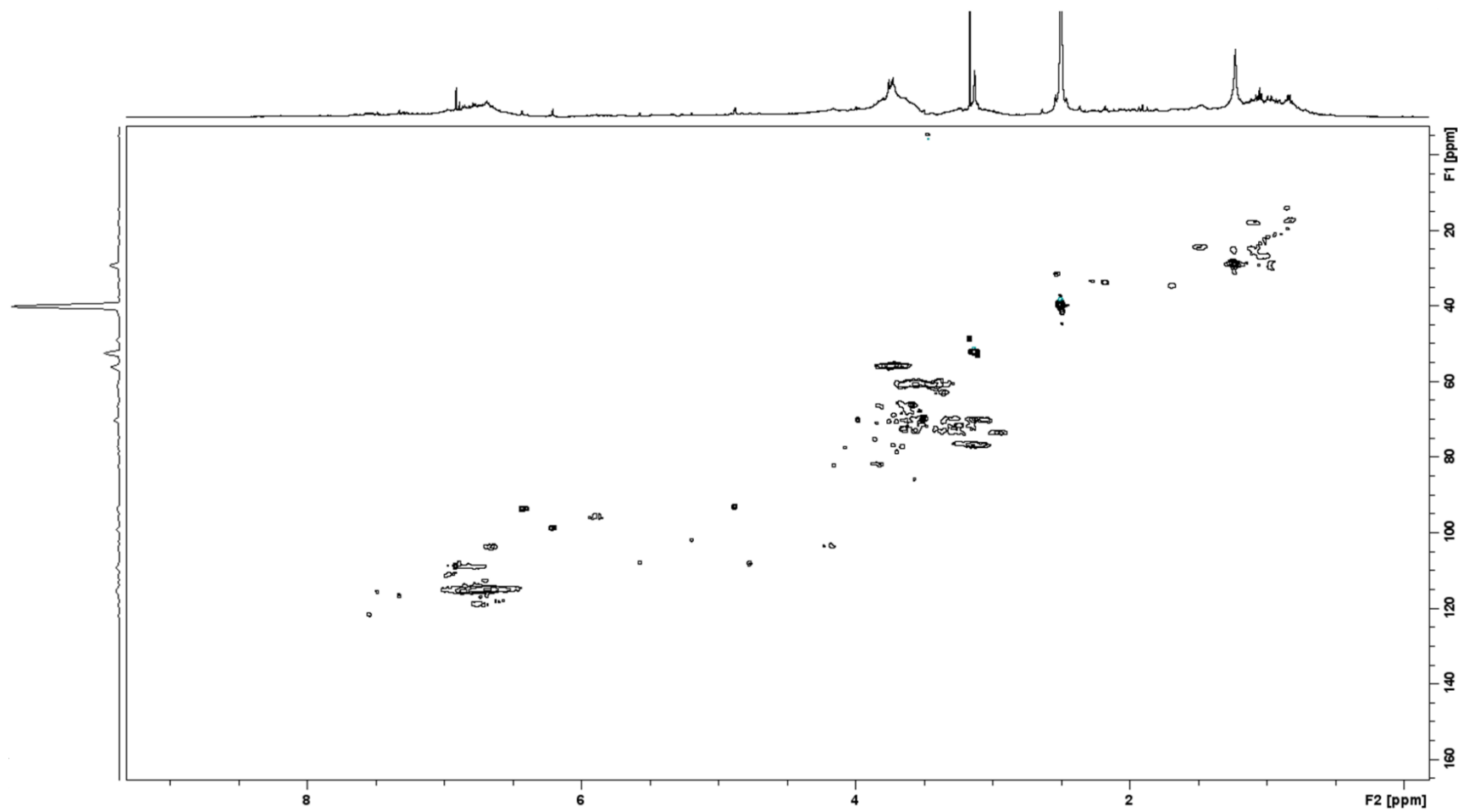


Figura S177

^1H - ^{13}H HMBC do extrato seco do extrato seco de C7-PA (11,74 T, $\text{DMSO-}d_6$).

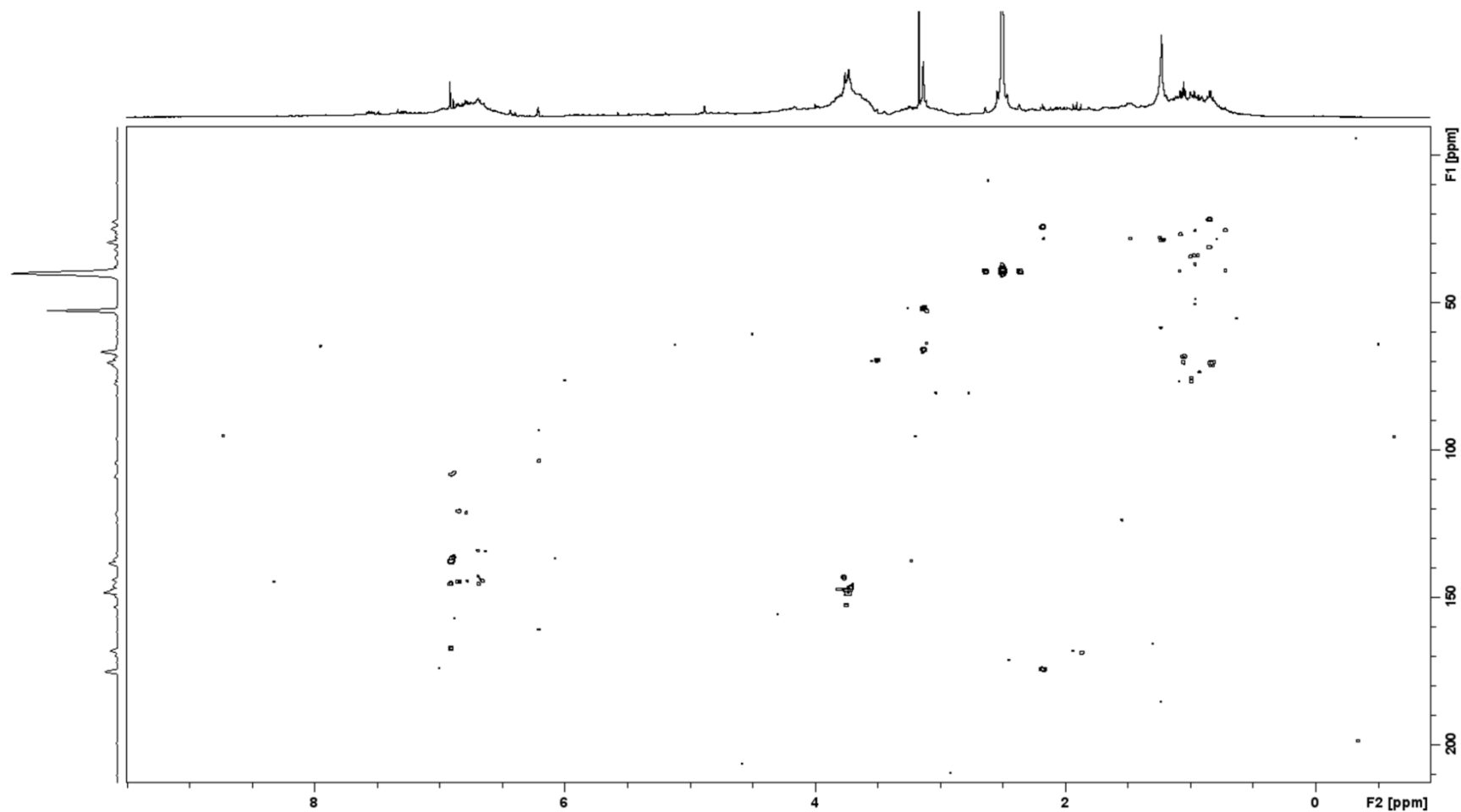


Figura S178

Espectro de RMN de ^1H do extrato seco de C8-PA (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$).

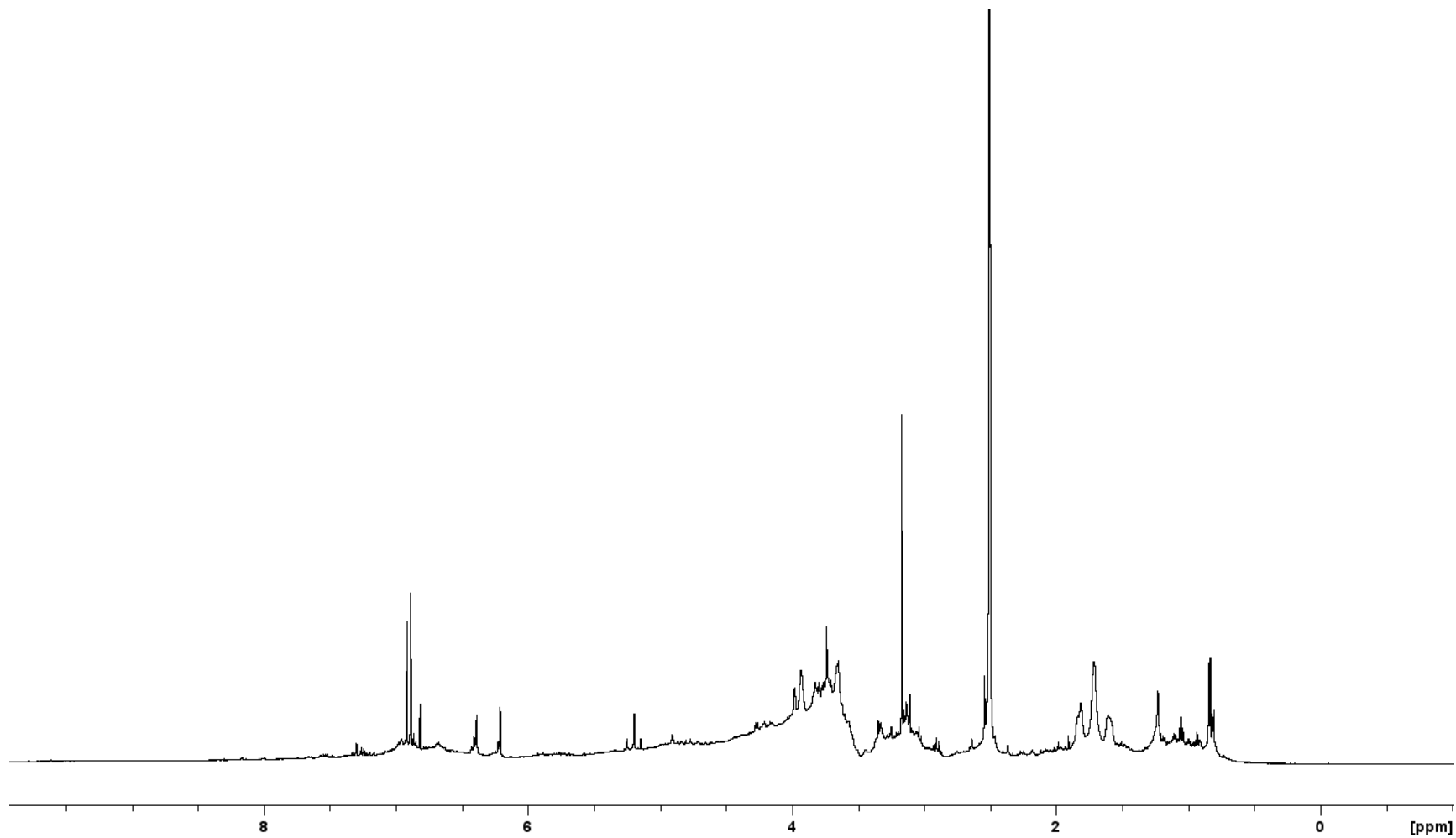


Figura S179

^1H - ^{13}H HSQC do extrato seco do extrato seco de C8-PA (11,74 T, $\text{DMSO}-d_6$).

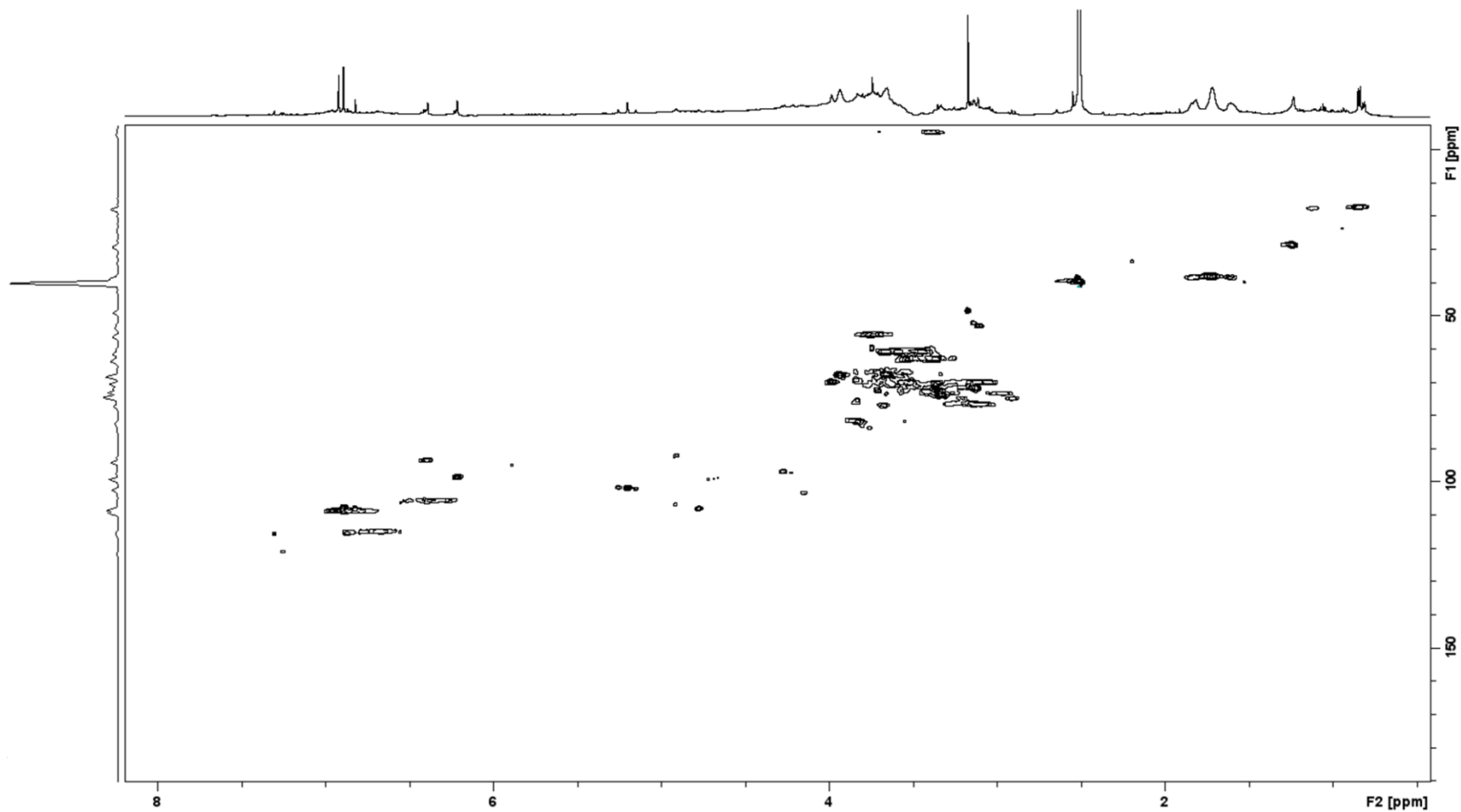


Figura S180

^1H - ^{13}H HMBC do extrato seco do extrato seco de C8-PA (11,74 T, $\text{DMSO}-d_6$).

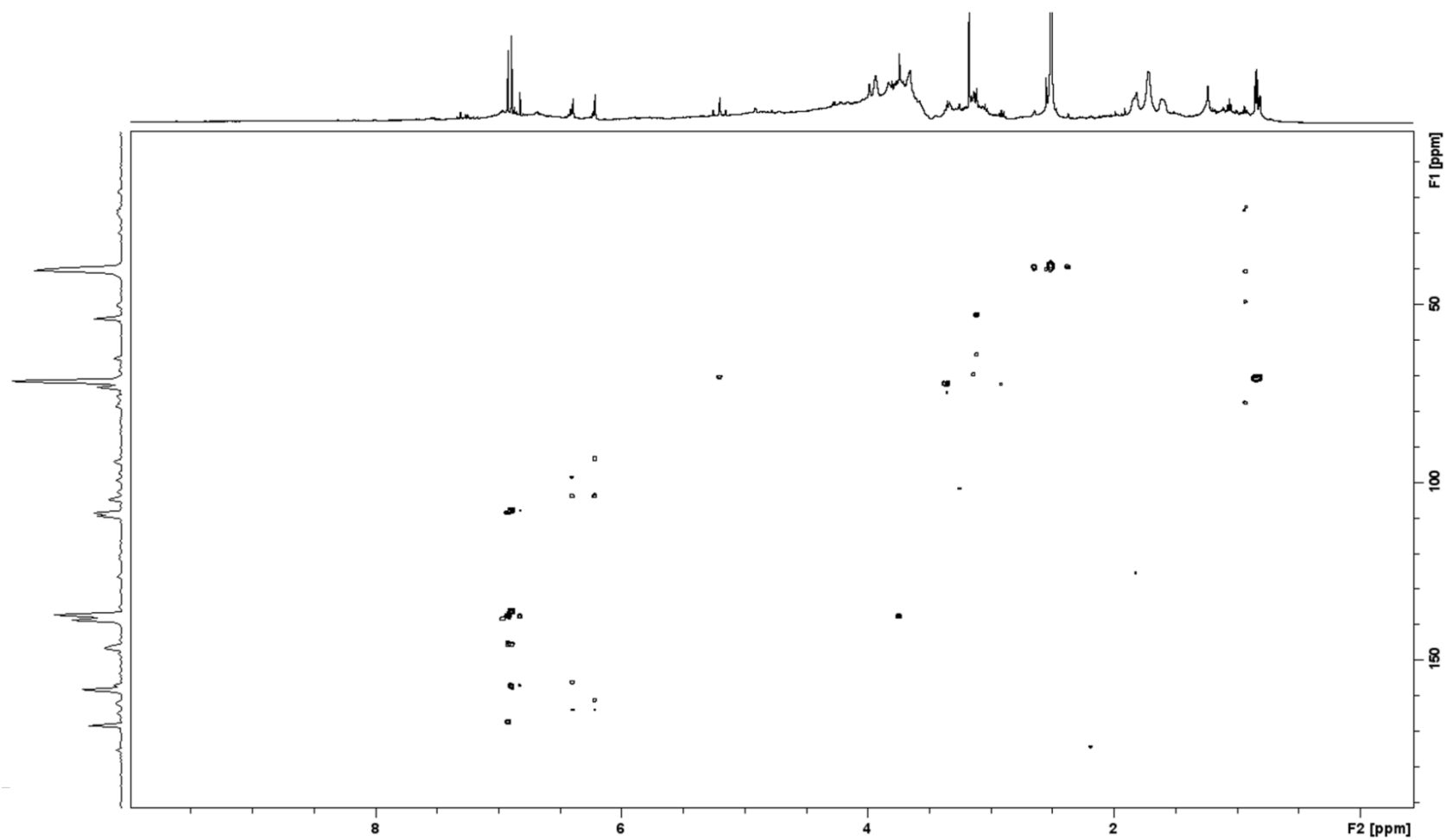


Figura S181

Espectro de RMN de ^1H do extrato seco de C9-PA (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)

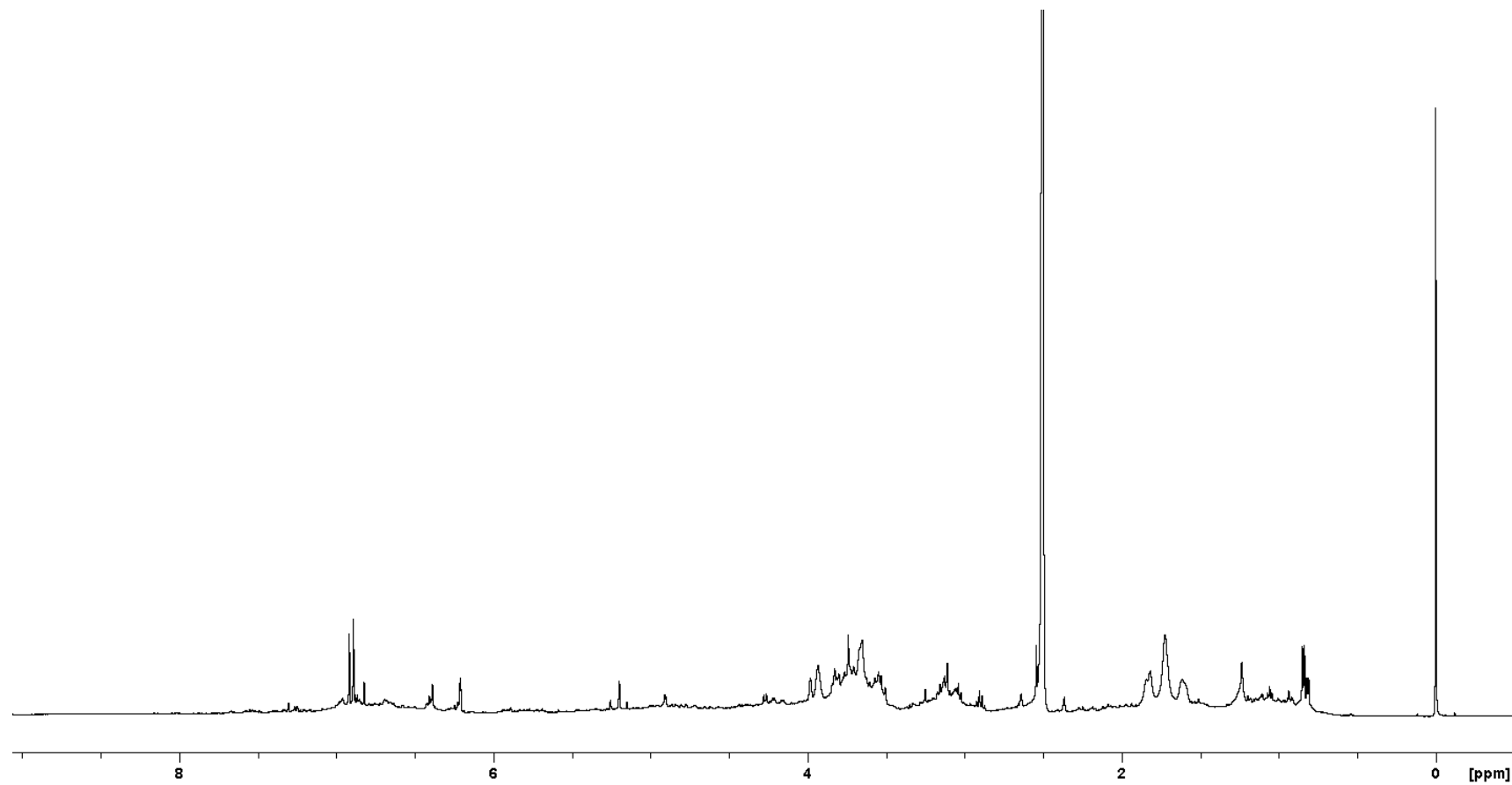


Figura S182

^1H - ^{13}H HSQC do extrato seco do extrato seco de C9-PA (11,74 T, $\text{DMSO}-d_6$)

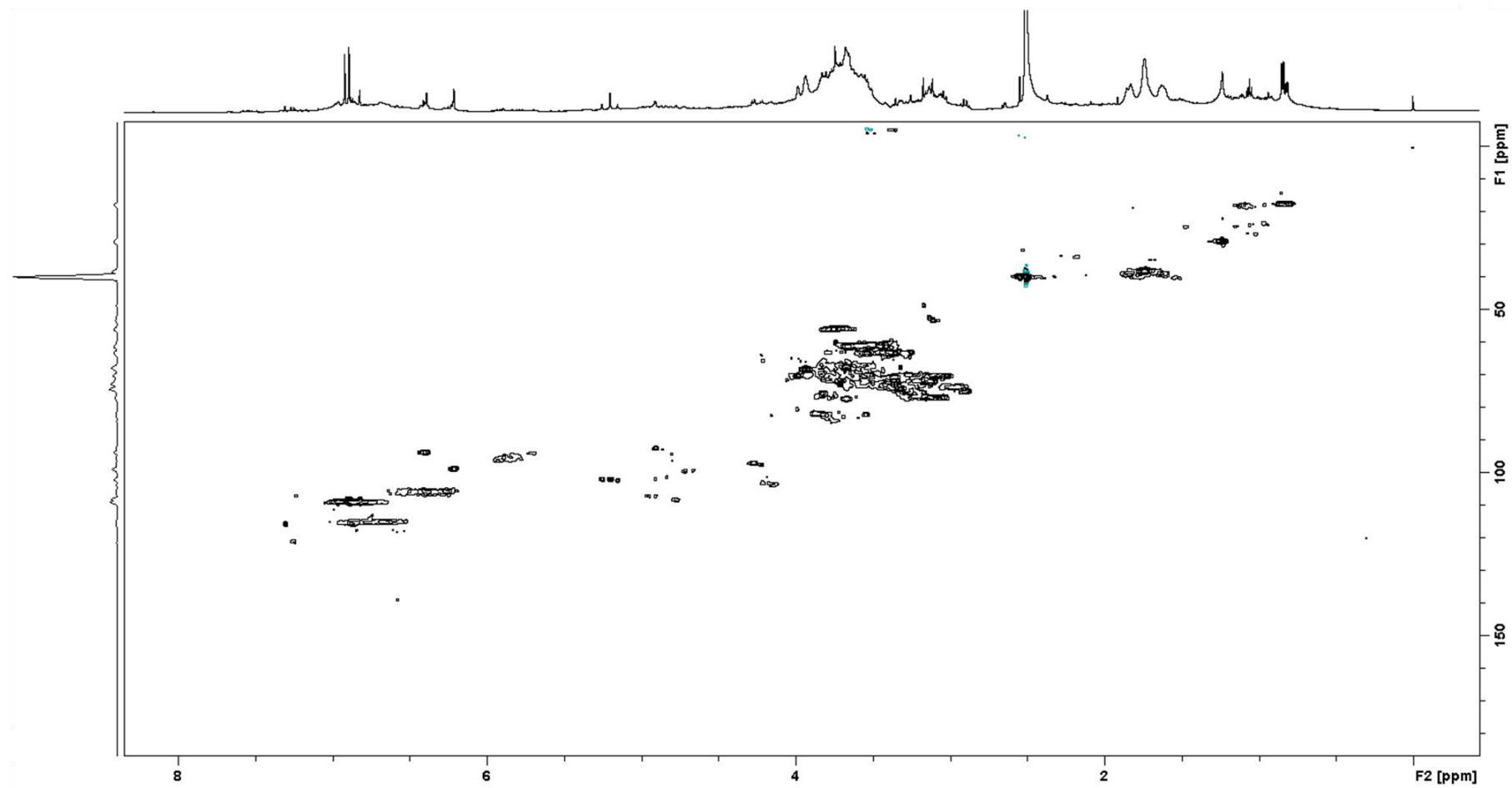


Figura S183

^1H - ^{13}H HMBC do extrato seco do extrato seco de C9-PA (11,74 T, $\text{DMSO}-d_6$)

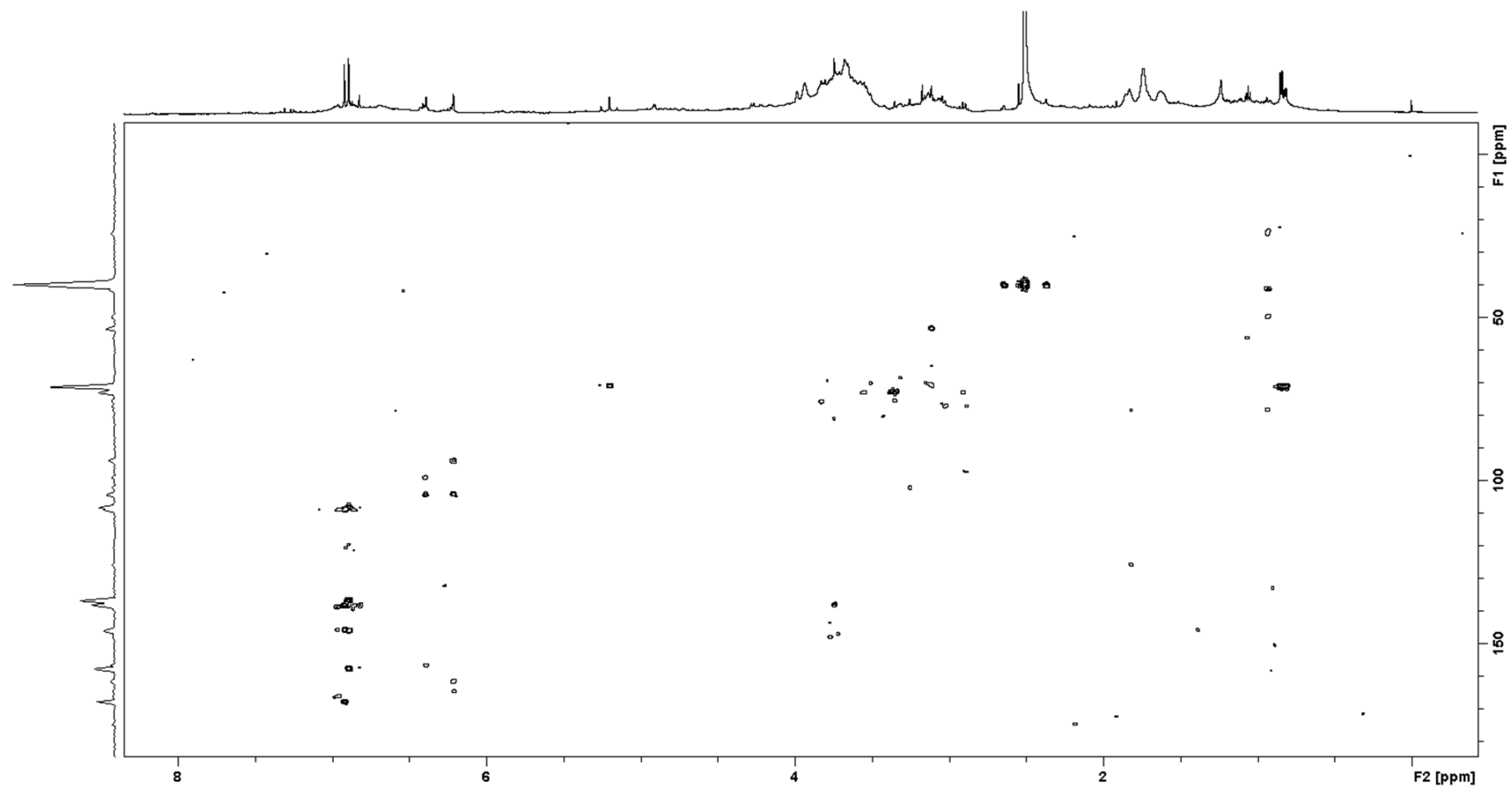


Figura S184

Espectro de RMN de ^1H do extrato seco de C10-PA (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$).

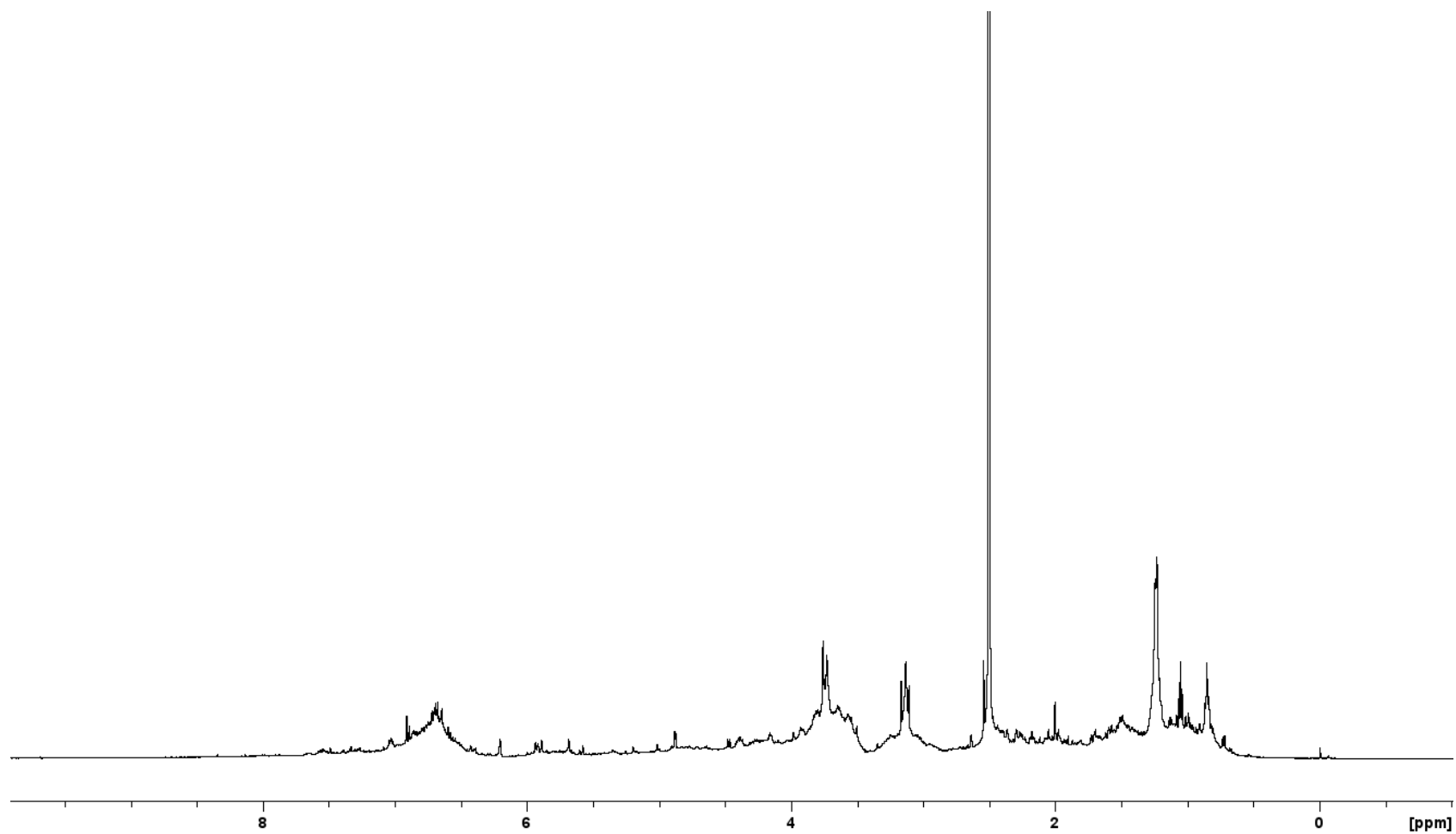


Figura S185

^1H - ^{13}H HSQC do extrato seco do extrato seco de C10-PA (11,74 T, $\text{DMSO}-d_6$).

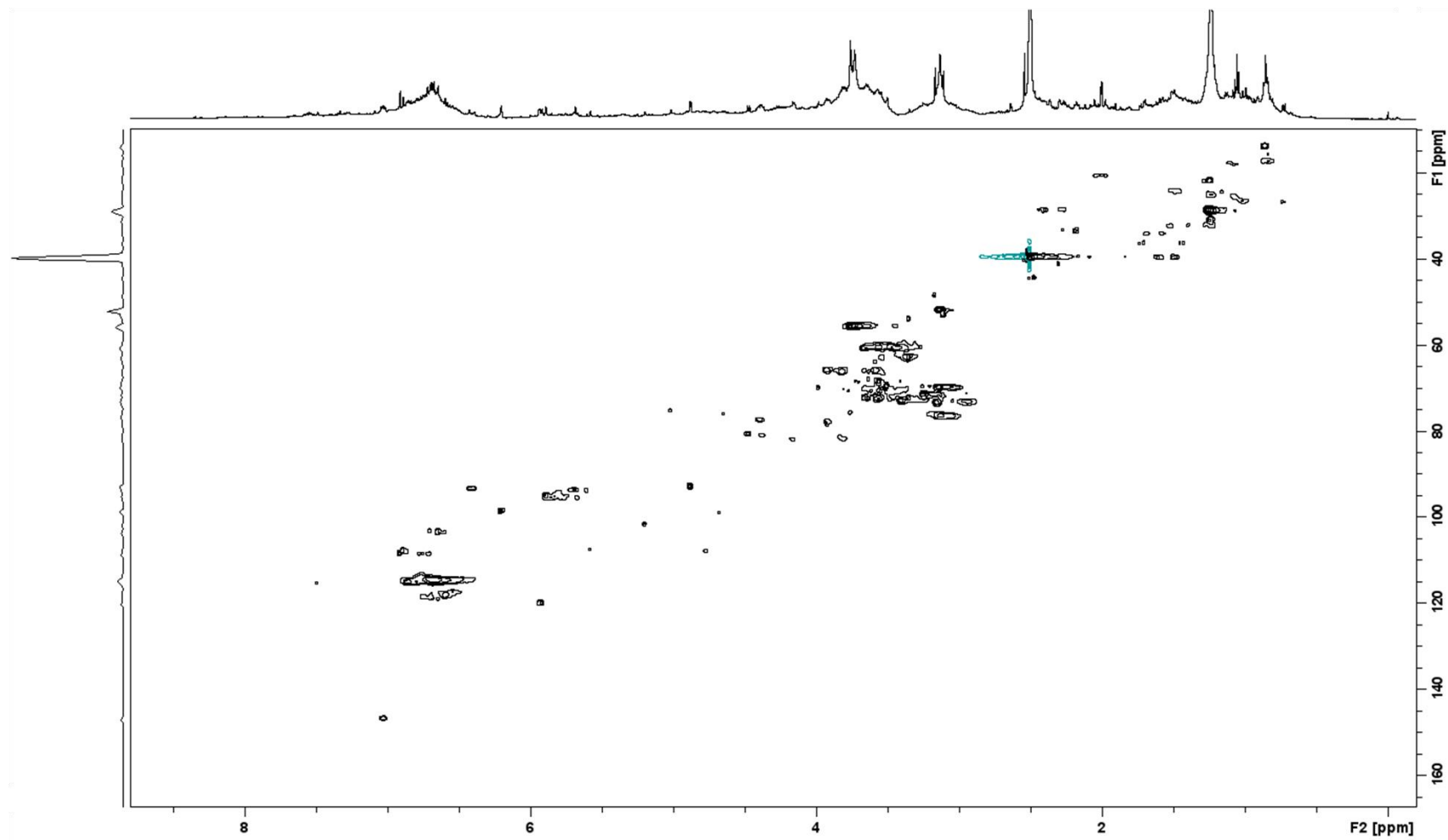


Figura S186

^1H - ^{13}H HMBC do extrato seco do extrato seco de C10-PA (11,74 T, $\text{DMSO}-d_6$).

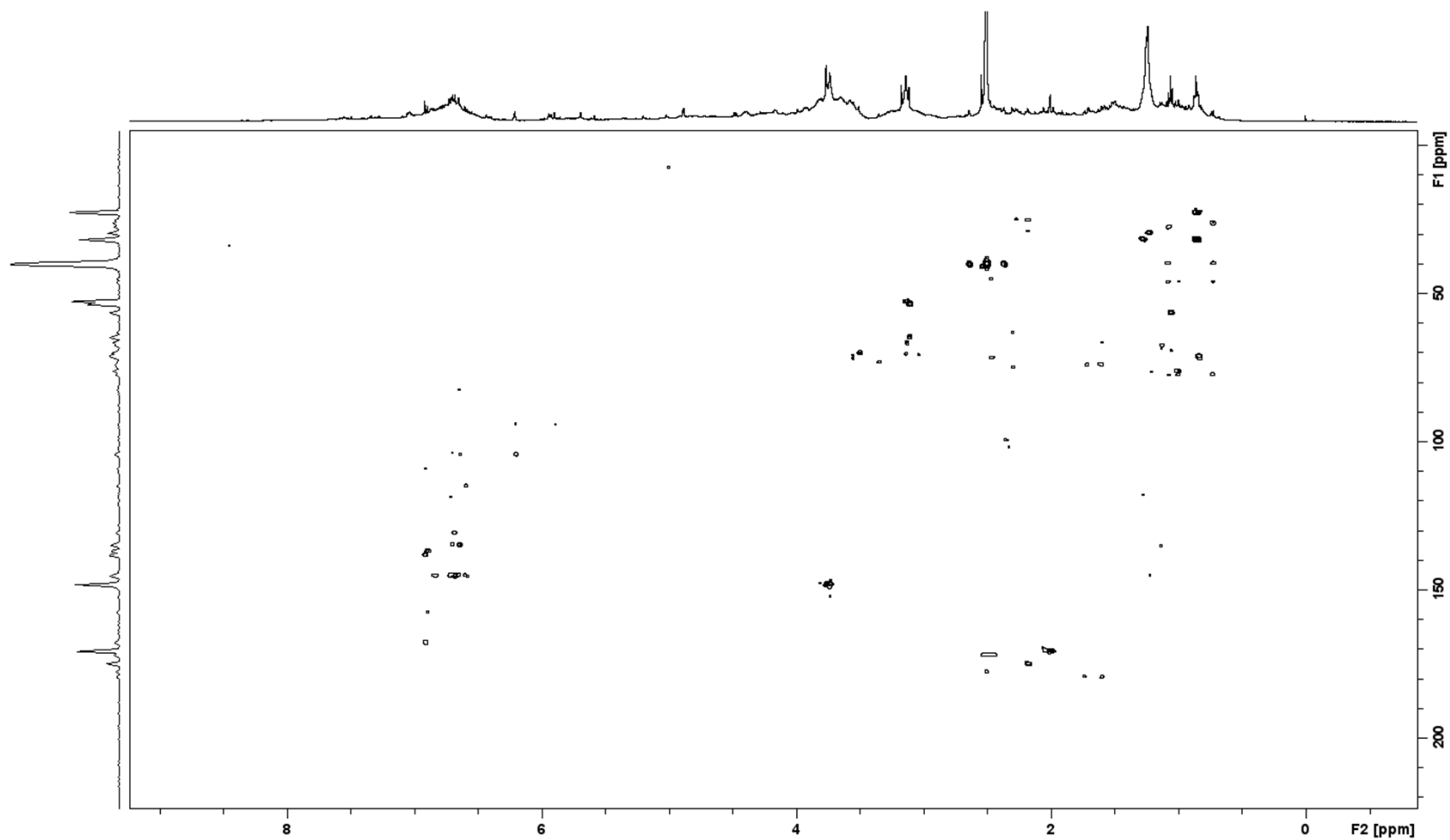


Figura S187

Espectro de RMN ^1H do extrato seco de C11-PA (500,13 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)

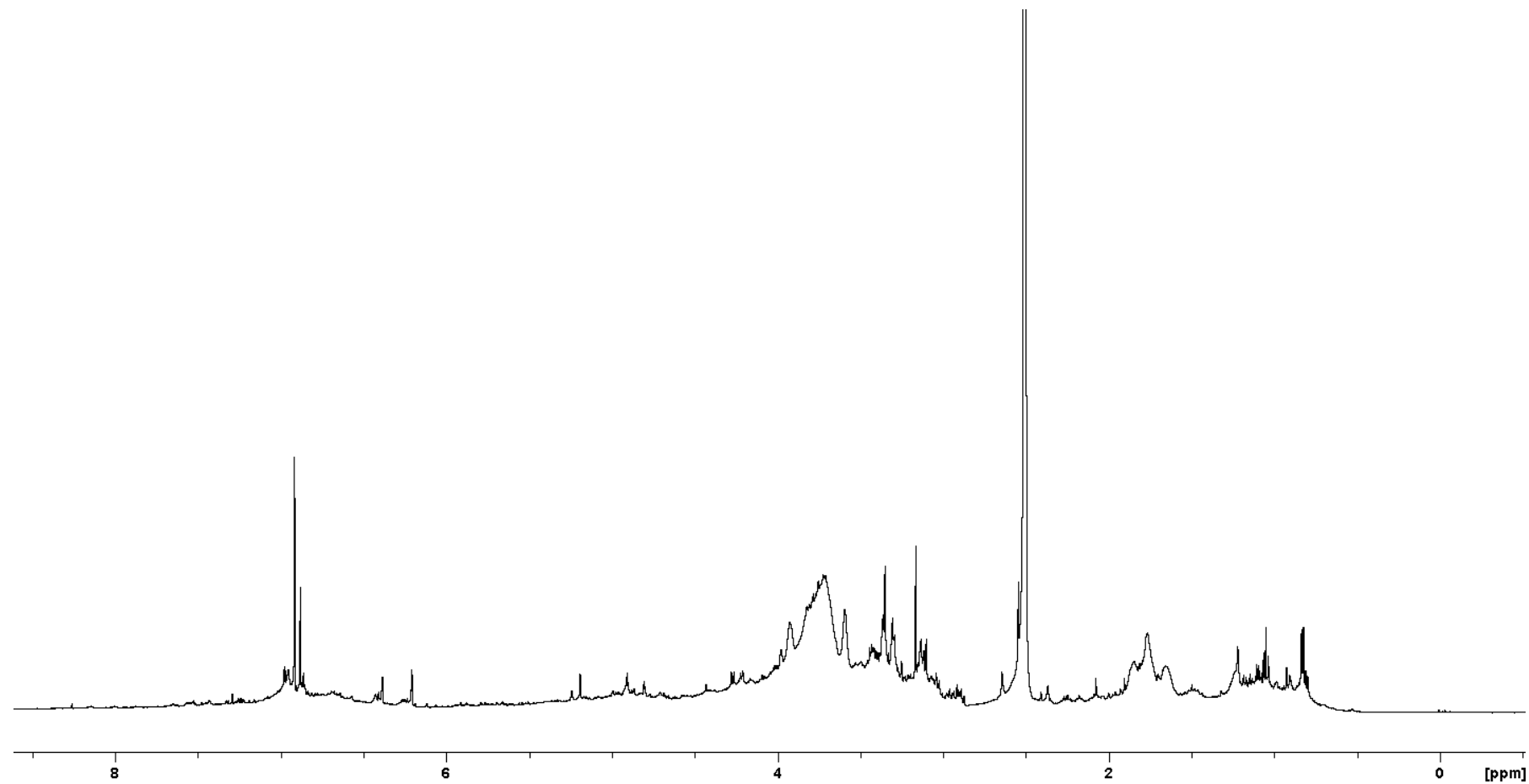


Figura S188

^1H - ^{13}H HSQC do extrato seco do extrato seco de C11-PA (11,74 T, $\text{DMSO}-d_6$)

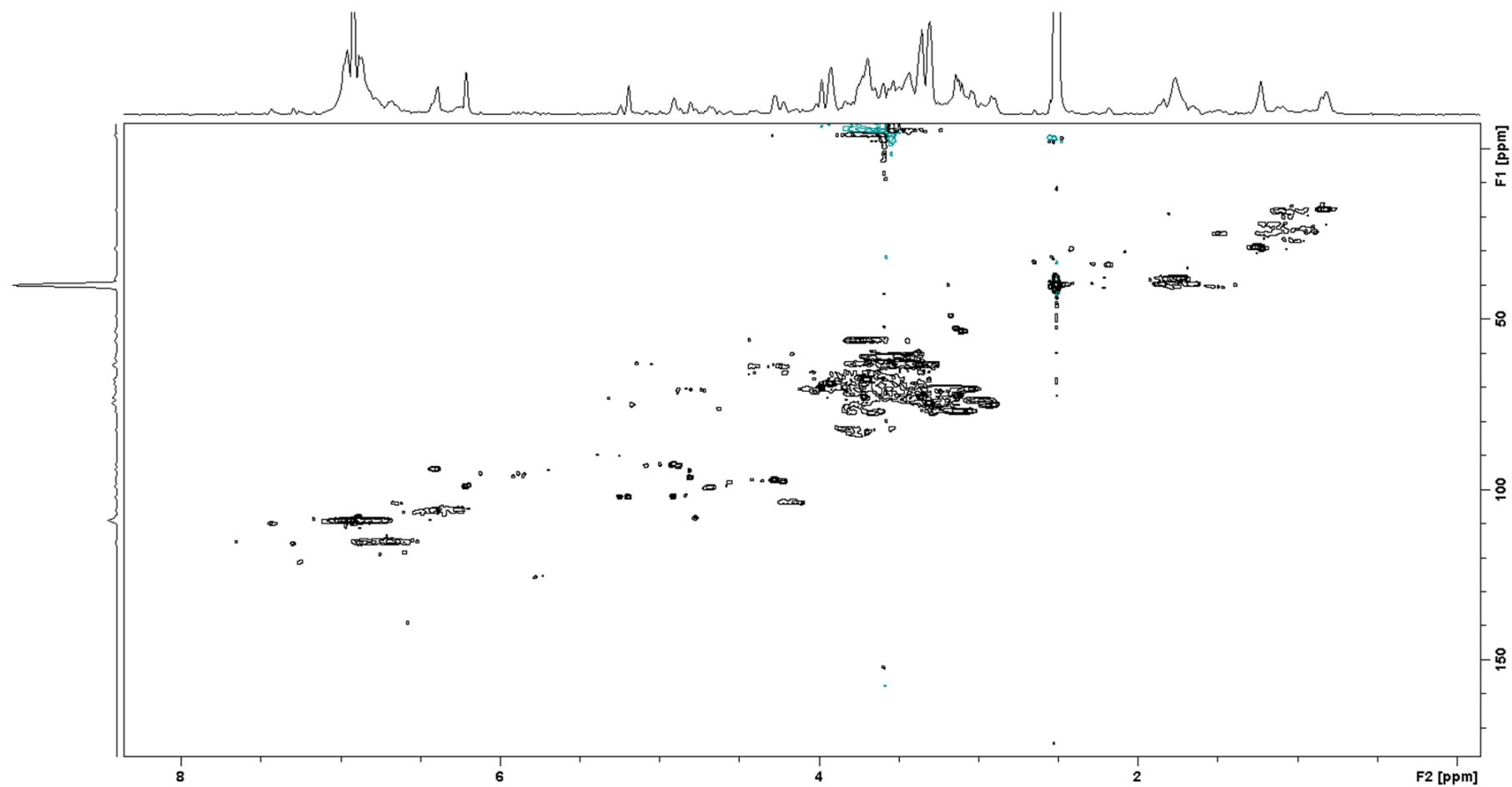


Figura S189

^1H - ^{13}H HMBC do extrato seco do extrato seco de C11-PA (11,74 T, $\text{DMSO}-d_6$)

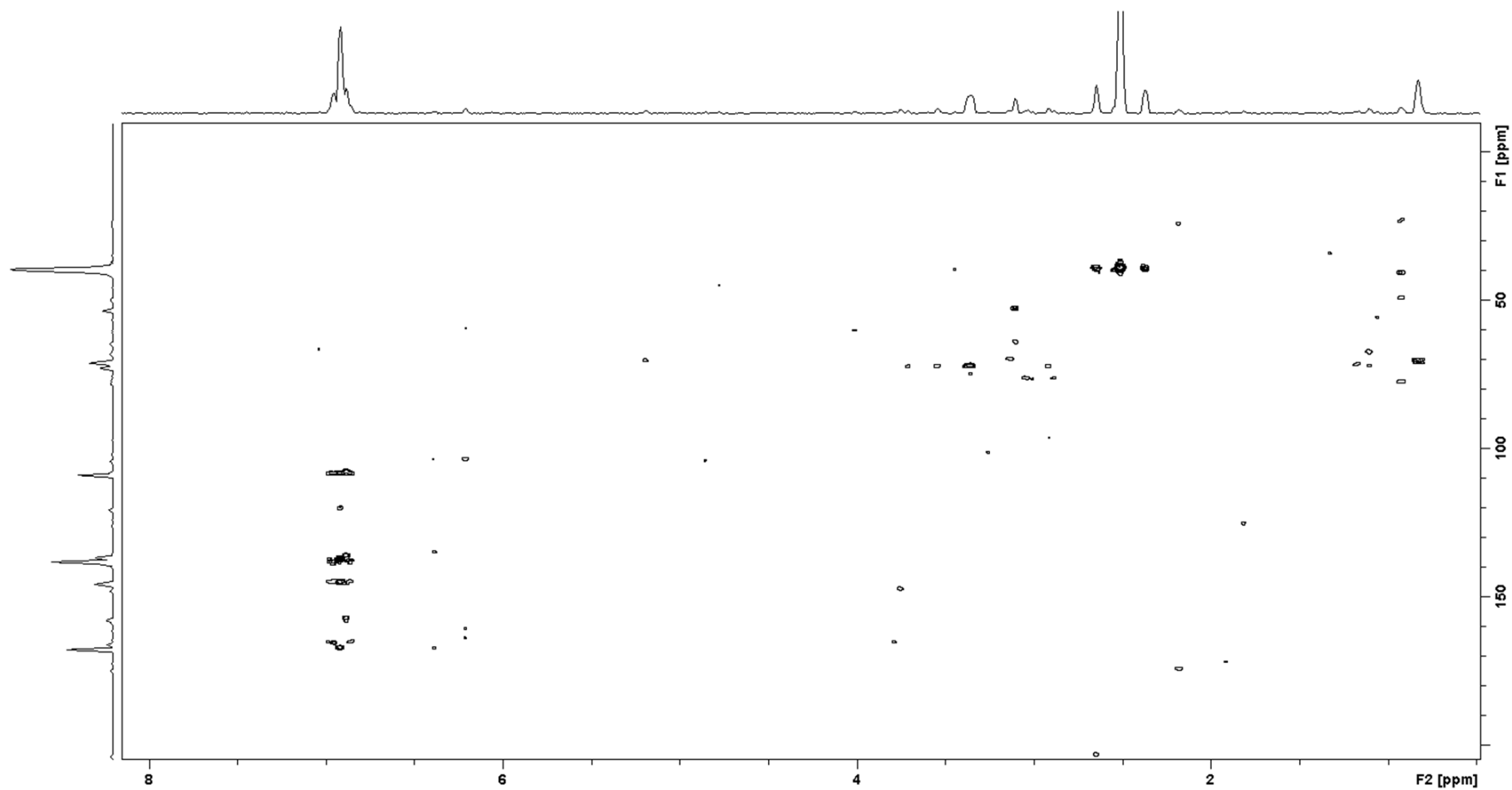


Figura S190

Espectro de RMN de ^1H do extrato seco de C12-PA (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)

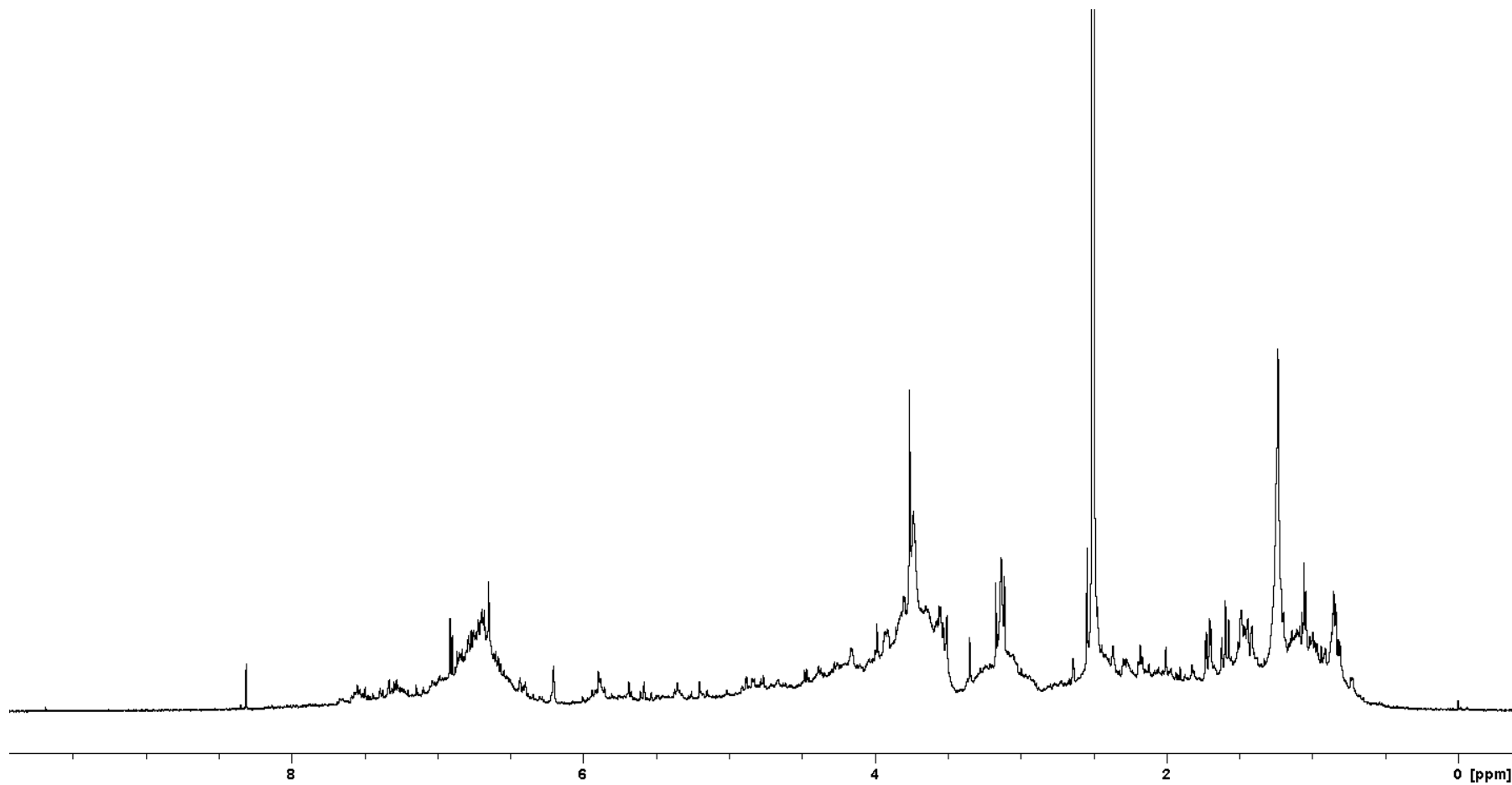


Figura S191

^1H - ^{13}H HSQC do extrato seco do extrato seco de C12-PA (11,74 T, $\text{DMSO}-d_6$)

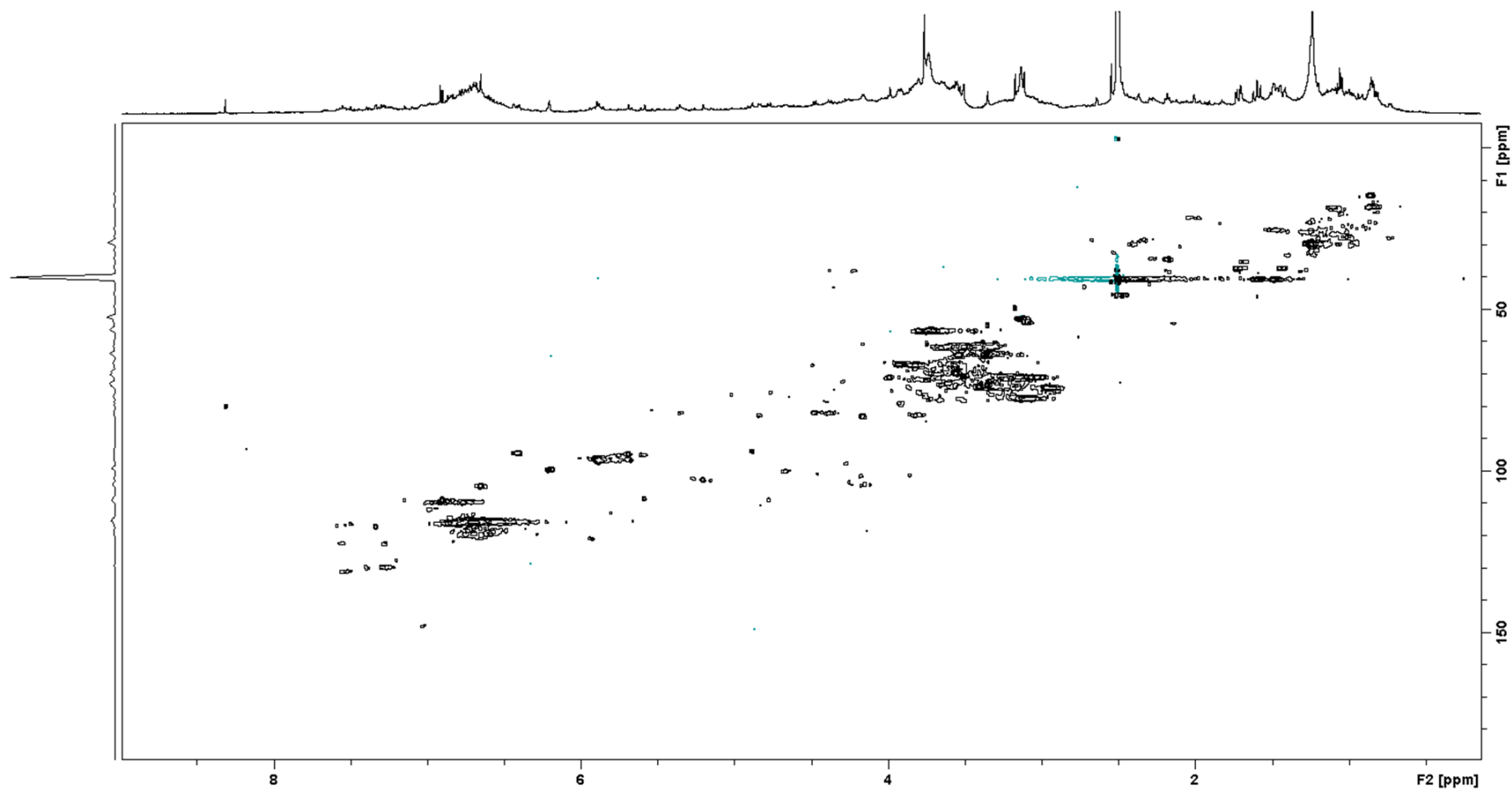


Figura S192

^1H - ^{13}H HMBC do extrato seco do extrato seco de C12-PA (11,74 T, $\text{DMSO}-d_6$)

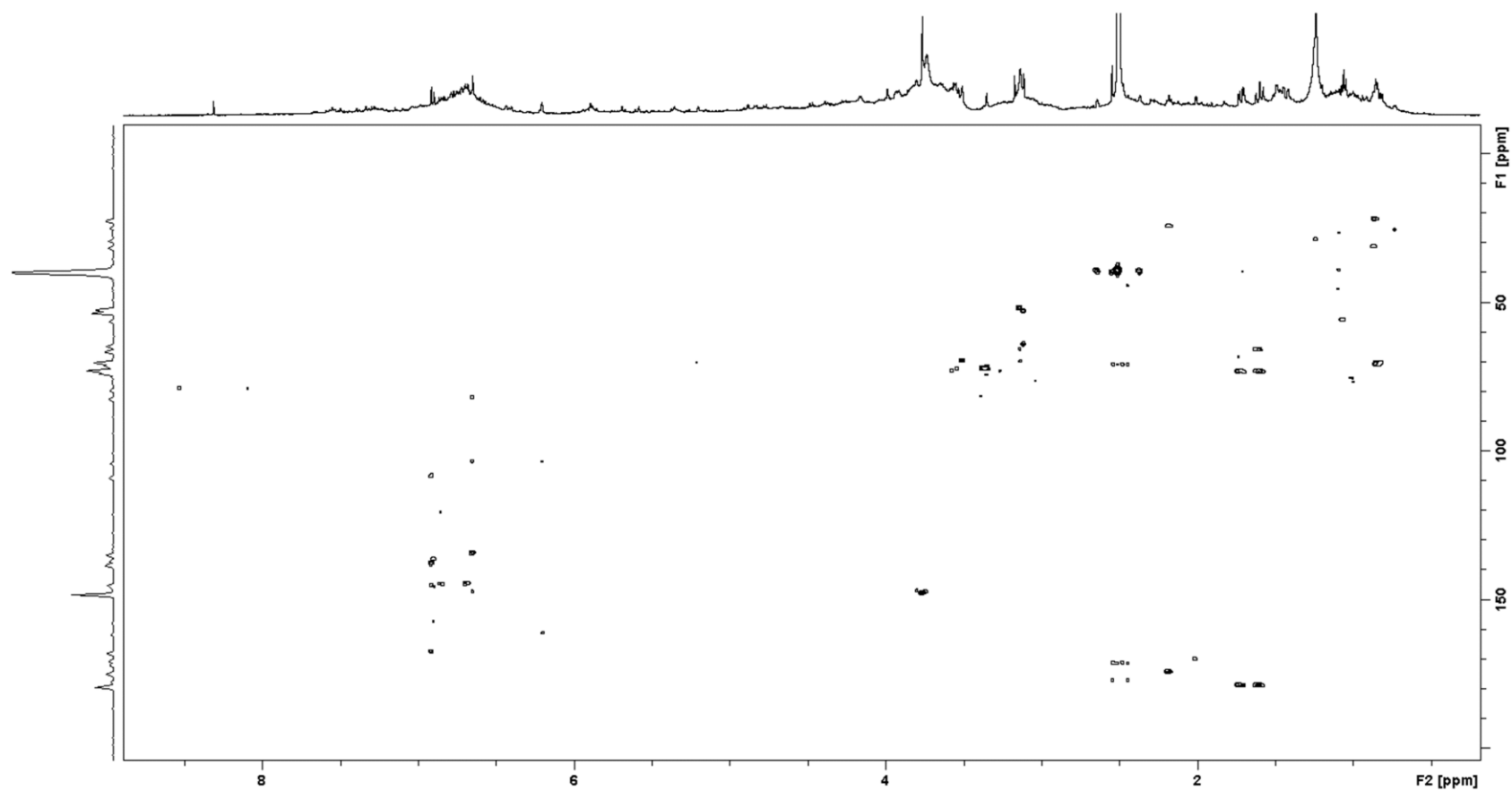


Figura S193

Espectro de RMN de ^1H do extrato seco de C13-GO (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)

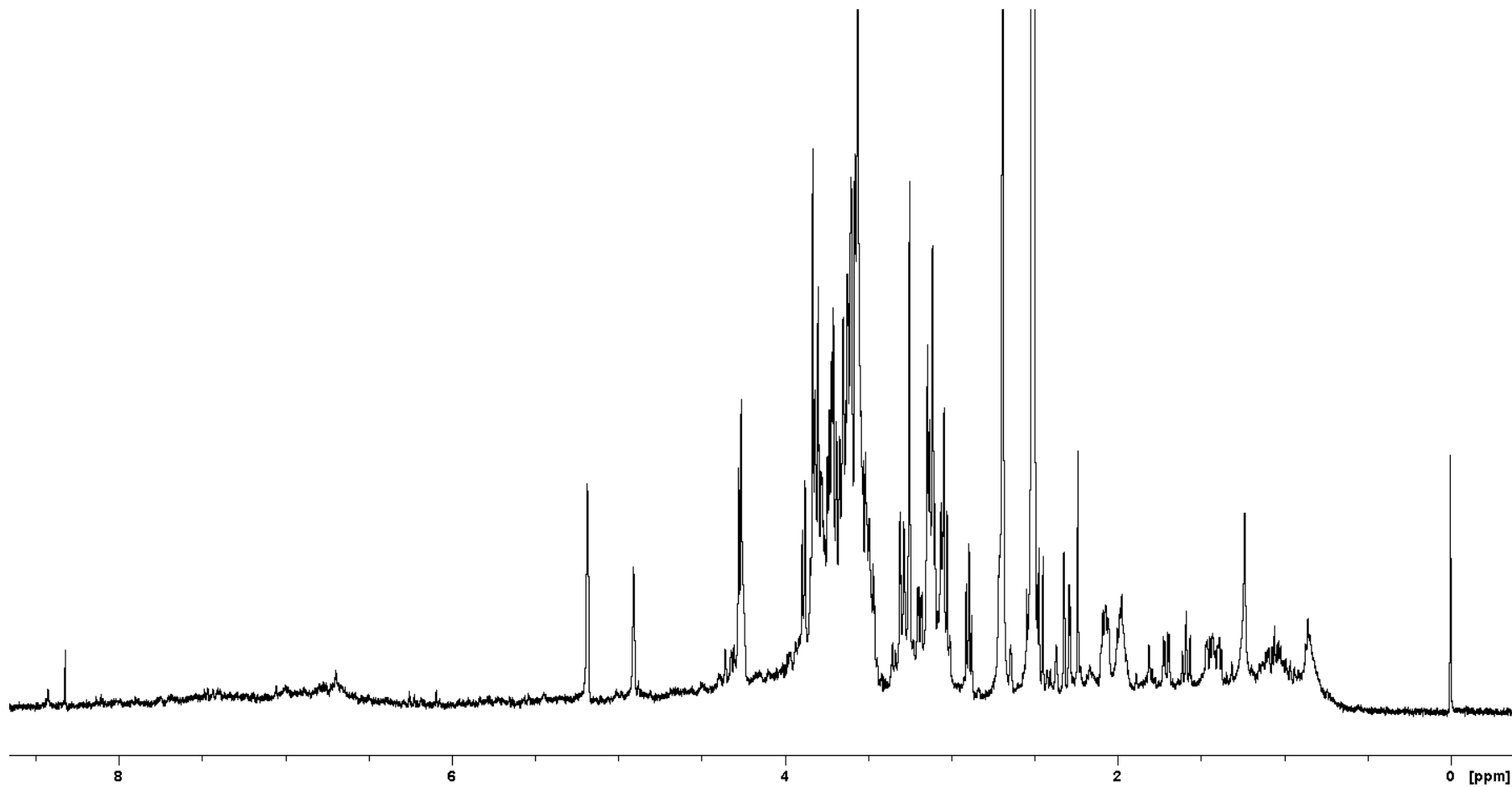


Figura S194

^1H - ^{13}H HSQC do extrato seco do extrato seco de C13-GO (11,74 T, $\text{DMSO}-d_6$)

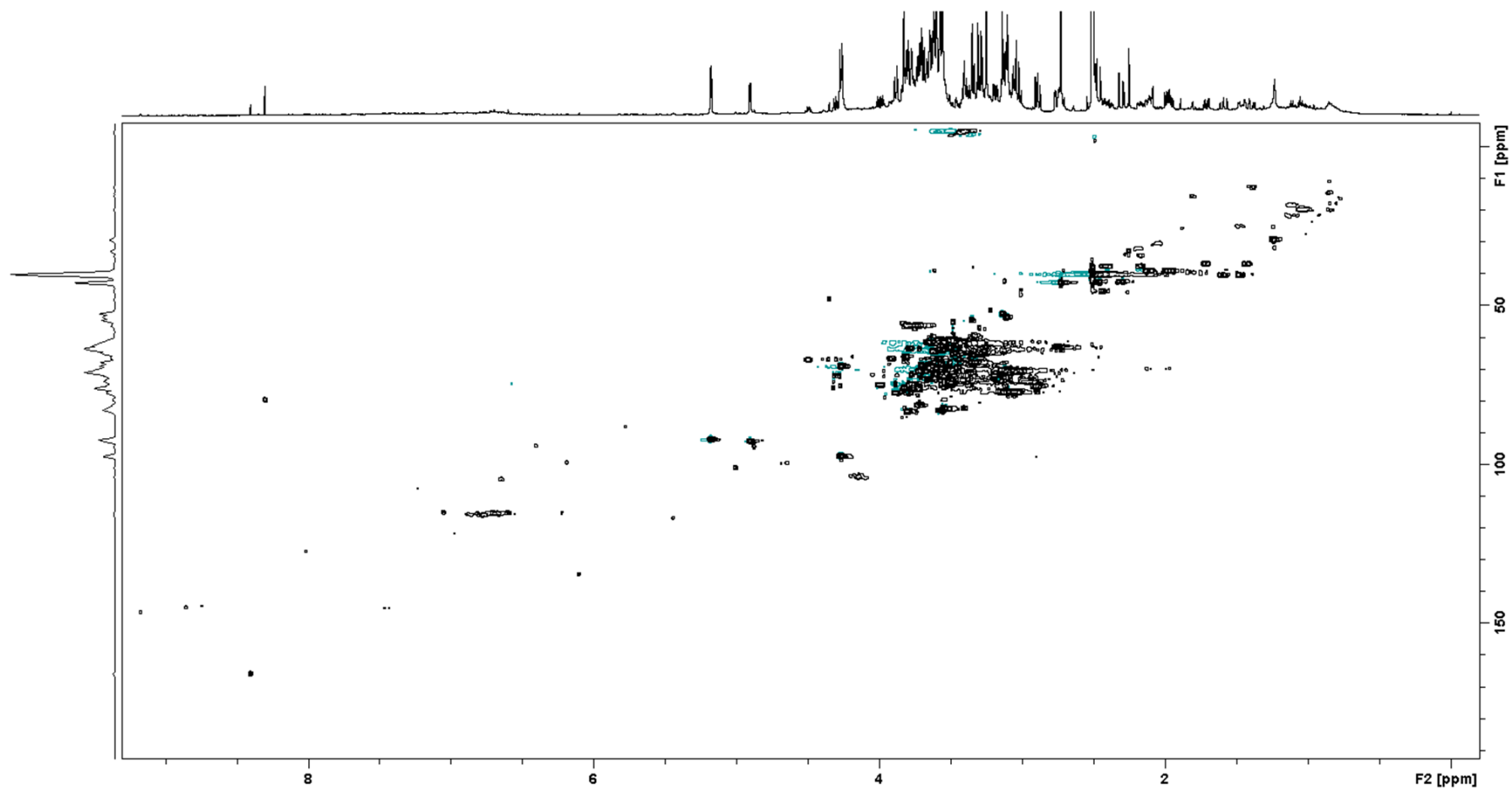


Figura S195

^1H - ^{13}H HMBC do extrato seco do extrato seco de C13-GO (11,74 T, $\text{DMSO}-d_6$)

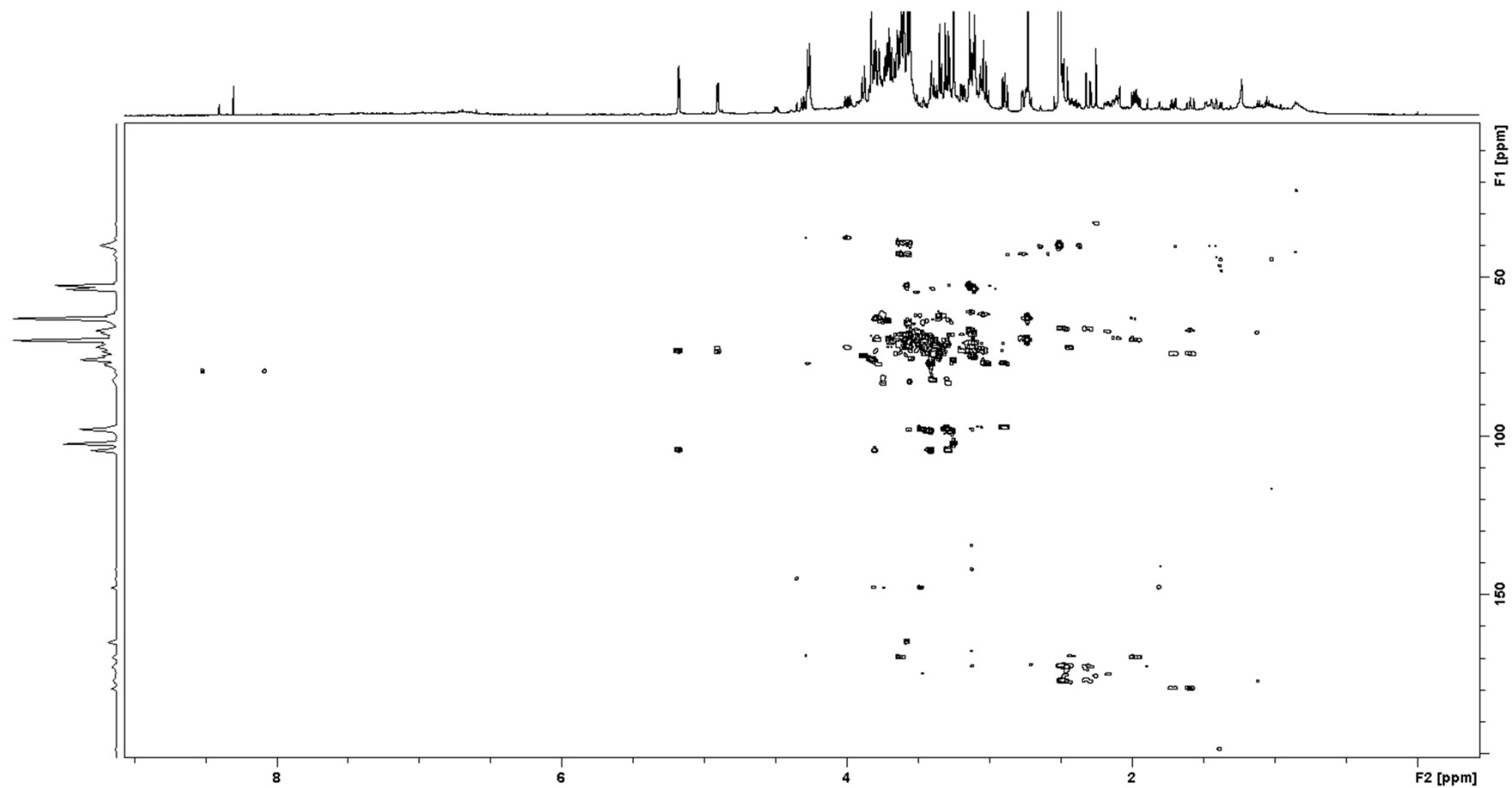


Figura S196

Espectro de RMN de ^1H do extrato seco de C14-GO (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)

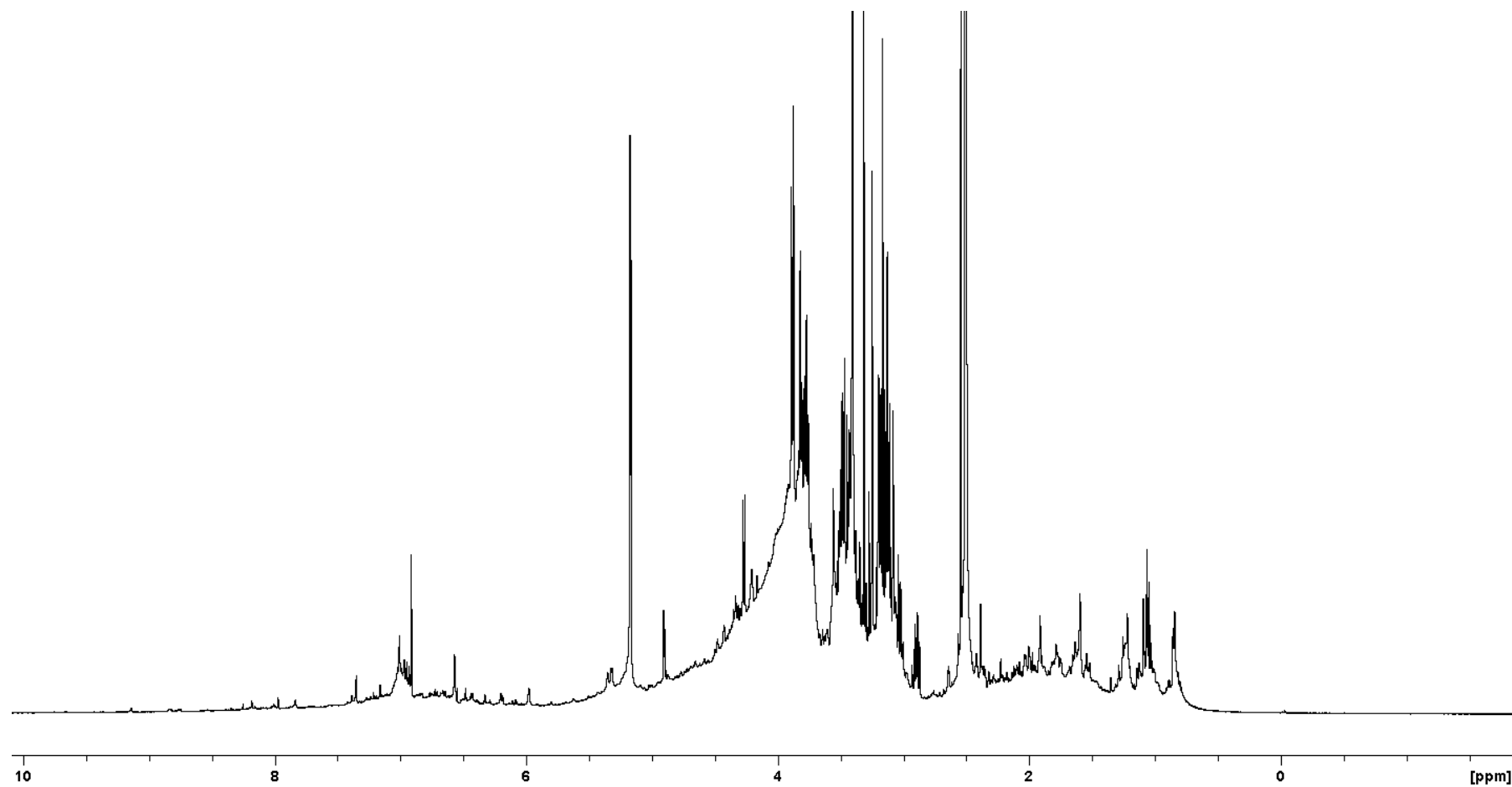


Figura S197

^1H - ^{13}H HSQC do extrato seco do extrato seco de C14-GO (11,74 T, $\text{DMSO-}d_6$)

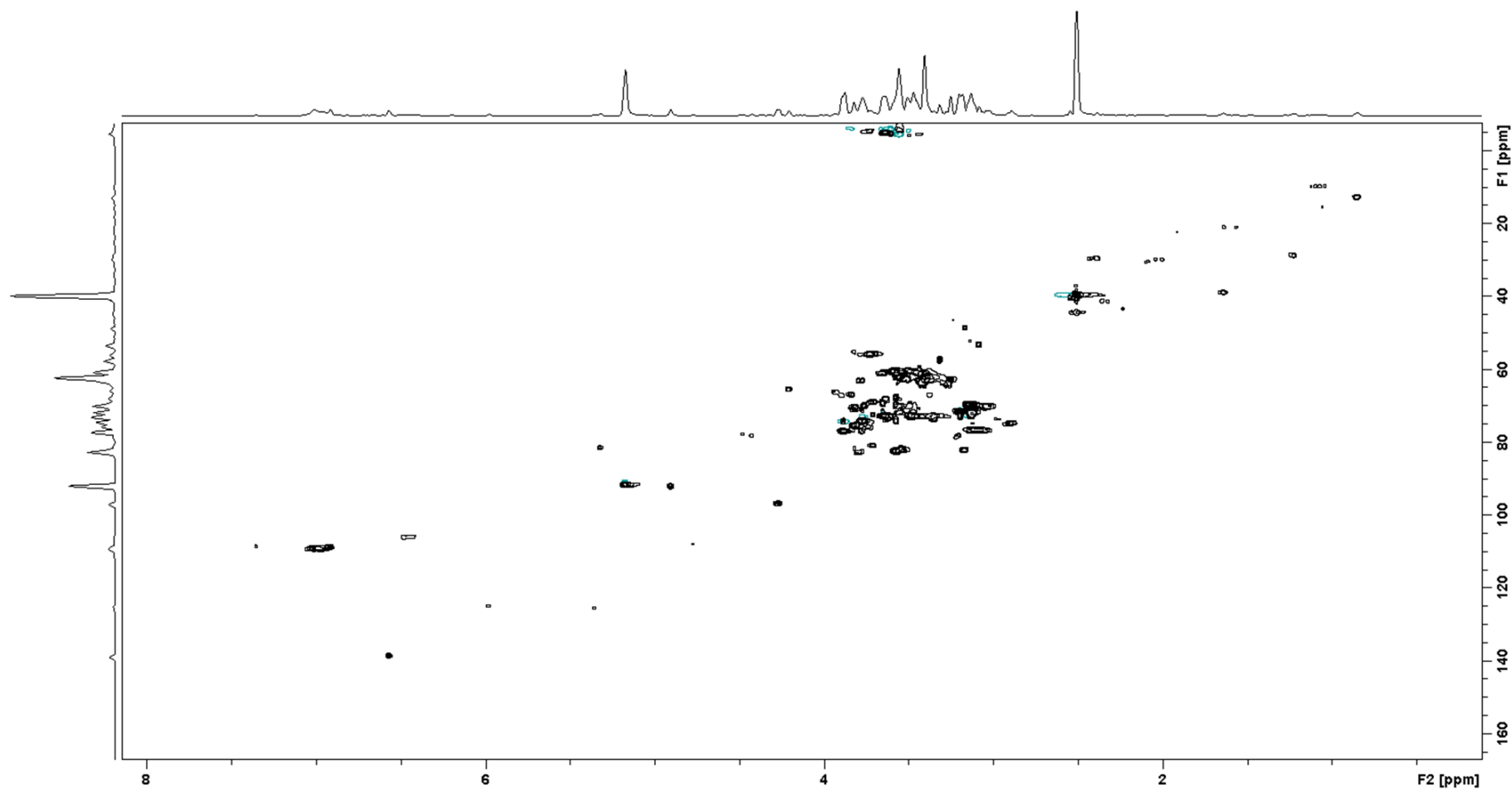


Figura S198

^1H - ^{13}C HMBC do extrato seco do extrato seco de C14-GO (11,74 T, $\text{DMSO}-d_6$)

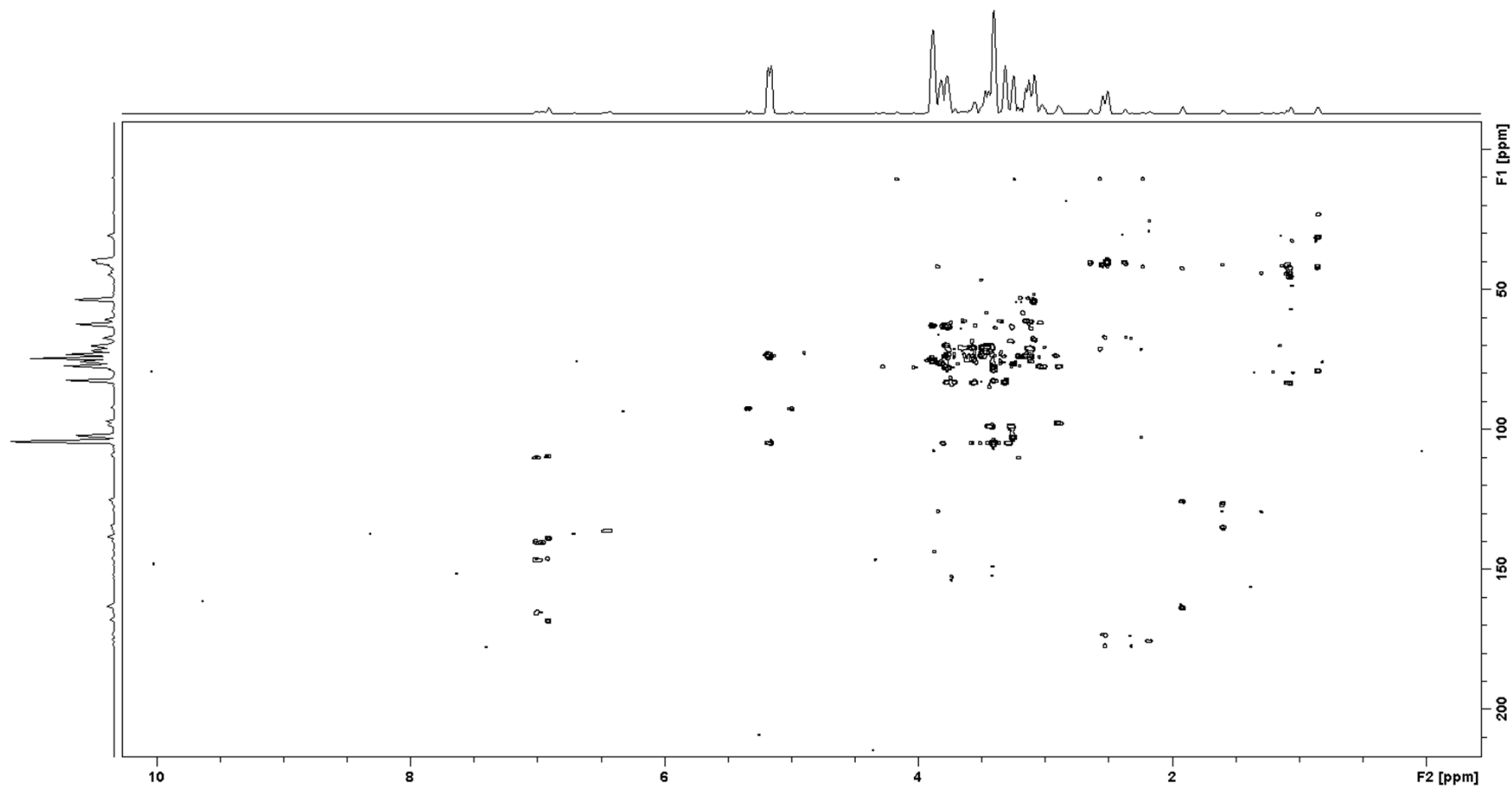


Figura S199

Espectro de RMN de ^1H do extrato seco de C15-AM (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$).

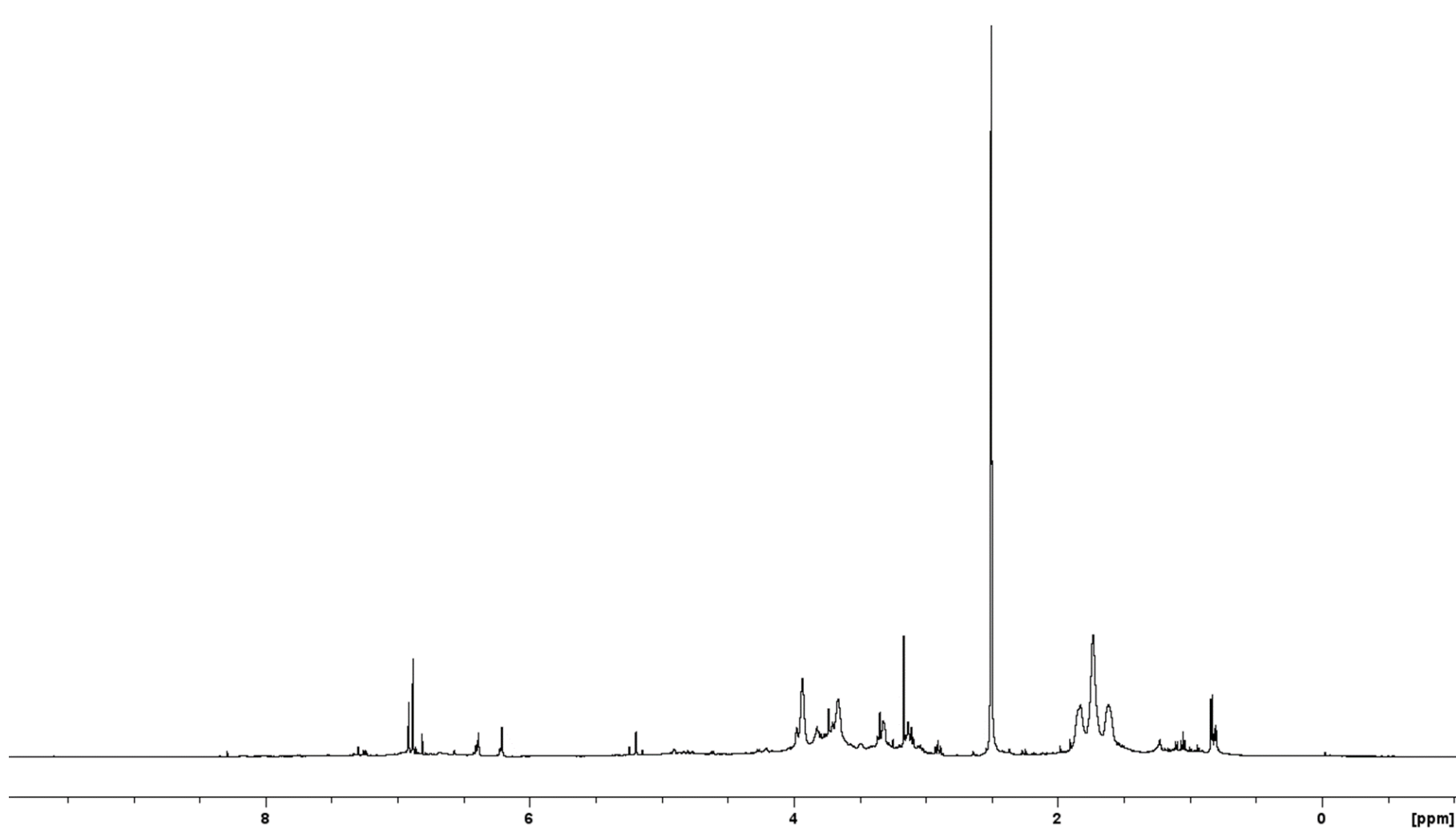


Figura S200

^1H - ^{13}H HSQC do extrato seco do extrato seco de C15-AM (11,74 T, $\text{DMSO}-d_6$).

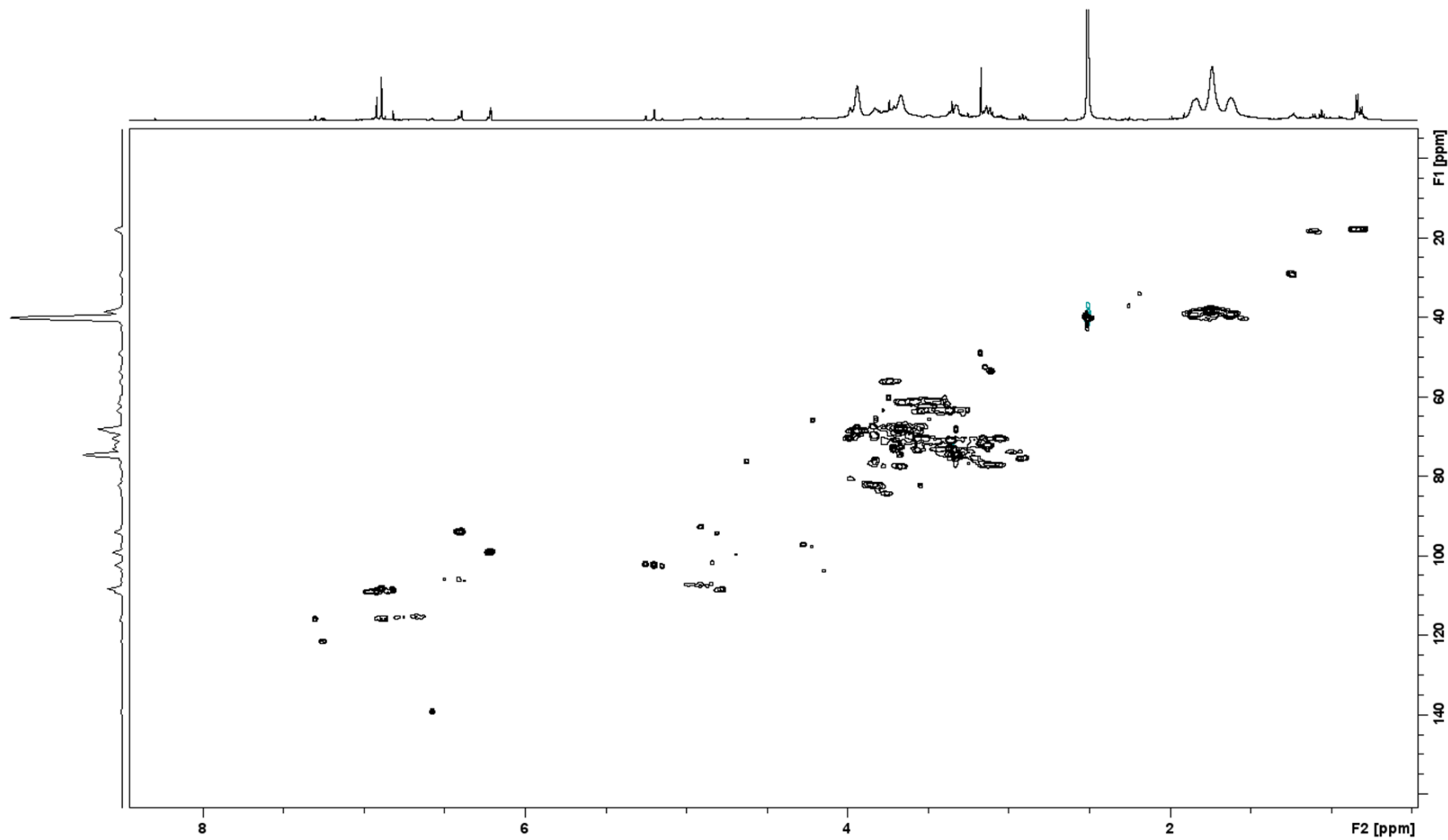


Figura S201

^1H - ^{13}H HMBC do extrato seco do extrato seco de C15-AM (11,74 T, $\text{DMSO}-d_6$).

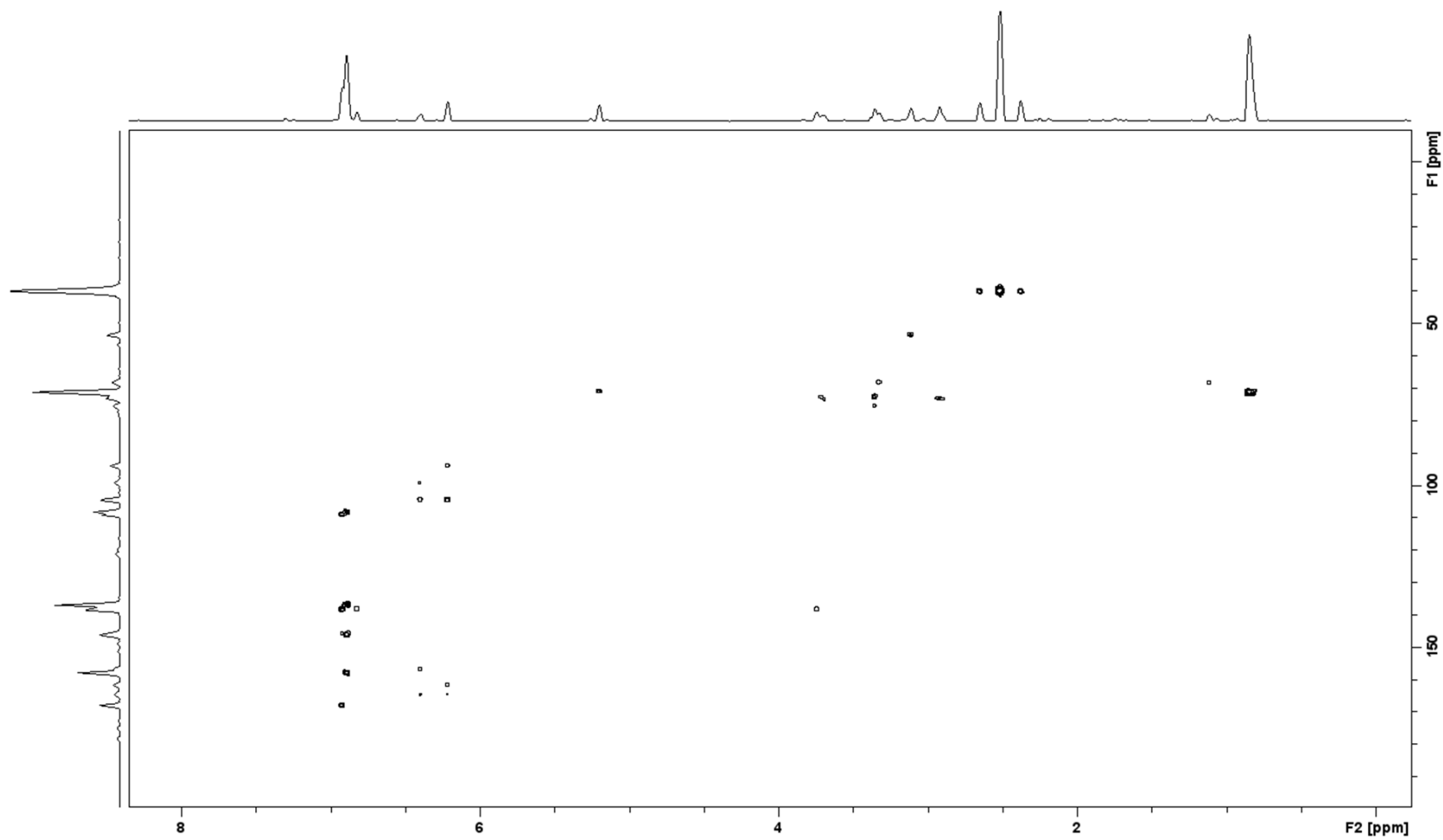


Figura S202

Espectro de RMN de ^1H do extrato seco de C16-AM (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)

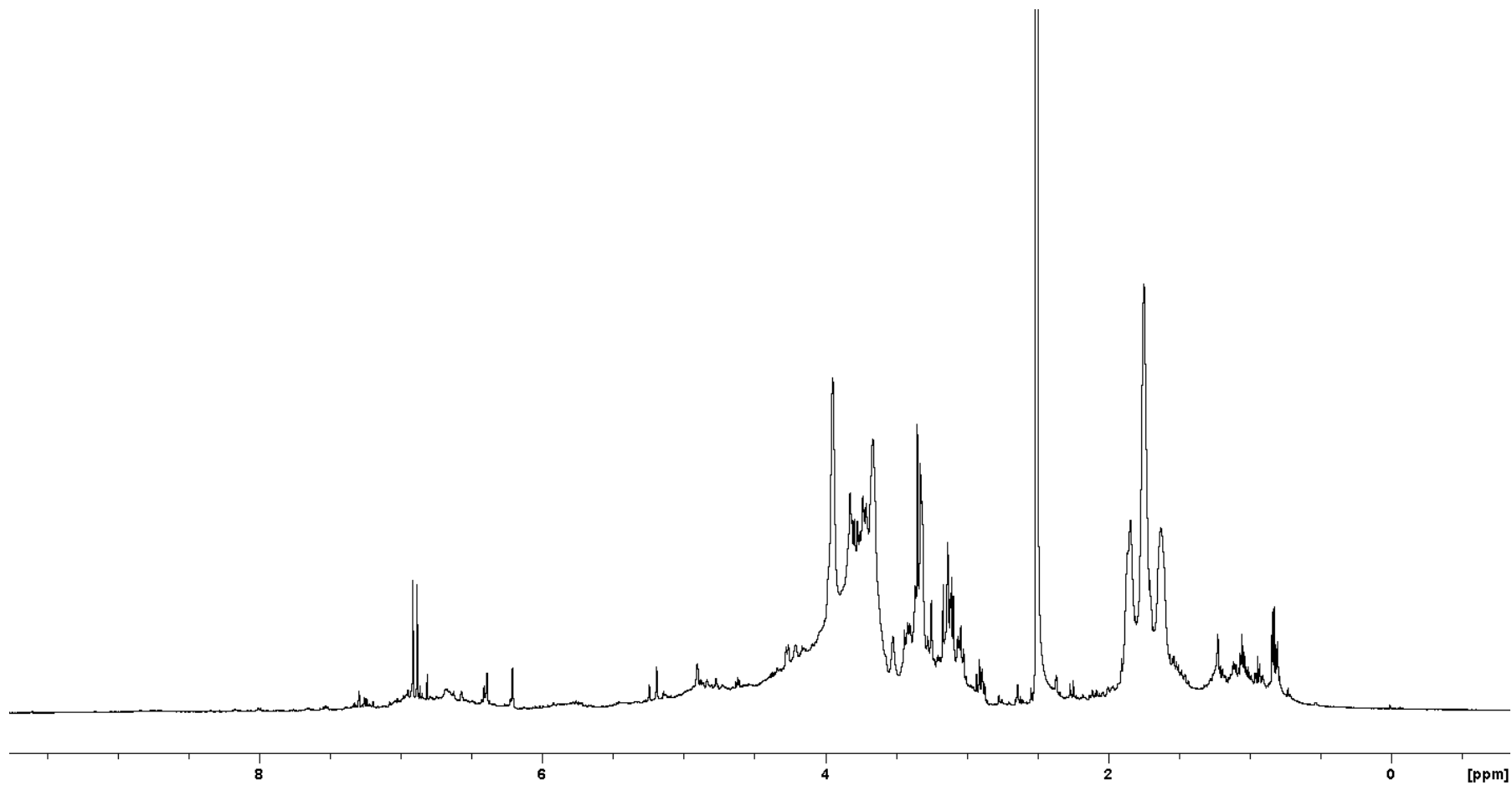


Figura S203

^1H - ^{13}H HSQC do extrato seco do extrato seco de C16-AM (11,74 T, $\text{DMSO}-d_6$)

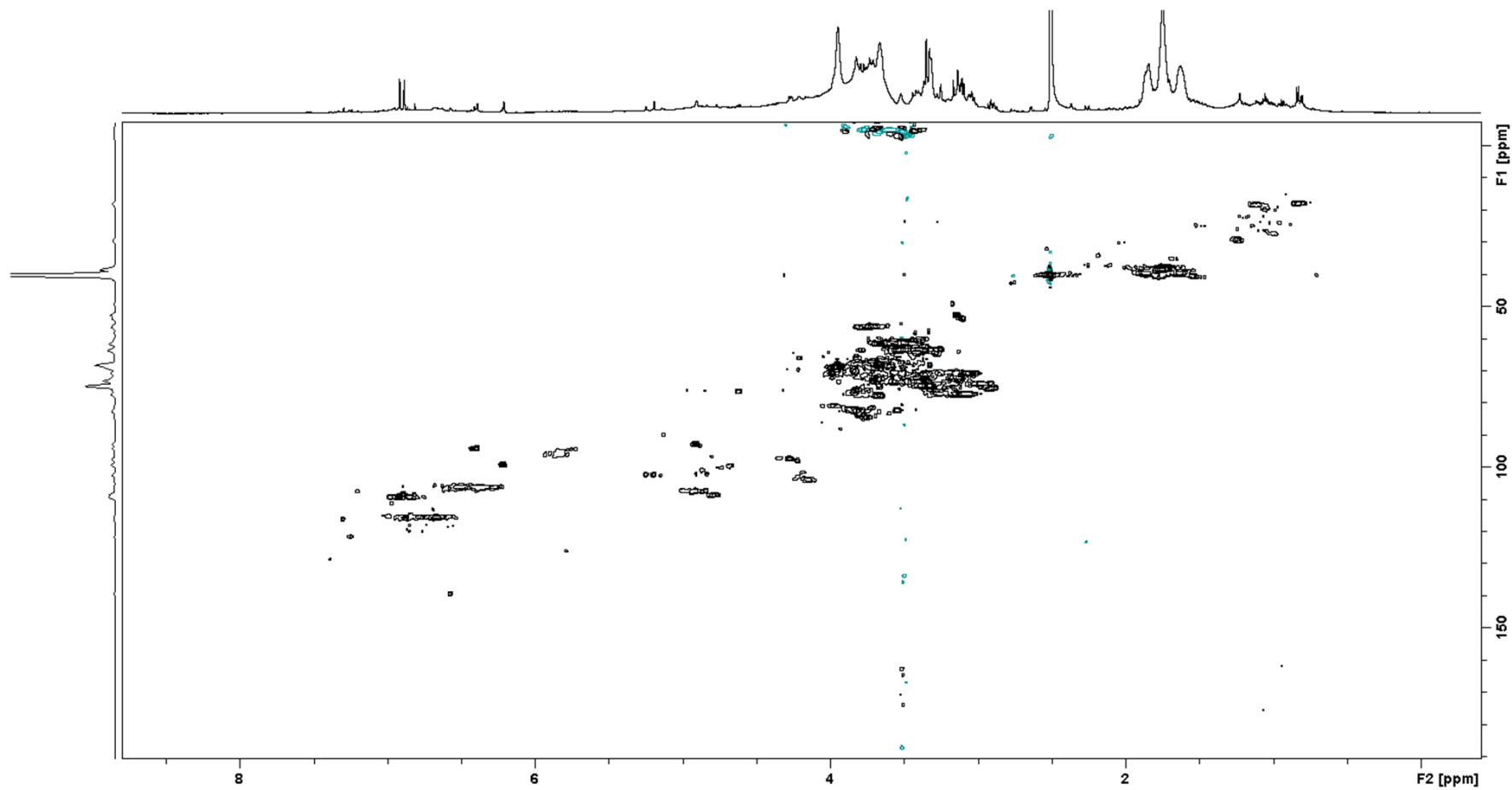


Figura S204

^1H - ^{13}H HMBC do extrato seco do extrato seco de C16-AM (11,74 T, $\text{DMSO}-d_6$)

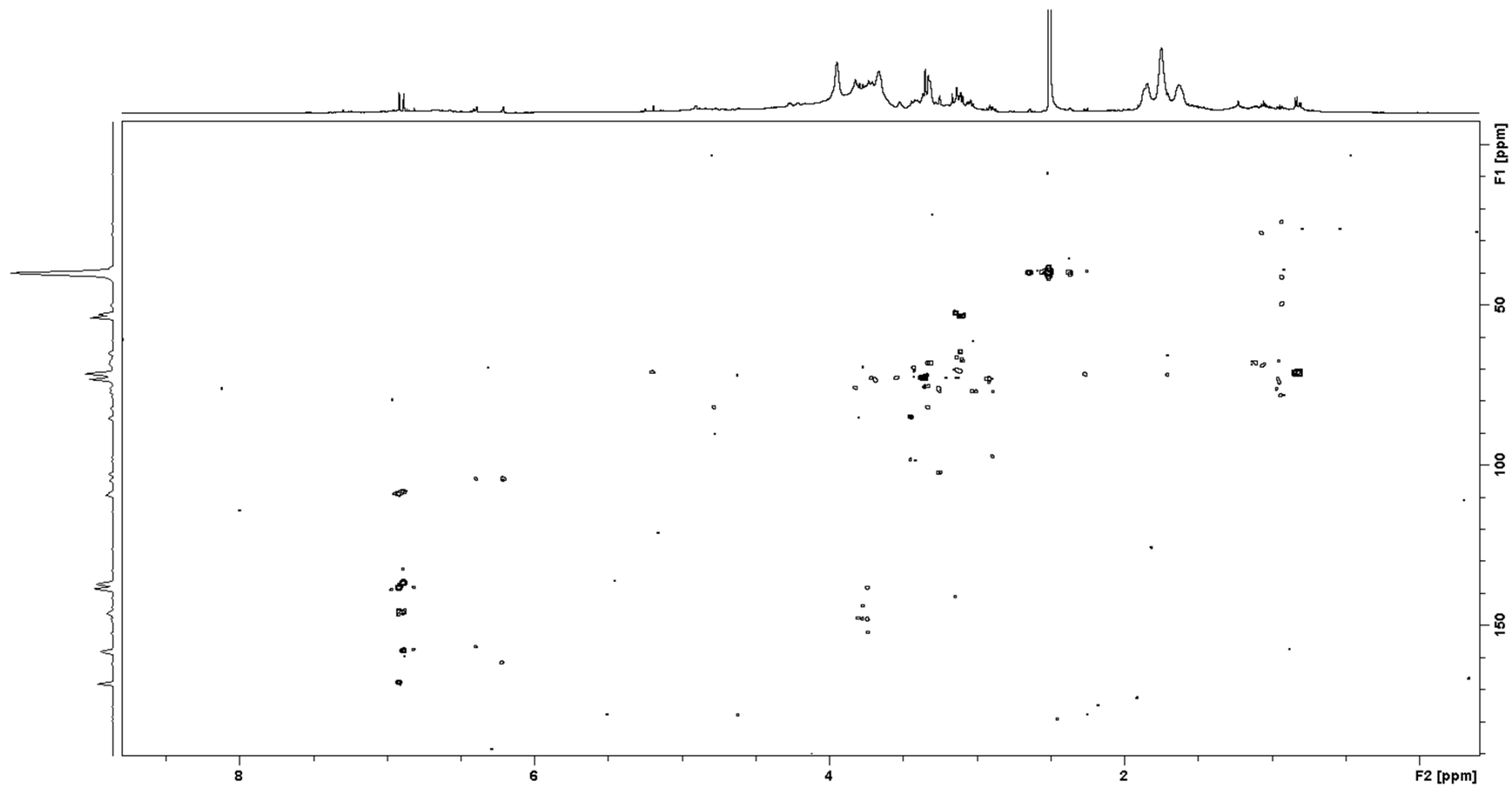


Figura S205

Espectro de RMN de ^1H do extrato seco de C17-AM (500,13 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)

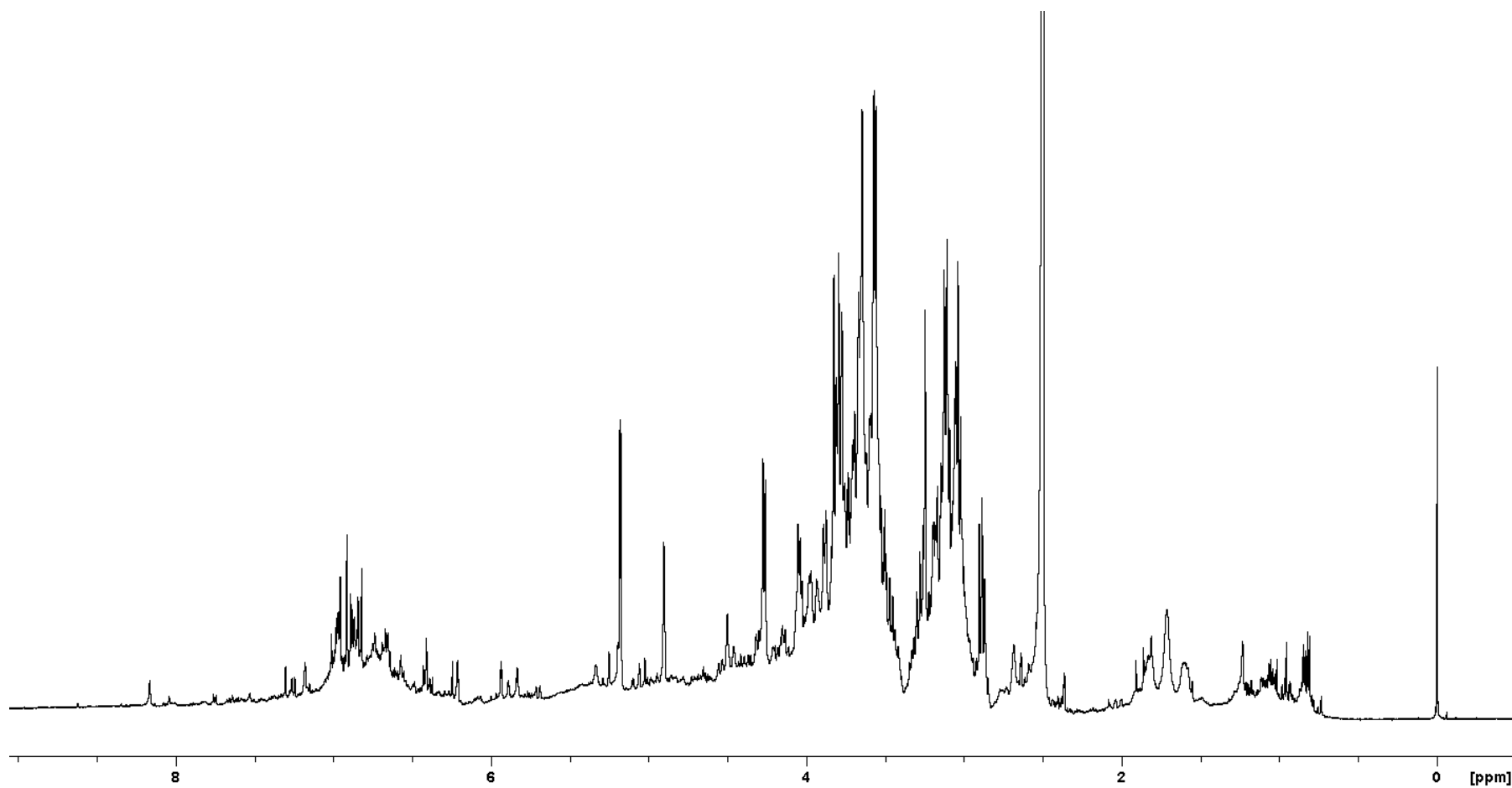


Figura S206

^1H - ^{13}H HSQC do extrato seco do extrato seco de C17-AM (11,74 T, $\text{DMSO}-d_6$)

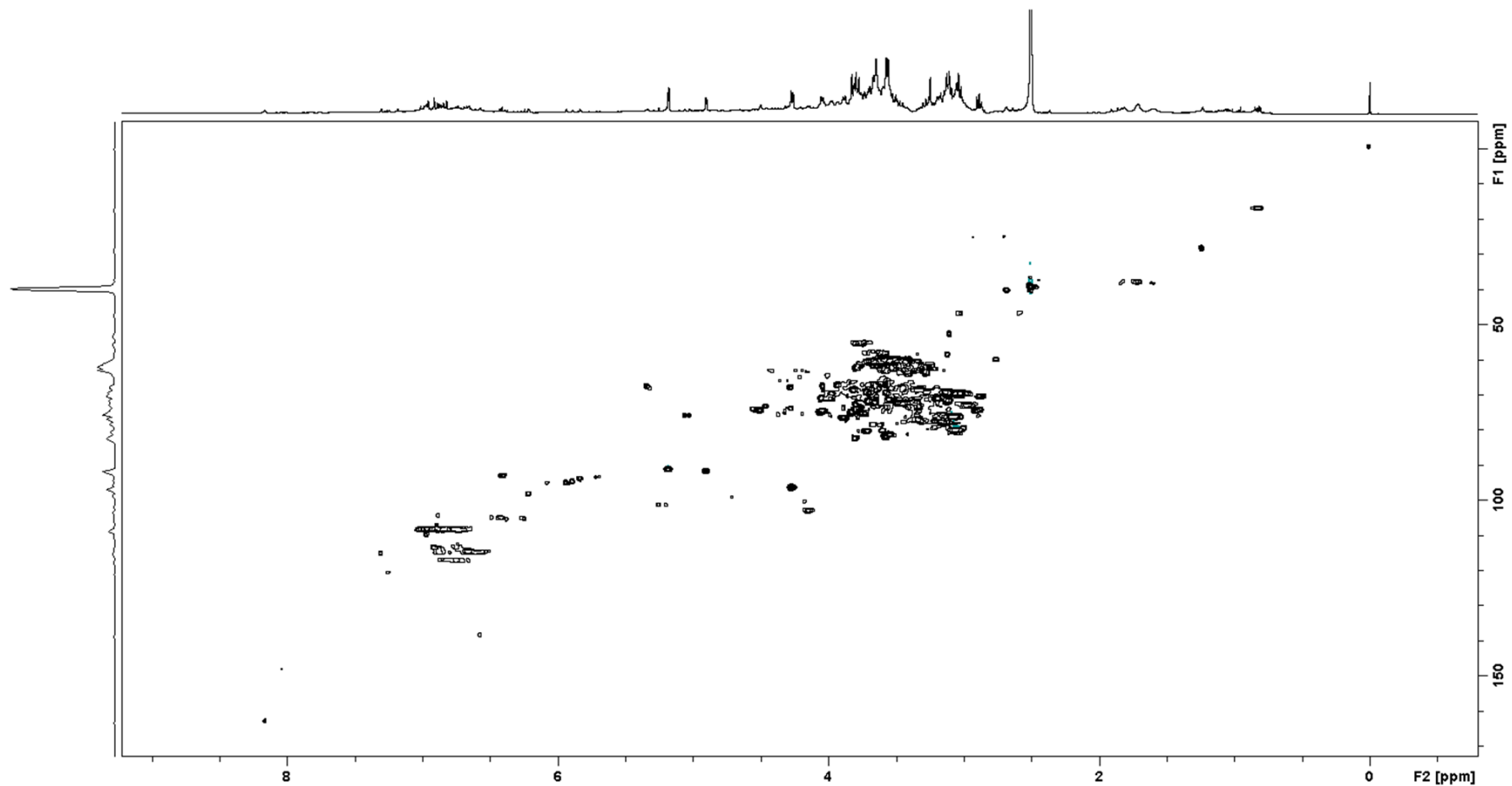


Figura S207

^1H - ^{13}H HMBC do extrato seco do extrato seco de C17-AM (11,74 T, $\text{DMSO-}d_6$)

