

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

ANDREZZA DA SILVA RAMOS

**FRUTOS NÃO CONVENCIONAIS AMAZÔNICOS:
DESCRIÇÃO QUÍMICA E PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES E ANTIGLICANTES**

Manaus-AM

2019

ANDREZZA DA SILVA RAMOS

**FRUTOS NÃO CONVENCIONAIS AMAZÔNICOS:
DESCRIÇÃO QUÍMICA E PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES E ANTIGLICANTES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Química, área de concentração em Química de Produtos Naturais e Biomoléculas.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Marcos Batista Machado

Departamento de Química

Instituto de Ciências Exatas

UFAM

Manaus-AM

2019

FICHA CATALOGRÁFICA

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

Ramos, Andrezza da Silva
D111f Frutos não convencionais amazônicos: descrição química e propriedades antioxidantes e antiglicantes / Andrezza da Silva Ramos. 2019
183 f.: il. color; 31 cm.

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

1. Myrtaceae. 2. Metabolômica. 3. Alimentos funcionais. 4. Espectroscopia. 5. Eretic2. I. Machado, Marcos Batista II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

DEDICATÓRIA

Às pessoas que amo

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Dr. Marcos Batista Machado, líder do grupo NEQUIMA (Núcleo de Estudos Químicos de Micromoléculas da Amazônia) pelo convite de continuar a fazer pesquisa sob sua orientação, por me acompanhar cientificamente e, por, desde o primeiro momento, acreditar em mim e me orientar com zelo e paciência.

Agradeço ao Departamento de Química e à Central Analítica da UFAM pelo espaço concedido, à CAPES pela bolsa concedida, e, todos os apoios prestados durante a execução desta tese bem como o financiamento parcial do PRO-AMAZÔNIA: BIODIVERSIDADE e SUSTENTABILIDADE/Edital 047/2012/Capes na pessoa do Prof. Dr. Afonso D. Leão; agradeço ao fomento nos ensaios antioxidantes da Pesquisadora Profa. Dra. Rita de C. S. Nunomura e Prof. Dr. Emerson S. Lima.

Agradeço ao Sr. Lucas Mergulhão a disponibilidade, empenho e cuidado na coleta dos frutos na RFAD.

A EMBRAPA-MANAUS, na pessoa do Dr. Francisco Célio Maia Chaves, agradeço a disponibilização dos frutos cultivados por ele e sua equipe.

Agradeço ao Prof. Dr. Valdely F. Kinupp por identificar, cultivar e disponibilizar frutos do seu sítio PANC (Plantas Alimentícias Não Convencionais) para realização de parte de minha pesquisa.

Agradeço à Central Analítica do Laboratório de Produtos Naturais (CALQT/PN/INPA) em nome do seu coordenador Prof. Dr. Sergio Nunomura, agradeço também ao técnico responsável e colega Magno Perea.

Ao Laboratório de Polímeros Nanoestruturados (NANOPOL/UFAM), na figura dos professores Dr. Edgar A. Sanches e Pedro Campelo pela colaboração nos processos tecnológicos e obtenção das microcápsulas, bem como na discussão dos resultados. À grande e preciosa Josiana Mar e a colega Laiane Silva pela colaboração.

Agradeço com carinho a quantos me prestaram valiosa colaboração científica:

- À Profa. Dr^a. Maria Anália D. Souza (Bióloga e Botânica – Laboratório de Botânica Florestal – LABAF/UFAM) pela valiosa colaboração no estudo e identificação das espécies frutíferas de Myrtaceae.

- À querida amiga Prof^a. Dr^a. Jaqueline Bezerra (DQA-IFAM), coordenadora do projeto pos-dos fomenado pelo FIXAM, agradeço o carinho gratuito e parceria.

Agradeço o companheirismo de meus colegas queridos que aguentaram meu mau-humor ao longo desses anos de trabalho: Kidney, Carla, Raimundo Jr., Lídia, Rene, Ayrton, Gisele, Úrsula, Andreza, Leonard, Leonardo, Edinilze, Amanda. E a todos integrantes do grupo de pesquisa NEQUIMA pelos anos de boa convivência.

Quando brotarem as flores

Quando crescerem as matas

Quando colherem os frutos

Digam o gosto pra mim

Ivan Lins

RESUMO

Os frutos pertencentes às espécies dos gêneros *Psidium*, *Eugenia* e *Myrcia* destacam-se por sua importância econômica regional (amazônica) e nacional. Nesse trabalho, o estudo químico dos frutos amazônicos não convencionais de 3 *Psidium* spp., 5 *Myrcia* spp. e da *Eugenia punicifolia* foi realizado empregando uma abordagem metodológica pouco invasiva, centrada em métodos cromatográficos e espectrométricos (RMN, DI-ESI-IT-MS/MS e HPLC-DAD-MS) assistidos por ferramentas quimiométricas. Além da descrição química desses frutos, suas propriedades antioxidantes e antiglicantes foram determinadas. Esse estudo levou à identificação de flavonoides glicosilados (quercitrina, miricitrina e astilbina), triterpenos (ácido 2 α -hidroxiursólico, guavenoico, guajavanoico e madecássico), ácidos fenólicos (derivados de ácidos gálico, elágico e cinâmico), elagitaninos (pedunculagina) e outros ácidos orgânicos (cítrico, málico, chiquímico e quínico), além de ácidos graxos (linoleico, linolênico e palmítico). O teor do ácido L-(+)-ascórbico foi quantificado por HPLC-DAD nesses frutos *in natura*, bem como os teores de quercitrina, ácido elágico e gálico por RMN (ERETIC2). Os extratos metanólicos das polpas de *E. punicifolia*, das sementes de *M. bracteata*, dos frutos inteiros verdes de *M. minutiflora* e das polpas e sementes verdes de *M. fenestrata* apresentaram melhores respostas antiglicantes e antioxidantes. As análises quimiométricas (PCA e HCA) mostraram que a composição química variou qualitativamente e quantitativamente nos diferentes estágios fenológicos desses frutos. A análise por PLS demonstrou que os elagitaninos e os flavonoides glicosilados presentes nesses frutos estão correlacionados com as respostas antiglicantes, assim como os derivados do ácido cinâmico estão fortemente associados às respostas antioxidantes. Assim, o estudo quimiométrico permitiu associar as respostas dos potenciais antioxidantes e antiglicantes aos constituintes químicos presentes nessas matrizes. Dessa forma, os resultados desse estudo químico demonstram a importância nutricional desses frutos amazônicos devido à presença de substâncias bioativas que podem agir como antioxidantes naturais e servir para prevenção de certas doenças relacionadas aos processos oxidativos, como tipos de câncer e diabetes. Esses resultados motivaram o encapsulamento do suco do fruto de *E. punicifolia*, cujas eficiências de encapsulação e retenção são promissoras para um bioproduto amazônico.

Palavras-chave: Myrtaceae, frutos amazônicos, metabolômica, HPLC, RMN, ERETIC2, Espectrometria de Massas, quimiometria, antioxidante, antiglicante, encapsulamento, alimentos funcionais.

ABSTRACT

The fruits from the species of *Psidium*, *Eugenia* and *Myrcia* have demonstrated economic importance for Brasil and mainly for Amazon region. In this work, the chemical study of the unconventional Amazon fruits from three *Psidium* spp., five *Myrcia* spp. and *Eugenia punicifolia* was performed using a non-invasive methodological approach, trend on chromatographic and spectrometric methods (NMR, DI-ESI-IT-MS/MS and HPLC-DAD-MS) assisted by chemometric tools. In addition, the antioxidant and antiglycant properties of these fruits were determined. This study has allowed the identification of *O*-glycosyl flavonoids (quercitrin, myricitrin and astilbin), triterpenes (2 α -hydroxyfluidic acid, guavenoic, guajavanoic, and madecassic), phenolic acids (derived from gallic, ellagic and cinnamic acids), ellagitannins (pedunculagine) and other acids (citric, malic, shiquimic, and quinic), as well as fatty acids (linoleic, linolenic and palmitic). The content of L-(+)-ascorbic acid was quantified by HPLC-DAD in these fresh fruits, as well as the levels of quercitrin, ellagic and gallic acids by NMR (ERETIC2). The methanolic extracts of *E. punicifolia* pulps, *M. bracteata* seeds, green whole fruits of *M. minutiflora* and green pulps and seeds of *M. fenestrata* showed better antiglycant and antioxidant response. The chemometric analyzes (PCA and HCA) have demonstrated that the chemical composition has varied qualitatively and quantitatively in the different phenological stages of these fruits. PLS analysis has shown that the ellagitannins and the glycosylated flavonoids present in these fruits are correlated with the antiglycant responses. In addition, the cinnamic acid derivatives have shown strongly associated with the antioxidant response. Thus, the chemometric study allowed associating the response of the antioxidant and antiglycant potentials to the chemical constituents present in these matrices. Therefore, this chemical study demonstrated the nutritional importance of these amazonian fruits due to the presence of bioactive compounds that can act as natural antioxidants and serve to prevent certain diseases, specially related to cellular oxidative processes such as cancers and diabetes. These results motivated the encapsulation of *E. punicifolia* fruit juice, which efficiencies of encapsulation and retention are promising for amazonian bioproducts.

Keywords: Myrtaceae, Amazonian fruits, metabolomic, HPLC, NMR, ERETIC2, Mass Spectrometry, chemometric, antioxidant, anti-glycation, encapsulation, functional food.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Exemplos de espécies frutíferas do gênero <i>Eugenia</i> com formatos distintos. A – <i>E. uniflora</i> , B – <i>E. puniceifolia</i> , C – <i>E. stipitata</i>	24
Figura 2 Frutos de <i>Psidium acutangulum</i>	26
Figura 3 Espécie frutífera de <i>Eugenia puniceifolia</i>	27
Figura 4 Frutos e folhas de <i>Myrcia fenestrata</i> coletados na Reserva Florestal Adolpho Ducke.....	28
Figura 5 Exemplos de espécies frutíferas de <i>Myrcia</i>	29
Figura 6 Representação da distribuição geométrica por um espaço dos dados amostrais (Figura de autoria própria).....	47
Figura 7 (A) Dados de espectros (região entre 5,5 – 11,0 ppm) originais de RMN de ¹ H (matriz MNN); (B) espectros após o Pré-tratamento aplicando-se Normalização por SNV.....	48
Figura 8 Frutos de <i>Eugenia puniceifolia</i> em diferentes estágios de maturação; as letras representam a coloração: (R) red (vermelho); (O) orange (laranja); (Y) yellow (amarelo); (G) green (verde).	56
Figura 9 Sequência de obtenção, pré-processamento da matriz de dados e processamento para análise multivariada.....	68
Figura 10 Sequência de obtenção, pré-processamento da matriz de dados e processamento para análise multivariada.....	70
Figura 11 Cromatograma obtido por UHPLC-ELSD com a separação dos açúcares (D-frutose, D-glicose e a sacarose) da fração aquosa obtida do extrato etanólico dos frutos inteiros de <i>P. acutangulum</i>	75
Figura 12 Perfil químico obtido por UHPLC–HRMS das frações FPA2 (linha azul) FPAC2 (linha vermelha) dos extratos etanólicos do fruto inteiro de <i>P. acutangulum</i> (PA); TR (tempo de retenção em minutos) e erro em ppm: ácidos guavenoico (TR 36,7: C ₃₀ H ₄₅ O ₆ -H, -5,7), madecassico (TR 39,0: C ₃₀ H ₄₇ O ₆ -H, -5,8 ppm), annurcoico (TR 39,8: C ₃₀ H ₄₅ O ₅ -H, -5,7), ácido asiático (TR 41,6: C ₃₀ H ₄₇ O ₄ -H, -5,5), e 2-α-hidroxiursólico (TR 47,6: C ₃₀ H ₄₇ O ₄ -H, -4,0); ácidos α-linolenico (TR 47,6: C ₁₈ H ₂₉ O ₂ -H, 1,1), linoleico (TR 49,5: C ₁₈ H ₃₁ O ₂ -H, 7,3), palmítico (TR 50,5: C ₁₆ H ₃₁ O ₂ -H, 6,8), oleico (TR 51,4: C ₁₈ H ₃₃ O ₂ -H, 7,8), esteárico (TR 54,2: C ₁₈ H ₃₅ O ₂ -H, 2,3), e lignocérico (TR 60,0: C ₂₄ H ₄₈ O ₂ -H, 0,9).....	76
Figura 13 Esquema geral de fragmentação de esqueleto triterpenico por Retro-Diels-Alder.....	77
Figura 14 Ampliações dos espectros de RMN de ¹ H (CD ₃ OD, 11,74T) do extrato metanólico da polpa dos frutos <i>Eugenia puniceifolia</i> no estágio de coloração amarela (YP).	85
Figura 15 Ampliação da região aromática do espectro de HMBC (¹ H- ¹³ C, CD ₃ OD, 11.74T) da polpa no estágio de maturação de cor amarela (yellow pulp - YP) dos frutos de <i>Eugenia puniceifolia</i>	86
Figura 16 Expansões das Regiões espectrais em ppm: Região 1 (0,2-3,0), Região 2 (3,0-5,5) e Região 3 (6,0-11) dos extratos dos frutos de <i>Eugenia puniceifolia</i> em D ₂ O (A) e CD ₃ OD (B) utilizadas na construção das novas matrizes para análise quimiométrica por PCA e HCA. As letras R (vermelha), O (laranja), Y (amarela), G (verde) representam a coloração por estágio fenológico e as letras P (polpa) e S (semente) representam as partes dos frutos.....	87
Figura 17 Comparação entre os espectros de RMN de ¹ H dos extratos metanólicos de sementes (S) e polpas (P) dos frutos de <i>E. puniceifolia</i> (EP); Região aromática; AE=ácido elágico; Quetr= quercitrina; AG=ácido gálico.	88
Figura 18 Ampliações do RMN de ¹ H (500 MHz, D ₂ O, 1D pre-sat) dos extratos aquosos de frutos de <i>E. puniceifolia</i> em diferentes estágios de maturação (observados com sloped overlap mode (Stacked view: horizontal offset = 0,03;% step vertical = 10); A: região entre 0,5- 4,7 ppm; B: região entre 4,7-11,0 ppm; as letras R (red), O (orange), Y (yellow), G (green) representam os estágios fenológicos; e as letras P (pulp) and S (seed) representam as partes segregadas dos frutos.....	89

Figura 19 Gráfico Bi-plot da análise por PCA dos espectros (inteiros) de RMN de ^1H dos extratos aquosos (D_2O) dos frutos de <i>E. punicifolia</i> (Mean Centered): Grupo I: polpa madura, coloração vermelha (R); Grupo II: polpa quase madura e verde, colorações amarela (Y) e verde (G), respectivamente; Grupo III: sementes, em todas as colorações.	92
Figura 20 Análise Hierárquica de Agrupamentos a partir dos dados de PCA dos dados de RMN de ^1H dos extratos em D_2O . Algoritmo usado: SVD. Método de transformação: derivada de 1ª ordem pelo método Derivative Savitzky-Golay Transform. Matriz de Dados utilizada: Pareto. Variância explicada de $\text{PC1} \times \text{PC2}$: 86%.....	93
Figura 21 A) Gráfico de Scores da PCA do espectro total (δ 0.2-11.0) de RMN ^1H dos extratos metanólicos (CD_3OD) dos frutos de <i>E. punicifolia</i> (centrado na média). Algoritmo usado: SVD. Matriz de dados: MNN. Variância explicada $\text{PC1} \times \text{PC2}$: 92 %; B) HCA da matriz de dados de PCA (<i>Ward's method using Squared Euclidean distance</i>). Cluster I: polpa madura de coloração vermelha (R) e polpa quase madura de coloração laranja (O), Cluster II: Cluster Ila maturação intermediária polpa de coloração amarela (Y) e polpa verde de coloração verde (G), Cluster Iib: todas as sementes.....	95
Figura 22 A) Gráfico Bi-plot da PCA (variância explicada: $\text{PC1} \times \text{PC2}$: 74%) obtida a partir dos espectros de RMN de ^1H dos extratos metanólicos (CD_3OD) dos frutos de <i>Eugenia punicifolia</i> : região espectral entre 6,0-11,0 ppm. Algoritmo usado: SVD. Matriz: MNN. B) HCA dos dados de PCA.....	97
Figura 23 Gráfico <i>biplot</i> de PCA ($\text{PC1} \times \text{PC3}$, variância explicada: 61%) obtido a partir dos espectros de RMN ^1H da Região 3 (δ 6,0 – 11,0) dos extratos metanólicos (CD_3OD) dos frutos de <i>E. punicifolia</i> (centrado na média). Algoritmo usado: SVD. Matriz de Dados utilizada: MNN.	98
Figura 24 Perfis cromatográficos por HPLC-DAD-MS (360 nm) dos extratos metanólicos de frutos de <i>E. punicifolia</i> em diferentes estágios de maturação: G (<i>green</i>); Y (<i>yellow</i>); O (<i>orange</i>); R (<i>red</i>); S (semente); P (polpa). Obtido com condições de gradiente: A) metanol; B) água (ácido fórmico a 2 % v / v). 10-60 % A em 12,5 min; 60-100 A em 5 min; 100 A em 10 min; coluna: Luna 5 μm , C18 (100 Å, 150 x 4.6 μm). Tempo de retenção em minutos: 7: Myricetina 3-ramnosídeo (TR: 12,53 GP m/z 463), 8: 481 (desconhecido) 9: ácido elágico (TR: 13,18, m/z 301), 10: Quercitrina (TR: 13,49, m/z 447), 11 (TR: 13,96 (Semente GS, YS, OS, RP e RS m/z 461 + 791)); 12 (TR: 14,28) (desconhecido), 13 Kaempferol (TR: 14,68, m/z 431 + 477 [$\text{M}-\text{H} + \text{HCOOH}$] $^-$).....	99
Figura 25 Espectros de DI-HRMS e HPLC-DAD-MS (APCI $^-$) de extratos metanólicos de <i>E. punicifolia</i> : ampliação na faixa dos tempos de retenção dos principais flavonoides presentes na polpa em estágio de coloração amarela EPYP.....	101
Figura 26 Espectros de DI-HRMS e HPLC-DAD-MS (APCI $^-$) de extratos metanólicos de <i>E. punicifolia</i> : observação do íon m/z 331 $[\text{M}-\text{H}]^{-1}$ no modo seletivo de íons (SIM) presente na polpa em estágio de coloração amarela EPYP.....	102
Figura 27 Espectros de DI-HRMS e HPLC-DAD-MS (APCI $^-$) de extratos metanólicos da polpa em estágio de coloração amarela EPYP de <i>E. punicifolia</i> : ampliação na faixa dos tempos de retenção dos principais favonoides e confirmação da presença do ácido elágico: íon m/z 301.	103
Figura 28 Cromatograma dos extratos metanólicos dos frutos no estágio verde de <i>Myrcia</i> spp. De baixo para cima, as amostras estão dispostas na sequência por cada espécie: SyUR; MaUR; MUR; BURp; BURs; FUR. Coluna Luna 5 μm C18, (150 mm x 4,6 mm); Fluxo = 1 mL/min. Gradiente: A) H_2O (2 % ácido fórmico); B) MeOH: 0-12,5 min, 10-60 % ; 12,5-17,5 min, 60-100 %; 17,5-27,5 min, 100 %; 27,5-37,5 min, 100-10 %; 37,5-48 min, 10 %.	114
Figura 29 Cromatograma dos extratos metanólicos dos frutos no estágio maduro de <i>Myrcia</i> spp. De baixo para cima, as amostras estão dispostas na sequência por espécie: SyR; MaR; MR; BRp; BRs; FR. Coluna	

Luna 5 μm C18 (150 mm x 4,6 mm); Fluxo = 1mL/min. Gradiente: A) H_2O (2 % ácido fórmico) e B) MeOH, 0-12,5 min, 10-60 % ; 12,5-17,5 min, 60-100 %; 17,5-27,5 min, 100 %; 27,5-37,5 min, 100-10 %; 37,5-48 min, 10%.	115
Figura 30 Mecanismos de RDA envolvendo anel C em esqueleto de flavonol.	117
Figura 31 Proposta de fragmentação do íon de m/z 463 (identificado como miricitrina).	118
Figura 32 (A) Cromatograma do extrato da polpa de <i>M.bracteata</i> madura; comprimento de onda 280 nm e, no modo de Monitoramento Seletivo de Íon (SIM): íon 447 $[\text{M}-\text{H}]^-$, pico em $\text{TR}=13,56$ min, nos modos ESI(-/+); (B) banda de absorção associada à substância flavonoídica: 210-290 nm (banda II) e, 320-380 nm (banda I); (C) fragmentos observados em modo negativo $[\text{M}-\text{H}]^-$: energia de colisão em eV: $\text{MS}^2=10$ e $\text{MS}^3=14$	119
Figura 33 Ampliações do mapa de correlações Heteronuclear $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ (HSQC); sinais da quercetina 3-O- α -L-ramnosídeo presentes no extrato metanólico de <i>Myrcia bracteata</i>	120
Figura 34 Exemplos de mecanismos para a quebra de ligação alfa-carbinílica.	121
Figura 35 Representação de reações do tipo retro-heteroene (X = heteroatomo) com rearranjo de McLaffert.	122
Figura 36 Proposta de fragmentação do íon de m/z 783 (identificado como pedunculagina).	123
Figura 37 Curva de calibração e cromatogramas do padrão de ácido L-ascórbico	130
Figura 38 Espectros de Massas obtidos por Injeção Direta e ionização por ESI(-) no modo <i>full scan</i> (m/z 100-1000) dos extratos metanólicos de frutos de <i>Myrcia</i> spp. A) frutos maduros; B) frutos verdes.	135
Figura 39 (A) PCA (PC1xPC2, com variância explicada de 83%) dos dados dos extratos metanólicos dos frutos verdes e maduros de <i>Myrcia</i> spp analisados por DI-IT-ESI(-); (B) Ampliação dos loadings; (D) carregamento dos <i>loadings</i> representados pelos íons de maior peso em cada quadrante da PCA. Scores = código das amostras; Loadings = íons em m/z	137
Figura 40 Dendrograma obtido por HCA das áreas relativas dos sinais do TIC (100-800 m/z) (DI-ESI(-)-IT-MS) dos frutos de <i>Myrcia</i> spp apresentando <i>linkage</i> pelo método de Ward com distância Euclideana; Índice de similaridade do grupo I = 6; Índice de similaridade para o grupo II = 4.	138
Figura 41 Análise por PLS entre os dados de DI-ESI(-)-MS (m/z) e atividade antioxidante DPPH (IC_{50}).	139
Figura 42 Análise por PLS entre os dados de MS (modo negativo) (m/z) e atividade antioxidante (IC_{50}); B) Valores de Loadings representados pelos íons (m/z) de maior importância: valores do lado positivo: 133 (ácido málico); 179 (unidades glicosídicas); 191 (ácido quínico); 325 (ácido 2-cafeoiloxi-4-hidroxiglutarico); 353 (ácido clorogênico); 371 (ácido 3-(3,4-dihidroxifenil) láctico ácido 2-O-quínico); 383 (dímero de ácido quínico); do lado negativo há os valores: 299 (diosmetina); 301 (ácido elágico); 447 (quercitrina); 633 HHDP-galoil-glicose; 783 (pedunculagina).	140
Figura 43 PLS: Matriz com os dados de EM (modo negativo) (m/z) versus atividade antiglicante (IC_{50}). Valores de Loadings representados pelos íons (m/z) de maior importância: valores do lado positivo: 191 (ácido quínico); 325 (ácido 2-cafeoiloxi-4-hidroxiglutarico); 353 (ácido clorogênico); 383 (dímero de ácido quínico); 463 (miricitrina); 783 (pedunculagina). Do lado negativo: 289 (catequina); 447 (quercitrina); 633 HHDP-galoil-glicose.	141

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Espécies frutíferas de Myrtaceae coletadas para análise do perfil químico	56
Tabela 2 Informações sobre parâmetros de pré-processamento dos dados de RMN de ^1H para obtenção da matriz Pareto e MNN	71
Tabela 3 Perfil químico dos constituintes químicos determinados em frutos de <i>P. acutangulum</i>	78
Tabela 4 Resultados do capacidade antioxidante dos extratos de <i>Psidium</i> spp.	81
Tabela 5 Parâmetros colorimétricos da análise de cor das polpas dos frutos frescos de <i>Eugenia punicifolia</i> usando Sistema CIELAB.	83
Tabela 6 Quantificação pelo metodo ERETIC2 das substâncias selecionadas nas polpas dos frutos de <i>Eugenia punicifolia</i>	94
Tabela 7 Substâncias identificadas nos frutos de <i>Eugenia punicifolia</i> em diferentes estágios fenológicos	104
Tabela 8 Atividades antioxidantes e antiglicante dos extratos metanólicos dos frutos de <i>Eugenia punicifolia</i>	107
Tabela 9 Atividade antiglicante dos extratos metanólicos dos frutos de <i>Eugenia punicifolia</i>	109
Tabela 10 Atividades antioxidante por DPPH $^{\bullet}$, ABTS $^{+\bullet}$, FT, e atividade antiglicante de capsulas de suco de fruta de <i>Eugenia punicifolia</i>	112
Tabela 11 Identificação química das substâncias dos diferentes estágios de maturação dos frutos de <i>Myrcia</i> spp.	124
Tabela 12 Quantidade de ácido ascórbico em frutos de <i>Myrcia</i> spp.	131
Tabela 13 Propriedades antioxidantes, antiglicante e fenólicos totais dos extratos metanólicos dos frutos de <i>Myrcia</i> spp.	133
Tabela 14 Correlação de <i>Pearson</i> dos dados antioxidantes dos extratos metanólicos dos frutos de <i>Myrcia</i> spp.	133
Tabela 15 Estruturas químicas dos metabólitos identificados nos frutos de Myrtaceae	143

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 Substâncias identificadas em diferentes espécies frutíferas da família Myrtaceae	29
Quadro 2 Mecanismo dos ensaios de atividade antioxidante <i>in vitro</i>	34
Quadro 3 Substâncias bioativas presentes em frutos de Myrtaceae	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AGE – *Advanced Glycosylation End products* (produtos finais de glicação avançada)

BPC – *Base Peak Chromatogram* (Cromatograma de Pico Base)

COSY – *Correlated Spectroscopy*

DI – *direct injection*

ERETIC2 – *Electronic Reference to access in vivo Concentrations*

FID - *Free Induction Decay*

HCA - *Hierarchical Cluster Analysis*

HMBC - *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*

HSQC - *Heteronuclear Single Quantum Coherence*

J - Constante de acoplamento

NIPALS - *Non-linear Iterative Partial Least Squares*

NOE - *Nuclear Overhauser Effect*

NOESYGPPR1D - sequência com pressaturação

NS - *Number of Scans*

OBA - *Optimized Bucketing Algorithm*

OSC - *Orthogonal Signal Correction*

PC - *Principal Component*

PCA - *Principal Component Analysis*

PLS- *Analysis of Partial Least Squares*

RDA- Reação via Retro-Diels-Alder

RG - *Receiver Gain*

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

RMN de ^1H - Ressonância Magnética Nuclear de ^1H

SNV - *Standard Normal Variate*

SVD - *Decomposição de Valor Singular*

TIC - *Total Ion Current chromatogram*

TMS - Tetrametilsilano $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$

TMSP - Trimetilsilil-2,2,3,3- d_4 -propionato de sódio

zg - sequência de pulso convencional com pulso de 90°

zgpr - sequência de pulso de 90° e com supressão de um sinal

δ - Deslocamento químico em partes por milhão (ppm)

SUMÁRIO

RESUMO	i
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE QUADROS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	viii
1 INTRODUÇÃO	21
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1 A química dos frutos de espécies da família Myrtaceae e seus potenciais antioxidantes e antiglicantes.....	23
2.1.1 <i>Psidium</i> spp.	25
2.1.2 <i>Eugenia</i> spp.	26
2.1.3 <i>Myrcia</i> spp.....	28
2.2 Avaliação das capacidades antioxidantes de frutos.....	32
2.3 Avaliação da Atividade antiglicante de frutos	36
2.4 Desreplicação de matrizes complexas por métodos cromatográficos e espectrométricos	42
2.4.1 <i>Métodos hifenados</i>	43
2.4.2 <i>Ressonância Magnética Nuclear (RMN)</i>	44
2.4.3 <i>ERETIC2</i>	45
2.5 <i>Quimiometria</i>	46
2.6 Bioprodutos a partir de frutos.....	50
2.6.1 <i>Microencapsulamento</i>	50
3 OBJETIVOS	52
3.1 Objetivo Geral	52
3.2 Objetivos específicos.....	52
4 MATERIAIS E MÉTODOS	53
4.1 Reagentes, padrões e solventes	53
4.2 Localização e coleta dos frutos	54
4.3 Preparo das amostras	54
4.4 Obtenção dos extratos dos frutos de Myrtaceae	56
4.5 Avaliação da Viabilidade Celular	58
4.6 Avaliação do capacidade antioxidante	59

4.6.1	Ensaio de sequestro de radical livre DPPH*	59
4.6.2	Avaliação da capacidade sequestrante do cátion radical ABTS**	59
4.6.3	Determinação de fenólicos totais (FT)	60
4.6.4	Atividade Antioxidante Celular (CAA)	60
4.7	Avaliação da atividade antiglicante	61
4.7.1	Atividade antiglicante por via oxidativa	61
4.7.2	Atividade antiglicante por via não-oxidativa	61
4.8	Análises cromatográficas e espectrométricas	62
4.8.1	Análise por DI-ESI-IT-MS/MS e DI-HRMS	62
4.8.2	Análise cromatográfica por HPLC-DAD-MS/HRMS/ELSD	63
4.9	Análise por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	65
4.9.1	Quantificação por RMN de ¹ H qHNMR (ERETIC2)	65
4.10	Processamento e análise multivariada dos dados obtidos por EM	67
4.11	Processamento e análise multivariada dos dados obtidos por RMN	68
4.12	Encapsulamento do suco dos frutos de <i>E. punicifolia</i>	71
4.12.1	Eficiência de Encapsulação (EE)	72
4.12.2	Eficiência de Retenção (ER)	72
4.13	Análise estatística	73
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	74
5.1	Caracterização química dos frutos de <i>Psidium acutangulum</i>	74
5.1.1	Análise cromatográfica dos constituintes majoritários de <i>Psidium acutangulum</i> por UHPLC-ELSD	74
5.1.2	Identificação dos constituintes minoritários de frutos de <i>Psidium acutangulum</i> por UHPLC-DAD-HRMS	75
5.2	Capacidade antioxidante dos extratos de frutos de <i>Psidium</i> spp.	81
5.3	Diferenciação colorimétrica dos frutos de <i>E. punicifolia</i>	83
5.4	Análise do perfil químico e identificação das substâncias dos frutos de <i>Eugenia punicifolia</i> por RMN, HPLC-DAD-MS e DI-HRMS	84
5.5	Análise quimiométrica dos dados de RMN de ¹ H dos extratos dos frutos de <i>Eugenia punicifolia</i>	90
5.6	Capacidade antioxidante dos extratos de frutos de <i>Eugenia punicifolia</i>	106
5.7	Atividade antiglicante dos extratos e capsulas de <i>E. punicifolia</i>	109
5.8	Atividade antiglicante e antioxidante do suco encapsulado	110

5.9	Caracterização química dos frutos de <i>Myrcia</i> spp. por HPLC-DAD-MS, DI-ESI-IT-MS/MS e RMN	113
5.9.1	Quantificação de ácido ascórbico em frutos de <i>Myrcia</i> spp.....	130
5.10	Capacidade antioxidante e antiglicante dos extratos de frutos de <i>Myrcia</i> spp.	132
5.11	Análise quimiométrica dos dados de DI-ESI(–)MS dos extratos dos frutos de <i>Myrcia</i> spp..	134
5	CONCLUSÃO	150
	REFERÊNCIAS.....	151
	Materia Suplementar	172
	Apêndice	179

1 INTRODUÇÃO

O principal papel de uma dieta saudável é fornecer nutrientes suficientes para atender às necessidades metabólicas, promover a manutenção da saúde e o bem-estar (SUN-WATERHOUSE, 2011). Substâncias bioativas, tais como substâncias fenólicas e carotenoides são os principais responsáveis pelos benefícios à saúde em uma dieta à base de alimentos naturais como frutas (SUN; CHU; WU; LIU, 2002) e vegetais (CHU; SUN; WU; LIU, 2002). A pesquisa envolvendo frutas tem crescido nas últimas décadas devido ao interesse por fontes de alimentos naturais ricos em substâncias com potencial nutracêutico que atuem na redução do risco de doenças cardiovasculares (CICERO; FOGACCI; COLLETTI, 2017; HEMLER; HU, 2019), prevenção de diabetes (QI, L. W.; LIU, E. H.; CHU, C.; PENG, Y. B. *et al.*, 2010) e doenças degenerativas associadas a processos oxidativos, como alguns tipos de câncer e envelhecimento precoce.

A floresta Amazônica ocupa quase metade do território brasileiro, constituindo um bioma com condições climáticas e de solo favoráveis ao desenvolvimento de diversas espécies frutíferas nativas (exóticas a outras regiões) com potencial para a indústria alimentícia, porém ainda pouco explorado (ABADIO FINCO; KAMMERER; CARLE; TSENG *et al.*, 2012; DE SOUZA SCHMIDT GONCALVES; LAJOLO; GENOVESE, 2010). A maioria das frutas não convencionais da Amazônia é, geralmente, obtida da natureza ou cultivada apenas para o mercado local e comercializada na forma *in natura*, levando a um baixo valor agregado (KINUPP; LORENZI, 2014; KUSKOSKI; ASUERO; MORALES; FETT, 2006; SCHRECKINGER; LOTTON; LILA; DE MEJIA, 2010). O estudo da composição química e das propriedades biológicas de frutos ocorrentes em regiões tropicais pode possibilitar o crescimento econômico local e regional devido à valoração desses frutos e a possibilidade do desenvolvimento de protótipos farmacêuticos, cosméticos ou suplementos alimentares (COLOMBO; JOLY, 2010; DE SOUZA SCHMIDT GONCALVES; LAJOLO; GENOVESE, 2010; KHAN; GRIGOR; WINGER; WIN, 2013; LI; ZHANG; XU; ZHOU *et al.*, 2016).

Assim, as frutas podem ser consideradas como alimentos funcionais, pois suas substâncias químicas podem apresentar efeitos fisiológicas e, portanto, promovem benefícios à saúde (DANTAS; MAFALDO; OLIVEIRA; LIMA *et al.*, 2019; FERREIRA ZIELINSKI; AVILA; ITO; NOGUEIRA *et al.*, 2014; VO; NGO, 2019). Portanto, alimento funcional ou nutracêutico pode ser classificado como um ingrediente seguro para o consumo como fibra

alimentar, ácido graxo poliinsaturado, proteína, peptídio, aminoácido, mineral, vitamina, substância antioxidante e fenólico bioativo (ANVISA, 1999).

Existem diversos estudos científicos que comprovam que frutas tropicais não convencionais podem ser consideradas como alimentos funcionais, pois apresentam elevados potenciais antioxidantes e nutricionais (AZEVEDO; RIBEIRO; OLIVEIRA; CORREIA *et al.*, 2019; BORGES; VIEIRA; COPETTI; VALDEMIRO *et al.*, 2011; CANDIDO; SILVA; AGOSTINI-COSTA, 2015; NERI-NUMA; CARVALHO-SILVA; MORALES; MALTA *et al.*, 2013; RAMOS, A. S.; SOUZA, R. O. S.; BOLETI, A. P. D.; BRUGINSKI, E. R. D. *et al.*, 2015). Denomina-se como planta alimentícia não convencional (PANC) aquelas espécies que não são cultivadas em sistemas de produção convencionais, têm distribuição limitada, são restritas a determinadas localidades ou regiões (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA (2010); (KINUPP, 2007).

Dessa forma, a pesquisa nas áreas de Saúde e Nutrição, Ciências, Química de Alimentos e Química vêm demonstrando a importância desses alimentos naturais para a saúde como nutracêuticos, valorizando assim, o consumo desses frutos e de seus bioprodutos, seja como suplementos alimentares ou fármacos, os quais corroboram com o aumento da expectativa de vida da população e a redução com gastos em tratamentos médicos (KESKA; WOJCIAK; STADNIK, 2019; ROBERFROID, 2000; VO; NGO, 2019; WESTON, 2010).

Nesse contexto, destacam-se os frutos de espécies de Myrtaceae ocorrentes na Amazônia, cujas descrições químicas, potenciais antioxidantes e antiglicantes ainda foram pouco explorados.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A química dos frutos de espécies da família Myrtaceae e seus potenciais antioxidantes e antiglicantes

As frutas proporcionam uma alimentação mais saudável, pois são fontes de substâncias antioxidantes naturais como ácidos elágico e cinâmico, vitaminas (A, C e E), derivados de quercetina, quercitrina, isoquercitrina e derivados de cianidina, os quais estão associados à prevenção de diversas doenças por apresentarem potenciais antioxidantes e atividade anti-inflamatória, efeitos anticarcinogênicos e antimutagênicos (GHOSH; MANDAL; CHAKRABORTY; RASUL *et al.*, 2010; HUANG; YIN; CHIU, 2011; PARK; JANG, 2017; QI, L.-W.; LIU, E. H.; CHU, C.; PENG, Y.-B. *et al.*, 2010; RAI; MEHTA; WATAL, 2010), antidiabetes (DENARDIN; HIRSCH; DA ROCHA; VIZZOTTO *et al.*, 2015; FLORES; WU; NEGRIN; KENNELLY, 2015; HUANG; YIN; CHIU, 2011; PARK; JANG, 2017; QI, L.-W.; LIU, E. H.; CHU, C.; PENG, Y.-B. *et al.*, 2010; RAI; MEHTA; WATAL, 2010; RAMOS, A. S.; SOUZA, R. O. S.; BOLETI, A. P. D.; BRUGINSKI, E. R. D. *et al.*, 2015).

No bioma amazônico, frutos de espécies da família Myrtaceae têm se destacado por sua composição química rica em flavonoides e antocianinas/proantocianidinas que podem ser responsáveis por suas atividades antioxidantes e biológicas, tais como o efeito antiproliferativo de células cancerígenas (DEMBITSKY; POOVARODOM; LEONTOWICZ; LEONTOWICZ *et al.*, 2011; GORDON; JUNGFER; DA SILVA; MAIA *et al.*, 2011; MEDINA; HAAS; CHAVES; SALVADOR *et al.*, 2011; SCHAUSS; WU; PRIOR; OU *et al.*, 2006; VALENTE; ALBUQUERQUE; SANCHES-SILVA; COSTA, 2011; ZANATTA; CUEVAS; BOBBIO; WINTERHALTER *et al.*, 2005). A presença de substâncias fenólicas, tais como flavonoides, carotenoides contribuem para os efeitos benéficos desses alimentos (AZEVEDO-MELEIRO; RODRIGUEZ-AMAYA, 2004; CONTRERAS-CALDERON; CALDERON-JAIME; GUERRA-HERNANDEZ; GARCIA-VILLANOVA, 2011; SOONG; BARLOW, 2004). Essas substâncias também são responsáveis por suas potencialidades farmacológicas (FRACASSETTI; COSTA; MOULAY; TOMAS-BARBERAN, 2013), a exemplo, o camu-camu (*Myrciaria dúbia* McVaugh), considerado o fruto brasileiro com a maior quantidade de vitamina C (1 a 3 gramas/100g de fruto fresco) (JUSTI; VISENTAINER; DE SOUZA; MATSUSHITA, 2000), outro exemplos são as espécies de araçá-boi (*Eugenia stipitata*

McVaugh) e araçá (*Psidium cattleianum* Sabine) ricos em carotenoides e em (-)-epicatequina, respectivamente (ASTRID GARZON; NARVAEZ-CUENCA; KOPEC; BARRY *et al.*, 2012; MEDINA; HAAS; CHAVES; SALVADOR *et al.*, 2011), e o araçá-da-pera (*Psidium acutangulum*) rico em fenólicos e vitamina C (RAMOS, A. S.; SOUZA, R. O. S.; BOLETI, A. P. D.; BRUGINSKI, E. R. D. *et al.*, 2015).

Dentre as substâncias fenólicas destacam-se os flavonoides (que englobam antocianinas e flavonóis), os ácidos fenólicos (derivados de ácidos cinâmico e benzóico), os estilbenos (resveratrol) e uma larga variedade de taninos (DANTAS; MAFALDO; OLIVEIRA; LIMA *et al.*, 2019). As antocianinas são um grupo de pigmentos naturais responsáveis pela cor vermelho-azulada de frutas. Antocianinas são abundantes nos vegetais (WANG; LI; BI, 2018).

As espécies de Myrtaceae mais conhecidas no Brasil são as goiabeiras (*Psidium* spp.), a jabuticabeira (*Myrciaria cauliflora*) e a pitangueira (*Eugenia uniflora*). Os frutos de Myrtaceae se apresentam em forma capsular com um único caroço, ou assemelham-se a pequenas azeitonas arredondadas, ou ainda, na forma baciforme com várias sementes, como a goiaba (CALIARI; SOUZA; MAZINE, 2016; OLIVEIRA; BACCARO; BRAGA-NETO; MAGNUSSON, 2008; RIBEIRO; SILVA, 1999; SOBRAL; DE SOUZA, 2015).



Figura 1 Exemplos de espécies frutíferas do gênero *Eugenia* com formatos distintos.
A – *E. uniflora*, B – *E. punicifolia*, C – *E. stipitata*

O cultivo e a comercialização dessas espécies amazônicas possibilitaria o crescimento econômico local e regional, assim como, também viabilizaria o desenvolvimento de produtos farmacêuticos, cosméticos e suplementos alimentares (COLOMBO; JOLY, 2010; DE SOUZA SCHMIDT GONCALVES; LAJOLO; GENOVESE, 2010; LI; ZHANG; XU; ZHOU *et al.*, 2016).

Portanto, a família Myrtaceae possui importante papel socioeconômico no cenário nacional (FERRENTINO; ASADUZZAMAN; SCAMPICCHIO, 2018; LIM; THAM; LIM; HENG *et al.*, 2018; PANIAGUA-ZAMBRANA; BUSSMANN; MACIA, 2017). Considerando o grande número de espécies vegetais pertencentes à família Myrtaceae ocorrentes na Amazônia ainda há muito a ser estudado, principalmente em relação aos constituintes químicos de seus frutos. Por isso, a valoração química dessas matrizes poderá agregar valor econômico e nutracêutico às espécies frutíferas da região Amazônica (ANDREW D. JONES; EJETA, 2016; DJIDEL; KHENNOUF; BAGHIANI; HARZALLAH *et al.*, 2010; SONIA S. ANAND; CORINNA HAWKES; RUSSELL J. DE SOUZA; ANDREW MENTE *et al.*, 2015). Dentre os diversos frutos amazônicos pertencentes à família Myrtaceae, destacam-se neste trabalho as espécies dos gêneros *Psidium*, *Eugenia* e *Myrcia*, ocorrentes em ecossistema de terra firme (bioma Amazônia), cujos frutos podem ser consumidos *in natura*, pois apresentam potencial nutracêutico, ou em forma industrializada por apresentarem potencial tecnológico para o desenvolvimento de doces, geleias, bebidas fermentadas, sorvetes e yogurtes (KINUPP; LORENZI, 2014; MAEDA, 1999).

2.1.1 *Psidium* spp.

Psidium acutangulum (araçá-pera), *P. cattleyanum* (araçá) e *P. friedrichsthalianum* (araçá-da-costa-rica) são espécies cujos frutos são conhecidos por seu potencial nutricional e antioxidante, devido ao seu elevado teor de ácido ascórbico e substâncias com atividade antioxidante (GORDON; JUNGFER; DA SILVA; MAIA *et al.*, 2011; MEDINA; HAAS; CHAVES; SALVADOR *et al.*, 2011; RAMOS, A. S.; SOUZA, R. O. S.; BOLETI, A. P. D.; BRUGINSKI, E. R. D. *et al.*, 2015). Essas espécies, em especial, são distribuídas por toda a Região Amazônica, nas Guianas e na Venezuela. Suas árvores são de pequeno porte medindo de 4 e 6 m de altura; os frutos apresentam forma esférica, geralmente com 1 a 3 cm ou 3 a 8 cm de diâmetro, com inúmeras sementes de formas e tamanhos variados dependendo da espécie. A polpa é saborosa e pode ser consumida *in natura* e utilizada no preparo de geleias, sucos e sorvete (KINUPP; LORENZI, 2014).



Figura 2 Frutos de *Psidium acutangulum*

2.1.2 *Eugenia* spp.

Os frutos do gênero *Eugenia* variam muito em tamanho, cor, sabor e forma. As árvores chegam a medir entre 3 a 15 m de altura, ocorrem em floresta de "terra firme" e apresentam flores pequenas, brancas a amareladas. O gênero *Eugenia* é o maior gênero da família Myrtaceae na América tropical, ocorre desde o México e Caribe até o norte da Argentina, estando presente em todas as regiões do Brasil onde se estima a existência de cerca de 350 espécies (BUNGER; EINSEHLOR; FIGUEIREDO; STEHMANN, 2015; GOVAERTS; SOBRAL; BARRIE; HOLST *et al.*, 2008; HERNANDEZ; MARTINEZ; FERNANDEZ-TRUJILLO, 2007; LANDRUM; KAWASAKI, 1997). Suas folhas têm sido utilizadas na medicina tradicional no tratamento do *diabetes mellitus* devido aos seus efeitos hipoglicêmicos (SALES; CARMONA; DE AZEVEDO; TALEB-CONTINI *et al.*, 2014).

E. puniceifolia (Kunth) DC., também chamada de pedra-ume caá, é uma espécie arbustiva frutífera amazônica. Seus frutos têm a aparência de uma pequena cereja suculenta com polpa doce e cores variadas ao longo dos estágios fenológicos (CASCAES; GUILHON; ANDRADE; ZOGHBI *et al.*, 2015). Os seus principais constituintes químicos são o ácido gálico, miricetina 3-ramnosídeo, quercetina-3-O-galactosídeo, quercetina-3-O-xilosídeo, quercetina-3-O-ramnosídeo e kaempferol-3-O-ramnosídeo (Quadro 1). Estas substâncias têm um elevado capacidade antioxidante e estão associadas a efeitos terapêuticos hipoglicemiantes e de inibição enzimática (α -amilase, α -glicosidase e xantina oxidase), ou seja, ajudam a prevenir doenças como a síndrome metabólica *diabetes mellitus* tipo 2 (LOPES GALENO; CARVALHO; DE ARAUJO BOLETI; LIMA *et al.*, 2014).



Figura 3 Espécie frutífera de *Eugenia punicifolia*

Frutos de *Eugenia dysenterica* DC. (cagaita) são ricos em polifenólicos com potencial para reverter ou prevenir a obesidade através da atenuação da gliconeogênese, da inflamação hepática (DONADO-PESTANA; DOS SANTOS-DONADO; DAZA; BELCHIOR *et al.*, 2018) e o *diabetes mellitus* tipo 2 (BURTON-FREEMAN; SANDHU; EDIRISINGHE, 2016; CARDOSO; MARTINO; MOREIRA; RIBEIRO *et al.*, 2011; DE SOUZA SCHMIDT GONCALVES; LAJOLO; GENOVESE, 2010; GUEDES; RUFINI; MARQUES; MELO *et al.*, 2017). Folhas e frutos de cagaita já são consumidos na medicina popular para o tratamento de diarreia, diabetes e icterícia (LIMA; SILVA; SILVA; ROCHA *et al.*, 2011).

Já, os frutos de *E. stipitata* Mc.Vaugh (araçá-boi) apresentam a forma de baga carnuda com um epicarpo fino, amarelo, e sabor cítrico (HERNANDEZ; MARTINEZ; FERNANDEZ-TRUJILLO, 2007). Estudos químicos com frutos de araçá-boi revelam a presença de substâncias fenólicas (derivados de ácido elágico), flavonoídicas (quercetina e kaempferol), e vitaminas (A, C e E), as quais são responsáveis pelas atividades anti-inflamatória, antioxidante e hipocolesterolêmica (DE SOUZA SCHMIDT GONCALVES; LAJOLO; GENOVESE, 2010; PERALTA-BOHORQUEZ; PARADA; QUIJANO; PINO, 2010).

2.1.3 *Myrcia* spp.

A composição química dos frutos de *Myrcia* spp. apresentam constituintes fenólicos como taninos, ácidos cafeico, gálico e quínico, flavonoides derivados de miricetina, e quercetina (GULDBRANDSEN; DE MIERI; GUPTA; SEISER *et al.*, 2015; SALDANHA; VILEGAS; DOKKEDAL, 2013).

Algumas espécies de *Myrcia* são conhecidas como “pedra hume caá”, “pedra-hume-caá”, “pedra-ume-caá” ou “insulina vegetal”, as quais são usadas na medicina popular tradicional para o tratamento de diarreia, enterite, úlceras e *diabetes mellitus* (BATISTA; COLOMBO; DE PASCOLI; TELES *et al.*, 2011; CASCAES; GUILHON; ANDRADE; ZOGHBI *et al.*, 2015). Este grupo de plantas inclui *Myrcia puniceifolia* (Kunth) DC., *M. speciosa* Mc Vaugh, *M. amazonica* DC., *M. citrifolia* (Aubl.) Urb., *M. guianensis* (Aubl.) DC., *M. multiflora* (Lam.) DC., *M. salicifolia* DC., *M. sylvatica* (G. Mey) DC., *M. uniflora* DC (FIGUEIREDO-GONZALEZ; GROSSO; VALENTAO; ANDRADE, 2016; SALDANHA; VILEGAS; DOKKEDAL, 2013).

Há muitos outros exemplos de espécies frutíferas de *Myrcia*, cujas composições químicas, potenciais antioxidantes e nutracêuticos ainda não foram descritos. Neste trabalho, destacam-se *M. fenestrata*, *M. sylvatica*, *M. minutiflora*, *M. bracteata* e *M. magnoliifolia*, todas ocorrentes na Reserva Florestal Adolpho Ducke (RFAD) em Manaus, Amazonas.



Figura 4 Frutos e folhas de *Myrcia fenestrata* coletados na Reserva Florestal Adolpho Ducke

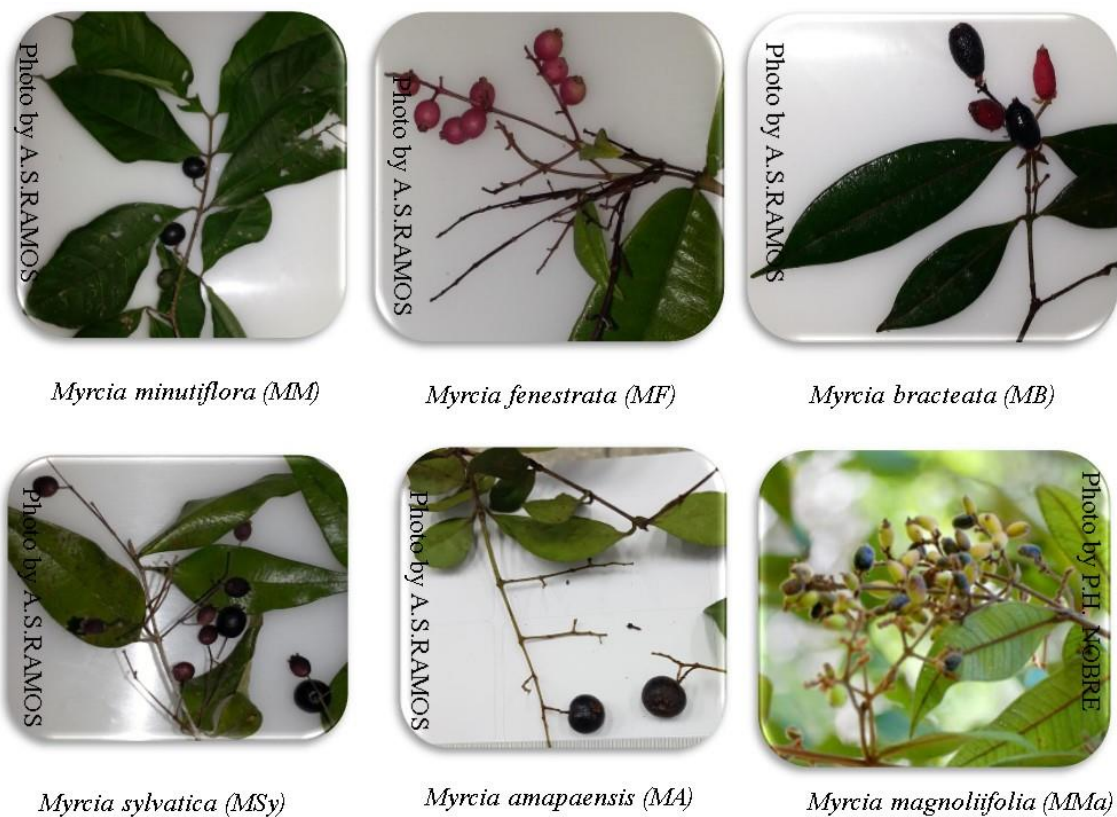
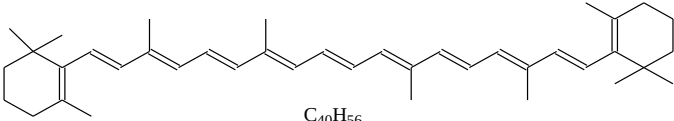
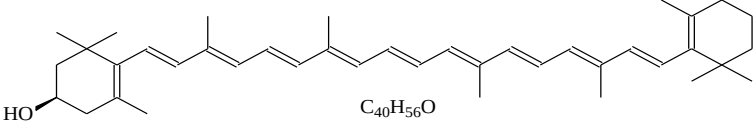
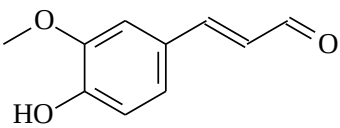
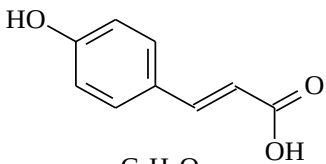
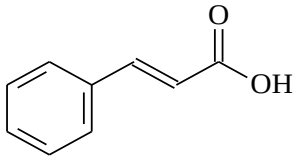
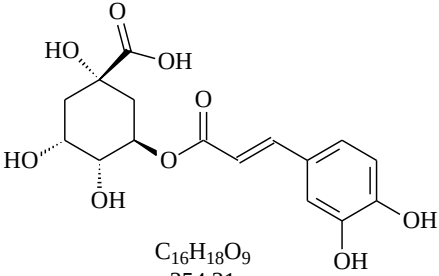
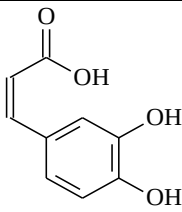
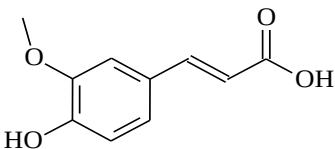
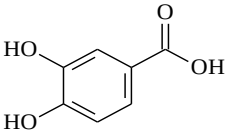
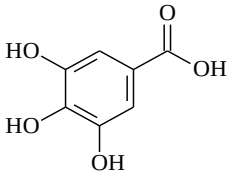
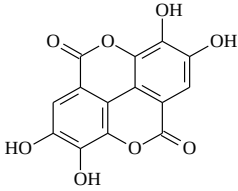
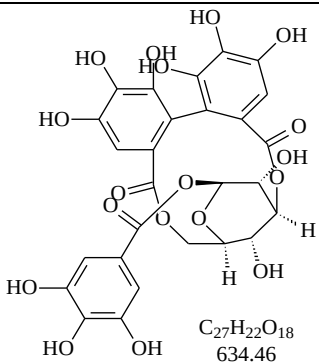
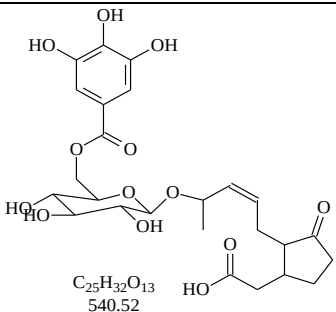
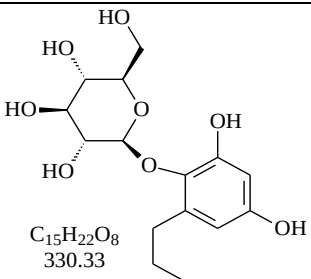
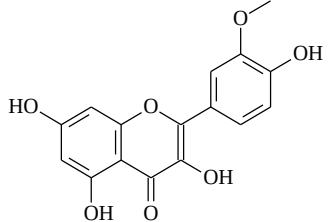
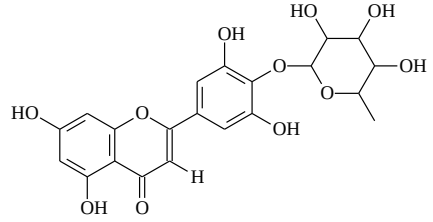
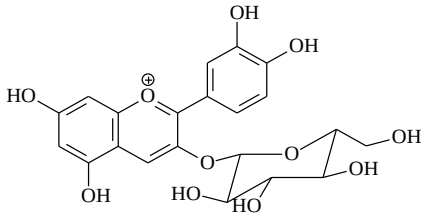
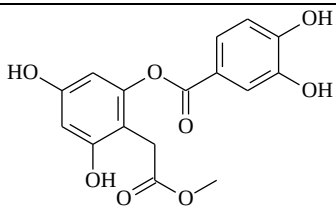


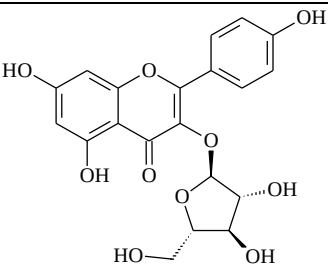
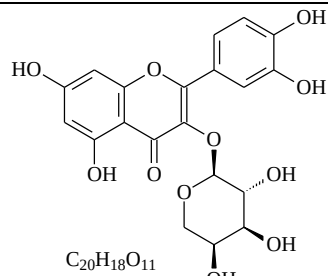
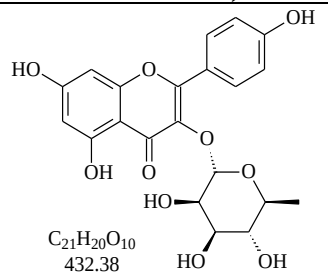
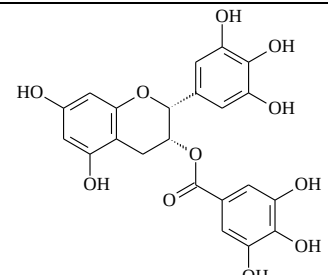
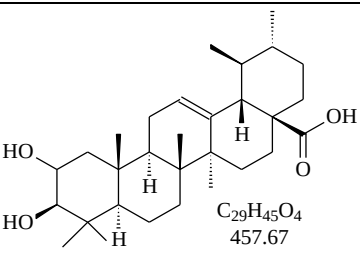
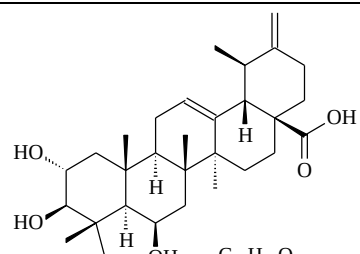
Figura 5 Exemplos de espécies frutíferas de *Myrcia*.

Quadro 1 Substâncias identificadas em diferentes espécies frutíferas da família Myrtaceae

Carotenoides	
 $C_{40}H_{56}$ 536.88 β-caroteno (BIEGELMEYER; MELLO ANDRADE; ABOY; APEL <i>et al.</i>, 2011)	
 $C_{40}H_{56}O$ 552.88 β-criptoxantina (BIEGELMEYER; MELLO ANDRADE; ABOY; APEL <i>et al.</i>, 2011)	

Derivados de ácidos fenilpropanoicos (C ₆ -C ₃)		
 $C_{10}H_{10}O_3$ 178.19 Coniferaldeído (SERAGLIO; SCHULZ; NEHRING; DELLA BETTA <i>et al.</i>, 2018)	 $C_9H_8O_3$ 164.16 Ácido <i>p</i>-coumárico (NICACIO; ROTTA; BOEING; BARIZAO <i>et al.</i>, 2017)	 $C_9H_8O_2$ 148.16 Ácido cinâmico (FLORES; DASTMALCHI; WU; WHALEN <i>et al.</i>, 2013)
 $C_{16}H_{18}O_9$ 354.31 Ácido clorogênico (NICACIO; ROTTA; BOEING; BARIZAO <i>et al.</i>, 2017)	 $C_9H_8O_4$ 180.16 Ácido cafeico (CUADRADO-SILVA; POZO-BAYON; OSORIO, 2017)	 $C_{10}H_{10}O_4$ 194.19 Ácido ferúlico (NICACIO; ROTTA; BOEING; BARIZAO <i>et al.</i>, 2017)
Derivados de ácidos benzoicos		
 $C_7H_6O_4$ 154.12 Ácido protocatecuico (CUADRADO-SILVA; POZO-BAYON; OSORIO, 2017)	 $C_7H_6O_5$ 170.12 Ácido gálico (NERI-NUMA; CARVALHO-SILVA; MORALES; MALTA <i>et al.</i>, 2013)	 $C_{14}H_6O_8$ 302.20 Ácido elágico (NICACIO; ROTTA; BOEING; BARIZAO <i>et al.</i>, 2017)

 $C_{27}H_{22}O_{18}$ 634.46 Corilagina (TRINH; STAERK; JAGER, 2016)	 $C_{25}H_{32}O_{13}$ 540.52 5-(5-carboximetil-2-oxo-ciclopentil)-3-Z-2-pentenol (OMAR; LI; YUAN; SEERAM, 2012)	 $C_{15}H_{22}O_8$ 330.33 5-propilresorcinol 4-O-β-D-glucopiranosídeo (WUBSHET; BRIGHENTE; MOADDEL; STAERK, 2015)
Diferentes classes de flavonoides		
 $C_{16}H_{12}O_7$ 316.27 Isoramnetina (SON; KWON; KIM; CHANG <i>et al.</i>, 1998)	 $C_{21}H_{20}O_{11}$ 448.38 tricetina-4'-O-α-L-raminopiranosídeo (DAMETTO; AGUSTONI; MOREIRA; PLAZA <i>et al.</i>, 2017)	
 $C_{21}H_{21}O_{11}$ 449.39 Cianidina-3-O-glicosídeo (ZHAO; SHI; PETROYA; YUE <i>et al.</i>, 2019)	 $C_{16}H_{14}O_8$ 334.28 Jaboticabina (ZHAO; SHI; PETROYA; YUE <i>et al.</i>, 2019)	

Diferentes classes de flavonoides	
 $C_{20}H_{18}O_{10}$ 418.36 Juglanina (SA; DE PAULA; DOS SANTOS; OLIVEIRA <i>et al.</i>, 2017)	 $C_{20}H_{18}O_{11}$ 434.36 Guaijaverina (YOSHIKAWA; SHIMADA; NISHIDA; LI <i>et al.</i>, 1998)
 $C_{21}H_{20}O_{10}$ 432.38 Kaempferol 3-O-α-ramnosídeo (DE SOUZA SCHMIDT GONCALVES; LAJOLO; GENOVESE, 2010)	 $C_{22}H_{18}O_{11}$ 458.38 Epigallocatequina galato (WUBSHET; MORESCO; TAHTAH; BRIGHENTE <i>et al.</i>, 2015)
Triterpenos	
 $C_{29}H_{45}O_4$ 457.67 Ácido 2-hidroxiursólico (RAMOS, A. S.; SOUZA, R. O. S.; BOLETI, A. P. D.; BRUGINSKI, E. R. D. <i>et al.</i>, 2015)	 $C_{30}H_{46}O_6$ 502.69 Ácido guavenoico (BEGUM; HASSAN; SIDDIQUI; SHAHEEN <i>et al.</i>, 2002)

2.2 Avaliação das capacidades antioxidantes de frutos

Os antioxidantes podem ser classificados em primários, sinergistas, removedores de oxigênio, biológicos, agentes quelantes e antioxidantes mistos (APAK; OZYUREK; GUCLU;

CAPANOGLU, 2016; ARUOMA, 1998). O ácido ascórbico, seus isômeros e derivados são os melhores exemplos do grupo de removedores de oxigênio porque atuam capturando o oxigênio presente no meio, através de reações químicas. O ácido ascórbico pode atuar também como sinergista na regeneração de antioxidantes primários (TAKEBAYASHI; TAI; GOHDA; YAMAMOTO, 2006; THAIPONG; BOONPRAKOB; CROSBY; CISNEROS-ZEVALLOS *et al.*, 2006). Exemplos de antioxidantes primários são as substâncias fenólicas que promovem a remoção ou inativação dos radicais livres formados durante a iniciação ou propagação da reação radicalar, através da doação de átomos de hidrogênio a estas moléculas, interrompendo a reação em cadeia (APAK; OZYUREK; GUCLU; CAPANOGLU, 2016; BIANCHI; ANTUNES, 1999).

Substâncias com potenciais antioxidantes têm despertado grande interesse devido principalmente às descobertas da ação sobre os radicais livres no organismo como a capacidade de retardar o envelhecimento celular precoce (GARRIDO; CRUCES; CEPRIAN; VARA *et al.*, 2019). Além dos antioxidantes de natureza endógena, produzidos em nosso corpo, o organismo utiliza aqueles provenientes da dieta como o α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno (pro-vitamina A), ácido ascórbico (vitamina C) e substâncias fenólicas, tais como os flavonoides (MARZOUK MOHAMED; MOHARRAM FATMA; MOHAMED MONA; GAMAL-ELDEEN AMIRA *et al.*, 2007; OU; HUANG; HAMPSCH-WOODILL; FLANAGAN *et al.*, 2002; SUN; CHU; WU; LIU, 2002).

Determinar as capacidades antioxidantes e quantificar o teor de fenólicos totais em alimentos naturais como frutas tem se mostrado importante para agregar valor nutricional a essas matrizes, pois a eficiência desses alimentos no controle de doenças relacionadas ao estresse oxidativo celular proporcionam benefícios à saúde (FU; XU; XU; GAN *et al.*, 2011; GARRIDO; CRUCES; CEPRIAN; VARA *et al.*, 2019; SINGH; KAUR; KISHORE; GUPTA, 2013).

A atividade antioxidante pode ser monitorada por alguns tipos de ensaios com diferentes mecanismos, e dependendo das reações químicas envolvidas, esses ensaios antioxidantes podem ser classificados como: transferência de átomos de hidrogênio (HAT), e, transferência de elétrons (ET) para espécies reativas, ou a combinação entre eles (APAK; OZYUREK; GUCLU; CAPANOGLU, 2016). A maioria dos ensaios baseados em HAT aplica um esquema de reação competitivo, no qual o antioxidante e o substrato competem por radicais peroxilas. Exemplos de ensaios que funcionam como HAT são o ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*) e o TRAP (*Total Reactive Antioxidant Potential*) (AKBIYIK; SONMEZOGLU; GUCLU; TOR *et*

al., 2012; HUANG; OU; PRIOR, 2005). Os ensaios baseados em ET medem a capacidade de um antioxidante na redução de um oxidante, que muda de cor quando reduzido. O grau de mudança de cor está correlacionado com as concentrações de antioxidantes da amostra. Exemplos de ensaios que funcionam com ET são os de capacidade antioxidante de equivalente de Trolox (TEAC), o poder antioxidante de redução do ferro (FRAP), "potencial de antioxidante total" usando um complexo de Cu (II) como um oxidante e DPPH (AKBIYIK; SONMEZOGLU; GUCLU; TOR *et al.*, 2012; HUANG; OU; PRIOR, 2005).

O DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) é um radical livre estabilizado em virtude da deslocalização do par de elétrons livres por toda molécula, o que gera coloração violeta caracterizada por uma banda de absorção a 515 nm. Quando a solução de DPPH é misturada com uma substância que apresenta a capacidade sequestrante, ocorre uma reação de redução e a solução apresenta cor amarela. Os resultados do ensaio são expressos em concentração inibitória a 50% (CI₅₀), que é definida como o valor do substrato que inibe em 50% o radical DPPH. O cálculo da CI₅₀ é realizado a partir da equação da reta obtida pela curva padrão de cada amostra (MOLYNEUX, 2004). O Quadro 2 abaixo resume os principais ensaios antioxidantes e seus mecanismos.

Quadro 2 Mecanismo dos ensaios de atividade antioxidante *in vitro*

Mecanismo de Transferência de elétrons	
$AH + nDPPH^{\bullet} \rightarrow A^{\bullet} + DPPH-H$	DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)
$M(n) + e^{-} (de\ AH) \leftrightarrow AH^{n+} + M^{(n-1)}$	CUPRAC (<i>cupric reducing antioxidant capacity</i>) Capacidade de redução de cobre (II)) FRAP (<i>ferric ion reducing antioxidant parameter</i>) TEAC (<i>Trolox equivalent antioxidant capacity</i>)
Mecanismo Tranferência de hidrogênio	
$ROO^{\bullet} + AH \leftrightarrow ROOH + A^{\bullet}$	TRAP (<i>total radical trapping antioxidant parameter</i>) ORAC (<i>oxygen radical absorbance capacity</i>)
$ROO^{\bullet} + LH \leftrightarrow ROOH + L^{\bullet}$	Inibição da oxidação do ácido linoleico e inibição da oxidação de LDL (<i>Low Density Lipoproteins</i>)

O método de captura de radicais ABTS (ácido 2,2-azinobis(3-etilbenztiazolina-6-sulfônico) foi desenvolvido por Miller e colaboradores em (1993) e foi então modificado por Re e colaboradores (1999). Inicialmente, a modificação é baseada na ativação da metamioglobina com peróxido de hidrogênio na presença de $ABTS^{\bullet+}$ para produzir um cátion radical. Este método, é gerado um cromóforo $ABTS^{\bullet+}$ azul/verde por meio da reação de ABTS e persulfato de potássio, sua redução na presença de antioxidantes é medida em espectrofotômetro a 734 nm. Esse método modificado permite agora utilizar qualquer solução que gere uma forma oxidada carreadora de oxigênio na presença do íon radical podendo ser melhor empregado. Esse ensaio de descoloração mede a capacidade antioxidante total de substâncias lipofílicas e hidrofílicas. O efeito da concentração de antioxidantes e a duração da inibição da absorção de cátions radicais são levados em conta quando a atividade antioxidante é determinada em função de Trolox, um padrão hidrossolúvel análogo a vitamina E (controle positivo). Essa atividade é expressa em termos da capacidade antioxidante equivalente ao Trolox por grama de amostra.

Um estudo com frutos verdes e maduros, de jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*), guabiju (*Myrcianthes pungens*) e jabolão (*Syzygium cumini*) revelou que esses frutos apresentam capacidade antioxidante elevada [2.569,0 a 5.066,3 mg EAA/100g (Equivalente de Ácido Ascórbico) no ensaio de DPPH; 13.777,5 a 26.667,4 $\mu\text{mol Fe}^{+2}$ /100 g no ensaio do FRAP; e 957,7 a 2.061,3 mg EAG/100 g no ensaio para Fenólicos Totais] (SERAGLIO; SCHULZ; NEHRING; DELLA BETTA *et al.*, 2018). Assim como os frutos de pitanga roxa (*Eugenia uniflora*) que apresentam alto teor de fenólicos totais, sendo 816,50 e 799,80 mg EAG/100g, respectivamente (DENARDIN; HIRSCH; DA ROCHA; VIZZOTTO *et al.*, 2015).

O extrato etanólico dos frutos do araçá-boi (*Eugenia stipitata*) apresentam $184,05 \pm 8,25$ mEAG/100g de polifenólicos e atividade antioxidante frente ao DPPH com CI_{50} de $0,69 \pm 0,23$ $\mu\text{g mL}^{-1}$ e ORAC, 371,98 $\mu\text{mol TE}/100$ g (NERI-NUMA; CARVALHO-SILVA; MORALES; MALTA *et al.*, 2013).

Há relatos de comprovação de capacidade antioxidante pelo ensaio de Atividade Antioxidante em Célula (CAA) de diversos frutos, como os nativos da Austrália, dentre eles os muntries (*Kunzea pomifera* F. Muell.), pertencentes a família Myrtaceae (TAN; KONCZAK; RAMZAN; SZE, 2011). O método tem sido empregado para quantificar a atividade antioxidante de extratos de plantas e frutas (ABADIO-FINCO; KAMMERER; CARLE; TSENG *et al.*, 2012; WOLFE; LIU, 2007). Esse método representa melhor a complexidade de sistemas biológicos

que ensaios de atividade antioxidante *in vitro*, pois, mimetiza as condições biológicas do sistema que inibem as espécies reativas de oxigênio (ROS) na célula.

Flavonoides glicosilados e antocianinas podem ser responsáveis pelas propriedades biológicas de frutos (ABADIO-FINCO; KAMMERER; CARLE; TSENG *et al.*, 2012; KICH; BITENCOURT; CAYE; FALEIRO *et al.*, 2017), como a atividade antiglicante. Há diversos estudos de determinação da composição química de folhas e galhos das espécies de Myrtaceae visando a identificação das substâncias responsáveis por essa atividade (YOSHIKAWA; SHIMADA; NISHIDA; LI *et al.*, 1998). Galeno e colaboradores (2014) realizaram um estudo destinado a investigar as atividades antioxidantes e biológicas, *in vitro*, de extrato de folhas de *E. puniceifolia* enfatizando a atividade inibitória de enzimas α -amilase, α -glicosidade e xantina oxidase *in vitro* ($CI_{50} = 122,8 \pm 6,3$; $2,9 \pm 0,1$; $23,5 \pm 2,6 \mu\text{g mL}^{-1}$), respectivamente, relacionadas ao *diabetes mellitus* (LOPES GALENO; CARVALHO; DE ARAUJO BOLETI; LIMA *et al.*, 2014). A atividade antioxidante dos extratos de suas folhas foi analisada pelos métodos ABTS, DPPH ($CI_{50} = 10,5 \pm 1,2$ e $28,8 \pm 0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$), respectivamente (LOPES GALENO; CARVALHO; DE ARAUJO BOLETI; LIMA *et al.*, 2014).

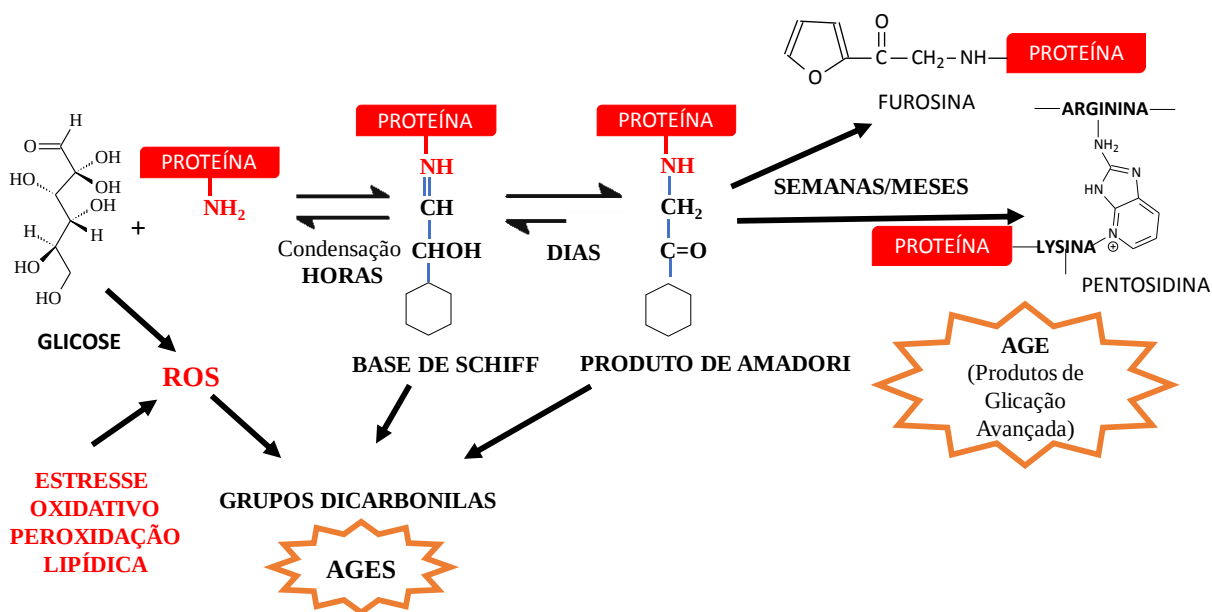
2.3 Avaliação da Atividade antiglicante de frutos

O desequilíbrio do metabolismo da glicose em humanos pode causar a formação excessiva de metilglioxal, que pode reagir com várias biomoléculas para formar os Produtos da Glicação Avançada (*Advanced Glycation End-products* - AGEs). Algumas substâncias naturais encontradas em espécies de Myrtaceae têm sido empregados para o tratamento desta perturbação, por exemplo, o elagitanino vescalagina ocorrente nas espécies de *Syzygium* spp, que reduz a resistência à insulina. Chang e colaboradores (2013) comprovaram que este elagitanino reduz os AGEs, prevenindo a inflamação induzida pelo metilglioxal em ratos e reduziu também o distúrbio metabólico de carboidratos.

A glicação é o processo de modificação pós-translacional também chamado de glicosilação não-enzimática; esse processo se inicia quando açúcares redutores como frutose, lactose, glicose e lactose conseguem reagir com as proteínas de forma não-enzimática (CHOMPOO; UPADHYAY; KISHIMOTO; MAKISE *et al.*, 2011). Nesse processo ocorrem

reações entre os grupos funcionais das amins nucleofílicas dos aminoácidos e os grupos aldeídicos da glicose (glioxal ou glicoaldeído) conhecidas como reação de Maillard (FU; WELLSKNECHT; BLACKLEDGE; LYONS *et al.*, 1994) (Esquema 1). A reação de condensação leva a formação (reação reversível) de uma base de Schiff permitindo uma sequência de rearranjos e formação de produtos de reação mais estáveis chamado de produto de Amadori, tais como a hemoglobina glicada e frutossilamina. Dessa forma, um novo rearranjo do produto de Amadori forma estruturas estáveis e irreversíveis denominadas AGEs (HARTOG; VOORS; BAKKER; SMIT *et al.*, 2007), principais fatores responsáveis pela complicação do diabetes (CHOMPOO; UPADHYAY; KISHIMOTO; MAKISE *et al.*, 2011).

Esquema 1 Formação dos AGEs (Figura de autoria própria)



Nos últimos anos, descobriu-se que muitos inibidores sintéticos das AGEs são eficazes contra a formação das AGEs, como a aminoguanidina (AG), o pró-fármaco sintético mais conhecido. No entanto, suas aplicações práticas são limitadas por causa de sua toxicidade e efeitos colaterais graves (PENG; CHENG; MA; CHEN *et al.*, 2008). Além disso, alguns inibidores de AGEs contribuem para o sequestro de piridoxal, causando deficiência de vitamina B6 em pacientes diabéticos (SINGH; BARDEN; MORI; BEILIN, 2001).

Muitos estudos demonstram que extratos de plantas e substâncias isoladas são capazes de inibir a formação dos AGEs, como rutina (KIHO; USUI; HIRANO; AIZAWA *et al.*, 2004), procianidinas (PENG; CHENG; MA; CHEN *et al.*, 2008), assim como os ácidos cafeico e clorogênico que são substâncias fenólicas com elevada atividade antioxidante (GUGLIUCCI; BASTOS; SCHULZE; SOUZA, 2009). Chen e colaboradores (2019) investigaram a ação antiglicante da (+)-catequina (CC) e (-)-epicatequina (EC) e demonstraram que o efeito de CC na inibição de AGEs foi significativamente melhor que o efeito da EC ($p < 0,05$). Essa catequina mostrou-se mais eficiente na inibição de geração de radicais $RO\bullet$, $OH\bullet$ e $\bullet CHO$.

Diversos trabalhos científicos correlacionam a atividade antiglicante de extratos vegetais com a presença de substâncias fenólicas responsáveis também pelas atividades antioxidantes frente a radicais livres, justificando a eficiência dessas substâncias na inibição de AGEs (CHEN; WU; ZHOU; JIE *et al.*, 2019; KAEWNARIN; NIAMSUP; SHANK; RAKARIYATHAM, 2014; SHIN; LEE; KIM; KUM *et al.*, 2015; WANG; YAGIZ; BURAN; NUNES *et al.*, 2011; YEN; WU, 2004).

Algumas espécies da família Myrtaceae têm sido utilizadas na medicina popular para o controle de certas doenças. Espécies do gênero *Myrcia* são chamadas de "pedra-hume-cao", plantas utilizadas tradicionalmente no tratamento da *diabetes mellitus* (CHATTERJEE; ALI; DE; PANDA *et al.*, 2012a). A maioria das substâncias isoladas das plantas dessa família apresentam atividades antioxidantes e biológicas como efeito hipoglicemiante (GHOSH; MANDAL; CHAKRABORTY; RASUL *et al.*, 2010). Em diferentes extratos obtidos de *Myrcia sphaerocarpa* e *Myrcia speciosa* foram identificados derivados de miricetina e quercetina (3-O-rhamnosídeo como substituinte). Esses extratos apresentaram potencial inibitório *in vitro* frente a α -glicosidade ($IC_{50} = 0,7$ a $4,1 \mu g mL^{-1}$) e α -amilase ($IC_{50} = 6,1$ a $29,0 \mu g mL^{-1}$) (FIGUEIREDO-GONZALEZ; GROSSO; VALENTAO; ANDRADE, 2016).

Um trabalho de dissertação executado por Adriana Lopez (2015), integrante do grupo NEQUIMA/UFAM, levou ao isolamento de quatro flavonóides glicosilados a partir de extratos de folhas de *M. bracteata*, sendo duas di-hidroflavonas (naringenina-7-O-glucosídeo e eriodictilo-7-O-glucosídeo), um diidroflavonol (astilbina) e um flavanol (quercitrina) que apresentaram efeitos inibitórios da atividade da enzima α -glicosidade de $20,60 \pm 0,08$ e $23,27 \pm 1,86 \%$, respectivamente.

Portanto, espécies de *Myrcia* são ricas em flavonoides glicosilados e apresentam atividades antioxidante e hipoglicemiante. Contudo, o estudo da composição química desses frutos é necessário e importante para a descoberta de novas fontes nutracêuticas. Entretanto, a caracterização química de matrizes se torna um desafio à altura de sua complexidade química.

Quadro 3 Substâncias bioativas presentes em frutos de Myrtaceae

Espécie	Substâncias bioativas	Potenciais	Referência
<i>P. acutangulum</i> D.C.	Fenólicos, ácido cítrico, ácido annurcoico, ácidos graxos (ω^3 , ω^6 , ω^9), ácido ascórbico	Atividade de inibição de radicais livres (DPPH, ABTS); capacidade antioxidante em célula (CAA)	(RAMOS, A. S.; SOUZA, R. O. S.; BOLETI, A. P. D.; BRUGINSKI, E. R. D. <i>et al.</i> , 2015)
<i>P. guajava</i> L.	Triterpenos do tipo ursanoico di-, tri- e tetrassubstituídos	Atividade antioxidante, anti-inflamatória, antitumoral	(BEGUM; ALI; TAUSEEF; ALI <i>et al.</i> , 2014; D'ABROSCA; FIORENTINO; MONACO; ORIANO <i>et al.</i> , 2006; SHU; CHOU; WANG, 2009).
<i>M. sphaerocarpa</i> D.C., <i>M. salicifolia</i> D.C., <i>M. speciosa</i> (Amshoff) McVaugh	Miricetina-3-O-ramnosídeo, quercetina-3-O-galactosídeo, quercetina-3-O-glucosídeo, miricetina, quercetina-3-O-ramnosídeo)	Atividade anti-bacteriana, anti-malária, anti-inflamatória, anti-helmínticos e propriedades antioxidantes	(FIGUEIREDO-GONZALEZ; GROSSO; VALENTAO; ANDRADE, 2016)
<i>Eugenia uniflora</i> L.	Derivados de quercetina, quercitrina, isoquercitrina, cianidina antocianinas, flavonois e carotenóides	Apresentam capacidade antioxidante	(AURICCHIO; BUGNO; BARROS; BACCHI, 2007; DENARDIN; HIRSCH; DA ROCHA; VIZZOTTO <i>et al.</i> , 2015).
<i>E. dysenterica</i> D.C.	Vitamina C, ácido elágico e polifenólicos como taninos, elagitaninos e proantocianidinas, assim como derivados de quercetina e kaempferol	Potenciais antioxidantes para reverter ou prevenir a obesidade e desordens metabólicas como <i>diabetes mellitus</i>	(BURTON-FREEMAN; SANDHU; EDIRISINGHE, 2016; CARDOSO; MARTINO; MOREIRA; RIBEIRO <i>et al.</i> , 2011; DE SOUZA SCHMIDT GONCALVES; LAJOLO; GENOVESE, 2010; GUEDES; RUFINI;

			MARQUES; MELO <i>et al.</i> , 2017).
<i>E. chlorophylla</i> , <i>E. piriforme</i> Cambess, <i>M. laruotteana</i> , <i>M. oblecta</i> (Berg) Kiarsk)	Ácido cafeico	Teor de fenólicos totais, DPPH	(SALVADOR; DE LOURENCO; ANDREAZZA; PASCOAL <i>et al.</i> , 2011)
<i>Zysygium cuminii</i> (L.) Skeels	Polifenólicos, flavonóides glicosilados, elagitaninos Tricetina-4'-O- α -L-ramnopiranosídeo, miricetina deoxihexosídeo, taninos (corilagina, 3,6-HHDP glicosídeo, 4,6-HHDP glicosídeo, 1-galoilglicosídeo, 3- galoilglicosídeo)	Capacidade inibitória de α -glicosidase propriedades anti-hiperglicêmico, anti- inflamatória, cardioprotetora e antioxidantes	(TRINH; STAERK; JAGER, 2016) (CHAGAS; FRANCA; MALIK; PAES, 2015; SOBRAL; PROENÇA; SOUZA; MAZINE <i>et al.</i> , 2020).
<i>E. jambolana</i>	Tricetina-4'-O- α -L-ramnopiranosídeo, miricitrina, antocianina, malvidina-3-O-gentibiosídeo	DPPH, CAA	(DAMETTO; AGUSTONI; MOREIRA; PLAZA <i>et al.</i> , 2017).

2.4 Desreplicação de matrizes complexas por métodos cromatográficos e espectrométricos

Avanços em métodos cromatográficos e espectrométricos têm possibilitado a determinação de diferentes metabolomas, melhor compreensão da bioatividade de metabólitos oriundos de produtos naturais e sua influência sobre a saúde humana quanto a dosagem necessária desses bioativos para garantir sua ação em relação às doenças (BALOGUN; ASHAFA, 2019; WISHART, 2008). Por esse motivo, o estudo químico de espécies vegetais tem auxiliado no desenvolvimento das áreas alimentícia, farmacêutica, agrícola e, em especial, a química, por possibilitar o conhecimento de produtos naturais e suas atividades, permitindo a descoberta de novas substâncias bioativas (AYYANAR; SUBASH-BABU; IGNACIMUTHU, 2013; DEMBITSKY; POOVARODOM; LEONTOWICZ; LEONTOWICZ *et al.*, 2011; HABTEMARIAM, 2017).

Dentre as substâncias orgânicas com atividades biológicas, a maioria é produzida por espécies vegetais, fato que dá maior vantagem à região amazônica devido a sua vasta biodiversidade, entretanto, muito pouco foi registrado a esse respeito. E, mesmo com investimentos em novas tecnologias, ainda não é possível assegurar a descoberta de moléculas ativas, sejam oriundas de produtos naturais como as plantas ou resultantes de síntese orgânica, que possam ser utilizadas na indústria farmacêutica e alimentícia (CRAGG; NEWMAN; YANG, 2006; DEXHEIMER; DELVING; DE OLIVEIRA; BIOLCHI *et al.*, 2017).

Assim, a metabolômica surge com a proposta de se realizar uma análise global e fornecer informação geral da complexidade de diversas matrizes, sem a preocupação de se isolar os marcadores químicos específicos (UM; CHOI; LEE; LEE *et al.*, 2013; WISHART, 2008).

Estudos comparativos entre as técnicas revelam que a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (acoplada a detectores de Massas e UV) e a Ressonância Magnética Nuclear estão entre as técnicas mais utilizadas na metabolômica de alimentos (WISHART, 2008).

A escolha do método analítico deve se basear nas propriedades físico-químicas, assim como na faixa de resposta confiável; o método deve permitir pelo menos resultados semiquantitativos e oferecer a vantagem de se utilizar o menor número de etapas de pré-processamento ou processamentos mais simples. Dessa forma, reduzir também o número de variáveis, como clean-up de amostras e supressões de íons (LC-MS) ou derivatização (GC-MS) (KRISTENSEN; ENGELSEN; DRAGSTED, 2012; OISHI; TANAKA; HASHIMOTO; SHINBO *et al.*, 2009). Fatores importantes podem influenciar nos resultados obtidos de uma análise metabolômica, como:

o período e o procedimento de coleta de amostra, processamento, estabilidade, armazenagem e a forma de extração (obtenção dos extratos brutos que foram analisados), diluição de amostra, o tipo e número de métodos analíticos que foram utilizados (KHAKIMOV; AMIGO; BAK; ENGELSEN, 2012).

Estudos fitoquímicos prévios de espécies de *Myrcia* descrevem a ocorrência de flavonoides mearnsitrina e miricitrina, empregando-se HPLC-PAD, método simples e robusto bastante empregado pela indústria para padronização de ervas comercializados no Brasil (BATISTA; COLOMBO; DE PASCOLI; TELES *et al.*, 2011). A separação cromatográfica por HPLC combinada com detecção de massas do tipo *quadrupole-Time-Of-Flight Mass Spectrometry* (qTOF-MS) tem sido usada para análise de desreplicação de flavonoides devido a precisão das medidas de massas que essa técnica fornece (HE; WU; NIE; YAN *et al.*, 2017).

A abordagem sobre o estudo de metabolômica tem sido cada vez mais utilizada para obter uma visão sobre a composição química de matrizes naturais como plantas e para caracterizar a variância dos dados obtidos sobre sua composição química (CHRISTIANS; KLAWITTER; HORNBERGER, 2011; DUNN; OVERY; QUICK, 2005; WUBSHET; MORESCO; TAHTAH; BRIGHENTE *et al.*, 2015).

Métodos hifenados trazem grande vantagem no estudo metabolômico de matrizes complexas, pois, possibilitam a separação, isolamento, identificação e quantificação dos constituintes químicos de forma prática e eficaz (HALABALAKI; VOUGOGIANNOPOULOU; MIKROS; SKALTSOUNIS, 2014; LAMBERT; WOLFENDER; STAERK; CHRISTENSEN *et al.*, 2007; TANG; XIAO; WANG, 2009).

2.4.1 Métodos hifenados

A identificação de moléculas (metabolômica) dentro da imensa biodiversidade de espécies vegetais ainda requer investimentos em equipamentos, tempo e recursos humanos. Uma saída mais simples e rápida para esse processo é a identificação rápida de substâncias conhecidas, a fim de concentrar os esforços na descoberta de novas moléculas. Surge assim, a "desreplicação". Inicialmente definida em 1990 como "um processo de identificação rápida de quimiotipos conhecidos", a desreplicação é hoje um conceito que evoluiu nos últimos anos de diferentes maneiras. Essa abordagem pode ser utilizada para a identificação rápida das principais substâncias,

qualquer que seja sua classe química em uma única amostra ou para a aceleração de procedimentos de fracionamento ou *clean up* visando moléculas bioativas. Em outros casos, a desreplicação é totalmente integrada em estudos metabólicos visando o perfil químico sem a preocupação em direcionar o estudo para uma classe pré-determinada de metabólitos (FREDENHAGEN; DERRIEN; GASSMANN, 2005; HALABALAKI; VOUGOGIANNPOULOU; MIKROS; SKALTSOUNIS, 2014; HUBERT; NUZILLARD; RENAULT, 2017).

Métodos hifenados como HPLC-DAD-ESI-MS têm sido empregados para identificação, quantificação e na validação de matrizes comercializadas como fitoterápicos utilizados na medicina popular. Santos e colaboradores (2017) empregaram método hifenado para determinar simultaneamente 13 substâncias bioativas de *Psidium guajava* L. diferenciando seus frutos em dois estágios fenológico a partir da análise de seus extratos metanólicos por HPLC-DAD de fase-reversa. Wubshet e colaboradores (2015) empregam HPLC-HRMS-SPE-NMR para identificar os constituintes responsáveis pela atividade inibitória α -glicosidade de alquilresorcinois glicosilados de *Eugenia catharinae*.

A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e a Espectrometria de Massas (EM) são os técnicas mais utilizados para se investigar a metabolômica de matrizes diversas devido à sua capacidade de analisar centenas de metabólitos em uma única medida (GOWDA; RAFTERY, 2015; HUBERT; NUZILLARD; RENAULT, 2017). Cada técnica possui sua particularidade, contudo, ambas se complementam e permitem o desenvolvimento de métodos e aplicações.

A RMN é uma ferramenta analítica essencial para elucidação estrutural de moléculas naturais e sintéticas, mais do que isso, nos fornece informações tanto qualitativas quanto quantitativas da metabolômica em diferentes matrizes (BRUNO; PATIN; BOCCA; NADAL-DESBARATS *et al.*, 2018; GLASER; LIENAU; ZEEB; KRUCKER *et al.*, 2003; GOULAS; MINAS; KOURDOULAS; LAZARIDOU *et al.*, 2015).

2.4.2 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

As melhorias em instrumentação e tecnologia da RMN, como os supercondutores, criossondas, técnicas de supressão de solventes e sequências de pulso têm permitido a aplicação da RMN como uma ferramenta quantitativa mesmo com a sua baixa sensibilidade (devido a diferença populacional de spins) quando comparada com a Espectrometria de Massas (GOWDA; RAFTERY, 2015). Como vantagens, inclui-se o desenvolvimento de métodos simples, fácil

preparo de amostras, tempos de análise relativamente curtos e calibração é feita de forma indireta. Dentre as aplicações está a verificação de identidade e pureza, controle e garantia de qualidade, caracterização geral de alimentos e produtos à base de espécies vegetais, bem como estudos de fluidos humanos, além de permitir a aquisição de informação sobre o perfil químico geral de uma amostra, possibilita o estudo desses metabólitos (GLASER; LIENAU; ZEEB; KRUCKER *et al.*, 2003; LIU; KOLPAK; WU; LEO, 2012; POPLAWSKA; BLAZEWICZ; KAMINSKI; BEDNAREK *et al.*, 2018).

Outra aplicação importante, é a RMN quantitativa por meio do método Pulcon que se baseia em comprimentos de pulso de uma amostra e de uma amostra referencia e o impacto desses comprimentos sobre a medida da intensidade de sinal baseando-se no princípio da reciprocidade, ou seja, uma medida indireta de quantificação, na qual não é necessário construir uma curva de calibração, permite estimar a concentração de uma substância a partir de uma curva obtida a partir do valor de T1 (tempo de relaxação) de um padrão de concentração molar conhecida e também para cada amostra a ser analisada (GARRIDO; DE CARVALHO, 2015).

A combinação dos dados espectrais com tratamentos quimiométricos tem sido um ótimo recurso utilizado nas estratégias de desreplicação de produtos naturais (CHARLES; ALAMSJAH, 2019; HALABALAKI; VOUGOGIANNOPOULOU; MIKROS; SKALTSOUNIS, 2014; PAULI; CHEN; LANKIN; BISSON *et al.*, 2014). Dessa forma, é possível identificar e associar essas substâncias à alguma propriedade ou capacidade antioxidante em matrizes de naturezas distintas (JAMROZ; PARADOWSKA; ZAWADA; MAKAROVA *et al.*, 2014; PEREIRA DA SILVA GRANDIZOLI; CAMPOS; SIMONELLI; BARISON, 2014). A combinação entre a RMN e a Quimiometria também auxilia na investigação quimiotaxonômica (FLORES; SILVA; FURQUIM; CASTRO *et al.*, 2018) pois, possibilita comparar perfis metabolômicos (YAO; HEINRICH; ZOU; REICH *et al.*, 2018).

2.4.3 ERETIC2

ERETIC2 (electronic reference to access in vivo Concentrations) é um dos módulos do software TopSpin, descrito no manual “eretic2.pdf”, usado para quantificar a concentração absoluta de uma molécula baseando-se no método PULCON para quantificação absoluta (WATANABE; SUGAI; YAMAZAKI; MATSUSHIMA *et al.*, 2016).

2.5 Quimiometria

A combinação da análise da composição química empregando-se a RMN com análise multivariada é o campo emergente na metabolômica (KRISHNAN; KRUGER; RATCLIFFE, 2005; LACHENMEIER; FRANK; HUMPFER; SCHAFER *et al.*, 2005). A análise e o tratamento dos dados têm sido de extrema importância, em especial, na análise da química de alimentos devido à complexidade dos dados de RMN (CHARLES; ALAMSJAH, 2019). Diferentemente dos dados de RMN e UV, os dados obtidos pela análise em Espectrometria de Massas (EM) são tratados como dados discretos, pois, cada valor da corrente total de íons, em m/z , representa um único valor numérico. A análise da composição química de um grande número de amostras determinada por RMN ou por EM, também denominado de *fingerprint* espectral, é realizada com o auxílio da análise estatística multivariada (quimiometria) para desvendar o agrupamento de amostras naturais ou para estabelecer um modelo de classificação/predição (MONAKHOVA; MUSHTAKOVA, 2016; 2017).

Uma das ferramentas mais poderosas de Análise de Dados Exploratórios (EDA) multivariada é a Análise de Componente Principal (PCA) que fornece abordagens preliminares, principalmente visuais, para encontrar padrões em dados. A PCA pode ser usada para revelar a constituição desconhecida de grandes conjuntos de dados (ESBENSEN; SWARBRICK, 2018). Ela fornece uma representação gráfica das relações entre amostras e variáveis, fornecendo informações sobre as variáveis e se as amostras são semelhantes ou como elas diferem uma da outra (ESBENSEN; SWARBRICK, 2018; MONAKHOVA; MUSHTAKOVA, 2017).

A PCA tem como vantagem a redução dimensional dos dados, facilitando sua interpretação. Exemplos disso são os dados espectroscópicos e cromatográficos, pois, dados de *fingerprint* ou metabolômica geram, normalmente, grandes conjuntos de dados. A interpretação da diferença entre as amostras é geométrica (**Figura 6**). Os dados são visualizados em diferentes dimensões, conforme o número de componentes principais empregadas para descrever o espaço de ordem superior. Cada amostra em uma **tabela** de dados pode ser representada por um ponto em um espaço multidimensional (**Figura 6**). Cada variável (*loadings*) desempenha assim o papel de um eixo de coordenadas no espaço multidimensional.

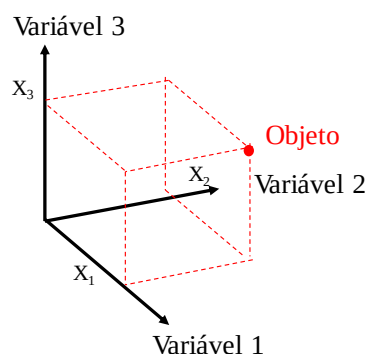


Figura 6 Representação da distribuição geométrica por um espaço dos dados amostrais (Figura de autoria própria).

A linha de base horizontal e os erros de fase observados em espectros de RMN e UV, as oscilações relativas ao sinal/ruído ou mesmo ruídos espectrais observados em EM precisam ser corrigidos, manualmente ou automaticamente. De maneira que os dados possam ser comparados sem gerar artefatos ou dados falsos (ESBENSEN; SWARBRICK, 2018).

Uma maneira simples para resolver problemas de variações no deslocamento químico – que podem ser ocasionados por diferença de pH da amostra, temperatura e/ou variações instrumentais – podem ser resolvidos aplicando-se o método de alinhamento espectral utilizando intervalos espectrais como o método de *bucketing* ou *binning* (GISKEODEGARD; BLOEMBERG; POSTMA; SITTER *et al.*, 2010), tal como o algoritmo nomeado OBA (*optimized bucketing algorithm*), permitindo reduzir a dimensão dos dados originais (de 16 a 32kB) e minimizar a influência das variações (ESBENSEN; SWARBRICK, 2018).

Cada amostra é normalizada pela soma da intensidade da amostra unitária (**Figura 7**), entretanto, essas abordagens de normalização estatística nem sempre são o procedimento mais ideal, já que o aumento da concentração de metabólito em um grupo não é automaticamente balanceado pela diminuição de outro grupo. Uma abordagem de normalização sugerida como o pré-tratamento dos dados espectrais é o método de transformação ou atenuação SNV (*Standard Normal Variate*), um passo importante antes da análise quimiométrica para reduzir a variação da linha de base (*baseline*) e ruídos sistemáticos, pode ser utilizado como pré-tratamento (BARNES; DHANOA; LISTER, 1989; ESBENSEN; SWARBRICK, 2018).

O efeito geral do SNV é centralizar os dados no nível médio global do espectro e dimensionar os dados para a variância unitária (por isso o nome SNV). A **Figura 7** mostram o efeito da atenuação resultante da aplicação do SNV nos espectros de RMN de ^1H .

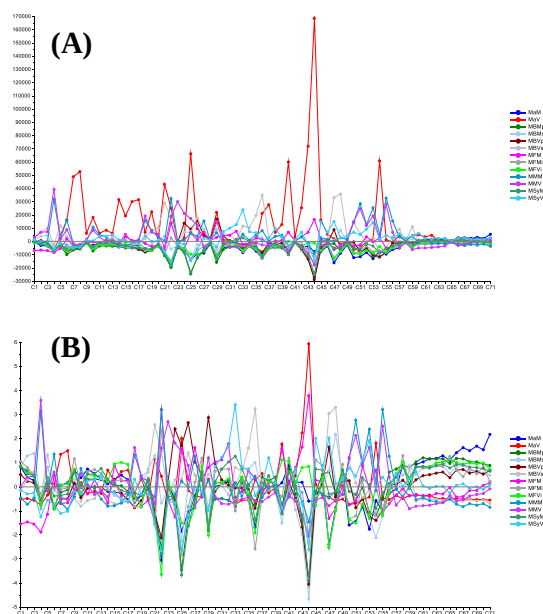


Figura 7 (A) Dados de espectros (região entre 5,5 – 11,0 ppm) originais de RMN de ^1H (matriz MNN); (B) espectros após o Pré-tratamento aplicando-se Normalização por SNV.

A análise por *Partial Least Squares* ou *Projection to Latent Structures* (PLS) é uma forma de modelagem para encontrar, simultaneamente, nas matrizes X (valores de *loadings*) e Y (valores de *scores*), as variáveis latentes (ou ocultas) em X que foram melhores preditas nas variáveis latentes em Y. Estas componentes obtidas na PLS são similares à componente principal (PCA), porém, são tratadas como Fatores. O modelo PLS aplica o método de Regressão para descobrir o quanto uma variável predita (X) explica as variações em algumas variáveis resposta (Y). Regressão é um termo genérico usado para todos os métodos que permitem modelar ou analisar diversas variáveis com o propósito de estabelecer uma relação entre dois grupos de variáveis, chamadas de variáveis independentes e dependentes. O modelo adequado deve ser usado tanto para descrever a relação entre dois grupos de variáveis quanto para prever novos valores (ESBENSEN; SWARBRICK, 2018). Portanto, é capaz de correlacionar os dados de RMN e EM para a classificação quimiométrica de alimentos e bebidas (LACHENMEIER; FRANK; HUMPFER; SCHAFER *et al.*, 2005) ou com os resultados antioxidantes (JAMROZ; PARADOWSKA;

ZAWADA; MAKAROVA *et al.*, 2014), comprovando que a combinação entre as técnicas é uma ferramenta útil no controle de qualidade (DOWLATABADI; FARSHIDFAR; ZARE; PIRALI *et al.*, 2017) e na identificação de substâncias bioativas (LIU; XU; GONG; CUI *et al.*, 2015; RAMOS; MAR; SILVA; LEONARD D. R. ACHO *et al.*, 2019).

Já a Análise Linear Discriminante (LDA) é um método de classificação que fornece uma transformação linear de vetores de características n -dimensionais (ou amostras) em um espaço m -dimensional ($m < n$), para que amostras pertencentes à mesma classe estejam próximas umas das outras, mas amostras de diferentes classes estejam distantes umas das outras. O LDA é um método de classificação supervisionado, pois as categorias às quais os objetos devem ser classificados são conhecidas antes de o modelo ser criado. O objetivo do LDA é determinar os melhores parâmetros de ajuste para classificação de amostras por um modelo desenvolvido. O modelo pode então ser usado para classificar amostras desconhecidas (ESBENSEN; SWARBRICK, 2018). O LDA é o mais simples de todos os métodos de classificação possíveis baseados na fórmula de Bayes. A partir da regra de Bayes, desenvolve-se um modelo de classificação assumindo que a distribuição de probabilidade dentro de todos os grupos é conhecida e que as probabilidades anteriores para grupos são dadas e somam 100% em todos os grupos. Ele é baseado na suposição de distribuição normal e na suposição de que as matrizes de covariância dos dois (ou mais) grupos são idênticas. Isso significa que a variabilidade dentro de cada grupo tem a mesma estrutura. A única diferença entre os grupos é que eles têm centros diferentes. O LDA considera tanto a variação dentro do grupo quanto a variação entre grupos. A matriz de covariância estimada para o LDA é obtida agrupando matrizes de covariância entre grupos.

Quando a variabilidade de cada grupo não tem a mesma estrutura (matriz de covariância desigual), a forma dos grupos de ‘separação de curvas’ não é linear e, portanto, a análise discriminante quadrática (PLS) fornecerá um modelo de classificação melhor. A distância das observações do centro dos grupos também pode ser medida usando a distância de Mahalanobis, baseada nas correlações entre variáveis, com as quais distintos padrões podem ser identificados e analisados. É uma estatística útil para determinar a similaridade entre uma amostra desconhecida e uma conhecida. Distingue-se da distância euclidiana já que tem em conta as correlações do conjunto de dados e é invariante à escala, ou seja, não depende da escala das medições.

Os dados em ambos os grupos a comparar deverão ter o mesmo número de variáveis (ou seja, o mesmo número de colunas) mas não necessariamente o mesmo número de elementos (o número de linhas pode ser diferente).

2.6 Bioprodutos a partir de frutos

Diversas espécies frutíferas têm sido utilizadas na medicina tradicional e/ou seus frutos são consumidos *in natura*. A possibilidade de diminuir desperdícios e aumentar o estímulo ao consumo de alimentos naturais tem reforçado a ideia da criação de produtos alimentícios, sejam eles tradicionais como geleias e sucos, ou em forma de bioprodutos que conservem as propriedades nutracêuticas e que agregue valor a essas matrizes (SHEHATA; ABD-RABOU; EL-SOHAIFY, 2019), como as microcápsulas – contendo substâncias específicas, sucos ou óleos essenciais – que são obtidas através da utilização de novas tecnologias empregadas pela área de Engenharia de Alimentos.

2.6.1 Microencapsulamento

Uma preocupação com o uso de nutracêuticos tem sido sua biodisponibilidade, uma vez que suas propriedades nutracêuticas podem não ser ativas após a ingestão ou mesmo após sua manipulação (DANTAS; MAFALDO; OLIVEIRA; LIMA *et al.*, 2019). Portanto, para conservar substâncias bioativos de frutas frescas, a produção de extrato em pó ou suco fresco é uma alternativa para prolongar a vida útil do produto. Uma das técnicas usadas para este propósito é o encapsulamento, no qual as substâncias fenólicas são aprisionados dentro de um material de parede (DAZA; FUJITA; GRANATO; FAVARO-TRINDADE *et al.*, 2017). No contexto, o processo de encapsulamento pode aumentar a biodisponibilidade da substância ativa, pois o encapsulamento pode concentrar e conservar por mais tempo as propriedades dessas substâncias. Essa proteção permite o controle da estabilidade da substância ativa encapsulada e sua liberação controlada em diferentes intervalos de tempo, melhorando a administração da dose (BORGOGNA; BELLICH; ZORZIN; LAPASIN *et al.*, 2010; COMUNIAN; THOMAZINI; ALVES; DE MATOS *et al.*, 2013; DAZA; FUJITA; GRANATO; FAVARO-TRINDADE *et al.*, 2017).

A técnica de microencapsulação permite proteger e conservar as propriedades química e biológica de diferentes matrizes, em especial, as matrizes vegetais, pois, baseia-se no efeito de incorporação de uma matriz polimérica, que cria um microambiente na cápsula capaz de controlar interações entre a parte interna e a externa (BORGOGNA; BELLICH; ZORZIN; LAPASIN *et al.*,

2010; COMUNIAN; THOMAZINI; ALVES; DE MATOS *et al.*, 2013; DAZA; FUJITA; GRANATO; FAVARO-TRINDADE *et al.*, 2017; EL-AASSAR; HAFEZ; EL-DEEB; FOUDA, 2014). Essas características tornam a microencapsulação adequada para aplicações na indústria alimentícia, uma vez que o processo de microencapsulação podem acentuar os resultados das ações anti-inflamatórias (TRINH; STAERK; JAGER, 2016), antioxidantes e antiglicantes (COMUNIAN; THOMAZINI; ALVES; DE MATOS *et al.*, 2013; DAS; GOUD; DAS, 2019), além da preservação dos componentes nutricionais, mantendo a estabilidade e controle de sua biodisponibilidade (ROVALINO-CORDOVA; FOGLIANO; CAPUANO, 2019; SHEHATA; ABD-RABOU; EL-SOHAIFY, 2019) de polpas (TRINH; STAERK; JAGER, 2016) e chás (VARDANEGA; MUZIO; SILVA; PRATA *et al.*, 2019).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Estudar a composição química de frutos da família Myrtaceae pertencentes aos gêneros: *Psidium*, *Eugenia* e *Myrcia* ocorrentes no bioma Amazônia por métodos cromatográficos e espectrométricos/espectroscópicos assistidos por ferramentas quimiométricas e/ou estatísticas, bem como avaliar seus potenciais antioxidantes, antiglicantes e citotóxicos.

3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar os constituintes químicos presentes nos frutos de *Psidium* spp., *Eugenia* sp. e *Myrcia* spp. em diferentes estágios de maturação por métodos cromatográficos e espectrométricos/espectroscópicos (HPLC-DAD-MS, MS/MS e RMN);
- Analisar os perfis espectrais dos extratos obtidos empregando métodos multivariados não-supervisionados (PCA e HCA) e supervisionados (PLS);
- Quantificar o ácido L-(+)-ascórbico nos extratos dos frutos selecionados por HPLC-DAD;
- Avaliar a citotoxicidade dos extratos desses frutos utilizando linhagem celular normal pelo método Alamar Blue;
- Encapsular os sucos naturais das polpas dos frutos que apresentarem melhores potenciais antiglicantes e antioxidantes;
- Determinar os potenciais antioxidantes dos extratos e das cápsulas contendo suco pelos ensaios DPPH, ABTS, Fenólicos Totais (FT) e Atividade Antioxidante em Célula (CAA);
- Determinar os potenciais antiglicantes dos extratos e das cápsulas pelo ensaio antiglicante *in vitro* (via oxidativa e não-oxidativa).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Reagentes, padrões e solventes

Ácido metafosfórico (MPA) (pureza 99,99 %), fosfato dibásico de sódio (Na_2HPO_4), etilenodiamina tatraacético dissódico (Na_2EDTA), adquiridos da Prolabo (Mollet del Vallés, Barcelona, Spain). Hidróxido de sódio (NaOH), ácido acético ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$), ácido sulfúrico (H_2SO_4), ácido fórmico (CH_2O_2), ácido clorídrico (HCl), adquiridos da Sigma-Aldrich®.

Padrão de D-glicose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$), ácido gálico ($\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$), ácido ferúlico ($\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_4$), miricetina ($\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_8$), quercetina ($\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$), apigenina ($\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5$), ácido cítrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$), β -caroteno, ácido 4-hidroxibenzoico ($\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_3$), ácido cafeico ($\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_4$), Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico), ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico (ABTS^{+}), 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) e ácido L-(+)-ascórbico (AA) ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$) (pureza 99,05 %) foram adquiridos da Sigma (St. Louis, MO, USA). DMFU (2,5-dimetilfurano) ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}$), TMSP-*d4* (ácido trimetilsililpropanoico), Quinina ($\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_2$), CD_3OD , CDCl_3 , $\text{DMSO-}d_6$, e D_2O (≥ 99.9 % D), foram adquiridos da Cambridge Isotope Laboratories, Inc. (CIL, Massachusetts, USA). Todos os solventes utilizados são de grau analítico e espectroscópico.

Os equipamentos utilizados no preparo das amostras e extratos e nas análises foram:

- Minicentrífuga de bancada (UniSpin, UniScience®)
- Liquidificador industrial Oster®;
- Liofilizador Edwards®;
- Evaporador rotativo,
- Ultrassom, vortex ou minicentrífuga de bancada BioSpin;
- Espectrômetro Delta Vista
- Espectrofotômetro Ultrospec 2000 UV/Vis (Pharmacia Biotech, Cambridge, Inglaterra);
- Espectrômetro Delta Vista Spectrometer e o Software i7 Gold 1.0.2.4;
- Leitor de microplacas Thermoplate® (TP-Reader, Thermoplate, Itália);
- Espectrômetro de RMN de alto campo Bruker® (Bruker Avance III HD, sonda BBFO Plus SmartProbe™) (11,7 T, 500 MHz (^1H) e 126 MHz (^{13}C)) com software TopSpin® para aquisição dos dados;

- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (HPLC) da Thermo Scientific, Acella® com injetor automático e bomba quaternária, acoplado a espectrômetro de massas da Thermo®, triplo quadrupolo (TQS) (San Jose, CA, USA), ionizador por eletrospray operando nos modos positivo (+) e negativo (–), com software XCalibur® para aquisição dos dados;
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (HPLC) da Shimadzu HPLC LC-20 com detector PDA (80 H data rate) equipado com detector de arranjo de fotodiodos (DAD) equipado com um auto-amostrador e bombas;

Colunas cromatográficas utilizadas: fase reversa C18, 100 Å Phenomenex® (150 x 4,6 mm, 5 µm), com pré-coluna de mesma fase interna; coluna Synergi 4u, 150x4,6, Hydro - Fase Reversa 80Å e sua pré-coluna C18. Coluna Luna C18.

- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (HPLC) (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) incluindo um Evaporative Light Scattering Detector (ELSD) 3300 (Alltech®, Sorocaba, São Paulo, Brazil).

4.2 Localização e coleta dos frutos

As coletas (autorização SISGEN AB1A9F9) foram realizadas na região metropolitana de Manaus, Amazonas. Os locais de coleta foram: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária em Manaus (EMBRAPA Manaus, Localização: (2o, 53', 33.53'' S; 59o, 58', 25.29'' W); na Reserva Florestal Adolpho Ducke (RFAD, Localização: (3o, 6', 0.70'' S; 60o, 1', 0.30'' W); Sítio de Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC), km 06, Ramal do Brasileirinho, nº 4960; Universidade Federal do Amazonas (UFAM) e no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA).

4.3 Preparo das amostras

Os frutos selecionados foram lavados com água deionizada para remover as impurezas superficiais, arejados e secos à temperatura ambiente com auxílio de papel toalha. Foram escolhidos e pesados 10 (dez) exemplares aleatórios de cada fruto verde e maduro para medição de diâmetro e peso úmido.

Os frutos selecionados foram congelados em freezer (–25 °C) e, em seguida, liofilizados até que a massa seca final se mantivesse constante. Cada espécie frutífera apresentou um tempo

distinto para completar o processo de liofilização devido à diferença de teor de umidade. Então, fez-se o cálculo do teor de umidade de cada grupo.

Após a secagem e pesagem, foi feita uma nova segregação apenas dos frutos em que era possível se separar as sementes (S) da polpa (P), obtendo-se, assim, quatro amostras de uma mesma espécie: fruto verde (UNRIPE: URseed ou URpulp), fruto maduro (RIPE: Rpulp ou Rseed) (**Tabela 1**). Aqueles frutos cujas sementes se apresentaram muito pequena ou de difícil separação da polpa, foram mantidos inteiros.

A variação de cor dos estágios fenológicos dos frutos de *E. punicifolia* impossibilitou a separação em verde e maduro, assim como para os demais frutos. Portanto, os frutos de *Eugenia punicifolia* foram segregados e codificados, em inglês, de acordo com a coloração de cada estágio. Sendo: Red (R), Orange (O), Yellow (Y) e Green (G), letras seguidas por P ou S. As partes dos frutos foram armazenadas em refrigerador, congeladas, ao abrigo da luz até o momento do preparo dos extratos. Uma pequena alíquota dos frutos maduros foi mantida fresca, para determinação do teor de vitamina C.

4.3.1 Análise colorimétrica dos frutos de *Eugenia punicifolia*

A segregação desse fruto se deu a partir de análise colorimétrica em triplicata, empregando-se um espectrômetro Delta Vista Spectrometer e o Software i7 Gold 1.0.2.4. Aproximadamente 20 unidades dos frutos foram escolhidas de forma aleatória de acordo com cada cor observada empregando-se o sistema CIELAB que avalia os parâmetros (L, a*, b*), C (*chroma*), e h° (*hue angle*) foram medidos descrevendo-se um espaço tridimensional de cor em que L* indica *lightness read* de 0 a 100, quando os valores se aproximam de zero quer dizer completamente opaco ou “*black*”), e, quando se aproximam de 100, quer dizer completamente transparente ou “*white*”). Um valor positivo de a* indica *redness* (–a* é igual a *greenness*), e, um valor positivo de b* indica *yellowness* (–b* indica *blueness*) sobre o *huecircle*. O *hue angle* (°), $hue = \arctg(b^*/a^*)$, expressa a variação da nuance de cor de *red-purple*: (0°), *yellow* (90°), *bluish-green* (180°), e *blue* (270°). O *chroma* (C), obtido como $(a^* \times 2 + b^* \times 2) / 2$, é a medida de representa a pureza ou saturação da cor (GOULAS; MINAS; KOURDOULAS; LAZARIDOU *et al.*, 2015). Após a medida, as cores foram classificadas, em inglês, e de acordo com a cor: green (G), yellow (Y), orange (O), red (R) (**Figura 8**).

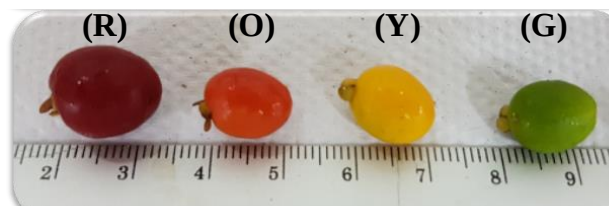


Figura 8 Frutos de *Eugenia punicifolia* em diferentes estágios de maturação; as letras representam a coloração: (R) red (vermelho); (O) orange (laranja); (Y) yellow (amarelo); (G) green (verde).

Tabela 1 Espécies frutíferas de Myrtaceae coletadas para análise do perfil químico

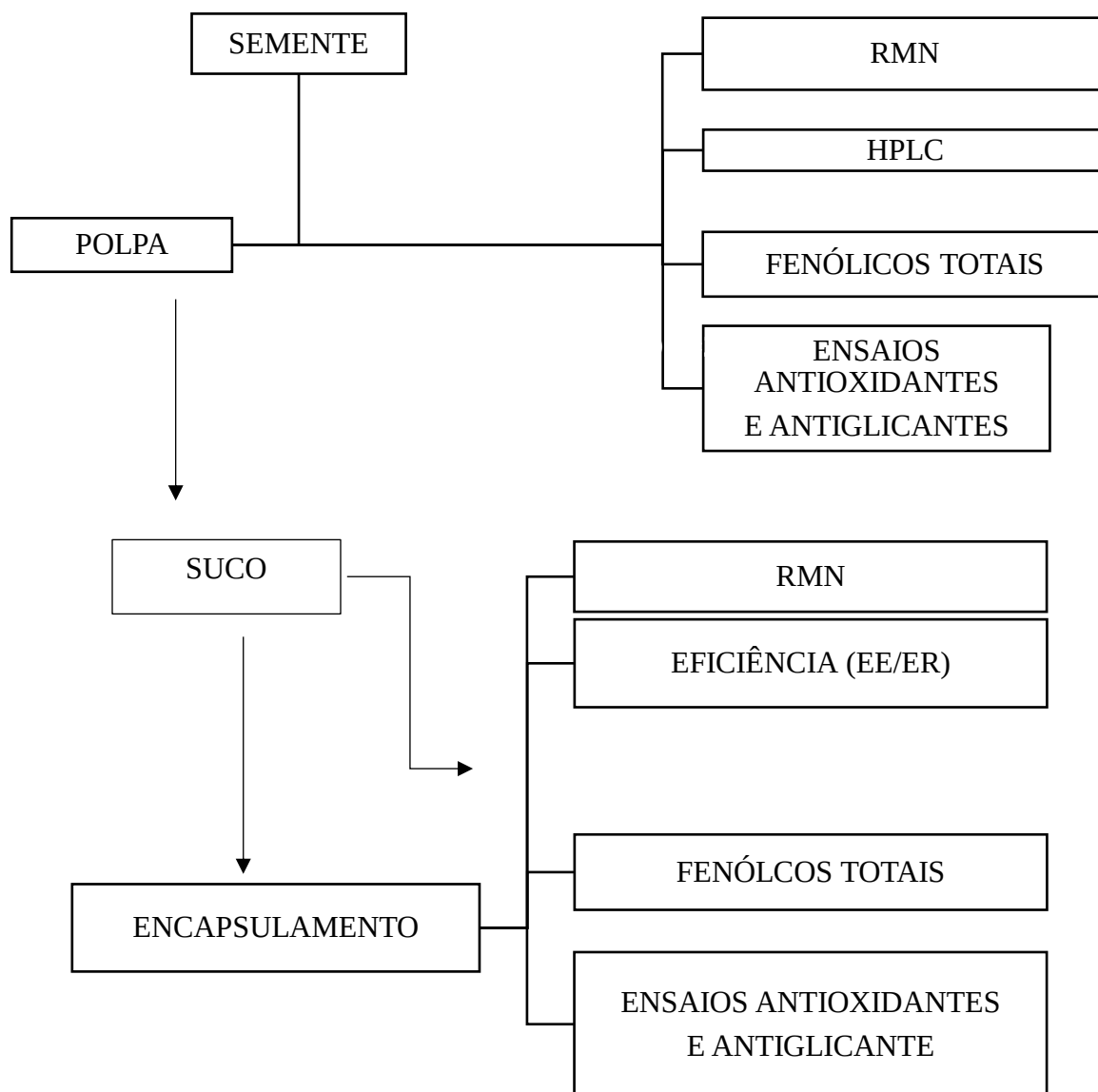
Espécies	Data de coleta	Local	Referência de localização	Identificador	Exsicata	[Código]
<i>Myrcia magnoliifolia</i> DC	Janeiro 2016	RFAD	M050	Souza, M.A.D. de	273014	[MaUR]/[MaR]
<i>M. minutiflora</i> Sagot	Abril 2015	RFAD	M511	Souza, M.A.D. de	4774-30	[MUR]/[MR]
<i>M. bracteata</i> (Rich.) DC	Abril 2015	RFAD	Estrada do alojamento ao lado da RFAD	Souza, M.A.D. de	273008	[BUR]/[BR]
<i>M. fenestrata</i> DC	Abril 2015	RFAD	M016	Souza, M.A.D. de	273002	[FR]/[FUR]
<i>M. sylvatica</i> (G. Mey) DC	Abril 2015	RFAD	Próximo a guarita da RFAD	Souza, M.A.D. de	273007	[SyUR]/[SyR]
<i>Eugenia punicifolia</i> (Kunth) DC	Setembro 2016	EMBRAPA	Setor de plantas medicinais	Chaves, F.C.M.	-	[EPG]/[EPY]/[EPO]/[EPR]
<i>Psidium guajava</i> L	Maio de 2016	INPA	Proximo à guarita	Souza, M.A.D. de	-	[PGV]/[PGM]
<i>Psidium friedrichsthalianum</i> (O. Berg) Nied	Maio de 2016	INPA	Proximo ao Laboratorio de analises fisico-quimicas	Souza, M.A.D. de	-	[PFV]/[PFM]
<i>Psidium acutangulum</i> (O. Berg) Nied	Agosto de 2016	UFAM	Proximo à TV UFAM	Souza, M.A.D. de	254586	[PAV]/[PAM]

4.4 Obtenção dos extratos dos frutos de Myrtaceae

As amostras de todos os frutos e suas partes segregadas foram pesadas (1,00 g) e submetidas às extrações múltiplas em metanol 100% (grau HPLC) assistidas por ultrassom (15 minutos) seguida de 5 minutos em banho de gelo. A cada extração, fez-se filtração com auxílio de funil, papel de filtro e algodão. Todos os volumes foram unidos levando a um volume final médio de 150 mL (cada extrato). Os extratos foram concentrados em evaporador rotativo a 40 °C.

Foi realizado teste de solubilidade para escolha do melhor solvente deuterado para obtenção dos espectros de RMN. Os extratos metanólicos (8 a 20 mg) das espécies de *Psidium* foram ressolubilizados em DMSO deuterado (560 μL); os extratos (25 mg) das espécies de *Myrcia* foram solubilizados em CD_3OD (560 μL). Cerca de 70 mg de cada amostra liofilizada de *E. punicifolia*, em triplicata, foi extraída diretamente com 600 μL de solventes deuterados (CD_3OD e D_2O). Os solventes deuterados foram preparados com a referência interna de TMSP (0,47 mg mL^{-1}). Utilizou-se banho ultrassônico por 5 minutos, minicentrífuga de bancada (UniSpin, UniScience®) por 15 minutos, seguida de 5 minutos em repouso. Retirou-se o sobrenadante e, com auxílio de algodão adaptado em ponteira, transferiram-se 540 μL para os tubos de RMN. A partir dos extratos metanólicos obtidos, alíquotas de 2,0 a 10,0 mg foram separadas para a realização dos ensaios antioxidantes. Essas alíquotas foram solubilizadas nos devidos solventes utilizados em cada ensaio.

Esquema 2 Preparo de amostra e análises realizadas



4.5 Avaliação da Viabilidade Celular

A citotoxicidade dos extratos obtidos foi testada utilizando-se linhagem celular de fibroblasto humano MRC-5 empregando-se o método do reagente Alamar Blue descrito por Nakayama et al. (1997). As células foram obtidas em parceria com a Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Resumidamente, as células ($0,5 \times 10^4$ células/poço) foram previamente cultivadas em placas de cultura de tecidos de 96 poços e expostas aos extratos numa faixa de concentração de

3,25-100 mg mL⁻¹, durante 24 h. Em seguida, após a incubação, as células foram lavadas com solução salina tamponada com PBS e incubadas em solução de Alamar Blue (10 µL de 0,4 %) durante 3 h a 37 °C. A fluorescência foi medida (excitação a 545 nm e emissão a 595 nm) e expressa em % de inibição calculada a partir da Equação abaixo.

$$\text{Viabilidade (\%)} = [\Sigma (\text{AbsFinal}_{1-3} - \text{AbsInicial}_{1-3})] * 100 / \text{Média AbsFinal-Inicial}$$

4.6 Avaliação do capacidade antioxidante

4.6.1 Ensaio de sequestro de radical livre DPPH[•]

Os extratos metanólicos foram solubilizados em etanol (10 mg mL⁻¹) e avaliados quanto a capacidade antioxidante pelo método frente ao radical livre DPPH de acordo com o método de Molyneux (2004) com modificações. O ensaio consiste no monitoramento do consumo do radical livre DPPH[•] pelas amostras, por meio da medida do decréscimo da absorbância de soluções de diferentes concentrações. As medidas foram feitas no comprimento em leitor de microplaca (Elx800, Biotek) no comprimento de onda de 515 nm. Em microplaca, uma alíquota de 20 µL de cada extrato foi diluída em metanol, em diferentes concentrações. Em seguida foram adicionados 180 µL de DPPH[•] (60 µM) e incubação por 30 minutos em temperatura ambiente, à proteção da luz. O branco consistiu de metanol sem DPPH[•]. As análises foram feitas em triplicata e os resultados obtidos a partir da análise de regressão da equação da reta de cada amostra foram expressos em CI₅₀ (µg mL⁻¹). O cálculo da % de inibição foi feito de acordo com a Equação abaixo:

$$\% \text{ de Inibição} = 100 - \frac{(\text{absorbância da amostra} - \text{abs. do branco}) \times 100}{\text{abs. do controle}}$$

4.6.2 Avaliação da capacidade sequestrante do cátion radical ABTS^{•+}

O ensaio consiste em medir a descoloração da solução de ABTS^{•+} pela presença de extratos antioxidantes, de acordo com o método descrito por Miller e colaboradores (1993) e adaptado por Re e colaboradores (1999). Em microplaca foi adicionado a 300 µL de solução de ABTS (0,7 a 750 nm), uma alíquota de 3 µL de amostra. Após o período de reação de 6 min, sob proteção da luz foi realizada a leitura a 750 nm em Leitora de microplaca (Elx800, Biotek). O Trolox (ácido 6-

hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico), um análogo sintético da vitamina E foi utilizado como padrão. Os resultados foram expressos em miligramas de equivalentes de Trolox por grama de amostra a partir da análise de regressão linear da curva de calibração obtida para o padrão (100 – 2000 μM).

4.6.3 Determinação de fenólicos totais (FT)

A determinação de fenólicos totais em frutos seguiu o método utilizando o reagente de Folin Ciocalteu. O procedimento experimental, envolvendo as amostras, os reagentes e a leitura espectrofotométrica, foi conduzido conforme descrito por Velioglu e colaboradores (1998), com adaptações para a Leitora de Microplaca. Uma alíquota de 20 μL de amostra reagiu com 150 μL de reagente de Folin Ciocalteu (1:10), após o período de 5 min reagiu com 150 μL de bicarbonato de sódio (60 g/L). Após 90 min de reação foi realizada a leitura a 750 nm em Leitora de Microplaca (Elx800, Biotek). Uma curva padrão de ácido gálico foi construída (31,2; 62,5; 125; 250; 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e os resultados de FT expressos em Equivalentes de ácido gálico por grama de extrato (EAG/g) a partir da análise de regressão da curva padrão. As soluções-padrão foram preparadas em etanol PA, e as amostras também foram solubilizadas em etanol.

4.6.4 Atividade Antioxidante Celular (CAA)

Os extratos metanólicos foram ressolubilizados em DMSO (10 mg mL^{-1}). A Atividade Antioxidante Celular em células de fibroblasto humano da linhagem MRC-5 foi medida pela produção intracelular de espécies reativas de oxigênio (ROS), utilizando-se um substância de permeação celular não-fluorescente, 2',7'-diclorofluoresceinadiacetato (DCFH-DA), com base no método adaptado (WOLFE; LIU, 2007). DCFH-DA hidrolisado por esterase intracelular e, em seguida, oxidado por ROS até sua forma fluorescente 2'-7'-DCF.

Células de MRC-5 semeadas a uma densidade de 6×10^4 células/poço numa microplaca de 96 poços em 100 μL de meio de crescimento. Após o período de 24 h de incubação, o meio de crescimento foi removido e os poços lavados com PBS. Em seguida, 100 μL de DCFH-DA 10 mM foi dissolvido em HBSS (*Hanks Balanced Salt Solution*), em seguida, incubadas durante 30 min a 37 °C e 5 % de CO_2 . Poços em triplicata foram tratados com 100 μL de cada extrato em diferentes concentrações com adição de 100 μL de solução DCFH-DA tratadas com HBSS. As células foram lavadas com 100 μL de PBS. A fluorescência foi medida imediatamente com comprimento de onda

de excitação de 485 nm de comprimento de onda e de emissão de 520 nm utilizando um leitor de microplacas (DTX 800, Beckman, CA, EUA). A vitamina C, quercetina, com/sem DCFH-DA, foram utilizadas como controles positivos (100 µg mL⁻¹). Para calcular os valores de CAA após o tratamento de 72 horas usou-se a equação abaixo:

$$\text{CAA \%Inibição} = [100 - (\text{Fluorescência}_{\text{Final}} - \text{Fluorescência}_{\text{Inicial}} / 100) / \text{Controle}] \times 100$$

4.7 Avaliação da atividade antiglicante

4.7.1 Atividade antiglicante por via oxidativa

Esta atividade antiglicante foi determinada de acordo com Kiho (2004) com algumas modificações: albumina (BSA) 10 mg mL⁻¹, glioxal 30 mM e 1 mg mL⁻¹ de cada amostra (dissolvidos em DMSO). As soluções de glioxal e BSA foram preparadas em tampão fosfato (0,2 M, pH 7,4), contendo azida de sódio 3 mM como agente antimicrobiano. As reações foram realizadas com 300 µL da mistura total reacional [BSA (135 µL), glioxal (135 µL) e DMSO ou amostra (30 µL)], incubada a 37 °C por 48 horas. Após a incubação, cada amostra foi analisada no leitor de microplaca pela intensidade da fluorescência (emissão λ 330 nm e excitação λ 420 nm). O ensaio foi realizado em triplicata, a quercetina (1 mg mL⁻¹) foi utilizada como padrão e o DMSO como controle negativo. Os resultados foram expressos em % de inibição e a CI₅₀ calculada através do cálculo de regressão linear da curva de calibração obtida, com auxílio do software estatístico GraphPad Prism 6.0.

$$\% \text{Inib} = [100 - (\text{Flu}_{\text{amostra}} - \text{Flu}_{\text{Branco}}) / \text{Flu}_{\text{Branco}}] \times 100$$

4.7.2 Atividade antiglicante por via não-oxidativa

Esta atividade antiglicante foi determinada de acordo com Kiho (2004) com algumas modificações. Seguindo a partir dos passos do item 4.7.1 (Atividade antiglicante via oxidativa), substituindo o glioxal por frutose (0,1 mM) e utilizando albumina-frutose além do tempo de incubação maior, 72 horas. O padrão utilizado foi a aminoguanidina em vez de quercetina, que, assim como as amostras, foi testado primeiramente em uma concentração inicial (1 mg mL⁻¹) e,

em seguida, após a medida preliminar de % de inibição, foi submetido a diluição sucessiva (0,78 – 100 µg mL⁻¹) para o cálculo de IC₅₀.

A equação obtida para o padrão de aminoguanidina: $y = 2,00116x - 5,0346$ e $R^2 = 0,9907$.

$$\%InibAmostra = [100 - (Fluorescência_{Amostra} - Flu_{Branco} / Flu_{Padrão} - Br)] \times 100$$

4.8 Análises cromatográficas e espectrométricas

4.8.1 Análise por DI-ESI-IT-MS/MS e DI-HRMS

Alíquotas de 1,0 mg mL⁻¹ dos diferentes micro-extratos obtidos a partir de frutos de *Eugenia* sp., *Psidium* spp. e *Myrcia* spp. foram ressolubilizados em metanol (grau HPLC) e água deionizada (90:10 v/v) e filtrados em membranas de PTFE de 0,22 µm. Após, foram analisadas em um Espectrômetro de Massas (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) com ionização do tipo *electrospray* e analisador do tipo *ion trap* nos modos positivo e negativo; a princípio no modo *fullscan*, com janela espectral entre 100-1000 *m/z*, em seguida, com janela reduzida para 100-800 *m/z*. Os dados de *fullscan* foram utilizados na análise quimiométrica.

O *fullscan* por DI-HRMS foi realizada utilizando-se um espectrômetro de massas MicroTOF-Q II híbrido quadrupolo *time-of-flight* (Bruker Daltonics®, Fremont, CA, USA) equipado com uma fonte de ionização por *electrospray* operando no modo negativo e positivo. As seguintes configurações instrumentais foram utilizadas: nitrogênio como gás em 2,0 bar; N₂ (fluxo de 8,0 L min⁻¹) a 200 °C; voltagem do capilar, 3,5 kV; *corrector fill*, 47 V; *pulser pull*, 778 V e *push* 780 V; *reflector*, 1,700 V; *flight tube*, 8,600 V; *corrector extract* 533 V; e detector qTOF, 1,969 V. A fase móvel: água/metanol (1:1) com 0,1 % ácido fórmico. Formiato de Amônio 3,0 mM foi usado somente no modo negativo. O instrumento foi calibrado com formiato de sódio. A aquisição foi feita com o software Bruker® Compass Data Analysis 4.1.

Após análise do perfil químico (*fullscan*) de cada extrato para verificar as possíveis classes químicas e suas polaridades, pôde-se, então, planejar as rampas cromatográficas (gradientes cromatográficos) para análise e separação cromatográfica descrita no item 4.8.2 a seguir. Os principais íons, os mais intensos e os de maior peso na modelagem quimiométrica foram submetidos a análise de fragmentação por DI-ESI-IT-MS/MS.

4.8.2 Análise cromatográfica por HPLC-DAD-MS/HRMS/ELSD

Antes da análise por UHPLC-DAD-HRMS (ESI -/+) foi desenvolvido um método de separação cromatográfica por HPLC-DAD-MS (APCI +/-). Foi utilizada a seguinte condição cromatográfica: metanol (A) e água (B) acidificada a 2 % ácido fórmico (v/v), gradiente de 0-10 min, isocrático a 10 % A, 10-30 min 40% A (2 % taxa) A, 30-40 min 70 % A (7 % taxa), 40-45 min 100 % e fluxo de 0,8 mL min⁻¹. Em seguida, o gradiente foi ajustado conforme a taxa de variação e tempo de retenção de cada substância de interesse.

As soluções dos extratos obtidas conforme descrito no item 4.4 foram diluídas a 1 mg mL⁻¹, utilizando-se os solventes da Fase Móvel (FM). Padrões de ácidos cítrico e ferúlico, miricetina, quercetina e apigenina foram analisados nas mesmas condições cromatográficas com intuito de identificar os constituintes presentes nas matrizes selecionadas mediante comparação dos parâmetros cromatográficos (tempo de retenção) e espectrométricos (*m/z*).

A análise cromatográfica dos extratos foi realizada utilizando um sistema de HPLC acoplado a um espectrômetro de massa TSQ (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, EUA) usando coluna Luna 5 µm C₁₈ (100 Å, 150 x 4,6 µm) com pós-coluna da mesma fase. A fase móvel consistiu de um sistema binário: água acidificada e metanol em modo gradiente com metanol (A) e água acidificada (B) a 2 % ácido fórmico (v/v): 10 a 60 % de A em 12,5 min; 60 a 100 % de A em 5 min; e 100 % A até 10 min. O volume de amostra da injeção foi de 10 µL. A taxa de fluxo foi mantida em 1,00 mL min⁻¹. A temperatura da coluna foi de 24,0 ± 0,1 °C e o forno foi mantido a 30,0 ± 0,1 °C. Os parâmetros da fonte de ionização (Ionização Química à Pressão Atmosférica - APCI) foram os seguintes: sonda (capilar), tensão 4,5 kV (modo positivo) e 3,8 kV (modo negativo); nitrogênio (30 psi); gás de secagem (5 psi); temperatura da fonte 250 °C; e lentes *offset* e tubulares capilares em 35 V e 75 V, respectivamente. A aquisição de dados foi realizada pelo software XCalibur® 2.0.7.

As análises em UHPLC-DAD-HRMS foram realizadas em cromatógrafo Shimadzu HPLC LC-20 A equipado com o Software Profile Data Analysis 2.1 (Bruker) e com detector de Massas por ESI: micrOTof Q-II, operando no modo Negativo e Detector: UV a 280 nm; Voltagem do Capilar: 3,5 eV.

Para a quantificação dos açúcares nas amostras de *Psidium*, UHPLC system (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) com detector Evaporative Light Scattering Detector (ELSD) 3300 (Alltech®, Sorocaba, São Paulo, Brazil). A coluna cromatográfica empregada foi do tipo aminada

da Phenomenex Luna® NH₂ (150 × 4.6 mm, 5 µm), com pré-coluna de mesma fase. O método foi adaptado de Ma, Sun, Chen, Zhang, and Zhu (2014): volume de injeção de 20 µL; fase móvel consistindo de acetonitrila/H₂O (40:10, v/v), flow rate de 0.30 mLmin⁻¹ em modo isocrático por 30 min. O detector de ELSD trabalhou em temperatura de 80 °C (drift tube temperature) e o fluxo de N₂ foi ajustado a 2 Lmin⁻¹. A aquisição dos dados foi feita com Chromeleon® 7.1.2 e tratamento com o programa Origin® 9.0.

- As condições cromatográficas para análise das amostras de *Psidium* por HPLC-DAD-HRMS:

Coluna Zorbax Eclipse Plus C₁₈ (2,1 mm x 150 mm x 3,5 µm); Temperatura da coluna: 40 °C; Fluxo: 0,5 mL min⁻¹; Solventes: Fase A: Água com Formiato de Amônia 0,1 mM e Fase B: Metanol; Gradiente: 0-20 min [10 – 30 % B], 21-45 min [30 – 80 % B], 46-60 min [80 – 100 % B].

- Análise por HPLC-DAD-HRMS dos extratos das espécies de *Myrcia* por HPLC-DAD-HRMS foram:

Coluna Luna 5 µm C₁₈ (150 mm x 4,6 mm), fluxo = 1,0 mL/min [Split 0,15 mL MS]; P = 1472 psi; volume de injeção = 10 µL; Gradiente: A: H₂O 2% ácido fórmico; B: MeOH LC: 0-12,5 min/10-60 %; 12,5-17,5 min/60-100 %; 17,5-27,5 min/100 %; 27,5-37,5 min/100-10 %; 37,5-48 min/10 %. A calibração foi realizada com solução de Formiato de Sódio.

- Condições de análise e preparo de amostra para quantificação de ácido L(+)-ascórbico:

As amostras liofilizadas e *in natura* de frutos foram homogeneizadas em solução extratora (pH 3,0) composta por ácido acético, ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), ácido sulfúrico (H₂SO₄), ácido *m*-fosfórico (MPA), em triplicata, em banho de gelo, utilizando-se um liquidificador comercial, baseando-se no método de extração de Ramos e colaboradores (2015). Cada extrato foi centrifugado por 5 min e filtrado em membrana de PTFE. Do sobrenadante, 500 µL foi homogeneizado em 500 µL da fase móvel (água acidificada com ácido fórmico 1 % (pH 3,5) e, 20 mM de (NH₄)₂HPO₄, MPA a 0,015 %), em seguida, foi submetido à análise por HPLC-DAD no modo isocrático por 7 minutos.

Coluna utilizada: Phenomenex Hydro-RP (150 mm x 4,5 mm, 4 µm); fluxo: 600 µL/min; volume de injeção: 10 µL, temperatura do forno: 25 °C e temperatura da prateleira contendo as

amostras: 4 °C; faixa do UV: 200 a 600 nm. O método de adição de padrão foi empregado a fim de confirmar o tempo de retenção do analito em análise.

As soluções-estoque do padrão de AA (1 mg mL^{-1}) foram preparadas em triplicata em cada dia de análise. As soluções-padrão de trabalho foram solubilizadas em água com 1% de MPA, e foram diluídas conforme necessário para obter concentrações finais de 1, 20, 40, 60, 80, 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A calibração foi feita a partir da injeção de solução padrão de ácido L-(+)-ascórbico em triplicata, em seis concentrações diferentes (1 a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) preparadas em solução de MPA 1%.

Para aqueles frutos cuja área do sinal do ácido ascórbico tenha ficado superior a área dos sinais da faixa de trabalho do padrão de AA, foram feitas novas diluições utilizando-se a fase móvel até que as áreas se adequassem a faixa de trabalho.

4.9 Análise por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A caracterização estrutural das substâncias de interesse deu-se principalmente por RMN [1D: ^1H e 2D: ^1H - ^{13}C HMBC (*Heteronuclear Multiple-Bond Correlation*) e HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*)] utilizando-se um espectrômetro Bruker Avance III HD, operando em 500,13 MHz para ^1H e 125,76 MHz para ^{13}C , equipado com sonda multinuclear de observação direta de 5 mm (BBO Plus Smart ProbeTM).

Todos os experimentos foram realizados a 298 K e foi feita a supressão de todas as bandas de sinal do próton da água residual usando as sequências de pulso zgpr e/ou noesygppr1d. O TMS ou TMSP- d_4 foram utilizados como referência interna (δ 0,00 ppm).

4.9.1 Quantificação por RMN de ^1H qHNMR (ERETIC2)

A quantificação por RMN de ^1H (qHNMR) foi realizada utilizando-se o método de calibração externa pelo ERETIC2 (*Electronic Referencing to Access In Vivo Concentrations*) que fornece resultados quantitativos precisos sem a necessidade de um padrão químico interno, ou de réplicas da amostra. Seguiu-se o Guia de Suporte do Usuário da Bruker. O ERETIC2 é uma medida indireta que consiste na conversão de um sinal de referência sintético criado eletronicamente, calibrado por um padrão de referência. Esse sinal é então usado para medir as concentrações absolutas de outros sinais de hidrogênio, de forma indireta.

A solução padrão de quinina (98 % de pureza), foi preparada em triplicata nas concentrações de 5,88 mM em CD₃OD e 1,90 mM em D₂O. O espectro de próton foi adquirido por um pulso simples, zg (90°), e, em seguida um experimento de noesygppr1d foi utilizado para a pré-saturação do sinal do hidrogênio da água (4,6 a 4,7 ppm). As configurações usadas para o espectrômetro Bruker® Avance III HD NMR foram as seguintes: TD 64 k, ns 20, DS 8, SW 10 kHz, AQ 3,28 s, D1 (7 * T1) a 298 K. O *Shimming* e o bloqueio foram realizados automaticamente para cada amostra. foi determinado o valor de P1 e T1 para cada amostra e para o padrão. As áreas de cada sinal foram escalonadas em relação ao número de núcleos de ¹H de cada molécula. As concentrações foram obtidas por cálculos únicos baseados na fórmula molecular de cada substância de forma automática pelo método Pulcon baseado no modo do CALCULO DE T1 (Relaxação por Inversão-Recuperação).

Os espectros de RMN de ¹H de matrizes complexas costumam fornecer pouca ou nenhuma informação estrutural quando há sobreposição de sinais ou quando a concentração dos constituintes está abaixo do limite de detecção da técnica. Em geral, quando se está analisando extrato bruto, a RMN de ¹H funciona muito bem para substâncias majoritárias, que muitas das vezes representam apenas uma pequena parte da composição química dessas matrizes complexas. Dessa forma, o uso de métodos estatísticos multivariados foi empregado para se extrair o máximo de informações desses espectros, independentemente da multiplicidade dos sinais, mas em função de sua variância. Desta forma, os espectros são distinguidos ou agrupados por semelhanças de acordo com o perfil espectral.

Métodos estatísticos multivariados foram utilizados com a finalidade de simplificar ou facilitar a interpretação das variáveis representadas pelas medidas espectrométricas e espectroscópicas. Dessa forma, pôde-se avaliar a relação entre as diversas variáveis medidas de um número determinado de medidas provenientes das análises dos perfis químicos de cada espécie estudada. Dessa forma, construiu-se índices ou variáveis alternativas que sintetizem a informação original dos dados, ou seja, construir grupos amostrais que apresentem similaridade entre si (ESBENSEN; SWARBRICK, 2018).

4.10 Processamento e análise multivariada dos dados obtidos por EM

Dos dados de *fullscan* obtidos por injeção direta em espectrômetro de massas de baixa resolução, foram utilizadas as médias espectrais relativas dos íons observados de cada amostra. Os arquivos foram importados do XCallibur (formato RAW) para o Excel (formato csv). No Excel, foi utilizado um MACRO para ajustar os dados de EM obtidos e criar uma matriz quadrada, ou seja, o macro permite atribuir valor igual a zero (m/z x intensidade) para aqueles valores de m/z ausentes em determinada amostra. Dessa forma, foi obtida uma matriz de dimensão 701 x 12 [variáveis (m/z) x amostras]. Essa matriz foi então importada para o software The Unscrambler™ versão 10.2 (CAMO software, Oslo, Norway) para realização da análise multivariada. Esses dados foram normalizados e transpostos, gerando uma nova matriz 12 x 701. A análise quimiométrica (Análise por Componentes Principais – PCA e Análise Hierárquica de Clusters – HCA). Na PCA foi utilizado o algoritmo SVD (Decomposição de Valor Singular) para pequenos fatores de dados, empregando-se *cross validation* em todos os casos (com peso 1,00 para todas as variáveis). Em seguida, avaliaram-se os agrupamentos amostrais por HCA a partir da matriz de dados obtida. Para análise por PLS foi utilizada a mesma matriz normalizada. Quando se tinha um número pequeno de amostras utilizou-se o algoritmo *Kernel*. Kernel é um algoritmo não-interativo e resulta em resultados melhores que outros para dados que possuem um número de amostras muito amplo e poucas variáveis, relativamente ('tall and thin' data).

Pré-processamento da matriz

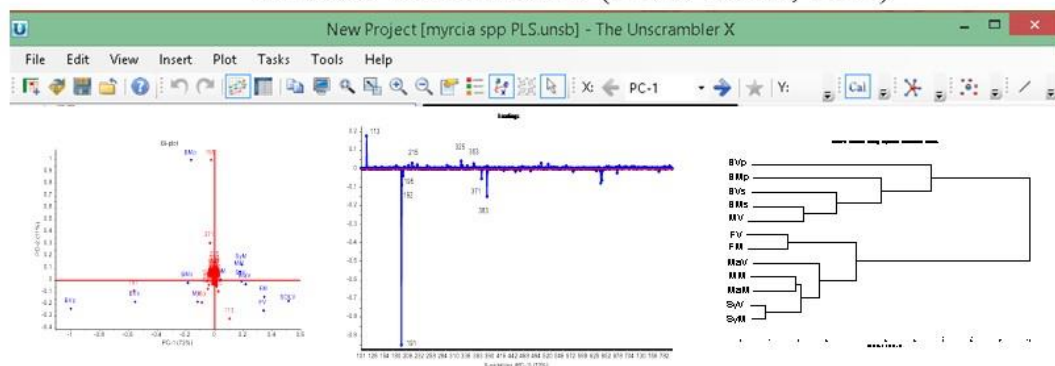
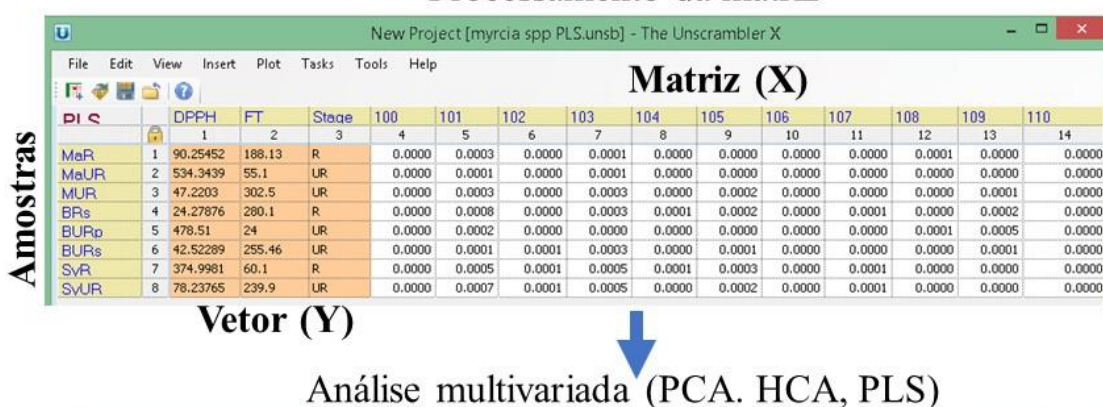
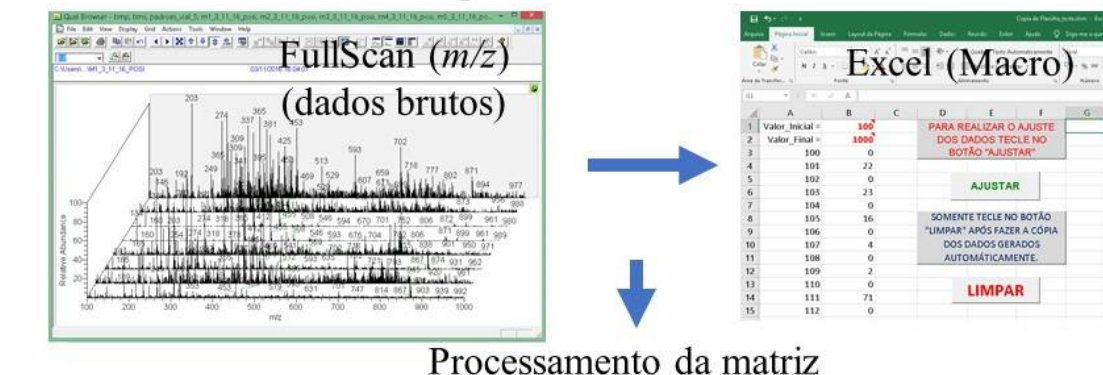


Figura 9 Sequência de obtenção, pré-processamento da matriz de dados e processamento para análise multivariada.

4.11 Processamento e análise multivariada dos dados obtidos por RMN

Os espectros de RMN de ^1H foram primeiramente tratados no software TopSpin 3.1, onde foi realizada a correção da linha de base e o ajuste de fase dos espectros através dos comandos `absn` e `apk`, respectivamente. Em seguida, os espectros foram convertidos a formato Excel com o

comando `convbin2csv` para serem exportados para o software RStudio (Versão 1.0.44) a fim de realizar o pré-processamento e construção das matrizes.

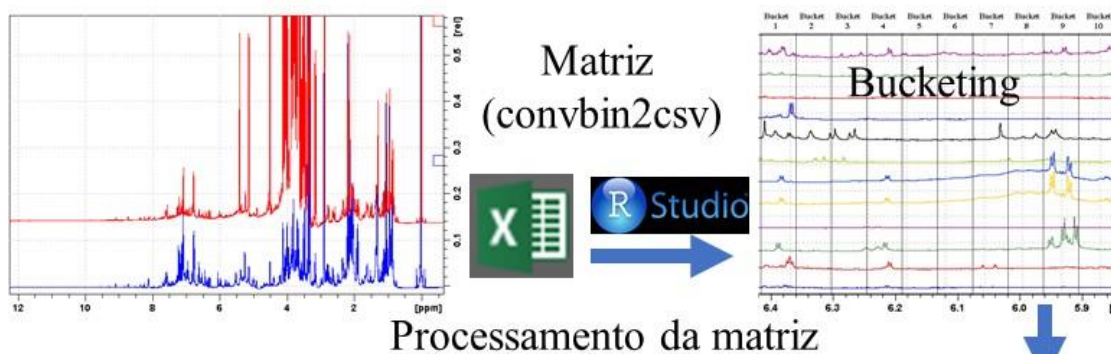
Os espectros de RMN de ^1H foram pré-processados com as devidas regiões de exclusão, como as regiões de supressão dos sinais de hidrogênio de água residual dos solventes de acordo com a **Tabela 2**. As intensidades espectrais foram dimensionadas ou normalizadas por ‘range’, ou seja, pela região do menor intervalo que contém todos os pontos de uma amostra dentro da região espectral, reduzindo as regiões integrantes de igual largura a um número inteiro.

Foram definidas janelas espectrais por regiões como descrito na **Tabela 2**. Em seguida, para submeter os espectros à análise quimiométrica, o número de variáveis foi reduzido dividindo-se os espectros em pequenos intervalos de 0,04 ppm cada, conhecidos como *buckets*, adotando-se um grau de liberdade de 50%. As intensidades absolutas dos sinais foram usadas para a integração das áreas dos *buckets* utilizando-se o método OBA (*Optimized Bucketing Algorithm*) para normalização das variáveis (*buckets*). Os *buckets* foram normalizados em relação à área total dos *buckets*. As áreas de cada *bucket* foram então utilizadas como variáveis de entrada nas análises quimiométricas por PCA, HCA e PLS. Os dados finais pré-tratados foram convertidos em arquivos ASCII e transferidos para análise multivariada em Software The Unscrambler.

A PCA foi aplicada aos dados de RMN de ^1H dos extratos aquosos e metanólicos para visualização da disposição amostral, e como ferramenta para observar a possível diferenciação entre amostras. A técnica de validação cruzada (*Cross Validation*) foi aplicada para determinar o número ideal de componentes principais (PCs) necessários. Dois métodos de pré-processamento foram aplicados no RStudio: escala de Pareto e OBA, obtendo-se a matriz Pareto; em um segundo pré-processamento, nenhuma escala foi testada para o conjunto de dados, dessa forma foi gerada a matriz não normalizada (MNN), com *bucket* de mesmo tamanho.

O mapa de PCA foi gerado considerando a *Mean Centered*, o algoritmo utilizado foi SVD, o método de validação foi o *Cross Validation* completo; o número de componentes solicitado foi de 7, porém o número de componentes foi otimizado, assim como o número utilizado para o Teste de Incerteza e de *prediction/projection/classification* para cada matriz de dados. O agrupamento hierárquico (HCA) foi feito de acordo com o método de minimização de variância de Ward (ESBENSEN; SWARBRICK, 2018).

Pré-processamento da matriz



Processamento da matriz

nareff		DPPH	TPC	GNO	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
MaR	1	90.2545	188.1300	13.0000	0.2056	0.1586	0.2344	0.1171	-0.0140	-0.1031	0.1050	-0.0833	-0.1496	0.2971
MaUR	2	534.3439	55.1000	95.3000	0.0239	-0.0439	-0.0615	-0.0948	-0.1674	-0.1210	-0.0628	-0.0769	-0.1871	-0.0492
BRp	3				0.6973	0.5812	0.5765	0.5252	0.4723	0.3854	0.4160	0.4125	0.2187	0.5122
BRs	4	24.2788	280.1000	9.5000	0.0279	-0.1316	0.0002	0.1920	0.1936	-0.2713	-0.2975	-0.3799	-0.3921	-0.3275
BURp	5	478.5100	24.0000	76.8000	0.6860	0.5840	0.5002	0.5704	0.3227	0.3227	0.3603	0.2598	0.1888	0.4685
BURs	6	42.5229	255.4600	8.5000	-0.3412	-0.2381	-0.3555	-0.2765	-0.2614	-0.2764	-0.3555	-0.3387	-0.3197	-0.4216
FR	7				0.2541	0.3496	0.2280	0.2751	-0.0190	0.0032	0.1202	-0.1026	-0.2726	0.4584
FUR	8	49.0200	182.1400	13.9000	0.9047	0.9173	0.7430	0.8827	0.8640	0.6763	0.5837	0.5897	0.6709	0.4161
MR	9				-0.5530	-0.4981	-0.4234	-0.4620	-0.4084	-0.3003	-0.3050	-0.2369	-0.0830	-0.3266
MUR	10	47.2203	317.4000	3.9000	-0.4286	-0.2875	-0.3217	-0.0797	-0.0412	0.0952	0.0189	0.1693	0.3744	-0.2176
SvR	11	374.9981	60.1000	29.9000	0.6286	0.4977	0.5352	0.5308	0.4473	0.3555	0.3504	0.3196	0.2379	0.4870
SvUR	12	78.2377	239.9000	9.2000	0.1402	0.0992	0.0950	0.0836	-0.0370	-0.1470	-0.1080	-0.1785	-0.2967	0.1306

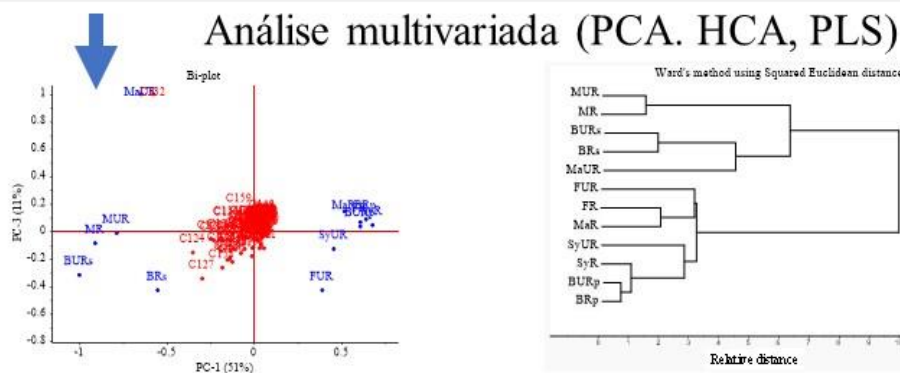


Figura 10 Sequência de obtenção, pré-processamento da matriz de dados e processamento para análise multivariada.

A fim de eliminar o efeito de magnitude das variações de intensidade, aplicou-se a normalização por SNV utilizando o software The Unscrambler. Isto é importante no caso dos dados de RMN, pois os espectros de ^1H podem apresentar ruídos que podem atrapalhar a interpretação no momento em que for feita a análise quimiométrica desses dados. Isso causa interferência nas análises comparativas e de normalização devido aos ruídos serem confundidos com sinais, ou mesmo, pela diferença de intensidades. Os modelos quimiométricos não foram validados, pois o método não exige.

Tabela 2 Informações sobre parâmetros de pré-processamento dos dados de RMN de ^1H para obtenção da matriz Pareto e MNN

Janela espectral (ppm)	Bucket (ppm)	Sequência de pulso para pré-saturação	Regiões de exclusão (ppm)	Transformação/alinhamento espectral/Validação
0,2-11	0,04	zgpr, noesygppr1d	Água: 4,68-4,75; H residual DMSO: 4,6-4,5	Algoritmo: SVD; matriz: Pareto; alinhamento por SNV, Derivatização por Savitzky-Golay, Normalização por 'Range'
Região 1 (0,2-3,0)			CD ₃ OD: 3,28-3,31 e 4,5-5 D ₂ O: 4,7-4,9	Algoritmo: SVD e/ou Kernel; Validação por Cross validation; Matriz MNN: alinhamento por SNV e Normalização por 'Range'; Matriz: pareto; SNV; Varimax; OSC usando <i>Non-linear Iterative Partial Least Squares algorithm</i> (NIPALS); PLS
Região 2 (3,0-5,5)				
Região 3: (5,5-11,0)				
Região 1M: (0,2-3,03)				
Região 2M: (3-5, 5)				
Região 3M: (5,5-12)				

Temperatura fixada em 300 K; RG padronizado; tamanho do bucket: 0,04 ppm; grau de liberdade dos buckets: 50%;

4.12 Encapsulamento do suco dos frutos de *E. punicifolia*

A amostra YP foi escolhida para a preparação de suco fresco filtrado [1:3 (polpa:água) m/v, preparada com liquidificador] devido ao seu estágio maduro, que contém substâncias flavonoides. As maltodextrinas (2,5 g) de diferentes equivalentes de dextrose (ED10, ED20 ou ED30) foram homogeneizadas com alginato de sódio (AS) (15 mg mL⁻¹) e 50 mL do suco fresco usando um homogeneizador Ultra Stirrer® ultra-380 (IKA, Alemanha) durante 5 min. Em seguida, estas soluções foram adicionadas gota a gota à solução de incorporação de cápsulas (solução de cloreto de cálcio) utilizando uma bureta de 50 mL à distância de 10 cm de altura. As cápsulas foram secas usando papel absorvente a 25 °C e, em seguida, pesadas. Cada grupo de cápsula recebeu o código referente ao alginato de sódio (A) e a matodextrina (M) e seus respectivos ED, desta forma: AM10, AM20 e AM30.

Alíquotas de suco fresco filtrado foram homogeneizadas em solução de cloreto de cálcio contendo AS e utilizadas como amostra controle. As cápsulas contendo apenas água (sem suco encapsulado) foram preparadas e testadas como amostras em branco (Branco 10, Branco 20 e Branco 30) para os ensaios de FT, ABTS, DPPH e antiglicante.

Em seguida, a atividade antiglicante do suco fresco foi avaliada (EL-AASSAR; HAFEZ; EL-DEEB; FOUDA, 2014). Para o ensaio antioxidante (FT, DPPH, ABTS) e o ensaio antiglicante, as cápsulas foram novamente solubilizadas em solução tamponada (pH 7,0, 1 mg mL⁻¹).

4.12.1 Eficiência de Encapsulação (EE)

A eficiência de encapsulação (EE) das substâncias bioativas foi analisada por espectroscopia UV-visível (Global Trade Technology, modelo UV-5100) com base em estudos previamente relatados, com algumas modificações (CAMPELO; DO CARMO; ZACARIAS; YOSHIDA *et al.*, 2017; LAVELLI; SRI HARSHA, 2018). Uma curva de calibração foi previamente desenvolvida com diferentes concentrações de suco fresco em água destilada (0,39 a 200 ppm) considerando o pico máximo de absorção em $\lambda = 228$ nm. As medidas foram realizadas em triplicata. As áreas médias dos picos para cada concentração foram plotadas como absorbância x concentração de suco. O coeficiente de correlação linear foi calculado pela análise de regressão linear ($R^2 = 0,9932$) utilizando-se a equação da reta abaixo.

$$Y = 0,2546x - 0,3920$$

Em seguida, a EE foi estimada relacionando o conteúdo de substâncias bioativas no interior das cápsulas após a microencapsulação, em função do teor de substâncias bioativas na amostra inicial de suco, conforme a Equação a seguir:

$$EE (\%) = (SB_m/SB_{\text{suco}}) \times 100$$

Onde, SB_m significa Substâncias Bioativas nas microcápsulas e, SB_{suco}, Substâncias Bioativas no suco.

4.12.2 Eficiência de Retenção (ER)

A eficiência de Retenção (ER) das microcápsulas (AM 10, AM20 e AM30) foi determinada pela diferença de concentração de Fenólicos Totais (FT) no suco fresco antes de encapsulação

(SBsuco FT) e FT do suco fresco encapsulado (SBencap FT). A análise de FT das cápsulas foi realizada usando-se um espectrômetro de UV (Global Trade Technology, model UV-5100), solubilizando-se as amostras das cápsulas em etanol. O teor de ER foi calculado de acordo com a Equação abaixo.

$$\text{ER (\%)} = (\text{SB}_{\text{encapFT}}/\text{SB}_{\text{sucoFT}}) \times 100$$

4.13 Análise estatística

A distribuição dos dados foi avaliada usando-se o teste de normalidade empregando-se o teste Shapiro-Wilk que verifica o quão normal ou homogênea a distribuição dos dados de uma determinada população amostral está, levando-se em consideração a ‘hipótese-nula’, que avalia a modelagem de amostras com variáveis randomizadas em função de algum processo de análise. Os resultados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão. A comparação de dados múltiplos, cuja distribuição é normal, foi realizada usando análise paramétrica de variância (One-Way ANOVA) seguida de teste Tukey com um nível de significância de 95 % (GHOSH; GHOSH, 2017). Os coeficientes de correlação de Pearson foram obtidos com $p < 0,05$. O software Minitab® 18.1 foi utilizado nessas análises.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A identificação estrutural das substâncias presentes nos frutos de Myrtaceae foi realizada em mistura com base na interpretação dos dados de RMN (^1H , ^{13}C , HSQC, HMBC e COSY ^1H - ^1H) e Espectrometria de Massas [ESI (-/+) MS/MS]. Empregou-se sistemas UHPLC-DAD-ESI-qTOF-MS e HPLC-DAD-MS na identificação das substâncias minoritárias.

Os dados espectrais foram comparados com descritos na literatura e/ou reportados no *software* online (www.nmrdb.org) ou biblioteca Aldrich (POUCHERT; BEHNKE, 1993).

5.1 Caracterização química dos frutos de *Psidium acutangulum*

A composição química majoritária de frutos de *P. acutangulum* foi realizada por Ramos e colaboradores (2015). Nesse estudo prévio foram identificadas por RMN e Espectrometria de Massas as substâncias glicosídicas (glicose, frutose e sacarose), bem como os ácidos cítrico e málico presentes no extrato etanólico desse fruto. Pelo método de injeção direta (ESI-IT-MS/MS) foi possível propor a ocorrência de alguns constituintes minoritários como substâncias fenólicas, triterpenos e ácidos orgânicos. Com o objetivo de confirmar a presença das unidades glucosídicas presentes no extrato etanólico de *P. acutangulum* desenvolveu-se um método de separação cromatográfico hifenado a um detector de espalhamento de luz (UHPLC-ELSD) e, para identificação das substâncias minoritárias fez-se uso de UHPLC-DAD-ESI-qTOF-MS.

5.1.1 Análise cromatográfica dos constituintes majoritários de *Psidium acutangulum* por UHPLC-ELSD

Os constituintes majoritários dos frutos de *P. acutangulum* foram separados por UHPLC-ELSD, sendo possível separar açúcares D-frutose, D-glicose e sacarose, cujos tempos de retenção foram comparados com os padrões autênticos (**Figura 11**). Há relatos da presença desses três glicosídeos em frutos de *P. acutangulum* (SOARES; PEREIRA; MARQUES; MONTEIRO, 2007).

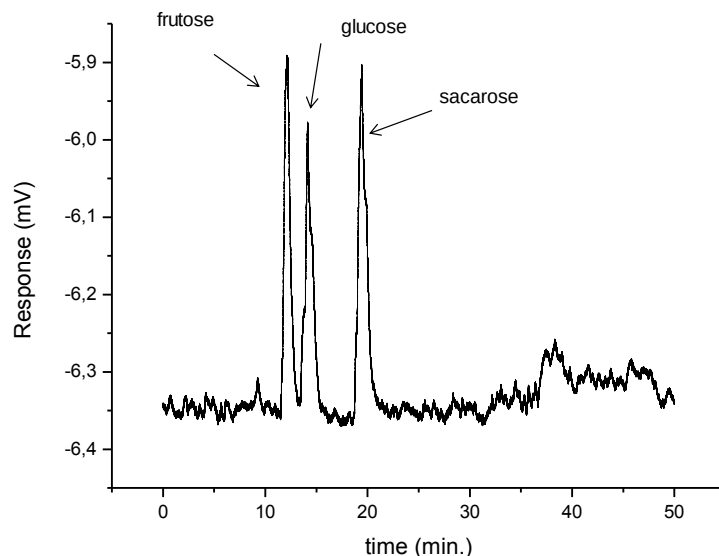


Figura 11 Cromatograma obtido por UHPLC-ELSD com a separação dos açúcares (D-frutose, D-glucose e a sacarose) da fração aquosa obtida do extrato etanólico dos frutos inteiros de *P. acutangulum*.

5.1.2 Identificação dos constituintes minoritários de frutos de *Psidium acutangulum* por UHPLC-DAD-HRMS

As frações dos extratos etanólicos de *P. acutangulum* foram analisados por UHPLC-HRMS, cuja interpretação dos resultados possibilitou identificar 16 (dezesesseis) substâncias (**Figura 12**). A substância com tempo de retenção (tr) de 13,4 min apresenta fragmentação do íon molecular de m/z 357,0817 $[M-H]^-$ ($C_{15}H_{17}O_{10}$, 0,2 ppm), gerando o íon fragmento m/z 195 $[M-H-162]^-$, correspondente a perda de uma unidade hexose (162 Da). A análise espectral sugere a presença do ácido 3-[4-(β -D-glicopiranosiloxi)-3,5-hidroxifenil]-2-propenoico. Uma substância similar foi identificada por HPLC-HRMS em frutos de *Citrullus lanatus* como ácido 3-[4-(β -D-glucopiranosiloxi)-3,5-dimetoxifenil]-2-propenoico (ácido sinapico 4-O-glucosídeo) (ABU-REIDAH; ARRAEZ-ROMAN; SEGURA-CARRETERO; FERNANDEZ-GUTIERREZ, 2013).

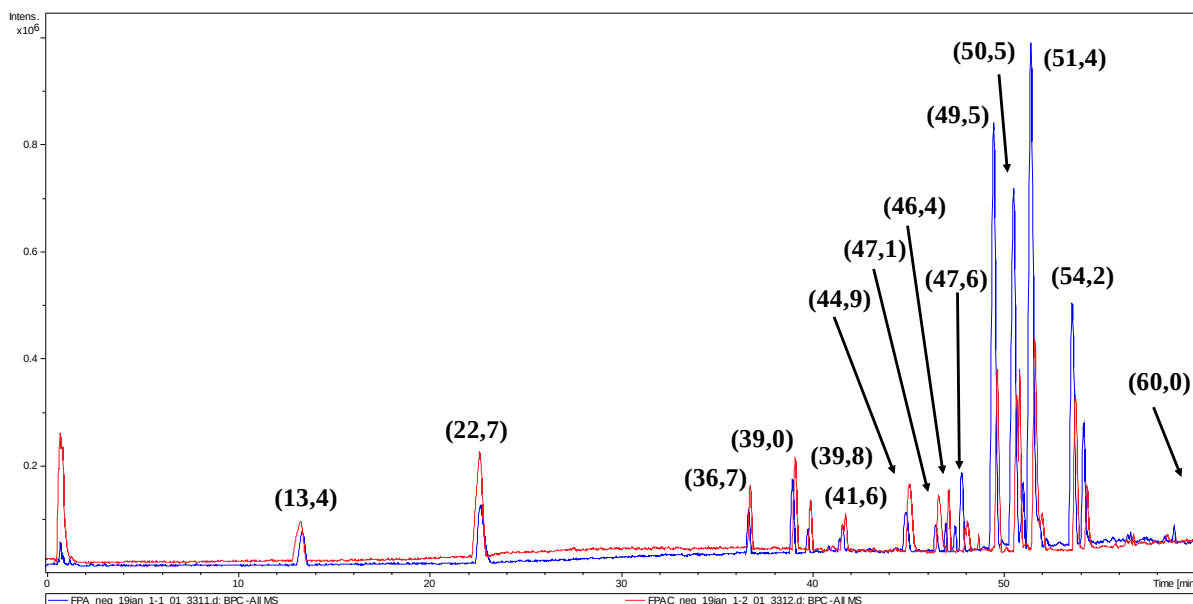


Figura 12 Perfil químico obtido por UHPLC–HRMS das frações FPA2 (linha azul) FPAC2 (linha vermelha) dos extratos etanólicos do fruto inteiro de *P. acutamgulum* (PA); TR (tempo de retenção em minutos) e erro em ppm: ácidos guavenoico (TR 36,7: $C_{30}H_{45}O_6-H$, -5,7), madecassico (TR 39,0: $C_{30}H_{47}O_6-H$, -5,8 ppm), annurcoico (TR 39,8: $C_{30}H_{45}O_5-H$, -5,7), ácido asiático (TR 41,6: $C_{30}H_{47}O_4-H$, -5,5), e 2- α -hidroxiursolico (TR 47,6: $C_{30}H_{47}O_4-H$, -4,0); ácidos α -linolenico (TR 47,6: $C_{18}H_{29}O_2-H$, 1,1), linoleico (TR 49,5: $C_{18}H_{31}O_2-H$, 7,3), palmítico (TR 50,5: $C_{16}H_{31}O_2-H$, 6,8), oleico (TR 51,4: $C_{18}H_{33}O_2-H$, 7,8), esteárico (TR 54,2: $C_{18}H_{35}O_2-H$, 2,3), e lignocérico (TR 60,0: $C_{24}H_{48}O_2-H$, 0,9).

O ácido sinápico e derivados ocorrem em frutos de *Psidium friedrichsthalianum* (araça-da-costa-rica) (FLORES; DASTMALCHI; WU; WHALEN *et al.*, 2013). A substância em TR 22,7 minutos apresenta íon molecular de m/z 509,1236 $[M-H]^-$ ($C_{22}H_{21}O_{14}$, -4,0), cuja fragmentação gera o íon de m/z 357 $[M-H-152]^-$ atribuído a perda de um fragmento galoil e identificado como éster 1,1'-[(1*R*,2*S*,3*R*,5*R*)-3,5-dihidroxi-5-(metoxicarbonil)-1,2-ciclohexanedil. Estas duas substâncias estão sendo reportadas pela primeira vez nesta espécie. Derivados de ácidos gálico e cinâmico são ocorrentes em espécies de Myrtaceae (BALCKE; HANDRICK; BERGAU; FICHTNER *et al.*, 2012; FLORES; WU; NEGRIN; KENNELLY, 2015; MARTINS DE SA; CASTRO; LINO; BERNARDES *et al.*, 2014; RAMOS, A. S.; SOUZA, R. O. S.; BOLETI, A. P. D.; BRUGINSKI, E. R. D. *et al.*, 2015; ZHU; LIU; ZHAN; LIU *et al.*, 2013; ZLOTEK; SWIECA; JAKUBCZYK, 2014).

Foram identificados os ácidos guavenoico ($C_{30}H_{45}O_6-H$, -5,7), madecássico ($C_{30}H_{47}O_6-H$, -5,8), annurcoico ($C_{30}H_{45}O_5-H$, -5,7), ácido asiático ($C_{30}H_{47}O_5-H$, -5,5) e o 2- α -hidroxiursólico ($C_{30}H_{47}O_4-H$, -4,0). A análise espectral MS/MS do ácido annurcoico referente ao íon m/z 487

$[M+H]^+$ (15%) gera o fragmento m/z 441 $[M+H-H_2O-CO]^+$ (55%), 335 $[M+H-C_9H_{12}O_2]^+$ (47%), e 315 $[M+H-C_9H_{16}O_3]^+$ (100%). O padrão de fragmentação dos íons em m/z 315 e 335 sugerem ser devido as perdas dos anéis A e E (Figura 13), respectivamente, permitindo propor um triterpenoide do tipo ursano. Estudos prévios de cultivares de *P. guajava* cultivares revela a presença desses triterpenoides, exceto o ácido annurcoico que foi detectado pela primeira vez nesse gênero (FLORES; WU; NEGRIN; KENNELLY, 2015). Triterpenoides tipo ursano como os ácido guajavolideo, guavenoico e o guajavanoico (*p*-hidroxicinamoil éster) são comumente isolados de espécies de *Psidium* (BEGUM; HASSAN; SIDDIQUI, 2002; SHU; CHOU; WANG, 2009). Assim como, os triterpenos tipo ácido di-, tri-, e tetrahidroxi-urs-12-en-28-oico que apresentam atividades antioxidante, citotóxica, anti-inflamatória e antitumoral (BEGUM; ALI; TAUSEEF; ALI *et al.*, 2014; D'ABROSCA; FIORENTINO; MONACO; ORIANO *et al.*, 2006; SHU; CHOU; WANG, 2010; SHU; LIU; CHOU; WANG, 2012).

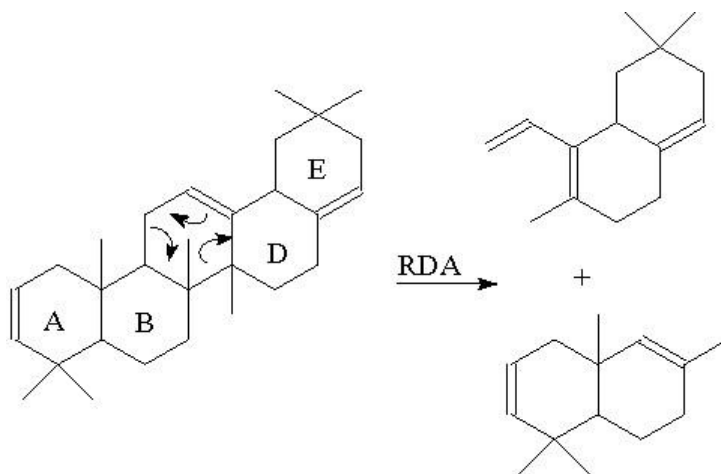
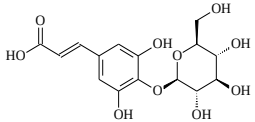
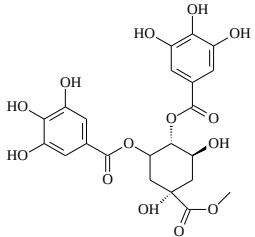


Figura 13 Esquema geral de fragmentação de esqueleto triterpênico por Retro-Diels-Alder

A análise por UHPLC-HRMS das frações de extratos etanólicos de *P. acutangulum* também permite sugerir a presença de ácidos lipofílicos pelos sinais observados em tempos de retenção: como ácidos α -linolenico ($C_{18}H_{28}O_2$, 1,1), linoleico ($C_{18}H_{30}O_2$, -7,3), palmítico ($C_{16}H_{30}O_2$, 6,8), oleico ($C_{18}H_{32}O_2$, -7,8), esteárico ($C_{18}H_{34}O_2$, -2,3), e lignocérico ($C_{24}H_{47}O_2$, 0,9). Há relatos da ocorrência desses ácidos graxos em sementes das espécies *Psidium cattleianum* Sabi. e *P. guajava*, sendo o ácido linoleico o mais abundante (81,38 % e 76,4 %, respectivamente) (KOBELNIK; CASSIMIRO; SANTOS DIAS; RIBEIRO *et al.*, 2012; PRASAD; AZEEMODDIN, 1994). A **Tabela 3** apresenta as substâncias identificadas e seus relatos.

Tabela 3 Perfil químico dos constituintes químicos determinados em frutos de *P. acutangulum*

Substância	T.R. (min) *	[M-H] ⁻ ou [M-H+HCOOH] ⁻ (F.M, erro (ppm))	EM ⁿ (m/z)	Observação
 Ácido 3-[4-(β-D-glucopiranosiloxano) - 3,5-hidroxifenil]-2-propenoico	13,4	357,0817 [M-H] ⁻ (C ₁₅ H ₁₇ O ₁₀ , 0,2); 195,0296 [M-H-C ₆ H ₁₀ O ₅] ⁻ (C ₉ H ₇ O ₅ , 1,3)	EM ² [357 (38)]: 195 [M-H-162] ⁻ (100), 237 [M-H-120] ⁻ (25); EM ² [359 (45)]: 341 [M+H-18] ⁺ (100), 313 [M+H-HCOOH] ⁺ (24)	Detectado pela primeira vez no gênero.
 Éster 1,1'-[(1R,2S,3R,5R)-3,5-Dihidroxi- 5-(metoxycarbonil)-1,2-ciclohexanedil	22,7	509,0905 [M-H] ⁻ (C ₂₂ H ₂₁ O ₁₄ , -4,0)	EM ² [509 (6)]: 481 [M-H-28] ⁻ (56), 357 [M-H-152] ⁻ (38), 313 [M-H-196] ⁻ (54), 195 [M-H-314] ⁻ (100); EM ³ [357 (28)]: 195 [M-H-162] ⁻ (100)	Detectado pela primeira vez no gênero.
Ácido guavenoico	36,7	501,3182 [M-H] ⁻ (C ₃₀ H ₄₅ O ₆ , -5,7); 547,3225 [M-H+HCOOH] ⁻ C ₃₁ H ₄₇ O ₆ , 7,3)	EM ² [503 [M+H] ⁺ (<1)]: 485 [M+H-H ₂ O] ⁺ (70), 467 [M+H-2H ₂ O] ⁺ , 449 [M+H-3H ₂ O] ⁺ (15)	Reportado no gênero (FLORES; WU; NEGRIN; KENNELLY, 2015).
Ácido madecassico	39,0	503,3338 [M-H] ⁻ (C ₃₀ H ₄₇ O ₆ , -5,8); 549,3389 [M-H+HCOOH] ⁻ (C ₃₁ H ₄₉ O ₆ , 7,0)	nd	Reportado no gênero (FLORES; WU; NEGRIN; KENNELLY, 2015).

Ácido annurcoico	39,8	485,3234 [M-H] ⁻ (C ₃₀ H ₄₅ O ₅ , -5,7); 531,3281 [M-H+HCOOH] ⁻ (C ₃₁ H ₄₇ O ₅ , 7,6)	EM ² [487 [M+H] ⁺ (15)]: 441 [M+H-H ₂ O]-CO ⁺ (52), 335 [M+H-C ₉ H ₁₂ O ₂] ⁺ (47), 315 [M+H-C ₉ H ₁₆ O ₃] ⁺ (100)	Detectado pela primeira vez no gênero,
Ácido asiático	41,6	487,3391 [M-H] ⁻ (C ₃₁ H ₄₇ O ₅ , -5,5); 533,3436 [M-H+HCOOH] ⁻ (C ₃₁ H ₄₇ O ₅ , 7,9)	Nd	Reportado no gênero (FLORES; WU; NEGRIN; KENNELLY, 2015).
Ácido α-linolênico	47,6	277,2165 [M-H] ⁻ (C ₁₈ H ₂₉ O ₂ , 1,1)	EM ² [471 (32)]: 453 [M-H-H ₂ O] ⁻ (42), 427 [M-H- CO ₂] ⁻ (22), 423 (100)	Reportado no gênero (KOBELNIK; CASSIMIRO; SANTOS DIAS; RIBEIRO <i>et al.</i> , 2012); Reportado no gênero (BEGUM; HASSAN; SIDDQUI; SHAHEEN <i>et al.</i> , 2002).
Ácido 2α-hidroxiursólico		471,3450 [M-H] ⁻ (C ₃₀ H ₄₇ O ₄ , -4,0); 517,3499 [M-H+HCOOH] ⁻ (C ₃₁ H ₄₉ O ₆ , 5,8)		
Ácido linoleico	49,5	279,2339 [M-H] ⁻ (C ₁₈ H ₃₁ O ₂ , 7,3)	EM ² [279 (30)]: 261 [M-H-H ₂ O] ⁻ (100)	Reportado no gênero (KOBELNIK; CASSIMIRO; SANTOS DIAS; RIBEIRO <i>et al.</i> , 2012)
Ácido palmítico	50,5	255,2336 [M-H] ⁻ (C ₁₆ H ₃₁ O ₂ , 6,8)	Nd	Reportado no gênero (KOBELNIK; CASSIMIRO; SANTOS DIAS; RIBEIRO <i>et al.</i> , 2012)
Ácido oleico	51,4	281,2497 [M-H] ⁻ (C ₁₈ H ₃₃ O ₂ , 7,8)	nd	Reportado no gênero (KOBELNIK; CASSIMIRO; SANTOS

				DIAS; RIBEIRO <i>et al.</i> , 2012)
Ácido esteárico	54,2	283,2638 [M-H] ⁻ (C ₁₈ H ₃₅ O ₂ , 2,3)	Nd	Reportado no gênero (KOBELNIK; CASSIMIRO; SANTOS DIAS; RIBEIRO <i>et al.</i> , 2012)
Ácido lignocérico	60,0	367,3574 [M-H] ⁻ (C ₂₄ H ₄₇ O ₂ , 0,9)	Nd	Reportado no gênero (PRASAD; AZEEMODDIN, 1994)

***TR**= Tempo de Retenção baseado no cromatograma da **Figura 12** (linha azul); **F.M.** = Fórmula Molecular; nd= não determinado.

5.2 Capacidade antioxidante dos extratos de frutos de *Psidium* spp.

Os frutos de *P. acutangulum* foram testados pelo método de Atividade Antioxidante Celular (CAA) que mimetiza as condições biológicas do sistema inibindo as espécies reativas de oxigênio (ROS) na célula. A viabilidade celular foi examinada pelo ensaio Alamar Blue para determinar a citotoxicidade dessas amostras.

Os valores de CAA para os extratos liofilizados foram resumidos na **Tabela 5**. Valores de ROS inibitório entre 76 e 91 % ($0,625\text{--}5\ \mu\text{g mL}^{-1}$) para todas as amostras, estes valores são semelhantes à quercetina ($90,4 \pm 2,8\%$) e aproximado para o ácido ascórbico ($100,0 \pm 0,5\%$) ($p < 0,05$). A análise *in vitro* do extrato etanólico dos frutos de *P. acutangulum* apresentou CAA entre 82 e 100 %, muito semelhante ao do ácido ascórbico ($93,9 \pm 1,5\%$) e ao da quercetina ($89,5 \pm 0,9\%$), e melhor que o do ácido cítrico ($78,4 \pm 0,7\%$) ($p < 0,05$).

Tabela 4 Resultados da capacidade antioxidante dos extratos de *Psidium* spp.

	CAA (%)
PAM	88,6–88,9 ^a
PAMcasca	76,8–88,6 ^a
PAM(p+s)	84,9–90,6 ^a
PAMs	86,8–87,5 ^a
Quercetina	$90,4 \pm 2,8^a$
Ácido ascórbico	$100,0 \pm 0,5^b$
Citotoxicidade (uM) >100	

Em um estudo prévio realizado por Ramos e colaboradores (2015) verificou-se que os frutos de *P. acutangulum* apresentam capacidade antioxidante frente ao radical livre DPPH (epicarpo: $191,98 \pm 3,20$; endocarpo: $406,52 \pm 26,42$; fruto inteiro: $332,17 \pm 36,30$; e resíduos de sementes: $41,29 \pm 1,72$ g de FF/g de DPPH[•]). Esses resultados foram inversamente proporcionais aos teores de fenólicos (epicarpo: $603,61 \pm 11,77$; endocarpo: $315,13 \pm 68,49$; fruto inteiro: $481,77 \pm 22,60$ e resíduo de sementes: $785,68 \pm 86,63$ mg EAG 100g^{-1} de fruto) e de flavonoides totais (epicarpo: $46,1 \pm 3,4$; endocarpo: $17,1 \pm 2,6$; fruto inteiro: $25,7 \pm 4,2$ e resíduo de sementes: $82,7 \pm 3,7$ mg

100g⁻¹ de fruto). O extrato hidroalcoólico (P.A.) dos frutos *in natura* apresentou potenciais antioxidantes frente aos radicais livres ABTS^{•+} e DPPH[•] de 7,32 ± 0,36 e 34,50 ± 0,12 µg mL⁻¹, respectivamente.

Comparando esses valores com os descritos na literatura para frutos de *Psidium guajava* L., cujo capacidade antioxidante foi avaliado por DPPH (10,28 µg FF/µg de DPPH) e FRAP (78,56 µM Trolox (TE)/g FF) para goiaba branca e (7,82 µg FF/µg de DPPH) e (111,06 µM TE/g FF) para goiaba vermelha. Fenólicos Totais de (145,52 e 163,36 mg (AGE)/100 g FF) e Flavonoides Totais de (19,06 e 35,85 mg catequina equivalente (CE)/100 g FF), respectivamente (THUAYTONG; ANPRUNG, 2011).

Essas 16 substâncias foram identificadas pela primeira vez nos frutos de *P. acutangulum* (araçá-pera), dentre as quais três delas são descritas pela primeira vez neste gênero. Os frutos de *P. acutangulum* revelam capacidade antioxidante melhor em comparação com o *P. friedrichsthalianum* (araçá-da-costa-rica) e o *P. guajava* (goiaba comum). Este potencial é reflexo do elevado teor de ácido ascórbico *in natura*, quantificado por HPLC-MS, bem como a presença de outras substâncias antioxidantes (fenólicos e ácidos graxos, cítricos, anurcoicos e ácidos linolênico, linoleico e oleico). Portanto, os frutos de *P. acutangulum* podem ser consumidos *in natura* como fonte nutracêutica de vitamina C e ácido cítrico, além de poderem ser utilizados na fabricação de alimentos funcionais para a dieta humana.

5.3 Diferenciação colorimétrica dos frutos de *E. punicifolia*

A princípio, os frutos foram selecionados de acordo com sua coloração, que normalmente, indica também, o estágio de maturação de um fruto. Os parâmetros (L, a*, b*), C (*chroma*), e h° (*hue angle*) foram medidos. Os parâmetros de cor (L, a*, b*, C e h) foram significativamente diferentes para cada estágio de maturação dos frutos de *E. punicifolia* (**Tabela 5**). Os frutos nos estágios amarelo e verde apresentaram maiores valores de b*, C e L. Esses valores diminuem à medida que o fruto amadurece e se aproxima do estágio vermelho. Nesta fase, o teor de açúcar aumentou significativamente.

Tabela 5 Parâmetros colorimétricos da análise de cor das polpas dos frutos frescos de *Eugenia punicifolia* usando Sistema CIELAB.

Amostra	Cor	L	a*	b*	C	h
EPGP	Verde	34,44 ± 0,24 ^b	-4,29 ± 1,11 ^c	29,69 ± 0,95 ^b	30,05 ± 0,89 ^a	98,26 ± 2,26 ^a
EPYP	Amarela	43,49 ± 2,73 ^a	14,75 ± 1,13 ^b	47,80 ± 2,13 ^a	49,57 ± 2,04 ^b	74,73 ± 2,26 ^b
EPOP	Alaranjada	30,60 ± 2,26 ^b	18,80 ± 2,64 ^b	26,86 ± 5,45 ^b	33,03 ± 3,71 ^b	56,04 ± 5,96 ^c
EPRP	Vermelha	21,09 ± 0,64 ^c	23,12 ± 0,46 ^a	14,61 ± 0,40 ^c	27,35 ± 0,60 ^b	32,34 ± 0,23 ^d

Valores dos parâmetros em uma mesma coluna seguidos de uma mesma letra não são diferentes estatisticamente, $p < 0,05$ usando teste Tukey. As letras representam a coloração e o estágio fenológico: (R) red (vermelho); (O) orange (laranja); (Y) yellow (amarelo); (G) green (verde); EP = *Eugenia punicifolia*; P = polpa

Quando há um aumento na concentração de pigmentos, os valores dos parâmetros a* podem ser afetados. A coloração pode ser um fator importante para a tipificação de frutos com variação de cor, pois os parâmetros b*, C e L estão relacionados à composição química e ao tempo de maturação dos frutos (GOULAS; MINAS; KOURDOULAS; LAZARIDOU *et al.*, 2015). Portanto,

o ensaio colorimétrico contribuiu para a seleção das amostras de frutos, identificando os quatro estágios fenológicos com sua variedade de cores ao longo do processo de maturação.

5.4 Análise do perfil químico e identificação das substâncias dos frutos de *Eugenia punicifolia* por RMN, HPLC-DAD-MS e DI-HRMS

Os espectros de RMN de ^1H foram adquiridos em dois tipos de solventes deuterados (CD_3OD e D_2O) e foram divididos em três faixas espectrais: Região 1: δ 0,2–3 (rica em sinais alifáticos), Região 2: δ 3,0–5,5 (rica em sinais carbinólicos) e Região 3: δ 6–11 (rica em sinais aromáticos). Os espectros de RMN de ^1H adquiridos em CD_3OD apresentaram maior quantidade de sinais e de maior intensidade na região aromática que as amostras adquiridas em D_2O . Os espectros de RMN de ^1H dos extratos metanólicos possibilitaram obter maior informação química do que os extratos aquosos. As regiões 2 e 3 (região dos hidrogênios carbinólicos e aromáticos, respectivamente) que permitiram distinguir a variação química dos diferentes estágios de maturação, por meio das diferenças e das intensidades dos sinais.

Nas amostras dos frutos analisadas em CD_3OD , observa-se a presença de sinais característicos de ésteres de glicerol, bem como ácidos graxos saturados e insaturados. Os sinais comuns em RMN de ^1H para identificar ácidos graxos insaturados são os dos hidrogênios olefínicos (5,3-5,4 ppm), os hidrogênios ligados aos carbonos bis-alílicos (2,7-2,8 ppm), os hidrogênios ligados aos carbonos alílicos (2,0-2,1 ppm) e os hidrogênios do grupo metila terminal (0,8-0,9 ppm), além de sinais de hidrogênios metilênicos (CH_2) em 1,2-1,4 ppm, não observados nos extratos aquosos.

Na Região 2 foram observados sinais referentes à sacarose (Glu-H-1, δ 5,38; d 3,6 Hz e Fru-H-1, δ 4,09, d 8,4 Hz) presente apenas nas amostras de sementes para os extratos metanólicos e aquosos.

Em todos os estágios, no extrato aquoso, e em menor intensidade no extrato metanólico, observa-se a sinais de β -glicose (H-1, δ 4,46, d 7,8 Hz) e α -glicose (H-1, δ 5,10, d 3,8 Hz), cujas

intensidades são maiores nas polpas. Portanto, a Região 2 permitiu a separação entre os frutos verdes e maduros.

Quanto à análise da Região 3, é possível observar sinais típicos de estruturas fenólicas/flavonoidicas, tais como ácido gálico (δ 7,04, s, H-2 e H-6, CD₃OD) e quercitrina e/ou miricetrina [δ 6,20 (d, 2,2 Hz), δ 6,37 (d, 2,2 Hz), 6,88 (d, 8,5 Hz) e δ 7,52 (d, 8,5 Hz)], caracterizando a presença de um sistema tetrassubstituído trioxigenado e um dissobstituído monooxigenado, respectivamente. Há também sinais identificados que são característicos dos anéis B e A do flavonoide trissubstituídos: dubletos em δ 7,3-7,4 (H-2', d, 2,4 Hz), δ 6,20 (H-8, d, 1,8 Hz) e 6,38 (H-6, d, 1,8 Hz), respectivamente; bem como sinais na região de δ 6,90 a 6,97 (**Figura 14 e 15**).

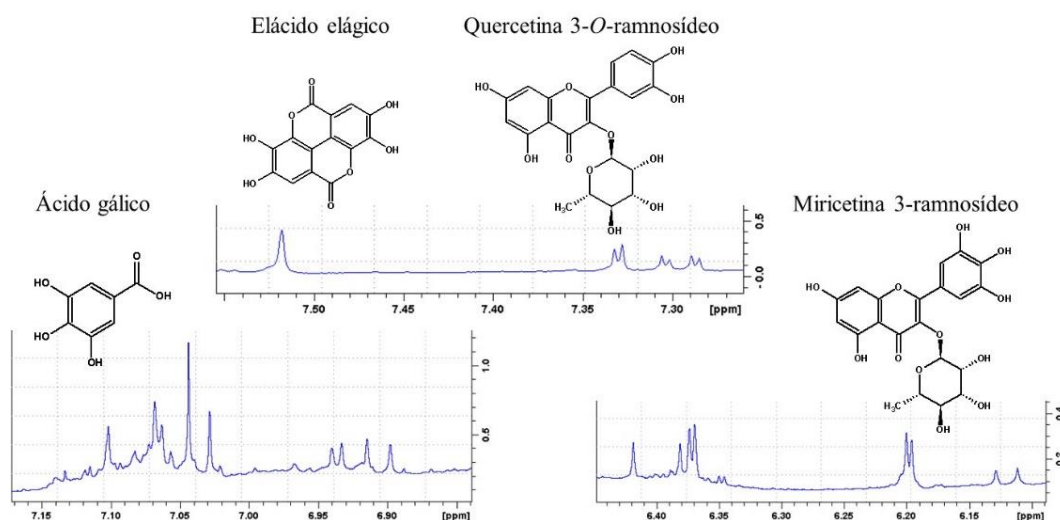


Figura 14 Ampliações dos espectros de RMN de ¹H (CD₃OD, 11,74T) do extrato metanólico da polpa dos frutos *Eugenia punicifolia* no estágio de coloração amarela (YP).

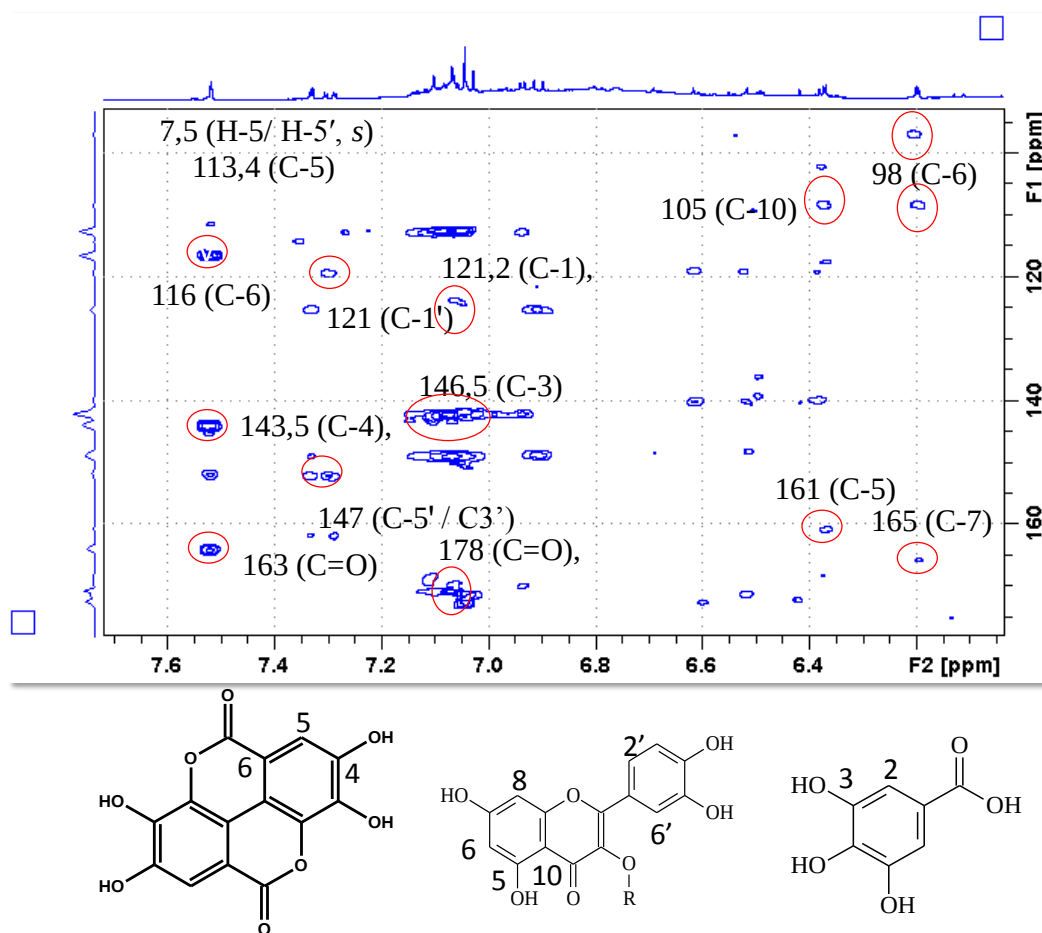


Figura 15 Ampliação da região aromática do espectro de HMBC (^1H - ^{13}C , CD_3OD , 11.74T) da polpa no estágio de maturação de cor amarela (yellow pulp - YP) dos frutos de *Eugenia punicifolia*.

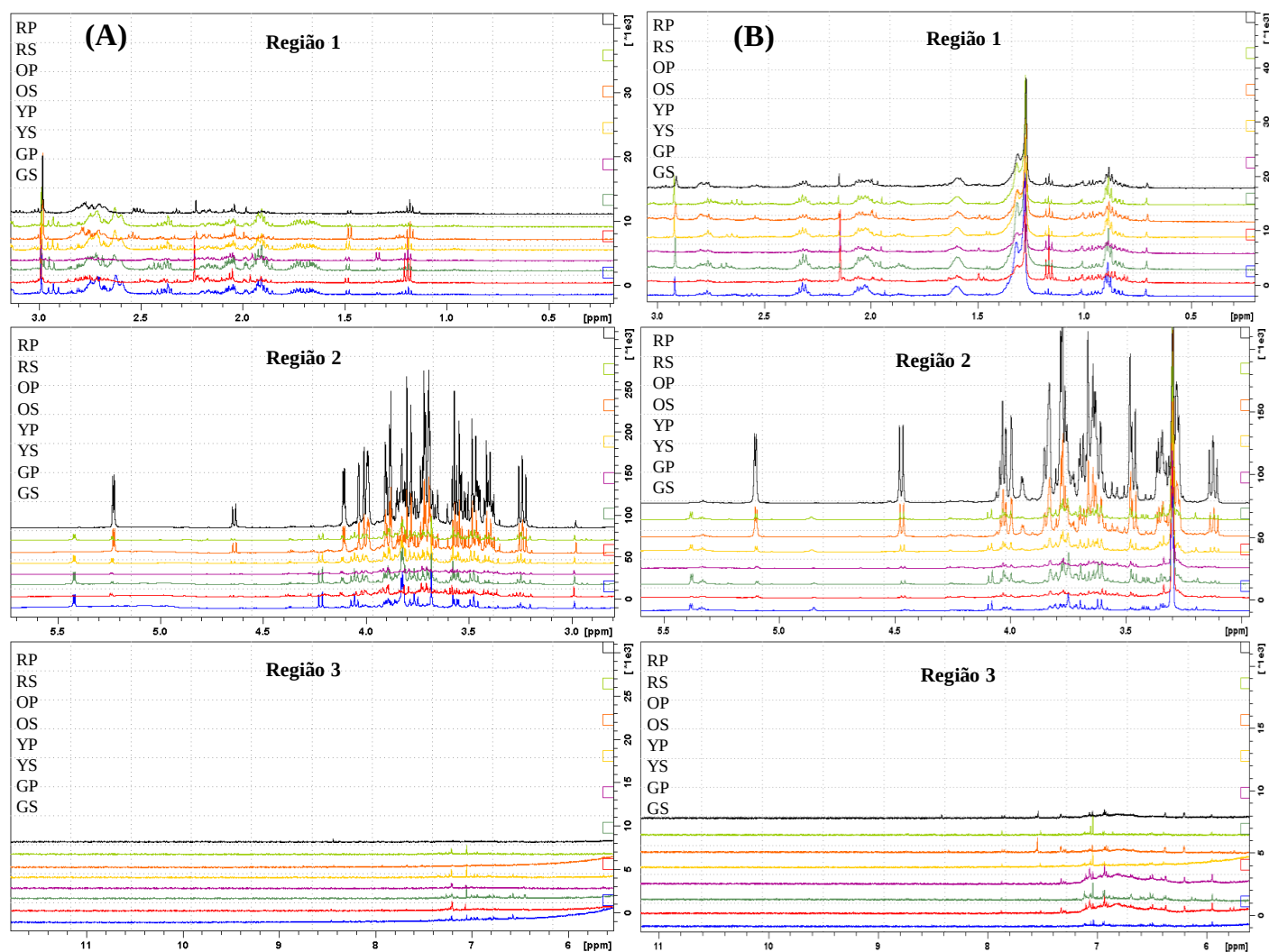


Figura 16 Expansões das Regiões espectrais em ppm: Região 1 (0,2-3,0), Região 2 (3,0-5,5) e Região 3 (6,0-11) dos extratos dos frutos de *Eugenia punicifolia* em D₂O (A) e CD₃OD (B) utilizadas na construção das novas matrizes para análise quimiométrica por PCA e HCA. As letras R (vermelha), O (laranja), Y (amarela), G (verde) representam a coloração por estágio fenológico e as letras P (polpa) e S (semente) representam as partes dos frutos.

A análise dos espectros de RMN de ^1H dos extratos metanólicos (CD_3OD) evidenciaram maior complexidade espectral (**Figura 17**). Foram verificados sinais aromáticos para todos os extratos metanólicos, porém, com diferentes perfis espectrais.

O extrato de semente exibiu níveis relativamente mais altos em região alifática (δ 0,00-3,00). Sinais de derivados de flavonoides (δ 7,20-7,40 e δ 6,17-6,40) foram observados apenas nas amostras de polpa. Além dessas substâncias, observa-se um sinal vinílico (δ 6,68) coerente com a presença do ácido chiquímico (H-2, *m*, CD_3OD), presente apenas nas amostras de polpa e semente no estágio de coloração amarela (Y) sendo mais intenso nas amostras de sementes (YS).

O ácido gálico está presente nas sementes em maior intensidade na evolução dos estágios de maturação, diminuindo nas polpas, até desaparecer na polpa madura de coloração vermelha (R). A análise desses resultados evidência que as polpas verdes (G) e amarelas (Y) são quimicamente semelhantes.

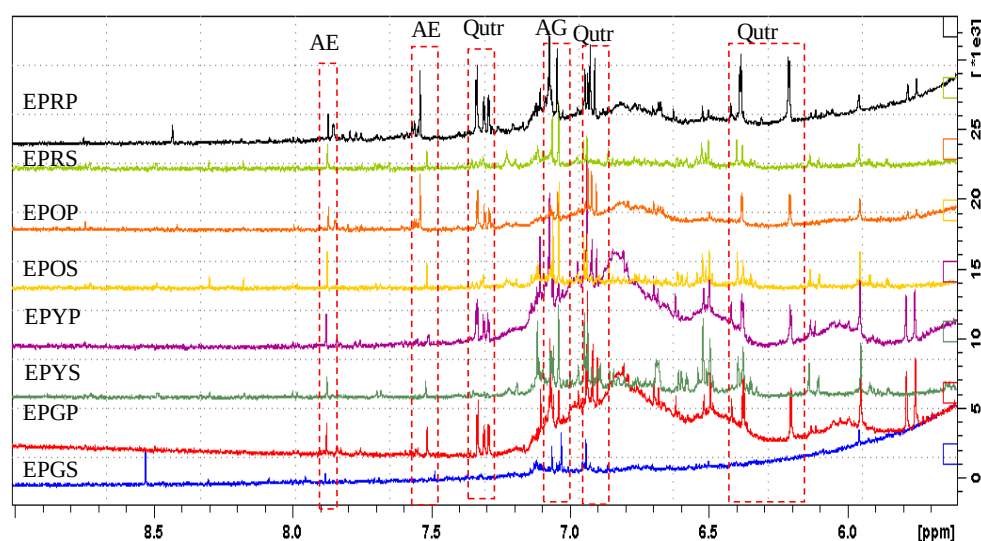


Figura 17 Comparação entre os espectros de RMN de ^1H dos extratos metanólicos de sementes (S) e polpas (P) dos frutos de *E. puniceifolia* (EP); Região aromática; AE=ácido elágico; Qutr= quercitrina; AG= ácido gálico.

Os espectros de RMN de ^1H dos extratos aquosos (D_2O) dos frutos de *E. puniceifolia* apresentaram perfis químicos semelhantes para todos os extratos de polpa e semente (Figura 18). Sinais de carboidratos típicos foram observados em extratos de polpa [α -glicose (H-1; δ 5,23; d ; $J = 3,8$ Hz) e β -glicose (H-1; δ 4,64; d ; $J = 7,8$ Hz)]. Por outro lado, a sacarose foi identificada nos extratos de sementes (Glu-H-1; δ 5,41; d ; $J = 3,7$ Hz). Os sinais na região do açúcar (δ 3,00-5,00) aumentaram ao longo dos estágios de maturação (Figura 18). Quanto aos sinais minoritários, há sinais aromáticos sugerindo a presença de compostos fenólicos nos quatro estágios fenológicos desse fruto.

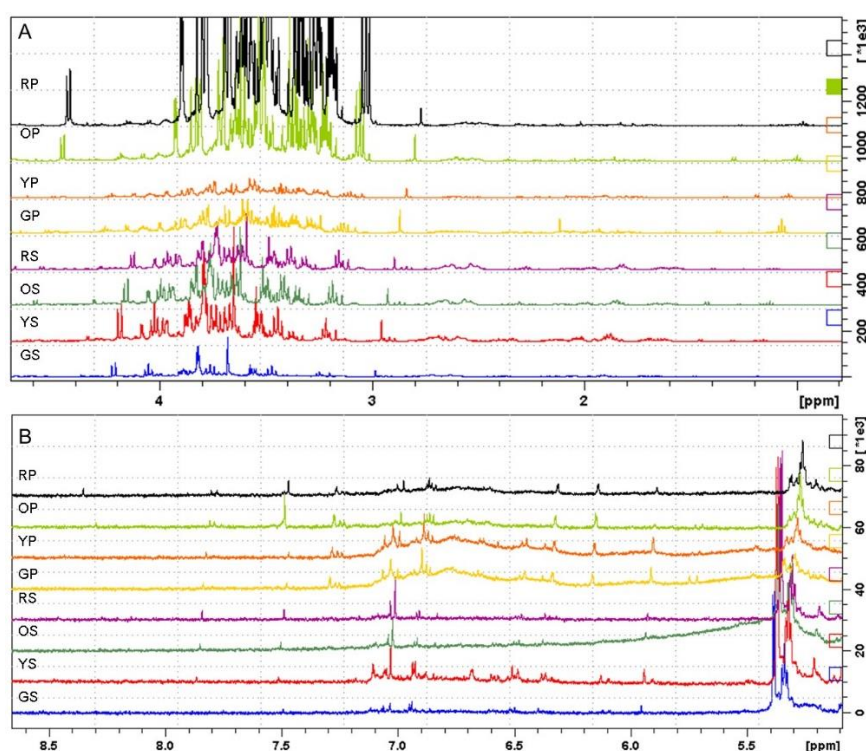


Figura 18 Ampliações do RMN de ^1H (500 MHz, D_2O , 1D pre-sat) dos extrato aquosos de frutos de *E. puniceifolia* em diferentes estágios de maturação (observados com sloped overlap mode (Stacked view: horizontal offset = 0,03;% step vertical = 10); A: região entre 0,5- 4,7 ppm; B: região entre 4,7-11,0 ppm; as letras R (red), O (orange), Y (yellow), G (green) representam os estágios fenológicos; e as letras P (pulp) and S (seed) representam as partes segregadas dos frutos.

5.5 Análise quimiométrica dos dados de RMN de ^1H dos extratos dos frutos de *Eugenia punicifolia*

A fim de comparar os perfis espectrais dos extratos metanólicos dos diferentes estágios fenológicos, métodos estatísticos multivariados foram utilizados para simplificar a interpretação dos espectros de ^1H de RMN. Assim, foi possível extrair o máximo de informação espectral, independentemente da intensidade de um dado sinal, mas em função de sua variância. Os espectros de RMN ^1H total foram submetidos a análise de PCA e HCA, o que permitiu a formação de agrupamentos por similaridade espectral (ESBENSEN; SWARBRICK, 2018). A relação entre as variáveis destacadas (*buckets*: intervalos espectrais de RMN em ppm) foi determinada, contribuindo para a classificação dos sinais de cada grupo formado em relação às diferentes partes da fruta.

A PCA na (**Figura 19**) mostra os resultados da análise multivariada dos extratos aquosos, que apresentaram no gráfico de *scores* da PC1 x PC2 uma variância explicada de 86 % (65% PC1 e 21% PC2). Os grupos com sementes em todos os estágios de maturação se agruparam (III). As amostras de polpas nos diferentes estágios de maturação revelaram semelhança, formando dois subgrupos: (I) grupo laranja (O) e vermelho (R) e o (II) grupo amarelo (Y) e verde (G).

Através da análise de HCA (**Figura 20**), as amostras foram classificadas em três *clusters* principais, apresentando um índice de similaridade de 5, 35 entre os *clusters* (I) e (II e III), confirmando os resultados obtidos por PCA. As sementes quando analisadas isoladamente, não se distinguiram entre si.

Em relação aos espectros de RMN ^1H , os dados de *scores* permitem verificar que a forma como PCA divide as amostras depende da similaridade das intensidades dos sinais de hidrogênio de uma determinada substância com um determinado deslocamento químico. A distribuição dos valores de *loadings* (variáveis: *buckets*) tem

maior peso para as amostras de coloração diferente da vermelha (R), ou seja, todos os *buckets* atribuem maior importância aos outros grupos de amostra dos diferentes estágios de maturação, excluindo o mais maduro (R) ou maduro (O), pois, pelo espectro de RMN de ^1H , nota-se a ausência de sinais de ácidos graxos presentes nas amostras de sementes no estágio verde nos frutos de *E. punicifolia*.

Análises detalhadas dos espectros de RMN de ^1H permitiram a identificação de metabólitos, cujos dados estruturais foram confirmados por experimentos de correlação COSY, HSQC e HMBC, e comparados com dados previamente relatados na literatura. A Tabela 7 resume os deslocamentos químicos (^1H e ^{13}C) e as constantes de acoplamento de todos os compostos identificados no extrato metanólico de frutos de *E. punicifolia*. Estes compostos incluem ácidos orgânicos, carboidratos e compostos fenólicos com sistema compatível para a estrutura da quercitrina, bem como para o ácido elágico, presente nas polpas de todos os estágios fenológicos.

Os espectros de RMN de ^1H mostraram sinais de magnitude variada entre os estágios de maturação deste fruto, pois todas as amostras de polpa e semente apresentaram constituintes fitoquímicos similares com diferentes concentrações. Os resultados obtidos pelo método ERETIC2 são apresentados na **Tabela 6**. O uso da referência eletrônica na análise quantitativa de RMN (qHNMR) para medir concentrações absolutas utilizando RMN ^1H consistiu no uso de um sinal de referência de um padrão calibrado (quinina, δ 8,66, 1H, *d*, $J = 4,5$ Hz). A análise quantitativa por RMN de três compostos fenólicos (quercitrina, ácidos elágico e ácido gálico) revelou maior concentração de quercitrina em **YP** (117,6 mg / 100 g de fruta fresca), assim como ácido elágico em **OP** (11,5 mg / 100 g de fruta) e **RP** (20,2 mg / 100 g de fruta fresca), além de ácido gálico em **GP** (22,1 mg / 100 g de fruta fresca).

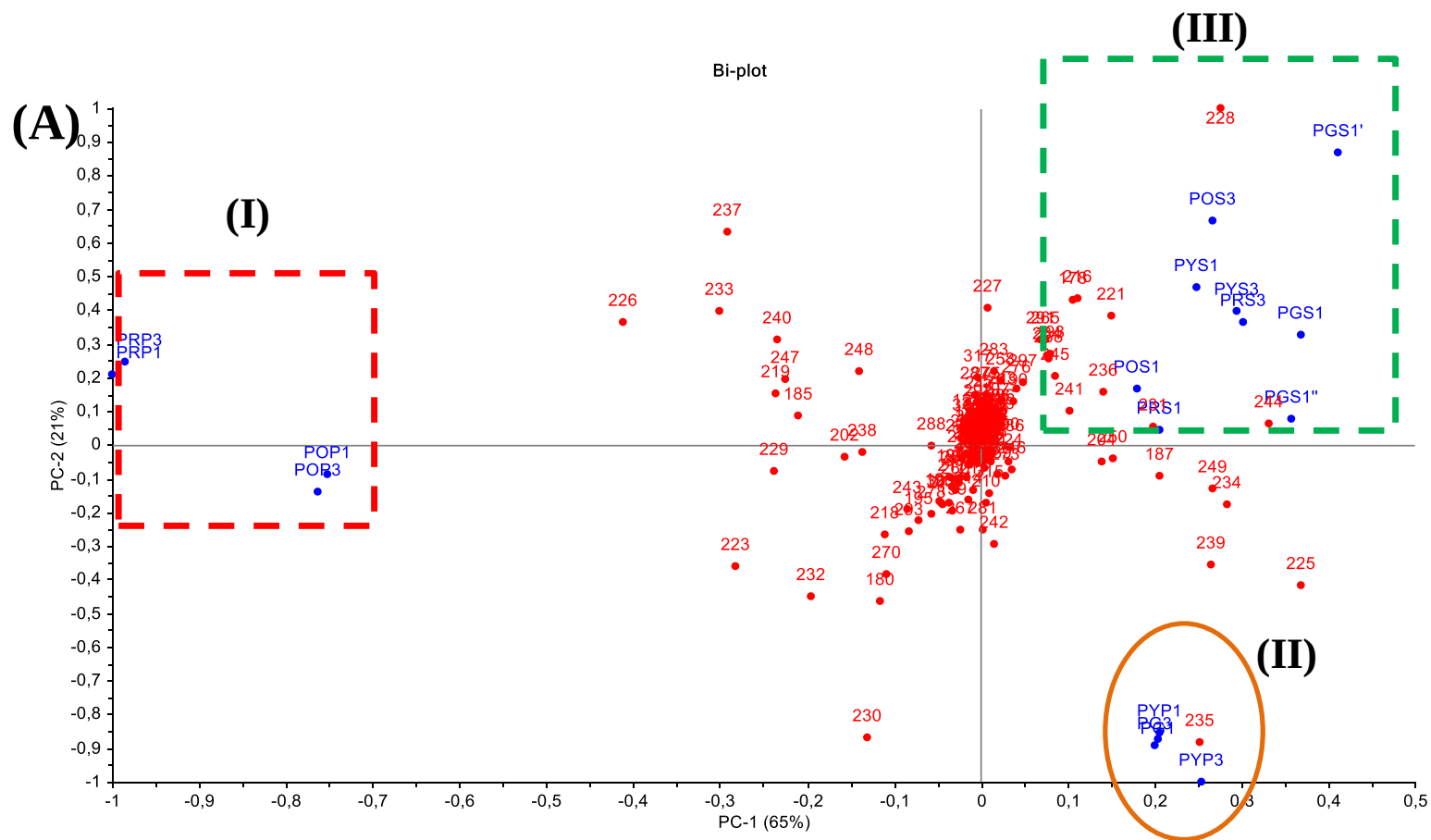


Figura 19 Gráfico Bi-plot da análise por PCA dos espectros (inteiros) de RMN de ^1H dos extratos aquosos (D_2O) dos frutos de *E. punicifolia* (Mean Centered): Grupo I: polpa madura, coloração vermelha (R); Grupo II: polpa quase madura e verde, colorações amarela (Y) e verde (G), respectivamente; Grupo III: sementes, em todas as colorações.

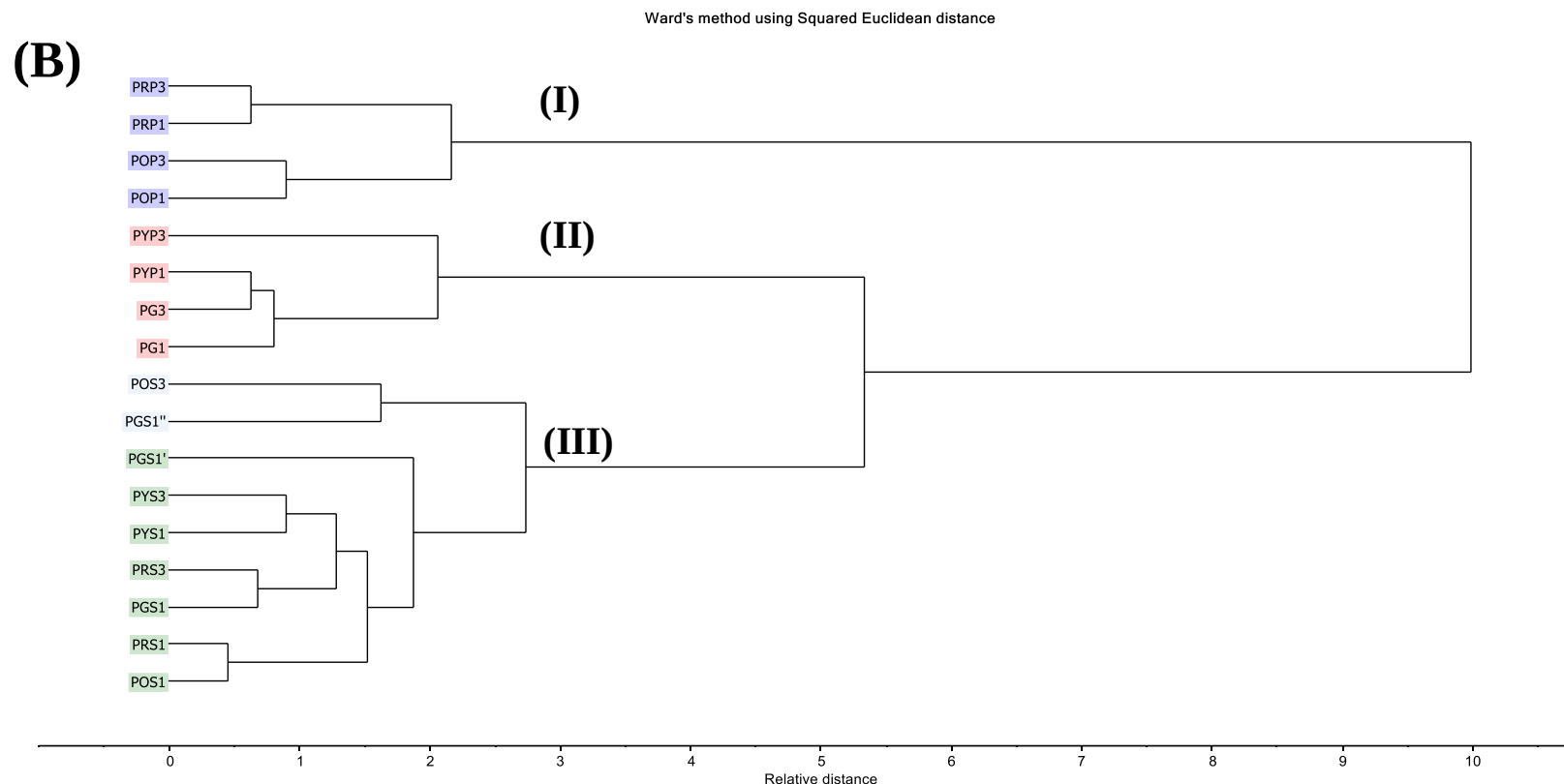


Figura 20 Análise Hierárquica de Agrupamentos a partir dos dados de PCA dos dados de RMN de ^1H dos extratos em D_2O . Algoritmo usado: SVD. Método de transformação: derivada de 1ª ordem pelo método Derivative Savitzky-Golay Transform. Matriz de Dados utilizada: Paretto. Variância explicada de PC1xPC2: 86%.

Tabela 6 Quantificação pelo metodo ERETIC2 das substâncias selecionadas nas polpas dos frutos de *Eugenia punicifolia*

Coloração da Polpa	Quercitrina		Ácido elágico		Ácido gálico	
	mM	(mg/100 g FF)	mM	(mg/100 g FF)	mM	(mg/100 g FF)
Green	0,20	29,4	0,05	4,9	0,40	22,1
Yellow	0,80	117,6	0,02	2,0	0,25	13,9
Orange	[†] nd	[†] nd	0,11	11,2	0,28	16,1
Red	[†] nd	[†] nd	0,10	20,2	0,04	4,5

[†]nd = não determinado (região com razão sinal-ruído abaixo do recomendado para qHNMR). FF: Fruta Fresca.

A PCA permitiu a visualização da variância entre diferentes partes de frutos com diferentes colorações, com base em seus sinais espectrais. Os resultados do PCA *biplot* para o sinal de pico relativo dos espectros de RMN ¹H total (CD₃OD) são mostrados na (Figura 21). As amostras foram agrupadas no quadrante ocupado pelas duas primeiras componentes principais PC1 x PC2, com 92 % da variância explicada. As amostras foram classificadas em três grupos principais: Um agrupamento com todas as amostras de sementes (RS, OS, YS e GS) ao longo do eixo de PC1 (+) e de PC2 (+), um agrupamento com as amostras YP e GP valores de PC2 (-) e valores de PC1 (+), esses agrupamentos apresentaram maior porcentagem de sinais de sacarose [C184: $\Delta\delta$ 5,37-5,40 (H-1a) e ácido linoléico [C300 e C301: $\Delta\delta$ 1,24-1,33 (CH₂), C314: $\Delta\delta$ 0,84-0,90 (CH₃)]. E um agrupamento das amostras de polpa OP e RP, em PC1 (-) e de PC2 (+), que apresentaram maior porcentagem de α -glicose e β -glicose (C193: $\Delta\delta$ 5,07-5,13; C197: $\Delta\delta$ 4,44-5,00; C218: $\Delta\delta$ 3,81-3,86; C224: $\Delta\delta$ 3,62 -3,68 e C230: $\Delta\delta$ 3,44-3,50). Por outro lado, o grupo do extrato de polpa menos madura foi agrupado com base nas diferenças entre a intensidade dos sinais da região espectral aromática observada ao longo do PC2 (23% de variância). Basicamente, as amostras

foram agrupadas por ácidos graxos e sinais de açúcar. A PCA mostrou uma tendência para agrupar os extratos de sementes (Figura 21 B).

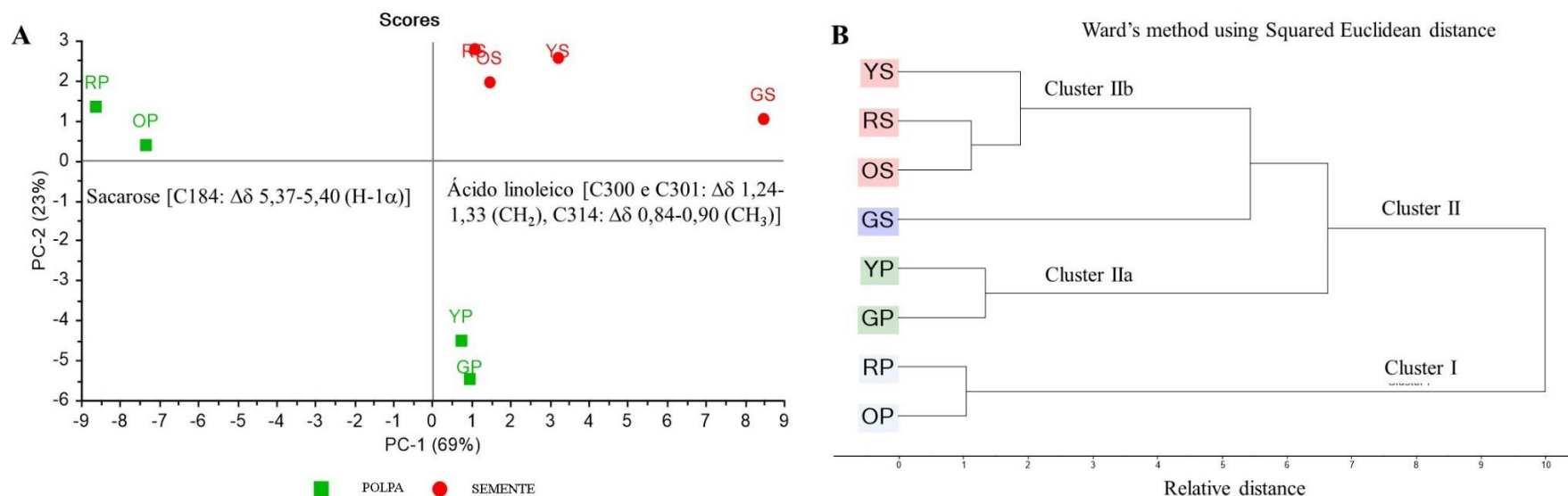


Figura 21 A) Gráfico de Scores da PCA do espectro total (δ 0.2-11.0) de RMN ^1H dos extratos metanólicos (CD_3OD) dos frutos de *E. punicifolia* (centrado na média). Algoritmo usado: SVD. Matriz de dados: MNN. Variância explicada PC1 x PC2: 92 %; B) HCA da matriz de dados de PCA (*Ward's method using Squared Euclidean distance*). **Cluster I**: polpa madura de coloração vermelha (R) e polpa quase madura de coloração laranja (O), Cluster II: **Cluster IIa** maturação intermediária polpa de coloração amarela (Y) e polpa verde de coloração verde (G), **Cluster IIb**: todas as sementes.

A PCA (Figura 22) dos sinais espectrais de RMN ^1H da região aromática ($\sim 6\text{-}11$ ppm) permitiu a separação das amostras em dois grupos principais de PC1, com variância explicada de 48%. Esta região foi escolhida devido à variação do espectro de RMN ^1H ($\square\square 6,0\text{-}11,0$), correspondente ao sistema flavonóide que representa a capacidade antioxidante dos frutos da polpa de *E. punicifolia*. Os dois primeiros PCs foram seleccionados para fornecer a maior variação de objetos de dados (Figura 22 A). O primeiro grupo observado em PC1 ($\square$) foi formado pelos extratos de polpa e o segundo pelos extratos de sementes observados no PC1 ($\square$). Os resultados representados graficamente permitiram a visualização clara dos padrões. Em relação à análise hierárquica de clusters, o dendrograma resultante permitiu a classificação das amostras em dois grupos principais, confirmando os resultados do PCA (Figura 22).

O gráfico de *loadings* PC1 x PC3 (**Figura 23**) destacou alguns buckets específicos [PC1 (+): C113 ($\Delta\delta 7,53\text{-}7,57$), C120 ($\Delta\delta 7,30\text{-}7,35$), C139 ($\Delta\delta 6,72\text{-}6,77$), C141 ($\Delta\delta 6,66\text{-}6,70$), C157 ($\Delta\delta 6,19\text{-}6,22$); PC1 (–): C127 (7,10-7,14), C128 (7,05-7,10), C129 (7,02-7,05), C147 (6,47-6,53)]. A multiplicidade desses sinais por RMN ^1H dos extratos pulparez revelou dois dubletos com meta-acoplamento [$\delta 6,38$ (*d*; $J = 2,0$ Hz) e $6,20$ (*d*; $J = 2,0$ Hz)] compatíveis com um sistema aromático tetrasubstituído trioxigenado, bem como como três sinais em $\delta 7,31$ (*d*; $J = 2,2$ Hz), $\delta 6,87$ (δ ; $J = 8,2$ Hz) e $\delta 7,29$ (*dd*; $J = 8,2$ e $2,2$ Hz) atribuídos ao sistema aromático trissubstituído 3,4-dioxigênio. Além disso, foi observado um sinal singlete de hidrogênio na região do ácido elágico $\delta 7,51\text{-}7,54$.

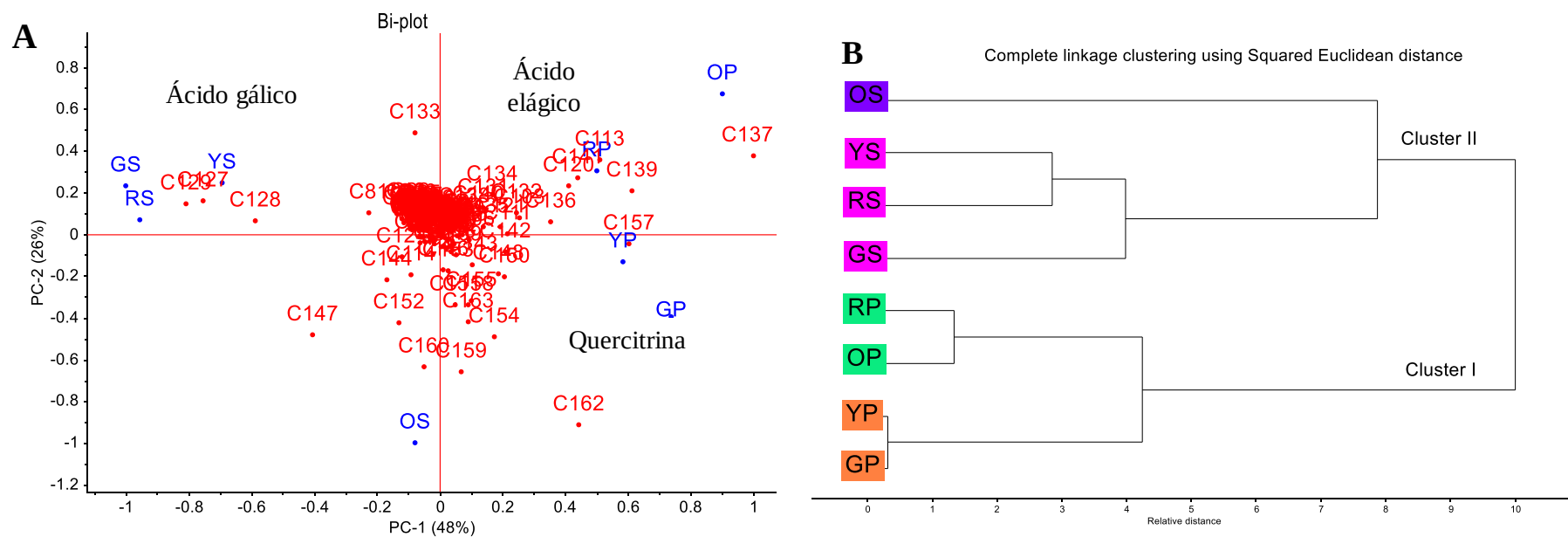


Figura 22 A) Gráfico Bi-plot da PCA (variância explicada: PC1 x PC2: 74%) obtida a partir dos espectros de RMN de ^1H dos extratos metanólicos (CD_3OD) dos frutos de *Eugenia punicifolia*: região espectral entre 6,0-11,0 ppm. Algoritmo usado: SVD. Matris: MNN. **B)** HCA dos dados de PCA.

No entanto, PC1 X PC3 (48% e 13% de variação) foi selecionado para melhorar a visualização e diferenciação, proporcionando maior variação nos dados de buckets (**Figura 23**). O gráfico loadings de PC3 (–) destaca os buckets C127 ($\Delta\delta$ 7,10-7,14), C128 ($\Delta\delta$ 7,05-7,10), C129 ($\Delta\delta$ 7,02-7,05) e C147 ($\Delta\delta$ 6,47-6,53), correspondente a os sinais aromáticos característicos dos ácidos gálico e glicogálico, observados principalmente nos extratos de GP e YP.

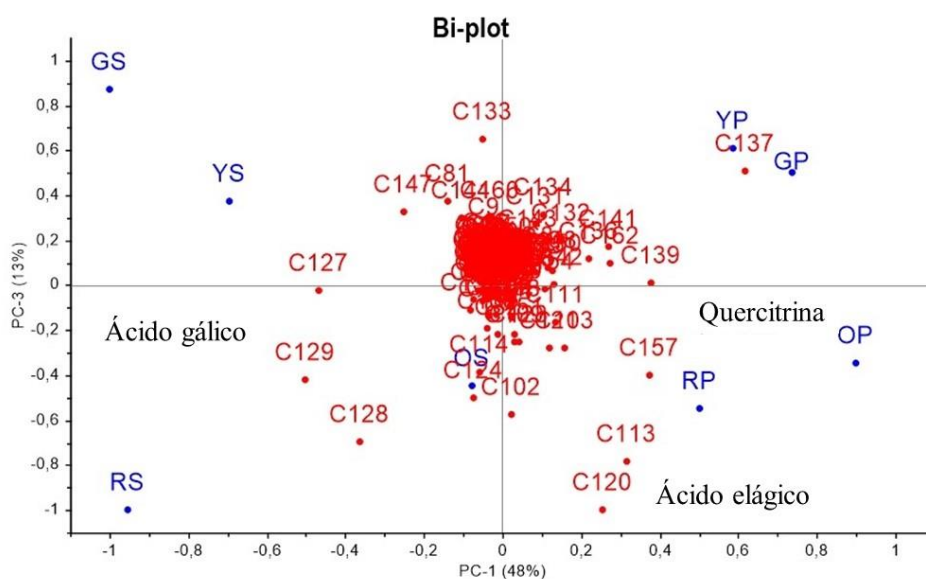


Figura 23 Gráfico *biplot* de PCA (PC1 x PC3, variância explicada: 61%) obtido a partir dos espectros de RMN ^1H da **Região 3** (δ 6,0 – 11,0) dos extratos metanólicos (CD_3OD) dos frutos de *E. punicifolia* (centrado na média). Algoritmo usado: SVD. Matriz de Dados utilizada: MNN.

A análise dos espectros HPLC-DAD-MS (APCI – / +) de extratos metanólicos de *E. punicifolia* permitiu confirmar a presença de flavonoides nas polpas (**Figura 24**). O pico em 12,53 min consiste no íon m/z 463 $[\text{M}-\text{H}]^-$ e 317 $[\text{M}-146\text{H}]^-$, sugerindo a perda de uma unidade de desoxihexose (146 Da). O EM e os dados do pico em 13,49 min revelaram dois sinais principais em m/z 447 e 301, que poderiam ser atribuídos à quercetina-3-ramnosídeo (quercitrina). Esses dois picos apresentam bandas de absorção

na gama de Espectro UV-vis características de sistema flavonoídico (Banda II: 210-290 nm e Banda I: 320-380 nm).

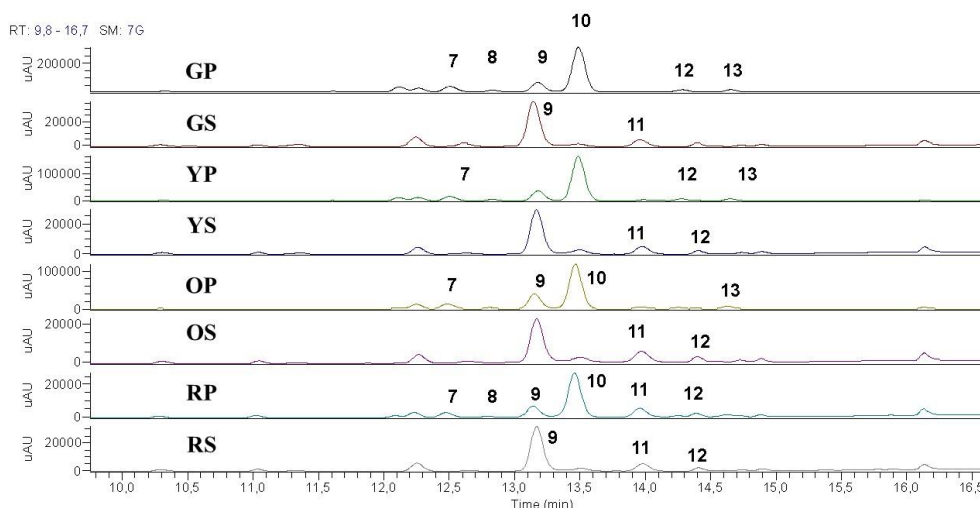


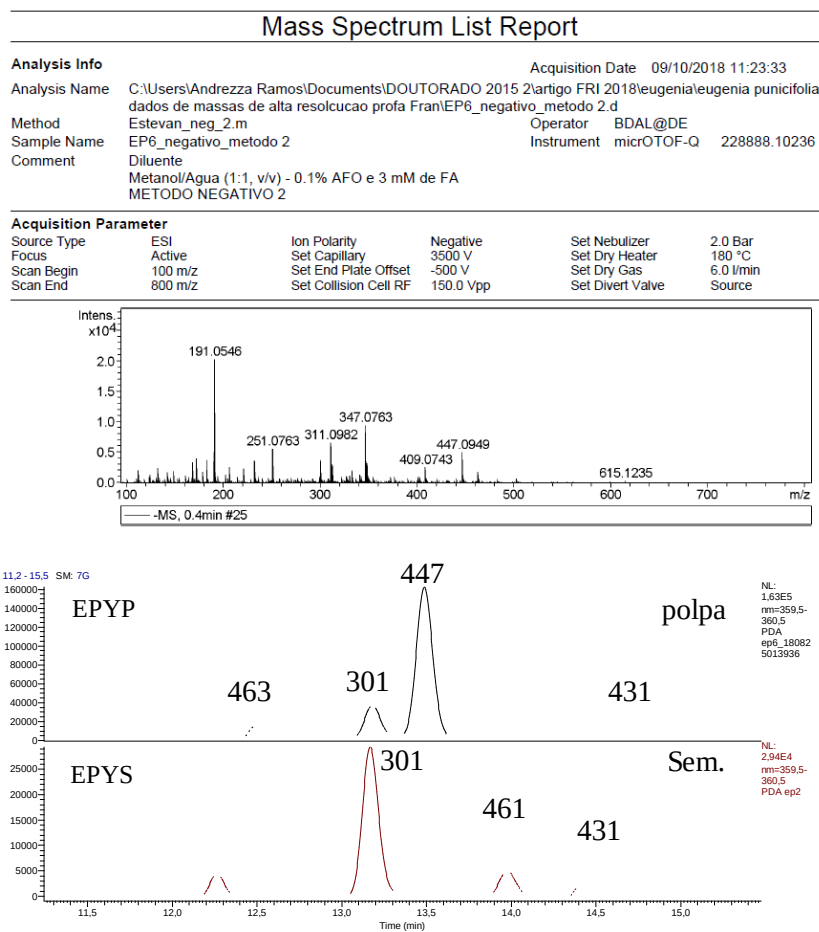
Figura 24 Perfis cromatográficos por HPLC-DAD-MS (360 nm) dos extratos metanólicos de frutos de *E. puniceifolia* em diferentes estágios de maturação: **G** (green); **Y** (yellow); **O** (orange); **R** (red); **S** (semente); **P** (polpa). Obtido com condições de gradiente: A) metanol; B) água (ácido fórmico a 2 % v / v)). 10-60 % A em 12,5 min; 60-100 A em 5 min; 100 A em 10 min; coluna: Luna 5 µm, C18 (100 Å, 150 x 4.6 µm). Tempo de retenção em minutos: **7**: Myricetina 3-ramnosídeo (TR: 12,53 GP *m/z* 463), **8**: 481 (desconhecido) **9**: ácido elágico (TR: 13,18, *m/z* 301), **10**: Quercitrina (TR: 13,49, *m/z* 447), **11** (TR: 13,96 (Semente GS, YS, OS, RP e RS *m/z* 461 + 791)); **12** (TR: 14,28) (desconhecido), **13** Kaempferol (TR: 14,68, *m/z* 431 + 477 [*M*-H + HCOOH]⁻).

A ocorrência de quercitrina foi previamente registrada em espécies de Myrtaceae (NICACIO; ROTA; BOEING; BARIZAO *et al.*, 2017; SALDANHA; VILEGAS; DOKKEDAL, 2013). A identificação destes compostos foi confirmada pelo DI-HRMS, cujos dados estavam de acordo com a quercetina 3-*O*-ramnosídeo e myricetina 3-ramnosídeo, mostrando o diagnóstico de íons moleculares de *m/z* 447,0921 [*M*-H]⁻ (C₂₁H₂₀O₁₁, 1,3) e 463,0870 [*M*-H]⁻ (C₂₁H₁₉O₁₂, 2,5), respectivamente. O pico em 14,68 min consiste no íon molecular com *m/z* 431 [*M*-H]⁻. O perfil de DI-HRMS totalmente negativo estava de acordo com o derivado de kaempferol com uma unidade

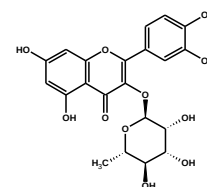
de carboxihexose, mostrando o íon molecular de diagnóstico a m/z 431,0971 $[M-H]^-$ ($C_{21}H_{19}O_{10}$, 2,9). A análise dos espectros HPLC-DAD-MS (APCI – / +) de extratos metanólicos de *E. puniceifolia* permitiu confirmar a presença de flavonoides em polpas (**Figura 25**). O pico em 12,53 min consiste no íon m/z 463 $[M-H]^-$ e 317 $[M-146H]^-$, sugerindo a perda de uma unidade de desoxihexose (146 Da). O EM e os dados do pico em 13,49 min revelaram dois sinais principais em m/z 447 e 301, que poderiam ser atribuídos à quercetina-3-ramnosídeo (quercitrina). A ocorrência de quercitrina foi previamente registrada em frutos da espécie de *Eugenia involucrata* DC (Nicacio, Rotta, Boeing, Barizao, Kimura, Visentainer et al., 2017; Saldanha, Vilegas, & Dokkedal, 2013).

A análise dos extratos dos quatro estágios fenológicos por HPLC-DAD-MS e DI-HRMS corroborou com a descrição química observada por RMN. Os cromatogramas obtidos dos oito extratos confirmaram a presença de ácido gálico, elágico, miricetina 3-ramnosídeo e quercitrina.

A identificação destas substâncias foi confirmada a partir do DI-HRMS, cujos dados estavam de acordo com quercetina 3-*O*-ramnosídeo e miricetina 3-ramnosídeo, mostrando o íon molecular $[M-H]^-$ do íon em m/z 447,0921 ($C_{21}H_{20}O_{11}$, 1,3) e 463,0870 $[M-H]^-$ ($C_{21}H_{19}O_{12}$, 2,5), respectivamente. O pico em 14,68 min consiste no íon molecular em m/z 431 $[M-H]^-$. O perfil de DI-HRMS totalmente negativo estava de acordo com o derivado de kaempferol com uma unidade carboxihexose, mostrando o íon molecular de diagnóstico a 431,0971 $[M-H]^-$ ($C_{21}H_{19}O_{10}$, 2,9). Esses resultados permitiram a detecção de dois flavonóides glicosídeos e dois ácidos fenólicos identificados de acordo com os espectros UV-vis e EM, além da comparação dos dados da literatura. A análise dos extratos dos quatro estágios fenológicos por HPLC-DAD-MS e DI-HRMS corroborou com a descrição química observada por RMN. Os cromatogramas obtidos dos oito extratos confirmaram a presença de ácido gálico (5) e elágico (9), miricetina 3-ramnosídeo (8) e quercitrina (10).

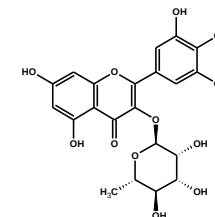


Quercetin 3-O-rhamnoside



447.0921 [M-H]⁻
(C₂₁H₂₀O₁₁, 1.3)

Myricetol 3-rhamnoside



463.0870 [M-H]⁻
(C₂₁H₁₉O₁₀, 2.9)

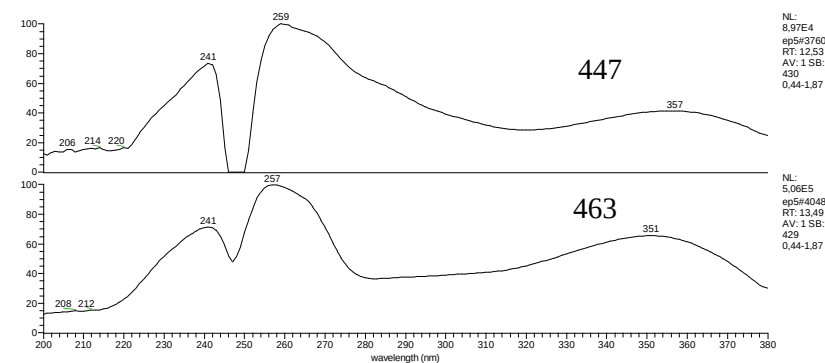


Figura 25 Espectros de DI-HRMS e HPLC-DAD-MS (APCI-) de extratos metanólicos de *E. puniceifolia*: ampliação na faixa dos tempos de retenção dos principais flavonoides presentes na polpa em estágio de coloração amarela EPYP.

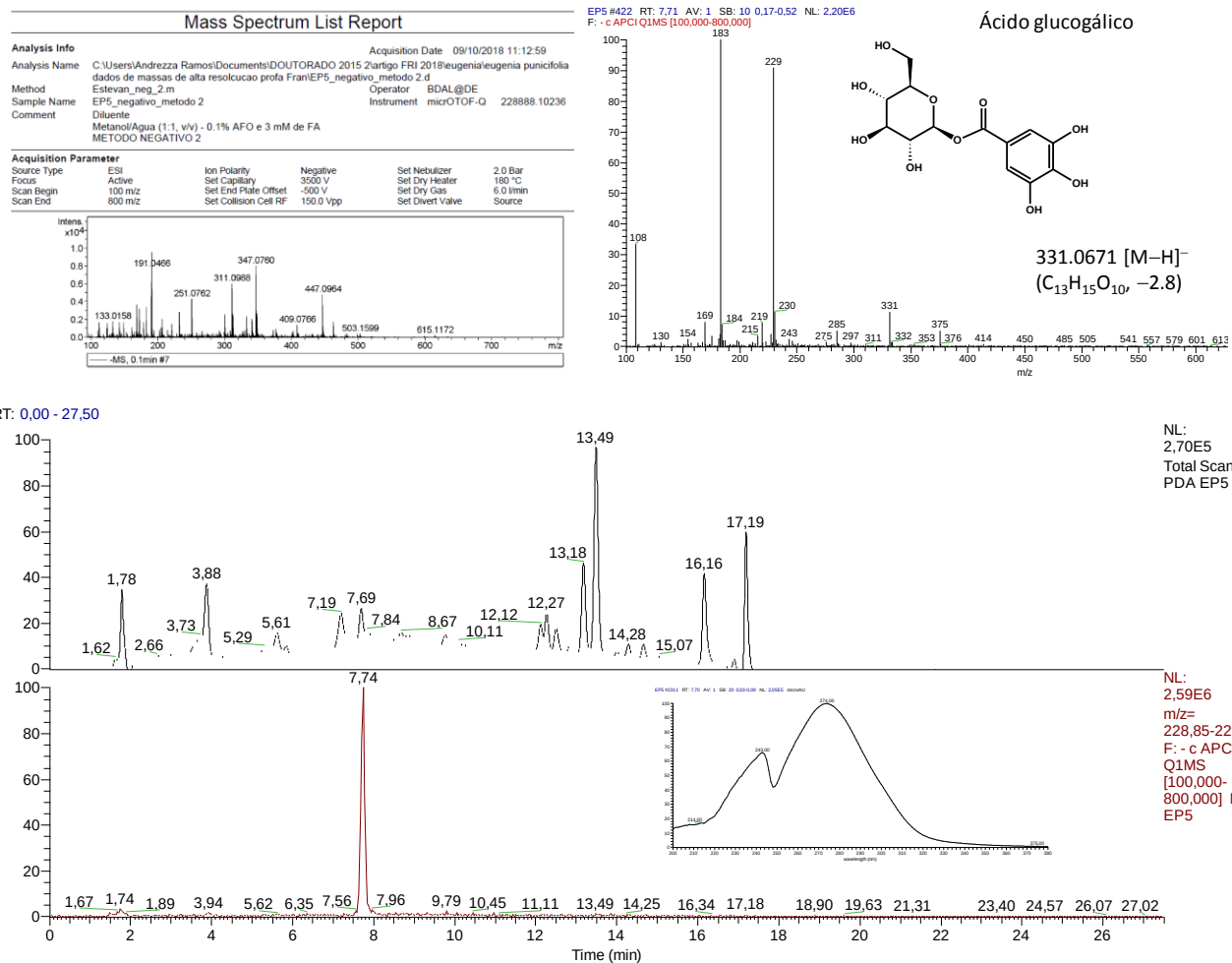
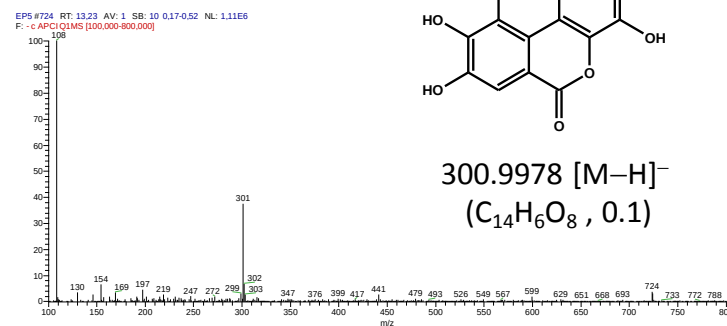
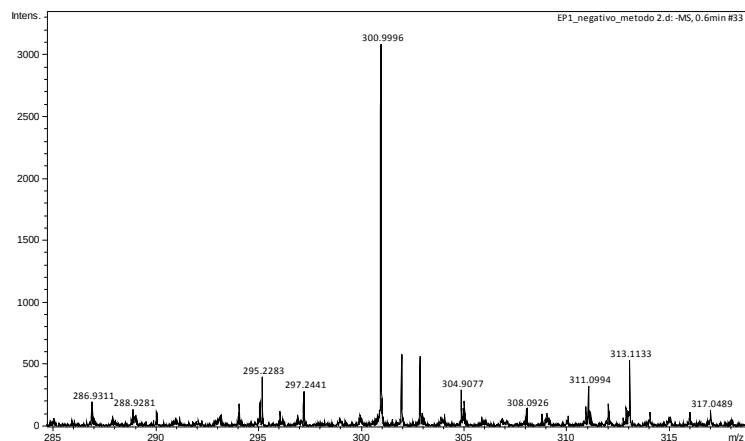
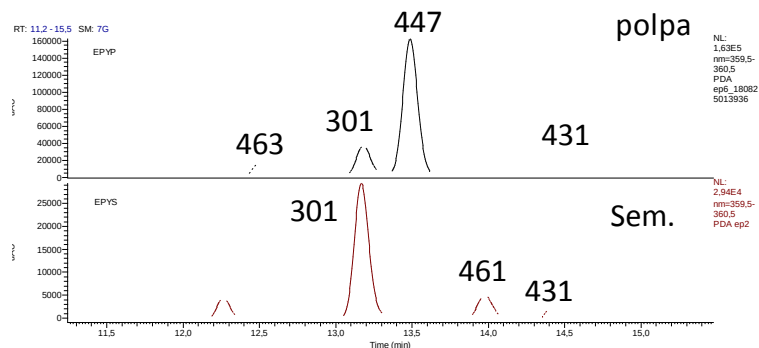
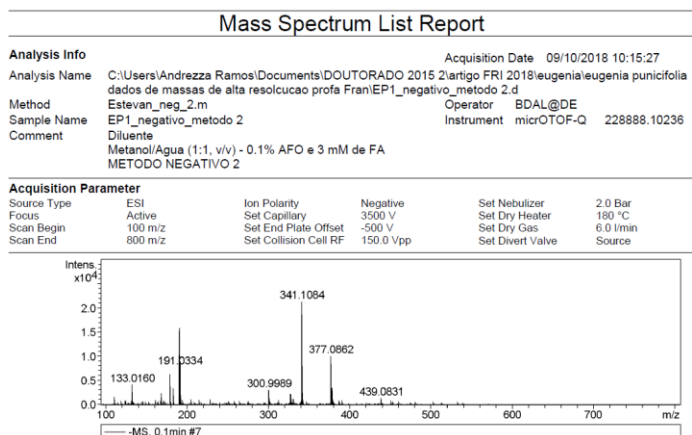
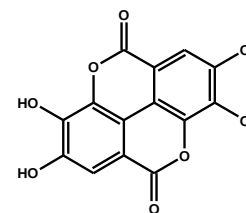


Figura 26 Espectros de DI-HRMS e HPLC-DAD-MS (APCI-) de extratos metanólicos de *E. punicifolia*: observação do íon m/z 331[M-H]⁻¹ no modo seletivo de íons (SIM) presente na polpa em estágio de coloração amarela EPYP.



Ácido elágico



300.9978 [M-H]⁻
(C₁₄H₆O₈, 0.1)

Figura 27 Espectros de DI-HRMS e HPLC-DAD-MS (APCI-) de extratos metanólicos da polpa em estágio de coloração amarela EPYP de *E. puniceifolia*: ampliação na faixa dos tempos de retenção dos principais flavonoides e confirmação da presença do ácido elágico: íon m/z 301.

Tabela 7 Substâncias identificadas nos frutos de *Eugenia punicifolia* em diferentes estágios fenológicos

Nº.	Substâncias	Parte do fruto	[M-H] ⁻ (erro em ppm)	MS ⁿ (m/z)	RMN		Referências
					δ ¹ H in ppm (multiplicidade e J em Hz)	δ ¹³ C	
1 ^a	Sucrose	GS, YS, OS, RS	nd	nd	5,38 (H-1, <i>d</i> , <i>J</i> = 3,5), 3,85 (H-2, <i>m</i>), 3,70 - 3,20 (<i>m</i>), 3,64 (H-2', <i>s</i>), 4,17 (H-3', <i>d</i> , <i>J</i> = 9,0), 4,01 (H-4', <i>t</i> , <i>J</i> = 8,5), 3,81 (H-5', <i>m</i>)	92,3 (C-1), 73,1 (C-2), 73,0 (C-3), 69,9 (C-4), 74,9 (C-5), 61,1 (C-6), 62,2 (C-1'), 77,1 (C-3'), 81,9 (C-4'), 74,9 (C-5'), 63,0 (C-6')	(HERNANDEZ; MARTINEZ; FERNANDEZ-TRUJILLO, 2007)
2 ^b	α-D-Glucopiranosose	GP, YP, OP, RP GP, YP, OP, RP	nd	nd	5,22 (<i>d</i> , <i>J</i> = 3,7) 4,67 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,0), 3,68 - 3,86 (<i>m</i>), 3,34 - 3,45 (<i>m</i>), 3,20 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 9,5, 8,0)	92,3 (C-1), 72,3 (C-2), 73,1 (C-3), 70,6 (C-4), 72,0 (C-5), 61,3 (C-6)	
3 ^a	β-D-Glucopiranosose	GP, YP, OP, RP			96,9 (C-1), 74,9 (C-2), 76,8 (C-3), 70,3 (C-4), 76,8 (C-5), 61,3 (C-6)	96,9 (C-1), 74,9 (C-2), 76,8 (C-3), 70,3 (C-4), 76,8 (C-5), 61,3 (C-6)	
4 ^a	Ácido Linoléico	GS, YS, OS, RS	279,2330 [M-H] ⁻ (C ₁₈ H ₃₁ O ₂ , 5.8)	EM ² [279 (30)]: 261 (100) [M-H-H ₂ O] ⁻	0,89 (H-18, <i>t</i> , 7,0), 1,18 (<i>m</i>), 1,25 - 1,40 (<i>m</i>), 2,06 (<i>m</i>), 2,70 (<i>m</i>), 5,30 - 5,40 (<i>m</i>)	16,2 (C-18), 131,1)	(KNOTHE; KENAR, 2004)
5 ^a	Ácido Gálico	GS, YS, OS, RS GP, YP , OP, RP	169,0131 [M-H] ⁻ (C ₇ H ₅ O ₅ , -2.4)	nd	7,04 (H-2/H-6, <i>s</i>)	121,2 (C-1), 109,3 (C-2/C-6), 146,5 (C-3/C-5), 138,2 (C-4), 166,4 (COOH)	(ZHANG; LIN, 2009)
6 ^a	Ácido Chiquímico	YS, YP	173,0444 [M-H] ⁻ (C ₇ H ₁₀ O ₅ , -7.7)	nd	6,6 (H-2), 4,43 (H-3), 3,72 (H-4), 4,01 (H-5), 2,77 (H-6a), 2,22 (H-6b)	170,1 (COOH), 132,0 (C-1), 138,0 (C-2), 66,0 (C-3), 32,0 (C-6)	(POUCHERT; BEHNKE, 1993)
7 ^a	Ácido β-Glicogálico	GP , YP, OP, RP	331,0671 [M-H] ⁻ (C ₁₃ H ₁₅ O ₁₀ , -2,8)	EM ² [331 (12)]: 191 (100) [M-H-C ₄ H ₆ O ₃] ⁻ , 183 (85%)	nd	nd	(SOBEH; YOUSSEF; ESMAT; PETRUK <i>et al.</i> , 2018)

8 ^a	Miricetina 3'-ramnosídeo	GP, YP , OP, RP	463,0870 [M-H] ⁻ (C ₂₁ H ₁₉ O ₁₀ , 2,5)	nd	6,17 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 1.9 Hz, H-6), 6,34 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 1.9 Hz, H-8) and 6,8 (2H, <i>s</i> , H-2" and H-6"), 5,18 (H-1", 1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 1.5), 0,83 (H-6", 3H, <i>d</i> , <i>J</i> = 6,0)	nd	(CELLI; PEREIRA- NETTO; BETA, 2011)
9 ^a	Ácido Elágico	GP, YP , OP, RP	300,9978 [M-H] ⁻ (C ₁₄ H ₆ O ₈ , 0,1)	nd	7,5 (H-5/ H-5', <i>s</i>)	113,4 (C-5), 143,5 (C-4), 116,1 (C-6)	(OMAR; LI; YUAN; SEERAM, 2012)
10 ^a	Quercetina 3-O-ramnosídeo	GP, YP , OP, RP	447,0921 [M-H] ⁻ (C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁ , 1,3)	EM ² [447]: 301 (100%) EM ³ [301]: 179 (25%), 151(10%), 284 (20) and 228 (5%)	6,38 (H-6, <i>d</i> , 1,8), 6,20 (H-8, <i>d</i> , 1,8), 7,31 (H-2', <i>d</i> , 1,8), 6,90 (H-5', <i>d</i> , 8,1), 7,29 (H-6', <i>dd</i> , 8,1 and 1,8), 4,98 (H-1", <i>d</i> , 1,5), 3,5 - 4,0 (<i>m</i>)	157 (C-2), 137 (C-3), 100 (C-6), 118,1 (C-2'/C-5'), 121 (C-6'), 97,0 (C-1")	(SALDANHA; VILEGAS; DOKKEDAL, 2013)
11 ^a	Kampeferol 7-O-ramnosídeo	GP, YP, OP , RP	431,0971 [M-H] ⁻ (C ₂₁ H ₁₉ O ₁₀ , 2,9), 477,1026 [M-H+HCOOH] ⁻ (C ₂₂ H ₂₁ O ₁₂ , -4,4)	nd	nd	nd	(NEERGHEEN; SOBRATTEE; BAHORUN; ARUOMA, 2006)

^a Dados de RMN em CD₃OD (11,74 T). ^b Dados de RMN em D₂O (11,74 T). ^c As letras em negrito representam maior abundância da substância indicada. GP (polpa verde), YP (polpa amarela), OP (polpa laranja), RP (polpa vermelha), GS (semente verde), YS (semente amarela), OS (semente laranja), and RS (semente vermelha).

5.6 Capacidade antioxidante dos extratos de frutos de *Eugenia punicifolia*

Os extratos de frutas mostraram baixa toxicidade contra fibroblastos humanos saudáveis em comparação com células tratadas com doxorubicina, (após 72 h de tratamento, em concentrações de 3,1-100,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ promoveu 78,5 % de letalidade). Os extratos de polpa (GP, YP, OP e RP) promoveram 82,5 a 105,7 % de viabilidade celular e os extratos de sementes (GS, YS, OS e RS) promoveram 62,3 a 106,7 % de viabilidade celular na faixa de concentração 3,1-100,0 g mL^{-1} . Esses valores indicam que as amostras não causam mortalidade significativa quando comparadas à doxorubicina ($p < 0,05$). As amostras de YP e GP apresentaram o capacidade antioxidante mais pronunciado, bem como a inibição mais efetiva da oxidação de DCFH induzida por radical peroxila (CAA) quando comparada às demais partes da fruta (**Tabela 8**). Os valores de FT (mg GAE por grama de extrato) para GP e YP são $655,6 \pm 2,4$ e $616,3 \pm 2,7$, respectivamente. Estes valores são comparáveis àqueles obtidos de frutos de outras espécies de *Eugenia*, como *E. uniflora*, 457,4 a 799,8 mg GAE/100 g fruto (DENARDIN; HIRSCH; DA ROCHA; VIZZOTTO *et al.*, 2015), e a *E. stipitata*, $184,1 \pm 8,3$ mg GAE/100 g fruto (NERI-NUMA; CARVALHO-SILVA; MORALES; MALTA *et al.*, 2013). As amostras GP e YP foram as que apresentaram maiores teores de FT, além de apresentaram melhores valores de IC_{50} , $89,5 \pm 8,2$ e $120,5 \pm 1,2$ $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente, confirmando o capacidade antioxidante mais pronunciado para estes estágios de maturação. Entretanto, os resultados dos frutos de *E. stipitata* mostraram DPPH (IC_{50}) de $0,7 \pm 0,2$ $\mu\text{g mL}^{-1}$ (NERI-NUMA; CARVALHO-SILVA; MORALES; MALTA *et al.*, 2013). Pelo método do ensaio com ABTS, as amostras GP e YP apresentaram valores entre $1.876,6 \pm 6,9$ e $1.090,7 \pm 3,9$ $\mu\text{mol TE}$ por grama de extrato, respectivamente, enquanto que os outros extratos apresentaram valores entre 157,3 e 281,8 $\mu\text{mol TE}$ por grama de extrato. Extratos hidroalcoólicos obtidos de todas as partes dos frutos de *E. involucrata* apresentaram atividade antioxidante pelo método ABTS entre 100,0-870,0 $\mu\text{mol TE}$ por grama (NICACIO; ROTTA; BOEING; BARIZAO *et al.*, 2017). Existem diferenças quantitativas entre os perfis químicos dos extratos de polpa de *E. punicifolia* que podem justificar os resultados obtidos nos ensaios antioxidantes. Em geral, em amostras complexas, como extratos de frutas, efeitos sinérgicos ou antagônicos ocorrem naturalmente. Entretanto, os ensaios de FT e DPPH apresentaram forte correlação (fator de correlação de Pearson de 0,70; $p < 0,05$). Os Frutos de *Eugenia* vêm apresentando, bom capacidade antioxidante. O teor de FT (mg EAG/100 g matéria seca), foi compatível com outros frutos de *E. uniflora* $457,43 \pm 15,2$ a $433,84 \pm 60,5$ e $799,80 \pm 54,7$.

Tabela 8 Atividades antioxidantes e antiglicante dos extratos metanólicos dos frutos de *Eugenia punicifolia*

Amostra	Estágio de maturação	FT (mEAG g ⁻¹)	DPPH (IC ₅₀)	ABTS (μmol TE g ⁻¹)	(CAA) (% Inib.)*	‡VO (Glioxal) (% Inib.)*	VNO (Frutose)	
							(% Inib.)*	(IC ₅₀)
GP	polpa verde	655,6 ± 2,3 ^a	89,5 ± 8,2 ^e	1876,6 ± 6,9 ^a	45,6 ± 3,4 ^a	28,5 ± 2,2 ^b	100,9 ± 0,4 ^a	15,00 ± 0,5 ^f
GS	semente verde	61,0 ± 2,9 ^e	618,6 ± 5,3 ^b	255,1 ± 5,1 ^d	8,8 ± 0,8 ^c	13,5 ± 4,2 ^c	95,3 ± 0,4 ^b	56,4 ± 0,7 ^c
YP	polpa parcialmente verde	616,2 ± 2,7 ^b	120,5 ± 1,2 ^d	1090,7 ± 3,8 ^b	51,5 ± 2,5 ^a	32,4 ± 3,7 ^b	100,5 ± 0,6 ^a	7,90 ± 0,1 ^g
YS	semente parcialmente verde	83,5 ± 0,7 ^d	514,7 ± 1,9 ^c	281,8 ± 5,1 ^c	14,6 ± 2,5 ^{bc}	17,2 ± 2,7 ^c	99,5 ± 1,2 ^a	30,00 ± 0,6 ^e
OP	polpa parcialmente madura	112,0 ± 1,9 ^c	826,7 ± 3,0 ^a	211,8 ± 5,1 ^e	20,4 ± 3,0 ^b	13,3 ± 2,9 ^c	95,4 ± 1,3 ^b	42,47 ± 0,4 ^d
OS	semente parcialmente madura	60,2 ± 0,9 ^e	>1000	157,3 ± 5,8 ^g	14,6 ± 2,4 ^{bc}	13,6 ± 0,6 ^c	93,2 ± 0,2 ^b	63,27 ± 2,4 ^b
RP	polpa madura	36,6 ± 0,9 ^f	>1000	174,0 ± 3,3 ^f	11,2 ± 2,5 ^c	11,4 ± 0,7 ^c	33,9 ± 0,7	ND
RS	semente madura	30,0 ± 0,6 ^g	>1000	211,8 ± 5,1 ^e	nd	12,3 ± 1,6 ^c	88,0 ± 0,8 ^c	83,5 ± 3,2 ^a
Querc						88,5 ± 0,2 ^a		
AG								90,20 ± 0,93 ^{ef}

Resultados expressos como média ± desvio padrão de triplicatas, concentração dos padrões de Quercetina (Querc) e aminoguanidina (AG): 100,0 μg mL⁻¹

IC₅₀: Capacidade inibitória em μg mL⁻¹; **mAGE** = miliequivalente de ácido gálico; **TE** = Trolox Equivalente; **CAA** = Antioxidante Celular; **% Inib** = porcentagem de inibição; ‡ não foi possível calcular o valor de IC₅₀ neste trabalho; **VO** = glicação via oxidativa, **VNO** = glicação via não oxidativa.

* Valores cujo número de células foi reduzido para 10% após 72 h de tratamento. Os valores seguidos da mesma letra, na mesma coluna, são estatisticamente iguais (p < 0,05).

A polpa verde (GP) apresentou capacidade antioxidante mais pronunciado em comparação com outras partes do fruto, cujos resultados devem estar relacionados à maior concentração de ácido gálico nesta polpa (**Tabela 6**). No entanto, a amostra da polpa amarela (YP) apresentou a maior concentração de quercitrina, um flavonóide glicosilado com atividade antiglicante (FERCHICHI; DERBRE; MAHMOOD; TOURE *et al.*, 2012). Portanto, esses resultados sugerem que os frutos de *E. punicifolia* no estágio amarelo possuem a atividade antigênica mais pronunciada.

Embora não haja recomendação de ingestão diária de substâncias fenólicas e suas subclasses (segundo a Organização Mundial da Saúde - OMS), a recomendação diária de consumo de vegetais e frutas da Organização para a Alimentação e Agricultura (FAO) é de cerca de 400 g por dia. Assim, seu consumo pode levar a um aumento na oferta de polifenólicos (DICKINSON; WATSON; PRICHARD, 2018).

Há diversos estudos que relatam as propriedades antioxidantes de substâncias fenólicas como os flavonoides, ácido gálico e cinâmico ocorrentes em frutos de *Eugenia uniflora*, *E. stipitata*, *E. brasiliensis*, *E. pyriformis*, e *E. dysenterica* (DE ARAÚJO; NERI-NUMA; DE PAULO FARIAS; DA CUNHA *et al.*, 2019).

5.7 Atividade antiglicante dos extratos e capsulas de *E. punicifolia*

Os extratos metanólicos dos frutos de *E. punicifolia* não apresentaram atividade superior a 50 % de inibição pela via oxidativa (Tabela 9). No entanto, todas as amostras apresentaram atividade antiglicante pela via não oxidativa na concentração de 100 µg mL⁻¹, exceto a amostra de polpa no estágio de coloração vermelha (RP).

Uma diluição seriada dessas amostras foi realizada para obter a concentração inibitória de 50% (IC₅₀). A amostra de YP (IC₅₀ = 7,9 ± 0,1 µg mL⁻¹) e a amostra de GP (IC₅₀ = 15 ± 0,5 µg mL⁻¹) foram mais ativas do que o padrão de aminoguanidina (IC₅₀ = 28,6 ± 1,4 µg mL⁻¹). Entre as amostras, a amostra de YP foi ativa com base nos ensaios de DPPH e antigênica pela via não oxidativa. Além disso, foi observada alta correlação entre o FT e a glicação via resultados não oxidativos (GNO) (correlação de Pearson = 0,71, *p* < 0,05), sugerindo que os compostos fenólicos podem ser responsáveis por essa atividade. Portanto, a amostra YP foi a que apresentou melhores resultados, e foi seleccionada para o processo de encapsulamento.

Tabela 9 Atividade antiglicante dos extratos metanólicos dos frutos de *Eugenia punicifolia*

Amostra	VO (Gloxal)		VNO (Fructose)	
	% Inibição*	IC ₅₀ (µg mL ⁻¹)	% Inibição*	IC ₅₀ (µg mL ⁻¹)
GP	28,5 ± 2,2 ^b	ND	100,9 ± 0,4 ^a	15,00 ± 0,5 ^f
GS	13,5 ± 4,2 ^c	ND	95,3 ± 0,4 ^b	56,4 ± 0,7 ^c
YP	32,4 ± 3,7 ^b	ND	100,5 ± 0,6 ^a	7,90 ± 0,1 ^g
YS	17,2 ± 2,7 ^c	ND	99,5 ± 1,2 ^a	30,00 ± 0,6 ^e
OP	13,3 ± 2,9 ^c	ND	95,4 ± 1,3 ^b	42,47 ± 0,4 ^d
OS	13,6 ± 0,6 ^c	ND	93,2 ± 0,2 ^b	63,27 ± 2,4 ^b
RP	11,4 ± 0,7 ^c	ND	33,9 ± 0,7	ND
RS	12,3 ± 1,6 ^c	ND	88,0 ± 0,8 ^c	83,5 ± 3,2 ^a
Querc	88,5 ± 0,2 ^a	-		
AG			87,7 ± 3,3 ^c	28,6 ± 1,3 ^e

Resultados expressos como media ± desvio padrão (n=3), concentração dos padrões Quercetina (Querc) e aminoguanidina (AG): 100,0 µg mL⁻¹. **VO**= atividade antiglicante por via oxidativa; **VNO**= atividade antiglicante por via não-oxidativa. *valores cujo numero de celulas foi reduzido a 10% após 72 h de tratamento; os valores seguidos da mesma letra, na mesma coluna, são estatisticamente iguais (*p* < 0,05).

A glicação é uma reação não-enzimática irreversível que forma os Produtos Avançados de Glicação (AGEs) quando ocorre o desequilíbrio do metabolismo da glicose em humanos. O desequilíbrio do metabolismo da glicose pode causar a formação excessiva de metilglioxal, um composto orgânico altamente citotóxico que pode reagir com várias biomoléculas para formar o precursor dos produtos finais da glicação avançada (AGEs). Esses AGEs são altamente reativos e podem modificar as estruturas primárias e secundárias das proteínas, alterando sua função nos animais. Este processo ocorre nas vias oxidativa ou não-oxidativa (FU; WELLSKNECHT; BLACKLEDGE; LYONS *et al.*, 1994). Compostos naturais como os elagitaninos das espécies de Myrtaceae têm sido utilizados para o tratamento deste distúrbio (CHANG; SHEN; WU, 2013).

Semelhante ao relatado neste trabalho, outros autores confirmam a alta retenção de substâncias fenólicas e antocianidinas em suco de ‘bayberry’ (*Myrica pensylvanica*) obtido pelo método de *spray-drying* (96 e 94%, respectivamente), utilizando a maltodextrina como carreador (FANG; BHANDARI, 2012) e microencapsulação do extrato aquoso de jabuticaba (*Myrciaria cauliflora* Berg.) (RODRIGUES; JANUARIO; DOS SANTOS; BERGAMASCO *et al.*, 2018). Mahdavi e colaboradores (2016) observaram que o uso de uma mistura de maltodextrina e goma arábica como material de parede para o encapsulamento da antocianina de ‘barberry’ (*Berberis vulgaris*) (uma variedade de groselha) apresentou maior eficiência de encapsulação do que a apresentada pela mistura de maltodextrina e gelatina também utilizada para encapsulação dos substâncias ativos.

Assim, a microencapsulação pode ser indicada como um método para preservar as substâncias bioativas do extrato aquoso de frutos de *E. puniceifolia*, possibilitando o uso do subproduto como fonte natural antioxidante.

5.8 Atividade antiglicante e antioxidante do suco encapsulado

O suco fresco (FJ) na concentração de 36,5 mg mL⁻¹ e suas microcápsulas formadas a partir de AM10, AM20, AM30 e SA (em 100 µg mL⁻¹) não apresentaram atividade superior a 50% de inibição pela via oxidativa (**Tabela 10**). Por outro lado, as micropartículas contendo suco fresco encapsulado em *E. puniceifolia* mostraram atividade antioxidante pela via não

oxidativa com uma porcentagem de inibição de $98,9 \pm 1,7$ %. Estatisticamente, esse resultado é melhor que o encontrado para o padrão de aminoguanidina (AG) ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$). O Teor Fenólico Total (FT em mg GAE por grama de extrato) no extrato metanólico da amostra YP foi de $616,2 \pm 2,7$ e no suco fresco foi de $990,0 \pm 2,0$ mg GAE L^{-1} , cerca de 70% mais concentrado. A maior resposta antioxidante foi observada na amostra AM30 com cerca de 30% de resposta comparando com o suco fresco. Este fato pode ser explicado devido ao melhor processo de encapsulamento resultante do material da parede. A eficiência de encapsulação (EE) e a eficiência de retenção de (RE) da AM30 foram encontradas em torno de 89,7 e 97,6 %, respectivamente (**Tabela 10**). Os resultados mostraram que a AM30 maximizou o conteúdo de compostos polifenólicos no suco, provavelmente devido à proteção mais eficiente dos compostos bioativos, resultante do uso desse material específico. Este fato pode ser explicado devido às maltodextrinas altamente hidrolisadas (DE 30), que apresentam cadeias menores que podem ocupar melhor os poros das esferas de alginato, otimizando assim o processo de encapsulação (CAMPELO; DO CARMO; ZACARIAS; YOSHIDA *et al.*, 2017). Semelhante a este estudo, outros autores confirmam a elevada retenção dos compostos fenólicos e antocianidinas do suco de *bayberry* em pó (96 e 94 %, respectivamente) (FANG; BHANDARI, 2012), empregando maltodextrina como material de parede para a microencapsulação de extrato aquoso de *Myrciaria cauliflora* Berg (jabuticaba) (RODRIGUES; JANUARIO; DOS SANTOS; BERGAMASCO *et al.*, 2018). Portanto, o processo de microencapsulação proposto representa um método efetivo de preservação dos compostos bioativos presentes no extrato aquoso dos frutos de *E. punicifolia*, permitindo sua utilização como fonte natural de biocompostos antioxidantes e antiglicantes.

Outras espécies de *Eugenia* também são fontes promissoras de inibidores da α -glicosidase e antioxidantes que podem ser usados para controlar a glicemia em pacientes com *diabetes mellitus* tipo 2 (CHATTERJEE; ALI; DE; PANDA *et al.*, 2012b; VINHOLES; LEMOS; BARBIERI; FRANZON *et al.*, 2017). Na família Myrtaceae existem outras espécies pertencentes ao gênero *Myrcia*, como *Myrcia sphaerocarpa* e *M. speciosa*, também popularmente usadas como sendo pedra-ume caá, estas espécies apresentam derivados químicos da miricetina e quercetina (com 3-O-ramnosídeo como substituinte) em sua composição. Seus extratos apresentaram potencial inibitório *in vitro* contra α -glicosidase

(IC₅₀ = 0,7 a 4,1 µg mL⁻¹) e α-amilase (IC₅₀ = 6,1 a 29,0 µg mL⁻¹) (FIGUEIREDO-GONZALEZ; GROSSO; VALENTAO; ANDRADE, 2016).

Tabela 10 Atividades antioxidante por DPPH*, ABTS⁺, FT, e atividade antiglicante de capsulas de suco de fruta de *Eugenia punicifolia*.

Amostra	FT *mg GAE L ⁻¹	DPPH *µMTE	ABTS *µMTE	VO (Gloxal) % Inib.	VNO (Frutose) % Inib.	EE (%)	ER (%)
SF	990,0 ± 2,0 ^a	1,426,0 ± 5,2 ^a	1.499,9 ± 6,9 ^a	29,3 ± 1,1	98,9 ± 1,7	-	-
AM10	482,6 ± 1,4 ^d	616,5 ± 10,0 ^d	791,0 ± 12,0 ^d	2,4 ± 0,4 ^{bc}	17,7 ± 1,8 ^b	85,2 ± 0,6 ^b	96,4 ± 0,0 ^c
AM20	770,3 ± 1,3 ^c	959,8 ± 8,0 ^c	1107,7 ± 6,7 ^c	4,0 ± 1,2 ^{ab}	37,7 ± 3,5 ^a	88,7 ± 0,4 ^a	97,1 ± 0,0 ^b
AM30	938,4 ± 0,5 ^b	1334,0 ± 15,2 ^b	1427,7 ± 8,8 ^b	5,2 ± 1,0 ^a	38,9 ± 3,8 ^a	89,7 ± 0,4 ^a	97,6 ± 0,0 ^a
SA	133,8 ± 3,9 ^e	430,7 ± 3,8 ^e	251,0 ± 13,3 ^e	1,2 ± 0,3 ^c	1,1 ± 0,6 ^c	83,4 ± 0,6 ^c	94,2 ± 0,0 ^d
Querc				88,5 ± 0,2		-	-
AG					90,2 ± 0,9	-	-

Resultados como média ± desvio padrão (n = 3), concentração dos padrões de Quercetina (Querc) e aminoguanidina (AG): 100,0 µg mL⁻¹. *Valores calculados em cada grama de extrato de amostra; **FT** = teor de Fenólicos Totais; **VO** = glicação via oxidativa; **VNO** = glicação via não oxidativa; **SF** = suco fresco de frutas em estágio amarelo de maturação; **AS** = alginato de sódio puro; **AM** = alginato de sódio + maltodextrina; **EE** = Eficiência de encapsulamento; **ER** = Eficiência de Retenção; **mg GAE L⁻¹** = miligrama de equivalente de ácido gálico por litro de suco; **µMTE** = micromolar de Trolox Equivalente por suco. Os valores seguidos da mesma letra, na mesma coluna, são estatisticamente equivalentes quando p < 0,05 de acordo com o teste de Tukey.

A investigação por espectroscopia de RMN ¹H combinada com ferramentas quimiométricas (PCA e HCA) e EM tem se mostrado eficiente na diferenciação química dos estágios fenológicos de frutas da Amazônia, com o objetivo de identificar os principais compostos orgânicos sem o processo de isolamento. Onze compostos foram identificados por DI-HRMS e RMN. As amostras de polpa metanólica de *E. punicifolia*, especialmente em estágio intermediário de maturação com coloração amarela, revelaram maior atividade antioxidante e os principais picos de quercitrina presentes em diferentes concentrações, segundo a análise dos dados do ERETIC2. A principal vantagem é que os espectros de RMN ¹H podem ser facilmente obtidos diretamente das amostras sem a necessidade de pré-tratamento, possibilitando examinar todo o espectro e buscar padrões emergentes dos dados.

Além disso, um eficiente material de parede foi proposto para o encapsulamento do suco de pedra-ume caá com o objetivo de preservar as atividades antioxidante e antiglicante dessa cereja. Entretanto, futuros estudos ainda serão realizados para avaliar a estabilidade desses sistemas em função do tempo e do meio de liberação. Portanto, as microcápsulas contendo o suco de fruta encapsulado em pedra-ume caá podem representar uma alternativa

promissora para o desenvolvimento de um produto nutracêutico com propriedades antiglicantes e antioxidantes.

5.9 Caracterização química dos frutos de *Myrcia* spp. por HPLC-DAD-MS, DI-ESI-IT-MS/MS e RMN

Os extratos metanólicos dos frutos de *Myrcia* apresentam algumas semelhanças, quando observados no modo BPC (Base Peak Chromatogram), que se baseia nas intensidades médias dos picos-base obtidos no espectro de massas. Há substâncias isômeras com tempos de retenção (TR) distintos e substâncias distintas, porém, com mesmo tempo de retenção (**Figura 28** e **Figura 29**). Muitos dos picos correspondem a derivados de ácidos elágico, cinâmico e quinico. São observados sinais principalmente de elagitaninos, m/z 633 nas amostras *M. magnoliifolia* madura (MaR), *M. minutiflora* madura (MR) e verde (MUR), *M. fenestrata* madura (FR) e verde (FUR); e m/z 783, MaR, *M. magnoliifolia* verde (MaUR), *M. sylvatica* verde (SyUR) e MUR. Flavonoides com valores de m/z 463 (quercetina glicosilada) aparecem nos extratos SyR e SyUR apenas; m/z 447 (quercirtina) aparece mais evidentes nos extratos *M. sylvatica* madura (SyR) e MaUR; m/z 289 (catequina) mais evidente nas amostras de *M. fenestrata*.

Algumas amostras mostram conjuntos distintos de marcadores (sinais de íons), como o m/z 371 (ácido cafeoilglucárico, ou ainda, o ácido 3-(3, 4- dihidroxifenil) láctico 2-O-quinico) comum em quase todas as polpas maduras e que não aparece nas amostras verdes (MAUR, MUR, FUR) e nem na amostra madura FR.

Os cromatogramas de cada espécie nos estágios verde e maduro estão apresentados nos Material suplementar. Em cada **Figura** há a descrição das substâncias identificadas e seus respectivos tempos de retenção. Os mapas de correlação HSQC e HMBC que auxiliaram nas propostas estruturais dos constituintes majoritários presentes nas polpas dos frutos de *Myrcia* spp. estão apresentados nos Apêndices de A1-A10. Alguns constituintes minoritários foram identificados apenas por HRMS. Um total de cerca de 53 picos foram observados, dentre os quais 33 substâncias foram identificadas com auxílio da interpretação do padrão de fragmentação, com os valores obtidos por UHPLC-DAD-HRMS e pelos principais sinais de hidrogênio observados por RMN.

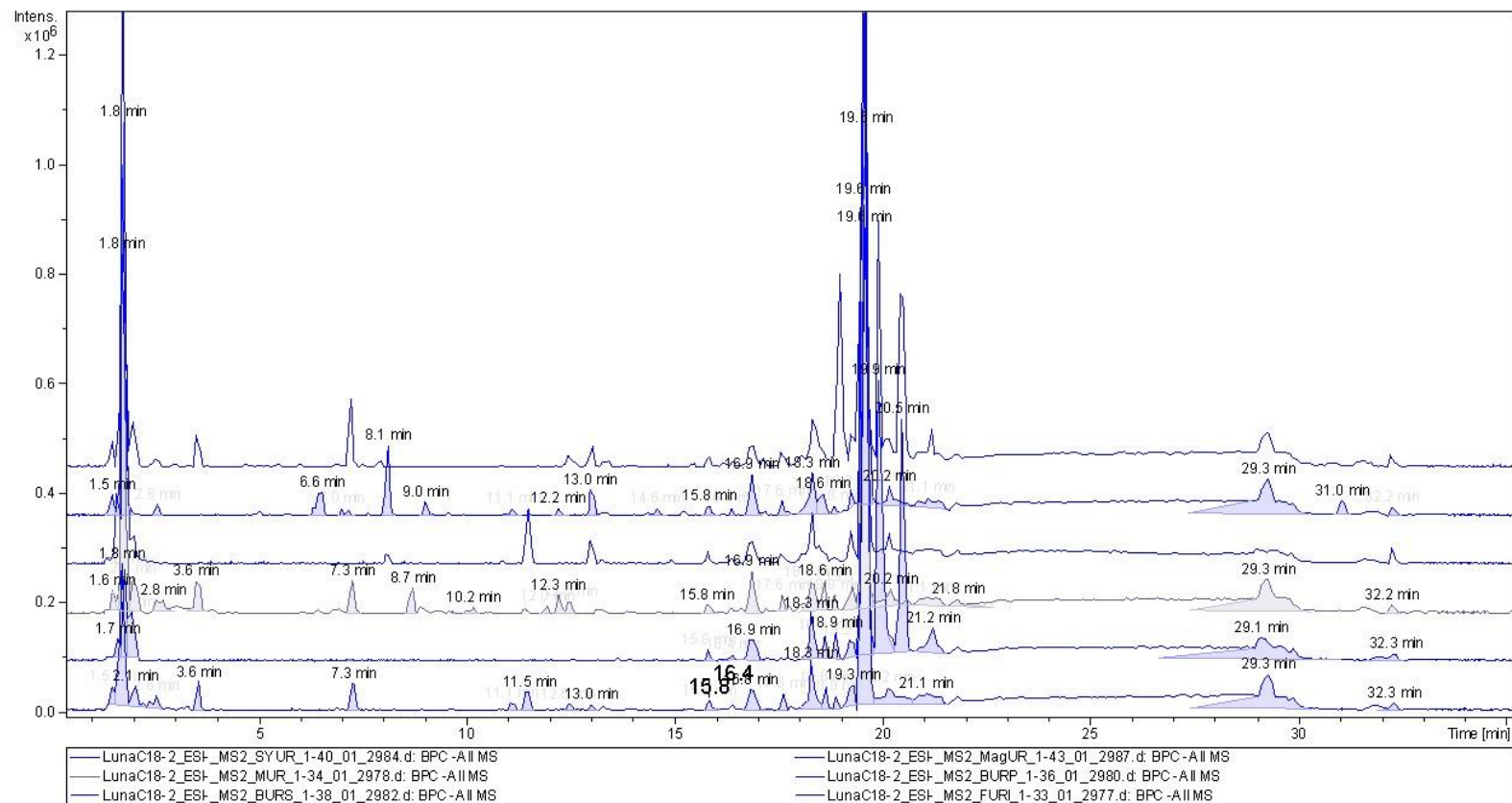


Figura 28 Cromatograma dos extratos metanólicos dos frutos no estágio verde de *Myrcia* spp. De baixo para cima, as amostras estão dispostas na sequência por cada espécie: SyUR; MaUR; MUR; BURp; BURs; FUR. Coluna Luna 5 μ m C18, (150 mm x 4,6 mm); Fluxo = 1 mL/min. Gradiente: A) H₂O (2 % ácido fórmico); B) MeOH: 0-12,5 min, 10-60 %; 12,5-17,5 min, 60-100 %; 17,5-27,5 min, 100 %; 27,5-37,5 min, 100-10 %; 37,5-48 min, 10 %.

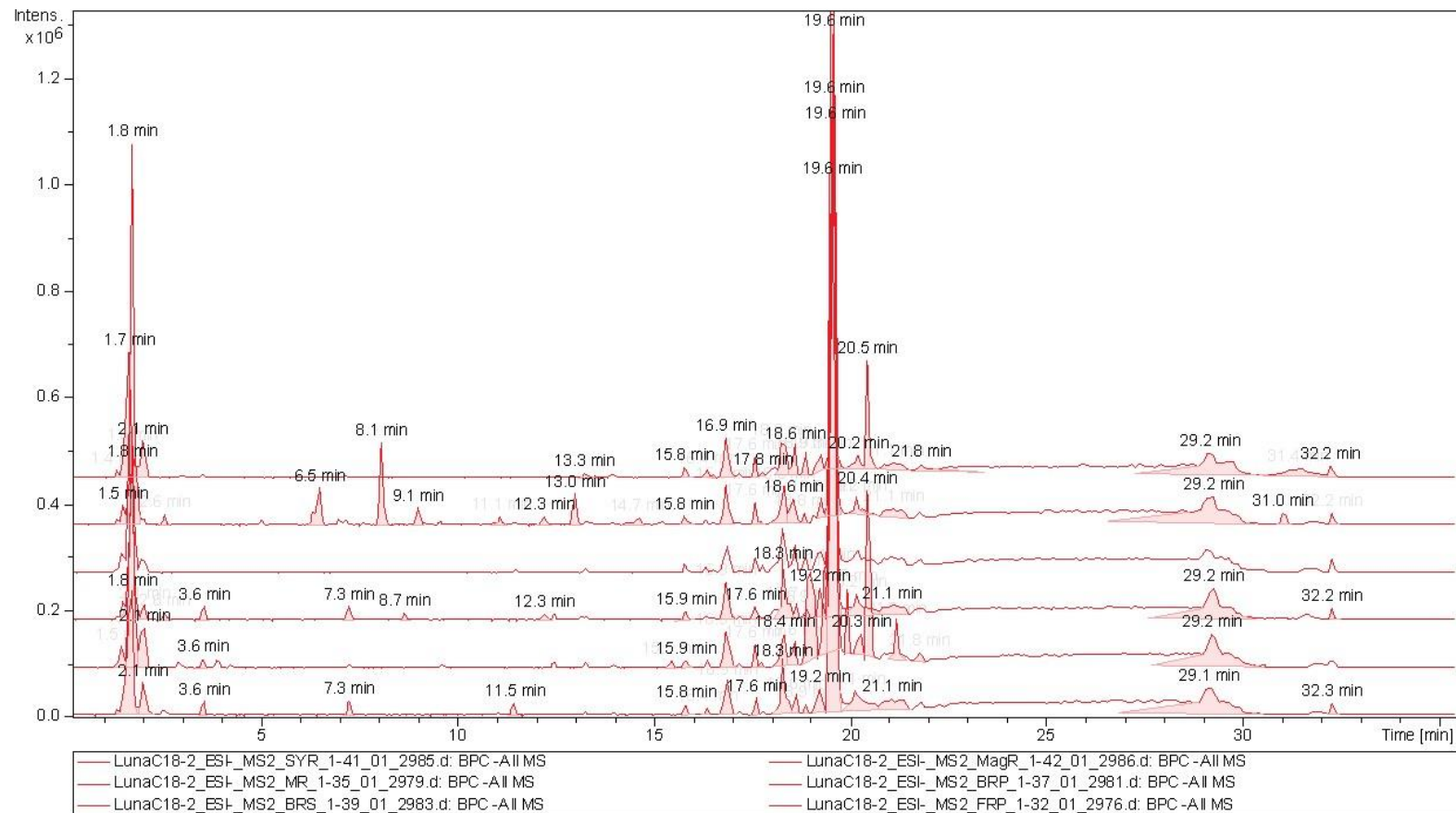


Figura 29 Cromatograma dos extratos metanólicos dos frutos no estágio maduro de *Myrcia* spp. De baixo para cima, as amostras estão dispostas na sequência por espécie: SyR; MaR; MR; BRp; BRs; FR. Coluna Luna 5 μ m C18 (150 mm x 4,6 mm); Fluxo = 1mL/min. Gradiente: A) H₂O (2 % ácido fórmico) e B) MeOH, 0-12,5 min, 10-60 % ; 12,5-17,5 min, 60-100 %; 17,5-27,5 min, 100 %; 27,5-37,5 min, 100-10 %; 37,5-48 min, 10%.

A fragmentação de segunda-ordem (EM^2) do íon precursor m/z 463 $[M - H]^-$ levou ao íon produto de m/z 317 $[M - 46 - H]^-$, sugerindo a perda de uma unidade de deoxihexose (146 Da). O íon produto $^{1,2}A^-$ é típico da fragmentação Retro Diels Alder (RDA) (**Figura 30**) em flavonoides (3-OH) com anel A dihidroxilado, assim considerando este padrão de fragmentação, a substância foi identificada como miricetina-3-O- α -L-ramnopiranosídeo. A ocorrência desse flavonoide foi registrada em folhas da espécie *Myrcia bella* Cambess e frutos de *Eugenia involucrata* DC anteriormente estudadas (NICACIO; ROTTA; BOEING; BARIZAO *et al.*, 2017; SALDANHA; VILEGAS; DOKKEDAL, 2013).

A clivagem do anel C pelo mecanismo de fragmentação retro-Diels-Alder (RDA) gera íons $^{ij}A^-$ e $^{ij}B^-$, dando informações sobre o número e tipo de constituintes no anel A e anel B. O fragmento $^{1,3}A^-$ é frequentemente o íon produto majoritário no modo negativo e o grau de hidroxilação do anel B interfere no padrão de fragmentação (HE; WU; NIE; YAN *et al.*, 2017). Por exemplo, flavonóis contendo dois ou mais grupos hidroxila no anel B, por exemplo, quercetina e miricetina, com íons correspondentes a $[^{1,2}A - H]^-$ e $[^{1,2}B + H]^-$ podem ser detectados, enquanto que no caso do anel B desprovido de substituição, a energia de colisão necessária para obtenção de fragmentos é muito maior, gerando vários íons-filhos (HE; WU; NIE; YAN *et al.*, 2017).

Geralmente as perdas neutras de CO, CO₂, C₃O₂, e perdas tipo C₂H₂O são comuns em isoflavonas, em modo negativo, utilizando-se ESI-MS/MS enquanto as clivagens de retrociclização do anel C ocorrem com menos frequência (HE; WU; NIE; YAN *et al.*, 2017). Na fragmentação de isoflavonas metoxiladas há a formação do ânion radical $[M - H - CH_3]^-$.

Outra fragmentação comum é a perda sequenciada de $[M-H-CH_3-CO-anel\ B]^-$ característica de isoflavonas metoxiladas na posição 6 do anel A (HE; WU; NIE; YAN *et al.*, 2017).

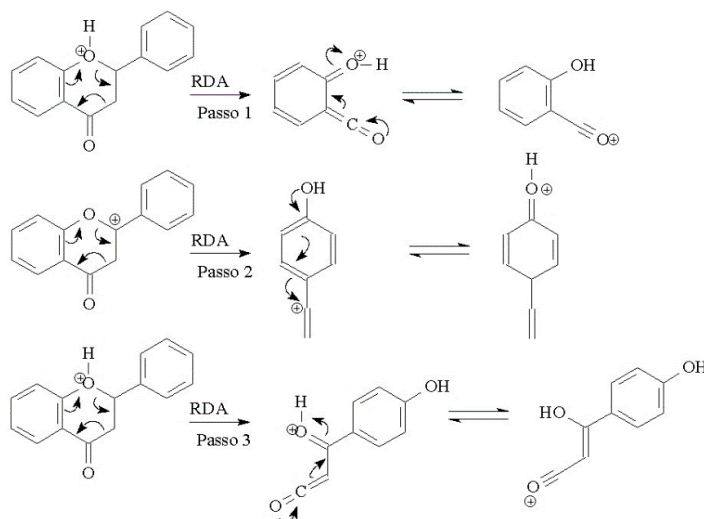


Figura 30 Mecanismos de RDA envolvendo anel C em esqueleto de flavonol.

Os dados de MS/MS do íon m/z 449 forneceram informação para identificar o dihidroflavonol ramnosídeo Astilbina. A confirmação dessas substâncias foi feita por análise de RMN e comparação com dados da literatura. Alguns desses flavonoides já foram previamente isolados e identificados a partir de folhas das espécies de *Myrcia bracteata* e *M. fenestrata* (LOPES, 2015).

A análise do espectro de fragmentação MS/MS do íon 447 $[M-H]^-$ permitiu determinar a presença de uma unidade de ramnosídeo, com fragmento prevalecente em 301. Há registros da ocorrência de flavonoides glicosilados em espécies de *Myrcia multiflora* (MATSUDA; MORIKAWA; YOSHIKAWA, 2002). Os picos desse íon apresentam bandas com absorção máxima a 351 nm. A interpretação do MS/MS sugere a presença de uma estrutura contendo flavonol ou flavona, 447/301 (WU; HUANG, 2005). O perfil de HPLC-DAD-MS, das amostras de *M. bracteata*, por exemplo, revela sinais que estão de acordo com a quercetina 3-*O*-ramnosídeo (quercetrina), íon molecular $[M-H]^-$ em m/z 447. A ocorrência

deste flavonoide foi registrada em espécies de *Myrcia* spp. (NICACIO; ROTTA; BOEING; BARIZAO *et al.*, 2017; SALDANHA; VILEGAS; DOKKEDAL, 2013).

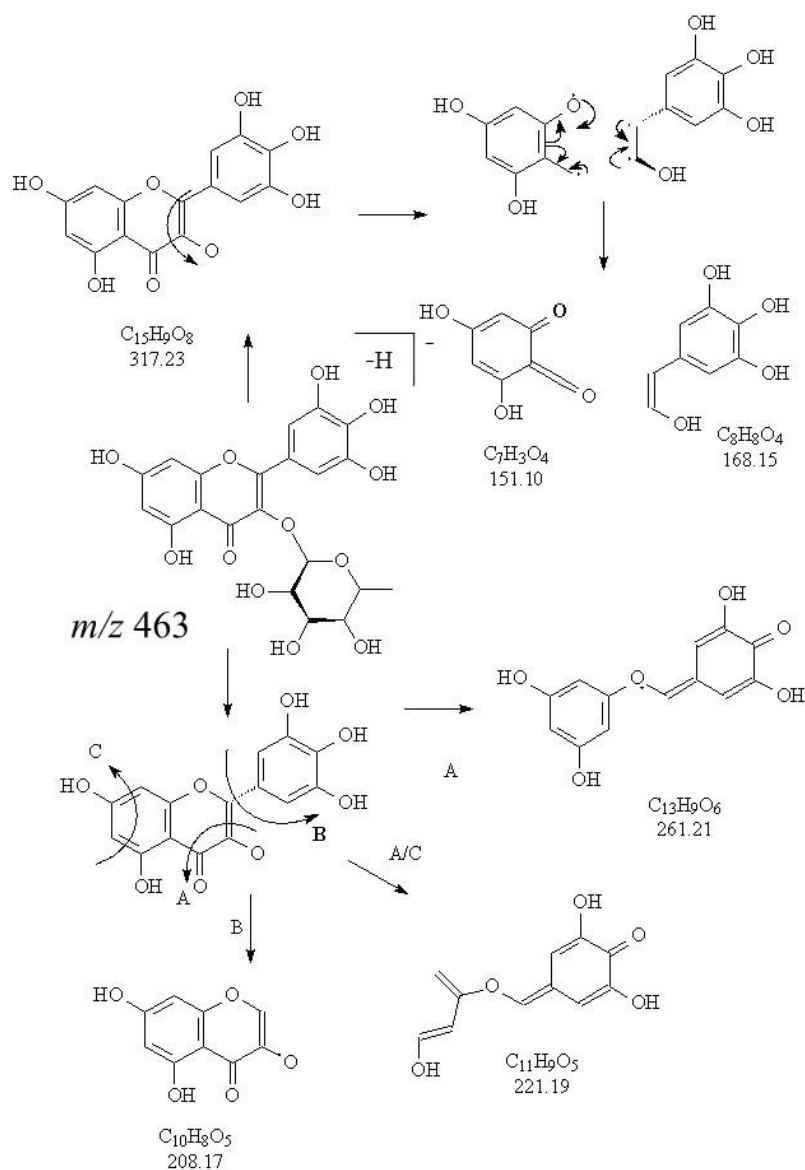


Figura 31 Proposta de fragmentação do íon de m/z 463 (identificado como miricitrina).

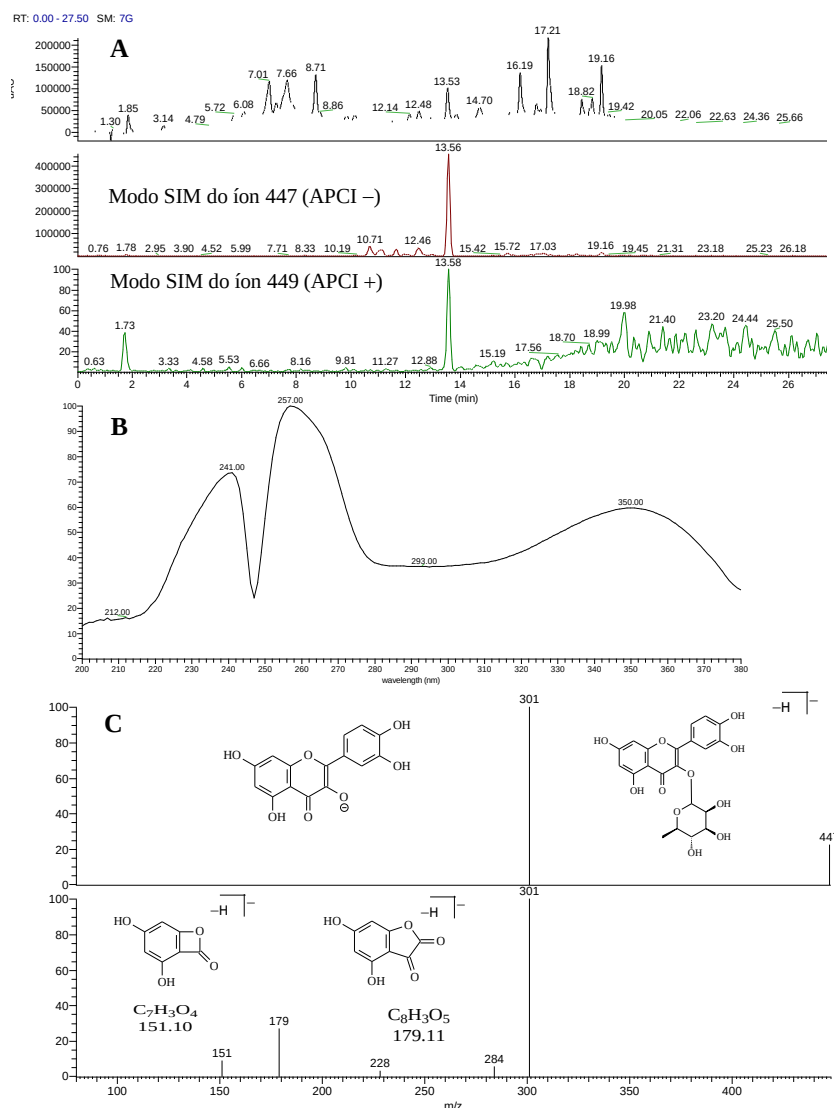


Figura 32 (A) Cromatograma do extrato da polpa de *M.bracteata* madura; comprimento de onda 280 nm e, no modo de Monitoramento Seletivo de Íon (SIM): ion 447 $[M-H]^-$, pico em TR=13,56 min, nos modos ESI(-/+); (B) banda de absorção associada à substância flavonoídica: 210-290 nm (banda II) e, 320-380 nm (banda I); (C) fragmentos observados em modo negativo $[M-H]^-$: energia de colisão em eV: $MS^2=10$ e $MS^3=14$.

Os sinais com deslocamentos químicos na região dos hidrogênios da molécula de quercetina 3-O-ramnosídeo observados nos extratos das espécies de *M. fenestrata* (verde),

M.bracteata (semente verde) e *M.bracteata* (semente madura) foram comprovados pela correlação entre os hidrogênios com acoplamento em meta sinalizado pelos hidrogenios em δ 6,38 (*d*, $J = 1,8$ Hz) e 6,20 (*d*, $J = 1,8$ Hz) compatíveis, respectivamente, com H-6 e H-8 do anel A trissubstituído e oxigenado nas posições C-5 e C-7; os sinais em δ 7,31 (*d*, $J = 2,4$ Hz), δ 6,87 (*d*, $J = 8,2$ Hz) e δ 7,26 (*dd*, $J = 8,2$ e $2,4$ Hz) referentes aos hidrogênios nas posições H-2', H-5' e H-6' do Anel B, 3,4-dihidroxilado (**Figura 33**). Sinais em δ 0,83 se correlacionam com os sinais de carbonos δ 17,51 para o grupo da ramnose. O próton anomérico em δ 5,25 com o C-3 em δ 134,1, confirmando a posição do grupo ramnosídeo ligado em C-3.

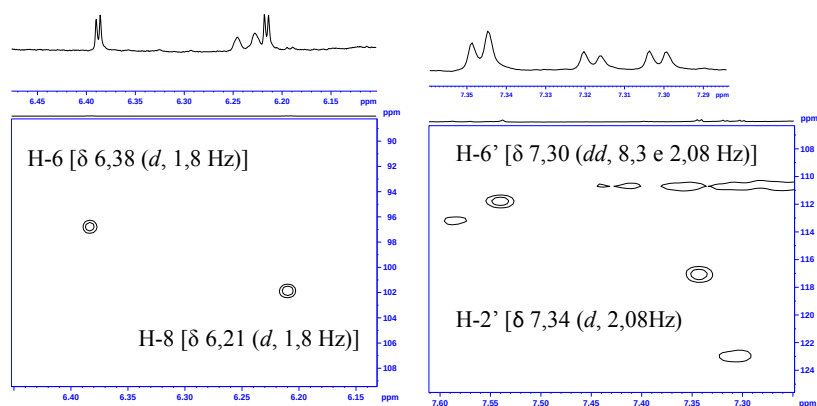


Figura 33 Ampliações do mapa de correlações Heteronuclear ^1H - ^{13}C (HSQC); sinais da quercetina 3-*O*- α -L-ramnosídeo presentes no extrato metanólico de *Myrcia bracteata*.

O íon a m/z 325 produziu o íon produto em m/z 169 [$\text{M} - 156 - \text{H}$] $^-$ e 183 [$\text{M} - 142 - \text{H}$] $^-$ que está relacionado à perda de ácido chiquímico e unidades glicosil, respectivamente. Substâncias com grupos carbonílicos tendem a quebrar a ligação alfa-carbonílica (**Figura 34**).

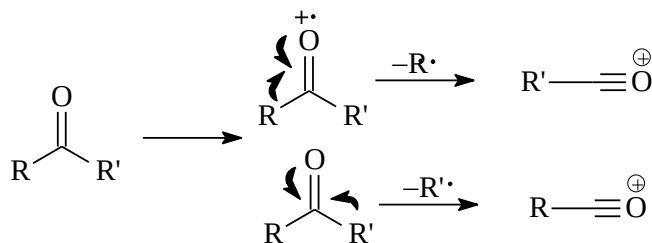


Figura 34 Exemplos de mecanismos para a quebra de ligação alfa-carbinílica.

Observou-se que o íon da molécula desprotonada m/z 477 perde uma unidade galoil $[\text{M} - 152 - \text{H}]^-$, que também leva à formação do íon em m/z 325. Essa substância foi identificada como ácido mono- e di-galoil chiquimico, respectivamente.

Observou-se que o íon da molécula desprotonada m/z 477 perde uma unidade galoil $[\text{M}-152-\text{H}]^-$, que também leva à formação do íon em m/z 325. Essa substância foi identificada como ácido mono- e di-galoil chiquímico, respectivamente.

O íon de m/z 371 foi caracterizado como um conjugado de ácido cafeico com ácido glucárico, de acordo com Spínola et al. (2015) trata-se do ácido cafeoilglucárico. Outra provável substância foi determinada como o ácido 3-(3, 4- dihidroxifenil) láctico 2-*O*-quinico. Esta substância foi identificada previamente por Gohari e colaboradores (2010), e considerada como um novo fenilpropanoide derivado de ácido quinico. O padrão de fragmentação do íon 371 levou ao íon 191. A fragmentação sequenciada do íon m/z 191 $[\text{M}-\text{H}]^-$ apresenta um padrão de fragmentação característica do ácido quinico: 191 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (2), 173 $[\text{M}-\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^-$ (14) 111 $[\text{M}-2\text{H}_2\text{O}-\text{CO}_2]^-$ (100).

O íon 353 exibe uma fragmentação padrão que indica a presença do ácido mono-cafeoilquinico, m/z 353 (perda de uma unidade de ácido cafeico m/z 191). Tentou-se identificar a substância como ácido 3-*O*-cafeoilquinico e foi confirmado por comparação de espectros de MS/MS e por HR-MS (GOUVEIA; CASTILHO, 2011). Outra estrutura de derivado de ácido cafeico foi proposta proveniente do íon m/z 325.

A fragmentação do íon de m/z 179 produziu os seguintes fragmentos nos espectros de MS³: m/z 161, 143 e 119. O esquema de fragmentação do restante da substância de peso molecular (180 Da) segue a via de dissociação de um ácido di-hidroxi-cinâmico. A

fragmentação de substâncias com grupos carbonílicos e que apresentam hidrogênio no carbono gama e cadeia lateral com sistemas de ligação alfa/beta comuns dos derivados de ácido cinâmico ocorre por rearranjo de McLaffert (**Figura 35**).

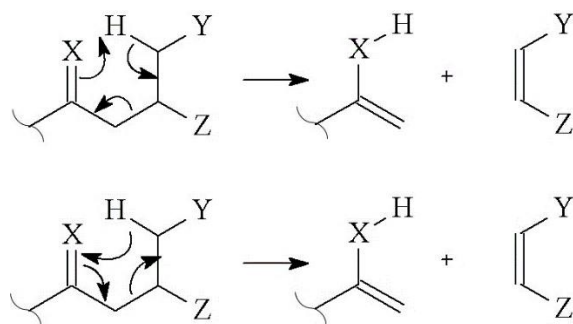


Figura 35 Representação de reações do tipo retro-heteroene (X = heteroátomo) com rearranjo de McLaffert.

O íon precursor m/z 301 do ácido elágico apresenta padrões de fragmentação característicos com perdas de 44 Da (CO_2) e 28 Da (CO), m/z 257 $[\text{M}-\text{H}-\text{CO}_2]^-$, m/z 229 $[\text{M}-\text{H}-\text{CO}_2-\text{CO}]^-$ e m/z 185 $[\text{M}-\text{H}-2\text{CO}_2-\text{CO}]^-$ (WUBSHET; MORESCO; TAHTAH; BRIGHENTE *et al.*, 2015).

O íon $[\text{M}-\text{H}]^-$ de m/z 783 foi classificado como bis-HHDP-*O*-hexosídeo com base na comparação do seu padrão de fragmentação com dados anteriores de *Eugenia brasiliensis* (TEIXEIRA; BERTOLDI; LAJOLO; AYMOTO HASSIRNOTTO, 2015). O íon em m/z 633 $[\text{M}-\text{H}]^-$ apresenta fragmentos m/z 301, MS^2 , característico da perda de uma unidade de ácido elágico. A substância de m/z 783 foi identificada como um derivado galoil-HHDP-hexosídeo (TEIXEIRA; BERTOLDI; LAJOLO; AYMOTO HASSIRNOTTO, 2015). No entanto, este íon aparece em 4 tempos de retenção distintos. O fragmento hexosídeo ligado ao ácido elágico também foi observada como um fragmento do um íon $[\text{M}-\text{H}]^-$ a m/z 633 que gerou m/z 615 e 301 em MS^2 . É possível que a molécula de galoil-HHDP-hexosídeo ocorra como três isômeros com padrões de fragmentação semelhantes. A formula molecular dessas substâncias podem ser atribuídos a corilagina (unidades ligadas através da posição 3,5 da unidade glicosídica), strictinina (ligadas através da posição 4,5 da unidade glicosídica) ou puniacorteína (ligadas

através da posição 2, 3 da unidade glicosídica e uma ligação C-glicosídica adicional) A ou B, estruturas isoméricas (FISCHER; CARLE; KAMMERER, 2011). Esses taninos são ocorrentes em espécies de *Syzygium aromaticum* (TANAKA; ORII; NONAKA; NISHIOKA, 1993) e *Feijoa sellowiana* (EL-SHENAWY; MARZOUK; EL DIB; ABO ELYAZED *et al.*, 2008).

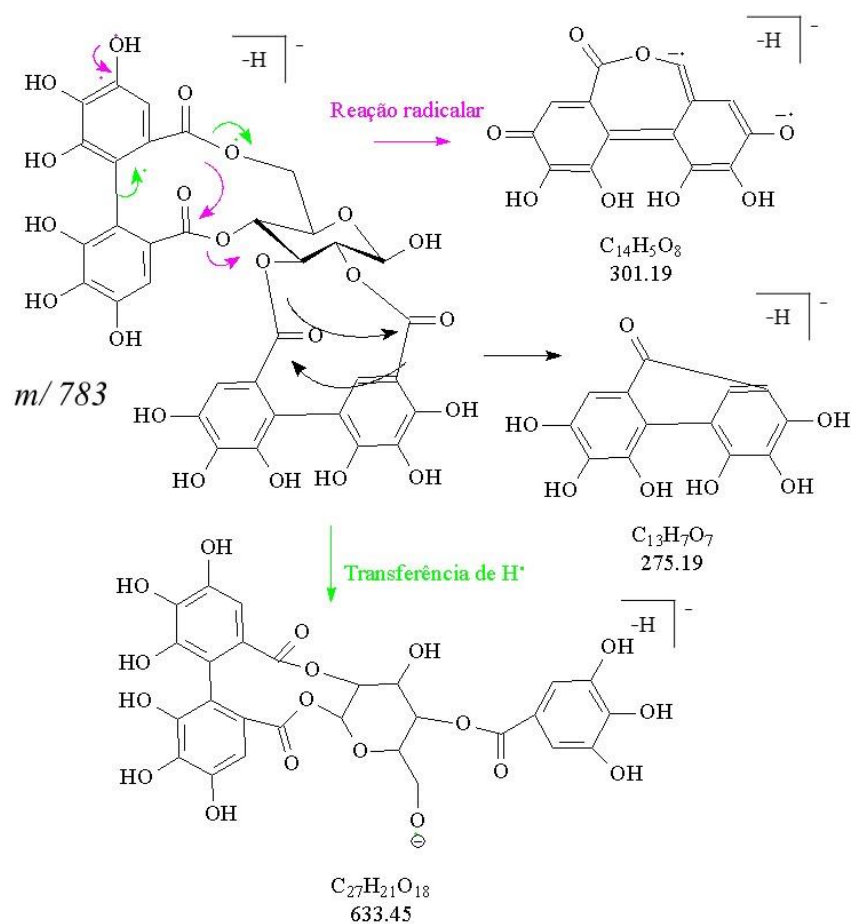


Figura 36 Proposta de fragmentação do ion de m/z 783 (identificado como pedunculagina).

Tabela 11 Identificação química das substâncias dos diferentes estágios de maturação dos frutos de *Myrcia* spp.

TR (min)*	Substância	Ocorrência	UHPLC-HRMS [M-H] ⁻ (F.M.; Erro ppm)	[m/z]: MS/MS (intensidade, %)	δ ¹ H (multiplicidade; J em Hz)	δ ¹³ C*	Referências
1,7	Glicose/Fructose	SyR	179,0558 [M-H] ⁻ (C ₆ H ₁₁ O ₆ , 1,6)	EM ² [179]: 161(100), 143(99), 131(80), 97(48), 119(41), 150(38), 101(31), 89(25), 87(19)	αGlic H-1: 4,65 (1H, d, J = 7,6) βGlic H-1: 5,23 (1H, d, J = 3,6)	αGlic C1 96; βGlic C1 92;	(HERNANDEZ; MARTINEZ; FERNANDEZ- TRUJILLO, 2007)
1,7	Glicose/Fructose	BURs	179,0536 [M-H] ⁻ (C ₆ H ₁₁ O ₆ , -8,9)	nd	nd	Nd	
1,8	Ácido idárico-1,4-lactona		191,0189 [M-H] ⁻ (C ₆ H ₈ O ₇ ,)	nd	nd	Nd	
	Ácido quínico	SyR; MaR; MaUR; MR; MUR; BVp	(C ₆ H ₁₁ O ₆ ,)	EM ² [191 (10)]: 111(100), 173 (22), 67 (20)	1,87 1,95 2,04	41,4 (C), 39,2 (C2), 41,37 (C3)	(SALDANHA; VILEGAS; DOKKEDAL, 2013)
				EM ² [191]:173 (100), 127(61), 111 (60), 87, 109 (35), 85(34), 59, 171(30), 61(10), 81, 113, 153, 143 (15)	1,88 (H-6, dd, J=3,45 e 10,69); 1,97 (ddd); 3,537 (dd); 4,00 (ddd); 2,05 (m) e 1,85 (dd); 2,03 (m) e 1,95 (ddd); 4,129 (q)	76,0 (C-1); 39,0 (C-2); 69,3 (C-3); 76,5 (C-); 71,1 (C-5); 39,0 (C-6); 179,5 77,8; 69,7; 43,3; 40,2 e 40,1; 73,0	
1,8	Dímero de ácido quínico	BRp; BRs; BURp; BURs FUR, FR, MUR, SyUR	383,1195 [2M-H] ⁻ [(C ₁₄ H ₂₃ O ₁₂ , -5,5)]	EM ² [383 (10)]: 191 (100)			
	Ácido gálico			EM ² [169 (20)]:125 (100)	7,08 (H-2/H-6, s)	121,2 (C-1); 109,3(C ₂ /C ₆); 146,5(C-3); 138,2(C-4); 166,4 (COOH) 170,3 (COOH);	
	Ácido chiquímico	FUR;FR; MaUR;MaR; BURp			6,58 (H-2); 4,43 (H-3); 3,72 (H-4); 4,01 (H-5); 2,77 (H-6a); 2,22 (H-6b)	132,7 (C-1); 138,6 (C-2);	

				66,1 (C-3); 73,1(C-4); 68,4 (C-5); 32,0 (C-6a e C-6b)	
2,1	Ácido málico	SyR	133,0135 [M-H] ⁻ (C ₄ H ₅ O ₅ ,3,7)		
2,5	HHDP-galoil- glicose	BURp;	633,0753	633,0753/463,045 3/ 300,9946/275,024 1/ 249,0462/169,010 4	nd
2,6	NI	SyR	191,0189 [M-H] ⁻ (C ₆ H ₇ O ₇ ,7,2)		nd
3,1	HHDP-galoil- glicose (isomer)	MaR ; BURp;	633,0643 [M-H] ⁻	633,0643/300,994 7/ 275,0185/169,011 9	nd
3,5	Pedunculagino (bis-HHDP-O- hexosideo)	MaR; MR; MUR;	783,0607 [M-H] ⁻ 633,0689/ 421,0460/ 300,9961/ 275,0156	EM ² [783 (20)]: 481 (18), 302 (44), 301 (100), 275 (16) EM ³ [301]: 257 (11), 229 (79), 185 (100)	(SILVA; PEREIRA; VERAS; DO VALE <i>et al.</i> , 2016)
3,5	NI	BURp;	191,0552 [M-H] ⁻ 342,4369	342,4369/191,055 2/	
4,0	HHDP-galoil- glicose (isômero)		783,0701 [M-H] ⁻ 708,0658		
4,3	HHDP-galoil- glicose (isômero)		633,0729 [M-H] ⁻	633,0729 /421,0306 300,9947/275,015 6	(LAMAS; LENQUISTE; BASEGGIO; CUQUETTO- LEITE <i>et al.</i> , 2018)
4,5	Derivado de ácido gálico		325,0519 [M-H] ⁻	325,0519/ 169,0129/ 125,0211	

4,8	NI	BURp;	603,0750 [M-H] ⁻	603,0750/533,0618/ 325,0531/174,9552/ 146,9571		
5,0	NI	BURp	577,1311 [M-H] ⁻	577,1311/ 533,0574/ 467,0360/ 174,9541		
5,0	HHDP-galoil-glicose (isômero)	MaR	633,0685 [M-H] ⁻	633,0685/481,0707 300,9985/275,0185 169,0086 785,0746/615,0372		
6,1	Elagitanino (derivado)	MR	785,0746 [M-H] ⁻	419,0667/301,0000 275,0113/249,0426 169,0262		
6,3	NI	MR	483 [M-H] ⁻			
7,1	1,3-O-Diferuloilglicerol	MUR; MR	443,1348 [M-H] ⁻ (C ₂₃ H ₂₃ O ₉ , 7,8)	EM ² [443 (50)]: 175 (100), 207 (20), 147 (30), 353 (35), 391 (10) 353/191,0551		
7,3	Ácido clorogênico	MR; MUR	353,0878 [M-H] ⁻ (C ₁₆ H ₁₇ O ₉ , 1,6)	183,0302/174,9545		
8,1	Catequina	BURs, BRs	579,1499 [M-H] ⁻ 289,0690	579/ 245/ 179		
8,3	Astilbina (dihidroquerceti na 3-O-ramnosídeo)	BURs, BRs	449,1089 [M-H] ⁻ (C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁ , - 0,9)	1,13 (3H, <i>d J</i> = 6,0), 3,94 (1H, <i>dq J</i> = 6 e 9); 3,42 <i>dd J</i> = 3 e 8,4); H-2 5,06 (1H, <i>d, J</i> = 10,6); H-3 4,56 (1H, <i>d, J</i> = 10,6); H-8 5,91 (1H, <i>d, J</i> = 2,1), H-6 5,89 (1H, <i>d, J</i> = 2,1), 6,43 (1H, <i>d, J</i> = 2,0); H-	C-2 85,9; C-3 80,6; C-8 99,3/168,8; C-6 98,2/166,5 C-2' 115/86; 122;148,9;	(LOPES, 2015)

					6 6,21-6,24 (2H, 6,22 (<i>d</i> , <i>J</i> = 1.6), H-8 6,23 (<i>d</i> , <i>J</i> = 1.6), H-2' 6,77 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 3,0, 0,4), H-5' 6,82 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 7,5, 0,4), H-6' 6.95 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 1,93; 7,5).	
8,7	Ácido 4-O-galoil-clorogênico	MR; MUR	505, 0996 [M-H] ⁻ (C ₂₃ H ₂₁ O ₉ , - 1,9)	505/343/191/169		
9,6	Ácido elágico glucuronídeo	MaR	477,0300 [M-H] ⁻ (C ₂₀ H ₁₃ O ₁₄ , - 4,9)/ 300,99			
9,8	Ácido 3-(3, 4-dihidroxifenil) lactico ácido 2-O-quinico	SyUR	371,0984 [M-H] ⁻ (C ₁₆ H ₁₉ O ₁₀ , 10)			
10,0	NI	MUR	657 [M-H] ⁻ 489	657/489/343/191/169		
10,2	NI		358 [M-H] ⁻	358/268		
11,5	Miricitrina	SyUR; SyR BURp	463,0882 [M-H] ⁻ (C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂ , - 1,9) 449	EM ² [463]: 316 (100), 317 (55), 136, 151, 179, 214, 238, 255, 271, 282, 301, 337, 359, 375, 418, 445(10) EM ² [463]: 271(100), 270 (32), 242 (25), 287 (14), 217 (12)	111,7 (C1), 135,9(C-2), 139,3 (C-3), 148,7 (C-4), 110,2(C-5), 108 (C-6)	
12,0	NI	MUR	439,1066 [M-H] ⁻	439/314/245/175		
12,3	NI	MUR	610,4086 [M-H] ⁻	610/483/564/508/431/315/225/145		
12,5	Ácido elágico	MaR; MR; MUR;	300,9970 [M-H] ⁻ (C ₁₄ H ₅ O ₈ , 6,8)	7,55 (H, <i>s</i> largo)	110/114/142/162	
13,0	quercitrina 3-O-r	BRs; BURs; BURp	447,0933 [M-H] ⁻ (C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁ , - 3,4)	EM ² [447]: 301 (100)	6,20 (H-8, <i>d</i> , 1,8); 6,38 (H-6, <i>d</i> , 1,8);	157 (C-2), 137 (C-3),

	amnosideo		EM ³ [301]: 179 (25), 151 (10), 284 e 228 (5)	7,31 (H-2' e H-6', d, 2,4), 5,26 (H-1'', d, 1,2), 3,5-4,0 (m),7,29 (dd 1,7 e 8,(1H, d, J = 1,2, H- 1''), 4,22 (1H, dd, J = 3,1, 1,3, H-2''), 3,79 (1H, dd, J = 9,6, 3,2, H-3''), 3,32(1H, m, H-5''), 3,34 (1H, t, J = 9,6, H-4''), 0,96 (3H, d, J = 6,3, H-6'')	100 (C-6), 118,1 (C- 2'/C-5'), 121 (C-6'),101 (C- 1'')
13,34	NI	SyR; MaR	723,6508 [M-H+HCOOH] ⁻ (C ₄₄ H ₆₇ O ₈ , 5,1) 677,4974 [M-H] ⁻ (C ₄₃ H ₆₅ O ₆ , 0,4)		Nd
13,85	NI	BRs	461 [M-H] ⁻ 461+46 9507)	461/329	Nd
14	NI	BURp	443,2286 [M-H] ⁻		Nd
14,99	NI	BRs	507 [M-H] ⁻		Nd
15,8	NI	MR; MUR; MaR; MaUR;	439 [M-H] ⁻ 311/223/179		Nd
16,9	1-[4-hidroxi-3- metoxifenil]-7- fenil-3- heptanona	SyR	311,1689 [M-H] ⁻ (C ₂₀ H ₂₃ O ₃ , 11,6)	311(10)/193 (100) /207(30)/251(25)/ 17(12)	Nd
16,9	NI	BRs	503 [M-H] ⁻ 193/179		Nd
16,9	1-[4-hidroxi-3- metoxifenil]-7- fenil-3- heptanona	MaUR; MaR	311 [M-H] ⁻ 251/207/193/179		Nd
18,3	NI	SyR; MaUR; MaR;	631 [M-H] ⁻ 543/383/315	631/315(100)/269 (30)/174(10)	Nd
18,5	Ácido 2- Cafeoiloxi-4- hidroxiglutárico	BRp, MR, MaR	325 [M-H] ⁻ (C ₁₄ H ₁₃ O ₉)	EM ² [325(20)]: 279 (100), 184 (70), 173(55), 169 (15), 237(12)	Nd
19	NI	MaR	715 [2M-H] ⁻ (C ₄₀ H ₇₅ O ₁₀ , 0,1)/357[M-H] ⁻ 699/341		Nd

19,2	NI	SyR	519,3891 [M-H] ⁻ 297,2431	519/433(10)/365(15)/297 (100)/271 (20)		
19,6	Diosmetina	MaR; SyR; MR, BURs	299,2577 [M-H] ⁻ (C ₁₈ H ₃₅ O ₃ , 1,5)		δ 3,92 (3H, s), 6,26 (1H, d, J = 2,0), 6,40 (1H, s), 6,43 (1H, d, J = 2,0), 6,95 (1H, dd, J = 8,4, 0,4), 7,49 (1H, dd, J = 1,7, 0,4), 7,74 (1H, dd, J = 8,4, 1,7)	Primeira vez no gênero
19,9	Dímero do Ácido 2-O-cafeoil treônico	MaUR	595 [M-H] ⁻ 297		Nd	Primeira vez no gênero
20,14	Ácido 2-O-cafeoil treônico	MaUR	297 [M-H] ⁻ 343		Nd	
20,6	NI	MaR; MaUR	325,2733 [M-H] ⁻ (C ₂₀ H ₃₇ O ₃ , 3,7);		Nd	Primeira vez no gênero
20,8	Ácido palmítico	BRs	255,2330 [M-H] ⁻ (C ₁₆ H ₃₁ O ₂ , - 12,8)		Nd	
20,84	Ácido 3-(3, 4-dihidroxifenil) láctico 2-O-quínico	MaUR	325 [M-H] ⁻ 371/651		Nd	Primeira vez na família
21,2	Ácido Cafeoil quínico	MaUR	353,0878 [M-H] ⁻ (C ₁₆ H ₁₇ O ₉ , 3,1);	EM ² [353]: 173 (100), 111 (56) EM ³ [353:173]: 111 (100)	Nd	(FISCHER; KATO; KONISHI, 2003)
23,0	NI	MaUR	381 [M-H] ⁻ 427			

*TR= tempo de retenção; Multiplicidade: singlete (s), dubleto (d), tripleto (t), duplo dubleto (dd), quinteto (q), multiplete (m). #: os sinais ou as multiplicidades não puderam ser determinados; NI=Não identificado.

5.9.1 Quantificação de ácido ascórbico em frutos de *Myrcia* spp

A **Tabela 12** apresenta os valores de concentração de ácido ascórbico (AA) determinados nos frutos de Myrtaceae. Os valores apresentados resultam de uma média de valores de três áreas espectrais de 3 amostras individuais ($n=3$). O método adotado apresenta boa linearidade na faixa de concentração de $1-100 \mu\text{g mL}^{-1}$ e boa resolução para AA ($0,4 < R_s < 1,3$). O coeficiente de determinação da linearidade (R^2) da curva de calibração foi de 0,9993. A menor concentração detectável – (Limite de Detecção - LD) para AA foi de $0,0221 \mu\text{g mL}^{-1}$, calculada como a relação sinal / ruído (S/R) de 3: 1 (ICH, 1996; Snyder & Kirkland, 1979). O limite de quantificação (LQ) determinado foi de $0,0737 \mu\text{g mL}^{-1}$ e obtido a partir da menor concentração cujo valor de S/R foi maior que 10:1 (SNYDER; KIRKLAND, 1979). O LD e LQ para o AA determinado neste estudo são semelhantes aos relatados na literatura quando se trata de vitamina C e m frutos e vegetais. Portanto, este método de quantificação de AA pode ser considerado sensível com base na linearidade e nos valores de LD e LQ.

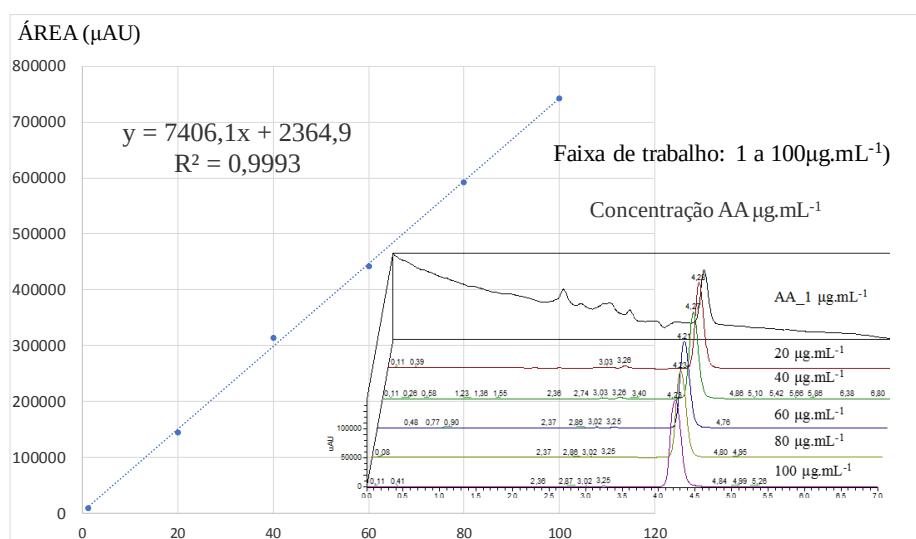


Figura 37 Curva de calibração e cromatogramas do padrão de ácido *L*-ascórbico

A **Figura 37** apresenta o resultado da verificação do tempo de retenção do ácido ascórbico. Observa-se que, é possível confirmar o TR observado na amostra é o mesmo do padrão de AA. E, após a adição de padrão na matriz, o TR manteve-se e a área sob o sinal foi aumentada proporcionalmente devido à somatória das áreas.

Os limites mínimos de detecção (LD), na relação sinal / ruído (S/R) de 3:1, e os níveis mínimos de quantificação (LQ), com relação S/R de 10:1, foram determinados experimentalmente.

Tabela 12 Quantidade de ácido ascórbico em frutos de *Myrcia* spp.

Amostra	AA (mg/100g de Fruto Fresco)	Parâmetros
MR	<LQ	LD: 0,0221 $\mu\text{g mL}^{-1}$ LQ: 0,0737 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Eq Linear: $y = 7406,1x + 2364,9$ $R^2: 0,9993$
BR	<LQ	
FR	109,08 $\pm$ 19,69	
SyR	<LQ	
MaR	607,46 $\pm$ 60,00	

Entre todas amostras de frutos exóticos analisados, *M. magnoliifolia* apresenta o maior valor de AA (607,46 $\pm$ 60,00 mg/100 g FF). No Brasil, esse fruto ainda é pouco conhecido e ainda não é cultivado, sendo encontrado apenas na forma silvestre, assim como o *M. fenestrata* que apresenta o segundo maior resultado de AA. Este é o primeiro relato da determinação de ácido ascórbico em polpas frescas de frutos não convencionais do gênero *Myrcia*. Não foi possível detectar ácido ascórbico nos extratos metanólicos, apenas nas polpas frescas.

Os estados fisiológicos de amadurecimento e aparência de frutos estão relacionados as condições climáticas e ao tipo de região. Esses fatores podem influenciar a cor, o sabor e a quantidade dos constituintes químicos contidos nesses frutos que podem variar de acordo com o estágio de maturação. Dessa forma, os teores de fenólicos totais (FT), assim como os níveis de ácido ascórbico podem variar nas polpas durante a maturação, influenciando as respostas antioxidantes (BRANDAO; DE SENA; TESHIMA; DAVID *et al.*, 2011).

5.10 Capacidade antioxidante e antiglicante dos extratos de frutos de *Myrcia* spp.

A **Tabela 13** apresenta os resultados dos ensaios antioxidantes pelo ensaio de DPPH e a determinação do Teor de Fenólicos Totais (FT) nas diferentes amostras de frutos de *Myrcia* spp.

A maior atividade antioxidante obtida pelo ensaio de DPPH foi dos extratos das sementes de frutos maduros de *M. bracteata* (BRs) ($24,2 \pm 1,1 \mu\text{g mL}^{-1}$). Assim como as sementes de seus frutos verdes ($42,5 \pm 1,1 \mu\text{g mL}^{-1}$). Aparentemente, os frutos verdes das espécies de *Myrcia* apresentam maior potencial de inibição do radical DPPH que os frutos maduros. As espécies de *Myrcia* que apresentaram maior capacidade antioxidante (DPPH) também foram aquelas com os melhores valores no ensaio antiglicante via não-oxidativa (frutose) (VNO): BURs, BRs, SyUR, MUR, FRs (**Tabela 13**). Na análise de CAA dos extratos, BRs, BRp, BURp, SyR e MUR apresentam respostas estatisticamente semelhantes, sendo também o grupo de amostras com a melhor porcentagem de inibição dos chamados ROS, com valores entre 36 e 45 % na concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($p < 0,05$). O padrão de quercetina apresenta 100% de inibição nessa mesma concentração ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Estatisticamente, o teor de Fenólicos Totais (FT) nessas amostras é inversamente proporcional ao valor da capacidade inibitória frente ao radical livre DPPH, ou seja, quanto maior o teor em fenóis totais, menor será a concentração necessária para inibição de 50% da concentração de radicais livres de DPPH representada pelo IC_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$). As amostras de sementes dos frutos de *M. bracteata* foram as que apresentaram melhores resultados em todos os ensaios, assim como a *M. sylvatica* verde. A atividade antioxidante (DPPH) e antiglicante (Via Não Oxidativa) estão fortemente correlacionados (**Tabela 14**).

Tabela 13 Propriedades antioxidantes, antiglicante e fenólicos totais dos extratos metanólicos dos frutos de *Myrcia* spp

Amostra	FT (mg EAG g ⁻¹)	DPPH IC ₅₀ (µg mL ⁻¹)	*CAA % Inib.#	*VO (Glioxal [‡])	*VNO (Frutose)	
				% Inib.	% Inib.	IC ₅₀ (µg mL ⁻¹)
BURS	255,4 ± 0,6 ^c	42,5 ± 1,1 ^f	3,9 ± 1,4 ^b	32,6 ± 1,2 ^{de}	94,6 ± 3,9 ^a	8,5 ± 0,4 ^a
BURP	24,0 ± 1,8 ^g	475,2 ± 11,0 ^b	38,0 ± 2,9 ^{bc}	18,1 ± 1,3 ^f	91,5 ± 0,6 ^{ab}	76,8 ± 3,2 ^b
BRP	23,5 ± 0,9 ^g	NC	40,6 ± 3,7 ^b	5,2 ± 1,9 ^{de}	5,3 ± 1,9 ^d	NC
BRS	280,1 ± 2,9 ^b	24,2 ± 1,1 ^g	41,1 ± 0,8 ^b	31,9 ± 1,2 ^{de}	98,8 ± 0,5 ^a	9,5 ± 1,2 ^a
SYUR	239,9 ± 1,3 ^c	78,3 ± 0,1 ^e	22,6 ± 2,7 ^{de}	18,2 ± 2,4 ^f	99,4 ± 1,2 ^a	9,2 ± 0,9 ^a
SYR	60,1 ± 2,1 ^f	371,7 ± 7,8 ^c	40,6 ± 3,6 ^b	18,2 ± 1,2 ^f	96,2 ± 0,5 ^a	29,9 ± 0,6 ^e
MUR	317,4 ± 9,1 ^a	47,2 ± 0,5 ^f	39,1 ± 2,0 ^{bc}	49,9 ± 2,3 ^b	104,6 ± 0,4 ^a	3,9 ± 0,1 ^a
MR	57,2 ± 4,3 ^f	NC	14,2 ± 5,0 ^{ef}	31,4 ± 0,8 ^e	101,0 ± 2,4 ^a	27,2 ± 0,3 ^e
MaR	205,0 ± 14,7 ^d	90,3 ± 0,3 ^e	29,7 ± 0,9 ^{cd}	31,3 ± 2,1 ^e	98,6 ± 0,5 ^a	13,0 ± 0,2 ^c
MaUR	55,9 ± 3,6 ^f	534,3 ± 1,1 ^a	27,1 ± 2,4 ^d	13,6 ± 1,7 ^f	79,5 ± 1,2 ^{bc}	95,3 ± 1,5 ^d
FRp	283,2 ± 13,3 ^b	233,4 ± 12,2 ^d	1,3 ± 1,8 ^h	36,9 ± 1,1 ^{cd}	2,7 ± 5,4 ^d	NC
FRs	291,6 ± 14,7 ^b	35,2 ± 2,9 ^{fg}	12,8 ± 3,7 ^{efg}	38,9 ± 2,5 ^c	98,0 ± 2,3 ^a	7,4 ± 0,4 ^a
FUR	182,1 ± 4,3 ^e	49,0 ± 2,9 ^f	7,8 ± 4,9 ^{fgh}	61,3 ± 1,9 ^a	93,8 ± 14,4 ^a	13,9 ± 2,6 ^c
Querc		23,9 ± 0,2 ^g	104,6 ± 5,8 ^a	85,0 ± 0,3		
AA		45,9 ± 1,5 ^f				
AG		2,9 ± 0,1 ^h				
Ag					77,4 ± 2,2 ^c	28,6 ± 1,3 ^e

Resultados expressos em média ± desvio padrão (n = 3). Concentração de Quercetina (Querc), aminoguanidina (Ag), ácido gálico (AG) e ácido ascórbico (AA): 100,0 µg mL⁻¹. FT = Fenólicos Totais; VO = atividade antiglicante por via oxidativa (‡ não foi possível determinar o IC₅₀); VNO = atividade antiglicante por via não-oxidativa; mgEAG = milliequivalente de ácido gálico; IC₅₀ = Capacidade Inibitória em µg mL⁻¹. *Valores medidos com extratos diluídos a concentração de 100,0 µg mL⁻¹. #Valores de CAA cujo número de células foi reduzido a 10% depois de 72 h de tratamento. Os valores em cada coluna com a mesma letra são estatisticamente iguais, distribuição normal com nível de significância $p < 0,05$ pelo teste de Tukey.

Tabela 14 Correlação de *Pearson* dos dados antioxidantes dos extratos metanólicos dos frutos de *Myrcia* spp.

	CAA (%)	FT	DPPH (IC ₅₀)	GNO%	GNO (IC ₅₀)
FT	-0,275				
DPPH	0,386	-0,927			
GNO%	0,171	0,603	-0,642		
GNO (IC ₅₀)	0,255	-0,845	0,943	-0,746	
GO%	-0,384	0,578	-0,679	0,360	-0,594

O grupo de *Myrcia* (BURs, BRs, SyUR, MUR, FRs) tem em comum as substâncias majoritárias identificadas no modo $[M-H]^-$: ácido quinico 191,0189 e seu dímero 383,1195 $[2M-H]^-$; 191,0558; Ácido gálico 169,0104; ácido HHDP-galoil-glicosídeo 633,0753/191,0189; Pedunculagina (bis-HHDP-O-hexosídeo) 783,0607; ácido 3-(3, 4- dihidroxifenil) láctico 2-O-quinico 325 e seu dímero 651 $[2M-H]^-$. Como minoritários: ácido clorogênico 353,0878; diosmetina 299,2577 e quercitrina 447,1088.

Substâncias fenólicas sendo os derivados como miricetina e quercetina-3-O-rhamnosídeo, estão relacionadas às atividades antioxidantes e antiglicantes, de acordo com ensaios realizados com espécies de *Eugenia pyriformis*, *Myrcia laruotteana*, *Myrcia obtecta*, *Eugenia pyriformis*, *Myrcia laruotteana*, *Myrcia obtecta*, *Eugenia chlorophyllae*, *Eugenia punicifolia* (SALVADOR; DE LOURENCO; ANDREAZZA; PASCOAL *et al.*, 2011). Na literatura há relatos da atividade antioxidante de extratos de outros frutos de *Myrcia* que apresentam resultados semelhantes aos determinados para os frutos de *Myrcia* nesse estudo de revisão de (CASCAES; GUILHON; ANDRADE; ZOGHBI *et al.*, 2015).

5.11 Análise quimiométrica dos dados de DI-ESI(-)MS dos extratos dos frutos de *Myrcia* spp.

Os espectros de MS obtidos no modo full scan de cada amostra foram utilizados na análise estatísticas afim de verificar similaridades e diferenças químicas entre os frutos de *Myrcia* spp. Os *fingerprints* ESI(-)-MS apresentaram conjuntos distintos de marcadores para algumas amostras, principalmente flavonóides e elagitaninos. São observados sinais (m/z) de íons com valores m/z de 289 (catequina), 463 (quercetina glicosídeo), 447 (quercirtina), 633 e 783 (possivelmente elagitaninos).

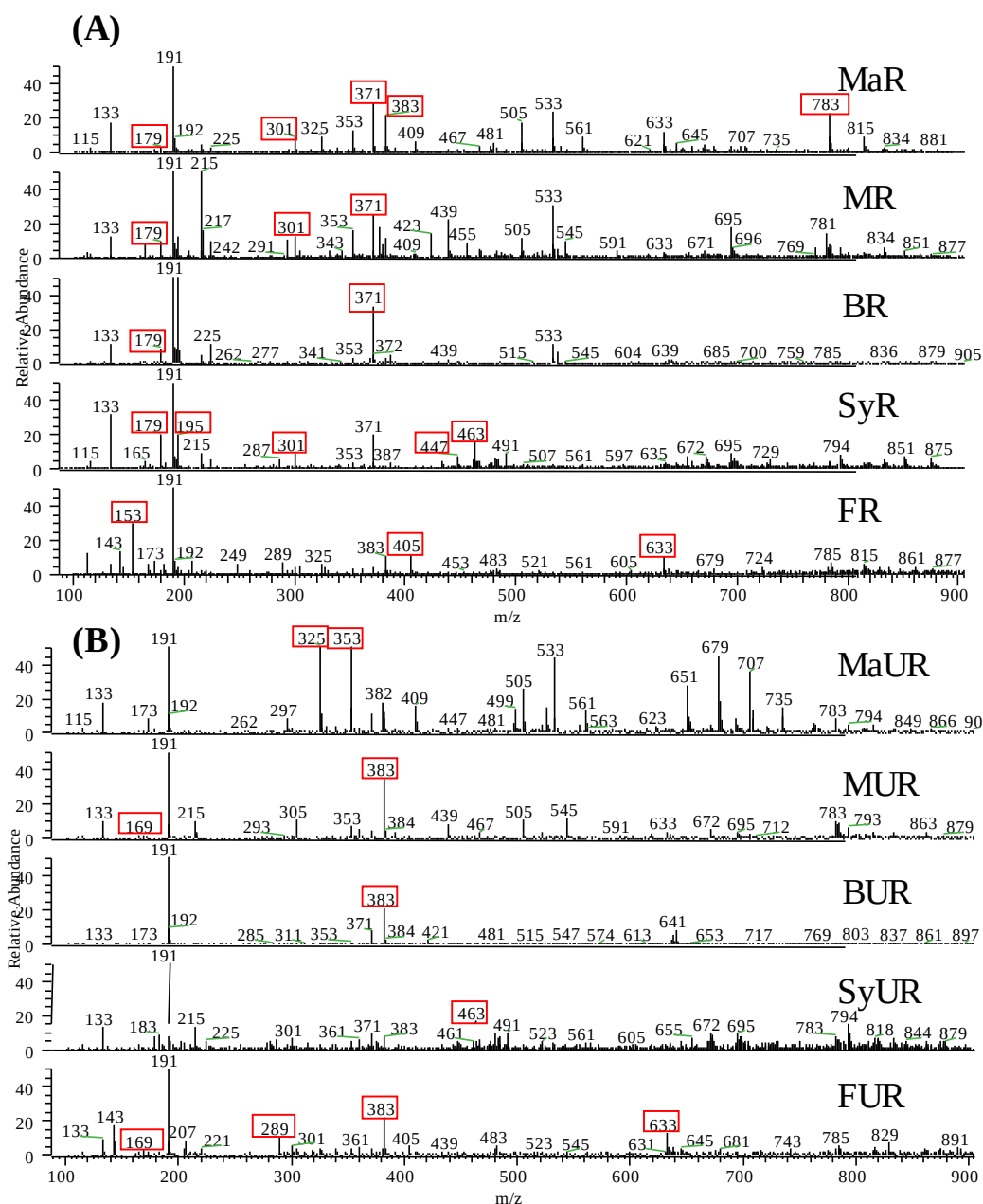


Figura 38 Espectros de Massas obtidos por Injeção Direta e ionização por ESI(–) no modo *full scan* (m/z 100-1000) dos extratos metanólicos de frutos de *Myrcia* spp. A) frutos maduros; B) frutos verdes.

Método PCA (Figura 39) com os dados MS mostraram claramente separando os frutos em espécies. O *biplot* dos PCs explica 83% da variância total. Este resultado pode ser atribuído a efeitos de heterogeneidade da amostra e pode ser explicado levando-se em conta que espécies diferentes foram analisadas. Quando comparados os estágios de maturação, apenas *M. bracteata* e *M. minutiflora* não maduros foram agrupados por PC1(–), além de uma amostra de semente madura de *M. bracteata*. As partes (polpa e

semente) não foram importantes para a modelagem. O outro grupo de amostras apresentou um perfil metabolômico mais homogêneo, com menor dispersão amostral.

No modo negativo de ionização, observa-se que a *M. minutiflora* verde (MUR) é mais semelhante com o grupo formado pela *M. bracteata* (MB) no lado negativo da PC1 (–) e, que a *M. minutiflora* madura (MM) se agrupou ao outro grupo formado pela *M. sylvatica* (SyR e SyUR), *M. magnoliifolia* (MaR e MaUR) e *M. fenestrata* (FUR e FR), no eixo positivo da PC1 (+). Observando o conjunto de dados por PC2 (11%) nota-se que há alguma semelhança entre *M. fenestrata* e *M. bracteata*, incluindo a amostra de *M. minutiflora* Verde ao agrupamento. Dessa forma, não se observa separação por estágios de maturação Verde e Maduro, nem entre Polpa e Sementes, e a informação química, ou seja, os valores dos íons, pesou mais na análise PCA dessas amostras.

Em relação à análise hierárquica de cluster (HCA), a distância entre os *clusters* foi calculada pelo método Euclidiano. Os índices de similaridade de cada agrupamento são, para o grupo I = 6 e, para o grupo II = 4 (**Figura 40**). O dendrograma resultante classificou as amostras em dois *clusters* principais confirmando o resultado observado por PCA.

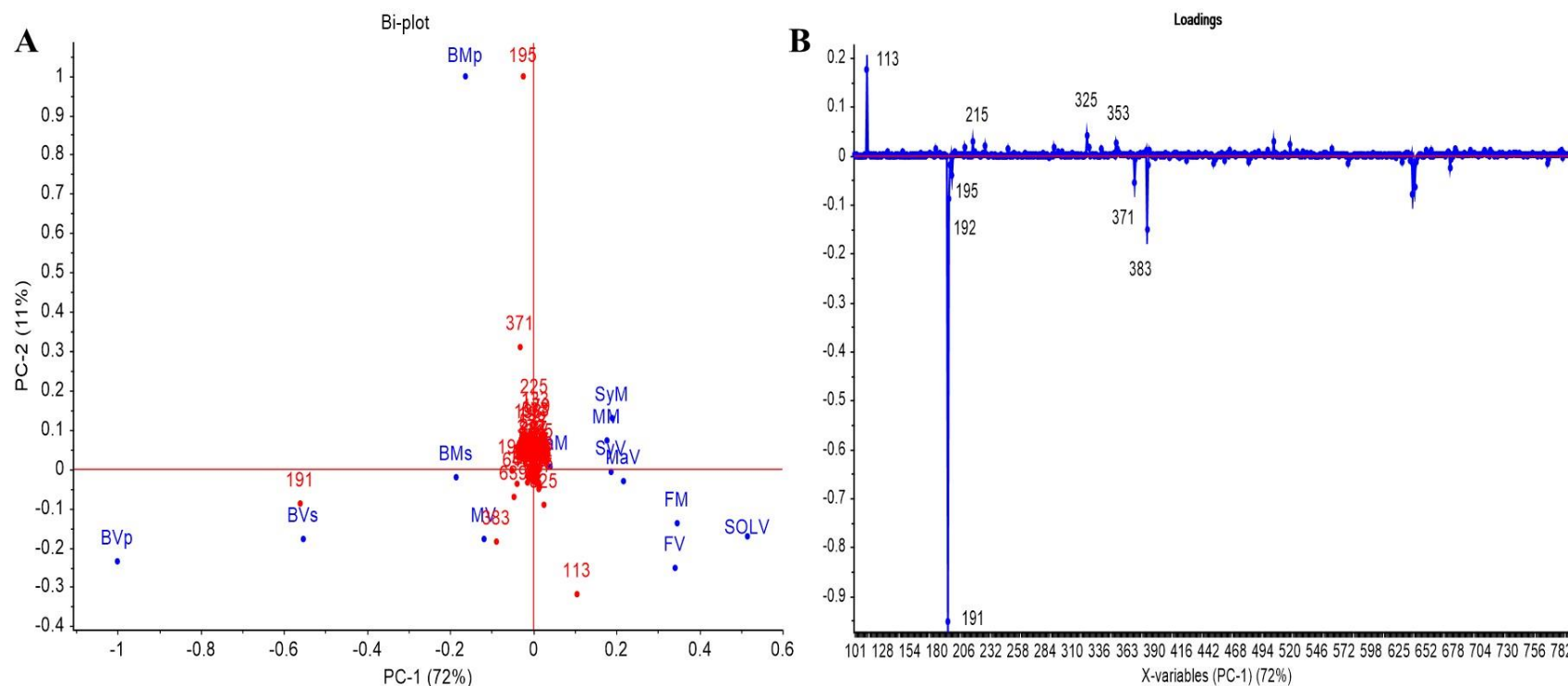


Figura 39 (A) PCA (PC1xPC2, com variância explicada de 83%) dos dados dos extratos metanólicos dos frutos verdes e maduros de *Myrcia* spp analisados por DI-IT-ESI(-); (B) Ampliação dos loadings; (D) carregamento dos *loadings* representados pelos íons de maior peso em cada quadrante da PCA. Scores = código das amostras; Loadings = íons em *m/z*.

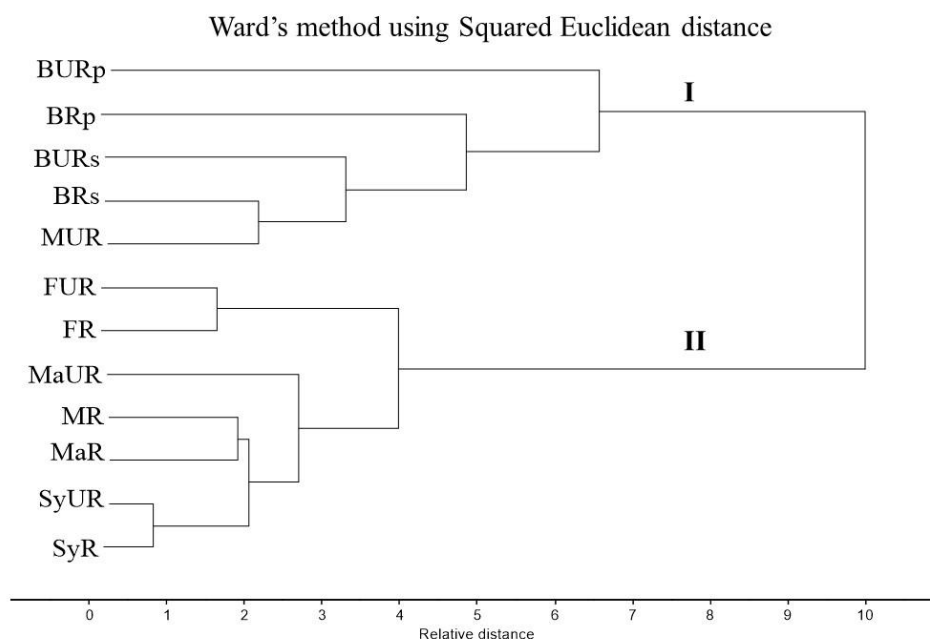


Figura 40 Dendrograma obtido por HCA das áreas relativas dos sinais do TIC (100-800 m/z) (DI-ESI(-)-IT-MS) dos frutos de *Myrcia* spp apresentando *linkage* pelo método de Ward com distância Euclideana; Índice de similaridade do grupo I = 6; Índice de similaridade para o grupo II = 4.

Os perfis de metabólitos dessas espécies foram claramente separados por regressão PLS em função de metabólitos antioxidantes que responderam ao ensaio de DPPH e a atividade antiglicante. Dessa forma, é possível verificar a relação entre as classes de metabolitos e os frutos de Myrtaceae. As diferenças entre os grupos (espécies e partes de frutos, polpa e semente) foram comparadas e os gráficos de PLS obtidos mostraram que cada grupo estava claramente separado. Além disso, foi possível verificar pelos valores dos coeficientes de regressão por PLS as diferenças em relação à variação entre as classes dos metabólitos.

A PCA possibilitou diferenciar os frutos em função dos seus metabolitos. Porém, para explicar quais classes químicas (variáveis latentes em X (Predict)) estão relacionadas às respostas antioxidantes (DPPH, antiglicante variáveis latentes em Y (Response)), as matrizes foram analisadas por PLS par modelar a separação entre os grupos observados por PCA e, dessa forma, entender quais variáveis (íons) têm maior importância (maior peso) no agrupamento das amostras.

No score plot do gráfico de PLS que correlaciona os dados antioxidantes (DPPH) com os dados de DI-ESI(-)-MS (Figura 41), as amostras de SyR, BURp e MaUR foram claramente discriminadas por Fator-1 (54%; 70%) e Fator-2 (28%; 24%), das demais

amostras com melhor resposta antioxidante. Quanto mais próximas as amostras estiverem (*predicted versus reference*), mais correlacionadas elas são em relação aos dois componentes envolvidos. Os valores satisfatórios das variáveis X (54%) e Y (70%) tiveram acurácia de predição de 0,9999 (R²) e Slop 0,9999. Se a soma das variâncias explicadas para os dois componentes for grande (por exemplo, entre 70-80%), então grande parte dos dados apresentados no grafico é aceitável e, para que as correlações possam ser interpretadas com um alto grau de certeza o valor de Slop (inclinação) deve ser sempre próximo ou igual a 1 (ESBENSEN; SWARBRICK, 2018).

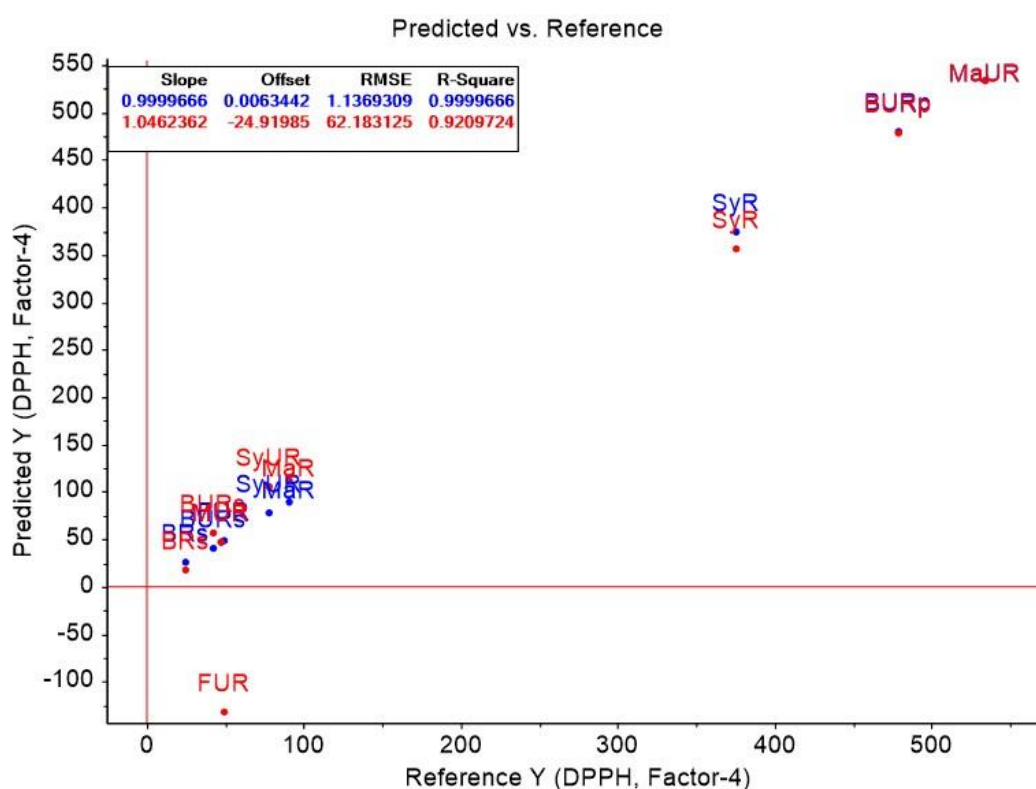


Figura 41 Análise por PLS entre os dados de DI-ESI(-)-MS (m/z) e atividade antioxidante DPPH (IC₅₀).

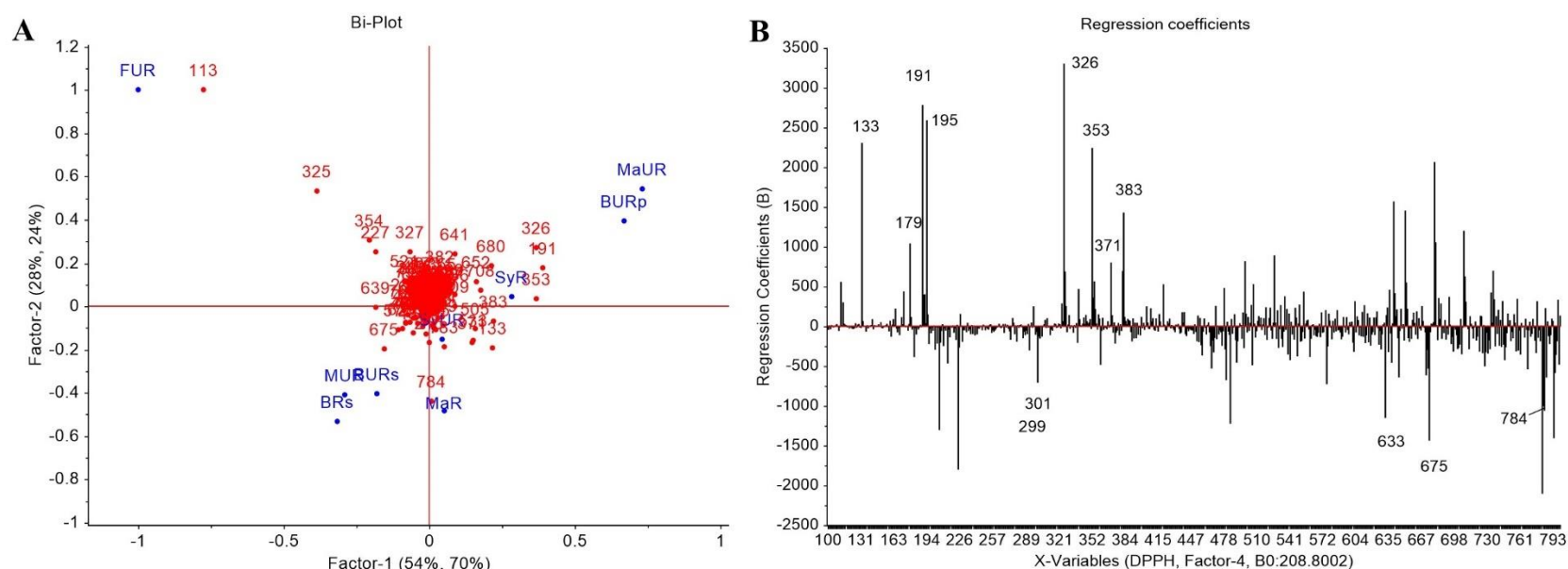


Figura 42 Análise por PLS entre os dados de MS (modo negativo) (m/z) e atividade antioxidante (IC_{50}); B) Valores de Loadings representados pelos íons (m/z) de maior importância: valores do lado positivo: 133 (ácido málico); 179 (unidades glicosídicas); 191 (ácido quínico); 325 (ácido 2-cafeoiloxi-4-hidroxiglutarico); 353 (ácido clorogênico); 371 (ácido 3-(3,4-dihidroxifenil) láctico ácido 2-O-quínico); 383 (dímero de ácido quínico); do lado negativo há os valores: 299 (diosmetina); 301 (ácido elágico); 447 (quercitrina); 633 HHDP-galoil-glicose; 783 (pedunculagina).

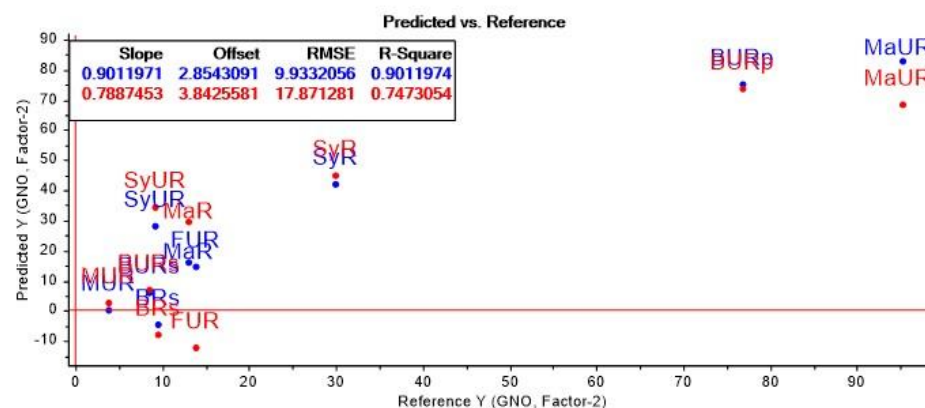
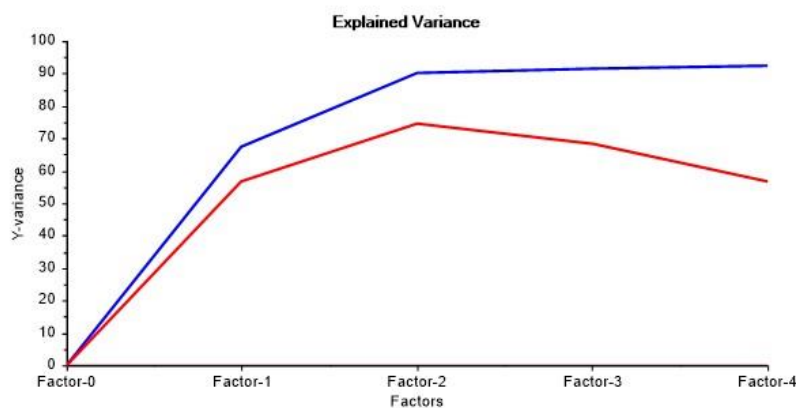
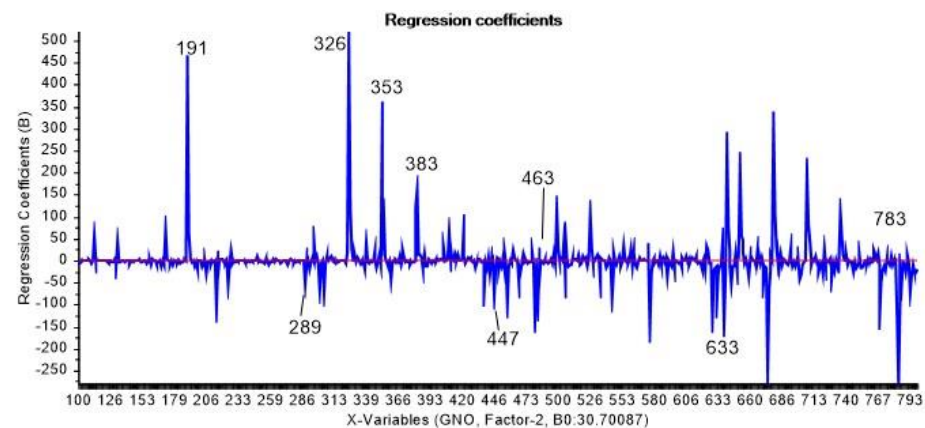
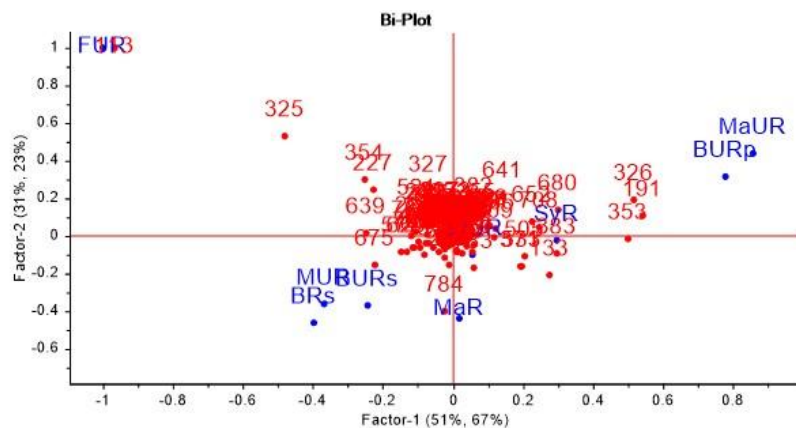
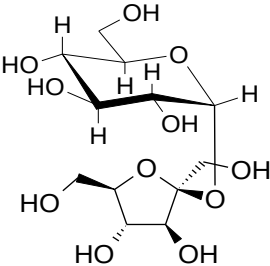
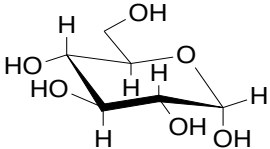
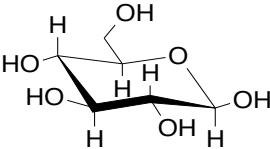
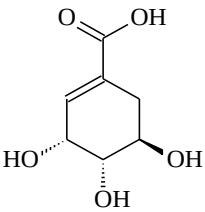
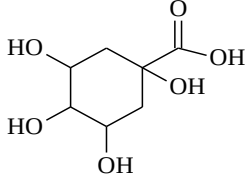
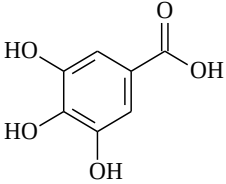
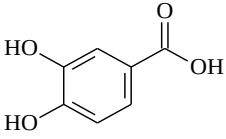
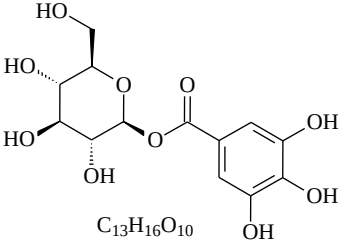
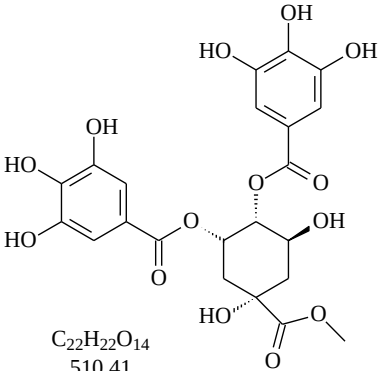
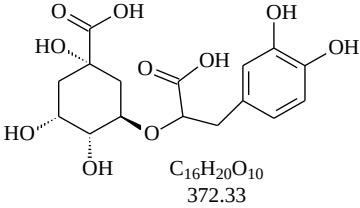
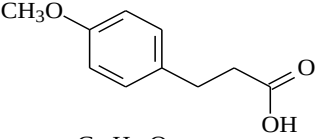


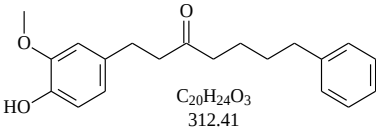
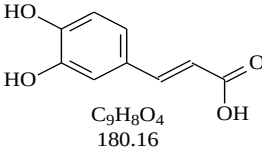
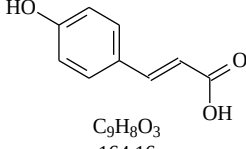
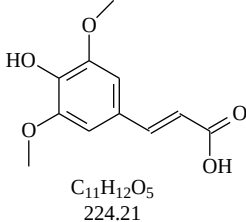
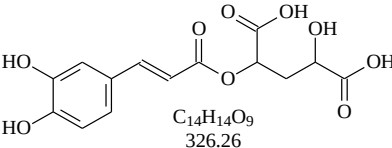
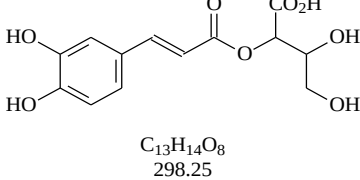
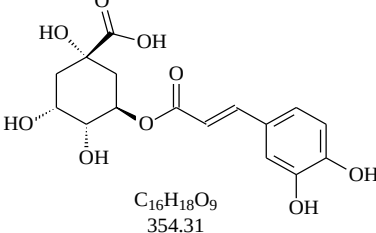
Figura 43 PLS: Matriz com os dados de EM (modo negativo) (m/z) *versus* atividade antiglicante (IC₅₀). Valores de Loadings representados pelos íons (m/z) de maior importância: valores do lado positivo: 191 (ácido quínico); 325 (ácido 2-cafeoiloxi-4-hidroxiglutarico); 353 (ácido clorogênico); 383 (dímero de ácido quínico); 463 (miricitrina); 783 (pedunculagina). Do lado negativo: 289 (catequina); 447 (quercitrina); 633 HHDP-galoil-glicose.

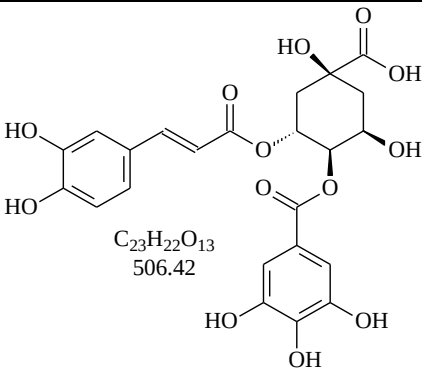
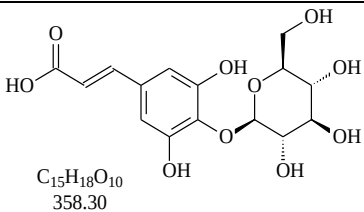
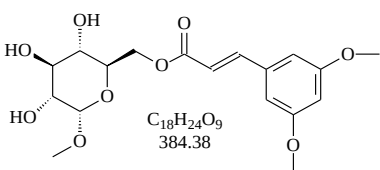
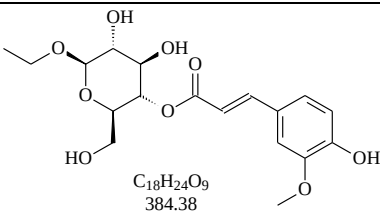
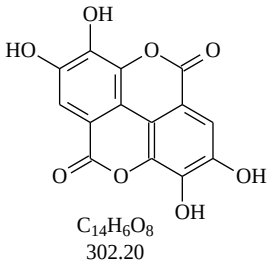
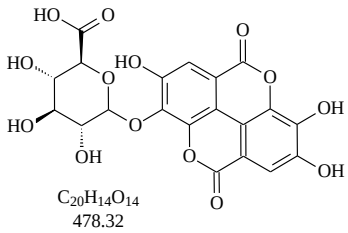
Dessa forma, considerando a complexidade dos dados obtidos combinando os fingerprints dos extratos em ambos os modos de ionização ESI(-)-MS, com abordagem quimiométrica, foi possível diferenciar os frutos e avaliar as diferenças em termos de metabólitos em função das suas capacidades antioxidantes por PCA e, por análise PLS, verificar que os potenciais antioxidantes e antiglicantes (Via Não Oxidativa) estão fortemente correlacionados ($P = 0,943$). A PLS sugere que os elagitaninos identificados nas matrizes das sementes dos frutos de *Myrcia bracteata* nos estágios verde (BURs) e maduro (BRs), *M. sylvatica* verde, *M. minutiflora* verde (MUR), sementes maduras de *M. fenestrata* (FRs) estão correlacionados com as respostas antiglicantes, assim como os derivados de ácido cinâmico estão fortemente associados com as respostas antioxidantes pelo método vai radical DPPH.

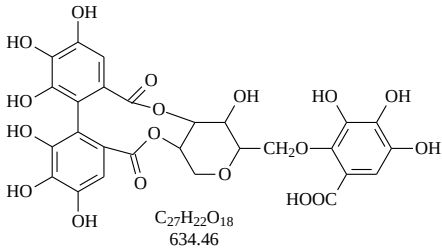
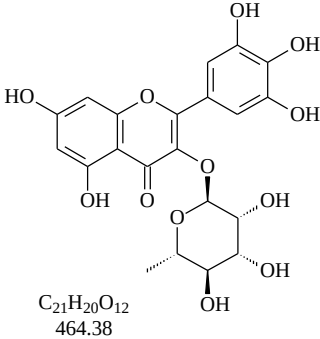
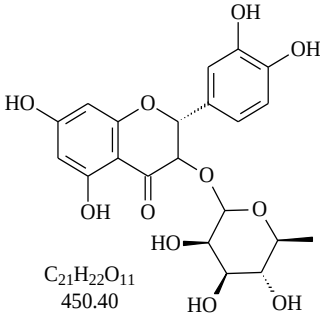
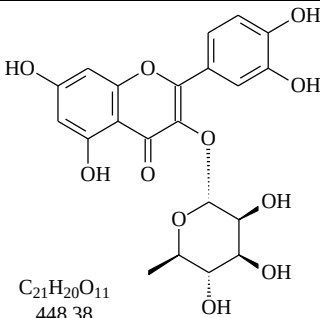
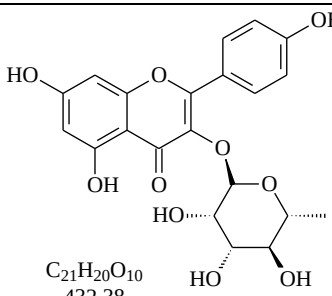
Tabela 15 Estruturas químicas dos metabólitos identificados nos frutos de Myrtaceae com auxílio de espectrometria de massas e por ressonância magnética nuclear.

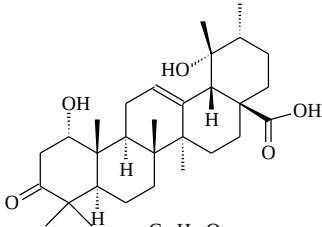
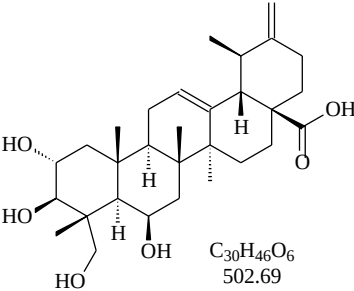
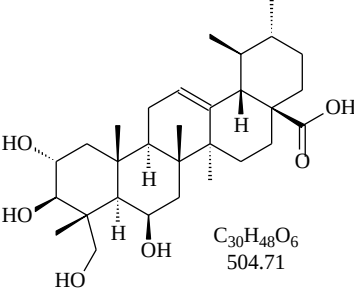
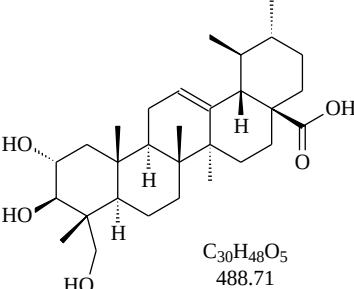
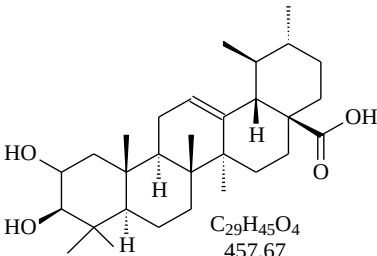
Carboidratos		
Substância	Estrutura/Fórmula/Massa Molecular	Espécie *(parte do fruto)
Sucrose		<i>Eugenia punicifolia</i> (sementes: GS, YS, OS, RS)
α -D-Glicopirranose		<i>Eugenia punicifolia</i> (polpas: GP, YP, OP, RP)
β -D-Glicopirranose		<i>Eugenia punicifolia</i> (polpas: GP, YP, OP, RP)
Ácido chiquímico	 $C_7H_{10}O_5$ 174.15	<i>Eugenia punicifolia</i> (Sementes em estágio de coloração amarela) <i>Myrcia fenestrata</i> (polpa e semente) <i>Myrcia magnoliifolia</i> (madura) <i>Myrcia bracteata</i> (polpa madura)
Ácido quínico	 $C_7H_{12}O_6$ 192.17	<i>Myrcia</i> spp

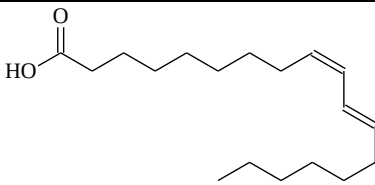
Ácido gálico	 $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$ 170.12	<i>Myrcia spp</i> <i>Eugenia sp</i> <i>Psidium spp</i>
Ácido protocatecuico	 $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_4$ 154.12	<i>Myrcia fenestrata</i> (semente madura)
Ácido β-Glucogálico	 $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{O}_{10}$ 332.26	<i>Eugenia puniceifolia</i> (todas as polpas)
1,1'-[(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-3,5-dihidroxi-5-(metoxi carbonil)-1,2-ciclohexanedil éster	 $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_{14}$ 510.41	<i>Psidium acutangulum</i>
Ácido 3-(3, 4- dihidroxifenil) láctico 2- <i>O</i> -quínic	 $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{O}_{10}$ 372.33	<i>Myrcia magnoliifolia</i> Madura
Ácido metoxihidroxicinâmico	 $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_3$ 180.20	<i>Myrcia fenestrata</i> (polpa e semente)

1-[4-hidroxi-3-metoxifenil]-7-fenil-3-heptanona	 $C_{20}H_{24}O_3$ 312.41	<i>Myrcia sylvatica madura</i>
Ácido cafeico	 $C_9H_8O_4$ 180.16	<i>Myrcia minutiflora</i> (fruto inteiro maduro e verde)
Ácido cumárico	 $C_9H_8O_3$ 164.16	<i>Psidium</i> spp
Ácido sinápico	 $C_{11}H_{12}O_5$ 224.21	<i>Psidium</i> spp <i>Myrcia minutiflora</i>
Ácido 2-Cafeoiloxi-4-hidroxi-glutárico	 $C_{14}H_{14}O_9$ 326.26	<i>Myrcia magnoliifolia</i>
Ácido 2-O-cafeoil treônico	 $C_{13}H_{14}O_8$ 298.25	<i>Myrcia magnoliifolia</i>
Ácido clorogênico	 $C_{16}H_{18}O_9$ 354.31	<i>Myrcia</i> spp

Ácido 4-O-galoil-clorogênico	 $C_{23}H_{22}O_{13}$ 506.42	<i>Myrcia minutiflora</i> (verde e maduro)
Ácido 3-[4-(β-D-glicopiranosilo)-3,5-hidroxifenil]-2-propenoico	 $C_{15}H_{18}O_{10}$ 358.30	<i>Psidium spp</i>
α-D-Glicopiranosídeo, metil, 6-[(2E)-3-(3,4-dimetoxifenil)-2-propenoato]	 $C_{18}H_{24}O_9$ 384.38	<i>M.bracteata</i> (polpa e semente), <i>M. minutiflora</i> verde, <i>M. fenestrata</i> (verde e madura), <i>M. magnolifolia</i> (verde), <i>M. sylvatica</i> (verde)
Ácido 4-hidroxi-1-prenil-5-(3-O-α-D-glicopiranosil)-benzoico	 $C_{18}H_{24}O_9$ 384.38	
Ácido elágico	 $C_{14}H_6O_8$ 302.20	<i>Eugenia punicifolia</i> <i>Myrcia spp</i>
Ácido elágico glucurônico	 $C_{20}H_{14}O_{14}$ 478.32	<i>Myrcia magnolifolia</i> madura

Galoil-HHDP-hexosídeo	 $C_{27}H_{22}O_{18}$ 634.46	<i>Myrcia</i> spp.
Flavonoides glicosilados		
Miricitrina	 $C_{21}H_{20}O_{12}$ 464.38	SyR; <i>Eugenia puniceifolia</i> (polpas: GP, YP , OP, RP)
Astilbina	 $C_{21}H_{22}O_{11}$ 450.40	<i>Myrcia bracteata</i> (semente verde)
Quercitrin 3-O-ramnosídeo	 $C_{21}H_{20}O_{11}$ 448.38	<i>Myrcia</i> spp <i>Eugenia puniceifolia</i> <i>Myrcia bracteata</i> (semente verde e madura)
Kaempferol 7-O-ramnosídeo	 $C_{21}H_{20}O_{10}$ 432.38	<i>Eugenia puniceifolia</i> (polpas: GP, YP , OP , RP)

Triterpenoides		
Substância	Estrutura/Fórmula/Massa Molecular	Espécie (parte do fruto)
Ácido annurcoico	 $C_{30}H_{46}O_5$ 486.69	<i>Psidium spp</i>
Ácido guavenóico	 $C_{30}H_{46}O_6$ 502.69	<i>Psidium acutangulum</i>
Ácido madecassico	 $C_{30}H_{48}O_6$ 504.71	<i>Psidium acutangulum</i>
Ácido asiático	 $C_{30}H_{48}O_5$ 488.71	<i>Psidium acutangulum</i>
2- α -hidroxiursólico	 $C_{29}H_{45}O_4$ 457.67	<i>Psidium acutangulum</i>

Ácido linoleico	 $C_{18}H_{32}O_2$ 280.45	<i>Eugenia</i> sp (frutos verdes e sementes) <i>Psidium</i> spp (frutos verdes e sementes)
Ácido palmítico	$C_{16}H_{32}O_2$	<i>Psidium acutangulum</i>
Ácido oleico	$C_{18}H_{34}O_2$	<i>Psidium acutangulum</i>
Ácido esteárico	$C_{18}H_{36}O_2$	<i>Psidium acutangulum</i>
Ácido lignocérico	$C_{24}H_{49}O_2$	<i>Psidium acutangulum</i>
*quando não for especificada a parte da espécie onde foi identificada a substância, significa que a substância foi observada em diferentes partes e estágios fenológicos do fruto		

5 CONCLUSÃO

O estudo químico dos frutos amazônicos pertencentes a três *Psidium* spp, cinco *Myrcia* spp. e da *Eugenia punicifolia* permitiu a identificação química de 43 substâncias, dentre as quais 23 são derivadas são substâncias fenólicas, tais como flavonoides glicosilados e derivados dos ácidos cinâmico, gálico e elágico. Em sua maioria, são substâncias bioativas que podem ser responsáveis pelos potenciais antioxidantes e antiglicantes desses frutos amazônicos não-convencionais. Esse estudo químico empregou uma abordagem pouco invasiva, centrada nas técnicas de Espectrometria de Massas e RMN assistidas por análises quimiométricas, as quais possibilitaram a desreplicação dessas matrizes, bem como associar as respostas antioxidantes e antiglicantes com algumas substâncias bioativas caracterizadas. Também possibilitou diferenciar os estágios fenológicos dos frutos de *Eugenia punicifolia* pela diferença de concentração de seus constituintes majoritários presentes nas polpas dessa matriz. Esses frutos podem fazer parte da dieta humana, pois não apresentam citotoxicidade considerável. Portanto, essas matrizes são fontes promissoras de substâncias bioativas, motivando a obtenção de bioprodutos, tais como microcápsulas contendo suco do fruto de *E. punicifolia*. Esse processo de encapsulamento apresentou elevada retenção e eficiência, preservando os resultados antioxidantes e antiglicantes dos bioativos presentes. Dessa forma, os frutos de *Psidium* spp., *Myrcia* spp. e de *E. punicifolia*, em seus diferentes estágios fenológicos, podem ser considerados alimentos funcionais e contribuir para prevenção de doenças relacionadas aos processos oxidativos celulares como o câncer e a diabetes mellitus tipo 2.

REFERÊNCIAS

- ABADIO FINCO, F. D. B.; KAMMERER, D. R.; CARLE, R.; TSENG, W.-H. *et al.* Antioxidant Activity and Characterization of Phenolic Compounds from Bacaba (*Oenocarpus bacaba* Mart.) Fruit by HPLC-DAD-MSn. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 60, n. 31, p. 7665-7673, Aug 8 2012.
- ABADIO-FINCO, F., D. B.; KAMMERER, D. R.; CARLE, R.; TSENG, W.-H. *et al.* Antioxidant Activity and Characterization of Phenolic Compounds from Bacaba (*Oenocarpus bacaba* Mart.) Fruit by HPLC-DAD-MSn. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 60, n. 31, p. 7665-7673, Aug 8 2012.
- ABU-REIDAH, I. M.; ARRAEZ-ROMAN, D.; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNANDEZ-GUTIERREZ, A. Profiling of phenolic and other polar constituents from hydro-methanolic extract of watermelon (*Citrullus lanatus*) by means of accurate-mass spectrometry (HPLC-ESI-QTOF-MS). **Food Research International**, 51, n. 1, p. 354-362, Apr 2013.
- AKBIYIK, T.; SONMEZOGLU, I.; GUCLU, K.; TOR, I. *et al.* PROTECTION OF ASCORBIC ACID FROM COPPER(II)-CATALYZED OXIDATIVE DEGRADATION IN THE PRESENCE OF FRUIT ACIDS: CITRIC, OXALIC, TARTARIC, MALIC, MALONIC, AND FUMARIC ACIDS. **International Journal of Food Properties**, 15, n. 1-2, p. 398-411, Jan-Apr 2012.
- ANDREW D. JONES; EJETA, G. A new global agenda for nutrition and health: the importance of agriculture and food systems. *Bulletin of the World Health Organization*. 94: 228-229 p. 2016.
- ANVISA, A. N. D. V. S. Diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos. NETO, G. V. 1999.
- APAK, R.; OZYUREK, M.; GUCLU, K.; CAPANOGLU, E. Antioxidant Activity/Capacity Measurement. 2. Hydrogen Atom Transfer (HAT)-Based, Mixed-Mode (Electron Transfer (ET)/HAT), and Lipid Peroxidation Assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 64, n. 5, p. 1028-1045, Feb 2016. Review.
- ARUOMA, O. I. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. **Journal of the American Oil Chemists Society**, 75, n. 2, p. 199-212, Feb 1998.
- ASTRID GARZON, G.; NARVAEZ-CUENCA, C.-E.; KOPEC, R. E.; BARRY, A. M. *et al.* Determination of Carotenoids, Total Phenolic Content, and Antioxidant Activity of Araza (*Eugenia stipitata* McVaugh), an Amazonian Fruit. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 60, n. 18, p. 4709-4717, May 9 2012.
- AURICCHIO, M. T.; BUGNO, A.; BARROS, S. B. M.; BACCHI, E. M. Antimicrobial and antioxidant activities and toxicity of *Eugenia uniflora*. **Lat. Am. J. Pharm.**, 26, n. 1, p. 76-81, 2007.

AYYANAR, M.; SUBASH-BABU, P.; IGNACIMUTHU, S. *Syzygium cumini* (L.) Skeels., a novel therapeutic agent for diabetes: Folk medicinal and pharmacological evidences. **Complementary Therapies in Medicine**, 21, n. 3, p. 232-243, Jun 2013. Article.

AZEVEDO, L.; RIBEIRO, P. F. D.; OLIVEIRA, J. A. D.; CORREIA, M. G. *et al.* Camu-camu (*Myrciaria dubia*) from commercial cultivation has higher levels of bioactive compounds than native cultivation (Amazon Forest) and presents antimutagenic effects in vivo. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 99, n. 2, p. 624-631, Jan 2019. Article.

AZEVEDO-MELEIRO, C. H.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Confirmation of the identity of the carotenoids of tropical fruits by HPLC-DAD and HPLC-MS. **Journal of Food Composition and Analysis**, 17, n. 3-4, p. 385-396, Jun-Aug 2004.

BALCKE, G. U.; HANDRICK, V.; BERGAU, N.; FICHTNER, M. *et al.* An UPLC-MS/MS method for highly sensitive high-throughput analysis of phytohormones in plant tissues. **Plant Methods**, 8, Nov 22 2012.

BALOGUN, F. O.; ASHAFA, A. O. T. A Review of Plants Used in South African Traditional Medicine for the Management and Treatment of Hypertension. **Planta Medica**, 85, n. 4, p. 312-334, Mar 2019. Review.

BARNES, R. J.; DHANOA, M. S.; LISTER, S. J. STANDARD NORMAL VARIATE TRANSFORMATION AND DE-TRENDING OF NEAR-INFRARED DIFFUSE REFLECTANCE SPECTRA. **Applied Spectroscopy**, 43, n. 5, p. 772-777, Jul 1989. Article.

BATISTA, A. N. D. L.; COLOMBO, R.; DE PASCOLI, I. C.; TELES, H. L. *et al.* Development and validation of a HPLC method for standardization of herbal and commercial extracts of *Myrcia uniflora*. **Rev. Bras. Farmacogn.**, 21, n. 3, p. 402-406, 2011.

BEGUM, S.; ALI, S. N.; TAUSEEF, S.; ALI, S. T. *et al.* Chemical Constituents and Antioxidant Activity of Fresh Leaves of *Psidium guajava* Cultivated in Pakistan. **Journal of the Chemical Society of Pakistan**, 36, n. 1, p. 119-122, Feb 2014.

BEGUM, S.; HASSAN, S. I.; SIDDIQUI, B. S. Two new triterpenoids from the fresh leaves of *Psidium guajava*. **Planta Medica**, 68, n. 12, p. 1149-1152, Dec 2002.

BEGUM, S.; HASSAN, S. I.; SIDDIQUI, B. S.; SHAHEEN, F. *et al.* Triterpenoids from the leaves of *Psidium guajava*. **Phytochemistry**, 61, n. 4, p. 399-403, Oct 2002.

BIANCHI, M. D. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais Livres e os Principais Antioxidantes da Dieta. *Revista de Nutrição. Campinas*. 12: 123-130 p. 1999.

BIEGELMEYER, R.; MELLO ANDRADE, J. M.; ABOY, A. L.; APEL, M. A. *et al.* Comparative Analysis of the Chemical Composition and Antioxidant Activity of Red (*Psidium cattleianum*) and Yellow (*Psidium cattleianum* var. *lucidum*) Strawberry Guava Fruit. **Journal of Food Science**, 76, n. 7, p. C991-C996, Sep 2011.

- BORGES, G. D. S. C.; VIEIRA, F. G. K.; COPETTI, C.; VALDEMIRO, G. L. *et al.* Chemical characterization, bioactive compounds, and antioxidant capacity of jussara (*Euterpe edulis*) fruit from the Atlantic Forest in southern Brazil. **Food Research International**, 44, n. 7, p. 2128-2133, 2011.
- BORGOGNA, M.; BELLICH, B.; ZORZIN, L.; LAPASIN, R. *et al.* Food microencapsulation of bioactive compounds: Rheological and thermal characterisation of non-conventional gelling system. **Food Chemistry**, 122, n. 2, p. 416-423, Sep 2010. Article.
- BRANDAO, T. S. D.; DE SENA, A. R.; TESHIMA, E.; DAVID, J. M. *et al.* Changes in enzymes, phenolic compounds, tannins, and vitamin C in various stages of jambolan (*Syzygium cumini* Lamark) development. **Ciencia E Tecnologia De Alimentos**, 31, n. 4, p. 849-855, Oct-Dec 2011. Article.
- BRUNO, C.; PATIN, F.; BOCCA, C.; NADAL-DESBARATS, L. *et al.* The combination of four analytical methods to explore skeletal muscle metabolomics: Better coverage of metabolic pathways or a marketing argument? **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 148, p. 273-279, Jan 2018. Article.
- BUNGER, M. D.; EINSEHLOR, P.; FIGUEIREDO, M. L. N.; STEHMANN, J. R. Resolving Species Delimitations in the *Eugenia involucrata* Group (*Eugenia* sect. *Phyllocalyx* - Myrtaceae) with Morphometric Analysis. **Systematic Botany**, 40, n. 4, p. 995-1002, Oct-Dec 2015. Article.
- BURTON-FREEMAN, B. M.; SANDHU, A. K.; EDIRISINGHE, I. Red Raspberries and Their Bioactive Polyphenols: Cardiometabolic and Neuronal Health Links. **Advances in Nutrition**, 7, n. 1, p. 44-65, Jan 2016. Review.
- CALIARI, C. P.; SOUZA, V. C.; MAZINE, F. F. Two new species of *Myrcia* (Myrtaceae) from Brazilian Atlantic Forest. **Phytotaxa**, 267, n. 3, p. 201-210, Jul 2016.
- CAMPELO, P. H.; DO CARMO, E. L.; ZACARIAS, R. D.; YOSHIDA, M. I. *et al.* Effect of dextrose equivalent on physical and chemical properties of lime essential oil microparticles. **Industrial Crops and Products**, 102, p. 105-114, Aug 2017. Article.
- CANDIDO, T. L. N.; SILVA, M. R.; AGOSTINI-COSTA, T. S. Bioactive compounds and antioxidant capacity of buriti (*Mauritia flexuosa* L.f.) from the Cerrado and Amazon biomes. **Food Chemistry**, 177, p. 313-319, Jun 2015. Article.
- CARDOSO, L. D.; MARTINO, H. S. D.; MOREIRA, A. V. B.; RIBEIRO, S. M. R. *et al.* Cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.) of the Cerrado of Minas Gerais, Brazil: Physical and chemical characterization, carotenoids and vitamins. **Food Research International**, 44, n. 7, p. 2151-2154, Aug 2011. Article.
- CASCAES, M. M.; GUILHON, G.; ANDRADE, E. H. D.; ZOGHBI, M. D. B. *et al.* Constituents and Pharmacological Activities of *Myrcia* (Myrtaceae): A Review of an Aromatic and Medicinal Group of Plants. **International Journal of Molecular Sciences**, 16, n. 10, p. 23881-23904, Oct 2015. Review.

CELLI, G. B.; PEREIRA-NETTO, A. B.; BETA, T. Comparative analysis of total phenolic content, antioxidant activity, and flavonoids profile of fruits from two varieties of Brazilian cherry (*Eugenia uniflora* L.) throughout the fruit developmental stages. **Food Research International**, 44, n. 8, p. 2442-2451, Oct 2011. Article; Proceedings Paper.

CHAGAS, V. T.; FRANCA, L. M.; MALIK, S.; PAES, A. M. D. *Syzygium cumini* (L.) skeels: a prominent source of bioactive molecules against cardiometabolic diseases. **Frontiers in Pharmacology**, 6, p. 8, Nov 2015. Review.

CHANG, W. C.; SHEN, S. C.; WU, J. S. B. Protective Effects of Vescalagin from Pink Wax Apple *Syzygium samarangense* (Blume) Merrill and Perry Fruit against Methylglyoxal-Induced Inflammation and Carbohydrate Metabolic Disorder in Rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 61, n. 29, p. 7102-7109, Jul 2013. Article.

CHARLES, A. L.; ALAMSJAH, M. A. Application of chemometric techniques: An innovative approach to discriminate two seaweed cultivars by physico-functional properties. **Food Chemistry**, 289, p. 269-277, Aug 2019. Article.

CHATTERJEE, K.; ALI, K. M.; DE, D.; PANDA, D. K. *et al.* Anti diabetic and anti oxidative potencies study of ethyl acetate fraction of hydromethanolic (40:60) extract of seed of *Eugenia jambolana* Linn. and its chromatographic purification. **J. Pharm. Res.**, 5, n. 1, p. 696-703, 698 pp, 2012a.

CHATTERJEE, K.; ALI, K. M.; DE, D.; PANDA, D. K. *et al.* Anti diabetic and anti oxidative potencies study of ethyl acetate fraction of hydromethanolic (40:60) extract of seed of *Eugenia jambolana* Linn. and its chromatographic purification. **Journal of Pharmacology Research**, 5, n. 1, p. 696-703, 698 pp, 2012b.

CHEN, X. J.; WU, W. J.; ZHOU, Q.; JIE, J. P. *et al.* Advanced glycation end-products induce oxidative stress through the Sirt1/Nrf2 axis by interacting with the receptor of AGEs under diabetic conditions. **Journal of Cellular Biochemistry**, 120, n. 2, p. 2159-2170, Feb 2019. Article.

CHOMPOO, J.; UPADHYAY, A.; KISHIMOTO, W.; MAKISE, T. *et al.* Advanced glycation end products inhibitors from *Alpinia zerumbet* rhizomes. **Food Chemistry**, 129, n. 3, p. 709-715, Dec 2011. Article.

CHRISTIANS, U.; KLAWITTER, J.; HORNBERGER, A. How Unbiased is Non-Targeted Metabolomics and is Targeted Pathway Screening the Solution? **Current Pharmaceutical Biotechnology**, 12, n. 7, p. 1053-1066, Jul 2011. Review.

CHU, Y. F.; SUN, J.; WU, X. Z.; LIU, R. H. Antioxidant and anti proliferative activities of common vegetables. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 50, n. 23, p. 6910-6916, Nov 6 2002.

CICERO, A. F. G.; FOGACCI, F.; COLLETTI, A. Food and plant bioactives for reducing cardiometabolic disease risk: an evidence based approach. **Food & Function**, 8, n. 6, p. 2076-2088, Jun 2017. Review.

COLOMBO, A. F.; JOLY, C. A. Brazilian Atlantic Forest lato sensu: the most ancient Brazilian forest, and a biodiversity hotspot, is highly threatened by climate change. **Braz J Biol**, 70, n. 3 Suppl, p. 697-708, 2010.

COMUNIAN, T. A.; THOMAZINI, M.; ALVES, A. J. G.; DE MATOS, F. E. *et al.* Microencapsulation of ascorbic acid by complex coacervation: Protection and controlled release. **Food Research International**, 52, n. 1, p. 373-379, Jun 2013. Article.

CONTRERAS-CALDERON, J.; CALDERON-JAIMES, L.; GUERRA-HERNANDEZ, E.; GARCIA-VILLANOVA, B. Antioxidant capacity, phenolic content and vitamin C in pulp, peel and seed from 24 exotic fruits from Colombia. **Food Research International**, 44, n. 7, p. 2047-2053, Aug 2011.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J.; YANG, S. S. Natural Product Extracts of Plant and Marine Origin Having Antileukemia Potential. The NCI Experience. **J. Nat. Prod.**, 69, n. 3, p. 488-498, 2006.

CUADRADO-SILVA, C. T.; POZO-BAYON, M. A.; OSORIO, C. Targeted Metabolomic Analysis of Polyphenols with Antioxidant Activity in Sour Guava (*Psidium friedrichsthalianum* Nied.) Fruit. **Molecules**, 22, n. 1, p. 10, Jan 2017. Article.

D'ABROSCA, B.; FIORENTINO, A.; MONACO, P.; ORIANO, P. *et al.* Annurcoic acid: A new antioxidant ursane triterpene from fruits of cv. Annurca apple. **Food Chemistry**, 98, n. 2, p. 285-290, 2006 2006.

DAMETTO, A. C.; AGUSTONI, D.; MOREIRA, T. F.; PLAZA, C. V. *et al.* Chemical composition and in vitro chemoprevention assessment of *Eugenia jambolana* Lam. (Myrtaceae) fruits and leaves. **Journal of Functional Foods**, 36, p. 490-502, Sep 2017. Article.

DANTAS, A. M.; MAFALDO, I. M.; OLIVEIRA, P. M. D.; LIMA, M. D. *et al.* Bioaccessibility of phenolic compounds in native and exotic frozen pulps explored in Brazil using a digestion model coupled with a simulated intestinal barrier. **Food Chemistry**, 274, p. 202-214, Feb 2019. Article.

DAS, A. B.; GOUD, V. V.; DAS, C. Microencapsulation of anthocyanin extract from purple rice bran using modified rice starch and its effect on rice dough rheology. **International Journal of Biological Macromolecules**, 124, p. 573-581, Mar 2019. Article.

DAZA, L. D.; FUJITA, A.; GRANATO, D.; FAVARO-TRINDADE, C. S. *et al.* Functional properties of encapsulated Cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.) fruit extract. **Food Bioscience**, 18, p. 15-21, Jun 2017. Article.

DE ARAÚJO, F. F.; NERI-NUMA, I. A.; DE PAULO FARIAS, D.; DA CUNHA, G. R. M. C. *et al.* Wild Brazilian species of *Eugenia* genera (Myrtaceae) as an innovation hotspot for food and pharmacological purposes. **Food Research International**, 121, p. 57-72, 2019/07/01/ 2019.

DE SOUZA SCHMIDT GONCALVES, A. E.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Chemical Composition and Antioxidant/Antidiabetic Potential of Brazilian Native Fruits and Commercial Frozen Pulps. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 58, n. 8, p. 4666-4674, Apr 28 2010.

DEMBITSKY, V. M.; POOVARODOM, S.; LEONTOWICZ, H.; LEONTOWICZ, M. *et al.* The multiple nutrition properties of some exotic fruits: Biological activity and active metabolites. **Food Research International**, 44, n. 7, p. 1671-1701, Aug 2011.

DENARDIN, C.; HIRSCH, G.; DA ROCHA, R.; VIZZOTTO, M. *et al.* Antioxidant capacity and bioactive compounds of four Brazilian native fruits. **Journal of Food and Drug Analysis**, 23, n. 3, p. 387-398, SEP 2015 2015. Article.

DEXHEIMER, G. M.; DELVING, L.; DE OLIVEIRA, H. S.; BIOLCHI, V. *et al.* *Calyptanthus grandifolia* O.Berg (Myrtaceae) ethanolic extract inhibits TNF-alpha gene expression and cytokine release in vitro. **Molecular Medicine Reports**, 15, n. 5, p. 2873-2880, May 2017. Article.

DICKINSON, K. M.; WATSON, M. S.; PRICHARD, I. Are Clean Eating Blogs a Source of Healthy Recipes? A Comparative Study of the Nutrient Composition of Foods with and without Clean Eating Claims. **Nutrients**, 10, n. 10, p. 10, Oct 2018. Article.

DJIDEL, S.; KHENNOUF, S.; BAGHIANI, A.; HARZALLAH, D. *et al.* Medicinal plants used traditionally in the Algerian folk medicine for gastrointestinal disorders and hypertension: total polyphenols, flavonoids and antioxidant activity. **Acta Hort.**, 854, n. Proceedings of the XIIIth International Conference on Medicinal and Aromatic Plants, 2009, p. 59-65, 2010.

DONADO-PESTANA, C. M.; DOS SANTOS-DONADO, P. R.; DAZA, L. D.; BELCHIOR, T. *et al.* Cagaita fruit (*Eugenia dysenterica* DC.) and obesity: Role of polyphenols on already established obesity. **Food Research International**, 103, p. 40-47, Jan 2018. Article.

DOS SANTOS, W. N. L.; SAUTHIER, M. C. D.; DOS SANTOS, A. M. P.; SANTANA, D. D. *et al.* Simultaneous determination of 13 phenolic bioactive compounds in guava (*Psidium guajava* L.) by HPLC-PAD with evaluation using PCA and Neural Network Analysis (NNA). **Microchemical Journal**, 133, p. 583-592, Jul 2017. Article; Proceedings Paper.

DOWLATABADI, R.; FARSHIDFAR, F.; ZARE, Z.; PIRALI, M. *et al.* Detection of adulteration in Iranian saffron samples by H-1 NMR spectroscopy and multivariate data analysis techniques. **Metabolomics**, 13, n. 2, p. 11, Feb 2017. Article.

DUNN, W. B.; OVERY, S.; QUICK, W. P. Evaluation of automated electrospray-TOF mass spectrometry for metabolic fingerprinting of the plant metabolome. **Metabolomics**, 1, n. 2, p. 137-148, Apr 2005.

EL-AASSAR, M. R.; HAFEZ, E. E.; EL-DEEB, N. M.; FOUDA, M. M. G. Microencapsulation of lectin anti-cancer agent and controlled release by alginate beads, biosafety approach. **International Journal of Biological Macromolecules**, 69, p. 88-94, Aug 2014. Article.

EL-SHENAWY, S. M.; MARZOUK, M. S.; EL DIB, R. A.; ABO ELYAZED, H. E. *et al.* Polyphenols and biological activities of Feijoa sellowiana leaves and twigs. **Rev. Latinoam. Quim.**, 36, n. 3, p. 103-120, 2008.

ESBENSEN, K. H.; SWARBRICK, B. **Multivariate Data Analysis** 6th Edition ed. United States: CAMO Software AS, 2018. 13204 p. 978-82-691104-01.

FANG, Z. X.; BHANDARI, B. Comparing the efficiency of protein and maltodextrin on spray drying of bayberry juice. **Food Research International**, 48, n. 2, p. 478-483, Oct 2012. Article.

FERCHICHI, L.; DERBRE, S.; MAHMOOD, K.; TOURE, K. *et al.* Bioguided fractionation and isolation of natural inhibitors of advanced glycation end-products (AGEs) from Calophyllum flavoramulum. **Phytochemistry**, 78, p. 98-106, Jun 2012. Article.

FERREIRA ZIELINSKI, A. A.; AVILA, S.; ITO, V.; NOGUEIRA, A. *et al.* The Association between Chromaticity, Phenolics, Carotenoids, and In Vitro Antioxidant Activity of Frozen Fruit Pulp in Brazil: An Application of Chemometrics. **Journal of Food Science**, 79, n. 4, p. C510-C516, Apr 2014.

FERRENTINO, G.; ASADUZZAMAN, M.; SCAMPICCHIO, M. M. Current technologies and new insights for the recovery of high valuable compounds from fruits by-products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 58, n. 3, p. 386-404, 2018. Review.

FIGUEIREDO-GONZALEZ, M.; GROSSO, C.; VALENTAO, P.; ANDRADE, P. B. alpha-Glucosidase and alpha-amylase inhibitors from Myrcia spp.: a stronger alternative to acarbose? **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 118, p. 322-327, Jan 2016.

FISCHER, D. C. H.; KATO, E. T. M.; KONISHI, S. T. Pharmacognostic characterization of leaves and stem barks of Eugenia brasiliensis Lam. (Myrtaceae). **Rev. Bras. Plant. Med.**, 6, n. 1, p. 15-22, 2003.

FISCHER, U. A.; CARLE, R.; KAMMERER, D. R. Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (Punica granatum L.) peel, mesocarp, aril and differently produced juices by HPLC-DAD-ESI/MSn. **Food Chemistry**, 127, n. 2, p. 807-821, Jul 2011. Article.

FLORES, G.; DASTMALCHI, K.; WU, S. B.; WHALEN, K. *et al.* Phenolic-rich extract from the Costa Rican guava (Psidium friedrichsthalianum) pulp with antioxidant and anti-inflammatory activity. Potential for COPD therapy. **Food Chemistry**, 141, n. 2, p. 889-895, Nov 2013.

FLORES, G.; WU, S.-B.; NEGRIN, A.; KENNELLY, E. J. Chemical composition and antioxidant activity of seven cultivars of guava (*Psidium guajava*) fruits. **Food Chemistry**, 170, p. 327-335, Mar 1 2015.

FLORES, I. S.; SILVA, A. K.; FURQUIM, L. C.; CASTRO, C. F. S. *et al.* HR-MAS NMR Allied to Chemometric on *Hancornia speciosa* Varieties Differentiation. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 29, n. 4, p. 708-714, Apr 2018. Article.

FRACASSETTI, D.; COSTA, C.; MOULAY, L.; TOMAS-BARBERAN, F. A. Ellagic acid derivatives, ellagitannins, proanthocyanidins and other phenolics, vitamin C and antioxidant capacity of two powder products from camu-camu fruit (*Myrciaria dubia*). **Food Chemistry**, 139, n. 1-4, p. 578-588, Jul 1 2013.

FREDENHAGEN, A.; DERRIEN, C.; GASSMANN, E. An MS/MS library on an ion-trap instrument for efficient dereplication of natural products. Different fragmentation patterns for M+H (+) and M+Na (+) ions. **Journal of Natural Products**, 68, n. 3, p. 385-391, Mar 2005.

FU, L.; XU, B.-T.; XU, X.-R.; GAN, R.-Y. *et al.* Antioxidant capacities and total phenolic contents of 62 fruits. **Food Chem.**, 129, n. Copyright (C) 2012 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved., p. 345-350, 2011. 10.1016/j.foodchem.2011.04.079.

FU, M. X.; WELLSKNECHT, K. J.; BLACKLEDGE, J. A.; LYONS, T. J. *et al.* GLYCATION, GLYCOXIDATION, AND CROSS-LINKING OF COLLAGEN BY GLUCOSE - KINETICS, MECHANISMS, AND INHIBITION OF LATE STAGES OF THE MAILLARD REACTION. **Diabetes**, 43, n. 5, p. 676-683, May 1994. Article.

GARRIDO, A.; CRUCES, J.; CEPRIAN, N.; VARA, E. *et al.* Oxidative-Inflammatory Stress in Immune Cells from Adult Mice with Premature Aging. **International Journal of Molecular Sciences**, 20, n. 3, p. 23, Feb 2019. Article.

GARRIDO, B. C.; DE CARVALHO, L. J. Nuclear magnetic resonance using electronic referencing: method validation and evaluation of the measurement uncertainties for the quantification of benzoic acid in orange juice. **Magnetic Resonance in Chemistry**, 53, n. 2, p. 135-141, Feb 2015. Article.

GHOSH, C. P. K.; GHOSH, E. S. **Anova simplified: Test your research hypothesis**. India: M.Com., LL.B., A.C.S., 2017. 37 p. 1973158329.

GHOSH, P.; MANDAL, A.; CHAKRABORTY, P.; RASUL, M. G. *et al.* Triterpenoids from *Psidium guajava* with Biocidal Activity. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, 72, n. 4, p. 504-507, Jul-Aug 2010.

GISKEODEGARD, G. F.; BLOEMBERG, T. G.; POSTMA, G.; SITTER, B. *et al.* Alignment of high resolution magic angle spinning magnetic resonance spectra using warping methods. **Analytica Chimica Acta**, 683, n. 1, p. 1-11, Dec 2010. Article.

GLASER, T.; LIENAU, A.; ZEEB, D.; KRUCKER, M. *et al.* Qualitative and quantitative determination of carotenoid stereoisomers in a variety of spinach samples by use of MSPD before HPLC-UV, HPLC-APCI-MS, and HPLC-NMR on-line coupling. **Chromatographia**, 57, p. S19-S25, 2003 2003.

GOHARI, A. R.; SAEIDNIA, S.; MOGHADDAM, K. M.; YASSA, N. *et al.* Isolation of a new quinic acid derivative and its antibacterial modulating activity. **Daru-Journal of Faculty of Pharmacy**, 18, n. 1, p. 69-73, Win 2010. Article.

GORDON, A.; JUNGFER, E.; DA SILVA, B. A.; MAIA, J. G. S. *et al.* Phenolic Constituents and Antioxidant Capacity of Four Underutilized Fruits from the Amazon Region. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 59, n. 14, p. 7688-7699, Jul 27 2011.

GOULAS, V.; MINAS, I. S.; KOURDOULAS, P. M.; LAZARIDOU, A. *et al.* H-1 NMR Metabolic Fingerprinting to Probe Temporal Postharvest Changes on Qualitative Attributes and Phytochemical Profile of Sweet Cherry Fruit. **Frontiers in Plant Science**, 6, Nov 10 2015.

GOUVEIA, S.; CASTILHO, P. C. Characterisation of phenolic acid derivatives and flavonoids from different morphological parts of *Helichrysum obconicum* by a RP-HPLC-DAD-(-)-ESI-MSn method. **Food Chemistry**, 129, n. 2, p. 333-344, Nov 15 2011.

GOVAERTS, R.; SOBRAL, N.; ASHTON, P.,; BARRIE, F.; HOLST, B. K. *et al.* World Checklist of Myrtaceae. The Plant List: A working list of all plant species: 1-455 p. 2008.

GOWDA, G. A. N.; RAFTERY, D. Can NMR solve some significant challenges in metabolomics? **Journal of Magnetic Resonance**, 260, p. 144-160, Nov 2015. Article.

GUEDES, M. N. S.; RUFINI, J. C. M.; MARQUES, T. R.; MELO, J. O. F. *et al.* MINERALS AND PHENOLIC COMPOUNDS OF CAGAITA FRUITS AT DIFFERENT MATURATION STAGES (*Eugenia dysenterica*). **Revista Brasileira De Fruticultura**, 39, n. 1, p. 9, 2017. Article.

GUGLIUCCI, A.; BASTOS, D. H. M.; SCHULZE, J.; SOUZA, M. F. F. Caffeic and chlorogenic acids in *Ilex paraguariensis* extracts are the main inhibitors of AGE generation by methylglyoxal in model proteins. **Fitoterapia**, 80, n. 6, p. 339-344, Sep 2009. Article.

GULDBRANDSEN, N.; DE MIERI, M.; GUPTA, M.; SEISER, T. *et al.* Screening of Panamanian Plant Extracts for Pesticidal Properties and HPLC-Based Identification of Active Compounds. **Scientia Pharmaceutica**, 83, n. 2, p. 353-367, 2015 2015.

HABTEMARIAM, S. Protective Effects of Caffeic Acid and the Alzheimer's Brain: An Update. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, 17, n. 8, p. 667-674, 2017. Review.

HALABALAKI, M.; VOUGOGIANNPOULOU, K.; MIKROS, E.; SKALTSOUNIS, A. L. Recent advances and new strategies in the NMR-based identification of natural products. **Current Opinion in Biotechnology**, 25, p. 1-7, Feb 2014. Review.

HARTOG, J. W. L.; VOORS, A. A.; BAKKER, S. J. L.; SMIT, A. J. *et al.* Advanced glycation end-products (AGES) and heart failure: Pathophysiology and clinical implications. **European Journal of Heart Failure**, 9, n. 12, p. 1146-1155, Dec 2007. Review.

HE, M.; WU, H.; NIE, J.; YAN, P. *et al.* Accurate recognition and feature qualify for flavonoid extracts from Liang-wai Gan Cao by liquid chromatography-high resolution-mass spectrometry and computational MS/MS fragmentation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 146, p. 37-47, Nov 2017. Article.

HEMLER, E. C.; HU, F. B. Plant-Based Diets for Cardiovascular Disease Prevention: All Plant Foods Are Not Created Equal. **Current Atherosclerosis Reports**, 21, n. 5, p. 8, May 2019. Review.

HERNANDEZ, M. S.; MARTINEZ, O.; FERNANDEZ-TRUJILLO, J. P. Behavior of araza (*Eugenia stipitata* Mc Vaugh) fruit quality traits during growth, development and ripening. **Scientia Horticulturae**, 111, n. 3, p. 220-227, Feb 2007. Article.

HUANG, C.-S.; YIN, M.-C.; CHIU, L.-C. Antihyperglycemic and antioxidative potential of *Psidium guajava* fruit in streptozotocin-induced diabetic rats. **Food Chem. Toxicol.**, 49, n. 9, p. 2189-2195, 2011.

HUANG, D. J.; OU, B. X.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 53, n. 6, p. 1841-1856, Mar 2005. Review.

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

JAMROZ, M. K.; PARADOWSKA, K.; ZAWADA, K.; MAKAROVA, K. *et al.* H-1 and C-13 NMR-based sugar profiling with chemometric analysis and antioxidant activity of herbhoney and honeys. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 94, n. 2, p. 246-255, Jan 30 2014.

JUSTI, K. C.; VISENTAINER, J. V.; DE SOUZA, N. E.; MATSUSHITA, M. Nutritional composition and vitamin C stability in stored camu-camu (*Myrciaria dubia*) pulp. **Archivos Latinoamericanos De Nutricion**, 50, n. 4, p. 405-408, Dec 2000.

KAERNARIN, K.; NIAMSUP, H.; SHANK, L.; RAKARIYATHAM, N. Antioxidant and Antiglycation Activities of Some Edible and Medicinal Plants. **Chiang Mai Journal of Science**, 41, n. 1, p. 105-116, Jan 2014. Article.

KESKA, P.; WOJCIAK, K. M.; STADNIK, J. Bioactive peptides from beef products fermented by acid whey - in vitro and in silico study. **Scientia Agricola**, 76, n. 4, p. 311-320, Jul-Aug 2019. Article.

KHAKIMOV, B.; AMIGO, J. M.; BAK, S.; ENGELSEN, S. B. Plant metabolomics: Resolution and quantification of elusive peaks in liquid chromatography-mass spectrometry profiles of

complex plant extracts using multi-way decomposition methods. **Journal of Chromatography A**, 1266, p. 84-94, Nov 2012. Article.

KHAN, R. S.; GRIGOR, J.; WINGER, R.; WIN, A. Functional food product development - Opportunities and challenges for food manufacturers. **Trends in Food Science & Technology**, 30, n. 1, p. 27-37, Mar 2013. Review.

KICH, D. M.; BITENCOURT, S.; CAYE, B.; FALEIRO, D. *et al.* Lymphocyte genotoxicity and protective effect of *Calyptanthus tricona* (Myrtaceae) against H₂O₂-induced cell death in MCF-7 cells. **Molecular and Cellular Biochemistry**, 424, n. 1-2, p. 35-43, Jan 2017. Article.

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

KINUPP, V. F.; LORENZI, H. **Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC) no Brasil**. 1^a ed. Plantarum, 2014. 768 p. 9788576714467.

KNOTHE, G.; KENAR, J. A. Determination of the fatty acid profile by H-1-NMR spectroscopy. **European Journal of Lipid Science and Technology**, 106, n. 2, p. 88-96, Feb 2004. Article.

KOBELNIK, M.; CASSIMIRO, D. L.; SANTOS DIAS, D.; RIBEIRO, C. A. *et al.* Thermal behavior of araca oil (*Psidium cattleianum* Sabine). **J. Therm. Anal. Calorim.**, 108, n. 3, p. 1281-1286, 2012.

KRISHNAN, P.; KRUGER, N. J.; RATCLIFFE, R. G. Metabolite fingerprinting and profiling in plants using NMR. **Journal of Experimental Botany**, 56, n. 410, p. 255-265, Jan 2005.

KRISTENSEN, M.; ENGELSEN, S. B.; DRAGSTED, L. O. LC-MS metabolomics top-down approach reveals new exposure and effect biomarkers of apple and apple-pectin intake. **Metabolomics**, 8, n. 1, p. 64-73, Feb 2012.

KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A. G.; MORALES, M. T.; FETT, R. Wild fruits and pulps of frozen fruits: antioxidant activity, polyphenols and anthocyanins. **Ciencia Rural**, 36, n. 4, p. 1283-1287, Jul-Aug 2006.

LACHENMEIER, D. W.; FRANK, W.; HUMPFER, E.; SCHAFER, H. *et al.* Quality control of beer using high-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy and multivariate analysis. **European Food Research and Technology**, 220, n. 2, p. 215-221, Feb 2005. Article.

LAMAS, C. A.; LENQUISTE, S. A.; BASEGGIO, A. M.; CUQUETTO-LEITE, L. *et al.* Jaboticaba extract prevents prediabetes and liver steatosis in high-fat-fed aging mice. **Journal of Functional Foods**, 47, p. 434-446, Aug 2018. Article.

LAMBERT, M.; WOLFENDER, J.-L.; STAERK, D.; CHRISTENSEN, B. *et al.* Identification of natural products using HPLC-SPE combined with CapNMR. **Analytical Chemistry**, 79, n. 2, p. 727-735, Jan 15 2007.

LANDRUM, L. R.; KAWASAKI, M. L. The genera of Myrtaceae in Brazil: an illustrated synoptic treatment and identification keys. **Brittonia**, 49, n. 4, p. 508-536, Oct-Dec 1997.

LAVELLI, V.; SRI HARSHA, P. S. C. Microencapsulation of grape skin phenolics for pH controlled release of antiglycation agents. **Food Research International**, 2018.

LI, Y.; ZHANG, J. J.; XU, D. P.; ZHOU, T. *et al.* Bioactivities and Health Benefits of Wild Fruits. **International Journal of Molecular Sciences**, 17, n. 8, p. 27, Aug 2016. Review.

LIM, S. Y.; THAM, P. Y.; LIM, H. Y. L.; HENG, W. S. *et al.* Potential Functional Byproducts from Guava Puree Processing. **Journal of Food Science**, 83, n. 6, p. 1522-1532, Jun 2018. Article.

LIMA, T. B.; SILVA, O. N.; SILVA, L. P.; ROCHA, T. L. *et al.* In Vivo Effects of Cagaita (*Eugenia dysenterica*, DC.) Leaf Extracts on Diarrhea Treatment. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p. 10, 2011. Article.

LIU, X. J.; KOLPAK, M. X.; WU, J. J.; LEO, G. C. Automatic Analysis of Quantitative NMR Data of Pharmaceutical Compound Libraries. **Analytical Chemistry**, 84, n. 15, p. 6914-6918, Aug 2012. Article.

LIU, Y. F.; XU, S.; GONG, H.; CUI, Y. F. *et al.* Partial least-squares discriminant analysis optimized by particle swarm optimization: application to H-1 nuclear magnetic resonance analysis of lung cancer metabonomics. **Journal of Chemometrics**, 29, n. 10, p. 537-546, Oct 2015. Article.

LOPES, A. C. D. S. **ESTUDO QUÍMICO E ISOLAMENTO DE FLAVONOIDES DE *Myrcia* spp. OCORRENTES EM AMAZÔNIA DE TERRA FIRME**. Orientador: MACHADO, M. B. 2015. 125 f. (Master) - Chemistry Department, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas.

LOPES GALENO, D. M.; CARVALHO, R. P.; DE ARAUJO BOLETI, A. P.; LIMA, A. S. *et al.* Extract from *Eugenia punicifolia* is an Antioxidant and Inhibits Enzymes Related to Metabolic Syndrome. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 172, n. 1, p. 311-324, Jan 2014.

MAEDA, R. N. **Adequação tecnológica do camu-camu (*Myrciaria dubia* McVaugh) para produção de vinho**. 1999. 58 f. (Monografia em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Amazonas (Ufam), Manaus, Amazonas.

MAHDAVI, S. A.; JAFARI, S. M.; ASSADPOOR, E.; DEHNAD, D. Microencapsulation optimization of natural anthocyanins with maltodextrin, gum Arabic and gelatin. **International Journal of Biological Macromolecules**, 85, p. 379-385, Apr 2016. Article.

MARTINS DE SA, L. Z. C.; CASTRO, P. F. S.; LINO, F. M. A.; BERNARDES, M. J. C. *et al.* Antioxidant potential and vasodilatory activity of fermented beverages of jaboticaba berry (*Myrciaria jaboticaba*). **Journal of Functional Foods**, 8, p. 169-179, May 2014.

MARZOUK MOHAMED, S. A.; MOHARRAM FATMA, A.; MOHAMED MONA, A.; GAMAL-ELDEEN AMIRA, M. *et al.* Anticancer and antioxidant tannins from *Pimenta dioica* leaves. **Z Naturforsch C**, 62, n. 7-8, p. 526-536, 2007.

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

MEDINA, A. L.; HAAS, L. I. R.; CHAVES, F. C.; SALVADOR, M. *et al.* Araca (*Psidium cattleianum* Sabine) fruit extracts with antioxidant and antimicrobial activities and antiproliferative effect on human cancer cells. **Food Chemistry**, 128, n. 4, p. 916-922, Oct 2011.

MILLER, N. J.; RICEEVANS, C.; DAVIES, M. J.; GOPINATHAN, V. *et al.* A NOVEL METHOD FOR MEASURING ANTIOXIDANT CAPACITY AND ITS APPLICATION TO MONITORING THE ANTIOXIDANT STATUS IN PREMATURE NEONATES. **Clinical Science**, 84, n. 4, p. 407-412, Apr 1993.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl(DPPH) for estimating antioxidant activity. 2004.

MONAKHOVA, Y. B.; MUSHTAKOVA, S. P. Application of MATLAB package for the automation of the chemometric processing of spectrometric signals in the analysis of complex mixtures. **Journal of Analytical Chemistry**, 71, n. 8, p. 759-767, Aug 2016. Article.

MONAKHOVA, Y. B.; MUSHTAKOVA, S. P. Methodology of chemometric modeling of spectrometric signals in the analysis of complex samples. **Journal of Analytical Chemistry**, 72, n. 2, p. 147-155, Feb 2017. Article.

NAKAYAMA, G. R.; CATON, M. C.; NOVA, M. P.; PARANDOOSH, Z. Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability in vitro. **Journal of Immunological Methods**, 204, n. 2, p. 205-208, May 26 1997.

NEERGHEEN, V. S.; SOOBRAATTEE, M. A.; BAHORUN, T.; ARUOMA, O. I. Characterization of the phenolic constituents in Mauritian endemic plants as determinants of their antioxidant activities in vitro. **J. Plant Physiol.**, 163, n. 8, p. 787-799, 2006.

NERI-NUMA, I. A.; CARVALHO-SILVA, L. B.; MORALES, J. P.; MALTA, L. G. *et al.* Evaluation of the antioxidant, antiproliferative and antimutagenic potential of araca-boi fruit (*Eugenia stipitata* Mc Vaugh - Myrtaceae) of the Brazilian Amazon Forest. **Food Research International**, 50, n. 1, p. 70-76, Jan 2013. Article.

NICACIO, A. E.; ROTTA, E. M.; BOEING, J. S.; BARIZAO, E. O. *et al.* Antioxidant Activity and Determination of Phenolic Compounds from *Eugenia involucrata* DC. Fruits by UHPLC-MS/MS. **Food Analytical Methods**, 10, n. 8, p. 2718-2728, Aug 2017. Article.

OISHI, T.; TANAKA, K.-I.; HASHIMOTO, T.; SHINBO, Y. *et al.* An approach to peak detection in GC-MS chromatograms and application of KNApSAcK database in prediction of candidate metabolites. **Plant Biotechnol. (Tokyo, Jpn.)**, 26, n. 1, p. 167-174, 2009.

OLIVEIRA, M. L.; BACCARO, F. B.; BRAGA-NETO, R.; MAGNUSSON, W. E. **Reserva Ducke: A biodiversidade amazônica através de uma grade**. Manaus: Áttema Design Editorial, 2008.

OMAR, R.; LI, L.; YUAN, T.; SEERAM, N. P. alpha-Glucosidase Inhibitory Hydrolyzable Tannins from *Eugenia jambolana* Seeds. **Journal of Natural Products**, 75, n. 8, p. 1505-1509, Aug 2012.

OU, B. X.; HUANG, D. J.; HAMPSCH-WOODILL, M.; FLANAGAN, J. A. *et al.* Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: A comparative study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 50, n. 11, p. 3122-3128, May 22 2002.

PANIAGUA-ZAMBRANA, N.; BUSSMANN, R. W.; MACIA, M. J. The socioeconomic context of the use of *Euterpe precatoria* Mart. and *E. oleracea* Mart. in Bolivia and Peru. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, 13, p. 17, Jun 2017. Article.

PARK, J.; JANG, H. J. Anti-diabetic effects of natural products an overview of therapeutic strategies. **Molecular & Cellular Toxicology**, 13, n. 1, p. 1-20, Mar 2017. Review.

PAULI, G. F.; CHEN, S. N.; LANKIN, D. C.; BISSON, J. *et al.* Essential Parameters for Structural Analysis and Dereplication by H-1 NMR Spectroscopy. **Journal of Natural Products**, 77, n. 6, p. 1473-1487, Jun 2014. Article.

PENG, X. F.; CHENG, K. W.; MA, J. Y.; CHEN, B. *et al.* Cinnamon bark proanthocyanidins as reactive carbonyl scavengers to prevent the formation of advanced glycation endproducts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 56, n. 6, p. 1907-1911, Mar 2008. Article.

PERALTA-BOHORQUEZ, A. F.; PARADA, F.; QUIJANO, C. E.; PINO, J. A. Analysis of Volatile Compounds of Sour Guava (*Psidium guineense* Swartz) Fruit. **Journal of Essential Oil Research**, 22, n. 6, p. 493-498, Nov-Dec 2010.

PEREIRA DA SILVA GRANDIZOLI, C. W.; CAMPOS, F. R.; SIMONELLI, F.; BARISON, A. GRAPE JUICE QUALITY CONTROL BY MEANS OF H-1 NMR SPECTROSCOPY AND CHEMOMETRIC ANALYSES. **Quimica Nova**, 37, n. 7, p. 1227-1232, 2014 2014.

POPLAWSKA, M.; BLAZEWICZ, A.; KAMINSKI, K.; BEDNAREK, E. *et al.* Application of high-performance liquid chromatography with charged aerosol detection (LC-CAD) for unified quantification of synthetic cannabinoids in herbal blends and comparison with quantitative NMR results. **Forensic Toxicology**, 36, n. 1, p. 122-140, Jan 2018. Article.

POUCHERT, C. J.; BEHNKE, J. The Aldrich Library of ¹³C and ¹H FT NMR Spectra. United State of America: Aldrich. 1 1993.

PRASAD, N. B. L.; AZEEMODDIN, G. CHARACTERISTICS AND COMPOSITION OF GUAVA (PSIDIUM-GUAJAVA L) SEED AND OIL. **Journal of the American Oil Chemists Society**, 71, n. 4, p. 457-458, Apr 1994.

QI, L.-W.; LIU, E. H.; CHU, C.; PENG, Y.-B. *et al.* Anti-diabetic agents from natural products-an update from 2004 to 2009. **Curr. Top. Med. Chem. (Sharjah, United Arab Emirates)**, 10, n. 4, p. 434-457, 2010.

QI, L. W.; LIU, E. H.; CHU, C.; PENG, Y. B. *et al.* Anti-Diabetic Agents from Natural Products-An Update from 2004 to 2009. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, 10, n. 4, p. 434-457, Mar 2010. Review.

RAI, P. K.; MEHTA, S.; WATAL, G. Hypolipidaemic & hepatoprotective effects of Psidium guajava raw fruit peel in experimental diabetes. **Indian Journal of Medical Research**, 131, n. 6, p. 820-824, Jun 2010. Article.

RAMOS, A. S.; MAR, J. M.; SILVA, L. S. D.; LEONARD D. R. ACHO *et al.* Pedra-ume caá fruit: An Amazon cherry rich in phenolic compounds with antiglycant and antioxidant properties. **Food Research International**, 2019.

RAMOS, A. S.; SOUZA, R. O. S.; BOLETI, A. P. D.; BRUGINSKI, E. R. D. *et al.* Chemical characterization and antioxidant capacity of the araca-pera (Psidium acutangulum): An exotic Amazon fruit. **Food Research International**, 75, p. 315-327, Sep 2015. Review.

RAMOS, A. S.; SOUZA, R. O. S.; BOLETI, A. P. D. A.; BRUGINSKI, E. R. D. *et al.* Chemical characterization and antioxidant capacity of the araca-pera (Psidium acutangulum): An exotic Amazon fruit. **Food Research International**, 75, p. 315-327, Sep 2015.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A. *et al.* Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, 26, n. 9-10, p. 1231-1237, May 1999.

RIBEIRO, J. E. H., M. J. G. VICENTINI, A. SOTHERS, C. A. COSTA, M. A. S. BRITO, J. M. SOUZA, M. A. D. MARTINS, L. H. P. LOHMANN, L. G. ASSUNÇÃO, P. A. C. L. PEREIRA, E. C.; SILVA, C. F. M., M. R. PROCÓPIO, L. C. **Flora da Reserva Ducke**. Manaus - AM: INPA-DFID, 1999.

ROBERFROID, M. B. Concepts and strategy of functional food science: the European perspective. **American Journal of Clinical Nutrition**, 71, n. 6, p. 1660S-1664S, Jun 2000. Article; Proceedings Paper.

RODRIGUES, L. M.; JANUARIO, J. G. B.; DOS SANTOS, S. S.; BERGAMASCO, R. *et al.* Microcapsules of 'jabuticaba' byproduct: Storage stability and application in gelatin. **Revista Brasileira De Engenharia Agricola E Ambiental**, 22, n. 6, p. 424-429, Jun 2018. Article.

ROVALINO-CORDOVA, A. M.; FOGLIANO, V.; CAPUANO, E. The effect of cell wall encapsulation on macronutrients digestion: A case study in kidney beans. **Food Chemistry**, 286, p. 557-566, Jul 2019. Article.

SA, F. A. D.; DE PAULA, J. A. M.; DOS SANTOS, P. A.; OLIVEIRA, L. D. R. *et al.* Phytochemical Analysis and Antimicrobial Activity of *Myrcia tomentosa* (Aubl.) DC. Leaves. **Molecules**, 22, n. 7, p. 10, Jul 2017. Article.

SALDANHA, L. L.; VILEGAS, W.; DOKKEDAL, A. L. Characterization of Flavonoids and Phenolic Acids in *Myrcia bella* Cambess. Using FIA-ESI-IT-MSn and HPLC-PAD-ESI-IT-MS Combined with NMR. **Molecules**, 18, n. 7, p. 8402-8416, Jul 2013.

SALES, D. S.; CARMONA, F.; DE AZEVEDO, B. C.; TALEB-CONTINI, S. H. *et al.* *Eugenia punicifolia* (Kunth) DC. as an Adjuvant Treatment for Type-2 Diabetes Mellitus: A non-Controlled, Pilot Study. **Phytotherapy Research**, 28, n. 12, p. 1816-1821, Dec 2014. Article.

SALVADOR, M. J.; DE LOURENCO, C. C.; ANDREAZZA, N. L.; PASCOAL, A. C. R. F. *et al.* Antioxidant capacity and phenolic content of four myrtaceae plants of the south of Brazil. **Nat. Prod. Commun.**, 6, n. 7, p. 977-982, 2011.

SCHAUSS, A. G.; WU, X.; PRIOR, R. L.; OU, B. *et al.* Antioxidant capacity and other bioactivities of the freeze-dried Amazonian palm berry, *Euterpe oleracea* Mart. (Acai). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 54, n. 22, p. 8604-8610, Nov 1 2006.

SCHRECKINGER, M. E.; LOTTON, J.; LILA, M. A.; DE MEJIA, E. G. Berries from South America: A Comprehensive Review on Chemistry, Health Potential, and Commercialization. **Journal of Medicinal Food**, 13, n. 2, p. 233-246, Apr 2010. Review.

SERAGLIO, S. K. T.; SCHULZ, M.; NEHRING, P.; DELLA BETTA, F. *et al.* Nutritional and bioactive potential of Myrtaceae fruits during ripening. **Food Chemistry**, 239, p. 649-656, Jan 2018. Article.

SHEHATA, M. G.; ABD-RABOU, H. S.; EL-SOHAIFY, S. A. Plant Extracts in Probiotic Encapsulation: Evaluation of their Effects on Strains Survivability in Juice and Drinkable Yogurt During Storage and an in-vitro Gastrointestinal Model. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, 13, n. 1, p. 609-617, Mar 2019. Article.

SHIN, S.; LEE, J. A.; KIM, M.; KUM, H. *et al.* Anti-Glycation Activities of Phenolic Constituents from *Silybum marianum* (Milk Thistle) Flower in Vitro and on Human Explants. **Molecules**, 20, n. 3, p. 3549-3564, Mar 2015. Article.

SHU, J.; CHOU, G.; WANG, Z. Triterpenoid constituents in fruits of *Psidium guajava*. **Zhongguo Zhong Yao Za Zhi**, n. 34(23), p. 3047-3050, 2009.

SHU, J.; CHOU, G.; WANG, Z. Two new benzophenone glycosides from the fruit of *Psidium guajava* L. **Fitoterapia**, 81, n. 6, p. 532-535, Sep 2010.

SHU, J. C.; LIU, J. Q.; CHOU, G. X.; WANG, Z. T. Two new triterpenoids from *Psidium guajava*. **Chinese Chemical Letters**, 23, n. 7, p. 827-830, Jul 2012.

SILVA, R. M.; PEREIRA, L. D.; VERAS, J. H.; DO VALE, C. R. *et al.* Protective effect and induction of DNA repair by *Myrciaria cauliflora* seed extract and pedunculagin on cyclophosphamide-induced genotoxicity. **Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, 810, p. 40-47, Nov 2016. Article.

SINGH, R.; BARDEN, A.; MORI, T.; BEILIN, L. Advanced glycation end-products: a review. **Diabetologia**, 44, n. 2, p. 129-146, Feb 2001. Review.

SINGH, R.; KAUR, N.; KISHORE, L.; GUPTA, G. K. Management of diabetic complications: A chemical constituents based approach. **Journal of Ethnopharmacology**, 150, n. 1, p. 51-70, Oct 2013. Review.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J. **Introduction to modern liquid chromatography**. 2 ed. New York: Wiley Interscience, 1979.

SOARES, F. D.; PEREIRA, T.; MARQUES, M. O. M.; MONTEIRO, A. R. Volatile and non-volatile chemical composition of the white guava fruit (*Psidium guajava*) at different stages of maturity. **Food Chemistry**, 100, n. 1, p. 15-21, 2007 2007.

SOBEH, M.; YOUSSEF, F. S.; ESMAT, A.; PETRUK, G. *et al.* High resolution UPLC-MS/MS profiling of polyphenolics in the methanol extract of *Syzygium samarangense* leaves and its hepatoprotective activity in rats with CCl₄-induced hepatic damage. **Food and Chemical Toxicology**, 113, p. 145-153, Mar 2018. Article.

SOBRAL, M.; DE SOUZA, M. A. D. Thirteen new Amazonian Myrtaceae. **Phytotaxa**, 238, n. 3, p. 201-229, Dec 2015. Article.

SOBRAL, M.; PROENÇA, C.; SOUZA, M.; MAZINE, F. *et al.* **Myrtaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2020. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/listaBrasil/PrincipalUC/PrincipalUC.do#CondicaoTaxonCP>. Acesso em: 02/02/2018.

SON, K. H.; KWON, S. Y.; KIM, H. P.; CHANG, H. W. *et al.* Constituents from *Syzygium aromaticum* Merr. et Perry. **Nat. Prod. Sci.**, 4, n. 4, p. 263-267, 1998.

SONIA S. ANAND; CORINNA HAWKES; RUSSELL J. DE SOUZA; ANDREW MENTE *et al.* Food Consumption and its Impact on Cardiovascular Disease: Importance of Solutions Focused on the Globalized Food System. **JOURNAL OF THE AMERICAN COLLEGE OF CARDIOLOGY**, 66, n. 14, p. 1590 – 1614, 2015.

SOONG, Y. Y.; BARLOW, P. J. Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. **Food Chemistry**, 88, n. 3, p. 411-417, Dec 2004.

SPINOLA, V.; PINTO, J.; CASTILHO, P. C. Identification and quantification of phenolic compounds of selected fruits from Madeira Island by HPLC-DAD-ESI-MSn and screening for their antioxidant activity. **Food Chemistry**, 173, p. 14-30, Apr 2015. Article.

SUN, J.; CHU, Y. F.; WU, X. Z.; LIU, R. H. Antioxidant and anti proliferative activities of common fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 50, n. 25, p. 7449-7454, Dec 4 2002.

SUN-WATERHOUSE, D. The development of fruit-based functional foods targeting the health and wellness market: a review. **International Journal of Food Science and Technology**, 46, n. 5, p. 899-920, May 2011. Review.

TAKEBAYASHI, J.; TAI, A.; GOHDA, E.; YAMAMOTO, I. Characterization of the radical-scavenging reaction of 2-O-substituted ascorbic acid derivatives, AA-2G, AA-2P, and AA-2S: A kinetic and stoichiometric study. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, 29, n. 4, p. 766-771, Apr 2006.

TAN, A. C.; KONCZAK, I.; RAMZAN, I.; SZE, D. M. Y. Antioxidant and cytoprotective activities of native Australian fruit polyphenols. **Food Res. Int.**, 44, n. 7, p. 2034-2040, 2011.

TANAKA, T.; ORII, Y.; NONAKA, G.; NISHIOKA, I. Tannins and related compounds. CXXIII. Chromone, acetophenone and phenylpropanoid glycosides and their galloyl and/or hexahydroxydiphenoyl esters from the leaves of *Syzygium aromaticum* Merr. et Perry. **Chem. Pharm. Bull.**, 41, n. 7, p. 1232-1237, 1993.

TANG, H.; XIAO, C.; WANG, Y. Important roles of the hyphenated HPLC-DAD-MS-SPE-NMR technique in metabonomics. **Magnetic Resonance in Chemistry**, 47, p. S157-S162, Dec 2009.

TEIXEIRA, L. D. L.; BERTOLDI, F. C.; LAJOLO, F. M.; AYMOTO HASSIRNOTTO, N. M. Identification of Ellagitannins and Flavonoids from *Eugenia brasiliensis* Lam. (Grumixama) by HPLC-ESI-MS/MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 63, n. 22, p. 5417-5427, Jun 10 2015.

THAIPONG, K.; BOONPRAKOB, U.; CROSBY, K.; CISNEROS-ZEVALLOS, L. *et al.* Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. **Journal of Food Composition and Analysis**, 19, n. 6-7, p. 669-675, Sep-Nov 2006.

THUAYTONG, W.; ANPRUNG, P. Bioactive Compounds and Prebiotic Activity in Thailand-Grown Red and White Guava Fruit (*Psidium guajava* L.). **Food Science and Technology International**, 17, n. 3, p. 205-212, Jun 2011.

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

UM, J. A.; CHOI, Y.-G.; LEE, D.-K.; LEE, Y. S. *et al.* Discrimination between genetically identical peony roots from different regions of origin based on H-1-nuclear magnetic resonance spectroscopy-based metabolomics: determination of the geographical origins and estimation of the mixing proportions of blended samples. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 405, n. 23, p. 7523-7534, Sep 2013.

VALENTE, A.; ALBUQUERQUE, T. G.; SANCHES-SILVA, A.; COSTA, H. S. Ascorbic acid content in exotic fruits: A contribution to produce quality data for food composition databases. **Food Research International**, 44, n. 7, p. 2237-2242, Aug 2011.

VARDANEGA, R.; MUZIO, A. F. V.; SILVA, E. K.; PRATA, A. S. *et al.* Obtaining functional powder tea from Brazilian ginseng roots: Effects of freeze and spray drying processes on chemical and nutritional quality, morphological and redispersion properties. **Food Research International**, 116, p. 932-941, Feb 2019. Article.

VELIOGLU, Y. S.; MAZZA, G.; GAO, L.; OOMAH, B. D. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 46, n. 10, p. 4113-4117, Oct 1998. Article.

VINHOLES, J.; LEMOS, G.; BARBIERI, R. L.; FRANZON, R. C. *et al.* In vitro assessment of the antihyperglycemic and antioxidant properties of araca, butia and pitanga. **Food Bioscience**, 19, p. 92-100, Sep 2017. Article.

VO, T. S.; NGO, D. H. The Health Beneficial Properties of *Rhodomyrtus tomentosa* as Potential Functional Food. **Biomolecules**, 9, n. 2, p. 16, Feb 2019. Review.

WANG, T. Y.; LI, Q.; BI, K. S. Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, 13, n. 1, p. 12-23, Jan 2018. Review.

WANG, W.; YAGIZ, Y.; BURAN, T. J.; NUNES, C. D. *et al.* Phytochemicals from berries and grapes inhibited the formation of advanced glycation end-products by scavenging reactive carbonyls. **Food Research International**, 44, n. 9, p. 2666-2673, Nov 2011. Article.

WATANABE, R.; SUGAI, C.; YAMAZAKI, T.; MATSUSHIMA, R. *et al.* Quantitative Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy Based on PULCON Methodology: Application to Quantification of Invaluable Marine Toxin, Okadaic Acid. **Toxins**, 8, n. 10, p. 9, Oct 2016. Article.

WESTON, R. J. Bioactive products from fruit of the feijoa (*Feijoa sellowiana*, Myrtaceae): A review. **Food Chem.**, 121, n. 4, p. 923-926, 2010.

WISHART, D. S. Metabolomics: applications to food science and nutrition research. **Trends in Food Science & Technology**, 19, n. 9, p. 482-493, 2008 2008.

WOLFE, K. L.; LIU, R. H. Cellular antioxidant activity (CAA) assay for assessing antioxidants, foods, and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 55, n. 22, p. 8896-8907, Oct 31 2007.

WU, W.-N.; HUANG, C. H. Structural characterization of flavonols and flavanones in nanogram quantities by API-ionspray tandem mass spectrometry. **Chin. Pharm. J. (Taipei, Taiwan)**, 57, n. 1, p. 7-15, 2005.

WUBSHET, S., G.; BRIGHENTE, I., M. C. ; MOADDEL, R.; STAERK, D. Magnetic Ligand Fishing as a Targeting Tool for HPLC-HRMS-SPE-NMR: α -Glucosidase Inhibitory Ligands and Alkylresorcinol Glycosides from *Eugenia catharinae*. **Journal of Natural Products**, 78, p. 2657–2665, 2015.

WUBSHET, S. G.; MORESCO, H. H.; TAHTAH, Y.; BRIGHENTE, I. M. G. *et al.* High-resolution bioactivity profiling combined with HPLC-HRMS-SPE-NMR: alpha-Glucosidase inhibitors and acetylated ellagic acid rhamnosides from *Myrcia palustris* DC. (Myrtaceae). **Phytochemistry**, 116, p. 246-252, Aug 2015.

YAO, R. Y.; HEINRICH, M.; ZOU, Y. F.; REICH, E. *et al.* Quality Variation of Goji (Fruits of *Lycium* spp.) in China: A Comparative Morphological and Metabolomic Analysis. **Frontiers in Pharmacology**, 9, p. 12, Feb 2018. Article.

YEN, G. C.; WU, C. H. Inhibitory effect of naturally occurring flavonoids on in vitro advanced glycation end-product formation. **Free Radical Biology and Medicine**, 36, p. S133-S133, 2004. Meeting Abstract.

YOSHIKAWA, M.; SHIMADA, H.; NISHIDA, N.; LI, Y. H. *et al.* Antidiabetic principles of natural medicines. II. Aldose reductase and alpha-glucosidase inhibitors from Brazilian natural medicine, the leaves of *Myrcia multiflora* DC. (Myrtaceae): Structures of myrciacitrins I and II and myrciaphenones A and B. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, 46, n. 1, p. 113-119, Jan 1998. Article.

ZANATTA, C. F.; CUEVAS, E.; BOBBIO, F. O.; WINTERHALTER, P. *et al.* Determination of anthocyanins from camu-camu (*Myrciaria dubia*) by HPLC-PDA, HPLC-MS, and NMR. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 53, n. 24, p. 9531-9535, Nov 30 2005.

ZHANG, L. L.; LIN, Y. M. Antioxidant tannins from *Syzygium cumini* fruit. **African Journal of Biotechnology**, 8, n. 10, p. 2301-2309, May 2009. Article.

ZHAO, D. K.; SHI, Y. N.; PETROYA, V.; YUE, G. G. L. *et al.* Jaboticabin and Related Polyphenols from Jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) with Anti-inflammatory Activity for Chronic Obstructive Pulmonary Disease. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 67, n. 5, p. 1513-1520, Feb 2019. Article.

ZHU, Y.; LIU, Y.; ZHAN, Y.; LIU, L. *et al.* Preparative Isolation and Purification of Five Flavonoid Glycosides and One Benzophenone Galloyl Glycoside from *Psidium guajava* by High-

Speed Counter-Current Chromatography (HSCCC). **Molecules**, 18, n. 12, p. 15648-15661, Dec 2013.

ZLOTEK, U.; SWIECA, M.; JAKUBCZYK, A. Effect of abiotic elicitation on main health-promoting compounds, antioxidant activity and commercial quality of butter lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Food Chemistry**, 148, p. 253-260, Apr 1 2014.

Materia Suplementar

Análise quimiométrica dos extratos metanólicos de *Eugenia punicifolia*

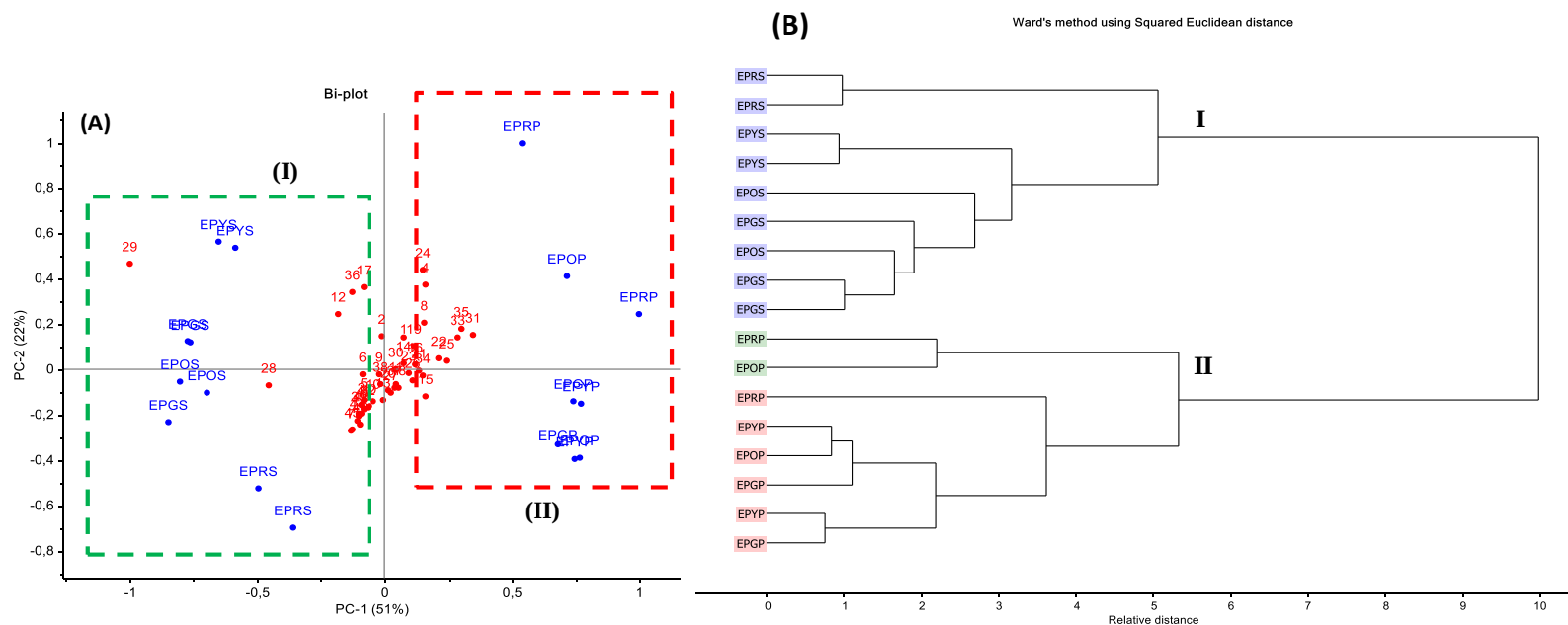


Figura S 1 A) Bi-plot do mapa obtido por PCA da matriz Pareto (17x46) dos dados de RMN de ^1H (CD_3OD) da Região 1 dos espectros (0,2-3,02 ppm): PC1xPC2 (73% de variância explicada). Algoritmo: SVD; método de Validação: Cross validation (17 segmentos); Componentes usados

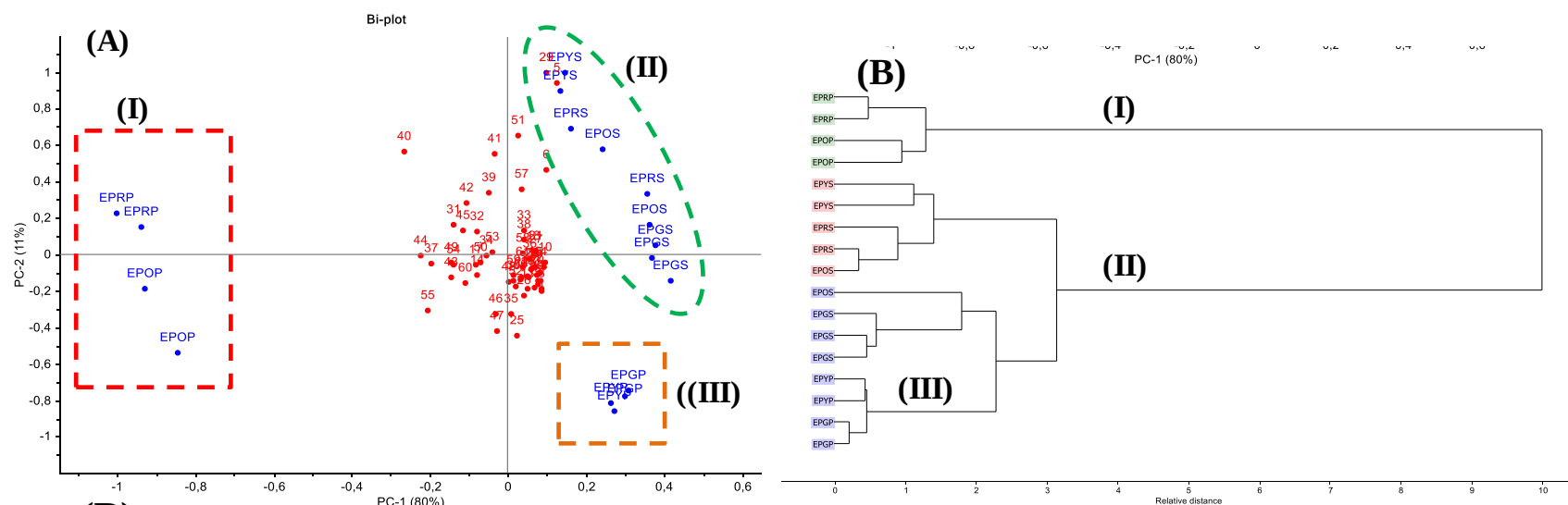


Figura S 2 A) Bi-plot do mapa obtido por PCA da matriz Pareto (17x61) dos dados de RMN de ^1H da **Região 2** dos espectros (3,0-5,5 ppm): PC1xPC2 (91% de variância explicada). Algoritmo: SVD; método de Validação: *Cross validation* (17 segmentos); Componentes usadas para Teste de Incerteza: 5; Pré-tratamentos: Transformação por SNV e Normalização por Range Normalization; B) HCA dos dados da PCA obtida pela matriz Pareto

Material suplementar - Ampliações dos espectros de RMN 1D dos extratos metanólicos dos frutos de *Myrcia* spp

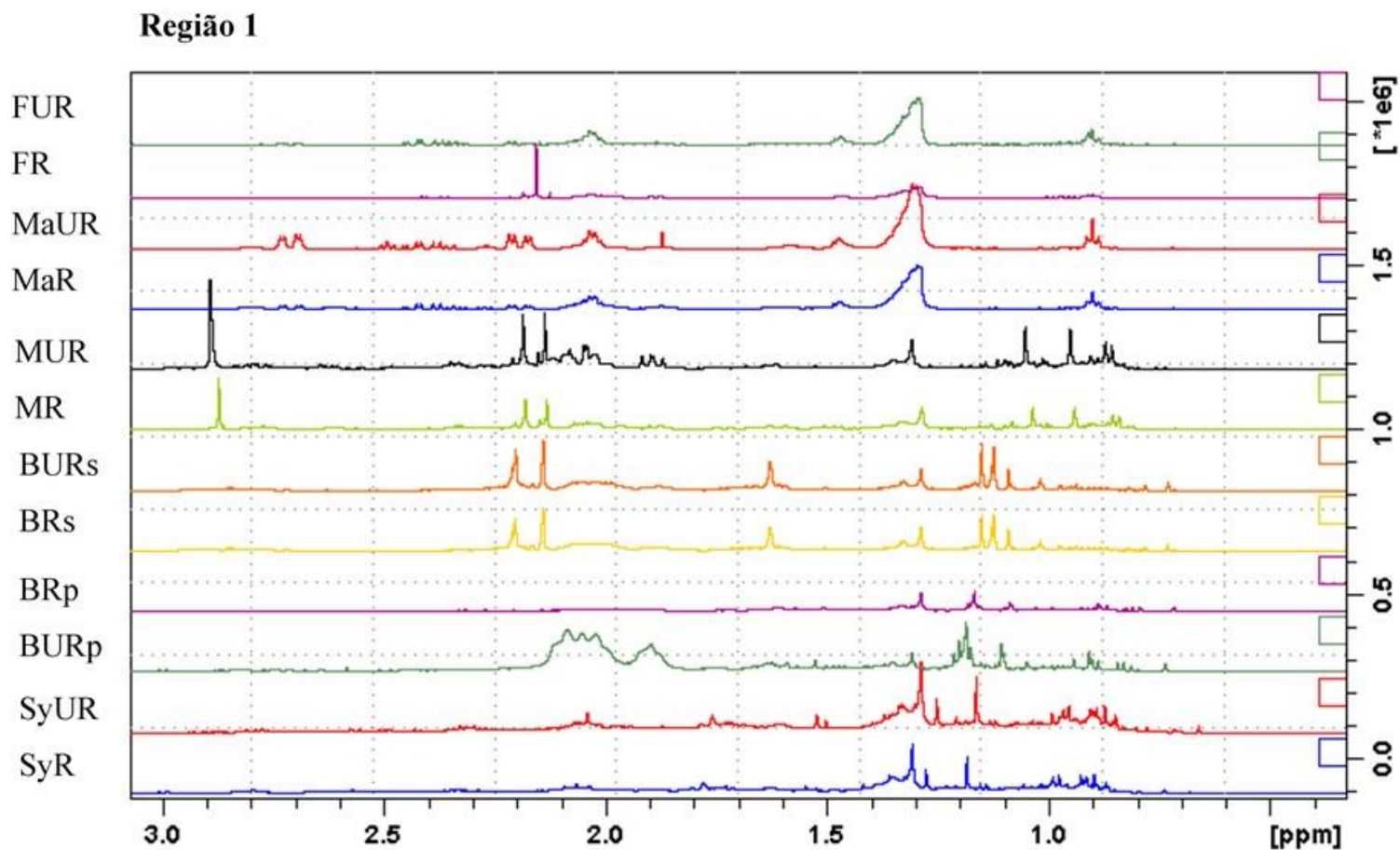


Figura S 3 Expansões das Regiões espectrais em ppm: Região 1 (0,2-3,0) dos extratos dos frutos de *Myrcia* spp em CD_3OD utilizadas na construção das matrizes para análise quimiométrica por PCA e HCA. Os códigos representam sementes (S); polpa (P); maduro/ripe (R); não maduro/unripe (UR); F (*Myrcia fenestrata*); Ma (*M. magnoliifolia*); M (*M. minutiflora*); B (*M. bracteata*); Sy (*M. sylvatica*).

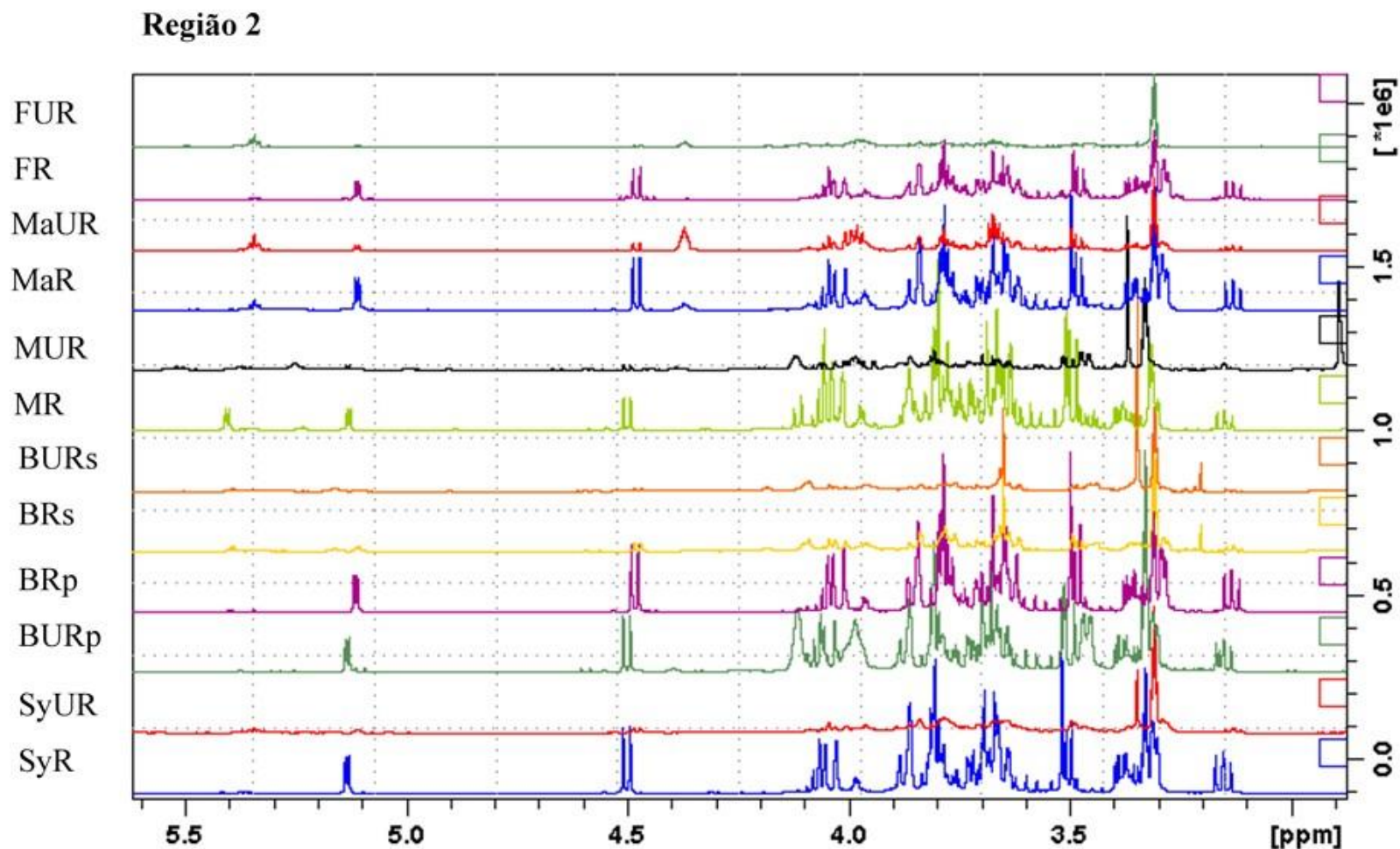


Figura S 4 Expansões das Regiões espectrais em ppm: Região 2 (3,0-5,5) dos extratos dos frutos de *Myrcia* spp em CD₃OD utilizadas na construção das matrizes para análise quimiométrica por PCA e HCA. Os códigos representam sementes (S); polpa (P); maduro/ripe (R); não maduro/unripe (UR); F (*Myrcia fenestrata*); Ma (*M. magnoliifolia*); M (*M. minutiflora*); B (*M. bracteata*); Sy (*M. sylvatica*).

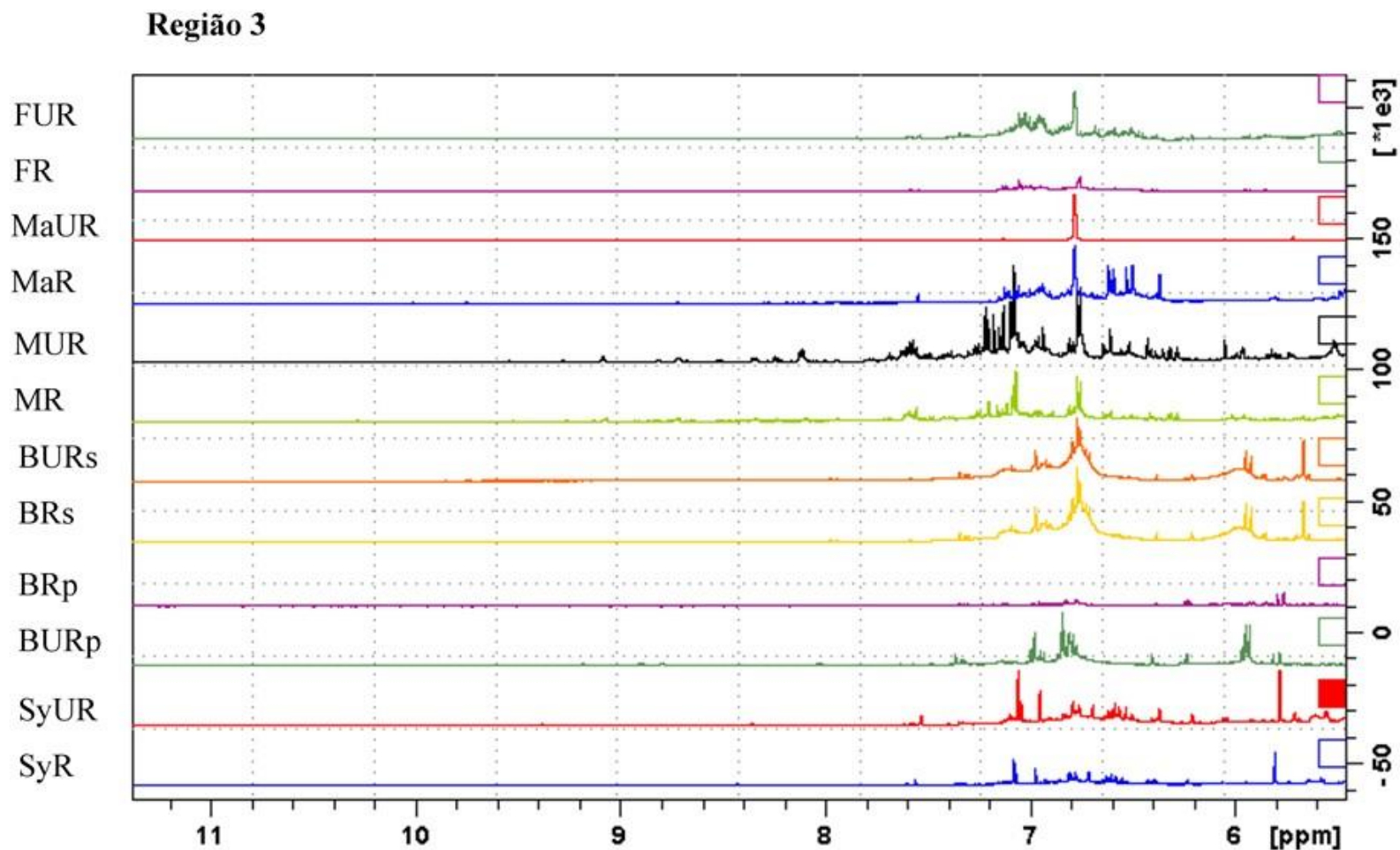


Figura S 5 Expansões das Regiões espectrais em ppm: Região 3 (6,0-11) dos extratos dos frutos de *Myrcia* spp em CD₃OD utilizadas na construção das matrizes para análise quimiométrica por PCA e HCA. Os códigos representam sementes (S); polpa (P); maduro/ripe (R); não maduro/unripe (UR); F (*Myrcia fenestrata*); Ma (*M. magnoliifolia*); M (*M. minutiflora*); B (*M. bracteata*); Sy (*M. sylvatica*).

Material suplementar - Espectros HPLC-DAD-MS dos extratos dos frutos de *Myrcia* spp

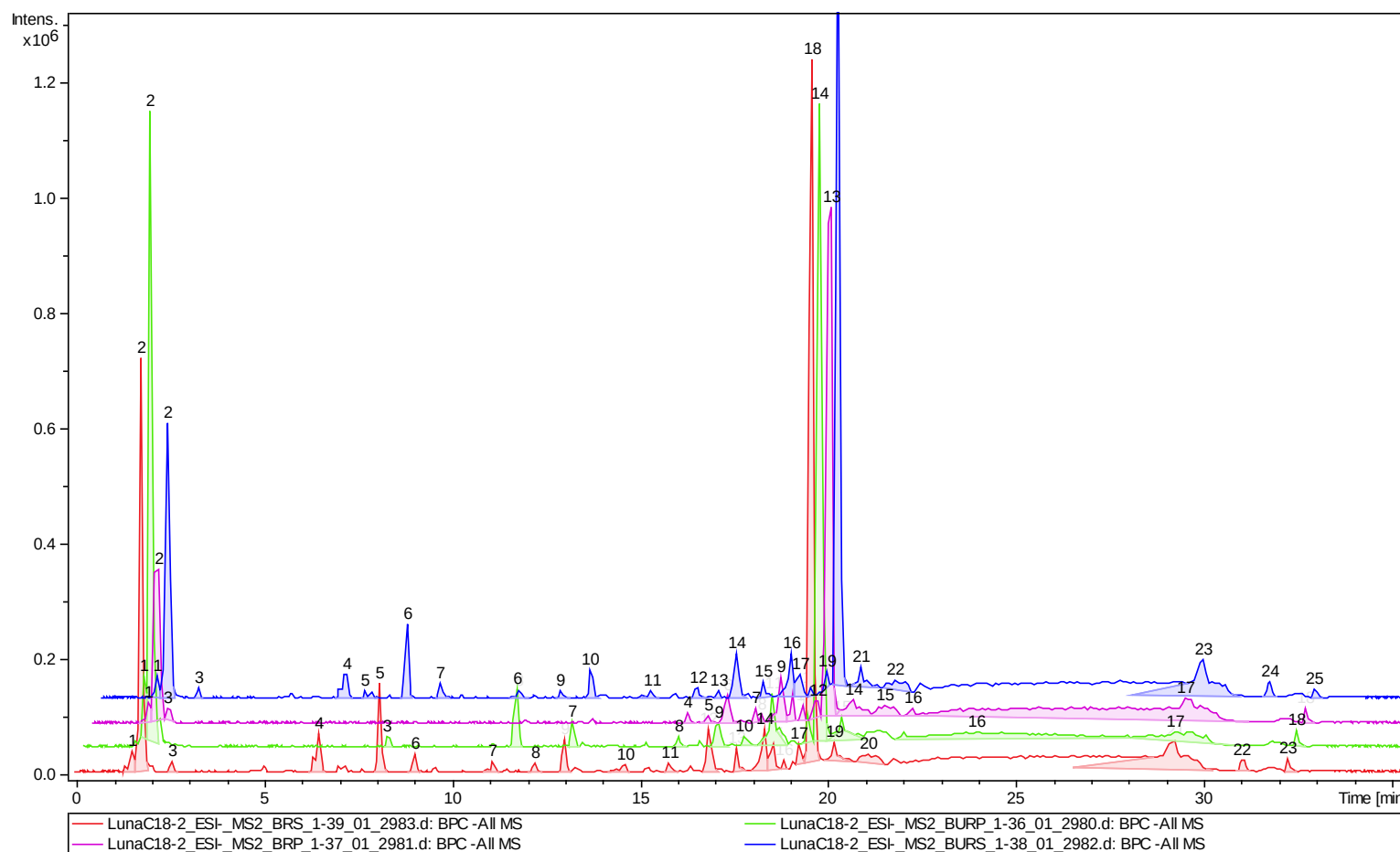


Figura S 6 cromatogramas dos extratos de *Myrcia bracteate*: **BRs** (linha vermelha); **BURp** (linha verde); **BRp** (linha roxa); **BURs** (linha azul); 1: ($C_6H_{11}O_3$) (113/179/181/249/317); 2: ácido quínico (191/383/405/533); 3: derivado de ácido quínico 173/191/405; 4: desconhecido 577/645; 5: derivado de ácido ferulico 174/443/511/729; 6: catequina 289/335/357/449/579; 7: 431/448/385; 8: 377; 8/5: 449; 9: 483/377; 10: 447/510; 11: 477/494; 12: 431/311/223/174; 13: 653/311/289/177; 14: 503/457/311/251/207/193; 15: 361/293/236/220/174; 16: 275/315/383/543/631; 17: 277/174/233/375; 18: 315/325/283/221/171/804; 19: 297/311/271/365; 20: Diosmetina (299); 21: 375/519/498/463/450; 22: 662/519/375/74/113/699.

Material suplementar

Desenvolvimento de método por HPLC-DAD-MS APCI (-/+)

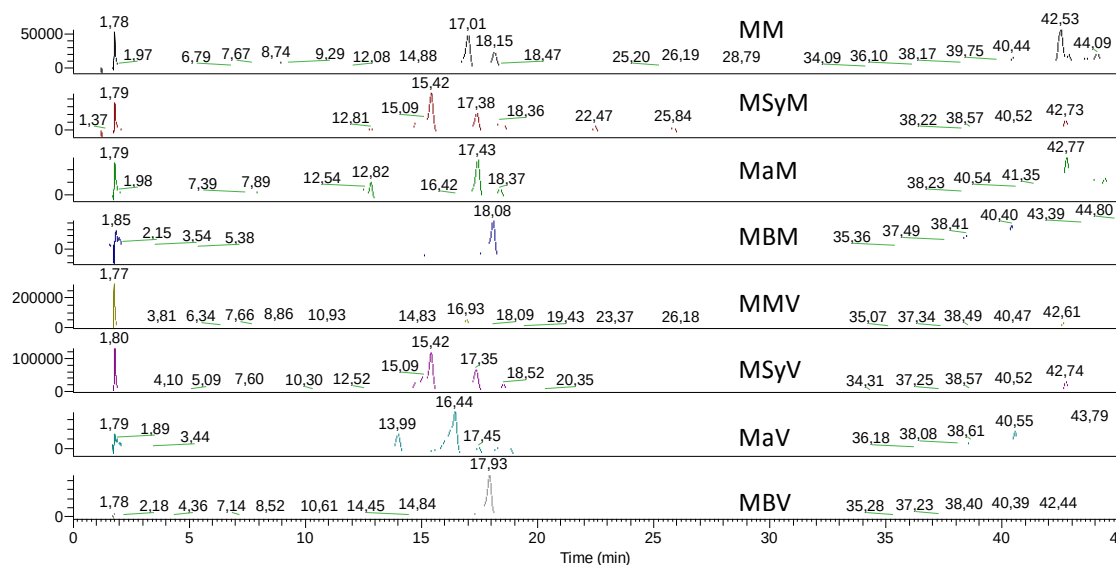


Figura S 7 Comparação entre os cromatogramas dos extratos metanólico dos frutos maduros (MMR, MSyR, MMar, MBR) e verdes (MMUR, MSyUR, MMarUR, MBUR) de *Myrcia* spp observados no comprimento de onda (nm): 380 e seus tempos de retenção (RT min). Condições cromatográficas: coluna: RP 18 (Agilent), 5µm, 4,6x150 mm (volume de injeção de 10µL e *looping* de 25µL); Metanol e (B) Água acidificada 1% ácido fórmico (v/v): gradiente: 0-10 min, isocrático a 10% A, 10-30 min 40%A(2% taxa) A; 30-40 min 70%A (7%taxa), 40-45 min 100%. Fluxo de 0,800mL min⁻¹.

Apêndice

Análise por RMN 2D dos extratos metanólicos de frutos de *Eugenia punicifolia* spp

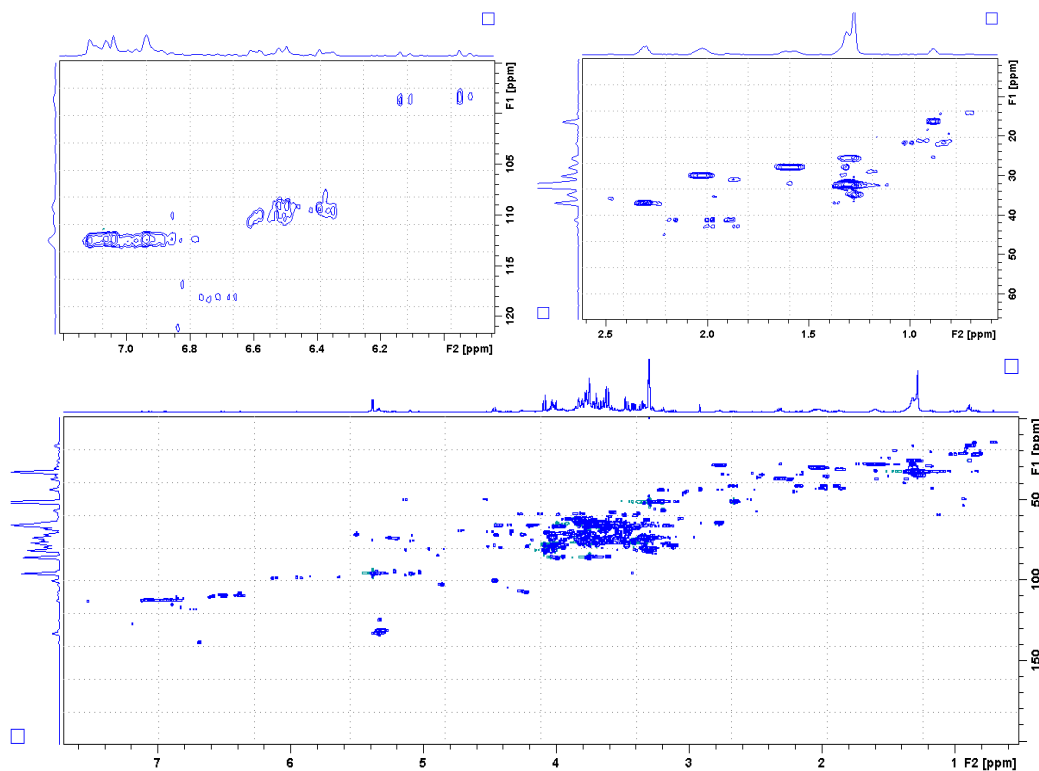


Figura A 1 Ampliações do mapa HSQC (¹H-¹³C) dos extratos metanólicos das sementes maduras de coloração amarela dos frutos de *Eugenia punicifolia* (EPYS).

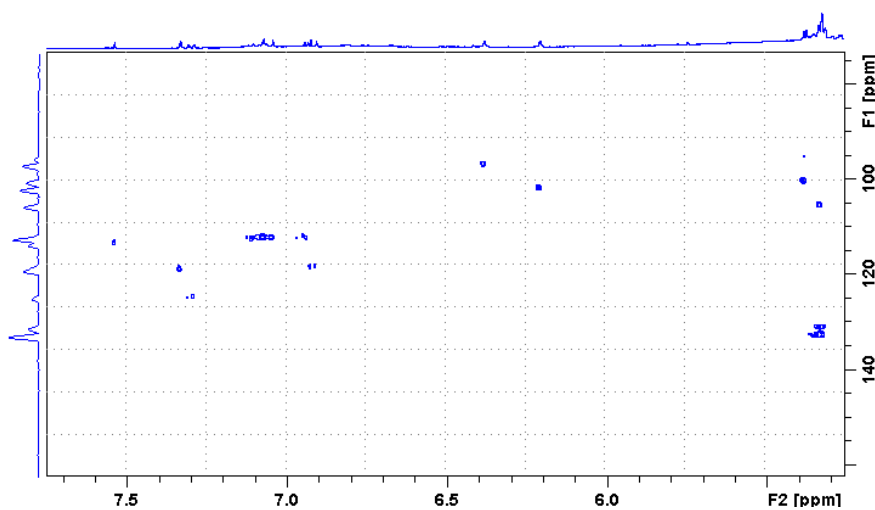


Figura A 2 Ampliação da região aromática do mapa de HSQC (¹H-¹³C) dos extratos metanólicos das polpas maduras de coloração vermelha dos frutos de *Eugenia punicifolia* (EPRP).

Análise por RMN 2D dos extratos metanólicos de frutos de *Myrcia* spp

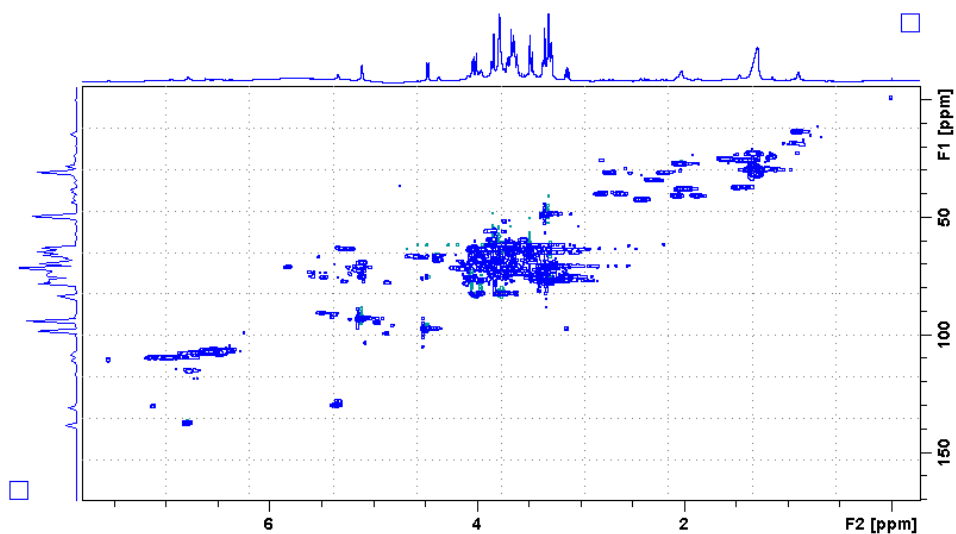


Figura A 3 Ampliação do mapa de HSQC (^1H - ^{13}C) do extrato metanólico (CD_3OD , 500 MHz) dos frutos maduros de *M. magnoliifolia* (MaR).

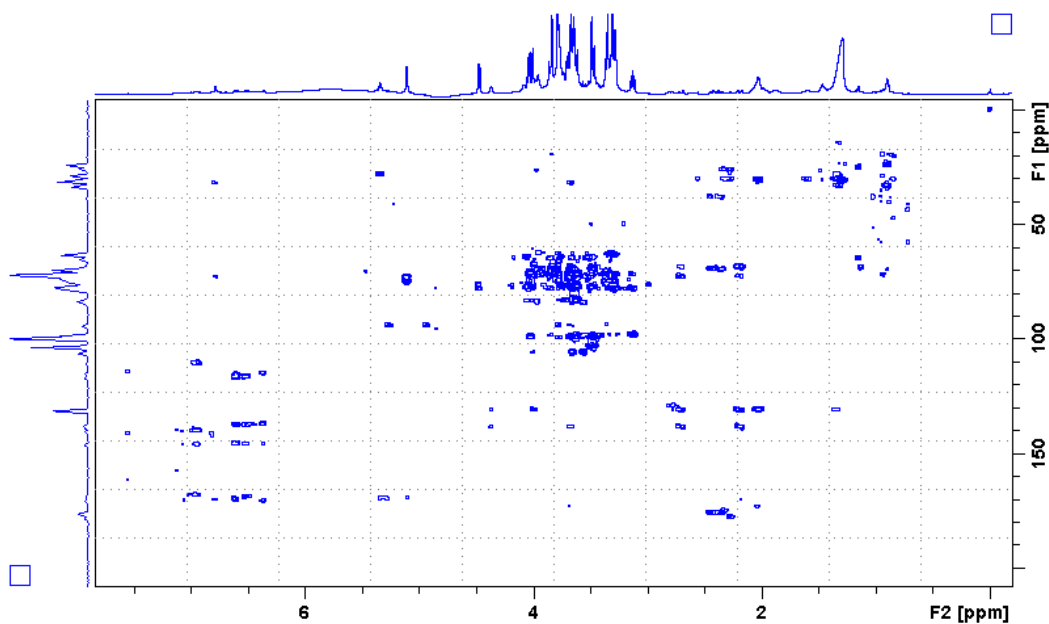


Figura A 4 Ampliação do mapa de HMBC (^1H - ^{13}C) do extrato metanólico (CD_3OD , 500 MHz) dos frutos maduros de *M. magnoliifolia* (MaR).

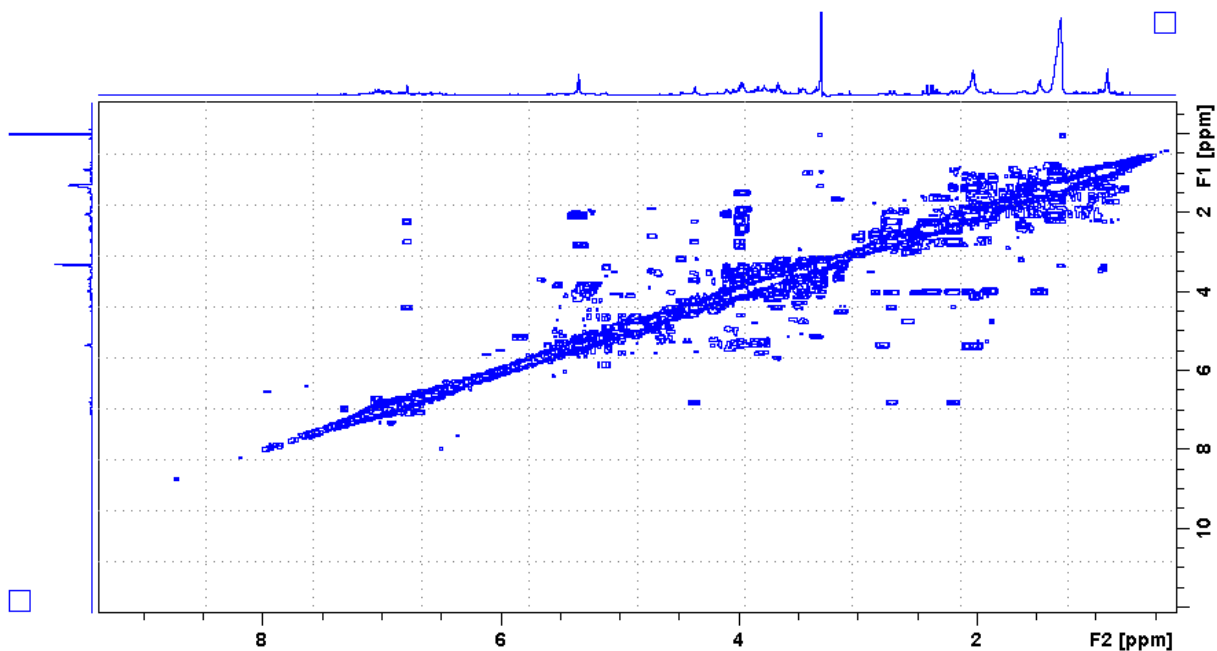


Figura A 5 Ampliação do mapa de COSY ^1H - ^1H (CD_3OD , 500MHz) do espectro do extrato metanólico dos frutos verdes inteiros de *M. fenestrata* (MFUR).

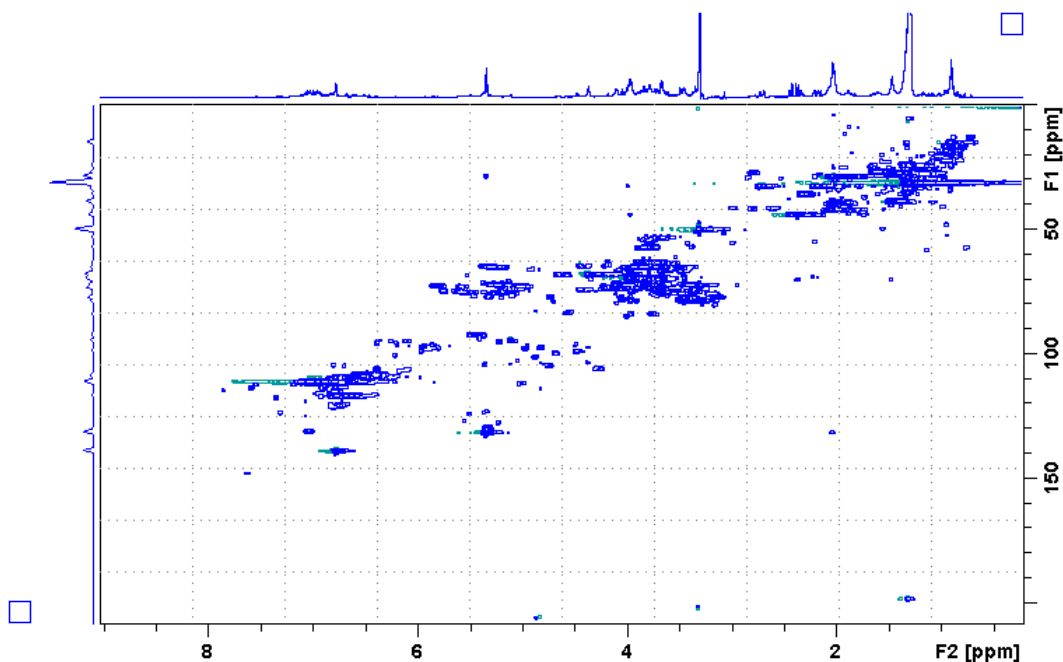


Figura A 6 Ampliação do mapa HSQC (CD_3OD , 500MHz) do espectro do extrato metanólico dos frutos verdes inteiros de *M. fenestrata* (MFUR).

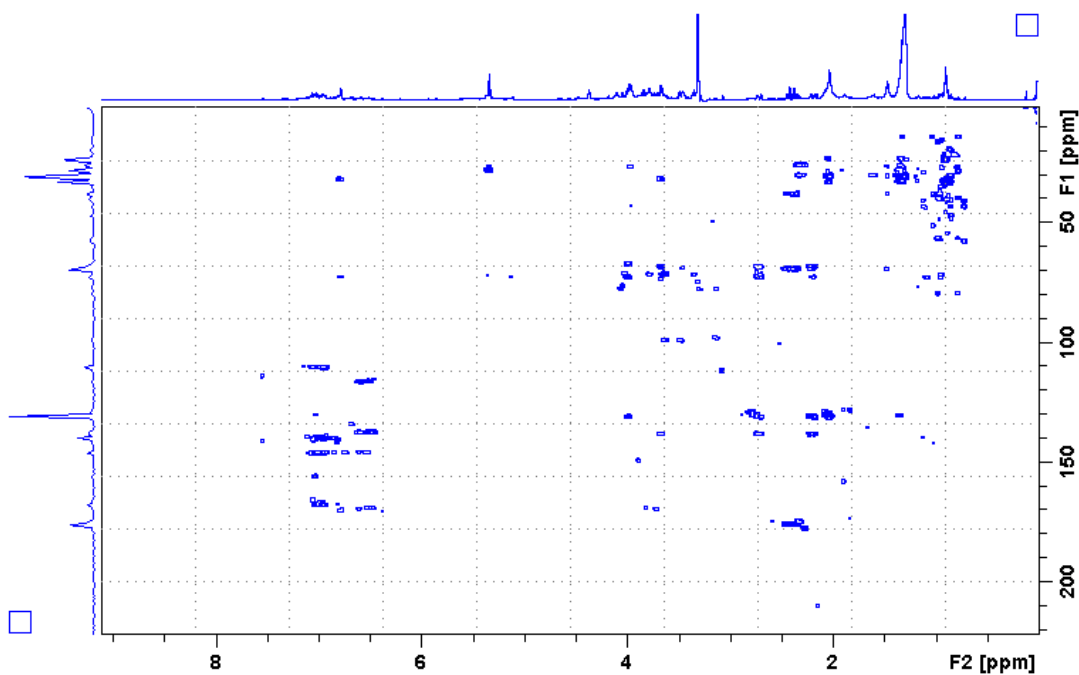


Figura A 7 Ampliação do mapa HMBC (CD₃OD, 11,74 T) do espectro do extrato metanólico dos frutos verdes inteiros de *M. fenestrata* (FUR).

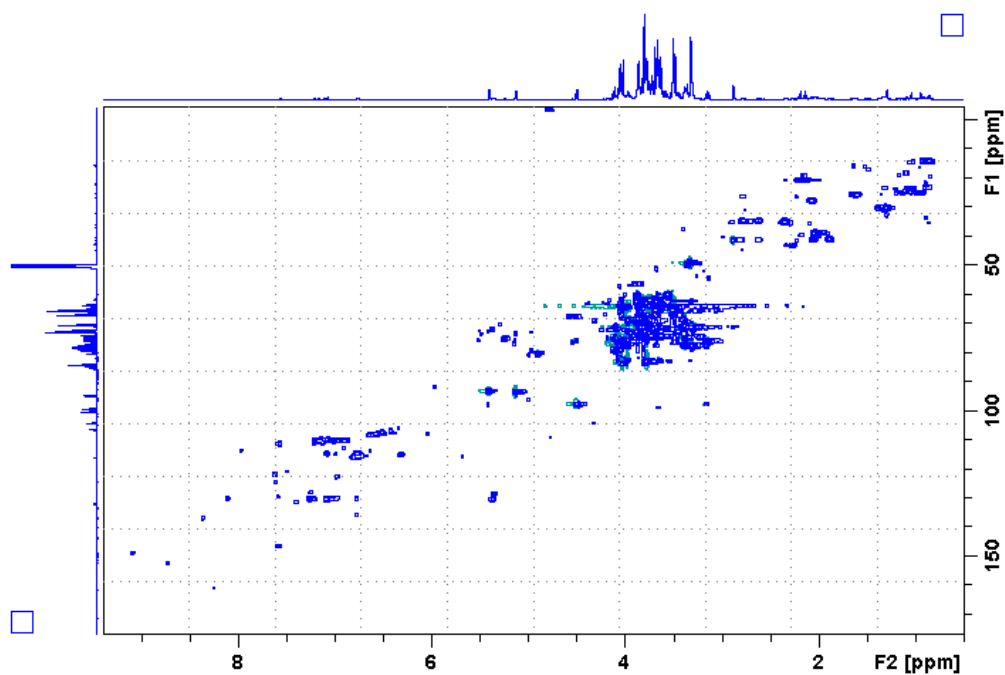


Figura A 8 Ampliação do mapa de HSQC do extrato metanólico de *M. minutiflora* madura MMR (CD₃OD, 500 MHz).

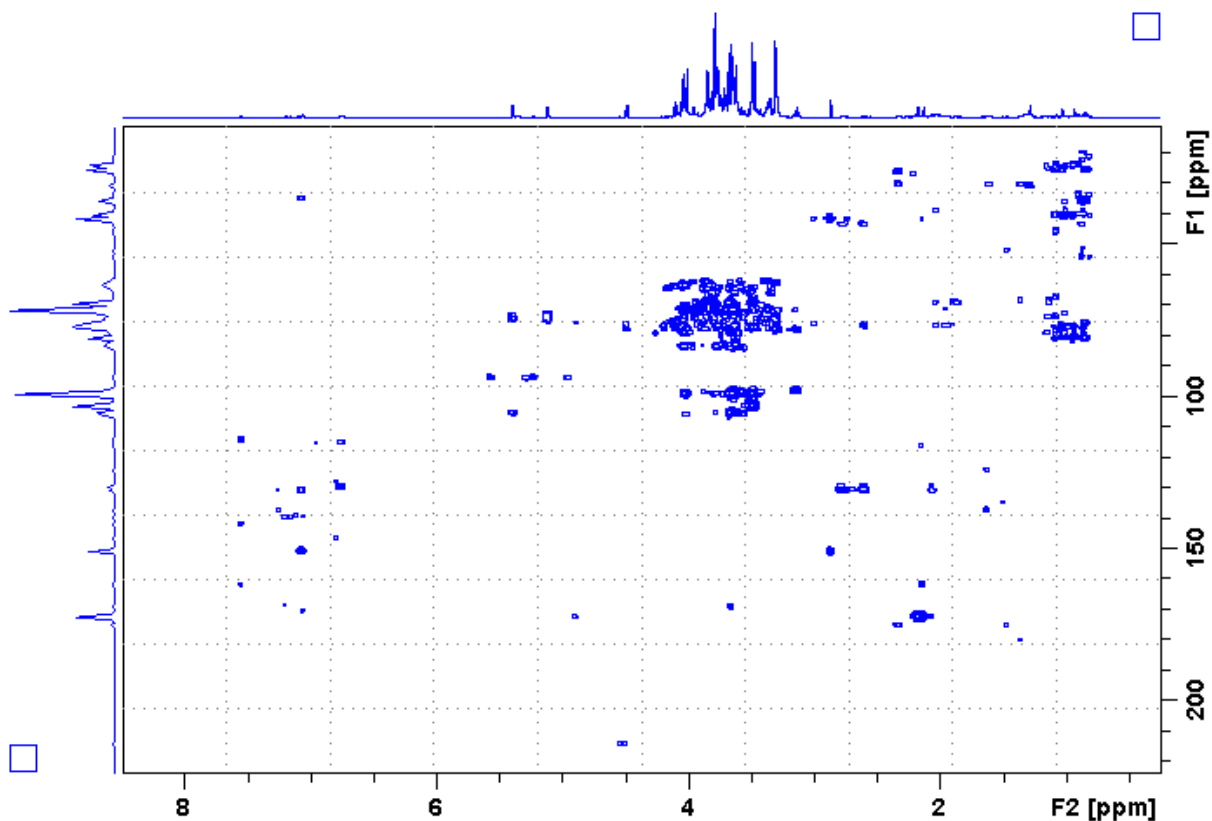


Figura A 9 Ampliação do mapa de HMBC do extrato metanólico de *M. minutiflora* madura MR (CD₃OD, 500 MHz).

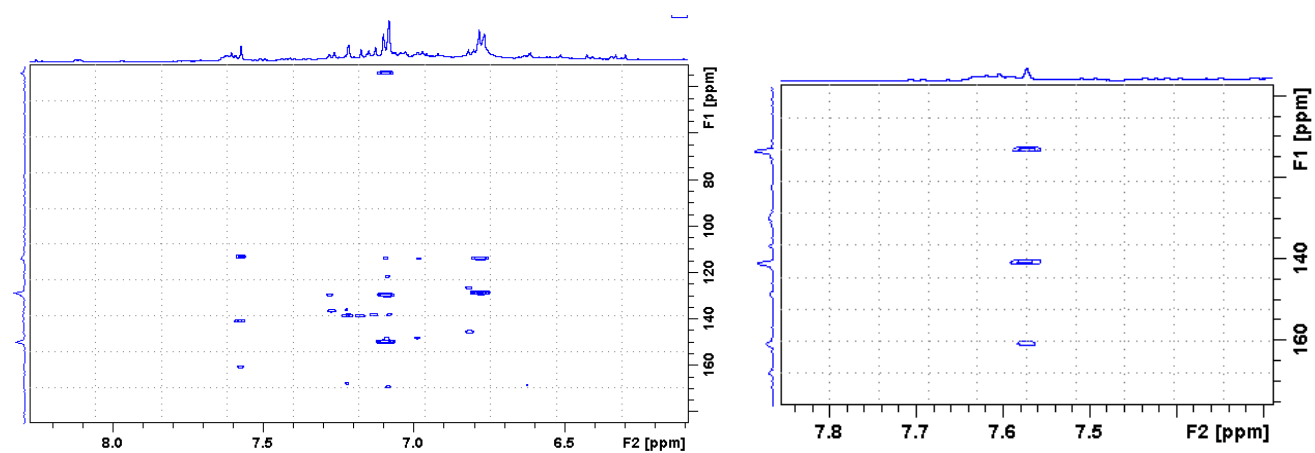


Figura A 10 Ampliação do mapa HMBC do extrato metanólico de MR; correlação entre os carbonos do ácido elágico.