

ANA JÚLIA BORIM DE SOUZA

**INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS DA DISPONIBILIDADE
HÍDRICA EM PARÂMETROS FOTOSSINTÉTICOS E NO
METABOLISMO ESPECIALIZADO DE “PATA-DE-VACA”
Bauhinia unguolata NA ERA DAS MUDANÇAS CLIMÁTICAS**

Bauru, SP

2020

ANA JÚLIA BORIM DE SOUZA

**INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS DA DISPONIBILIDADE
HÍDRICA EM PARÂMETROS FOTOSSINTÉTICOS E NO
METABOLISMO ESPECIALIZADO DE “PATA-DE-VACA”
Bauhinia unguolata NA ERA DAS MUDANÇAS CLIMÁTICAS**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências, Bauru, para a obtenção do título de Mestre em Biociências (Área do Conhecimento: Aplicação da Diversidade Biológica).

Orientador: Dr Luiz Leonardo Saldanha

Co-Orientadora: Dr^a Anne Lígia Dokkedal

Bauru, SP

2020

De Souza, Ana Júlia Borim.

Investigação dos efeitos da disponibilidade hídrica em parâmetros fotossintéticos e no metabolismo especializado de "pata-de-vaca" *Bauhinia unguolata* na era das mudanças climáticas / Ana Júlia Borim de Souza, 2020

90 f.: il.

Orientador: Luiz Leonardo Saldanha

Dissertação (Mestrado)-Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências, Bauru, 2020

1. Flavonoides. 2. Metabolômica. 3. Padronização. 4. Planta Medicinal. I. Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências. II. Título.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE ANA JÚLIA BORIM DE SOUZA, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS, DA FACULDADE DE CIÊNCIAS - CÂMPUS DE BAURU.

Aos 17 dias do mês de fevereiro do ano de 2020, às 14:00 horas, no(a) Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Prof. Dr. LUIZ LEONARDO SALDANHA - Orientador(a) do(a) Instituto de Biociências de Rio Claro / UNESP, Prof^ª. Dr^ª. FERNANDA MARIA MARINS OCAMPOS do(a) Embrapa Instrumentação Agropecuária (CNPDIA), Prof. Dr. LUIZ FERNANDO ROLIM DE ALMEIDA do(a) Dep Botânica / Instituto de Biociências de Botucatu, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de ANA JÚLIA BORIM DE SOUZA, intitulada **INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS DA DISPONIBILIDADE HÍDRICA EM PARÂMETROS FOTOSSINTÉTICOS E NO METABOLISMO ESPECIALIZADO DE "PATA-DE-VACA" Bauhinia unguolata NA ERA DAS MUDANÇAS CLIMÁTICAS**. Após a exposição, a discente foi arguida oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo recebido o conceito final: ---
APROVADA ---. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Prof. Dr. LUIZ LEONARDO SALDANHA *Luiz Leonardo Saldanha*
Prof^ª. Dr^ª. FERNANDA MARIA MARINS OCAMPOS *Fernanda m. m. Campos*
Prof. Dr. LUIZ FERNANDO ROLIM DE ALMEIDA *por ser circunstâncias*

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Luiz Leonardo Saldanha, mais do que pela orientação, por se esforçar ao máximo para se fazer presente durante todo o meu mestrado, mesmo que a milhares de quilômetros de distância, por acreditar em mim e ter me ensinado tanto sobre algo completamente novo para mim. Tenho o maior carinho, respeito e admiração.

À Prof^a Dra. Anne L. Dokkedal, que me aceitou em seu laboratório e grupo de pesquisa, e contribuiu diversas vezes na elaboração e execução desse trabalho.

À Prof^a Dra. Inês Cechin, que me concedeu o uso da estufa agrícola, e independente de chuva ou sol, me acompanhou durante a realização de todo o experimento.

Ao Dr. Luiz Alberto Colnago, e à Dra. Fernanda M. M. Ocampos que me auxiliaram e possibilitaram realizar as análises de RMN. E principalmente à Fernanda, que me ensinou muito, e se tornou uma grande inspiração para mim.

Ao Jardim Botânico Municipal de Bauru, por me cederem as sementes e mudas de *Bauhinia* para possibilitar a execução desse trabalho.

Aos colegas de laboratório, Fernanda, Beatriz, Matheus e Júlia pela constante colaboração, e por tornarem nossos dias de trabalho mais alegres.

Ao Rafael Catoia, que me ajudou muito nas análises estatísticas, e pela paciência com as minhas constantes mudanças de opinião sobre a execução dos testes.

Aos meus pais Júlio e Ana Paula, que me incentivam a correr atrás dos meus sonhos, independentemente de qualquer dificuldade, apoiam minhas decisões e me servem de exemplo. Eu amo muito vocês.

A minha vó Ivone, que me recebia todos os dias em sua casa com muito amor e carinho.

Ao André, que renunciou à minha presença diversas vezes, e me incentiva a seguir esse caminho que eu escolhi.

DE SOUZA, Ana Júlia Borim. Investigação dos efeitos da disponibilidade hídrica em parâmetros fotossintéticos e no metabolismo especializado de “pata-de-vaca” *Bauhinia unguolata* na era das mudanças climáticas. 2020. 90 f. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências, Faculdade de Ciências, Bauru, 2020).

Resumo

Bauhinia unguolata L. (Fabaceae) é utilizada na medicina tradicional para o tratamento de diabetes, pela presença de flavonoides com potencial hipoglicemiante e esses metabólitos estão envolvidos na sobrevivência das plantas. Períodos de seca são limitantes da fotossíntese e interferem no metabolismo da planta, o que é preocupante dado à previsão de mudanças climáticas, e devem ser analisados sob o ponto de vista agrônomo para garantir material vegetal com qualidade para produção de fármacos. Visando avaliar os impactos da variação da disponibilidade hídrica em plantas medicinais, este trabalho teve como objetivo avaliar parâmetros fotossintéticos e o metabolismo especializado de espécimes de *B. unguolata* submetidos a três diferentes períodos de irrigação: diária (Controle), com interrupções por sete dias (7D) e por quinze dias (15D) durante 90 dias. Amostras de folhas foram congeladas, liofilizadas e submetidas a extração com MeOH 70% em ultrassom. Numa primeira etapa foi realizada análise fitoquímica do extrato por RMN 1D e 2D e por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrômetro de massas de alta resolução (UHPLC-HRMS). A anotação dos compostos foi realizada por comparação de espectros disponíveis na plataforma *Global Natural Products Social (GNPS)* e organizados em uma rede de moléculas. Variações no metabolismo especializado foram investigadas por meio de análises em espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) com abordagem metabolômica seguida de análise multivariada. Parâmetros fotossintéticos foram investigados *in planta* através da mensuração de trocas gasosas por meio de um analisador de gás infra-vermelho (IRGA). O estudo fitoquímico possibilitou a identificação de treze flavonoides derivados de quercetina, canferol, miricetina, isorhamnetina e datiscetina, além de 4,4'-dihidroxibenzil e prolina. A análise dos parâmetros fotossintéticos mostrou que a variação da disponibilidade hídrica reduziu a condutância estomática, fotossíntese e transpiração nos grupos 7D e 15D em comparação com o grupo controle ($p > 0.05$). A partir da análise multivariada, foi possível observar alterações nos espectros de RMN de ^1H na região dos sinais 6 a 7 ppm, e na região 1,80-3,9 ppm atribuída à prolina, um aminoácido responsável por conferir proteção osmorreguladora em resposta a situações de seca severa. Esse aminoácido foi correlacionado positivamente ao grupo 15D, diferentemente dos sinais da região dos compostos fenólicos. Esses resultados mostram que a diminuição da disponibilidade hídrica induziu alterações nos parâmetros fotossintéticos, que reduzem a produção de matéria verde e compostos fenólicos de interesse medicinal em *B. unguolata*. Essas alterações têm impactos negativos tanto no fornecimento de material para produção de fármacos, quanto para a sua sobrevivência em condições previstas nos cenários das mudanças climáticas, que preveem maiores períodos de seca num futuro próximo. Entretanto, do ponto de vista agrônomo, os resultados indicam que apenas uma irrigação por semana, por até 60 dias, não ocorre alterações significativas no acúmulo de biomassa e substâncias relevantes no ponto de vista medicinal.

Palavras-chave: Flavonoides; Metabolômica; Padronização; Planta Medicinal.

DE SOUZA, Ana Júlia Borim. **Literature on screen:** Investigation of the effects of water availability on photosynthetic parameters and on the specialized metabolism of “pata-de-vaca” *Bauhinia unguolata* under the climate changes. 2020. 90 p. Dissertation (Masters in bioscience). São Paulo State University (UNESP), School of Sciences, Bauru, 2020.

Abstract

Bauhinia unguolata L. (Fabaceae) is used in traditional medicine for the treatment of diabetes, due to the presence of flavonoids with hypoglycemic potential. Dry periods are limiting photosynthesis and interfere with plant metabolism, which is worrisome given the prediction of climate change, and should be analyzed from an agronomic point of view to ensure plant material with quality for the drugs production. In order to evaluate the impacts of the variation in water availability in medicinal plants, this study aimed to evaluate photosynthetic parameters and specialized metabolism of *B. unguolata* specimens submitted to three different periods of irrigation: daily (Control), with interruptions for seven days (7D) and for fifteen days (15D) for 90 days. Leaf samples were frozen, freeze-dried and extracted with 70% MeOH on ultrasound. In a first step, phytochemical analysis of the extract was performed by 1D and 2D NMR and by ultra efficiency liquid chromatography coupled to a high resolution mass spectrometer (UHPLC-HRMS). A molecular network (MN) was generated using the Global Natural Products Social Platform (GNPS) workflow. Compounds in the MN were annotated against the GNPS spectral database in level 2. Variations in specialized metabolism were investigated by nuclear magnetic resonance (NMR) spectrometer analyses with metabolomic approach followed by multivariate analysis. Photosynthetic parameters were investigated *in planta* by measuring gas exchange by means of an infra-red gas analyzer (IRGA). The phytochemical study allowed the identification of thirteen flavonoids derived from quercetin, canferol, myricetin, isorhamnetin and datiscetin, in addition to 4,4'-dihydroxybibenzand and proline. The analysis of photosynthetic parameters showed that the variation in water availability reduced stomatal conductance, photosynthesis and transpiration in the 7D and 15D groups compared to the control group ($p > 0.05$). From the multivariate analysis, it was possible to observe changes in the ^1H NMR spectra in the region of signals 6 to 7 ppm, and in the region 1.80-3.9 ppm attributed to proline, an amino acid responsible for conferring osmorregulatory protection in response to drought situations. This amino acid was positively correlated to the 15D group, differently from the signals of the phenolic compounds region. These results show that the decrease in water availability induced changes in photosynthetic parameters, which reduce the production of green matter and phenolic compounds of medicinal interest in *B. unguolata*. These changes have negative impacts on the supply of material for drug production and on plant survival under conditions predicted in climate change scenarios, which predict longer periods of drought in the near future. From the agronomic point of view, our results indicate that only one irrigation per week, for up to 60 days, dont cause significant changes in the accumulation of biomass and substances relevant from the medicinal point of view.

Keywords: Flavonoids; Medicinal Plant; Metabolomics; Standardization.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	8
1.1 <i>BAUHINIA UNGULATA</i> L.	11
1.2. FLAVONOIDES	15
1.3. MUDANÇAS CLIMÁTICAS	16
1.4 EFEITOS DO DÉFICIT HÍDRICO	17
1.5 ANÁLISE FITOQUÍMICA COM ABORDAGEM METABOLÔMICA	20
1.6. PRODUÇÃO AGRONÔMICA DE PLANTAS MEDICINAIS	22
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
3 OBJETIVOS	28
3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
4. MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1. PROPAGAÇÃO E OBTENÇÃO DAS MUDAS DE <i>BAUHINIA UNGULATA</i>	29
4.2. ACLIMATAÇÃO DAS PLANTAS EM ESTUFA AGRÍCOLA	30
4.3. DESENHO EXPERIMENTAL PARA ESTUDO DE DISPONIBILIDADE HÍDRICA	31
4.4. ANÁLISES DE PRODUÇÃO DE BIOMASSA, CONDUTÂNCIA ESTOMÁTICA E DE TROCAS GASOSAS	31
4.5. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS	32
4.6 ANÁLISE DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR	32
4.7 ANÁLISE UHPLC-ESI-HRMS	33
4.8 PROCESSAMENTO DE DADOS OBTIDOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA-EFICÊNCIA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS (UHPLC-HRMS)	34
4.9 ANÁLISE DE REDES DE MOLÉCULAS	35
4.10. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	35
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1. ANÁLISE FITOQUÍMICA DO EXTRATO DE <i>BAUHINIA UNGULATA</i>	37
5.1.1. Identificação de metabólitos majoritários por RMN	38
5.1.2. Análise do extrato por UHPLC-HRMS e desreplicação por rede de moléculas	57
5.2. ANÁLISE DOS EFEITOS INDUZIDOS PELA VARIAÇÃO DA DISPONIBILIDADE HÍDRICA	62
5.2.1. Análise dos parâmetros fotossintéticos	62
5.2.2. Estudo de metabolômica por RMN	70
5.3 APLICAÇÃO AGRONÔMICA	73
5.4 MUDANÇAS CLIMÁTICAS	74
6. CONCLUSÃO	76
7. REFERÊNCIAS	78

1. INTRODUÇÃO

Uma vez que o Brasil detém extensa e diversificada flora, concebendo aproximadamente um terço da biodiversidade do mundo, é interessante estudos fitoquímicos para exploração do ambiente e a descoberta de novos produtos naturais ativos (YUNES; PEDROSA; CECHINEL FILHO, 2001). A partir disso, há possibilidade de somar para o crescimento do país, uma vez que gera conhecimentos botânicos e químicos, e de matérias prima naturais e comercializáveis (BRAZ FILHO, 2010).

A utilização de plantas como forma de tratamento contra inúmeras doenças vem ganhando cada vez mais espaço no mercado mundial, em que os fitoterápicos movimentam, aproximadamente, 60 bilhões de dólares anualmente (HAWKINS, 2008), com uma taxa de aumento de 15% ao ano no Brasil (CATI, 2017). Esta é também, a forma mais antiga utilizada para prevenções e curas de doenças, inicialmente na forma de chás e de emplastros. E com o avanço obtido ao longo dos anos, extratos vegetais têm o uso como matéria-prima, a fim de obter compostos ativos para o desenvolvimento racional de medicamentos ou de fitoterápicos em sua forma bruta ou fracionada (YUNES; PEDROSA; CECHINEL FILHO, 2001; NEWMAN; CRAGG, 2016).

O espaço crescente adquirido pelos fitoterápicos pode ser explicado pela revalorização dos medicamentos naturais, uma vez que grande parte da população os consome por acreditar que são mais baratos, menos tóxicos, além de promoverem baixas ou nenhuma dependência no uso (CRAGG; NEWMAN; SNADER, 1997). Em alguns países industrializados, como Canadá, França, Itália e Alemanha, o uso de produtos da medicina natural atende de 70 a 90% de sua população, que opta por essa forma de tratamento sobre a denominação de complementar, alternativa ou não convencional (WHO, 2011). Essa tendência é explicada pela busca de opções naturais e adoção de estilos de vida saudáveis para prevenir e remediar doenças (BRASIL, 2012).

E essa revalorização por plantas medicinais levou grandes companhias farmacêuticas a investirem em pesquisas que viabilizem o uso de extratos de plantas, uma vez que os compostos em mistura apresentam ação sinérgica e,

portanto, vantagens comparadas a uma substância pura, como por exemplo, a redução de efeitos colaterais (HOSTETTMAN; QUEIROZ; VIEIRA, 2003).

A Organização Mundial da Saúde OMS (1998), define planta medicinal como sendo todos os vegetais que apresentarem, em um ou mais órgãos, substâncias com fins terapêuticos, ou precursores de fármacos semissintéticos. Sua transformação em fitoterápico ocorre a partir de estudos multidisciplinares, validação e padronização, e esse processo conta com pesquisas étnica, botânica, química e farmacológica (PEREIRA; CARDOSO, 2012).

Comunidades tradicionais desempenham importante função para a etnofarmacologia, ao transmitir por séculos a tradição do consumo de plantas como forma de remediar ou prevenir doenças. Esses conhecimentos estimulam pesquisadores a iniciar suas investigações sobre o potencial medicinal e como garantir se há ou não uso seguro e eficaz dessas plantas (GOTTLIER; BORIN, 2003; BALBINO; DIAS, 2010).

Na América do Sul, espécies de *Bauhinia* L. são exemplos de plantas utilizadas na medicina popular. Povos indígenas utilizavam chás de suas folhas como forma de remédios para diabetes, dores, inflamações ou infecções microbianas (GUPTA, 1995; CAVALCANTI; FAVORETO; LINK, 2005; MALI *et al.*, 2007; CECHINEL FILHO, 2009). Porém, são poucas as espécies de plantas desse gênero que foram estudadas fitoquímica e farmacologicamente. Todavia, a partir dessas poucas variedades em questão é que se identificou compostos naturais de interesse, como lactonas, terpenoides, esteroides, taninos e principalmente os compostos fenólicos (SILVA; CECHINEL FILHO, 2002).

Estudos farmacológicos confirmaram experimentalmente as atividades antioxidantes e hipoglicemiantes de algumas espécies de *Bauhinia*, e atribuíram essa atividade farmacológica aos compostos fenólicos, dentre eles os flavonoides (AHMED, *et al.*, 2012).

Um estudo com *Bauhinia variegata* L., demonstrou melhoria no metabolismo de carboidratos atribuído aos menores níveis de glicemia no sangue de camundongos diabéticos (PEPATO, *et al.*, 1998). Em *Bauhinia cheilantha* (Bong.) Steud, foi comprovada atividade hipoglicemiante (ALMEIDA;

XAVIER; GUEDES, 1997), bem como em *Bauhinia monandra* Kurz. em estudos *in vivo* (MENEZES, *et al.*, 2007).

Estudos realizados com *Bauhinia holophylla* (Bong) Steud, identificaram diferentes cianoglicosídeos não-cianogênicos, dentre eles o composto litospermosídeo. Esse metabólito apresentou forte atividade hipoglicemiante observada por meio de testes de tolerância à glicose e avaliação da glicemia em camundongos diabéticos, quando comparado com Metformina® (SALDANHA, 2017; CAMAFORTE, *et al.*, 2019).

Bauhinia forficata L., é a espécie do gênero mais difundida na medicina tradicional considerada como a pata-de-vaca “verdadeira” por ser a espécie mais efetiva no tratamento do diabetes, segundo as comunidades, e com maior quantidade de trabalhos científicos publicados sobre suas propriedades. Além das atividades antifúngica e diurética (LUZ, *et al.*, 1996), seu potencial hipoglicemiante tem sido muito pesquisado ao longo dos anos (JULIAN, 1929; RUSSO, *et al.*, 1990; MARMITT; REMPEL, 2016), o que a tornou disponível no mercado farmacêutico para o tratamento de diabetes (SILVA; CECHINEL FILHO, 2002) e a colocou na lista de interesse do SUS (BRASIL, 2009).

A partir dessas informações, é nítido que *Bauhinia* possui diversas espécies com potencial para descoberta de produtos naturais farmacologicamente ativos. No entanto, espécies do gênero carecem de estudos que viabilizem seu uso racional e sustentável (VAZ; TOZZI, 2003; FARAG, *et al.*, 2015). Por isso, a investigação de espécies desse gênero, se faz extremamente importante, uma vez que já foi apresentado o seu potencial no controle de índices glicêmicos em geral.

Os principais constituintes químicos identificados em *B. forficata* são flavonoides presentes em relativa abundância, sendo a kaempferitrina, descrita como o principal composto responsável pela atividade hipoglicemiante (MENDES; MACHADO; FALKENBERG, 2006; MARMITT; REMPEL, 2016). Outros flavonoides com atividade hipoglicemiante, são Canferol e Quercetina (COPP, 2003). Já identificados em *Bauhinia unguolata* L. anteriormente (GANIKO-DUTRA; SALDANHA; DOKKEDAL, 2018), essas substâncias presentes na folha podem, portanto, indicar que a espécie seja uma potencial planta medicinal com propriedades antidiabéticas.

Segundo Morais *et al.* (2005), *B. unguolata* é utilizada por índios Tapebas no Ceará, por causa da sua ação hipoglicemiante no tratamento do diabetes e para casos de diarreia (BIESKI, *et al.*, 2012). Alguns trabalhos apontam a presença de diferentes flavonoides nas folhas de *B. unguolata* que apresentam uma ampla gama de atividades biológicas, incluindo ação antioxidante, anti-inflamatória, antitrombótica, antialérgica, além de conseguirem inibir enzimas relacionadas à tumorigênese, e induzir sistemas enzimáticos desintoxicantes (MIEAN; MOHAMED, 2001).

1.1 *Bauhinia unguolata* L.

Bauhinia unguolata, também conhecida popularmente como “pata-de-vaca” ou “mororó”, é uma espécie nativa do Brasil, com distribuição geográfica centralizada principalmente nas regiões: Norte (Acre, Amazonas, Amapá, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins); Nordeste (Ceará, Maranhão e Piauí); Centro-Oeste (Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso do Sul e Mato Grosso); Sudeste (Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo), e Sul (Paraná), com domínios fitogeográficos evidentes na Amazônia, Cerrado e Mata Atlântica (VAZ, 2014).

Apresenta-se como arbusto ou arvoreta, que pode variar de 2-6m de altura. Têm flores actinomorfas, noturnas, brancas e nectaríferas. Polinização noturna dada por morcegos, uma vez que florescem no período de seca (abril a agosto), sendo a única fonte de alimento para esses animais durante esses meses. Frutifica em julho a outubro, e é, portanto, uma angiosperma, cujos frutos, em forma de vagem, envolvem e protegem suas sementes, e esta é uma característica da família Fabaceae (ou Leguminosae), na qual é pertencente (DUTRA, *et al.*, 2009).

As folhas são unifoliadas, bilobadas (Figura 1), de tamanho aproximado de 1,2 a 3,3 por 2,2 a 5,8 cm, 9 a 11 nervuras, estípulas com 2 mm de comprimento, lanceoladas; folíolos divididos de um terço à metade, lobos subreniformes a elípticos, margem inteira, face abaxial purulenta, com tricomas glandulares, face adaxial glabra; nectário rudimentar. Inflorescência pseudoracemosa, pluriflora, terminal; cálice de 5 a 9,3 cm de comprimento, tubuloso, ferrugíneo, purulento externamente; corola 2,3 a 3,8 cm de

comprimento, pétalas brancas, linear-lanceoladas; estames heterodínamos com 3,8 a 6 cm de comprimento, filetes irregularmente unidos na base formando uma coluna, anteras de 0,8 a 1,2 cm de 40 comprimento; estaminódios ausentes; ovário com 1,5 cm de comprimento, estipitado, purulento, estilete com 3,3 cm de comprimento, glabro, estigma oblíquo, clavado. Legume planocompresso, 13 a 15,5 por 1,5 cm, apiculado, puberulento; 9 a 14 sementes, 1 por 0,5 cm, obviadas, esverdeadas (DUTRA; GARCIA; LIMA, 2008).

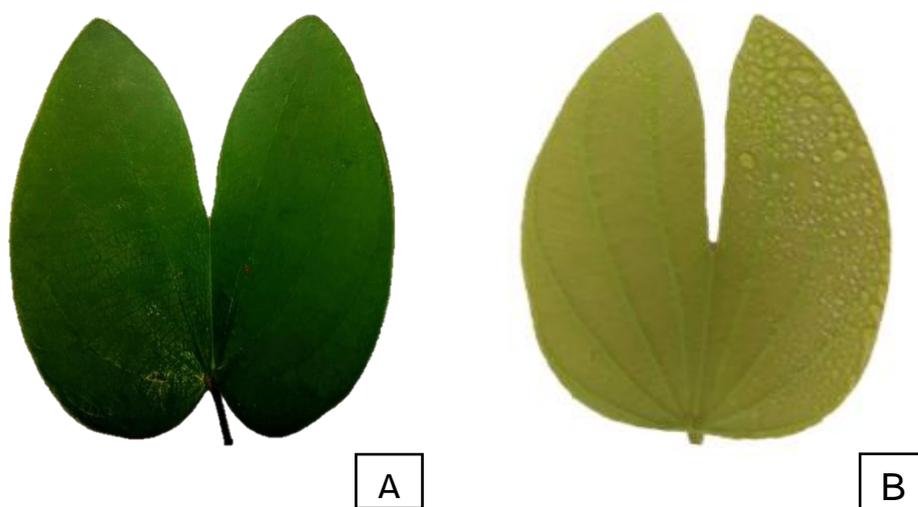
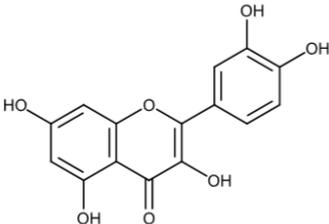
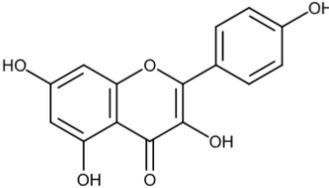
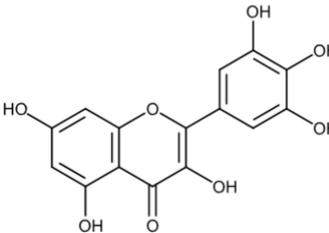
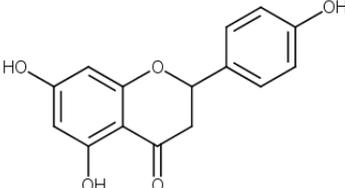
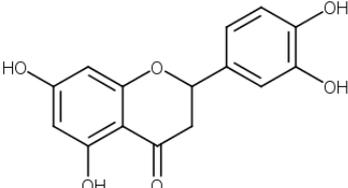
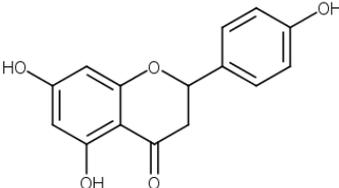


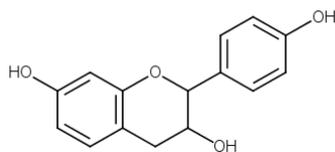
Figura 1. Folhas bilobadas **A)** Face adaxial e **B)** Face abaxial de *Bauhinia unguolata*.

A espécie *B. unguolata* foi escolhida para esse estudo por ser nativa e com ampla distribuição no Cerrado da região de Bauru (CAVASSAN; WEISER, 2015). Além disso, o gênero *Bauhinia* é similar tanto morfológicamente como fisiologicamente (VAZ; TOZZI, 2003), apresentando importantes metabólitos de interesse farmacológico, como os apresentados na já distribuída comercialmente *B. forficata* (SILVA; CECHINEL FILHO, 2002). Por fim, estudos recentes apontam a presença de diferentes flavonoides nas folhas de *B. unguolata* que apresentam ação antioxidante, anti-inflamatória, antitrombótica, antialérgica e hipoglicemiantes (Tabela 1).

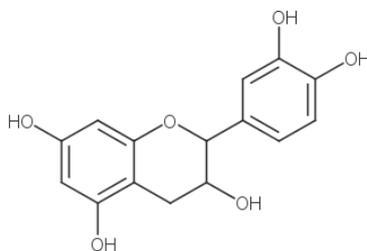
Tabela 1. Flavonoides encontrados em *Bauhinia unguolata*.

Composto	Estrutura	Referência
Quercetina		GANIKKO-DUTRA; SALDANHA; DOKKEDAL, 2018. DE SOUSA, <i>et al.</i> , 2016. MAIA NETO, <i>et al.</i> , 2008. PAULA, <i>et al.</i> , 2014.
Canferol		GANIKKO-DUTRA; SALDANHA; DOKKEDAL, 2018. MAIA NETO, <i>et al.</i> , 2008. PAULA, <i>et al.</i> , 2014.
Miricetina		GANIKKO-DUTRA; SALDANHA; DOKKEDAL, 2018.
Naringenina		DE SOUSA, <i>et al.</i> , 2016.
Eriodictiol		DE SOUSA, <i>et al.</i> , 2016.
Liquiritigenina		DE SOUSA, <i>et al.</i> , 2016.

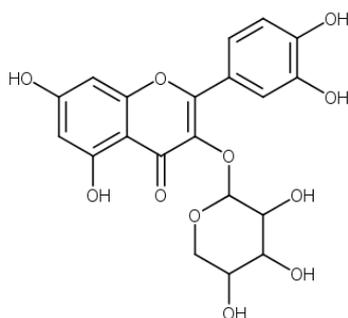
Guibourtinidol

DE SOUSA, *et al.*, 2016.

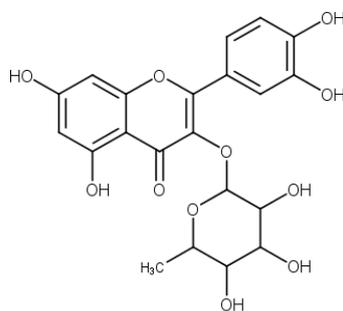
Fisetinidol

DE SOUSA, *et al.*, 2016.

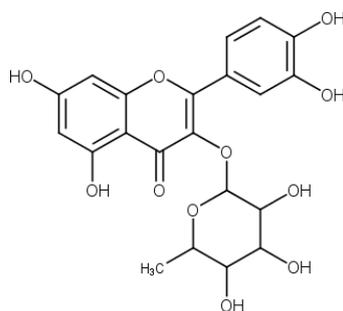
Avicularina

MAIA NETO, *et al.*, 2008.

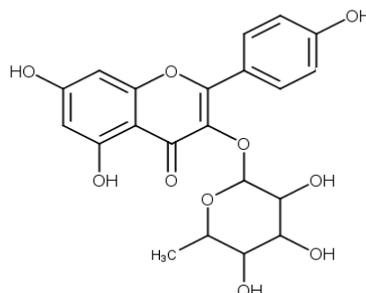
Quercitrina

MAIA NETO, *et al.*, 2008.

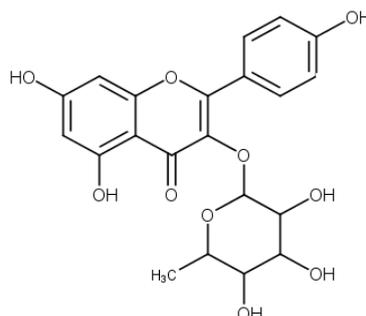
Astilbina

PAULA, *et al.*, 2014.

Engelatina

PAULA, *et al.*, 2014.

Afzelina

PAULA, *et al.*, 2014.

1.2. Flavonoides

Estudos preliminares demonstraram a presença de diferentes flavonoides nas folhas de *B. unguata* (Tabela 1). Esses compostos desempenham diversas funções nas plantas como pigmentos naturais com principal função na proteção contra danos produzidos por raios ultravioletas e visíveis, poluição ambiental e períodos de seca (MARTÍNEZ-FLÓREZ; *et al.*, 2002). Além de proteção contra herbívoros e ataques patogênicos, atuam também como meio de atração de polinizadores, hormônios vegetais, e inibidores de enzimas (ZUNAZZI; MONTANHA, 2003).

Os flavonoides, em sua maioria, apresentam um esqueleto estrutural formado pela presença de dois anéis aromáticos A e B, e um heterocíclico oxigenado, o anel C (WILHELM FILHO; DA SILVA; BOVERIS, 2001). Os átomos de carbono possuem numeração ordinária para o anel A, C e B, como é apresentado na Figura 2.

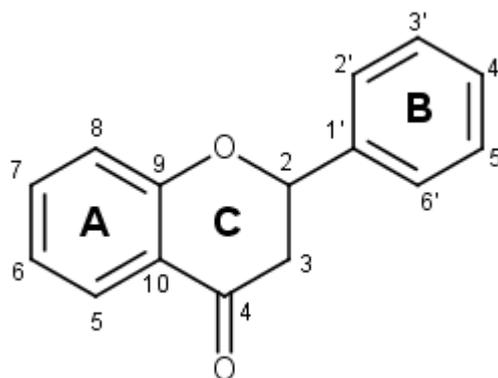


Figura 2. Estrutura molecular básica dos flavonoides.

Portanto, a presença de flavonoides nas folhas de *B. unguolata*, favorece a ocorrência de manutenções nos seus sistemas, permitindo-as se estabelecer frente a estresses do ambiente, garantindo a sua sobrevivência e perpetuando sua espécie (HARBORNE; WILLIAMS, 2000).

1.3. Mudanças climáticas

Correntemente, nas duas décadas que se passaram, o termo “mudanças climáticas” tem sido uma das mais importantes preocupações globais para pesquisadores e governantes (GUPTA, *et al.*, 2019). Isso porque, as previsões das alterações climáticas para os anos a seguir têm apontado condições críticas devido ao aquecimento global, tais como aumento do nível do mar; alterações no regime de suprimento de água continental; tempestades de neve e de chuvas fortes e mais frequentes; além de forte e rápido ressecamento do solo devido a períodos secos mais intensos e longos (MARENGO, 2006).

Tais mudanças tem impacto em diferentes níveis, como a saúde humana, umidade do ar, composição do solo, comunidades microbianas, plantas com seus componentes farmacologicamente ativos e segurança alimentar, florestas e biodiversidade, bem como o funcionamento de todo o ecossistema (LEPERTZ, *et al.*, 2009).

Fatores abióticos são importantes para o crescimento e desenvolvimento de plantas, e cada espécie precisa de condições ambientais especiais para o seu estabelecimento. Mudanças extremas nessas condições promovidas pelas

alterações climáticas, podem acarretar a extinção de uma espécie, ou estimular processos fisiológicos para enfrentar a adversidade ocasionada (ARBONA, *et al.*, 2013).

Estudos demonstraram a ação de metabólitos especializados na proteção contra estresses abióticos (MILLAR, *et al.*, 2007). Já em situação de seca severa, condição prevista devido ao aquecimento global, é analisada em diversos trabalhos que demonstram no conteúdo de metabólitos especializados de plantas, como terpenoides, compostos fenólicos, alcaloides e outros, pode aumentar (KLEINWÄCHTER; SELMAR, 2014).

No entanto, em condições de disponibilidade hídrica extremamente baixa, indaga-se sobre a existência de condições à todas as espécies em sobreviver nas novas situações em que estarão submetidas, e caso consigam se estabelecer, quais serão os ajustamentos que as permitirão a manutenção de seus processos fisiológicos. Por isso, entender as alterações metabólicas e bioquímicas induzidas pelo déficit hídrico causado pela variação na disponibilidade hídrica é essencial para avaliar como as plantas de interesse medicinal, responderão sob esse estresse, como isso influenciará em seu crescimento e desenvolvimento, e se essas respostas alterarão o teor de substâncias de interesse farmacológico com potencial prejuízo às propriedades medicinais.

1.4 Efeitos do déficit hídrico

O estresse em plantas pode ser definido como qualquer alteração que ocorra durante o desenvolvimento, que atrapalhe a homeostasia do vegetal, e o faça recorrer a diferentes mecanismos de resistência que promovam a aclimação. O déficit hídrico reduz a disponibilidade de água para os processos associados ao transporte de solutos, conduz mudanças nas concentrações de muitos metabólitos, além de ocasionar distúrbios nos hidratos de carbono, no metabolismo de aminoácidos, e até a destruição das membranas celulares (SANTOS; LIMA; MORGADO, 2010).

Essa deficiente disponibilidade hídrica na planta, pode comprometer a germinação e seu estabelecimento (HARRIS, *et al.*, 2002), promover a redução

da produção e o tamanho das folhas (NONAMI, 1998), dificultar a taxa de exportação de sacarose para órgãos superiores, e assim, afetar o desenvolvimento reprodutivo (FAROOQ, *et al*, 2009).

A exposição de plantas a certos estresses ambientais, leva a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO's), como ânion superóxido (O_2^-), radicais hidroxila (OH) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o qual pode elevar a concentração de malonildialdeído, substância essa, caracterizada por ser produto secundário da lipoperoxidação (MUNNÉ-BOSCH; PENUELAS, 2003). As ERO's podem reagir com proteínas e lipídios, causando danos oxidativos e prejudicando as funções normais das células (FOYER; FLETCHER, 2001).

A planta responde ao estresse ocasionado pela seca, a partir do fechamento de estômatos, o que evita a perda de água por transpiração. Com isso, ocorre uma diminuição na difusão do CO_2 para o mesófilo foliar, acarreta na redução da taxa fotossintética, e diminui o acúmulo de fotoassimilados, o que reduz a produtividade das culturas (SOUSA, R.; SOUSA, J., 2017).

Uma das respostas para a manutenção da sobrevivência das plantas em ambientes secos, é o ajustamento osmótico, via o acúmulo ou compartilhamento de solutos, e a sinalização para demais áreas da planta repetir a ação de defesa (BRITO *et al.*, 2008). Essa é a resposta mais comum dada pela planta frente ao estresse ocasionado pelo déficit hídrico, uma vez que a superprodução de diferentes tipos de solutos orgânicos como a prolina, glicinabetaína e ácidos orgânicos (SUBBARAO, *et al*, 2000), são compostos de baixo peso molecular e altamente solúveis, tornando-os não-tóxicos mesmo em altas concentrações (SERRAJ; SINCLAIR, 2002).

Em situações de déficit hídrico, ocorre um aumento dos fitohormônios como o etileno e o ácido abscísico (NILSEN; ORCUTTE, 1996), que são sinalizadores dos mecanismos de indução do acúmulo de prolina (SADIQOV, *et al*, 2002). Esse aminoácido protege a planta através de ajuste osmótico, desintoxicação de espécies reativas de oxigênio, estabilização de membranas e estruturas de enzimas e proteínas (FAROOQ, *et al*, 2009).

Devido à ampla distribuição da espécie *B. unguolata*, sugere-se que esta disponha de mecanismos fisiológicos e bioquímicos, baseados no acúmulo de

compostos, como os já mencionados osmorreguladores, sinalizadores de estresse, e polifenóis, que permite, sua ocorrência e sobrevivência sob condições de déficit hídrico (SANCHES; SILVA, 2013).

Flavonoides são amplamente descritos como agentes redutores, sequestrantes de radicais livres, o que lhes permite proteger a parede celular da planta estressada, por exemplo, por altas temperaturas, grande incidência de raios UV, e também, a deficiência hídrica (TAIZ; ZEIGER, 2013).

Selmar e Kleinwachter (2013), afirmam que as concentrações de metabólitos especializados aumentam expressivamente nas plantas em condições de seca, e também, afirmam que a combinação entre esse estresse, promovido pela deficiência hídrica, e o aumento no acúmulo desses metabólitos, provocam uma redução significativa no crescimento de várias espécies vegetais. Outro estudo realizado com capim-limão (*Cymbopogon citratus* DC) pertencente à Poaceae, em diferentes lâminas de irrigação sobre o efeito em seu rendimento e a composição de seu óleo essencial, permitiram confirmar que quanto maior o valor da lâmina de irrigação, menor o valor do rendimento do óleo, indicando que o déficit hídrico pode favorecer maior produção de óleo (PINTO *et al.*, 2014).

Segundo Aleman (2015), as técnicas de manejo de irrigação podem ser empregadas em diferentes culturas, dentre as quais se devem destacar o cultivo de plantas medicinais. Em virtude de existirem poucos estudos relacionados à demanda hídrica de plantas medicinais, torna-se importante quantificar essa disponibilidade, e determinar qual a linha tênue entre melhor produção de biomassa, e melhor produção de princípios ativos de interesse; além de garantir economia dos recursos hídricos disponíveis.

Descobrir quais são as mudanças que ocorrem no perfil químico, e determinar como as estimular, permitirá auxiliar na domesticação e padronização da sua produção, e responderá a um dos requisitos para entrar na lista de fitoterápicos do SUS, onde a “Comissão de Seleção de Plantas” instituída pela Portaria Ceme nº 093, de 07 de dezembro de 1982, exige a partir do “Critério botânico-econômico”, que haja ampla distribuição geográfica, disponibilidade atual, facilidade de cultivo, produtividade e identificação botânica, fazendo necessário o investimento na área de desenvolvimento de técnicas de propagação de plantas medicinais em geral (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

1.5 Análise fitoquímica com abordagem metabolômica

Abordagens como a metabolômica vêm modificando a forma de análise fitoquímica de processos que envolvem sistemas biológicos. Também conhecidas como “*omics*”, tais abordagens fazem uso de tecnologias analíticas com eficiente resolução, e fornece conjuntos de dados complexos sobre determinado fenômeno biológico, que são processados, tratados e correlacionados por análises estatísticas multivariadas para identificação de substâncias de importância biológica (WOLFENDER, *et al.*, 2009).

Alguns dados demonstram que o metabolismo especializado das plantas sofre maior influência de fatores ambientais, do que variações genéticas, ou seja, o fenótipo está mais relacionado a um padrão do meio ambiente, do que à estruturas genéticas, onde o perfil de metabólitos está diretamente associado às condições do plantio (MATSUDA, *et al.*, 2012). Estudos metabolômicos viabilizam analisar o fenótipo funcional de indivíduos, e fornece dados precisos, bem como, respostas fisiológicas a alterações bióticas e abióticas em diferentes níveis (FIELD, *et al.*, 2011).

A metabolômica, seguida de análise multivariada de dados, surge como uma ferramenta robusta para a análise de metabólitos especializados relevantes em sistemas biológicos (CANUTO *et al.*, 2018). Vários estudos têm obtido sucesso na identificação de alterações metabólicas ocasionadas em plantas em resposta a diferentes tipos de estresse físico (luz UV, calor, desidratação etc.); químico (como fármacos e agrotóxicos) ou biológico (patógenos, entre outros) (FUNARI *et al.*, 2013). Tradicionalmente as aquisições de dados em estudos de metabolômica têm sido realizadas por meio de técnicas analíticas como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e ou gasosa (CG) acopladas a espectrômetro de massas, ou ainda por ressonância magnética nuclear (RMN) (ABDELNUR, 2017).

O objetivo principal da metabolômica é detectar o maior número possível de metabólitos (quali- e quantitativamente) de uma amostra, o que pode fornecer uma imagem metabólica de um organismo vivo sob diferentes condições num determinado momento. Para viabilizar tal análise, é comum o uso de diferentes

plataformas para se obter uma ampla gama de substâncias de uma amostra (KIM; CHOI; VERPOORTE, 2010).

A ressonância magnética nuclear (RMN) tem sido aplicada na ciência química das plantas, podendo ser utilizada para distinguir as diferentes condições impostas aos vegetais partir de análises de seu perfil químico. Apesar da baixa sensibilidade quando comparada com a espectrometria de massas, a análise por RMN possibilita a detecção simultânea e quantitativa de diversos grupos de metabólitos, já que seus sinais são proporcionais à concentração molar real de substâncias presentes no extrato. Outra vantagem da RMN é a possibilidade de elucidação estrutural sem a necessidade de fracionamento do extrato e do uso de padrões (KIM; CHOI; VERPOORTE, 2010).

Já a espectrometria de massas (MS) é uma técnica que detecta a razão massa sobre a carga (m/z) de íons, gerados a partir de moléculas neutras ou carregadas em uma fonte de ionização, e para diversos tipos de substâncias passíveis de ionização, até mesmo voláteis, graças aos avanços nas fontes de ionização (ABDELNUR, 2017). Técnicas metabolômicas baseadas em MS oferecem excelente combinação de sensibilidade e seletividade, sendo uma plataforma indispensável para análises do perfil químico de plantas medicinais (LEI; HUHMAN; SUMMER, 2011).

A parte das vantagens e desvantagens de cada técnica, estas plataformas geram um alto volume de dados muitas vezes complexos de difícil interpretação. Uma estratégia é o pré-tratamento desses dados e posterior avaliação através de análises multivariadas. Técnicas como regressão por mínimos quadrados parciais PLS (*Partial Least Squares*), regressão por componentes principais PCR (*Principal Regression Components*), além das técnicas de reconhecimento de padrões PCA (*Principal Components Analysis*) e aglomeração HCA (*Hierarchical Cluster Analysis*). Essas técnicas possibilitam a identificação de variáveis de importância biológica para determinado processo biológico (ARAÚJO, *et al*, 2006).

A PCA é uma técnica útil para o reconhecimento de padrões, não supervisionada, que fornece informações sobre tendência a formação de grupos no conjunto de dados. A técnica reduz o número de variáveis presentes, de modo a expressar as informações relevantes contidas nas primeiras variáveis em um

menor número possíveis de variáveis, descrevendo as principais variações da matriz de dados (BRERETON, 2007). OPLS análise ortogonal discriminante por mínimos quadrados parciais, e é um método supervisionado e usado para discriminar duas ou mais componentes (TRYGG; WOLD, 2002).

Uma vez identificadas as variáveis de importância, é necessária a identificação de sua estrutura química. Atualmente, uma das formas de identificação de substâncias é através da comparação de espectros de massas com bancos espectrais disponíveis *on-line*, que tem possibilitado a anotação massiva de compostos com alto grau de confiança. Após esta etapa, a plataforma online, *Global Natural Products Social (GNPS)*, tem possibilitado a organização desses metabólitos, com base em íons comuns em seus espectros, em grupos de substâncias com similaridade estrutural por meio de redes moleculares (ALLARD, *et al.*, 2016; KIM; CHOI; VERPOORTE, 2010; WOLFENDER, *et al.*, 2019).

1.6. Produção agronômica de plantas medicinais

O Brasil é o décimo mercado farmacêutico mundial, no entanto ainda importa cerca de 80% da matéria-prima utilizada na produção de fitoterápicos, tornando o país altamente dependentes do mercado externo para garantir o abastecimento. Isso prejudica o desenvolvimento tecnológico e científico para produção de fármacos, e encarece o preço do produto, dificultando a concorrência comercial de medicamentos (ADAME; JACCOUD, COBRA, 2005; COSTA, *et al.*, 2014).

Haja vista, há a necessidade de contínuo fornecimento da matéria-prima de qualidade para viabilizar o seu uso medicinal de maneira segura e eficaz, sendo necessário estudos que forneçam subsídio a diferentes maneiras de domesticação, tendo em vista sua sobrevivência, garantindo um menor número possível de sua extração do meio natural, evitando assim a extinção, e permitindo maior independência frente ao mercado externo (AMARAL *et al.*, 2017).

O extrativismo, além de não ser recomendável para a manutenção da planta, uma vez que os coletores responsáveis podem não possuir treinamento

sobre técnicas que permitam a rebrota, e também não terem conhecimento sobre as características diagnósticas da espécie a ser extraída, podendo levar a identificação da espécie errada (ALVEZ; SANTOS; AZEVEDO, 2012).

Esse problema atinge as espécies de *Bauhinia*, já que possuem uma alta similaridade botânica (VAZ; TOZZI, 2003). Todas as espécies nomeadas popularmente como pata-de-vaca, apresentam folhas bifoliadas, nervura central com um único feixe e pecíolo calculado com projeções laterais. Essa uniformidade morfológica de seus órgãos vegetativos, dificulta a distinção principalmente de amostras estéreis (COSTA-SILVA, *et al.*, 2018). Em relação a composição química, estas espécies compartilham heterosídeos de flavonoides derivados principalmente de canferol e quercetina (CECHINEL, 2009; FARAG, *et al.*, 2015).

A alta similaridade morfológica das espécies de *Bauhinia*, resulta num grupo taxonômico de difícil identificação e a alta frequência de adulteração de seus fitoterápicos, por conta da identificação errônea das espécies, o que tem causado variação ou até mesmo ausência da atividade farmacológica esperada, como é destacada por diferentes estudos (VAZ; TOZZI, 2003; FERRERES *et al.*, 2012; CAMAFORTE, *et al.*, 2019).

Altas concentrações de diferentes flavonoides são determinantes para explicar as atividades biológicas de *Bauhinia* (FERRERES, *et al.*, 2012), como por exemplo, em *B. forficata*, cujo extrato foliar apresenta maiores concentrações de canferol e derivados, o que justifica sua atividade hipoglicemiante (PINHEIRO, *et al.*, 2006). Por isso, ao estabelecer correta identificação da espécie, reproduzir e desenvolvê-las agronomicamente, atendendo suas necessidades, garante material final com segurança e alta qualidade (ALVEZ; SANTOS; AZEVEDO, 2012).

Os metabólitos secundários, apresentam importante função na interação das plantas com o meio ambiente, uma vez que permitem sua sobrevivência frente a estresses bióticos e abióticos, permitindo que mantenham seu pleno desenvolvimento, até a fase de reprodução, que lhe habilite transmitir seus genes e manter sua espécie ativa ao longo dos anos (PEREIRA; CARDOSO, 2012).

Dado o papel específico dessas substâncias para a sobrevivência das plantas, Arimura e Maffei (2017), propõem que é mais pertinente a utilização do termo “especializados” ao invés de “secundários”.

O estudo fenotípico da planta medicinal permite elaborar técnicas que auxiliem na sua reprodução, tanto no seu desenvolvimento vegetativo, garantindo um maior número de biomassa por planta, quanto no desenvolvimento de situações e ambientes, que potencialmente estimulem a produção de um maior número de metabólitos especializados aumentando a concentração do princípio ativo de interesse. São diversos os fatores que influenciam o conteúdo desses metabólitos, como por exemplo, sazonalidade, ritmo circadiano, desenvolvimento, temperatura, radiação ultravioleta, nutrientes, poluição atmosférica, altitude, indução por estímulos mecânicos ou ataques de patógenos, além de disponibilidade hídrica (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Uma etapa inicial importante à produção de qualquer planta medicinal em escala comercial, é pesquisar o seu comportamento a partir das características climáticas da região em que será inserida, aos tratos culturais e às condições biológicas que interferem em seu desenvolvimento de biomassa, e acúmulo de metabólitos especializados, para garantir a padronização de seu cultivo, uma vez que é possível reproduzir essas características estimulantes a produção de seus princípios ativos de interesse, sem diminuir seu crescimento de massa verde (SCHWERZ, 2013).

Promover a produção agrícola de *B. unguolata* e plantas medicinais em geral, permite também, viabilizar a conservação das espécies, já que são plantas cada vez mais prejudicadas pelas mudanças climáticas, as quais tendem a mudar as características do meio ambiente em que estão inseridas, inviabilizando sua homeostasia, e até a sua continuidade (GUPTA, *et al.*, 2019). Dado esse fator, é interessante também, analisar a capacidade das plantas em geral, frente aos fatores alterados pelas condições climáticas, a fim de prever se há a possibilidade de sobrevivência delas em um futuro não tão distante.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Desde a industrialização mundial, gases como CO₂, CH₄ e N₂O, aumentaram de maneira exorbitante, preocupando muito a comunidade científica, uma vez que estes são os responsáveis por promover o aquecimento global (LEPERTZ, *et al.*, 2009). Apesar de acordos para reduzir a emissão desses gases, o clima continuará a mudar por pelo menos as próximas centenas de anos, dado a inércia da circulação oceânica e os sistemas atmosféricos (IPCC, 2014). As projeções para futuro próximo e distante indicam mudanças na precipitação, aumentando os períodos de seca (SILVA; PAULA, 2009).

O déficit hídrico tem sido bastante investigado na produção agrícola brasileira; são várias pesquisas que estudam respostas de diversas cultivares frente a baixa disponibilidade hídrica, bem como o trabalho de Zandalinas *et al.* (2017) que demonstrou alteração na produção de flavonoides em *Citrus* spp. que atuam como fotoprotetores e antioxidantes, com função de mitigar os efeitos nocivos do estresse; ou Gava *et al.* (2018), que teve sua pesquisa focada em estresse hídrico e a produção de soja, e demonstrou que a resposta da cultura à irrigação está relacionada principalmente às características genéticas de cada cultivar.

Porto, Klar e Vasconcellos (1998), que estudaram o efeito do déficit hídrico no sorgo, o qual apresentou resultados a variação no status de água na folha observado através do potencial e do teor relativo de água nas folhas. Isso pode ser utilizado para indicar o momento de irrigar, e ainda indicar as plantas ou cultivares de sorgo que mostram maior tolerância à seca.

Em contrapartida, muitas plantas nativas com potencial medicinal recém comprovado experimentalmente, como *B. unguata*, não apresentam estudos frente aos fatores abióticos que podem alterar a produção de substâncias de interesse bem como viabilidade de produção de biomassa para produção de fitoterápicos, ou suas adaptações frente a baixa disponibilidade hídrica prevista. Observa-se que plantas medicinais com uso popular, encontra-se próximo ao estado silvestre, submetidas a diversas condições ambientais, e as informações sobre o impacto destes fatores na produção de metabólitos especializados

provém principalmente de esforços de pesquisa para aumentar a produção de princípios ativos de espécies medicinais aromáticas (MORAIS, 2009).

As possíveis variações de solo e clima nos ambientes onde espécies de interesse ocorrem, demonstram dificuldades na padronização de extratos vegetais para o uso seguro, já que o metabolismo vegetal tem grande influência pela variação de nutrientes no solo e pelo clima, como mostrado por Saldanha (2017), em seu estudo com espécimes de *Myrcia bela*, (Myrtaceae) localizados em diferentes regiões de Cerrado no Brasil. As propriedades do solo têm grande influência no conteúdo de taninos e flavonoides nas populações de *M. bela* em diferentes regiões.

Por isso, o estudo agrônômico em condições controladas pode garantir novos conhecimentos para viabilizar padronizações na produção de plantas medicinais, e também pode permitir um maior número de opções para o pequeno e médio produtor garantir sua renda, e assegurar a qualidade nos extratos a partir destas plantas, e pode até ser disponibilizado a indústrias farmacêuticas que trabalham com os metabólitos de interesse medicinal (ALVEZ; SANTOS; AZEVEDO, 2012). O estudo agrônômico se faz importante principalmente para o grupo *Bauhinia*, onde a similaridade morfológica, discutida anteriormente, pode levar a erros na identificação das espécies e gerar adulteração e variação do conteúdo de metabólitos e prejudicar a atividade medicinal (COSTA-SILVA, *et al.*, 2018).

Os flavonoides são importantes compostos por serem capazes de afetar vários sistemas enzimáticos e funções biológicas dos mamíferos, sendo a capacidade antioxidante uma das ações mais estudadas desses compostos. Isso, porque são substâncias capazes de retardar as reações de degradação oxidativa, a qual é ocasionada pelo próprio metabolismo humano, e formar naturalmente espécies reativas ao oxigênio (ERO's), ou também chamados, radicais livres (BARREIROS; DAVID, 2006).

O excesso de radicais livres no organismo tem ação deletéria, uma vez que consegue alterar as estruturas celulares quando ligadas às mesmas, e, possui vida longa, e potencial para atravessar membranas das células, apresentando elevada toxicidade (BARBOSA, *et al.*, 2010). Estes excedentes podem ser impedidos pelos flavonoides, uma vez que realiza o sequestro direto

de espécies reativas de oxigênio (ROS) ao doar átomos de hidrogênio, ativa enzimas antioxidantes, retira substâncias, como o cobre e o ferro, ou algumas enzimas responsáveis por ativar esses radicais, entre outras atividades que diminuem ou impeçam essa oxidação (AMIC, *et al.*, 2014).

Estudos que avaliem a produção e acúmulo de substâncias de interesse medicinal são importantes para elaboração de estratégias de conservação para garantir a produção contínua da planta (SCHWERZ, 2013). As ciências “ômicas” buscam o entendimento do funcionamento celular dos organismos e suas alterações biológicas, e a metabolômica trata-se, portanto, do estudo das alterações dos metabólitos (CANUTO, *et al.*, 2018).

Os metabólitos gerais são produtos do metabolismo, encontrado na maioria dos sistemas vivos e essenciais ao crescimento e a vida. Metabólitos secundários (especializados), também são produtos com função na diferenciação de grupos taxonômicos restritos, e biossintetizados a partir de um ou mais metabólitos gerais, não correlacionados ao crescimento do organismo (VERPOORTE, 2000). Metabolismo consiste em toda a matéria e energia em organismos que permite os considerar fisicamente como seres-vivos. São associados a outras definições da “vida”, como organização, emergência, autonomia, crescimento, desenvolvimento, reprodução, adaptação, capacidade de respostas e até evolução (BODEN, 1999).

O conjunto de todos os metabólitos de baixa massa molecular, presentes ou alterados em um sistema biológico é chamado de metaboloma. Pesquisas relacionadas a metabólitos, que é definida como metabonômica, consiste na medida quantitativa da resposta metabólica de um sistema biológico após estímulos fisiopatológicos ou modificações genéticas (OLIVER, *et al.*, 1998). Já a metabolômica é a análise abrangente e quantitativa do metaboloma de um sistema biológico (FIEHN, 2001).

Monitorar as reações de um organismo sob diferentes estresses abióticos, como situações de déficit hídrico, permitirá criar situações ou espaços que garantam sua sobrevivência e alta produção, tanto de biomassa, quanto de metabólitos especializados (PORFIRIO *et al.*, 2014).

3 OBJETIVOS

Investigar os efeitos induzidos pela variação da disponibilidade de água nos parâmetros fotossintéticos e no metabolismo especializado de *B. unguolata*, e demonstrar se haverá impacto em seu cultivo e sua sobrevivência em períodos secos promovidos pelas mudanças climáticas

3.1. Objetivos específicos

Para isso, espécimes de *B. unguolata* foram submetidas a diferentes períodos de irrigação, e os seguintes parâmetros foram analisados:

- Trocas gasosas e biomassa seca;
- Perfil fitoquímico do extrato foliar por UHPLC-HRMS² e RMN;
- Análise metabolômica por RMN.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Propagação e obtenção das mudas de *Bauhinia unguolata*

Os espécimes de *B. unguolata* foram obtidos por meio de propagação de sementes coletadas em agosto/2015, de árvores matrizes localizadas no Jardim Botânico Municipal de Bauru (JBB) às margens da Rodovia Comandante João R. de Barros – SP 225 (22°20'30" S e 49°00'30" W). As sementes foram propagadas em setembro de 2015 após tratamento com ácido sulfúrico (H_2SO_4 concentrado a 98%) por um período de cinco minutos, e em seguida rinçadas em água (Figura 3).

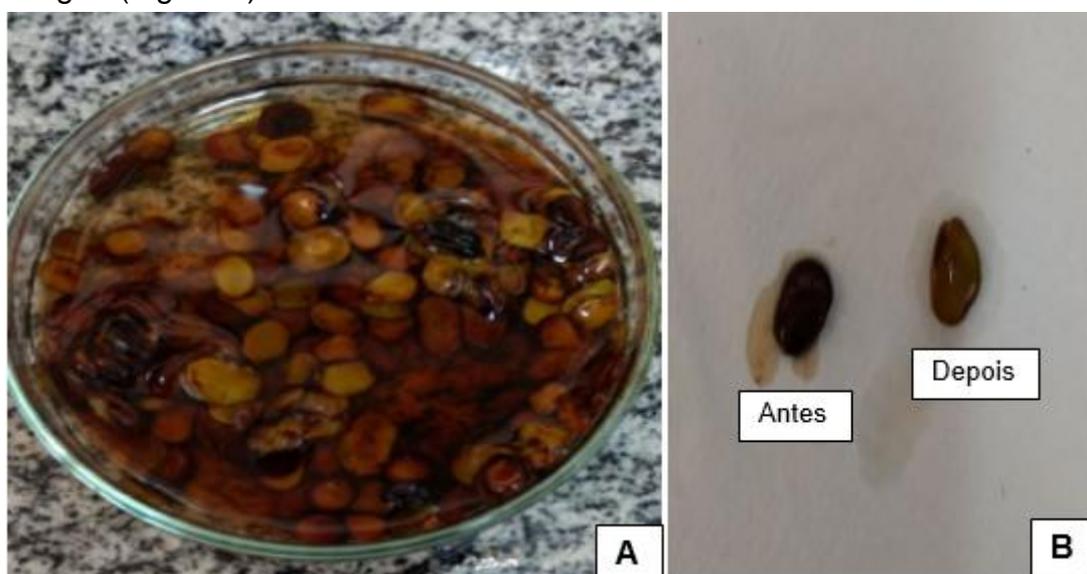


Figura 3. Sementes de *Bauhinia unguolata* **A)** mergulhadas em ácido sulfúrico para quebra de dormência, **B)** à esquerda antes do beneficiamento e à direita após o beneficiamento para estimular a germinação (2017).

Posteriormente, as sementes foram dispostas em bandejas com substrato estéril (Figura 4), e permaneceram alocadas em casa de vegetação semicoberta, recebendo irrigação três vezes ao dia, além da aplicação de fertilizantes NPK (10:10:10) e calda bordalesa, mensalmente, visando promover seu pleno crescimento e prevenir possíveis ataques de patógenos até a data do experimento.



Figura 4. Sementes de *Bauhinia unguolata* dispostas em bandeja para propagação (2017).

4.2. Aclimação das plantas em estufa agrícola

Assim que as mudas completaram três anos de idade, foram acondicionadas em vasos de 8 L, com substrato “Carolina” composto por turfa, vermiculita, resíduo orgânico agroindustrial classe A e calcário. Foram aclimatadas por 30 dias, além de mantidas durante todo o experimento em estufa agrícola Van der Hoeven, em parceria com a professora Dra. Inês Cechin, localizada na Faculdade de Ciências, Bauru, São Paulo, Brasil (22°21’28” S, 49°01’37” W) (Figura 5).



Figura 5. Mudas de *B. unguolata* com mesmo período fisiológico, alocadas na estufa agrícola Van der Hoeven (2018).

A irrigação foi controlada por gotejamento sob fotoperíodo natural de outubro a dezembro de 2018, sendo a radiação fotossintética ativa dentro da casa de vegetação igual a 70% das condições à céu aberto. A variação da temperatura dentro da estufa foi controlada com sistema de ventilação e monitorada por um termômetro. As temperaturas obtidas durante o experimento foram médias máximas de 30,7°C e as médias mínimas de 22,0 °C.

4.3. Desenho experimental para estudo de disponibilidade hídrica

As plantas foram divididas em três grupos experimentais, de modo casual com irrigação controlada, e descrita abaixo:

- Irrigação contínua (Grupo Controle);
- Irrigação interrompida por sete dias (Grupo 7D);
- Irrigação interrompida por quinze dias (Grupo 15D).

As avaliações de trocas gasosas *in planta* e coletas de amostras de folhas para análise metabólica foram realizadas com três repetições por tratamento por coleta (n=3), a cada quinze dias ao longo de três meses, num total de seis coletas (SANCHES; SILVA, 2013). A irrigação nos grupos 7D e 15D eram retomadas por 24 h após a coleta de folhas e análises de parâmetros fotossintéticos.

4.4. Análises de produção de biomassa, condutância estomática e de trocas gasosas

A produção de biomassa, foi avaliada através da massa de matéria seca das folhas (*MSF*). As folhas coletadas foram congeladas em -80°C e posteriormente secas a frio por meio de liofilização. A massa obtida foi apresentada em g planta⁻¹.

As análises de trocas gasosas foram realizadas utilizando um Analisador de Gás Infravermelho (IRGA), modelo LCpro (ADC, Hoddesdon, UK). Os dados de condutâncias estomática (g_s) foram apresentados em mol m⁻² s⁻¹, taxa de assimilação de CO₂ (*A*) em μmol m⁻² s⁻¹, os de transpiração (*E*) em mmol de H₂O

$\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, e os da concentração de CO_2 na cavidade subestomática (C_i) em $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. A eficiência instantânea do uso da água (EUA) foi calculada a partir dos dados de trocas gasosas (A/E) e é dada pela função $(\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}) (\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1})^{-1}$.

As mensurações foram feitas entre 8 e 10 horas da manhã, dentro da estufa agrícola, sob luz natural e temperatura ambiente, com pressão parcial de dióxido de carbono e pressão do vapor de água do ar de $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e as folhas foram mantidas sob esse valor até que estado estacionário fosse alcançado.

4.5. Obtenção dos extratos

Após a coleta das folhas, o material vegetal foi imediatamente armazenado em freezer a -80°C e seco a frio por meio de liofilização. Após completa secagem, o material vegetal foi triturado em moinho de facas e uma alíquota de 50 mg foi separada. A extração foi realizada em ultrassom por 20 minutos utilizando 1,5 ml de metanol e água deuterados ($\text{CD}_3\text{OD}:\text{D}_2\text{O}$) na proporção 7:3 (v/v). Em seguida os tubos foram centrifugados a 6585,6 g por 20 minutos, o sobrenadante coletado e eluído em cartucho de extração em fase sólida C-18 (SPE) (500 mg/3mL), para remoção de substâncias lipofílicas. Uma alíquota de 600 μL dos extratos obtidos foram depositados em tubos de 5 mm para posterior análise em espectrômetro de ressonância magnética nuclear (RMN) (KIM; CHOI; VERPOORTE, 2010).

4.6 Análise de Ressonância Magnética Nuclear

As análises de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram realizadas na Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias - EMBRAPA Instrumentação, localizada em São Carlos, SP, sob a responsabilidade do Professor Dr. Luiz Alberto Colnago. Os extratos foram analisados em espectrômetro AVANCE III HD 600, operando a 14,1 T, observando os núcleos de ^1H e ^{13}C a 600,13 e 150.90 MHz respectivamente, de detecção multinuclear

de 5mm com gradiente z. Todos os deslocamentos químicos foram observados em relação ao sinal do tetrametilsilano (TMS), em 0,00 ppm, como referência interna. Os espectros de ^1H foram adquiridos com uma janela espectral de ~20 ppm, 32 k pontos, utilizando a sequência de pulsos Bruker noesygppr1d, para eliminação do sinal da água. Os preenchidos com zeros para 64 k pontos e ampliação da linha exponencial de 0,3 Hz foi aplicada. Após a transformada de Fourier, a fase e a linha de base foram ajustadas. Os mapas de correlação heteronuclear ^1H - ^{13}C a uma ligação (HSQC) e a longa distância (HMBC) foram otimizados para uma média de constantes de acoplamento $^1J_{(\text{H,C})}$ e $^{\text{LR}}J_{(\text{H,C})}$ de 140 e 8 Hz, respectivamente.

4.7 Análise UHPLC-ESI-HRMS

A análise de cromatografia líquida de ultra-eficiência acoplada a espectrômetro de massas de alta resolução (UHPLC-HRMS) foi realizada em cromatógrafo *Waters Acquity UPLC IClass* acoplado a espectrômetro de massa *Q-Exactive Focus* (Thermo Scientific, Bremen, Germany), utilizando-se de uma fonte ionizada por electrospray aquecido (HESI-II). As separações foram realizadas em coluna *Acquity UPLC BEH C18*, 130 Å, 1,7 μm , 2,1 mm X 150 mm mantida a 60°C. A fase móvel consistiu em 0,1% de ácido fórmico em água ultrapura (solvente A) e em Acetonitrila (solvente B) grau massas. A vazão foi de 0,75 mL/min; o gradiente desenvolvido foi: 5% B para 50% B em A em 4 min; 50-95% B em A em 3 min; 95% B em 1 min; 5% B em 2 min com tempo total de 10 min. O volume de injeção foi de 2 μL .

Os parâmetros otimizados da fonte de ionização (HESI-II) foram: voltagem da fonte 3,5 kV; fluxo de gás (N_2), 48 unidades; fluxo de gás auxiliar, 11 unidades; fluxo de gás sobressalente, 2,0 unidades; temperatura do capilar, 300°C, *S-Lens RF Level*, 55. O analisador de massa foi calibrado usando uma mistura de cafeína, acetato de metionina, arginina, fenil alanina (MRFA), sulfato de dodecil de sódio, taurocolato de sódio, e *Ultramark 1621* em uma solução de acetonitrila/metanol/água contendo 1% de ácido fórmico por injeção direta.

Os eventos de MS/MS dependentes foram realizados nos três íons mais intensos detectados na verificação completa da MS (Experimentos *Top 3*). A largura da janela do MS/MS foi de 2 Da, e a energia de colisão normalizada (ECN) foi colocada em 35 unidades. Nos experimentos MS/MS dependentes de dados, varreduras completas foram adquiridas em uma resolução de 35.000 fwhm (a m/z 200) e MS/MS em a 17.500 fwhm, ambos com tempo máximo de injeção de 50 ms. Depois de serem adquiridas na varredura MS/MS, os pares de íons foram alocados na lista de exclusão dinâmica por 3,0 s.

As análises de UHPLC-HRMS foram realizadas em parceria com os Professores Dr. Jean-Luc Wolfender e Dr. Emerson Ferreira Queiroz da Universidade de Genebra, Suíça.

4.8 Processamento de dados obtidos por cromatografia líquida de ultra-eficiência acoplada a espectrometria de massas (UHPLC-HRMS)

Os dados brutos obtidos do UHPLC-HRMS foram convertidos para mzXML usando o software MS converter (*Proteowizard*) e analisados no programa MZmine 2.10 para detecção de picos, filtração de picos, construção do cromatograma, deconvolução do cromatograma, agrupamento isotrópico de pico, alinhamento do cromatograma e preenchimento de lacunas (*gap filling*).

Os parâmetros usados para processamento dos dados foram: nível de ruído a 1×10^6 para MS¹ e 0 para MS². Os cromatogramas foram construídos usando o modelo ADAP com os seguintes parâmetros: tamanho mínimo de grupo de 5, altura mínima de 1×10^6 , e tolerância m/z de 0,001 Da (ou 10 ppm). A deconvolução do cromatograma foi realizada usando modelo *wavelets* (ADAP) como o algoritmo para reconhecimento de picos, m/z e a faixa de RT para o emparelhamento de varredura MS² foi de 0,3 Da e 0,1min, o limite S/N foi 50, altura mínima do recurso foi 5×10^5 , limite de coeficiente/área foi 90, intervalo de duração de pico foi 0,02-1,5 min, e o intervalo da RT *wavelets* foi de 0,02-0,05.

Os cromatogramas foram então de-isotopados por um algoritmo de agrupamento de picos isotópicos com uma tolerância m/z de 0,001 Da e uma tolerância RT de 0,05 min. O alinhamento dos picos foi realizado usando um alinhador, com tolerância m/z ajustada a 0,001 Da, tolerância absoluta RT a 0,05

min, e peso para m/z e RT a 30. A lista de picos ausentes pós o alinhamento foi preenchida pelo preenchimento das lacunas de mesmo módulo de preenchimento de intervalos RT e m/z com uma tolerância m/z de 0,001 Da. Após o preenchimento das lacunas, todas as listas de picos foram feitas com a identificação dos adultos. Esse tratamento resultou em uma lista de picos de 1579 íons (*features*) que foi posteriormente filtrado para uma lista de picos de 704 íons que possuíam espectro de MS² dependentes. Essa lista resultante de 704 íons foi exportada como entrada para geração da rede de moléculas (dados MS¹ e MS²).

4.9 Análise de Redes de Moléculas

A rede de moléculas (RM) com espectros MS² da *Bauhinia unguolata* foi gerada usando o fluxo de trabalho da plataforma online da *Global Natural Products Social Molecular Networking* (GNPS). Os espectros MS² foram então agrupados com o *MS-Cluster* com uma tolerância de massa em 0,02 Da para criar espectros de consenso, e espectros de consenso contendo menos de dois espectros foram descartados. Uma rede foi então criada onde as arestas foram filtradas para ter um valor de cosseno acima de 0,7 e mais de 6 picos correspondentes. As arestas mais distantes entre dois nós foram mantidas na rede se e somente se cada um dos nós apareceu nos respectivos *top 10* nós mais semelhantes. Os espectros na rede foram então pesquisados nas bibliotecas espectrais disponíveis no GNPS. Todas os *hits* com pontuação acima de 0,7 e pelo menos 6 picos coincidentes foram mantidos na anotação.

4.10. Análises estatísticas

Os dados dos parâmetros ecofisiológicos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o programa estatístico R. Testes de normalidade foram realizados anteriormente. E os dados foram submetidos a análises de correlação de *Pearson* entre os parâmetros avaliados.

Para as análises metabolômicas, espectros de RMN de ^1H das amostras obtidas, foram tratados a partir da correção de fase e da linha de base, submetendo-os a transformações e pré-tratamentos, com o auxílio do software da Amix (Bruker Biospin GmbH). Desta forma os espectros foram inicialmente divididos em pequenos intervalos (buckets) de 0,04 ppm. A região do espectro correspondente à região de saturação do sinal da água/metanol e outras possíveis regiões indesejáveis foram excluídas das análises multivariadas. Em seguida, foram realizados diferentes pré-tratamentos estatísticos, visando enfatizar os compostos em baixa concentração, entre outras possibilidades.

Os dados foram submetidos à análise estatística pelo método de Análises dos Componentes Principais (PCA), a partir do software SIMCA (Umetrics, Umeå, Sweden), que gera gráficos *scores* e *loadings*, e possibilitou identificar os principais metabólitos alterados em cada tipo de tratamento.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para avaliar os efeitos induzidos pela variação da disponibilidade hídrica no metabolismo de *Bauhinia unguolata*, várias espécies foram distribuídas em estufa agrícola a fim de serem aclimatadas, e posteriormente, submetidas a diferentes regimes de irrigação. Os efeitos do déficit hídrico foram avaliados a cada quinze dias, durante um período total de noventa dias, através de análises de parâmetros fotossintéticos, produção de biomassa e perfil químico por ressonância magnética nuclear, e cromatografia líquida de ultra eficiência acoplado a espectrômetro de massas de alta resolução.

Para viabilizar o estudo de metabolômica, numa primeira etapa, foi realizado o estudo fitoquímico do extrato foliar por RMN e UHPLC-HRMS, como descrito nas seções seguintes.

5.1. Análise fitoquímica do extrato de *Bauhinia unguolata*

Através das análises por UHPLC-HRMS e por RMN, foi possível a identificação de 15 substâncias no extrato MeOH 70% das folhas de *B. unguolata*. As estruturas das substâncias são apresentadas na Figura 6.

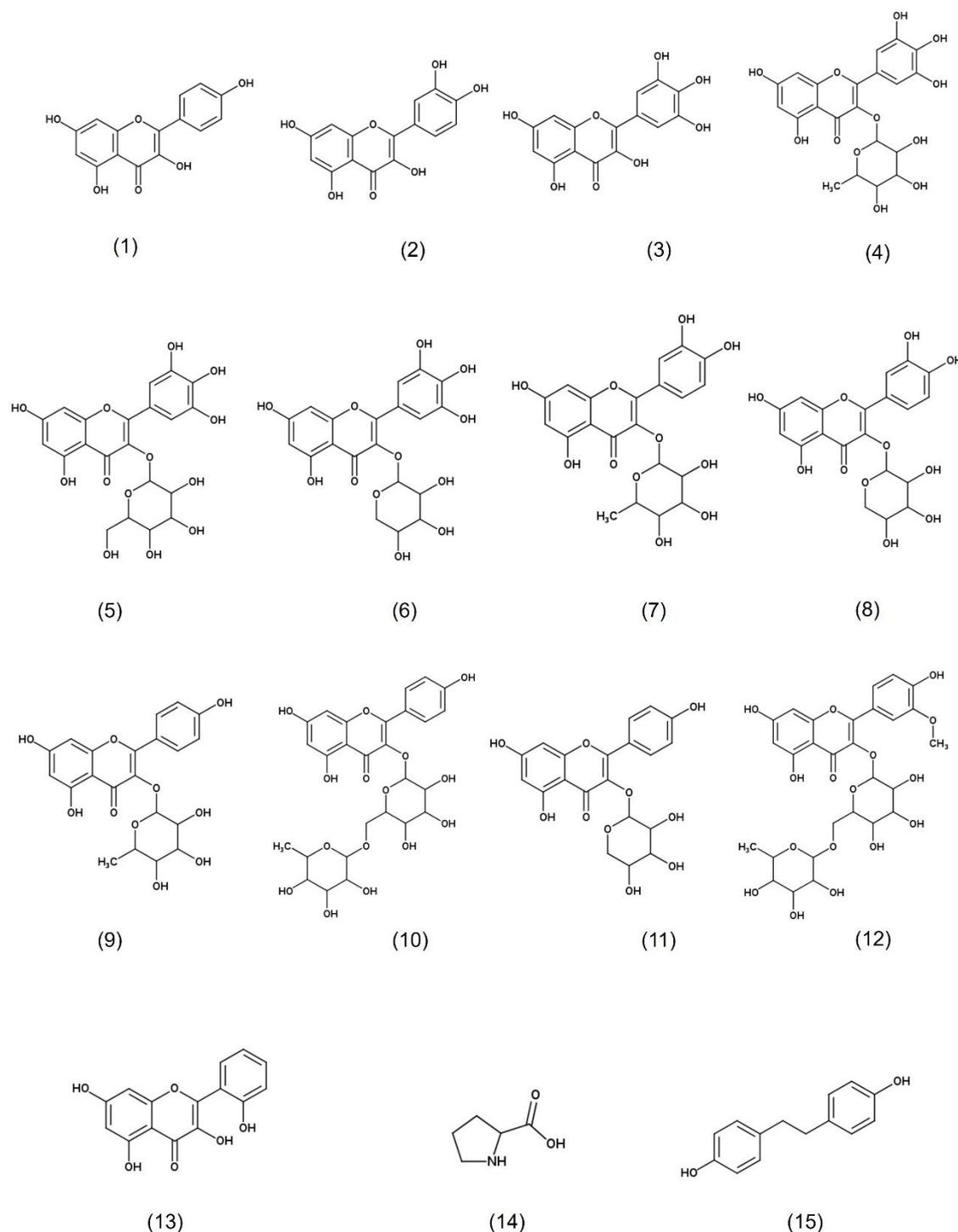


Figura 6. Estrutura das substâncias identificadas no extrato MeOH 70% das folhas de *Bauhinia unguolata* por meio de RMN direto do extrato e desrepliação por UHPLC-HRMS.

5.1.1. Identificação de metabólitos majoritários por RMN

A partir da análise direta do extrato CD₃OD:D₂O 70% de *B. unguolata* (Figura 7), foram identificados quatro compostos em *B. unguolata*, previamente descritos na literatura em espécies de *Bauhinia*, sendo dois flavonoides (1 e 2), um aminoácido (14) e um 4,4'-dihidroxibenzil (15).

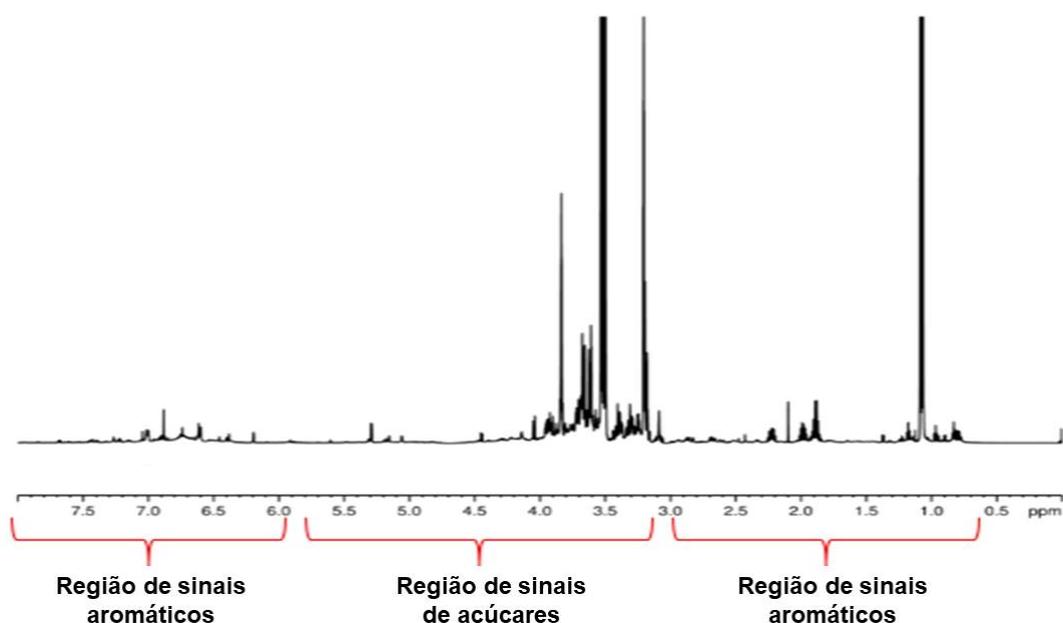


Figura 7. Expansão do espectro de ¹H RMN (de 0,5 a 8,0 ppm), e região de sinais característicos: 1 a 3 ppm para alifáticos; 3,5 a 5,9 ppm para açúcares e 6 a 8 ppm para aromáticos.

Foram identificados no espectro de RMN de ¹H (Figura 8) dois flavonoides diferentes (1 e 2). O sistema de spins do dubleto δ 6,19 (d; *J* = 2,2 Hz; H-6) corresponde aos hidrogênios do anel A das duas moléculas, uma vez que apresentaram deslocamento químico semelhante, e integrais superiores (~1,5) quando comparadas aos sinais de hidrogênios dos outros sistemas de spins das duas moléculas. Já em δ 6,40 (d; *J* = 2,2 Hz; H-8), notamos se tratar do deslocamento químico para o hidrogênio 8, também do anel A, referente a estrutura 1, uma vez que o valor de sua integral (0,5), é equivalente às integrais dos demais sinais de hidrogênios presentes na molécula, e se apresentando menos intensa quando comparada a integral da estrutura 2, posicionada em δ 6,38 (d; *J* = 2,2 Hz; H-8), cujo valor foi igual a 1, e também equivale as integrais dos demais sinais referentes a sua molécula.

A diferença entre as duas estruturas pode ser observada no anel B, que apresenta na primeira molécula uma hidroxila no carbono 4', enquanto na segunda molécula, há duas hidroxilas nos carbonos 3' e 4'.

Na primeira estrutura molecular (1), são observados dois dubletos de diferentes intensidades na região dos aromáticos. São eles: δ 7,68 (d; $J = 8,8$ Hz; H-2' e H-6') e δ 6,90 (d; $J = 8,8$ Hz; H-3' e H-5'), cujas constantes de acoplamento e integrais possibilitaram afirmar que é um anel parassubstituído, conformando simetria ao anel B.

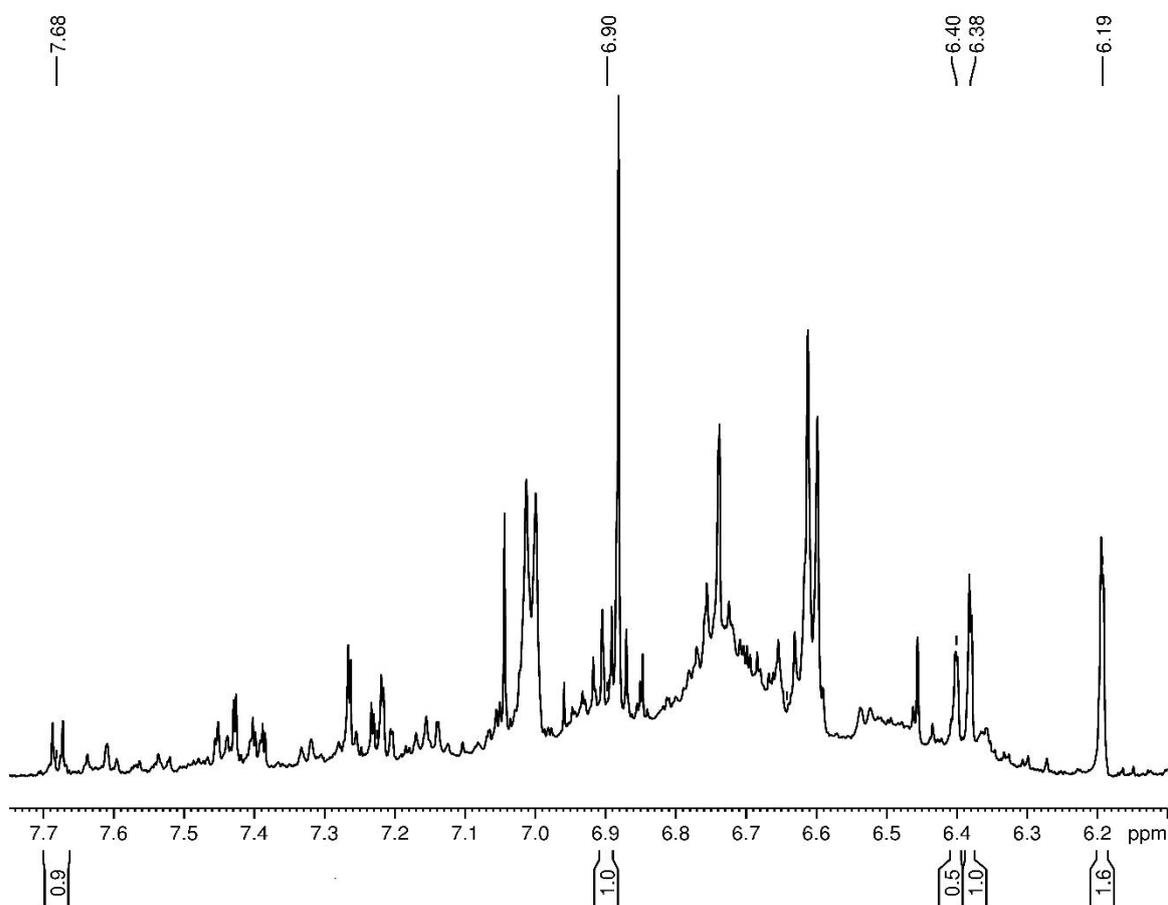


Figura 8. Expansão do espectro de RMN de ^1H (de 6,0 a 7,8 ppm) de *B. unguolata*, com as integrais e deslocamentos químicos da molécula 1 ($\text{CD}_3\text{OD}:\text{D}_2\text{O} - 7:3$ v/v, 600 MHz, 27 °C).

O mapa de correlação HSQC (*Heteronuclear Single-Quantum Correlation*) (Figura 9 e Tabela 2), indica as correlações diretas entre hidrogênios e carbono, demonstra que para o ^1H em δ 7,68, há correlação com o carbono em δ 130,9. O hidrogênio δ 6,90 se correlaciona com o carbono em δ 115,6. O ^1H em δ 6,40, há correlação com o carbono em δ 94,1. Por fim, para o hidrogênio δ 6,19, a correlação com o carbono é em δ 99,0.

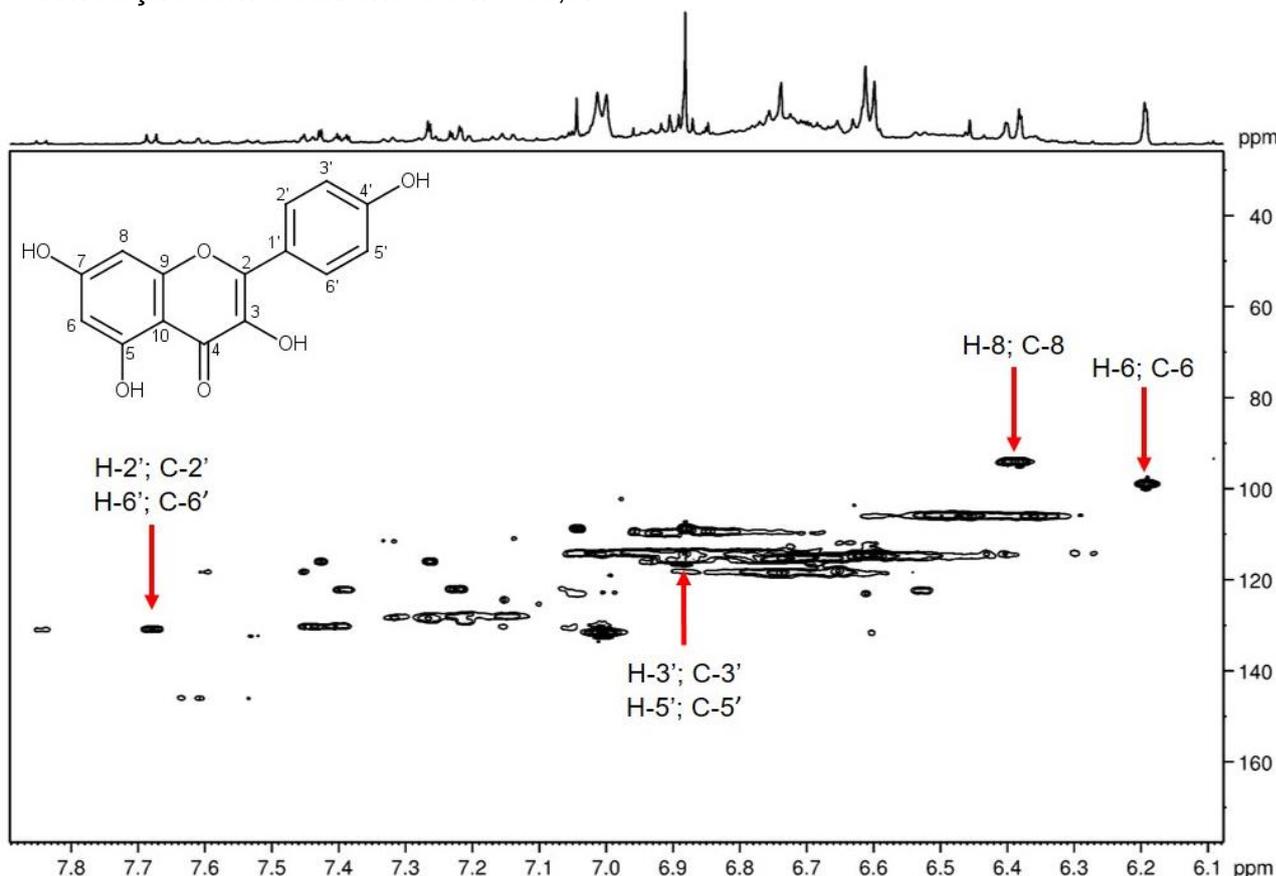


Figura 9. Expansão do mapa de correlação HSQC (de 6,1 a 7,9 ppm e 30 a 170 ppm) do extrato de *B. unguolata* da substância 1 ($\text{CD}_3\text{OD}:\text{D}_2\text{O} - 7:3$ v/v, 600 MHz, 27 °C).

O mapa de correlação à longa distância entre hidrogênios e carbonos dada pelo experimento HMBC (*Heteronuclear Multiple-Bond Correlation*) (Figura 10, Figura 11 e Tabela 2) possibilitou a observação apenas das moléculas mais abundantes. O hidrogênio em δ 7,68, demonstra correlação com os carbonos δ 130,9 (C-2'; C-6') e δ 159,4 (C-4'). Já em δ 6,90, há a correlação com os carbonos em δ 121,7 (C-1'); δ 144,5 (C-2) e δ 115,6 (C-3'; C-5'). Para o ^1H em δ 6,40, as correlações com os carbonos ocorrem em δ 99,0 (C-6); δ 164,2

(C-7); δ 157,2 (C-9) e δ 104,7 (C-10). E por fim, o hidrogênio em δ 6,19, se demonstra correlacionado com os carbonos em δ 161,3 (C-5); δ 164,2 (C-7); δ 94,1 (C-8) e δ 104,7 (C-10); .

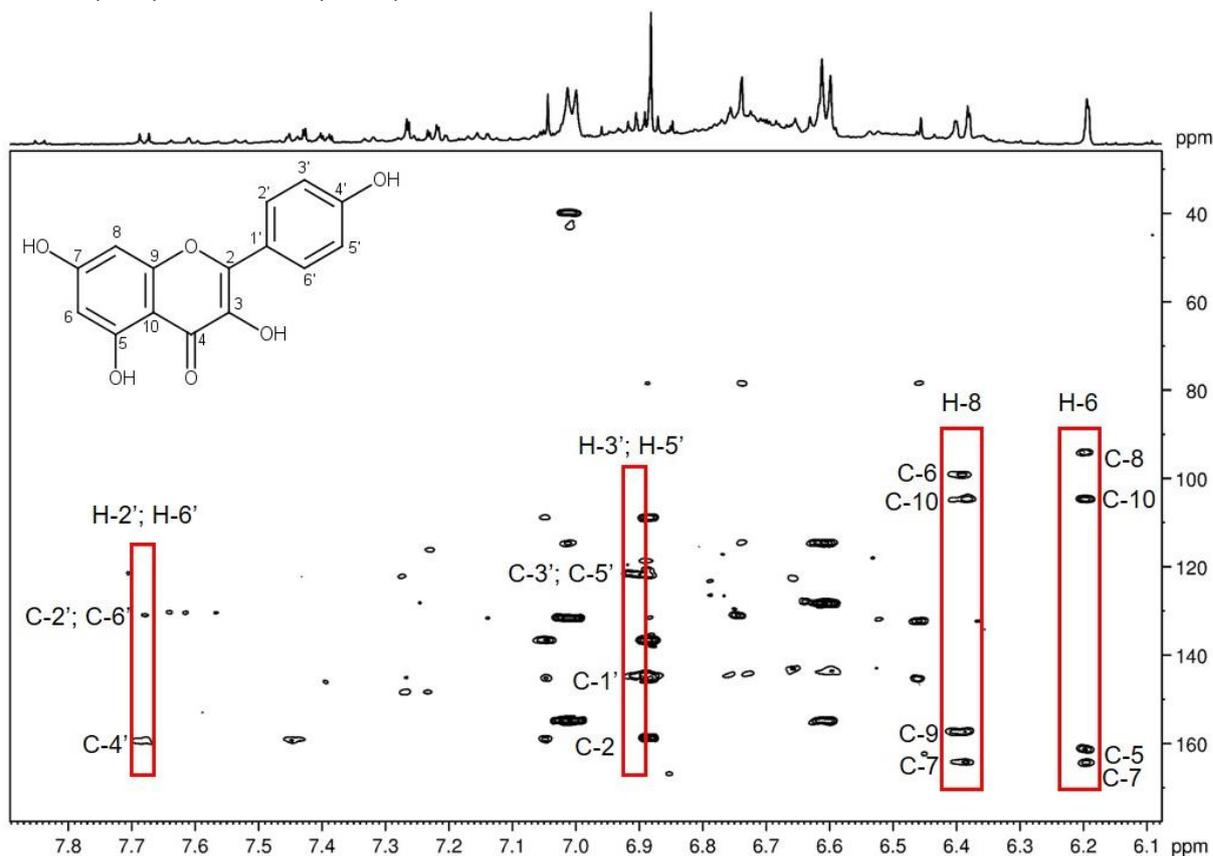


Figura 10. Expansão do mapa de correlação HMBC (de 6,1 a 7,9 ppm e 30 a 170 ppm) de *B. unguolata* da substância 1 (CD₃OD:D₂O – 7:3 v/v, 600 MHz, 27 °C).

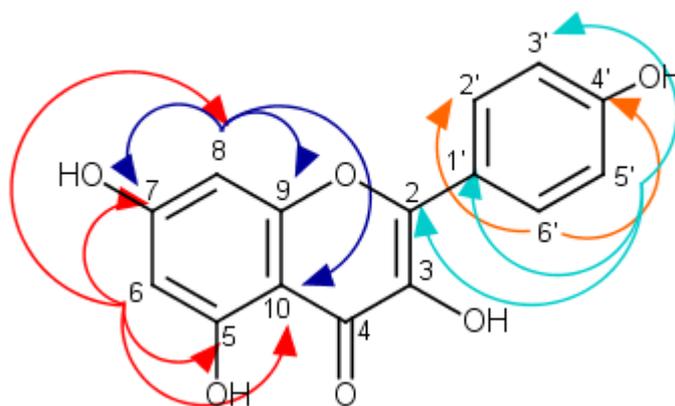


Figura 11. Correlações entre hidrogênios e carbonos a longa distância à partir de HMBC de *B. unguolata* para a substância 1 (CD₃OD:D₂O – 7:3 v/v, 600 MHz, 27 °C) (setas indicam as correlações observadas).

A partir dos dados obtidos por Bachheti *et al.* (2011) a estrutura da molécula pôde ser comparada a partir dos deslocamentos químicos, multiplicidades, constantes de acoplamento referentes aos hidrogênios, além dos deslocamentos químicos dos carbonos evidenciados nos mapas de correlação, confirmando-a como canferol.

Tabela 2. Deslocamentos químicos do canferol (1).

Posição	Canferol (CD ₃ OD:D ₂ O – 7:3 v/v)			Canferol Literatura (CD ₃ OD)	
	δ_{H} , mult. (J em Hz)	δ_{C}	HMBC	δ_{H} , mult. (J em Hz)	δ_{C}
2		144,5 C			148,1 C
3		n.d.			137,1 C
4		n.d.			177,3 C
5		161,9 C			162,4 C
6	6,19 (d; 2,2)	99,0 CH	5, 7, 8, 10	6,18 (d; 1,5)	99,2 CH
7		164,2 C			165,5 C
8	6,40 (d; 2,2)	94,1 C	6, 7, 9, 10	6,39 (d; 1,5)	94,4 C
9		157,4 C			158,2 C
10		104,7 C			104,5 C
1'		121,7 C			123,7 C
2'	7,68 (d; 8,8)	130,9 CH	2', 4', 6'	8,08 (d; 8,8)	130,6 CH
3'	6,90 (d; 8,8)	115,6 CH	2, 1', 3', 5'	6,90 (d; 8,8)	116,3 CH
4'		159,4 C			160,5 C
5'	6,90 (d; 8,8)	115,6 CH	2, 1', 3', 5'	6,90 (d; 8,8)	116,3 CH
6'	7,68 (d; 8,8)	130,9 CH	2', 4', 6'	8,08 (d; 8,8)	130,6 CH

^{n.d.}: Não detectados pelos mapas de correlação heteronuclear

Para a segunda molécula de flavonoide (2), o espectro de RMN de ¹H a seguir (Figura 12), apresenta dois dubletos na região dos aromáticos. São eles δ 7,26 (d; $J = 2,2$ Hz; H-2'); δ 6,64 (d; $J = 8,4$ Hz; H-5'), além dos anteriormente citados, referentes ao anel A. Há, nessa mesma região, um duplo dubleto em δ 7,23 (dd; $J = 8,4$ Hz; 2,2 Hz; H-6'), demonstrando estar acoplado em *orto* com o hidrogênio em δ 6,64, e acoplado em *meta* com o hidrogênio em δ 7,26.

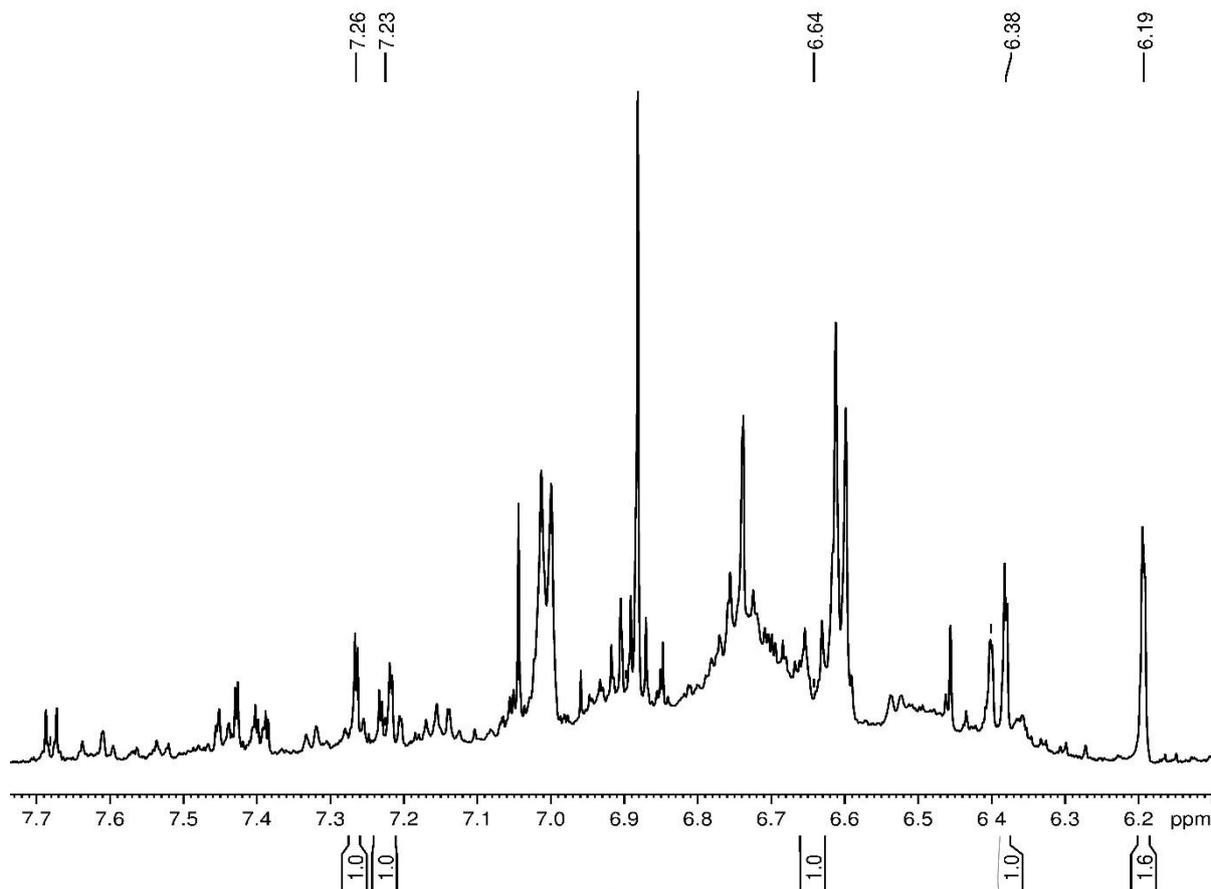


Figura 12. Expansão do espectro de RMN de ^1H (de 6,1 a 7,8 ppm) de *B. unguata*, com as integrais e deslocamentos químicos da molécula 2 ($\text{CD}_3\text{OD}:\text{D}_2\text{O} - 7:3$ v/v, 600 MHz, 27 °C).

O mapa de correlação HSQC (Figura 13 e Tabela 3), indica que o hidrogênio em δ 7,26, há correlação com o carbono em δ 116,1. O hidrogênio δ 7,23 se correlaciona com o carbono em δ 122,0. O hidrogênio em δ 6,64, demonstra correlação com o carbono em δ 115,3. Para o ^1H em δ 6,38, a correlação com o carbono ocorre em δ 94,1. E Por fim, para o hidrogênio δ 6,19, há a correlação com o carbono em δ 99,0.

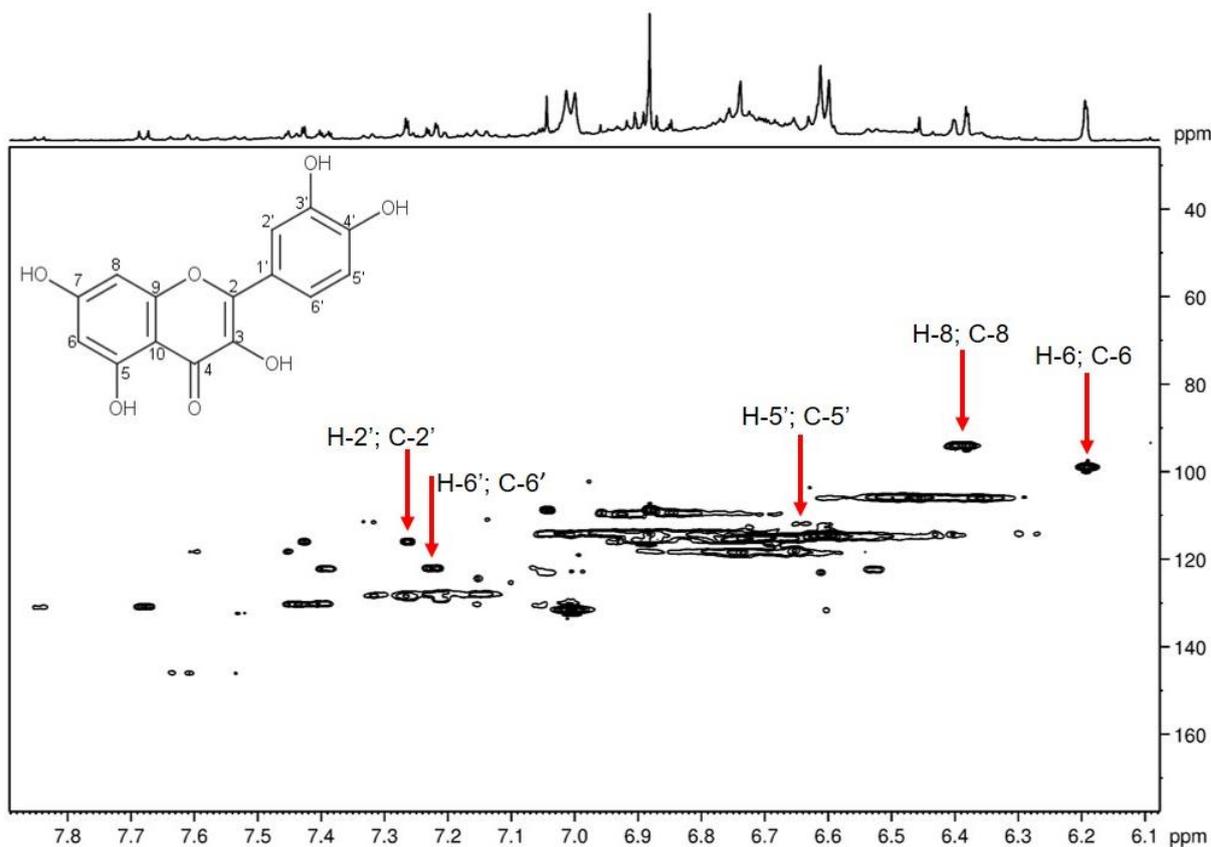


Figura 13. Expansão do mapa de correlação HSQC (de 6,1 a 7,9 ppm e 30 a 170 ppm) de *B. unguolata* da substância 2 (CD₃OD:D₂O – 7:3 v/v, 600 MHz, 27 °C).

A correlação à longa distância entre hidrogênios e carbonos dada pelo experimento HMBC (Figura 14, Figura 15 e Tabela 3), apresenta o hidrogênio em δ 7,26, correlacionado com os carbonos δ 144,9 (C-3'); δ 148,2 (C-4') e δ 122,0 (C-6'). Já em δ 7,23, há a correlação com os carbonos em δ 116,1 (C-2') e δ 148,2 (C-4'). No hidrogênio δ 6,64, as correlações com os carbonos foram apresentadas em δ 122,6 (C-1') e δ 143,1 (C-3). Para o ¹H em δ 6,38, as correlações com os carbonos ocorrem em δ 99,0 (C-6); δ 164,2 (C-7); δ 157,2 (C-9) e δ 104,7 (C-10). Por fim, o hidrogênio em δ 6,19, se demonstra correlacionado com os carbonos em δ 161,3 (C-5); δ 164,2 (C-7); δ 94,1 (C-8) e δ 104,7 (C-10);.

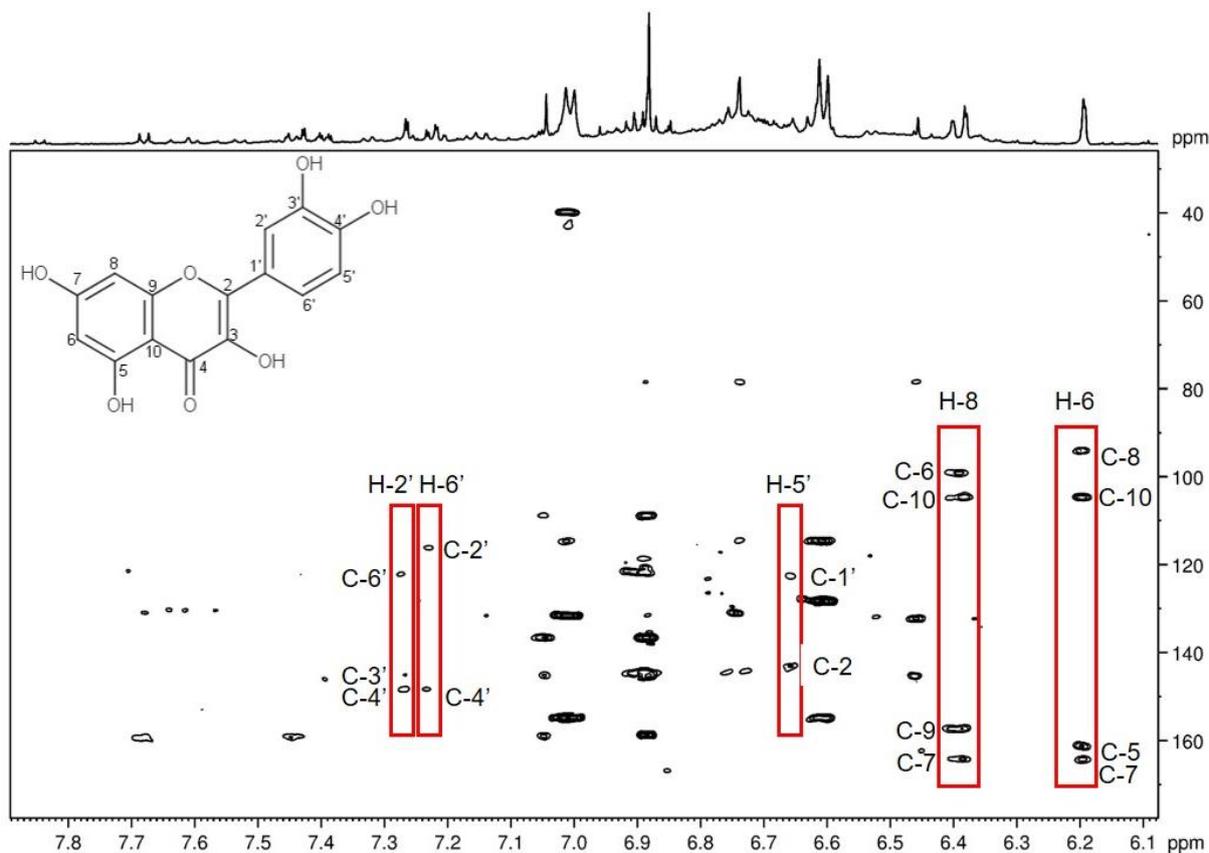


Figura 14. Expansão do mapa de correlação HMBC (de 6,1 a 7,9 ppm e 30 a 170 ppm) de *B. unguolata* da substância 2 (CD₃OD:D₂O – 7:3 v/v, 600 MHz, 27°C).

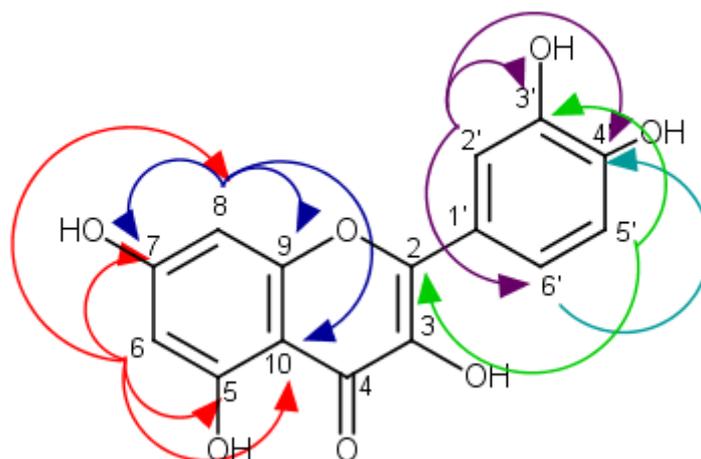


Figura 15. Correlações entre hidrogênios e carbonos a longa distância à partir de HMBC de *B. unguolata* para a substância 2 (CD₃OD:D₂O – 7:3 v/v, 600 MHz, 27 °C) (setas indicam as correlações observadas).

A partir dos dados obtidos por Kalegari *et al.* (2011) a estrutura da molécula pôde ser comparada a partir dos deslocamentos químicos, multiplicidades, constantes de acoplamento referentes aos hidrogênios, além dos deslocamentos químicos dos carbonos evidenciados nos mapas de correlação, confirmando-a como quercetina.

Tabela 3. Deslocamentos químicos da quercetina (2).

Posição	Quercetina (CD ₃ OD:D ₂ O – 7:3 v/v)			Quercetina Literatura (CD ₃ OD)	
	δ_H , mult. (J em Hz)	δ_C	HMBC	δ_H , mult. (J em Hz)	δ_C , mult.
2		n.d.			147,7 C
3		n.d.			137,1 C
4		n.d.			177,4 C
5		161,9 C			162,6 C
6	6,19 (d; 2,2)	99,0 CH	5, 7, 8, 10	6,18 (d; 2,0)	99,3 CH
7		164,2 C			165,6 C
8	6,38 (d; 2,2)	94,1 CH	6, 7, 9, 10	6,39 (d; 2,0)	94,3 CH
9		157,4 C			158,4 C
10		104,7 C			104, 4 C
1'		121,4 C			124,1 C
2'	7,26 (d; 2,2)	116,1 CH	3', 4', 6'	7,73 (d; 2,2)	116,0 CH
3'		144,9 C			146,2 C
4'		148,2 C			148,8 C
5'	6,64 (d; 8,4)	115,3 CH	1', 3'	6,8 (d; 8,5)	116,0 CH
6'	7,23 (dd; 8,4; 2,2)	122,0 CH	2', 4'	7,60 (dd; 8,5; 2,2)	121,8 CH

n.d.: Não detectados pelos mapas de correlação heteronuclear

O espectro de RMN de ¹H da Figura 16 apresenta seis multipletos encontrados na região dos compostos alifáticos, sendo estes δ 3,93 (m; H-2); δ 2,22 (m; H-3); δ 1,98 (m; H-3); δ 1,89 (m; H-4); δ 3,29 (m; H-5) e δ 3,19 (m; H-5) referentes a estrutura da molécula 14.

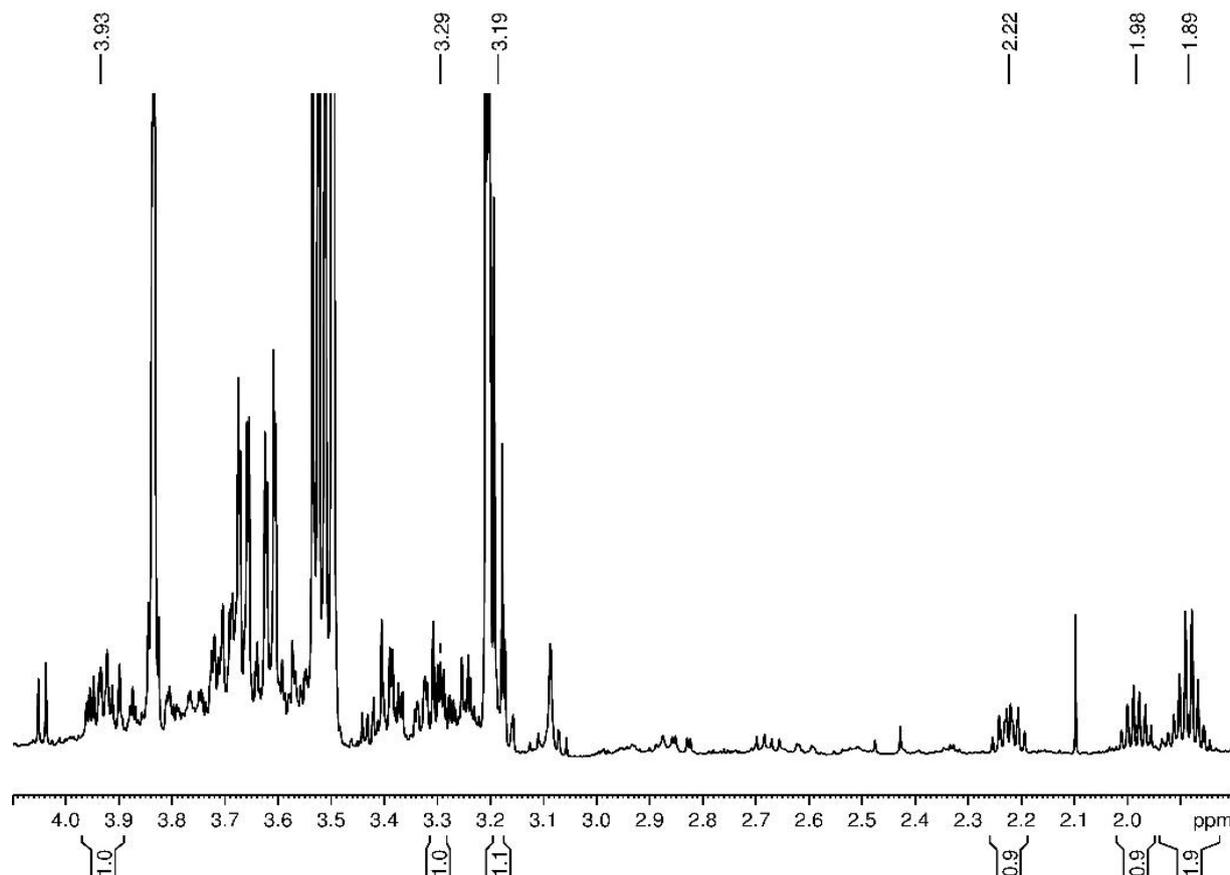


Figura 16. Expansão do espectro de RMN de ^1H (de 1,8 a 4,1 ppm) de *B. unguata* com as integrais e deslocamentos químicos da molécula 14 ($\text{CD}_3\text{OD}:\text{D}_2\text{O} - 7:3 \text{ v/v}$, 600 MHz, 27°C).

O mapa de correlação HSQC (Figura 17 e Tabela 4), indica que o hidrogênio em δ 3,93 é correlacionado com o carbono em δ 61,3. O hidrogênio de δ 3,29, se correlaciona com o carbono em δ 46,1. Para o hidrogênio em δ 3,20, o carbono correlacionado, está também em δ 46,1. O ^1H em δ 2,22, apresenta correlação com o carbono em δ 29,2, assim como o hidrogênio em δ 1,98. Por fim, o CH_2 apresenta seus hidrogênios em δ 1,89 correlacionados com o carbono em δ 23,9.

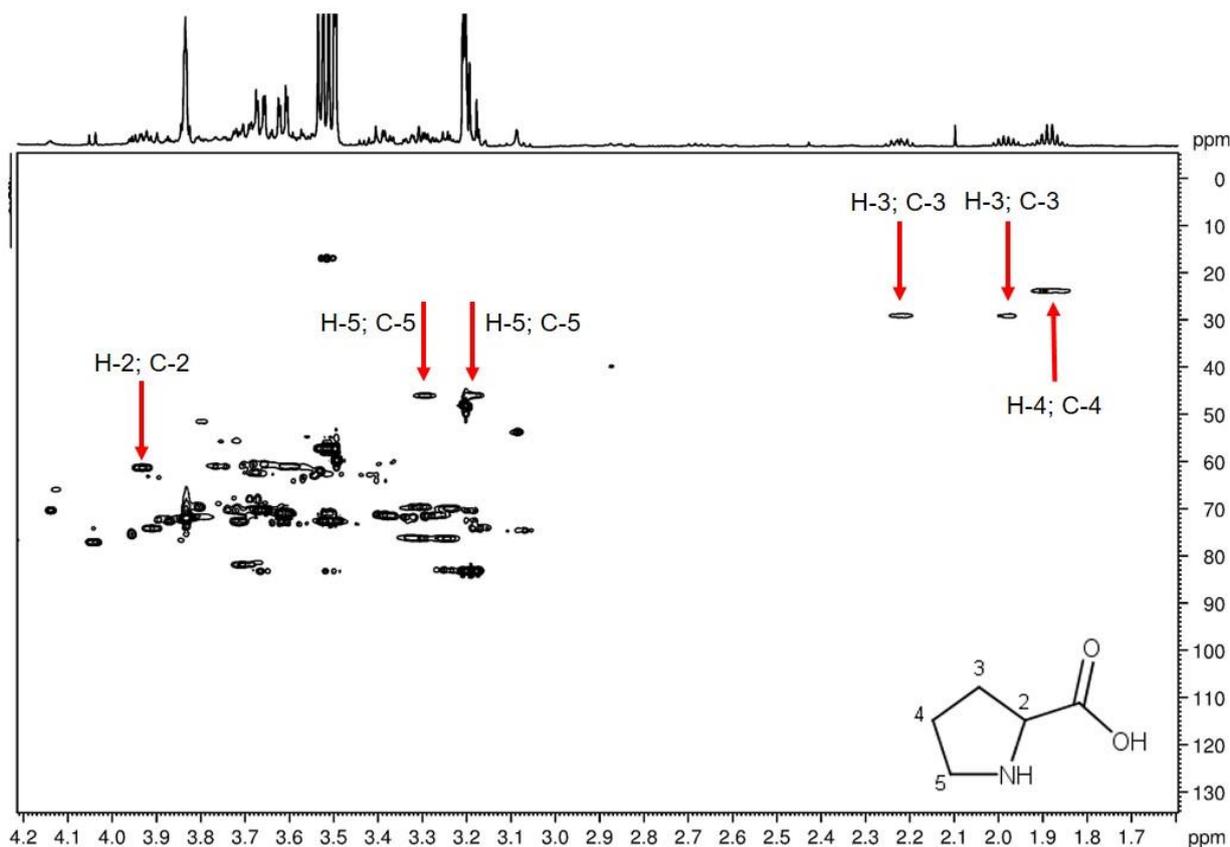


Figura 17. Expansão do mapa de correlação HSQC (de 1,6 a 4,2 ppm, e 0 a 130 ppm) de *B. unguolata* da substância 14 ($\text{CD}_3\text{OD}:\text{D}_2\text{O} - 7:3$ v/v, 600 MHz, 27°C).

A correlação a longa distância entre os hidrogênios e carbonos apresentada por HMBC (Figura 18, Figura 19 e Tabela 4), apresenta o ^1H em δ 3,93, correlacionado com os carbonos em δ 173,5 (C-1); δ 29,2 (C-3); δ 23,9 (C-4) e δ 46,1 (C-5). Para os hidrogênios posicionados em δ 3,29 e δ 3,19, as correlações com os carbonos ocorrem em δ 61,3 (C-2); δ 29,2 (C-3) e δ 23,9 (C-4). Nos hidrogênios δ 2,22 e δ 1,98, as correlações foram em δ 173,5 (C-1); δ 61,3 (C-2); δ 23,9 (C-4) e δ 46,1 (C-5). Por fim, os hidrogênios de δ 1,89, foram correlacionados com os carbonos em δ 61,3 (C-2); δ 29,2 (C-3) e δ 46,1 (C-5).

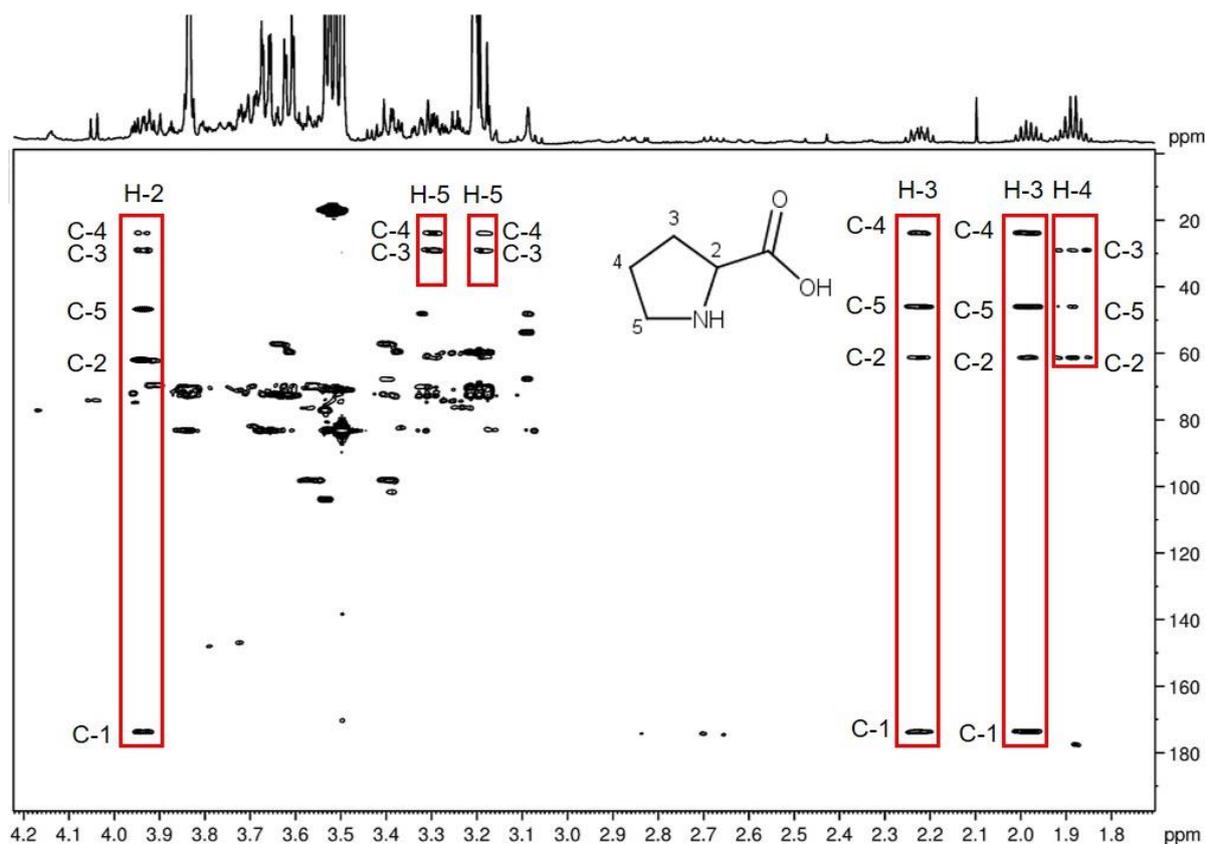


Figura 18. Expansão do mapa de correlação HSQC (de 1,6 a 4,2 ppm, e 10 a 190 ppm) de *B. unguolata* da substância 14 (CD₃OD:D₂O – 7:3 v/v, 600 MHz, 27°C).

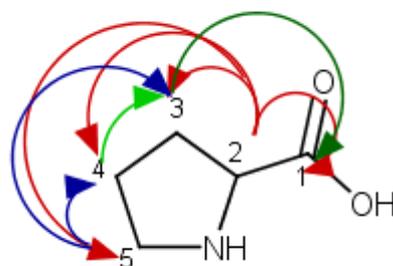


Figura 19. Correlações entre hidrogênios e carbonos a longa distância à partir de HMBC de *B. unguolata* para a substância 14 (CD₃OD:D₂O – 7:3 v/v, 600 MHz, 27 °C) (setas indicam as correlações observadas).

A partir dos dados obtidos por Shintu, Ziarelli e Caldarelli (2004) a estrutura da molécula pôde ser comparada a partir dos deslocamentos químicos, multiplicidades, constantes de acoplamento referentes aos hidrogênios, além dos deslocamentos químicos dos carbonos evidenciados nos mapas de correlação, confirmando-a como prolina.

Tabela 4. Deslocamentos químicos da Prolina (14).

Posição	Prolina (CD ₃ OD:D ₂ O – 7:3 v/v)			Prolina Literatura (D ₂ O)	
	δ_H , mult.	δ_C	HMBC	δ_H , mult.	δ_C
1		173,5 C		-	-
2	3,93 m	61,3 CH	1, 3, 4, 5	4,11 m	58,0 CH
3	1,98 m – 2,22 m	29,2 CH ₂	1, 2, 4, 5	2,03 m – 2,32 m	29,0 CH ₂
4	1,89 m	23,9 CH ₂	1, 3, 5	1,95 m	24,0 CH ₂
5	3,19 m – 3,29 m	46,1 CH ₂	1, 3, 4, 5	3,32 m – 3,39 m	46,0 CH ₂

O espectro de RMN de ¹H da Figura 20 representa os deslocamentos químicos da estrutura da molécula 15. Este apresenta dois dubletos encontrados na região dos compostos aromáticos, sendo estes δ 7,00 (d; $J = 8,2$ Hz; H-2; H-2'; H-6; H-6') e δ 6,60 (d; $J = 8,2$ Hz; H-3; H-3'; H-5; H-5'), demonstrando a partir de suas constantes de acoplamento, a proximidade entre eles. Há ainda dois multipletos situados na região dos alifáticos, em δ 2,88 (m; H₂-7) e em δ 2,94 (m; H₂-8).

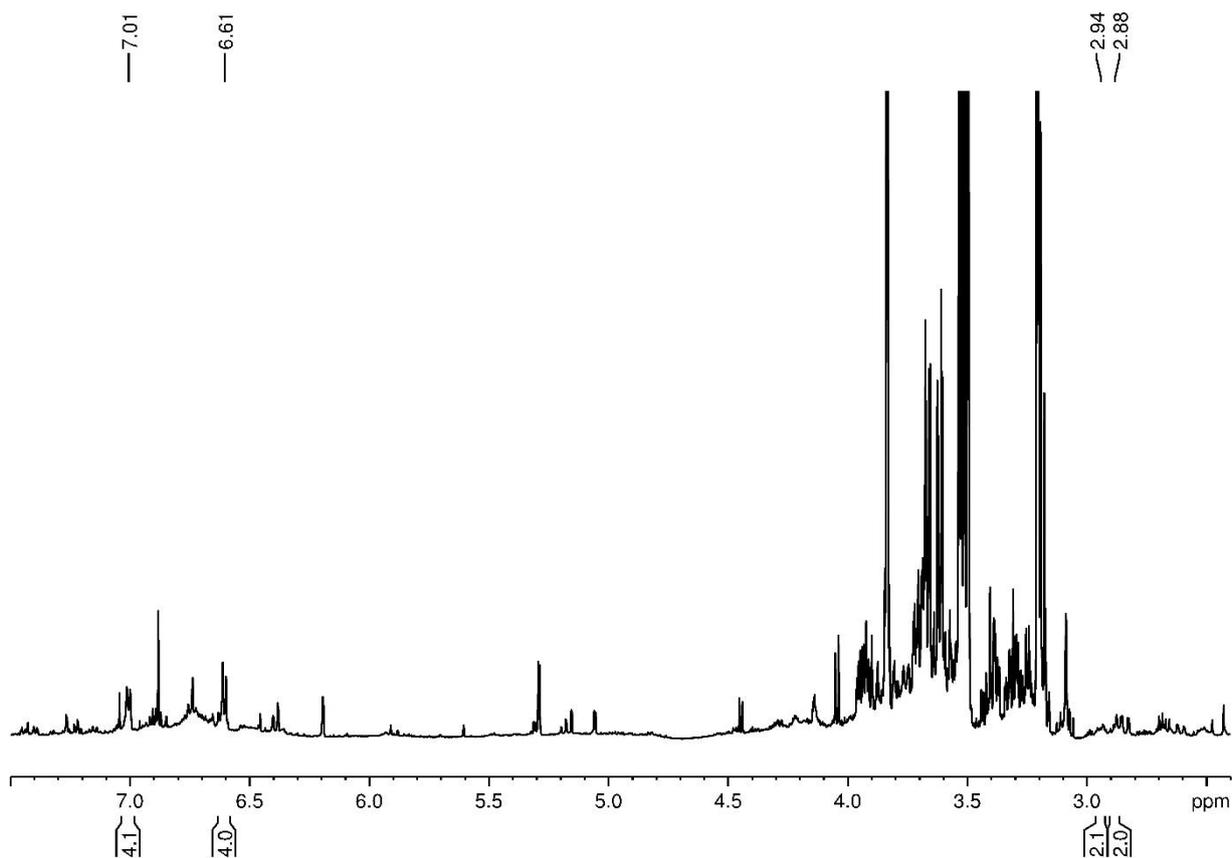


Figura 20. Expansão do espectro de RMN de ^1H (de 2,0 a 7,5 ppm) de *B. unguolata* com as integrais e deslocamentos químicos da molécula 15 ($\text{CD}_3\text{OD}:\text{D}_2\text{O} - 7:3 \text{ v/v}$, 600 MHz, 27°C).

O mapa de correlação HSQC (Figura 21 e Tabela 5), indica que o hidrogênio em δ 7,00 é correlacionado com o carbono em δ 131,5. O hidrogênio de δ 6,60 se correlaciona com o carbono em δ 114,6 (Figura 21 A). E os dois hidrogênios apresentados em δ 2,88 e δ 2,94, são correlacionados com o carbono em δ 39,7 (Figura 21 B).

A correlação a longa distância entre os hidrogênios e carbonos apresentada pelo HMBC (Figura 22, Figura 23 e Tabela 5), apresentada na figura 22 A o ^1H em δ 7,00, correlacionado com os carbonos em δ 39,7 (C-7; C-8); δ 114,6 (C-4; C-5; C-3'; C-5'); δ 131,5 (C-1; C-2; C-2'; C-6') e δ 154,8 (C-4; C-4'). Para o hidrogênio posicionado em δ 6,60, as correlações com os carbonos ocorrem em δ 114,6 (C-4; C-5; C-3'; C-5'); δ 128,8 (C-1; C-1') e δ 154,8 (C-4; C-4'). Nos hidrogênios δ 2,88 e δ 2,94 (Figura 22 B), as correlações foram em 128,8 (C-1; C-1') e δ 131,5 (C-1; C-2; C-2'; C-6').

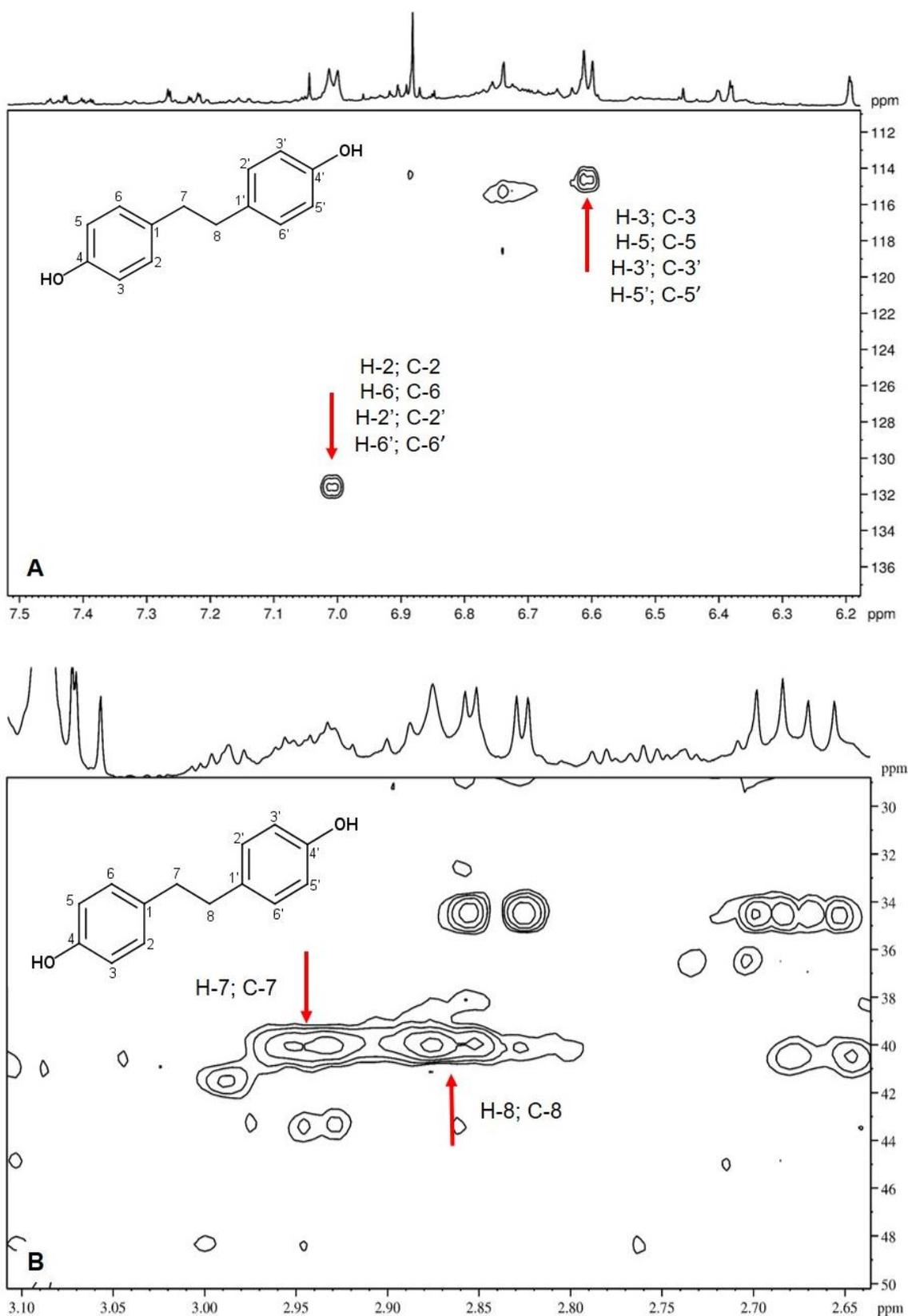


Figura 21. Superior **(A)**: Expansão do mapa de correlação HSQC para os sinais na região dos aromáticos; Inferior **(B)**: Expansão do mapa de correlação HSQC para os sinais na região dos alifáticos da substância 15 ($\text{CD}_3\text{OD}:\text{D}_2\text{O} - 7:3 \text{ v/v}$, 600 MHz, 27°C).

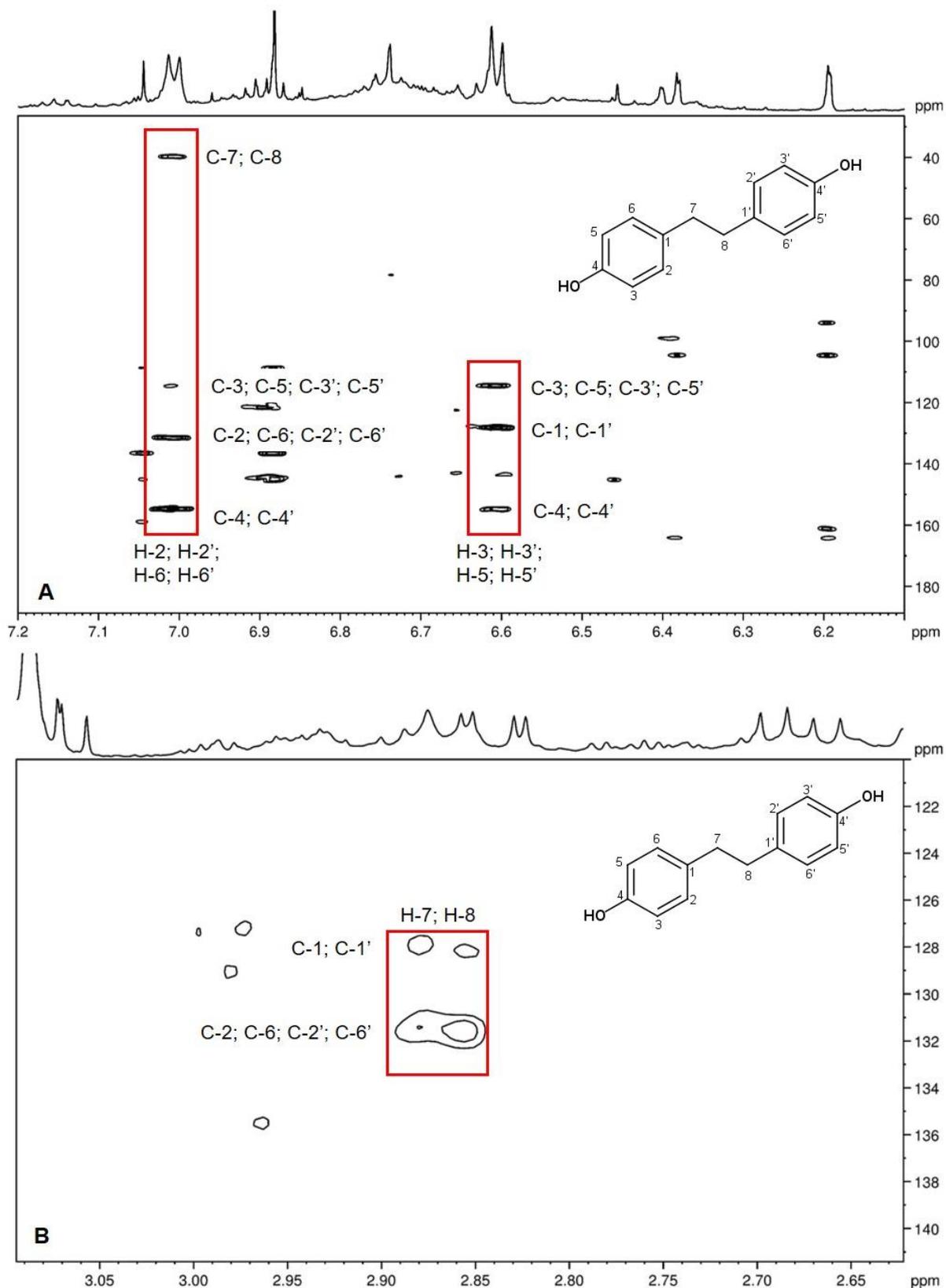


Figura 22. Superior **(A)**: Expansão do mapa de correlação HMBC para os sinais na região dos aromáticos; Inferior **(B)**: Expansão do mapa de correlação HMBC para os sinais na região dos alifáticos, da substância 15 ($\text{CD}_3\text{OD}:\text{D}_2\text{O} - 7:3 \text{ v/v}$, 600 MHz, 27°C).

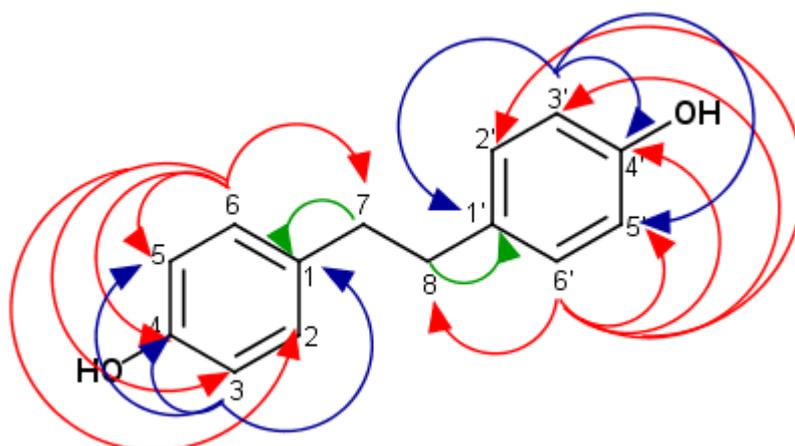


Figura 23. Correlações entre hidrogênios e carbonos a longa distância à partir de HMBC de *B. unguolata* para a substância 15 (CD₃OD:D₂O – 7:3 v/v, 600 MHz, 27 °C) (setas indicam as correlações observadas).

A partir dos dados obtidos por Waibel, *et al.* (2004) a estrutura da molécula pôde ser comparada a partir dos deslocamentos químicos, multiplicidades, constantes de acoplamento referentes aos hidrogênios, além dos deslocamentos químicos dos carbonos evidenciados nos mapas de correlação, confirmando-a como 4,4'-dihidroxibibenzil, ou também nomeado 1,2-Bis-(4-hidroxifenil)-etano.

Tabela 5. Deslocamentos químicos de 1,2-Bis-(4-hidroxifenil)-etano (15).

Posição	Dihidroxiestilbeno (CD ₃ OD:D ₂ O – 7:3 v/v)			1,2-Bis-(4-hidroxifenil)-etano literatura (CD ₃ COCD ₃)	
	δ_{H} , mult. (J em Hz)	δ_{C}	HMBC	δ_{H} , mult. (J em Hz)	δ_{C}
1		128,8 C			
2	7,00 (d; 8,2)	131,5 CH	2, 3, 4, 5, 6, 7	7,01 (d; 8,6)	133,57 CH
3	6,60 (d; 8,2)	114,6 CH	1, 3, 4, 5	6,72 (d; 8,6)	115,80 CH
4		154,8 C		8,06 (d; 8,0; OH)	156,31 C
5	6,60 (d; 8,2)	114,6 CH	1, 3, 4, 5	6,72 (d; 8,6)	115,80 CH
6	7,00 (d; 8,2)	131,5 CH	2, 3, 4, 5, 6, 7	7,01 (d; 8,6)	133,57 CH
7	2,88 (m)	39,7 CH ₂	1, 2, 6, 8	2,74 (s)	38,17
8	2,94 (m)	39,7 CH ₂	7, 1', 2', 6'	2,74 (s)	38,17
1'		128,8 C			
2'	7,00 (d; 8,2)	131,5 CH	8, 2', 3', 4', 5', 6'	7,01 (d; 8,6)	133,57 CH
3'	6,60 (d; 8,2)	114,6 CH	1', 3', 4', 5'	6,72 (d; 8,6)	115,80 CH
4'		154,8 C		8,06 (d; 8,0; OH)	156,31 C
5'	6,60 (d; 8,2)	114,6 CH	1', 3', 4', 5'	6,72 (d; 8,6)	115,80 CH
6'	7,00 (d; 8,2)	131,5 CH	8, 2', 3', 4', 5', 6'	7,01 (d; 8,6)	133,57 CH

O estresse oxidativo ocorre como um desequilíbrio entre o balanço pró-oxidante/antioxidante, sendo que a pró-oxidação é favorecida, e promove dano potencial. Esse dano oxidativo que as biomoléculas sofrem é relacionado a alguma adversidade biótica ou abiótica (MORAIS, *et al.*, 2009). A partir do momento em que a planta sofre estresse oxidativo, pode haver um aumento nos radicais livres, fazendo-se necessário recorrer aos antioxidantes, como uma forma de promover equilíbrio no sistema fisiológico da planta (BURDA; OLESZEK, 2001).

Substâncias fenólicas são importantes antioxidantes, uma vez que possuem esqueleto carbônico propício para a estabilização de radicais livres. É notável que a posição e o grau de hidroxilação, são fatores importantes para a atividade antioxidante dos metabólitos nas plantas (KWAK, *et al.*, 2017). E os flavonoides são moléculas reconhecidas por realizar essa proteção à oxidação nas células das plantas (BILIA, *et al.*, 2002).

Canferol e quercetina são flavonoides que podem ser encontrados na forma conjugada a carboidratos, representando uma estratégia de adaptação e sobrevivência das plantas, relacionadas a proteção contra radiação UV-B e antioxidante como em condições de déficit hídrico, uma vez que fatores como esses, promovem o aumento de estresse oxidativo na planta (HARBORNE; WILLIAMS, 2000). Para a saúde humana, a quercetina é um importante fitoantioxidante (GIL, *et al.*, 2005), que têm sido avaliado no campo terapêutico, por conta da sua ação contra radicais livres (KWAK, *et al.*, 2017) e por apresentar propriedades hepatoprotetoras (KUMAR; PANDEY, 2013).

Muitas espécies criam adaptações frente à perda de água via transpiração quando a absorção é interrompida. Assim, as estratégias de fechamento estomático, possuem grande importância para a manutenção hídrica na planta. Após essa resposta inicial admitida por ela, ocorre a síntese de solutos osmoticamente ativos, como a do aminoácido prolina (CARVALHO, 2005; CORDEIRO, *et al.*, 2017).

Esse aminoácido, presente em pequenas quantidades na planta, têm sua concentração elevada sob condições de estresse, permitindo a osmoproteção celular como tampão, evitando efeitos deletérios nas membranas e preservando a integridade de compostos como proteínas e enzimas (JALEEL, *et al.*, 2007). E

a sua forma de ação consiste em promover o seu acúmulo nos vacúolos da planta, de maneira não nociva ao metabolismo, que estimula a pressão osmótica no interior das células, que induz a maior absorção de água, e possibilita assim a continuidade nos processos fisiológicos, ainda que em níveis menores (MARIJUAN; BOSCH, 2013; MONTEIRO, *et al.*, 2014).

Sua síntese nas folhas com baixo potencial hídrico é estimulada a fim de garantir uma biossíntese aumentada e lenta oxidação nas mitocôndrias. Promove estabilização de macromoléculas, e se torna uma alternativa para o excesso de agentes redutores, além de ser uma fonte de carbono e nitrogênio para serem utilizados após o fim do estresse por déficit hídrico (ZHU, 2002).

Diversos trabalhos relatam a prolina como marcador bioquímico em culturas submetidas a diferentes condições de estresse ocasionado pelo déficit hídrico, como a mangabeira (SANTOS, *et al.*, 2016), no açaizeiro (CORDEIRO, *et al.*, 2017), no girassol (ARAUJO, *et al.*, 2018) e no feijão (AVILA, *et al.*, 2006).

Trabalhos anteriores identificaram a presença de diferentes bibenzis em folhas de *B. unguolata* (DE SOUSA, *et al.*, 2016; RODRIGUES, 2019), em que foi avaliada e comprovada a sua citotoxicidade frente a quatro linhagens tumorais. Outros trabalhos identificaram o então 4,4'-dihidroxibenzil, e a sua importância desta substância como agente potencial anticâncer (WITTMAN, 1962; NICULESCU-DUVĂZ, *et al.*, 1966).

O 4,4'-dihidroxibenzil também tem sido utilizado como fitoestrogênio, uma vez que os receptores apresentam capacidade seletiva e sensível a estes estrógenos naturais. Estrógenos em geral, são responsáveis por regular o sistema reprodutor feminino, manter a densidade mineral óssea, regular perfis lipídicos no sangue, e apoiar funções cerebrais, entretanto, seu acúmulo no organismo, pode aumentar o risco de câncer de mama e no útero. Todavia, é interessante que mulheres no período da menopausa realizem a reposição hormonal com estes estrogênios, para evitar os sintomas ocasionados por esta. E a fim de evitar quaisquer prejuízos a saúde das mulheres, há a necessidade de moduladores seletivos de receptores de estrogênios, que evitem o seu excesso e conseqüentemente, qualquer reprodução de células cancerígenas, tornando vantajoso o uso dos fitoesteróis, como 1,2-Bis-(4-hidroxifenil)-etano (WAIBEL, *et al.*, 2009; YONEKUBO, *et al.*, 2016).

O estilbeno é conhecido por elevar a quantidade de *High Density Lipoprotein* (HDL) e ApoA-I, gene codificador da apolipoproteína-A1, a qual solubiliza lipídios no plasma sanguíneo. O HDL é responsável por transportar o colesterol dos tecidos periféricos ao fígado, onde serão excretados como esteróis fecais e ácidos biliares, prevenindo o acúmulo de placas ateroscleróticas. ApoA-I, é um crítico componente das partículas de HDL, e o aumento de seus níveis, demonstrou significativa redução dessas placas, agindo como importante protetor cardiovascular (NISSEN, *et al.*, 2003). Análogo ao estilbeno, o 1,2-Bis-(4-hidroxifenil)-etano, apresentou também habilidade de induzir a expressão do gene ApoA-I, demonstrando que a dupla ligação que os diferencia, não é essencial para essa atividade biológica (HANSEN *et al.*, 2010).

Para a planta, a presença dessa substância, mostra função antioxidante para situações com extrema intensidade de raios UV-B, podendo ter seu acúmulo também em situações de déficit hídrico (XIAO, *et al.*, 2011), ou até como defensor ao ataque de patógenos (DE SOUSA, *et al.*, 2016).

5.1.2. Análise do extrato por UHPLC-HRMS e desreplicação por rede de moléculas

A identificação dos compostos no extrato MeOH 70% de *B. unguolata* foi obtido através de análises em cromatografia líquida de ultra-eficiência acoplado à espectrômetro de massas de alta resolução (UHPLC-HRMS²) e desreplicação por rede de moléculas (Figura 24).

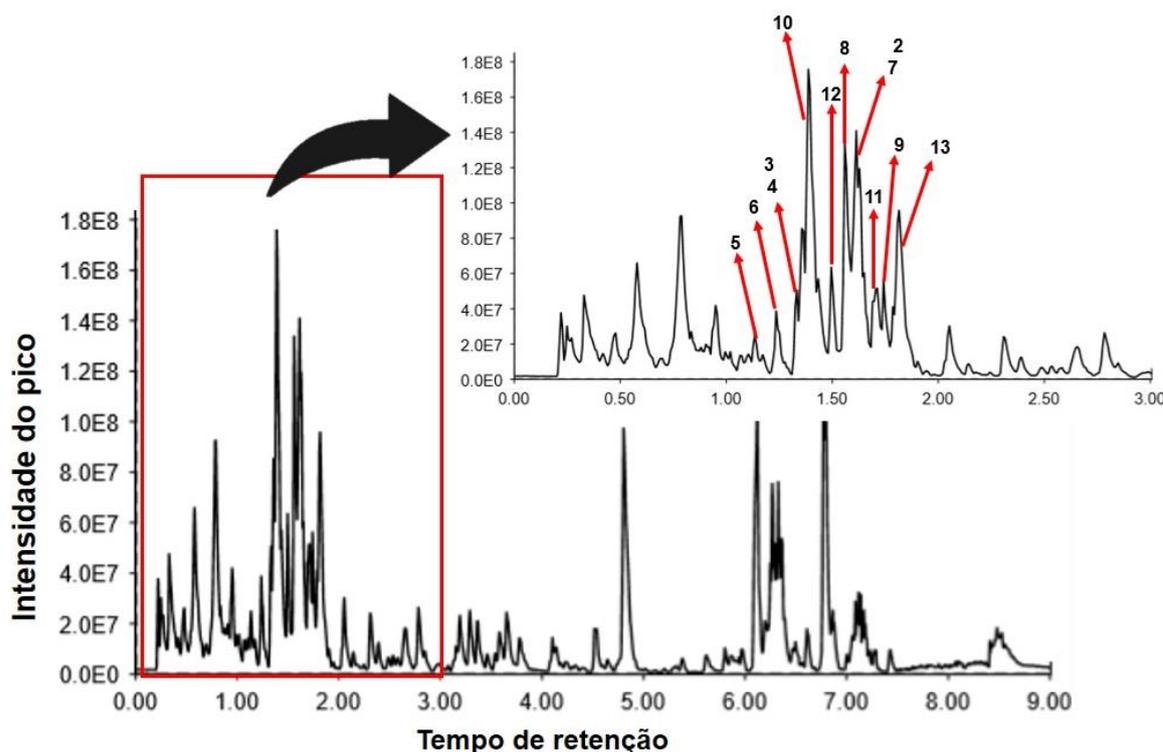


Figura 24. Cromatograma analítico do extrato MeOH 70% de *Bauhinia unguolata* obtido por UHPL-HRMS em modo positivo, com aproximação da região até 3 minutos do tempo de retenção e picos identificados pelo número de cada molécula respectiva. Condições cromatográficas em MM.

Uma vez que foi realizado um gradiente de eluição exploratório genérico para análise cromatográfica do extrato (ver condições do gradiente em MM no tópico 4.7), há a possibilidade de acontecer a coeluição de diferentes substâncias no mesmo tempo de retenção. A etapa de deconvolução, um algoritmo desenvolvido recentemente, permite separar todas as massas detectadas que ocorrem em um único pico, e analisar as intensidades nas diferentes amostras.

Após o processamento dos dados (m/z , tempo de retenção e intensidade do sinal), foi criada uma lista de picos com 1579 (MS^1) íons que posteriormente, foi filtrada em uma segunda lista de picos com 823 íons contendo espectros de segunda ordem (MS^1 e MS^2). Essa segunda lista foi então organizada na forma de uma única rede de moléculas através da plataforma *Global Natural Products Social Molecular Networking* (GNPS) (Figura 25).

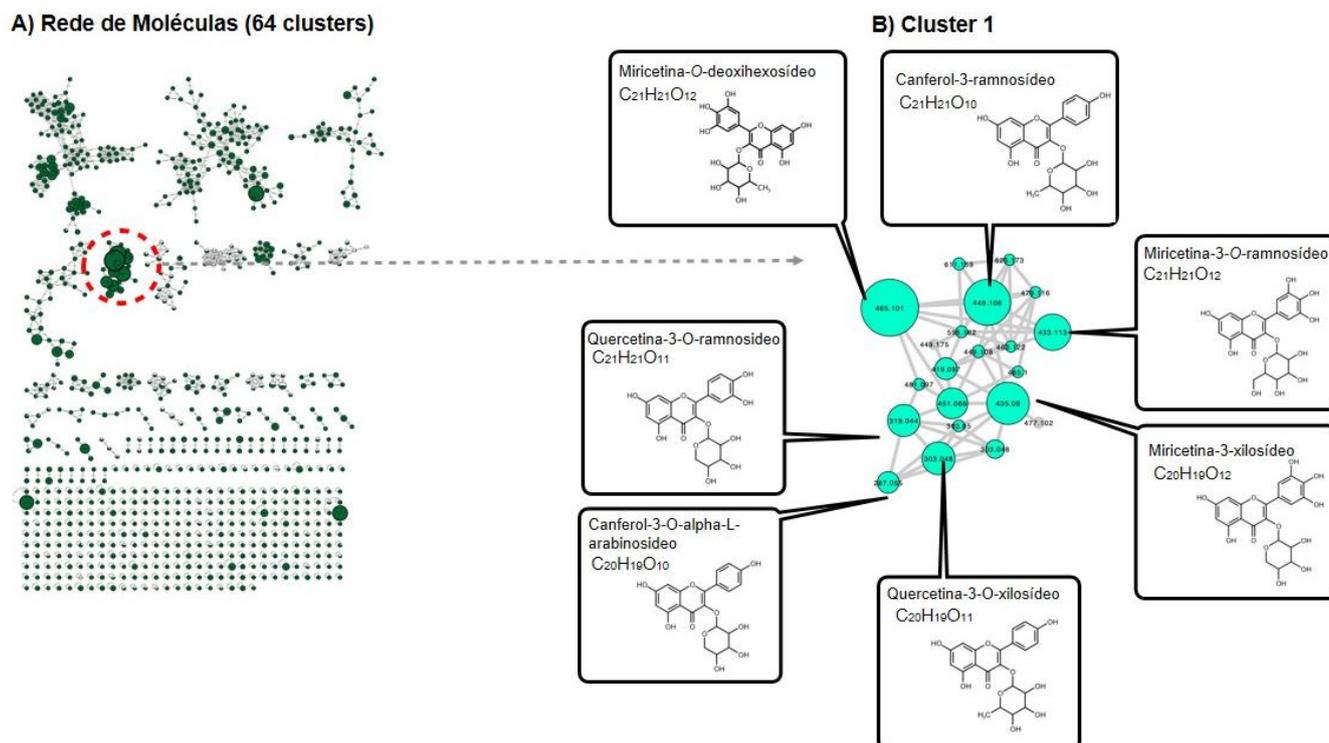


Figura 25. Rede de moléculas do extrato MeOH 70% de *Bauhinia unguolata*. **A)** *Molecular network* contendo 64 clusters. **B)** Cluster selecionado com os compostos majoritários do extrato com base na intensidade do sinal, representada no tamanho dos nodos.

A partir da rede de moléculas construída (Figura 25A), foi possível organizar os espectros de massas de segunda ordem por similaridade e agrupar estruturas de uma mesma família de compostos. A intensidade do sinal do massas foi representada no tamanho do nodo, o que nos permitiu selecionar clusters de compostos com alta intensidade no cromatograma obtido. Neste trabalho, selecionamos *clusters* contendo anotação de compostos de uma mesma família com alta intensidade. Seguindo este critério, um cluster contendo flavonoides foi selecionado e a identificação dos compostos investigada (Figura 25B).

A comparação entre os espectros experimentais obtidos do extrato com bibliotecas espectrais disponíveis na plataforma GNPS, possibilitou a anotação de doze metabólitos presentes no *cluster* 1. Na Tabela 6 são apresentadas as substâncias desreplcadas de acordo com a base de dados e suas estruturas relativas na forma de *InChi Key*.

Tabela 6. Substâncias identificadas em extrato MeOH 70% de *Bauhinia unguolata* obtido por UHPL-HRMS em modo positivo.

ID	Composto correspondente na DB*	Fórmula molecular	t _R (min)	m/z [M+H] ⁺	InChi Key** da estrutura relativa
3	Miricetina	C ₁₅ H ₁₁ O ₈	1,39	319,0438	IKMDFBPHZJCSN
4	Miricetina-3-O-ramnosídeo	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₂	1,39	465,1013	DCYOADKBABEMIQ
5	Miricetina-3-galactosídeo	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₃	1,24	481,0966	FOHXFLPXBUAOJM
6	Miricetina-3- xilosídeo	C ₂₀ H ₁₉ O ₁₂	1,36	451,0856	SBEOEJNITMVWLK
2	Quercetina	C ₁₅ H ₁₁ O ₇	1,61	303,0483	REFJWTPEDVJJIY
7	Quercetina-3-O-ramnosídeo	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁	1,61	449,1056	OXGUCUVFOIWWQJ
8	Quercetina-3-O-xilosídeo	C ₂₀ H ₁₉ O ₁₁	1,56	435,0897	PZZRDJXEMZMZF
9	Canferol-3-ramnosídeo	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₀	1,81	433,1127	SOSLMHZOJATCCP
10	Canferol-3-O-rutinosídeo	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₅	1,47	595,1625	RTATXGUCZHCSNG
11	Canferol-3-O-alpha-L-arabinosídeo	C ₂₀ H ₁₉ O ₁₀	1,74	419,0966	RNVUDWOQYYWXB
12	Isorhamnetina-3-O-rutinosídeo	C ₂₈ H ₃₃ O ₁₆	1,55	625,1730	UIDGLYUNOUKLBM
13	Datiscetina	C ₁₅ H ₁₁ O ₆	1,82	287,0546	WCNLFKXBGWWDS

*DB = Base de dados **InChiKey = *International Chemical Identifier Key*

Seguindo esta abordagem, foi possível identificar diferentes flavonoides glicosilados derivados das agliconas miricetina, quercetina, canferol, isorhamnetina e datiscetina (Tabela 7).

Dentre as 12 substâncias identificadas, apenas quatro delas já haviam sido reportadas em folhas de *B. unguolata* anteriormente, sendo elas a miricetina (3) (GANIKKO-DUTRA; SALDANHA; DOKKEDAL, 2018); quercetina-3-O-ramnosídeo (7) (MAIA NETO, *et al.*, 2008), canferol-3-ramnosídeo (9) (PAULA, *et al.*, 2014), e quercetina (2) (MAIA NETO, *et al.*, 2008; PAULA, *et al.*, 2014; DE SOUZA, *et al.*, 2016; GANIKKO-DUTRA; SALDANHA; DOKKEDAL, 2018).

Já os compostos Miricetina-3-O-ramnosídeo (4); Miricetina-3-galactosídeo (5); Miricetina-3- xilosídeo (6); Quercetina-3-O-xilosídeo (8); Canferol-3-O-rutinosídeo (10); Canferol-3-O-alpha-L- arabinosídeo (11);

Isorhamnetina-3-O-rutinosídeo (12) e Datiscetina (13) foram identificados pela primeira vez em *B. unguolata*.

Tabela 7. Substâncias já reportadas nas folhas de outras espécies de *Bauhinia*.

Nome do composto	Espécie	Referência
Miricetina	<i>B. longifolia</i>	SALATINO, <i>et al.</i> , 1999
Miricetina-3-galactosídeo	<i>B. longifolia</i>	DOS SANTOS, <i>et al.</i> , 2014
Miricetina-3-O-ramnosídeo	<i>B. longifolia</i> ; <i>B. forficata</i> ; <i>B. variegata</i> ; <i>B. affins</i>	AQUINO, 2018
Quercetina	<i>B. longifolia</i> ; <i>B. variegata</i> .	AQUINO, 2018
Quercetina-3-O-ramnosídeo	<i>B. longifolia</i>	DOS SANTOS, <i>et al.</i> , 2014
Canferol-3-ramnosídeo	<i>B. uruguayensis</i>	IRIBARREN; POMÍLIO, 1989
Canferol-3-O-rutinosídeo	<i>B. forficata</i>	EL-DONDAITY, <i>et al.</i> , 2005
Isorhamnetina-3-O-rutinosídeo	<i>B. variegata</i>	FARIAS; MENDEZ, 2014

Os resultados obtidos demonstram que a desreplicação por meio de rede de moléculas se mostrou eficiente na identificação de compostos já reportados em *B. unguolata* além de outros compostos previamente identificados em outras espécies do gênero.

Portanto, após a etapa de identificação das substâncias presentes no extrato de *B. unguolata*, foram realizados estudos para avaliar possíveis alterações no acúmulo dessas substâncias além de parâmetros fotossintéticos responsáveis pelo desenvolvimento vegetal.

5.2. Análise dos efeitos induzidos pela variação da disponibilidade hídrica

5.2.1. Análise dos parâmetros fotossintéticos

a) Análise da condutância estomática

A análise dos valores médios de condutância estomática ao CO₂ (g_s) durante o período do experimento, não mostrou aumento significativo da abertura estomática dos grupos 7D e 15D a partir da 4ª coleta, quando comparados com o grupo controle (Figura 26).

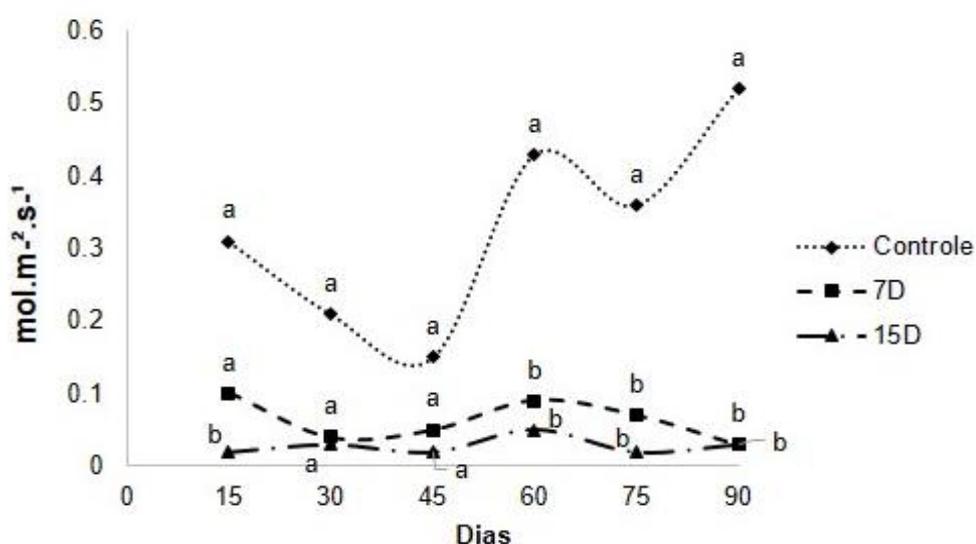


Figura 26. Média da condutância estomática média ao CO₂ (g_s), dos espécimes de *B. unguolata*, nos diferentes grupos: irrigação diária (controle) e submetidos a 7 e 15 dias sem irrigação, durante as seis coletas no experimento. (Teste de Tukey; n=3; p<0,05).

O processo de abertura e fechamento dos estômatos é determinado pelo balanço entre o teor de água presente no solo e nas folhas das plantas (COSTA; MARENGO, 2007). Em situações de baixa disponibilidade hídrica a resposta inicial da planta é impedir que haja perda de água nos seus tecidos e prevenir dessecação (SILVA, *et al.*, 2009).

Assim que as raízes notam menor disponibilidade hídrica no solo, o ácido abscísico induz o fechamento dos estômatos para evitar perda de água por transpiração (TURNER, *et al.*, 2001). Analisar a condutância estomática, é o parâmetro mais frequentemente usado para avaliar o grau de seca (CORNIC; MASSACCI, 1996). As plantas dos grupos 7D e 15D, ao se encontrarem em

situação deficitária ao longo de 60 dias com a irrigação descontínua, respondeu de forma imediata a situação imposta, evitando a sua abertura estomática e a desidratação.

b) Análise da taxa de transpiração

Em paralelo, a condutância estomática ao CO_2 , a transpiração dada em $\text{mmol de H}_2\text{O.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, apresentou redução significativa entre os tratamentos 7D e 15D, quando comparadas ao grupo controle a partir da quarta coleta (Figura 27). Essa redução na taxa transpiratória permite que a planta não perca água de seus tecidos para o ambiente, viabilizando manter seu metabolismo ativo, mesmo que de forma mais lenta (KARTHIKA, *et al*, 2019).

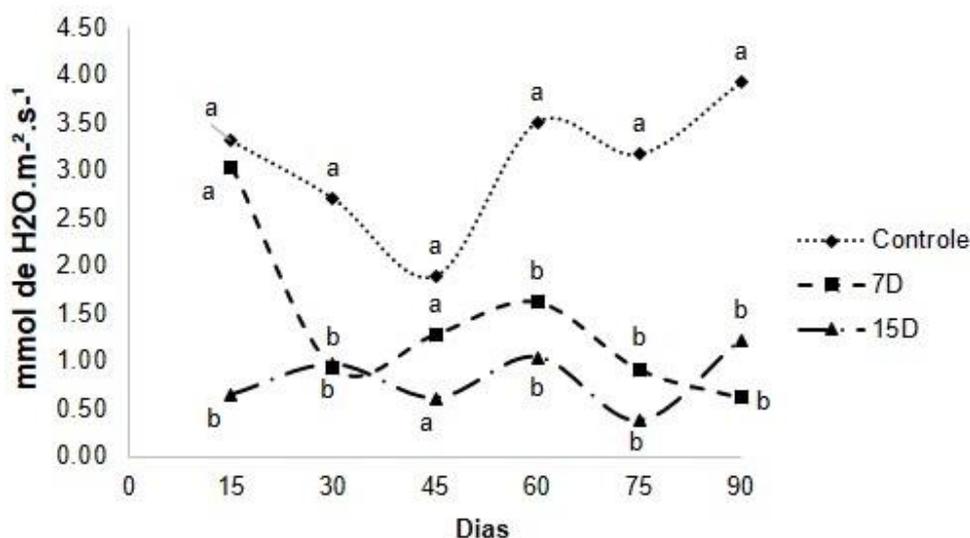


Figura 27. Média da Transpiração (E), dos espécimes de *B. unguolata*, nos diferentes grupos: irrigação diária (controle) e submetidos a 7 e 15 dias sem irrigação, durante as seis coletas no experimento. (Teste de Tukey; n=3; p<0,05).

c) Concentração de CO_2 na cavidade subestomática

Foi determinado anteriormente por Yokota, *et al.* (2002), que o responsável principal da diminuição da fotossíntese é o fechamento estomático em situações de seca moderada. O estresse por déficit hídrico prolongado induz limitações relacionadas ao metabolismo do mesófilo, sendo uma limitação fotossintética

não-estomática. Outro exemplo, é em condições de seca muito severa, ocorre a diminuição da fotossíntese líquida devido a um declínio na atividade de rubisco, ou então, diminuição na adenosina trifosfato, principal fator limitante da atividade fotossintética (BOTA; FLEXAS; MEDRANO, 2004).

Para determinar se valores obtidos pela análise da assimilação de gás carbônico foi alterada por limitações estomáticas ou não-estomáticas, é necessário que seja analisada também a concentração de CO₂ na cavidade subestomática (Figura 28), a fim de responder se, caso houver um aumento de gás carbônico nessa região, qual outra área da planta não está com seu funcionamento normal, prejudicando então a atividade fotossintética (CECHIN, *et al.*, 2008).

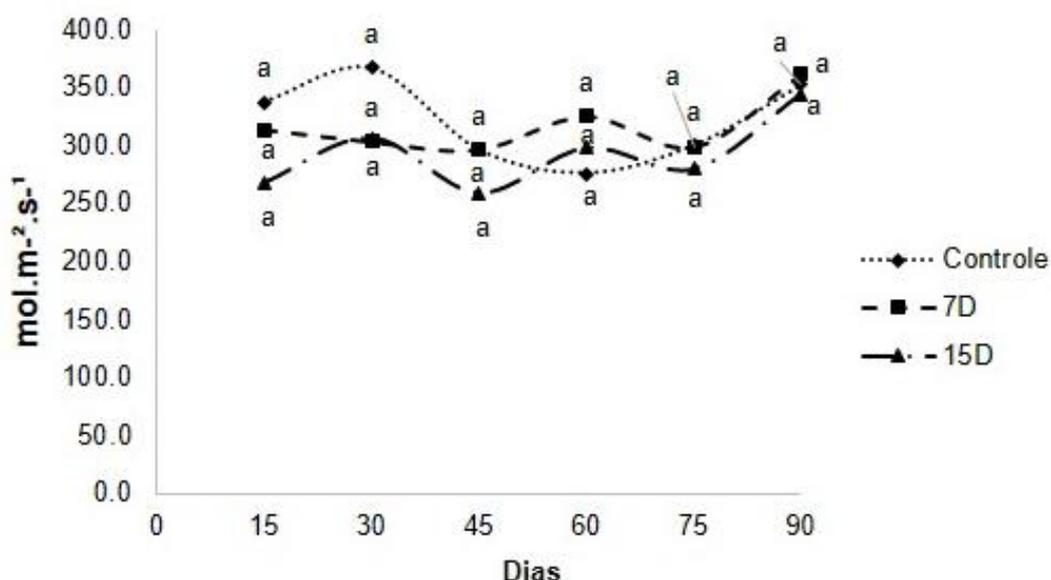


Figura 28. Concentração de CO₂ (C_i), dos espécimes de *B. unguolata*, nos diferentes grupos: irrigação diária (controle) e submetidos a 7 e 15 dias sem irrigação, durante as seis coletas no experimento. (Teste de Tukey; n=3; p<0,05).

Bem como é apresentado na Figura 28, é possível analisar que não houve alterações na concentração de CO₂ na cavidade subestomática ao longo do experimento em todos os tratamentos. Isso leva a crer, que qualquer alteração que surgiu na atividade fotossintética nos espécimes de *B. unguolata*, teve como responsável à sua limitação, apenas fatores estomáticos (CECHIN, *et al.*, 2008).

d) *Análise da fotossíntese*

A análise da assimilação de CO₂, mostrou redução significativa na taxa de fotossíntese dos grupos de 7D e 15D quando comparados ao grupo controle ao longo do experimento, mas principalmente no grupo com quinze dias sem irrigação, dada a diferença estatística em todas as coletas realizadas no experimento, uma vez que correspondia ao tratamento com seca mais intensa, e certamente, o que menos apresentou assimilação de gás carbônico (A) (Figura 29).

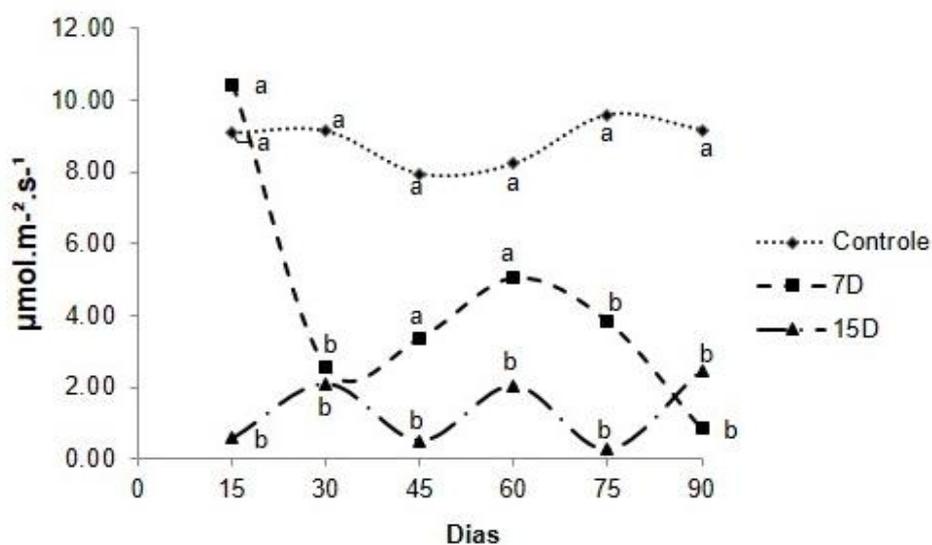


Figura 29. Assimilação de CO₂ – Fotossíntese (A), dos espécimes de *B. unguolata*, nos diferentes grupos: irrigação diária (controle) e submetidos a 7 e 15 dias sem irrigação, durante as seis coletas no experimento. (Teste de Tukey; $n=3$; $p<0,05$).

A redução da abertura estomática está diretamente relacionada com a taxa fotossintética dos espécimes de *B. unguolata*, como a análise anterior sugere, e isso pode ser justificado pelo fato de que o fechamento dos estômatos preventivo a perda d'água por transpiração, reduz também a entrada de CO₂, e limita o gás fundamental para atividade (TAIZ; ZIEGER, 2009; CARON, *et al.*, 2014). A severidade e a duração da seca comprometem, portanto, a produção de foto assimilados pela planta sujeita a tal estresse (CORNIC; MASSACCI, 1996).

e) Análise da biomassa

Em situações onde a planta se encontra com baixa disponibilidade de água no solo, vários de seus processos fisiológicos são influenciados, como o fechamento dos estômatos, a redução da fotossíntese e da transpiração, como vistos anteriormente, porém, todas essas atividades que permitem a sobrevivência da planta frente ao estresse pelo déficit hídrico acabam levando a um declínio na sua taxa de crescimento (SCALON, *et al.*, 2011).

Várias dessas respostas fisiológicas, frente à escassez hídrica imposta as plantas de *B. unguolata*, foram apresentadas, e conseqüentemente, a produção de massa verde também se mostrou menor em situação de estresse extremo. E isso é explicado dado à redução da disponibilidade hídrica a valores inferiores do determinado como crítico, bem como no grupo 15D (Figura 30), o qual demonstrou diferenças significativas principalmente em 45 até 75 dias do experimento, quando comparado aos demais grupos (CASAROLI, *et al.*, 2008).

O crescimento da planta é realizado através da divisão celular, e é um dos processos fisiológicos mais sensível a seca devido a redução da pressão do turgor (TAIZ; ZEIGER, 2006). O estresse por déficit hídrico frequentemente aloca matéria seca nas raízes, o que pode aumentar a captação de água (LEPORT, *et al.*, 2006), e isso pode inibir o crescimento de plantas superiores dada a interrupção do fluxo de água do xilema para as células adjacentes, prejudicando principalmente o desenvolvimento e crescimento de plantas mais jovens (NONAMI, 1998).

Outro efeito que inibe o crescimento das plantas é a perda de equilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO's) e a defesa antioxidante. As ERO's são acumuladas nas plantas em situações de seca severa, e a fim de impedir sua oxidação, a planta opta por focar sua produção em metabólitos especializados, que proteja a degradação de suas células, e permita sua sobrevivência frente ao estresse, e com isso, interrompe sua produção de biomassa (REDDY, *et al.*, 2004).

Inclusive, nessas situações de hidratação deficitária, as plantas geralmente limitam o número e a área das folhas, em resposta ao estresse

causado pela seca, apenas para reduzir o orçamento da água pelo custo da perda de rendimento (SCHUPPLER, *et al.*, 1998).

Já o grupo 7D não apresentou diferenças significativas em comparação com o grupo controle, demonstrando que disponibilidade hídrica a cada sete dias, ao longo de 75 dias, não prejudica a produção de massa verde por planta, o que pode ser justificado pelo fato de que a redução do rendimento induzido pela seca, depende da gravidade e duração do período do estresse e diferente do grupo 15D, é visível que o grupo que recebeu uma irrigação a cada sete dias, não teve esse intervalo sem água como crítico para seu crescimento (CATTIVELLI, *et al*, 2008).

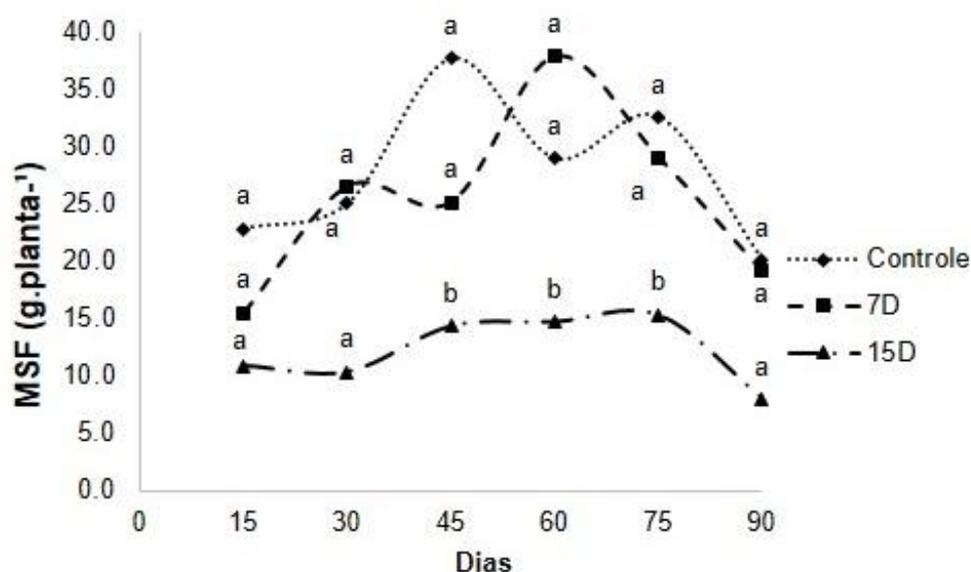


Figura 30. Matéria seca das folhas (MSF), dos espécimes de *B. unguolata*, nos diferentes grupos: irrigação diária (controle) e submetidos a 7 e 15 dias sem irrigação, durante as seis coletas no experimento. (Teste de Tukey; $n=3$; $p<0,05$).

f) Análise de eficiência instantânea do uso da água

A eficiência do uso da água (EUA) é caracterizada pela quantidade de água transpirada pela planta, para a sua produção de matéria seca. Ou seja, as plantas que são mais eficientes no uso da água, conseguem produzir mais biomassa, pela quantidade de água transpirada (BAPTISTA, *et al.*, 2001).

A baixa disponibilidade hídrica reduz a eficiência do uso da água, porém, as espécies tolerantes à seca mantêm a eficiência no uso, reduzindo a sua perda. Eventos onde o crescimento da planta é prejudicado, dados associados ao EUA, são reduzidos significativamente (FAROOQ, *et al.*, 2009).

Isso explica os dados obtidos para a produção de matéria seca das folhas no grupo 7D, que não apresentou diferença significativa quando comparada ao controle. E isso pode ser influenciado também pelas análises de eficiência instantânea do uso da água (Figura 31), onde apresentou melhor aproveitamento hídrico pelas plantas até 75 dias, de maneira bastante similar à do grupo Controle, por não apresentarem diferença significativa, e assim, viabilizar uma produção de massa verde tão eficiente com o regime de irrigação reduzido.

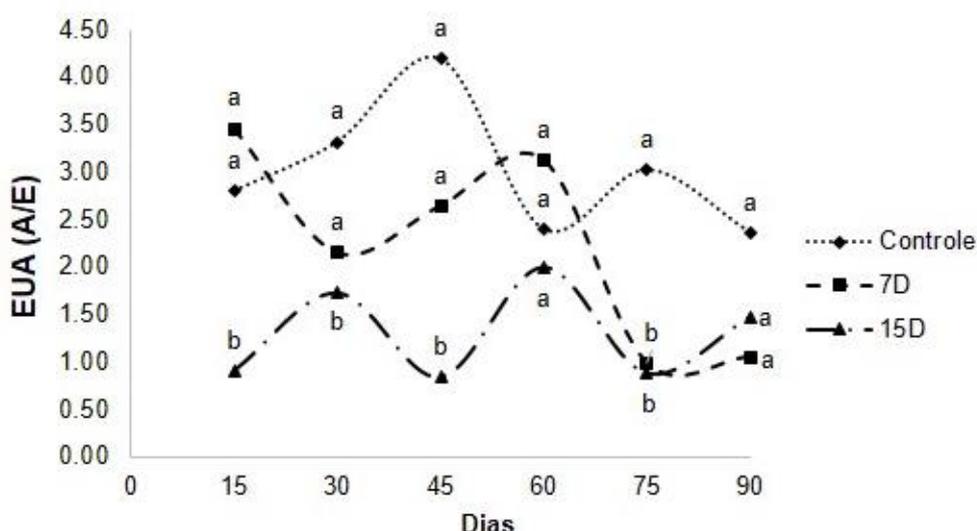


Figura 31. Eficiência instantânea do uso da água (EUA), dos espécimes de *B. unguolata*, nos diferentes grupos: irrigação diária (controle) e submetidos a 7 e 15 dias sem irrigação, durante as seis coletas no experimento. (Teste de Tukey; $n=3$; $p<0,05$).

f) Correlação entre os parâmetros fotossintéticos

A partir dos dados obtidos pelas análises ecofisiológicas, foi possível analisar a correlação entre os diferentes parâmetros fotossintéticos analisados nos diferentes grupos (Figura 32). Neste estudo, fotossíntese (A), transpiração (E) e condutância estomática (g_s) apresentaram alta correlação estatística, uma vez que A e E são limitadas pela abertura estomática (CARON, *et al.*, 2014).

E	E					
A	0,94	A				
G_s	0,91	0,81	G_s			
C_i	0,34	0,35	0,24	C_i		
EUA	0,65	0,78	0,43	0,27	EUA	
MSF	0,34	0,49	0,37	0,03	0,62	MSF

Figura 32. Correlação de *Pearson* para a média dos dados das respostas primárias das plantas de *B. unglata*. *Legenda:* E = *transpiração*; A= *Fotossíntese*; G_s = *Condutância estomática ao CO₂*; C_i= *Concentração de CO₂*; EUA = *eficiência no uso da água* e MSF = *Massa seca das folhas*.

A eficiência instantânea do uso da água apresentou correlação efetiva com a fotossíntese, uma vez que lhe permite realizar tal função, independente da baixa disponibilidade hídrica presente nos tecidos da planta (BAPTISTA, *et al.*, 2001), e correlação significativa com a transpiração, porque as plantas que mantêm essa eficiência, conseqüentemente, reduzem a perda de água por transpiração, correlacionando diretamente esses dados (FAROOQ, *et al.*, 2009).

A produção de massa seca das folhas (MSF), apresenta correlação significativa com a eficiência instantânea do uso da água, pelo fato de que os dados obtidos para essa biomassa é explicado pela capacidade que a planta detém em aproveitar eficientemente a baixa disponibilidade hídrica oferecida, e promover seu crescimento celular independentemente da situação desfavorável (FAROOQ, *et al.*, 2009).

Os dados obtidos na análise da concentração de CO₂ na cavidade subestomática (C_i), não apresentaram correlações significativas com nenhum

outro dado, uma vez que foi mostrado nenhuma alteração no armazenamento de gás carbônico na sua região, indicando portanto, que nenhum dos eventos alterados ao longo do experimento, teve como responsável alguma limitação não-estomática (CECHIN, *et al.*, 2008).

Uma vez que, os grupos submetidos a variação da disponibilidade hídrica tiveram alterações efetivas em seus parâmetros fotossintéticos e que estes podem influenciar rotas de biossíntese, um estudo com abordagem metabolômica foi realizado para investigar o acúmulo diferencial de metabólitos especializados induzidos pelo déficit hídrico.

5.2.2. Estudo de metabolômica por RMN

Para o estudo dos efeitos induzidos pela variação na disponibilidade hídrica no metabolismo especializado de *Bauhinia unguolata*, as amostras de folhas coletadas foram analisadas por RMN e submetidas à análise multivariada, como descrita a seguir.

Os dados obtidos a partir das análises de ^1H -RMN foram pré-tratados utilizando intensidade média e extração de *buckets* a cada 0.4 Hz e submetidos a análises multivariadas. A análise por PCA (Figura 33) mostra a separação das amostras em três grupos de acordo com a disponibilidade hídrica com alto valor estatístico de Rx^2 (0.513) e Q^2 (0.487) (Fig. 33 A). No gráfico (Figura 33 B e 33 C), os sinais de RMN correspondente a região da prolina, contribuem negativamente para a PC1 e correspondem aos grupos com irrigação deficitária, mas principalmente ao grupo 15D. Em contraste, os sinais correspondentes aos sinais de canferol, quercetina e 4,4'-dihidroxibenzil, contribuem de maneira positiva para a PC1 e corresponde ao grupo Controle (C) e também a sinais de deslocamentos químicos do hidrogênio para o grupo 7D.

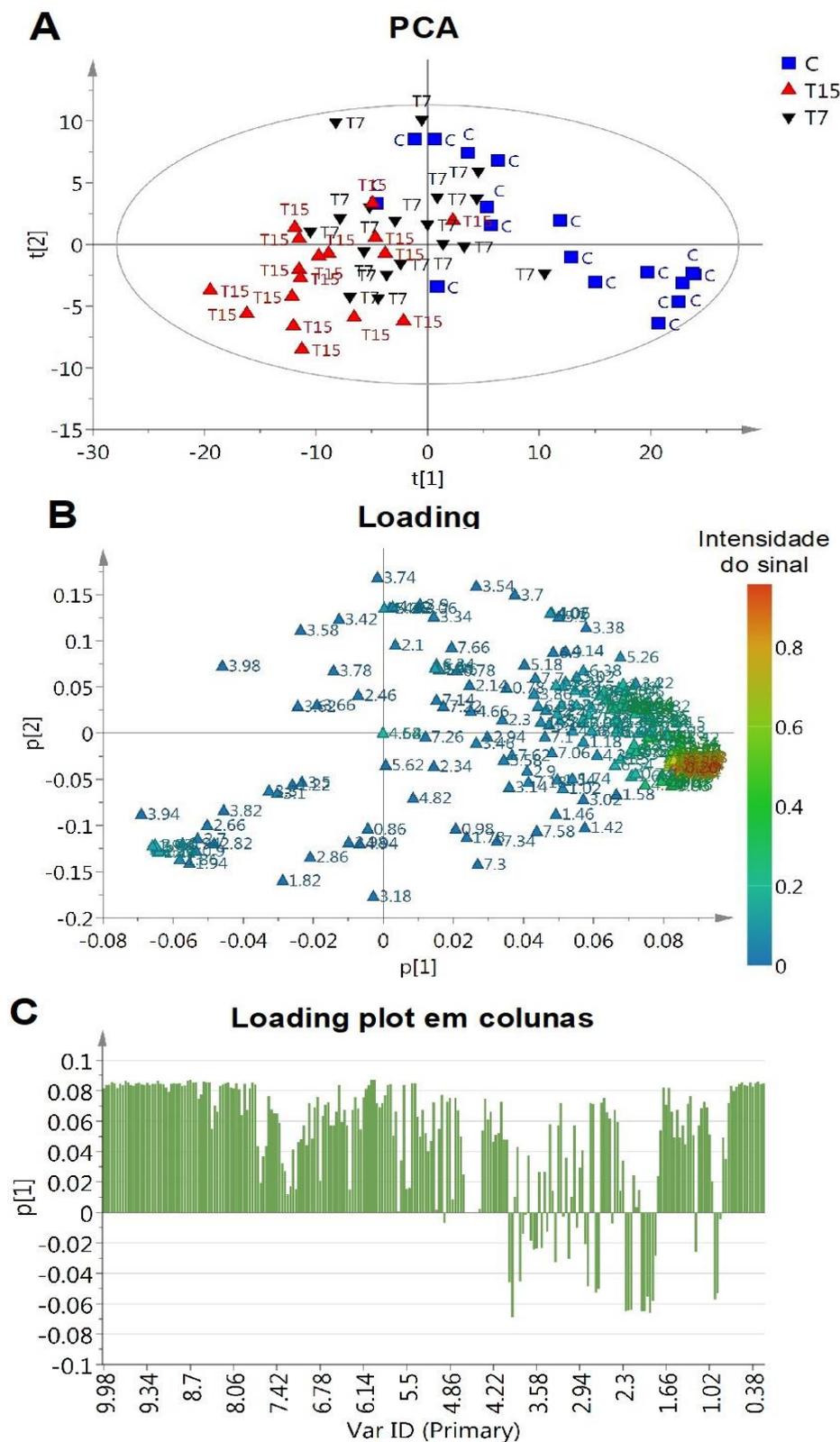


Figura 33. Análise multivariada dos dados de RMN das amostras dos grupos Controle (C), irrigação a cada 7 (T7) e 15 dias (T15). **A)** Análise de componente principal. **B)** *Loading plot* obtido a partir da análise de PCA e colorido de acordo com a intensidade da região no espectro de ^1H -RMN. **C)** *Loading plot* na forma de colunas.

A partir desses resultados, foi possível identificar alterações nos deslocamentos químicos atribuídos à prolina. Esta substância é caracterizada como indicadora de estresse causado pelo déficit hídrico, já que sua acumulação nos tecidos promove proteção por osmorregulação e ação antioxidante (JALEEL, *et al.*, 2007). Há também alterações nos deslocamentos químicos atribuídos a açúcares, que segundo Kramer (1995), em situações de seca, são acumulados para atuarem no processo de regulação osmótica.

Alguns deslocamentos químicos atribuídos aos compostos fenólicos, foram também correspondentes com o grupo controle, onde não houve alteração da disponibilidade hídrica. Estes resultados sugerem que substâncias como os flavonoides, que são moléculas provenientes de rotas biossintéticas mais derivadas, demandam alta disponibilidade de fotoassimilados para sua biossíntese (CHAVES *et al.*, 2002; LARCHER, 2004). Em condição de baixa disponibilidade hídrica, há um decréscimo na fotossíntese, como vistos no capítulo anterior, e conseqüentemente, diminuição na produção de fotoassimilados (CARON, *et al.*, 2014), impossibilitando atender a demanda destes para a produção dos polifenóis no grupo 15D com indução a seca mais severa.

A posição intermediária do grupo 7D no PCA, mais aproximados ao grupo controle, indica similaridade química significativa, o que corrobora com os dados dos parâmetros fotossintéticos apresentados até o 60º dia após o início do experimento, e demonstra que o tratamento com baixa disponibilidade hídrica para o grupo, não foi tão severo, quando comparado ao 15D.

Isso pode ser justificado pelo fato de que de maneira geral, plantas de Cerrado apresentam maior resistência e alta adaptabilidade a climas secos, não sendo a interrupção da irrigação por sete dias um fator limitante na produção desses compostos fenólicos em plantas de *B. unguolata* (EMBRAPA CERRADOS, 2005).

Os compostos fenólicos como os flavonoides e o 4,4'-dihidroxibenzil apresentam funcionalidade no sistema das plantas, ao agirem como antioxidantes a radicais livres acumulados por situações desfavoráveis ocasionadas em seu meio ambiente, garantindo assim, a sobrevivência e

perpetuação, bem como uma forma de adaptação para a planta (BORTOLO; MARQUES; PACHECO, 2008).

5.3 Aplicação agronômica

Os componentes dos custos anuais de irrigação foram definidos pelo PRONI - Programa Nacional de Irrigação (1987), que define tópicos a serem contabilizados como: custo fixo anual para aquisição do sistema; investimento inicial; depreciação e os juros sobre o capital investido; custos com manutenção e reparos; taxas e seguros; custos da produção agrícola despendidos na irrigação e custos com energia para operação do sistema.

A redução no consumo de energia de um sistema de irrigação implica em uma redução do custo financeiro, e apresenta como alternativa a redução do volume de água bombeada (FAVETTA, 1998). Além de estimar-se que 25% das propriedades rurais brasileiras não possuem energia elétrica, é fundamental racionalizar o consumo de energia elétrica, tanto para a sociedade, quanto para as concessionárias e consumidores (OLIVEIRA FILHO; TEIXEIRA; RIBEIRO, 2004).

Qualquer sistema de irrigação precisa ser dimensionado com custo operacional energético anual minimizado. E para que isso se torne possível é necessário que identifique quais culturas receberão irrigação, qual a quantidade de água irrigada, o custo da tubulação instalada, e o custo da energia elétrica e da rede elétrica (PAULINO; PEREIRA, 1986).

Considerando uma lâmina de irrigação de 8mm/dia indicada para árvores perenes, resulta num consumo de 80 mil litros de água por hectare/dia. E o valor de sistemas de irrigação para um hectare varia de R\$2500,00 para aspersores, até R\$5000,00 para os gotejadores (FILHO; SÁ; SIMÕES, 2008). A partir de valores informados pelo CAESB (Companhia de Saneamento Ambiental do Distrito Federal), válidos para o período de 01 de junho de 2019 até 31 de maio de 2020 (Índice do Reajuste de 3,45%, definido pela Resolução SEI-GDF N° 06, de 29 de abril de 2019) a tarifa de irrigação cobrada para mais de 10m³ é de R\$26,70.

Logo, o gasto com água em apenas um dia é de duzentos e treze reais, e sessenta centavos. E no final de um mês é possível garantir que os regimes de

irrigação – 1 vez a cada sete dias (Grupo 7D), permita uma economia de R\$5553,60, e uma vez a cada quinze dias (Grupo 15D), permitem uma economia de até R\$5980,80 no mês, para produtores que dependem exclusivamente de água fornecida por sistemas de abastecimento.

5.4 Mudanças climáticas

As mudanças climáticas afetam todos os níveis da vida, sendo essa uma grande ameaça para toda a biodiversidade. Por isso, estudos que investiguem os efeitos de fatores meteorológicos no desenvolvimento das plantas, permite compreender e prever o impacto que estes terão, e assim, ajustar o manejo e garantir a conservação da espécie (LEPERTZ; *et al.*, 2009).

No entanto, são poucos os trabalhos que analisam as plantas medicinais e demonstram se essas terão condições de sobreviver dentro das alterações previstas. Prever se as plantas nativas, compositoras das florestas de um país permanecerão saudáveis no futuro, permite manter grande parte do funcionamento do ecossistema, sem causar grandes distúrbios em vários outros níveis e principalmente na vida humana (MANYAMA, *et al.*, 2019). Além também, de que diversas plantas pertencentes ao Cerrado brasileiro, por exemplo, possuem metabólitos de interesse medicinal, essenciais para a manutenção da saúde da população (RODRIGUES; CARVALHO, 2001).

Dados como esse, reforçam a ideia de que o sucesso para garantir a sobrevivência de uma espécie, é de que a mesma crie adaptações, bem como em seu perfil químico, acumulando maiores quantidades de metabólitos especializados, que lhes promovam resiliência (MILLAR, *et al.*, 2007; KLEINWÄCHTER; SELMAR, 2013).

Gupta, *et al.* (2019) fez um importante levantamento bibliográfico de trabalhos que apresentaram as respostas de plantas medicinais frente a diferentes estresses promovidos pelas mudanças climáticas, como a análise das respostas de *Digitalis lonata* com o aumento de CO₂ (STUHLFAUTH; FOCK, 1990); ou das baixas temperaturas impostas a *Satureja thymbra* (LIANOPOULA; BOSBALIDIS, 2014); e o aumento de compostos fenólicos em plantas de

Hypericum brasiliense sob baixas condições de seca (ABREU; MAZZAFERA, 2005).

Por outro lado, nesse trabalho, diferentemente da maioria dos trabalhos na literatura, foi observado que espécimes de *Bauhinia unguolata* submetidas a condição de déficit hídrico intenso como no grupo 15D, apresentaram uma diminuição relativa nos sinais de compostos fenólicos (FAROOQ, *et al.*, 2009).

As plantas que receberam uma irrigação a cada sete dias, puderam manter a produção normal de compostos fenólicos quando comparadas com as plantas que receberam irrigação diariamente, demonstrando que a seca apenas não afeta seu metabolismo especializado, e não o estimula, diferente de outras plantas que responderam com um aumento desses compostos frente a seca induzida (ABREU; MAZZAFERA, 2005; CHAVARRIA, *et al.*, 2010; ZANDALINAS, *et al.*, 2017).

Estes resultados chamam atenção para o fato de que espécies diferentes podem responder de maneiras diferentes aos fatores meteorológicos, não sendo indicado extrapolar respostas das plantas frente a uma adversidade de maneira generalizada. Outro aspecto importante a ser investigado é a interação dos fatores climáticos e seu impacto no desenvolvimento vegetal. O estudo realizado por Zandalinas *et al.* (2017) demonstrou que alterações na temperatura combinado com déficit hídrico leva a modificações no perfil químico de porta-enxertos de *Citrus* spp, confirmando o aumento de fenilpropanóides, flavonoides e flavonas, que as forneceram meios de se estabelecer em duas das mudanças previstas nas condições climáticas.

6. CONCLUSÃO

A partir da análise dos parâmetros ecofisiológicos, foi possível observar que os grupos com irrigação a cada 7 e 15 dias tiveram alterações em parâmetros fotossintéticos e no metabolismo especializado, induzidos pela variação da disponibilidade hídrica em comparação com o grupo controle. Os resultados mostram que os espécimes de *Bauhinia unguolata* apresentaram alterações na Fotossíntese (A), Transpiração (E) após 30 dias do início do experimento, e redução significativa dos valores de condutância estomática (g_s), principalmente aos 60 dias no andamento do experimento.

Através de análises fitoquímica por RMN e UHPLC-HRMS, foi possível identificar 15 substâncias diferentes, sendo a maioria pertencente a classe dos flavonoides, bem como canferóis, quercetinas, miricetinas, isoharmnetina e datiscetina, além de um dihidroxiestilbeno, e um aminoácido com função de proteção ao déficit hídrico.

A partir de análises metabolômicas por rmn, foi possível identificar alteração na produção de substâncias aromáticas, como canferol, quercetina e dihidroxiestilbeno, induzidas pela variação na disponibilidade hídrica.

Foi detectado uma maior produção de prolina nas plantas com déficit hídrico induzido, principalmente no grupo 15D, uma vez que obteve o tratamento de seca mais intenso, e o acúmulo desse aminoácido em seus tecidos, lhe provém osmoproteção. Em contrapartida, apresentou menores deslocamentos químicos dos compostos fenólicos, substâncias essas de maior interesse farmacêutico, e que leva a crer que esse regime de irrigação imposto a plantas de *Bauhinia unguolata*, não é interessante para atender as exigências do mercado farmacêutico.

Por outro lado, o grupo 7D não apresentou diferença estatística na produção de biomassa quando comparado ao grupo Controle, além também, de demonstrar a partir da análise metabolômica, a presença de compostos fenólicos de interesse farmacêutico, bem como o grupo com irrigação diária. Como visto anteriormente, a economia tida com gastos aplicados a sistemas de irrigação, energia e água, na minimização de seus usos, faz-se interessante optar pelo regime de uma irrigação a cada sete dias, até oito semanas antes da colheita,

onde o produtor garantirá eficiente produção de matéria prima com alta concentração de princípios ativos de interesse farmacêutico, além de menores gastos para sua produção.

Por fim, este trabalho demonstra que espécimes de *B. unguolata* em situações de estresse por déficit hídrico intenso, tem suas funções primárias limitadas, as quais, quando comprometidas, podem levar a morte por dessecação (SILVA, *et al.*, 2009). Haja vista, as projeções para um futuro próximo e distante indicam mudanças na precipitação, e períodos de seca mais longos e frequentes (SILVA; PAULA, 2009), e para as plantas dessa espécie, é possível observar adaptabilidade a situação de estresse por déficit hídrico, por acumular aminoácido osmoprotetor que lhe viabilize a sobrevivência em disponibilidade hídrica restrita.

Todavia, outros fatores ambientais podem ser alterados em consequência do aquecimento global, como alterações drásticas da temperatura (extremo frio, ou extremo calor), aumento da incidência de raios ultravioleta ou altos níveis de CO₂ (GUPTA, *et al.*, 2019). Estes fatores, quando analisados em combinação com o déficit hídrico, podem apresentar um impacto diferente nas plantas gerando respostas diversas quando comparados aos resultados obtidos nesse trabalho, que analisou apenas as respostas da planta frente a variação da disponibilidade hídrica. Portanto, investigações que avaliem outros fatores em combinação e suas interações, podem trazer resultados mais próximos da realidade considerando o conjunto de fatores climáticos que serão alterados.

7. REFERÊNCIAS

- ABDELNUR, P. V., **Metabolômica e Espectrometria de Massas**, Embrapa-Circular Técnica, ISSN 2177-4420, v.10, 1ª ed., 2017.
- ABREU, I. N.; MAZZAFERA, P., Effect of water and temperature stress on the content of active constituents of *Hypericum brasiliense* Choisy, Plant physiology and biochemistry, v. 43, (3), p. 241-248, 2005.
- ADAME, A.; JACCOUD, C. V.; COBRA, E. A., **Biodiversidade, biopirataria e aspectos da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. 2005. Disponível em: http://www.publicadireito.com.br/conpedi/manaus/arquivos/anais/manaus/propried_intelectual_alcione_adame_e_outros.pdf. Acesso em: jan. 2020.
- AHMED, A. S.; *et al.*, **The antimicrobial, antioxidative, anti-inflammatory activity and cytotoxicity of different fractions off our South African Bauhinia species used traditionally to treat diarrhoea**. Journal of Ethnopharmacology, v. 143, p. 826–839, 2012.
- ALEMAN, C. C., **Manejo de irrigação em diferentes fases de desenvolvimento de *Calendula officialis* L.** – DIBD/ESALQ/USP, Piracicaba, 2015.
- ALMEIDA, E. R.; XAVIER, H.; GUEDES, M. C.; III Jornada Paulista de Plantas Medicinais, Campinas, Brasil, 1997.
- ALVES, A.; SANTOS, A. L. S.; AZEVEDO, R. M. C. - **Agricultura orgânica no Brasil: sua trajetória para a certificação compulsória** - Revista Brasileira de Agroecologia v.7, (2) p. 19-27, 2012.
- AMARAL, W.; *et al.*, **Ácido indolbutírico no enraizamento de estacas de louro (*Laurus nobilis* L.)** Revista Acadêmica: Ciência Animal, 2017.
- AMIC', A.; *et al.*, **Towards an improved prediction of the free radical scavenging potency of flavonoids: The significance of double PCET mechanisms**. Food Chemistry, v. 152, p. 578-585, 2014.
- AQUINO, A. J., **Diferenciação química de quatro espécies de *Bauhinia* (Pata-de-vaca)**, Tese (Doutorado em Ciências) apresentada ao centro de ciências exatas e de tecnologia, UFSCar, São Carlos, 2018.
- ARAÚJO, J. C., *et al.*, **O complexo superbrotamento do guaranazeiro e seu controle Manaus** Embrapa Amazônia Ocidental, 2006.
- ARAUJO, S. B.; *et al.*, **Teores de prolina em cultivares de girasol**, Trabalho apresentado no VIII Seminário de Iniciação Científica e Pós-Graduação, Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2018.
- ARBONA, V., *et al.*, **Metabolomics as a Tool to Investigate Abiotic Stress Tolerance in Plants**, International Journal of Molecular Sciences, v. 14, (3), p. 4885-4911, 2013.
- ARIMURA, G. I.; MAFFEI, M., **Plant Specialized Metabolism: Genomics, Biochemistry, and Biological Functions**. CRC, 2017.

- AVILA, M. L. C., *et al.*, **Variability in accumulation of free proline on in vitro calli of four bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties exposed to salinity and induced moisture stress.** *Phyton*, (75), p.103-108,2006.
- BACHHETI, R. K.; *et al.*, **Phytochemical analysis of aerial Parts of *Ixora paviflora*.** *International Journal of Chemtech Research*, v. 3, n. 3, p. 1028-1032, 2011.
- BALBINO, E. E.; DIAS, M. F. **Farmacovigilância: um passo em direção ao uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos.** *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 20, p. 992-1000, 2010.
- BAPTISTA, J. M.; *et al.*, **Programa nacional para o uso eficiente da água.** Lisboa: Instituto Superior de Agronomia, p. 212, 2001.
- BARBOSA, K. B. F.; *et al.*, **Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios.** *Revista de Nutrição*, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, E. J. M., **Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo.** *Química Nova*, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.
- BIESKI, I. G. C.; *et al.*, **Ethnopharmacology of medicinal plants of the Pantanal region (Mato Grosso, Brazil).** *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2012, p. 1-36, 2012.
- BILIA, A. R., *et al.*, **Stability of the constituents of Calendula, Milk-thistle and Passionflower tinctures by LC-DAD and LC-MS,** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 30, (3), p. 613-624, 2002.
- BODEN, M. (1999). **Is metabolism necessary?** *The British Journal for the Philosophy of Science*, v. 50, (2), p. 231–248, 1999.. doi:10.1093/bjps/50.2.231
- BORTOLO, D. P. G.; MARQUES, P. A. A.; PACHECO, A. C., **Teor e rendimento de flavonóides em calêndula (*Calendula officinalis* L.) cultivada com diferentes lâminas de irrigação.** *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, v.11, p.435-441, 2009.
- BOTA, J., FLEXAS, J., MEDRANO, H., **Is photosynthesis limited by decreased Rubisco activity and RuBP content under progressive water stress?** *New Phytol.*, v. 162, p. 671–681, 2004.
- BRASIL. **Ministério da Saúde. Portal da Saúde: Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos.** 2009.
- BRASIL. **Ministério da saúde secretaria de atenção à saúde departamento de atenção básica: práticas integrativas e complementares plantas medicinais e fitoterapia na atenção básica,** 2012.
- BRAZ FILHO, R., **Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente.** *Química Nova*, v. 33, n. 1, 2010.
- BRERETON, R. G., **Applied Chamometrics for Scientists.** Chichester: The Atrium, 2007.
- BRITO, L. K. L. F.; *et al.*, **Alterações no perfil de frações nitrogenadas em calos de cana-de-açúcar induzidas por déficit hídrico.** *Revista Agropecuária Brasileira*, v. 43, n. 6, p.683-690, 2008.

BURDA, S.; OLESZEK, W.; **Antioxidant and antiradical activities of flavanoids**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 46, n. 6, p. 2774-2779, 2001.

CAMAFORTE, N. A. P. P., *et al.* **Hypoglycaemic activity of *Bauhinia holophylla* through GSK3-b inhibition and glycogenesis activation**. Pharmaceutical Biology, v. 57, n. 1, p. 269-279, 2019.

CARON, B. O., *et al.*, **Physiologic relationships in Brazilian Orchid Tree (*Bauhinia forficata* Link) seedlings**, Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, v. 16, n. 2, 2014.

CAVALCANTI, K. M. P. H.; FAVORETO, R. F.; LINK, B. F., **Coletânea Científica de plantas de uso medicinal**. Coordenação Amaral ACF, Simões EV, Ferreira JLP, 2005.

CECHIN, I.; *et al.*, **Ultraviolet-B and water stress effects on growth, gas exchange and oxidative stress in sunflower plants**, Radiat Environ Biophys, (47), p. 405–413, 2008.

CECHINEL, V. F., **Chemical composition and biological potential of plants from the genus *Bauhinia***. Phytotherapy Research, v. 23, p. 1347-1354, 2009.

CANUTO *et al.* **Metabolomics: definitions, state-of-the-art and representative applications**. Química Nova, v. 41, n. 1, p. 75-91, 2018.

CARVALHO, C. J. R., **Respostas de plantas de *Schizolobium amazonicum* [*S. parahyba* var. *amazonicum*] e *Schizolobium parahyba* [*Schizolobium parahybum*] à deficiência hídrica**. Revista Árvore, v. 29, p. 907-914, 2005.

CAESB, Companhia de Saneamento Ambiental do Distrito Federal, Período de 01/06/2019 a 31/05/2020. Disponível em: <<https://www.caesb.df.gov.br/tarifas-e-precos.html>>. Acesso em 23 de dezembro 2019.

CASAROLI, D.; *et al.*, **Estimativa da taxa de transpiração do feijoeiro a partir de medidas de porometria, em diferentes camadas do dossel**. Revista Brasileira de Agrometeorologia, v.16, n. 2, p.149-153, 2008.

CATI impulsiona projetos de plantas medicinais com produção de matrizes, Secretaria de Agricultura e Abastecimento Coordenadoria de Desenvolvimento Rural Sustentável, Governo de São Paulo, 24 de fevereiro de 2017. Disponível em: <<http://www.cati.sp.gov.br/portal/imprensa/noticia/cati-impulsiona-projetos-de-plantas-medicinais-com-producao-de-matrizes>>. Acesso em 24 de setembro de 2019.

CATTIVELLI, L., *et al.*, **Chromosome regions and stress-related sequences involved in resistance to abiotic stress in triticeae**, Plant Mol. Biol., v. 48, p. 649–665, 2002.

CAVASSAN, O.; WEISER, V. L., **Vascular flora of the cerrado of Bauru-SP**, Biota Neotropica, v. 15, n. 3, 2015.

CHAVARRIA, G. *et al.*, **Relações hídricas, rendimento e compostos fenólicos de uvas Cabernet Sauvignon em três tipos de solo**, Bragantia, v. 70, n. 3, p.481-487, 2011.

- CHAVES, M. M.; *et al.*, **How plants cope with water stress in the field Photosynthesis and growth**. *Annals of Botany*, London, v. 89, n. 7, p. 907-916, 2002.
- COPP, B. R. **Antimycobacterial natural agents**. *Natural Products Report*, v. 20, p. 535-557, 2003.
- CORDEIRO, Y. E. M., *et al.*, **Aspectos bioquímicos de plantas jovens de Açaizeiro (*Euterpe oleracea*) sob dois regimes hídricos na Amazônia Oriental**, *Biota Amazônia*, v. 7, n. 3, p. 52-56, 2017.
- CORNIC G., MASSACCI, A., **Leaf photosynthesis under drought stress**, in: Baker N.R., (Ed.), *Photosynthesis and the Environment*, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 1996.
- COSTA, G. F.; MARENCO, R. A., **Fotossíntese, condutância estomática e potencial hídrico foliar em árvores jovens de andiroba (*Carapa guianensis*)**. *Acta Amazonica*, v. 37, n.2, p. 229-234, 2007.
- COSTA, J. C. S., *et al.*, **Avaliação do setor produtivo farmoquímico no Brasil: capacitação tecnológica e produtiva**, *RECIIS*, v. 8, (4), p. 443-460, 2014.
- COSTA-SILVA, R., *et al.*, **Morfoanatomia foliar de mororó (*Bauhinia e Schnellia*, Fabaceae)**, *Revista brasileira de Farmacognosia*, v. 28 n. 4, 2018.
- CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J.; SNADER, K. M. J., *Natural Products*, v.60, p. 52, 1997.
- DE SOUSA, L. M.; *et al.*, **New Cytotoxic Bibenzil and other constituents from *Bauhinia unguolata* L. (Fabaceae)**. *Chemistry e Biodiversity*, v. 13, (12), p. 1630-1635, 2016.
- DOS SANTOS, A. E., *et al.*, **Quercetin and quercetin 3-O-glycosides from *Bauhinia longifolia* (Bong.) Steud. show anti-Mayaro virus activity**, *Parasites & Vectors*, v. 7, (1), p. 130, 2014.
- DUTRA, V. F.; GARCIA, F. C. P.; LIMA, H. C., **Caesalpinioideae (Leguminosae) nos Campos Rupestres do Parque Estadual do Itacolomi, MG, Brasil**. *Acta botânica. Brasília*, n. 22, v. 2, p. 547-558, 2008.
- DUTRA, V. F.; *et al.*, **Fenologia reprodutiva, síndromes de polinização e dispersão em espécies de leguminosae dos campos rupestres do parque estadual do Itacolomi, Minas Gerais, Brasil**. *Rodriguésia*, v. 2, p. 371-387, 2009.
- EL-DONDAITY, S. E.; *et al.*, **Chemical and/or biological studies of *Bauhinia variegata* L. and *Cleome droserifolia* (Forssk.) Del. Growing in Egypt**. *Egyptian Journal of Biomedical Sciences*, v. 19, n. 10, p. 181-203, 2005.
- EMBRAPA CERRADO, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Documentos, ISSN-1517 51111 v. 4, 2ª Ed. Revista e Ampliada, 2005.
- FAVETTA, G. M. **Estudo econômico do sistema de adução em equipamentos de irrigação do tipo pivô central**, p. 110. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP, 1998.

- FARAG, M. A., *et al.*, **Phytochemical, antioxidant and antidiabetic evaluation of eight *Bauhinia* L. species from Egypt using UHPLC–PDA–qTOF-MS and chemometrics**, *Phytochemistry*, v. 119, p. 41-50, 2015.
- FARIAS, L. S.; MENDEZ, A. S. L.; **LC/ESI-MS method applied to characterization of flavonoids glycosides in *B. forficata* subsp. *Pruinosa***, *Quim. Nova*, v. 37, n. 3, p. 483-486, 2014.
- FAROOQ, M.; *et al.*, **Plant drought stress: effects, mechanisms and management**, *Agronomy for Sustainable Development*, v. 29, (1), p. 185–212, 2009.
- FERRERES, F.; *et al.*, ***Bauhinia forficata* Link authenticity using flavonoids profile: Relation with their biological properties**. *Food Chemistry*. (134), p.894–904, 2012.
- FIEHN, O. **Metabolomics – the link between genotypes and phenotypes**. *Plant Mol Biol*, v. 48, p. 155–171, 2002. <https://doi.org/10.1023/A:1013713905833>
- FILHO, J. N.; SÁ, V. A. L.; SIMÕES, A. L., **Irrigação**, Instituto Agrônômico de Pernambuco, Folheto Explicativo, 2008.
- FOYER C. H., FLETCHER J. M., **Plant antioxidants: colour me healthy**, *Biologist*, v. 48, p. 115–120, 2001.
- FUNARI, C. S.; *et al.* **Metabolômica, uma abordagem otimizada para exploração da biodiversidade brasileira: estado da arte, perspectivas e desafios**, *Química Nova*, v. 36, n. 10, p.1605-1609, 2013.
- GANIKO-DUTRA, M.; SALDANHA, L. L., DOKKEDAL, A. L., **Análise fitoquímica e morfológica de duas espécies de *Bauhinia* sect. *Cansenia* (Fabaceae) popularmente conhecidas como “pata-de-vaca”**, trabalho apresentado no 30º Congresso de Iniciação científica UNESP, Bauru, SP, 2018.
- GAVA, R.; *et al.*, **Lâminas de irrigação para diferentes cultivares de soja em pivô central**. *Revista brasileira engenharia agrícola e ambiente*, Campina Grande, v.22, n.1, 2018.
- GIL, E. S.; *et al.*, **Atividade antioxidante de extrato etanólico e hidroalcoólico de “canjiqueira” (*Byrsonima orbygniana*). Doseamento de rutina, quercetina, ácido elágico e ácido ascórbico**. *Revista Eletrônica de Farmácia Suplemento*, v. 2, (2), p. 85-88, 2005.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P.; **Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários**, *Química Nova*, v. 30, n. 2, p.374-381, 2007.
- GOTTLIER, O. R.; BORIN, M. R. M. B. **Quimiosistemática como ferramenta na busca de substâncias ativas**. In: SIMÕES, C.M.O. et al. *Farmacognosia da Planta ao Medicamento*. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. da UFRGS/ Ed. da UFSC, p. 91- 105, 2003.
- GUPTA, M. P.; **Plantas Medicinales Iberoamericanas**; Talleres de Editorial Presencia, Santafé de Bogotá, Colômbia, ed. 270, p. 347, 1995.

GUPTA, A., *et al.*, **Medicinal Plants Under Climate Change: Impacts on Pharmaceutical Properties of Plants**; *Climate Change and Agricultural Ecosystems*, c. 8, p. 181-209, 2019.

HANSEN, H. C.; *et al.*, **Stilbene analogs as inducers of apolipoprotein-I transcription**, *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 45, (5), p. 2018-2023, 2010.

GURIB-FAKIM, A. **Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow**. *Molecular Aspects of Medicine*, v. 27, p. 1-93, 2006.

HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A., **Advances in flavonoid research since 1992**, *Phytochemistry*, v. 55, (6), p. 481-504, 2000.

HARRIS D.; *et al.*, **On-farm seed priming to improve crop establishment and yield in dry direct-seeded rice**, in: Pandey S., Mortimer M., Wade L., Tuong T.P., Lopes K., Hardy B. (Eds.), **Direct seeding: Research Strategies and Opportunities**, International Research Institute, Manila, Philippines, p. 231–240, 2002.

HAWKINS, B., **Plants for life: Medicinal plant conservation and botanic gardens**. *Botanic Gardens Conservation International*, Richmond, UK. Heimann, M. & Reichstein, M., **Terrestrial ecosystem carbon dynamics and climate feedbacks**, *Nature*, (451), p. 289-292, 2008.

HOSTETTMAN, K; QUEIROZ, E.F.; VIEIRA, P.C. **Princípios ativos de plantas superiores**. São Carlos, UFSCar, 2003.

Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC), **“Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change”**, 2014.

IRIBARREN, A. M.; POMILIO, A. B., **Steroidal glycosides, flavonoids, and other components of *Bauhinia uruguayensis***. *Anales de la Asociación Química Argentina*, v. 77, n. 4, p. 461- 466, 1989.

JALEEL, C. A., *et al.*, **Alterations in osmoregulations, antioxidant enzymes and indole alkaloid levels in *Catharanthus roseus* exposed to water deficit**. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 59, (2), p. 150-157, 2007.

JULIAN, C., *Medicinal Pharmacology and Chemistry Physiology*, v. 2, (1), 1929.

KALEGARI, M.; *et al.*, **Phytochemical constituents and preliminary toxicity evaluation of leaves from *Rourea induta* Planch. (Connaraceae)**. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 47, n. 3, p. 635-642, 2011.

KARTHIKA, G.; *et al.*, **Measurement of transpiration restriction under high vapor pressure deficit for sorghum mapping population parents**, *Plant Physiology Reports*, v. 24, (1), p. 74-85, 2019.

KIM, H. K.; CHOI, Y. H.; VERPOORTE, R., *Nature Protocols*, v. 5, (3), p. 536-549, 2010.

KLEINWÄCHTER, M., SELMAR, D., **Influencing the Product Quality by Applying Drought Stress During the Cultivation of Medicinal Plants**, *Physiological Mechanisms and Adaptation Strategies in Plants Under Changing Environment*, Springer, v. 1, p. 57-73, 2014.

- KRAMER, P. J., **Water relations of plants and soils**. Academic Press, London, 1995.
- KURMAR, S.; PANDEY, A. K., **Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview**, The Scientific World Journal, v. 2013, p. 16, 2013.
- KWAK, J., *et al.*, **Variation of quercetin glycoside derivatives in three onion (*Allium cepa* L.) varieties**, Saudi Journal of Biological Sciences, v. 24, (6), p. 1387-1391, 2017.
- LARCHER, W. *Ecofisiologia Vegetal*. São Carlos: RiMa, P. 531, 2004.
- LEI, Z.; HUHMANN, D. V.; SUMMER, L. W., **Mass spectrometry strategies in metabolomics**. JBC Papers in Press, Manuscript R111.238691, 2011.
- LEPERTZ, V., *et al.* **Biodiversity monitoring: some proposals to adequately study species' responses to climate change**. Biodiversity Conservation, v. 18, p. 3185, 2009.
- LEPORT L., *et al.*, **Physiological responses of chickpea genotypes to terminal drought in a Mediterranean-type environment**, Eur. J. Agron., v. 11, p. 279–291, 2006.
- LIANOPOULOU, V., BOSABALIDIS, A. M. **Traits of seasonal dimorphism associated with adaptation to cold stress in *Origanum dictamnus* L. (Lamiaceae)**. Journal of Biology Research-Thessaloniki, v. 21, n. 17, 2014.
- MAIA NETO, *et al.*, **Flavonoids and alkaloids from leaves of *Bauhinia unguolata* L.** Biochemical Systematics and Ecology, v. 36, p. 227-229, 2008.
- MALI, R. G. *et al.*, **(*Bauhinia variegata*): chemistry, traditional and medicinal uses – a review**. Pharmacognosy Review, v. 1, p. 314-319, 2007.
- MANYAMA, F. F., *et al.*, **The importance of bushmeat in household income as a function of distance from protected areas in the western Serengeti ecosystem, Tanzania**. Environment and Natural Resources Research, v. 9, (3), p. 49-62, 2019.
- MARENCO, J. A., **Mudanças Climáticas Globais e seus Efeitos sobre a Biodiversidade Caracterização do Clima Atual e Definição das Alterações Climáticas para o Território Brasileiro ao Longo do Século XXI**, Ministério do meio ambiente, secretaria da biodiversidade e florestas, Brasília, 2006.
- MARIJUAN, M. P.; BOSCH, S. M., **Ecophysiology of invasive plants: osmotic adjustment and antioxidants**. Trends in Plant Science, v.18, p.660-666, 2013.
- MARMITT, D. J.; REMPEL, C., **Análise fitoquímica das folhas de três espécimes de *Bauhinia forficata* link comparando com um espécime de *Bauhinia variegata* I**. Revista da Universidade Vale do Rio Verde, Três Corações, v. 14, n. 2, p. 229-237, 2016.
- MARTÍNEZ-FLÓREZ, S.; *et al.*, **Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes**. Nutricion Hospitalaria, v. XVII, n. 6, p. 271-278, 2002.
- MENDES, B. G.; MACHADO, M. J.; FALKENBERG, M. **Triagem de glicolipídios em plantas medicinais**. Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 16, p. 568-575, 2006.

- MENEZES, F. S.; *et al.*, **Atividade hipoglicemiante de duas espécies de *Bauhinia* brasileira: *Bauhinia forficata* L. e *Bauhinia monandra* Kurz.** Revista brasileira farmacognosia, v.17, n.1, p. 8-13, 2007.
- MIEAN, K. H.; MOHAMED, S., **Flavonoid (Myricetin, Quercetin, Kaempferol, Luteolin, and Apigenin) Content of Edible Tropical Plants**, Food Chemistry, v. 49, (6), p. 3106-3112, 2001.
- MILLAR, C. I., *et al.*, **Climate change and forests of the future: managing in the face of uncertainty**, Ecological Society of America, v.17, (8), p. 2145-2151, 2007.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE - **A Fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisas de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos**, Brasília – DF, 2006.
- MONTEIRO, J. G., *et al.*, **Crescimento e conteúdo de prolina em plântulas de guandu submetidas a estresse osmótico e à putrescina exógena**, Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 49, p. 18-25, 2014.
- MORAIS, S. M.; *et al.*, **Plantas medicinais usadas pelos índios Tapebas do Ceará.** Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 15, p. 169-177, 2005.
- MORAIS, S. M.; *et al.*, **Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil.** Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 19, 2009.
- MORAIS, L. A. S., **Influência dos fatores bióticos na composição química dos óleos essenciais.** Horticultura Brasileira, v 27, n 2, 2009.
- MUNNÉ-BOSCH S., PENUELAS J., **Photo and antioxidative protection, and a role for salicylic acid during drought and recovery in fieldgrown *Phillyrea angustifolia* plants**, Planta, v. 217, p. 758–766, 2003.
- NEWMAN, T. J.; CRAGG, G. M., **Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014**, Journal of natural products, v. 79, (3), p. 629-61, 2016.
- NILSEN E. T., ORCUTTE D. M., **Phytohormones and plant responses to stress**, in: Nilsen E.T., Orcutte D.M. (Eds.), **Physiology of Plant under Stress: Abiotic Factors**, John Wiley and Sons, New York, p. 183–198, 1996.
- NONAMI, H., **Plant water relations and control of cell elongation at low water potentials**, Journal Plant Reource, v. 111, p. 373–382, 1998.
- NICULESCU-DUVAZ, V. F.; *et al.*, **Potential anticancer agents 111. Urethane-type nitrogen mustards of some synthetic estrogens**, Canadian Journal of Chemistry, v. 44, (9), p. 1102-1105, 1966.
- NISSEN, S. E., *et al.*, *Jama*, v. 290, p. 2292–2300, 2003.
- OLIVEIRA FILHO, D.; TEIXEIRA, C. A.; RIBEIRO, M. C., **Racionalização energética de uma estação de pressurização de um perímetro irrigado.** Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental, v.8, n.1, p.135-143, 2004.
- OLIVER, S. G.; WINSON, M. K.; KELL, D. B.; BAGANZ, F.; **Systematic functional analysis of the yeast genome**, Trends Biotechnol, v.16, (10), p.447, 1998.
- OMS, **Bulletin of the World Health Organization. Regulatory situation of herbal medicines.** A worldwide review, Geneva, 1998.

- PAULA, C. S.; *et al.*, **Potencial antioxidante in vitro das folhas da *Bauhinia unguolata* L.** Revista Ciência Farmacêutica Básica Aplicada, v. 35, (2), p. 217-22, 2014.
- PAULINO, W. D.; PEREIRA, P. M., **Dimensionamento Econômico de tubulações de recalque.** In: Congresso nacional de irrigação e Drenagem, v.3, p. 777-796, 1986.
- PROGRAMA NACIONAL DE IRRIGAÇÃO. **Tempo de irrigar: manual do irrigante.** São Paulo: Mater, Fundação Victor Civita, p. 160, 1987.
- PEPATO, M. T.; *et al.*, XIII Reunião anual da FSBE, Caxambú, Brasil, 1998.
- PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. G. **Vegetable secondary metabolites and antioxidants benefits.** Journal of Biotechnology and Biodiversity, v. 3, p. 146-152, 2012.
- PINHEIRO, T. S. D. B., *et al.* **Comparative assessment of kaempferitrin from medicinal extracts of *Bauhinia forficata* Link.** Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v. 41, p. 431–436, 2006.
- PINTO, D. A.; *et al.*, **Produtividade e qualidade do óleo essencial de capim-limão, *Cymbopogon citratus*, DC, submetido a diferentes lâminas de irrigação.** Revista brasileira de plantas medicinais, n. 16, v. 1, p. 54-61, 2014.
- PORFIRIO, L. L.; *et al.*, **Improving the Use of Species Distribution Models in Conservation Planning and Management under Climate Change.** PLoS ONE 9(11): e113749. doi:10.1371/ journal.pone.0113749, 2014.
- PORTO, C. A. L.; KLAR, A. E.; VASCONCELLOS, J. V.; **Efeitos do déficit hídrico em parâmetros fisiológicos de folhas de sorgo (*Sorghum bicolor*, L.)** Irriga, Botucatu, v. 03, n. 3, p.81-88, 1998.
- REDDY, A. R., CHAITANYA, K. V., VIVEKANANDAN, M., **Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants,** J. Plant Physiol., v. 161, p. 1189–1202, 2004.
- RODRIGUES, R. O., *et al.*, **Antioxidant and Anti-inflammatory Activities of *Bauhinia unguolata* L. (Fabaceae) on LPS-Stimulated RAW 264.7 Cells,** Pharmacognosy Journal, v. 11, (1), p. 37-42, 2019.
- RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D. A., **Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do Cerrado na região do Alto Rio Grande – Minas Gerais,** Ciência agrotecnológica, v.25, n.1, p.102-123, 2001.
- RUSSO, E. M. K.; *et al.*; *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 23, n. 11, 1990.
- SADIQOV S. T., *et al.*, **Role of Ca²⁺ in drought stress signaling in wheat seedlings,** Biochemistry-Moscow, v. 67, p. 491–497, 2002.
- SALATINO, A., *et al.*, **Foliar flavonoids of nine species of *Bauhinia*,** Revista Brasileira de Botânica, v. 22, p. 17-20, 1999.
- SALDANHA, L. L. **Plantas medicinais: isolamento bioguiado de princípios ativos e variações do perfil químico no Cerrados brasileiro baseado em metabolômica.** Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) apresentada ao Instituto de Biociências, UNESP, Campus de Botucatu, 2017.
- SANCHES, R. F. E.; SILVA, E. A., **Changes in leaf water potential and photosynthesis of *Bauhinia forficata*,** Hoehnea, v.40 (1), p.181-190, 2013.

- SANTOS, C. F.; LIMA, G. P. P.; MORGADO, L. B. **Tolerância e caracterização bioquímica em feijão-caupi submetido a estresse hídrico na pré-floração.** *Naturalia*, v. 33, p. 34-44, 2010.
- SANTOS, M. C., *et al.*, **Teor de prolina em brotações adventícias de mangabeira cultivadas in vitro sob condições de estresse osmótico,** *Scientia Plena*, v. 12, n. 12, 2016.
- SCALON, S. P. Q., *et al.*, **Water stress in metabolism and initial growth of mutambo (*Guazuma ulmifolia* lam.) seedlings,** *Ciência Florestal*, Santa Maria, v. 21, n. 4, p. 655-662, 2011.
- SCHUPPLER, U.; *et al.*, **Effects of water stress on cell division and cell-division-cycle-2-like cell-cycle kinase activity in wheat leaves,** *Plant Physiol.*, v. 117, p. 667–678, 1998.
- SCHWERZ, L.; **Produção de biomassa, teor de óleo essencial e trocas gasosas em *Aloysia triphylla* submetida a diferentes disponibilidades hídricas.** Frederico Westphalen, RS, Brasil, 2013.
- SELMAR, D.; KLEINWÄCHTER, M., **Influencing the product quality by deliberately applying drought stress during the cultivation of medicinal plants.** *Industrial Crops and Products*, n. 42, v.4, p. 558-566, 2013.
- SERRAJ R., SINCLAIR T. R., **Osmolyte accumulation: can it really help increase crop yield under drought conditions?** *Plant Cell Environment*, v 25, p. 333–341, 2002.
- SHINTU, L.; ZIARELLI, F.; CALDARELLI, S.; **Is high resolution magic angle spinning NMR a practical speciation tool for cheese samples?** *Magnetic Resonance in chemistry*, (42), p. 396-401, 2004.
- SILVA, A. J. B.; BARRETO, J. G.; **Determinação de teor de princípio ativo em comprimidos de ácido Acetilsalicílico;** *Acta Biomédica Brasiliensis*, v. 4, n. 1, 2013.
- SILVA, E. C.; *et al.*, **Stomatal changes induced by intermittent drought in four umbu tree genotypes.** *Brazilian Journal of Plant Physiology*, Londrina, v. 21, n. 1, p. 33-42, 2009.
- SILVA, K. L.; CECHINEL FILHO, V.; **Plantas do gênero *Bauhinia*: Composição química e potencial farmacológico.** *Química nova*, v. 25, n. 3, 2002.
- SILVA, R. W. C., PAULA, B. L., **Causa do aquecimento global: antropogênica versus natural.** *Terræ Didática*, v. 5, (1), p. 42-49, 2009.
- SINGH–SANGWAN, N. *et al.* **Effect of drought stress on growth and essential oil metabolism in lemongrasses.** *New Phytologist*, v. 128, p. 173-179, 1994.
- SOUSA, R. F.; SOUSA, J. A., **Metabólicos secundários associados a estresse hídrico e suas funções nos tecidos vegetais,** *Revista Brasileira de Gestão Ambiental*, Pombal – PB, Brasil, v. 11, n.01, p.01 - 08, 2017.
- STUHLFAUTH, T.; FOCK, H.P., **Effect of whole season CO₂ enrichment on the cultivation of a medicinal plant, *Digitalis lanata*,** *Journal of Agronomy and Crop Science*, v. 64, (3), p. 168-173, 1990.

- SUBBARAO, G. V., *et al.*, **Osmotic adjustment, water relations and carbohydrate remobilization in pigeonpea under water deficits**, *Journal Plant Physiology*, v. 157, p. 651–659, 2000.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E., *Plant Physiology*, 4 ed., Sinauer Associates Inc. Publishers, Massachusetts, 2006.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia vegetal*. 4.ed. Porto Alegre: Artmed. 2009.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia vegetal*. 5.ed. Porto Alegre, Artemed, p 954, 2013.
- TRYGG, J.; WOLD, S., **Orthogonal projections to latent structures (O-PLS)**. *Journal of Chemometrics*, v. 16, n. 3, p. 119–128, 2002.
- TURNER N.C., WRIGHT G.C., SIDDIQUE K.H.M., **Adaptation of grain legumes (pulses) to water-limited environments**, *Adv. Agron.*, v. 71, p. 123–231, 2001.
- VAZ, A. M. S. F.; TOZZI, A. M. G. A. ***Bauhinia ser. Cansenia* (Leguminosae: Caesalpinioideae) no Brasil**. *Rodriguésia* v.54, (83), p. 55-143. 2003.
- VAZ, A. M. S. F. ***Bauhinia* in Lista de Espécies da Flora do Brasil 2014**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB22831>>, 2014.
- VERPOORTE, R., **Secondary Metabolism**. *Metabolic Engineering of Plant. Secondary metabolism*. Spring, Dordrecht, 2000.
- WAIBEL, M., *et al.*, **Bibenzyl- and stilbene-core compounds with non-polar linker atom substituents as selective ligands for estrogen receptor beta**, *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 44, (9), 3412-3424, 2009.
- WEI, X. H., *et al.*, **Chemical Constituents of *Caesalpinia decapetala* (Roth) Alston**, *Molecules*, v. 18, (1), p. 1325-1336, 2013.
- WHO, **The world medicines situation 2011: traditional medicines: global situation, issues and challenges**. Geneva: WHO PUBLICATIONS, p. 12, 2011.
- WILHELM FILHO, D., SILVA, E. L.; BOVERIS, A., **Flavonoides antioxidantes de plantas medicinais e alimentos: importância e perspectivas terapêuticas**. In: Yunes RA, Calixto JB. *Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna*. Chapecó: Universidade do Oeste de Santa Catarina, p.317-334, 2001.
- WITTMAN, H., **Spaltungen mittels Diazoniumverbindungen und Chinonimidchlorid, 2. Mitt: Über die Reaktion von 4,4'-Dihydroxydiphenyl-äthan- und-propanderivaten mit Diazoniumsalzen und Chinonimidchlorid**, *Monatshefte für Chemie und verwandte Teile anderer Wissenschaften*, v. 93, (5), p. 1128–1135, 1962.
- WOLFENDER, J. L.; *et al.*, **MS-based plant metabolomic approaches for biomarker discovery**. *Natural Products Communications*, v. 10, p. 1417, 2009.
- WOLFENDER, J. L., *et al.*, **Accelerating metabolite identification in natural product research: Toward an ideal combination of liquid chromatography-high-resolution tandem mass spectrometry and NMR profiling, in silico**

databases, and chemometrics. Analytical Chemistry, v. 91 (1), p. 704–742, 2019.

XIAO, M.; *et al.*, **Studies on flavonoids from the leaves of *Lindera aggregate*.** Zhong Yao Cai, v. 34, n. 1, p. 62-4, 2011.

YOKOTA A., *et al.*, **Citrulline and DRIP-1 Protein (ArgE Homologue) in Drought Tolerance of Wild Watermelon,** Ann. Bot., v. 89, p. 825–832, 2002.

YONEKUBO, S., *et al.*, **Synthesis and structure–activity relationships of 1-benzylindane derivatives as selective agonists for estrogen receptor beta,** Bioorganic & Medicinal Chemistry, v. 24, (22), p. 5895-5910, 2016.

YUNES, R, A.; PEDROSA, R, C; CECHINEL FILHO, V. Química Nova, v. 24, p. 147, 2001.

ZANDALINAS, S. I., *et al.*, **Activation of Secondary Metabolism in Citrus Plants Is Associated to Sensitivity to Combined Drought and High Temperatures.** Plant Sci. (7), p. 1954., 2017.

ZHU, J. K.; **Salt and drought stress signal transduction in plants,** Annu. Rev. Plant Biol, v. 53, p. 247–273, 2002.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. **Flavonoides. Farmacognosia, da planta ao medicamento.** 5a ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, Florianópolis, p. 577-614, 2003.