



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**IDENTIFICAÇÃO POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE FONTES  
BOTÂNICAS EM AMOSTRAS COMERCIAIS DE MIRARÚIRA E  
AVALIAÇÃO DO SEU POTENCIAL ANTIOXIDANTE**

**SHELSON MAGDYEL DA RESSURREIÇÃO BRAGA**

**MANAUS-AM  
2022**

**IDENTIFICAÇÃO POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE FONTES  
BOTÂNICAS EM AMOSTRA COMERCIAIS DE MIRARUÍRA E AVALIAÇÃO  
DO SEU POTENCIAL ANTIOXIDANTE**

**SHELSON MAGDYEL DA RESSURREIÇÃO BRAGA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas, como parte do requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Química.

**Orientador:** Dr. Felipe Moura Araujo da Silva  
**Coorientador:** Dr. Hector Henrique Ferreira Koolen

**MANAUS-AM  
2022**

## Ficha Catalográfica

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

B813i Braga, Shelson Magdyel da Ressurreição  
Identificação por espectrometria de massa de fontes botânicas em amostra comerciais de miraruíra e avaliação do seu potencial antioxidante / Shelson Magdyel da Ressurreição Braga . 2021  
60 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Felipe Moura Araújo da Silva  
Coorientador: Hector Henrique Ferreira Koolen  
Dissertação (Mestrado em Química de Prod. Naturais) -  
Universidade Federal do Amazonas.

1. Connarus ruber. 2. Epicatequina. 3. Mangiferina. 4. Plantas medicinais. 5. Salacia impressifolia. I. Silva, Felipe Moura Araújo da. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

## AGRADECIMENTOS

A Deus criador do universo por tudo que fez na minha vida, pois recebi muitas oportunidades de aprendizado através de todas as pessoas que Ele pôs em meu caminho; A minha família, em especial a minha mãe, Randira Maria da Ressurreição Braga, que me ensinou que o conhecimento nos liberta;

Ao meu pai, Alcione Araújo Braga, que me mostrou que os melhores resultados são possíveis ainda que às condições não sejam favoráveis e aos meus irmãos, Charlys, Sheila, Daniel e Aldon, pelos anos de companheirismo que tivemos;

A minha noiva Nathana César Bastos que me apresentou ao meu estimado orientador e que sempre me incentivou a continuar o mestrado em meio a tantas dificuldades;

Ao meu orientador, Dr. Felipe Moura Araújo da Silva, por tudo, pois sem ele este trabalho não seria possível. Sua motivação foi meu estímulo em querer fazer meu melhor mesmo quando duvidei se conseguiria;

Ao meu coorientador, Prof Dr. Hector Henrique Ferreira Koolen pelos conhecimentos transmitidos e apoio para a realização deste trabalho; aos meus amigos Rodrigo e Charles por toda amizade e acompanhamento ao longo dos anos;

Aos meus colegas de laboratório e sala de aula que foram parceiros o projeto; a amiga Ingrity Suelen Costa Sá pelo auxílio nos ensaios biológico; a amiga Márcia Grace Araújo de Almeida por toda contribuição durante a execução deste projeto;

A Prof<sup>a</sup> Dra. Maria Lúcia Belém Pinheiro pelos conhecimentos transmitidos e apoio para a realização deste trabalho;

Aos Professores Dr. Afonso Leão e Dr Sérgio Nunomura que deram apoio no momento da Pandemia;

Aos Professores Dra. Dominique Fernandes de Moura do Carmo e Dr. Raimundo Carlos Pereira Junior pelas valiosas contribuições dadas no exame de qualificação;

Ao Grupo NC, empresa da qual sou funcionário, pois foi parceira em flexibilizar meus horários durante as aulas e pesquisas;

Ao PPGQ, pela oportunidade de aprimoramento;

Aos laboratórios da central analítica por conceder o espaço e equipamentos necessários para que o trabalho pudesse ser realizado;

Ao CNPQ, FAPEAM e à FINEP pelo suporte financeiro empregado para o desenvolvimento deste projeto.

## RESUMO

*Miraruíra* ou *cipó-miraruíra* é uma liana medicinal utilizada na região Amazônica para o tratamento de diversas doenças, incluindo o diabetes. Contudo, sua natureza botânica é imprecisa, já que pelo menos duas espécies vegetais, *Salacia impressifolia* e *Connarus ruber*, recebem esse nome popular. Portanto, o presente trabalho teve como objetivo identificar a natureza botânica do cipó-miraruíra comercializado no estado do Amazonas através da análise do perfil químico de amostras comerciais de miraruíra, e autênticas de *S. impressifolia* e *C. ruber*, além de investigar o potencial antioxidante dessas amostras. Inicialmente, dez amostras comerciais (A-J) foram compradas em mercados, feiras e empórios distribuídos pela cidade de Manaus AM, e, juntamente com amostras autênticas de *S. impressifolia* e *C. ruber*, tiveram seus extratos aquosos preparados por decocção. Em seguida, todos os extratos aquosos foram submetidos ao procedimento de clean up através da técnica de extração em fase sólida (SPE), sendo as frações metanólicas resultantes analisadas por espectrometria de massas (EM). Finalmente, os perfis químicos obtidos foram submetidos às análises de PCA e HCA. Por outro lado, o conteúdo de fenólicos totais (CFT) dos extratos aquosos foi avaliado, assim como seu potencial antioxidante através dos ensaios DPPH e FRAP. O procedimento de clean up dos extratos aquosos removeu interferentes prejudiciais às análises por EM, tais como frutose ou glucose e sacarose, garantindo uma análise satisfatória do perfil químico das amostras investigadas. A análise por EM revelou perfis químicos distintos entre as amostras *S. impressifolia* e *C. ruber*, além de apontar marcadores químicos característicos para cada amostra: mangiferina para *S. impressifolia* e epicatequina para *C. ruber*. Além disso, com base na análise de PCA, todas as amostras comerciais de miraruíra apresentaram perfis químicos semelhantes à espécie *C. ruber*, o que sugere que esta espécie é comercializada como miraruíra no estado do Amazonas. Já a análise de HCA apontou variabilidade química entre as amostras comerciais, o que pode indicar que outras espécies do gênero *Connarus*, tal como *C. perrottetii*, ou mesmo espécies de outros gêneros da família *Connaraceae*, tal como *R. cuspidata*, podem estar sendo comercializadas como miraruíra. Por outro lado, o CFT de *C. ruber* (46,52 mg EAG/g) foi significativamente superior ao observado para *S. impressifolia* (8,91 mg EAG/g). Além disso, *C. ruber* também apresentou maior potencial antioxidante com base nos ensaios de DPPH (CS50 = 171,36 µg/ml) e FRAP (266,52 µmol de Fe(II)/g), o que sugere que produtos à base de *C. ruber* têm maior capacidade antioxidante do que aqueles à base de *S. impressifolia*, e, portanto, devem trazer maior benefício terapêutico para o tratamento de doenças relacionadas ao processo oxidativo, tal como o diabetes.

**Palavras-Chave:** *Connarus ruber*, Epicatequina, Mangiferina, plantas medicinais, perfil químico, *Salacia impressifolia*

## ABSTRACT

Miraruíra or cipó-miraruíra is a medicinal liana used in the Amazon region for the treatment of various diseases, including diabetes. However, its botanical nature is imprecise, as at least two plant species, *Salacia impressifolia* and *Connarus ruber*, have this popular name. Therefore, the present study aimed to identify the botanical nature of the miraruíra marketed in the state of Amazonas through the analysis of the chemical profile of commercial miraruíra and authentic samples of *S. impressifolia* and *C. ruber*, in addition to investigating their antioxidant potential. Initially, ten commercial samples (A-J) were purchased in markets, fairs and emporiums distributed throughout the city of Manaus-AM, and, along with authentic samples of *S. impressifolia* and *C. ruber*, had their aqueous extracts prepared by decoction. Then, all the aqueous extracts were subjected to a clean-up procedure using the solid phase extraction (SPE) technique, and the resulting methanolic fractions were analyzed by mass spectrometry (MS). Finally, the chemical profiles obtained were submitted to PCA and HCA analyses. On the other hand, the total phenolic content (TPC) of the aqueous extracts was evaluated, as well as their antioxidant potential through DPPH and FRAP assays. The clean-up procedure of the aqueous extracts removed interferences to MS analysis, such as fructose or glucose and sucrose, ensuring a satisfactory analysis of the chemical profile of the investigated samples. The MS analysis revealed distinct chemical profiles for the *S. impressifolia* and *C. ruber* samples, and pointed out characteristic chemical markers for each sample: mangiferin for *S. impressifolia* and epicatechin for *C. ruber*. Moreover, based on PCA analysis, all commercial samples of miraruíra showed chemical profiles similar to the species *C. ruber*, suggesting that the species *C. ruber* is marketed as miraruíra in the state of Amazonas. In turn, the HCA analysis showed chemical variability among commercial samples, which may indicate that other species of the *Connarus* genus, such as *C. perrottetii*, or even species of other genera of the *Connaraceae* family, such as *R. cuspidata*, may be used as miraruíra. On the other hand, the TPC of *C. ruber* (46.52 mg GAE/g) was higher than that observed for *S. impressifolia* (8.91 mg GAE/g). In addition, *C. ruber* also showed the highest antioxidant potential based on the DPPH (CS50 = 171.36 µg/ml) and FRAP (266.52 µmol Fe (II)/g) assays, which suggests that products based on *C. ruber* have greater antioxidant capacity than those based on *S. impressifolia*, and therefore should bring greater therapeutic benefit for the treatment of diseases related to the oxidative process, such as diabetes.

**Keywords:** Chemical profile, *Connarus ruber*, Epicatechin, Mangiferin, Medicinal plants, *Salacia impressifolia*

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

<b>APCI</b>	Ionização química à pressão atmosférica (do inglês <i>atmospheric pressure chemical ionization</i> )
<b>API</b>	Ionização à pressão atmosférica (do inglês <i>atmospheric pressure ionization</i> )
<b>C18</b>	Octadecilsilano
<b>CID</b>	Dissociação induzida por colisão (do inglês <i>collision-induced dissociation</i> )
<b>AFT</b>	Conteúdo de fenólicos totais
<b>CS<sub>50</sub></b>	Concentração capaz de sequestrar 50% dos radicais livres de DPPH
<b>FRAP</b>	Poder antioxidante redutor férrico (do inglês <i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i> )
<b>EAG</b>	Equivalente de ácido gálico
<b>HCA</b>	Análise de agrupamento hierárquico (do inglês <i>hierarchical cluster analysis</i> )
<b>CLAE</b>	Cromatografia líquida de alta eficiência
<b>INPA</b>	Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
<b>MALDI</b>	Ionização e dessorção a laser assistida por matriz (do inglês <i>matrix-assisted laser desorption/ionization</i> )
<b>MeOH</b>	Metanol
<b>EM</b>	Espectrometria de massas (do inglês <i>mass spectrometry</i> )
<b>EM/EM</b>	Espectrometria de massas sequencial
<b><i>m/z</i></b>	Relação massa/carga
<b>PCA</b>	Análise de componentes principais (do inglês <i>principal component analysis</i> )
<b>RFAD</b>	Reserva Florestal Adolpho Ducke
<b>ERO</b>	Espécies reativas de oxigênio (do inglês <i>reactive oxygen species</i> )
<b>SisGen</b>	Sistema nacional de gestão do patrimônio genético e do conhecimento tradicional associado
<b>SPE</b>	Extração em fase sólida (do inglês <i>solid phase extraction</i> )

## LISTA DE FIGURAS

Figura 2. Exemplos de amostras de miraruíra comercializadas no estado do Amazonas. Fonte: Acervo pessoal. ....	13
Figura 3 . Instruções para o preparo do chá de miraruíra contidas em amostras comercializadas no estado do Amazonas. Fonte: Acervo pessoal. ....	14
Figura 4. Distribuição geográfica da espécie <i>Salacia impressifolia</i> no Brasil. Fonte: Biral e Lombardi, 2020. ....	15
Figura 5. Folhas (A), flor (B) e frutos (C e D) da espécie <i>S. impressifolia</i> . Fonte: <a href="http://www.plantsoftheworldonline.org/">http://www.plantsoftheworldonline.org/</a> e <a href="http://www.ecologia.ib.usp.br">http://www.ecologia.ib.usp.br</a> ....	16
Figura 6. Substâncias isoladas do tronco e galhos de <i>Salacia impressifolia</i> . ....	18
Figura 7. Substâncias isoladas das raízes de <i>Salacia impressifolia</i> . ....	19
Figura 8. Distribuição geográfica da espécie <i>Connarus ruber</i> no Brasil. Fonte: TOLEDO e SOUZA, 2020. ....	19
Figura 9. Exsiccatas de <i>Connarus ruber</i> (Poepp.) Planch depositadas no Herbário do INPA sob os códigos: (A) INPA 103890 e (B) INPA 10587. Fonte: Herbário online INPA, 2021. ....	20
Figura 10. Substâncias reportadas no extrato aquoso de <i>Connarus ruber</i> . ....	21
Figura 11. Exemplos de vitaminas e ácidos orgânicos previamente descritos como antioxidantes naturais. ....	22
Figura 12. Exemplos de diferentes tipos de flavonoides previamente descritos como antioxidantes naturais. ....	22
Figura 13. Reação de estabilização do radical DPPH. ....	23
Figura 14. Reação de redução do complexo $[\text{Fe(III)} (\text{TPTZ})_2]^{3+}$ para $[(\text{Fe(II)} (\text{TPTZ})_2)]^{2+}$ . ....	24
Figura 15. Esquema extração aquosa das amostras comerciais de miraruíra (A-J) e autênticas de <i>S. impressifolia</i> e <i>C. ruber</i> . ....	29
Figura 16. Esquema do clean up dos extratos aquosos das amostras comerciais e autênticas por meio de SPE. ....	30
Figura 17. Análise por CLAE-EM dos extratos aquosos e frações da SPE de <i>S. impressifolia</i> e <i>C. ruber</i> . ....	31
Figura 18. Determinação do conteúdo de fenólicos totais (CFT). ....	33
Figura 19. Determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH. ....	33
Figura 20. Determinação da atividade antioxidante pelo método FRAP. ....	34
Figura 21. Cromatograma dos extratos aquosos de <i>S. impressifolia</i> (A) e <i>C. ruber</i> (C) e de suas frações metanólicas provenientes do protocolo de SPE (B e D). ....	36
Figura 22. Espectro de massas do pico cromatográfico com tempo de retenção de 1,60 minutos presente no extrato aquoso de <i>C. ruber</i> . ....	37
Figura 23. Espectro de massas da fração metanólica de <i>S. impressifolia</i> (A) e <i>C. ruber</i> (B) com * denotando o pico base. ....	38
Figura 24. Gráficos de escore de PCA (A) e biplot (B) baseados no perfil químico por APCI-EM. ....	38
Figura 25. Espectro de EM/EM dos íons de m/z 421 (A) e 289 (B) com * denotando íons fragmentos previamente descritos para mangiferina e epicatequina. ....	39
Figura 26. Dendrograma de HCA das amostras comerciais de miraruíra (A-J) coletadas em diferentes estabelecimentos e autênticas de <i>S. impressifolia</i> (SAL) e <i>C. ruber</i> (CON). ....	40

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Origem das amostras comerciais de miraruíra e informações disponíveis em seus rótulos. ....	28
Tabela 2. Rendimentos dos extratos aquosos obtidos a partir do procedimento de decocção. ....	35
Tabela 3. Conteúdo de fenólicos totais (CFT) e atividade antioxidante dos extratos aquosos pelos métodos DPPH e FRAP. ....	42

## LISTA DE ANEXOS

Figura A 1. Espectro de APCI-EM (modo negativo) da fração metanólica de <i>S. impressifolia</i> . ....	52
Figura A 2. Espectro de APCI-EM (modo negativo) da fração metanólica de <i>C. ruber</i> . ....	52
Figura A 3. Espectro de APCI-EM (modo negativo) da fração metanólica da amostra comercial A. ....	53
Figura A 4. Espectro de APCI-EM (modo negativo) da fração metanólica da amostra comercial B. ....	53
Figura A 5. Espectro de APCI-EM (modo negativo) da fração metanólica da amostra comercial C. ....	54
Figura A 6. Espectro de APCI-EM (modo negativo) da fração metanólica da amostra comercial D. ....	54
Figura A 7. Espectro de APCI-EM (modo negativo) da fração metanólica da amostra comercial E. ....	55
Figura A 8. Espectro de APCI-EM (modo negativo) da fração metanólica da amostra comercial F. ....	55
Figura A 9. Espectro de APCI-EM (modo negativo) da fração metanólica da amostra comercial G. ....	56
Figura A 10. Espectro de APCI-EM (modo negativo) da fração metanólica da amostra comercial H. ....	56
Figura A 11. Espectro de APCI-EM (modo negativo) da fração metanólica da amostra comercial I. ....	57
Figura A 12. Espectro de APCI-EM (modo negativo) da fração metanólica da amostra comercial J. ....	57
Tabela A 1. Matriz utilizada na análise de PCA, obtida após a eliminação dos íons com intensidade relativa abaixo de 5%. ....	58

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	10
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	13
2.1. Miraruíra.....	13
2.2. A espécie <i>Salacia impressifolia</i> (Miers) A.C. Sm.....	14
2.3. A espécie <i>Connarus ruber</i> .....	17
2.4. Atividade antioxidante de plantas medicinais .....	21
2.5. Abordagens baseadas em espectrometria de massas na investigação química de plantas medicinais .....	24
3. OBJETIVOS .....	26
3.1. Geral .....	26
3.2. Específicos.....	26
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	27
4.1 Análises cromatográficas.....	27
4.1.1. Extração em fase sólida (SPE) .....	27
4.1.2. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	27
4.2 Solventes.....	27
4.3 Análises baseadas em espectrometria de massas (EM).....	27
4.4. Coleta das amostras comerciais de miraruíra e obtenção de amostras autênticas de <i>S. impressifolia</i> e <i>C. ruber</i> .....	28
4.5. Obtenção dos extratos aquosos das amostras comerciais de miraruíra (A-J) e autênticas de <i>S. impressifolia</i> e <i>C. ruber</i> .....	29
4.6. Clean up dos extratos aquosos das amostras comerciais e autênticas por meio de SPE .....	30
4.7. Análise por CLAE-EM dos extratos aquosos e frações da SPE de <i>S. impressifolia</i> e <i>C. ruber</i> .....	31
4.8. Análise por APCI-EM das frações metanólicas e tratamento quimiométrico dos dados.....	32
4.9. Determinação do conteúdo de fenólicos totais e avaliação da atividade antioxidante pelos métodos DPPH e FRAP .....	32
4.9.1. Conteúdo de fenólicos totais (CFT) .....	32
4.9.2. Atividade antioxidante pelo método DPPH.....	33

4.9.3. Atividade antioxidante pelo método FRAP .....	34
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
5.1. Rendimento dos extratos aquosos das amostras comerciais e autênticas.....	35
5.2. Avaliação do procedimento de clean up dos extratos aquosos por CLAE-EM.....	35
5.3. Caracterização do perfil químico das frações metanólicas por APCI-EM e análises quimiométricas .....	37
5.4. Conteúdo de fenólicos totais e atividade antioxidante dos extratos aquosos das amostras comerciais e autênticas .....	41
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	45
ANEXOS .....	52

## 1. INTRODUÇÃO

Produtos derivados de plantas medicinais são comercializados em todo o mundo, principalmente em mercados e feiras livres, devido ao seu baixo custo e supostas propriedades terapêuticas. Estima-se que 65% a 80% da população dos países em desenvolvimento utilizam plantas medicinais como remédios naturais (PALHARES et al., 2015). Essa prática crescente tem estimulado muitos grupos de pesquisa a investigarem os efeitos farmacológicos e a composição química de diversas espécies de plantas supostamente utilizadas na medicina tradicional (ALBUQUERQUE et al., 2007; LEITÃO et al., 2013; BITU et al., 2015; LIMA et al., 2016).

O estudo aprofundado de plantas medicinais busca confirmar seus benefícios terapêuticos e identificar seus princípios ativos, contribuindo assim com o desenvolvimento de produtos derivados de plantas para o tratamento das mais diversas doenças. Por outro lado, é sabido que uma das principais dificuldades deste tipo de investigação é a identificação correta da espécie utilizada no preparo destes produtos (SOUZA-MOREIRA et al., 2010; PALHARES et al., 2015). De acordo com as farmacopeias, a identificação correta da espécie, juntamente com a confirmação da presença e concentração mínima dos princípios ativos são etapas determinantes para garantir a qualidade de produtos à base de plantas medicinais (SOUZA-MOREIRA et al., 2010; PALHARES et al., 2015).

Dentre as diversas espécies comercializadas na região amazônica para fins terapêuticos, destaca-se a miraruíra ou cipó-miraruíra, uma liana medicinal utilizada principalmente para o tratamento dos sintomas do diabetes, uma doença crônica causada por disfunções metabólicas devido ao aumento de glicose no sangue, o que desencadeia a glicação de proteínas levando ao desenvolvimento de sérios danos a diversas partes do corpo, e que poderá afetar 592 milhões em 2035 (GUARIGUATA et al., 2014; BLAIR, 2016; ARANHA et al., 2021).

No estado do Amazonas, o nome popular miraruíra é associado às espécies *Salacia impressifolia* (Celastraceae), *Connarus* (Connaraceae) e *Connarus ruber* (AMARAI, 2008; ACHO, 2018; PAZ et al., 2018; RODRIGUES et al., 2019; ARANHA et al., 2021). No que diz respeito ao potencial farmacológico destas espécies, *S. impressifolia* tem potencial anticancerígeno e ação antidiabetes, enquanto *C. ruber* tem potencial para reduzir o risco de carcinogênese e para o tratamento do diabetes,

com base, entre outras coisas, no seu potencial antioxidante (NAKAMURA et al., 2011; CHINCHANSURE et al., 2015; ACHO, 2018; RODRIGUES et al., 2019, ARANHA et al., 2020). Surpreendentemente, embora apresentem atividades biológicas semelhantes, sua composição química é distinta, sendo *S. impressifolia* considerada uma fonte promissora de triterpenos quinonametídeos e *C. ruber* de compostos fenólicos como flavonoides (NAKAMURA et al., 2011; SILVA et al., 2016).

Plantas medicinais com potencial antioxidante tem cada vez mais atraído o interesse de grupos de pesquisa em todo o mundo. Isso é devido, em parte, à sua capacidade de extinguir espécies reativas de oxigênio (ERO), as quais acabam interagindo com diversos componentes celulares e extracelulares e resultando no desenvolvimento de doenças diversas, tal como o diabetes mellitus (PIETTA et al., 1998; BAYR, 2005). Embora a maioria dos organismos vivos possuam mecanismos de defesa contra o excesso de ERO, sua capacidade de resposta diminui com o tempo. Assim, antioxidantes naturais têm sido apontados como fortes candidatos para prevenção e/ou combate a doenças relacionadas ao processo oxidativo (RICE-EVANS et al., 1997; PIETTA et al., 1998; MIGUEL, 2009).

As espécies vegetais têm metabólitos capazes de regular a glicose sanguínea de diversas formas, podendo agir no fígado, músculos, pâncreas e intestino. Devido a isso, o consumo de moléculas antioxidantes tais como os alcaloides, os quais agem no epitélio intestinal, diminuindo o transporte de glicose; os flavonoides estimulam a secreção de insulina; as saponinas inibem a atividade do glucagon; as cumarinas apresentam atividade hipoglicemiante e auxiliam na prevenção de algumas complicações causadas pelo diabetes ao exercerem efeitos sobre a enzima aldose redutase e na agregação plaquetária; além dos compostos que têm ação antioxidante, eles são de grande valor no manejo da doença, pois agem diminuindo o estresse oxidativo nas células (CRUZ, 2021).

Dentre os diversos ensaios existentes capazes de mensurar o potencial antioxidante em plantas naturais, os ensaios de DPPH e FRAP têm se destacado devido à simplicidade de execução do protocolo e ampla utilização em estudos envolvendo plantas medicinais no tratamento da diabetes mellitus (KATALINIC et al., 2006; HASAN et al., 2009; SONG et al., 2010; FAZAL et al., 2011).

A espectrometria de massas é considerada uma das técnicas analíticas mais completas na investigação química de matrizes vegetais, incluindo plantas medicinais. A partir da análise do perfil químico por inserção ou infusão direta da amostra no

espectrômetro de massas é possível atribuir a fórmula molecular e propor a estrutura química ao maior número possível de compostos presentes na espécie. Essa abordagem, em conjunto com ferramentas quimiométricas, tem permitido a prospecção de substâncias bioativas e a caracterização química de produtos de origem vegetal (NUNES e GUERREIRO, 2012; BASTOS et al., 2020; SILVA-FILHO et al., 2021).

Portanto, o presente trabalho teve como objetivo identificar a espécie vegetal utilizada no preparo do cipó-miraruíra através da análise do perfil químico de amostras comerciais e autênticas de *S. impressifolia* e *C. ruber*, além de investigar o potencial antioxidante dessas amostras.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Miraruíra

Miraruíra ou cipó-miraruíra é o nome popular, ou vernacular, de lianas medicinais utilizadas na região amazônica para o tratamento de diversas doenças, incluindo o diabetes e inflamações diversas (ARANHA et al., 2021). Devido às suas supostas propriedades medicinais, sua comercialização ocorre indiscriminadamente em todo estado do Amazonas, sendo possível encontrar diferentes produtos com diferentes apresentações em mercados populares, feiras e empórios (Figura 1).



**Figura 1.** Exemplos de amostras de miraruíra comercializadas no estado do Amazonas. Fonte: Acervo pessoal.

Por outro lado, parece haver consenso quanto ao preparo do chá para consumo, sendo recomendada a decocção de uma colher de sopa do material vegetal para 1 litro de água por 10-15 minutos (Figura 2). Embora diversos trabalhos acadêmicos tenham sugerido que esta liana medicinal seja a espécie *Salacia impressifolia* (Miers) A.C. Sm. (Celastraceae) (ACHO, 2018; PAZ et al., 2018; RODRIGUES et al., 2019), alguns trabalhos apontam que espécies do gênero *Connarus* (Connaraceae) também são conhecidas popularmente como miraruíra (AMARAI, 2008; ARANHA et al., 2021).

Mais recentemente, *Rourea cuspidata* (Connaraceae) Benth. ex Baker foi arbitrariamente descrita na literatura como miraruíra, cipó miraruíra e muiraruíra (LAIKOWSKI et al., 2017), entretanto os autores não apresentaram qualquer referência

que justificasse essa atribuição. Desde então, outros trabalhos acadêmicos têm associado o nome popular miraruíra ou cipó miraruíra à espécie *R. cuspidata* (OSMAN et al., 2019; PAIM et al., 2020). Vale destacar que o espécime *R. cuspidata* descrito como miraruíra por Laikowski e colaboradores (2017) foi primeiramente classificado como *S. impressifolia* (LAIKOWSKI, 2015), demonstrando a dificuldade de identificação botânica da miraruíra no estado do Amazonas, principalmente devido às similaridades morfológicas e anatômicas entre indivíduos de *S. impressifolia* e indivíduos da família Connaraceae, o que pode resultar na comercialização de plantas sem as propriedades medicinais desejadas ou mesmo tóxicas para o consumo.



**Figura 2** . Instruções para o preparo do chá de miraruíra contidas em amostras comercializadas no estado do Amazonas. Fonte: Acervo pessoal.

## 2.2. A espécie *Salacia impressifolia* (Miers) A.C. Sm.

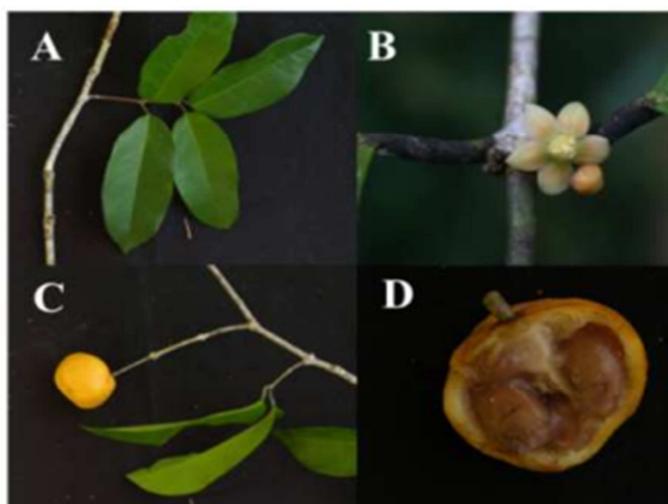
*Salacia impressifolia* é uma espécie de liana, volúvel, ou trepadeira, não endêmica do Brasil, pertencente ao gênero *Salacia* L. (Celastraceae R.Br.). No Brasil sua ocorrência se dá principalmente nos estados do Acre, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima e Mato Grosso (Figura 3), em campos ou florestas de várzea, florestas ciliares, de igapó e de terra firme (BIRAL e LOMBARDI, 2020). De acordo com dados disponíveis no Herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), *S. impressifolia* é a espécie do gênero *Salacia* com maior ocorrência na Região Norte, com 87 registros na instituição (Herbário online INPA, 2021).



**Figura 3.** Distribuição geográfica da espécie *Salacia impressifolia* no Brasil. Fonte: Biral e Lombardi, 2020.

*Salacia impressifolia* apresenta como principais características botânicas o caule do tipo ereto ou escandente, com ramos jovens achatados; folhas de filotaxia opostas com formato elíptico, oval ou oboval (Figura 4A), margem inteira, consistência coriácea, nervura secundária na face abaxial impressa ou plana, cor da face abaxial marrom quando seca e cor da nervura seca na face abaxial esverdeada; inflorescência de posição axilar ou ramiflora do tipo fasciculada a inconspícuo ramificada e indumento glabro; flor de forma rotácea com 2 lóculos (Figura 4B), anteras no formato triangular ou rômbrica, conectivos triangulares; disco pateliforme, estigmas não lobados e 6 a 8 óvulos por lóculos; fruto de formato esferoide (Figura 4C e 4D) (BIRAL e LOMBARDI, 2020).

Do ponto de vista farmacológico, extratos, frações e substâncias puras de *S. impressifolia* têm demonstrado elevado potencial anticâncer frente às mais diversas linhagens de células cancerígenas (RODRIGUES et al., 2019, ARANHA et al., 2020). Rodrigues e colaboradores (2019) demonstraram que o extrato acetato de etila da casca do caule da espécie, suas frações e alguns triterpenos quinonametídeos exibiram atividade *in vitro* e *in vivo* frente a células da leucemia promielocítica aguda humana (HL-60). Além disso, Aranha e colaboradores (2020) demonstraram que o triterpeno quinonametídeo 22 $\beta$ -hidroxitingenona, isolado dos troncos e galhos da espécie, apresentou significativa atividade frente a células de melanoma (SK-MEL-28).



**Figura 4.** Folhas (A), flor (B) e frutos (C e D) da espécie *S. impressifolia*. Fonte: <http://www.plantsoftheworldonline.org/> e <http://www.ecologia.ib.usp.br>

No que diz respeito à investigação do potencial de *S. impressifolia* para o tratamento do diabetes, Acho (2018) recentemente demonstrou que os extratos hexânico (EHSI), acetato de etila (EASI), metanólico (EMSI) e hidroetanólico (EhSI) das cascas de *S. impressifolia* não apresentaram potencial de inibição frente a enzima  $\alpha$ -glucosidase. Entretanto, o extrato hexânico (EHSI) apresentou significativa atividade contra a enzima lipase e também inibiu a glicação por via oxidativa e não oxidativa. Nas análises bioquímicas, o extrato hexânico (EHSI) promoveu a diminuição da glicose, insulina, TGO, triglicerídeos, além do aumento da creatinina em camundongos, sugerindo que este extrato, rico em priestimerina, tingenona,  $\alpha$  e  $\beta$ -amirina, apresenta elevado potencial antiglicante *in vitro* e hipoglicemiante *in vivo*.

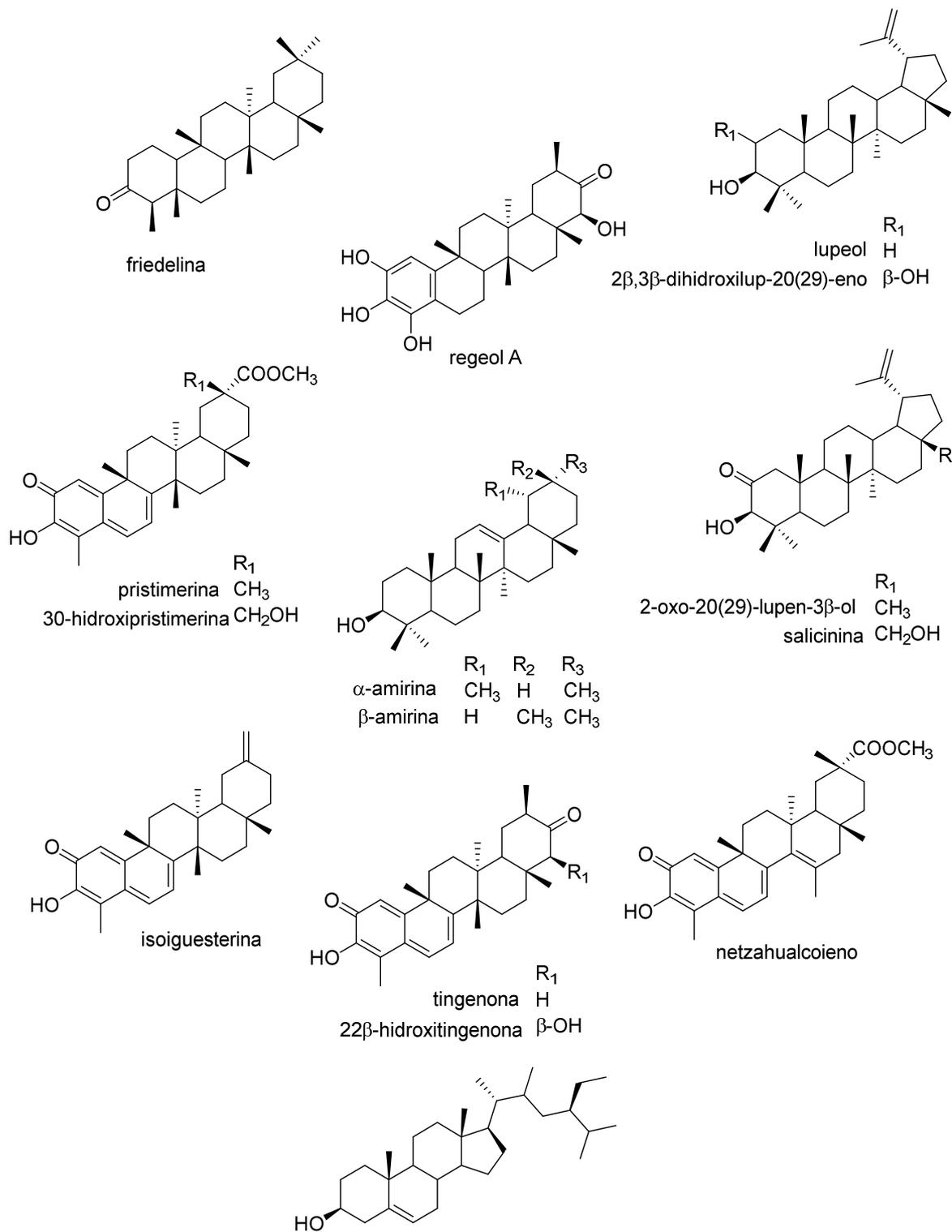
Embora os resultados farmacológicos apontem *S. impressifolia* como uma fonte promissora de substâncias com potencial para o desenvolvimento de fitoterápicos, principalmente anticâncer, pouco se conhece sobre a sua composição química. Silva e colaboradores (2016) reportaram o isolamento dos triterpenos friedelina, regeol A, lupeol,  $2\beta,3\beta$ -dihidroxilup-20(29)-eno, pristimerina, 30-hidroxipristimerina,  $\alpha$ -amirina,  $\beta$ -amirina, 2-oxo-20(29)-lupen- $3\beta$ -ol, salicinina, isoiguesterina, tingenona,  $22\beta$ -hidroxitingenona, netzahualcoieno, além do esteróide  $\beta$ -sitosterol (Figura 5), do tronco e galhos da espécie. Além disso, Paz e colaboradores (2018) reportaram o isolamento de alguns destes triterpenos, além de ácido quinóico, ácido cinchólico, ácido  $3\beta$ -O-6-

deoxi- $\beta$ -D-glicopiranosídeo cinchólico e ácido 3 $\beta$ -O- $\beta$ -D-glicopiranosídeo quinóvico (Figura 6), ainda não reportados no gênero *Salacia*, a partir das raízes da espécie.

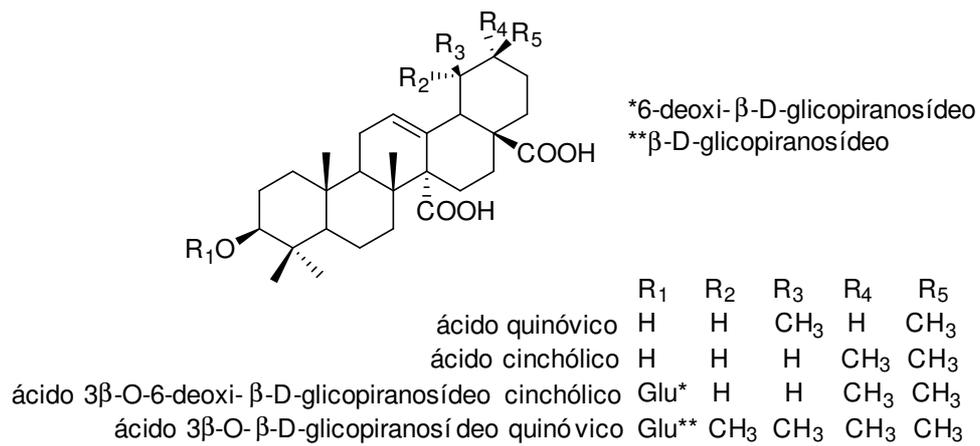
### 2.3. A espécie *Connarus ruber*

*Connarus ruber* é uma espécie de liana, volúvel, ou trepadeira, ou arbustos escandente, não endêmica do Brasil, pertencente ao gênero *Connarus* L. (Connaraceae R.Br.). De acordo com Forero (1983), existem três variedades para esta espécie, sendo elas: *Connarus ruber* var. *acutissimus* (G.Schellenb.) Forero, *Connarus ruber* var. *sprucei* (Baker) Forero e *Connarus ruber* (Poepp.) Planch. var. *ruber*. No Brasil sua ocorrência se dá principalmente nos estados do Acre, Amazonas, Pará, Rondônia e Mato Grosso (Figura 7), em áreas antrópicas, florestas ciliares e de terra firme (TOLEDO e SOUZA, 2020). De acordo com dados disponíveis no Herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), *Connarus ruber* (Poepp.) Planch, sinonímia de *Connarus ruber* (Poepp.) Planch. var. *ruber*, é a espécie do gênero *Connarus* com maior ocorrência na Região Norte, com 74 registros na instituição (Herbário online INPA, 2021).

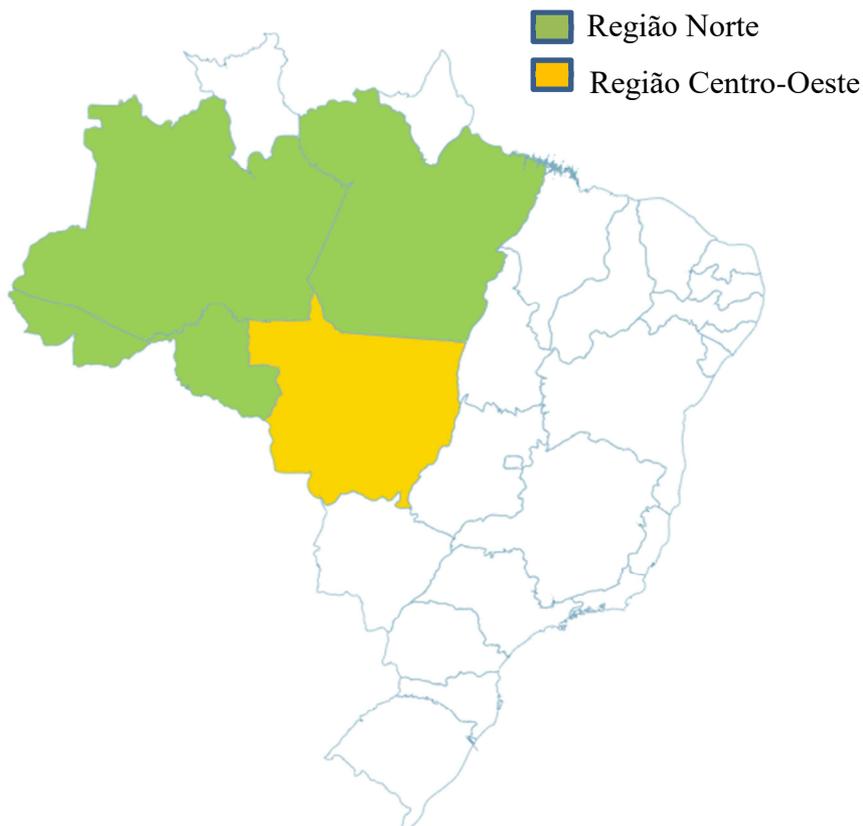
*Connarus ruber* apresenta como principais características botânicas: ramos sem tricomas dendróides; 1-3 folíolos de lamina elíptica, base simétrica, consistência cartácea, margem plana, nervura secundária broquidódroma; nervura terciária percorrente; inflorescência tipo axilar com indumento seríceo dendroide de cor ferrugíneo ou marrom e raque com mais de 10 cm (Figura 8); flor com sépalas com pontos glandulosos preto e pétalas com pontos glandulosos preto numerosos; fruto com formato semi orbicular apiculado, indumento de face externa serícea, face interna sem tricoma glandular, estipes de 1-3 mm e cálice com sépala reflexa (TOLEDO e SOUZA, 2020.).



**Figura 5.** Substâncias isoladas do tronco e galhos de *Salacia impressifolia*.



**Figura 6.** Substâncias isoladas das raízes de *Salacia impressifolia*.



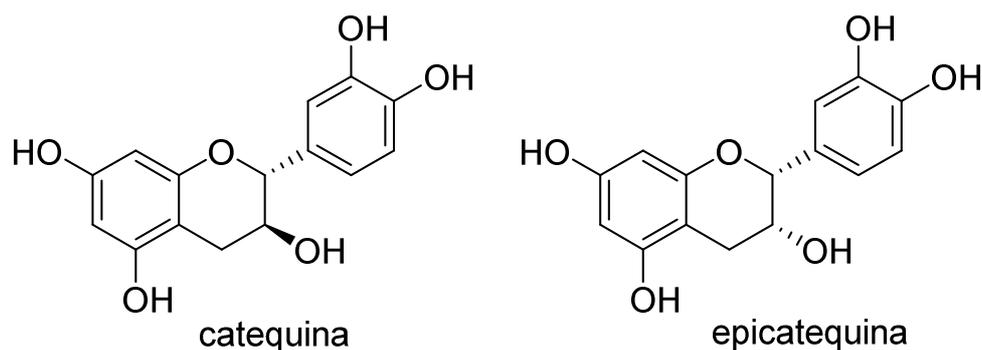
**Figura 7.** Distribuição geográfica da espécie *Connarus ruber* no Brasil. Fonte: TOLEDO e SOUZA, 2020.



**Figura 8.** Exsicatas de *Connarus ruber* (Poepp.) Planch depositadas no Herbário do INPA sob os códigos: (A) INPA 103890 e (B) INPA 10587. Fonte: Herbário online INPA, 2021.

Do ponto de vista farmacológico, o extrato aquoso de *C. ruber* demonstrou potencial de supressão de genotoxicidade *in vitro* e *in vivo* (NAKAMURA et al., 2011). Foi sugerido que esse mesmo potencial poderia reduzir o risco de carcinogênese causada pelo consumo de tabaco, o que estaria relacionado ao elevado potencial antioxidante do extrato aquoso (NAKAMURA et al., 2015). Por outro lado, uma revisão realizada por Chinchansure e colaboradores (2015) sobre o desenvolvimento recente de produtos vegetais com atividade antiglicante apontou o extrato aquoso de *C. ruber* como promissor para o tratamento do diabetes com base, entre outras coisas, no seu potencial antioxidante.

Os dados relativos ao conteúdo fitoquímico de *C. ruber* são escassos, existindo um único trabalho publicado que aborda a composição química do extrato aquoso (NAKAMURA et al., 2011). Nakamura e colaboradores (2011) demonstraram que o extrato aquoso é constituído predominantemente por taninos (1140 mg/100g de extrato), epicatequina (77 mg/100g de extrato) e catequina (12 mg/100g de extrato) (Figura 9).



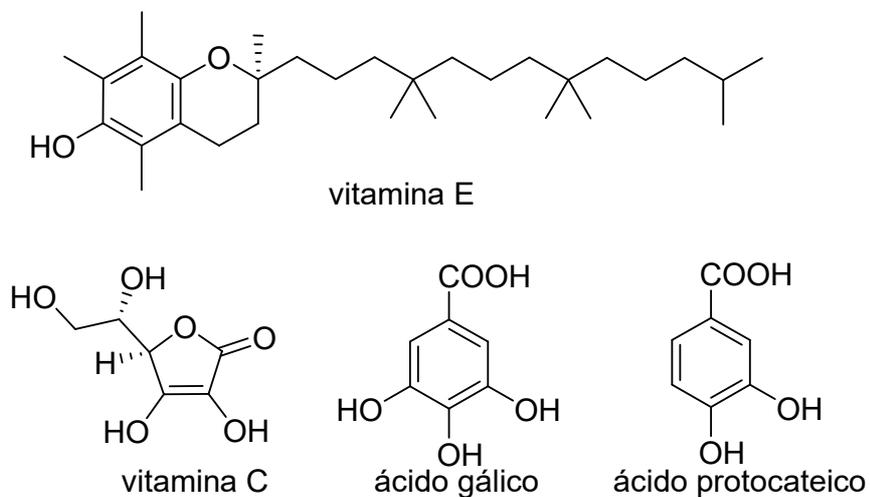
**Figura 9.** Substâncias reportadas no extrato aquoso de *Connarus ruber*.

#### 2.4. Atividade antioxidante de plantas medicinais

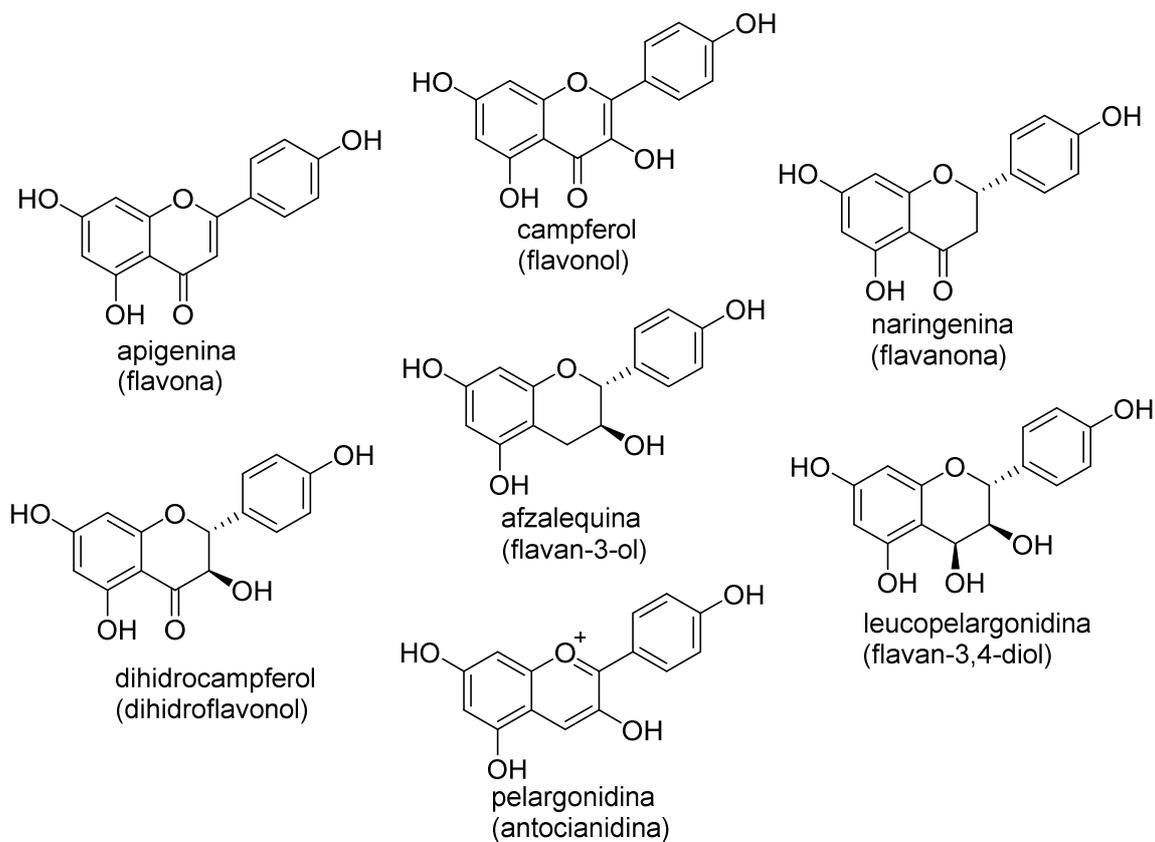
A investigação do potencial antioxidante de plantas medicinais tem se tornado uma prática cada vez mais comum no campo da química de produtos naturais e em áreas afins (PIETTA et al., 1998; KRISHNAIAH et al., 2011; BANOTHU et al., 2017; NOREEN et al., 2017; AKHTAR, et al., 2018; SEKHON-LOODU e RUPASINGHE, 2019). Esse interesse crescente deve-se à capacidade que plantas antioxidantes têm de extinguir espécies reativas de oxigênio (ERO) radicalares, tais como os radicais superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidroxil ( $OH^{\cdot}$ ), peroxil ( $RO_2^{\cdot}$ ) e hidroperoxil ( $HO_2^{\cdot}$ ), e não radicalares, tais como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o ácido hipocloroso (HClO) (PIETTA et al., 1998; BAYR, 2005).

ERO são naturalmente geradas em células animais a partir de uma variedade de processos enzimáticos e não enzimáticos e acabam interagindo com diversos componentes celulares e extracelulares, incluindo DNA, RNA, lipídios, proteínas e enzimas, o que pode ocasionar o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, vasculares, câncer, diabetes, entre outras (PIETTA et al., 1998; PALM et al., 2003; BAYR, 2005; KANETO et al., 2010; LIOU et al., 2010; SAEIDNIA e ABDOLLAH, 2013). Embora a maioria dos organismos vivos possuam mecanismos de defesa contra o excesso de ROS, diferentes fatores externos, incluindo o consumo de tabaco e álcool, e o envelhecimento, diminuem a sua capacidade de resposta, resultando em perturbações do equilíbrio redox da célula. Portanto, antioxidantes naturais, tais como vitaminas e compostos fenólicos, incluindo ácidos orgânicos e flavonoides diversos (Figuras 10 e 11), têm sido apontados como fortes candidatos para prevenção e/ou combate a doenças

relacionadas ao processo oxidativo (RICE-EVANS et al., 1997; PIETTA et al., 1998; MIGUEL, 2009).



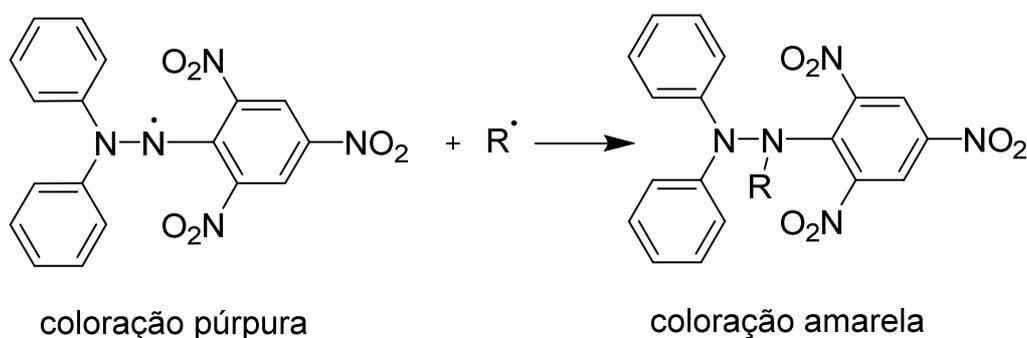
**Figura 10.** Exemplos de vitaminas e ácidos orgânicos previamente descritos como antioxidantes naturais.



**Figura 11.** Exemplos de diferentes tipos de flavonoides previamente descritos como antioxidantes naturais.

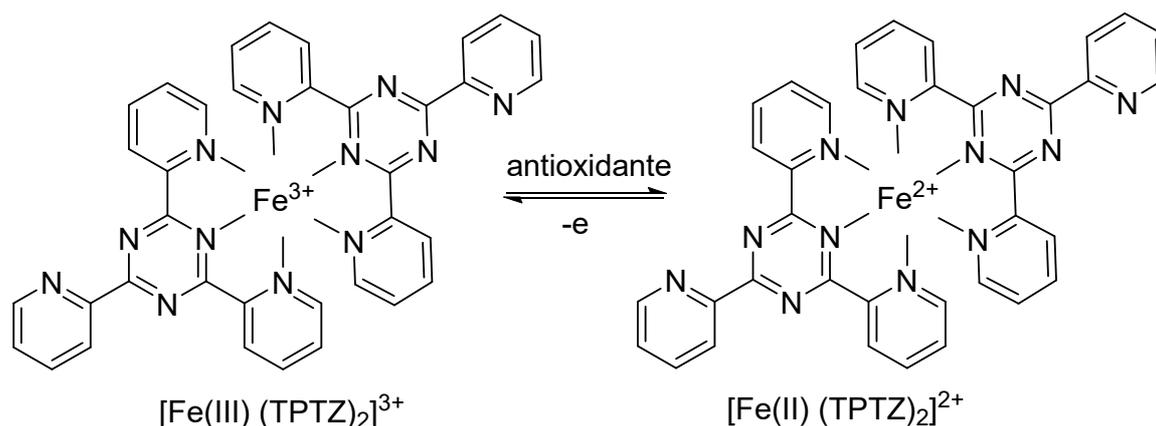
No que diz respeito aos ensaios utilizados para avaliar o potencial antioxidante de plantas medicinais, diversas abordagens têm sido utilizadas, incluindo ensaios que avaliam a capacidade de absorção dos radicais oxigenados (ORAC), de sequestro do cátion radicalar 2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolína-6-sulfonato (ABTS<sup>+</sup>), de captura de radicais livres de 2,2-difenil-picril-hidraxina (DPPH), e o poder antioxidante redutor férrico (FRAP) de extratos diversos (PIETA et al., 1998; MIGUEL, 2010; KRISHNAIAH et al., 2011). Dentre estas metodologias destacam-se os ensaios DPPH e FRAP devido à simplicidade de execução do protocolo e ampla utilização em estudos envolvendo plantas medicinais (KATALINIC et al., 2006; HASAN et al., 2009; SONG et al., 2010; FAZAL et al., 2011).

O método DPPH é um dos métodos mais utilizados para avaliação do potencial antioxidante de amostras de plantas. O ensaio consiste em avaliar a capacidade sequestradora do radical DPPH, o qual possui uma coloração púrpura característica (absorvância em 515 nm). Na presença de um antioxidante ou espécie radicalar, o DPPH é reduzido a difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela (Figura 12). Assim, a atividade é medida pela diminuição da absorção em 515 nm (KRISHNAIAH et al., 2011).



**Figura 12.** Reação de estabilização do radical DPPH.

Por outro lado, o ensaio FRAP, consiste na medida da capacidade da amostra em reduzir Fe<sup>3+</sup> para Fe<sup>2+</sup>, através da redução do complexo metálico [Fe(III) (TPTZ)<sub>2</sub>]<sup>3+</sup> (ferritripiridiltriazina) para [(Fe(II) (TPTZ)<sub>2</sub>)<sup>2+</sup> ferroso-tripiridiltriazina (Figura 13). O complexo Fe<sup>2+</sup>-TPTZ tem uma cor azul intensa e pode ser monitorado a 593 nm (VASCONCELOS et al., 2007).



**Figura 13.** Reação de redução do complexo  $[\text{Fe(III) (TPTZ)}_2]^{3+}$  para  $[(\text{Fe(II) (TPTZ)}_2)]^{2+}$ .

## 2.5. Abordagens baseadas em espectrometria de massas na investigação química de plantas medicinais

A espectrometria de massas (EM) é uma técnica analítica que envolve o estudo de íons em fase gasosa. Os íons formados em uma fonte de ionização à pressão atmosférica (API) (ex. ESI, APCI) ou sob alto vácuo (ex. EI, MALDI) são separados em um analisador, de acordo com suas diferentes razões de massa/carga ( $m/z$ ). Devido à sua alta sensibilidade, seletividade, limite de detecção, velocidade de análise e diversidade de aplicações, principalmente quando combinada a sistemas cromatográficos (ex. GC, HPLC), a EM tem se destacado entre as técnicas analíticas modernas utilizadas no estudo químico de plantas medicinais (WOLFENDER e HOSTETTMANN, 1995; DE HOFFMANN, 2000; ZHU et al., 2018).

Uma das abordagens baseadas em EM mais simples utilizada atualmente na investigação de matrizes vegetais é a análise do perfil químico através de inserção ou infusão direta da amostra em espectrômetro de massas, seguido da desreplicação dos constituintes da amostra através da interpretação dos dados obtidos em experimentos de fragmentação sequencial (EM/EM) ou de múltiplos estágios (EMn). Essa abordagem tem permitido a rápida identificação de substâncias conhecidas em extratos ou outras matrizes complexas sem a necessidade de isolamento, auxiliando nas etapas de seleção cromatográfica e permitindo o isolamento seletivo de novas substâncias,

potencializando a abordagem fitoquímica (SILVA et al., 2012, 2014; SOARES et al., 2015).

Por outro lado, o processamento dos dados de perfil químico através de ferramentas quimiométricas, tal como PCA e HCA, tem permitido uma abordagem de reconhecimento de padrão onde amostras quimicamente semelhantes são agrupadas e marcadores químicos são apontados. Essa abordagem tem sido utilizada em trabalhos quimiosistemáticos, de prospecção de substâncias bioativas (ex. polifenóis, alcaloides) e na caracterização química de produtos de origem vegetal, tal como o própolis verde (NUNES e GUERREIRO, 2012; SILVA et al., 2016; BASTOS et al., 2020; SILVA-FILHO et al., 2021).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Geral**

Identificar a natureza química do cipó-miraruíra através da técnica analítica de espectrometria de massa em amostras comerciais e autênticas de *S. impressifolia* e *C. ruber* e investigar seu potencial antioxidante.

#### **3.2. Específicos**

- Realizar o preparo dos extratos aquosos de diversas amostras comerciais de miraruíra e amostras autênticas de *S. impressifolia* e *C. ruber*, baseado em informações etnobotânicas;
- Realizar o *clean up* de todos os extratos aquosos através do uso da técnica de extração em fase sólida (SPE);
- Acessar o perfil químico dos extratos aquosos e frações através de abordagens baseadas em espectrometria de massas (EM);
- Realizar análises multivariadas (PCA e HCA) do conjunto de dados obtidos através das análises por EM;
- Realizar a quantificação de fenólicos totais das amostras comerciais e autênticas;
- Avaliar o potencial antioxidante das amostras comerciais e autênticas.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Análises cromatográficas**

#### *4.1.1. Extração em fase sólida (SPE)*

Os procedimentos de SPE foram realizados utilizando pipetas Pasteur como suporte e KP-C18-HS (35-70  $\mu\text{m}$ ) (Biotage, VA, EUA) como adsorvente.

#### *4.1.2. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)*

As análises de HPLC foram realizadas em cromatógrafo modelo Acella (Thermo Scientific, MA, EUA), equipado com bomba Acella *Pump Plus*, autoamostrador Acella *Autosampler Plus* e válvula de injeção Rheodyne (25 $\mu\text{L}$ ).

### **4.2 Solventes**

Metanol (MeOH) grau HPLC (Tedia, OH, EUA) e água ultrapura, obtida a partir de um sistema Milli-Q (Millipore, MA, EUA), foram utilizados nas análises de HPLC, procedimento de SPE, bem como nas análises por espectrometria de massas. Para o preparo dos extratos aquosos utilizou-se água destilada.

### **4.3 Análises baseadas em espectrometria de massas (EM)**

Os espectros de massas no modo *full scan* e sequencial (EM/EM) foram registrados em espectrômetro do tipo triplo-quadrupolo (QqQ), modelo TSQ Quantum Acess (Thermo Scientific, MA, EUA), equipado com fonte de ionização química à pressão atmosférica (APCI) e operando nos modos positivo ou negativo. Os espectros foram adquiridos e processados através do software Xcalibur® versão 2.7 (Thermo Scientific).

#### 4.4. Coleta das amostras comerciais de miraruíra e obtenção de amostras autênticas de *S. impressifolia* e *C. ruber*

As amostras comerciais de miraruíra foram compradas em mercados, feiras e empórios distribuídos pela cidade de Manaus-AM, sendo em seguida devidamente codificadas (A-J) e armazenadas. Informações detalhadas sobre cada produto são apresentadas da Tabela 1.

**Tabela 1.** Origem das amostras comerciais de miraruíra e informações disponíveis em seus rótulos.

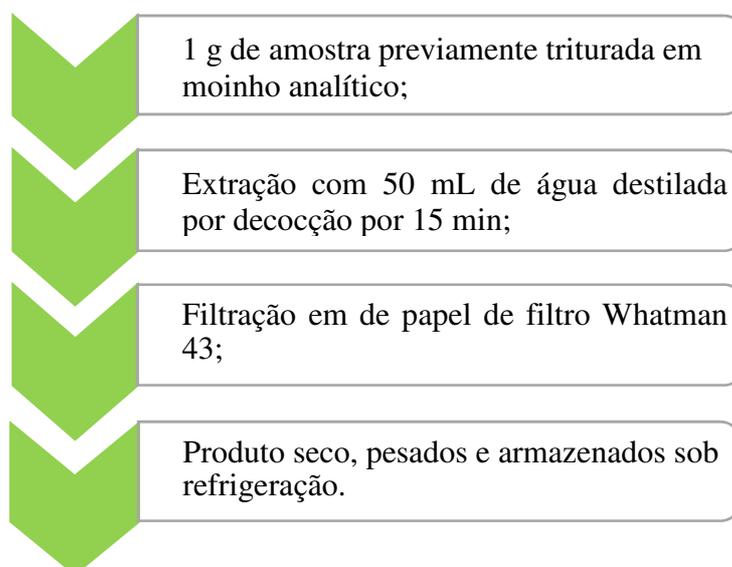
<b>Amostras</b>	<b>Origem</b>	<b>Informações do rótulo</b>
A	Mercado	Indicação terapêutica, modo de preparo e consumo.
B	Feira	Indicação terapêutica, modo de consumo.
C	Empório	Sem rótulo.
D	Empório	Nome botânico, indicação terapêutica, modo de preparo e consumo.
E	Empório	Nome botânico, indicação terapêutica, modo de preparo e consumo.
F	Feira	Nome botânico, indicação terapêutica, modo de preparo e consumo.
G	Empório	Modo de preparo e consumo.
H	Empório	Modo de preparo e consumo.
I	Feira	Sem rótulo.
J	Mercado	Sem rótulo.

O material vegetal (cascas do tronco) de *C. ruber* foi coletado na cidade de Maués (lat: -3.38361001014709 long: -57.7186012268066 err: ±447092 WGS84) de indivíduo previamente identificado. Sua exsicata encontra-se depositada no herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) sob o N° 230896. Por outro lado, o material vegetal (cascas do tronco) de *S. impressifolia* foi cedido pelo Dr. Hector Henrique Ferreira Koolen. Este material foi previamente coletado na Reserva Florestal Adolfo Ducke (RFAD), na cidade de Manaus (lat: -2.883333 long: -59.966667 WGS84), de indivíduo previamente identificado, estando sua exsicata depositada no herbário do INPA sob o N° 193803. O acesso às amostras comerciais de miraruíra, bem como ao material vegetal da espécie *C. ruber* encontra-se registrado no Sistema

Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob o código A088AFE. Por outro lado, o acesso ao material vegetal de *S. impressifolia* foi previamente registrado no SisGen sob o código A715C2F.

#### 4.5. Obtenção dos extratos aquosos das amostras comerciais de miraruíra (A-J) e autênticas de *S. impressifolia* e *C. ruber*

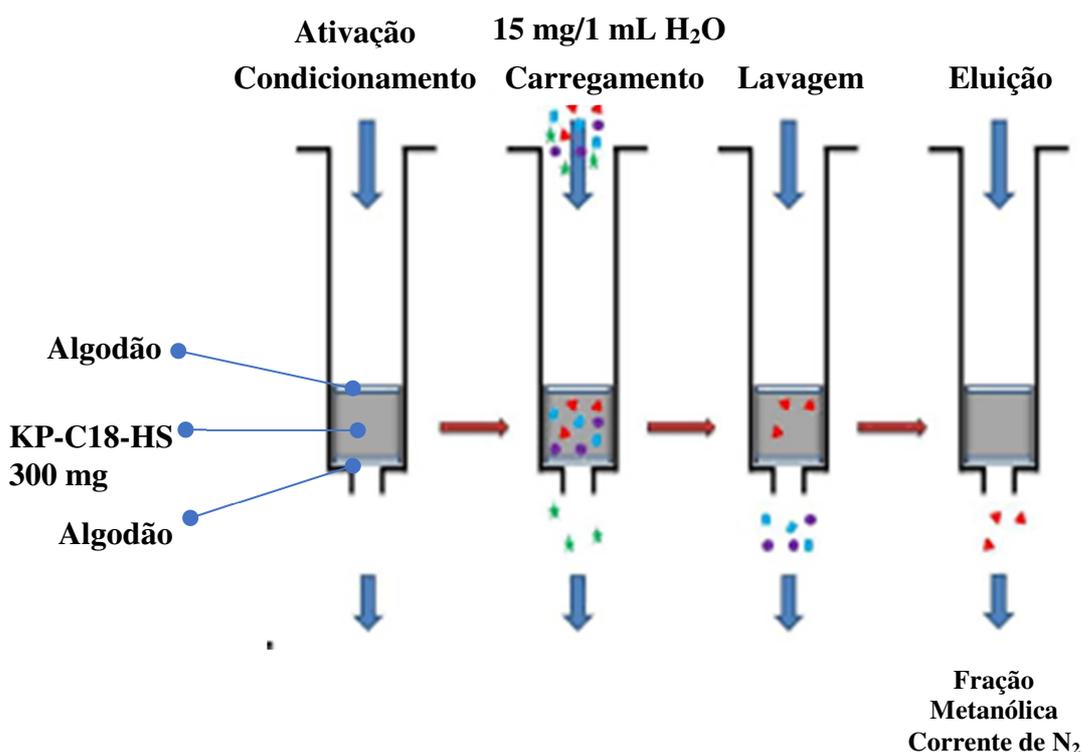
Para a obtenção dos extratos aquosos, aproximadamente 1g de cada amostra comercial e autêntica, previamente pulverizada em moedor analítico modelo 80374 (Hamilton Beach, SP, Brasil), foi submetido à extração com água destilada (50 mL) por decocção por 15 minutos. Esse procedimento foi adotado levando-se em consideração as instruções contidas nos rótulos de algumas amostras comerciais de miraruíra (Figura 2), bem como experiências prévias do nosso grupo de pesquisa com o preparo de extratos aquosos de plantas medicinais (SILVA et al., 2019; SANTOS et al., 2020). Após o período de 15 minutos, os extratos foram filtrados através de papel de filtro Whatman 43 (Sigma Aldrich, MO, EUA) e secos em liofilizador modelo Alpha 1-2 LDplus (Martin Christ, Osterode am Harz, Germany). Após secos, todos os extratos foram devidamente pesados e armazenados sob refrigeração. O experimento foi conduzido em triplicata e descrito na Figura 14.



**Figura 14.** Esquema extração aquosa das amostras comerciais de miraruíra (A-J) e autênticas de *S. impressifolia* e *C. ruber*.

#### 4.6. Clean up dos extratos aquosos das amostras comerciais e autênticas por meio de SPE

A fim de remover interferentes prejudiciais às análises por EM, tais como sais e açúcares, um procedimento de *clean up* dos extratos foi realizado de acordo com Silva e colaboradores (2019). Inicialmente, 15 mg de cada extrato foram solubilizados em 1 ml de água Milli-Q e passados através de uma pipeta Pasteur contendo 300 mg de adsorvente (KP-C18-HS) previamente ativado com MeOH HPLC (3 ml) e condicionado com água Milli-Q (5 ml). Em seguida, cada coluna foi lavada com água Milli-Q (3 mL) (fração aquosa) e posteriormente eluída com MeOH HPLC (1 mL) para um vial de 2 ml (fração metanólica). Finalmente, cada fração metanólica foi seca sob corrente de nitrogênio gasoso (N<sub>2</sub>), conforme ilustrado na Figura 15.

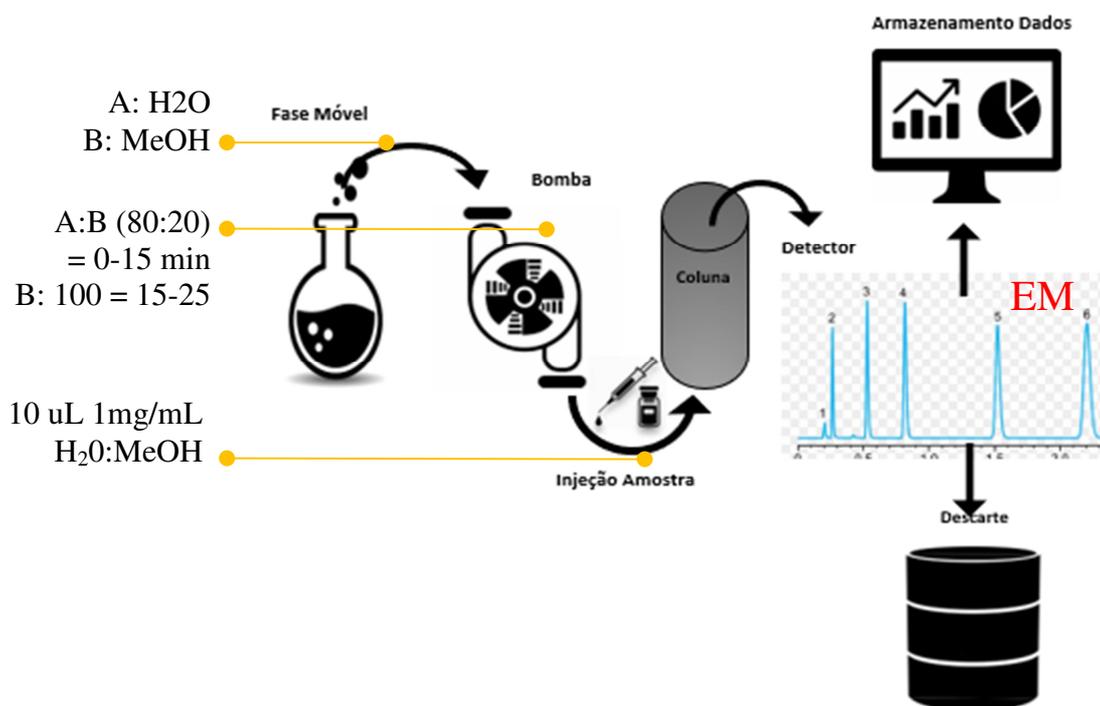


**Figura 15.** Esquema do *clean up* dos extratos aquosos das amostras comerciais e autênticas por meio de SPE.

#### 4.7. Análise por CLAE-EM dos extratos aquosos e frações da SPE de *S. impressifolia* e *C. ruber*

Os extratos aquosos e frações provenientes da SPE (aquosas e metanólicas) de *S. impressifolia* e *C. ruber* foram analisados por CLAE-EM a fim de confirmar a remoção de interferentes prejudiciais às análises por EM (Figura 16). Utilizou-se um sistema constituído por um CLAE, modelo Acella, acoplado a um espectrômetro de massas do tipo triplo-quadrupolo, modelo TSQ Quantum Access, equipado com fonte APCI operando no modo negativo.

As amostras foram preparadas com uma mistura de água-metanol (50:50, v/v) na concentração de 1 mg/mL e injetadas (10  $\mu$ L) em uma coluna Phenomenex Luna C18 (2) (5  $\mu$ m, 150 mm x 4,6 mm id) (Torrance, CA, EUA). Água milli-Q (A) e MeOH (B) foram utilizados como fases móveis. Utilizou-se o seguinte gradiente de eluição: 0-15 min, 20-80% B; 15-25 minutos, 80% de B a um fluxo de 1 mL/min. Os parâmetros analíticos utilizados no EM foram os seguintes: *discharge current*: 5  $\mu$ A; *vaporizer temperature*: 350  $^{\circ}$ C; *capillary temperature*: 270  $^{\circ}$ C; *sheath gas*: 35 psi; *aux gas*: 15 arb, *mass range*, *m/z* 150-1000.



**Figura 16.** Análise por CLAE-EM dos extratos aquosos e frações da SPE de *S. impressifolia* e *C. ruber*.

#### **4.8. Análise por APCI-EM das frações metanólicas e tratamento quimiométrico dos dados**

Soluções estoque (1 mg/mL) das frações metanólicas das amostras comerciais (A-J) e autênticas de *S. impressifolia* e *C. ruber* foram preparadas em MeOH HPLC. Aliquotas (10 µL) das soluções estoque foram posteriormente transferidas para vials contendo 1 mL de MeOH. Finalmente, 10 µL das soluções diluídas (10 ppm) foram analisadas por inserção direta no espectrômetro de massas do tipo triplo-quadrupolo, modelo TSQ Quantum Access, equipado com fonte APCI operando no modo negativo. Os parâmetros analíticos utilizados foram os seguintes: *discharge current*: 5 µA; *vaporizer temperature*: 320 °C; *capillary temperature*: 220 °C; *sheath gas*: 30 psi; *aux gas*: 10 arb, *mass range, m/z* 150-1000. Os espectros de EM/EM foram obtidos através de dissociação induzida por colisão (CID) utilizando-se argônio como gás de colisão e energias de colisão variando entre 30 a 35 eV.

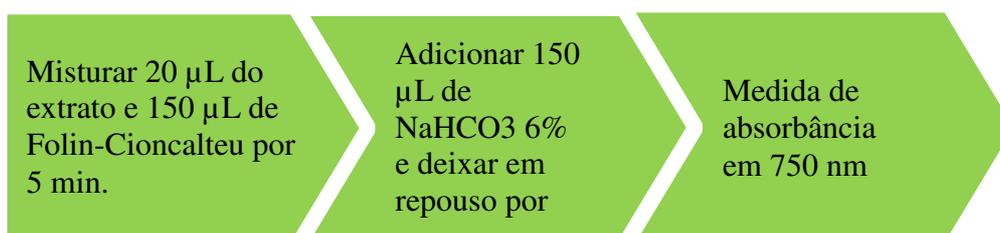
Para a análise de componentes principais (PCA), pelo menos 10 espectros de cada amostra foram processados no modo *full scan*, sendo em seguida convertidos em uma lista de íons (*spectrum list*) contendo valores de intensidade absoluta e relativa para cada íon na faixa de *m/z* 150 a 1000. Os dados de intensidade relativa para todos os íons na faixa de *m/z* 150 a 1000 foram tabulados no Excel e os íons com intensidade abaixo de 5% em relação ao íon mais abundante foram posteriormente negligenciados (SILVA et al., 2016; BASTOS et al., 2020). A matriz resultante foi analisada através do software Chemoface (versão 1.5) (NUNES et al., 2012). Por sua vez, a análise de agrupamento hierárquico (HCA) foi calculada através do uso da distância Euclidiana e tipo de ligação média. As quatro primeiras componentes principais (PC1-PC4) foram consideradas na análise de HCA.

#### **4.9. Determinação do conteúdo de fenólicos totais e avaliação da atividade antioxidante pelos métodos DPPH e FRAP**

##### *4.9.1. Conteúdo de fenólicos totais (CFT)*

O conteúdo de fenólicos totais (TPC) de cada extrato aquoso foi determinado em uma microplaca de 96 poços usando reagente de Folin-Ciocalteu de acordo com metodologia previamente descrita (BASTOS et al., 2020) (Figura 17). Resumidamente,

20  $\mu\text{L}$  de cada extrato na concentração de 1 mg/mL foi misturado com 150  $\mu\text{L}$  de reagente de Folin-Ciocalteu (previamente diluído 10 vezes com água destilada). Após 5 min, 150  $\mu\text{L}$  de solução de bicarbonato de sódio a 6% foram adicionados à mistura e deixados em repouso por 90 min em temperatura ambiente no escuro. A absorbância da mistura foi medida a 750 nm com um leitor de microplaca modelo ELX 808 (Biotek, Burlington, VT). Uma curva de calibração foi preparada usando uma solução padrão de ácido gálico e o conteúdo fenólico total (TPC) foi expresso em equivalentes de ácido gálico (mg GAE/100 g).



**Figura 17.** Determinação do conteúdo de fenólicos totais (CFT).

#### 4.9.2. Atividade antioxidante pelo método DPPH

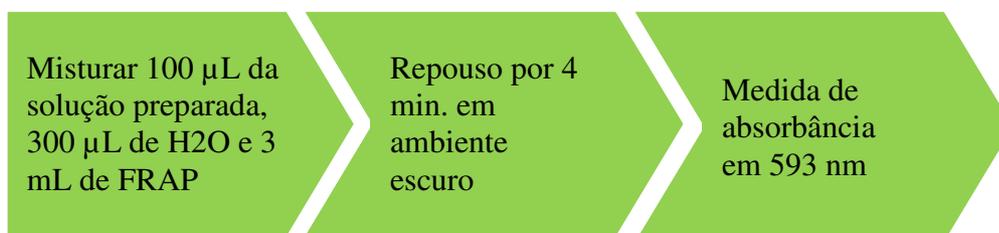
A determinação da atividade antioxidante pelo método de captura de radicais livres de 2,2-difenil-picril-hidraxina (DPPH) foi realizada de acordo com metodologia previamente descrita (BASTOS et al., 2020) (Figura 18). Resumidamente, 30  $\mu\text{L}$  de cada solução de extrato em várias concentrações (1000-6,25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) foram misturados com 270  $\mu\text{L}$  de DPPH (100  $\mu\text{M}$ ) e deixados em repouso por 30 min em temperatura ambiente no escuro. A absorbância da mistura foi medida a 515 nm com um leitor de microplaca modelo ELX 808. Uma curva de calibração foi preparada usando uma solução padrão de ácido gálico (100-1,56  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).



**Figura 18.** Determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH.

#### 4.9.3. Atividade antioxidante pelo método FRAP

A determinação da atividade antioxidante por meio do poder antioxidante redutor férrico (FRAP) foi realizada de acordo com metodologia previamente descrita (RUFINO et al., 2010, 2011) (Figura 19). Inicialmente, foram preparadas soluções metanólicas na concentração de 1 mg/mL dos extratos aquosos, as quais foram reservadas. Preparou-se então o reagente FRAP, que é obtido através da mistura de uma solução 20 mM de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  com solução 10 mM TPTZ [2,4,6- tri(2-*pidil*)-1,3,5-triazina] e solução tampão acetato pH 3,6, na proporção de 1:1:10. Foram transferidos 100  $\mu\text{L}$  das soluções previamente preparadas das amostras, 300  $\mu\text{L}$  de água Milli-Q e 3 mL do reagente FRAP para um frasco âmbar. Em seguida, colocou-se o frasco âmbar ao abrigo da luz durante 4 min à temperatura ambiente. Por fim, mediu-se a absorbância a 593 nm em espectrofotômetro UV/Visível modelo 800XI (FEMTO, SP, Brasil). Os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol}$  de  $\text{Fe(II)}$ /mg de extrato seco e calculados por meio da equação de regressão linear, obtida a partir da construção de uma curva analítica de sulfato ferroso nas concentrações de 250, 500, 1000, 1250, 1500 e 2000  $\mu\text{M}$ . As análises dos extratos foram realizadas em triplicatas utilizando solventes com grau HPLC. Além disso, foi determinada a capacidade antioxidante FRAP de um padrão (ácido gálico).



**Figura 19.** Determinação da atividade antioxidante pelo método FRAP.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Rendimento dos extratos aquosos das amostras comerciais e autênticas

Os extratos aquosos das amostras autênticas de *S. impressifolia* e *C. ruber* apresentaram rendimento de 4,19% e 4,36%, respectivamente, em relação ao material vegetal seco. Por outro lado, as amostras comerciais de miraruíra tiveram rendimento do extrato aquoso variando entre 1,25-7,20%. Amostras coletadas em feiras (B, F, e I) tiveram rendimento entre 3,04-6,15%, empórios (C, D, E, G e H) entre 1,29-7,20% e mercados populares (A e J) entre 1,25-2,19%. Os maiores rendimentos foram observados para as amostras C (7,20%) e I (6,15%), ambas sem rótulo. Portanto, não foi possível correlacionar o rendimento dos extratos aquosos com o local de coleta, ou mesmo com a forma de apresentação do produto.

**Tabela 2.** Rendimentos dos extratos aquosos obtidos a partir do procedimento de decocção.

Amostras	Material extraído (g) <sup>a</sup>	Extrato liofilizado (g) <sup>b</sup>	Rendimento (%)
A	1,0082	0,0126	1,25
B	1,0148	0,0420	4,14
C	1,0124	0,0729	7,20
D	1,0058	0,0328	3,26
E	1,0050	0,0285	2,83
F	1,0076	0,0306	3,04
G	1,0114	0,0131	1,29
H	1,0266	0,0150	1,46
I	1,0235	0,0629	6,15
J	1,0037	0,0220	2,19
SAL <sup>b</sup>	1,0187	0,0427	4,19
CON <sup>c</sup>	1,0112	0,0441	4,36

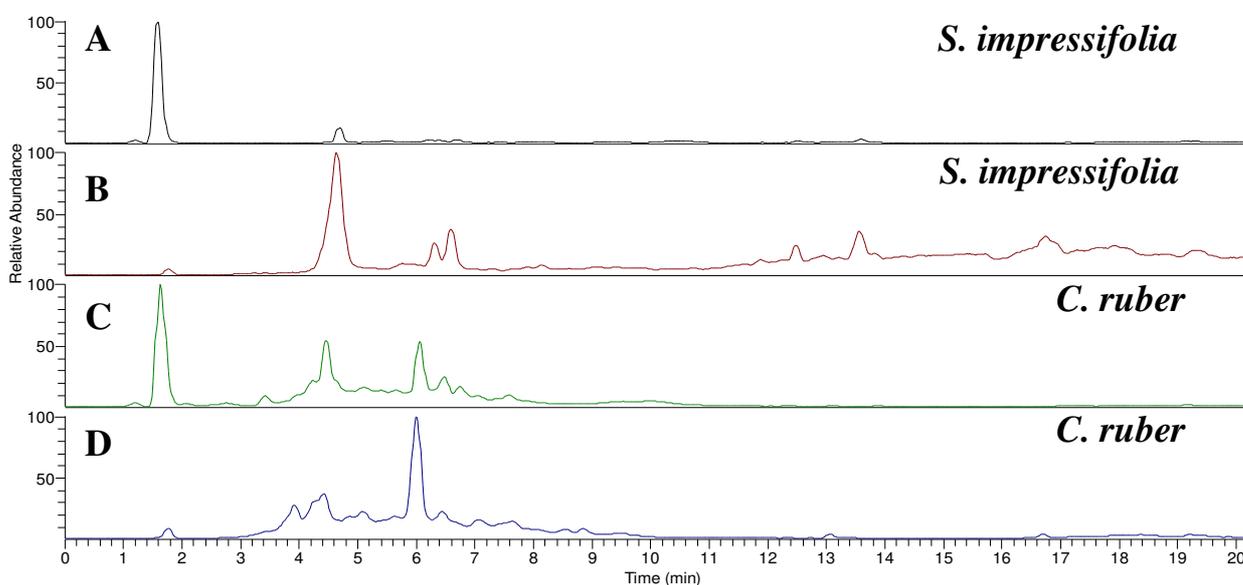
<sup>a</sup>amostras coletadas em feiras ■, empórios ■, mercados ■ e autênticas ■

<sup>b</sup>média de três replicatas.

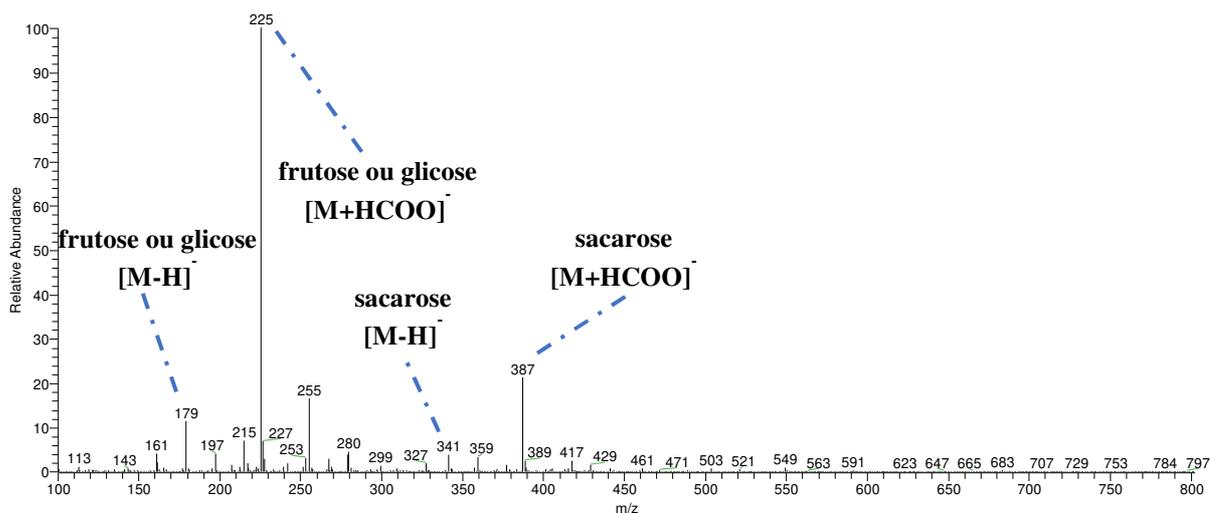
### 5.2. Avaliação do procedimento de clean up dos extratos aquosos por CLAE-EM

As análises por CLAE-EM dos extratos aquosos de *S. impressifolia* (Figura 20A) e *C. ruber* (Figura 20C) revelaram a presença de picos majoritários com tempo de retenção de 1,60 minutos em ambas as amostras. Através da análise do espectro de

massas (*full scan*) destes picos (Figura 21) foi possível observar a presença de íons característicos de açúcares, tais como frutose ou glicose ( $m/z$  179 e 225) e sacarose ( $m/z$  341 e 387), comumente encontrados em matrizes vegetais (GUIGNARD et al., 2005). Por outro lado, as frações metanólicas de *S. impressifolia* (Figura B) e *C. ruber* (Figura 20D), resultantes do protocolo de *clean up* com SPE, tiveram uma redução significativa do pico cromatográfico referente aos açúcares, confirmando a eficiência do protocolo na remoção de interferentes prejudiciais às análises por EM. Uma análise comparativa permitiu ainda verificar que o efeito de *clean up* foi significativamente maior para o extrato aquoso de *S. impressifolia*, o qual teve um ganho expressivo de sinal após a remoção dos açúcares (Figura 20A e 20B).



**Figura 20.** Cromatograma dos extratos aquosos de *S. impressifolia* (A) e *C. ruber* (C) e de suas frações metanólicas provenientes do protocolo de SPE (B e D).

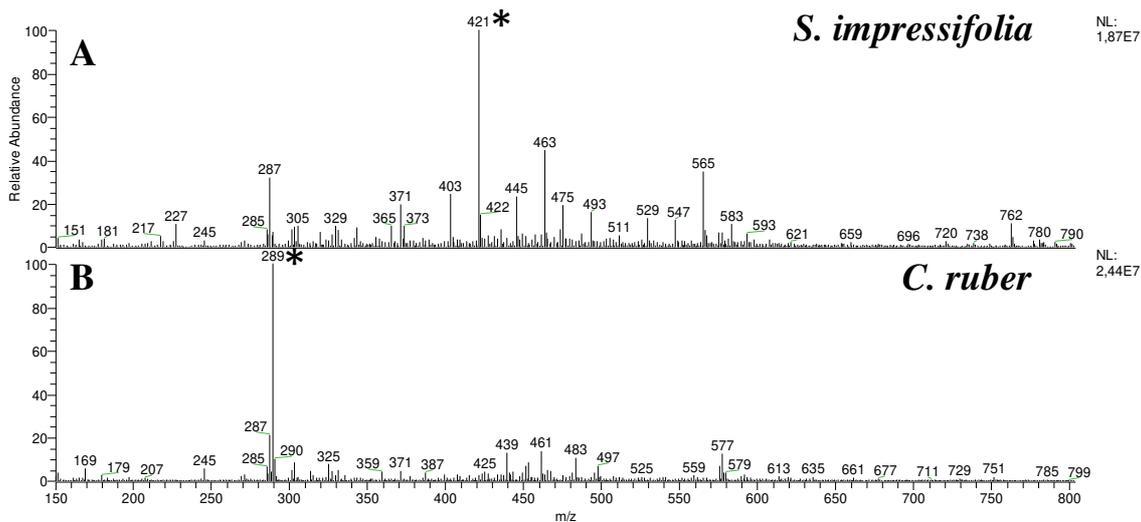


**Figura 21.** Espectro de massas do pico cromatográfico com tempo de retenção de 1,60 minutos presente no extrato aquoso de *C. ruber*.

### 5.3. Caracterização do perfil químico das frações metanólicas por APCI-EM e análises quimiométricas

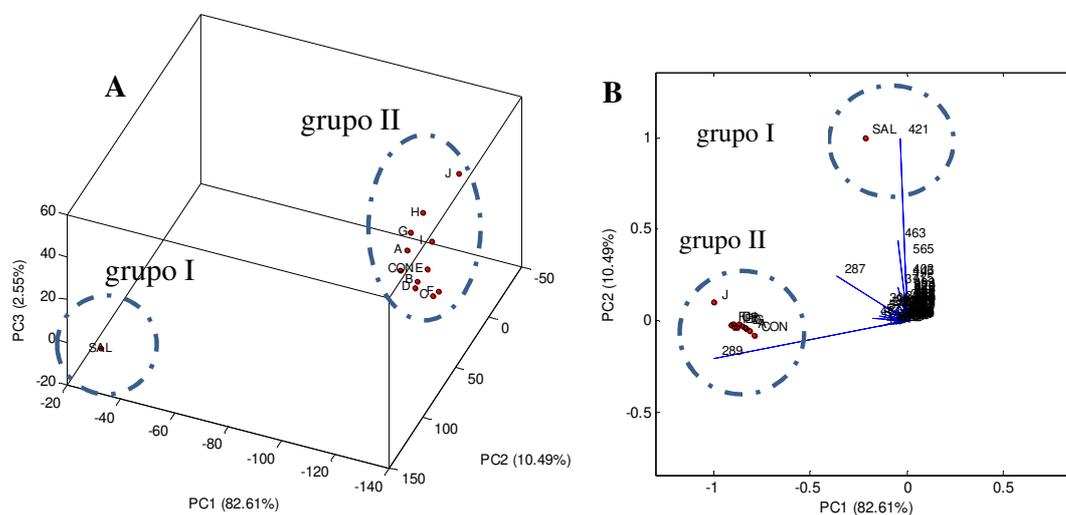
A análise por inserção direta das frações metanólicas de *S. impressifolia* e *C. ruber*, na faixa de  $m/z$  150-1000, revelou perfis distintos para ambas as espécies (Figura 22A e 22B). Para a amostra de *S. impressifolia* foi observado o íon de  $m/z$  421 como pico base, enquanto que para *C. ruber* foi observado o íon de  $m/z$  289. Diversos outros íons de menor intensidade foram observados em ambas as amostras. As amostras comerciais (A-J) por sua vez apresentaram perfis químicos semelhantes entre si, tendo o íon de  $m/z$  289 como pico base (Figuras A3 a A12 do material anexo).

No gráfico de escore de PCA (Figura 23A), gerado a partir da abundância relativa dos 114 íons que permaneceram após eliminação dos íons abaixo de 5% (Tabela S1), foi observada a formação de dois grupos principais, sendo o grupo I constituído pela amostra SAL (*S. impressifolia*), e o grupo II pela amostra CON (*C. ruber*) e demais amostras comerciais (A-J).



**Figura 22.** Espectro de massas da fração metanólica de *S. impressifolia* (A) e *C. ruber* (B) com \* denotando o pico base.

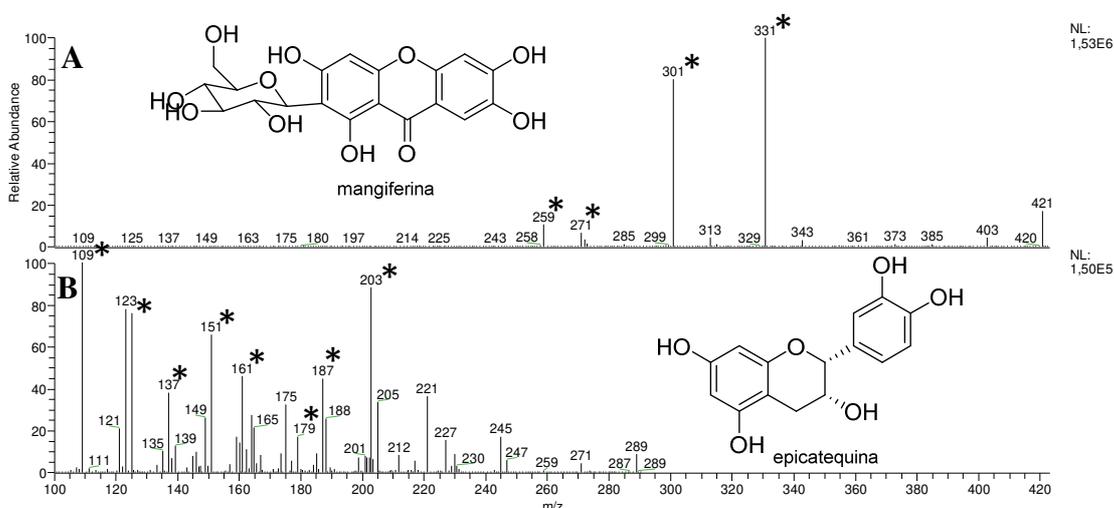
De acordo com o gráfico biplot de PCA (Figura 23B), os íons de  $m/z$  289 e 421 foram os principais responsáveis pela segregação entre os grupos I e II. Portanto, seus espectros de EM/EM foram analisados na tentativa de caracterizar estas substâncias.



**Figura 23.** Gráficos de escore de PCA (A) e biplot (B) baseados no perfil químico por APCI-EM.

O espectro de EM/EM do íon de  $m/z$  421 (Figura 24A) apresentou um pico base de  $m/z$  331, um íon intenso de  $m/z$  331, além de outros íons de menor intensidade de  $m/z$  271 e 259, sendo estes fragmentos consistentes com a estrutura da xantona mangiferina

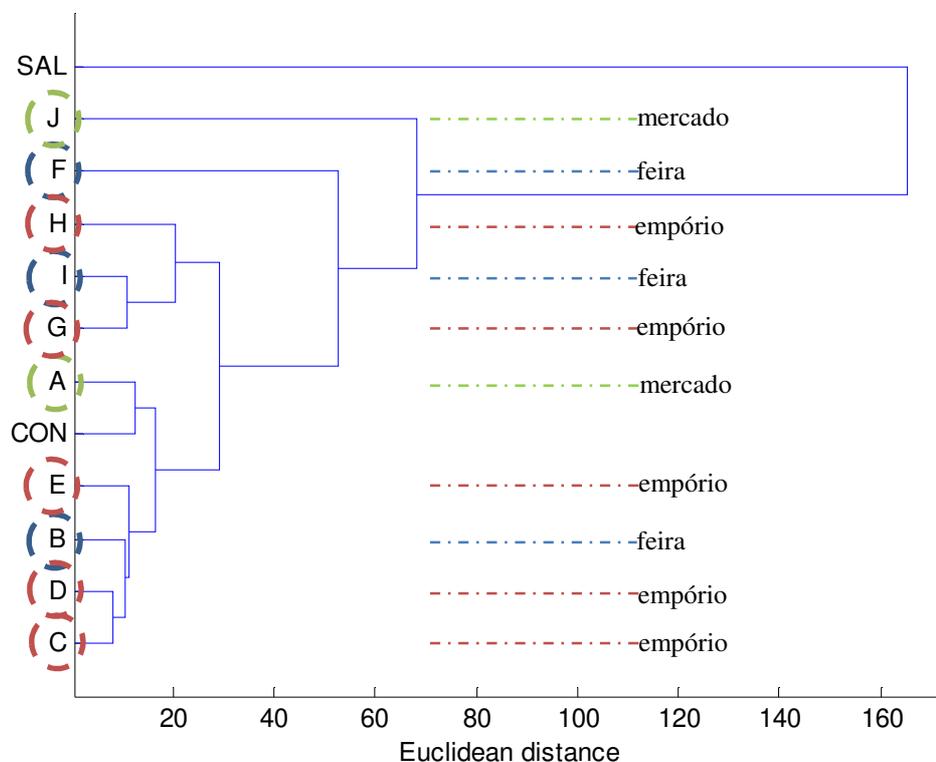
(TREVISAN et al., 2016), previamente reportada em diversas espécies de *Salacia*, tais como *S. chinensis*, *S. oblonga*, *S. roxburghii* e *S. reticulata* (GIRÓN et al., 2009; SHIMADA et al., 2011; SELLAMUTHU et al., 2013a; KALIAPPAN et al., 2014), mas ainda não reportada em *S. impressifolia*. Mangiferina tem sido apontada como promissora para o tratamento do diabetes, devido ao seu potencial de reduzir o estresse oxidativo, o que está relacionado às suas características antioxidantes (SELLAMUTHU et al., 2013a, 2013b; PAL et al., 2014).



**Figura 24.** Espectro de EM/EM dos íons de  $m/z$  421 (A) e 289 (B) com \* denotando íons fragmentos previamente descritos para mangiferina e epicatequina.

Por outro lado, o espectro de EM/EM do íon de  $m/z$  289 (Figura 24B) se apresentou mais complexo, com diversos íons fragmentos intensos na região de  $m/z$  109-203, destacando-se o pico base de  $m/z$  109, e os íons de  $m/z$  125, 137, 151, 161, 179, 187 e 203, os quais são consistentes com fragmentos previamente reportados para o flavonoide epicatequina (SOUZA et al., 2008). Epicatequina foi previamente descrita como constituinte majoritário do extrato aquoso de *C. ruber* (NAKAMURA et al., 2011). Epicatequina também tem sido apontada como promissora para o tratamento de diversas doenças, incluindo o diabetes, devido ao seu potencial de reduzir o estresse oxidativo, o que também está relacionado às suas características antioxidantes (RAMIREZ-SANCHEZ et al., 2013; MARTÍN et al., 2014; ABDULKHALEQ et al., 2017; KELLER et al., 2020).

Através da análise do dendrograma de HCA (Figura 25) foi possível observar a formação de subgrupos dentro do grupo II, o que sugere a existência de variabilidade química entre as amostras comerciais.



**Figura 25.** Dendrograma de HCA das amostras comerciais de miraruira (A-J) coletadas em diferentes estabelecimentos e autênticas de *S. impressifolina* (SAL) e *C. ruber* (CON).

As amostras comerciais B, C, D e E apresentaram forte similaridade química entre si, baseada no perfil químico por APCI-EM, assim como as amostras A e CON (*C. ruber*). Esses subgrupos acabaram se conectando devido a maior similaridade entre si do que com o subgrupo que contem as amostras G, H e I. Por sua vez, as amostras F e J foram as que apresentaram menor similaridade química entre as amostras comerciais. Essa variabilidade química pode ser devido à comercialização de produtos a base de outras espécies do gênero *Connarus*, tal como *C. perrottetii*, cuja ocorrência é significativa na Região Norte (Herbário online INPA, 2021), ou mesmo espécies de outros gêneros da família Connaraceae, tal como *R. cuspidata* (LAIKOWSKI et al., 2017), recentemente sugerida como miraruíra. Mais uma vez, não foi possível correlacionar a similaridade química entre as amostras comerciais com o local de coleta.

#### 5.4. Conteúdo de fenólicos totais e atividade antioxidante dos extratos aquosos das amostras comerciais e autênticas

Os resultados do conteúdo de fenólicos totais (CFT) e atividade antioxidante dos extratos aquosos das amostras comerciais (A-J) e autênticas de *C. ruber* (CON) e *S. impressifolia* (SAL) encontram-se apresentados na Tabela 3.

Através do método de Folin-Ciocalteu foi possível observar que o extrato de *C. ruber* apresentou CFT (46,52 mg EAG/g) significativamente superior ao observado para *S. impressifolia* (8,91 mg EAG/g). Estas observações estão de acordo com dados previamente publicados sobre espécies dos gêneros *Connarus* e *Salacia*. Em estudo realizado com o extrato metanólico das folhas de *C. semidecandrus* foi observado CFT de 39,7 mg EAG/g (MACHANA et al., 2017), enquanto Silva e colaboradores (2016) reportaram CFT de 25,83 mg EAG/g para o extrato aquoso das cascas de *C. favosus*. Por outro lado, Santana e colaboradores (2015) demonstraram que o extrato aquoso de *S. impressifolia* apresenta baixo CFT (1,2 a 3,5 mg de equivalentes de ácido pirogálico/g). Resultado semelhante foi observado para o extrato aquoso das frutas de *S. chinensis* (CFT = 1,22 mg EAG/g) (CHAVAN et al., 2013) e para o extrato hidroetanólico das folhas de *S. kraussii* (CFT = 5,0 mg EAG/g) (ZIMILA et al., 2020).

Dentre as amostras comerciais, as amostras H (53,00 mg EAG/g) e J (51,29 mg EAG/g), compradas respectivamente em empório e feira, apresentaram os melhores valores de CFT, enquanto as amostras F (12,22 mg EAG/g) e J (12,48 mg EAG/g), compradas respectivamente em feira e mercado, apresentaram os valores mais baixos de CFT. Entretanto, todas as amostras comerciais apresentaram valores de CFT superior ao observado para *S. impressifolia*. Em relação ao CFT de plantas medicinais com potencial para o tratamento do diabetes, Wongsa e colaboradores (2012) avaliaram os extratos aquosos de diversas espécies e observaram CFT variando entre 2,89 e 75,26 mg EAG/g, sendo as mais promissoras *Solanum xanthocarpum* (75,26 mg EAG/g), *Ocimum sanctum* (70,88 mg EAG/g) e *Acacia pennata* (66,48 mg EAG/g). Já o chá verde (*Camellia sinensis*), notoriamente conhecido devido aos seus benefícios para o tratamento do diabetes (GOMES et al., 1995; ISLAM, 2011), apresentou CFT entre 4,80 e 26,20 mg de pirogálico/g em amostras comerciais (PEREIRA et al., 2009).

**Tabela 3.** Conteúdo de fenólicos totais (CFT) e atividade antioxidante dos extratos aquosos pelos métodos DPPH e FRAP.

Amostras <sup>a</sup>	CFT (mg EAG/g) <sup>b</sup>	DPPH (µg/ml) <sup>b,c</sup>	FRAP (µmol de Fe(II)/g) <sup>b,d</sup>
A	39,77	124,04	268,90
B	36,39	146,36	237,95
C	22,76	176,77	127,00
D	25,72	112,72	143,19
E	17,23	60,15	716,52
F	12,22	127,75	59,38
G	13,33	217,95	398,90
H	53,00	134,45	525,57
I	51,29	80,98	535,10
J	12,48	124,77	115,10
SAL <sup>b</sup>	8,91	244,80	30,33
CON <sup>c</sup>	46,52	171,36	266,52

<sup>a</sup>amostras coletadas em feiras ■, empórios ■, mercados ■ e autênticas ■;

<sup>b</sup>média de três replicatas; <sup>c</sup>padrão de ácido gálico = 8,41 µg/ml; <sup>d</sup> padrão de ácido gálico = 1822,38 µmol de Fe(II)/g.

Através dos ensaios de DPPH e FRAP foi possível observar maior potencial antioxidante para o extrato aquoso de *C. ruber* (CS50 = 171,36 µg/ml e FRAP = 266,52 µmol de Fe(II)/g) em comparação ao extrato de *S. impressifolia* (CS50 = 244,80 µg/ml e FRAP = 30,33 µmol de Fe(II)/g). A atividade antioxidante observada para *C. ruber* está de acordo com dados previamente publicados para a espécie. Nakamura e colaboradores (2005) demonstraram que o extrato aquoso de *C. ruber* apresenta concentração capaz de sequestrar 50% dos radicais livres de DPPH (CS50) < 200 µg/ml. O potencial antioxidante do extrato aquoso de *C. ruber*, o qual é devido em grande parte à presença de epicatequina (NAKAMURA et al., 2005), tem sido apontado como responsável pelos possíveis benefícios terapêuticos desta planta no tratamento do diabetes (CHINCHANSURE et al., 2015). Como mencionando anteriormente, epicatequina tem sido apontada como promissora para o tratamento do diabetes, devido ao seu potencial de reduzir o estresse oxidativo (RAMIREZ-SANCHEZ et al., 2013; MARTÍN et al., 2014; ABDULKHALEQ et al., 2017; KELLER et al., 2020).

Por outro lado, a atividade antioxidante observada para *S. impressifolia* está de acordo com dados publicados para outras espécies do gênero. Como exemplo, Chavan e colaboradores (2013) descreveram o extrato aquoso dos frutos de *S. chinensis* como pouco ativo. Roopa e colaboradores (2015) também reportaram baixa atividade antioxidante para o extrato aquoso das folhas de *S. macrosperma* (CS50 > 1 mg/ml).

Embora magiferina esteja presente no extrato aquoso de *S. impressifolia*, e esta substância tenha sido apontada como promissora para o tratamento do diabetes, devido ao seu potencial de reduzir o estresse oxidativo (SELLAMUTHU et al., 2013a, 2013b; PAL et al., 2014), sua concentração parece não ser suficiente para garantir uma elevada capacidade antioxidante.

Dentre as amostras comerciais, as amostras E (CS50 = 60,15 µg/ml – FRAP = 716,52 µmol de Fe(II)/g) e I (CS50 = 80,98 µg/ml – FRAP = 535,10 µmol de Fe(II)/g), compradas respectivamente em empório e feira, apresentaram as melhores capacidades antioxidantes. No geral, as amostras comerciais apresentaram potencial antioxidante superior ao observado para *S. impressifolia*. Em relação ao CFT, bem como o potencial antioxidante observado para *C. ruber* e amostras comerciais, os resultados apresentados sugerem que estas amostras devem trazer benefício terapêutico para o tratamento de doenças relacionadas ao processo oxidativo, tal como o diabetes. De fato, diversas espécies apontadas como promissoras para o tratamento do diabetes tem apresentado significativa atividade antioxidante, o qual tem mostrado elevada correlação com o CFT dos extratos aquosos (WONGSA et al., 2012).

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O procedimento de *clean up* dos extratos aquosos por SPE foi determinante para a remoção de açúcares, tais como frutose ou glicose e sacarose das amostras comerciais de miraruíra e autênticas de *S. impressifolia* e *C. ruber*. Portanto, a remoção destes interferentes prejudiciais às análises por EM garantiu uma análise satisfatória do perfil químico das amostras investigadas.

As análises por EM revelaram que as frações metanólicas de *S. impressifolia* e *C. ruber* têm perfis químicos distintos, com marcadores característicos: mangiferina para *S. impressifolia* e epicatequina para *C. ruber*. Por outro lado, todas as amostras comerciais de miraruíra apresentaram perfis químicos semelhantes à espécie *C. ruber*. Portanto, esses resultados sugerem que a espécie *C. ruber* é utilizada como miraruíra no estado do Amazonas.

A variabilidade química observada para as amostras comerciais, através da análise de HCA, pode ser um indicativo de que outras espécies do gênero *Connarus*, tal como *C. perrottetii*, ou mesmo espécies de outros gêneros da família Connaraceae, tal como *R. cuspidata*, podem estar sendo utilizadas como miraruíra.

Os resultados do CFT e do potencial antioxidante do extrato aquoso de *C. ruber* sugerem que produtos à base de *C. ruber* têm maior capacidade antioxidante do que aqueles à base de *S. impressifolia*, e, portanto, devem trazer maior benefício terapêutico para o tratamento de doenças relacionadas ao processo oxidativo, tal como o diabetes. Esse benefício é devido, em parte, à presença de epicatequina, substância previamente apontada como promissora para o tratamento do diabetes e presente em todas as amostras de miraruíra comercializadas no estado do Amazonas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULKHALEQ, L. A., ASSI, M. A., NOOR, M. H. M., ABDULLAH, R., SAAD, M. Z., & TAUFIQ-YAP, Y. H. 2017. Therapeutic uses of epicatechin in diabetes and cancer. *Veterinary world*, 10(8), 869.

ACHO, L. D. R. Avaliação da atividade antidiabética de extratos das cascas de *Salacia impressifolia*. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Brasil, 2018.

ALBUQUERQUE, U. P., MONTEIRO, J. M., RAMOS, M. A., & DE AMORIM, E. L. C. 2007. Medicinal and magic plants from a public market in northeastern Brazil. *Journal of ethnopharmacology*, 110(1), 76-91.

AMARAL, W. C. D. Avaliação biológica de extratos vegetais no tratamento de diabetes mellitus e hiperlipidemia em coelhos. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Brasil, 2008.

ARANHA, E. S. P., PORTILHO, A. J. S., DE SOUSA, L. B., DA SILVA, E. L., MESQUITA, F. P., ROCHA, W. C., SILVA, F. M. A., LIMA, E. S., ALVES, A. P. N. N., KOOLEN, H. H. F., MONTENEGRO, R. C., DE VASCONCELLOS, M. C. 2021. 22 $\beta$ -hydroxytingenone induces apoptosis and suppresses invasiveness of melanoma cells by inhibiting MMP-9 activity and MAPK signaling. *Journal of Ethnopharmacology*, 267, 113605.

AKHTAR, N., MIRZA, B. 2018. Phytochemical analysis and comprehensive evaluation of antimicrobial and antioxidant properties of 61 medicinal plant species. *Arabian journal of chemistry*, 11(8), 1223-1235.

BAYR, H. 2005. Reactive oxygen species. *Critical care medicine*, 33(12), S498-S501.

BANOTHU, V., NEELAGIRI, C., ADEPALLY, U., LINGAM, J., BOMMAREDDY, K. 2017. Phytochemical screening and evaluation of in vitro antioxidant and antimicrobial activities of the indigenous medicinal plant *Albizia odoratissima*. *Pharmaceutical biology*, 55(1), 1155-1161.

BASTOS, L. M., SILVA, F. M. A., SOUZA, L. R. S., SÁ, I. S. C., SILVA, R. M., SOUZA, A. D. L., NUNOMURA, R. C. S. 2020. Integrative Approach Based on Simplex-Centroid Design, ESI-MS and Chemometric Analysis for Comprehensive Characterization of Phenolic Compounds from *Endopleura uchi* Bark. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 31(2), 351-356.

BIRAL, L.; LOMBARDI, J.A. 2020. Celastraceae in Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB22429>>. Acesso em: 20 fev. 2021.

BITU, V. D. C. N., BITU, V. D. C. N., MATIAS, E. F. F., DE LIMA, W. P., DA COSTA PORTELO, A., COUTINHO, H. D. M., & DE MENEZES, I. R. A. 2015.

Ethnopharmacological study of plants sold for therapeutic purposes in public markets in Northeast Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, 172, 265-272.

CHINCHANSURE, A. A., KORWAR, A. M., KULKARNI, M. J., JOSHI, S. P. 2015. Recent development of plant products with anti-glycation activity: a review. *RSC Advances*, 5(39), 31113-31138.

DE HOFFMANN, E. 2000. Mass spectrometry. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*.

CRUZ, P. M. S. N. Abordagem etnofarmacológica na busca de alternativas terapêuticas para tratamento de diabetes mellitus e suas comorbidades. Tese de doutorado. Universidade Federal de Pernambuco, Manaus, Amazonas, 2021.

FAZAL, H., AHMAD, N., & KHAN, M. A. 2011. Physicochemical, phytochemical evaluation and DPPH-scavenging antioxidant potential in medicinal plants used for herbal formulation in Pakistan. *Pak. J. Bot*, 43, 63-67.

FORERO, E. 1983. Connaraceae. In: *Flora Neotropica Monograph n° 36*. New York Botanical Garden, 208 p.

GIRÓN, M. D., SEVILLANO, N., SALTO, R., HAIDOUR, A., MANZANO, M., JIMÉNEZ, M. L., RUEDA, R., LÓPEZ-PEDROSA, J. M. 2009. *Salacia oblonga* extract increases glucose transporter 4-mediated glucose uptake in L6 rat myotubes: role of mangiferin. *Clinical Nutrition*, 28(5), 565-574.

GUIGNARD, C., JOUVE, L., BOGÉAT-TRIBOULOT, M. B., DREYER, E., HAUSMAN, J. F., HOFFMANN, L. 2005. Analysis of carbohydrates in plants by high-performance anion-exchange chromatography coupled with electrospray mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1085(1), 137-142.

HASAN, S. R., HOSSAIN, M. M., AKTER, R., JAMILA, M., MAZUMDER, M. E. H., & RAHMAN, S. 2009. DPPH free radical scavenging activity of some Bangladeshi medicinal plants. *Journal of Medicinal plants research*, 3(11), 875-87.

Herbário online INPA. 2021. Disponível em: <<http://www.splink.org.br/form?lang=pt&collectioncode=INPA>>. Acesso em: 20 fev. 2021.

KALIAPPAN, I., KAMMALLA, A. K., RAMASAMY, M. K., ARUNA, A., & DUBEY, G. P. 2014. LC-MS quantification of mangiferin in hydroalcoholic extract of *Salacia oblonga*, *Salacia roxburghii* and polyherbal formulation. *Int J Phytopharmacy Res*, 4(1), 11-15.

KANETO, H., KATAKAMI, N., MATSUHISA, M., MATSUOKA, T. A. 2010. Role of reactive oxygen species in the progression of type 2 diabetes and atherosclerosis. *Mediators of inflammation*, 2010, 453892.

KATALINIC, V., MILOS, M., KULISIC, T., JUKIC, M. 2006. Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food chemistry*, 94(4), 550-557.

KRISHNAIAH, D., SARBATLY, R., NITHYANANDAM, R. 2011. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food and bioproducts processing*, 89(3), 217-233.

LAIKOWSKI, M. M. Avaliação dos principais metabólitos secundários por espectrometria de massas e atividade hipoglicêmica de *Salacia impressifolia* Miers A. C. Smith. Dissertação de mestrado, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, Brasil, 2015.

LAIKOWSKI, M. M., DOS SANTOS, P. R., SOUZA, D. M., MINETTO, L., GIRONDI, N., PIRES, C., ROESCH-ELY, M., TASSO, L., MOURA, S. 2017. *Rourea cuspidata*: Chemical composition and hypoglycemic activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7(8), 712-718.

LEITÃO, F., LEITÃO, S. G., ALMEIDA, M. Z., CANTOS, J., COELHO, T., SILVA, P. E. A. 2013. Medicinal plants from open-air markets in the State of Rio de Janeiro, Brazil as a potential source of new antimycobacterial agents. *Journal of ethnopharmacology*, 149(2), 513-521.

LIMA, P. G. C., COELHO-FERREIRA, M., SANTOS, R. S. 2016. Perspectives on medicinal plants in public markets across the Amazon: a review. *Economic Botany*, 70(1), 64-78.

LIU, G. Y., STORZ, P. 2010. Reactive oxygen species in cancer. *Free radical research*, 44(5), 479-496.

MARTÍN, M. Á., FERNÁNDEZ-MILLÁN, E., RAMOS, S., BRAVO, L., & GOYA, L. 2014. Cocoa flavonoid epicatechin protects pancreatic beta cell viability and function against oxidative stress. *Molecular nutrition & food research*, 58(3), 447-456.

MIGUEL, M. G. 2010. Antioxidant activity of medicinal and aromatic plants. A review. *Flavour and Fragrance Journal*, 25(5), 291-312.

NAKAMURA, T., NAKAI, M., OOKUBO, K., KITAMURA, Y., DOE, N., HATTORI, S., MURAKAMI, N., YAMAMOTO, A., HONDA, G., SASAKI, Y. F. 2011. Genotoxicity-suppressing effect of aqueous extract of *connarus ruber* cortex. *Genes and Environment*, 33(3), 81-88.

NAKAMURA, T., ISHIDA, Y., AINAI, K., NAKAMURA, S., SHIRATA, S., MURAYAMA, K., KURIMOTO, S. I., SAIGO, K., MURASHIGE, R., TSUDA, S., SASAKI, Y. F. 2015. Genotoxicity-suppressing effect of aqueous extract of *Connarus ruber* cortex on cigarette smoke-induced micronuclei in mouse peripheral erythrocytes. *Genes and Environment*, 37(1), 1-6.

NOREEN, H., SEMMAR, N., FARMAN, M., MCCULLAGH, J. S. 2017. Measurement of total phenolic content and antioxidant activity of aerial parts of

medicinal plant *Coronopus didymus*. Asian Pacific journal of tropical medicine, 10(8), 792-801.

NUNES, C. A., GUERREIRO, M. C. 2012. Characterization of Brazilian green propolis throughout the seasons by headspace GC/MS and ESI-MS. Journal of the Science of Food and Agriculture, 92(2), 433-438.

NUNES, C. A.; FREITAS, M. P.; PINHEIRO A. C. M.; BASTOS S. C. 2012. Chemoface: a novel free user-friendly interface for chemometrics. J. Brazil. Chem. Soc. 23, 2003-2010.

OSMAN, C. P., ZAHARI, Z., ADENAN, M. I., ZOHDI, R. M. 2019. A review on traditional uses, phytochemistry, and pharmacology of the genus *Rourea*. Journal of Applied Pharmaceutical Science, 9(09), 125-131.

PAL, P. B., SINHA, K., SIL, P. C. 2014. Mangiferin attenuates diabetic nephropathy by inhibiting oxidative stress mediated signaling cascade, TNF $\alpha$  related and mitochondrial dependent apoptotic pathways in streptozotocin-induced diabetic rats. PloS one, 9(9), e107220.

PALHARES, R. M., DRUMMOND, M. G., BRASIL, B. F. A. S., COSENZA, G. P., BRANDÃO, M. G. L., OLIVEIRA, G. 2015. Medicinal plants recommended by the world health organization: DNA barcode identification associated with chemical analyses guarantees their quality. PloS one, 10(5), e0127866.

PAIM, L. F. N. A., TOLEDO, C. A. P., DA PAZ, J. R. L., PICOLOTTO, A., BALLARDIN, G., SOUZA, V. C., SALVADOR, M., MOURA, S. 2020. Connaraceae: An updated overview of research and the pharmacological potential of 36 species. Journal of Ethnopharmacology, 261, 112980.

PALM, F., CEDERBERG, J., HANSELL, P., LISS, P., & CARLSSON, P. O. 2003. Reactive oxygen species cause diabetes-induced decrease in renal oxygen tension. Diabetologia, 46(8), 1153-1160.

PAZ, W. H., DA SILVA, F. M. A., DA SILVA-FILHO, F. A., DE ALMEIDA, R. A., PINHEIRO, M. L., KOOLEN, H. H. 2018. Triterpenes from the roots of *Salacia impressifolia*. Chemistry of Natural Compounds, 54(1), 200-201.

PIETTA, P., SIMONETTI, P., MAURI, P. 1998. Antioxidant activity of selected medicinal plants. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46(11), 4487-4490.

RAMIREZ-SANCHEZ, I., TAUB, P. R., CIARALDI, T. P., NOGUEIRA, L., COE, T., PERKINS, G., HOGAN, M., MAISEL, A. S., HENRY, R. R., CEBALLOS, G., VILLARREAL, F. 2013. (-)-Epicatechin rich cocoa mediated modulation of oxidative stress regulators in skeletal muscle of heart failure and type 2 diabetes patients. International journal of cardiology, 168(4), 3982-3990.

RICE-EVANS, C., MILLER, N., PAGANGA, G. 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. Trends in plant science, 2(4), 152-159.

RODRIGUES, A. C. B. C., DE OLIVEIRA, F. P., DIAS, R. B., SALES, C. B. S., ROCHA, C. A. G., SOARES, M. B. P., COSTA, E. V., SILVA, F. M. A., ROCHA, W. C., KOOLEN, H. H. F., BEZERRA, D. P. 2019. In vitro and in vivo anti-leukemia activity of the stem bark of *Salacia impressifolia* (Miers) AC Smith (Celastraceae). *Journal of ethnopharmacology*, 231, 516-524.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; DE BRITO, E. S.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F.; MANCINI-FILHO, J. 2010. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. *Food Chemistry*, v.121, p. 996-1002.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; FERNANDES, F. A. N.; BRITO, E. S. 2011. Free radical scavenging behavior of ten exotic tropical fruits extracts. *Food Research International*, v.44, p. 2072-2075.

SAEIDNIA, S., ABDOLLAHI, M. 2013. Toxicological and pharmacological concerns on oxidative stress and related diseases. *Toxicology and applied pharmacology*, 273(3), 442-455.

SANTOS, C. L. G., ANGOLINI, C. F. F., NEVES, K. O. G., COSTA, E. V., SOUZA, A. D. L., PINHEIRO, M. L. B., KOOLEN, H. H. F., SILVA, F. M. A. 2020. Molecular networking-based dereplication of strictosidine-derived monoterpene indole alkaloids from the curare ingredient *Strychnos peckii*. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 34, e8683.

SEKHON-LOODU, S., RUPASINGHE, H. P. 2019. Evaluation of antioxidant, antidiabetic and antiobesity potential of selected traditional medicinal plants. *Frontiers in nutrition*, 6, 53.

SELLAMUTHU, P. S., ARULSELVAN, P., MUNIAPPAN, B. P., FAKURAZI, S., KANDASAMY, M. 2013a. Mangiferin from *Salacia chinensis* prevents oxidative stress and protects pancreatic  $\beta$ -cells in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of medicinal food*, 16(8), 719-727.

SELLAMUTHU, P. S., ARULSELVAN, P., KAMALRAJ, S., FAKURAZI, S., KANDASAMY, M. 2013b. Protective nature of mangiferin on oxidative stress and antioxidant status in tissues of streptozotocin-induced diabetic rats. *International Scholarly Research Notices*, 2013.

SHIMADA, T., NAGAI, E., HARASAWA, Y., WATANABE, M., NEGISHI, K., AKASE, T., SAI, Y., MIYAMOTO, K. Y., ABURADA, M. 2011. *Salacia reticulata* inhibits differentiation of 3T3-L1 adipocytes. *Journal of ethnopharmacology*, 136(1), 67-74.

SILVA, F. M. A., KOOLEN, H. H. F., ALMEIDA, R. A., SOUZA, A. D. L., PINHEIRO, M. L. B., COSTA, E. V. 2012. Desreplicação de alcaloides aporfínicos e oxoaporfínicos de *Unonopsis guatterioides* por ESI-IT-MS. *Química Nova*, 35(5), 944-947.

SILVA, F. M. A., SOUZA, A. D., KOOLEN, H. H., BARISON, A., VENDRAMIN, M. E., COSTA, E. V., FERREIRA, A. G., PINHEIRO, M. L. B. 2014. Phytochemical study of the alkaloidal fractions of *Unonopsis duckei* RE Fr. guided by electrospray ionisation ion-trap tandem mass spectrometry. *Phytochemical Analysis*, 25(1), 45-49.

SILVA, F. M. A., PAZ, W. H., VASCONCELOS, L. S. F., SILVA, A. L. B., SILVA-FILHO, F. A., ALMEIDA, R. A., SOUZA, A. D. L., PINEIRO, M. L. B., KOOLEN, H. H. 2016. Chemical constituents from *Salacia impressifolia* (Miers) AC Smith collected at the Amazon rainforest. *Biochemical Systematics and Ecology*, 68, 77-80.

SILVA, F. M. A., SILVA FILHO, F. A., LIMA, B. R., ALMEIDA, R. A., SOARES, E. R., KOOLEN, H. H., SOUZA, A. D. L., PINHEIRO, M. L. B. 2016. Chemotaxonomy of the Amazonian *Unonopsis* species based on leaf alkaloid fingerprint direct infusion ESI-MS and chemometric analysis. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 27(3), 599-604.

SILVA, F. M. A., HANNA, A. C. S., SOUZA, A. A., SILVA-FILHO, F. A., CANHOTO, O. M. F., MAGALHÃES, A. BENEVIDES, P. J. C., AZEVEDO, M. B. M., SIANI, A. C., POHLIT, A. M., SOUZA, A. D. L., KOOLEN, H. H. 2019. Integrative analysis based on HPLC-DAD-MS/MS and NMR of *Bertholletia excelsa* bark biomass residues: determination of ellagic acid derivatives. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 30(4), 830-836.

SILVA-FILHO, F. A., SOUZA, M. M. M., REZENDE, G. O., SILVA, F. M. A., CRUZ, J. C., SILVA, G. F., SOUZA, A. D. L., SOUZA, A. Q. L. 2021. Screening of Alkaloid-Producing Endophytic *Penicillium* Strains from Amazon Medicinal Plants by Electrospray Ionization Mass Spectrometry (ESI-MS) and Principal Component Analysis (PCA). *Journal of the Brazilian Chemical Society*. <https://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20210074>

SOARES, E. R., SILVA, F. M., ALMEIDA, R. A., LIMA, B. R., SILVA-FILHO, F. A., BARISON, A., KOOLEN, H. H. F., PINHEIRO, M. L. B., SOUZA, A. D. 2015. Direct infusion ESI-IT-MSn alkaloid profile and isolation of tetrahydroharman and other alkaloids from *Bocageopsis pleiosperma* Maas (Annonaceae). *Phytochemical analysis*, 26(5), 339-345.

SONG, F. L., GAN, R. Y., ZHANG, Y., XIAO, Q., KUANG, L., LI, H. B. 2010. Total phenolic contents and antioxidant capacities of selected Chinese medicinal plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(6), 2362-2372.

SOUZA, L. M., CIPRIANI, T. R., IACOMINI, M., GORIN, P. A., SASSAKI, G. L. 2008. HPLC/ESI-MS and NMR analysis of flavonoids and tannins in bioactive extract from leaves of *Maytenus ilicifolia*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 47(1), 59-67.

SOUZA-MOREIRA, T. M., SALGADO, H., PIETRO, R. C. 2010. O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 20, 435-440.

TOLEDO, C.A.P.; SOUZA, V.C. 2020. Connaraceae in Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em:

<<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB22532>>. Acesso em: 21 fev. 2021.

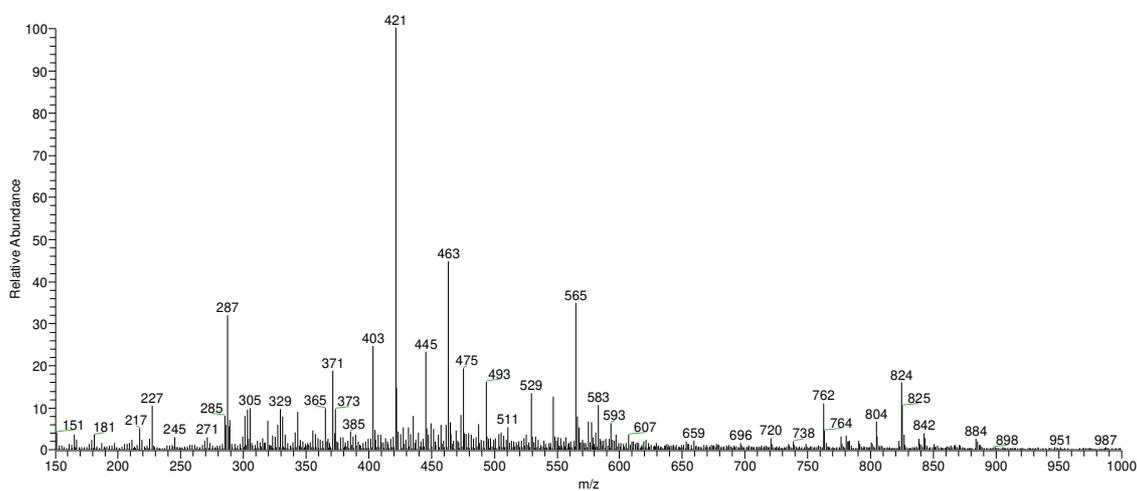
TREVISAN, M. T., DE ALMEIDA, R. F., SOTO, G., VIRGINIO FILHO, E. D. M., ULRICH, C. M., OWEN, R. W. 2016. Quantitation by HPLC-UV of mangiferin and isomangiferin in coffee (*Coffea arabica*) leaves from Brazil and Costa Rica after solvent extraction and infusion. *Food Analytical Methods*, 9(9), 2649-2655.

VASCONCELOS, S. M. L., GOULART, M. O. F., MOURA, J. B. D. F., MANFREDINI, V., BENFATO, M. D. S., KUBOTA, L. T. 2007. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Química nova*, 30(5), 1323-1338.

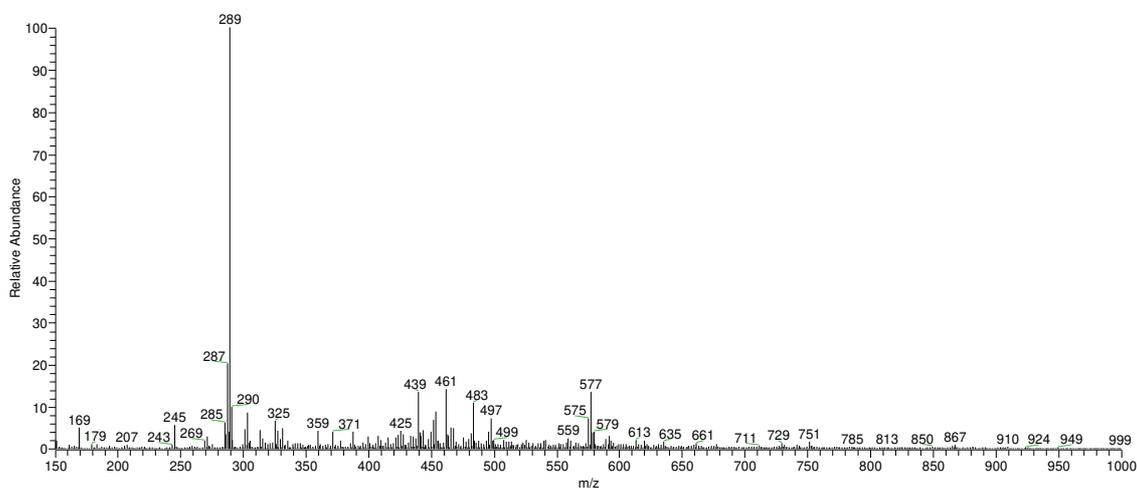
WOLFENDER, J. L., HOSTETTMANN, K. 1995. Applications of liquid chromatography-mass spectrometry to the investigation of medicinal plants. In *Phytochemistry of Medicinal Plants* (pp. 189-215). Springer, Boston, MA.

ZHU, M. Z., CHEN, G. L., WU, J. L., LI, N., LIU, Z. H., & GUO, M. Q. 2018. Recent development in mass spectrometry and its hyphenated techniques for the analysis of medicinal plants. *Phytochemical Analysis*, 29(4), 365-374.

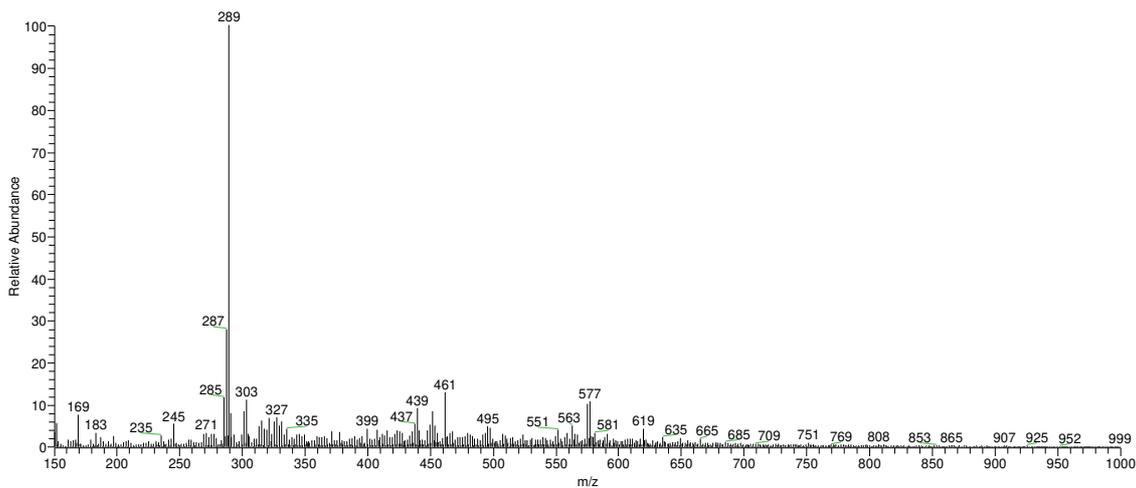
## ANEXOS



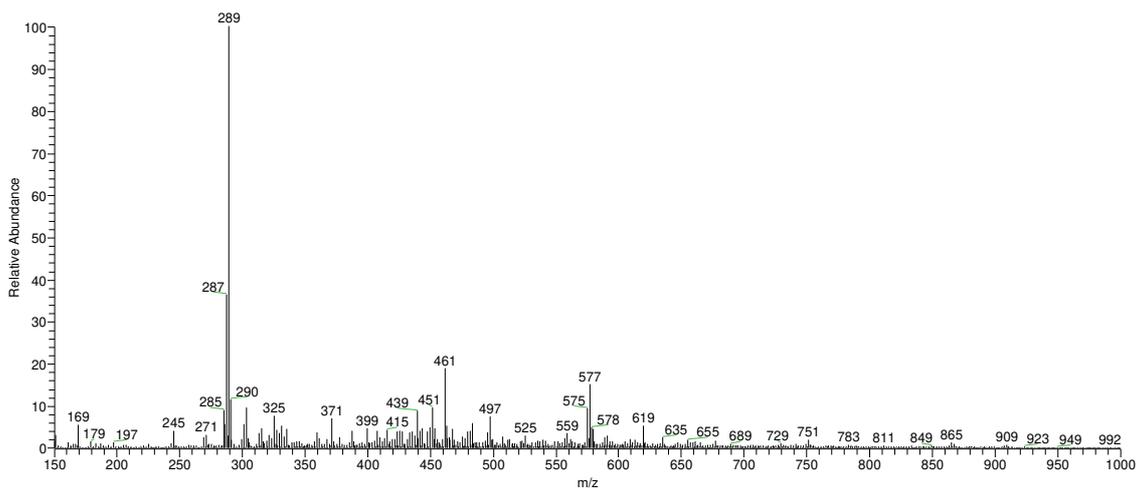
**Figura A 1.** Espectro de APCI-EM (modo negativo) da fração metanólica de *S. impressifolia*.



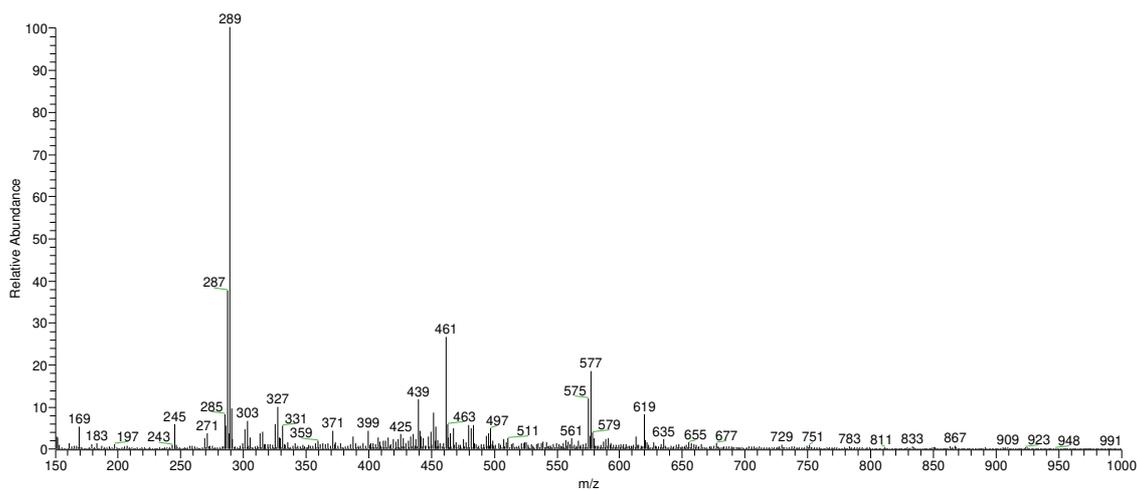
**Figura A 2.** Espectro de APCI-EM (modo negativo) da fração metanólica de *C. ruber*.



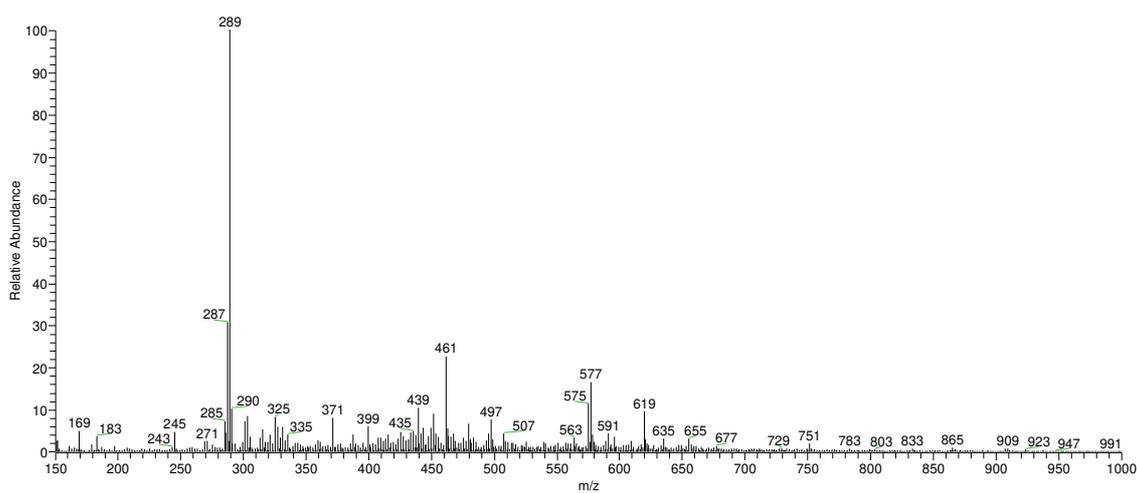
**Figura A 3.** Espectro de APCI-EM (modo negativo) da fração metanólica da amostra comercial A.



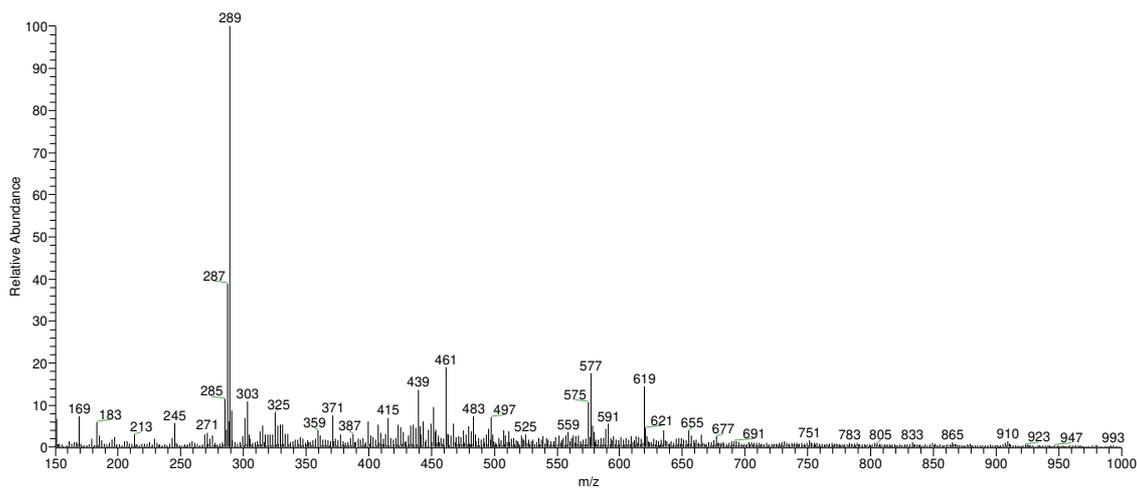
**Figura A 4.** Espectro de APCI-EM (modo negativo) da fração metanólica da amostra comercial B.



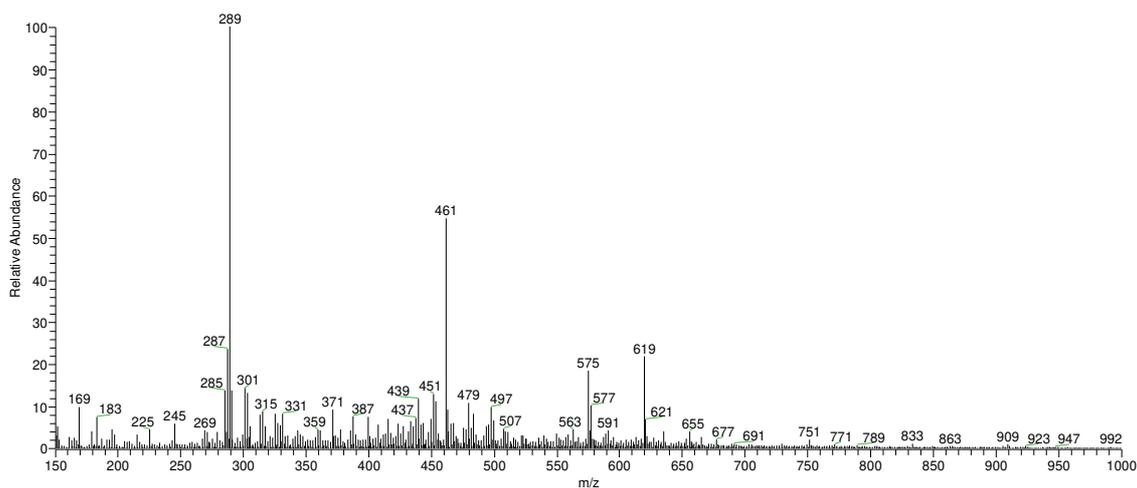
**Figura A 5.** Espectro de APCI-EM (modo negativo) da fração metanólica da amostra comercial C.



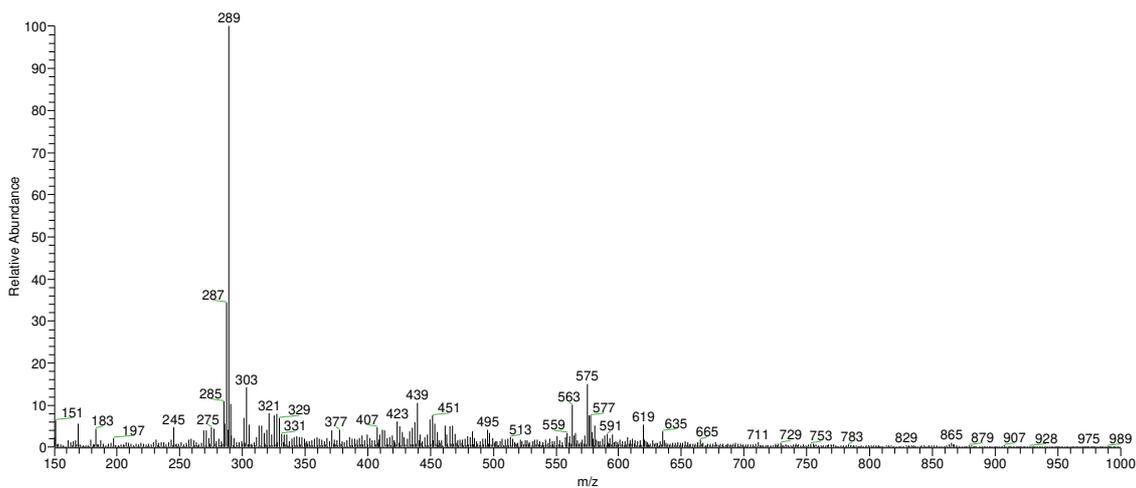
**Figura A 6.** Espectro de APCI-EM (modo negativo) da fração metanólica da amostra comercial D.



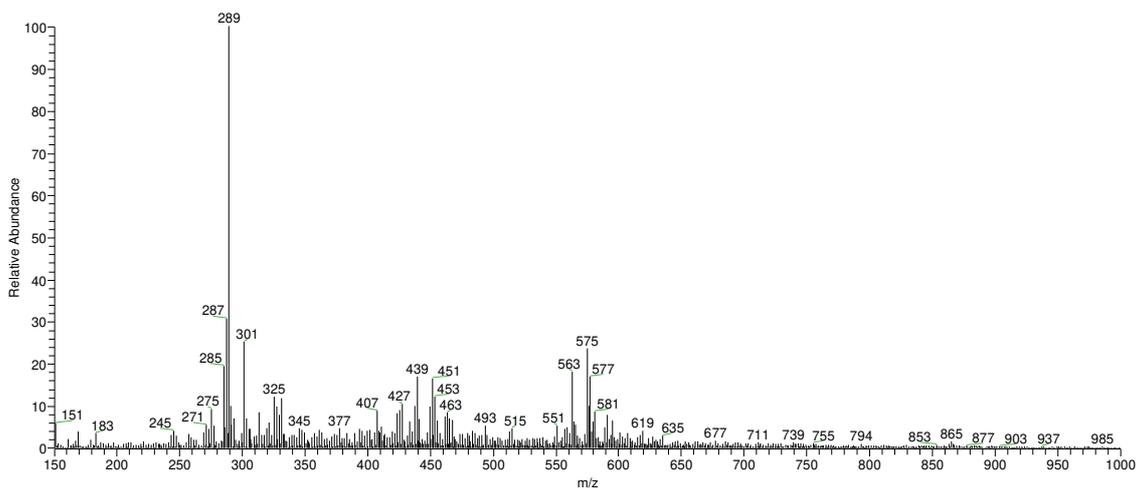
**Figura A 7.** Espectro de APCI-EM (modo negativo) da fração metanólica da amostra comercial E.



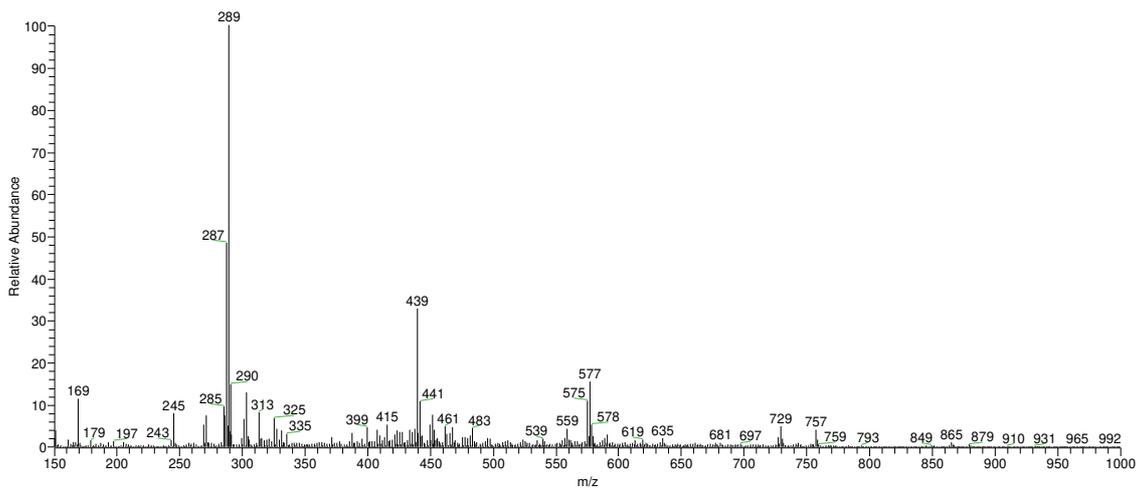
**Figura A 8.** Espectro de APCI-EM (modo negativo) da fração metanólica da amostra comercial F.



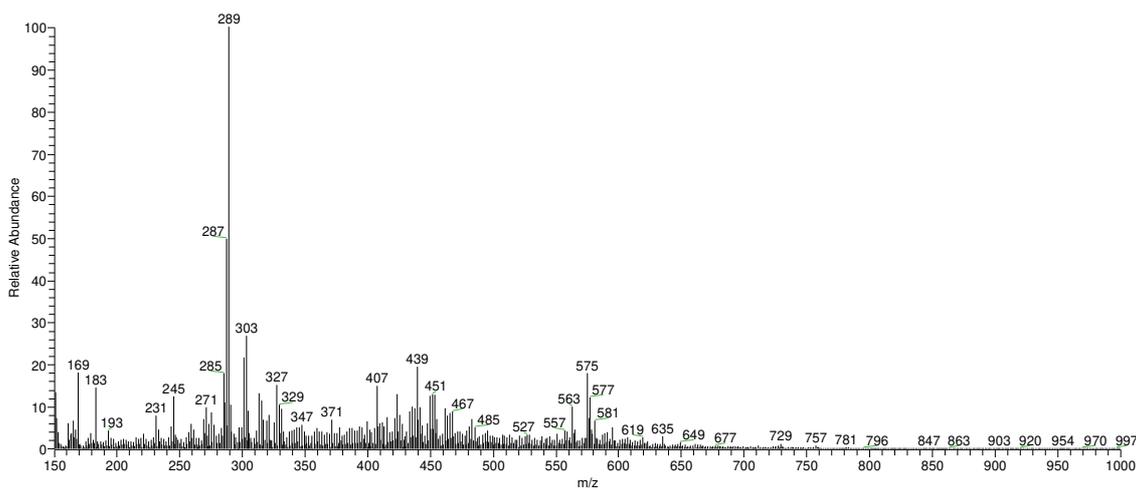
**Figura A 9.** Espectro de APCI-EM (modo negativo) da fração metanólica da amostra comercial G.



**Figura A 10.** Espectro de APCI-EM (modo negativo) da fração metanólica da amostra comercial H.



**Figura A 11.** Espectro de APCI-EM (modo negativo) da fração metanólica da amostra comercial I.



**Figura A 12.** Espectro de APCI-EM (modo negativo) da fração metanólica da amostra comercial J.

**Tabela A 1.** Matriz utilizada na análise de PCA, obtida após a eliminação dos íons com intensidade relativa abaixo de 5%.

	SAL	COM	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
151	0	0	5.62	0	0	0	8	6.92	7.06	12.74	0	11.58
161	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5.93
165	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6.35
169	0	0	7.56	5.81	0	0	8.88	12.26	5.71	6.54	11.34	18.91
183	0	0	0	0	0	0	6.19	7.72	0	0	0	15.14
227	9.76	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
231	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8.04
243	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5.31
245	0	5.73	5.35	0	6.48	0	5.51	5.75	0	0	8.26	12.57
259	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5.89
269	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5.34	7.04
271	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5.08	7.61	9.75
273	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6.02
275	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7.63	0	8.61
277	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5.07
285	7.7	5.99	11.65	9.5	7.11	7.28	11.76	13.53	10.84	17.84	9.36	18.41
286	5.67	0	0	5.92	5.53	0	0	0	5.29	0	7.36	11.82
287	31.4	20.79	26.3	37.82	44.6	30.74	39.21	23.95	33.95	31.22	48.79	51.94
288	0	0	0	0	0	0	5.57	0	0	0	0	0
289	6.42	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
290	0	10.84	0	11.45	0	10.08	9.08	13.13	10.32	0	15.16	10.28
291	0	0	8	0	7.74	0	0	0	0	10.76	0	0
293	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6.22	0	0
297	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5.13
299	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5.08
301	7.98	0	8.38	5.98	5.84	7.16	7.06	14.4	6.73	20.72	6.73	22.2
303	9.19	8.33	11.2	10.03	6.18	8.47	10.97	12.58	13.93	11.19	13.2	27.63
305	9.68	0	0	0	0	0	0	0	5.16	0	0	9.17
313	0	0	0	0	0	0	0	7.72	5.05	7.23	8.47	13.36
315	0	0	6.22	0	0	5.27	5.06	8.83	0	0	0	11.66
317	0	0	0	0	0	0	0	5.19	0	0	0	7.02
319	6.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6.92
321	0	0	6.76	0	0	0	0	0	7.97	6.12	0	8.28
325	0	6.02	6.08	8.34	0	8.26	8.45	8.73	7.52	11.81	7	6.21
327	5.53	0	7	0	8.26	5.84	5.5	6.35	7.87	11.49	0	15.42
329	9.17	0	5.01	0	0	0	5.97	5.79	6.65	7.53	0	10.48
331	7.55	5.07	6.04	5.6	0	5.79	5.28	7.84	5.89	9.76	0	9.46
343	8.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5.21
347	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5.7
365	9.21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
371	18.86	0	0	7.95	5.28	8.32	7.68	9.3	0	0	0	7.01

373	9.16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
377	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5.12
387	0	0	0	0	0	0	0	7.27	0	0	0	0
393	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5.55
395	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5.46
399	0	0	0	0	5.13	6.08	5.99	7.38	0	0	0	6.49
403	24.54	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
407	0	0	0	0	0	0	0	5.21	0	7.02	0	15.1
408	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5.36
409	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6.09
411	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6.39
413	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5.47
415	0	0	0	0	0	0	6.34	6.42	0	0	5.39	7.7
421	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7.6
422	14.76	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
423	0	0	0	0	0	0	5.03	5.45	5.89	6.58	0	13.22
425	0	0	0	0	5.37	0	0	0	0	6.81	0	8.14
427	5.26	0	0	0	0	0	0	0	0	7.36	0	6.02
431	5.14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
433	0	0	0	0	0	0	0	6.04	0	0	0	9.13
435	7.91	0	0	0	0	0	0	5.02	0	0	0	10.26
437	0	0	5.51	0	0	0	0	6.42	5.81	7.64	0	9.93
439	0	14.26	9.18	9.15	14.69	10.3	13.02	10.77	10.09	11.64	33.7	20.15
440	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6.96
441	0	0	0	0	5.25	0	0	5.4	0	5.32	11.28	10.06
443	0	0	0	0	0	5.62	5.93	5.57	0	0	0	5.64
445	23.03	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
446	5.06	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
447	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6.3
449	6.13	0	5.32	5.25	5.04	5.71	5.42	6.75	6.2	7.68	5.33	13
451	0	6.93	8.39	9.99	10.06	9.07	8.87	11.73	7.43	13.24	7.84	13.45
453	0	8.7	5	0	6.64	0	0	10.08	5.33	9.7	0	13.25
455	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5.06	0	7.33
457	5.75	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
461	5.93	13.94	12.93	19.27	30.85	22.53	18.29	51.53	0	5.73	5.11	9.89
463	44.22	0	0	5.4	6.55	5.34	0	8.78	0	5.96	0	8.07
465	6.21	5.17	0	0	0	0	0	5.18	0	5.68	0	8.79
467	0	5.14	0	0	7.18	0	5.28	5.47	0	5.14	0	9.22
473	8.14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
475	19.23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
479	0	0	0	0	7.38	6.65	0	9.9	0	0	0	0
481	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5.55
483	0	11.57	0	5.91	7.87	0	6.87	7.39	0	0	0	7.4
485	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5.2
487	6.02	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

493	16.07	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
495	0	0	0	0	0	0	0	5.25	0	0	0	0
497	0	7.43	0	7.46	6.83	7.64	6.46	9.02	0	0	0	0
499	0	0	0	0	0	0	0	6.16	0	0	0	0
511	5.24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
529	13.43	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
547	12.57	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
563	0	0	0	0	0	0	0	0	9.8	12.9	0	10.39
565	35.01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
566	7.86	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
567	5.15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
575	6.43	7.68	10.22	9.44	14.16	11.32	10.32	16.33	14.62	17.72	11.25	18.38
576	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6.95	0	7.48
577	6.3	14.18	10.67	15.27	25.52	16.49	16.32	8.93	7.32	11.68	16.08	12.63
578	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5.43	0
579	0	0	0	0	5.35	0	0	0	0	0	0	0
581	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8.17	0	6.89
583	10.56	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
591	0	0	0	0	0	0	5.1	0	0	5.51	0	0
593	6.29	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
595	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5.25
619	0	0	0	5.3	10.78	9.58	13.61	20.17	5.24	0	0	0
621	0	0	0	0	0	0	0	6.21	0	0	0	0
729	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5.13	0
762	10.86	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
804	6.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
824	15.49	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
825	10.09	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0