

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^a. Dr^a. 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 Vareda 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

INTRODUÇÃO	9
1.1. ISOLAMENTO DE PRODUTOS NATURAIS BIOATIVOS	9
1.2. METABOLÔMICA AMBIENTAL E TÉCNICAS ASSOCIADAS.....	12
CAPÍTULO 1.....	21
"ISOLAMENTO BIO-GUIADO DE COMPOSTOS HIPOGLICEMIANTES	
DAS FOLHAS DE <i>Bauhinia holophylla</i> (Bong.) Steud. (FABACEAE)"	21
2.1. INTRODUÇÃO.....	22
2.2. MATERIAL E MÉTODOS	28
2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
2.4. CONCLUSÃO	64
2.5. REFERÊNCIAS	66
CAPÍTULO 2.....	68
"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"	68
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-dihidroxíciclohex-2-en-1-ilideno-acetonitrila (1), (2*E*)-2-[(4*R*,5*S*,6*S*)-4,5,6-trihidroxíciclohex-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 a 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-(β -D-glycopyranosiloxy)-4,5-dihydroxycyclohex-2-en-1-ylideno-acetonitrile (1), (2E)-2-[(4R,5S,6S)-4,5,6-trihydroxycyclohex-2-en-1-yliden]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 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 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 bioguiados *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 ($> 10 \text{ mg}$) 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.

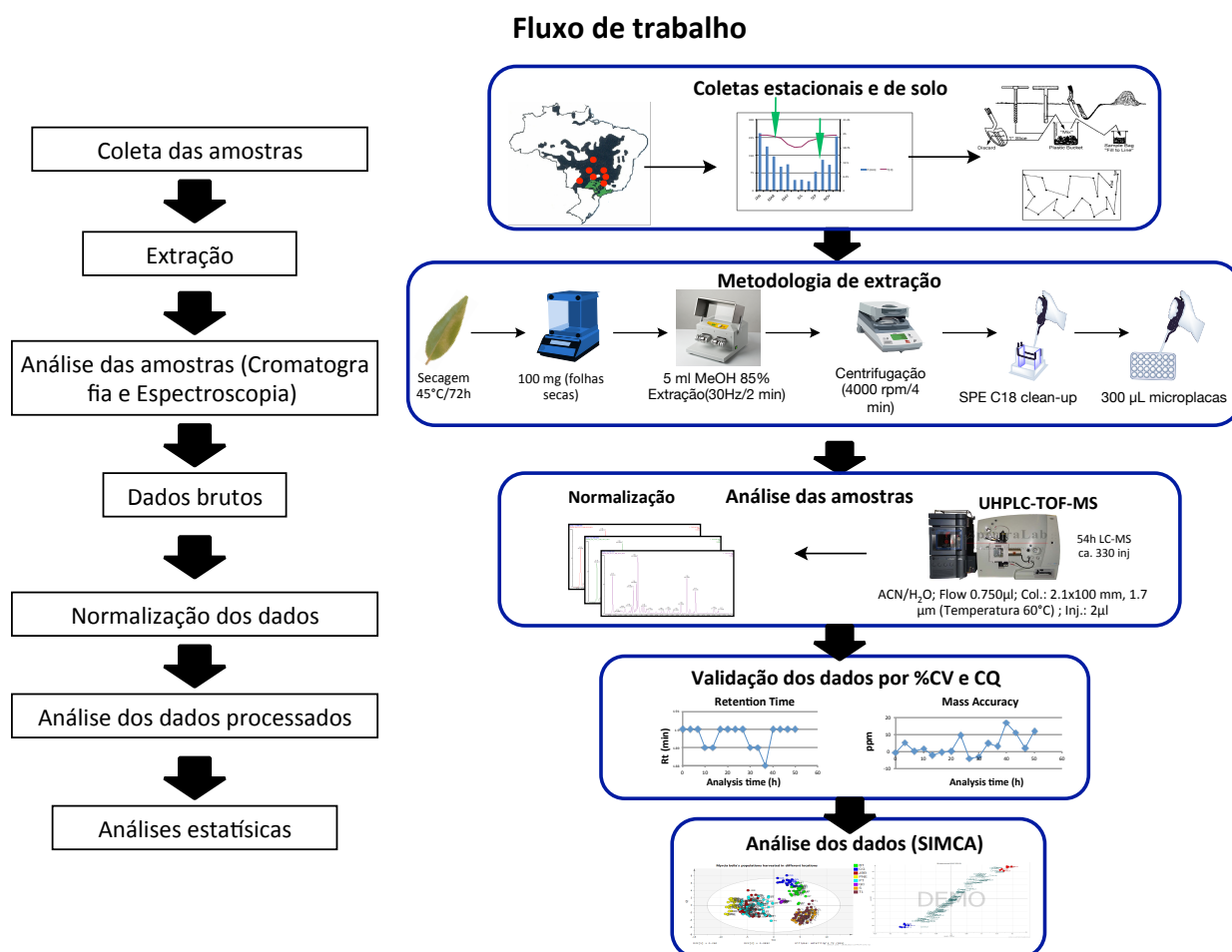


Figura 1. Fluxo de trabalho realizado para análise química com abordagem metabolômica por UHPLC-TOF-MS.

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 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.

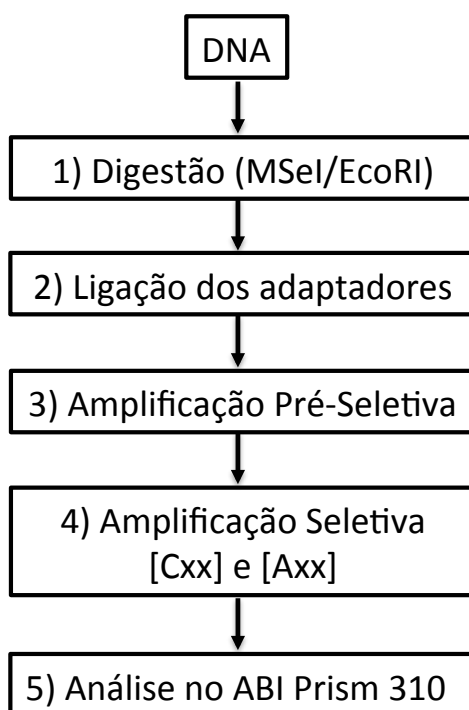


Figura 2. Procedimento realizado para os experimentos de amplificação de comprimento de fragmentos polimórficos (AFLP).

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. Consequentemente, 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 km² do território Brasileiro, porém devido ao desflorestamento para a agricultura, essa área tem sofrido perdas constantes (KLINK E MACHADO, 2005).

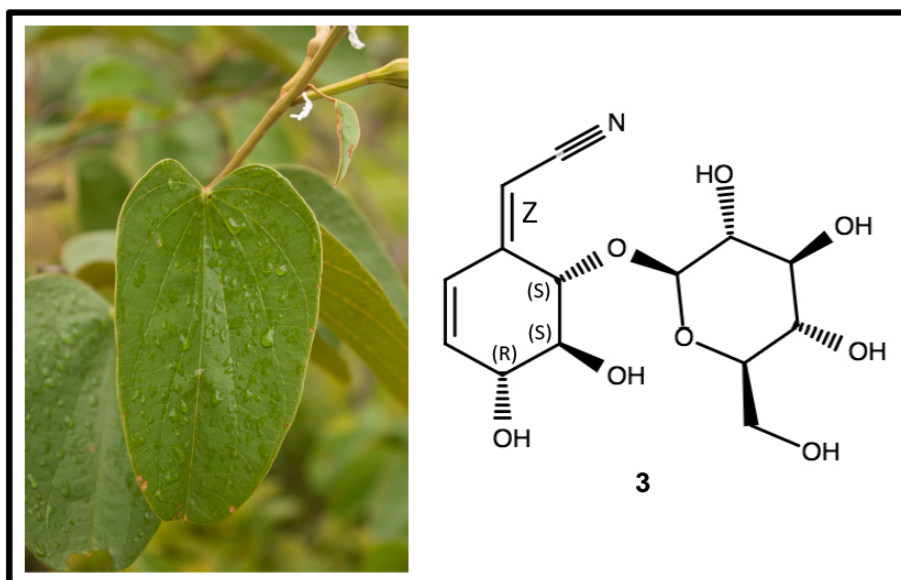
A diversidade dos padrões biogeográficos do domínio do Cerrado foram estudados sob diferentes aspectos e, de maneira geral, tanto estudos florísticos quanto filogeográficos geram padrões geográficos similares. Os estudos fitogeográficos mais amplos realizados até então encontraram padrões que resultam 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 & LICHTÉ, 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.

Capítulo 1

Capítulo 1

"Isolamento bio-guiado de compostos hipoglicemiantes das folhas de *Bauhinia holophylla* (Bong.) Steud. (Fabaceae)"



Introdução

2.1. Introdução

Entre a diversidade de plantas nativas do Brasil em fragmentos de cerrado ainda preservados, algumas se destacam pelo uso na medicina tradicional em diferentes regiões do país. Presentes em vários biomas do cerrado, as espécies de *Bauhinia* L. (Fabaceae Lindl.) são popularmente conhecidas por "pata-de-vaca" ou "unha-de-boi" e identificadas pelo aspecto bilobado da folha (**Figura 1**). O gênero *Bauhinia* pertence à tribo Cercidae e compreende aproximadamente 160 espécies distribuídas nas regiões tropicais (WUNDERLIN, 2010). O uso de espécies do gênero *Bauhinia* na medicina tradicional é relatado em diferentes partes do mundo, como África, Ásia, Américas Central e do Sul para diferentes tratamentos, como infecções, dores, inflamação e *Diabetes mellitus* (DM) (ACHENBACH et al., 1988; CECHINEL et al., 2009; MOHAMED et al., 2015).

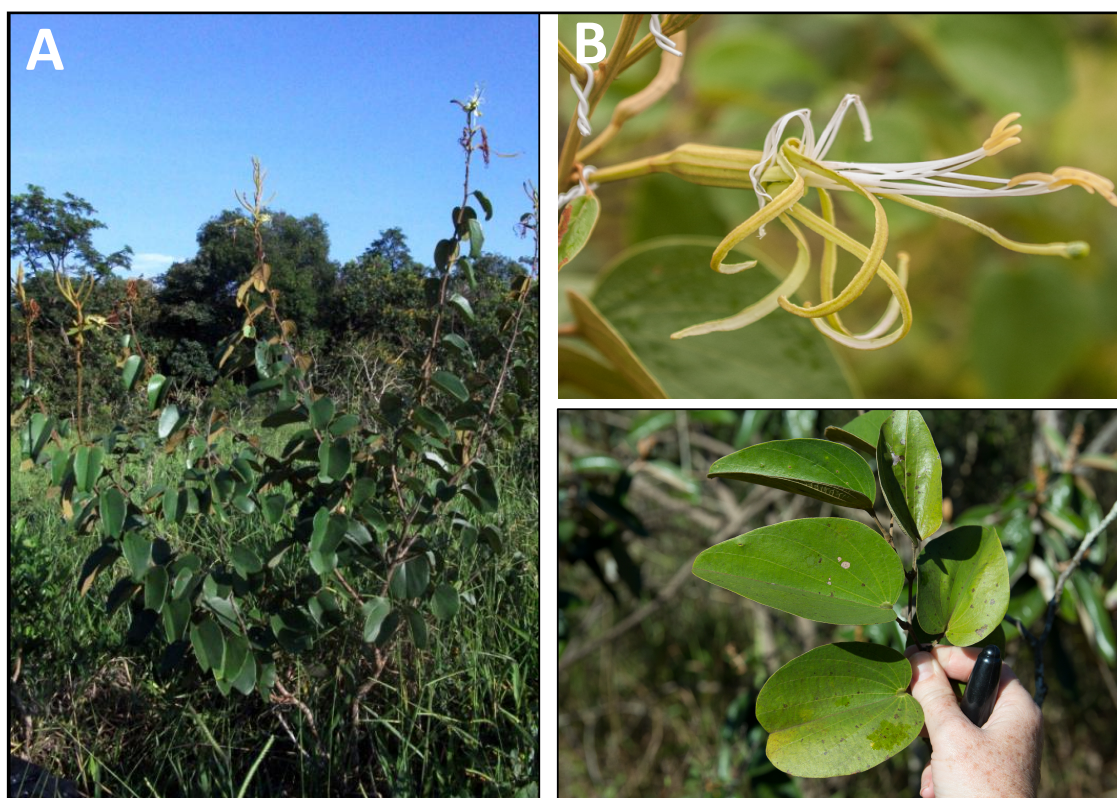


Figura 1. A) Espécime de *Bauhinia holophylla* (Bong.) Steud.. B) Detalhe da flor e dos folíolos quase que totalmente fusionados. Fotos: Luiz L. Saldanha.

No Brasil, o uso de espécies de *Bauhinia* L. por comunidades tradicionais ocorre principalmente no tratamento do DM. Folhas, cascas e raízes de várias espécies de *Bauhinia* são usadas em formas de chás e fitopreparados para baixar os níveis de

açúcar sanguíneo (CAVALCANTI & FAVORETO, 2005, CECHINEL FILHO, 2009; GUPTA, 1995; MALI et al., 2007), indicando que estas espécies contêm potencialmente compostos com atividade hipoglicemiante. No território Brasileiro ocorrem cerca de 98 espécies nativas, pertencentes a 3 subgêneros e seis seções (VAZ, 2001) amplamente distribuídas pelo país, com ocorrência nas regiões Sul, Sudeste, Centro-Oeste, Nordeste e Norte (VAZ, 2010).

A espécie nativa do Brasil mais conhecida e utilizada no tratamento do DM é *Bauhinia forficata* Link., uma espécie arbórea considerada como a "pata-de-vaca" "verdadeira" por algumas comunidades. O potencial terapêutico de *B. forficata* foi confirmado primeiramente por estudos clínicos que mostraram atividade hipoglicemiante (JULIANI, 1929), e depois confirmada em outros modelos experimentais. Os resultados obtidos com essa espécie são controversos. Uma hipótese da divergência de resultados pode ser a diferença na composição de epímeros de flavonoides, dependentes da idade dos espécimes utilizados para o preparo do extrato. Estariam os compostos ativos presentes apenas em determinados estádios de desenvolvimento da planta? Alguns estudos realizados com pacientes e camundongos diabéticos não confirmam a atividade diabética (COIMBRA-TEIXEIRA, 1992; RUSSO et al., 1990); já outros estudos mais recentes demonstram efeito hipoglicemiante tanto em camundongos normoglicêmicos quanto em diabéticos (DA SILVA et al., 2002; PEPATO et al., 2002). Além do efeito hipoglicemiante, estudos com os extratos aquoso, etanólico e hexânico das folhas de *B. forficata* descrevem a redução dos níveis de glicose, triglicérides, colesterol totais e HDL em camundongos diabéticos, o que lhe confere um grande potencial para uso clínico no tratamento do DM.

Apesar do efeito hipoglicemiante desta planta ser conhecido há cerca de 80 anos, somente em 2004 esta atividade foi confirmada e relacionada a um composto em particular. A atividade hipoglicemiante do composto kampferol-3,7-O-(α)-dirhamnosídeo (kaempferitrina), um flavonoide isolado a partir da fração *n*-butanol das folhas de *B. forficata*, é descrita em camundongos diabéticos, além da atividade antioxidante, o que contribui para sua atividade hipoglicemiante. A administração oral da kaempferitrina leva a um efeito hipoglicemiante em camundongos diabéticos e normoglicêmicos e teria como mecanismo de ação o efeito insulinomimético no consumo da glicose periférica, inibição da reabsorção de glicose no fígado, retardo no

catabolismo da insulina e/ou potencialização do efeito de insulina residual (DE SOUSA et al., 2004). Uma patente (US 2004/0170714) descreve o uso de *B. forficata* para o tratamento do DM e também atribui a atividade hipoglicemiante à presença de flavonas e outros flavonoides. Das frações AcOEt e *n*-BuOH das folhas e flores de *B. forficata* foram isolados heterosídeos de flavonoides derivados de quercetina e kaempferol (PIZZOLATI et al., 2003).

No México, *Bauhinia divaricata* L., conhecida como "pezuña-de-vaca", apresentou atividade hipoglicemiante moderada em coelhos normoglicêmicos que receberam decocção das folhas (RAMOS et al., 1992), porém, os mecanismos de ação permanecem desconhecidos. Espécies como *B. monandra* Kurz., *B. rufa* (Bong.) Steud., *B. longifolia* (Bong.) Steud também são descritas na literatura brasileira por apresentarem diversos efeitos medicinais, porém, até o presente momento não foi publicado qualquer trabalho científico que caracterize o perfil químico, os mecanismos de ação ou o potencial destas espécies no tratamento do DM.

As espécies de *Bauhinia* mais estudadas, do ponto de vista fitoquímico, são *B. manca* Standl., *B. candicans* Benth., *B. unguata* L., *B. uruguayensis* Benth., *B. purpurea* L., *B. forficata* e *B. splendens* Kunth.. Estudos realizados com essas plantas apontam a presença de uma grande variedade de compostos das classes dos flavonoides, terpenos, esteroides, alcaloides, ácido aromáticos, bibenzinas e taninos (CECHINEL FILHO, 2009; NETO et al., 2008). Os flavonoides estão amplamente distribuídos em *Bauhinia*, sendo os flavonóis a classe majoritária, seguida das flavanas e flavanonas (DA SILVA & CECHINEL FILHO, 2002). A partir destes estudos foram identificados flavonóis derivados de quercetina, kaempferol, isorhamnetina e ombuína, flavonas derivadas de apigenina, luteolina e crisoeriol, monômeros de catequinas derivados de epiafzelequina, epi/catequina e galato de epicatequina, além do ácido linoleico e um ácido graxo (MOHAMED et al., 2015). A figura 2 apresenta um panorama das principais classes dos metabólitos identificados em *Bauhinia*.

O DM, uma doença metabólica, é caracterizada pela hiperglicemia no sangue, persistente acima de valores normais, causada em consequência de um defeito progressivo na secreção de insulina pelas células β pancreáticas e na ação em tecidos periféricos. O não tratamento deste quadro, caracterizando hiperglicemia crônica está

associado à disfunção de diferentes órgãos como olhos, fígado, nervos, coração e vasos sanguíneos e no aumento de fatores de risco como hipertensão e obesidade.

Indivíduos portadores de DM com resistência à insulina, pelo menos em estágios iniciais, podem melhorar sua qualidade de vida controlando os níveis de glicose

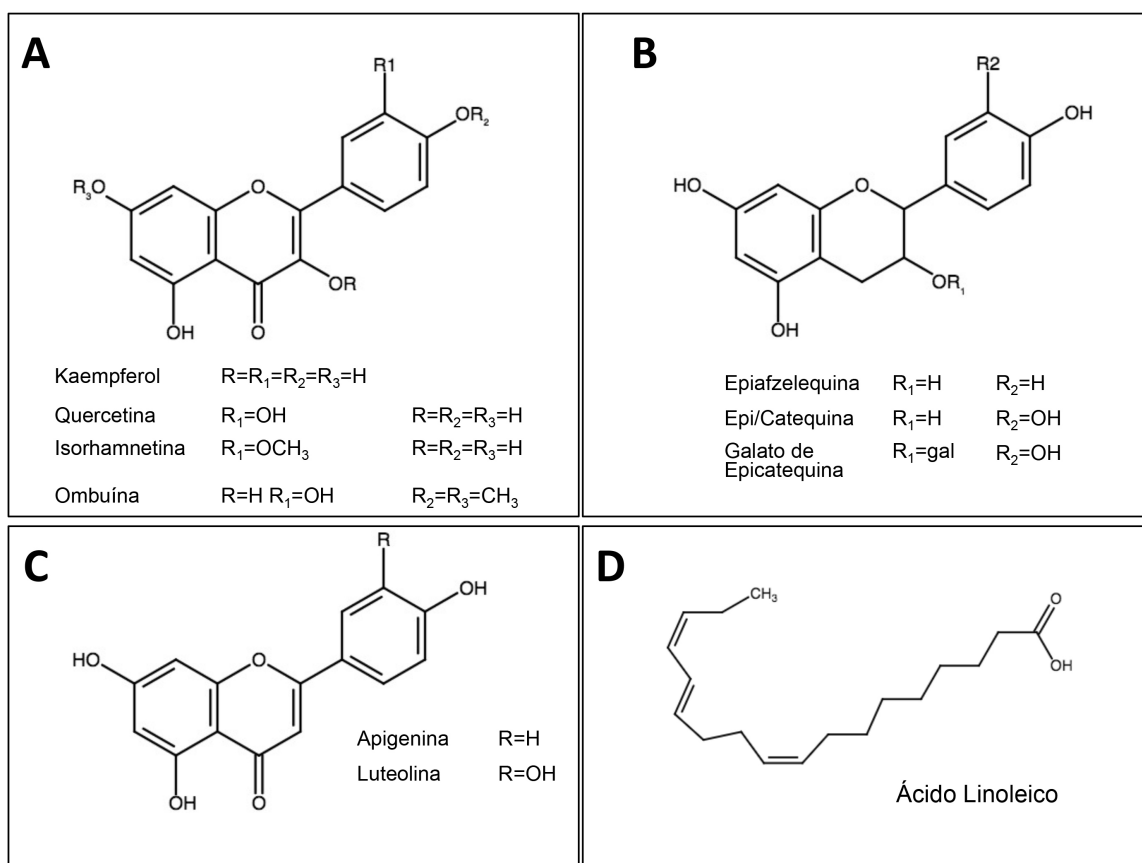


Figura 2. Principais classes de metabólitos isolado de espécies *Bauhinia*: A) Flavonóis, B) monômeros de catequinas, C) Flavonas, D) Ácido graxo. Adaptado de Mohamed et al. (2015).

no sangue com mudanças no estilo de vida, tais como a prática de exercícios, perda de peso e mudanças na alimentação. Porém, em casos de disfunção severa das células β , onde não há secreção residual de insulina, o indivíduo necessita de tratamento com insulina ou agentes terapêuticos para sobreviver. Atualmente, o tratamento do DM é realizado através de insulino terapia e administração de drogas alopáticas como sulfoniluréias (glibenclamida), biguanidas (Metformina®) e inibidores da α -glicosidase e α -amilase (ascarbose, miglitol), podendo ou não ser administradas em

conjunto. No entanto, estes medicamentos possuem muitos efeitos adversos (HSU, BOYCO E FUJIMOTO, 2012).

Como a prevalência desta doença tem aumentado expressivamente em todo o mundo e estima-se que em 2025, 300 milhões de pessoas serão portadoras de DM, há uma necessidade constante da busca de novos compostos naturais para tratamentos alternativos do DM.

Portanto, dada a necessidade pela busca de novas substâncias hipoglicemiantes e muitos trabalhos preliminares na literatura com novas espécies de *Bauhinia*, é necessário o desenvolvimento de pesquisas interdisciplinares que relacionem claramente a atividade medicinal a um composto em particular. Assim, como um dos objetivos deste trabalho, este capítulo descreve a identificação de compostos hipoglicemiantes isolados das folhas de *Bauhinia holophylla*, uma importante espécie presente no Cerrado de Bauru/SP, já estudada pelo nosso grupo anteriormente, com atividade hipoglicemiante comprovada (CAMAFORTE, 2013). Este estudo se baseia em uma nova abordagem, mais racional, de estudo bio-guiado *in vivo* aliado à transferência de método cromatográfico de HPLC para MPLC, recém desenvolvida e mais eficiente para o isolamento alvo de substâncias ativas.

Material e Métodos

2.2. Material e Métodos

Com exceção da coleta do material vegetal e avaliação das atividades farmacológicas, todos os outros experimentos foram realizados durante estágio realizado no exterior no Lab. de Fitoquímica e Produtos Naturais Bioativos sob orientação do Prof. Dr. Jean-Luc Wolfender e do Prof. Dr. Emerson Ferreira Queiroz, na Seção de Ciências Farmacêuticas da Universidade de Genebra, Suíça.

2.2.1. Coleta do material vegetal

Amostras de folhas de *Bauhinia holophylla* foram coletadas no Jardim Botânico Municipal de Bauru às margens da Rodovia Comandante João R. de Barros – SP 225 (22°20'30'' S e 49°00'30'' W) . Foi coletado aproximadamente 1 kg de amostras de folhas frescas para os estudos fitoquímicos e ensaios biológicos. Ramos férteis foram utilizados para identificação e herborização. A herborização e o armazenamento ficaram a cargo de MSc. Luiz Leonardo Saldanha, e foram identificados em parceria com a Prof. Dra. Ângela M.S. da Fonseca Vaz, do Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, especialista em taxonomia de *Bauhinia*. As exsicatas (*voucher* químico) foram incluídas no Herbário do Instituto de Pesquisas do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, sob número de registro RB 507.043. (Autorização de Coleta, Acesso e Remessa do Patrimônio Genético nº 010468/2014-5)

2.2.2. Obtenção dos extratos

As folhas de *B. holophylla* foram secas em estufa a 45 °C até completa secagem. Em seguida, foram pulverizadas em moinho de facas (Marconi, SP, Brasil) a fim de facilitar a extração de seus constituintes químicos, sendo posteriormente pesadas, embaladas, etiquetadas e armazenadas em local seco e escuro. A extração foi feita por percolação do pó com EtOH 70 % (PRISTA, 1995). O material moído (686 g) foi previamente intumescido com 2 L de etanol 70 % (v/v) durante 2 h em béquer. Após esse período, o percolador foi empacotado com a mistura (pó + etanol 70 %), sendo o empacotamento feito da forma mais homogênea possível, evitando a formação de bolhas ou buracos no conteúdo alocado dentro do percolador. A altura do

enchimento obedeceu à proporção 5:1 (referente ao volume do percolador e do material vegetal) em relação ao tamanho do percolador. A vazão do percolador ficou entre 1-2,0 mL.min⁻¹.Kg de material vegetal. Com este processo obteve-se o extrato EtOH 70 % das folhas de *B. holophylla*, com rendimento de 29,5 % a partir de matéria seca.

2.2.3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

As análises cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo de alta eficiência, modelo HP-1100 acoplado a detectores de arranjo de fotodiodos e espalhamento de luz (HPLC-DAD-ELSD) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) com coluna X-Bridge C18 (5 µm, 250 × 4,6 mm i.d.; Waters) ou ZEOprep[®] C18 (15-25 µm, 250 × 4,6 mm d.i.) e vazão do cromatógrafo de 1 mL.min⁻¹. Os cromatogramas e espectros de UV foram obtidos pelo DAD em diferentes comprimentos de onda, entre 190-600 nm. Os parâmetros do ELSD foram: pressão do gás de secagem (N₂) 3,5 bar, temperatura de 45 °C, vazão de 500 µL/min, ganho 8.

2.2.4. Cromatografia Líquida a Vácuo

Uma alíquota de 9 g do extrato EtOH 70 % das folhas de *B. holophylla* foi fracionado por cromatografia líquida a vácuo (VLC), utilizando um funil de vidro (250 mL, 110 mm d.i.) como empacotamento a seco com sílica C18 ZEOprep[®] 60 Å, 15-25 µm (Zeochem, Suíça) (140 g). O extrato foi fracionado em eluição isocrática em dois segmentos, utilizando-se MeOH:H₂O (3:7) (3,750 mL) e MeOH:H₂O (8:2) (1,750 mL) obtendo-se duas frações BHCIA (4 g) e BHFLA (1,1 g) respectivamente.

2.2.5. Fracionamento por Cromatografia de Média Pressão (MPLC-UV)

O fracionamento por cromatógrafo líquido a média pressão (MPLC) foi composto por um sistema de bombeamento binário Büchi C-681 equipado com detector UV Knauer e coletor de frações Büchi C-684 para tubos de 250 mL. O fracionamento foi realizado em coluna com sílica C18 Zeoprep[®] 60 Å, 15-25 µm (Zeochem, Suíça) 49 x 460 mm d.i..

2.2.6. Experimentos de rotação ótica ($[\alpha]_D$)

Os espectros de $[\alpha]_D$ das moléculas isoladas foram obtidos em polarímetro Jasco F1030, utilizando-se rotação ótica, fonte de luz de Na, temperatura de 22,6 °C e comprimento de onda em 589 nm. As amostras foram suspensas em MeOH e as leituras realizadas com voltagem < 350.

2.2.7. Análises de massas em alta resolução

Os espectros de massa de alta resolução foram obtidos em espectrômetro de massa (Waters, Mass., USA) (Micromass LCT Premier) de tempo de voo (TOF) com interface de *electro spray* (ESI) acoplado a um sistema UPLC (Waters, Mass., USA). Coluna BEH C18, 1,7 μ m, 150 mm x 2,1 mm d.i.. (Waters Acquity, Milford, MA, EUA). As temperaturas do injetor automático de amostras e do forno de coluna foram fixadas em 10 e 60 °C, respectivamente. As condições da interface electrospray (ESI) foram definidas como da seguinte forma: voltagem capilar de 2,8 kV, cone de tensão a 40 V, temperatura da fonte 120 °C, temperatura de dessolvatação 250 °C, fluxo de gás de dessolvatação 600 L/h, A vazão de solvente utilizada foi de 600 μ L/min e volume de injeção de 1 μ L. A detecção foi realizada em modo negativo (m/z 100-1000), com *scan* a cada 0,25 s no modo centroide.

Uma solução de Leucina (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) foi injetada a 5 μ g/mL por meio de uma sonda *Lock Spray*TM, numa taxa de vazão de 20 μ L/min por uma segunda bomba (Shimadzu LC-10ADvp, Duisburg, Alemanha).

Os dados obtidos foram analisados no software MassLynx v.4.1 (Waters Corporation, Milford, MA, EUA). A análise de composição elementar considerando C, H, N e O foi realizada para se obter as possíveis fórmulas moleculares dos compostos.

2.2.8. Análise de Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de ressonância foram obtidos em espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) (Unity Inova[®] 500 MHz Varian[®]) operando em 11,7 T em

500 MHz para ^1H e 125 MHz para ^{13}C . As amostras foram dissolvidas em D_2O e analisadas em diferentes concentrações entre 0,5-10 mg.

2.2.9. Dicroísmo Circular Eletrônico

Os espectros de dicroísmo circular eletrônico foram obtidos em espectrômetro Jasco F-815 em tubos de 1 cm. As amostras foram analisadas em solução metanólica com fluxo de nitrogênio a 6 L/min e temperatura de 20 °C. Os espectros foram obtidos por arranjo de dados linear, com início em 600 nm e término em 200 nm, com leitura de 100 nm/min.

As análises conformacionais para isomeria E/Z do compostos foram realizadas em parceria com o Departamento de Fitoquímica, Plantas Medicinais e Instituto de Pesquisa de Fármacos da Universidade Shahid Beheshti do Teerã, Iran - pelo Dr. Samad Nejad Ebrahimi, utilizando o software MacroModel 9.1 (SCHRÖDINGER LLC, New York) com Potencial Otimizado para Simulações de Líquidos (OPLS 2005) de campos de força em H_2O . Conformações ocorrendo na faixa de energia de 1,0 kcal/mol do mínimo global foram escolhidas para otimização geométrica e cálculo da energia, usando a Teoria Funcional de Densidade (DFT) com função B3LYP e base 631G** na fase gasosa com o programa Gaussian 09 (FRISCH, 2009). Análises vibracionais foram feitas no mesmo nível para confirmação mínima. TD-DFT/B3LYP/6-31G** foi realizado em MeOH, usando método SCRF, com modelo CPCM. As curvas de dicroísmo circular eletrônico foram construídas com base na velocidade de rotação (Rvel), e no comprimento (Rlen) e calculados com meia-banda de 0,2 eV usando SpecDis v1.61. (BRUHN, 2013).

2.2.10. Estudo de atividade hipoglicemiante

As frações e o composto puro foram submetidos a testes farmacológicos para identificação dos princípios ativos em parceria com o Laboratório de Fisiologia do Pâncreas Endócrino da Faculdade de Ciências de Bauru/UNESP, coordenado pelo Prof. José Roberto Bosqueiro e participação das alunas Nathalia Aparecida Camaforte e Priscilla Maria Ponce Vareda.

Foram utilizados camundongos machos Swiss com 60 ± 10 dias de idade, provenientes do Biotério Central da UNESP. Os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Fisiologia do Pâncreas Endócrino da UNESP – Bauru, sob temperatura controlada (23 ± 2 °C) em ciclo de iluminação claro-escuro (12 h), com livre acesso à comida e água.

Para indução do diabetes, os camundongos receberam uma injeção única intraperitoneal de Estreptozotocina (150 mg/kg p.c., diluído em tampão Citrato de Sódio pH 4,5). Após sete dias da indução, os animais tiveram a glicemia de jejum mensurada e aquele que apresentaram glicemia ≥ 250 mg/dL foram incluídos no experimento.

Os camundongos foram divididos nos seguintes grupos (n=10):

- **CTLSAL:** Camundongos normoglicêmicos tratados com salina via gavagem (0,1%) durante 7 dias.
- **STZMET:** Camundongos diabéticos tratados com Metformina® na dose de 300 mg/kg.
- **STZSAL:** Camundongos diabéticos tratados com veículo salina (0,1 %) via gavagem durante 14 dias.
- **STZMeOH 80%:** Camundongos diabéticos tratados com fração enriquecida em flavonoides na dose de 50 e 100 mg/kg durante 7 dias.
- **STZMeOH30%:** Camundongos diabéticos tratados com fração enriquecida em cianoglicosídeos na dose de 50 e 100 mg/kg durante 7 dias.
- **Litospermosídeo (BH-21):** Camundongos diabéticos tratados com composto litospermosídeo (BH-21) na dose de 10 mg/kg durante 28 dias.

2.2.11. Avaliação da glicemia de jejum

Camundongos de todos os grupos foram deixados em jejum de 10 a 12 h e tiveram a glicemia medida com glicosímetro (One Touch Jonshon & Jonshon) ao final do tratamento.

2.2.12. Teste de tolerância à glicose (ipGTT):

Para verificar a ação das frações ricas em flavonoides e cianoglicosídeos em camundongos diabéticos, foi realizado o teste de tolerância à glicose intraperitoneal

(ipGTT). Após 7 dias de tratamento com as frações, os camundongos foram submetidos à jejum de 10-12 h, antes do procedimento experimental. No dia do experimento, os camundongos receberam gavagem referente ao seu grupo [salina, MeOH 80 % (flavonoides), MeOH 30 % (cianoglicosídeos) ou litospermosídeo (BH-21)] e após 30 min foram anestesiados com Tiopental[®] (15 mg/kg) e, em seguida, foi coletado sangue para a dosagem de glicemia inicial dos animais (Tempo 0'). Após a dosagem de glicemia, glicose na dose de 2 g/kg foi administrada intraperitonealmente e, a partir de então, a glicemia foi coletada nos tempos 15, 30, 60, 90 e 120 min. A coleta de sangue foi realizada pela cauda do animal e a glicemia medida utilizando o glicosímetro (One touch, Johnson & Johnson).

2.2.13. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Para comparação múltipla de resultados paramétricos foi utilizado ANOVA seguido de *post test tukey*. O nível de significância adotado foi $P < 0,05$.

Resultados e Discussão

2.3. Resultados e Discussão

2.3.1. Estudo químico de *Bauhinia holophylla*

O perfil cromatográfico do extrato EtOH 70 % (EEtOH70%) das folhas de *B. holophylla* (EEtOH70%) foi obtido por HPLC-DAD-ELSD. Após as corridas iniciais com gradiente exploratório (5-95 % de MeOH em 60 min), o extrato foi analisado em coluna X-Bridge (5 μ m, 250 x 4.6 mm d.i.) com gradiente otimizado: 5-33 % de MeOH (A) em H₂O (B) em 15 min, 33-60 % de A em B em 40 min e 60-100 % de A em B em 50 min com vazão de 1 mL.min⁻¹. A Figura 2 apresenta os cromatogramas com gradiente otimizados obtidos em 254 nm, 360 nm e ELSD.

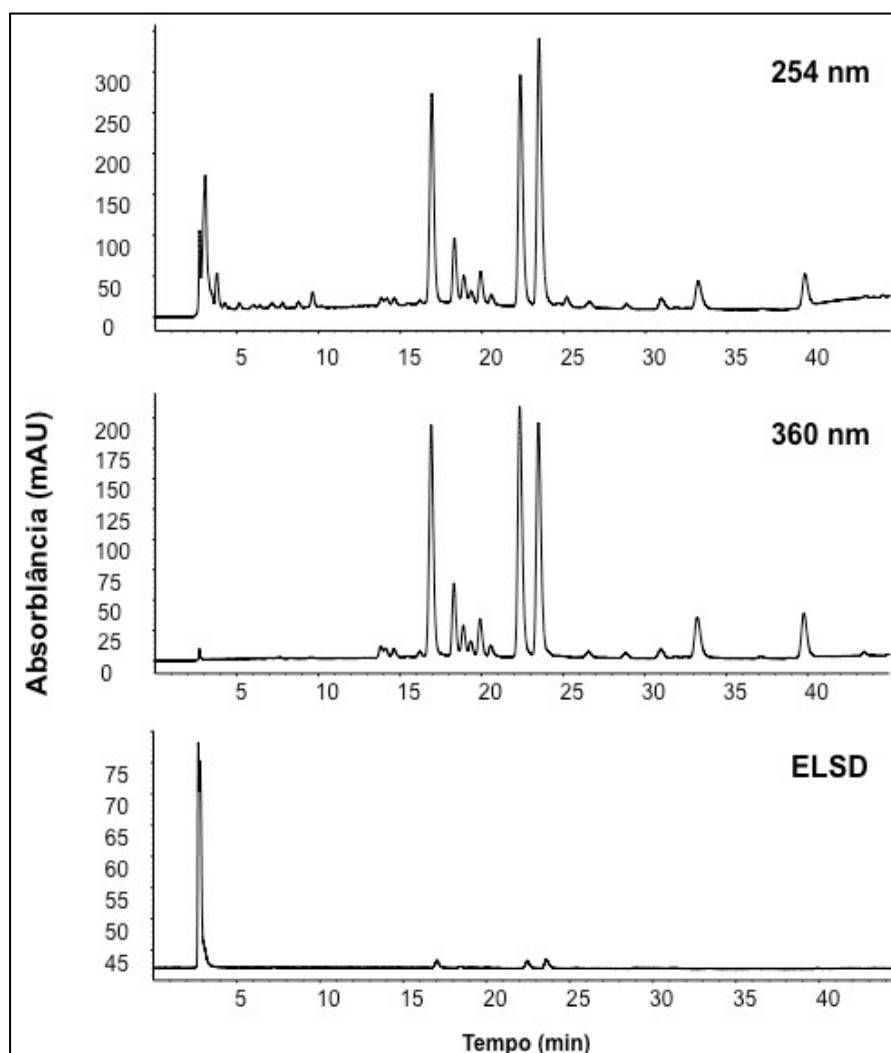


Figura 2. Cromatograma analítico obtido por HPLC-DAD-ELSD do EEtOH70% das folhas de *Bauhinia holophylla*. Solventes: MeOH (A) e H₂O (B) com 0,1 % ácido fórmico. Coluna: X-Bridge (250 x 4,6 mm d.i., 5 μ m). Gradiente: 5-33 % de A em B em 15 min, 33-60 % em 40 min e 60-100 % em 50 min. Vazão de 1 mL.min⁻¹. Temperatura da coluna: 21°C. Vol. de injeção: 10 μ L.

A partir do cromatograma analítico da figura 2, a análise dos espectros de UV-vis (Figura 3) obtidos dos picos, pode-se observar duas classes de compostos naturais majoritárias. Na primeira parte do cromatograma se observa picos relativamente mais polares, com tempo de retenção entre 0 e 15 min e com espectros de UV com $\lambda_{\text{máx}} = 259 \text{ nm}$. Já os picos com tempo de retenção entre 15 e 35 min, apresentam espectros de UV com $\lambda_{\text{máx}} = 260 \text{ nm}$ e $340\text{-}370 \text{ nm}$, típico de flavonoides com insaturação nos carbonos C2 e C3, os quais são reconhecidos por apresentarem a Banda II, com máximos na faixa espectral de $240\text{-}290 \text{ nm}$, atribuída ao anel-A e da Banda I, com máximos na faixa espectral de $300\text{-}390 \text{ nm}$, atribuída ao anel-B (MERKEN e BEECHER, 2000).

O cromatograma obtido pelo ELSD nos chama atenção para a região dos picos dos compostos relativamente mais polares, pois indica a presença de um pico majoritário. Uma vez que o ELSD é um detector semi-universal e quantitativo, pois detectamos compostos que não evaporam com a fase móvel, concluímos que havia uma grande quantidade desses compostos presentes no EEtOH70% em relação aos picos com espectros típicos de flavonoides.

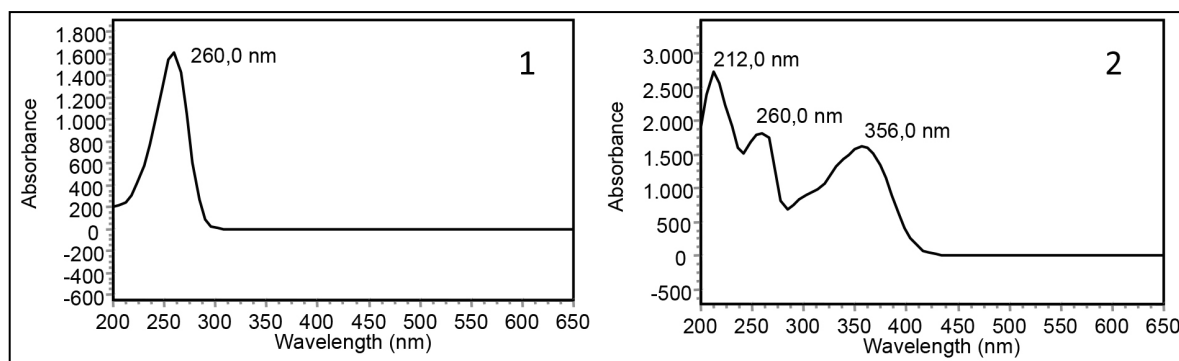


Figura 3. Espectros de ultravioleta (UV-vis) obtidos por DAD característicos de cianoglicosídeos (1) e flavonoides com insaturação no C2 e C3 (2).

A partir dessas informações, foram elaboradas estratégias para o fracionamento por cromatografia do extrato a fim de se obter frações enriquecidas com cada região do cromatograma e identificar a classe de compostos ativos desta planta no tratamento do DM e consequentemente a identificação dos compostos ativos responsáveis pela atividade hipoglicemiante do EEtOH70%.

O EEtOH70% das folhas de *B. holophylla* foi fracionado por cromatografia líquida a vácuo (VLC) preparativa, a fim de se obter frações enriquecidas com as

principais classes dos compostos presentes. As condições para fracionamento por VLC foram previamente otimizadas, utilizando-se cartuchos de SPE (500 mg/3mL) em escala analítica (25 mg do EtOH 70 %), e transferidas para condições preparativas (9 g do EtOH 70 %). O sistema de VLC foi montado utilizando-se um funil de vidro (250 mL, 110 mm d.i.) com empacotamento a seco, com 140 g de Sílica gel C18 Zeoprep® 60 Å, 15-25 µm (Zeochem, Suíça).

O EEtOH70% foi fracionado sucessivamente, com dois segmentos isocráticos, utilizando MeOH:H₂O (3:7; v/v) (3,750 mL) e MeOH:H₂O (8:2; v/v) (1,750 mL). Deste modo foram obtidas duas frações: MeOH 30 % (4 g) e MeOH 80 % (1,1 g). As frações foram analisadas por HPLC-DAD para se obter o perfil químico (Figura 4).

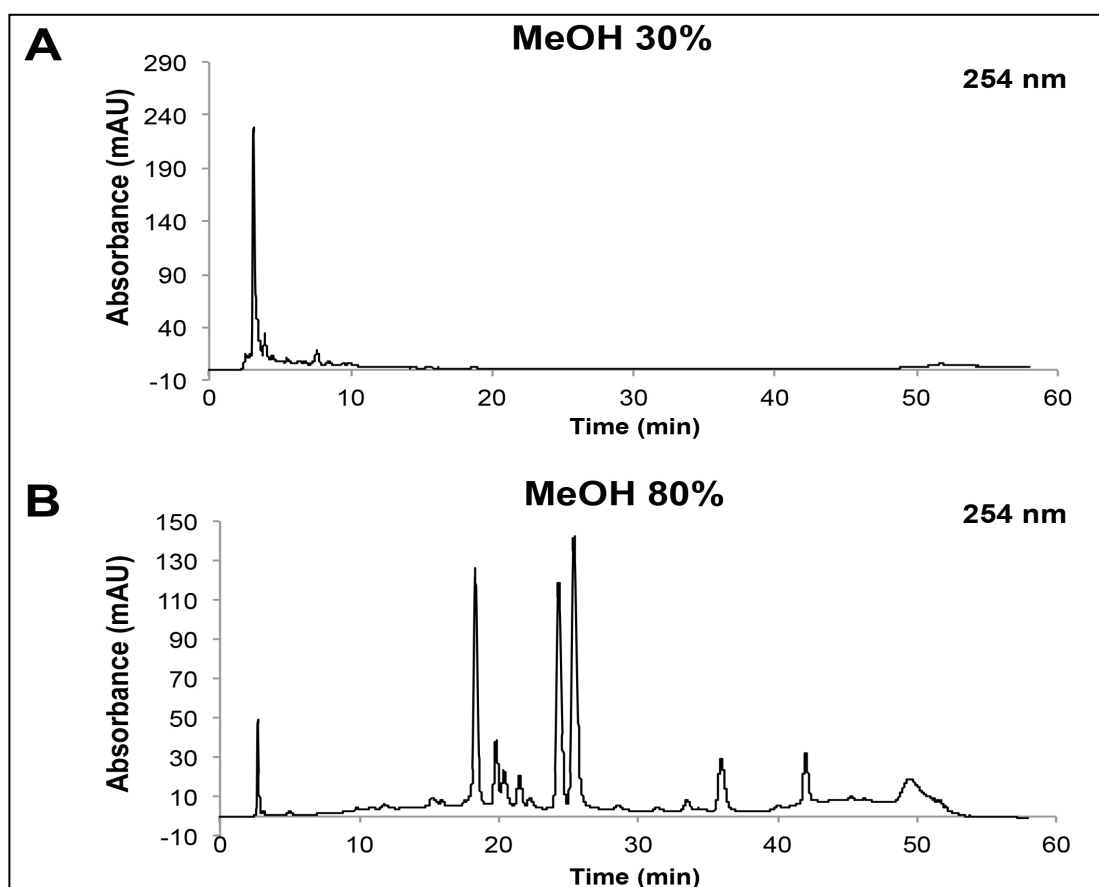


Figura 4. Cromatogramas analíticos obtidos por HPLC-DAD das frações obtidas por VLC. Solventes: MeOH (A) e H₂O (B) com 0.1 % ácido fórmico. Coluna: X-Bridge (250 x 4.6 mm d.i., 5 µm). Gradiente: 5-33 % de A em B em 15 min, 33-60 % em 40 min e 60-100 % em 50 min. Vazão de 1 mL.min⁻¹. Temperatura da coluna: 21°C. Vol. de injeção: 10 µL.

Novamente o rendimento das frações obtidas nos chamam a atenção pela quantidade em massa da primeira fração, com compostos mais polares, em relação a fração flavonoídica. O perfil químico obtido das frações e a análise do espectros UV dos picos presentes nos cromatogramas mostram que a fração MeOH 30 % concentrou os compostos com espectros de UV com $\lambda_{\text{máx}} = 259 \text{ nm}$, e a fração MeOH 80 %, os picos com UV e tempo de retenção típico de flavonoides.

2.3.2. Teste de Tolerância à glicose

O Teste de Tolerância à Glicose (GTT) é amplamente utilizado em práticas clínicas para detectar desordens no metabolismo de glicose que podem estar relacionadas ao diabetes ou outras síndromes metabólicas (ANDRIKOPOULOS et al., 2008). Ao final de 7 dias de tratamento, os camundongos de todos os grupos experimentais foram mantidos em jejum de 10 a 12 h. A glicemia de jejum foi medida no tempo 0'. Em seguida, os camundongos foram tratados via gavagem oral de acordo com a divisão dos grupos. Após 30 minutos dos tratamentos, os mesmos receberam injeção intraperitoneal de solução de glicose (2 g/kg). A glicemia foi medida nos tempos 15, 30, 90, 60 e 120 min depois da administração de glicose, utilizando-se glicosímetro (One touch, Johnson & Johnson), como mostra a figura 5.

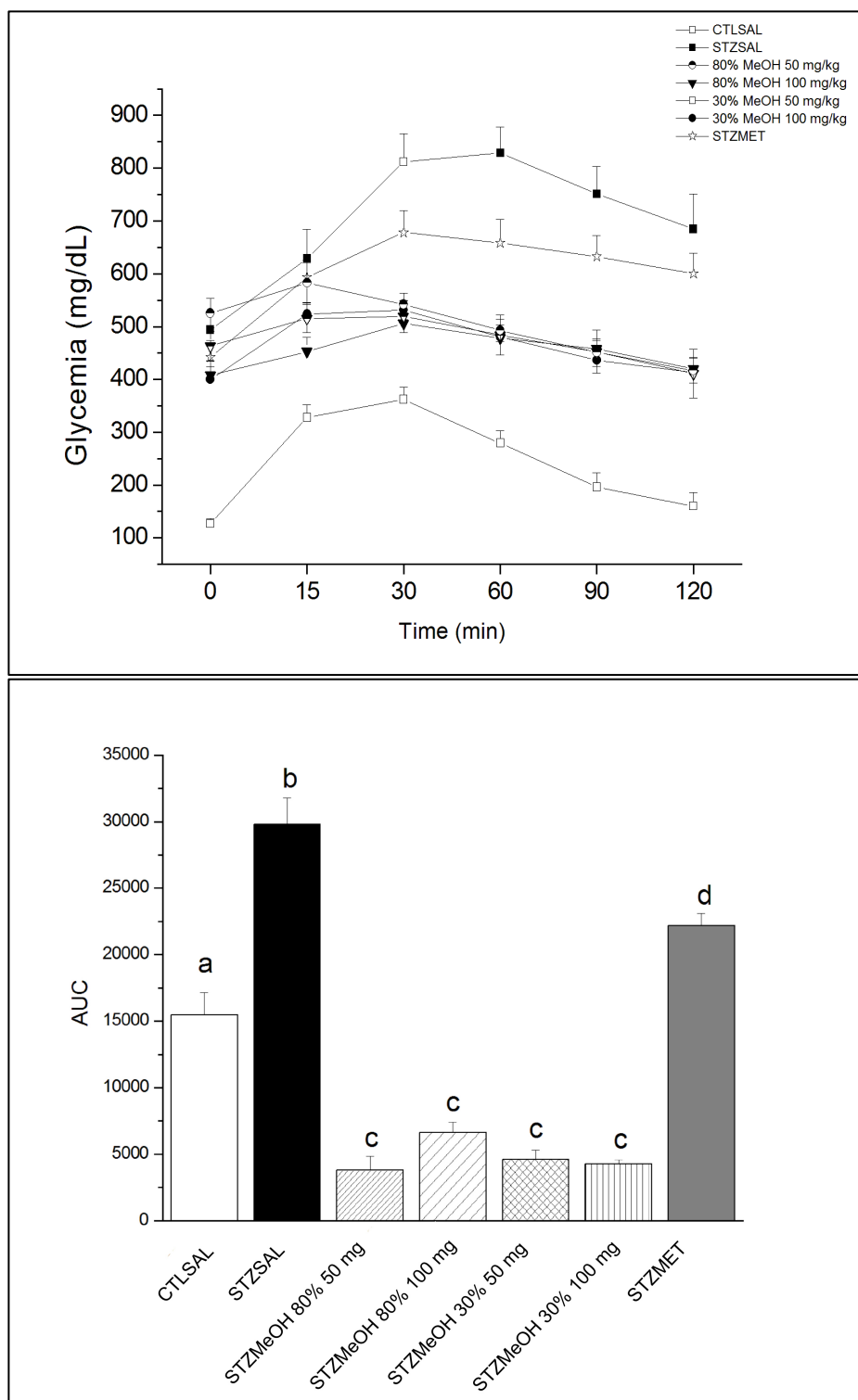


Figura 5. Glicemia após injeção intraperitoneal de glicose (2 g/kg) (A) e área sob a curva (B) de camundongos controles normoglicêmicos (CTL SAL) e diabéticos tratados por 7 dias com veículo solução salina (STZ SAL) , Metformina® (STZ MET) (300 mg/kg), flavonoides (STZMeOH 80%) e compostos polares (STZMeOH 30%) (50 e 100 mg/kg). Letras diferentes indicam diferença estatística significativa. Valores expressos em média $\pm$ EPM, $n = 10$, $p < 0,05$. ANOVA seguido de teste Tukey.

Na curva glicêmica, nossos resultados demonstraram que todos os grupos de camundongos diabéticos apresentaram aumento da glicemia inicial (tempo 0') em relação ao grupo normoglicêmico CTLSAL (Fig. 5, $p < 0,05$). Após 30 minutos da ingestão de solução de glicose, os grupos diabéticos STZMeOH 80% 50 mg/kg (519.4 ± 30.4), STZMeOH 80% 100 mg/kg (506.7 ± 23.4), STZMeOH 30% 50 mg/kg (542.9 ± 20.9) e STZMeOH 30% 100 mg/kg (531.5 ± 21.9) apresentaram menor glicemia comparada aos grupos diabéticos STZSAL (811.8 ± 53.1) e STZMET (678.1 ± 41.8) e a mesma se manteve menor no decorrer do experimento nos tempos 30, 60, 90 e 120 minutos (Fig. 5, $p < 0,05$). Em relação à área sob a curva, podemos notar que os grupos STZSAL e STZMET apresentaram maior intolerância à glicose (29805.06 ± 1964 e 22179 ± 917.01 ; $p < 0,0001$) quando comparado ao grupo CTLSAL ($15454,72 \pm 1701$). Em contra partida, os grupos STZMeOH 80% 50 mg/kg ($3788,25 \pm 1068$), STZMeOH 80% 100 mg/kg (6638.84 ± 747.47), STZMeOH 30% 50 mg/kg ($4614 \pm 677,61$) e STZMeOH 30% 100 mg/kg ($4270 \pm 305,8$) apresentaram menor área, sugerindo melhora na tolerância à glicose, em relação ao grupo CTLSAL ($15454,72 \pm 1701$, $p < 0,0001$). Não houve diferença estatística significativa entre os grupos tratados com as frações ($p > 0,05$).

Uma vez que obtivemos resultados de melhora na tolerância à glicose no grupo STZMeOH 30% 100 mg/kg ($4270 \pm 305,8$), algo inédito na literatura, quando comparado ao grupo STZMeOH 80% 100 mg/kg (6638.84 ± 747.47), o grupo STZMeOH 30% 100 mg/kg foi selecionado para continuidade dos estudos e posterior fracionamento e purificação de compostos.

2.3.3. Isolamento dos compostos alvo

O EEtOH70% foi purificado, com foco nos compostos polares presentes na fração com atividade mais promissora (BHCIA), por cromatografia de média pressão (MPLC), usando sílica Zeoprep C18 (15–25 μm , 460×49 mm d.i., Zeochem) como fase estacionária, e gradiente linear com MeOH (A) e H₂O (B) acidificados (0,1 % Ác. Fórmico) (5-33 % de A em B em 7:35 h, 33-60 % de A em B em 9:40 h e 60-100 % de A em B em 6:40 h) a 35 °C (Figura 6).

Uma mistura de sílica (45 g) ZEOprep[®] 60 Å C18/40-63 μm e de extrato (15 g) foi acondicionada em um cartucho (11,5 $\times$ 2,7 cm d.i.) conectado em linha entre as

bombas e a coluna do MPLC para carregamento do extrato na coluna cromatográfica. A vazão foi ajustada em 15 mL/min e a detecção UV em 254 nm.

As condições cromatográficas utilizadas em escala analítica foram geometricamente transferidas para escala preparativa, utilizando-se uma metodologia desenvolvida no laboratório e com o software *HPLC calculator* 3.0. (CHALLAL et al., 2015). Para a análise em modo analítico foi usada coluna com FE com as mesmas dimensões da fase preparativa, Sílica gel C18 ZEOprep® 60 Å, 15-25 µm, 250 x 4,6 mm d.i. (Zeochem, Suíça). As condições de análise analítica e preparativa estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Condições analíticas e preparativas utilizadas no isolamento direcionado de cianoglicosídeos.

CLAE-DAD (analítico)			MPLC-UV (preparativo)	
Coluna				
Altura (mm)	250		460	
Diâmetro (mm)	4,6		49,0	
Tam. de	15-25		15-25	
Partícula (µm)				
Aplicação (g)	0,01		12	
Temp. coluna °C	35		35	
Vazão (mL/min)	1		15	
<i>Dwell volume</i>	0,95		12	
(mL)				
Vol. morto da	2.64		510	
coluna (mL)				
Gradiente	t(min)	%B	t(h)	%B
	0	5	0	5
	45	33	7:35	33
	90	60	17:15	60
	100	100	23:53	100

A análise dos cromatogramas obtidos (Figura 6) mostra que ao se usar partículas de sílica padronizadas, ou seja, de mesmo tamanho, conseguimos uma transferência do método mais robusta e maior precisão para prever o tempo de

retenção dos compostos de interesse. Nota-se um deslocamento do cromatograma semipreparativo em relação ao cromatograma analítico pela diferença na temperatura do solvente e da coluna nos dois experimentos. Na separação analítica a coluna estava condicionada em 21 °C, já a fase móvel e a coluna semipreparativa em 35 °C.

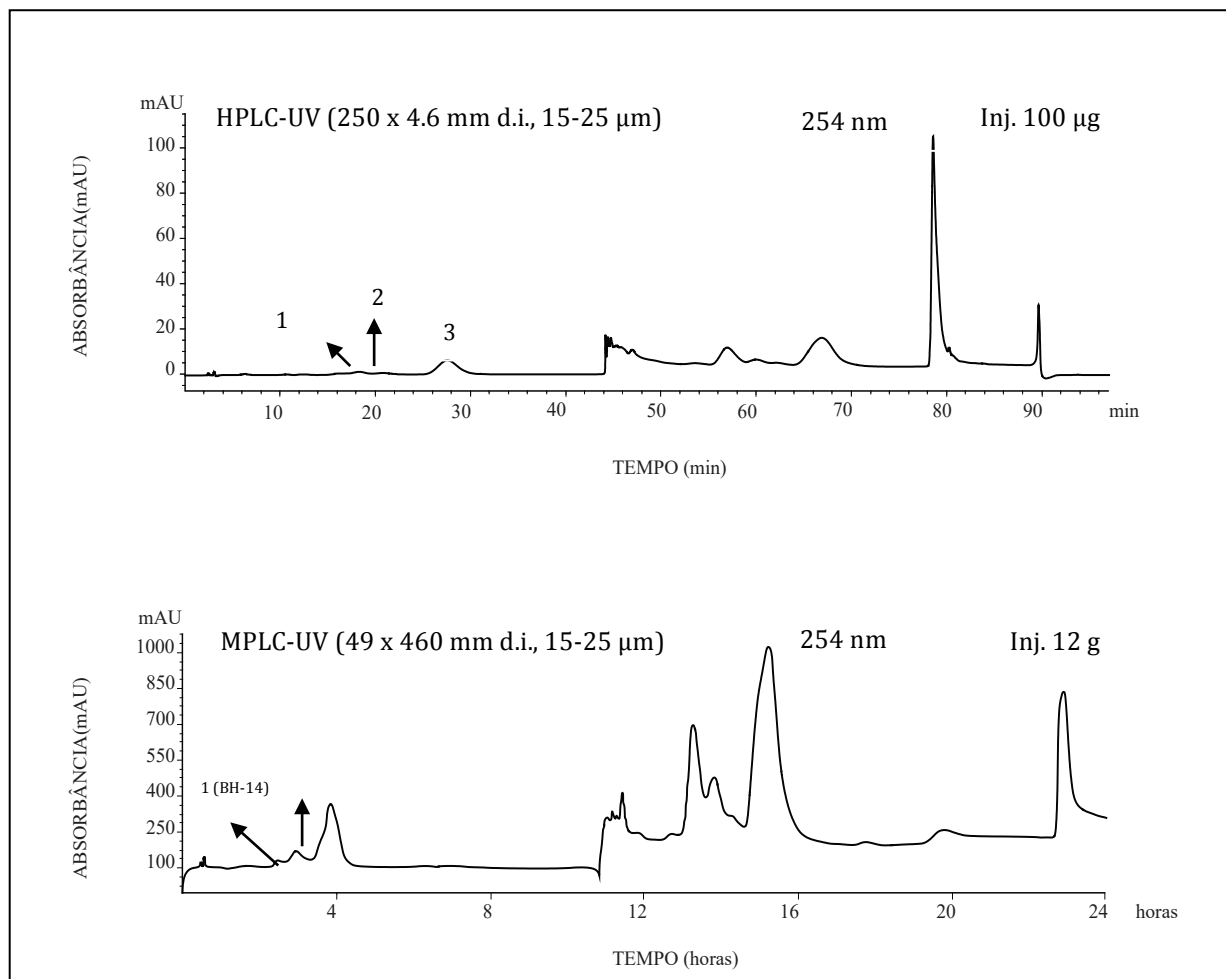


Figura 6. Cromatogramas do EEtOH70% das folhas de *Bauhinia holophylla*. A) HPLC-DAD em 254 nm com coluna analítica ZEOprep C18 (250 x 4,6 mm d.i., 15-25 µm). Vol. Inj. 15 µL (10 mg/mL). Temperatura da coluna: 21 °C. Vazão: 1 mL/min. B) MPLC-UV em 254 nm com coluna semi-preparativa ZEOprep C18 (49 x 460 mm d.i., 15-25 µm). Inj. 15 g. Temperatura da coluna e do solvente: 35 °C. Vazão: 15 mL/min.

Por desta abordagem foi possível isolar, em um único passo, 3 compostos com os seguintes rendimentos e pureza por RMN de hidrogênio: **BH-14** (6,8 mg, 88 %), **BH-15** (11 mg, 80 %) and **BH-21** (244 mg, 98 %).

2.3.4. Análises espectrométricas dos compostos isolados

Os compostos isolados foram submetidos a análises espectrométricas para identificação estrutural (TOF-HRMS e RMN) e determinação da configuração absoluta da estrutura (dicroísmo circular eletrônico). Os dados obtidos foram similares aos dados encontrados na literatura para cianoglicosídeos (HAN et al., 2001; JOSIEN-LEFEBVRE & LE DRIAN, 2007).

➤ Composto BH-14

O composto **BH-14** foi obtido como sólido branco amorfo; $[\alpha]_D^{22.6} -11,95^\circ$ (c = 0,5 MeOH); UV $\lambda_{\text{máx}}$ (log e) 260 nm; ^1H -RMN (D_2O , 499,9 MHz) ver Tabela 2; ESI-MS (modo negativo): m/z 328,1 $[\text{M-H}]^-$; HRMS: m/z 328,1055 $[\text{M-H}]^-$ (cálculo teórico $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{NO}_8$, 328,1032, Δ ppm = 7,0) ver Tabela 3.

O espectro de RMN de ^1H do composto **BH-14** (Figura 7) apresentou três sinais de hidrogênios olefínicos. Observa-se deslocamentos em δ 6,67 (H2, dd, $J = 10,1; 2,3$ Hz), δ 6,21 (H3, dt, $J = 10,1; 2,0$ Hz) e δ 5,85 (H7, s) (Figura 8). Outros sinais em δ 4,42 (H4, dt, $J = 8,3; 2,3$), δ 3,74 (H5, ddd, $J = 10,5; 8,3; 2,0$ Hz) e δ 4,62 (H6, dd, $J = 1,5; 2,3$ Hz). Foram observados também sinais referentes à unidade de açúcar em δ 4,79 (H1', anomérico, d, $J = 7,3$ Hz) indicando a posição β da ligação do açúcar, δ 3,52 H2' (*overlap*) δ 3,54 (H3', d, $J = 9,1$ Hz), δ 3,89 (H6'a, dd, $J = 12,4; 1,5$ Hz), δ 3,75 (H6'b, $J = 12,9$), δ 3,93 (dd, $J = 12,4; 2,1$ Hz), δ 3,75 (dd, $J = 12,4; 5,4$ Hz). Os dados são apresentados na Tabela 2.

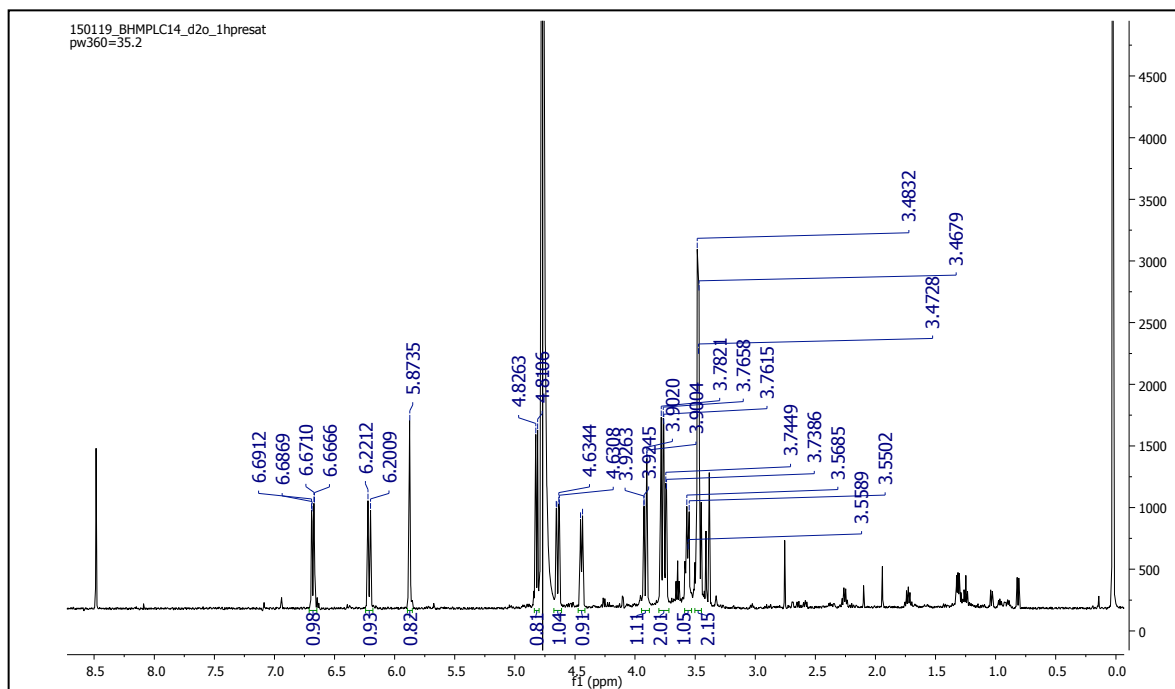


Figura 7. Espectro de RMN de ^1H do composto **BH-14** (D_2O , 499,9 MHz).

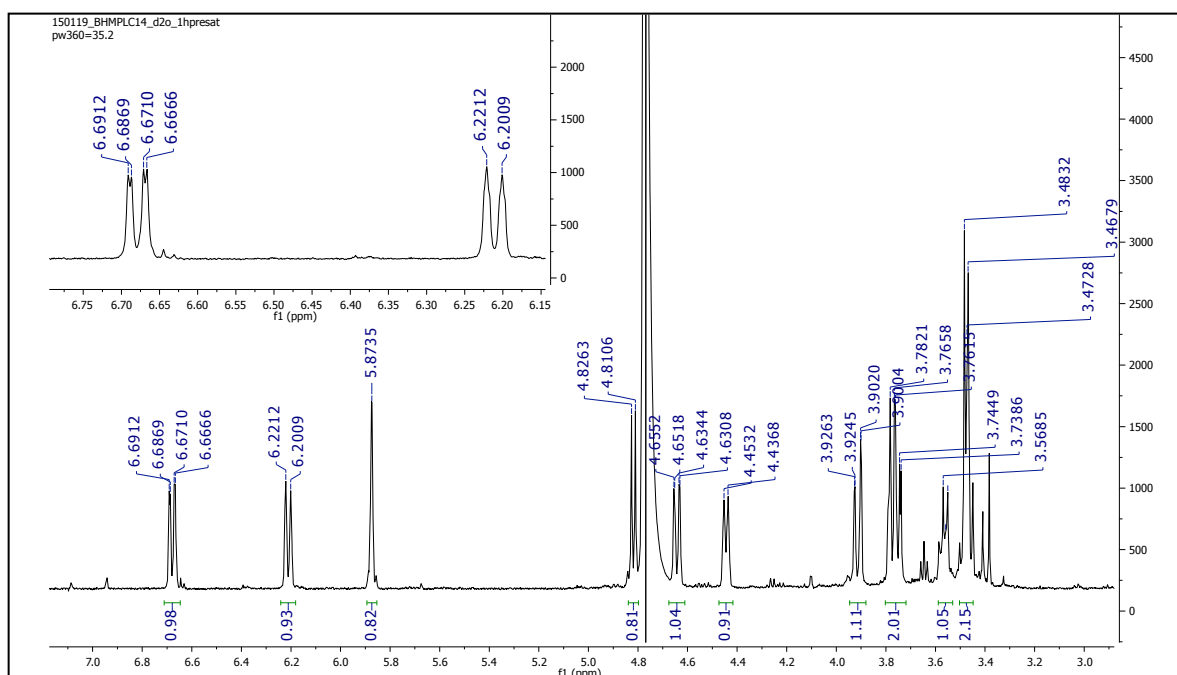


Figura 8. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (δ 2,5 a δ 7,5 ppm) do composto **BH-14** (D_2O , 499,9 MHz).

A partir do espectro de gHSQC (Figura 9) determinamos as atribuições para os carbonos da molécula. No espectro de HMBC (Figura 10) podemos ver a correlação do sinal do H1' (anomérico) em δ 4,79 com o do C6 em δ 82,1 ppm, confirmando a

posição do açúcar na estrutura da aglicona.

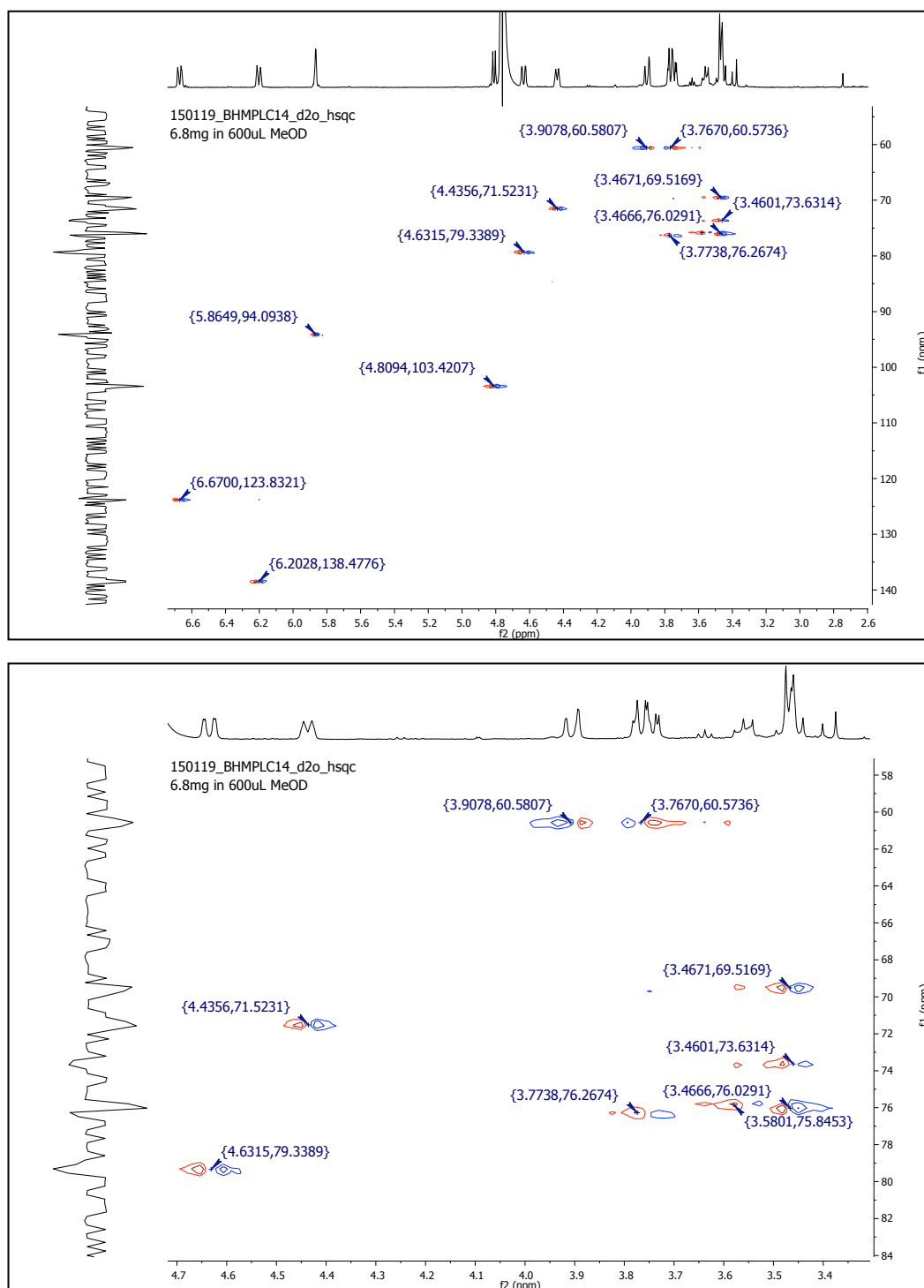


Figura 9. Ampliação do mapa de contorno gHSQC (δ 2,6 a δ 6,7 ppm) do composto BH-14.

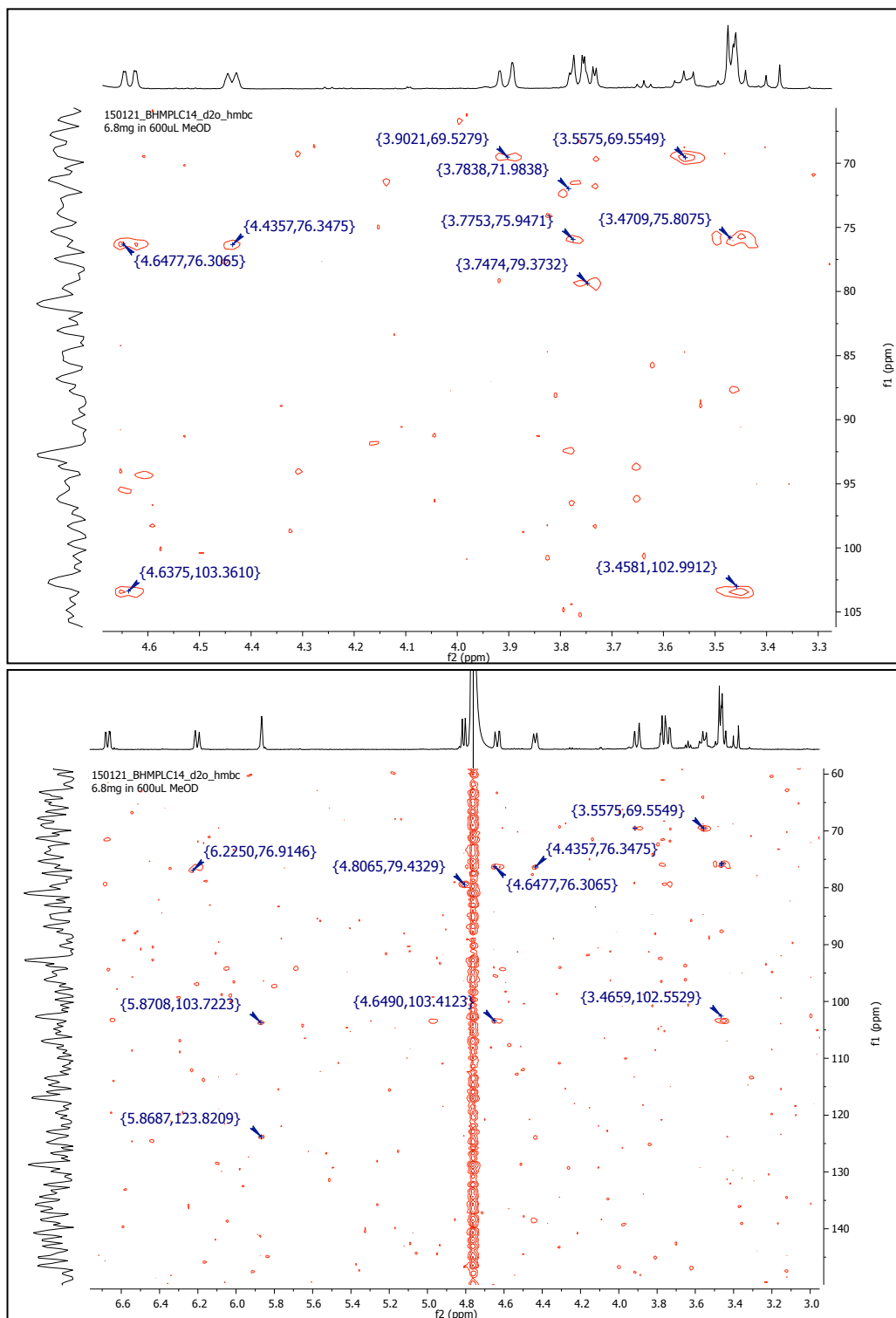


Figura 10. Ampliação do mapa de contorno gHMBC (δ 3 a δ 7 ppm) do composto BH-14.

A **Figura 11** mostra a estrutura do composto **BH-14** a partir dos dados obtidos por RMN.

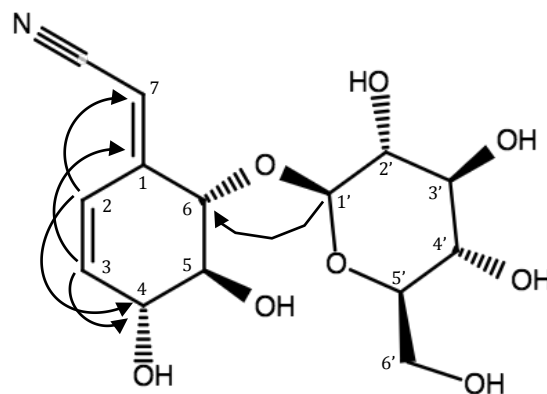


Figura 11. Estrutura molecular do composto **BH-14**. As setas indicam as correlações heteronucleares obtidas por gHMBC.

Portanto, o composto **BH-14** foi identificado como sendo o cianoglicosídeo não-cianogênico (2*E*)-(4*R*,5*S*,6*S*)-6-(β-*D*-glicopiranosiloxil)-4,5-dihidrox ciclohex-2-en-1-ilideno-acetonitrila.

➤ Composto **BH-15**

O composto **BH-15** foi obtido como sólido branco amorfo; $[\alpha]_D^{22.6} + 7,12^\circ \text{ c} = 0,1 \text{ MeOH}$; UV $\lambda_{\text{máx}}$ (log e) 260 nm; ^1H RMN (D_2O , 499,9 MHz) e ^{13}C RMN (D_2O , 125,7 MHz): para dados de RMN de ^1H e ^{13}C ver Tabela 2; ESI-MS (modo negativo): m/z 166,0 $[\text{M}-\text{H}]^-$; HRMS: m/z 168,0694 $[\text{M}+\text{H}]^+$, $\Delta \text{ ppm} = 14,6$ (Calculado para $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{NO}_3$, 168,0661) (ver Tabela 3).

O espectro de RMN de ^1H (Figuras 12 e 13) do composto **BH-15** apresentou sinais com deslocamento δ 6,65 (H2, dd, $J=10,1$; 2,0 Hz) e δ 6,18 (H3, dt, $J=10,1$; 2,0 Hz) além dos sinais em δ 4,31 (H4, dt, $J=8,1$; 2,0 Hz), δ 3,51 (H5, dd, $J=10,4$; 8,1 Hz), δ 4,37 (H6, dd, $J=10,4$; 2,0 Hz) e δ 5,65 (H7, s). Os dados de RMN de ^1H e ^{13}C são apresentados na Tabela 2.

A correlação dos hidrogênios e carbonos foi determinada através dos experimentos de gHMBC e gHSQC (Figuras 14 e 15).

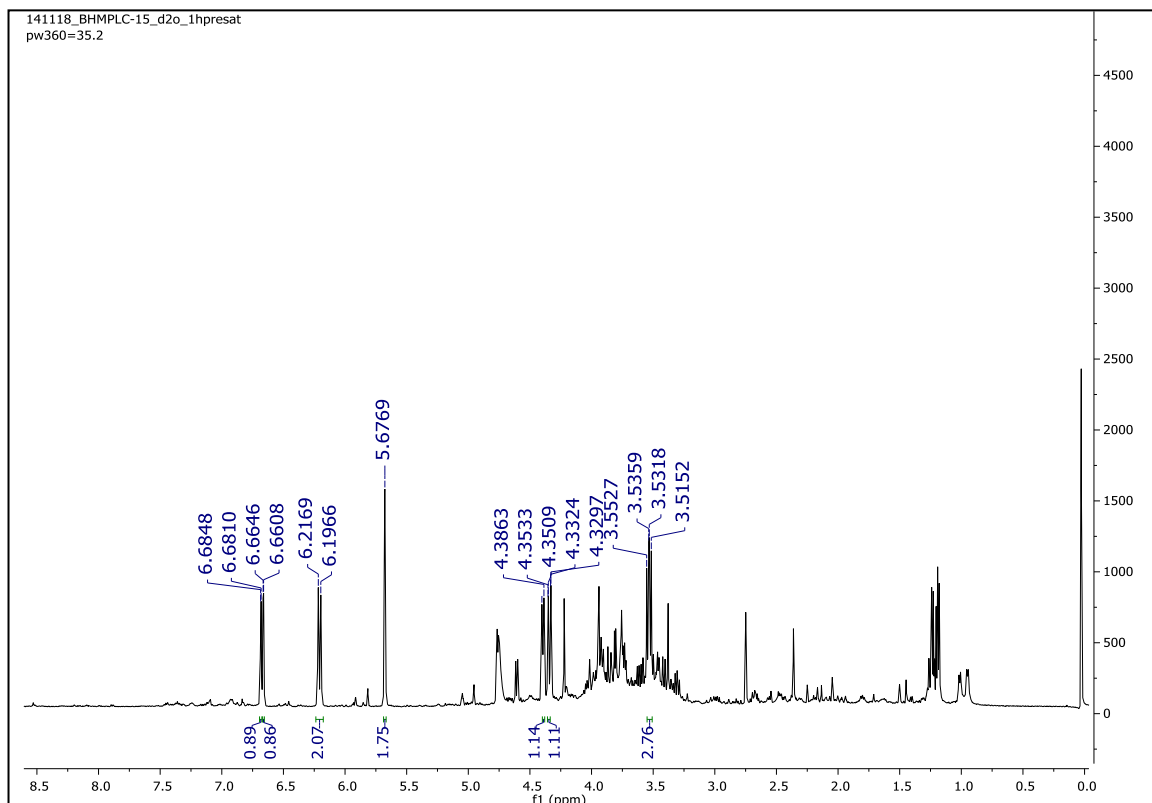


Figura 12. Espectro de RMN de ^1H (δ 0 a δ 8,5 ppm) do composto **BH-15** (D_2O , 499,9 MHz).

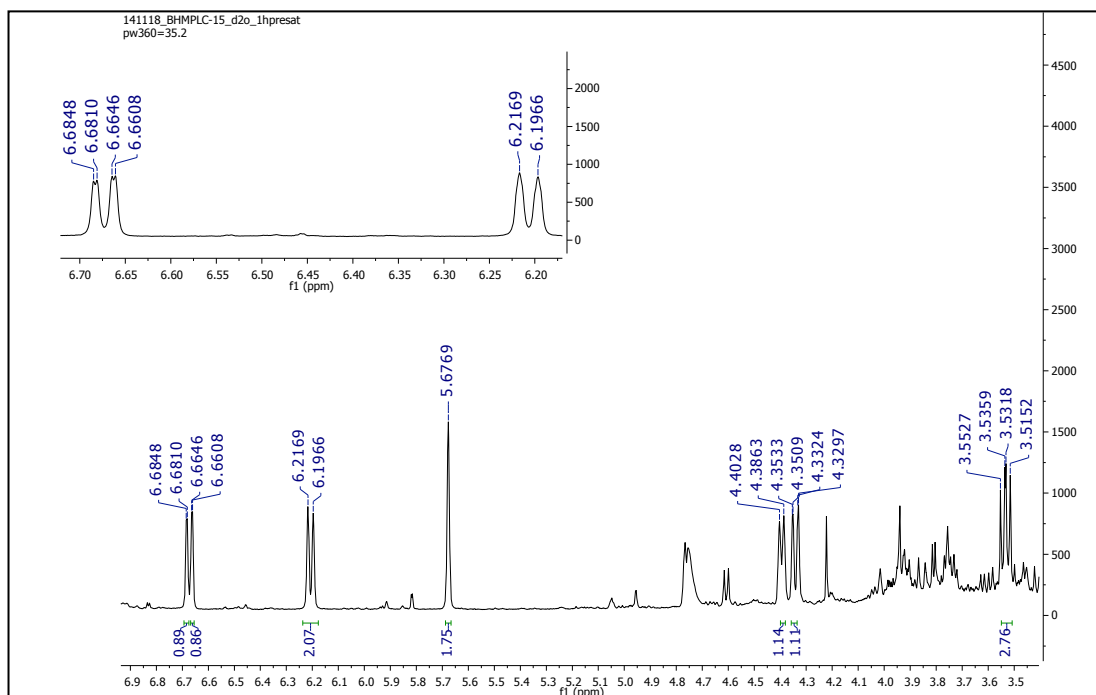


Figura 13. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (δ 3 a δ 7,5 ppm) do composto **BH-15** (D_2O , 499,9 MHz).

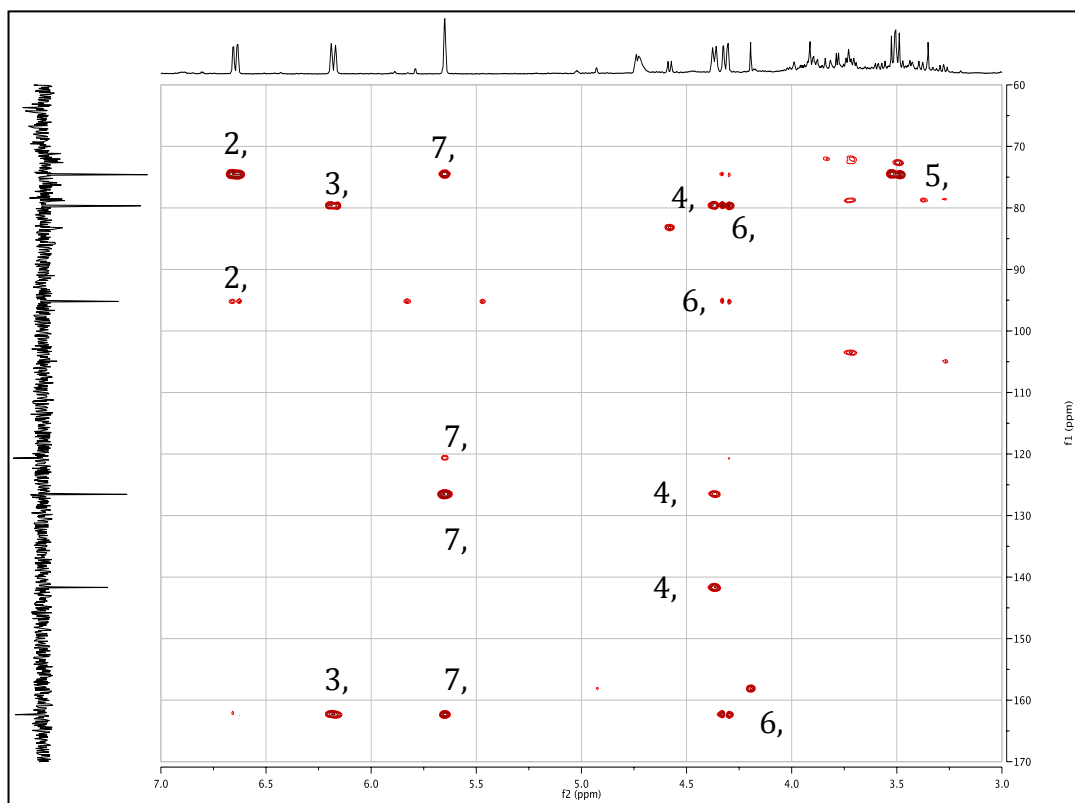


Figura 14. Ampliação do mapa de contorno de gHMBC (δ 3 a δ 7 ppm) do composto BH-15.

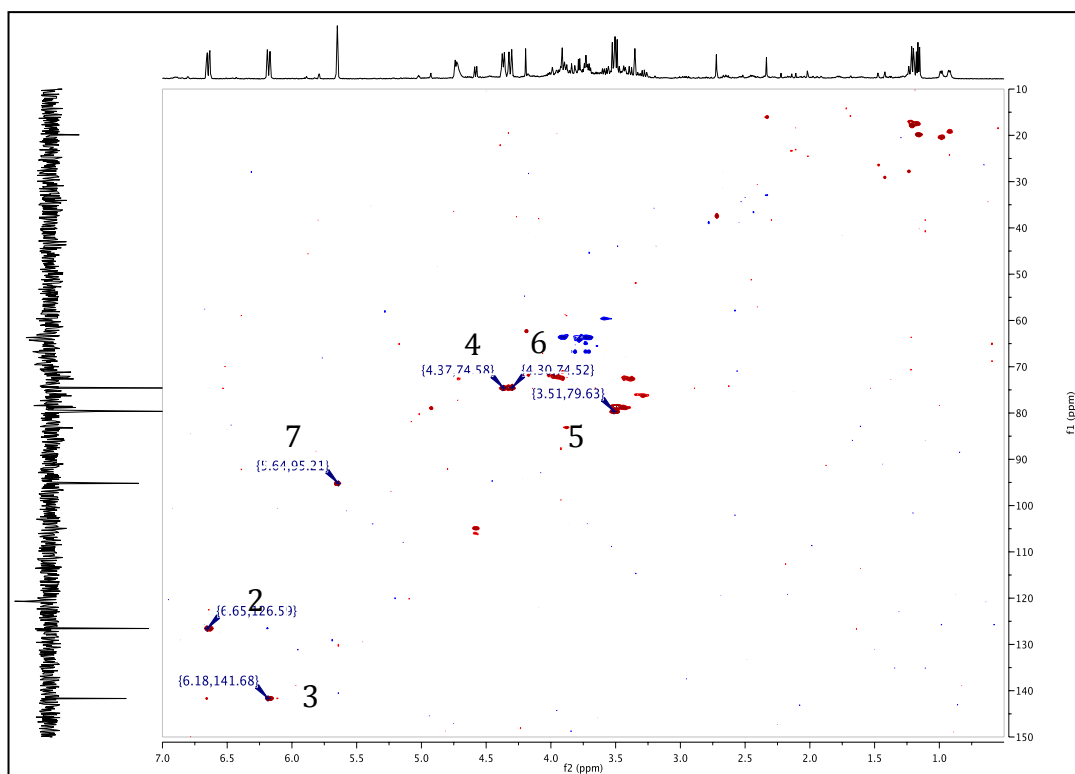


Figura 15. Ampliação do mapa de contorno gHSQC (δ 3 a δ 7 ppm) do composto **BH-15**.

A partir dos experimento de RMN foi possível propor a estrutura do composto **BH-15** (**Figura 16**).

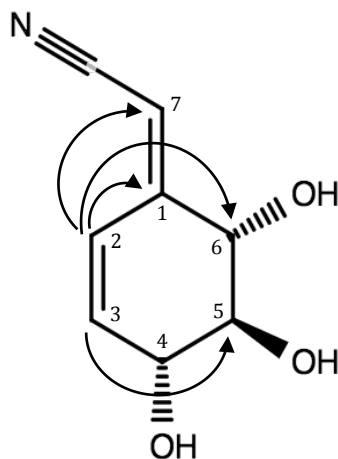


Figura 16. Estrutura molecular do composto **BH-15**. As setas indicam as correlações heteronucleares obtidas por gHMBC.

Após interpretação dos espectros obtidos, o composto BH-15 foi identificado como (2*E*)-2-[(4*R*,5*S*,6*S*)-4,5,6-trihidroxíciclohex-2-en-1-ilideno]acetonitrila, sendo outro cianoglicosídeo não-cianogênico.

➤ Composto **BH-21**

O composto **BH-21** foi obtido como sólido amorfo; $[\alpha]_D^{22.6}$ -209,12° ($c = 0,1$ MeOH); UV $\lambda_{\text{máx}}$ (log ϵ) 260 nm; ^1H RMN (D_2O , 499,9 MHz) e ^{13}C RMN (D_2O , 125,7 MHz): para dados de RMN de ^1H e ^{13}C (500 MHz, D_2O , δ em ppm) ver Tabela 2; ESI-MS (modo negativo): m/z 328,1 $[\text{M}-\text{H}]^-$; HRMS: m/z 328,1059, Δ ppm = 8,2 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{NO}_8$, 328,1032) ver Tabela 3.

O espectro de RMN de ^1H do composto **BH-21** (Figura 17) apresentou três sinais de hidrogênios olefínicos. Observa-se deslocamentos em δ 6,36 (H2, dd, $J = 10,2$; 1,8 Hz), δ 6,14 (H3, dd, $J = 10,2$; 3,2 Hz) e (H7, s). Outros sinais em δ 4,31 (H4, m, *overlap*), δ 3,97 (H5, dd, $J = 8,2$; 6,1 Hz), δ 4,86 (H6, dd, $J = 8,2$; 1,7 Hz) e δ 5,65. Foi observado também sinais referentes à unidade de açúcar em δ 4,90 (H1',

anomérico, d, $J = 7,8$ Hz), δ 3,52, δ 3,54 H3' (*overlap*), δ 3,44 (H4', *overlap*), δ 3,45 (H5', *overlap*), δ 3,93 (dd, $J = 12,4$; 2,1 Hz), δ 3,75 (dd, $J = 12,4$; 5,4 Hz). Os dados de RMN de ^1H e ^{13}C são apresentados na Tabela 2.

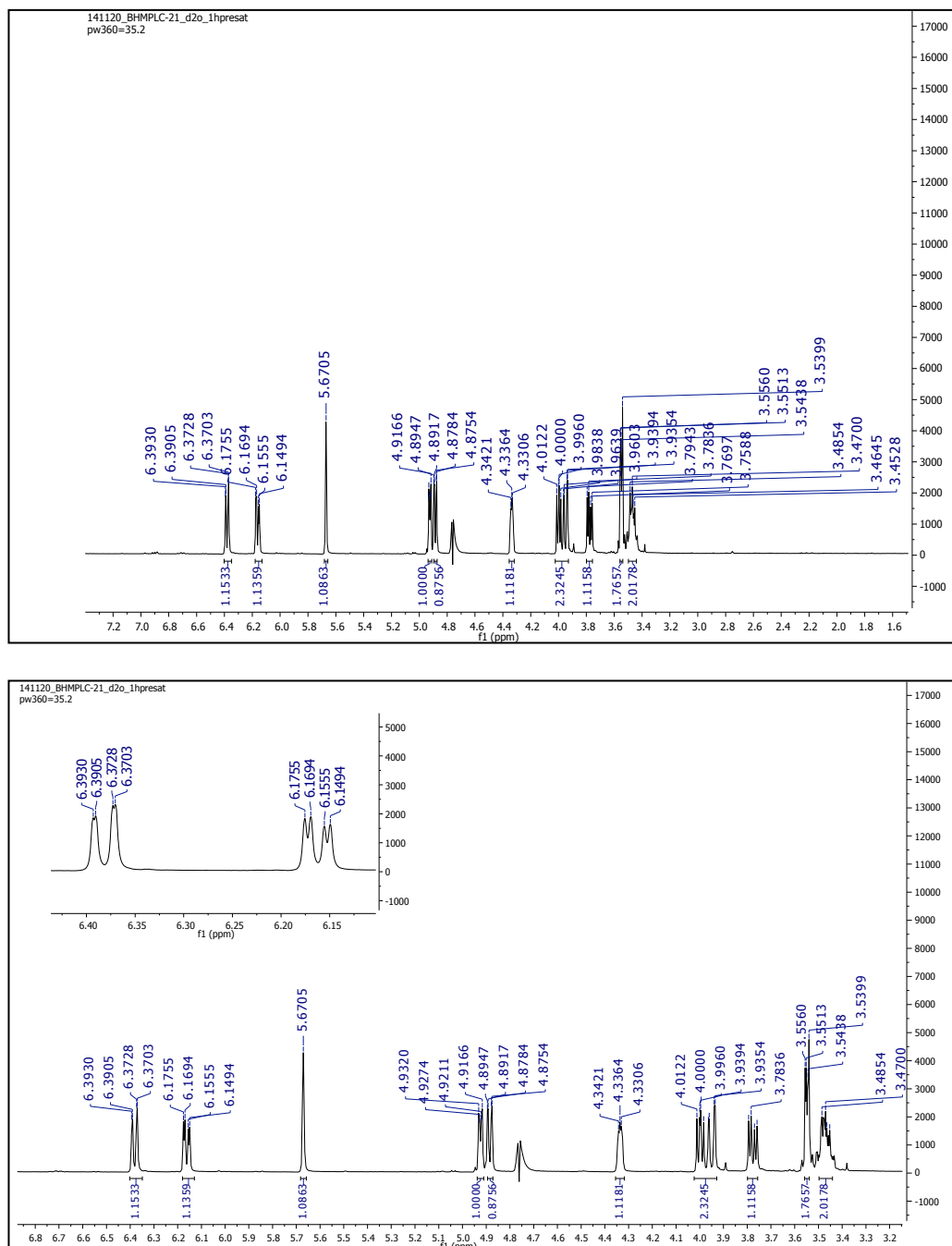


Figura 17. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (δ 7,5 a δ 1,5 ppm) do composto BH-21 (D_2O , 499.9 MHz). *(continua próxima página).

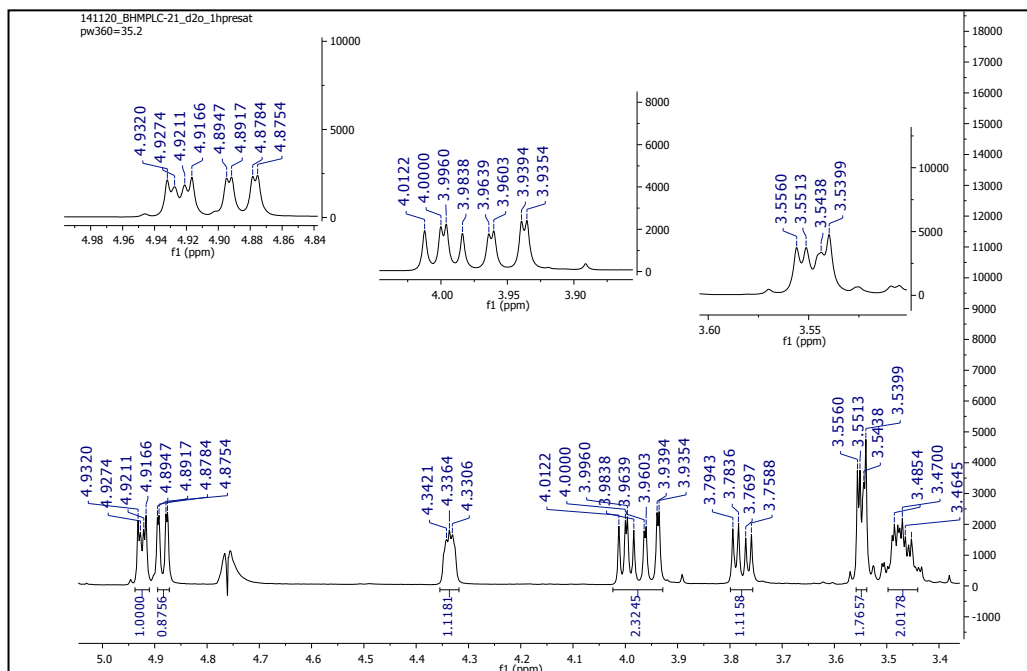


Figura 17. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (δ 7 a δ 3 ppm) do composto **BH-21** (D_2O , 499.9 MHz).

As atribuições dos hidrogênios e carbonos foram feitas através dos experimentos de gHMBC e gHSQC (Figuras 18 e 19). Análise do espectro de gHMBC (Figura 18) confirmou a posição do açúcar pela correlação do hidrogênio anomérico ($\text{H1}'$) em δ 4,90 ppm e o C6 em δ 78,6 ppm.

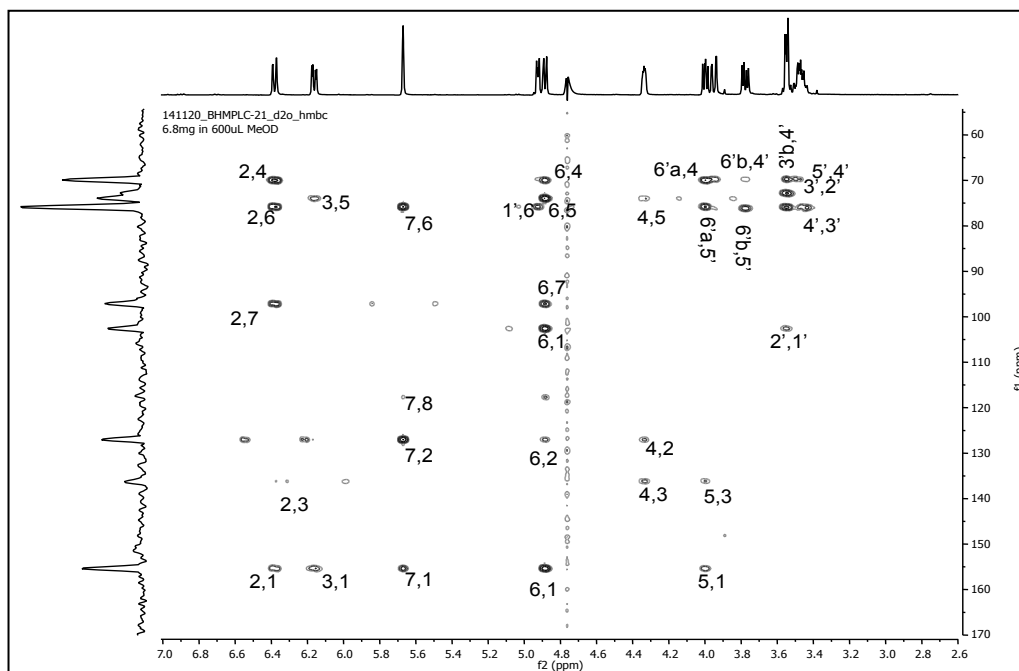


Figura 18. Ampliação do mapa de contorno gHMBC (δ 2,6 a δ 7 ppm) do composto **BH-21**.

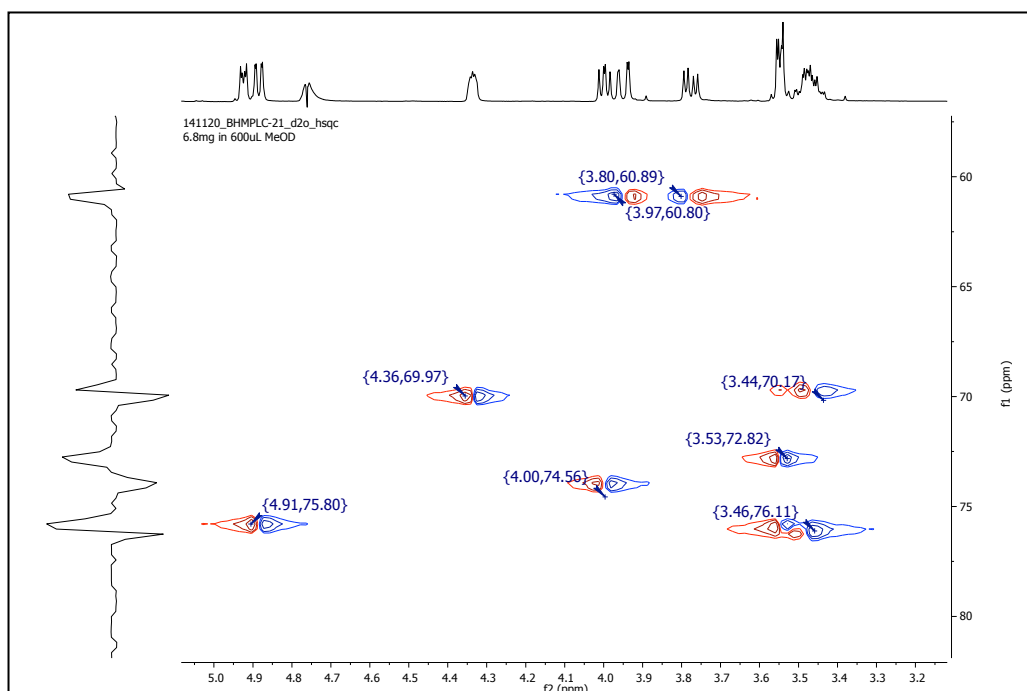
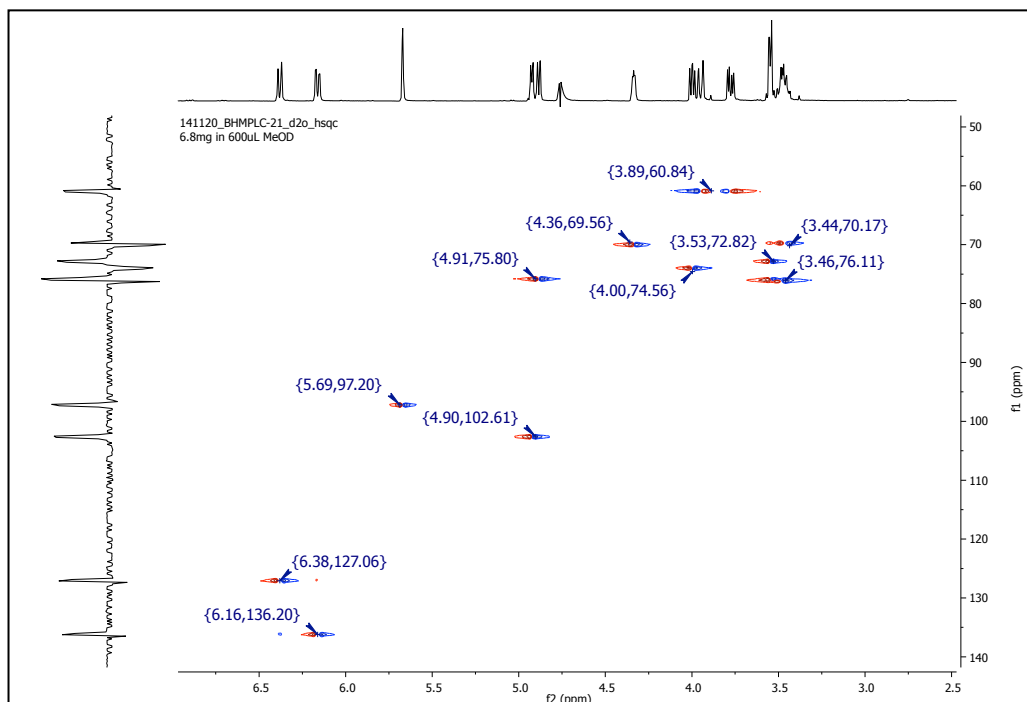


Figura 19. Ampliação do mapa de contorno gHSQC (δ 2,4 a δ 7 ppm) do composto BH-21.

A estrutura do composto **BH-21** pode ser proposta a partir dos experimentos de RMN (**Figura 20**).

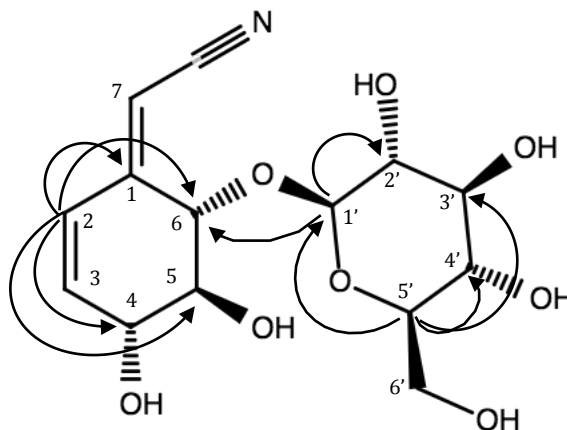


Figura 20. Estrutura molecular do composto **BH-21** (litospermosídeo). As setas indicam as correlações heteronucleares obtidas por gHMBC.

Já o composto BH-21 foi identificado como litospermosídeo, outro composto também pertencente à classe dos cianoglicosídeos.

A Tabela 2 apresenta os dados de deslocamentos químicos dos compostos BH-14, BH-15 e BH-21 (litospermosídeo).

Table 2. Deslocamentos químicos de RMN de ^1H (D_2O , 499,9 MHz) e ^{13}C (D_2O , 127,5 MHz) do compostos BH-14, BH-15 e BH-21.

Posição	BH-14		BH-15			BH-21 (litospermosídeo)		
	δ_{C}	δ_{H} (<i>J</i> em Hz)	δ_{C}	δ_{H} (<i>J</i> em Hz)	HMBC ^a	δ_{C}	δ_{H} (<i>J</i> em Hz)	HMBC ^a
CN	--		120,7 (CN)			120,5 (CN)		
1	160,0 (C)	--	162,4 (C)			158,1 (C)		
2	126,6 (CH)	6,65 (dd, 10,1; 2,0)	126,6 (CH)	6,65 (dd, 10,1; 2,0)	1, 6, 7	129,8 (CH)	6,36 (dd (10,2; 1,8)	1,3,4,6, 7
3	141,3 (CH)	6,19 (dd, 10,1; 2,0)	141,7 (CH)	6,18 (dd, 10,1; 2,0)	1, 5	139,0 (CH)	6,14 (dd (10,2; 3,2)	1,5
4	74,3 (CH)	4,42 (dt, 8,3; 2,0)	74,6 (CH)	4,37 (dt, 8,1; 2,0)	2, 3, 5	72,7 (CH)	4,31 (m)	2, 3, 5
5	79,1 (CH)	3,74 (ddd, 10,5; 8,3; 2,0)	79,7 (CH)	3,51 (dd, 10,4; 8,1)	6	76,7 (CH)	3,97 (dd, 8,2, 6,1)	1, 3
6	82,1 (CH)	4,62; (dd, 10,5; 2,0)	74,5 (CH)	4,31 (dd, 10,4; 2,0)	1,5, 7	78,6 (CH)	4,86 (dd, 8,2; 1,7)	1, 2, 4, 5, 7, 1'
7	96,9 (CH)	5,85 (s)	95,2 (CH)	5,65 (s)	1, 2, 6, CN	99,9 (CH)	5,65 (s)	1, 2, 6, 8
1'	106,2 (CH)	4,79 (d, 7,8)				102,62 (CH)	4,90 (dd 7,8; 2,35)	2'
2'	76,4 (CH)	3,45 (m)				75,6 (CH)	3,52	
3'	78,6 (CH)	3,54; (t, 9,1)				78,7 (CH)	3,52	2'
4'	72,3 (CH)	3,46				72,5 (CH)	3,44	3'
5'	78,8 (CH)	3,46				78,9 (CH)	3,45	1', 3', 4'
6'a	63,3 (CH ₂)	3,89 (dd, 12,5; 1,6)				63,7 (CH ₂)	3,93 (dd 12,4; 2,1)	4', 5'
6'b	63,3 (CH)	3,75 (d, 12,5)				63,7 (CH)	3,75 (dd, 12,4; 5,4)	4', 5'

2.3.5. Análise dos compostos por UPLC-TOF-HRMS

Os espectros de massas de alta resolução foram obtidos em espectrômetro de massa acoplado a um cromatógrafo (UPLC-ToF-HRMS). Na análise de composição elementar do espectro da amostra **BH-14**, identificamos no modo positivo o íon ($[M+H]^+$) de m/z 168,0694. Já nos espectros das amostras **BH-15** e **BH-21** obtidos no modo negativo identificamos os íons ($[M-H]^-$) de m/z 328,1055 e de m/z 328,1059 respectivamente. A Tabela 3 apresenta os dados obtidos.

Tabela 3. Análise da composição elementar das fórmulas moleculares dos compostos isolados do EEtOH 70% das folhas de *Bauhinia holophylla*.

Composto	Fórmula molecular	Modo de Ionização	m/z experimental	m/z teórico	Desvio (ppm)
BH-15	C ₈ H ₁₀ NO ₃	ESI + ($[M+H]^+$)	168,0694	168,0661	14,6
BH-14	C ₁₄ H ₁₈ NO ₈	ESI - ($[M-H]^-$)	328,1055	328,1032	7,0
BH-21	C ₁₄ H ₁₈ NO ₈	ESI - ($[M-H]^-$)	328,1059	328,1032	8,2

2.3.6. Determinação da configuração absoluta dos compostos isolados por DCE e $[\alpha]^D$

A diferenciação dos isômeros (*E/Z*) foi determinada por dicroísmo circular eletrônico. A diferenciação é possível através da interação diferencial com a luz das diferentes configurações. Dentre os métodos para determinação da configuração total de moléculas provenientes de fontes naturais estão: Raio-X, para cristais, RMN após derivatização quiral, síntese química e métodos ópticos-quiral (DCE, DEV) para soluções incolores (MeOH, H₂O, Hexano, etc) (BEROVA et al., 2007).

No dicroísmo circular eletrônico, os isômeros absorvem a luz circulante polarizada à esquerda e a luz circulante polarizada à direita. O efeito Cotton foi observado próximo de 230 e 270 nm para o isômero (*Z*) e em 230 nm para o isômero

(E) (Figura 21). Abaixo são apresentados os espectros de DC obtidos dos compostos isolados (BH-14, BH-15 e BH-21).

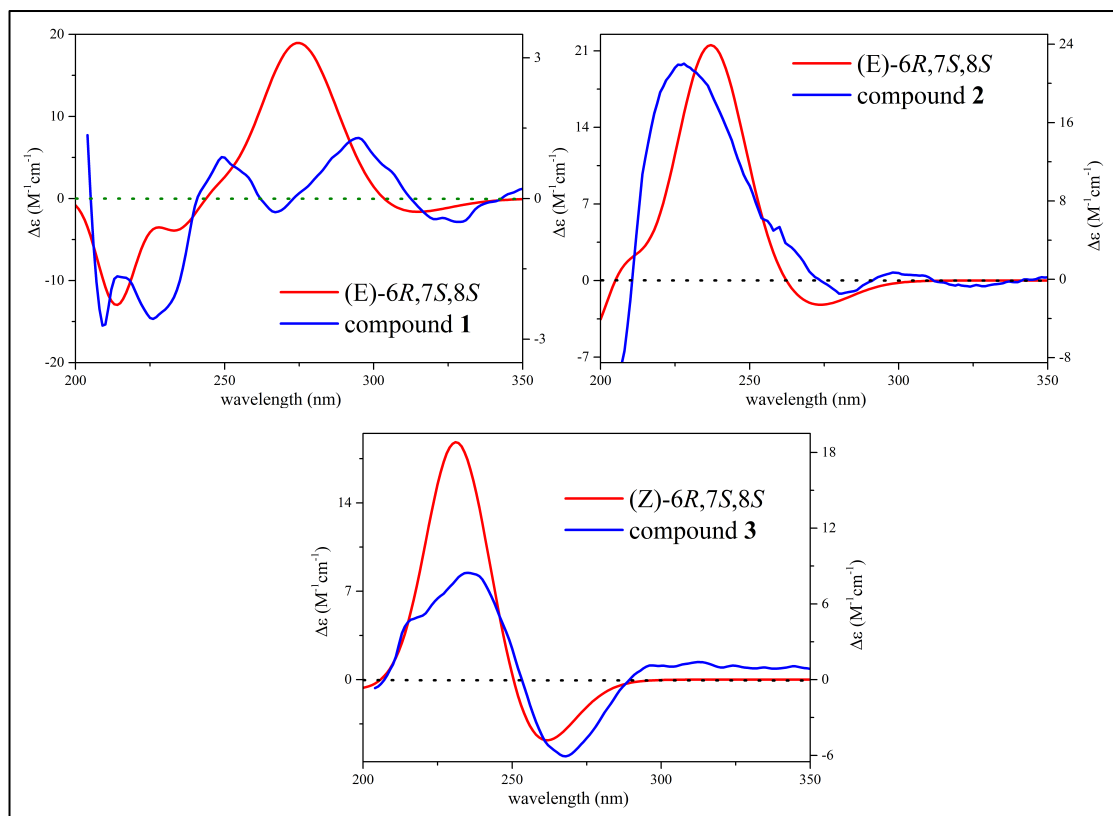


Figura 21. Comparação dos espectros de dicroísmo circular eletrônico experimental e teórico dos compostos isolados do extrato EtOH 70% das folhas de *Bauhinia holophylla*. *Compound 1 = BH-14; Compound 2 = BH-15; Compound 3 = BH-21.

As análises de rotação óptica também auxiliam para a determinação correta da configuração total dos compostos. Os resultados obtidos no experimento de $[\alpha]_D^{22.6}$ com os compostos isolados foram: BH-14 $[\alpha]_D^{22.6} -11,95^\circ$ ($c = 0,5$ MeOH), BH-15 $[\alpha]_D^{22.6} +7,48^\circ$ $c = 0.1$ MeOH e BH-21 $[\alpha]_D^{22.6} -209,12^\circ$ ($c = 0,1$ MeOH).

A partir dos dados espectroscópicos obtidos por RMN, UV e $[\alpha]_D$ dos compostos e comparação com a literatura e cálculos teóricos e experimentais de DCE, foi possível propor a configuração absoluta dos compostos como (2E)-(4R,5S,6S)-6-(β-D-glucopiranosiloxi)-4,5-dihidroxiciclohex-2-en-1-ilidene-acetonitrila (BH-14) (Josien-Lefebvre & Le Drein, 2003), (2E)-2-[(4R,5S,6S)-4,5,6-trihidroxiciclohex-2-en-1-ylidene]acetonitrila (BH-15) (ZHANG et. al., 2004) e (-)-litospermosídeo (BH-21) (WU et al., 1979) (Figura 22).

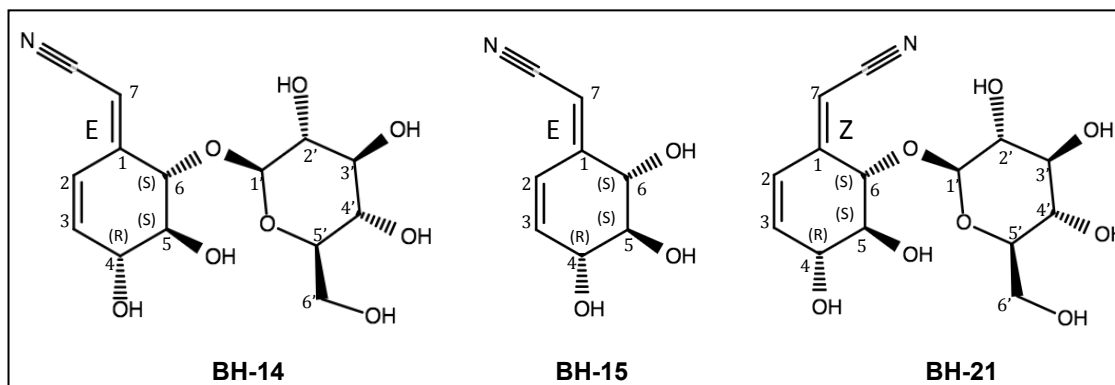


Figura 22. Proposta da configuração total dos compostos isolados do EEtOH70% das folhas de *Bauhinia holophylla*.

O composto litospermosídeo foi isolado das raízes de *Lithospermum purpureo*, *Lithospermum officinalis*, *Thalictrum rugosum*, *Thalictrum revolutum* e *Griffonia simplicifolia*. Este composto foi isolado também das cascas de *Cercis siliquastrum*.

Outros cianoglicosídeos não-cianogênicos similares aos identificados nesse estudo foram isolados de outras espécies consideradas medicinais, como por exemplo: simmondsina, bauhinina, purshianina e dasycarponina. Contudo, este é o primeiro estudo que demonstra claramente a atividade hipoglicemiante de cianoglicosídeos não-cianogênicos por meio de testes de tolerância à glicose em camundongos diabéticos.

Para se aprofundar o conhecimento acerca das propriedades hipoglicemiantes desta classe de substância, o composto litospermosídeo foi testado isoladamente e sua atividade hipoglicemiante avaliada por meio do teste de tolerância à glicose, como descrito a seguir.

2.3.7. Teste de tolerância à glicose e avaliação da glicemia de jejum

Do processo de fracionamento por MPLC-UV do EEtOH70%, somente a fração **BH-21** foi obtida com rendimento suficiente para a realização dos testes *in vivo*, para se relacionar a atividade biológica do extrato a um composto em particular. Portanto, somente a fração **BH-21** foi submetida aos teste de tolerância à glicose.

Durante o tratamento, a glicemia foi mensurada nos dias 0, 7, 14, 21 e 28 dias nos animais normoglicêmicos e diabéticos tratados. Nossos resultados mostram que os grupos diabéticos apresentaram glicemia de jejum maior que o grupo CTLSAL. No

entanto o grupo tratado com litospermosídeo (**BH-21**) ($358,5 \pm 32,5$) apresentou redução da glicemia de jejum logo após 7 dias do início do tratamento quando comparado aos grupos ($454,9 \pm 25,8$) e STZMET ($465,8 \pm 12,1$) e ao final do tratamento, essa redução chegou a 50 % quando comparado ao grupo STZSAL ($544,9 \pm 28,3$) (Figura 23).

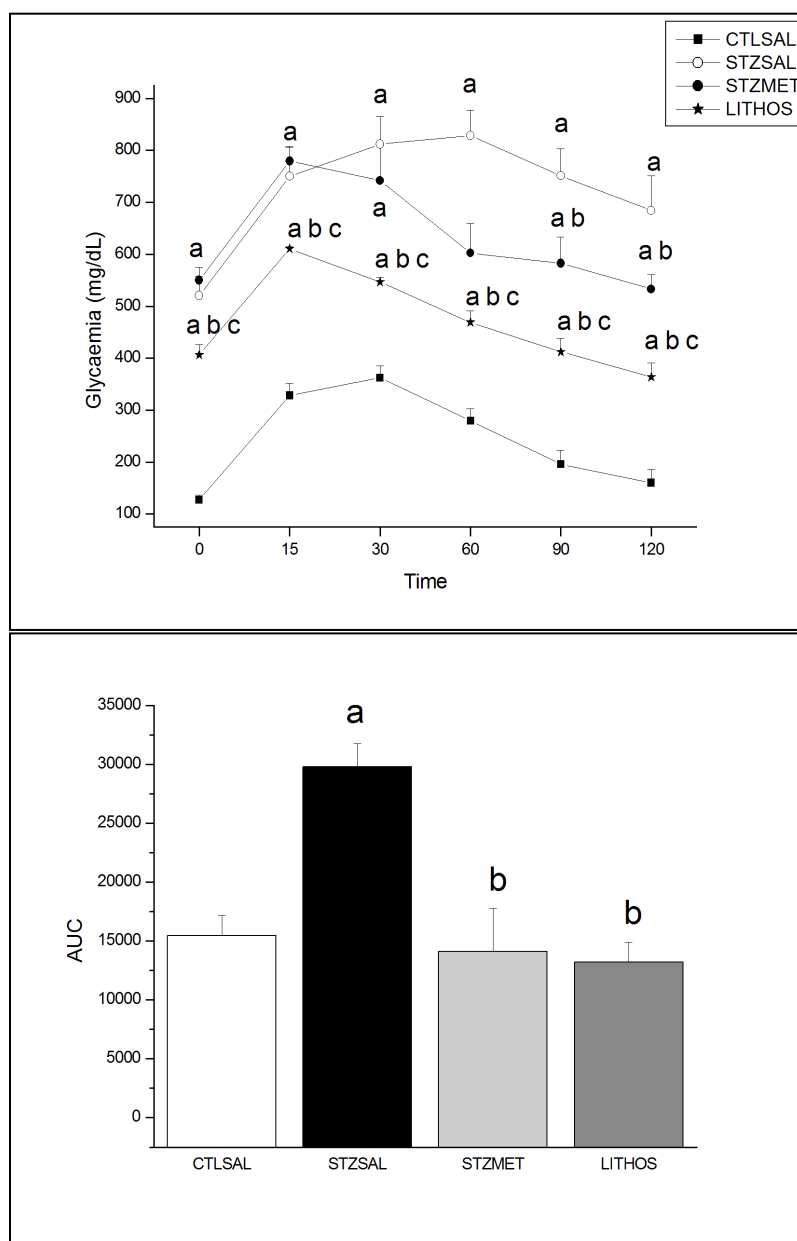


Figura 23. Glicemia durante o ipGTT (2A) e AUC (2B) dos animais controles normoglicêmicos e diabéticos tratados com salina, Metformina® (300 mg/kg) e composto litospermosídeo (BH-21) (10 mg/kg). a vs. CTLSAL, b vs. STZSAL, c vs. STZMET. Valores expressos em média $\pm$ EPM, $n = 10$, $p < 0,05$. ANOVA seguido de teste Tukey.

Ao final dos 28 dias de tratamento foi realizado o teste de tolerância à glicose em animais normoglicêmicos e diabéticos. Nossos resultados mostram que os animais tratados com o composto Litospermosídeo (**BH-21**) também apresentaram melhora da tolerância à glicose, quando comparados ao grupo STZSAL (13188.8 ± 1674 e 29805 ± 1964 respectivamente), ($p < 0,001$), sendo que não houve diferença estatística significativa com o grupo STZMET (14118.7 ± 3660) ($p > 0,05$). Apesar de não haver diferença estatística entre os grupos STZMET e Litospermosídeo, este último foi avaliado em concentração 30 vezes mais baixa em relação ao primeiro.

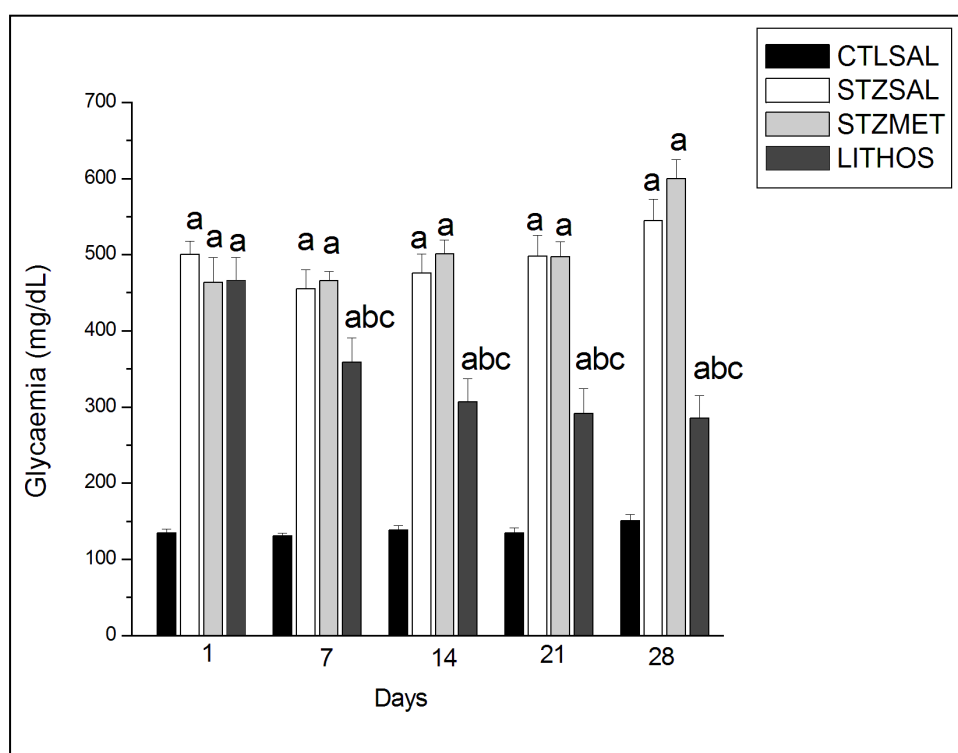


Figura 24. Glicemia de jejum dos animais normoglicêmicos e diabéticos tratados com salina, Metformina® ou litospermosídeo (BH-21) durante 28 dias. a vs. CTLSAL, b vs. STZSAL, c vs. STZMET. Valores expressos em média $\pm$ EPM, $n = 10$, $p < 0,05$. ANOVA seguido de teste Tukey.

Esse é um dado importante, visto que a Metformina® é um fármaco amplamente utilizado para melhora do quadro de resistência à insulina e diabetes. A Metformina®, uma droga sintética, é muito similar ao composto galegina, isolado de *Galega officinalis*, uma espécie pertencente à Fabaceae, mesma família a qual pertencem espécies do gênero *Bauhinia*, considerada a primeira planta com atividade antidiabética claramente elucidada (PERLA & JAYANTY, 2013). A dose de

Metformina® utilizada para o tratamento foi maior que a administrada aos camundongos do grupo litospermosídeo (**BH-21**), por ser uma concentração padronizada para este modelo de diabetes em camundongos. Além disso, o tratamento com litospermosídeo (**BH-21**) mostrou ser eficiente para a prevenção da perda de peso dos animais, visto que o grupo diabético tratado com salina apresentou acentuada perda de peso durante todo o tratamento, sendo que aos 28 dias apresentou redução estatística significativa em comparação aos grupos STZMET e litospermosídeo (**BH-21**).

Este é o primeiro trabalho que demonstra a atividade hipoglicemiante desta classe de compostos pouco explorada do ponto de vista biológico, e em especial, do composto Litospermosídeo, considerando a literatura disponível. Esse composto foi brevemente relatado e identificado em *Bauhinia fassoglensis* Kotschy ex Schweinf., uma trepadeira com uso tradicional no tratamento de diarreia e febre, em tribos na Tanzânia (FORT & NELSON, 2001). Esse composto foi identificado também nas raízes de espécies de *Lithospermum* L. (Boraginaceae), *Griffonia simplicifolia* Baill. (Fabaceae) e *Thalictrum* L. (Ranunculaceae) (JOSIEN-LEFEBVRE & LE DRIAN, 2003).

A maior parte dos cianoglicosídeos na natureza é cianogênica, pois através de reações enzimáticas de hidrólise, são capazes de gerar HCN (**Figura 25**) (YAMASAKI, 1999).

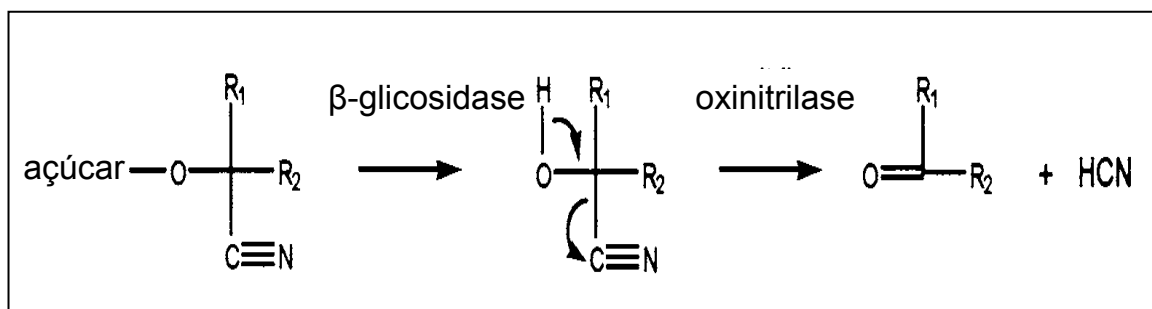


Figura 25. Esquema mostrando a liberação de cetona e cianureto de hidrogênio pela hidrólise de glicosídeos cianogênicos por β -glicosidase.

Este processo, chamado de cianogênese, está amplamente presente nas angiospermas. Atualmente se conhece 5 vias biossintéticas diferentes para estes compostos. Os cianoglicosídeos sintetizados a partir da tirosina estão presentes em famílias das ordens Magnoliales e Laurales. Os cianoglicosídeos presentes em Fabaceae e Sapindaceae são similares aos derivados da leucina. Os cianoglicosídeos

não cianogênicos, como litospermosídeo, formam um pequeno grupo, pois não apresentam o grupo nitrila adjacente ao açúcar, o que os torna não cianogênicos. Outros compostos não-cianogênicos com estruturas similares à do litospermosídeo foram isolados de plantas medicinais. Portanto, por se tratar de um glicosídeo não-cianogênico, o litospermosídeo possui um grande potencial para uso terapêutico como demonstrado nesse trabalho.

Conclusão

2.4. Conclusão

Através do estudo de fracionamento e isolamento, empregando transposição das condições cromatográficas, da escala analítica para semipreparativa, em linha com teste intraperitoneal de tolerância à glicose (IpGTT) em camundongos diabéticos, foi possível isolar e identificar, pela primeira vez na literatura, cianoglicosídeos não-cianogênicos ativos, responsáveis pela atividade hipoglicemiante de *Bauhinia holophylla*. Apesar do efeito hipoglicemiante descrito na literatura para flavonoides isolados de outras espécies de *Bauhinia* e também nos experimentos de IpGTT neste estudo, os derivados de cianoglicosídeos não-cianogênicos se mostraram ativos também, o que comprova que são compostos hipoglicemiantes, responsáveis em parte pela atividade anti-diabética de *B. holophylla*. O litospermosídeo possui um forte efeito hipoglicemiante similar à metformina, em doses mais baixas, comprovado pelos testes de IpGTT e, portanto, possui um alto potencial para o desenvolvimento de medicamento hipoglicemiante via oral. Dado a atividade potencial do composto e dos resultados de atividade hipoglicemiante de cianoglicosídeos serem inéditos na literatura, um pedido de patente foi registrado junto ao Instituto Nacional de Propriedade Industrial, em parceria com as universidades UNESP e a Universidade de Genebra - Suíça (UNIGE), para a obtenção de frações enriquecidas com cianoglicosídeos não-cianogênicos de *Bauhinia* e seu uso no tratamento do diabetes.

Referências

2.5. Referências

ACHENBACH, H.; STOCKER, M.; CONSTELA, M.A. Flavonoid and other constituents of *Bauhinia manca*. *Phytochemistry*. v. 27, p. 1835-1841, 1988.

ANDRIKOPOULOS, S.; BLAIR, A.R.; DELUCA, N.; FAM, B.C.; PROIETTO, Evaluating the glucose tolerance test in mice. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, v. 295, p. 1323-1332, 2008.

BEROVA N, DI BARI L, PESCITELLI G. Application of electronic circular dichroism in configurational and conformational analysis of organic compounds. *Chemical Society Reviews*. v. 36(6), p.914-31, 2007.

CAMAFORTE, N.A.H. *Avaliação da atividade hipoglicemiante do extrato bruto de Bauhinia holophylla (Steud.) em camundongos diabéticos induzidos por estreptozotocina*. 2013. 80 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral Aplicada) - Instituto de Biociências, Univ. Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, 2013.

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

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

CHALLAL, S.; BUENAFE, O. E. M.; QUEIROZ, E. F.; MALJEVIC, S.; MARCOURT, L.; BOCK, M.; KLOETI, W.; DAYRIT, F. M.; HARVEY, A. L.; LERCHE. H.; ESGUERRA, C. V.; WITTE, P. A. M.; WOLFENDER, J.-L.; CRAWFORD, A. D. Zebrafish Bioassay-Guided Microfractionation Identifies Anticonvulsant Steroid Glycosides from the Philippine Medicinal Plant *Solanum torvum*. v.5, n. 10, p. 993–1004, 2014.

COIMBRA-TEIXEIRA, C.; DANNI, F. D.; BLOTTA, R.M.; MUSSNICH, D. G.; DA COSTA, P. P.; RANQUETAT, G. G. Plants employed in the treatment of diabetes

mellitus: results of an ethnopharmacological survey in Porto Alegre, Brazil. *Fitoterapia*. v. 63, p. 320–323, 1992.

DA SILVA, K. L., CECHELIN FILHO, V. Plantas do gênero Bauhinia: composição química e potencial farmacológico. *Química Nova* v. 25, p. 449–454, 2002.

DE SOUSA, E.; ZANATTA, L.; SEIFRIZ, I.; BEATRIZ, T.; CRECZYNSKI-PASA, PIZZOLATTI, M. G.; SZPOGANICZ, B.; SILVA, F. R. M. B. Hypoglycemic Effect and Antioxidant Potential of Kaempferol-3,7-*O*-(α)-dirhamnoside from *Bauhinia forficata* Leaves. *Journal of Natural Products*, v. 67, p. 829-832, 2004.

FAVRE-GODAL, Q.; DORSAZ, S.; QUEIROZ, E. F.; CONAN, C.; MARCOURT, L.; WARDOJO, B. P. E.; VOINESCO, F.; BUCHWALDER, A.; GINDRO, K.; SANGLARD, D.; WOLFENDER, J.-L. Comprehensive approach for the detection of antifungal compounds using a susceptible strain of *Candida albicans* and confirmation of *in vivo* activity with the *Galleria mellonella* model. *Phytochemistry*. v. 105, p. 68-78, 2014.

GUILLARME, D.; NGUYEN, D. T. T.; RUDAZ, S.; VEUTHEY, J. L. Method transfer for fast liquid chromatography in pharmaceutical analysis: application to short columns packed with small particle. Part I: isocratic separation. *European Journal of Pharmaceutical Biopharma*. v. 66, p. 475-482, 2007.

GUPTA M. P., ed. 270; *Plantas Medicinales Iberoamericanas*; Talleres de Editorial Presencia, Santafé de Bogotá: Colombia, 1995, p. 347.

HAN Q. et al. Constituents from the roots of *Semiaquilegia adoxoide*. *Fitoterapia*, v. 72, p. 86-88, 2001.

HSU, W. C.; BOYKO, E. J.; FUJIMOTO, W. Y. et al. Pathophysiologic differences among Asians, Native Hawaiians, and other Pacific Islanders and treatment implications. *Diabetes Care*. v. 35, p.1189–1198, 2012.

JULIANI, C. Ação hipoglicemiante da unha-de-vaca. *Rev Med Pharm Chim Phys* v. 2, p. 165–169, 1929.

JOSIEN-LEFEBVRE, D.; LE DRIAN, C. Total Synthesis of (2Z)-[(4R,5R,6S)-6-(b-D-Glucopyranosyloxy)-4,5-dihydroxycyclohex-2-en-1-ylidene]ethanenitrile, a Cyanoglucoside from *Ilex warburgii*. *Helvetica Chimica Acta*, v.90, p. 19-30, 2007.

KURITA, K. L.; GLASSEY, E.; LININGTON, R. G. Integration of high-content screening and untargeted metabolomics for comprehensive functional annotation of natural product libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A*. v. 29, n. 112 (39), p.1999-2004, 2015.

LI, J. W.-H.; VEDERAS, J. C. Drug Discovery and Natural Products: End of an Era or an Endless Frontier? *Science*, v. 325, p. 161-165, 2009.

MALI, R. G.; MAHAJAN, S. G.; MEHTA, A. A.; RAKTA, K. (*Bauhinia variegata*): chemistry, traditional and medicinal uses – a review. *Pharmacognosy Review*, v. 1, p. 314–319, 2007.

MERKEN, H. M.; BEECHER, G. R. Measurement of food flavonoids by high performance liquid chromatography: a review. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v. 28, n. 3, p. 577-599, 2000.

MOHAMED, A; FARAG SARAH T. SAKNA, NABAWEYA M. EL-FIKY, MARAWAN M. SHABANA, LUDGER A. WESSJOHANN. 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.

NETO, M. M.; NETO, M. A.; BRAZ FILHO, R.; LIMA, M. A. S.; SILVEIRA, E.R. Flavonoids and alkaloids from leaves of *Bauhinia unguolata* L. *Biochemistry and Systematic Ecology*, v. 36, p. 227–229, 2008.

PEPATO, M.T.; KELLER, E.H., BAVIERA, A.M.; KETTELHUT, I.C.; VENDRAMINI, R.C.; BRUNETTI, I. L. Anti-diabetic activity of *Bauhinia forficata* decoction in streptozotocin-diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology* v. 81, p. 191–197, 2002.

PERLA, V.; JAYANTY, S. S. Biguanide related compounds in traditional antidiabetic functional foods. *Food Chemistry*. v. 138, p. 1574-1580, 2013.

PIZZOLATTI, M.G.; CUNHA, J. R. A.; SZPOGANICZ, B.; DE SOUZA, E.; BRAZ-FILHO, R.; SCHRIPSEMA, J. Flavonoids glicosilados das folhas e flores de *Bauhinia forficata* (Leguminosae). *Química Nova*. v. 26, p. 466–469, 2003.

QUEIROZ, M. M. F.; QUEIROZ, E. F.; ZERAIK, M.L.; EBRAHIMI, S.N.; MARCOURT, L.; CUENDET, M.; CASTRO-GAMBOA, I.; HAMBURGER, M.; DA SILVA BOLZANI, V.; WOLFENDER, J-L. Chemical Composition of the Bark of *Tetrapteryx mucronata* and Identification of Acetylcholinesterase Inhibitory Constituents. *Journal of Natural Products*. v. 77, n. 3, p. 650–656, 2014.

QUEIROZ, M. M. F.; QUEIROZ, E. F.; ZERAIK, M.L.; MARTI, G.; FAVRE-GODAL, Q.; SIMÕES-PIRES, C.; MARCOURT, L.; CARRUPT, P. A.; CUENDET, M.; PAULO, M. Q.; BOLZANI, V. S.; WOLFENDER, J.L. Antifungals and acetylcholinesterase inhibitors from the stem bark of *Croton heliotropiifolius* *Phytochemical Letters* v. 10, p. 88-93, 2014.

RAMOS, R.R.; ALARCON-AGUILAR, F.; LARA-LEMUS, A.; FLORES-SAENZ, J. L. Hypoglycemic effect of plants used in Mexico as antidiabetics *Archives of Medical Research* v. 23, p. 59, 1992.

RUSSO, E.M.; REICHELT, A. A.; DE-SÁ, J. R. 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.

United States Patent Application Publication *Bauhinia* extracts Pub. No.: US 2004/0170714 A Buchholz et al. Pub. Date: Sep. 2, 2004

VAZ, A. M. S. F. 2001. *Taxonomia de Bauhinia sect. Pauletia (Leguminosae: Caesalpinioideae: Cercideae) no Brasil*. Tese, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.

WOLFENDER, J.-L.; MARTI, G.; THOMAS, A.; BERTRAND, S. Current approaches and challenges for the metabolite profiling of complex natural extracts. *Journal of Chromatography A*, v. 1382, p. 136-164, 2015.

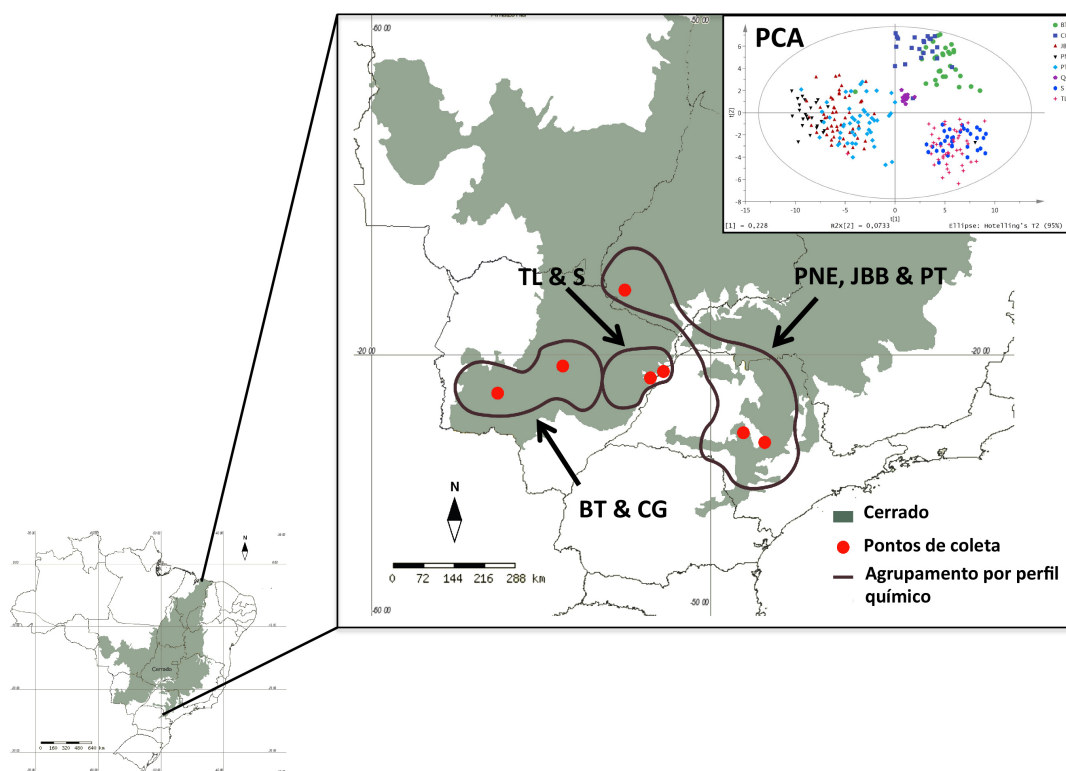
WU, J. E. H. Lithospermoside and dasycarponin, cyanoglucosides from *Thalictrum*. *Journal of Natural Products*, v. 42, n. 3, p. 500-511, 1979.

YAMASAKI, K. Non-cyanogenic cyanoglucosides Advances in Plant Glycosides, *Chemical Biology*. v.6, p. 335-345, 1999.

ZHANG, H.; LIAO, Z. X.; YUE, J. M. Cyano- and Nitro-containing Compounds from the Roots of *Semiaquilegia adoxoides* *Chinese Journal of Chemistry*, 22, 1200-1203, 200

Capítulo 2

"Influências geográfica e das condições de solo no perfil químico de *Myrcia bella* Cambess. (Myrtaceae) baseado em estudos de metabolômica por UPLC-TOF-HRMS"



Introdução

3.1. Introdução

Uma importante fonte de compostos naturais de interesse da medicina tradicional brasileira no tratamento do DM e alvo de vários estudos são as espécies da família Myrtaceae. O gênero *Myrcia*, pertence à subtribo Myrciinae, é um dos maiores gêneros americanos de Myrtaceae, com mais de 300 espécies distribuídas do México até o sul do Brasil (MARCHIORI, 1997). Tribos indígenas e comunidades tradicionais do Brasil têm usado espécies do gênero *Myrcia* para o tratamento de *D. mellitus*, entre outras doenças (PEPATO et al., 1993; RUSSO et al., 1990). *Myrcia multiflora* (Lam.) DC. é uma das espécies amplamente utilizadas na medicina tradicional e comercializada em farmácias na América do Sul para o tratamento de *D. mellitus* (RUSSO et al., 1990; PEPATO et al., 1993; FERREIRA et al., 2006). Estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa mostraram que o extrato bruto de *M. bella* (**Figura 1**) apresenta atividade hipoglicemiante em camundongos diabéticos induzidos por estreptozotocina, uma vez que apresentaram diminuição significativa da glicemia de jejum já a partir do sétimo dia de tratamento. O tratamento com o extrato também levou à diminuição dos níveis séricos de colesterol total e triglicérides em animais normoglicêmicos (VAREDA et al., 2014).

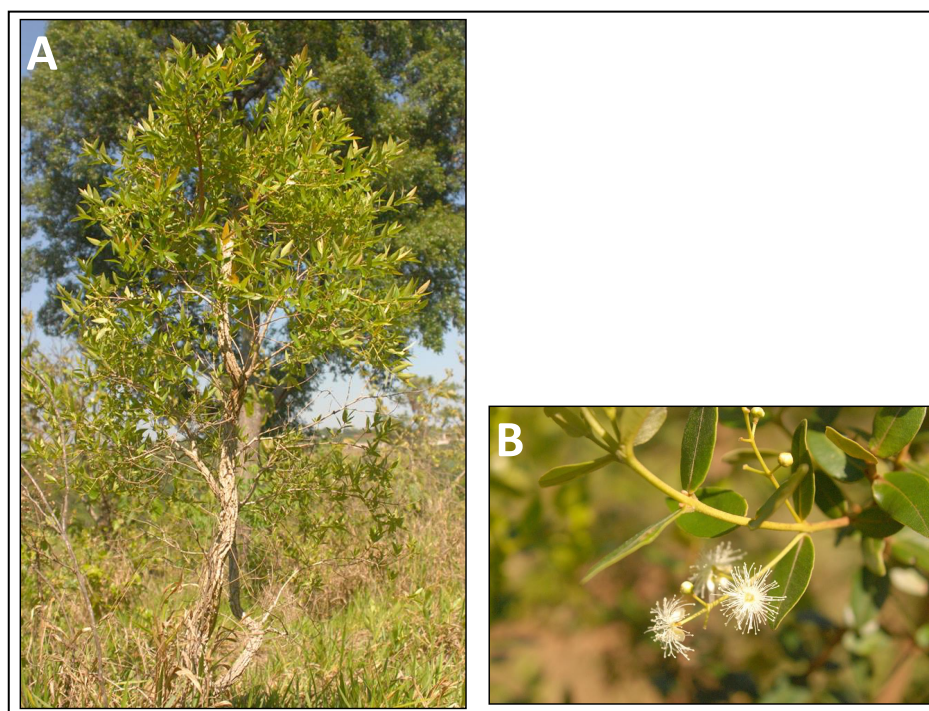


Figura 1. A) Espécime de *Myrcia bella* Cambess. B) Detalhe da flor com estames numerosos, típico de Myrtaceae. Fotos: LLS.

Ferreira et al., (2011) demonstraram que compostos isolados de *Myrcia multiflora* DC. possuem algumas propriedades farmacológicas, como atividade hipolipidêmica e antiobesidade. Pepato et al. (1993) mostraram que ratos diabéticos tratados com extrato aquoso de *Myrcia uniflora* Barb. Rodr. apresentaram melhora nos parâmetros metabólicos relacionados à homeostase glicêmica. Em um estudo mais aprofundado, realizado com uma classe de flavonoides isolados de *Myrcia uniflora*, myrciacitrinas, Matsuda et al. (2002) demonstraram diminuição na atividade da enzima aldose redutase. Estudos desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa, mostraram que o extrato EtOH 70 % das folhas de *M. bella* apresenta heterosídeos de flavonoides derivados de quercetina, miricetina, kaempferol e ácidos fenólicos (**Figura 2**) (SALDANHA et al., 2013).

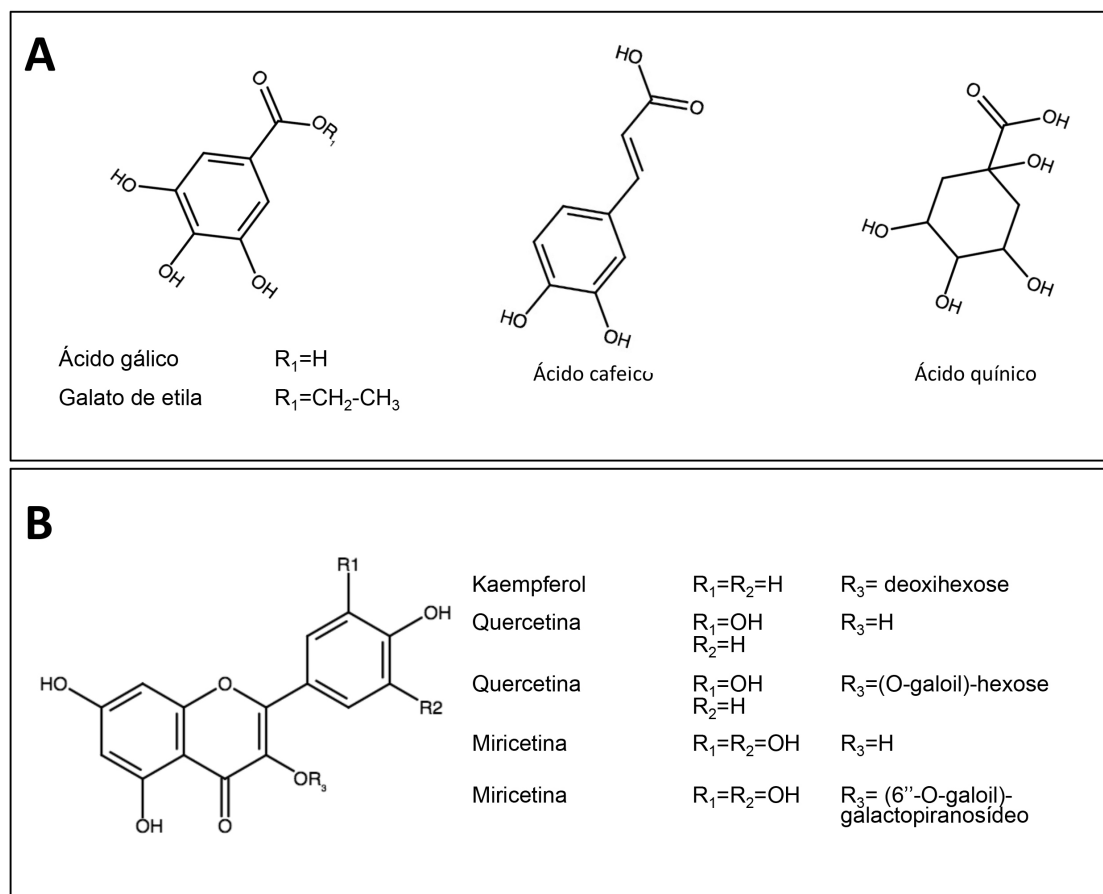


Figura 2. Principais metabólitos identificados nas folhas de *Myrcia bella*: **A)** Ácidos fenólicos e ácido quínico, **B)** Heterosídeos de flavonois acilados.

No Brasil, as espécies de *Myrcia* ocorrem naturalmente nos biomas do Cerrado, também conhecido como a savana brasileira. O Cerrado pode ser considerado

como um complexo de biomas distribuídos em mosaico (BATALHA, 2011), que se estende da margem da Floresta Tropical Pluvial do Domínio Amazônico e Ombrófila Densa do domínio da mata atlântica até as áreas dos Estados de São Paulo e Paraná, na região Sudeste e Sul do Brasil. Situa-se entre 5 e 20° de latitude Sul e de 45 a 60° de longitude Oeste (SILVA et al., 2008) e apresenta variação de altitude de 300 a 1100 m (COUTINHO, 2002). Originalmente, a savana ocupava aproximadamente 23 % do território brasileiro (RATTER et al., 1997).

A área geográfica que a savana brasileira abrange (Figura 2) estende-se por regiões caracterizadas por diferentes condições ambientais, o que resulta em padrões florísticos regionais distintos (DURIGAN et al, 2003). Estudos das fisionomias do Cerrado mostraram que a vegetação das áreas de Cerrado no oeste de São Paulo, predominantemente cerradão e ecótono cerrado/floresta, distinguiu-se claramente da flora do cerrado *sensu lato* presente em áreas vizinhas, situadas em estados como Minas Gerais, Goiás e Mato Grosso do Sul (DURIGAN et al, 2003; RATTER et al., 2003).

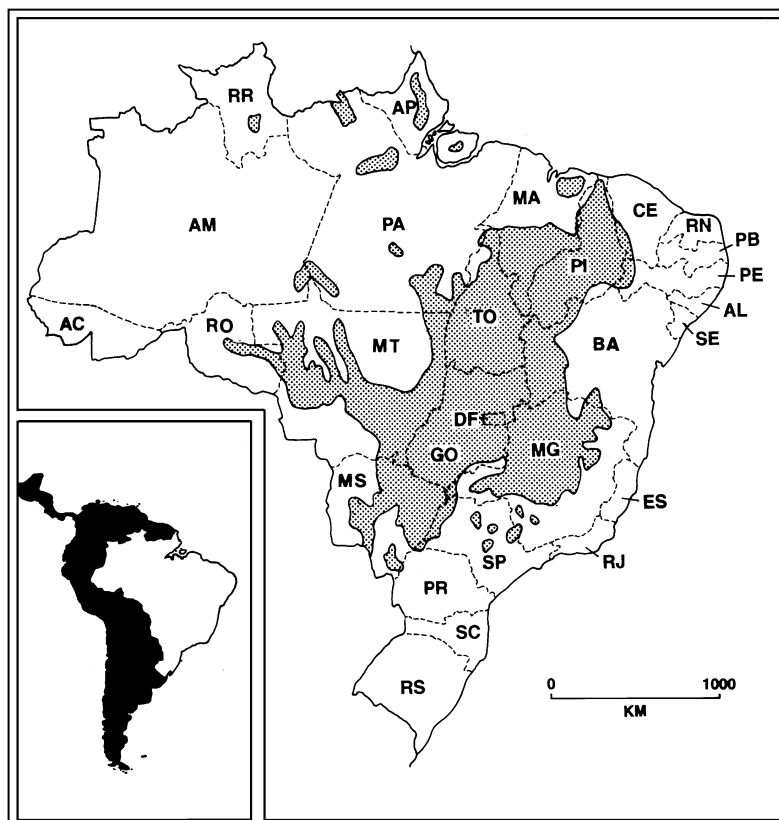


Figura 2. Distribuição dos biomas de Cerrado em diferentes regiões do Brasil (destacado em cinza). Retirado de Ratter et al., 1997.

Os critérios que guiam a diversidade das fisionomias na superfície terrestre são complexos e relacionam-se principalmente com os climas e, dentre os seus elementos, mais diretamente com a temperatura e a precipitação, seja a quantidade de chuva, seja a sua distribuição ao longo do ano (WALTER, 1986).

No caso do Cerrado, em princípio, a diversidade da vegetação deveria, predominantemente, estar relacionada à frequência do fogo (COUTINHO, 1982) e às mudanças dinâmicas ocorridas nos períodos Terciário e Quaternário, na gênese do solo pela rocha matriz. Porém, atualmente, o fator antrópico deve ser incluído na tentativa de se identificar os critérios que guiam a diversidade do Cerrado.

O Cerrado apresenta dois tipos de clima predominantes, segundo Koeppen, Aw (megatérmico ou tropical úmido, com inverno seco e chuvas máximas no verão) e Cwa (mesotérmico ou temperado quente, com inverno seco e temperatura média do mês mais quente maior que 22°C) (SILVA et al., 2008). O período da estação seca, historicamente, se inicia nos meses de abril e maio e se estende até setembro e outubro; a estação chuvosa se inicia nos meses de setembro e outubro e se estende até março e abril, com uma variação dos níveis de precipitação média anual de 400 a 2200 mm (SILVA et al., 2008). Em algumas regiões de Cerrado, estudos sugerem que existe relação entre a fertilidade do solo e a diversidade de fisionomias do Cerrado. Os solos das regiões de Cerrado no Brasil são Latossolos, Neossolos Quartzarênicos e Agrisolos (REATTO et al., 2008) e, de maneira geral, são profundos, permeáveis, bem drenados, ácidos, com baixa capacidade de troca catiônica, baixa soma de bases e alta concentração de alumínio (COUTINHO, 2002). As fisionomias mais abertas estão associadas a solos mais pobres em nutrientes e com maior teor de alumínio (MORENO et al., 2008). Outros estudos não corroboram esses resultados e sugerem que há relação com o componente granulométrico do solo, sendo o teor de argila mais elevado nas áreas de cerradão (MARIMON-JUNIOR & HARIDASAN, 2005).

Os fatores antropogênicos, como a fragmentação das áreas de Cerrado, influenciam não somente a diversidade de suas fisionomias, mas também a diversidade genética e química das populações de plantas (EGYDIO-BRANDÃO et al., 2016). Devido à expansão de monoculturas de milho, soja e cana-de-açúcar nos estados de Goiás e São Paulo, e da agropecuária no Mato Grosso do Sul, o Cerrado passa por um processo de fragmentação, mesclando-se com áreas de cultivo de cana-de-açúcar ou soja. Como os solos dessas regiões apresentam baixa fertilidade e pH ácido, se faz

necessária a adição de calcário para o cultivo da soja e cana-de-açúcar, assim alterando as condições de disponibilidade de nutrientes do solo. Essa condição, consequência da ação do homem, modifica a paisagem e os fatores ecológicos que guiam a diversidade dos padrões de vegetação desses fragmentos, atribuindo maior importância a áreas de entorno dos fragmentos. Dessa situação, espera-se mudanças não somente na paisagem, mas também nas respostas das plantas a variações no ambiente natural.

As pressões abióticas, como mudanças na disponibilidade de nutrientes, irradiação e temperatura representam desafios para as plantas em termos de capacidade de crescimento e competição com plantas vizinhas, e podem ter grandes variações em escalas espaciais (WALTERS, 2004).

A plasticidade fenotípica permite às plantas se adequarem ao dinamismo ambiental, a curto e a longo prazo, e é regulada por genes que determinam não somente as características, mas também a capacidade de resposta da planta frente a estímulos ambientais (BRADSHAW, 2006). Essa resposta é avaliada na habilidade da planta de mudar seus traços morfológicos e funcionais, assim como as vias metabólicas.

As mudanças ecofisiológicas, ou seja, respostas químicas, representam uma interface entre as plantas e o ambiente circundante. Variações temporais e espaciais no conteúdo total, bem como as proporções relativas de metabólitos secundários em plantas ocorrem em diferentes níveis (sazonais e diárias; intraplanta, inter- e intraespecífica) e, apesar da existência de um controle genético, a expressão pode sofrer modificações resultantes da interação de processos ecológicos e evolutivos (FORBEY et al., 2013).

Estudos de extratos vegetais com abordagens holísticas que avaliem padrões de perfil químico em diferentes áreas e que relacionem modificações genéticas e filtros ambientais, contribuem para o entendimento e sistematização do uso de plantas medicinais (GLAUSER, et al. 2013; WOLFENDER et al. 2013) e são questões que direcionam este trabalho. Os efeitos medicinais de plantas são principalmente resultantes da ação de produtos do metabolismo secundário.

Portanto, uma vez que o extrato de *Myrcia bella* possui substâncias de interesse no tratamento do diabetes e possui ampla distribuição nos biomas do Cerrado, este trabalho teve como objetivo avaliar se os seus perfis químico e genético apresentam variações em função do local (regiões fitogeográficas), condições climáticas (estação seca/chuvosa) e/ou ambientais (composição química e pH do solo).

Material e Métodos

3.2. Material e Métodos

3.2.1. Coleta do material vegetal

As coletas de amostras de *Myrcia bella* foram realizadas em biomas do cerrado com ocorrência destas espécies, com base em consultas a coleções biológicas disponíveis na base de dados: *speciesLink* (<http://splink.cria.org.br/>). As áreas de coleta foram estabelecidas nos estados: Goiás (16° 40' 00" S, 49° 15' 00" W), no município de Chapadão do Céu, no Parque Nacional das Emas; Mato Grosso do Sul, em Três Lagoas (20° 45' 4" S, 51° 40' 42" W), Campo Grande (20° 26' 34" S, 54° 38' 45" W) e Bonito (21° 07' 15" S, 56° 28' 55" W), e Selvíria (20° 22' 1" S, 51° 25' 8" W) em áreas da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul; São Paulo em Bauru (22° 18' 54" S, 49° 3' 39" W), no Jardim Botânico Municipal de Bauru e em Pratânia (22° 48' 28" S, 48° 39' 57" W). *Autorização de Coleta, Acesso e Remessa do Patrimônio Genético nº 010468/2014-5.

Nas áreas selecionadas, sorteamos três pontos (coordenadas) com o auxílio de um sistema de *Global Position System* (GPS) dentro da área total; coletamos os espécimes de cada espécie que se encontravam mais próximos a cada ponto sorteado. Coletamos ainda os dados de altitude, longitude e latitude utilizando um sistema de GPS em cada área sorteada. Coletamos no total aproximadamente 25-55 espécimes de cada espécie por localidade. Coletas na estação seca e chuvosa foram realizadas em duplicata em cada área. Todos os indivíduos foram coletados no estágio vegetativo e devidamente etiquetados. Utilizamos ramos férteis para identificação e herborização das espécies. Exsicatas (*vouchers* químicos) de espécimes representantes de cada localidade de coleta foram incluídas no Herbário da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" no campus de Bauru - UNBA - sob número de registro: Parque Nacional das Emas - GO UNBA 6028, Pratânia - SP, UNBA 6029, Três Lagoas - MS UNBA 6030; Bonito - MS UNBA 6031; Selvíria - MS UNBA 6032; Campo Grande - MS UNBA 6033; Jardim Botânico Municipal de Bauru - SP, UNBA 5508. Um espécime foi doado ao Herbário da Universidade Federal de São João Del Rei - HUFSJ para determinação da espécie por um especialista em taxonomia de *Myrcia* e está depositado sob número de registro HUFSJ 4731.

Coletamos de 10 a 20 amostras simples de solo, com profundidade de coleta de 10 a 20 cm para a elaboração de amostras compostas nas áreas de coleta. Aliquotas de

500g de amostra composta foram avaliadas para determinação química (CaCl₂, Al, Ca, K, Mg) e de pH. As análises foram realizadas no Departamento de Recursos Naturais, Área de Ciências do Solo da Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP no câmpus de Botucatu.

Coletamos ~ 300 g de folhas frescas para o estudo químico de cada espécie e as secamos em estufa a 45 °C por 72 h. Em seguida trituramos as folhas secas em moinho de facas (Marconi, SP, Brasil).

Coletamos ~ 1 g de folhas para a extração de DNA. As folhas foram armazenadas separadamente em sacos plásticos hermeticamente vedados e contendo sílica gel na proporção de 1:20 g e armazenadas em *freezer* -80 °C até a extração.

3.2.2. Extração de DNA

As análises de perfil genético foram realizadas em estágio no Laboratório de Fitoquímica do Departamento de Botânica da Universidade de São Paulo sob a supervisão da Profa. Dra. Claudia Maria Furlan. A extração foi feita através da trituração de 30-50 mg de pequenos pedaços de tecido foliar secos em nitrogênio líquido em tampão de extração (Tris-HCl 100 mM pH 8,0; CTAB 2 %, NaCl 1,4 M; PVP 1 %; EDTA 20 mM; 2-mercaptoetanol 0,2 %) (modificado de Ferreira & Grattapaglia 1996). Todos os procedimentos envolvendo reações de restrição, ligação e amplificação seguiram as instruções do protocolo da Applied Biosystems “AFLP *Plant Mapping*”, disponível no endereço eletrônico www.appliedbiosystems.com. As reações de restrição e ligação utilizaram a ação das enzimas MseI, EcoRI e T4 DNA-ligase. Para a primeira reação de amplificação adicionou-se solução contendo os iniciadores específicos para as extremidades coesivas resultantes da digestão por EcoRI e MseI, avaliando-se o resultado por eletroforese em gel de agarose 1,5% em presença de brometo de etídeo e marcadores moleculares “1 Kb DNA Ladder” (Invitrogen Life Technologies). Para a segunda reação de amplificação foram utilizadas 15 das possíveis combinações do kit de iniciadores para as reações de amplificação seletiva em PCR “Regular plant genome” (50-6000 pb) - Applied Biosystems - para as enzimas EcoRI (E) e MseI (M). Nos iniciadores para amplificação pré-seletiva, E e M correspondem a C e G, respectivamente. Nos iniciadores para amplificação seletiva, M corresponde a CAA, CAC, CAG, CAT,

CTA, CTC, CTG ou CTT, enquanto E corresponde a ACT, ACA, AAC, ACC, AGC, AAG, AGG OU ACG. Os fragmentos amplificados foram finalmente analisados em sequenciador para se determinar o tamanho do fragmento gerado com as combinações de nucleotídeos utilizados. Foram utilizadas 4 combinações para cada amostra com os seguintes nucleotídeos: ACG/CTG, ACC/CTT, ACA/CAA e ACC/CAT. Os produtos da segunda amplificação seletiva foram analisados em sequenciador automático ABI Prism 310 (Applied Biosystems) em presença de padrões “GenScan-500 Rox” (Applied Biosystems).

3.2.3. Extração e preparo das amostras

Para o estudo de metabolômica, foi separada uma alíquota de 100 mg de folhas trituradas em moinho de esferas (esfera de 2 cm; frequência 30 Hz; 4 min; 5 mL de MeOH–H₂O 85:15 % v/v) (Retsch MM200, Schieritz & Hauenstein AG, Arlesheim, Suíça). Os extratos foram pré tratados para a remoção de compostos hidrofóbicos utilizando-se cartuchos de extração em fase sólida (Finisterre C18, 100 mg/1 mL). Após condicionamento (1 mL MeOH, 1 mL MeOH–H₂O (85:15 % v/v), o extrato (5 mg) foi dissolvido em 1 mL de MeOH–H₂O (85:15 % v/v), aplicado e eluído no cartucho. O eluente (50 µL) foi diluído em 250 µL de MeOH–H₂O (85:15 % v/v) grau HPLC.

As amostras foram secas por liofilização rápida em um sistema de evaporação a baixa pressão (Genevac HT-4SII & HT4X Series II).

3.2.4. Análises por UHPLC-TOF-HRMS

As análises por UPLC-ToF-HRMS foram realizadas durante um estágio no exterior no Lab. de Fitoquímica e Produtos Naturais Bioativos, sob orientação do Prof. Dr. Jean-Luc Wolfender na Universidade de Genebra, Suíça,

O perfil químico dos extratos foi obtido em espectrômetro de massa (Waters, Mass., USA) (Micromass LCT Premier) de tempo de voo (TOF), com interface de ionização por *electro spray* (ESI) acoplado a um sistema UPLC (Waters, Mass., USA). As condições da interface electrospray (ESI) foram definidas da seguinte forma: voltagem capilar de 2,8 kV, cone de tensão a 40 V, temperatura da fonte 120 °C,

temperatura de dessolvatação 250 °C, fluxo de gás de dessolvatação 600 L/h. A vazão do solvente utilizado foi de 600 µL/min e volume de injeção de 1 µL. A detecção foi realizada em modo negativo (m/z 100-1000) com *scan* a cada 0,25 s no modo centroide.

Uma solução de Leucina (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) foi injetada a 5 µg/mL por meio de uma *probe Lock Spray*TM numa vazão de 20 µL/min por uma segunda bomba (Shimadzu LC-10ADvp, Duisburg, Alemanha).

Os espectros e cromatogramas obtidos foram manipulados, usando-se o software MassLynx v. 4.1 (Waters, Mass., USA).

3.2.5. Processamento dos dados e análises multivariadas

Os dados obtidos das análises dos extratos por UHPLC-TOF-HRMS foram previamente tratados e processados para as análises estatísticas multivariadas. Os dados de massas obtidos no modo negativo foram convertidos para o formato .cdf através do software Bridge - MassLynx. Os dados convertidos foram processados no software MZmine 2.10 para detecção dos picos, filtração destes, deconvolução do cromatograma, alinhamento de cromatogramas e preenchimento de lacunas.

Os dados processados foram então exportados como tabelas categorizadas de acordo com a área do pico, massa exata e tempo de retenção para cada amostra de extrato para, então, serem submetidos a análises multivariadas.

Os dados ambientais obtidos das análises de nutrientes do solo e do clima foram processados de acordo com o tipo do conjunto de dados. Os dados de precipitação foram expressos como a média mensal de precipitação acumulada em mm para cada região de coleta durante os 24 meses de estudo. Os dados do solo para K, Ca e Mg foram expressos em mmolc/dm³ e para P, Fe, Cu, Zn, Mn, B e S em mg/dm³. Os níveis de matéria orgânica foram expressos em g/dm³.

Para o estudo dos padrões de perfil químico e da variação dos compostos nas diferentes regiões e estações de coleta, os resultados obtidos foram analisados no software SIMCA-P 14.1 (Umetrics®). Os resultados obtidos foram separados em três conjuntos de variáveis: químico (resultado da análise dos extratos por UHPLC-TOF-HRMS), ambientais (clima e solo) e genéticas (AFLP). Estas variáveis foram utilizadas para se realizar as análises multivariadas não supervisionadas como análise

dos componentes principais (PCA) e análise hierárquica de agrupamento (HCA) além das supervisionadas como análise ortogonal dos quadrados parciais discriminantes (OPLS-DA).

Resultados e Discussão

3.3. Resultados e Discussão

3.3.1. Coletas regionais e estacionais

As coletas de amostras de folhas de *Myrcia bella* foram realizadas em diferentes regiões fitogeográficas do Brasil nos biomas do Cerrado localizados nos estados de Goiás, Mato Grosso do Sul e São Paulo (Figura 3).

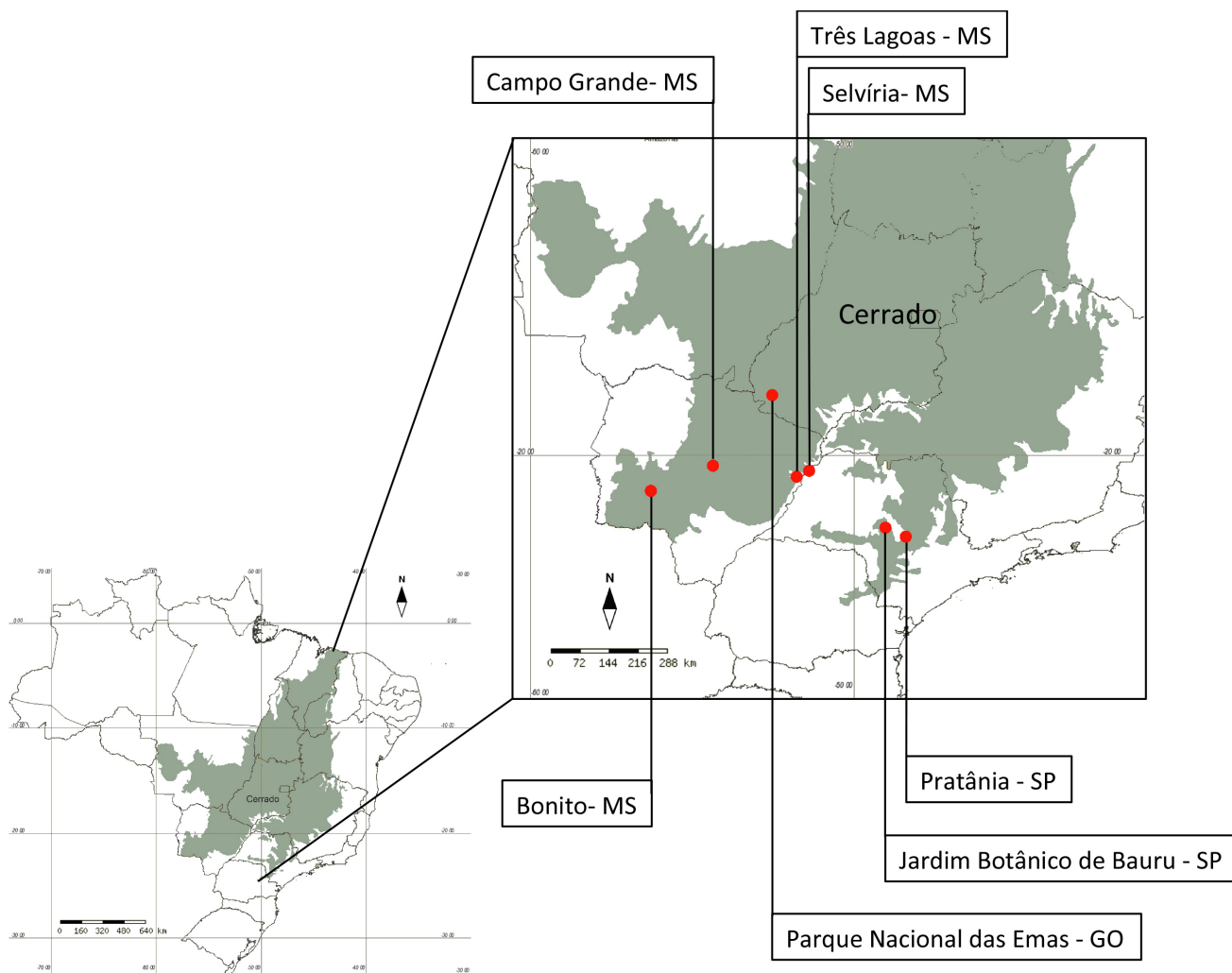


Figura 3. Mapa com indicação dos locais de coleta de *Myrcia bella* em diferentes regiões do Cerrado.

Com exceção do Parque Nacional das Emas/GO, as coletas sazonais foram realizadas em duplicata ($n = 2$) após um período de seca e após um período chuvoso em cada localidade. A **Tabela 1** apresenta os locais e as datas em que foram realizadas as coletas.

Tabela 1. Coletas estacionais de amostras de folhas de *Myrcia bella* em diferentes regiões do Brasil.

Local (Cidade/estado)	Código	Coordenadas	Nº de espécimes	Data (mês/ano)	
				Estação seca	Estação chuvosa
Bonito/MS	BT	S 21° 07' 15", W 56° 28' 55"	34	06/13 – 07/14	03/13 – 04/15
Campo Grande/MS	CG	S 20° 30' 29.3", W 54° 36' 59.3"	25	06/13 – 07/14	03/13 – 04/15
Jardim Botânico Municipal de Bauru/SP	JBB	S 22° 20' 30", W 49° 00' 30"	55	08/13 – 07/14	04/13 – 04/15
Parque Nacional das Emas /GO	PNE	S 18° 07' 17", W 52° 54' 30"	41	06/14	03/15
Pratânia /SP	PT	S 22° 48' 28", W 48° 39' 57"	55	09/13 – 07/14	04/13 - 03/15
Selvíria/MS	S	S 20° 64.4' 73.6", W 51° 76.4' 92.4"	34	06/13 – 07/14	03/13 – 04/15
Três Lagoas/MS	TL	S 20° 46' 39.5", W 51° 40' 25.5"	48	06/13 – 07/14	03/13 – 04/15
Total: 308					

As coletas estacionais obedeceram os climatogramas (Figura 4) de cada região de coleta para se obter amostras íntegras dos períodos de seca e chuva. A análise dos climatogramas mostra que a estação seca ocorreu entre os meses de junho e setembro em 2013 e 2014, apresentando grandes variações nas diferentes localidades.

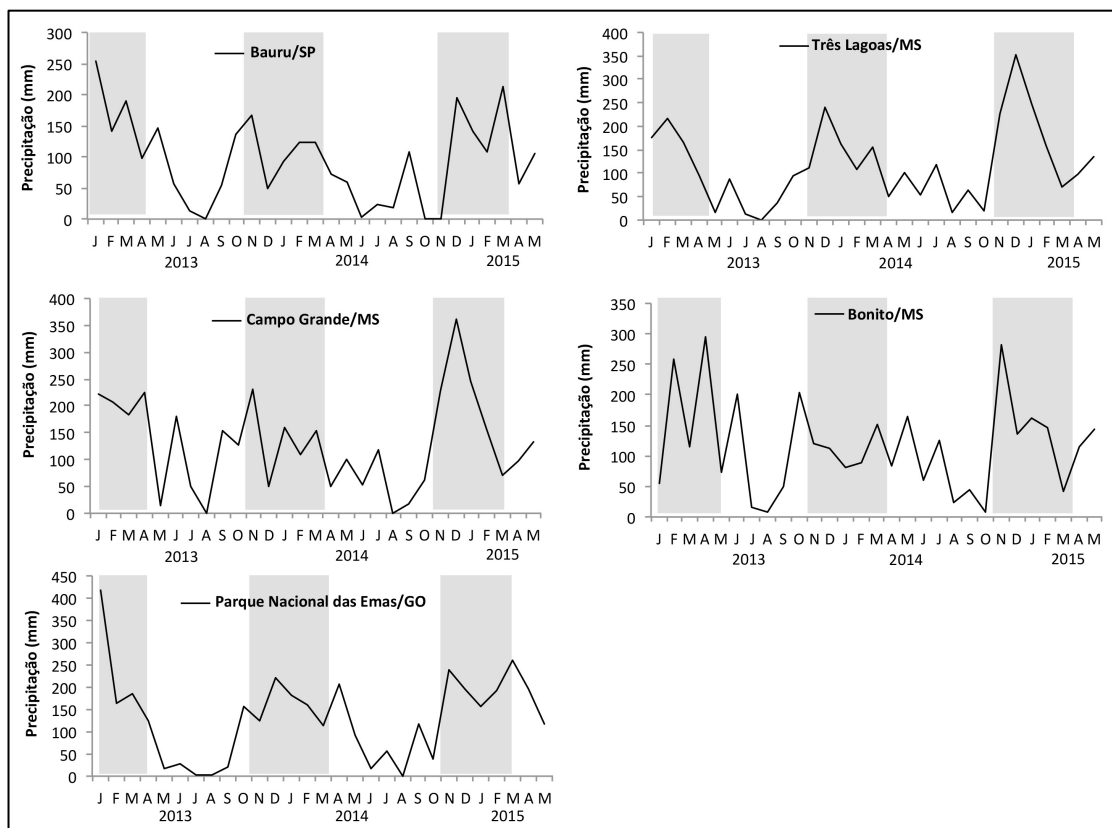


Figura 4 . Dados climáticos obtidos nas regiões de coleta durante os 24 meses de estudo. Precipitação é apresentada como média dos valores mensais de precipitação total acumulada por mês. As áreas cinzas indicam as estações de chuva e brancas estações de seca.

A estação chuvosa ocorreu entre os meses de março e abril em 2013, 2014 e 2015. Quando possível as coletas obedeceram a variação de cada localidade.

Ao final do período de amostragem (2013, 2014 e 2015) foram coletadas no total 308 amostras de folhas de *M. bella*. As amostras foram acondicionadas em sacos de papel e levadas do campo para o laboratório para secagem.

3.3.2. Análise da composição de solo

Com exceção da área BT, foram coletadas amostras de solo para análise química. Foram determinados o pH, os teores de matéria orgânica (M.O), fósforo (P resina), fósforo (P), alumínio (Al^{3+}), potássio (K), acidez potencial (H+Al), cálcio (Ca), magnésio (Mg), ferro (Fe), soma das bases (SB), capacidade de troca de cátions (CTC%), enxofre (S), saturação por bases (V%), além de boro (B), cobre (Cu), manganês (Mn) e zinco (Zn). Os dados obtidos são apresentados na Tabela 2 e 3.

Tabela 2. Níveis de micro e macronutrientes nos solos das áreas de coletas das folhas de *Myrcia bella*.

Área de coleta	Al^{3+}	K	Ca	Mg	SB	CTC	B	Cu	Fe	Mn	Zn
Campo Grande/MS	16	0,7	10	2	13	96	1,11	2,3	24	38,0	0,2
Selvíria/MS	1	2,7	23	11	37	88	0,33	6,2	33	4,4	1,4
Três Lagoas/MS	4	0,5	13	4	17	35	0,59	0,2	24	0,9	0,1
PN das Emas/GO	8	0,6	11	3	15	70	0,43	0,2	61	0,7	0,3
Pratânia/SP	7	1,3	10	3	15	47	0,84	0,3	54	4,0	1,1
Bauru/SP	9	0,6	11	3	15	57	0,87	0,5	38	2,0	0,1

*P, Fe, Zn, Mn, B e S apresentados em mg/dm^3 ; K, Ca e Mg apresentados em $\text{mmol}_\text{c}/\text{dm}^3$.

Os resultados obtidos pela análise química das amostras de solo mostram uma grande diversidade na composição das variáveis analisadas. O solo da área de coleta em Campo Grande/MS apresentou os maiores valores na concentração de Mn (38 mg/dm^3), CTC ($96 \text{ mmol}_\text{c}/\text{dm}^3$), B ($1,1 \text{ mg/dm}^3$), Al^{3+} ($16 \text{ mmol}_\text{c}/\text{dm}^3$), H+Al ($83 \text{ mmol}_\text{c}/\text{dm}^3$) e P-resina (15 mg/dm^3). Os maiores teores de M.O. (59 mg/dm^3), SB ($37 \text{ mmol}_\text{c}/\text{dm}^3$), K ($2,7 \text{ mmol}_\text{c}/\text{dm}^3$), Ca ($23 \text{ mmol}_\text{c}/\text{dm}^3$), Mg ($11 \text{ mmol}_\text{c}/\text{dm}^3$), Cu ($6,2 \text{ mg/dm}^3$) e Zn ($1,4 \text{ mg/dm}^3$) foram encontrados em Selvíria/MS. Os dados de M.O., H + Al, P-resina, pH e saturação de bases são apresentados na tabela 3.

Tabela 3. Outros indicadores da composição mineral dos solos das áreas de coleta das folhas de *Myrcia bella*.

Área de coleta	pH (CaCl ₂)	M.O.	P _{resina}	H+Al	SB	CTC	V%
Campo Grande/MS	4,0	23	15	83	13	96	13
Bonito/MS	4,9	59	8	51	37	88	42
Três Lagoas/MS	4,7	6	3	18	17	35	48
PN das Emas/GO	4,2	26	3	55	15	70	22
Pratânia/SP	4,3	13	4	33	15	47	31
Bauru/SP	4,1	12	3	41	15	57	27

*Matéria Orgânica (M.O.) apresentadas em g/dm³; Capacidade de troca catiônica (CTC) em % e potencial ácido do solo (H+Al) apresentado em mmol_c/dm³; Soma de bases (SB) apresentadas em %.

O solo da área de coleta de Campo Grande/MS apresentou o valor mais baixo para o pH (pH = 4), o que pode ser atribuído aos altos teores de Al, Mn, H+Al e alta CTC característicos de áreas de cerrado. Nossos dados e os obtidos de outros trabalhos mostram que o solo dos Cerrados de Mato Grosso do Sul apresenta índices mesotróficos, ou seja, possui teores moderados a alto de nutrientes (RATTER et al., 2003). Algumas espécies presentes no Cerrado, como as dos gêneros *Qualea* e *Vochysia*, são exemplos de espécies acumuladoras de alumínio como adaptação à condição de elevada acidez.

O solo das áreas de São Paulo, Goiás e Três Lagoas/MS apresentaram maior similaridade e apresentaram baixos teores para todas as variáveis determinadas, indicando a prevalência de solos distróficos. Esta similaridade fica evidente na análise de componentes principais (PCA) para as variáveis edáficas das áreas de coletas (Figura 5).

Já para Campo Grande/MS, os dados obtidos mostram uma baixa SB, típico de solos pobres. A alta saturação por Al ocorre em solos ácidos e está de acordo com o valor do pH determinado nesta área (pH = 4,0), sendo o mais baixo em relação às áreas amostradas.

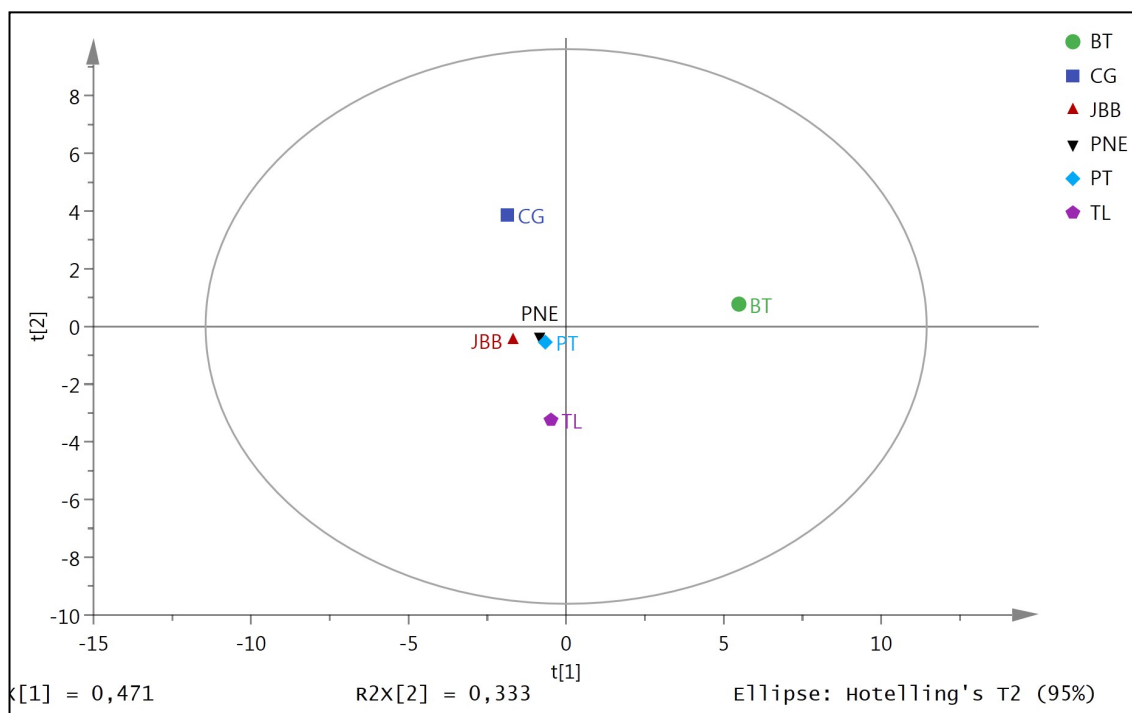


Figura 5. Análise de componentes principais (PCA) das variáveis edáficas das 6 áreas de coletas em diferentes regiões do Brasil. *BT=Bonito/MS; CG=Campo Grande/MS; JBB=Jardim Botânico de Bauru/SP; PNE=Parque Nacional das Emas/GO; PT=Pratânia; TL=Três Lagoas/MS.

A proporção da matriz X explicada pelo modelo foi de $R^2X = 47\%$ para PC1 e $R^2X = 33\%$ para PC2. O agrupamento das áreas de São Paulo (JBB e PT) e Goiás (PNE), próxima da origem dos eixos, torna evidente a similaridade da composição química dos solos dessas áreas. Já as áreas de Mato Grosso do Sul (BT, e CG e TL) estão dispersas, o que indica serem distintas entre si e em relação às áreas de São Paulo e Goiás, quanto aos teores medidos.

O Bi-plot (Figura 6) apresenta num mesmo plano os objetos e as variáveis e suas direções variáveis podem ser interpretadas. A distância do centro do plano é importante pois, quanto mais distantes do centro o comportamento do objetos é mais explicado e interpretado. Quanto maior é a distância de uma variável do centro do plano, maior é seu poder discriminatório para a interpretação do fenômeno observado.

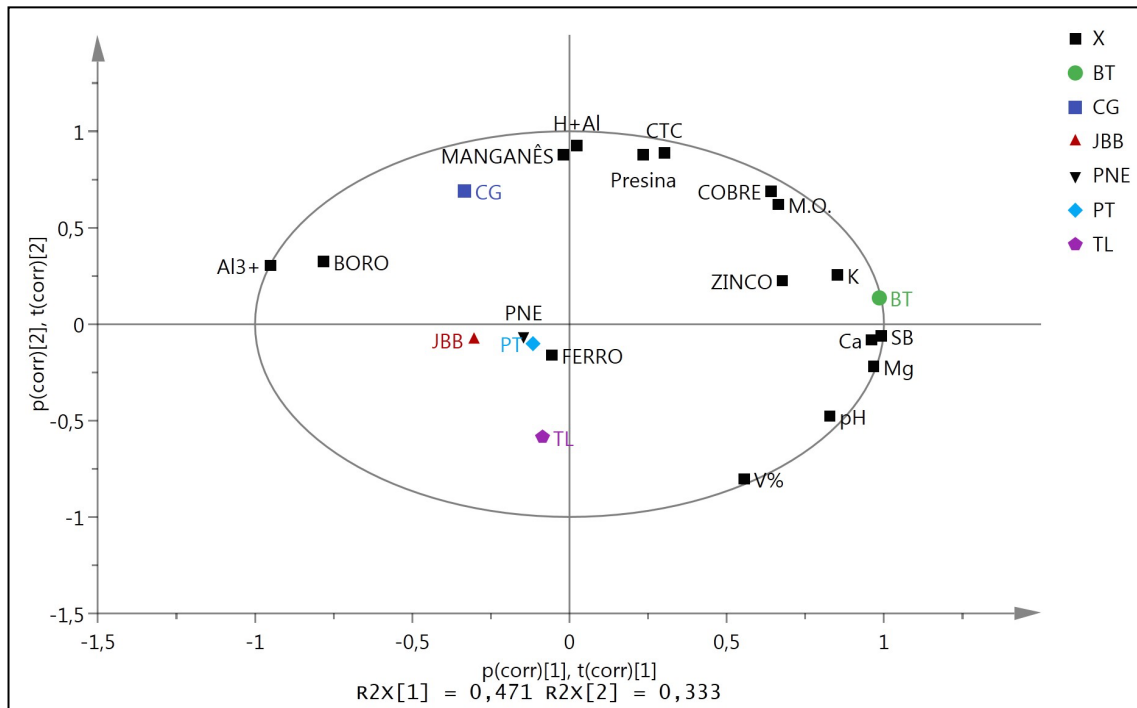


Figura 6. Bi-plot da análise de componentes principais (PCA) com variáveis edáficas das 6 áreas de coletas em diferentes regiões do Brasil. *SE = Selvária/MS; CG = Campo Grande/MS; JBB = Jardim Botânico de Bauru/SP; PNE = Parque Nacional das Emas/GO; PT = Pratânia; TL = Três Lagoas/MS.

A análise do Bi-plot obtido a partir dos dados coletados sugere que, exceto a variável Fe, que possui baixo poder discriminatório para as áreas de coletas, parte das variáveis possui poder discriminatório para as áreas S e CG. Para a área CG, Mn, Al^{3+} , H+Al e B possuem poder discriminatório em correlação positiva. Para a área SE, K, Ca, Mg e SB possuem poder discriminatório em correlação positiva. Assim, as regiões de Mato Grosso do Sul, principalmente S e CG, agrupam-se na região do gráfico com altos valores para as variáveis edáficas determinadas, exceto para o teor de Fe. Portanto, teoricamente, os espécimes coletados em S e CG estariam em solos mais similares entre si e diferentes dos solos das áreas do Estados de São Paulo e Goiás na estação coletada.

Diversidade Genética

3.3.3. Extração de DNA

O DNA obtido (Figura 7) do tecido foliar de *M. bella* foi submetido à análise de amplificação de fragmentos polimórficos (AFLP) para obtenção e análise do *fingerprint* do genoma dos espécimes de *M. bella* coletados em diferentes regiões do Brasil.

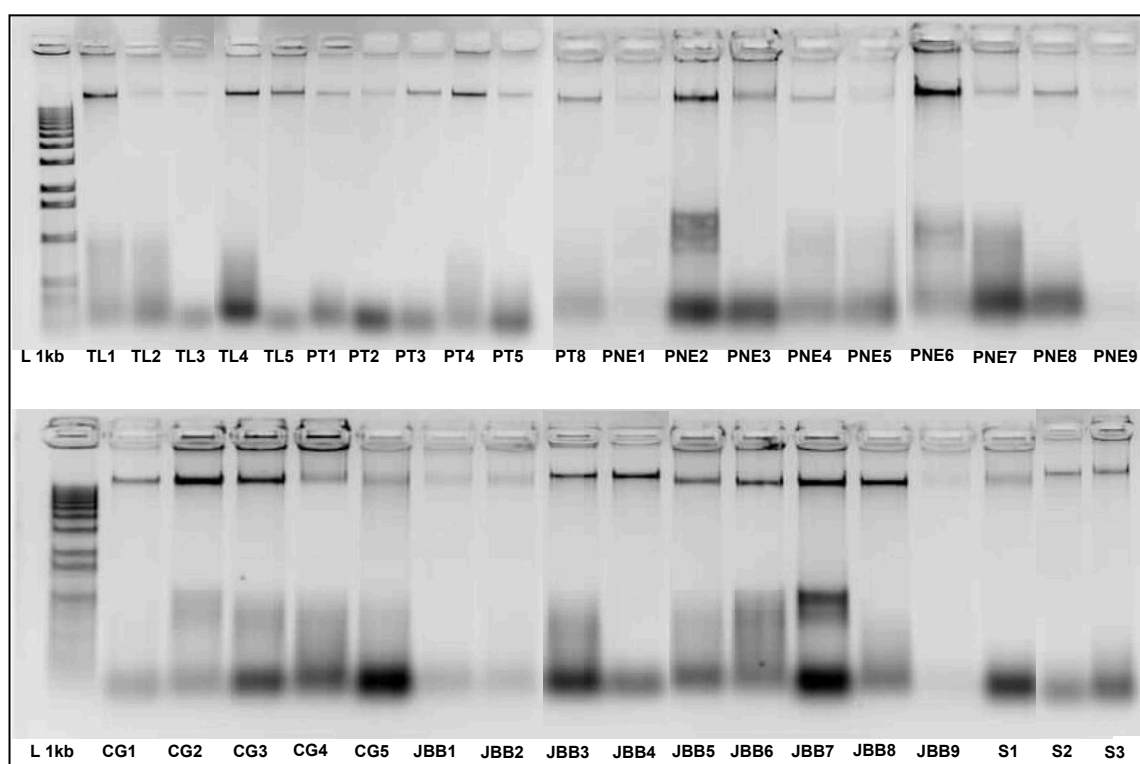


Figura 7. Corrida de eletroforese em gel de agarose 15 % em solução tampão TBE 1x (50V; 400A) de amostras de DNA extraídos do tecido foliar de espécimes de *Myrcia bella*. Vol. da amostra 3uL.*TL=Três Lagoas/MS; PT=Pratânia/SP; PNE=Parque Nacional das Emas/GO; CG=Campo Grande/MS; JBB=Jardim Botânico de Bauru ; S=Selvíria/MS.

A análise por amplificação de fragmentos polimórficos (AFLP) usando *primers* com 4 combinações (ACC/CTT - 316; ACC/CAT - 291; ACG/CTG - 225 e ACG/CAG - 196 fragmentos) gerou 1028 fragmentos da análise de 45 espécimes. Os dados do sequenciador foram processados no software ABI Prism GenoTyper (Applied Biosystems).

Uma tabela global de presença/ausência para cada tamanho de fragmento (bp) gerado para cada uma das 4 combinações de nucleotídeos utilizadas de cada amostra foi elaborada e exportada para o Excel. Esta tabela foi submetida a PCA, utilizando padronização por pareto. A proporção da matriz X explicada pelo modelo foi de $R^2X = 8\%$ para PC1 e $R^2X = 5\%$ para PC2 e a capacidade de predição $Q^2(Y) = 69\%$. Com exceção da população de *M. bella* de Bonito/MS (BT), foram analisados fragmentos de DNA de 40 espécimes coletados em diferentes regiões do Brasil.

A PCA dos fragmentos gerados a partir do DNA extraído das amostras de tecido foliar revelou um agrupamento formado majoritariamente por espécimes das populações de Goiás (PNE) e São Paulo (JBB e PT) e outro grupo formado por espécimes das populações de Mato Grosso do Sul (S, TL e CG) além de espécimes de PT (São Paulo) (Figuras 8 e 9).

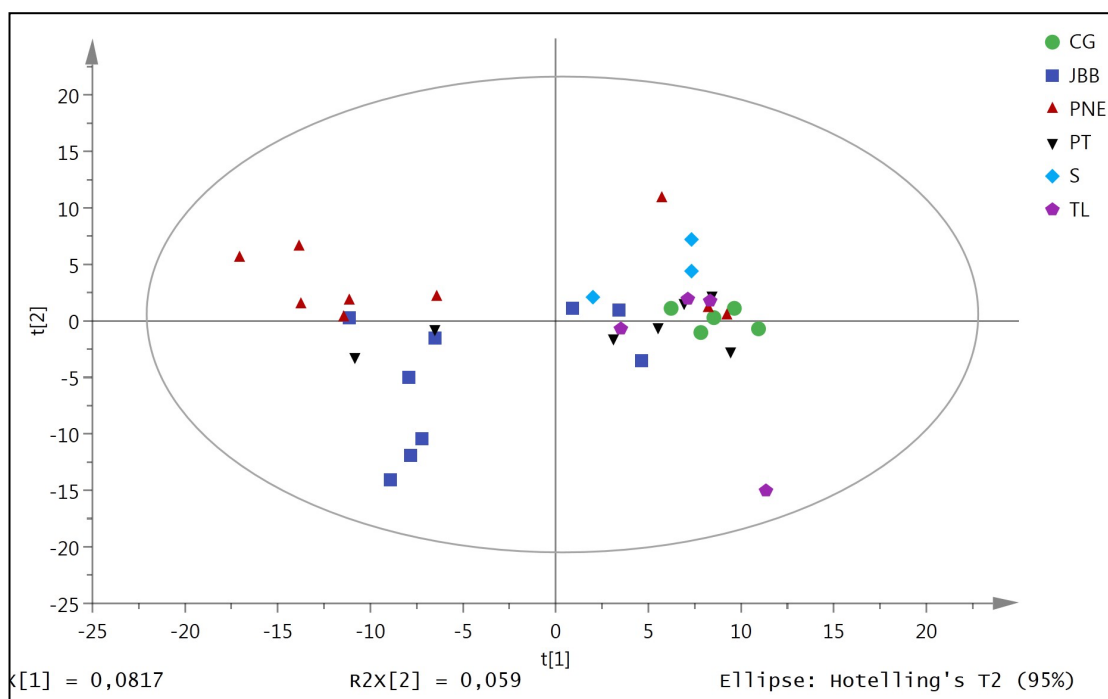


Figura 8. Análise dos componentes principais (PC1 vs PC2) gerados pela análise por AFLP (n = 40) das amostras de DNA de espécimes de *Myrcia bella* coletados em diferentes regiões do Brasil. *CG; Campo Grande/MS; JBB - Jardim Botânico de Bauru/SP; PNE - Parque Nacional das Emas/GO; Pratânia/SP; S = Selvíria/MS; TL - Três Lagoas/MS.

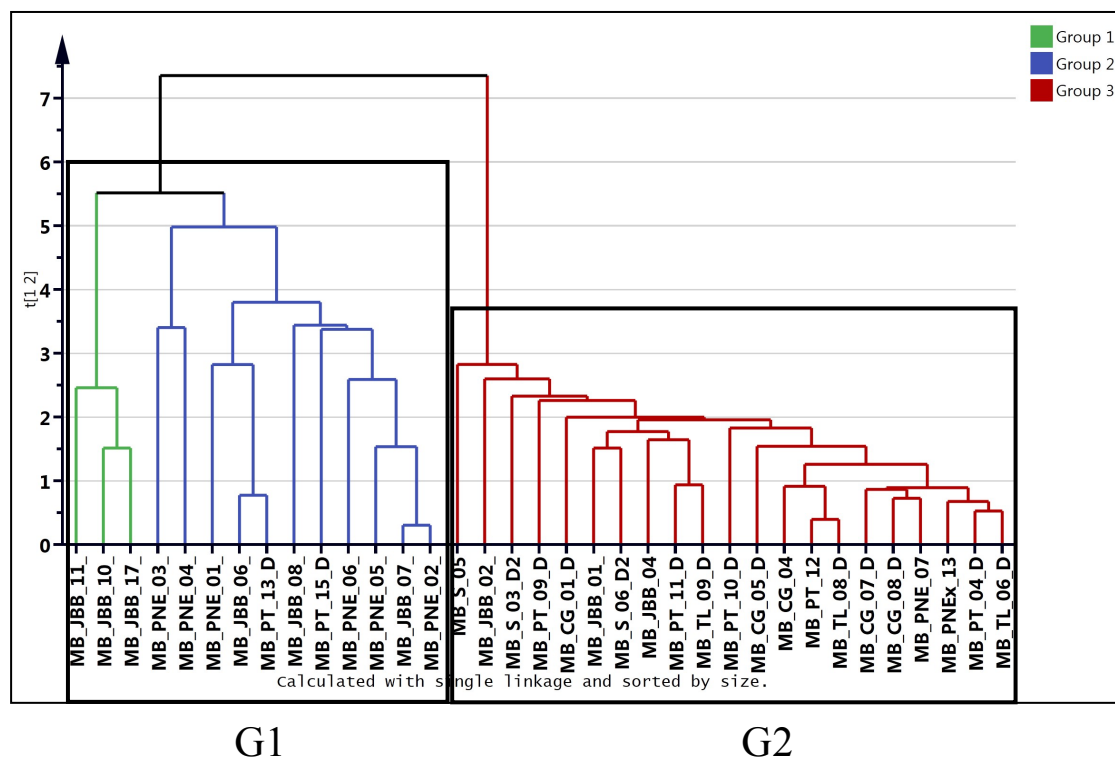


Figura 9. Análise hierárquica de agrupamento (HCA) extraída dos componentes principais (PC1 vs PC2) gerados pela análise por AFLP (n = 40) das amostras de DNA de espécimes de *Myrcia bella* coletados em diferentes regiões do Brasil. *Grupo 1 (G1) formado por: CG; Campo Grande/MS; JBB - Jardim Botânico de Bauru/SP; PNE - Parque Nacional das Emas/GO; Pratânia/SP; S = Selvíria/MS; TL - Três Lagoas/MS.

Esse padrão de agrupamento observado na PCA sugere que o genoma dos espécimes de *M. bella* das populações de São Paulo e Goiás são mais similares, e distintos dos espécimes das populações amostradas em Mato Grosso do Sul, que formam outro grupo, composto por espécimes das populações de Selvíria (S), Três Lagoas e Campo Grande (CG), e alguns espécimes de Pratânia (PT - São Paulo). Apesar dos grupos majoritário formados na PCA e HCA, nota-se uma maior heterogeneidade genética das populações de São Paulo pela presença de espécimes de PT e JBB agrupados às populações de TL, S e CG. Nota-se que o inverso não é observado, ou seja, as populações de Mato Grosso do Sul formam um único grupo mais bem conectado.

3.3.4. Etapa de desreplicação do extrato de *Myrcia bella* por UPLC-TOF-HRMS

Numa primeira etapa, para viabilizar o estudo de metabolômica, foi realizado um estudo de desreplicação do extrato MeOH 85 % por UPLC-TOF-HRMS, uma vez que vários compostos já foram isolados e identificados nas folhas de *M. bella* (SALDANHA et al., 2013). As folhas de *M. bella* apresentam em sua constituição química, entre outros compostos ainda não identificados, heterosídeos de flavonoides derivados de quercetina e miricetina, e também heterosídeos com grupo galoil, isolados do extrato hidroalcoólico das mesmas.

Como resultado da desreplicação, 17 substâncias já descritas em *M. bella* foram identificadas e outros compostos não identificados tiveram sua fórmula molecular destacadas (Tabela 4) no cromatograma de íons do extrato MeOH 85 % (Figura 10), obtido por UPLC-TOF-HRMS.

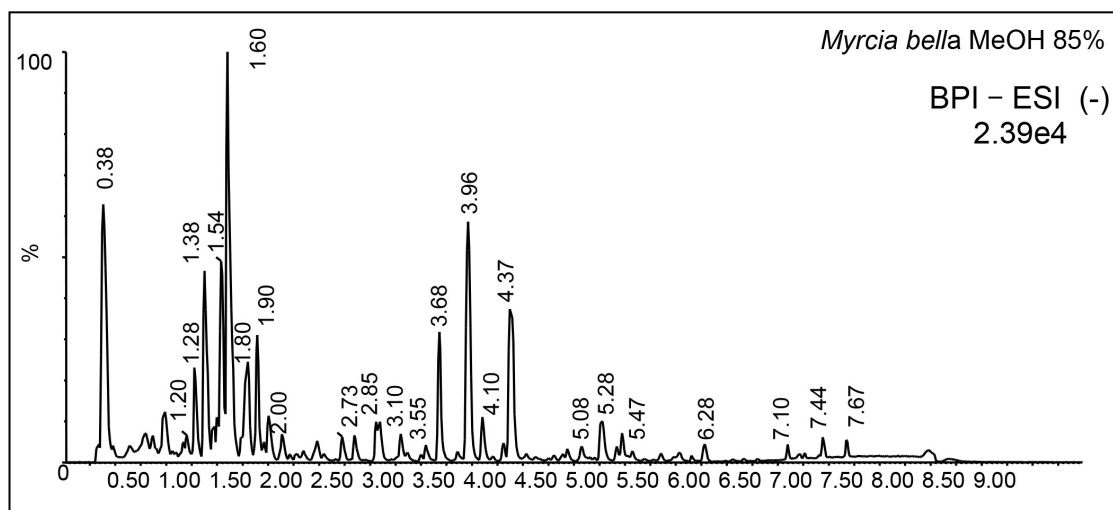


Figura 10. Cromatograma de íons obtidos do extrato MeOH 85% das folhas de *Myrcia bella* por UPLC-TOF-HRMS, em modo negativo, utilizado para desreplicação. ACN/H₂O - Grad.: 5-50 % B em 4 min; 50-95 % B em 7 min; 95 % B em 8 min; 5 % B em 10 min. Vazão: 0,750 µl/min; Col.: BEH C18 (2,1 x 100 mm d.i., 1,7 µm). Temperatura da coluna: 60 °C. Inj.: 2 µL.

Tabela 4. Dados da etapa de desreplicação do extrato das folhas (MeOH 85 %) de *Myrcia bella* em modo negativo por UPLC- TOF-HRMS.

ID	Rt (min)	Massa monosiotópica	Formula molecular	Composto atribuído ^a
1	0,37	191,0708	C ₁₁ H ₁₁ O ₃	ácido quínico
2	0,38	481,0618	C ₂₀ H ₁₇ O ₁₄	n.i.
3	0,48	331,0665	C ₁₃ H ₁₅ O ₁₀	n.i.
4	0,66	449,1295	C ₁₈ H ₂₅ O ₁₃	miricetina-3-O- α -xylopiranosídeo
5	0,87	577,1346	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₂	n.i.
6	0,99	189,0712	C ₁₅ H ₁₃ O ₆	n.i.
7	1,15	465,0669	C ₂₀ H ₁₇ O ₁₃	n.i.
8	1,16	635,0884	C ₂₇ H ₂₃ O ₁₈	n.i.
9	1,20	729,1483	C ₂₀ H ₁₇ O ₁₄	n.i.
10	1,28	631,0935	C ₂₈ H ₂₃ O ₁₇	miricetina-O-(O-galoil)-hexosídeo
11	1,37	479,0826	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₃	miricetina-3-O- β -D-galactopiranosídeo
12	1,45	433,0429	C ₁₉ H ₁₃ O ₁₂	n.i.
13	1,48	449,0758	C ₂₀ H ₁₇ O ₁₂	miricetina-3-O- α -arabinopiranosídeo
14	1,50	615,1088	C ₂₈ H ₂₄ O ₁₆	miricetina-O-(O-galoil)-pentosídeo
15	1,54	449,0806	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₂	miricetina-3-O- α -arabinofuranosídeo
16	1,61	463,0877	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	miricetina-3-O- α -L-rhamnopiranosídeo
17	1,65	463,0877	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂	quercetina-3-O- β -D-galactopiranosídeo
18	1,79	601,0875	C ₂₇ H ₂₁ O ₁₆	miricetina-O-(O-galoil)-pentosídeo
18	1,81	433,0819	C ₂₀ H ₁₇ O ₁₁	quercetina-3-O- β -D-xilosídeo
19	1,90	447,0982	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁	quercetina-3-O- α -L-rhamnopiranosídeo
20	2,00	615,1011	C ₂₈ H ₂₃ O ₁₆	quercetina-3-O-(6"-O-galoil)- β - galactopiranosídeo
21	2,01	585,0886	C ₂₇ H ₂₁ O ₁₅	quercetina-O-(O-galoil)-pentosídeo
22	2,02	317,0287	C ₁₅ H ₉ O ₈	miricetina
23	2,03	417,0865	C ₂₀ H ₁₇ O ₁₀	n.i.
24	2,14	431,1000	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₀	n.i.
25	2,29	301,0354	C ₁₅ H ₉ O ₇	quercetina
26	3,09	711,3994	C ₃₀ H ₆₃ O ₁₈	n.i.
27	3,10	711,3994	C ₃₀ H ₆₃ O ₁₈	n.i.
28	3,68	501,3216	C ₃₀ H ₄₅ O ₆	n.i.
29	3,96	503,3398	C ₃₀ H ₄₇ O ₆	n.i.
30	4,10	485,3308	C ₂₃ H ₄₉ O ₁₀	n.i.
31	4,31	487,3471	C ₂₃ H ₅₁ O ₁₀	n.i.
32	4,39	487,3471	C ₂₃ H ₅₁ O ₁₀	n.i.
33	5,27	471,3472	C ₂₃ H ₅₁ O ₉	n.i.

^aComparação dos dados com a literatura (SALDANHA et al., 2013); n.i. = compostos não identificados.

3.3.5. Desenvolvimento da extração e preparo de amostras para análise metabolômica

Após as coletas realizadas durante as estações de chuva e seca em 2013, 2014 e 2015, em diferentes regiões de Cerrado do Brasil, iniciamos o estudo químico com abordagem metabolômica.

Neste trabalho, adaptamos o procedimento de extração desenvolvido por Gratta et al (2009). Para a extração, foram pesados 100 mg do material vegetal seco e triturado de cada amostra, em uma mesma balança analítica, os quais foram submetidos à extração em moinho de esferas (diâmetro de 2 cm), com frequência 30 Hz, durante 2 min e centrifugação a 4000 rpm/min, utilizando 5 mL da solução para extração com duas concentrações de metanol, MeOH/H₂O (50:50 %, v/v) e MeOH/H₂O (85:15 %, v/v).

Para se calcular o rendimento em massa, as amostras foram secas por liofilização em um sistema de evaporação com rotação a pressão reduzida. A **Tabela 5** apresenta os parâmetros utilizados:

Tabela 5. Parâmetros e condições empregadas na liofilização das amostras obtidas.

Parâmetros	Condições			
	1	2	3	4
Suporte	40°C	0°C	0°C	40°C
Câmara	25°C	0°C	0°C	30°C
Rotação (g)	500	500	500	500

Após a secagem a massa de cada amostra foi determinada e as amostras foram dissolvidas em MeOH:H₂O (85:15 % v/v) na concentração final 1 mg/mL.

A análise sistemática realizada no software MzMine dos cromatogramas de íons totais obtidos por UHPLC-TOF-MS (dados não apresentados), mostra que o procedimento desenvolvido utilizando-se MeOH:H₂O (85:15 % v/v) apresentou maior

número de íons no cromatograma quando comparado com o procedimento B (MeOH:H₂O 50:50 % v/v) (Figura 12).

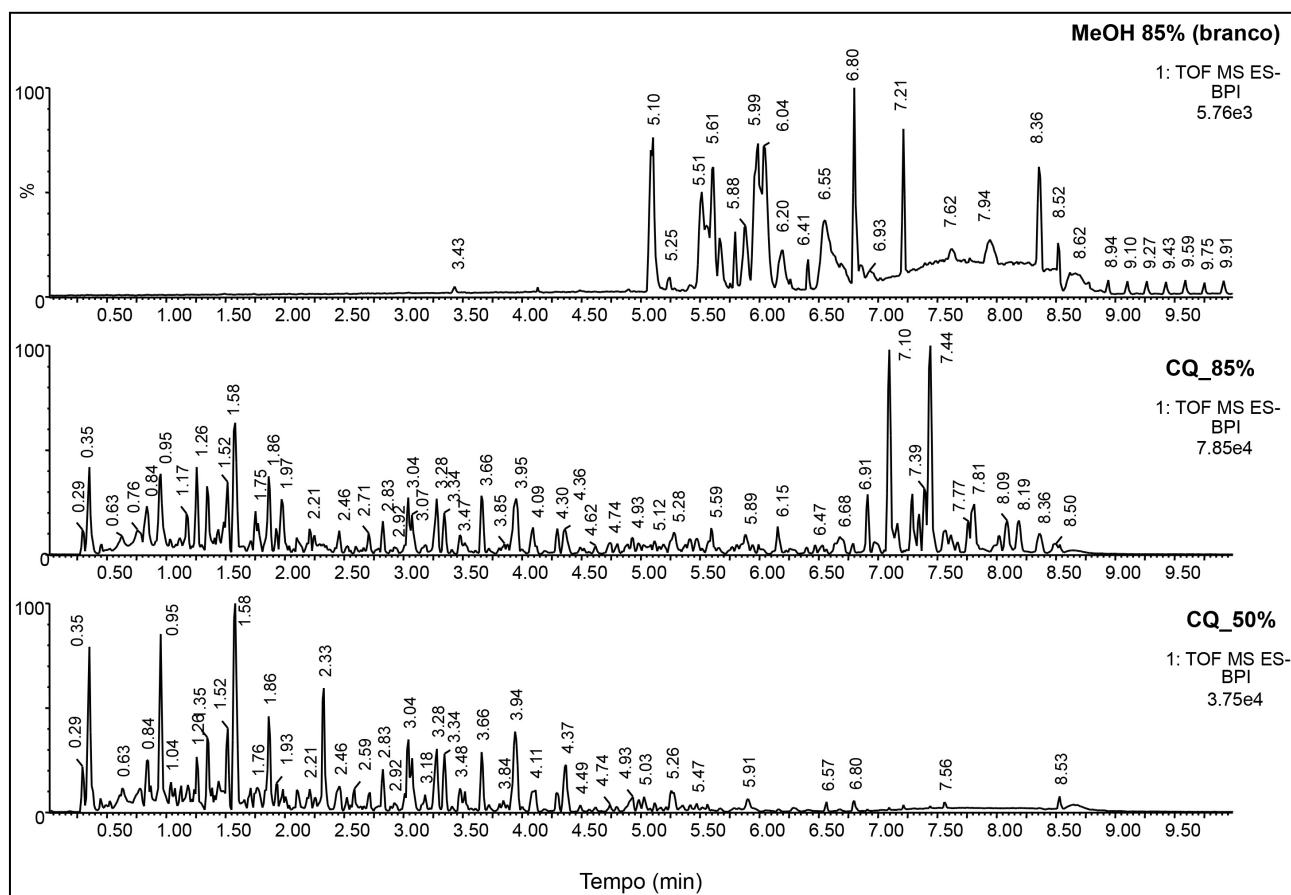


Figura 12. Chromatogramas analíticos de íons totais obtidos por UHPLC-TOF-MS das amostras de controle de qualidade (MeOH 50 % e 85 %) das folhas de *Myrcia bella* e do solvente utilizado na extração (MeOH : H₂O, 85:15 v/v). Condições: solventes Acetonitrila (A) H₂O (B), gradiente linear: 5-50 % de A em B em 4 min, 50-95 % de A em B em 7 min e 95 % de A em 8 min ; Vazão: 0.750 µl.min⁻¹. Coluna: 2.1 x 100 mm i.d., 1.7 µm. Temperatura da coluna: 60 °C Injeção: 2 µl.

Posteriormente à determinação do solvente extrator, avaliamos a repetibilidade e eficiência do método de extração empregado.

3.3.6. Validação do método de extração

A validação foi realizada para garantir que o método de extração empregado tivesse eficiência e repetitividade para todas as amostras, de forma satisfatória, a partir da matriz vegetal. Para se avaliar a eficiência, uma amostra foi submetida a 4 extrações sucessivas com 5mL de MeOH:H₂O (85:15% v/v), em moinho de esferas (diâmetro de 2 cm; 30 Hz por 2 min; 4000 rpm/min). Outras 4 amostras foram

submetidas ao mesmo processo de extração para se avaliar a repetitividade da metodologia. Os resultados obtidos são apresentados na figura 13 a seguir.

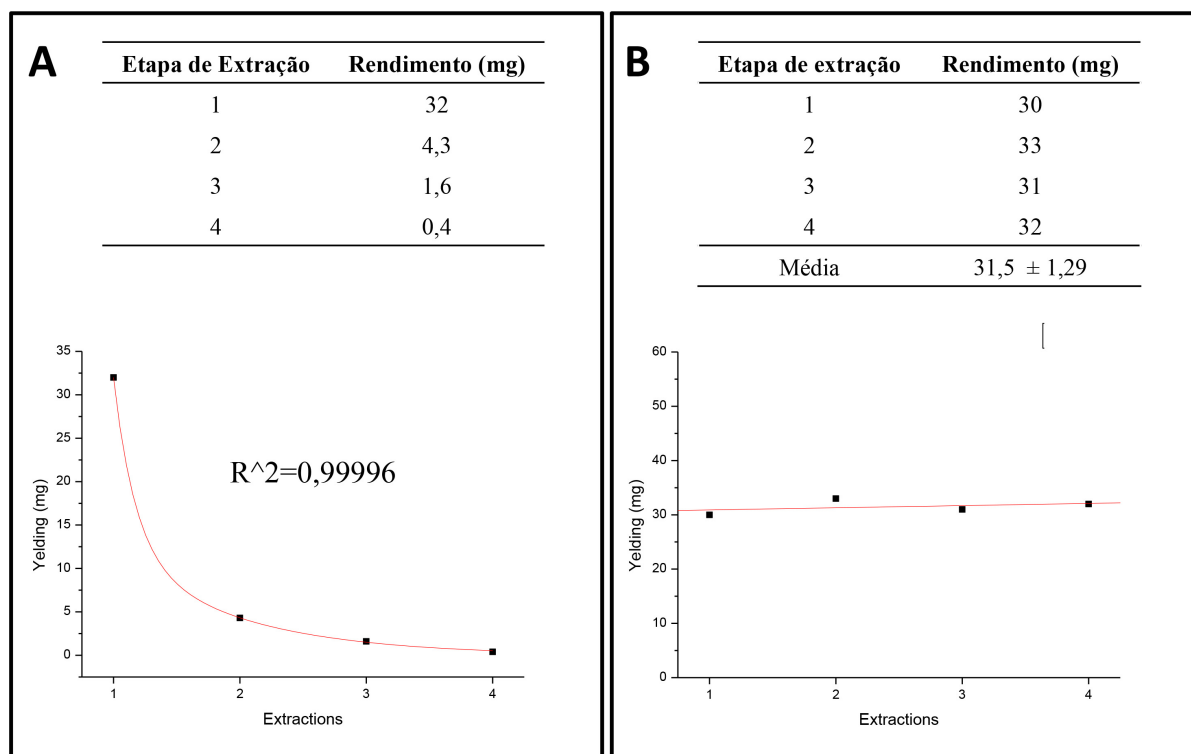


Figura 13. Validação do procedimento de extração para amostras de folhas de *Myrcia bella*. **A)** Eficiência. **B)** Repetitividade.

Os dados obtidos mostram que na primeira extração a eficiência foi de 83,5 % da massa total, a partir da matriz vegetal. No outro experimento realizado, a repetibilidade foi considerada satisfatória, visto que o desvio padrão ($31,5 \pm 1,29$) foi baixo para esse tipo de análise.

Uma vez que os dados obtidos foram satisfatórios esta metodologia foi considerada adequada para ser aplicada a todas as amostras coletadas.

3.3.7. Análise por UPLC-TOF-HRMS para estudo de metabolômica

Apesar do UHPLC-TOF-MS ser um equipamento preciso, em análises de lotes com alto número de amostras, limitações potenciais podem ocorrer por conta do tempo ao qual o equipamento é submetido para a realização das análises. 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 vieses devido à 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).

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 e que os dados obtidos são duvidosos, podendo levar a falsas conclusões.

Portanto, as amostras foram injetadas aleatoriamente e intercaladas, a cada 20 amostras, com amostras de controle de qualidade (CQ), para monitorar a precisão do sistema, ou seja, a proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Uma alíquota de 1 µL de cada amostra a ser analisada foi reunida em um único *vial* e usada como CQ. As injeções foram feitas em cromatógrafo de ultra eficiência, acoplado a detector de massas de alta resolução (UPLC-TOF-HRMS) utilizando-se coluna a 60 °C (BEH C18: 2,1 × 100 mm d.i., 1,7 µm), fase móvel composta por ACN (A) e H₂O (B) acidificada (0,1% Ác. fórmico) e vazão de 0,750 mL/min. O perfil químico das amostras foi obtido em gradiente rápido de 7 min (5-50 % de A em B em 4 min, 50-95 % de A em B em 7 min).

Neste trabalho foi utilizado CQ feito a partir das amostras biológicas e análises da assimetria e forma dos picos, precisão da massa, tempo de retenção e intensidade do sinal para monitoramento da estabilidade dos íons. O agrupamento coeso das amostras de CQ e próximo à origem dos eixos indica um nível aceitável da qualidade dos dados.

Os parâmetros obtidos para assimetria dos picos, forma do pico, estabilidade do sinal de intensidade das amostras de CQ, precisão de massa e tempo de retenção dos picos presentes nas amostras foram utilizados como critérios para se avaliar a estabilidade do UHPLC e HRMS e são apresentados nas Figuras 14 e 15.

A análise dos cromatogramas de íons das amostras de CQ (Figura 14) obtidos do início ao final da corrida, se mostrou satisfatória quanto à assimetria, à forma dos picos e à estabilidade da intensidade do sinal (CQ1 = 2,39 e4; CQ2 = 1,70 e4 e CQ16 = 2,40 e3) apesar de ter ocorrido queda do sinal ao final do experimento.

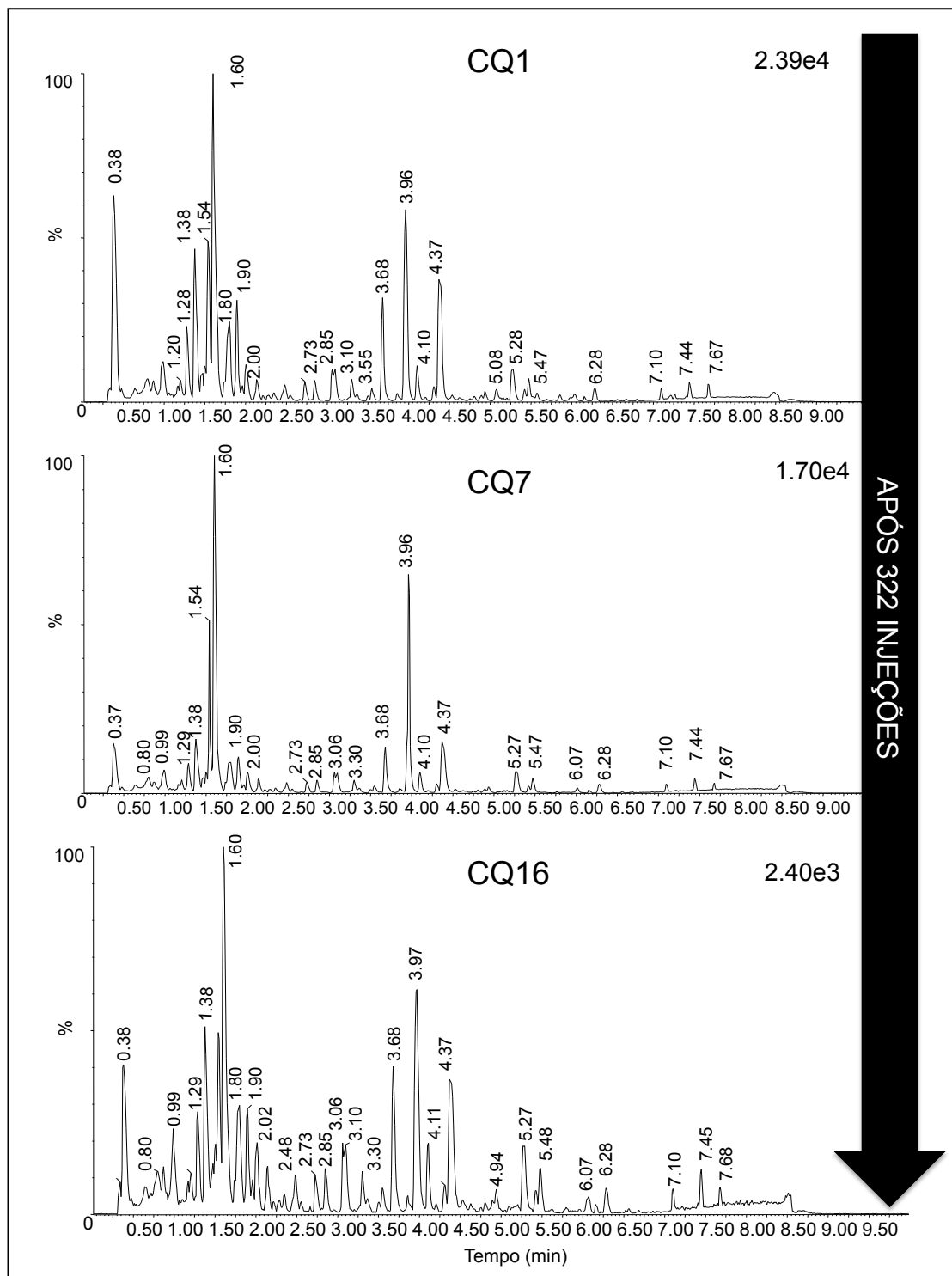


Figura 14. Cromatograma de íons obtidos das amostras de CQ das folhas de *Myrcia bella* por UPLC-TOF-HRMS, em modo negativo, mostrando boa precisão através da

repetitividade e estabilidade na intensidade do sinal mesmo após 30,3 h de análise. CQ-1 após 3,3 h de análise; CQ-7 após 25,6 h de análise; CQ-16 após 50,3 h de análise. ACN/H₂O - Grad.: 5-50 % B em 4 min; 50-95 % B em 7 min; 95 % B em 8 min; 5 % B em 10 min. Vazão: 0,750 µl/min; Col.: 2,1 x 100 mm, 1,7 µm. (Temperatura: 60 °C). Inj.: 2 µl.

A estabilidade do sistema (UPLC-TOF-MS) foi monitorada através da análise do tempo de retenção e precisão de vários compostos (dados não apresentados) identificados na etapa de desreplicação em *Myrcia bella* e presentes nos extratos. A Figura 15 apresenta os dados para quercetina-3-O- α -rhamnopiranosídeo (Tr - 1,90; FM = 448,3769; C₂₁H₂₀O₁₁, ver Tabela 4), previamente identificada nas folhas de *M. bella* (SALDANHA et al., 2013).

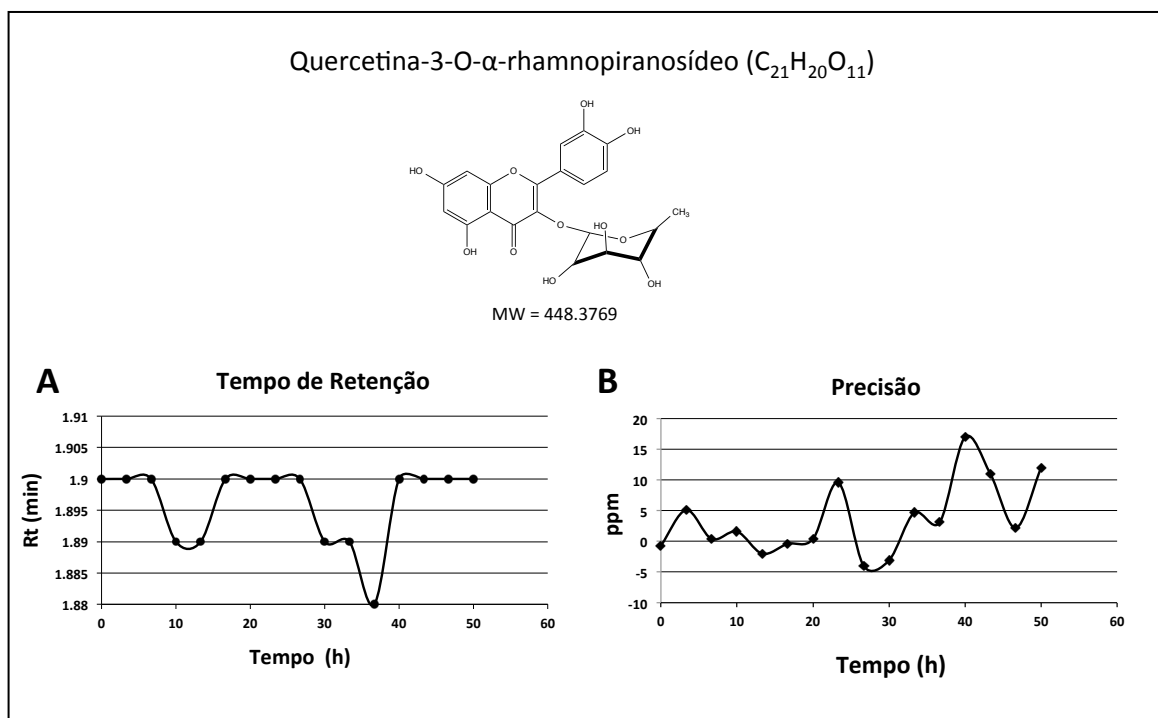


Figura 15. Análise da estabilidade do sistema (UPLC-TOF-MS) utilizando o composto quercetina-3-O- α -rhamnopiranosídeo, um flavonoide presente nas folhas de *Myrcia bella*, como padrão. **A)** Tempo de retenção (UPLC). **B)** Precisão da massa (TOF-MS).

Uma vez que o sistema se mostrou estável durante todo o experimento, e apresentou resolução satisfatória e baixa supressão de íons em um grande número de amostras, os dados foram exportados do equipamento para o processamento dos dados.

3.3.8. Processamento dos dados obtidos

Os cromatogramas de íons obtidos foram processados utilizando o programa MarkerLynx. As variáveis utilizadas no método de processamento de dados estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Variáveis utilizadas no método de processamento dados dos cromatogramas de íons obtidos por UHPLC-TOF-MS.

Variáveis	Parâmetros
Rt inicial (min)	0,0
Rt final (min)	7,0
Menor massa (m/z)	100
Maior massa (m/z)	1000
Tolerância da massa (Da)	0,02
Nível eliminação de ruído	10
Intensity thersholde (counts)	250
janela de Rt (min)	0,5
Janela de massa	0,05

Após o processamento dos cromatogramas, os dados foram exportados para uma tabela global no Excel®, contendo variações da intensidade do sinal de uma determinada massa (m/z) de tempo de retenção específico.

Nesta mesma tabela global, avaliamos a proximidade dos resultados obtidos na série de análises cromatográficas, através da estabilidade dos íons detectados nas amostras de CQ, quantitativamente, por meio do cálculo do Coeficiente de Variação (CV), expresso em %. Agências reguladoras como *Food and Drug Administration* (FDA), do Estados Unidos da América, aceitando até 20 % de variabilidade do sinal para validação de métodos bioanalíticos (VISWANATHAN et al., 2007). Seguimos,

portanto, uma adaptação desse critério para análises de *full scan*, sem o uso de marcadores internos ou transições MRM, aceitando íons com $CV < 30 \%$ como recomendado por Theodoridis et al. (2011), dada a ausência destas recomendações em órgãos reguladores nacionais na literatura disponível.

Com esta análise quantitativa da estabilidade de íons, pudemos detectar sinais referentes a impurezas da fase móvel, e artefatos gerados durante o processo de obtenção das amostras, que podem levar a falsos resultados na determinação de marcadores químicos, por exemplo. A situação ideal é obter 100 % dos íons com $CV < 30 \%$, contudo, matrizes contendo $CV > 80 \%$ indicam uma boa qualidade dos dados obtidos.

3.3.9. Análise de Componentes Principais (PCA) dos dados de perfil químico

As análises de PCA foram realizadas com a matriz global elaborada na tentativa de se identificar padrões de perfil químico de espécimes de *M. bella* em diferentes regiões do Brasil.

A matriz inicial foi elaborada com 308 amostras (observações) e 135 variáveis (Tr e m/z), com $CV < 30 \%$, e submetida a análise estatística multivariada. A primeira análise foi realizada com 308 amostras e a segunda, com modificações na planilha, sem *outliers* continha 294 amostras. As duas análises apresentaram resultados similares, porém, na segunda os padrões de similaridade, sem *outliers*, são mais claros. A proporção da matriz X explicada pelo modelo foi de 22 % para PC1 e 7 % para PC2 e capacidade de predição $R^2(X) = 70 \%$. A capacidade de predição por validação cruzada foi $Q^2(X) = 41 \%$. A padronização dos dados foi estabelecida por pareto, onde as diferenças na intensidade dos sinais são importantes.

A PCA (Figura 16), mostra a formação de 2 grandes grupos pelas populações de *M. bella* de São Paulo e de Goiás em relação ao eixo 1 (t1) e outro formado pelas populações de Bonito, Campo Grande, Selvíria e Três Lagoas em Mato Grosso do Sul. Não foi detectada diferença na composição química das folhas deste espécie, entre as estações seca e chuvosa, utilizando este modelo de estudo e durante o período de amostragem. A PC1 explica 7,3 % da variação total e a PC2 2,2 % da variância total.

Apesar dos eixos explicarem uma baixa porcentagem de variação, os grupos formados são concisos e possibilitam a discriminação dos indivíduos.

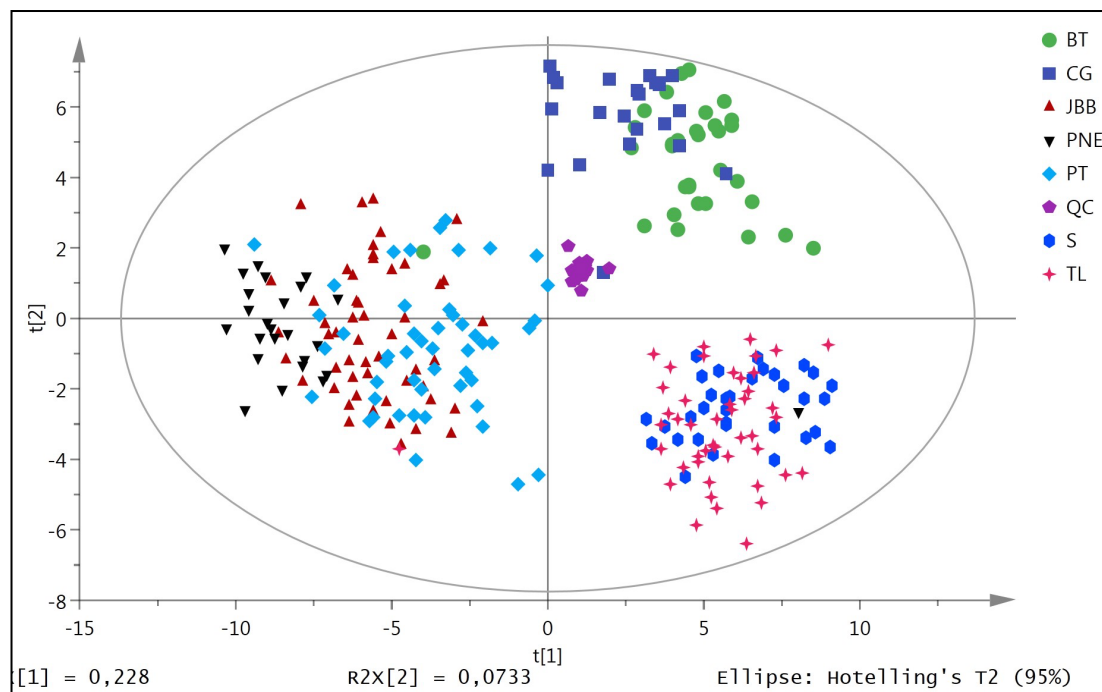


Figura 16. Análise dos componentes principais (PC1 vs PC2) gerados pela análise por UPLC-TOF-MS ($n = 294$) das amostras de folhas de espécimes de *M. bella* coletadas em diferentes regiões do Brasil. *BT = Bonito/MS. CG; Campo Grande/MS; JBB - Jardim Botânico de Bauru/SP; PNE - Parque Nacional das Emas/GO; Pratânia/SP; S = Selvíria/MS; TL - Três Lagoas/MS. QC= amostras controle de qualidade.

O perfil químico analisado por PCA mostra que as populações de *M. bella* de São Paulo e de Goiás estão bem conectadas, formando um grande grupo conciso. O outro agrupamento, das populações de Mato Grosso do Sul, mostra que Bonito e Campo Grande estão mais conectadas entre si, assim como Três Lagoas e Selvíria, formando dois subgrupos. Esses dados foram plotados em mapa do Brasil com a vegetação do Cerrado em destaque (Figura 17).

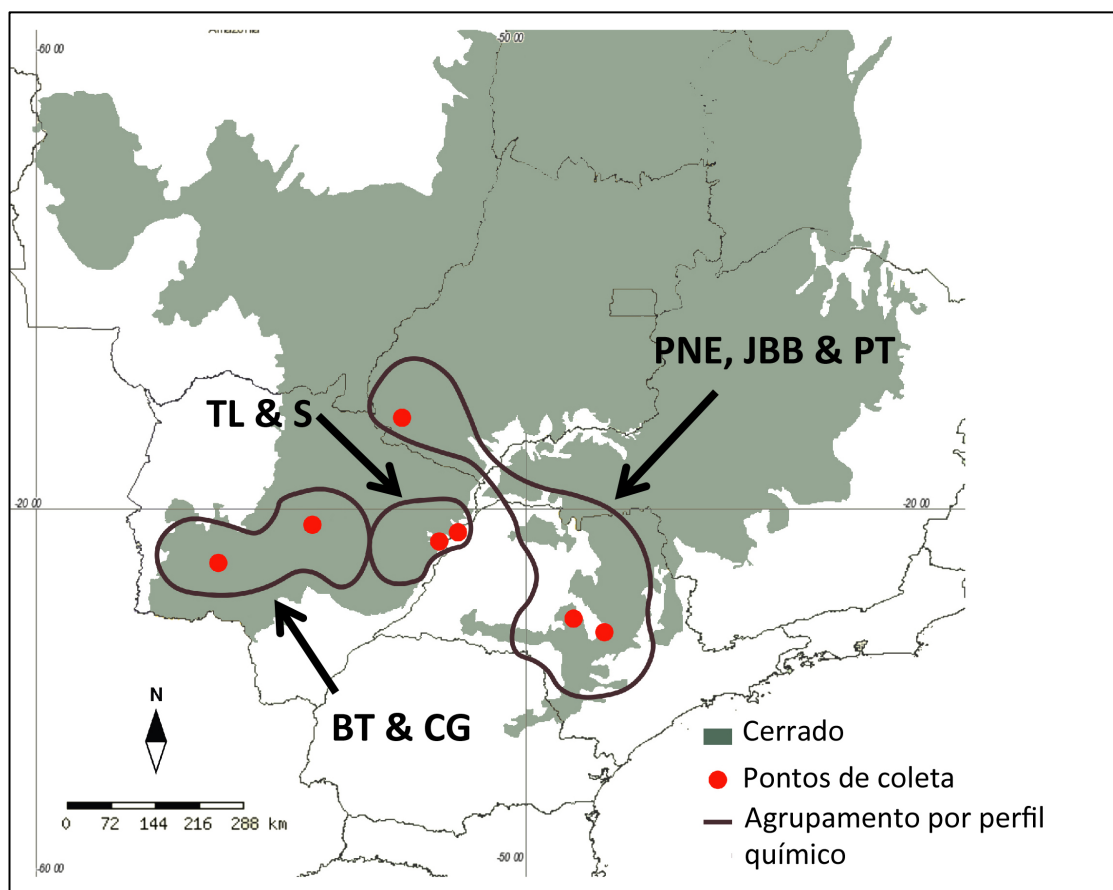


Figura 17. Ampliação do mapa da área do Cerrado com os pontos de coletas e agrupamento das populações de *Myrcia bella* por perfil químico baseado na análise dos componentes principais (PCA). *BT = Bonito/MS. CG; Campo Grande/MS; JBB - Jardim Botânico de Bauru/SP; PNE - Parque Nacional das Emas/GO; Pratânia/SP; S = Selvíria/MS; TL - Três Lagoas/MS.

Os resultados obtidos na PCA da análise do perfil químico das folhas de *M. bella*, quando plotados no mapa da figura 17, apresentam um padrão muito similar aos obtidos por Ratter et al., (2003), nos quais a análise florística de fragmentos de Cerrado mostraram similaridade entre os fragmentos de Cerrado de Goiás e São Paulo do que com os de Mato Grosso do Sul.

Os resultados aqui apresentados mostram que existe um forte padrão geográfico de perfil químico de populações de *Myrcia bella* em algumas regiões do Cerrado brasileiro e reafirmam, de um modo mais amplo, a diferença entre os Cerrados de Mato Grosso do Sul e de São Paulo e Goiás, já evidenciada em outros trabalhos florísticos. Castro (1994) e Castro e Martins (1999) analisaram 145 áreas de cerrado e reconheceram três principais grupos fitogeográficos: Cerrado Sul, nomeado de São Paulo, Cerrado Central, nomeado Planalto Central e Cerrado Norte. O mesmo padrão

foi obtido por Ratter et al. (2003) baseado em um estudo mais amplo, realizado em 376 áreas de Cerrado de similaridade florística. Em outro estudo filogeográfico realizado com 32 populações (287 espécimes) de *Dalbergia miscolobium* (Fabaceae), uma espécie endêmica e amplamente distribuída no Cerrado Brasileiro, também foram encontrados resultados similares, ao se analisar a estrutura genética dessas populações, mostrando claramente as particularidades dos Cerrados do Nordeste e Sudeste e, também, da diferenciação das porções leste e oeste (NOVAES et al., 2016).

3.3.10. Diferença da composição química entre os grupos

Para uma maior precisão dos componentes que geram grandes variações de perfil químico entre os espécimes de São Paulo (Jardim Botânico de Bauru - JBB) e de Mato Grosso do Sul (Bonito - BT) nas análise de PCA, foi realizada a análise supervisionada por OPLS-DA (Figura 18) (por classes, onde a classe 1 é representada por Bonito (MS) (esquerda) e a classe 2 por Jardim Botânico de Bauru (SP) (direita).

A análise OPLS-DA (Figura 18) resultou em 1 predição e 1 componente ortogonal (1 + 1) e com validação-cruzada da capacidade de predição $Q^2(Y) = 97 \%$. A variabilidade total explicada por esse modelo foi $R^2(X) = 33 \%$. Metabólitos com significância estatística relacionados à classes JBB e BT foram selecionados a partir do S-plot (Figura 19).

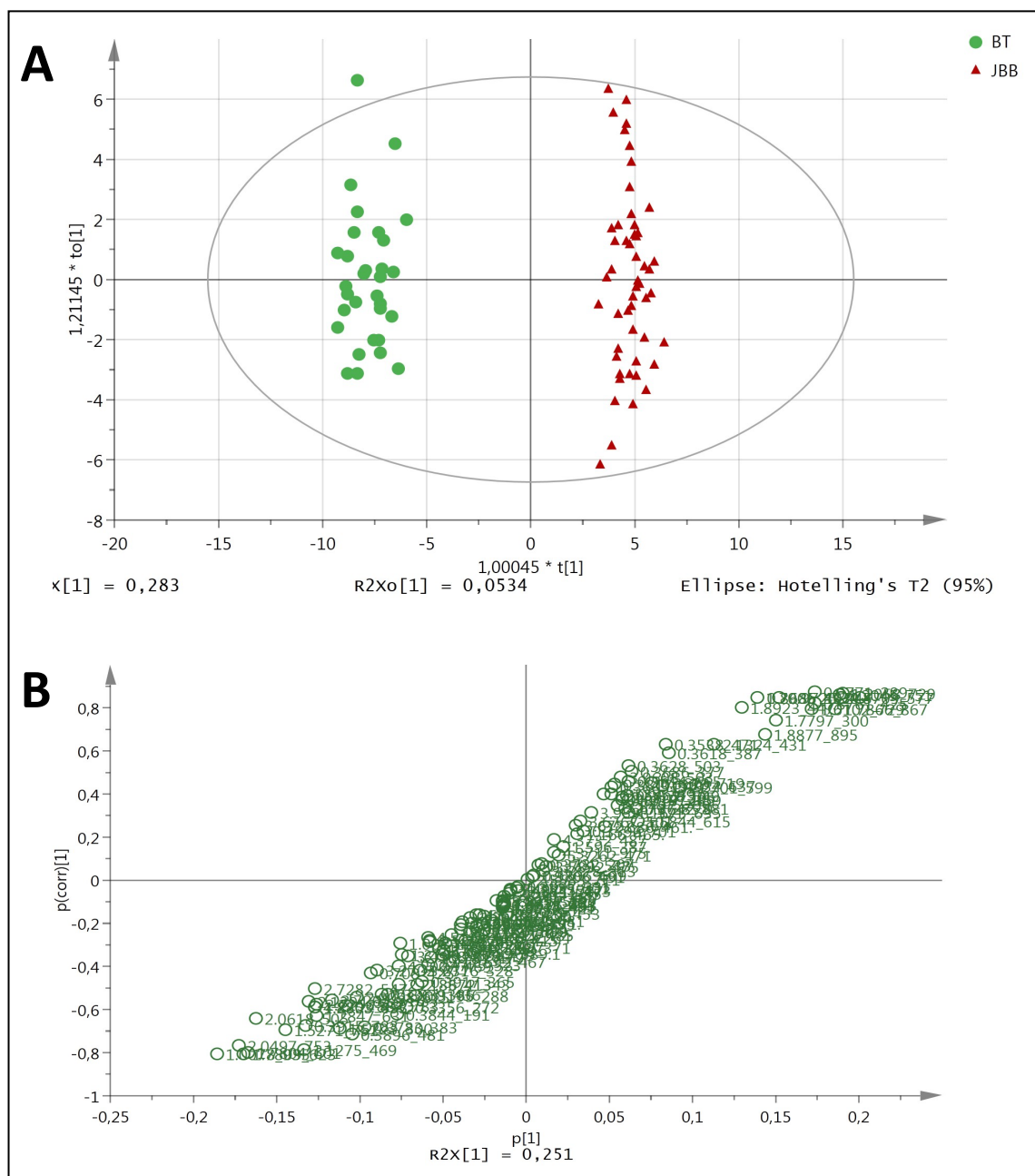


Figura 18. Análises OPLS-DA (A) e S-Plot (B) das classes 1 (BT-MS) e 2 (JBB-SP). Os pontos em azul (esquerda) e em vermelho (direita), representam as variáveis que influenciam na separação das classes.

Os compostos encontrados em maior concentração, com diferença estatística, para a classe JBB retirados do S-plot foram: miricetina-O-(O-galoil)-hexosídeo (Tr = 1,28; m/z 631), quercetina-3-O- β -D-xilopiranosídeo (Tr = 1,45; m/z 433), quercetina-3-O- α -L-rhamnopiranosídeo (Tr = 1,89; m/z 447). Para BT, quercetina-3-O- β -D-xilofuranosídeo (Tr = 1,79; m/z 433) e miricetina-O-(O-galoil)-deoxihexosídeo (Tr = 2,00; m/z 615).

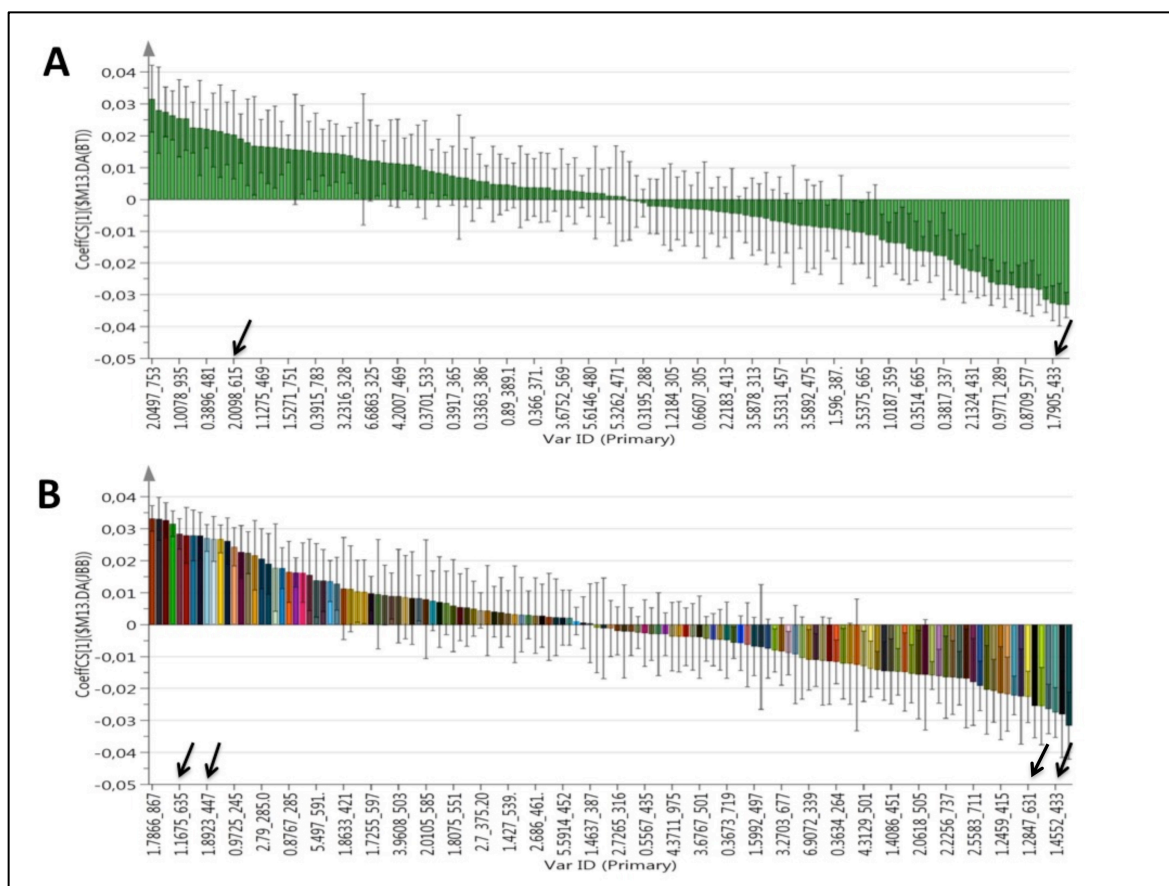


Figura 19. Variável Importante na Projeção (VIP) extraído das análises de S-Plot das populações de (A) Bonito/MS e (B) Jardim Botânico de Bauru/SP. Os compostos (setas) miricetina-O-(O-galoil)-hexosídeo (Tr = 1,28; m/z 631), quercetina-3-O-β-D-xilopiranosídeo (Tr = 1,45; m/z 433), quercetina-3-O-α-L-rhamnopiranosídeo (Tr = 1,89; m/z 447) são variáveis que influenciam fortemente a separação da classes JBB. Para BT são quercetina-3-O-β-D-xilofuranosídeo (Tr = 1,79; m/z 433) e miricetina-O-(O-galoil)-deoxihexosídeo (Tr = 2,00; m/z 615). *Identificação dos compostos por desreplcação, ver seção 2.2.4.

A variação de flavonoides derivados de miricetina e quercetina em *M. bella*, principalmente seus heterosídeos com grupos galoil, é um dado importante considerando-se a sua aplicação como planta hipoglicemiante e a capacidade destes compostos em inibir enzimas catalíticas envolvidas na clivagem hidrolítica de oligossacarídeos. Os flavonoides quercetina, miricetina, miricetina-3-O-β-D-(O-6"-galoil)-galactopiranosídeo de *Myrcia palustris* DC. foram identificados como inibidores da enzima α-glicosidase, uma enzima chave envolvida no processo de liberação de α-glicose a partir de carboidratos (WUBSHET et al., 2016). O grupo galoil possui grande importância para os flavonoides, com relação à atividade inibitória de α-glicosidase, aumentado-a. Já seus análogos, com ausência do grupo

galoil, por exemplo miricetina- ou quercetina-3-O- β -D-galactopiranosídeo, não possuem atividade inibitória (WUBSHET et al., 2016).

3.3.11. Relações entre perfil químico, genético e influência do solo

Baseado nos resultados obtidos (Figura 20), é possível predizer que as características químicas das folhas de *M. bella* seguem padrões, primeiramente em relação à origem geográfica, tendo em conta as variações de perfil químico observadas pela diferença entre certos metabólitos secundários, em diferentes regiões de Cerrado e também do perfil genético. Em relação ao perfil químico, considerando as diferenças genéticas na produção de metabólitos, os resultados obtidos sugerem que o perfil genético das populações tem menor influência em relação ao perfil de nutrientes no solo onde foram coletadas.

Podemos destacar também que o principal padrão de separação dos grupos na PCA da análise química das folhas de *M. bella* se baseia principalmente na posição geográfica, e não nas estações de seca e chuva, mostrando que, bioquimicamente, as amostras foram agrupadas de acordo com a origem da coleta. Cabe ressaltar que os fatores ambientais como temperatura, radiação solar, umidade e temperatura assim, como a variação sazonal de macro e micronutrientes parecem não exercer um efeito constante no metabolismo geral da planta, sendo que cada órgão da planta responde diferentemente às mudanças no ambiente (SAMPAIO et al., 2016).

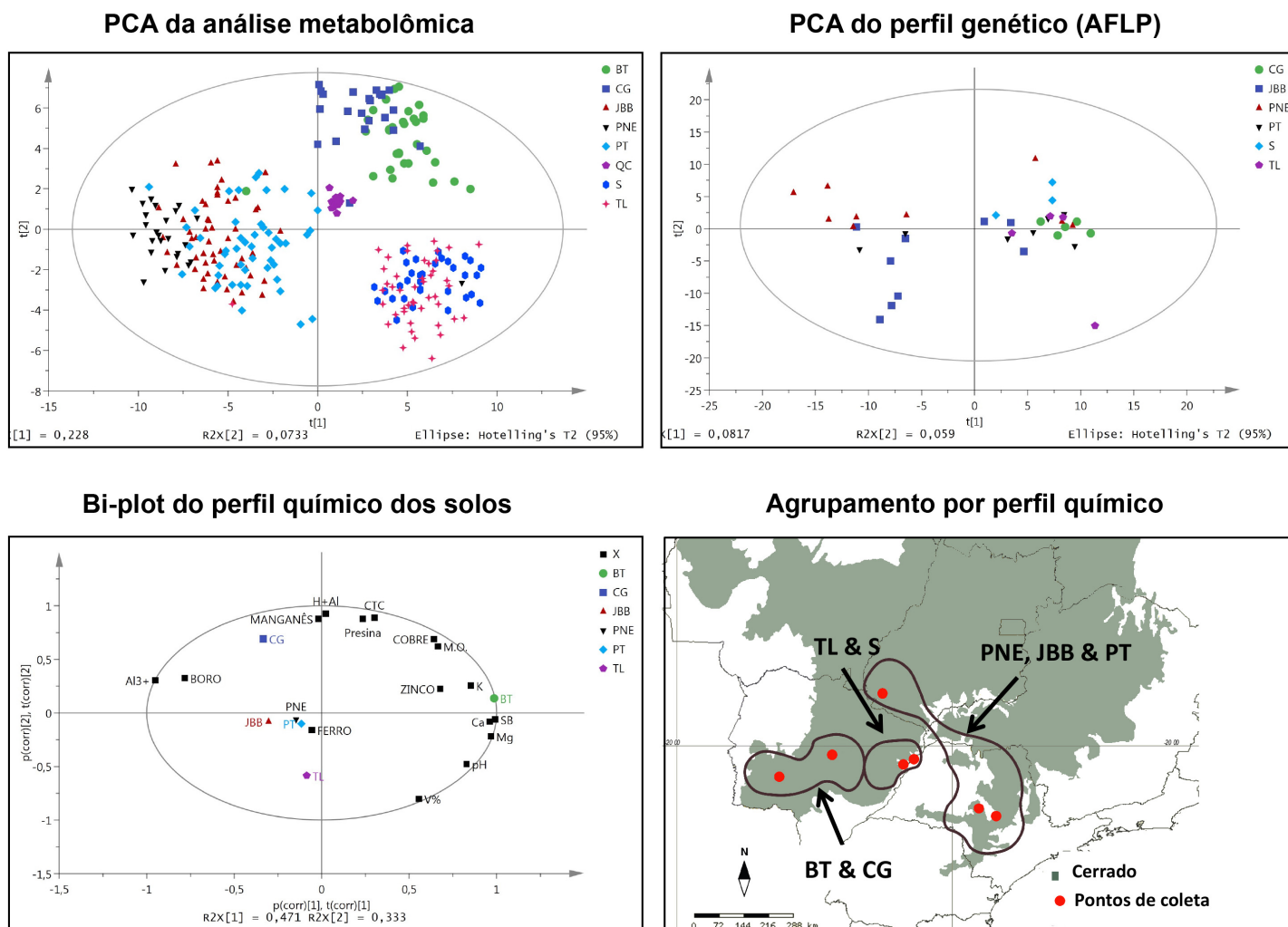


Figura 20. Compilação dos resultados obtidos da PCA da análise metabolômica das folhas de *Myrcia bella*, PCA da análise genética por AFLP e da PCA da análise química do solo das áreas de coleta.

De acordo com a PCA e HCA do perfil genético por AFLP, o perfil químico das folhas das populações de *M. bella* foram agrupados primeiramente em um padrão geográfico, principalmente relacionado à disponibilidade de certos nutrientes do solo. O solo das áreas de coletas em São Paulo e Goiás possuem um solo similar, distrófico, com baixos teores de micronutrientes. Diferentemente, o solo de Campo Grande apresentou o pH mais baixo ($\text{pH} = 4,0$) em relação ao das outras áreas e os maiores teores de Al, Mn, H+Al, além de alta CTC. Em Bonito (BT), foram encontrados altos teores de K, Ca, Mg, SB. A presença de nutrientes do solo como Ca, Mg e K podem ter influência nas raízes de *M. bella*, alterando várias funções fisiológicas com as quais estão relacionados em plantas superiores e podem modular o metabolismo secundário (MARSCHNER, 1995; SAMPAIO et al., 2016). As maiores concentrações de

heterosídeos de flavonoides acetilados foram encontradas nas regiões de São Paulo, em solos com baixas concentrações de nutrientes.

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.; LICHTÉ, 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.; REICHEL, 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.