



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO - UFPE  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA - CCEN  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FUNDAMENTAL - DQF  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA - PPGQ

CHAIANNE KAIALLE DA SILVA NASCIMENTO

**ANÁLISE METABONÔMICA DO EXTRATO ETANÓLICO  
DAS FOLHAS DE PITANGUEIRA (*EUGENIA UNIFLORA* L.)  
EM FUNÇÃO DA SAZONALIDADE**

Recife  
2025

CHAIANNE KAIALLE DA SILVA NASCIMENTO

**Análise metabonômica do extrato etanólico das folhas de  
pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) em função da sazonalidade**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Química da Universidade Federal de Pernambuco,  
como parte dos requisitos para obtenção do título de  
Mestre em Química.

Área de concentração: Química Analítica

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Oliveira da Silva.

Recife  
2025

*Dedico a Deus, pela sua infinita bondade e aos  
meus pais, por todo o apoio.*

CHAIANNE KAIALLE DA SILVA NASCIMENTO

**Análise metabonômica do extrato etanólico das folhas de  
pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) em função da sazonalidade**

Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Química no Departamento de  
Química Fundamental da  
Universidade Federal de  
Pernambuco, como requisito parcial  
para a obtenção do título de Mestre  
em Química.

Aprovada em: 27/ 08/ 2025

BANCA EXAMINADORA

---

**Prof. Ricardo Oliveira da Silva (Orientador)**  
Universidade Federal de Pernambuco

---

**Prof. Jorge Luiz Neves**  
Universidade Federal de Pernambuco

---

**Prof. Rômulo Pinto Tenório**  
Comissão Nacional de Energia  
Nuclear

.Catalogação de Publicação na Fonte. UFPE - Biblioteca Central

Nascimento, Chaianne Kaialle da Silva.

Análise metabonômica do extrato etanólico das folhas de pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) em função da sazonalidade / Chaianne Kaialle da Silva Nascimento. - Recife, 2025.

74f.: il.

Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Programa de Pós Graduação em Química, 2025.

Orientação: Ricardo Oliveira da Silva.

1. *Eugenia uniflora* L; 2. H1 RMN; 3. Metabólitos; 4. PCA; 5. Heatmap. I. Silva, Ricardo Oliveira da. II. Título.

UFPE-Biblioteca Central

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me mostrar soluções nos momentos mais difíceis, por me permitir realizar coisas que sempre me pareceram tão distantes.

Aos meus pais, “Dona Penha e seu Geraldo”, por nunca medirem esforços para que eu realizasse meus sonhos, por todo apoio não só nesse período do mestrado, mas em toda a minha vida. Tenho certeza de que jamais teria conseguido chegar até aqui sem as orações, apoio e amor que me deram. Obrigada por todo crédito e apoio.

Ao meu irmão, Charles Kaiky, pelos momentos de descontração e alegria.

Ao meu professor e amigo, Thiago Muniz, pelos indícios de espectroscopia e RMN na graduação (que me garantiram muitas noites em claro, rsrs). Agradeço por toda preocupação, conselhos e apoio.

As minhas amigas, Andresa Cintra, Maria Mikaelly, Taiza Santos e Quedyane Cruz, por tornarem toda essa jornada mais leve e alegre.

À Vanessa Rodrigues, pelas incontáveis vezes que me ouviu falando sobre o RMN, e as disciplinas do mestrado (mesmo que não entendesse muito sobre). O seu apoio e carinho foram fundamentais para que conseguisse finalizar essa etapa.

Ao meu orientador, Ricardo Oliveira, pela compreensão, paciência, correções, ensinamentos e mais ainda por toda humanidade. Aos companheiros do laboratório de metabonômica e quimiometria (LABMEQ) pelas valiosas contribuições. Agradeço a todos do grupo de pesquisa, em especial a Estefane Salles, Antônia Gois e Larissa Trindade por todo incentivo, apoio e ajuda nas análises.

A Central analítica, pela disponibilização do RMN, em especial a Eliete e Pablo pelos ensinamentos e apoio durante o manuseamento do equipamento.

Ao professor Luiz Soares e a Camylla Tenório, do Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFPE, pela concessão dos extratos aqui utilizados.

À UFPE e ao Programa de Pós Graduação em Química do Departamento de Química Fundamental (DQF), por todo o conhecimento compartilhado.

À CAPES, pela concessão de bolsa, a qual permitiu a permanência em Recife-PE e realização da pesquisa e disciplinas.

*“For I am Yours and you are mine...”* - United, Hilgsong (2013)

## RESUMO

Plantas vem sendo utilizadas com finalidade medicinal desde os primórdios da sociedade. Uma dessas plantas medicinais é a *Eugenia uniflora* L. conhecida popularmente como pitangueira. Nesse estudo, o foco está relacionado a influência da sazonalidade na composição química das folhas dessa planta, observando assim, a tendência de separação natural dessas amostras em função dos metabólitos que a compõem. Para isso, foram utilizadas 14 amostras de extrato etanólico 50% de folhas de *Eugenia uniflora* L. (de diversos meses do ano), as quais foram analisadas por meio da espectroscopia de ressonância magnética nuclear de  $H^1$  com o auxílio da sequência de pulso NOESY. Os espectros foram coletados num espectrômetro *Bruker Avance*, operando a 400 MHz e temperatura de 25°C. Os dados foram pré processados no Mestrenova 12.0 e depois seguiram para o Metaboanalyst 6.0, no qual foram realizadas as análises exploratórias: Análise de componentes principais (PCA), análise hierárquica de cluster (HCA) e *Heatmap*, por meio dos quais foram construídos os modelos metabonômicos. Os resultados apresentados nos 3 tipos de análise mostraram a tendência de formação de dois grupos, sendo que na PCA, as 25 principais variáveis indicaram que a classe 1 apresentava um maior teor de polifenóis. A HCA corroborou com os dados da PCA. No *heatmap* foram apresentadas outras 25 variáveis como mais relevantes, as quais apontaram que as amostras pertencentes a outra classe (2) apresentaram um maior teor de terpenos. Assim, os extratos da classe 1 apresentaram maior teor fenólico e menor concentração de terpenos, o que se mostrou contrário para as amostras da classe 2. Esses dados mostraram que as condições as quais a planta é submetida ao decorrer do ano, influenciam diretamente na sua composição metabólica.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Eugenia uniflora* L.;  $H^1$  RMN; metabólitos; PCA, *Heatmap*.



## ABSTRACT

Plants have been used for medicinal purposes since the dawn of society. One of these medicinal plants is *Eugenia uniflora* L., popularly known as pitangueira. In this study, the focus is on the influence of seasonality on the chemical composition of the leaves of this plant, thus observing the tendency of natural separation of these samples according to the metabolites that compose it. For this, 14 samples of 50% ethanolic extract of *Eugenia uniflora* L. leaves (from different months of the year) were used, which were analyzed by  $H^1$  nuclear magnetic resonance spectroscopy with the aid of the NOESY pulse sequence. The spectra were collected on a Bruker Avance spectrometer operating at 400 MHz and a temperature of 25°C. The data were pre-processed in Mestrenova 12.0 and then sent to Metaboanalyst 6.0, where exploratory analyses were performed: Principal Component Analysis (PCA), Hierarchical Cluster Analysis (HCA) and Heatmap, through which the metabolomic models were constructed. The results presented in the three types of exploratory analysis showed a tendency to form two groups, and in the PCA, the 25 main variables indicated that class 1 had a higher polyphenol content. The HCA corroborated the PCA data. The heatmap presented another 25 variables as main variables, which indicated that the samples belonging to another class (2) had a higher terpene content. Thus, the extracts of class 1 had a higher phenolic content and lower terpene concentration, which was contrary to the samples of class 2. These data showed that the conditions to which the plant is subjected throughout the year directly influence its metabolic composition.

**KEYWORDS:** *Eugenia uniflora* L.;  $H^1$  NMR; metabolites; PCA; *Heatmap*.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1-</b> Esquematisação da árvore de pitangueira e seus componentes. ....	13
<b>Figura 2-</b> a) Estrutura básica dos polifenóis, que diferem em função dos substituintes oxigenados. b) Estrutura de dois polifenóis frequentemente relatados em estudos com folhas de pitanga ( <i>Eugenia uniflora</i> L.).....	15
<b>Figura 3-</b> Exemplificação da formação de Taninos hidrolisáveis gálico e elágico. ....	17
<b>Figura 4-</b> Estrutura de taninos condensados. ....	17
<b>Figura 5-</b> Classificação de terpenos. ....	18
<b>Figura 6-</b> Exemplificação de terpenos e terpenoides.....	18
<b>Figura 7-</b> Esquematisação do espectro eletromagnético.....	20
<b>Figura 8-</b> Vetor magnetização M. ....	22
<b>Figura 9-</b> Aumento do vetor magnetização no eixo z.....	22
<b>Figura 10-</b> Esquematisação do processo de relaxação longitudinal ( $T_1$ ).....	23
<b>Figura 11-</b> Mecanismo de relaxação transversal ( $T_2$ ). ....	23
<b>Figura 12-</b> Conversão do FID em função da frequência, através da transformada de Fourier.....	24
<b>Figura 13-</b> Estruturas químicas do TMS e TPS.....	25
<b>Figura 14-</b> Representação da sequência de pulso NOESY.....	27
<b>Figura 15-</b> Representação da redução da dimensionalidade dos dados através do binning. ....	29
<b>Figura 16-</b> Gráficos representativos para PCA. À direita, o gráfico de pesos; à esquerda, o gráfico de escores em função de PC1 e PC2. ....	32
<b>Figura 17-</b> Exemplos de dendogramas aglomerativos e divisivos para HCA. ....	34
<b>Figura 18-</b> Representação gráfica de um heatmap. ....	35
<b>Figura 19-</b> Recorte da matriz construída a partir das informações espectrais. ....	39
<b>Figura 20-</b> Espectros de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, DMSO- $d_6$ , NOESY) de amostras de extratos etanólicos de folhas de pitanga da classe G1 (acima) e classe G2 (abaixo). ...	41
<b>Figura 21-</b> Gráficos de escores (esquerda e direita) das amostras obtidos a partir dos dados espectrais normalizados. Em verde, temos as amostras da classe G2 e, em rosa, da classe G1.....	42
<b>Figura 22-</b> Biplot da PCA, mostrando as 25 variáveis mais importantes (maior peso) para os agrupamentos naturais observados. ....	42
<b>Figura 23-</b> Exemplos de compostos fenólicos.....	44
<b>Figura 24-</b> Análise hierárquica de Cluster (HCA) para os extratos de pitanga. ....	46
<b>Figura 25-</b> Heatmap com extratos de folhas de <i>Eugenia uniflora</i> L. ....	47
<b>Figura 26-</b> Exemplo de terpeno encontrado nas folhas de <i>Eugenia uniflora</i> L. ....	48

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	10
<b>2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b>	13
2.1 <i>EUGENIA UNIFLORA</i> L. (PITANGUEIRA)	13
2.1.1 POLIFENÓIS	15
2.1.2 TERPENOS	17
2.2. ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)	
2.2.1 PRINCÍPIOS BÁSICOS	19
2.2.2 RELAXAÇÃO LONGITUDINAL ( $T_1$ ) E RELAXAÇÃO TRANSVERSAL ( $T_2$ )	22
2.2.3 DECAIMENTO LIVRE DA INDUÇÃO (FID)	24
2.2.4 SEQUÊNCIAS DE PULSO: NOESY	26
2.3 METABOLÔMICA/METABONÔMICA	27
2.4 PROCESSAMENTO DOS ESPECTROS, CONSTRUÇÃO DA MATRIZ E PRÉ PROCESSAMENTO DOS DADOS	29
2.5 QUIMIOMETRIA	30
2.5.1 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA)	32
2.5.2 ANÁLISE DE CLUSTER HIERÁRQUICO (HCA) E <i>HEATMAP</i> (MAPA DE CALOR)	33
<b>3. HIPÓTESE</b>	36
<b>5. OBJETIVOS</b>	37
5.1 OBJETIVO GERAL	37
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
<b>6. MÉTODO</b>	38
6.1 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS	38
6.2 PREPARO DAS AMOSTRAS E OBTENÇÃO DOS ESPECTROS DE RMN $H^1$	38
6.3 PROCESSAMENTO DOS ESPECTROS E ANÁLISE QUIMIOMÉTRICA	38
<b>7. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	40
7.1 ESPECTROS DE RMN	40
7.2 ANÁLISES EXPLORATÓRIAS	41
7.2.1 PCA	41
7.2.2 HCA	45
7.2.3 <i>HEATMAP</i>	46
<b>8. CONCLUSÃO</b>	51
<b>9. PERSPECTIVAS</b>	53
<b>REFERÊNCIAS</b>	54
<b>APÊNDICE</b>	73

## 1. INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a proteção de conhecimentos tradicionais, como a utilização de plantas com finalidade medicinal, é uma prioridade global (WHO, 2024). Uma planta medicinal (PM) é aquela cuja totalidade ou alguma parte, possui substâncias com atividade terapêutica (Brasil, 2017), como a *Eugenia uniflora* L. (pitangueira), por exemplo. Corroborando com o que diz a OMS, Pedroso, Andrade e Pires (2021) destacam o crescente incentivo no uso dessas PM para o tratamento de diversas enfermidades. Patrício *et al.* (2022) e Ferreira *et al.* (2019) destacam que o uso de PM é histórico e advém do início da sociedade.

As PM são vistas como medicamentos alternativos, sendo comumente mais acessíveis que os remédios industrializados (Bortoluzzi, Schmitt e Mazur, 2019). De acordo com Sá-Filho *et al.* (2021), a ação biológica das PM geralmente advém dos metabólitos secundários, que segundo Borges e Amorim (2020) e Pilon *et al.* (2020) atuam na adaptação, sobrevivência e interação desses organismos com o ambiente.

Visto o grande potencial das PM, pode-se observar a exorbitante gama de trabalhos que buscam entender e estudar as propriedades desses produtos naturais. Rocha *et al.* (2021) trazem um histórico da utilização de PM, através de um levantamento bibliográfico; Castro e Figueiredo (2019) também fazem uma pesquisa bibliográfica, objetivando identificar o uso de PM no Sistema Único de Saúde (SUS) do Brasil; Amatto *et al.* (2024) fazem uma avaliação do uso de fitoterápicos no tratamento de dermatite atópica; Franco *et al.* (2025) apresentam os benefícios farmacológicos da *Genipa americana* L. por exemplo.

A *Eugenia uniflora* L., conhecida como pitangueira pertence a um dos gêneros mais importantes da família *Myrtaceae* (Cardoso *et al.* 2018). Do ponto de vista acadêmico, pode-se observar uma grande quantidade de pesquisas que apresentam os seus benefícios para a área da saúde, os quais estão diretamente ligadas aos seus constituintes químicos, advindos do metabolismo da pitangueira.

Borsoi *et al.* (2023) investigam o potencial antitumoral e o perfil fitoquímico de extratos das sementes e polpa dos frutos da pitangueira; Cipriano, Maia e Deschamps (2021) avaliaram a atividade antioxidante do óleo essencial da planta, a qual, segundo os autores, é fundamentalmente afetada pela composição do óleo; Sobeh *et al.* (2019) fazem uma investigação fitoquímica do extrato das folhas de pitangueira; Zanusso *et al.* (2023), realizaram experimentos buscando os constituintes fitoquímicos da planta, observando o quanto estes podem variar a depender dentre outras coisas, do método de extração.

Como descrito acima, diversas partes da pitangueira possuem propriedades farmacológicas e consequente interesse acadêmico. Nesse estudo, o foco da análise foram as folhas de *Eugenia uniflora* L., as quais, assim como as demais PM, podem apresentar variações nos seus metabólitos secundários devido as condições externas as quais são submetidas, como índice pluviométrico, idade da planta e sazonalidade, por exemplo (Fidelis *et al.* 2022).

Pereira, Monteiro e Siqueira (2023) e Gama *et al.* (2022) também apontam o quanto a época de coleta pode influenciar a composição metabólica da planta. Assim, torna-se necessário compreender os principais metabólitos e quais dentre estes, estão mais presentes ou com maior concentração na planta, observando assim, se há um agrupamento natural de amostras em função de determinada época do ano.

Para um efetivo estudo desses metabólitos, é imprescindível o uso da abordagem metabonômica, a qual pode fazer uma investigação dos metabolismos primários e secundários de um determinado organismo (Pilon *et al.* 2020). Essa abordagem está intimamente relacionada com a espectroscopia de Ressonância magnética nuclear (RMN) ou *nuclear magnetic resonance* (NMR), do inglês, a qual vêm sendo bastante empregada devido a sua reprodutibilidade e facilidade na preparação do conjunto de amostras (Markley *et al.*, 2017).

Dessa forma, a informação metabólica acerca dos constiuintes da *Eugenia uniflora* L. pode ser obtida por meio da espectroscopia de RMN. Zanusso *et al.* (2023) também apontam a RMN como promissora na identificação de metabólitos. Além disso, Pilon *et al.* (2020) ressaltam a aplicabilidade dessa técnica na análise simultânea de flavonoides e alcaloides (metabólitos secundários), por exemplo, e alguns açúcares e aminoácidos (metabólitos primários).

Todavia, apenas a obtenção desses espectros não é suficiente para indicar as diferenças ou similaridades metabólicas, pois geralmente as mudanças nos dados espectrais são muito sutis e necessitam do uso de ferramentas de estatística multivariada para a identificação de um padrão. Essa é uma característica dos estudos que investigam perturbações provocadas por agentes externos como patógenos (Batista *et al.*, 2018; Salles, 2023), exposição a métodos fitossanitários (Ribeiro *et al.*, 2014) ou climáticos (Colella *et al.*, 2022).

Em relação a análise metabólica de plantas, Augustijn, Groot e Alia (2021) e Pilon *et al.* (2020) apontam que, após a obtenção dos espectros, é necessário o processamento desses dados, por meio de técnicas quimiométricas, para que assim a informação

metabólica seja compreendida. Pontes *et al.* (2016) ressaltam a eficácia da RMN quando acoplada a técnicas quimiométricas, como PCA (*Principal Component Analysis*, do inglês) e PLS-DA (*Partial Least Squares Discriminant Analysis*, do inglês), por exemplo, na identificação de doenças em plantas.

Sendo assim, considerando que as técnicas quimiométricas são capazes de reduzir a dimensionalidade dos dados, deixando-os mais compreensíveis (Ferreira, 2015) torna-se essencial a sua utilização para compreensão das mudanças nas concentrações das principais classes de metabólitos presentes no extrato etanólico de folhas de *Eugenia uniflora* L., em função da época de coleta.

Existem diversos trabalhos que fazem uso de técnicas quimiométricas no estudo metabolômico de plantas, como o de Falco *et al.* (2022) que fazem a avaliação e comparação dos perfis metabólicos dos extratos de folhas de medronheiro, alfarroba, eucalipto, louro, hortelã-d'água, murta comum e alecrim, por exemplo, com espectrometria de massas e PCA; Lei *et al.* (2023) que trabalharam com o perfil metabólico de pós de batata e Lanzotti *et al.* (2022) que investigaram o perfil metabolômico da *Lactuca sativa* L. (alface) quando submetida a tratamentos orgânicos diversos, usando RMN e PCA.

Na quimiometria, existem diversos tipos de métodos, sejam eles supervisionados ou não supervisionados, uni ou multivariados, os quais, devem ser escolhidos de forma adequada (Ocampos *et al.*, 2024). Na análise de plantas, geralmente são utilizadas análises exploratórias não supervisionadas, como análise de componentes principais (ACP), *Principal component analysis* (PCA), do inglês, e análise hierárquica de cluster, *Hierarchical cluster analysis* (HCA), do inglês, o que é corroborado por Pilon *et al.* (2020). A HCA, comumente é combinada com o *Heatmap* (mapa de calor), pois sozinha não fornece informações relativas aos deslocamentos químicos (Lee *et al.*, 2016).

No entanto, técnicas supervisionadas, como LDA (análise discriminante linear) ou PLS-DA, também podem ser utilizadas (Ocampos *et al.*, 2024; Pilon *et al.*, 2020).

Sendo assim, o presente trabalho visa observar a existência de um agrupamento natural de amostras de extratos etanólicos das folhas de *Eugenia uniflora* L., através da análise metabonômica dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$ , observando os principais metabólitos envolvidos nessa distinção nas análises de PCA, HCA e *Heatmap*.

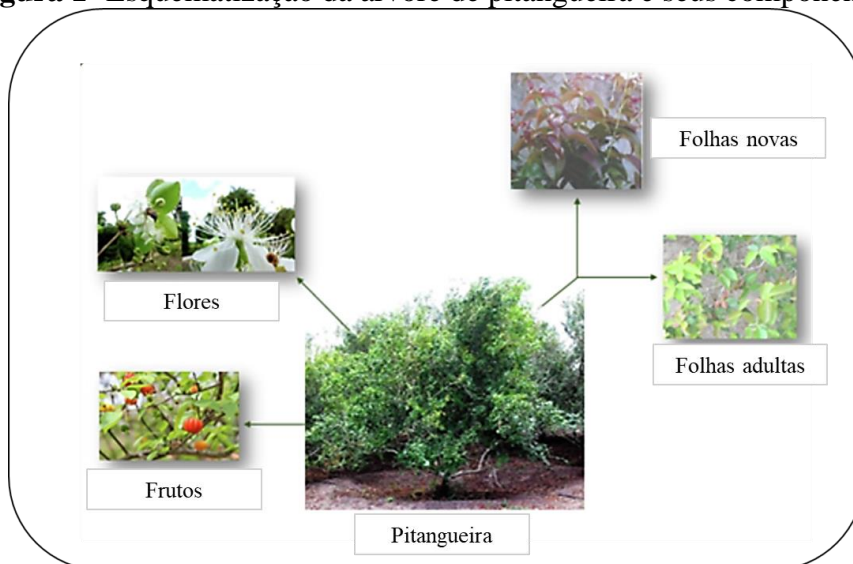
## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 *Eugenia uniflora* L. (PITANGUEIRA)

A utilização de plantas com finalidades medicinais data praticamente do início da sociedade. Segundo Fiuza *et al.* (2008) os índios guaranis do século XV já faziam uso da espécie *Eugenia* para tratamento de enfermidades. Do ponto de vista botânico, Fidelis *et al.* (2022) ressaltam que as plantas do gênero *Eugenia*, pertencem a família *Myrtaceae*, a qual está presente em praticamente todos os biomas brasileiros, sendo uma das angiospermas mais ricas do país (Amorim e Almeida Jr, 2021), se destacando como uma das principais famílias frutíferas da Terra (Farias *et al.*, 2020).

A *Eugenia uniflora* L., conhecida popularmente como pitangueira é uma das espécies de *Eugenia* que vêm sendo bastante estudada (Fidelis *et al.*, 2022), o que pode ser justificado pelo fato de estar incluída na lista de plantas com atividades medicinais de interesse do SUS (Sistema Único de Saúde) do Brasil (Souza *et al.*, 2022). Ela é uma árvore que mede entre dois e nove metros de altura (Fidelis *et al.*, 2022), possuindo folhas, flores e frutos (Figura 1). Suas folhas mudam de coloração a depender da idade, sendo inicialmente verdes-acastanhadas e verde escuras na fase adulta (Lorenzi, 1992) estas também são classificadas como opostas e simples (Lira Júnior *et al.*, 2007), enquanto as flores (cor branca) tendem a surgir quando a planta se aproxima do primeiro ano de vida.

**Figura 1-** Esquematização da árvore de pitangueira e seus componentes.



**Fonte:** Adaptado de Fidelis *et al.* (2022)

Os frutos, por sua vez, variam de acordo com o tempo de maturação, tanto na coloração, que pode ir do verde para laranja ou do vermelho para roxo escuro (Lira Júnior *et al.*, 2007), quanto nos constituintes químicos. Esses frutos, recebem a denominação de pitanga, nome originário da língua indígena tupi, o qual significa fruta vermelha escura

(Costa *et al.*, 2020).

Voltando nosso interesse para parte medicinal, diversos autores como Souza *et al.* (2022), Zanusso *et al.* (2023) e Gama *et al.* (2022) ressaltam as diferentes atividades atribuídas aos constituintes extraídos das folhas da pitangueira, como caráter anti-inflamatório e antimicrobiano, preparo de infusões com a finalidade de combater febre, cólica e até estímulo do fluxo menstrual. Sobeh *et al.* (2019) frisam a sua ação hipertensiva, analgésica e diurética, Bezerra *et al.* (2018) destacam a inibição de *Candida sp* a qual também foi evidenciada por Lima *et al.* (2006) contra *Candida k.*

A planta ainda pode ser utilizada na medicina popular contra dor de garganta, diarreia e tosse (Fidelis *et al.*, 2022). Chakravartula *et al.* (2020) e Fidelis *et al.* (2022) destacam o potencial antifúngico e antioxidante do extrato da folha da pitangueira, o que dá sentido as afirmações de Santos *et al.* (2023) que salientam os caracteres antioxidante e antifúngico como as atividades mais importantes desempenhados por essa planta, sendo que estes são conferidos pelos constituintes fitoquímicos que possuem.

A atividade medicinal atribuída a essa planta, de acordo com Pereira, Monteiro e Siqueira (2020) advém dos metabólitos secundários por ela produzidos. Souza *et al.* (2022), enfatizam que os principais metabólitos encontrados na *Eugenia Uniflora* L. foram flavonoides, taninos e terpenoides. Fiuza *et al.* (2008) relatam a presença de heterosídeos, saponinas e esteroides, por exemplo. Gama *et al.* (2020) corroboram com Souza *et al.* (2022) ressaltando flavonoides, como miricitrina e quercetina, além de terpenoides e taninos hidrolisáveis. Outros autores, como Santos *et al.* (2018) e Bezerra *et al.* (2018), relatam que a miricitrina é o principal composto marcador da existência de flavonoides, na planta.

Contudo, a presença e consequente eficácia desses metabólitos depende além da sazonalidade, como apontado por Fidelis *et al.* (2022), dos métodos de extração e das condições de coleta (Zanusso *et al.*, 2023). Isso pode ser comprovado observando resultados da literatura que apontam diferentes constituintes químicos a depender do tipo de extração realizado com as folhas da planta. Pereira, Monteiro e Siqueira (2023) salientam a presença de flavonoides como miricitrina e quercetina no extrato hidroalcoólico, ao passo que Zanusso *et al.* (2023) apontam a detecção de elagitinos no extrato aquoso e a presença de taninos e alcaloides na fração etanólica. Gama *et al.* (2022) também encontraram flavonoides e outros compostos fenólicos no extrato hidroalcoólico. Como o presente estudo, está focado nos extratos etanólicos da folha da pitangueira, é importante entender sobre os seus principais constituintes. Dado que todos os extratos na

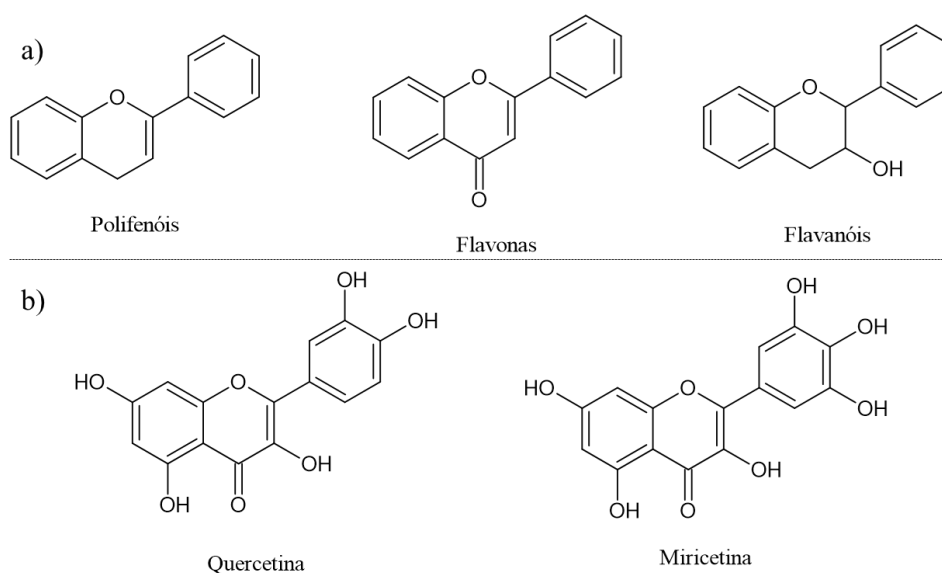


literatura, obtiveram como resultado a presença de polifenóis, este são de importante compreensão para esse trabalho.

### 2.1.1 Polifenóis

Os polifenóis (PF) são compostos de interesse de diversas áreas, sobretudo da farmacêutica, devido seu caráter antioxidante (Pereira, 2019). Eles são grupos de moléculas sintetizados por plantas, tendo a presença de anéis aromáticos com hidroxilas, em sua estrutura (Figura 2a). Podem ser classificados a depender da quantidade desses anéis e dos elementos estruturais que os ligam em: flavonoides, ácidos fenólicos, lignanas, taninos e estilbernos (Lôbo, Silva e Menezes, 2020).

**Figura 2-** a) Estrutura básica dos polifenóis, que diferem em função dos substituintes oxigenados. b) Estrutura de dois polifenóis frequentemente relatados em estudos com folhas de pitanga (*Eugenia uniflora* L.)



**Fonte:** Autor (2025).

Dentre os polifenóis apresentados na figura acima, destacam-se as estruturas da Figura 2b, referentes a quercetina e miricetina, relatados como presentes em extratos de folhas de *Eugenia uniflora* L. (Falcão *et al.*, 2018 e Rattmann *et al.*, 2012). Outros compostos, como a miricitrina, derivado da estrutura da miricetina (apresentada na Figura 2b) foram apresentados como majoritários nas folhas de pitangueira (Tenório *et al.*, 2024). No espectro de RMN, esses compostos apresentam deslocamentos químicos na região de aromáticos, em torno de  $\delta$  7,00 ppm, (Pavia *et al.*, 2015).

Dentre esses, destacam-se os flavonoides, que de acordo com testes de Zanusso *et al.* (2023) apresentaram resultado positivo nos extratos hidroalcóolicos da pitangueira. Estes, são compostos heterocíclicos que apresentam dois anéis aromáticos ligados por um

anel pirano (Silva *et al.*, 2020). Podem ser subdivididos em flavonas, flavononas, flavonóis, catequinas, antocianinas e isoflavonas, tendo como exemplo, a apigenina, hesperitina, quercetina, epicatequina, cianina e genisteína, respectivamente (Hoffmann-Ribani e Rodriguez-Amaya, 2008).

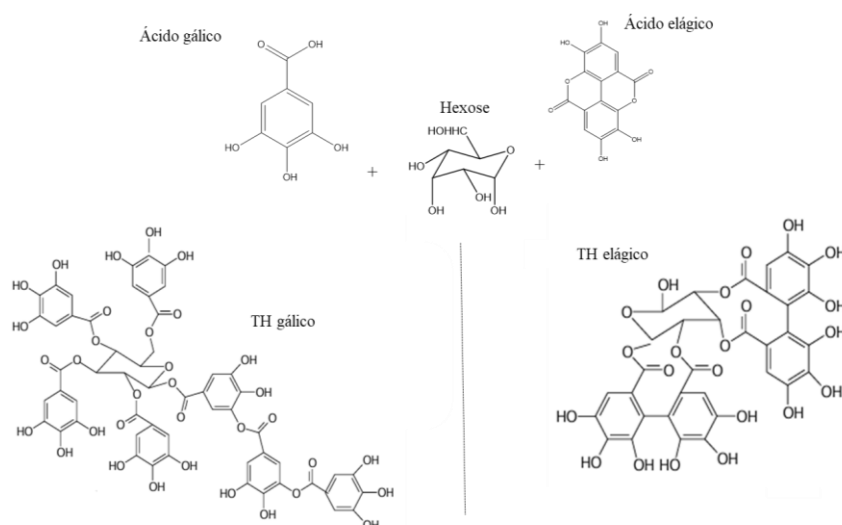
Ainda de acordo com Zanusso *et al.* (2023), as classes de flavonoides encontradas nas folhas da referida planta, foram flavanonas e flavonóis. Pereira, Monteiro e Siqueira (2020), por sua vez, relataram a presença de miricetina e quercetina, pertencentes a família dos flavonóis.

Essa subdivisão depende da posição dos substituintes nos anéis e da natureza química. Dentre estas, existem seis mais importantes: flavonas, flavonóis, flavanonas, chalconas, flavan-3-ol, ressaltando que nessa classificação estão contidas também isoflavonoides os quais juntamente com os “originais” são responsáveis pelo caráter antimicrobiano (Silva *et al.*, 2020; Hendrich, 2006). Diversos autores, como Silva *et al.* (2020), Simões *et al.* (2010), Valencia (2020) e Li *et al.* (2018) destacam as diversas atividades biológicas desempenhadas por esses compostos, como antialérgica, anticarcinogénica, anti-inflamatória, antibacteriana, dentre outras. Assim, torna-se evidente a importância da determinação da presença e identificação desses compostos, a qual pode ser realizada por meio da espectroscopia de ressonância magnética nuclear (Silva *et al.*, 2020).

Outra classe importante de polifenóis que desempenham inúmeras atividades biológicas, são os taninos. Estes constituem um grupo de compostos de alta massa molar, cuja estrutura é representada pela presença de compostos fenólicos heterogêneos (Tontini *et al.*, 2021). Segundo Vieira *et al.* (2020) e Tontini *et al.* (2021), essa categoria de polifenóis pode ser dividida em condensados e hidrolisáveis.

Estruturalmente, os taninos hidrolisáveis (TH) são constituídos por uma parte fenólica, constituída pelo ácido gálico ou elágico e uma unidade de hexose (açúcar) (Figura 3). Sua síntese, ocorre por meio do ácido chiquímico, na qual o açúcar sofre esterificação com os monômeros desses ácidos (Bezerra, 2016; Vieira *et al.*, 2020). Essa classe de taninos é de suma importância para esse trabalho, dado que a presença destes foi confirmada por testes fitoquímicos realizados por Zanusso *et al.* (2023).

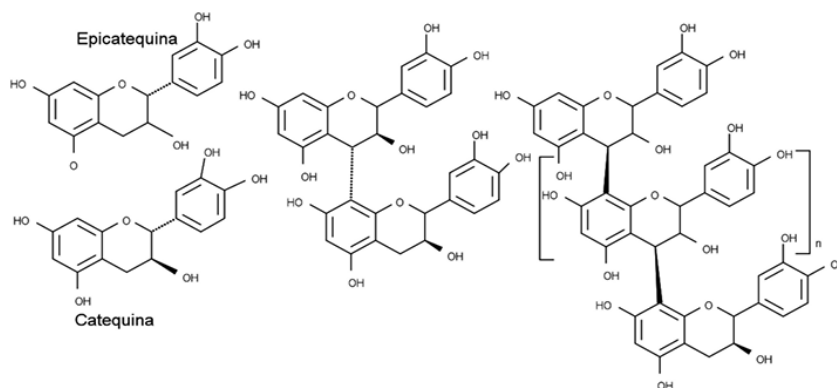
**Figura 3-**Exemplificação da formação de Taninos hidrolisáveis gálico e elágico.



**Fonte:** Adaptado de Bezerra (2016).

A outra classe de taninos, denominada de condensados, são polímeros naturais, formados pela condensação de procianidinas condensadas (flavonoides), como a catequina e epicatequina, por exemplo (Santiago *et al.*, 2020). Isso pode ser visualizado, na Figura 4.

**Figura 4-**Estrutura de taninos condensados.



**Fonte:** Bezerra (2016).

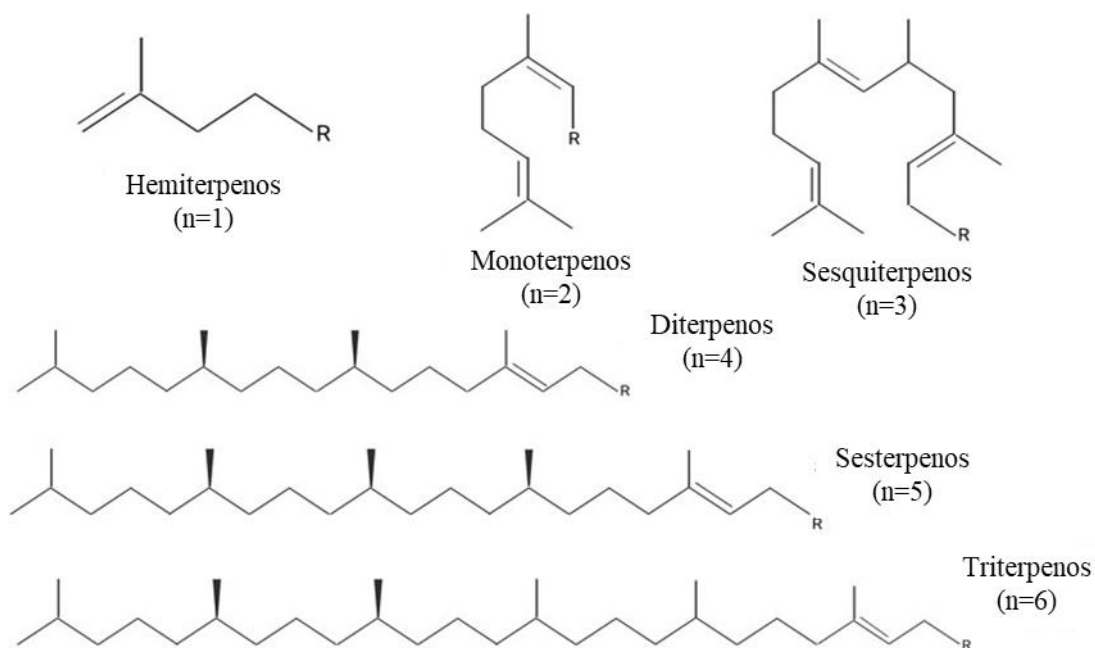
Esse tipo de polifenóis também pode ser identificado por meio da espectroscopia de ressonância magnética nuclear. Seus deslocamentos químicos (no RMN de  $^1\text{H}$ ) referentes aos anéis aromáticos, se encontram por volta de  $\delta$  7,00 ppm, enquanto as hidroxilas são observadas acima de  $\delta$  10,0 ppm (Pavia *et al.*, 2015). No entanto, se a água estiver presente no meio, os sinais de hidroxila podem ser suprimidos do espectro.

### 2.1.2 Terpenos

Outra classe de metabólitos comumente relatada nas amostras de pitanga são os terpenos (Meira *et al.*, 2020). Segundo Cox-Georgian *et al.* (2019) e Li *et al.* (2023) s

terpenos são os metabólitos secundários com maior abundância em plantas, possuindo assim a maior diversidade de componentes. Estruturalmente, eles são formados por uma ou mais unidades de 5 carbonos, as quais formam o hidrocarboneto isopreno. O número de unidades de isopreno é o que classifica o terpeno em sesquiterpenos, monoterpênos, diterpenos, triterpenos etc. (Li *et al.*, 2023) (Figura 5).

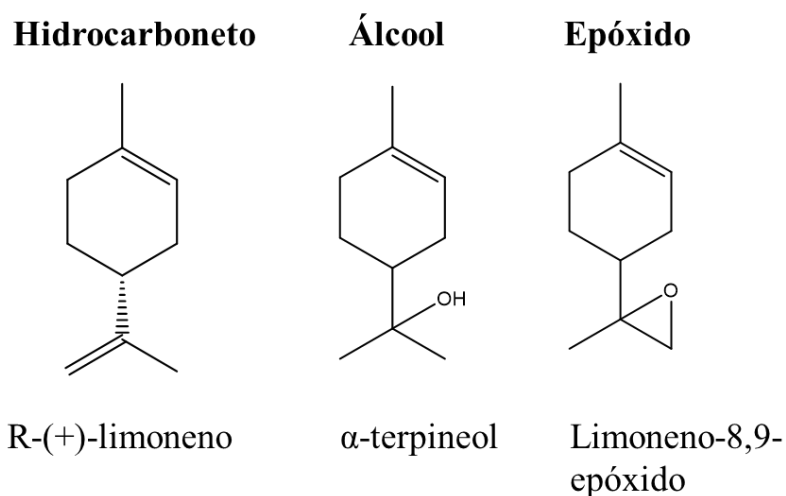
**Figura 5-** Classificação de terpenos.



**Fonte:** Adaptado de Del Prado-Audelo *et al.* (2021).

Contudo, de acordo com Del Prado-Audelo *et al.* (2021) os terpenos também podem ser denominados de terpenoides, quando possuem heteroátomos formando álcoois, aldeídos e cetonas, na sua estrutura (Figura 6).

**Figura 6-** Exemplificação de terpenos e terpenoides.



**Fonte:** Adaptado de Felipe e Bicas (2016).

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , essas espécies apresentam sinais olefínicos (entre  $\delta$  5,5 e 6,5 ppm) e alifáticos, com deslocamentos em torno de  $\delta$  0,8 a 1,5 ppm (Pavia *et al.* 2015), sendo que os últimos são majoritários, nos espectros analisados.

Li *et al.* (2023) reforçam a importância de mono ( $\text{C}_{10}\text{H}_{16}$ ) e sesquiterpenos ( $\text{C}_{15}\text{H}_{24}$ ) na interação e defesa das plantas, apontando o uso de terpenos como uma forma sustentável de controles de pragas. Do ponto de vista farmacológico, Cox-Georgian *et al.* (2019) ressaltam os terpenos como promissores na ação antiviral, anticancerígena, antidiabética e até antiplasmodial, tendo ação antimalárica.

Uma classe de terpenos também estudada em larga escala são os homólogos de terpenos como o DMNT (8-dimetilnona-1,3,7-trieno) e o TMTT (4,8,12-trimetiltrideca-1,3,7,11-tetraeno) que atuam na defesa contra pragas, atraindo seus inimigos naturais (Li *et al.*, 2023). A denominação homólogo se refere ao fato destes terem uma estrutura química com bastante semelhança dos terpenos convencionais (Huang *et al.*, 2021).

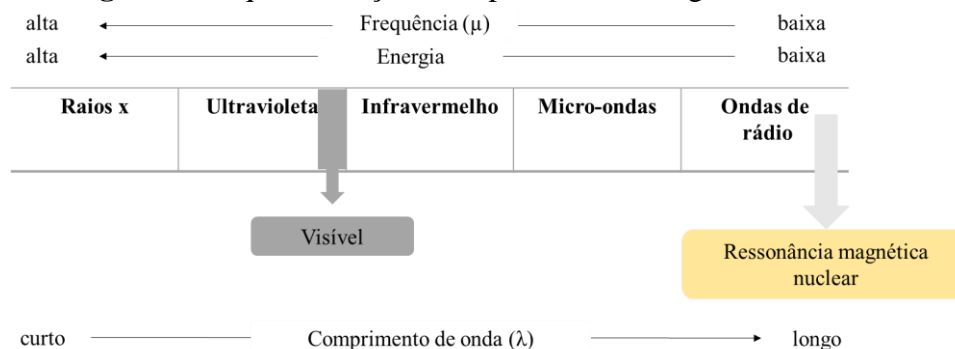
Por estarem entre os metabólitos secundários, os terpenos também podem ser identificados por meio de RMN e metabolômica.

## 2.2. ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

### 2.2.1 Princípios básicos

A espectroscopia é uma técnica que consiste na interação da radiação eletromagnética com a matéria, esse fenômeno pode ocorrer quando matéria e componente elétrica interagem (o que acontece nas espectroscopias de infravermelho e ultravioleta, por exemplo) ou quando o contato é feito entre a matéria e a componente magnética, o que é característico da espectroscopia de Ressonância Magnética nuclear (RMN) (Pavia *et al.* 2015). De acordo com Ross *et al.* (2007) o fenômeno de ressonância magnética nuclear foi descoberto por volta de 1940, sendo que o espectrômetro de RMN foi inventado na década de 50, na qual o primeiro espectrômetro comercial foi desenvolvido (Morris, 2019).

Para Shriver e Atkins (2006), esse é o método espectroscópico mais utilizado na elucidação de estruturas moleculares de líquidos puros ou soluções. Dentro do espectro de radiação eletromagnética (Figura 7), a RMN está na faixa das ondas de rádio (Pavia *et al.*, 2010), com comprimentos de onda ( $\lambda$ )  $> 10$  cm, em lado oposto aos raios gama, que tem alto poder de penetração, podendo causar maiores danos aos seres vivos (Alharshan *et al.*, 2024). Essa oposição aos raios gama é algo que também pode justificar a grande utilização da ressonância magnética, por parte das ciências, na área médica (Ross *et al.*, 2007).

**Figura 7-** Esquematisação do espectro eletromagnético.

**Fonte:** Adaptado de Pavia *et al.* (2010).

Essa técnica fundamenta-se na interação do momento magnético de vários núcleos atômicos, com um campo magnético externo ( $B_0$ ), esse momento magnético, é dependente do spin nuclear, que pode assumir valores distintos (Mlynarik, 2017).

Para que uma técnica espectroscópica seja possível, é necessário que haja transição entre níveis energéticos distintos. No caso da RMN, essa condição só é observada quando o núcleo tem spin ( $I$ ) diferente de zero, o que só acontece quando o núcleo atômico possui número de prótons ou nêutrons ímpares (Mlynarik, 2017). Essa afirmação justifica o fato do Carbono 12 ( $^{12}\text{C}$ ) não ter seu núcleo ativo em ressonância, pois este possui tanto o número de nêutrons quanto o de prótons pares, resultando em spin =0 (Dieguez *et al.*, 2018). Contudo, devido a relevância desse elemento, utiliza-se seu isótopo o Carbono 13 ( $^{13}\text{C}$ ), que tem momento magnético diferente de zero. Isso pode ser visualizado na Tabela 1, juntamente com outros núcleos amplamente estudados na ressonância. (Shriver e Atkins; 2006).

**Tabela 1-** Abundância isotópica e propriedades magnéticas de alguns núcleos importantes na espectroscopia de RMN.

	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{31}\text{P}$	$^{23}\text{Na}$	$^{17}\text{O}$	$^{19}\text{F}$
<b><math>I</math></b>	$1/2$	$1/2$	$1/2$	$3/2$	$5/2$	$1/2$
<b>Abundância (%)</b>	1,11	99,98	100	100	0,037	100
<b>Sensibilidade</b>	1,00	5680	377	525	0,0611	4730
<b>Constante magnetogirica (MHz/T)</b>	10,7	42,6	17,2	11,3	-5,8	40,1

**Fonte:** Adaptado de Pavia *et al.* (2010); Shriver e Atkins (2006).

A abundância natural do isótopo e seu momento magnético estão intrinsecamente relacionados com a sensibilidade do RMN, pois como enfatizam Shriver e Atkins (2006), átomos cujo isótopo mais abundante tem atividade na ressonância, como por exemplo o  $^1\text{H}$  são mais fáceis/sensíveis de observar. Isso está intimamente relacionado à abundância

do isótopo (99,98%), ao spin nuclear (1/2) e a constante magnetogírica ( $\gamma$ ), que no caso do  $^1\text{H}$ , é a maior constante magnetogírica conhecida.

Um tópico importante a ser falado sobre esses núcleos atômicos é a constante magnetogírica ( $\gamma$ ), uma constante física que é numericamente proporcional a razão entre o momento magnético ( $\mu$ ) e o momento angular ( $I$ ), o que pode ser visualizado na equação 1, onde  $h$  é a constante de Planck (Shriver e Atkins, 2006). Quanto maior a razão magnetogírica, maior será o momento magnético do núcleo.

$$\mu = \frac{h\gamma I}{2\pi} \quad (1)$$

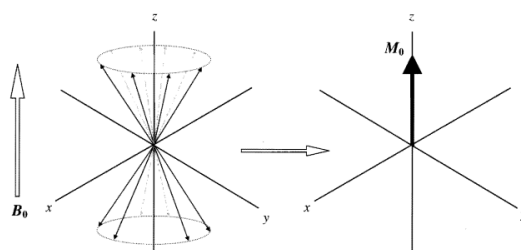
Para um núcleo com spin  $I$ , existem  $2I+1$  estados de spin, que vão de  $+I$  a  $-I$  (Shriver e Atkins, 2006). Assim, se  $I=1/2$ , o número de estados possíveis será igual a 2, denominados de  $\alpha$  e  $\beta$ , nos quais o estado alinhado com o campo aplicado ( $B_0$ ) tem menor energia e o que está oposto ao campo tem maior energia (Pavia *et al.*, 2010). A diferença de energia entre esses dois estados é dependente do ( $B_0$ ), conforme a equação 2.

$$\Delta E = \frac{h\gamma B_0}{2\pi} \quad (2)$$

Ao relacionarmos a equação 2 com a equação 1, temos a equação fundamental da ressonância (equação 3, onde  $\nu$  é a frequência).

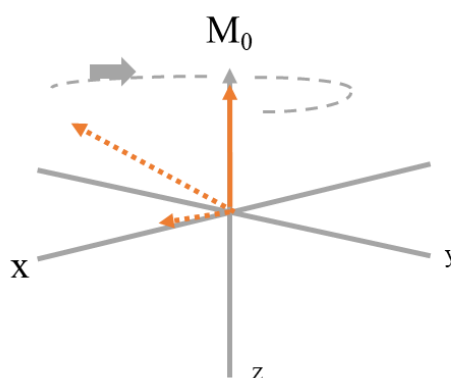
$$\Delta E = h\nu \rightarrow h\nu = \frac{h\gamma B_0}{2\pi} \rightarrow \nu = \frac{\gamma B_0}{2\pi} \quad (3)$$

Na ressonância são aplicados pulsos de radiofrequência, cuja função é excitar os núcleos magnéticos da espécie, mudando a população nos estados de spins (níveis energéticos). Após a interrupção do pulso de RF, inicia-se o processo de relaxação, visando o restabelecimento da condição inicial (Pavia *et al.*, 2010). A magnetização desses núcleos pode ser representada pelo vetor magnetização ( $M$ ) que é a soma de todos os spins individuais e está na mesma direção que o campo magnético aplicado no eixo  $z$  (Figura 8).

**Figura 8-** Vetor magnetização  $M$ .

**Fonte:** Silverstein, Webster e Kiemle (2005).

O pulso ou sequência de pulsos, pode ser aplicado nos eixos  $x$  ou  $y$ , o que ocasiona uma rotação do vetor magnetização para o plano  $(xy)$ , gerando o sinal (Pavia *et al.*, 2010). Quando o estímulo (pulso) cessa, os núcleos começam a perder energia e relaxar, fazendo com que o “sistema” volte ao estado inicial, no qual ocorre a diminuição do vetor no plano  $xy$  e aumento deste no eixo  $z$  (Figura 9).

**Figura 9-** Aumento do vetor magnetização no eixo  $z$ .

**Fonte:** Autor (2024).

Esse processo de relaxação, que ocasiona a diminuição do vetor no plano  $xy$  é denominado de tempo de relaxamento transversal ( $T_2$ ), enquanto o aumento do vetor no eixo  $z$  é denominado de relaxação longitudinal ( $T_1$ ) (Mlynarik, 2017). Para Cowan (1997)  $T_1$  e  $T_2$  dependem fisicamente da mobilidade e interação magnética entre os spins e essa mobilidade é totalmente influenciada pela viscosidade, temperatura e presença de moléculas grandes (Castellano e Salmon, 2019).

### 2.2.2 Relaxação longitudinal ( $T_1$ ) e relaxação transversal ( $T_2$ )

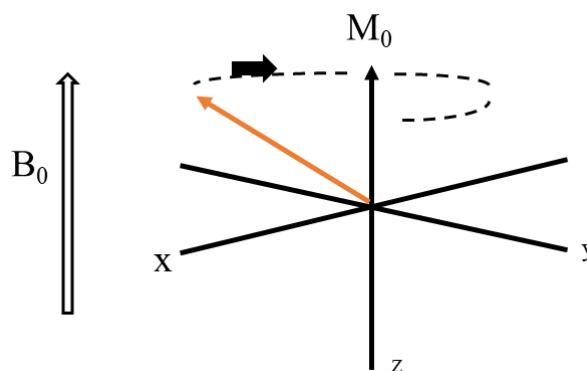
O vetor magnetização pode ser decomposto em dois vetores, que são as componentes no plano  $xy$  e a componente no eixo  $z$ . Como mencionado anteriormente, a relaxação ocorre depois da aplicação de um pulso de radiofrequência (RF), pois antes disso, a componente no eixo  $z$  tem valor máximo e a componente no plano  $xy$  é igual a zero (Alcântara *et al.*, 2019).



Após a aplicação de um pulso de RF de  $90^\circ$ , por exemplo, a componente em  $z$  passa a ser zero e a componente no plano  $xy$  tem valor máximo. O processo de relaxação inicia-se após a aplicação do pulso de RF e o tempo necessário para a componente do eixo  $z$  voltar ao valor inicial é chamado de Tempo de Relaxação Longitudinal ( $T_1$ ) (Alcântara *et al.*, 2019).

Castellano e Salmon (2019) ainda afirmam que  $T_1$  é conhecida como relaxação *spin-rede* pois envolve a interação entre os spins excitados e o meio (rede). Na Figura 10, é mostrado o processo de relaxação longitudinal, no qual ocorre aumento do vetor no eixo  $Z$ .

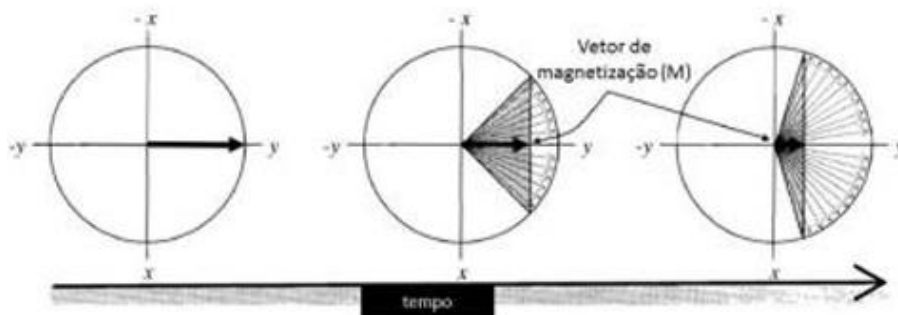
**Figura 10**-Esquemática do processo de relaxação longitudinal ( $T_1$ ).



**Fonte:** Autor (2024).

A relaxação transversal ( $T_2$ ) também advém após a aplicação do pulso de RF, sendo que se refere a perda de energia e consequente diminuição do vetor no plano  $xy$  (Alcântara *et al.*, 2019). Esse tipo de relaxação é denominado de *spin-spin* porque ocorre entre os próprios spins dos núcleos (spins vizinhos). (Castellano e Salmon, 2019) e pode ser visualizado na Figura 11.

**Figura 11**- Mecanismo de relaxação transversal ( $T_2$ ).



**Fonte:** Adaptado de Keeler (2002).

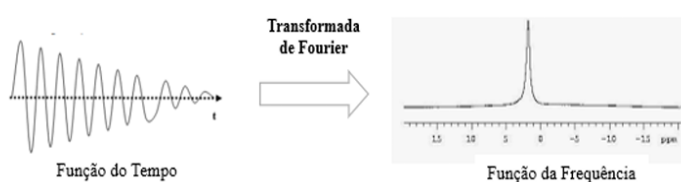
Segundo Almeida (2014)  $T_2$  ocasiona uma perda de coerência entre os núcleos, trazendo um alargamento dos picos e perda de sinal. O autor ainda enfatiza que ambos os processos de relaxação acontecem de forma paralela. Isso corrobora com o que dizem Castellano e Salmon (2019) sobre a diferença entre esses mecanismos.

### 2.2.3 Decaimento livre da indução (FID)

O sinal de RMN é obtido no plano xy a partir da corrente elétrica que é induzida pelo vetor magnetização neste plano. Como a intensidade da componente no plano xy diminui ao longo do tempo, a intensidade da corrente elétrica também diminui e portanto, o sinal de RMN também diminui. Esse fenômeno é chamado de Decaimento Livre da Indução (FID, do inglês Free Induction Decay) (Alcântara *et al.* 2019). Assim, pode-se dizer que os tempos de relaxação interferem diretamente no decaimento do FID (Conalogo e Andrade, 2016).

O FID é obtido após a aplicação de um pulso de RF de  $90^\circ$ , o qual causa a diferença de população entre os estados de spin. A frequência de Larmor é a frequência associada à diferença de energia entre esses estados de spin. O restabelecimento da condição inicial se dá através do movimento de precessão, fazendo com que o sinal de RMN seja captado pela bobina receptora, que transmite o sinal elétrico (Alcântara *et al.* 2019). O sinal produzido inicialmente é dado em função do tempo e após aplicação da transformada de Fourier, passa a ser lido em função da frequência, como pode ser visualizado na Figura 12 (Forezi e Castelo-Branco, 2017).

**Figura 12**-Conversão do FID em função da frequência, através da transformada de Fourier.



**Fonte:** Adaptado de Salles (2023).

A Figura 12 apresenta o espectro obtido que, nesse caso, apresenta apenas um pico, todavia não é o que acontece na prática, pois cada núcleo “sente” a presença do campo magnético dos núcleos vizinhos (Silverstein, Webster e Kiemle, 2005). Isto significa que cada núcleo de  $^1\text{H}$ , por exemplo, é influenciado pelo ambiente químico no qual está inserido, apresentando sinais em posições diferentes, as quais estão de acordo com a blindagem e as nuvens eletrônicas, que dependem diretamente da vizinhança de cada núcleo. Desse modo, podemos observar a seguinte mudança na equação fundamental

da ressonância magnética nuclear (equação 4), na qual  $\sigma$  é a constante de blindagem (Silverstein, Webster e Kiemle, 2005).

$$\nu_{\text{eff}} = \frac{\gamma}{2\pi} B_0(1 - \sigma) \quad (4)$$

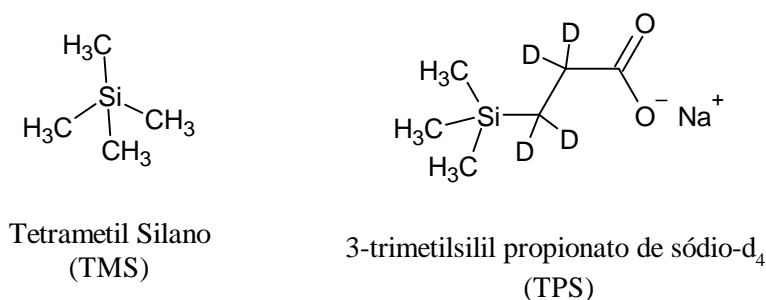
A Equação 4 indica que a frequência de ressonância efetiva ( $\nu_{\text{eff}}$ ) é diretamente proporcional ao campo externo ( $B_0$ ). Isso dificulta a comparação de dados espectrais obtidos em equipamento distintos. Por esse motivo, existe uma escala de referência que é independente do campo.

Essa escala é denominada de deslocamento químico ( $\delta$ ) e pode ser compreendida por meio da equação 5, onde  $\nu$  é a frequência do núcleo,  $\nu_{\text{ref}}$  é a frequência de referência e o fator  $10^6$  é necessário devido ao fato de a diferença entre as frequências (do núcleo e de referência) ser em hertz (Hz) e a frequência de Larmor ser expressa em megahertz (MHz). Isto faz com que o deslocamento químico seja dado em partes por milhão (ppm) (Gouveia, 2017).

$$\delta = \frac{\nu - \nu_{\text{Ref}}}{\nu_{\text{Ref}}} \times 10^6 \quad (5)$$

Para o RMN de  $^1\text{H}$ , existem sinais de referência amplamente utilizados, como o do tetrametilsilano (TMS) (Figura 13) empregado quando se têm solventes orgânicos e o sal de sódio do ácido 3-trimetilsilano propiônico- $\text{d}_4$  (TSP) (Figura 13), em soluções aquosas. Ambos com deslocamento químico em 0 ppm (Baddini, Neto e Teixeira, 2014), sendo que de acordo com Silverstein, Webster e Kiemle (2005) a leitura da escala espectral é sempre feita em ordem crescente, da direita para esquerda.

**Figura 13-** Estruturas químicas do TMS e TPS.



**Fonte:** Autor (2025).

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear é uma poderosa ferramenta de

elucidação estrutural, principalmente quando se trata da química orgânica (Pavia *et al.* 2015). Ademais, essa técnica também pode ser utilizada para identificação de mudanças em perfis metabólicos, como é o caso dessa pesquisa. Canuto *et al.* (2018) argumentam sobre a eficácia da RMN em estudos metabolômicos (por não ser uma análise destrutiva e precisar de um preparo amostral mínimo). Pilon *et al.* (2020) enfatizam sobre a capacidade da ressonância magnética nuclear em análises de metabólitos secundários, como flavonoides, por exemplo.

Contudo, na análise metabonômica é fundamental que a referida amostra, seja solubilizada em algum solvente deuterado, como clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ), água deuterada ( $\text{D}_2\text{O}$ ) ou dimetilsulfoxido ( $\text{DMSO-d}_6$ ) (Pilon *et al.*, 2020). Isso é necessário para evitar que o espectro fique ponderado pelos sinais do solvente.

Ademais, a presença de macromoléculas e água, dado que se tratam de amostras biológicas, torna imprescindível a otimização de parâmetros experimentais e sequências de pulso, com o intuito de suprimir esses sinais, obtendo assim informações espectrais mais “legíveis” (Pilon *et al.*, 2020). Uma das sequências de pulso recomendadas pela literatura para o estudo metabolômico de plantas é a NOESY que auxilia na determinação do perfil metabólico (Ocampos *et al.*, 2024).

#### **2.2.4 Sequências de pulso: NOESY**

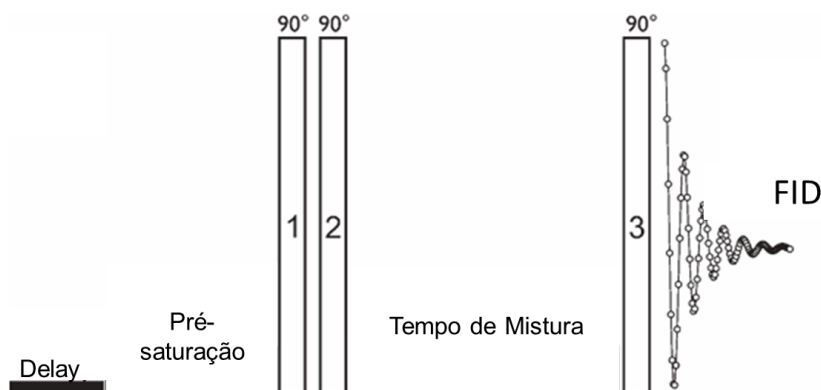
De acordo com Koos, Schulz e Gil (2020) o efeito nuclear Overhauser (NOE) é um fenômeno fundamental para análise em RMN, ocorrendo por meio do relaxamento que acontece numa interação dipolo-dipolo entre núcleos. Doost *et al.* (2019) ressalta que essa interação dipolo-dipolo não precisa necessariamente que os núcleos estejam ligados quimicamente, mas que tenham uma distância de até 5 Å (angstroms) entre si.

No NOE, a intensidade do sinal é afetada quando um núcleo vizinho, presente no mesmo espaço (numa distância de até 5 Å) é saturado (as populações do spin  $\alpha$  e  $\beta$  são igualadas) seletivamente (Pavia *et al.* 2010). Como a estabilidade foi alterada, as populações dos níveis de energia podem ser reestabelecidas, o que faz com que a população e intensidade de núcleos vizinhos seja alterada (Pavia *et al.* 2010).

No estudo aqui desenvolvido, são obtidos dados espectrais a partir de amostras de extrato hidroalcoólico de plantas, dissolvidos em  $\text{DMSO-d}_6$ . Então, é possível que sejam observados sinais de água, sugerindo a necessidade de usar uma sequência de pulsos com supressão do sinal da água. Ocampos *et al.* (2024) salientam que a sequência NOESY com supressão do sinal da água é a mais utilizada para obtenção de espectros desses

materiais. No experimento NOESY um pulso de radiofrequência de  $90^\circ$  ( $\pi/2$ ) é aplicado (fazendo com que o vetor magnetização se mova para o plano xy), logo depois o pulso de  $90^\circ$  é reaplicado no eixo z, gerando o efeito NOE durante o *mixing time* (tempo de mistura  $T_m$ ), por fim um terceiro pulso de  $90^\circ$  faz com que a magnetização volte para o plano xy e o sinal do FID é gerado (Mckay, 2011; Ocampos *et al.*, 2024). Um esquema representacional desse processo pode ser visualizado na Figura 14.

**Figura 14-**Representação da sequência de pulso NOESY.



**Fonte:** Adaptado de McKay (2011).

Entre uma e outra aquisição de FID é necessário que o equilíbrio seja reestabelecido, o que ocorre por meio de um tempo de espera  $d_1$  (*delay*). Esse  $d_1$  está relacionado proporcionalmente com o  $T_1$  (tempo de relaxação longitudinal) (Wieske e Érdelyi, 2021) e segundo Pellizzari *et al.* (2024) vem antes da pré-saturação do sinal, no caso da NOESY, como visualizado na Figura 14. Em estudos metabonômicos, o uso da sequência NOESY é recomendado para que sinais de água sejam suprimidos (Pilon *et al.* 2020).

### 2.3 METABOLÔMICA/METABONÔMICA

Segundo Canuto *et al.* (2018), existe um conjunto de ciências ômicas, as quais buscam entender as alterações biológicas e o funcionamento dos organismos. Dentre elas, estão a proteômica, que analisa as alterações protéicas; a transcriptômica, que analisa as mudanças nos transcritos; a genômica, que está interessada nas alterações dos genes e a metabolômica/metabonômica, que estuda as mudanças metabólicas.

No presente trabalho, nós investigamos a mudança no perfil de metabólitos contidos em extratos de planta em função da época de colheita, portanto, é necessário um breve entendimento sobre a definição de metabolômica. Assim, os metabólitos são produtos finais ou intermediários do sistema biológico, resultantes da resposta a mudança ambiental ou genética (Fiehn, 2002). A expressão metaboloma, segundo Oliver *et al.*

(1998), se refere a um conjunto de metabólitos com massa molecular de até 1500 Da (baixa).

Outrora o termo metabolômica é comumente associado como sinônimo de metabonômica, o que pode gerar confusões e dúvidas para estudantes do tema, assim torna-se necessário trazer definições para que o entendimento de ambos fique mais claro. Nicholson *et al.* (1999) definiram o termo metabonômica, partindo do grego *meta* e *nomos*, que significam alteração/mudança e regras ou leis, respectivamente. Portanto, para esses autores, metabonômica é a medida quantitativa da resposta metabólica multiparamétrica de seres vivos a estímulos fisiopatológicos ou modificação genética.

Por outro lado, o termo metabolômica foi concebido no final da década de 1990, sendo introduzido apenas em 2001 num artigo de Oliver Fiehn e colaboradores que demonstraram a aplicação do termo em plantas (Pilon *et al.*, 2020). Pilon *et al.* (2020) salientam que a metabolômica estabelece como ocorre o entendimento dos organismos por meio da análise de perfis metabólicos, além de que ela investiga de forma qualitativa e quantitativa os metabolismos primários e secundários de um sistema biológico.

Pilon *et al.* (2020) ainda afirmam que a metabolômica era dividida em estudos alvo, no qual os metabólitos eram analisados por meio da resposta a estímulos, e não-alvo, em que a análise era feita de forma indiscriminada, objetivando estudar todo o conjunto de substâncias, o que seria analiticamente muito complexo.

Dessa forma, a diferença entre os termos está no impacto da estratégia metodológica adotada. Enquanto a estratégia metabolômica visa a identificação e quantificação absoluta de todos os metabólitos presentes no metaboloma e as modificações produzidas por um agente externo, a metabonômica, objetiva identificar um perfil de metabólitos e sua associação com a perturbação provocada pelo agente externo, buscando um “padrão”. A necessidade de identificação e quantificação absoluta faz com que a estratégia metabolômica inclua o uso de uma técnica de separação de misturas, em geral, cromatografia em fase gasosa ou fase líquida, antes da técnica espectrométrica. Na estratégia metabonômica, não há necessidade do uso de técnicas de separação de misturas.

Nesse trabalho, iremos adotar a metabonômica baseada em RMN, uma vez que não buscamos a identificação e quantificação absoluta dos metabólitos, mas perseguimos a identificação de um padrão metabólico que esteja associado à ação de um agente externo. Com isso, a técnica espectrométrica é utilizada sem necessidade de uma corrida cromatográfica, simplificando a abordagem analítica.

O procedimento experimental dessas análises requer uma série de passos, como:

obtenção e preparo da amostra, aquisição dos espectros por RMN, processamento e tratamento dos dados (incluindo a transformação destes em uma matriz), pré processamento, análises quimiométricas e por fim identificação/classificação das amostras (Maimone *et al.*, 2024; Pilon *et al.*, 2020).

## 2.4 PROCESSAMENTO DOS ESPECTROS, CONSTRUÇÃO DA MATRIZ E PRÉ PROCESSAMENTO DOS DADOS

Posteriormente as aquisições espectrais, é necessário uma série de passos, para que os dados sejam transformados em matriz e assim sejam analisados. O processamento dos espectros é realizado por meio do *software* MestRenova.

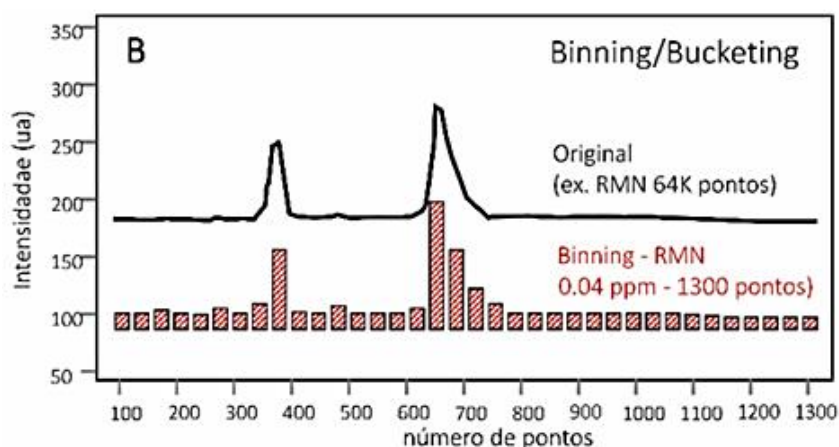
Comumente, nas informações espectrais estão contidas interferências como o deslocamento ou inclinação na linha de base, por exemplo (Ferreira, 2015). Assim, esse pré-tratamento dos dados é fundamental para que sejam eliminadas possíveis variações adquiridas na aquisição dos dados, as quais poderiam interferir negativamente nos resultados finais (Ferreira, 2015).

Dessa forma, no MestRenova, são corrigidos aspectos como fase e linha de base dos espectros. Segundo Pilon *et al.* (2020), o último é fundamental para corrigir distorções que poderiam afetar os resultados quimiométricos. Outra correção, que também é feita nesse *software* é o referenciamento, que consiste em “alinhar” o espectro de acordo com um sinal de referência, que pode ser o sinal residual do solvente deuterado utilizado, por exemplo. Esse referenciamento impede que os deslocamentos químicos apareçam em locais inadequados (Pilon *et al.*, 2020).

Ainda nesse programa, as informações espectrais são aprimoradas por meio da diminuição do ruído, as quais podem ser feitas pelo truncamento ou apodização (Pilon *et al.* 2020). Nesse trabalho, foi realizada a apodização na ordem de 0,3 Hz, a qual segundo Hoch e Stern (1996) consiste na multiplicação do FID por uma função, melhorando assim a razão sinal/ruído. Outrossim, para transformação das informações espectrais em matriz, foi realizado o *binning ou bucketing*, o qual tem a função de reduzir a dimensionalidade dos dados, por meio do agrupamento de faixas de deslocamento químico (Figura 15) (Craig *et al.* 2006; Pilon *et al.* 2020).

**Figura 15-**Representação da redução da dimensionalidade dos dados através do

*binning*.



Fonte: Pilon *et al.* (2020)

O tipo de tratamento depende do instrumento utilizado e do conjunto de amostras, pois em análises usando espectroscopia no infravermelho, por exemplo, geralmente é feita a redução da dimensionalidade dos dados, através da escolha de bandas específicas para análise (Butler *et al.*, 2018). No caso da espectroscopia de RMN, por mais que o *binning* reduza a dimensão de dados, como mencionado acima, não se escolhe um pico/banda específica (Ferreira, 2015).

Quando as informações espectrais são transformadas em matriz, são realizados outros tipos de processamento para que sejam feitas as modelagens. Nesse trabalho, essa etapa foi realizada usando o MetaboAnalyst 6.0 (Chong e Xia, 2020), que é uma plataforma online.

## 2.5 QUIMIOMETRIA

Diante da necessidade em tratar a avalanche de dados gerados pelas inovações nas técnicas de análises químicas, surgiu a Quimiometria, que é uma abordagem que utiliza ferramentas de análise multivariada aplicadas a dados químicos. De acordo com Ferreira (2015) a Quimiometria foi vista com o devido potencial apenas quando um grupo de cientistas publicaram uma sequência de artigos na *Analytical Chemistry* em 1969, ressaltando os métodos multivariados.

O termo, no entanto, foi utilizado pela primeira vez por volta de 1971 (Ferreira, 2015) por Svante Wold, considerado juntamente com Bruce Kowalski um dos fundadores da Quimiometria (Ferreira, 2022). Essa ciência multidisciplinar faz uso da matemática, computação e estatística para identificar e solucionar problemas químicos (Barros Neto, Scarminio e Bruns, 2006) intersectando assim a química, matemática e estatística (Ferreira, 2015).



No caso de amostras biológicas, as análises quimiométrica devem ser precedidas por algumas etapas que visam a correção de possíveis variações biológicas, que facilmente podem estar presentes em análise metabólica de plantas. A centralização dos dados na média e o escalamento são destacadas como práticas rotineiras na análise de metabólitos (Pilon *et al.*, 2020).

Todavia, esses autores (Pilon *et al.*, 2020) ressaltam que a centralização dos dados pode não ser suficiente na criação de modelos envolvendo metabólitos, pois dentre estes, os mais abundantes numa determinada amostra podem se sobressair. Assim, outras formas de normalização como o auto-escalamento, escalamento por pareto e escalamento por estabilidade de variável são recomendadas como técnicas complementares dentro de estudos metabolômicos (Sussulini, 2017). O escalamento tem a função de fazer com que todos os sinais da amostra tenham uma contribuição igualitária (tendo o mesmo “peso”).

Além disso, segundo Sussulini (2017) e Craig *et al.* (2006) também é necessária uma transformação dos dados, para que haja uma uniformização das várias fontes de ruído as quais os dados obtidos por RMN estão sujeitos. Isso pode ser feito por meio das transformações *glog* (apenas a variação biológica é considerada), *log* (os ruídos passam a ser aditivos) ou potência (há um efeito semelhante a transformação por *log*, mas a transformação é baseada em potenciações).

Voltando para o tratamento quimiométrico, de acordo com Souza e Poppi, (2012) este pode ser dividido em três grandes subáreas: calibração multivariada, planejamento de experimentos e reconhecimento de padrões. Sendo que o reconhecimento de padrões conforme afirma Ferreira (2022) foi a subárea que mais se desenvolveu, pois visa a identificação de falhas industriais, a origem desses industrializados e a identificação de metabólitos marcadores, sendo uma zona de grande vantagem tanto para o setor fabril como para as áreas de pesquisa em ciências exatas e saúde. Esse estudo foi realizado tendo como base essa subárea quimiométrica.

As análises quimiométricas podem ser classificadas em não supervisionadas, que buscam identificar um padrão, sem que haja necessidade de intervenção do analista, buscando semelhança entre os dados, identificando assim amostras anômalas; ou supervisionadas. Nas quais, o pesquisador usa uma variável de classe ou alguma informação de saída para modelar o conjunto de dados (Liu *et al.*, 2018; Pilon *et al.*, 2020).

Na análise de metabólitos de plantas, é necessária uma visão geral das flutuações metabólicas, para que assim os pontos discriminantes sejam identificados. Essa visão,

pode ser proporcionada pelos métodos não supervisionados, dentre os quais se destacam a Análise de Componentes Principais (PCA) e a Análise de Agrupamentos Hierárquicos (HCA) (Pilon *et al.*, 2020).

### 2.5.1 Análise de componentes principais (PCA)

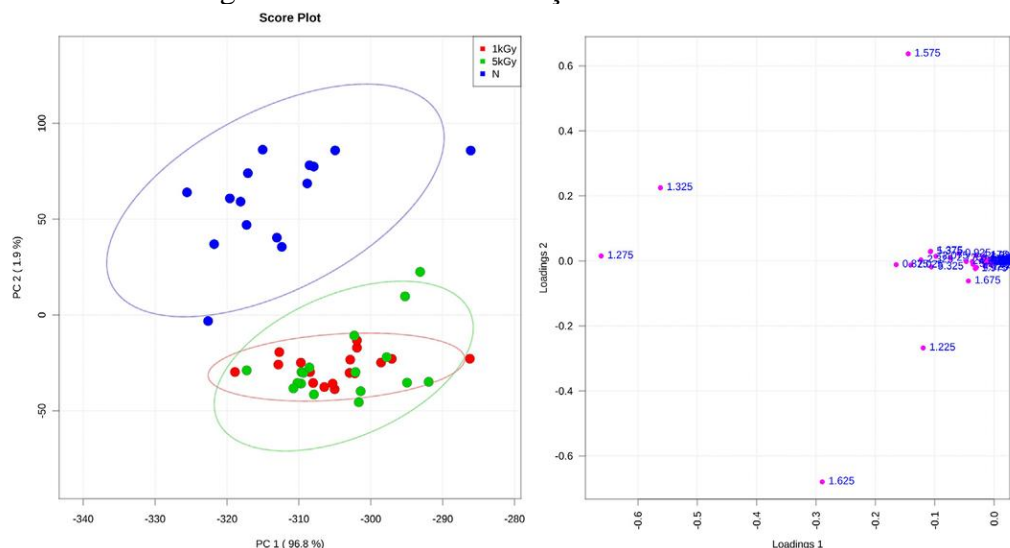
A análise de componentes principais (do inglês *Principal Component Analysis*, PCA) é a técnica mais antiga de análise multivariada (Mishra *et al.*, 2017) e visa catalogar as amostras e identificar a presença daquelas com comportamento anômalo (*outliers*) (Wu *et al.*, 1997). A PCA reduz a dimensionalidade da matriz de dados representando estes em eixos, chamados de componentes principais (PC), fazendo com que seja possível visualizar um grande volume de dados em poucas dimensões, algo que era almejado e necessário diante da crescente modernização (Mishra *et al.*, 2017).

Essa redução dimensional pode ser visualizada de forma bi ou tridimensional, por exemplo, na qual cada eixo é uma PC (Souza e Poppi, 2012). Como as componentes principais têm o intuito de estar na direção que explique a maior variância dos dados, a (PC1-primeira componente principal) contém ou explica a maior variância do conjunto de dados, seguida por PC2, PC3, etc. que têm variâncias decrescentes (Anowar, Sadaqui e Selim, 2021). Essas PCs são ortogonais entre si e juntas buscam explicar a maior variância do conjunto amostral (Granato *et al.*, 2018).

Durante a análise de componentes principais, a matriz de amostras original é decomposta em duas outras matrizes, sendo uma de *scores* ou escores (T) e a outra de *loadings* ou pesos (L) (Pilon *et al.* 2020). Nessa decomposição, enquanto os *scores* se referem as amostras, designando as semelhanças entre elas, os *loadings* apontam o quanto cada variável contribui para explicar aqueles dados específicos (Ferreira *et al.*, 2023). Então, os resultados de uma PCA são as projeções das amostras e das variáveis no sistema de coordenadas definido pelas componentes principais, gerando os gráficos de escores e de pesos, respectivamente. A análise desses resultados indica agrupamentos naturais e informa quais variáveis são importantes para esses agrupamentos. Eventualmente, as amostras podem se agrupar nas classes de interesse e podemos inferir quais variáveis estão associadas a essas classes. Por outro lado, o gráfico de escores pode indicar a presença de amostras anômalas. A Figura 16 apresenta um exemplo contendo os gráficos de escores e de *loadings*.

**Figura 16**-Gráficos representativos para PCA. À direita, o gráfico de pesos; à esquerda,

o gráfico de escores em função de PC1 e PC2.



Fonte: Ribeiro *et al.* (2014).

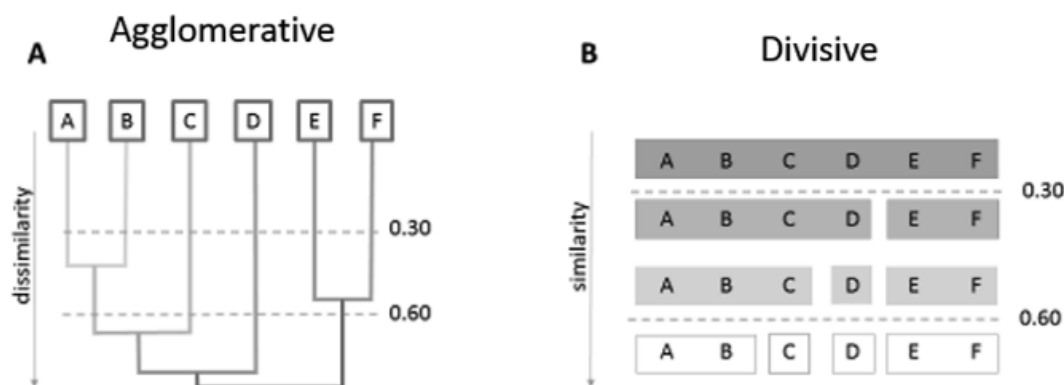
Outrora, também existem outras técnicas não supervisionadas que desempenham funções interessantes para o trabalho em questão, as quais são apontadas pela literatura como ferramentas quimiométricas de importância para o conjunto de metabólitos estudado, como a Análise de Cluster Hierárquica e o Heatmap (Lee *et al.*, 2016; Pilon *et al.*, 2020).

### 2.5.2 Análise de Cluster Hierárquico (HCA) e *Heatmap* (Mapa de Calor)

A Análise Hierárquica de Cluster, do inglês *hierarchical cluster analysis* (HCA) também se classifica como técnica de reconhecimento de padrões não supervisionados e tem se destacado na associação multivariada de bioativos (Granato *et al.*, 2018). É um método que busca organizar as amostras em grupos ou *clusters*, de forma hierárquica, em relação a sua similaridade (Silva *et al.* 2023).

Granato *et al.* (2018) ressaltam que os resultados dessa análise são apresentados em formas de dendogramas, os quais podem ser representados de forma aglomerativa, quando cada amostra é tida como um *cluster* (grupo), ou divisiva, no qual o grupo é obtido por meio da distância amostral e pela ligação entre esses grupos. Esses dois tipos de representação dependem do tipo de abordagem utilizada para modelar o conjunto de dados e podem ser visualizados na Figura 17.

**Figura 17**-Exemplos de dendogramas aglomerativos e divisivos para HCA.



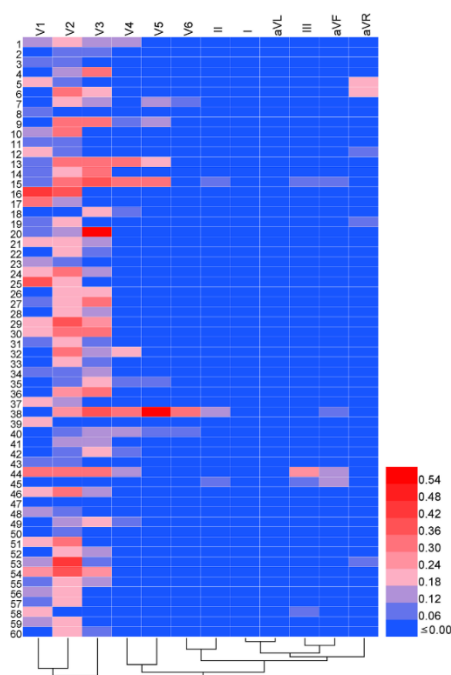
Fonte: Granato *et al.* (2018)

Todavia, Pilon *et al.* (2020) enfatizam que a determinação da distância (euclidiana ou mahalanobis, por exemplo) a ser utilizada para catalogação quanto à similaridade e o tipo de conexão amostral (ward, completo, médio, etc) são fundamentais, pois influenciam diretamente os resultados da análise. Os autores também salientam como o pré processamento de dados garante uma maior confiabilidade e precisão na HCA, ao indicarem a necessidade da redução de dados por *binning* (como já mencionado nesse texto).

A HCA é importante para esse trabalho porque vem sendo largamente utilizada na classificação de plantas, quanto ao seu perfil químico (Liu *et al.*, 2013). Contudo, essa análise apresenta a desvantagem de não indicar os sinais/deslocamentos químicos (Pilon *et al.*, 2020), no caso de RMN, dos metabólitos responsáveis pelo agrupamento das amostras, o que traz à tona a necessidade de utilizar outras análises combinadas a análise hierárquica de cluster, como a HCA bidimensional ou o *Heatmap*, o qual segundo Lee *et al.* (2016) tem sido comumente combinado com a HCA, podendo ser chamado de *clustergran*.

*Heatpmap* ou mapa de calor de acordo com Gu (2022) é um método de visualização de dados estatísticos que vem sendo bastante popularizado. Sua nomenclatura advém do fato da sua visualização/interpretação ser feita utilizando faixas de cor, nas quais a indicação de alta quantidade de metabólitos, por exemplo, é indicada pela cor vermelha, enquanto a baixa quantidade é representada pela cor azul ou esverdeada (Figura 18) (Wilkison e Friendly, 2009). Nesse tipo de representação, cada amostra é representada numa coluna de variáveis, de acordo com o bloco de cores, o qual como foi mencionado, vai se intensificando de acordo com a presença de determinada variável na amostra (Lee *et al.*, 2016).

**Figura 18-**Representação gráfica de um *heatmap*.



**Fonte:** Guo *et al.* (2020).

Segundo Wilkinson e Friendly (2009), o *heatmap* tem uma forma retangular, a qual tem árvores de *cluster* (como as visualizadas no HCA) acopladas as suas margens. Eisen *et al.* (1998) e Gu (2022) salientam que os mapas de calor tem sido um padrão no quesito de análise de dados ômicos, o que é corroborado por Weinsten (2008) que aponta a existência de cerca de 4 (quatro) mil publicações na área biológica ou biomédica, envolvendo esse tipo de representação. Buscas na Pubmed e no portal de periódico CAPES, mostraram respectivamente, cerca de 3.700 (United States [s.d]) e 6.600 (Brasil [20--]). resultados, para o termo *Heatmap*.

### **3. HIPÓTESE**

O emprego de ferramentas quimiométrica de reconhecimento de padrões a dados espectrais obtidos de extratos de folhas de pitanga é capaz de distinguir as amostras em função da sazonalidade.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 OBJETIVO GERAL**

Construir modelos metabonômicos capazes de distinguir/agrupar amostras de extrato etanólico de folhas de pitanga, de acordo com a sazonalidade.

### **5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Adquirir os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  a partir do extrato etanólico de folhas de pitanga, em DMSO- $\text{d}_6$ ;
- Selecionar métodos de análise multivariada que se adequem ao estudo realizado;
- Identificar as variáveis mais importantes para a discriminação das amostras.

## 6. MÉTODO

### 6.1 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

Os extratos etanólicos 50% das folhas de *Eugenia uniflora* L. (pitangueira) foram adquiridos do grupo do professor Luiz Soares do Laboratório de Farmacognosia, do departamento de Ciências Farmacêuticas da UFPE. A metodologia de obtenção pode ser encontrada em Tenório *et al.* (2024), a qual também indica que a região de coleta corresponde ao município do Paulista-PE.

### 6.2 PREPARO DAS AMOSTRAS E OBTENÇÃO DOS ESPECTROS DE RMN $^1\text{H}$

Foram pesados numa balança analítica, 20 mg de cada extrato, num tubo eppendorf, no qual se deu a solubilização com 600  $\mu\text{l}$  de DMSO- $\text{d}_6$ . A amostra então foi transferida para um tubo de RMN de 5mm de diâmetro interno. Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  foram obtidos usando as sequências de pulso NOESY, com pré-saturação do sinal da água em 3,56 ppm (sinal da água em DMSO), no espectrômetro *Bruker Avance* da Central Analítica do Departamento de Química Fundamental da UFPE, operando a 400 MHz e temperatura de 25°C. O sinal residual do DMSO- $\text{d}_6$ , em 2,5 ppm, foi utilizado como referência de deslocamento químico.

Ainda em relação aos parâmetros de aquisição, foram empregados: janela espectral de 13,8 ppm, tempo de espera (*delay*) de 3 segundos, tempo de aquisição de 2,94 s, pulso de RF de 90° e 128 repetições.

### 6.3 PROCESSAMENTO DOS ESPECTROS E ANÁLISE QUIMIOMÉTRICA

Os espectros foram processados usando apodização/*line broadening* igual a 0,3 Hz. no software MestreNova 12.0, no qual também foram corrigidos manualmente a linha de base e a fase, bem como o referenciamento do sinal do DMSO (em 2,5 ppm). Ainda nesse *software*, foi realizada o corte da região espectral de interesse, entre  $\delta$  7,5 e 0,5 ppm, sendo excluída a região entre 2,43 e 2,57 ppm, que contém o sinal residual do DMSO- $\text{d}_6$ . Por meio do *binning* a informação foi transformada em 1715 bins com largura de 0,004 ppm. Assim, foi construída uma matriz linha para cada amostra, as quais foram todas agrupadas em uma única matriz com 14 linhas (amostras) e 1716 variáveis (1715 bins mais a variável de classe), e esta matriz foi submetida à análise multivariada (Figura 19). As amostras foram a priori catalogadas em dois grupos, G1 (coletadas entre outubro e março) e G2 (coletadas entre abril e setembro).



**Figura 19-** Recorte da matriz construída a partir das informações espectrais.

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U
Title	Class	0,495	0,499001	0,503001	0,507002	0,511002	0,515003	0,519004	0,523004	0,527005	0,531005	0,535006	0,539006	0,543007	0,547007	0,551008	0,555009	0,559009	0,56301	0,56701
jan/20	1	0	512677	520645	533615	550188	572470	627828	666454	758420	854950	1,00E+06	1,46E+06	2,29E+06	1,47E+06	736126	609793	596374	622462	640000
ago/21	2	0	170846	184020	187683	212204	224506	270305	321510	413650	532572	828000	1,54E+06	2,73E+06	1,59E+06	634154	433002	351947	309755	340000
nov/19	1	0	873464	865332	879812	883969	890344	943425	958439	1,01E+06	1,03E+06	1,05E+06	1,14E+06	1,18E+06	1,03E+06	950831	971995	960396	1,00E+06	1,02E+06
dez/19	1	0	1,36E+06	1,36E+06	1,37E+06	1,39E+06	1,41E+06	1,45E+06	1,49E+06	1,55E+06	1,57E+06	1,58E+06	1,67E+06	1,67E+06	1,55E+06	1,51E+06	1,53E+06	1,54E+06	1,61E+06	1,63E+06
out/19	1	0	107159	119697	123580	98069,4	118290	127704	160277	209902	276783	265830	349474	435537	317020	209269	197136	178123	228733	270000
jun/20	2	0	-68358,2	-82464,3	-66200,2	-71738,9	-65751,6	-48592,3	-5317,5	40560,5	38876,4	57127,8	214029	469791	315883	36285,4	-23622,4	-30849,6	-7253,88	190000
2024	2	0	551236	554290	568171	586769	594322	622284	659147	734107	755079	780896	980737	1,21E+06	894592	641517	619415	633475	660234	680000
fev/19	1	0	846099	834881	847882	878632	875574	918864	955977	1,02E+06	1,03E+06	1,04E+06	1,20E+06	1,30E+06	1,10E+06	957964	958664	971791	1,03E+06	1,06E+06
jul/19	2	0	-83972,5	-78103,4	-63038,7	-58037,3	-54563,8	-16238,5	29191,9	94159,8	191741	326111	730813	1,51E+06	1,08E+06	314162	106928	54584,4	42256,2	690000
abr/19	2	818939	851723	870965	872846	930467	950857	1,03E+06	1,06E+06	1,10E+06	1,27E+06	1,47E+06	1,22E+06	978601	944144	971025	974991	1,05E+06	1,03E+06	1,06E+06
mai/19	2	0	108826	104196	99814,2	96771,4	94393,8	113707	123412	142637	144619	154517	215646	253235	190503	127343	125686	120781	145437	160000
ago/19	2	0	100569	117702	144688	187027	254763	376011	527324	811541	1,56E+06	2,87E+06	2,13E+06	756318	400181	266030	275780	287838	259638	280000
mar/21	1	0	659981	653074	681125	695369	711283	745822	779998	825396	899876	969596	847124	752868	733504	761881	790629	826466	805598	790000
mar/19	1	48647,4	77831,9	77945,2	88899,6	97713,7	136090	135429	198046	254630	185584	104582	86273,9	93136,9	101353	126698	138303	110546	132808	140000

**Fonte:** Autor (2025).

Posteriormente, a matriz foi transformada num arquivo csv e foi submetida à análise quimiométrica na plataforma online Metaboanalyst 6.0. Os dados foram normalizados pela soma, nas amostras, e autoescalados, nas variáveis, além de passarem pela transformação por *log* (indicada por Sussulini, 2017 e Pilon *et al.*, 2020 como passo importante para amenizar os efeitos de ruídos). A normalização e auto-escalamamento realizados, são fundamentais para “igualar” a importância das variáveis em cada amostra (Chong e Xia, 2020).

Foram realizadas as análises exploratórias não supervisionadas: Análise de componentes Principais (PCA), a análise hierárquica de *Cluster* (HCA), e HCA com *Heatmap*, com o intuito de observar se há agrupamento das amostras nas classes de interesse.

## 7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As amostras foram nomeadas conforme apresentadas na Tabela 2, considerando a época da coleta do material. A classificação quanto as classes (G1 e G2), foi feita de forma aleatória, dado que no Brasil não se têm estações do ano bem definidas, contudo é importante mencionar que os períodos mais frios ou mais quentes do ano, foram levados em consideração na classificação dos extratos em cada um dos grupos.

**Tabela 2-** Descrição das amostras quanto ao período de coleta e classificação a priori.

Mês/ano	Nome	Classe
Outubro 2019	S1	G1
Novembro 2019	S2	G1
Dezembro 2019	S3	G1
Janeiro 2020	S4	G1
Fevereiro 2019	S5	G1
Março 2021	S6	G1
Março 2019	S7	G1
Abril 2019	S8	G2
Maio 2019	S9	G2
Junho 2020	S10	G2
Julho 2019	S11	G2
Agosto 2019	S12	G2
Agosto 2021	S13	G2
2024*	S14	G2

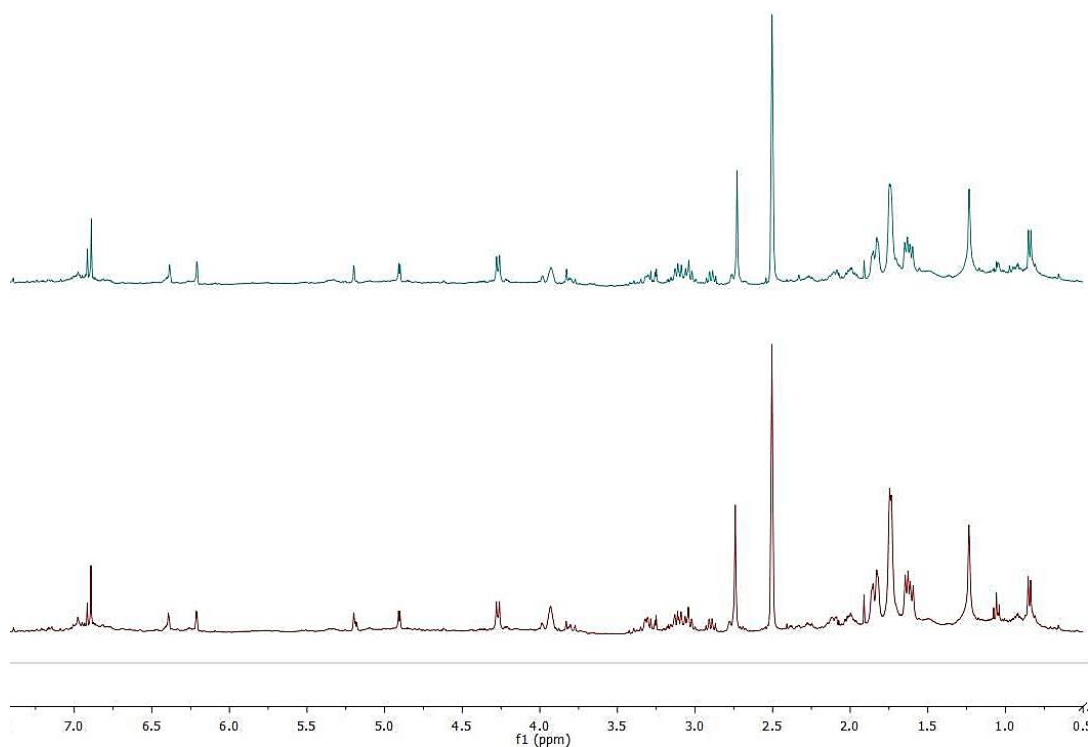
\* Para esta amostra, não temos informação do mês de coleta.

**Fonte:** Autor (2025).

### 7.1 ESPECTROS DE RMN

A Figura 20 apresenta dois típicos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  das amostras dos extratos das folhas de pitanga, sendo uma de cada grupo classificados previamente. Por meio da inspeção visual não é possível observar diferenças significativas entre os espectros, sendo assim uma análise quimiométrica torna-se fundamental para apontar as diferenças entre os grupos amostrais. Todavia, podemos definir algumas regiões espectrais importantes:  $\delta$  entre 8,0 e 6,0 ppm, onde são observados os sinais de grupos aromáticos;  $\delta$  entre 5,5 e 4,0 ppm, atribuída a grupos olefínicos;  $\delta$  entre 3,5 e 2,6 ppm, região de sinais carbinólicos; e  $\delta$  entre 2,0 e 0,5 ppm, região onde são observados os sinais de grupos alifáticos (Pavia *et al.*, 2015). O sinal residual de DMSO- $d_6$  é observado em  $\delta$  2,5 ppm, que é excluído na construção da matriz para tratamento quimiométrico.

**Figura 20-** Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ , NOESY) de amostras de extratos etanólicos de folhas de pitanga da classe G1 (acima) e classe G2 (abaixo).



**Fonte:** Autor (2025).

É importante ressaltar que foram realizados cortes espectrais das regiões que não serão utilizadas na modelagem.

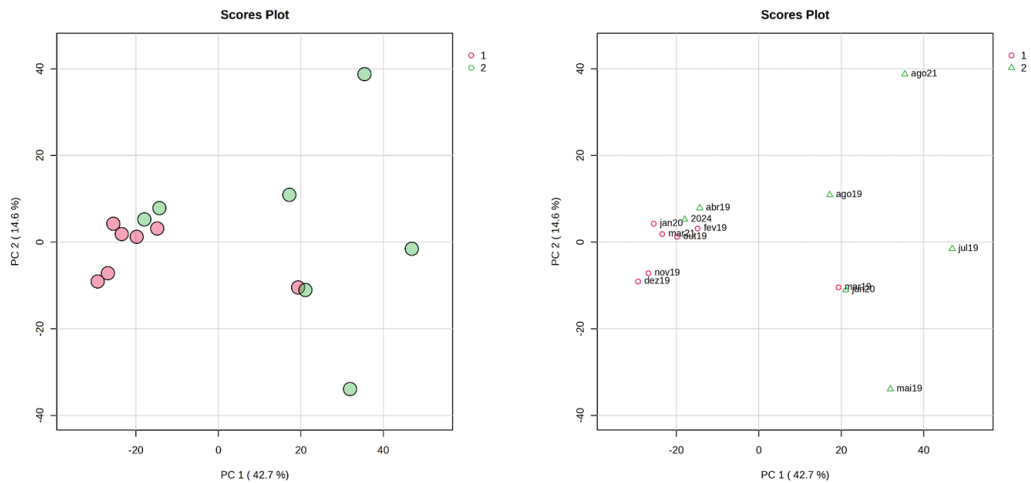
## 7.2 ANÁLISES EXPLORATÓRIAS

### 7.2.1 PCA

A primeira abordagem exploratória sempre é feita usando Análise de Componentes Principais. Por meio dessa análise, foi observada uma tendência de agrupamento das amostras em dois grupos, em PC1 (primeira componente principal), o que pode ser visualizado na Figura 21, que mostra os gráficos de escores e de loadings referente à PCA. As duas primeiras componentes explicam 57,3% da variância contida no conjunto de dados. As amostras do grupo G1 apresentam-se com baixa dispersão e escores negativos em PC1. Apenas uma amostra desse grupo apresentou escore positivo. Por outro lado, as amostras do grupo G2 apresentaram uma dispersão maior e duas dessas

amostras apresentaram escores semelhantes aos das amostras do G1. Não há indícios de ocorrência de amostras anômalas.

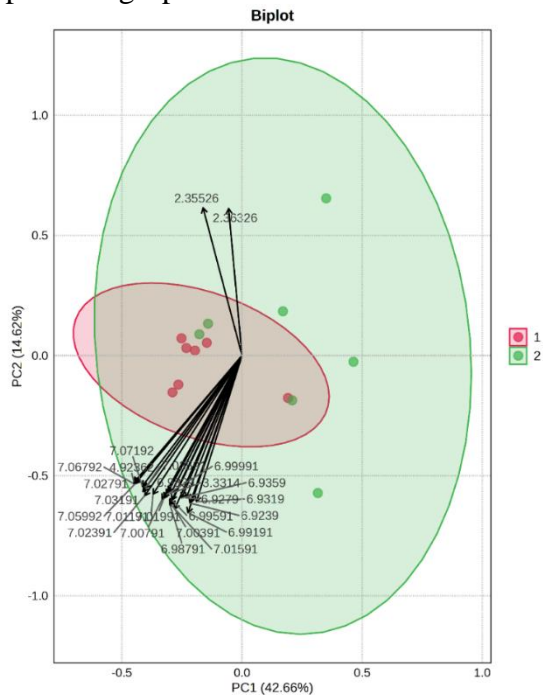
**Figura 21-** Gráficos de escores das amostras obtidos a partir dos dados espectrais normalizados. Em verde, temos as amostras da classe G2 e, em rosa, da classe G1.



\*No gráfico de escores da direita, temos informações referentes aos meses de coleta das amostras.  
**Fonte:** Autor (2025).

A Figura 22 apresenta uma sobreposição dos gráficos de escores e de *loadings* contendo as 25 variáveis mais importantes.

**Figura 22-** Biplot da PCA, mostrando as 25 variáveis mais importantes (maior peso) para os agrupamentos naturais observados.



**Fonte:** Autor (2025).

Pode-se observar que PC1 separa as amostras em dois grupos, tendo o zero como referência. Assim, temos seis amostras com escores positivos, em PC1; e oito amostras com escores negativos. As variáveis mais importantes para a PCA têm deslocamentos químicos entre  $\delta$  6,8 ppm e 7,1 ppm. Essa região espectral é atribuída a núcleos de H-1 de grupos benzênicos (Pavia *et al.*, 2015). Duas, das 25 variáveis, têm deslocamento químico da ordem de  $\delta$  2,35 ppm, o qual podem ser atribuídos a grupos metilenos (CH<sub>2</sub>) ligados a anéis benzênicos (Pavia *et al.*, 2015). Duas outras variáveis têm deslocamentos em  $\delta$  3,33 e 4,92 ppm, que podem advir respectivamente de metoxilas (OCH<sub>3</sub>) e de prótons vinílicos (R'-HC=CH-R'') (Pavia *et al.*, 2015). Considerando a natureza da amostra, esses sinais de compostos aromáticos são especificamente de compostos fenólicos, dos quais os extratos de folhas de pitanga são ricos, como afirmam Oliveira *et al.* (2024) ao citarem polifenóis como taninos e flavonoides como os principais PN (produtos naturais) de *Eugenia uniflora* L.

Através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês, *High-Performance Liquid Chromatography*) também foram identificados metabólitos da classe de polifenóis, como ácido gálico, ácido elágico e catequina, por exemplo, nas folhas da espécie (Bakr, Mohamed e Waly, 2017). Em relação a RMN de <sup>1</sup>H, Sobeh *et al.* (2019) relataram sinais de ácido gálico com deslocamentos em torno de  $\delta$  7,08 ppm.

Retomando o que foi observado por meio dos dados da Figura 22, pode se inferir que as amostras pertencentes a classe G1, (escores negativos em PC1), possuem um maior teor de compostos fenólicos, em relação às demais. Nesse caso, essas amostras estão concentradas, em sua maioria, entre os meses de outubro a março (S1-S6), sendo que duas amostras da classe G2 (S14 e S8) também apresentam escore negativos em PCA, o que pode ser justificado pelo fato de que não obtivemos informações relativas ao mês de coleta de S14 e em relação a S8 (abril) podemos apontar o acúmulo das condições climáticas as quais a planta foi submetida, dado que o que é observado no referido mês, advém dos efeitos de dias e meses antecessores (Ivanov *et al.*, 2022).

Assim, pode-se inferir que uma maior concentração de compostos fenólicos nesse período adveio da produção antecedente desses metabólitos. Os compostos fenólicos, especificamente os da classe de flavonoides (Ng, Eh Suk e Gew 2022) são metabólitos que tem a capacidade de absorver radiação ultravioleta (UV), o que é proveniente da sua estrutura rica em hidroxilas ligadas a anéis aromáticos (Lôbo, Silva e Menezes, 2020), formando um grande sistema de polifenóis conjugados. Isso pode ser confirmado pelas afirmações de Ng, Eh Suk e Gew (2022) sobre a capacidade fotoprotetora das estruturas

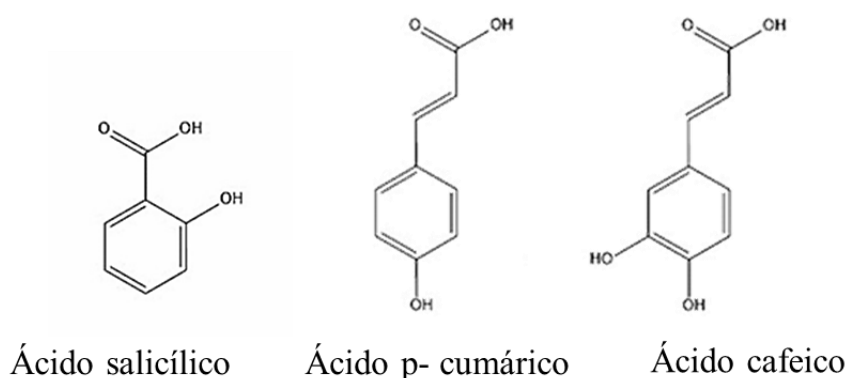
polifenólicas, as quais podem eliminar radicais livres, prevenindo assim o envelhecimento da pele, por exemplo. Katiyar e Mukhtar (2001) e Svobodová, Psotová e Walterová (2003) também relatam esse efeito benéfico dos flavonoides, contra a luz UV. Svobodová, Psotová e Walterová (2003) relatam inclusive a capacidade da quercetina na prevenção dos danos causados pela exposição à radiação UV. Essa capacidade de proteção contra a radiação UV é advinda do caráter antioxidante desses compostos fenólicos (Ng, Eh Suk e Gew, 2022).

Do ponto de vista farmacológico, uma maior concentração de compostos fenólicos é vantajosa, pois existe uma tendência crescente no uso dessa classe de metabólitos e seus derivados para tratamento de diversas enfermidades (Elshafie *et al.*, 2023). Losada-Barreiro *et al.* (2022) e Zhang *et al.* (2022) corroboram sobre os efeitos antivirais, antimicrobianos, antioxidantes e anti-hipertensivos dos compostos fenólicos.

Embora a atividade biológica desses metabólitos seja comumente centrada em seu caráter antioxidante (Duda-Chodak e Tarko, 2023), proveniente da sua atividade redutora, Belscav-Cvitanovic *et al.* (2018) salientam que as propriedades de ligação também são determinantes da atividade biológica. Zagorskina *et al.* (2023) afirmam que a afinidade por proteínas é oriunda das propriedades de ligação.

Sendo assim, é válido reafirmar que os benefícios conferidos por esses compostos fenólicos estão intimamente ligados a sua estrutura química, que pode ser visualizada, de forma exemplificada, na Figura 23, na qual pode-se observar a estrutura de alguns compostos fenólicos encontrados em extratos de folhas de *Eugenia uniflora* L. por HPLC (Bakr, Mohamed e Waly, 2017).

**Figura 23-** Exemplos de compostos fenólicos.



**Fonte:** Adaptado de Zagorskina *et al.* (2023).

Tomando como exemplo o combate ao excesso na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), que poderiam acarretar no desenvolvimento de doenças, os compotos

fenólicos atuam positivamente devido a sua capacidade de doar elétrons ou átomos de hidrogênio, o que é conferido pela presença de grupos aromáticos, ligações conjugadas e hidroxilas na sua estrutura (Olszowy, 2019).

Ademais, ainda como efeito da sua ação antioxidante, os polifenóis podem inibir o estresse oxidativo (Zagoskina *et al.*, 2023), o qual comumente causa uma progressão em doenças neurodegenerativas, como Parkinson e Alzheimer (Grabska-Kobyleca *et al.*, 2023).

Além disso, Fraga *et al.* (2019) acentuam a beneficidade da ingestão de alimentos com compostos fenólicos em relação a doenças crônicas não transmissíveis, como diabetes e problemas cardiovasculares, por exemplo. Os autores, ainda trazem os resultados positivos de estudos feitos por Kesse-Guyot *et al.* (2012) a respeito da ingestão de compostos fenólicos e consequente melhora cognitiva. Roszkowski (2023) realça esses metabólitos como promissores em terapias oncológicas.

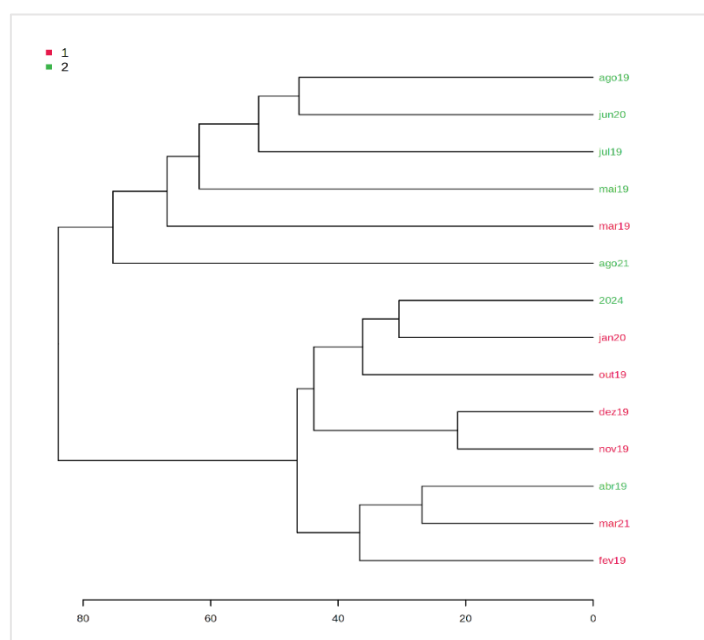
Dessa forma, pode-se compreender que os extratos de folhas de pitanga com uma maior concentração de polifenóis podem conferir diversos benefícios a saúde humana. Sendo que, esses compostos têm o caráter fotoprotetor, é justo afirmar que épocas do ano com maior índice de radiação (mais calor) propiciam uma produção mais acentuada de polifenóis, os quais, atuam assim na proteção da planta. Essa afirmação é consolidada por Zagorskina *et al.* (2023) que confirmam o aumento na produção de compostos fenólicos relacionado aos níveis de estresse da planta, o qual pode ser aumentado por fatores como mudanças na temperatura, índice de luz e radiação UV.

Esse achado é interessante porque a partir de uma análise exploratória, rápida e com o mínimo de intervenção do analista, foi possível discriminar as amostras em função da maior ou menor concentração relativa de compostos fenólicos.

### 7.2.2 HCA

A Figura 24 apresenta o resultado da análise hierárquica de clusters. Considerando uma distância de 80, podemos dividir o conjunto em dois grupos, que estão em consonância com o agrupamento apresentado nos resultados da PCA. Tem-se um grupo com seis amostras (S7, S9, S10, S11, S12, S13) e outro com oito amostras (S1, S2, S3, S4, S5, S6, S8 e S14). Contudo, se considerarmos uma distância de 40, o grupo contendo oito amostras se divide em três subgrupos, sendo dois subgrupos contendo três amostras (S14, S4 e S1; S5, S6 e S8) e um subgrupo contendo duas amostras (S2 e S3).

**Figura 24-** Análise hierárquica de Cluster (HCA) para os extratos de pitanga.



Fonte: Autor (2025).

Como a classificação mostrada no HCA confere com a PCA, inclusive com as amostras S7, S8 e S14 apresentando-se em grupo diverso àquela classificação a priori, é válido afirmar que as oito amostras de baixo para cima, possuem um maior teor de polifenóis, que as demais. Todavia, como já salientado no decorrer desse texto, esse tipo de análise de *cluster*, apenas realiza um agrupamento amostral, deixando pendente o fornecimento de informações relativas as variáveis envolvidas na separação desses grupos. Assim, no intuito de preencher essa lacuna, realizamos outro tipo de análise exploratória, concomitante com a HCA, o *heatmap* (mapa de calor).

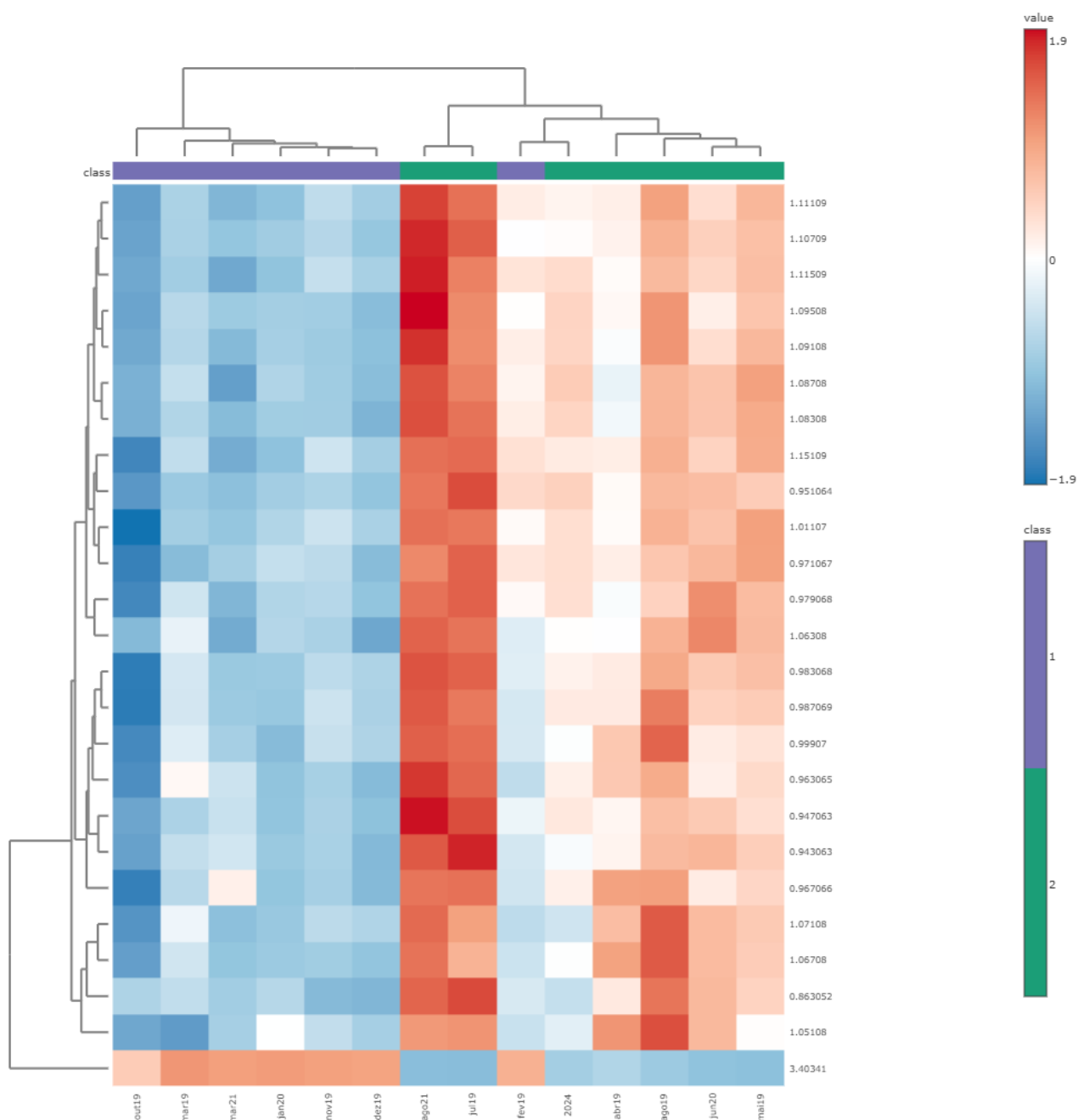
### 7.2.3 Heatmap

Nesse tipo de análise também se pode observar a formação de dois grupos dentre o conjunto amostral (parte superior da Figura 25). No grupo a direita do *heatmap*, em verde, pode-se observar o surgimento de três subgrupos, assim como na HCA. Contudo, no *heatmap*, embora se tenha a formação de dois grupos, as amostras presentes em cada um deles diferem um pouco da PCA e do HCA. Todavia, em sua maioria, os componentes de cada grupo estão em consonância.

Visualmente pode-se perceber que as amostras a direita do *heatmap* (classe G2), apresentam uma maior concentração de metabólitos com os deslocamentos característicos apresentados no gráfico (também na parte direita do mapa de calor).



**Figura 25-**Heatmap com extratos de folhas de *Eugenia uniflora* L.

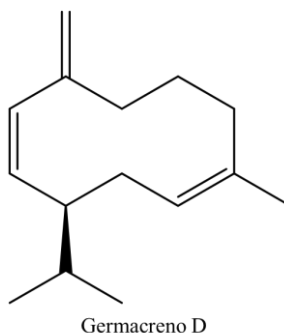


**Fonte:** Autor (2025).

Esses deslocamentos, são as 25 variáveis responsáveis pela formação desses dois grandes grupos, os quais em sua maioria estão na região entre  $\delta$  0,85 e 1,15 ppm, deslocamentos característicos de metilas alifáticas ( $\text{CH}_3$ ) (Pavia *et al.*, 2015), as quais dentre os componentes da pitanga, podem ser encontradas na estrutura de terpenos (Figura 26). Garmus *et al.*(2014), Silva e Lima (2016) e Zanusso *et al.* (2023) relataram a presença de terpenos em folhas de *Eugenia uniflora* L. Falcão *et al.* (2018) identificaram

terpenos e compostos fenólicos dentre os metabólitos secundários presentes nas folhas de pitanga, sendo que o sesquiterpeno espatulenol já foi relatado como principal componente do óleo essencial da espécie (Sobeh *et al.* 2016).

**Figura 26**-Exemplo de terpeno encontrado nas folhas de *Eugenia uniflora* L.



**Fonte:** Autor (2025).

A comprovação da presença desse tipo de metabólito em extratos de folhas de *Eugenia uniflora* L, foi confirmada por autores como Garmus *et al.* (2014) que encontraram terpenos como germacreno B e germacreno D, detectados por GC/MS. O sesquiterpeno curzereno, também foi relatado em óleos essenciais da referida planta (Costa *et al.* 2020). Duan *et al.* (2020) relataram sinais de triterpenos, usando espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$ , com deslocamentos em  $\delta$  0,84 e 0,98 ppm.

A classe que apresentou maior concentração de terpenos, de acordo com a análise do *Heatmap*, foi a G2 (contrária a classe com maior concentração de polifenóis na PCA), sendo assim, pode-se inferir que a classe G2 apresenta um maior teor relativo de terpenos em relação à classe G1. Nesse caso, as amostras que se classificaram com maiores concentrações de terpenos foram aquelas coletadas no período do ano que fica entre os meses de abril a setembro (S8-S13), sendo que a amostra S14 (sem mês) e S5 também foram catalogadas nessa classe. Esse efeito pode ser atribuído as variações sazonais, como discutido na seção PCA.

Dessa forma, também pode-se afirmar que um maior teor de terpenos adveio da necessidade de produção desse metabólito, por parte da planta, em épocas antecessoras a coleta. Isso pode ser explicado pelo fato de que terpenos, assim como outros compostos voláteis, atuam na defesa das plantas (Li *et al.*, 2023).

Li *et al.* (2023) discorrem acerca da incidência na concentração de homólogos de terpenos, relacionada com a necessidade da planta se proteger de insetos. Em outras palavras, um maior teor de terpenos nas folhas de pitanga, por exemplo, indica que a planta foi submetida a um estresse, provavelmente ocasionado por pragas. O terpeno

então, terá a função de inimigos naturais dessas pragas, objetivando a sua erradicação e consequente sobrevivência da espécie. Ademais, a incidência/aumento na concentração de terpenos também pode servir como sinalizadores para proteção da planta, funcionando como contra-ataque a predadores (Hu, 2022). Alguns terpenos como o limoneno e o  $\alpha$ -pineno são repulsivos ou até tóxicos para alguns herbívoros (Boncan *et al.* 2020). Os terpenos, também são vistos como agentes relevantes no controle de pragas (Li *et al.*, 2023). Um dado importante nesse sentido é que óleo essencial de pitanga já se mostrou eficaz como repelente larval, dada a incidência de sesquiterpenos, em sua composição (Lobo *et al.*, 2019).

Os Terpenos compreendem uma classe de metabólitos que propiciam inúmeros e variados benefícios (Cox-Georgian *et al.*, 2019), o que é vantajoso do ponto de vista farmacológico. Eles afirmam que os terpenos apresentam atividade antibacteriana, antifúngica e antiedemacia, por exemplo, e que suas funções geralmente dependem da classe a qual pertencem. Del Prado-Audelo *et al.* (2021) apontam os terpenos como potenciais agentes anti-inflamatórios, ação atribuída a classe dos diterpenos (Cox-Georgian *et al.*, 2019 e Vasas e Hohmann, 2014).

Os sesquiterpenos, dos quais o germacreno faz parte, desempenham um papel importante no crescimento e interação da referida planta com o ambiente. Em relação à farmacologia, Chadwick *et al.* (2013) apontam sua ação antiplasmodial.

Li *et al.* (2023) ainda ressaltam como os terpenos podem ser utilizados desde a indústria de alimentos até a perfumaria, apontando-os também como compostos potenciais no uso de biocombustíveis renováveis.

Quimicamente, a estrutura dos terpenos tem caráter lipofílico, como é o caso do  $\beta$ -cariofileno, por exemplo, terpeno presente na pitanga. Essa característica, faz com que esses compostos tenham facilidade para penetrar as membranas celulares, o que faz com que a referida ação farmacológica ocorra. Jha *et al.* (2021), por exemplo, trazem um estudo acerca da potencialidade do  $\beta$ -cariofileno no tratamento de inflamações da Covid-19.

Assim, pode-se perceber que os terpenos também podem conferir diversos benefícios, sendo que estes são frequentemente relatados nas folhas de *Eugenia uniflora* L. e que neste trabalho, a maior concentração dessa classe de metabólitos se deu nas amostras da classe G2, pode-se subentender que esses extratos tem um grande probabilidade de serem decorrentes duma época na qual a planta estava sujeita a estresse biótico. A incidência de pragas pode ser afetada pelas diferenças de temperatura (Deutsch

*et al.*, 2018) as quais apresentam oscilações em decorrência da época do ano.

No que diz respeito a tendência de formação de três subgrupos, vista na HCA e *Heatmap* (Figuras 24 e 25, respectivamente) pode-se atribuir, principalmente pelo mapa de calor, a incidência de mudanças no ambiente climático da pitanga, a qual como aqui discutido, influencia na produção e consequente aumento ou diminuição na concentração de metabólitos como terpenos e polifenóis. Por esse motivo, também há uma relação referente a proximidade dos meses de coleta e a formação dos subgrupos formados. Isso também pode justificar, o perpasso de algumas amostras por ambas as classes.

## 8. CONCLUSÃO

Os resultados demonstram que a estratégia metabonômica baseada na espectroscopia de ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$  é eficiente para identificar semelhanças e diferenças metabólicas entre amostras de extratos etanólicos de folhas de *Eugenia uniflora* L, agrupando-as em função da sazonalidade. Dessa forma, por ser um tipo de análise não destrutiva e que requer preparo mínimo da amostra, é uma técnica vantajosa para um *screening* que vise separar as amostras em função do teor de compostos polifenólicos e/ou terpenos.

Ademais, as principais classes de metabólitos aqui identificadas, catalogaram as amostras em dois grupos, por meio das análises exploratórias PCA, HCA e *Heatmap*; sendo que a PCA e o *Heatmap*, indicaram compostos fenólicos e terpenos como os responsáveis por essa distinção.

Pelo biplot da PCA, observou-se que o grupo de amostras pertencentes a classe G1 continha um maior teor de polifenóis, o que foi confirmado pelos deslocamentos em torno de  $\delta$  7,0 ppm. O agrupamento da HCA embora não apresentasse as variáveis, corroborou com o agrupamento da PCA, acrescentando, no entanto, um outro agrupamento entre as amostras, que se subdividiram em três outros grupos, o que também foi mostrado no *Heatmap*. Essa subdivisão, assim como o perpasso de algumas amostras de uma classe para outra (ao compararmos PCA e HCA com o mapa de calor) pode ser atribuída as mudanças as quais as folhas de pitangueira foram submetidas, em razão da sazonalidade.

Pelo *Heatmap*, foi possível visualizar que o grupo de amostras da classe G2 obteve uma maior concentração voltada para terpenos, por meio dos deslocamentos químicos baixos, em torno de  $\delta$  0,8 ppm (atribuído a grupos metílicos alifáticos). Sendo assim, é válido afirmar que a classe de amostras G1 apresentou um maior teor de polifenóis e menor concentração de terpenos, o que se mostrou contrário em relação a classe 2 (maior concentração de terpenos e menor teor polifenólico).

Por meio dessas análises, pode-se perceber como a sazonalidade influencia na concentração de metabólitos, mesmo se tratando do extrato da mesma planta. Isso é importante, pois embora polifenóis e terpenos possam ter algumas propriedades semelhantes, no quesito farmacêutico, nas questões que envolvem a planta, cada um dos metabólitos desempenha uma função específica.

Sendo assim, a maior concentração de polifenóis assinala que em momentos que antecederam a colheita, a *Eugenia uniflora* L. precisou aumentar a produção desse

metabólito, para se proteger de estresses, gerados pela radiação UV, por exemplo. Tratando da classe com maior teor de terpenos, podemos inferir que a pitangueira provavelmente foi submetida a estresse ocasionado pela incidência de pragas ou precisou se proteger de predadores. Para se ter um melhor entendimento acerca disso, informações sobre índice pluviométrico, radiação UV e incidência de pragas (nos meses que antecederam a coleta das amostras) seriam interessantes.

Por fim, este trabalho demonstrou o potencial da abordagem metabonômica como ferramenta de *screening* para identificação e discriminação de amostras de extratos de folhas de pitanga (*Eugenia uniflora* L.), mas que pode ser extrapolada para outras espécies também, em função do teor relativos de metabólitos secundários. Portanto, a hipótese inicialmente admitida foi confirmada.

## 9. PERSPECTIVAS

- Ampliar o número de amostras, possibilitando um maior conjunto de dados e análises supervisionadas;
- Realizar estudos com outros tipos de extratos (aquoso, por exemplo), objetivando uma comparação e conhecimento dos principais metabólitos presentes nas amostras;
- Observar como o tipo de extração influencia o perfil metabólico nos espectros de RMN de  $H^1$ .

## REFERÊNCIAS

- ALCÂNTARA, G. A. M. de; SILVA, A. C. da; PINTO, R. C. de F.; VINHAL, G. S. ANÁLISE DO FID NA RESSONÂNCIA MAGNÉTICA POR IMAGEAMENTO. **CEEL**, Universidade Federal de Uberlândia, nov 2019. Disponível em: [https://www.peteletricaufu.com.br/static/ceel/artigos/artigo\\_330.pdf](https://www.peteletricaufu.com.br/static/ceel/artigos/artigo_330.pdf). Acesso em: 25 set. 2024.
- ALHARSHAN, G. A. *et al.* Dielectric and gamma ray shielding properties of lead-doped lithium–zinc–borosilicate glasses. **Journal of electronic materials**, v. 53, n. 9, p. 5671–5681, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11664-024-11234-2>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11664-024-11234-2> Acesso em: 16 jun. 2025.
- ALMEIDA, L. G. de. **Uso de ressonância magnética nuclear sem solvente deuterado (No-D NMR) para análise de cocaína e seus adulterantes**. Orientador: Alvaro Cunha Neto. 2014. 92 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2014.
- AMATTO, P. de P. G. *et al.* *Herbal medicines used in the treatment of atopic dermatitis: a systematic review and meta-analysis*. **Archives of Dermatological Research**, Berlin, v. 316, n. 9, nov. 2024. DOI: 10.1007/s00403-024-03381-7 Disponível em: [springermedizin.de+1pubmed.ncbi.nlm.nih.gov+1](https://www.springermedizin.de/pubmed.ncbi.nlm.nih.gov). Acesso em: 12 jun. 2025.
- AMORIM, G. S.; ALMEIDA JR, E. B. A família Myrtaceae nas restingas da Ilha do Maranhão, Brasil. **Iheringia**, Série Botânica, Porto Alegre, v.76: e2021008, 2021. DOI:10.21826/2446-82312021v76e20211008. Disponível em: <https://isb.emnuvens.com.br/iheringia/article/view/887/524>. Acesso em: 18 abr. 2025.
- ANOWAR, F.; SADAoui, S.; SELIM, B. Conceptual and empirical comparison of dimensionality reduction algorithms (PCA, KPCA, LDA, MDS, SVD, LLE, ISOMAP, LE, ICA, t-SNE). **Computer Science Review**, v. 40, 100378, 2021. DOI: 10.1016/j.cosrev.2021.100378. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/349483622\\_Conceptual\\_and\\_empirical\\_comparison\\_of\\_dimensionality\\_reduction\\_algorithms\\_PCA\\_KPCA\\_LDA\\_MDS\\_SVD\\_LLE\\_ISOMAP\\_LE\\_ICA\\_t-SNE](https://www.researchgate.net/publication/349483622_Conceptual_and_empirical_comparison_of_dimensionality_reduction_algorithms_PCA_KPCA_LDA_MDS_SVD_LLE_ISOMAP_LE_ICA_t-SNE). Acesso em: 21 set. 2024.
- AUGUSTIJN, D.; GROOT, M. De.; ALIA, A. HR-MAS NMR Applications in Plant Metabolomics. **Molecules**, v. 26, n. 931, fev. 2021. DOI: 10.3390/molecules26040931. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/26/4/931>. Acesso em: 20 maio. 2025.
- BADDINI, A. L. Q.; NETTO, A. D. P.; TEIXEIRA, V. L. Metabolômica Baseada em RMN de <sup>1</sup>H e no Método dos Mínimos Quadrados Parciais Discriminante. **Revista virtual de química**, v. 6. n.2, p. 396-415, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.5935/1984-6835.20140028>. Disponível em: <http://www.uff.br/rvq>. Acesso em: 10 out. 2024.



BAKR, R. O.; MOHAMED, S. A.; WALY, N. E. Phytochemical and biological investigation of *Eugenia uniflora* L. cultivated in Egypt. **Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy**, v. 9, n. 5, p. 75-66, maio. 2017. DOI: 10.5897/JPP2017.0443. Disponível em: <https://academicjournals.org/journal/JPP/article-full-text/966E82B63903>. Acesso em: 01 jun. 2025.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. 25 anos de quimiometria no Brasil. **Quim. Nova**, v. 29, n. 6, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000600042> Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/mQNsqf68QY9TmMw3KytvdvN/> Acesso em: 13 jun. 2025.

BATISTA, A. D. *et al.* Proton nuclear magnetic resonance-based metabonomic models for non-invasive diagnosis of liver fibrosis in chronic hepatitis C: Optimizing the classification of intermediate fibrosis. **World Journal of Hepatology**, v. 10, n. 1, p. 105-115, jan. 2018. DOI: 10.4254/wjh.v19.i1.105. Disponível em: <https://www.wjgnet.com/1948-5182/full/v10/1/105.htm> Acesso em: 15 jun. 2025.

BELSCAK-CVITANOVIC, A. *et al.* Overview of polyphenols and their properties. In: **Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications**. Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2018; p. 3–44.

BEZERRA, I. C. F. **Investigação Fitoquímica de Extrato Bruto e Frações das Folhas de *Eugenia uniflora* L.** (Pitangueira). 2016.214f. Dissertação (Mestrado em Inovação terapêutica)- Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2016. Disponível em: <https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/26912>. Acesso em: 03 abr. 2025.

BEZERRA, I. C. F.; RAMOS, R. T. M.; FERREIRA, M. R. A.; SOARES, L. A. L. Chromatographic profiles of extractives from leaves of *Eugenia uniflora*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 28, p. 92-101, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2017.11.002>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbfar/a/y76f3NktmbZrvLRh3YG79Hn/?lang=en>. Acesso em: 02 abr. 2025.

BONCAN, D.A.T. *et al.* Terpenes and Terpenoids in Plants: Interactions with Environment and Insects. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n.19, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21197382> Disponível em: <https://www.mdpi.com/848694> Acesso em: 16 jun. 2025.

BORGES, L. P.; AMORIM, V. A. Metabólitos secundários de plantas. **Revista Agrotecnologia**, Ipameri. v.11, n.1, p.54-67, mar. 2020. Disponível em: <https://www.revista.ueg.br/index.php/agrotecnologia/article/view/9705>. Acesso em: 19 set. 2024.

BORSOI, F. T. *et al.* *Eugenia uniflora* L. seed and pulp extracts: phytochemical profile, cytotoxic potential, antitumoral activity, and  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase inhibition capacity. **Nat Prod Res**, v.37, n. 22, p. 3862-3867, nov. 2023. DOI:

10.1080/14786419.2022.2153128. Disponível em:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36448430/>. Acesso em: 24 abr. 2025.

BORTOLUZZI, M. M.; SCHMITT, V.; MAZUR, C. E. *Effect of herbal medical plants on anxiety: a brief review*. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 1, 2020. DOI: <https://doi.org/10.33448/rsd-v9i1.1504>. Disponível em:  
<https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/1504>. Acesso em: 13 jun. 2025.

BRASIL. Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES. **Plataforma de Periódicos da CAPES**. Brasília: CAPES, [20--]. Disponível em:  
<https://www.periodicos.capes.gov.br>. Acesso em: 16 jun. 2025.

BRASIL. (2017). **Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)**. Lista DCB Plantas Medicinais atualizada em dezembro 2017. Brasília. Disponível em:  
[http://portal.anvisa.gov.br/resultado-debusca?p\\_p\\_id=101&p\\_p\\_lifecycle=0&p\\_p\\_state=maximized&p\\_p\\_mode=view&p\\_p\\_col\\_id=column1&p\\_p\\_col\\_count=1&\\_101\\_struts\\_action=%2Fasset\\_publisher%2Fview\\_content&\\_101\\_assetEntryId=3881905&\\_101\\_type=document](http://portal.anvisa.gov.br/resultado-debusca?p_p_id=101&p_p_lifecycle=0&p_p_state=maximized&p_p_mode=view&p_p_col_id=column1&p_p_col_count=1&_101_struts_action=%2Fasset_publisher%2Fview_content&_101_assetEntryId=3881905&_101_type=document) Acesso em 22.abr.2025.

BUTLER, H. J. *et al.* Optimised spectral pre-processing for discrimination of biofluids via ATR-FTIR spectroscopy. **Analyst**, v. 143, n. 24, p. 6048–6058, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1039/C8AN01384E>. Disponível em:  
<https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2018/an/c8an01384e>. Acesso em: 24 abr. 2025.

CANUTO, G. A. B.; COSTA, J. L.; CRUZ, P. L. R.; SOUZA, A. R. L.; FACCIO, A. T.; KLASSEN, A.; RODRIGUES, K. T.; TAVARES, M. F. M. Metabolômica: definições, estado-da-arte e aplicações representativas. **Química Nova**, v. 41, n.1, p. 75-91, jan. 2018. DOI: <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170134>. Disponível em:  
<https://www.scielo.br/j/qn/a/hCJGvVZhZ9Zf4RyskbhgwJf/?lang=pt>. Acesso em: 18 abr. 2025.

CARDOSO, J de. S. *et al.* Antioxidant, antihyperglycemic, and antidyslipidemic effects of Brazilian-native fruit extracts in an animal model of insulin resistance. **Redox Rep**, v. 23, n. 1, p. 41–46. DOI: <https://doi.org/10.1080/13510002.2017.1375709>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29088999/>. Acesso em: 13 jun. 2025.

CASTELLANO, G.; SALMON, C. E. G. Técnicas Quantitativas de Imagens por Ressonância Magnética. **Revista Brasileira de Física médica**, v. 13, n. 1, p. 57-65, 2019. DOI: <https://doi.org/10.29384/rbfm.2019.v13.n1.p57-65>. Disponível em: <https://www.rbfm.org.br/rbfm/article/view/511>. Acesso em: 25 set. 2024.

CASTRO, M. R. de; FIGUEIREDO, F. F. *Saberes Tradicionais, Biodiversidade, Práticas Integrativas e Complementares: O uso de plantas medicinais no SUS*. **Hygeia: Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde**, Uberlândia, v. 15, n. 31, p. 56–

70, jul. 2019. DOI: 10.14393/Hygeia153146605. Disponível em:  
<https://seer.ufu.br/index.php/hygeia/article/view/46605>. Acesso em: 22 abr. 2025.

CHADWICK, M. *et al.* Lactonas sesquiterpenoides: benefícios para plantas e pessoas. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 6, p. 12780–12805, jun. 2013. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms140612780>. Disponível em:  
<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3709812/>. Acesso em: 13 jun. 2025.

CHAKRAVARTULA, S. S. N.; LOURENÇO, R. V.; BALESTRA, F.; BITTANTE, A. M. Q. B.; SOBRAL, P. J. A.; ROSA, M. D.; Influence of pitanga (*Eugenia uniflora* L.) leaf extract and/or natamycin on properties of cassava starch/chitosan active films. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 24, p. 10098, 2020. DOI:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.fpsl.2020.100498>. Disponível em:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2214289419301115>. Acesso em: 02 abr. 2025.

CHONG, J.; XIA, J. Using MetaboAnalyst 4.0 for metabolomics data analysis, interpretation, and integration with other omics data. **Computational methods and data analysis for metabolomics**, p. 337-360, 2020. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0239-3\\_17](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0239-3_17). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31953825/>. Acesso em: 12 jun. 2025.

CIPRIANO, R. R.; MAIA, B. H. L. N. S.; DESCHAMPS, C. Chemical variability of essential oils of *Eugenia uniflora* L. genotypes and their antioxidant activity. **An Acad Bras Cienc**, v. 93, n.1, 2021. DOI: 10.1590/0001-3765202120181299. Disponível em:  
<https://www.scielo.br/j/aabc/a/ZLt8g7R5cVPPPwf5nbPmdsh/>. Acesso em: 24 abr. 2025.

CONALGO, L. A.; ANDRADE, F. D. RMN no domínio do tempo: Fundamentos e aplicações pffline e inline. In: RESENDE, R. R. (org). **Biotecnologia aplicada à agro e indústria: Fundamentos e aplicações**. v. 4, Blucher, 2016.

COLELLA, M. F. *et al.* NMR Spectroscopy Applied to the Metabolic Analysis of Natural Extracts of *Cannabis sativa*. **Molecules**, v. 27, n.11, maio 2022. DOI:  
<https://doi.org/10.3390/molecules27113509>. Disponível em:  
<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9182145/> Acesso em: 15 jun. 2025

COSTA, J. S.; BARROSO, A. S.; MOURÃO, R. H. V.; SILVA, J. K. R.; MAIA, J. G. S.; FIGUEIREDO, P. L. Seasonal and Antioxidant Evaluation of Essential Oil from *Eugenia uniflora* L., Curzerene-Rich, Thermally Produced in Situ. **Biomolecules**, v. 10, n. 328, 2020. DOI: 10.3390/biom10020328. Disponível em:  
<https://www.mdpi.com/2218-273X/10/2/328>. Acesso em: 18 abr. 2025.

COWAN B. **Nuclear Magnetic Resonance and Relaxation**. Cambridge: Cambridge University Press; 1997. *E-book*.

COX-GEORGIAN, D., RAMADOSS, N., DONA, C., BASU, C. (2019). Usos Terapêuticos e Medicinais de Terpenos. In: Joshee, N., Dhekney, S., Parajuli, P. (orgs.) **Plantas Medicinais**. Springer, Cham, 2019. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-3-030-31269-5\\_15](https://doi.org/10.1007/978-3-030-31269-5_15).

CRAIG, A.; CLOAREC, O.; HOLMES, E.; NICHOLSON, J. K.; LINDON, J. C.; Scaling and normalization effects in NMR spectroscopic metabonomic data sets. **Anal. Chem.**, v. 78, p. 2262, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1021/ac0519312>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16579606/>. Acesso em: 18 abr. 2025.

DEL PRADO-AUDELO, M. L. *et al.* Therapeutic applications of terpenes on inflammatory diseases. **Frontiers in pharmacology**, v. 12, p. 704197, ago. 2021. DOI: 10.3389/fphar.2021.704197. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/pharmacology/articles/10.3389/fphar.2021.704197/full>. Acesso em: 09 jun. 2025.

DEUTSCH, C. A. *et al.* Increase in crop losses to insect pests in a warming climate. **Science (New York, N.Y.)**, v. 361, n. 6405, p. 916–919, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.aat3466>. Disponível em: <https://www.science.org/doi/full/10.1126/science.aat3466> Acesso em: 16 jun. 2025.

DIEGUEZ, C. M. T.; MONTANHEIRO, L. V.; CLETO, L. B.; BONFIM, M. J. C.; DARTORA, C. A. Os fundamentos quânticos da Ressonância Magnética Nuclear. **Revista Brasileira de ensino de física**, v. 40, n.1, e1319, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1590/1806-9126-RBEF-2017-0093> Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbef/a/VHbzGXCnLH7Wy55qt96bRKt/abstract/?lang=pt>. Acesso em: 05 abr. 2025.

DOOST, A. S.; AKBARI, M.; STEVENS, C. V.; SETIOWATI, A. D.; MEEREN, P. V. A review on nuclear overhauser enhancement (NOE) and rotating-frame overhauser effect (ROE) NMR techniques in food science: Basic principles and applications. **Trends in Food Science e technology**, v. 86, p. 16-24, 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2019.02.001>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924224418306745?via%3Dihub>. Acesso em: 05 abr. 2025.

DUAN, X. Y. *Et al.* Terpenes isolated from Polyalthia simiarum and their cytotoxic activities. **Fitoterapia**, v. 147, set. 2020. DOI: 10.1016/j.fitote.2020.104734. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2020.104734>. Acesso em: 09 jun. 2025.

DUDA-CHODAK, A.; TARKO, T. Possible side effects of polyphenols and their interactions with medicines. **Molecules**, v. 28, n. 6, p. 2536, mar. 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules28062536>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36985507/>. Acesso em: 13 jun. 2025.

EISEN, MICHAEL B., PAUL T. SPELLMAN, PATRICK O. BROWN E DAVID BOTSTEIN. 1998. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns . **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95, n. 25, dez. 1998. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.95.25.14863>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9843981/>. Acesso em: 13 jun. 2025.

ELSHAFIE, H.S.; CAMELE, I.; MOHAMED, A.A. Comprehensive review on the biological, agricultural and pharmaceutical properties of secondary metabolites based-plant origin. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 24, n. 4. Fev. 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms24043266> Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36834673/> Acesso em: 13 jun. 2025.

FALCÃO, T. R. *et al.* Crude extract and fractions from *Eugenia uniflora* Linn leaves showed anti-inflammatory, antioxidant, and antibacterial activities. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 18, n.1, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12906-018-2144-6> Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5845158/>. Acesso em: 16 jun. 2025.

FALCO, B. de. *et al.* Metabolomics and chemometrics of seven aromatic plants: Carob, eucalyptus, laurel, mint, myrtle, rosemary and Strawberry tree. **Phytochemical Analysis**, v. 33, n. 5, p.696-709, ago. 2022. DOI: 10.1002/pca.3121. Disponível em: <https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pca.3121>. Acesso em: 22 maio. 2025.

FARIAS, D. P.; NERI-NUMA, I. A.; ARAÚJO, F. F.; PASTORE, G. M. A critical review of some fruit trees from the Myrtaceae family as promising sources for food applications with functional claims. **Food Chemistry**, v. 306, n. 15, fev. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125630> Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814619317558>. Acesso em: 18 abr. 2025.

FELIPE, L. O.; BICAS, J. L. Terpenos, aromas e a química dos compostos naturais. **Química nova na escola**, São Paulo, v. 39, n. 2, p. 120-130, maio, 2017. DOI: 10.21577/0104-8899.20160068. Disponível em: [http://qnesc.sbq.org.br/online/qnesc39\\_2/04-QS-09-16.pdf](http://qnesc.sbq.org.br/online/qnesc39_2/04-QS-09-16.pdf). Acesso em: 12 jun. 2025.

FERREIRA, D. S.; RODRIGUES, L. S.; PEREIRA, F. M. V.; PEREIRA-FILHO, E. R. PRINCIPAL COMPONENT ANALYSIS (PCA) PARA A AVALIAÇÃO DE DADOS QUÍMICOS E GERAÇÃO DE HEAT MAPS: UM TUTORIAL. **Quim. Nova**, v. 46, n. 7, p. 747-754, 2023. DOI: <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20230030>. Disponível em: <https://quimicanova.sbq.org.br/pdf/NT2022-0288>. Acesso em: 21 set. 2024.

FERREIRA, E. T. *et al.* A utilização de plantas medicinais e fitoterápicos: uma revisão integrativa sobre a atuação do enfermeiro. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 2, n. 3, p. 1511–1523, 2019. Disponível em:

<https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/BJHR/article/view/1383>. Acesso em: 13 jun. 2025.

FERREIRA, M. M. C. Quimiometria III – revisitando a análise exploratória dos dados multivariados. **Quim. Nova**, v. 45, n. 10, p. 1251-1264, 2022. DOI: <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170910> Disponível em: <https://quimicanova.sbq.org.br/pdf/RV2022-0074>. Acesso em: 18 set. 2024.

FERREIRA, M. M. C. **Quimiometria: Conceitos, métodos e aplicações**. Campinas, SP: Editora da Unicamp, 2015. *E-book*. Disponível em: <https://books.scielo.org/id/2nc9y>. Acesso em: 13 jun. 2025.

FIDELIS, E. M.; SAVALL, A. S. P.; PEREIRA, F. O.; QUINES, C. B.; PINTO, D. S. A. Pitanga (*Eugenia uniflora* L.) as a source of bioactive compounds for health benefits: A review. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 15, n. 4, abr. 2022. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2022.103691> Disponível em: chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcgclefindmkaj/<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/1106305/1/Pitanga.pdf>. Acesso em: 02 abr. 2025.

FIEHN, O. Metabolomics– the link between genotypes and phenotypes. **Plant Molecular Biology**, v. 48, p. 155-171, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1013713905833> Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1013713905833>. Acesso em: 19 set. 2024.

FIUZA, T. S.; REZENDE, M. H.; SABÓIA-MORAIS, S. M. T.; BARA, M. T. F.; TRESVENZOL, L. M. F.; DE PAULA, J. R. Caracterização farmacognóstica das folhas de *Eugenia uniflora* L. (*Myrtaceae*). **Revista eletrônica de farmácia**, v. 2, n.1, nov. 2008. DOI: <https://doi.org/10.5216/ref.v5i2.5148> Disponível em: <https://revistas.ufg.br/REF/article/view/5148/4255>. Acesso em: 08 abr. 2025.

FRAGA, C. G. *et al.* The effects of polyphenols and other bioactives on human health. **Food & function**, v. 10, n. 2, p. 514–528, 2019. DOI: 10.1039/c8fo01997e. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2019/fo/c8fo01997e>. Acesso em: 06 jun. 2025.

FRANCO, S. P. B. *et al.* Phytochemical constitution and pharmacological effects of *Genipa americana* L. (Rubiaceae): a review. **Brazilian Journal of biology**, v. 85, e286031, 2025. DOI: 10.1590/1519-6984.286031. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/bjb/a/vkY9mnS7GfcnzPGSxLD9J5G/abstract/?lang=en>. Acesso em: 22 abr. 2025.

FOREZI, L. S. M.; CASTELO-BRANCO, F. S. Editando espectros de RMN com o software MestReNova: um guia prático. **Rev Virtual Quim**, v. 9, n. 6, p. 2650-2672, 2017. Disponível em: <http://static.sites.sbq.org.br/rvq.sbq.org.br/pdf/LuanaNoPrelo.pdf>. Acesso em: 12 jun. 2025.

GAMA, C. L.; ARRIOLA, N. D. A.; DIAS, C. O.; FREIRE, C. B. F.; RIBEIRO, D. H. B. Caracterização do extrato hidroalcoólico de folhas da pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) de cultivo hidropônico quanto à capacidade antioxidante e potencial antimicrobiano. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v. 8, n. 1, p. 6685-6700, jan. 2022.

DOI: <https://doi.org/10.34117/bjdv8n1-286> Disponível em:

<https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/BRJD/article/view/42803>. Acesso em: 01 abr. 2025.

GARMUS, T. T. *et al.* Extraction of phenolic compounds from pitanga (*Eugenia uniflora* L.) leaves by sequential extraction in fixed bed extractor using supercritical CO<sub>2</sub>, ethanol and water as solvents. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 86, p. 4-14, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2013.11.014> Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896844613003884> Acesso em: 16 jun. 2025.

GOUVEIA, L. R. **Metabonômica Aplicada ao Diagnóstico Diferencial de Doenças Hepáticas**. 2017. 123f. Dissertação (mestrado em Química). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2017. Disponível em:

<https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/29084>. Acesso em: 30 jan. 2024.

GRABSKA-KOBYŁECKA, I. *et al.* Polyphenols and their impact on the prevention of neurodegenerative diseases and development. **Nutrients**, v. 15, n. 15, ago. 2023. DOI: 10.3390/nu15153454. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37571391/>. Acesso em: 06 jun. 2025.

GRANATO, D.; SANTOS, J. S.; ESCHER, G. B.; FERREIRA, B. L.; MAGGIO, R. M. Use of principal component analysis (PCA) and hierarchical cluster analysis (HCA) for multivariate association between bioactive compounds and functional properties in foods: A critical perspective. **Trends in Food Science & Technology**, v. 72, p.83-90, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2017.12.006> Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224417306362>. Acesso em: 20 set. 2024.

GU, Z. Complex heatmap visualization. **iMeta**, [S.l.], v. 1, e43, 2022. DOI: 10.1002/imt2.43. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/imt2.43>. Acesso em: 01 maio. 2025.

GUO, H. *et al.* Heat map visualization for electrocardiogram data analysis. **BMC Cardiovascular Disorders**, Londres, v. 20, p. 277, jun. 2020 DOI: 10.1186/s12872-020-01560-8. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32513239/>. Acesso em: 13 maio. 2025.

HENDRICH, A. B. Flavonoid-membrane interactions: possible consequences for biological effects of some polyphenolic compounds1. **Acta Pharmacol Sin**, v. 27, n. 1, p. 27–40, jan. 2006. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1745-7254.2006.00238.x> Disponível em: <http://www.nature.com/doi/10.1111/j.1745-7254.2006.00238.x>. Acesso em: 18 abr. 2025.

HOCH, J. C.; STERN, A. **NMR Data Processing**. 1st ed. New York: Wiley-Liss, 1996.

HOFFMANN-RIBANI, R.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Otimização de método para determinação de flavonóis e flavonas em frutas por cromatografia líquida de alta eficiência utilizando delineamento estatístico e análise de superfície de resposta.

**Química Nova**, v. 31, p. 1378-1384, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000600020> Disponível em:

<https://www.scielo.br/j/qn/a/nRY7ng4f7GByDnKDh5tFM4v/?lang=pt> Acesso em: 13 jun. 2025.

**HILLSONG UNITED**. *Oceans (Where Feet May Fail)*. In: HILLSONG UNITED. *Zion*. [S.l.]: Hillsong Music, 2013. Faixa 3.

HU, L. Integration of multiple volatile cues into plant defense responses. **The new phytologist**, v. 233, n. 2, p. 618–623, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1111/nph.17724> Disponível em: <https://nph.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/nph.17724> Acesso em: 16 jun. 2025.

HUANG, Z.-Y. *et al.* Mining methods and typical structural mechanisms of terpene cyclases. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 8, n. 66, jul. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40643-021-00421-2>. Disponível em: <https://bioresourcesbioprocessing.springeropen.com/articles/10.1186/s40643-021-00421-2> Acesso em: 13 jun. 2025.

IVANOV, M. M. M. *et al.* Seasonal dynamics of the phenology of native species from the seasonally dry tropical forest. **Floresta e Ambiente**, v. 29, n. 4, 2022. DOI: 0.1590/2179-8087-FLORAM-2021-0032. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/2179-8087-FLORAM-2021-0032>. Acesso em: 06 jun. 2025.

JHA, N. K. *et al.* B-caryophyllene, A natural dietary CB2 receptor selective cannabinoid can be a candidate to target the Trinity of infection, immunity, and inflammation in COVID-19. **Frontiers in pharmacology**, v. 12, p. 590201, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.590201> Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34054510/>. Acesso em: 30 jun. 2025.

KATIYAR, S. K.; MUKHTAR, H. Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate treatment to mouse skin prevents UVB-induced infiltration of leukocytes, depletion of antigen-presenting cells, and oxidative stress. **Journal of leukocyte biology**, v. 69, n. 5, p. 719–726, 2001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11358979/>. Acesso em: 12 jun. 2025.

KEELER, J. **Understanding NMR Spectroscopy**. Wiley, 2002. *E-book*. Disponível em: <https://dl.iranchembook.ir/ebook/organic-chemistry-2756.pdf> Acesso em: 13 jun. 2025.

KESSE-GUYOT, E. *et al.* Total and specific polyphenol intakes in midlife are associated with cognitive function measured 13 years later, **J. Nutr.**, v. **142**, n.1, p. 76-83, jan. 2012. DOI: <https://doi.org/10.3945/jn.111.144428> Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22090468/> Acesso em: 13 jun. 2025.



KOOS, M. R. M.; SCHULZ, K. H. G.; GIL, R. R. Reference-free NOE NMR analysis. **Chemical Science**, v. 11, p. 9930-9936, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1039/D0SC02970J> Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2020/sc/d0sc02970j>. Acesso em:, 06 abr. 2025.

LANZOTTI, V. *et al.* NMR Metabolomics and Chemometrics of Lettuce, *Lactuca sativa* L., under Different Foliar Organic Fertilization Treatments. **Plants**, [S.l.], v. 11, n. 16, p. 2164, ago. 2022. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2223-7747/11/16/2164>. Acesso em: 22 maio. 2025.

LEE, J.; RECKER, M.; BOWERS, A. J.; YUAN, M. *Hierarchical Cluster Analysis Heatmaps and Pattern Analysis: An Approach for Visualizing Learning Management System Interaction Data*. In: **International Conference on Educational Data Mining (EDM)**, 2016, Raleigh, NC. Proceedings [...]. Raleigh: EDM, 2016. Disponível em: [https://www.educationaldatamining.org/EDM2016/proceedings/paper\\_34.pdf](https://www.educationaldatamining.org/EDM2016/proceedings/paper_34.pdf). Acesso em: 13 maio 2025.

LEI, J. *et al.* Comparative Chemical Characterization of Potato Powders Using <sup>1</sup>H NMR Spectroscopy and Chemometrics. **Plant Foods Hum Nutr**, v.78, n. 3, p. 590-596, set. 2023. DOI: 10.1007/s11130-023-01088-0. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37566209/>. Acesso em: 13 jun. 2025.

LI, C. *et al.* Advances in the Biosynthesis of Terpenoids and Their Ecological Functions in Plant Resistance. **International journal of Molecular sciences**, v. 24, n.14, p. 11561, jul. 2023. DOI: 10.3390/ijms241411561. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/24/14/11561>. Acesso em: 05 jun. 2025.

LI, D. *et al.* Interactions of Some Common Flavonoid Antioxidants. **Reference Module in Food Science**, p. 1-6, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.21509-6> Disponível em: <https://www.semanticscholar.org/paper/Interactions-of-Some-Common-Flavonoid-Antioxidants-Li-Sun-Waterhouse/63cd3417d4ab431608fe2ef329f393eacbf38e9c>. Acesso em: 18 abr. 2025.

LIMA, I.O.; OLIVEIRA, R.A.G.; LIMA, E.O.; FARIAS, N.M.P.; SOUZA E.L. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de Candida. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n. 2, p. 197-201, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2006000200011> Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbfar/a/CSjMBzTNRVtPZHHRjxm9Qcd/abstract/?lang=pt>. Acesso em: 18 abr. 2025.

LIRA JÚNIOR, J. S.; BEZERRA, J. E. F.; LEDERMAN, I. E.; SILVA JUNIOR, J. F. **Pitangueira**. Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária-IPA, Recife-PE, 87 p. 2007.*E-book*. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/265250136\\_Pitangueira](https://www.researchgate.net/publication/265250136_Pitangueira). Acesso em: 13 jun. 2025.

LIU, Z. *et al.* The chemotaxonomic classification of *Rhodiola* plants and its correlation with morphological characteristics and genetic taxonomy. **Chem. Cent. J.**, v. 7, n. 118, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1186/1752-153X-7-118> Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1186/1752-153X-7-118> Acesso em: 13 jun. 2025.

LIU, N., KOOT, A., HETTINGA, K., DE JONG, J. E VAN RUTH, SM. Portraying and tracing the impact of different production systems on the volatile organic compound composition of milk by PTR-(Quad)MS and PTR-(ToF)MS. **Food Chemistry**, v. 239, 201–207, 2018. DOI: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28873560/> Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.099> Acesso em: 16 jun. 2025.

LOBO, A. P. *et al.* Chemical composition and repellent activity of essential oils from the leaves of *Cinnamomum zeylanicum* and *Eugenia uniflora* against *Diaphania hyalinata* L. (Lepidoptera: Crambidae). **Journal of plant diseases and protection: scientific journal of the German Phytomedical Society (DPG)**, v. 126, n. 1, p. 79–87, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s41348-018-0190-4> Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s41348-018-0190-4> Acesso em: 16 jun. 2025.

LÔBO, G. B. S.; SILVA, A. V.; MENEZES, G. B. L. Polifenóis dietéticos e função endotelial em adultos sem diagnóstico de doenças: uma revisão sistemática de ensaios randomizados. **Brazilian journal of development**, v. 6, n.11, p. 85320-85346, nov. 2020. DOI: <https://doi.org/10.34117/bjdv6n11-085> Disponível em: <https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/BRJD/article/view/19398>. Acesso em: 02. Abr. 2025.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras : manual de identificacao e cultivo de plantas arboreas nativas do Brasil**. 352 p. Nova Odessa, Editora Plantarum, 1992. *E-book*. Disponível em: [https://www.academia.edu/43360606/ARVORES\\_BRASILEIRAS\\_ri\\_Manual\\_de\\_Identifica%C3%A7%C3%A3o\\_e\\_Cultivo\\_de\\_Plantas\\_Arb%C3%B3reas\\_Nativas\\_do\\_Brasil](https://www.academia.edu/43360606/ARVORES_BRASILEIRAS_ri_Manual_de_Identifica%C3%A7%C3%A3o_e_Cultivo_de_Plantas_Arb%C3%B3reas_Nativas_do_Brasil). Acesso em: 13 jun. 2025.

LOSADA-BARREIRO, S. *et al.* Biochemistry of antioxidants: Mechanisms and pharmaceutical applications. **Biomedicines**, v. 10, n. 12, nov. 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/biomedicines10123051> Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36551806/> Acesso em: 13 jun. 2025.

MAIMONE, N. M. *et al.* Análise de dados de metabolômica em produtos naturais: uma revisão-tutorial. **Revista Virtual de Química**, v. 16, n. 2, p. 248–270, 2024. DOI: <https://doi.org/10.21577/1984-6835.20230066> Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/375907922\\_Analysis\\_of\\_Metabolomics\\_data\\_in\\_Natural\\_Products\\_a\\_Tutorial\\_Review](https://www.researchgate.net/publication/375907922_Analysis_of_Metabolomics_data_in_Natural_Products_a_Tutorial_Review). Acesso em: 13 maio 2025.

MARKLEY, J. L. *et al.* The future of NMR-based metabolomics. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 3, p.34-40, fev. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.08.001> Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27580257/> Acesso em: 13 jun. 2025.

MCKAY, R. T. How the 1D-NOESY Suppresses Solvent Signal in Metabonomics NMR Spectroscopy: An Examination of the Pulse Sequence Components and Evolution. **Concepts in Magnetic Resonance Part A (Bridging Education and Research)**, p. 197-220, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/cmr.a.20223> Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/cmr.a.20223>. Acesso em: 07 abr. 2025.

MEIRA, E. F. *et al.* Eugenia uniflora (pitanga) leaf extract prevents the progression of experimental acute kidney injury. **Journal of Functional Foods**, v. 66, p. 1-9, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.103818>. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/339608765\\_Eugenia\\_uniflora\\_pitanga\\_leaf\\_extract\\_prevents\\_the\\_progression\\_of\\_experimental\\_acute\\_kidney\\_injury/fulltext/5e62955a4585153fb3c579ce/Eugenia-uniflora-pitanga-leaf-extract-prevents-the-progression-of-experimental-acute-kidney-injury.pdf](https://www.researchgate.net/publication/339608765_Eugenia_uniflora_pitanga_leaf_extract_prevents_the_progression_of_experimental_acute_kidney_injury/fulltext/5e62955a4585153fb3c579ce/Eugenia-uniflora-pitanga-leaf-extract-prevents-the-progression-of-experimental-acute-kidney-injury.pdf) Acesso em: 13 jun. 2025.

MISHRA, W. P.; SARKAR, U.; TARAPHDER, S.; DATTA, S.; SWAIN, D. P.; SAIKHOM, R.; PANDA, S.; LAISHRAM, M. Multivariate Statistical Data Analysis- Principal Component Analysis (PCA). **International Journal of Livestock Research**, v. 7, n. 5, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5455/ijlr.20170415115235>. Acesso em: 20 set. 2024.

MLYNÁRIK, V. Introduction to nuclear magnetic resonance. **Analytical biochemistry**, v. 529, p.4-9, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ab.2016.05.006> Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27210513/>. Acesso em: 08 jul. 2024.

MORRIS, G. A. (2019). Varian Associates and the birth of commercial NMR spectroscopy. **Journal of Magnetic Resonance** (San Diego, Calif.: 1997), v. 306, p. 12–16, set. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jmr.2019.07.039> Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1090780719301569> Acesso em: 16 jun. 2025.

NG, S. Y.; EH SUK, V. R.; GEW, L. T. Plant polyphenols as green sunscreen ingredients: A systematic review. **Journal of cosmetic dermatology**, v. 21, n. 11, p. 5409–5444, jul. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1111/jocd.15170>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35723888/>. Acesso em: 12 jun. 2025.

NICHOLSON, J. K.; LINDON, J.C.; HOLMES, E., 1999. “Metabonomics”: understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. **Xenobiotica**, v. 29, n. 11, p.1181–1189. DOI: 10.1080/004982599238047. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10598751/> Acesso em: 13 jun. 2025.

OCAMPOS, F. M. M.; SOUZA, A. J. B.; RIBEIRO, G. H.; ALMEIDA, L. S.; CÔNSOLO, N. R. B.; COLNAGO, L. A.; NMR-based plant metabolomics protocols: a step-by-step guide. **Frontiers in Natural Products**, v .3, jul. 2024. DOI: <https://doi.org/10.3389/fntpr.2024.1414506> Disponível em:

<https://www.frontiersin.org/journals/natural-products/articles/10.3389/fntpr.2024.1414506/full>. Acesso em: 05 abr. 2025.

OLIVER, S. G.; WINSON, M. K.; KELL, D. B.; BAGANZ, F. Systematic functional analysis of the yeast genome. **Trends Biotechnol.**, v. 16, p. 373-378, 1998. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0167-7799\(98\)01214-1](https://doi.org/10.1016/s0167-7799(98)01214-1) Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9744112/> Acesso em: 13 jun. 2025.

OLIVEIRA, F. M. G. de *et al.* Characterization of phenolic compounds in *Eugenia uniflora* leaves by ESI(-) FT-ICR MS, analysis of cytotoxic activity on gastric adenocarcinoma (AGS cells), and anti-*Helicobacter pylori* activity. **Natural product research**, v. 38, n. 23, p. 4297–4301, 2024. DOI: 10.1080/14786419.2023.2276390. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/14786419.2023.2276390>. Acesso em: 06 ju. 2025.

OLSZOWY, M. What is responsible for antioxidant properties of polyphenolic compounds from plants? **Plant Physiol. Biochem.**, v. 144, p. 135–143, nov. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.09.039> Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31563754/> Acesso em: 13 jun. 2025.

PATRÍCIO, K. P.; *et al.* Medicinal plant use in primary health care: an integrative review. **Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 27, n. 2, p. 677–686, fev. 2022. DOI:10.1590/1413-81232022272.46312020. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/csc/a/wzC3GWydBNNhPTX9kNWFGdk/> Acesso em: 13 jun. 2025.

PEDROSO, R. dos S.; ANDRADE, G.; PIRES, R. H. Plantas medicinais: uma abordagem sobre o uso seguro e racional. **Physis: Revista de Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 31, n. 2, e310218, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0103-73312021310218>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/physis/a/kwsS5zBL84b5w9LrMrCjy5d/> Acesso em: 13 jun. 2025.

PELLIZZARI, J.; SOONG, R.; DOWNEY, K.; BISWAS, R. G.; KOCK, F. C.; STEINER, K.; GOERLING, B.; HABER, A.; DECCKER, V.; BUSSE, F.; SIMPSON, M.; SIMPSON, A. Slicethroughthewater—Exploring the fundamental challenge of water suppression for bench top NMR systems. **Magn Reson Chem**, v. 62, p. 463–473, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1002/mrc.5431> Disponível em: <https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mrc.5431>. Acesso em: 07 abr. 2025.

PAVIA, D. L. *et al.* **Introdução à espectroscopia**. 5. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2015.

PAVIA, D. L. *et al.* **Introdução à espectroscopia**. 4. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010.

PEREIRA, I. R. S.; MONTEIRO, I. G.; SIQUEIRA, L. P.; Extrato da *Eugenia uniflora* L. (pitangueira) e sua ação anti-inflamatória em afecções dermatológicas – Uma revisão da literatura. **Brazilian Journal of development**, Curitiba, v, 6, n. 6, p. 33630-33645, jun. 2020. DOI: <https://doi.org/10.34117/bjdv6n6-062> Disponível em: <https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/BRJD/article/view/11039>. Acesso em: 04 abr. 2025.

PEREIRA, M. S. **Biossensores baseados em filmes Langmuir-Blodgett e Langmuir Schaefer de lipídios, bisftalocianina de lutécio e tirosinase**. 2019. 95f. Dissertação (Mestrado em Ciência e tecnologia de Materiais). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 2019. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/entities/publication/13acc976-bcbf-43a9-b71d-b7b008d7bad8>. Acesso em: 02 abr. 2025.

PILON, A. C.; SELEGATO, D. M.; FERNANDES, R. P.; BUENO, P. C. P.; PINHO, D. R.; NETO, F. C.; FREIRE, R. T.; CASTRO-GAMBOA, I.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P. Metabolômica de plantas: métodos e desafios. **Química nova**, v. 43, n.3, p. 329-354, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170499>. Disponível em: <https://quimicanova.sbq.org.br/pdf/RV2019-0431> Acesso em: 10 abr. 2025.

PONTES, J. G. M. *et al.* Metabolomics by NMR spectroscopy in plant disease diagnostic: Huanglongbing as a case study. **Chemistry Select**, v. 1, n. 6, p. 1176–1178, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1002/slct.201600064> Disponível em: <https://chemistry-europe.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/slct.201600064> Acesso em: 13 jun. 2025.

RATTMANN, Y. D. *et al.* Analysis of Flavonoids from *Eugenia uniflora* Leaves and Its Protective Effect against Murine Sepsis. **Evid Based Complement Alternat Med.**, v. 2012, 2012. DOI: 10.1155/2012/623940. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23320032/> Acesso em: 16 jun. 2025.

RIBEIRO, A. S. *et al.* Discriminating gamma-irradiated soybean seeds by <sup>1</sup>H NMR-based metabonomics. **Food Control**, v. 36, p. 266-272, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.08.040> Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0956713513004325> Acesso em: 15 jun. 2025.

ROCHA, L. P. B. da; ALVES, J. V. de O; AGUIAR, I. F. da S; SILVA, F. H. da; SILVA, R. L. da; ARRUDA, L. G. de; NASCIMENTO FILHO, E. J. do; BARBOSA, B. V. D. da R; AMORIM, L. C. de; SILVA, P. M. da; SILVA, M. V. da. Uso de plantas medicinais: histórico e relevância. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 10, n. 10, e44101018282, p. –, ago. 2021. DOI: 10.33448/rsd-v10i10.18282. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/18282>. Acesso em: 22 abr. 2025.

ROSZKOWSKI, S. Application of Polyphenols and Flavonoids in Oncological Therapy. **Molecules**, v. 28, 4080, maio. 2023. DOI: 10.3390/ molecules28104080. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ molecules28104080>. Acesso em: 06 jun. 2025.

ROSS, A.; SCHLOTTERBECK, G.; DIETERLE, F.; SENN, H. NMR Spectroscopy Techniques for Application to Metabonomics. In: LINDON, J. C.; NICHOLSON, J. K.; HOLMES, E. (editors). **The Handbook of Metabonomics and Metabolomics**. Elsevier, 2007.

SVOBODOVÁ, A.; PSOTOVÁ, J.; WALTEROVÁ, D. Natural phenolics in the prevention of uv-induced skin damage. A review. **Biomed. Papers**, v. 147, n. 2, p. 137–145, dez. 2003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15037894/>. Acesso em: 10 jun. 2025.

SANTOS, J. F. S. dos, ROCHA, J. E., BEZERRA, C. F., SILVA, M. K. N., DE MATOS, Y., DE FREITAS, T. S., DOS SANTOS, A. T. L., DA CRUZ, R. P., MACHADO, A. J. T., RODRIGUES, T. H. S., DE BRITO, E. S., SALES, D. L., ALMEIDA, W. O., DA COSTA, J. G. M., COUTINHO, H. D. M., & MORAIS BRAGA, M. F. B. Chemical composition, antifungal activity and potential anti-virulence evaluation of the *Eugenia uniflora* essential oil against *Candida* spp. **Food Chemistry**, v. 261, p. 233–239, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.04.015>. Disponível em: <https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/bmc.5723>. Acesso em: 18 abr. 2025.

SÁ-FILHO, G. F. de; *et al.* Plantas medicinais utilizadas na caatinga brasileira e o potencial terapêutico dos metabólitos secundários: uma revisão. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 10, n. 13, p. e140101321096, out. 2021. DOI: 10.33448/rsd-v10i13.21096. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/21096> Acesso em:

SALLES, E. C. S. **Ensaio metabonômico para avaliação prognóstica de pacientes submetidos à varicocelectomia visando melhora dos parâmetros seminais**. 2023. 82f. Dissertação (mestrado em Química) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2023. Disponível em: <https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/56782>. Acesso em: 28 ago. 2024.

SANTIAGO, M. C. P. A.; ANOS, M. R.; JESUS, M. S. C.; SOUZA, M. L. M.; PACHECO, S.; BIZZO, H. R. Análise e caracterização de taninos condensados por cromatografia líquida. **Brazilian journal of development**, Curitiba, v. 6, n. 8, p.61446-61462, ago. 2020. DOI:10.34117/bjdv6n8-533 Disponível em: <https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/BRJD/article/download/15514/12765/40105>. Acesso em: 04 abr. 2025.

SANTOS, E. C. F.; LIMA, J. M. A.; MACHADO, . C. B.; FERREIRA, M. R. A.; SOARES, L. A. L. Validation of stability-indicating LC method, degradation study, and

impact on antioxidant and antifungal activities of *Eugenia uniflora* leaves extract.

**Biomedical Chromatography**, v. 37. e. 5723, 2023. DOI:

<https://doi.org/10.1002/bmc.5723> Disponível em:

<https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/bmc.5723>.

Acesso em: 24 mar. 2025.

SHRIVER, D. F.; ATKINS, P. W. **Química inorgânica**. 4. ed. Porto Alegre: Bookman, 2006.

SILVA A, C. O.; LIMA R. A. Identificação das classes de metabólitos secundários no extrato etanólico dos frutos e folhas de *Eugenia uniflora* L. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental** Santa Maria, v. 20, n. 1, p. 381–388, 2016. DOI: 105902/2236117019537. Disponível em:

<https://periodicos.ufsm.br/reget/article/download/19537/pdf/101711> Acesso em: 13 jun. 2025.

SILVA, A. D. S.; KOWALSKI, L.; PAGNO, A, R.; PIANA, M. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE FLAVONOÍDES: UMA REVISÃO DE LITERATURA. **Revista Interdisciplinar em Ciências da Saúde e Biológicas**, v. 4, n. 1, p. 51-65, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.31512/ricsb.v4i1.119>. Disponível em:

<https://san.uri.br/revistas/index.php/ricsb/article/view/119> Acesso em: 03 abr. 2025.

SILVA, S. B.; GEMMA, S. F. B.; LIMA, F. T.; FERNANDES, A. L.; BRITTES, J. L. P.; MISUTA, M. S. ATIVIDADE DE PODA DE VEGETAÇÃO REALIZADA POR ELETRICISTA DE LINHA VIVA: UMA INTEGRAÇÃO DA ANÁLISE DO TRABALHO, ANÁLISE DE CLUSTER E BIOMECÂNICA. **Revista Ação Ergonômica**, v. 17, n. 1, 2023. DOI: <https://doi.org/10.4322/rae.v17e202305>.

Disponível em: <https://revistaacaoergonomica.org/doi/10.4322/rae.v17e202305> Acesso em: 24 set. 2024.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Spectrometric identification of organic compounds**. 7. ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2005.

SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia da Planta ao Medicamento**. 6. ed. 1104p. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2010. Disponível em: <https://search.worldcat.org/pt/title/Farmacognosia-da-planta-ao-medicamento/oclc/709814142>. Acesso em: 18 abr. 2025.

SOBEH, M.; EL-RAEY.; REZQ, S.; AABDELFATTAH, M. . O.; PETRUKK, G.; OSMAN, S.; EL-SSHAILY, A. M.; EL-BESHBISHY, H. A.; MAHMOUD, M. F.; WINK, M. Chemical profiling of secondary metabolites of *Eugenia uniflora* and their antioxidant, anti-inflammatory, pain killing and anti-diabetic activities: A comprehensive approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 240, p. 111939, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.111939>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31095981/> Acesso em: 18 abr. 2025.

SOBEH, M. *et al.* Chemical Profiling of the Essential Oils of *Syzygium aqueum*, *Syzygium samarangense* and *Eugenia uniflora* and Their Discrimination Using Chemometric Analysis. **Chemistry & biodiversity**, v. 13, n. 11, p. 1537–1550, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1002/cbdv.201600089> Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27447784/> Acesso em: 16 jun. 2025.

SOUZA, A. M.; POPPI, R. J. Experimento didático de quimiometria para análise exploratória de óleos vegetais comestíveis por espectroscopia no infravermelho médio e análise de componentes principais: um tutorial, parte I. **Quim. Nova**, v. 35, n. 1, p. 223-229, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422012000100039> Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/9JsN7MQQygC4CX46svZLJ4p/>. Acesso em: 19 set. 2024.

SOUZA, P. S. O.; SANTOS, M. T.; MONTEIRO, R. G.; ESPINDOLA, M. T. A.; SOUZA, H. J. S.; MONTEIRO, A. L. B.; CAMARA, C. A.; SILVA, T. M. S. Taninos e flavonoides das flores de *Eugenia uniflora* (MYRTACEAE). **Quim. Nova**, v. 45, N. 9, p. 1083-1091, 2022. DOI: <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170920> Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/bjZfJr3y764mjHWbpBTQCvj/>. Acesso em: 04. Abr. 2025.

SUSSULINI, A. **Metabolomics: from fundamentals to clinical applications**, 1st.ed., Springer: New York, 2017. *E-book*. Disponível em: <https://content.e-bookshelf.de/media/reading/L-8564650-543a91d6ca.pdf> Acesso em: 13 jun. 2025.

TONTINI, J. F.; SILVA, J. A.; FARIAS, M. S.; POLI, H. E. C. Respostas na fisiologia da digestão ruminal ao uso de taninos na alimentação de ruminantes. **Pubvet**, v. 15, n.3, p.1-14, mar. 2021. DOI: <https://doi.org/10.31533/pubvet.v15n03a780.1-14> Disponível em: <https://ojs.pubvet.com.br/index.php/revista/article/view/553>. Acesso em: 03 abr. 2025.

TENÓRIO, C. J. L., *et al.* Influence of major polyphenols on the anti-Candida activity of *Eugenia uniflora* leaves: Isolation, LC-ESI-HRMS/MS characterization and in vitro evaluation. **Molecules**, v, 29, n. 12, 2024. DOI:<https://doi.org/10.3390/molecules29122761> Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38930827/> Acesso em: 16 jun. 2025.

UNITED STATES. National Library of Medicine. **PubMed**. Bethesda, MD: NLM, [20-]. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov>. Acesso em: 16 jun. 2025.

VALENCIA, M. S. **Obtenção e caracterização de nanopartículas contendo polifenóis com potencial aplicação na indústria de alimentos**. 2020. 118f. Tese (Doutorado em ciências biológicas). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2020. Disponível em: <https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/39625>. Acesso em: 03 abr. 2025.

VIEIRA, L. V.; SCHMIDT, A. P.; BARBOSA, A. A.; FEIJÓ, J. O.; BRAUNER, C. C.; RABASSA, V. R.; CORRÊA, M. N.; SCHMIDT, E.; PINO, FF. A. B. D. Utilização de taninos como aditivo nutricional na dieta de ruminantes. **Arquivos de Ciências**



**Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, Umuarama, v. 23, n. 1cont., e2306, 2020.

Disponível em:

<https://unipar.openjournalsolutions.com.br/index.php/veterinaria/article/view/8040>.

Acesso em: 03 abr. 2025.

VASAS, A.; HOHMANN, J. Euphorbia diterpenes: isolation, structure, biological activity, and synthesis (2008-2012). **Chem Rev.**, v. 114, n. 17, p. 8579-8612, set. 2014.

DOI: <https://doi.org/10.1021/cr400541j>. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25036812/> Acesso em: 13 jun. 2025.

**WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Integrating traditional medicine into health systems.** Genebra: World Health Organization, 10 jul. 2024. Disponível em: <https://www.who.int/news/item/10-07-2024-integrating-traditional-medicine-into-health-systems>. Acesso em: 15 jun. 2025.

WILKINSON, L.; FRIENDLY, M. The History of the Cluster Heat Map. **The American Statistician**, v. 63, n. 2, p. 179-184, 2009. DOI: 10.1198/tas.2009.0033. Disponível em: <https://www.datavis.ca/papers/HeatmapHistory-tas.2009.pdf>. Acesso em: 11 maio. 2025.

WEINSTEIN, J. Biochemistry. A postgenomic visual icon. **Science**, v. 319, p. 1772–1773, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1151888> Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18369130/> Acesso em: 13 jun. 2025.

WIESKE, L. H. E.; ERDÉLYI, Non-uniformsamplingforNOESY?Acasestudyon spiramycin. **Magn Reson Chem.**v. 59, p. 723–737, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1002/mrc.5133>Disponível em: <https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mrc.5133>. Acesso em: 07 abr. 2025.

WU, W.; MASSART, D. L.; DE JONG, S.; The kernel PCA algorithms for wide data. Part I: Theory and algorithms. **Chemom. Intell. Lab. Syst.**, v.36, p.165-172, abr. 1997. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0169-7439\(97\)00010-5](https://doi.org/10.1016/S0169-7439(97)00010-5) Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169743997000105> Acesso em: 13 jun. 2025.

ZAGOSKINA, N. V. *et al.* Polyphenols in plants: Structure, biosynthesis, abiotic stress regulation, and practical applications (review). **International journal of molecular sciences**, v. 24, n. 18, 2023. DOI: 10.3390/ijms241813874. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms241813874>. Acesso em: 05 jun. 2025.

ZANUSSO, P. W.; MARÍÑO, P. A.; MALDANER, G.; GONÇALVES, R. P. Phytochemical screening of *Eugenia uniflora* L. leaf extracts. **Research, Society and Development**, v. 12, n.4, 2023. DOI: <https://doi.org/10.33448/rsd-v12i4.41060> Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/41060>. Acesso em: 14 agt. 2023.

ZHANG, Z.; LI, X.; SANG, S.; MCCLEMENTS, D.J.; CHEN, L.; LONG, J.; JIAO, A.; JIN, Z.; QIU, C. Polyphenols as plant-based nutraceuticals: Health effects, encapsulation, nano-delivery, and application. **Foods**, v. 11, n. 15, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods11152189> Disponível em: <https://www.mdpi.com/2304-8158/11/15/2189> Acesso em: 13 jun. 2025.

## APÊNDICE

### NOTA DE IMPRENSA

#### **Pesquisa da UFPE investiga alterações nas concentrações de metabólitos em folhas de *Eugenia Uniflora* L. (pitangueira) em função da sazonalidade**

Você sabia que a composição das folhas de uma planta, como a pitangueira, pode variar ao longo do ano devido a fatores como **sazonalidade**, método de extração e local de coleta? Essas variações influenciam a quantidade/concentração de metabólitos secundários, responsáveis pelos efeitos medicinais da planta e relacionados à sua adaptação ao ambiente.

Com o intuito de investigar essas mudanças, a mestrande **Chaianne Kaialle da Silva Nascimento**, sob orientação do professor **Ricardo Oliveira da Silva**, no Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQUI) da **Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)**, desenvolveu um estudo utilizando extrato de folhas de *Eugenia uniflora* L. (**pitangueira**) coletadas em diferentes épocas do ano. O objetivo foi observar uma tendência de agrupamento das amostras em função da sazonalidade, analisando assim qual/quais metabólitos se destacam nessa separação.

A pesquisa utilizou a espectroscopia de **Ressonância Magnética Nuclear (RMN)**, **Metabonomica** e **Quimiometria**. Foram realizadas as análises exploratórias: Análise de Componentes Principais (PCA), Análise Hierárquica de Cluster (HCA) e *Heatmap* (mapa de calor) a partir dos dados obtidos com as informações espectrais. Os resultados da PCA e do HCA indicaram a formação de dois grupos, denominados de **G1** (amostras coletadas entre **outubro** e **março**), que tinham uma **maior concentração relativa de compostos fenólicos**; e **G2** (amostras coletadas entre **abril** e **setembro**). A partir dos resultados obtidos com o mapa de calor, o **G2** continha as amostras com um **maior teor relativo de terpenos**.

Ao contrário de outras técnicas mais complexas e demoradas, o método utilizado neste estudo permite uma análise rápida e eficiente dos extratos. Isso indica que, a partir de um teste rápido e sofisticado, os pesquisadores podem separar as amostras a partir da classe de metabólitos secundários de interesse. Esses resultados são interessantes, pois podem guiar a época do ano em que seria mais propícia a colheita de folhas da pitangueira, objetivando uma maior incidência desses metabólitos. Todavia, em casos de mudanças climáticas, a amostra pode ser classificada com mais segurança, pois a classe de compostos é a variável usada para a discriminação.

Este estudo é parte da **dissertação de mestrado de Chaianne Kaialle da Silva**

**Nascimento**, sob orientação do professor Ricardo Oliveira da Silva, com **bolsa financiada pela CAPES**. A pesquisa destaca a importância da ciência interdisciplinar para valorização da medicina popular, unindo as áreas de Química, Farmácia e Estatística Multivariada, em benefício da sociedade.