

## RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo deste trabalho será disponibilizado somente a partir de 17/08/2018.

Plantas Medicinais: isolamento bioguiado de princípios ativos e  
variações de perfil químico no Cerrado brasileiro baseado em  
metabolômica

**Luiz Leonardo Saldanha**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,  
Câmpus de Botucatu, UNESP, para  
obtenção do título de Doutor no Programa  
de Pós-Graduação em Ciências Biológicas  
(Botânica), Área de concentração: Fisiologia  
e Bioquímica Vegetal.

**BOTUCATU – SP**

**2017**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“Júlio de Mesquita Filho”  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

Plantas Medicinais: isolamento bioguiado de princípios ativos e  
variações de perfil químico no Cerrado brasileiro baseado em  
metabolômica

**LUIZ LEONARDO SALDANHA**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. ANNE LÍGIA DOKKEDAL BOSQUEIRO**  
**ORIENTADORA**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,  
Câmpus de Botucatu, UNESP, para  
obtenção do título de Doutor no Programa  
de Pós-Graduação em Ciências Biológicas  
(Botânica) Botânica, Área de concentração:  
Fisiologia e Bioquímica Vegetal.

**BOTUCATU – SP**

**2017**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Saldanha, Luiz Leonardo.

Plantas medicinais : isolamento bioguiado de princípios ativos e variações de perfil químico no Cerrado brasileiro baseado em metabolômica / Luiz Leonardo Saldanha. - Botucatu, 2017

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Anne Lígia Dokkedal  
Capes: 20306008

1. Plantas medicinais. 2. Pata de vaca. 3. Cerrado.  
4. Metabolômica. 5. Hipoglicemiantes.

Palavras-chave: Anoglicosídeos; Diabetes; Padrões fitogeográficos.

Dedico este trabalho aos meus pais,  
irmão e amigos.

## Agradecimentos

Às agências de fomento FAPESP por ter financiado a pesquisa (proc. n. 09/52237-9) a qual este projeto está vinculado e à CAPES, pelas bolsas concedidas no país e no exterior possibilitando o estágio de doutorado sanduíche por 12 meses na Universidade de Genebra - Suíça.

Em especial à professora Anne Lígia Dokkedal, primeiramente pela paciência e por ter me orientado, desde a iniciação científica até o doutorado, não somente nos assuntos acadêmicos que levarei para a vida toda. Pela nossa amizade, especialmente.

À professora Cláudia Maria Furlan, do IB-USP, por me receber em seu laboratório, pela orientação e todo suporte para a execução dos experimentos de AFLP.

Ao professor José Roberto Bosqueiro pela parceria e suporte e à Priscilla Maria Ponce Varela e Nathália A.P.C. Henriques pela realização dos bioensaios de diabetes enriquecendo os nossos trabalhos e a todas as discussões/orientações.

Aos professores Jean-Luc Wolfender e Emerson Ferreira Queiroz por terem me recebido em seus laboratórios e dado a oportunidade de fazer parte de sua equipe na Universidade de Genebra - Suíça - onde obtive grandiosas experiências profissionais e culturais.

Et voilà, merci à tous mes amis de l'Université de Genève qui m'avez reçu très très bien, pour tous le ballade et amitié, essentielles pour la vie loin.

Ao Marcos M. F. Queiroz e à Claudia Q. da Rocha pela convivência, companheirismo e valiosos ensinamentos passados durante o estágio na Suíça.

Ao Marcelo Paes de Barros pela nossa amizade e pela grande ajuda durante os trabalhos de campo deste projeto.

Aos motoristas da FC/UNESP, Luiz e Ramos, por terem me levado, sempre em segurança, a todas as viagens de campo, e foram muitas!

A todos que ajudaram indiretamente na execução desse projeto.

"O mundo não foi feito em alfabeto. Senão que primeiro em água e luz.

Depois árvore."

Manoel de Barros

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>9</b>
1.1. ISOLAMENTO DE PRODUTOS NATURAIS BIOATIVOS .....	9
1.2. METABOLÔMICA AMBIENTAL E TÉCNICAS ASSOCIADAS.....	12
<b>CAPÍTULO 1</b> .....	<b>21</b>
<b>"ISOLAMENTO BIO-GUIADO DE COMPOSTOS HIPOGLICEMIANTES DAS FOLHAS DE <i>Bauhinia holophylla</i> (Bong.) Steud. (FABACEAE)"</b> .....	<b>21</b>
2.1. INTRODUÇÃO.....	22
2.2. MATERIAL E MÉTODOS .....	28
2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	35
2.4. CONCLUSÃO .....	64
2.5. REFERÊNCIAS .....	66
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	<b>68</b>
<b>"INFLUÊNCIAS GEOGRÁFICA E DAS CONDIÇÕES DE SOLO NO PERFIL QUÍMICO DE <i>Myrcia bella</i> Cambess. (MYRTACEAE) BASEADO EM ESTUDOS DE METABOLÔMICA POR UPLC-TOF-HRMS"</b> .....	<b>68</b>
3.1. INTRODUÇÃO.....	73
3.2. MATERIAL E MÉTODOS .....	79
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	85
3.4. CONCLUSÃO .....	114
3.5. REFERÊNCIAS .....	116



## Resumo

Presentes em vários biomas do Cerrado, as espécies de *Bauhinia* L. (Fabaceae), são popularmente conhecidas por "pata-de-vaca" e utilizadas por comunidades tradicionais principalmente no tratamento do *Diabetes mellitus* (DM). Este trabalho teve como um de seus objetivos identificar princípios ativos das folhas de *Bauhinia holophylla* (Bong.) Steud. por fracionamento bioguiado, em modelos *in vivo* de diabetes, aliado a isolamento em escala semipreparativa. Através dessa metodologia de estudo foi possível isolar três cianoglicosídeos não-cianogênicos: (2*E*)-(4*R*,5*S*,6*S*)-6-(β-D-glicopiranosiloxil)-4,5-dihidroxiciclohex-2-en-1-ilideno-acetonitrila (1), (2*E*)-2-[(4*R*,5*S*,6*S*)-4,5,6-trihidroxiciclohex-2-en-1-ilideno]acetonitrila (2), e (-)-litospermosídeo (3). A estrutura dos compostos foi elucidada por ressonância magnética nuclear, massas de alta resolução e dicroísmo circular eletrônico. O composto litospermosídeo (3) apresenta forte atividade hipoglicemiante, observada por meio de testes de tolerância à glicose e avaliação da glicemia, comparado à Metformina® e foi identificado como um dos principais compostos responsáveis pela atividade hipoglicemiante de *B. holophylla*. Uma vez que a produção de metabólitos secundários nas plantas pode variar em função das condições ambientais, este trabalho teve como objetivo complementar o estudo das relações entre os padrões de perfil químico e genético em diferentes regiões fitogeográficas do Cerrado Brasileiro, baseado em estudos de metabolômica por cromatografia de ultra eficiência acoplada à espectrômetro de massas de alta resolução e a influência do clima e componentes do solo. Esse estudo foi realizado com as folhas de *Myrcia bella* Cambess. (Myrtaceae), uma planta nativa do Cerrado com atividade hipoglicemiante, coletadas em 6 regiões geográficas do Brasil. Análises estatísticas revelaram um padrão químico com maior similaridade entre os estados de Goiás e São Paulo e em menor grau com Mato Grosso do Sul. A composição, especialmente de heterosídeos de flavonoides, é afetada pela variação dos teores de alguns nutrientes presentes no solo como Fe, Al, Mg e pelo pH. A análise do perfil genético por amplificação de fragmentos polimórficos evidenciou que este segue um padrão geográfico, similar ao químico. Este é o primeiro trabalho que mostra, sob a ótica da química de produtos naturais, padrões de similaridade entre os Cerrados dos estados de Goiás e São Paulo e em menor grau com Mato Grosso do Sul, já observados em estudos de composição florística.

**Palavras-chave:** cianoglicosídeos, diabetes, padrões fitogeográficos, "pata-de-vaca"

## Abstract

Present in several biomes of the Cerrado, the species of *Bauhinia* L. (Fabaceae), are popularly known as "cow's-feet" and used by traditional communities mainly in the treatment of Diabetes mellitus (DM). This work had as one of its objectives to identify the active principles of the leaves of *Bauhinia holophylla* (Bong.) Steud. via bio guided fractionation, through *in vivo* models of diabetes, combined with isolation in semipreparative scale. Through this method of study was possible to isolate three known non-cyanogenic glycosides: (2E)-(4R,5S,6S)-6-( $\beta$ -D-glycopyranosiloxy)-4,5-dihydroxycyclohex-2-en-1-ylideno-acetonitrile (1), (2E)-2-[(4R,5S,6S)-4,5,6-trihydroxycyclohex-2-en-1-ylidene]acetonitrile (2), and (-)-lithospermoside (3). The structures of the compounds were elucidated by NMR, HRMS and ECD. The compound lithospermoside (3) presents strong hypoglycemic activity observed by glucose tolerance tests and evaluation of blood glucose compared to Metformin® and has been identified as one of the main compounds responsible for the hypoglycemic activity of *B. holophylla*. Since the production of secondary metabolites in plants may vary depending on environmental conditions, this work aimed to study the relationship between the chemical and genetic profile patterns in different phytogeographic regions of the Brazilian Cerrado based on metabolomics studies by UHPLC-TOF-HRMS and the influence of climate and soil components. This study was conducted with *Myrcia bella* Cambess. (Myrtaceae), a native plant from Cerrado with hypoglycemic activity, collected in 6 regions of Brazil. Statistical analyses revealed a pattern with greater similarity between the States of Goiás and São Paulo and, to a lesser extent with Mato Grosso do Sul. The composition, especially of glycosides of flavonoids, is affected by variation in the levels of some nutrients present in the soil as Fe, Al, Mg and pH. The genetic profile analysis by AFLP showed that this follows a geographic pattern, as well as the chemical profile. This is the first work that shows, from the perspective of natural products chemistry, patterns of similarity between the Cerrado of Goiás and São Paulo States and, to a lesser extent with Mato Grosso do Sul, already observed in studies of floristic composition.

**Key words:** cyanoglucosides, diabetes, phytogeographic patterns, "pata-de-vaca".

## *Introdução*

## 1. Introdução

### 1.1. Isolamento de Produtos Naturais Bioativos

O estudo de química de produtos naturais, mais recentemente, está associado especialmente à busca de substâncias ativas para o desenvolvimento de medicamentos. Embora a humanidade venha utilizando as plantas como fonte de alimentos e medicamentos por milênios, há 200 anos temos o registro do primeiro isolamento de uma molécula pura bioativa: a morfina. Atualmente, moléculas provenientes de fontes naturais, chamadas de produtos naturais (PN's), continuam tendo grande importância na descoberta de novos compostos candidatos ao desenvolvimento de medicamentos (LI & VEDERAS, 2009). Para se manter competitivo a outros métodos, os processos de prospecção, isolamento e elucidação estrutural devem ser melhorados constantemente.

Inicialmente, para a elucidação estrutural, era necessário grandes quantidades (> dezenas de mg) de moléculas puras. Com os avanços na área de espectroscopia, especialmente da ressonância magnética nuclear em micro-escala e cromatografia com alta resolução (UPLC-UV-HRMS / LC-SPE-NMR), a necessidade do isolamento em grandes quantidades para elucidação estrutural tem se tornado cada vez menos importante, já que é possível a identificação da estrutura completa em escala de microgramas com o desenvolvimento de equipamentos com a tecnologia *cryo-probe* (WOLFENDER et al., 2012; WOLFENDER et al., 2005).

Apesar da elucidação estrutural ser possível em quantidades cada vez menores, paradoxalmente, o isolamento em larga escala (> dezenas de mg) de PN's é um passo essencial para se caracterizar as propriedades farmacológicas de PN's em testes farmacológicos. Os testes farmacológicos em modelos *in vivo* são necessários para se investigar os mecanismos de ação e ainda demandam grandes quantidades de PN's puros (HOSTETTMAN et al., 1998).

Os primeiros estudos com PN's eram realizados a partir de testes biológicos que avaliavam as propriedades farmacológicas de extratos brutos, ou seja, de PN's em misturas. Este tipo de estudo apresenta algumas limitações para se determinar o potencial farmacológico do extrato em decorrência da complexidade das misturas, pois nem todos os PN's conseguem atingir o alvo da análise e/ou podem estar em

concentrações muito baixas, impedindo a quantificação da atividade de cada componente. O extrato bruto pode conter também muitos compostos provenientes da matriz de extração como lignina, celulose, açúcares livres, além da presença de compostos lábeis que podem gerar artefatos, como os taninos, por exemplo.

Outra abordagem que tem se mostrado eficiente se baseia em testes biológicos com frações de menor complexidade química, sem a presença de interferentes a partir do extrato bruto. A remoção dos compostos considerados interferentes por diferentes meios de fracionamento, que têm como produto frações enriquecidas, permite a identificação e avaliação com maior precisão dos compostos ativos. Várias abordagens de fracionamento têm sido publicadas (CAMP et al., 2012; WONG, et al., 2012) uma delas, a estratégia tradicional de isolamento bioguiado, tem sido modificada e adaptada para absorver as inovações tecnológicas e se explorar o universo químico de uma forma mais eficiente. Os laboratórios modernos têm desenvolvido plataformas que integram bioensaios mais sensíveis e técnicas cromatográficas que possibilitam a identificação dos compostos ativos com experimentos miniaturizados, ou seja, poucos mg do extrato bruto são fracionados em placas de 96 poços para testes *in vitro* (CHALLAL et al., 2014; FAVRE-GODAL et al., 2014; Queiroz et al., 2014a, QUEIROZ et al., 2014b).

A identificação de PN's ativos em misturas complexas em pequena escala é um ponto chave para o isolamento alvo em larga escala de novos PN's com atividade farmacológica. Através desta abordagem de microfracionamento bio-monitorado por HPLC, em linha com experimentos *in vitro*, é possível identificar a região ativa do cromatograma, ou seja, a que contém os picos dos compostos que contribuem para a atividade medicinal e desenvolver estratégias cromatográficas para o isolamento dos compostos alvo em larga escala (dezenas de mg) para testes *in vivo*. O fracionamento do extrato bruto por cromatografia tem vantagem sobre outros métodos, uma vez que a subsequente purificação dos compostos alvo em larga escala é feita também por cromatografia, e assim não se corre o risco de não encontrar os PN's ativos das frações, como ocorre em frações originadas por métodos de fracionamento não-cromatográficos.

Os métodos de micro-fracionamento por cromatografia são compatíveis com testes *in vivo*, porém, considerando-se somente microorganismos como bactérias e fungos ou, mais recentemente, o modelo que utiliza larvas de *zebrafish*. Já nos

modelos de testes farmacológicos *in vivo* em mamíferos ainda existe uma grande necessidade do isolamento em larga escala de PN's. O estudo de PN's em camundongos, por exemplo, é um passo determinante para se caracterizar a atividade de novos PN's e aumenta as chances de transposição e aplicação para os testes clínicos em humanos. No diabetes, especialmente, uma patologia que envolve um quadro fisiológico e hormonal complexo, os testes em camundongos são determinantes para a elucidação dos mecanismos de ação dos compostos em diferentes órgãos como o pâncreas endócrino e o fígado, por exemplo.

Contudo, os passos cromatográficos tradicionais para se obter frações enriquecidas, em quantidades suficientes para testes *in vivo*, são trabalhosos e consomem muito tempo. Normalmente, se inicia o fracionamento do extrato na escala de gramas por cromatografia em coluna aberta ou de média pressão. A posterior purificação dos compostos provenientes desta frações, apesar de eficiente, é realizada na escala de µg/mg e é incompatível com testes biológicos em modelos *in vivo*. Além disso, como boa parte dos métodos cromatográficos são desenvolvidos empiricamente, há um alto consumo de solventes, além da baixa resolução das colunas abertas empacotadas manualmente. Considerando os altos custos e o impacto no ambiente, na ciência moderna, o processo do isolamento de moléculas deveria ser realizado somente com substâncias desconhecidas ou de interesse farmacológico.

Nesse contexto, uma nova alternativa ao fracionamento em colunas cromatográficas abertas, utilizando a transferência de método cromatográfico do HPLC para MPLC, tem aumentado a eficiência do fracionamento e também do isolamento de compostos alvo em larga escala (CHALLAL et al., 2015), o que possibilita sua integração com experimentos bioguidados *in vivo*. Esta técnica representa uma abordagem mais eficiente no isolamento de PN's ativos para diferentes espécies vegetais de interesse medicinal, e permite ainda o isolamento em larga escala de compostos alvo em um único passo, reduzindo os gastos de solventes, uma vez que os métodos são desenvolvidos e otimizados em escala analítica, e posteriormente, transferidos para o MPLC. O método cromatográfico é desenvolvido primeiramente em escala analítica (> 10 mg) por HPLC e posteriormente transferido geometricamente para o MPLC, utilizando fases estacionárias com química e tamanho de partículas padronizados, o que confere seletividade similar e melhora a predição do tempo de retenção dos compostos alvo na coluna do MPLC (CHALLAL et al., 2015).

Portanto, neste trabalho, esta abordagem mais eficiente para fracionamento e isolamento de compostos alvo, com transposição dos métodos do HPLC para MPLC, foi aliada ao estudo químico tradicional bioguiado *in vivo*, para a identificação de compostos ativos, em modelos de estudos de diabetes de espécies com indicação medicinal do Cerrado brasileiro.

## **1.2. Metabolômica Ambiental e Técnicas Associadas**

Na última década vimos o surgimento de abordagens modernas que revolucionaram a forma de análise de processos envolvendo sistemas biológicos. Essas abordagens modernas chamadas de "*omics*" utilizam tecnologias analíticas de alta resolução que geram conjuntos de dados complexos sobre um determinado fenômeno biológico. Aliado às técnicas analíticas ressonância magnética nuclear (RMN), cromatografia líquida e gasosa acoplada a detector de massas (LC-MS e CG-MS) (WOLFENDER, 2009), o tratamento e interpretação de dados são essenciais e necessitam de análises estatísticas apropriadas (THEODORIS, et al., 2011; VERPOORTE, 2007). Essas técnicas têm em comum a análise de amostras com alto número de variáveis e a geração de dados complexos, que quando interpretados adequadamente nos permitem obter alta capacidade de predição e padrões na natureza, e a identificação de biomarcadores importantes.

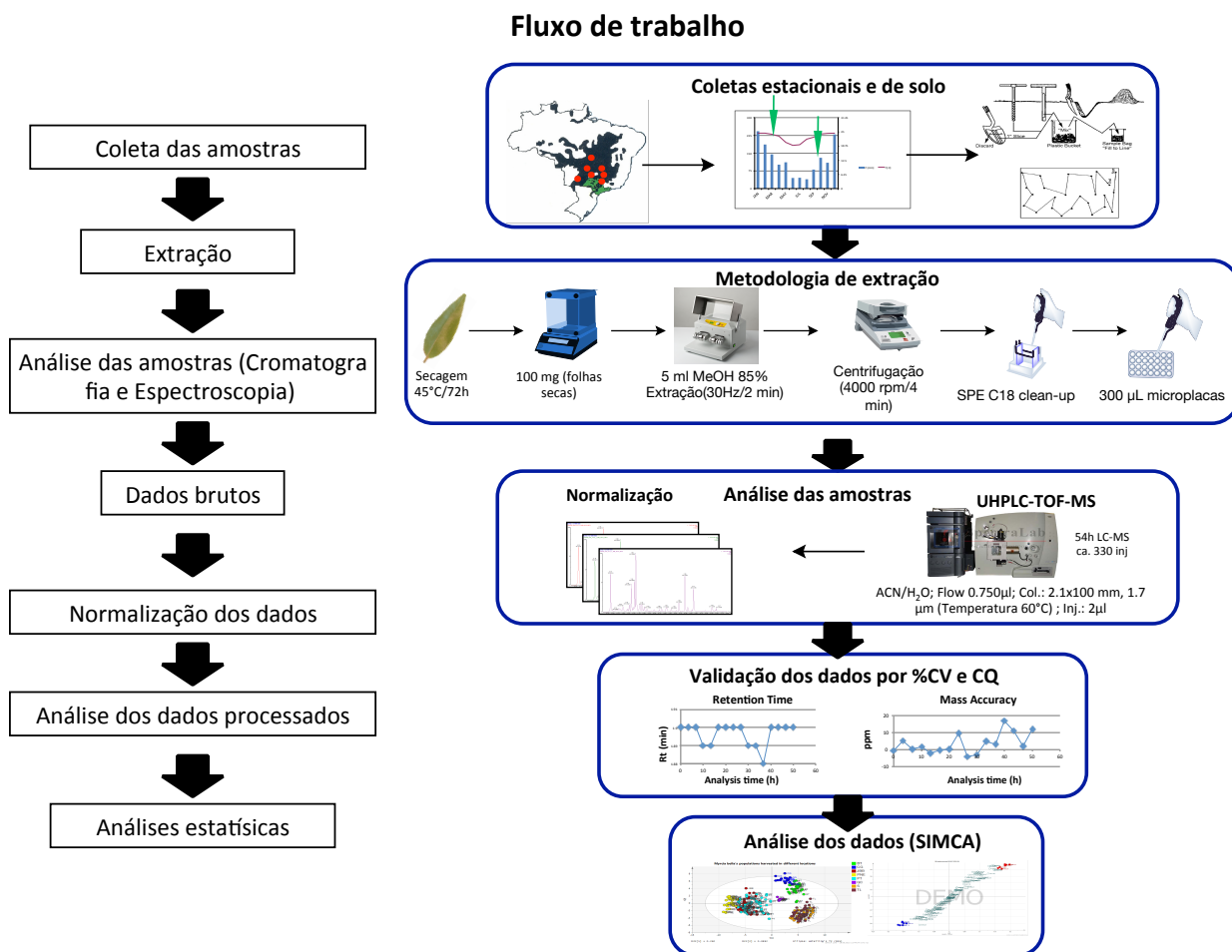
As análises quimiométricas têm ganhado espaço nessas abordagens, têm se mostrado robustas na modelagem de informações e eficientes na validação de dados químicos e biológicos. Ferramentas estatísticas como análise de componentes principais (PCA), análise hierárquica de agrupamentos (HCA), mínimos quadrados parciais (PLS) e PLS ortogonal (OPLS) têm se mostrado muito importantes na interpretação da relação entre dados quimiométricos, biológicos e ambientais (THEODORIS et al., 2011; VEERPORTE et al., 2007; VANDER, 2008; SAMPAIO et al., 2016). A partir de análises discriminantes como OPLS, de duas classes ou mais, utilizamos o S-plot como uma ferramenta de visualização e interpretação de modelos multivariados classificatórios. O S-plot apresenta tanto a covariância quanto a correlação entre os metabólitos e à classe pertencente. Deste modo, o S-plot ajuda a visualizar e identificar metabólitos estatisticamente significantes e, conseqüentemente, de importância biológica (WIKLUND et al., 2008) . Os marcadores ideais são aqueles

que apresentam alta covariância combinada à alta correlação, em intervalos de confiança pequenos. Portanto, quanto maior a correlação mais segura é a seleção de um determinado composto, e quanto menor, maior é o risco de se observar efeitos originados de variação analítica e ruído.

Um dos equipamentos mais utilizados nessas análises é o cromatógrafo líquido de ultra pressão acoplado a espectrômetro de massas de alta resolução (UHPLC-HRMS). Apesar do UHPLC-TOF-HRMS ser um equipamento relativamente estável em análises rotineiras, em estudos envolvendo lotes com alto número de amostras, potenciais variações na precisão e tempo de retenção dos compostos podem ocorrer por conta do tempo de análise ao qual o equipamento é submetido. Estas limitações são potenciais flutuações na performance do cromatógrafo e do espectrômetro de massas na precisão e repetitividade do método, prejudicando a qualidade dos dados obtidos. Essas limitações devem ser reconhecidas e esforços devem ser feitos para se evitar viés devido a mudanças graduais na performance do sistema. Para isso, as amostras devem ser analisadas de forma aleatória e amostras de controle de qualidade (CQ) devem ser utilizadas para monitorar a performance do sistema (MICHOPoulos et al., 2009; ZELENA et al., 2009).

A **Figura 1** abaixo apresenta um esquema de trabalho genérico e o utilizado para as análises de perfil químico com abordagem metabolômica.





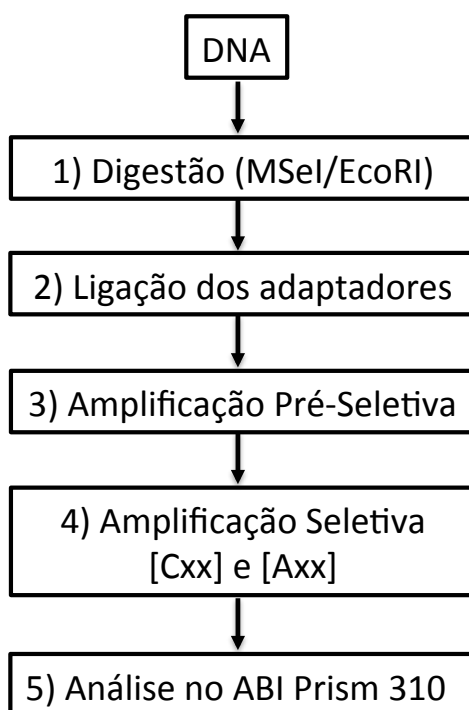
**Figura 1.** Fluxo de trabalho realizado para análise química com abordagem metabolômica por UHPLC-TOF-MS.

As amostras de CQ geralmente são padrões comerciais ou podem ser, também, uma amostra representativa feita a partir das amostras biológicas a serem testadas. As amostras de CQ devem ser injetadas e analisadas repetidamente em intervalos regulares entre as amostras a serem analisadas ao longo do experimento. Grandes mudanças no tempo de retenção, precisão da massa e intensidade do sinal significam que o sistema não está estável que e os dados obtidos são duvidosos.

O estudo de variações de perfil genético de populações, que pode ser associado e complementar à metabolômica, tem sido realizado recentemente por amplificação de comprimento de fragmentos polimórfico (AFLP). Essa técnica tem sido aplicada em estudos recentes, especialmente em espécies vegetais, para identificar diversidade genética dentro de populações, identificar e diferenciar cultivares, espécies que podem ser difíceis de se caracterizar, devido às suas características morfológicas semelhantes

ou traços indistintos e também identificar as plantas que contêm genes de interesse, responsáveis pela produção de substâncias de interesse medicinal.

O procedimento utilizado nos experimentos de AFLP (**Figura 2**) envolve a digestão do DNA utilizando MseI, realizado para gerar fragmentos de uma amplitude específica. Na reação de ligação, adaptadores conhecidos se ligam ao final dos fragmentos gerados na reação de ligação e formam modelos para a amplificação. *Primers* complementares aos adaptadores são utilizados para aumentar o número de modelos disponíveis para a seleção na reação chamada amplificação pré-seletiva.



**Figura 2.** Procedimento realizado para os experimentos de amplificação de comprimento de fragmentos polimórficos (AFLP).

A amplificação seletiva é usada para amplificar frações dos moldes pré amplificados usando *primers* com 2 nucleotídeos (ex: ACC e CAT; CAG e ACG; ACA e CAA).

Finalmente, com os devidos esforços para se obter dados íntegros, os resultados obtidos desta abordagem podem ser aplicados para a resolução de questões em diferentes áreas de estudo da Biologia. Nos estudos em Botânica, avanços recentes na química analítica e bioinformática têm colocado a metabolômica em destaque na tentativa de se entender como são governadas as variações bioquímicas ao longo do

tempo e do espaço. Estudos com abordagem metabolômica fornecem meios para se examinar o fenótipo funcional de indivíduos e geram dados precisos como, por exemplo, respostas fisiológicas de plantas à variação de fatores abióticos em diferentes escalas, como indivíduos de uma maneira menos enviesada (LAKE et al., 2009), populacional (DAVEY et al., 2008) e até comunidade (FIELD et al., 2011). Estes estudos são possíveis através da análise de metabolômica e subsequente análise estatística multivariada de espécies distribuídas em várias populações e localidades.

Os dados disponíveis na literatura até hoje, seguindo esta abordagem, indicam que o metabolismo secundário das plantas sofre maior influência das variações ambientais que genéticas. O fenótipo está mais relacionado a um padrão regional, e em menor grau às estruturas genéticas, em que as variações do perfil de metabólitos estão relacionadas às variações geográficas e estações do ano de plantio. (FRANK et al., 2009; MATSUDA et al., 2012; ROBINSON et al., 2007). A análise de perfil químico de grãos de *Coffea arabica* L. (Rubiaceae), por exemplo, possibilitou a identificação de padrões de perfil de metabólitos relacionados a regiões específicas de cultivo na Colômbia (CHOI et al., 2010), e das populações de tabaco da China e Zimbábue (LI et al., 2008).

Como visto, alguns estudos mostram que a diversidade de padrões de perfil químico é gerada, principalmente, em resposta às variações ambientais e são de grande importância para a descoberta e padronização de medicamentos naturais, uma vez que diferenças na composição química podem trazer variações na qualidade e valor terapêutico de extratos. Além disso, a atividade biológica de uma espécie vegetal em alguns casos, pode não depender de apenas uma substância e estar baseada na sinergia entre os diversos componentes majoritários e minoritários que podem ter grande variação no tempo e no espaço. Conseqüentemente, uma questão importante considerando plantas medicinais é a variação na composição dos compostos ativos e a sua relação com os efeitos medicinais (GLAUSER, et al. 2013).

O uso integrado dessas técnicas recentes, com abordagens inovadoras para a química de produtos naturais, possibilita melhor quantificar funcionalidades da biodiversidade, e tentar compreender os padrões de variação do metabolismo secundário, espacialmente e temporalmente, em resposta às variações de solo e clima em grandes centros de biodiversidade (SAMPAIO et al., 2016).

O estudo de padrões biogeográficos é debatido desde os primeiros estudos da ecologia, e vários avanços tecnológicos contribuíram para a elucidação da relação entre fatores edáficos e os padrões biogeográficos no globo Terrestre. No entanto, esses estudos se concentraram, até então, na análise de levantamentos florísticos (CASTRO, 1994; CASTRO & MARTINS, 1999; RATTER et al., 2001).

A diversificação de grandes núcleos de biodiversidade, principalmente no Hemisfério Sul, ainda permanece pouco estudada por abordagens modernas (BEHEREGARAY et al., 2008). O Brasil possui grande importância para esses estudos na América do Sul, por sua grande extensão territorial e megabiodiversidade de plantas (GIULIETTI et al., 2005). Uma região de interesse fica no interior da América do Sul Tropical Oriental, que apresenta estações de seca, é ocupada por fisionomias majoritariamente savânicas e florestas estacionais, compondo as fisionomias do Cerrado. O Cerrado representa a savana mais biodiversa com alto grau de endemismo. Originalmente, o Cerrado ocupava 2.039,386 km<sup>2</sup> do território Brasileiro, porém devido ao desflorestamento para a agricultura, essa área tem sofrido perdas constantes (KLINK E MACHADO, 2005).

A diversidade dos padrões biogeográficos do domínio do Cerrado foram estudados sob diferentes aspectos e, de maneira geral, tanto estudos florísticos quanto filogeográficos geram padrões geográficos similares. Os estudos fitogeográficos mais amplos realizados até então encontraram padrões que resultam em sete regiões florísticas, baseada na presença/ausência de táxons lenhosos (CASTRO, 1994; CASTRO & MARTINS, 1999; RATTER et al., 2003). Os resultados destes diferentes trabalhos estão amplamente em concordância e sugerem que variações de perfil do solo, clima e também eventos climáticos passados são as causas da formação destes padrões florísticos no Cerrado Brasileiro. Em relação ao solo, vários trabalhos apontam as características do solo como o principal fator responsável pelas fisionomias do Cerrado, determinando o gradiente desde o campo cerrado, onde predominam arbustos, até o cerradão, com presença predominante de espécies arbóreas formando um dossel contínuo. Quanto aos episódios passados de clima ainda existe uma grande divergência e a expansão, estabilidade e redução da sua extensão durante o Último Máximo Glacial (aprox. 22 mil anos atrás) foram propostas (BEHLING & LICHTER, 1997; LEDRU, 2002; MAYLE, 2004)

Portanto, sob o ponto de vista da Química de Produtos Naturais, as possíveis variações de solo e clima representam um desafio à padronização de extratos vegetais para seu uso seguro, uma vez que o metabolismo vegetal também sofre grande influência da disponibilidade de nutrientes no solo e do clima. Assim, neste projeto, buscamos utilizar ferramentas e técnicas recentes como a metabolômica integrada à amplificação de fragmentos polimórficos, para avaliar se os perfis químico e genético de uma espécie com ampla distribuição no Cerrado e de interesse medicinal, seguem os mesmos padrões fitogeográficos já descritos na literatura.

***Conclusão***

### **3.4. Conclusão**

Os dados obtidos nesse trabalho mostram que o perfil químico das folhas dos espécimes de *Myrcia bella* seguem um padrão geográfico e não sazonal, com maior influência das condições do solo, e em menor grau do perfil genético. Este padrão encontrado é similar àqueles obtidos em estudos de florística, mostrando que o solo pode modular não somente as fisionomias do cerrado, mas também a composição química das populações vegetais nele presentes. Esse dados são importantes para a sistematização e padronização dos extratos desta espécie, uma vez que o conteúdo de flavonoides, compostos importantes para as propriedades medicinais, apresenta variações entre as populações.

## *Referências*



### 3.5. Referências

BATALHA, M. A. The Brazilian cerrado is not a biome. *Biota Neotropica* v. 11 n.1, 2011.

BEHLING, H.; LICHTER, M. Evidence of dry and cold climatic conditions at glacial times in tropical southeastern Brazil. *Quaternary Research*, v. 48, p. 348–358, 1997.

BRADSHAW, A. Unravelling phenotypic plasticity – why should we bother? *New Phytologist*, v. 170, p. 644–648, 2006.

Castro, A. A. J. F. 1994. Comparação florístico-geográfica (Brasil) e fitossociológica (Piauí-São Paulo) de amostras de Cerrado. Tese. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1994.

CASTRO, A. A. J. F.; MARTINS, F. R. Cerrados do Brasil e do Nordeste: caracterização, área de ocupação e considerações sobre a sua fitodiversidade. *Pesquisa em Foco*, São Luís v. 7, p. 147, 1999.

COUTINHO, L. M. 1982. *Ecological effects of fire in Brazilian Cerrado*. In: B. J. Huntley & B.H. Walker (Eds.). *Ecology of Tropical Savannas*. Berlin: Springer-Verlag. p. 273-291.

COUTINHO, L. M. 2002. *O bioma Cerrado*. In: Eugen Warmin e o cerrado brasileiro: um século depois. (A.L. Klein, org.). Editora UNESP, São Paulo, p. 77-91.

Durigan, G, Ratter, JA, Bridgewater S, Siqueira MF & Franco, GADC.. Padrões fitogeográficos do cerrado paulista sob uma nova perspectiva regional. *Hoehnea*. v. 30, p. 39-51, 2003.

EGYDIO-BRANDÃO, A. P. M.; FURLAN, C. M.; SANTOS, D. Y. A. C. Genetic Diversity and Structure of Populations of *Annona crassiflora* MART. of Brazilian

Savanna and Its Association with Chemical Variability *Chem. Biodiversity*, v. 13, p. 990 – 997, 2016.

FERREIRA, A. C.; NETO, J. C.; DA SILVA, A. C.; KUSTER, R. M.; CARVALHO, D.P. Inhibition of thyroid peroxidase by *Myrcia uniflora* flavonoids. *Chemical Research in Toxicology*, v. 19, n. 3, p. 351-5, 2006.

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

FORBEY, J.S.; DEARING, M. D.; GROSS, E. M.; ORIAN, C. M.; SOTKA, E. E.; FOLEY, W. J. A pharm-ecological perspective of terrestrial and aquatic plant-herbivore interactions. *Journal of Chemical Ecology*. v. 39, n. 4, p. 465–480, 2013.

GLAUSER, G.; BOCCARD, J.; WOLFENDER, J.-L.; RUDAZ, S. (2013) *Metabolomics: Application in Plant Sciences*, in *Metabolomics in Practice. Successful Strategies to Generate and Analyze Metabolic Data* (eds M. Lämmerhofer and W. Weckwerth), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany.

GRATA, E.; GUILLARME, D.; GLAUSER, G.; BOCCARD, J.; CARRUPT, P.-A.; VEUTHEY, J.-L.; RUDAZ, S.; WOLFENDER, J.-L. Metabolite profiling of plant extracts by ultra-high-pressure liquid chromatography at elevated temperature coupled to time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. v. 1216, n. 30, p. 5660-5668, 2009.

HOSTETTMANN, K.; MARSTON, A.; HOSTETTMANN, M. Preparative chromatography techniques: applications in natural product isolation, 2nd edition. Berlin, New York: Springer; 1998.

KLINK, C.A.; MACHADO, R.B. Conservation of the Brazilian Cerrado. *Conservation Biology*, v. 19, n. 3, p. 707-713, 2005.

LEDRU, M.-P. (2002) Late quaternary history and evolution of the Cerrados as revealed by palynological records. In: Oliveira PS, Marquis RJ, editors. *The cerrados of Brazil: ecology and natural history of a neotropical savanna*. New York: Columbia University Press. pp. 33–68.

MARCHIORI, J. N. C.; SOBRAL, M. *Dendrologia das angiospermas- Myrtales*, Santa Maria: Ed. da UFSM, 1997.

MARSCHNER, H. (2011) Functions of Mineral Nutrients In: Marschner, H. *Mineral Nutrition of Higher Plants*. Elsevier Science Ltd., pp. 229–404.

MARIMON-JUNIOR, B. H.; HARIDASAN, M. Comparação da vegetação arbórea e características edáficas de um cerradão e um cerrado sensu strictu em áreas adjacentes sobre solo distrófico no leste de Mato Grosso do Sul, Brasil. *Acta Botanica Brasilica*, v. 10, p. 913-926, 2005.

MATSUDA, H.; NISHIDA, N.; YOSHIKAWA, M. Antidiabetic principles of natural medicines. V. Aldose reductase inhibitors from *Myrcia multiflora* DC. (2): structures of myrciacitrins III, IV, and V. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, v. 50, n. 3, p. 429–431, 2002.

MAYLE, F. E. Assessment of the Neotropical dry forest refugia hypothesis in the light of palaeoecological data and vegetation model simulations. *Journal of Quaternary Science*, v. 19, p. 713–720, 2004.

MICHOPOULOS, F.; LAI, L.; GIKA, H.; THEODORIDIS, G.; WILSON, I. D. UPLC-MS based analysis of human plasma for metabolomics using solvent precipitation or solid phase extraction. *Journal of Proteome Research*, v. 8, p. 2114–2121, 2009.

MORENO, M. I. C.; SCHIAVINI, I.; HARIDASAN, M. Fatores edáficos influenciando na estrutura de fitofisionomias do cerrado. *Caminhos de Geografia*. v.9, p. 173-194, 2008.

NOVAES, R. M. L.; RIBEIRO, R. A.; LEMOS-FILHO, J. P.; LOVATO, M. B. Concordance between Phylogeographical and Biogeographical Patterns in the Brazilian Cerrado: Diversification of the Endemic Tree *Dalbergia miscolobium* (Fabaceae). *Plos One*, v. 8, n. 12, 2013.

OKSMAN-CALDENTY, K.M.; SAITO, K. Integrating genomics and metabolomics for engineering plant metabolic pathways. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 16, p. 174–179, 2005.

PEPATO, M. T.; OLIVEIRA, J. R.; KETTELHUT, I. C.; MIGLIORINI, R. H. Assessment of the antidiabetic activity of *Myrcia uniflora* extracts in streptozotocin diabetic rats. *Diabetes Research*, v. 22, p.49-57, 1993.

RATTER, J. A.; BRIDGEWATER, S.; RIBEIRO, J. F. Analysis of the floristic composition of the brazilian cerrado vegetation III: comparison of the woody vegetation of 376 areas *Edinburgh Journal of Botany*, v. 60 n. 1, p. 57–109, 2003.

RATTER, J. A.; RIBEIRO, J. F. L.; BRIDGEWATER, S. Brazilian Cerrado vegetation and threats to its biodiversity. *Annals of Botany*, v. 80, p. 223-230, 1997.

REATTO, A.; CORREIA, J. R.; SPERA, S. T.; MARTINS, E. S. 2008. Solos do bioma Cerrado: aspectos pedológicos. In Cerrado: ecologia e flora (S.M. Sano, SP Almeida & JF Ribeiro, eds). Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, v. 1, p. 107-149.

RUSSO, E. M.; REICHELDT, A. A.; DE-SÁ, JR. et al. Clinical trial of *Myrcia uniflora* and *Bauhinia forficata* leaf extracts in normal and diabetic patients. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* v. 23, p. 11–20, 1990.

SAMPAIO, B. L.; EDRADA-EBEL, A.; DA COSTA, F.B. Effect of the environment on the secondary metabolic profile of *Tithonia diversifolia*: a model for environmental metabolomics of plants. *Scientific Reports* v. 6, 29265, 2016.

SALDANHA, L. L.; VILEGAS, W.; DOKKEDAL, A. L. Characterization of flavonoids and phenolic acids in *Myrcia bella* Cambess using FIA-ESI-IT-MS and HPLC-PAD-ESI-IT-MS combined with NMR. *Molecules*, v. 18, n. 7, p. 8402–8416, 2013.

SILVA, L. O. et al. Levantamento florístico e fitossociológico em duas áreas de cerrado sensu stricto no Parque Estadual da Serra de Caldas Novas, Goiás. *Acta Botanica Brasílica*, São Paulo, v. 16, n. 1, 2002.

SILVA, F. A. M.; ASSAD, E. D.; EVANGELISTA, B. A. 2008. Caracterização climática do bioma Cerrado. In *Cerrado: ecologia e flora* (S.M. Sano, SP Almeida & JF Ribeiro, eds). Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, v. 1, p. 69-68.

THEODORIDIS, G.; GIKA, H. G.; WILSON, I. D. Mass spectrometry-based holistic analytical approaches for metabolite profiling in systems biology studies. *Mass Spectrometry Reviews*, v. 30, p. 884 – 906, 2011.

VANDER-HEYDEN, Y. Extracting information from chromatographic herbal fingerprints LC-GC Europe. v. 21, p. 438, 2008.

VAREDA, P. M. P.; SALDANHA, L. L.; CAMAFORTE, N. A. P. D.; VIOLATO, N. M.; DOKKEDAL, A. L.; BOSQUEIRO, J. R. *Myrcia bella* leaf extract presents hypoglycemic activity via PI3K/AKT insulin signaling pathway. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2014, p.1-10, 2014.

VEERPORT, R.; CHOI, Y. H.; KIM, H. K. NMR-based metabolomics at work in phytochemistry. *Phytochemistry Reviews*, v. 6, p. 3, 2007.

ZELENA, E.; DUNN, W. B.; BROADHURST, D.; MCINTYRE, S. F.; CARROLL, K. M.; BEGLEY, P.; O'HAGAN, S.; KNOWLES, J. D.; HALSALL, A.; WILSON, I. D.; KELL, D. B. Development of a robust and repeatable UPLC-MS method for the longterm metabolomic study of human serum. *Analytical Chemistry*, v. 8, p. 1357–1364, 2009.

WIKLUND, S.; JOHANSSON, E.; STROIM, L.S.; MELLEROWICZ, E. J.; EDLUND, U.; SHOCKCOR, J. P.; GOTTFRIES, J.; MORITZ, T.; TRYGG, J. Visualization of GC/TOF-MS-Based Metabolomics Data for Identification of Biochemically Interesting Compounds Using OPLS Class Models. *Analytical Chemistry*, v. 80, p. 115-122, 2008.

WECKWERTH, W. Metabolomics in systems biology. *Annual Review of Plant Biology*, v. 54, p. 669–689, 2003.

WALTER, H. 1986. *Vegetação e zonas climáticas*. EPU, São Paulo.

WALTERS, R. Towards an understanding of photosynthetic acclimation. *Journal of Experimental Botany*, v. 56, p. 435–447, 2004.

WOLFENDER, J.-L.; QUEIROZ, E. F.; HOSTETTMANN, K. Phytochemistry in the microgram domain – a LC-NMR perspective. *Magnetic Resonance in Chemistry*. v. 43, p. 697–709, 2005.

WOLFENDER, J.-L.; GLAUSER, G.; BOCCARD, J.; RUDAZ, S. MS-based plant metabolomic approaches for biomarker discovery. *Natural Products Communications*, v. 10, p. 1417, 2009.

WOLFENDER, J.-L.; QUEIROZ, E. F. New approaches for studying the chemical diversity of natural resources and the bioactivity of their constituents. *Chimia*, v. 66, p. 324–329, 2012.

WONG, W. R.; OLIVER, A. G.; LININGTON, R. G. Development of antibiotic activity profile screening for the classification and discovery of natural product antibiotics *Chemical Biology*, v. 19, p. 1483-1495, 2012.