

Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Exatas

Departamento de Química

Alan Rodrigues Teixeira Machado

**Metabolômica por Ressonância Magnética Nuclear de *Annona* spp para o
Controle de Nematoides**

Belo Horizonte

2014

UFMG/ ICEx/ DQ.1041^a

T. 470^a

Alan Rodrigues Teixeira Machado

**Metabolômica por Ressonância Magnética Nuclear de *Annona* spp para o
Controle de Nematoides**

Tese apresentada ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências-Química.

Belo Horizonte

2014

M149m Machado, Alan Rodrigues Teixeira
2014 Metabolômica por ressonância magnética nuclear de
T Annona spp para o controle de nematoides [manuscrito]
/ Alan Rodrigues Teixeira Machado. 2014.
xxi, 149 f. : il.

Orientadora: Lúcia Pinheiro Santos Pimenta.
Coorientador: José Dias de Souza Filho.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas
Gerais - Departamento de Química.
Inclui bibliografia.

1. Química Orgânica - Teses 2. Ressonância
magnética nuclear - Teses 3. Metabolismo secundário -
Teses 4. Graviola - Teses 5. Plantas parasitas - Teses
6. Análise multivariada - Teses I. Pimenta, Lúcia
Pinheiro Santos, Orientadora II. Souza Filho, José
Dias de, Coorientador III. Título.

CDU 043

UFMG

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA - ICEx
31270-901 - BELO HORIZONTE - MG
TEL.: 031 - 3409-5732
FAX: 031 - 3409-5711
E-MAIL: pgquimic@qui.ufmg.br



"Metabolômica por Ressonância Magnética Nuclear de *Annona spp* para o
Controle de Nematoides"

Alan Rodrigues Teixeira Machado

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Profa. Lúcia Pinheiro Santos Pimenta - Orientadora
UFMG

Profa. Aníja Jocelyne Marsaioli
UNICAMP

Prof. Luciano Morais Lião
UFMG

Prof. Luiz Cláudio de Almeida Barbosa
UFMG

Prof. Jarbas Magalhães Resende
UFMG

Prof. José Dias de Souza Filho
UFMG

Belo Horizonte, 29 de agosto de 2014.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Minas Gerais e ao Departamento de Química, pela oportunidade concedida para realização do doutorado.

Aos meus orientadores, Dr^a. Lúcia Pinheiro Santos Pimenta e Dr. José Dias de Souza Filho, pela valiosa orientação.

Aos professores do departamento de química da UFMG, pelos ensinamentos transmitidos.

Aos amigos do laboratório: Felipe, Gisele e Sebastião, por me ajudarem na realização dos experimentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela concessão da bolsa de estudos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, pelo financiamento dos projetos de pesquisa.

RESUMO

Os fitonematoides são parasitas altamente especializados que infestam plantas, principalmente as raízes, causando perdas econômicas a diferentes culturas. A resistência de algumas espécies do gênero *Annona* a fitonematoides já foi observada e relatada. Entretanto, ainda não foi identificado o mecanismo e, ou, os metabólitos associados a esta resistência. Este trabalho apresenta a aplicação da RMN de ^1H em estudos metabolômicos de plantas do gênero *Annona* com o objetivo de avaliar e relacionar os perfis metabólicos dessas plantas com as suas propriedades nematicidas ou nemato repelentes. Inicialmente foi avaliada a resistência de *Annona muricata* ao nematoide *Meloidogyne javanica* através da comparação do metaboloma de raízes e folhas de plantas inoculadas e não inoculadas com o nematoide utilizando RMN de ^1H e análise quimiométrica. As plantas expostas ao nematoide apresentaram alterações significativas no seu metabolismo após 24 horas de exposição. Os resultados sugerem que a resistência de *A. muricata* ao nematoide *M. javanica* pode esta associada à reação de hipersensibilidade. Vários metabólitos relacionados com resistência puderam ser identificados nas raízes e folhas de *A. muricata* com o emprego da RMN de ^1H , dentre eles a dopamina, a xantina e acetogeninas. Neste trabalho, também foi avaliado o potencial da RMN de ^1H combinado com regressão por mínimos quadrados parciais, para previsão da atividade larvicida dos extratos das folhas de *Annona muricata*. Para tanto, foi construído um modelo de calibração utilizando os sinais entre δ 0,00 e 10,00 e os valores de DL_{50} dos extratos frente à *Artemia salina*. Os resultados mostraram o potencial da RMN de ^1H no desenvolvimento de metodologias para previsão de atividades biológicas. Na busca por substâncias nematicidas foi avaliado o perfil metabólico e a atividade nematicida *in vitro* dos extratos das folhas de *Annona crassiflora*, utilizando o teste de

mobilidade sobre o nematoide de vida livre *Caenorhabditis elegans*. A espécie *A. crassiflora* mostrou-se uma fonte promissora à descoberta de novos compostos bioativos contra nematoides. Finalmente, o potencial da RMN de ^1H para análise quantitativa e não objetivada foi mais uma vez comprovado, possibilitando a identificação e quantificação da betaína trigonelina, pela primeira vez em várias espécies de *Annona*.

Palavras-chave: *Annona*, metabolômica por RMN de ^1H , resistência a nematoide, atividade nematicida.

ABSTRACT

TITLE: Nuclear magnetic resonance-based metabolomics of *Annona* ssp for nematode control

Plant-parasitic nematodes are parasitizes highly specialized that infest plants, specially roots, causing economic losses to plant production of different cultures. The resistance of some species of the *Annona* genus to nematodes has been observed and reported. However, the mechanism has not been identified yet, neither the metabolites responsible for the resistance. This work presents a ^1H NMR-based metabolomic studies applied to *Annona* genus with the aim to evaluate and correlate the metabolic profile of these plants to their nematicidal or nematode repellent activity. Initially the resistance of *Annona muricata* to the nematode *Meloidogyne javanica* through the comparison of the metaboloma of roots and leaves of infected and not infected plants was evaluated. The plant infested with the nematodes showed metabolic alteration after 24 hours of infestation. The results suggest that the resistance of *A. muricata* to to the nematode *Meloidogyne javanica* can be related to a hypersensitivity reaction. Several metabolites related to nematode resistance could be identified in the roots and leaves of *A. muricata* by using the ^1H NMR such as dopamine, xanthine and acetogenins. This work also evaluated the potencial of ^1H NMR and partial least-squares analyses to predicting the larvicidal activity of leaf *Annona muricata* extracts. For this, it was constructed a calibration model using as imput the ^1H NMR signals between δ 0.00 to 10.00 and the DL_{50} values of the leaf extracts obtained in the *Artemia salina* larvicidal test. The results showed the potencial of ^1H NMR in the development of methodologies to predicting the biological activities. Searching for nematicidal substances, it was evaluated the metabolic profile and the *in vitro* nematicial activity of leaf *Annona crassiflora* extract by mobility assay against the free-living nematode *Caenorhabditis elegans*. The species *A.*

crassiflora provided to be an auspicious source of new nematicidal substances. Finally, the potential of ^1H NMR in a quantitative and untargeted analysis was once again corroborated, allowing the identification and quantification of the betaine trigonelline, for the first time, in several species of *Annona*.

Keywords: *Annona*, ^1H NMR-based metabolomic, resistance to nematode, nematicidal activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - Representação esquemática de um mapa de contorno <i>J</i> -resolvido.	11
Figura 1.2 - Fórmula estrutural da suvanina.	12
Figura 1.3 - Fórmulas estruturais dos compostos pinocembrina (1) , cafeína (2) e desidrovomifoliol (3) .	14
Figura 1.4 - Esquema para obtenção de uma matriz <i>n</i> x <i>m</i> a partir dos espectros de RMN de ¹ H.	17
Figura 2.1 - Espectro de HR-MAS de ¹ H da folha de <i>Annona muricata</i> .	43
Figura 2.2 - Fórmula estrutural da betaína identificada nas folhas de <i>Annona muricata</i> .	43
Figura 2.3 - (a) Espectros de RMN de ¹ H do extrato da folha de <i>Annona muricata</i> (400 MHz, metanol- <i>d</i> ₄ / tampão KH ₂ PO ₄ em D ₂ O, pH=6). (b) Espectro de HR-MAS de ¹ H (400 MHz) da folha de <i>Annona muricata</i> (400 MHz, 2 gotas de uma solução em D ₂ O contendo 1 % de DSS).	44
Figura 2.4 - Gráfico de escores da análise de componentes principais (PC1 versus PC2) dos espectros de RMN de ¹ H dos extratos das raízes de <i>Annona muricata</i> .	46
Figura 2.5 - Gráfico de peso obtido a partir dos espectros de RMN de ¹ H dos extratos das raízes de <i>Annona muricata</i> .	47
Figura 2.6 - Gráfico de escores da análise de componentes principais (PC1 versus PC3) dos espectros de RMN de ¹ H dos extratos das raízes de <i>Annona muricata</i> .	48
Figura 2.7 - Gráfico dos pesos da PC3 obtido a partir dos espectros de RMN de ¹ H dos extratos das raízes de <i>Annona muricata</i> .	49

Figura 2.8 - Espectros de RMN de ^1H dos extratos das raízes de <i>Annona muricata</i> (400 MHz, metanol- d_4 / tampão KH_2PO_4 em D_2O , pH=6).	50
Figura 2.9 - Via metabólica da xantina oxidase.	51
Figura 2.10 - Gráfico de escores da análise de componentes principais (PC1 versus PC2) dos espectros de RMN de ^1H dos extratos das folhas de <i>Annona muricata</i> .	52
Figura 2.11 - Gráfico de escores da análise de componentes principais (PC1 versus PC3) dos espectros de RMN de ^1H dos extratos das folhas de <i>Annona muricata</i> .	53
Figura 2.12 - Gráfico de peso obtido a partir dos espectros de RMN de ^1H dos extratos das folhas de <i>Annona muricata</i> .	54
Figura 2.13 – (a) Expansão do mapa de contornos COSY do extrato das folhas de <i>Annona muricata</i> (400 MHz, metanol- d_4 / tampão KH_2PO_4 em D_2O , pH=6). (b) Fórmula estrutural do glicosídeo rutina identificado nas folhas de <i>Annona muricata</i> .	54
Figura 2.14 - Expansão do mapa de contornos ^1H - ^{13}C HSQC do extrato das raízes de <i>Annona muricata</i> (400 MHz, metanol- d_4 / tampão KH_2PO_4 em D_2O , pH=6).	57
Figura 2.15 - Espectro de RMN de ^1H do extrato clorofórmico das raízes de <i>Annona muricata</i> (400 MHz, CDCl_3).	59
Figura 2.16 - Cromatograma do extrato clorofórmico das raízes de <i>Annona muricata</i> .	59
Figura 2.17 - EM-IQPA do extrato clorofórmico das raízes de <i>Annona muricata</i> .	60
Figura 2.18 - Fórmulas estruturais para algumas acetogeninas com massas moleculares correspondentes aos picos de íons registrados na análise de EM-IQPA.	61

Figura 3.1 - Subunidades γ -lactona α,β -insaturadas encontradas em acetogeninas (a, b e c) e (d) fórmula estrutural do antraceno.	74
Figura 3.2 - Annonacina ($R'=R''=OH$); Solamina ($R'=R''=H$).	75
Figura 3.3 - Espectro de RMN de 1H (400 MHz, $CDCl_3$) do extrato clorofórmico das folhas de <i>Annona muricata</i> .	78
Figura 3.4 - Seção expandida do mapa de contornos $^1H, ^{13}C$ - HSQS-TOCSY (400 MHz, $CDCl_3$) do extrato clorofórmico das folhas <i>Annona muricata</i> na região de δ 4,00-8,00.	79
Figura 3.5 - Cromatogramas ($\lambda = 220$ nm) obtidos com o uso de uma coluna ODS Hypersil C18 (5 μ m, 250 x 10 mm), utilizando os eluentes metanol e água como fase móvel.	80
Figura 3.6 - 27 espectros de RMN de 1H (400 MHz, $CDCl_3$) sobrepostos dos extratos clorofórmicos das folhas dos diferentes espécimes de <i>Annona muricata</i> após o “buckets”.	82
Figura 3.7 - Percentual da variância explicada para cada componente principal (PC).	83
Figura 3.8 - Gráfico de escores da análise de componentes principais (PC1 versus PC2) dos espectros de RMN de 1H (400 MHz, $CDCl_3$) dos extratos clorofórmicos das folhas de <i>Annona muricata</i> .	84
Figura 3.9 - Gráfico de peso da análise de componentes principais (PC1) dos espectros de RMN de 1H (400 MHz, $CDCl_3$) dos extratos das folhas de <i>Annona muricata</i> .	85
Figura 3.10 - Dendograma obtido da análise de agrupamento hierárquico, com	

base na distância euclidiana média, dos espectros de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) dos extratos das folhas de <i>Annona muricata</i> .	86
Figura 3.11 - Gráfico de variáveis latentes <i>versus</i> o erro quadrático médio de validação cruzada (RMSECV).	87
Figura 3.12 - Gráfico de “Leverage” <i>versus</i> resíduos de Student para a identificação de amostras anômalas.	88
Figura 3.13 - Valor real <i>versus</i> valor previsto para DL_{50} contra <i>Artemia salina</i> dos extratos das folhas de <i>Annona muricata</i> .	90
Figura 3.14 - Expansão do mapa de contornos <i>J</i> -resolvido (400 MHz, CDCl_3) obtido do extrato das folhas de <i>Annona muricata</i> para a região em δ 6,8-7,4.	91
Figura 3.15 - Espectros de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) dos extratos das folhas de <i>Annona muricata</i> com o padrão interno antraceno.	92
Figura 4.1 - Espectro de RMN de ^1H do extrato da folha de <i>Annona crassiflora</i> (400 MHz, metanol- d_4 / tampão KH_2PO_4 em D_2O , pH=6).	106
Figura 4.2 - Expansão do mapa de contornos <i>J</i> -resolvido obtido do extrato das folhas de <i>Annona crassiflora</i> (400 MHz, metanol- d_4 / tampão KH_2PO_4 em D_2O , pH=6) para a região em δ 1,0-3,0.	108
Figura 4.3 - Expansão do mapa de contornos <i>J</i> -resolvido obtido do extrato das folhas de <i>Annona crassiflora</i> (400 MHz, metanol- d_4 / tampão KH_2PO_4 em D_2O , pH=6) para a região em δ 4,1-5,2.	109
Figura 4.4 - Expansão do mapa de contornos <i>J</i> -resolvido obtido do extrato das folhas de <i>Annona crassiflora</i> (400 MHz, metanol- d_4 / tampão KH_2PO_4 em D_2O , pH=6) para a região em δ 6,5-8,2.	110

Figura 4.5 - (a) Expansão do mapa de contornos COSY do extrato das folhas de <i>Annona crassiflora</i> (400 MHz, metanol- <i>d</i> ₄ / tampão KH ₂ PO ₄ em D ₂ O, pH=6) para a região em δ 6,0-9,5.	111
Figura 4.6 - Espectro de RMN de ¹ H da fração hexânica das folhas de <i>Annona crassiflora</i> (400 MHz, CDCl ₃).	112
Figura 4.7 - Espectro de RMN de ¹ H da fração diclorometânica das folhas de <i>Annona crassiflora</i> (400 MHz, CDCl ₃).	113
Figura 4.8 - Espectro de RMN de ¹ H da fração acetoetílica das folhas de <i>Annona crassiflora</i> (400 MHz, CDCl ₃).	114
Figura 4.9 - Fórmula estrutural da feofítina a (a) e feofítina b (b).	114
Figura 4.10 - Fórmula estrutural do kaempferol.	116
Figura 4.11 - Cromatograma de íons totais (TIC) do óleo isolado das folhas de <i>Annona crassiflora</i> .	117
Figura 4.12 - Espectro de RMN de ¹ H do extrato alcaloídico das folhas de <i>Annona crassiflora</i> (400 MHz, CDCl ₃).	118
Figura 4.13 - Expansão do espectro de RMN de ¹ H do alcaloide isolado das folhas de <i>Annona crassiflora</i> (400 MHz, CDCl ₃).	119
Figura 4.14 – Estrutura básica do esqueleto de alcaloide oxaporfínicos.	119
Figura 4.15 - (a) Expansão do mapa de contornos COSY (região de δ 7,0 e 9,0) para o alcaloide isolado das folhas de <i>Annona crassiflora</i> (400 MHz, CDCl ₃). (b) Fórmula estrutural do alcaloide aterospermidina.	120
Figura 4.16 - (a) Expansão do mapa de contornos HSQC (região de δ 4,0 e 10,0) para o alcaloide isolado das folhas de <i>Annona crassiflora</i> (400 MHz, CDCl ₃). (b)	

Fórmula estrutural do alcaloide aterospermidina.	121
Figura 4.17 - Efeito dos compostos presentes nas folhas de <i>Annona crassiflora</i> sobre a mobilidade de <i>Caenorhabditis elegans</i> .	122
Figura 4.18 – (a) Fórmula estrutural do marcador Sytox. (b) Fórmula estrutural do iodeto de propídeo. (c) Larvas (13) mortas marcadas com Sytox. (d) Larvas (13) mortas marcadas com iodeto de propídeo.	123
Figura 5.1 - Fórmula estrutural da betaína trigonelina.	131
Figura 5.2 - (a) Espectro de RMN de ^1H do extrato das folhas de <i>Annona sylvatica</i> (400 MHz, metanol- d_4 / tampão KH_2PO_4 em D_2O , pH=6).	136
Figura 5.3 - Espectro de RMN de ^1H do extrato das folhas de <i>Annona sylvatica</i> sem e com a adição do padrão trigonelina (400 MHz, metanol- d_4 / tampão KH_2PO_4 em D_2O , pH=6).	138
Figura 5.4 - Tempo de relaxação longitudinal para o TSP- d_4 (a) e para trigonelina (b).	139
Figura 5.5 - Evolução temporal da magnetização longitudinal do espectro de ^1H da trigonelina em função de uma variação τ .	140
Figura 5.6 - Curva de calibração para determinação da concentração de trigonelina.	141
Figura 5.7 - Expansão do espectro de RMN de ^1H da betaína trigonelina (400 MHz, metanol- d_4 / tampão KH_2PO_4 em D_2O , pH=6).	141
Figura 5.8 - Mobilidade de <i>Caenorhabditis elegans</i> expostos a diferentes concentrações de trigonelina.	143

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1. Metabólitos identificados nos extratos das raízes e folhas de <i>Annona muricata</i> .	56
Tabela 3.1 - Parâmetros dendrométricos para os espécimes de <i>Annona muricata</i> .	72
Tabela 3.2 - Valores de DL ₅₀ obtidos frente a <i>Artemia salina</i> para os extratos de diferentes espécimes de <i>Annona muricata</i> .	81
Tabela 3.3 - Percentagem de variância obtida para cada variável latente do modelo PLS.	89
Tabela 3.4 - Resultados para a previsão da DL ₅₀ , frente <i>Artemia salina</i> , para as amostras do conjunto de validação.	90
Tabela 3.5 - Concentração de acetogeninas γ -lactona α,β -insaturadas das folhas de <i>Annona muricata</i> .	93
Tabela 4.1 - Metabólitos identificados nos extratos de <i>Annona crassiflora</i> por RMN.	107
Tabela 4.2 - Percentagem de nematoides imóveis após exposição aos extratos e frações das folhas de <i>Annona crassiflora</i> .	115
Tabela 4.3 - Composição química do óleo isolado das folhas de <i>Annona crassiflora</i> .	117
Tabela 5.1 - Concentração de trigonelina em espécies de <i>Annona</i> .	142

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURA

1D – Unidimensional

2D – Bidimensional

CC – Cromatografia em coluna

CCD – Cromatografia em camada delgada

CG – Cromatografia gasosa

CL – Cromatografia líquida

CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência

d – duplete

DAD – Detector por arranjo de diodos – do inglês “*Diode Array Detector*”

dd – Duplete duplo

DSS – 2,2-dimetil-2-silapentano-5-sulfonato de sódio

EAO's – Espécies ativas de oxigênio

EM – Espectrometria de massas

ESI – Ionização por eletrospray – do inglês “*Electrospray ionization*”

FIPA – Fotoionização à pressão atmosférica

FT-ICR – Ressonância ciclôtrônica de íons por transformada de Fourier – do inglês “*Fourier transform ion cyclotron resonance*”

HCA – Análise hierárquica de agrupamentos – do inglês “*Hierarchical cluster analysis*”

HMBC – Correlação Heteronuclear via Múltiplas Ligações – do inglês “*Heteronuclear multiple-bond correlation*”

HMQC – Coerência Heteronuclear de Múltiplo Quanta – do inglês “*Heteronuclear multiple quantum coherence*”

HSQC – Coerência Heteronuclear de Simples Quantum – do inglês “*Heteronuclear single quantum coherence*”

IQPA – Ionização química a pressão atmosférica

IV – Espectroscopia no infravermelho

J – Constante de acoplamento escalar spin-spin nuclear

MALDI – Ionização por dessorção a laser assistida por matriz – do inglês “*Matrix assisted laser desorption ionization*”

pág – página

PCA – Análise de Componentes Principais – do inglês “*Principal component analysis*”

PCs – Componentes Principais – do inglês “*Principal components*”

PLS – Regressão por Mínimos Quadrados Parciais – do inglês “*Partial least squares regression*”

ppm – Partes por milhão

RMN – Ressonância magnética nuclear

RMNHq – Ressonância magnética nuclear de hidrogênio quantitativa

RMSECV – Raiz quadrada do erro médio quadrático da validação cruzada – do inglês “*Root mean square error of cross-validation*”

RMSEP – Raiz quadrada do erro médio quadrático de previsão – do inglês “*Root mean squared error of prediction*”

s – Simpleto

t – Tripleto

T_1 – Tempo de relaxação longitudinal

TIC – Cromatograma de íons totais – do inglês “Total Ion Chromatogram”

TOCSY– Espectroscopia total de correlação – do inglês “*Total correlation spectroscopy*”

TOF – Tempo de voo – do inglês “*Time of flight*”

TSP- d_4 – 3-trimetilsilil-2,2,3,3-propionato- d_4 de sódio

UV-Vís – Ultravioleta-visível

δ – Deslocamento químico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1	Metabolômica	2
1.1.1	Técnicas analíticas aplicadas em metabolômica	4
1.1.1.1	Espectrometria de massas	5
1.1.1.2	Ressonância magnética nuclear	7
1.1.1.2.1	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio	9
1.1.1.2.2	Ressonância magnética nuclear bidimensional	10
1.1.1.2.2.1	<i>J-resolvido</i>	10
1.1.1.2.2.2	Espectroscopia de correlação homonuclear (COSY)	12
1.1.1.2.2.3	Métodos bidimensionais heteronucleares	13
1.2	Análise multivariada	15
1.2.1	Análise de componentes principais	15
1.2.2	Análise de agrupamentos hierárquicos	18
1.2.3	Regressão por mínimos quadrados parciais	18
1.3	Nematoides de galhas	19
1.4	Resistência de anonáceas aos nematoides de galhas	21
1.5	Referências Bibliográficas	24
2	ANÁLISE DA RESISTÊNCIA DE <i>Annona muricata</i> AO NEMATOIDE <i>Meloidogyne javanica</i> POR ANÁLISE METABOLÔMICA EMPREGANDO RMN de ¹ H	32
2.1	Introdução	33
2.2	Objetivos	34
2.3	Procedimentos experimentais	35
2.3.1	Obtenção das mudas de <i>Annona muricata</i>	35
2.3.2	Inóculo do nematoide	35
2.3.3	Montagem dos experimentos com mudas de <i>Annona muricata</i>	35
2.3.4	Preparo dos extratos de <i>Annona muricata</i>	36
2.3.4.1	Extratos polares	36
2.3.4.2	Extratos de baixa e média polaridade das raízes	36
2.3.5	Ressonância magnética nuclear	37
2.3.5.1	RMN de ¹ H: HR-MAS - Alta Resolução com giro no ângulo mágico (do Inglês: high resolution magic angle spinning)	37
2.3.5.2	Análise por RMN em solução	38
2.3.6	Análise multivariada	39
2.3.7	Análise por cromatografia líquida de alta eficiência	39
2.3.8	Análise por espectrometria de massas de alta resolução	40
2.3.9	Teste de mortalidade de <i>Meloidogyne javanica</i>	40
2.4	Resultados e discussão	42
2.4.1	Análise por HR-MAS	42

2.4.2	Análise multivariada	44
2.4.2.1	Análise multivariada dos extratos das raízes	45
2.4.2.2	Análise multivariada dos extratos das folhas	52
2.4.3	Identificação dos metabólitos presentes nas raízes e folhas de <i>Annona muricata</i>	55
2.4.3.1	Perfil metabólico do extrato polar das raízes e folhas	55
2.4.3.2	Perfil metabólico dos extratos de baixa e média polaridade das raízes	58
2.5	Conclusão	63
2.6	Referências Bibliográficas	64
3	APLICAÇÃO DA RMN DE ¹ H E ESTATÍSTICA MULTIVARIADA PARA O “SCREENING” DA ATIVIDADE EM MISTURAS COMPLEXAS	69
3.1	Introdução	70
3.2	Objetivos	70
3.3	Procedimentos experimentais	72
3.3.1	Material vegetal	72
3.3.2	Preparo dos extratos	73
3.3.3	Análise por RMN	73
3.3.3.1	Quantificação do teor de acetogeninas γ -lactona α,β -insaturadas	74
3.3.4	Análise por cromatografia líquida de alta eficiência	76
3.3.5	Avaliação da atividade larvicida frente <i>Artemia salina</i>	76
3.3.6	Análise multivariada	77
3.4	Resultados e discussão	78
3.4.1	Perfil metabólico	78
3.4.2	Atividade larvicida frente à <i>Artemia salina</i>	80
3.4.3	Análise multivariada	81
3.4.3.1	Análise de componentes principais	83
3.4.3.2	Análise de agrupamentos hierárquicos	86
3.4.3.3	Regressão por mínimos quadrados parciais	87
3.4.4	Quantificação do teor de acetogeninas γ -lactona α,β -insaturadas	91
3.5	Conclusão	93
3.6	Referências Bibliográficas	94
4	PERFIL METABÓLICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE NEMATICIDA DOS EXTRATOS DE <i>Annona crassiflora</i>	97
4.1	Introdução	98
4.2	Objetivos	99
4.3	Procedimentos experimentais	100
4.3.1	Materiais e reagentes	100
4.3.2	Material vegetal	100
4.3.3	Estudo metabolômico das folhas de <i>Annona crassiflora</i>	100
4.3.4	Extração e isolamento dos metabólitos	101
4.3.5	Análise por CG-EM	102
4.3.6	Síntese de ésteres metílicos	103
4.3.7	Avaliação da atividade nematicida	103
4.3.7.1	Cultivo das larvas de <i>Caenorhabditis elegans</i>	103

4.3.7.2	Teste de mobilidade	104
4.3.7.3	Avaliação da viabilidade celular de <i>C. elegans</i>	105
4.4	Resultados e discussão	106
4.4.1	Análise do perfil metabólico por RMN de ^1H	106
4.4.2	Atividade nematicida e purificação dos metabólitos	115
4.5	Conclusão	123
4.6	Referências Bibliográficas	125
5	ANÁLISE QUANTITATIVA DA BETAÍNA TRIGONELINA EM ESPÉCIES DE <i>Annona</i> POR ESPECTROSCOPIA DE RMN de ^1H E AVALIAÇÃO DA SUA ATIVIDADE NEMATICIDA	130
5.1	Introdução	131
5.2	Objetivos	132
5.3	Procedimentos experimentais	133
5.3.1	Material vegetal	133
5.3.2	Preparo dos extratos	133
5.3.3	Quantificação por RMN de ^1H	133
5.3.4	Análise estatística	135
5.3.5	Avaliação da atividade nematicida da betaína trigonelina	135
5.4	Resultados e discussão	136
5.4.1	Identificação da trigonelina	136
5.4.2	Quantificação da trigonelina nos extratos das folhas de <i>Annona</i>	139
5.4.3	Avaliação da atividade nematicida da betaína trigonelina	143
5.5	Conclusão	144
5.6	Referências Bibliográficas	145
6	CONCLUSÃO GERAL	147

Capítulo 1

INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Metabolômica

Várias estratégias para a análise de misturas complexas contendo grande número de metabólitos têm sido apresentadas à comunidade científica. Entre estas estratégias destaca-se a metabolômica, uma ferramenta introduzida no campo das “ômicas” sucedânea da genômica, da proteômica e da transcriptômica, sendo utilizada nos estudos de sistemas biológicos (Sumner *et al.*, 2003).

Uma análise detalhada do metaboloma proporciona a imagem da diversidade biológica e, ainda, a compreensão de uma resposta bioquímica a fatores externos como estresse, nutrição e ataque por patógenos. Portanto, o estudo do metaboloma tem sido proposto como uma ferramenta útil no estudo da função de genes específicos (Last *et al.*, 2007). A análise do metaboloma objetiva a identificação e a quantificação dos compostos de baixa massa molar (menor que 1000 g/mol), que estejam fora ou dentro da célula. Os estudos do metaboloma são acompanhados de termos utilizados na distinção dos diferentes tipos de abordagens experimentais, que segundo Fiehn (2002), podem ser divididas em quatro grupos principais: (i) análise direcionada; (ii) perfil metabólico; (iii) metabolômica e (iv) impressão digital (“*fingerprinting*”) metabólico.

Na análise direcionada, um conjunto de substâncias conhecidas é avaliado, o que geralmente permite a quantificação absoluta dos metabólitos. Essa análise refere-se a um método no qual um determinado número de metabólitos é analisado, normalmente concentrando-se em um ou mais metabólitos de interesse. Essa abordagem pode ser eficaz para estudos farmacocinéticos, metabolismo de fármacos, bem como para medir a influência de agentes terapêuticos ou modificações genéticas (Patti *et al.*, 2012).

O perfil metabólico trata-se de um estudo direcionado a metabólitos específicos ou a eles relacionados, geralmente decorrentes de um mesmo caminho metabólico (Broeckling *et al.*, 2005). Consiste, portanto, de um método analítico para a quantificação relativa de um grande número de metabólitos de amostras biológicas obtidas, geralmente, a partir de um tecido específico ou de uma parte do tecido de interesse. Porém, o perfil metabólico limita-se a uma determinada classe de compostos ou mesmo ao rastreamento de um ou mais compostos pré-definidos dentro de uma faixa de polaridade. Dentro dessas limitações, uma única plataforma analítica pode ser suficiente, tendo-se, por exemplo, a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), que tem sido descrita em vários experimentos no campo da metabolômica (Harrigan e Goodacre, 2003), mas que restringe seu campo de ação a compostos voláteis ou de fácil conversão em derivados.

A impressão digital (“*Fingerprinting*”) é uma análise rápida e global, na qual, em muitos casos, não estão envolvidas separações cromatográficas e parte dos metabólitos geralmente não são identificados (Choi *et al.*, 2004). Nessa metodologia, em determinadas condições de análise, alguns metabólitos são usados como marcadores biológicos para a identificação e/ou controle de qualidade de extratos e formulações. A ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio tem sido aplicada com sucesso em vários trabalhos de *fingerprinting*, nos quais as impressões digitais dos espectros de misturas complexas em condições padronizadas são avaliadas. Métodos multivariados, como análise de componentes principais (PCA), são usados para comparar grandes conjuntos de dados obtidos através dos respectivos espectros e identificar grupos de semelhança ou diferença entre eles. O emprego dessas técnicas permite coletar informações que podem ser usadas novamente de forma supervisionada, até se chegar a uma resposta ao questionamento

inicial (Frédérich *et al.*, 2009). A identificação dos metabólitos responsáveis pelas diferenças entre as classes é de suma importância, mas nem sempre é obtida.

A metabolômica tem por objetivo identificar e quantificar o metaboloma. O metaboloma pode ser definido como todas as moléculas com baixa massa molar (metabólitos) presentes em uma célula participante de uma rede de transformações químicas enzimaticamente controladas. O metaboloma fornece os metabólitos primários e secundários que são os verdadeiros produtos da expressão gênica e, em um determinado conjunto de condições fisiológicas, são as representações do fenotipo (Last *et al.*, 2007).

1.1.1 Técnicas analíticas aplicadas em metabolômica

O estudo do metaboloma pode ser realizado, utilizando-se das mais diversas técnicas, tais como espectroscopia no ultravioleta-visível (UV-Vís), espectroscopia no infravermelho (IV) (Goodacre, 2005; Defernez e Wilson, 1997), espectrometria de massas (EM) e ressonância magnética nuclear (RMN), ou ainda, através de técnicas cromatográficas. Também é comum no estudo do metaboloma o uso de técnicas hifenizadas como CG-EM ou CL-EM. No entanto, nenhum dos métodos analíticos existentes é capaz de alcançar o objetivo ambicioso da metabolômica, que é a identificação e quantificação de todos os metabólitos. De fato, um número muito grande de substâncias com propriedades químicas distintas, que podem ser instáveis ou estar presentes em diferentes concentrações, faz com que a escolha do método analítico seja um fator extremamente importante na metabolômica. Cada um dos métodos utilizados atualmente tem seus pontos fortes e fracos, todos eles relacionados tanto a uma enorme variedade nas propriedades químicas e físicas dos metabólitos, como a grande variação na massa molar, na

polaridade, volatilidade, estabilidade e, por último, mas não menos importante, sua concentração. A identificação e quantificação dos metabólitos são fatores determinantes no estudo do metaboloma. Neste sentido, a espectrometria de massas (EM) e a ressonância magnética nuclear (RMN) são as técnicas analíticas mais utilizadas.

1.1.1.1 Espectrometria de massas

A espectrometria de massas apresenta algumas metodologias distintas, variando-se de acordo com método de detecção (TOF-EM, FT-ICR), o método de introdução da amostra (direto, CG, CL) e o método de ionização (impacto de elétrons, MALDI, eletrospray), ela pode ser utilizada com sucesso na análise do metaboloma (Schripsema, 2010). A espectrometria de massas de alta resolução como TOF-EM, Orbitrap e FT-ICR oferece uma excelente combinação de sensibilidade e seletividade, fornecendo informações específicas que estão diretamente relacionadas às estruturas químicas, tais como a massa exata, o padrão de distribuição de isótopos e a fragmentação dos íons, o que permite a elucidação estrutural ou identificação através de comparação com banco de dados. Ademais, a alta sensibilidade permite a detecção em níveis de femtomols (Dettmer *et al.*, 2011).

A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) é uma das técnicas analíticas mais utilizadas em metabolômica, tendo-se assim a combinação da elevada eficiência de separação e da resolução da CG com a alta sensibilidade de detecção da EM. A CG-EM é usada para se analisar qualitativamente e quantitativamente uma variedade de metabólitos com alta reprodutibilidade. A identificação dos metabólitos é realizada pela comparação dos tempos de retenção e dos espectros de massas obtidos a partir da amostra, com aqueles dos

compostos puros, previamente analisados sob as mesmas condições experimentais. Muitos bancos de dados comerciais e de domínio público (por exemplo, NIST, Golm metaboloma, NIH) podem ajudar na identificação dos metabólitos. No entanto, esses bancos de dados não contêm todos os metabólitos esperados num metaboloma (Scalbert *et al.*, 2009). Uma grande desvantagem da CG-EM é o fato de que apenas compostos voláteis podem ser analisados. Além disso, eles devem ser termoestáveis durante a análise. Todavia, muitos compostos não voláteis, como açúcares e aminoácidos, podem ser convertidos em derivados sililados, acetilados ou metilados voláteis, e serem, então, analisados (Halket *et al.*, 2005).

Os recentes avanços envolvendo as técnicas de ionização à pressão atmosférica tais como ionização por eletrospray (IES), ionização química à pressão atmosférica (IQPA) e, mais recentemente, a fotoionização à pressão atmosférica (FIPA), possibilitaram a junção de duas ferramentas analíticas: a espectrometria de massas e a cromatografia líquida de alta eficiência, tendo-se assim um método (CLAE-EM) robusto e aplicável a uma grande variedade de matrizes. Dessa forma, a CLAE-EM tornou-se uma ferramenta universal, capaz de analisar desde metabólitos de baixa massa molar até moléculas de alta massa como, por exemplo, proteínas (Pereira *et al.*, 2005; Chiaradia *et al.*, 2008). A CLAE-EM é amplamente empregada no estudo do metaboloma. Os métodos utilizados permitem a obtenção de íons a partir de moléculas sensíveis à temperatura e/ou pouco voláteis (Dunn e Elli, 2005). Ademais, a CLAE-EM também permite a recuperação do analito através da coleta de frações, o que é mais difícil quando se usa CG-EM (Bedair e Sumner, 2008). Uma das desvantagens da CLAE-EM em relação à CG-EM na análise do metaboloma é a falta de bancos de dados para a identificação dos metabólitos. O espectro de massas apresenta baixa reprodutibilidade (Halket *et al.*, 2005), embora o íon molecular quase sempre está presente em estudos por CLAE-EM. Desse modo, a massa pode ser usada para

pesquisas em bancos de dados de metabólitos, tais como a base de dados METLIN (Tautenhahn *et al.*, 2012).

Os estudos do metaboloma utilizando a CG-EM e a CLAE-EM são relativamente trabalhosos, requerendo longos tempos de preparo das amostras. Quando a quantificação é desejada, curvas de calibração para cada substância são requeridas, devido à diferença de resposta aos detectores CG (EM) e CL (EM, UV e DAD).

1.1.1.2 Ressonância magnética nuclear

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) é uma das mais importantes técnicas analíticas, com relevantes aplicações na metabolômica. A RMN é um fenômeno, que pode ser observado para qualquer átomo que contenha spin nuclear diferente de zero ($I \neq 0$). Esses átomos, devido a sua configuração nuclear, possuem propriedades giromagnéticas intrínsecas, devido a seus momentos angulares e magnéticos, que os fazem detectáveis por RMN. Todos os metabólitos podem apresentar em suas estruturas átomos de hidrogênio, carbono, nitrogênio, oxigênio e fósforo. Esses elementos têm alguns isótopos com $I \neq 0$, sendo os isótopos ^1H , ^{13}C e ^{15}N os mais importantes para o estudo do metaboloma. O isótopo de hidrogênio de massa atômica igual a 1, o ^1H , é o mais utilizado, devido a sua sensibilidade e sua elevada abundância natural (Krishnan *et al.*, 2005).

O uso generalizado da RMN para estudos clássicos de metabólitos, juntamente com a ampla possibilidade de sua utilização em misturas complexas, fez com que essa técnica se tornasse a plataforma de tecnologia preferida no campo da metabolômica (German *et al.*, 2005). Embora outras tecnologias, como a CG-EM e a CL-EM sejam muito empregadas em

metabolômica, a RMN ainda tem um número ímpar de vantagens. Em particular, a RMN exige pouca ou nenhuma separação da amostra e permite a detecção simultânea de diversas classes de substâncias de uma forma não objetivada. A análise por RMN é não destrutiva e não requer condições especiais de análise, as quais são necessárias para EM ou condições cromatográficas (e.g. fase estacionária, fase móvel, temperatura).

A RMN é uma técnica não direcionada, tendo como limitação apenas a incapacidade de realizar análises de traços. Cada substância tem um espectro específico e as únicas variáveis são o solvente usado e a intensidade do campo magnético aplicado, que podem ser facilmente padronizáveis. A alta reprodutibilidade torna a RMN, dentre os outros métodos, o mais adequado para a formação de um banco de dados de metabolômica de domínio público, que poderá ser usado por muitos anos. Apesar de o método apresentar baixa sensibilidade se comparado à EM, a eficiência do RMN pode ser melhorada usando as técnicas em dupla dimensão (RMN 2D), que resolvem ou amenizam o problema da superposição dos sinais. A sensibilidade também pode ser melhorada pelo aperfeiçoamento dos equipamentos e aparatos utilizados na obtenção dos espectros (Kim *et al.*, 2010). Dentre eles, destacam-se a utilização de sondas criogênicas (CryoProbe, Bruker, ou ColdProbe, Agilent), o aumento do campo e a redução do volume do solvente com o uso de microsondas inversas multinucleares, o que permite a análise de poucos microlitros de solução (MicroProbe ou NanoProbe).

A metabolômica realizada por RMN é uma ferramenta poderosa, que pode ser aplicada à química de produtos naturais. Dentre as inúmeras aplicações destacam-se: 1) A classificação e a caracterização de diferentes espécies de plantas, através de uma visão geral dos metabólitos presentes numa determinada espécie, proporcionando uma classificação quimiotaxonômica. Em se tratando de plantas medicinais, a metabolômica auxilia no controle de qualidade de um extrato

ou planta. Considerando que a atividade é atribuída ao extrato ou planta como um todo, a presença de todos os metabólitos é uma garantia de eficácia farmacológica. 2) Monitoramento da resposta de um indivíduo quando exposto a determinado stress, biótico ou abiótico, injúria, herbivoria e/ou infecções. As mudanças metabólicas induzidas por cada um desses fatores podem ser monitoradas pelo acompanhamento da mudança do perfil metabólico. 3) Genômica funcional, analisando-se e comparando-se, por exemplo, os metabólitos de indivíduos geneticamente modificados com aqueles nativos e analisando-se as mudanças de rotas metabólicas induzidas pela engenharia genética (Fiehn, 2002; Last *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2010).

1.1.1.2.1 Ressonância magnética nuclear de hidrogênio

A ressonância magnética de hidrogênio (RMN de ^1H) é uma das técnicas mais usadas nas plataformas metabolômicas uma vez que a maior parte dos metabólitos orgânicos contém o isótopo ^1H e esse apresenta uma alta abundância natural (99,98 %). O estudo do metaboloma utilizando a RMN de ^1H apresenta alta reprodutibilidade e fácil quantificação, uma vez que a intensidade do sinal está diretamente relacionada à concentração em quantidade de matéria relativa da substância (Last *et al.*, 2007). Em outras palavras, a RMN de ^1H reflete os níveis em quantidade de matéria reais dos metabólitos presentes na amostra, além de permitir a caracterização estrutural completa dos metabólitos presentes. Ao se combinarem vários métodos bidimensionais de RMN, muitos sinais podem ser identificados sem a necessidade de um fracionamento do todo (Kim *et al.*, 2010).

1.1.1.2.2 Ressonância magnética nuclear bidimensional

A espectroscopia de RMN bidimensional utilizada para o estudo do metaboloma pode ser dividida em duas classes de experimentos bidimensionais: as que originam mapas de contornos com resolução em J e as que originam mapas de contornos correlacionados (Gil e Gerald, 1987; Kooy *et al.*, 2009). Destaca-se o experimento homonuclear com resolução em J (*J-resolvido*). Dentro da segunda classe, destacam-se a espectroscopia de correlação homonuclear (COSY) e os experimentos heteronucleares: Correlação heteronuclear de múltiplo quanta (HMQC), correlação heteronuclear de quantum simples (HSQC) e de correlação heteronuclear através de múltiplas ligações (HMBC).

1.1.1.2.2.1 *J-resolvido*

No experimento 2D *J-resolvido*, os deslocamentos químicos e os acoplamentos escalares J são separados em duas dimensões independentes e projetados em dois diferentes eixos: o deslocamento químico (δ) no eixo F2, as constantes de acoplamento escalar (J) e multiplicidades no eixo F1. A separação dessas variáveis em dois eixos pode ser melhor visualizada e medida após a manipulação dos dados no computador, girando o espectro absoluto por um ângulo de 45° (Figura 1.1, pág. 11).

O experimento de RMN *J-resolvido* diferencia-se dos experimentos típicos de RMN 2D (por exemplo, COSY ou HSQC), por possuir resolução em J . Esse tipo de experimento é útil para resolver problemas como a sobreposição de sinais, sinais com deslocamentos químicos próximos e para a determinação das constantes de acoplamento (Ludwind e Viant, 2010).

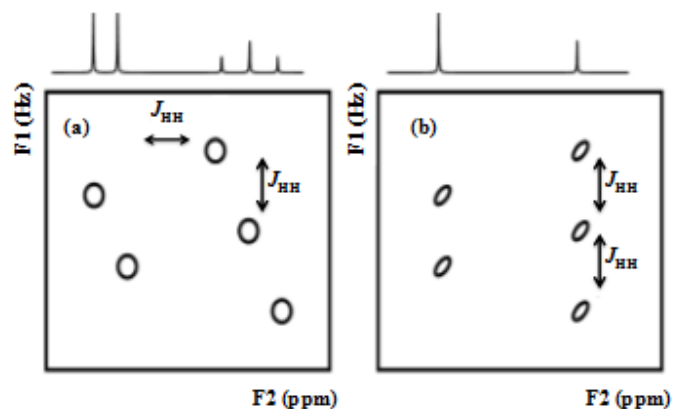


Figura 1.1 - Representação esquemática de um mapa de contorno J -resolvido. O painel (a) mostra o mapa de contorno após a transformação de Fourier, e o painel (b) depois da inclinação de 45° . J_{HH} representa a constante de acoplamento escalar J . (Adaptado de Ludwind e Viant, 2010).

O experimento J -resolvido tem sido aplicado em vários estudos do metaboloma. Para exemplificar, pode-se citar o estudo de Liang e colaboradores (2006), que utiliza o mapa de contornos J -resolvido combinado com técnicas multivariadas para analisar o efeito da aplicação de jasmonato de metila em folhas de *Brassica rapa*. Na região de sinais de hidrogênios aromáticos, o experimento J -resolvido mostrou claramente a presença de dois sinais referentes a compostos indólicos (neoglucobrassicina e ácido indol-3-acético), os quais foram encontrados somente nas plantas expostas ao jasmonato de metila. Também vale mencionar o estudo da resistência de *Dendranthema grandiflora* ao inseto *Frankliniella occidentalis* realizado por Less e colaboradores (2009). Com auxílio do experimento J -resolvido foi possível a atribuição dos sinais característicos dos prótons de fenilpropanoides na região de sinais fenólicos (δ 6,0-8,5). Outro exemplo pode ser encontrado no trabalho de Hendrawati e colaboradores (2006), onde esse

tipo de experimento possibilitou identificar sinais de hidrogênios anoméricos, característicos de glucosinolatos, bem como aqueles referentes ao ácido málico.

1.1.1.2.2.2 Espectroscopia de correlação homonuclear (COSY)

Nesse tipo de metodologia, pode-se determinar quais hidrogênios estão acoplados através de duas ou três ligações ($^{2-3}J_{H,H}$) passíveis de medida no experimento de RMN de ^1H e assim obter os deslocamentos químicos dos núcleos envolvidos no processo (Kaiser, 1999). A modificação da sequência de pulsos do COSY, permite obter correlações devido a acoplamentos a longas distâncias por $^{4-6}J_{H,H}$, os quais são raramente visíveis nos espectros de RMN de ^1H , ou em experimentos COSY de rotina (Kaiser, 1999; Kooy *et al.*, 2009). Todos esses parâmetros são de grande valia para elucidação estrutural de metabólitos. Por exemplo, a análise metabolômica dos extratos de esponjas marinhas por COSY, confirmou a presença da suvanina (Figura 1.2), um sesteterpeno triciclo. As correlações observadas no mapa de contornos COSY confirmaram os acoplamentos entre os hidrogênios que ressonam em δ 7,29 e 7,43 com o hidrogênio que ressona em δ 6,35 (Ali *et al.*, 2013).

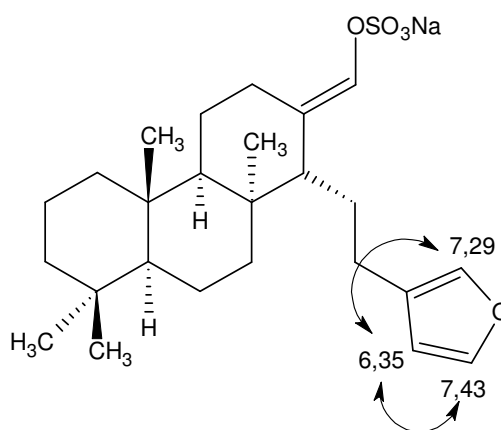


Figura 1.2 - Fórmula estrutural da suvanina.

Apesar do potencial da técnica COSY na identificação de metabólitos em extratos brutos ou semi-purificados, sua interpretação e a identificação dos sinais pertencentes a uma mesma molécula em uma mistura complexa é uma das tarefas mais trabalhosas e demoradas. Para exemplificar, a maioria dos sinais de ^1H dos carboidratos são registrados em uma região extremamente congestionada (δ 3,0-4,5) com os sinais sobrepostos ou ainda com os sinais de hidrogênios de aminoácidos ou ácidos orgânicos (Kooy *et al.*, 2009). O uso das técnicas combinadas *J*-resolvido e COSY podem facilitar esta identificação, que realmente se consolida com o uso das técnicas 2D heteronucleares.

1.1.1.2.2.3 Métodos bidimensionais heteronucleares

Os métodos bidimensionais heteronucleares são utilizados para assinalar os átomos de hidrogênios ligados a núcleos como o ^{13}C , o ^{15}N e o ^{31}P . A técnica depende dos acoplamentos $^nJ_{\text{C,H}}$ e nos experimentos de detecção inversa o espectro é representado com o eixo horizontal (dimensão F2) correspondendo ao deslocamento químico para o núcleo de ^1H e o eixo vertical (dimensão F1) ao deslocamento químico para o núcleo de ^{13}C . Nesse tipo de experimentos, os deslocamentos químicos dos dois núcleos são correlacionados através de transferência de polarização modulada pelo acoplamento escalar.

O acoplamento entre os átomos de carbonos e hidrogênios diretamente ligados ($^1J_{\text{C,H}}$), pode ser detectado por correlação heteronuclear de múltiplo-quanta (HMQC) ou correlação heteronuclear de quantum-simples (HSQC). Em ambos os métodos, os átomos de carbono ligados pelo menos a um hidrogênio são detectados. Um exemplo da utilização da técnica pode ser encontrado no trabalho de Schievano e colaboradores (2012), onde a análise do mapa de

contornos HSQC de extratos clorofórmicos de várias amostras de mel permitiu a atribuição completa de vários sinais de metabólitos, tais como a pinocembrina **(1)**, a cafeína **(2)** e a desidrovomifoliol **(3)** (Figura 1.3).

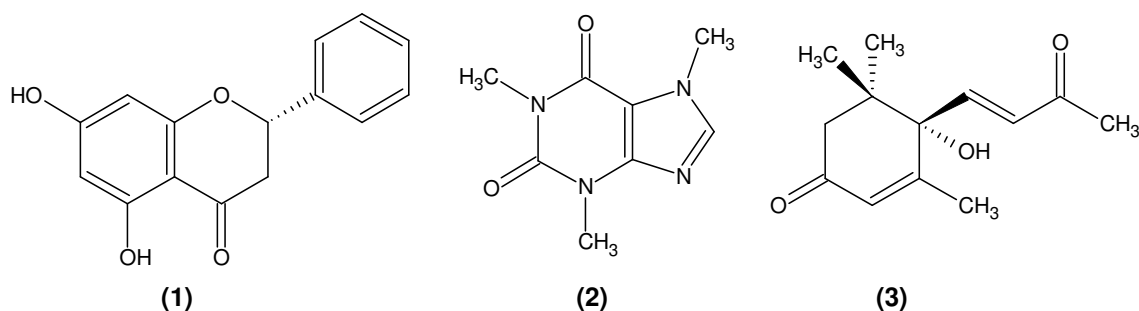


Figura 1.3 - Fórmulas estruturais dos compostos pinocembrina **(1)**, cafeína **(2)** e desidrovomifoliol **(3)**.

Correlações de longa distância entre ressonâncias de carbonos e hidrogênios podem ser registradas pelo experimento de correlação heteronuclear através de múltiplas ligações ($^nJ_{C,H}$, HMBC). É uma das técnicas de grande valia para elucidação estrutural, pois permite obter indiretamente as conectividades entre carbono-carbono, com o auxílio dos experimentos HMQC ou HSQC. Correlações entre os hidrogênios vizinhos e carbonos que não portam hidrogênio(s) (“não-hidrogenados”), como carbonilas de ácidos, amidas e ésteres, por exemplo, podem ser registradas. Os acoplamentos de longo alcance observados no mapa de contornos HMBC fornecem ainda informações sobre a conectividade entre dois grupos que estão ligados apenas por carbonos “não-hidrogenados” ou heteroátomos (por exemplo, N em alcaloides).

1.2 Análise multivariada

1.2.1 Análise de componentes principais

A análise de componentes principais, do inglês, “Principal Component Analysis” (PCA) é um modelo matemático da matriz de dados que objetiva reduzir a dimensionalidade original da mesma. Torna-se muito útil, quando o conjunto de amostras possui informações de um grande número de variáveis, como no caso de dados espectroscópicos. O que uma PCA faz é descrever a variância de um conjunto de dados multivariados em termos de um conjunto de variáveis ortogonais subjacentes, denominadas componentes principais (PC). Dessa forma, é possível descrever as informações com um número menor de variáveis do que as originalmente presentes (Otto, 1999).

Um padrão típico de dados é reconhecido por uma classe ou várias classes de observações através da PCA. O padrão de uma classe providencia informações sobre as relações entre as observações dentro das classes, mostrando aquelas que são relacionadas e aquelas que se encontram completamente fora do padrão estabelecido. Neste sentido, a PCA é um método não supervisionado que pode ser caracterizado como exploratório, uma vez que auxilia na elaboração de hipóteses gerais a partir dos dados coletados. O agrupamento das amostras define a estrutura dos dados através de gráficos de escores e pesos cujos eixos são as componentes principais (PCs), onde os dados são projetados.

Os escores podem ser representados graficamente em um mapa de componentes principais. Uma vez que, na maioria dos casos, grande parte da variância é retida nos primeiros componentes principais, os dados após a análise de PCA podem ser representados em um mapa de

componentes principais em duas ou três dimensões, descrevendo a maioria das informações presentes nos dados e facilitando a sua interpretação (Otto, 1999). Desse modo, a projeção dos dados no espaço definido pelo número de PCs utilizadas na análise por PCA fornece um parâmetro útil para estudar as inter-relações entre as amostras, pois escores similares significam variáveis similares.

Os espectros de RMN de ^1H de amostras biológicas (tecidos, extratos de tecidos e fluidos biológicos) contêm um grande número de sinais e, em muitos casos, a simples inspeção visual destes espectros revela apenas uma pequena quantidade de informação. Sabe-se que esses espectros são ricos em informações sobre a constituição química da amostra, o que possibilita inferir informações sobre propriedades químicas, físicas e biológicas de um material. Usando uma modelagem quimiométrica, pode-se formalizar um processo de correlação entre essas propriedades e seu espectro. Assim, métodos quimiométricos têm sido utilizados para extrair o máximo de informações desses sistemas multivariados (Wishart, 2008).

Nas análises quimiométricas, os dados obtidos sobre as amostras são organizados em uma única planilha, a qual é constituída por “ n ” amostras e “ m ” variáveis, resultando em uma matriz “ $n \times m$ ” (Figura 1.4, pág. 17). Ao se realizar determinados experimentos em uma amostra, os resultados podem ser expressos em termos de concentração, intensidade do sinal, absorvância, entre outros parâmetros. No caso da RMN de ^1H , por exemplo, os espectros podem ser convertidos em uma tabela de área *versus* intervalo de deslocamento químico. Para evitar que pequenas variações no deslocamento químico entre os espectros dificultem a PCA, é feito o alinhamento do sinal. Assim, o espectro é dividido em pequenos intervalos de deslocamentos químicos (geralmente são utilizados intervalos entre δ 0,01 e 0,04) conhecidos como “bins ou buckets”. O objetivo do “bucketing” é obter um novo espectro no qual cada “buckets” de δ 0,04,

corresponda à integral de todos os sinais presentes na respectiva janela espectral. Outra possibilidade para construir a matriz envolve o uso de todos os pontos sem a subdivisão do espectro. Desse modo, a matriz é construída a partir da intensidade dos sinais *versus* o deslocamento químico (Lião *et al.*, 2010; Kuhnen *et al.*, 2010).

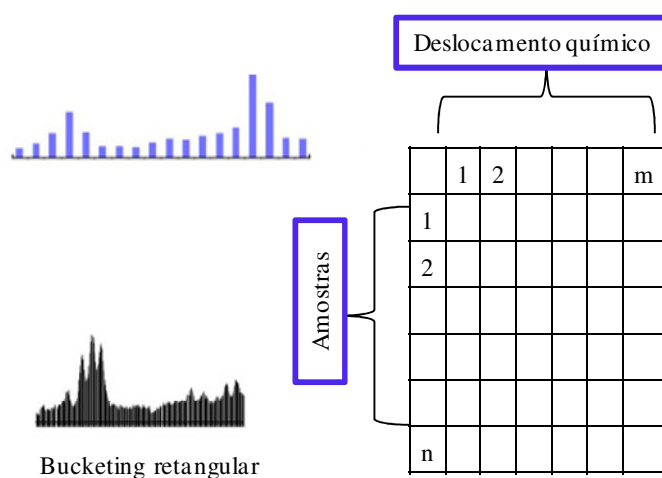


Figura 1.4 - Esquema para obtenção de uma matriz $n \times m$ a partir dos espectros de RMN de ^1H . (Adaptado do manual do software AMIX®, 2008).

Quando é observada a distinção entre os conjuntos de amostras nas análises por PCA pela projeção das amostras no gráfico de escores, é possível verificar quais as variáveis que mais influenciaram na ocorrência da discriminação. Essa informação é resultado da análise dos gráficos de peso, o qual é obtido em conjunto com os gráficos de escores e tem por objetivo explicar o resultado destes (Beebe *et al.*, 1998). Portanto, em uma discriminação obtida a partir de espectros de RMN, a análise dos gráficos de pesos permite inferir sobre quais substâncias caracterizam um ou outro grupo de amostras, seja simplesmente por variações na concentração

ou pela presença ou ausência de compostos, possibilitando, por exemplo, identificar biomarcadores (Nicholson e Lindon, 2008).

1.2.2 Análise de agrupamentos hierárquicos

A análise de agrupamentos hierárquicos, do inglês, “Hierarchical Cluster Analysis” (HCA) é também um método de classificação de dados. Ela engloba uma variedade de técnicas e algoritmos, cujo objetivo principal é a descoberta de grupos naturais nos itens ou variáveis, sendo considerada uma importante técnica exploratória, na qual nenhuma suposição é feita a respeito do número de grupos ou de sua estrutura. Na HCA as distâncias interpontuais entre todas as amostras do conjunto de dados são representadas na forma de um gráfico bidimensional chamado dendrograma. Por meio do dendrograma, pode-se visualizar os agrupamentos e similaridades entre as amostras e/ou variáveis. O objetivo da HCA é exibir os dados em um espaço bidimensional de maneira a enfatizar os seus agrupamentos e padrões naturais. A distância entre os pontos (amostras ou variáveis) reflete a similaridade de suas propriedades, sendo útil para determinar a semelhança entre amostras.

1.2.3 Regressão por mínimos quadrados parciais

A regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) é um método de regressão multivariada que relaciona uma matriz de dados \mathbf{X} com uma matriz resposta \mathbf{Y} , que pode ser singular (uma variável, uma resposta) ou múltipla [várias variáveis, uma (várias) resposta(s)]. Desta forma PLS é uma poderosa ferramenta para relacionar dados espectroscópicos com uma

resposta biológica. A equação de regressão para descrever a resposta Y como uma combinação linear da matriz X e os coeficientes de regressão, é expressa na equação 1.1.

$$Y = XB + F \quad 1.1$$

Onde F é a informação remanescente que não foi modelada e B é a matriz dos coeficientes de regressão.

A PLS está fundamentada na PCA e difere de um modelo PCA porque determina correlações quantitativas entre os dados contidos em duas matrizes. O método PLS é usado na calibração multivariada, onde as variáveis dependentes Y (por exemplo, atividade biológica e qualidade do produto) intervêm diretamente na decomposição em componentes principais (variáveis latentes) das variáveis independentes X (espectros). Essas novas variáveis são, na realidade, combinações lineares das componentes principais calculadas pelo método PCA (Cunha Junior *et al.*, 2003).

1.3 Nematoides de galhas

Os fitonematoides são parasitas altamente especializados que infestam plantas, utilizando uma vasta gama de estratégias. Esses animais microscópicos parasitam principalmente as raízes das plantas, embora algumas espécies possam parasitar outras partes (Haegeman *et al.*, 2012). Dentre esses patógenos destacam-se os nematoides de galhas (*Meloidogyne* spp.), que causam consideráveis perdas econômicas. Frequentemente são citadas reduções de até 10% na produção de diversas culturas (Molinari, 2009) devido à infestação por esses animais. No entanto,

dependendo do gênero, das espécies cultivadas de plantas e do nível de população do nematoide (Ornat e Sorribas, 2008), percentagens mais elevadas já foram registradas. Por exemplo, Sikora e Fernández (2005) relataram perdas no rendimento de mais de 30% em três culturas vegetais altamente suscetíveis (berinjela, tomate e melão).

Os nematicidas sintéticos têm sido utilizados como o principal método de controle dos fitonematoides, entretanto apresentam algumas limitações, como por exemplo, a natureza temporária do controle obtido, a possibilidade de acumulação dos materiais tóxicos no solo e riscos à saúde humana (Chitwood, 2002). Como consequência, tem-se reduzido a disponibilidade desses compostos. O brometo de metila, um dos agentes químicos fumigantes mais importantes usados para o controle de nematoides e outras pragas, afeta um grande número de organismos, e foi definido como uma substância que contribui para a destruição da camada de ozônio (Carpenter *et al.*, 2001). Em decorrência, o uso do brometo de metila foi proibido em 2005 nos países desenvolvidos e será retirado dos países em desenvolvimento até 2015.

A rotatividade de culturas com espécies não hospedeiras e ou antagônicas tem se revelado como um método básico para sistemas integrados de controle de fitonematoides (Rosa *et al.*, 2003). Esse método é capaz de manter as populações desses patógenos abaixo do nível capaz de causar dano econômico, sem oferecer riscos ao ambiente e minimizando o uso de nematicidas (Ferraz e Valle, 1995). Entretanto, existem várias culturas, principalmente as perenes, que apresentam grandes dificuldades quanto à implementação de tais metodologias (Sasser e Carter, 1985; Starr *et al.*, 2002; Viaene, 1998).

Para algumas culturas, os nematoides de galhas podem ser controlados pelo uso de genes para resistência. Em *Solanum lycopersicum*, a resistência ao *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria* é atribuída ao gene de resistência Mi-3 (Roberts e Thomason, 1989), que foi

identificado em espécies selvagens de tomate *S. peruvianum*. Esse gene foi a fonte de resistência aos nematoides de galha por mais de 40 anos em todos os cultivares de tomates resistentes. No entanto, populações de *Meloidogyne* capazes de contornar tal resistência já foram identificadas. Por exemplo, Rodríguez *et al.* (2007), ao realizarem testes de parasitismo de *M. mayaguensis* com diferentes espécies botânicas, demonstraram que o feijoeiro comum (IPA-9), o caupi (IPA-206) e os cultivares de tomateiros Santa Cruz e Viradouro, portadores do gene Mi, se mostraram suscetíveis a essa espécie de nematoide.

Métodos de controle de *Meloidogyne* pelo emprego de microrganismos antagônicos a nematoides têm sido estudados por vários pesquisadores, que em geral, optam por trabalhar com fungos e bactérias. Entre esses microrganismos, os fungos têm se destacado, mostrando um grande potencial (Stirling, 1991). Como exemplo, é possível mencionar os fungos da espécie *Trichoderma* spp, que são potenciais agentes de controle biológico de nematoides (Spiegel e Chet, 1998). Vários mecanismos possíveis têm sido sugeridos, incluindo a indução de respostas de defesa das plantas, pela produção de metabólitos antifúngicos, por exemplo, ou a competição por nutrientes (Howell, 2003). Dentre as bactérias, destacam-se as do gênero *Pasteuria*, que aderem à cutícula do nematoide para nele penetrar em seguida. Portanto, urge que novas abordagens objetivando a descobertas de novas formas de controle de nematoides sejam estimuladas.

1.4 Resistência de anonáceas aos nematoides de galhas

A resistência de uma planta pode ser definida como a capacidade em atrasar ou evitar a entrada, ou o desenvolvimento de um patógeno em seus tecidos (Stadnik e Maraschin, 2004). As

plantas possuem complexos mecanismos de defesa aos patógenos. Alguns desses mecanismos são constitutivos, representados por estruturas físicas como camada de ceras, cutícula, parede celular espessa, tricomas, adaptações em estômatos e fibras vasculares; também podem ser substâncias químicas como os fenóis, alcaloides, lactonas insaturadas, glicosídeos fenólicos, glicosídeos cianogênicos, fitotoxinas, inibidores proteicos e enzimas hidrolíticas (Agrios, 2005). Por outro lado, existem mecanismos de defesa que são ativados após o reconhecimento do agente agressor pelo hospedeiro, denominados mecanismos induzidos. Esses mecanismos podem envolver a formação de papilas, halos, lignificação, camada de cortiça e formação de tiloses, além da síntese de compostos como as fitoalexinas, metabólitos secundários e espécies ativas de oxigênio (Pesdras *et al.*, 2009)

Em geral, as plantas resistentes aos nematoides de galhas não impedem a penetração de juvenis destes parasitas em seus sistemas radiculares, mas afetam o desenvolvimento ou a reprodução do nematoide. Para tanto, acredita-se que, em vários casos, a presença do nematoide nas raízes desencadeie um processo de defesa da planta, que ocorre através de mudanças nas suas produções metabólicas (Roberts, 2002). Todas as plantas cultiváveis podem ser atacadas por fitonematoides, cuja presença no solo pode passar despercebida pelos agricultores, devido ao seu tamanho reduzido e ao fato de nem sempre apresentarem sintomas visíveis nas plantas atacadas.

A família Annonaceae compreende cerca de 2300 espécies distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. A família se destaca pela grande diversidade química de seus constituintes. De uma maneira geral, observa-se uma especialização de alguns gêneros na capacidade de sintetizar diferentes e específicos tipos de metabólitos.

Plantas pertencentes ao gênero *Annona* são reconhecidas há séculos por suas propriedades inseticidas e parasiticidas. Hoje acredita-se que essa atividade é atribuída à classe de produtos

naturais conhecida como acetogeninas (Pimenta, 1995). Anonina I, uma acetogenina bis-tetraidrofurânica isolada de *Annona squamosa* apresentou grande atividade ovicida e larvicida sobre *Drosophila melanogaster*. O extrato em acetato de etila de *A. squamosa* em solução aquosa apresentou potencial anti-helmíntico sobre nematoides gastrointestinais de ovinos e caprinos, inibindo em 99% a eclosão de larvas de *Haemonchus contortus* (Strongylida: Trichostrongylidae) na concentração de 5 mg/mL (Souza, 2003). Extratos, frações e acetogeninas de *Annona squamosa* e *Annona muricata* também foram ativos em diferentes pragas agrícolas como *Plutella xylostella* Linnaeus, *Spodoptera frugiperda* e *Spodoptera litura* Fabricius (Saito *et al.*, 1990).

Espécies do gênero *Annona*, como *A. coriacea*, *A. squamosa* e *A. muricata*, são resistentes aos nematoides de galhas (Rossi, 2002). Monteiro e colaboradores (1996) verificaram a resistência da *A. squamosa* à espécie *Meloidogyne exigua*. Segundo Ferraz e Valle (1997), as anonáceas, principalmente a *A. squamosa*, produzem compostos que são tóxicos aos nematoides de galha, embora não se tenha conhecimento das estruturas desses compostos. Nos trabalhos realizados por Ribeiro e colaboradores (2004), observou-se que a *A. squamosa* e a *A. muricata* se comportaram como resistentes a *M. javanica*, sendo essas indicadas para o plantio em solos infestados com essa espécie.

1.5 Referências bibliográficas

- Agrios, G. N. Plant pathology. Burlington, MA: Elsevier Academic, 2005. 922p.
- Ali, K., Iqbal, M., Yuliana, N.D., Lee, Y., Park, S., Han, S., Lee, J., Lee, H., Verpoorte, R., Choi, Y.H. Identification of bioactive metabolites against adenosine A1 receptor using NMR-based metabolomics. *Metabolomics*, v.9, p. 778-785, 2013.
- Bedair, M., Sumner, L.W. Current and emerging mass-spectrometry technologies for metabolomics. *Trends in Analytical Chemistry*, v.27, p.238-250, 2008.
- Beebe, K.R., Pell, R.J., Seasholtz, M.B. Chemometrics: A practical guide. New York: Wiley, 1998.
- Broeckling, C.D., Huhman, D.V., Farag, M.A., Smith, J.T., May, G.D., Mendes, P., Dixon, R.A., Sumner, L.W. Metabolic profiling of *Medicago truncatula* cell cultures reveals the effects of biotic and abiotic elicitors on metabolism. *Journal of Experimental Botany*, v.56, p. 323-336, 2005.
- Carpenter, S.R., Cole, J.J., Hodgson, J.R., Kitchell, J.F., Pace, M.L., Bade, D., Cottingham, K.L., Essington, T.E., Houser, J.N., Schindler, D.E. Trophic cascades, nutrients and lake productivity: Whole-lake experiments. *Ecological Monographs*, v.71, p. 163-186, 2001.
- Chiaradia, M. C., Collins, H. C., Jardim, I. C. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. *Química Nova*, v.31, p. 623-636, 2008.
- Chitwood, D. J. Phytochemical based strategies for nematode control. *Annual Review of Phytopathology*, v.40, p. 221-249, 2002.

- Choi, H.K., Choi, Y.H., Verberne, M., Lefeber, A.W.M., Erkelens, C., Verpoorte, R. Metabolic fingerprinting of wild type and transgenic tobacco plants by ^1H NMR and multivariate analysis technique. *Phytochemistry*, v.65, p.857-864, 2004.
- Cunha Jr., A.P., Cunha, V.P.P., Silveira Jr., L., Martin, A.A. Modelo de calibração da concentração de metilmetacrilato em solução aquosa utilizando espectroscopia de absorção no ultravioleta. *Química Nova*, v.26, p.850-54, 2003.
- Defernez, M., Wilson, R.H. Infrared spectroscopy: instrumental factors affecting the long-term validity of chemometrics models. *Analytical Chemistry*, v.69, p.1288-1294, 1997.
- Dettmer, K., Aronov, P.A., Hammock, B.D. Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrometry Reviews*, v.26, p. 51–78, 2007.
- Dunn, W.B., Bailey, N.J.C., Johnson, H.E. Measuring the metabolome: current analytical technologies. *Analyst*, v.130, p. 606-625, 2005.
- Dunn, W.B., Ellis, D. I. Metabolomics: current analytical platforms and methodologies. *Trends in Analytical Chemistry*, v.24, p. 285-294, 2005.
- Ferraz, S., Valle L.A.C. Controle de fitonematóides por plantas antagonistas. Viçosa, UFV, 1997.
- Ferraz, S., Valle, L. A. C. Utilização de plantas antagônicas no controle de fitonematóides. In: Congresso internacional de nematologia tropical. Rio Quente, SBN/ONTA, 1995.
- Fiehn, O. Metabolomics-the link between genotypes and phenotypes. *Plant Molecular Biology*, v.48, p.155-171, 2002.
- Frédérich, M., Jansen, C., Tullio, P., Tits, M., Demoulin, V., Angenot, L. Metabolomic analysis of Echinacea spp. by ^1H nuclear magnetic resonance spectrometry and multivariate data analysis technique. *Phytochemical Analysis*, v.21, p. 61-65, 2009.

- German, J.B., Hammock, B.D., Watkins, S.M. Metabolomics: Building on a century of biochemistry to guide human health. *Metabolomics*, v.1, p. 3-9, 2005.
- Gil, V. M. S., Geraldes, C. F. G. C. Ressonância magnética nuclear: fundamentos, método e aplicações. Fundação Calouste Gulbekian, 1987, p. 680.
- Goodacre, R. Making sense of the metabolome using evolutionary computation: seeing the wood with the trees. *Journal of Experimental Botany*, v.56, p. 245-254, 2005.
- Haegeman, A., Mantelin, S., Jones, J. T., and Gheysen, G. Functional roles of effectors of plant-parasitic nematodes. *Gene*, v.492, p.19–31, 2012.
- Halket, J.M., Waterman, D., Przyborowska, A.M., Patel, R.K., Fraser, P.D., Bramley, P.M. Chemical derivatization and mass spectral libraries in metabolic profiling by GC/MS and LC/MS/MS. *Journal of Experimental Botany*, v.56, p. 219-243, 2005.
- Harrigan, G.G.; Goodacre, R. *Metabolic Profiling: Its Role in Biomarker Discovery and Gene Function Analysis*. Kluwer Academic Publishers; Boston, 2003.
- Hendrawati, O., Yao, Q., Kim, H.K., Linthorst, H.J.M., Erkelens, C., Lefeber, A.W.M., Choi, Y.H., Verpoorte, R. Metabolic differentiation of *Arabidopsis* treated with methyl jasmonate using nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Plant Science*, v.170, p. 1118-1124, 2006.
- Howell, C. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolutions of current concepts. *Plant Disease*, v.87, p. 4-10, 2003.
- Kaiser, C. R. RMN 2D: Detecção inversa e gradiente de campo na determinação estrutural de compostos orgânicos. *Química Nova*, v.23, p. 231-236, 2000.
- Kim, H.K.; Choi, Y.A.; Verpoorte, R. NMR-based metabolomic analysis of plants. *Nature Protocols*, v.5, p. 36-49, 2010.

- Kooy, F., Maltese, F., Choi, Y.H., Kim, H. K., Verpoorte, R. Quality control of herbal material and phytopharmaceuticals with MS and NMR based metabolic fingerprinting. *Planta Medica*, v.75, p.763-775, 2009.
- Krishnan, P., Kruger, N.J., Ratcliffe, R.G. Metabolite fingerprinting and profiling in plants using NMR. *Journal of Experimental Botany*, v.56, p. 255–265, 2005.
- Kuhnen, S., Ogliari, J.B., Dias, P.F., Boffo, E.F., Correia, I., Ferreira, A.G., Delgadillo, I., Maraschin, M. ATR-FTIR spectroscopy and chemometric analysis applied to discrimination of landrace maize flours produced in southern Brazil. *International Journal of Food Science and Technology*, v.45, p.1673-1681, 2010.
- Last, R.L., Jones, A.D., Shachar-Hill, Y. Towards the plant metabolome and beyond. *Nature Reviews*, v.8, p.167-174, 2007.
- Leiss, K. A., Maltese, F., Choi, Y.H., Verpoorte, R., Klinkhamer, P.G.L. Identification of chlorogenic acid as a resistance factor for *Thrips* in *Chrysanthemum*. *Plant Physiology*, v.150, p. 1567-1575, 2009.
- Liang, Y.S., Kim, H.K., Lefeber, A.W.M., Erkelens, C., Choi, Y.H., Verpoorte, R. Identification of phenylpropanoids in methyl jasmonate treated *Brassica rapa* leaves using two dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal of Chromatography A*, v.1112, p. 148-155, 2006.
- Lião, L. M., Choze, R., Cavalcante, P.P.A., Santos, S.C., Ferri, P.H., Ferreira, A.G. Perfil químico de cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris*) pela técnica de high resolution magic angle spinning (HR-MAS). *Química Nova*, v.33, p. 634-638, 2010.
- Ludwig, C., Viant, M.R. Two-dimensional J-resolved NMR spectroscopy: review of a key methodology in the metabolomics toolbox. *Phytochemical Analysis*, v.21, p.22-32, 2010.

- Manual do programa AMIX® de análises quimiométricas. Bruker Biospin, Karlsruhe, 2008.
- Molinari, S. Bioassays on plant: nematode interaction. Bari: Institute of Plant Protection, 2009. 1354p.
- Monteiro, A.R., Oliveira, C.M.G., Kuroki, A. Reação da pinha (*Annona squamosa* L.) a três espécies de fitonematóides. *Scientia Agricola*, v.53, p. 223-225, 1996.
- Nicholson, J. K.; Lindon, J. C. Systems biology: metabonomics. *Nature*, v.455, p.1054-1056, 2008.
- Ornat, C., Sorribas, F. J. Integrated management of root-knot nematodes in Mediterranean horticultural crops. In: Integrated Management and Biocontrol of Vegetable and Grain Crops Nematodes. Eds. Ciancio, A. Mukerji, K. G. Springer, p. 295-320, 2008.
- Otto, M. Chemometrics and computer application in analytical chemistry. Weinheim, New York, 1999. 314p.
- Patti, G.J., Yanes, O., Siuzdak, G. Innovation: Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. *Nature Reviews*, v.13, p.263-269, 2012.
- Pedras, M., Soledade, C., Okinyo-Owiti, D.P., Thoms, K., Adio, A.M. The biosynthetic pathway of crucifer phytoalexins and phytoanticipins: De novo incorporation of deuterated tryptophans and quasi - natural compounds. *Phytochemistry*, v.70, p.1129-1138, 2009.
- Pereira, A.S., Bicalho, B., Lilla, S., De Nucci, G. Desafios da Química Analítica frente às necessidades da indústria farmacêutica. *Química Nova*, v.28, p. 107-111, 2005.
- Pimenta, L. P. S. Estudo químico bio-monitorado das sementes de *Annona crassiflora* objetivando o isolamento de acetogeninas tetra-hidrofurânicas. Belo Horizonte, UFMG, 1995. Tese de doutorado,

- Ribeiro, R.C.F., Souza, T.H.R., Xavier, A.A., Mizobutsi, E.H., Pereira, F.R., Barros, R.F.X. Reação de diferentes anonáceas a *Meloidogyne javanica*. *Unimontes Científica*, v.6, p. 123-27, 2004.
- Roberts, P.A. Concepts and consequences of resistance. In: Starr J.L., Cook, R., Bridge, J. (eds.). *Plant Resistance to Parasitic Nematodes*. CAB International, 2002.
- Roberts, P.A., Thomason, I.J.. A review of variability in four *Meloidogyne* spp. measured by reproduction on several hosts including *Lycopersicon*. *Agricultural Zoology Reviews*, v.3, p. 225-252, 1998.
- Rodríguez, M., Gómez, L., Peteira, B. *Meloidogyne mayaguensis* Rammah y Hirschmann, plaga emergente para la agricultura tropical y subtropical. *Revista Protección Vegetal*, v.22, p. 183-198, 2007.
- Rosa, R.C.T., Moura, R.M., Pedrosa, E.M.R. Efeitos do uso de *Crotalaria juncea* e carbofuran observados na colheita de cana planta. *Nematologia Brasileira*, v.27, p.167-171, 2003.
- Rossi, C.E. Levantamento, reprodução e patogenicidade de nematóides a fruteiras de clima subtropical e temperado. Piracicaba, ESALQ, 2010. Tese de doutorado, 114p.
- Saito, M. L., Pott, A., Ferraz, J. M. G., Nascimento, R.S. Avaliação de plantas com atividade deterrente alimentar em *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) e *Anticarsia gemmatilis* Hubner. *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, v.14, p.1-10, 2004.
- Sasser, J. N., Carter, C. C. An advanced treatise on *Meloidogyne*: biology and control. Raleigh: United States Agency for International Development, 1985. v.1,150p.
- Scalbert, A., Brennan, L., Fiehn, O., Hankemeier, T., Kristal, B.S., Van Ommen, B., Pujos-Guillot, E., Verheij, E., Wishart, D., Wopereis, S. Mass-spectrometry-based metabolomics:

- limitations and recommendations for future progress with particular focus on nutrition research. *Metabolomics*, v.5, p. 435-458, 2009.
- Schievano, E., Stocchero, M., Morelato, E., Facchin, C., Mammi, S. An NMR-based metabolomic approach to identify the botanical origin of honey. *Metabolomics*, v.8, p. 679-690, 2012.
- Schripsema, J. Application of NMR in plant metabolomics: techniques, problems and prospects. *Phytochemical Analysis*, v.21, p. 14-21, 2010.
- Sikora R.A., Fernandez, E. Nematode parasites of vegetables. In: Luc, M., Sikora, R.A., Bridge, J. (eds.). *Plant-Parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture*, 2° ed. CABI Publishing, Wallingford, p. 319-392, 2005.
- Souza, M. M. C. Avaliação da atividade ovicida de *Annona squamosa* Linnaeus sobre o nematoide *Haemonchus contortus* Rudolphi e toxicidade em camundongos. Fortaleza, UFCE, 2003, Dissertação de mestrado, 88p.
- Spiegel, Y., Chet, I. Evaluation of *Trichoderma* spp. as a biocontrol agent against soilborne fungi and plant-parasitic nematodes in Israel. *Integrated Pest Management Reviews*, v.3, p.169-175, 1998.
- Stadnik, M.J., Maraschin, M. In: Stadnik, M.J., Talamini, V. Florianópolis, SC: CCA/ UFSC, p. 221-244, 2004.
- Starr, J. L., Bridge, J., Cook, R. *Plant resistance to parasitic nematodes*. Cambridge CABI, 2002. 288p.
- Stirling, G.R. *Biological control of plant-parasitic nematodes*. CAB International, 1991. 282p.
- Sumner, L.W., Mendes, P. Dixon, R.A. Plant metabolomics: large-scale phytochemistry in the functional genomics era. *Phytochemistry*, v.62, p. 817-836, 2003.

Tautenhahn, R., Cho, K., Uritboonthai, W., Zhu, Z., Patti, G., Siuzdak, G. An accelerated workflow for untargeted metabolomics using the METLIN database. *Nature Biotechnology*, v.30, p. 826-828, 2012.

Viaene, N. M. Management of *Meloidogyne hapla* on lettuce in organic soil with sudangrass as cover crop. *Plant Disease*, v.82, p. 945-952, 1998.

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

Capítulo 2

ANÁLISE DA RESISTÊNCIA DE *Annona muricata* AO NEMATOIDE

***Meloidogyne javanica* POR ANÁLISE METABOLÔMICA**

EMPREGANDO RMN DE ^1H

2.1 Introdução

Todas as plantas cultiváveis podem ser atacadas por fitonematoides, cuja presença no solo pode passar despercebida pelos agricultores, devido ao seu tamanho reduzido e ao fato de nem sempre apresentarem sintomas visíveis nas plantas atacadas. Como os métodos atualmente disponíveis para o controle de fitonematoides apresentam desvantagens, como a dificuldade de aplicação em algumas localidades e custo elevado, existe uma demanda cada vez maior por novas metodologias menos onerosas e que não contaminem o homem e o ambiente com substâncias de alta toxicidade (Chitwood, 2002; Machado, 2010). Para tanto, uma das possíveis alternativas consiste no emprego de produtos de origem vegetal, já que existem vários relatos na literatura sobre a capacidade de produção de substâncias nematicidas por plantas (Chitwood, 2002). Tais potenciais substâncias para o controle de fitonematoides apresentam características químicas muito variadas e, às vezes complexas. Elas podem ser encontradas nas diferentes classes de produtos naturais como os alcaloides, terpenos, taninos, flavonoides e glicosídeos, dentre outros (Hall, 2006).

Devido ao fato de várias anonáceas apresentarem resistência aos nematoides de galhas e ainda aos relatos das propriedades nematicidas para algumas espécies, desenvolveu-se a hipótese de que plantas do gênero *Annona* possam produzir substâncias nematicidas. No entanto, essa resistência ainda não foi associada a algum metabólito específico. Desta forma, um estudo metabolômico para este gênero poderia contribuir para o entendimento do mecanismo de defesa utilizado por estas espécies resistentes ao nematoide, e ainda, a compreensão da relação planta-nematoide (Campos *et al.*, 2012). A análise metabolômica de plantas inoculadas e não inoculadas poderia contribuir para o desenvolvimento de novos métodos de controle de

fitonematoides. Assim, a RMN de ^1H combinada com técnicas multivariadas foi aplicada para avaliar as respostas metabólicas de plantas de *Annona muricata* expostas ao nematoide *Meloidogyne javanica*.

6.5 Objetivos

Identificar por análise metabolômica utilizando-se a RMN de ^1H , os metabólitos diferenciais nas raízes e folhas de *Annona muricata* após a inoculação com *Meloidogyne javanica*. Também foi objetivo desse estudo, submeter os extratos das raízes de *A. muricata*, antes e após a inoculação com *M. javanica*, a testes *in vitro* contra o nematoide para verificar se houve produção de substâncias nematicidas após a infestação.

2.3 Procedimentos Experimentais

2.3.1 Obtenção das mudas de *Annona muricata*

Sessenta mudas de *A. muricata*, após 90 dias de germinação e altura homogênea, adquiridas no Instituto Estadual de Florestas de Lavras, foram cultivadas em bandejas plásticas contendo substrato, sendo mantidas em casa de vegetação durante todo o experimento.

2.3.2 Inóculo do nematoide

Raízes de tomateiro infestadas com *M. javanica* foram lavadas cuidadosamente e cortadas em pedaços de 1 cm. Em seguida, foram trituradas em liquidificador por 40 s em solução de hipoclorito de sódio a 0,5 % (p/p), seguindo-se a técnica de Hussey e Barker (1973). Os ovos retidos na peneira com poros de 25 µm foram recolhidos e colocados para eclodirem em um funil de Baermann. Os juvenis do segundo estágio (J2) foram recolhidos depois de 48 e 72 horas, sendo descartada a primeira coleta de 24 horas. Uma suspensão aquosa contendo 500 J2/mL foi preparada com o auxílio de lâmina de Peters e microscópio ótico.

2.3.3 Montagem dos experimentos com mudas de *Annona muricata*

Uma suspensão aquosa (2,0 mL) contendo 1000 J2 de *M. javanica*, foi inoculada ao substrato de 30 das 60 mudas de *A. muricata*. Após 1, 2, 4, 20 e 30 dias, as partes aéreas de todas as plantas foram cortadas e os sistemas radiculares foram separados cuidadosamente do substrato e lavados com água. Em seguida, as raízes e as folhas foram congeladas em nitrogênio, moídas,

liofilizadas, e armazenadas em freezer a $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento das extrações dos seus metabólitos.

2.3.4 Preparo dos extratos de *Annona muricata*

2.3.4.1 Extratos polares

Para a obtenção desses extratos, utilizou-se a metodologia descrita por Kim e colaboradores (2010). 50 mg das folhas ou raízes processadas como descrito no item 2.3.3, pág. 35, foram submetidas à extração com uma combinação de 0,75 mL de solução tampão de KH_2PO_4 em D_2O ($\text{pH} = 6,0$), contendo 0,01 % (p/v) do TSP- d_4 como referência interna e 0,75 mL de metanol- d_4 . Após a combinação dos solventes as amostras foram agitadas por 1 minuto em vortex, colocadas em banho de ultrassom por 20 min e centrifugadas a 17.000 rpm. 800 μL do sobrenadante foram transferidos para tubos de RMN com diâmetro de 5 mm. Para cada amostra foram utilizadas três repetições.

2.3.4.2 Extratos de baixa e média polaridade das raízes de *Annona muricata*

Para a obtenção dos extratos, utilizou-se a metodologia descrita por Chatterjee e colaboradores (2010), com adaptações. A massa de 400 mg da raiz de *A. muricata*, foi extraída com 5 mL de hexano. Em seguida, o extrato foi filtrado e esse processo foi repetido por mais três vezes. Os extratos obtidos foram combinados e o solvente foi removido em rotaevaporador, dando origem ao extrato hexânico. O resíduo vegetal foi extraído três vezes com 5 mL de uma

mistura de metanol/água 90 % (v/v). Esse extrato hidroalcoólico foi concentrado no rotaevaporador e em seguida particionado com CHCl_3 . A fase clorofórmica foi separada, secada com sulfato de sódio anidro e filtrada, sendo o solvente removido em rotaevaporador, dando origem ao extrato clorofórmico.

2.3.5 Ressonância magnética nuclear

Os experimentos de RMN foram obtidos em espectrômetros Bruker *AVANCE DRX400* no Laboratório de Ressonância Magnética de Alta Resolução (LAREMAR) do Departamento de Química-ICEx-UFMG.

2.3.5.1 RMN de ^1H : HR-MAS - Alta Resolução com Giro no Ângulo Mágico (do Inglês: High Resolution Magic Angle Spinning)

Os espectros de HR-MAS das folhas de *A. muricata* (item 2.3.3, pág. 35) foram obtidos em um espectrômetro, equipado com sonda HR-MAS de 4 mm, com gradiente de campo no eixo z. O material vegetal moído e 2 gotas de uma solução de DSS $0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ em D_2O foram acondicionados em um rotor de zircônio. Os espectros foram obtidos com giro de 5 kHz, utilizando a sequência de pulsos *cpmgpr*, largura espectral de 20 ppm e 16 promediações. O processamento foi efetuado utilizando o programa TopSpin 1.3.

2.3.5.2 Análise por RMN em solução

Todos os extratos foram analisados por RMN uni e bidimensional utilizando uma sonda multinuclear de detecção inversa (BBI-“*Broadband Inverse*”) de 5 mm. Para realização dos experimentos foram usados os parâmetros descritos por Kim e colaboradores (2010) com algumas adaptações.

Os espectros de RMN de ^1H foram adquiridos a 300 K com janela espectral de 16 ppm, número de pontos 32k, com pré-saturação do sinal de HDO, 128 promediações, tempos de aquisição (AQ) e recuperação (d1) de 2,6 s e 2,0 s, respectivamente. Todos os espectros foram obtidos utilizando-se a sequência de pulsos zgcppr. Para o processamento foi utilizado o alargamento de linha de 0,3 Hz, anterior à transformada de Fourier. As fases e linhas de base foram corrigidas automaticamente utilizando o programa TopSpin 1.3 e, por fim, os espectros foram calibrados pelo sinal do TSP- d_4 em 0,00 ppm (extratos polares, item 2.4.3.1, pág. 36) ou do TMS em 0,00 ppm (extratos de baixa ou média polaridade, item 2.4.3.2, pág. 36).

Os experimentos *J*-resolvido foram adquiridos usando 8 promediações por 32 incrementos, coletados dentro de 16K pontos de dados, com janela espectral de 6,6 kHz em F2 (eixo do deslocamento químico) e 66 Hz em F1 (acoplamento spin-spin). Utilizou-se 1,0 s de tempo de recuperação, resultando em um total de tempo de aquisição de 20 min. A transformada de Fourier foi aplicada, e os dados transformados foram então submetidos ao giro de 45° e simetrizados.

As correlações homonucleares ^1H - ^1H COSY, foram registradas com uma sequência de pulsos padrão de 90°-90° e gradientes de campo na direção do eixo z. Esses experimentos foram adquiridos com tempo de recuperação de 1,0 s e sob a janela espectral de 8 kHz em ambas as

dimensões, tendo sido adquiridos 1024 incrementos com 8 promediações. A transformada de Fourier foi aplicada e os dados transformados foram então simetrizados.

As correlações heteronucleares ^1H - ^{13}C HSQC, foram adquiridas com tempo de recuperação de 1,5 s, janelas espectrais F1 e F2 de 20 kHz e 8 Hz respectivamente. 1024 incrementos em F1 foram coletados com 16 promediações de 2048 pontos para cada FID. A transformada de Fourier foi aplicada, seguida do ajuste de fase.

2.3.6 Análise multivariada

Os espectros de RMN de ^1H (item 2.3.4.1, pág. 36) das folhas e raízes de *Annona muricata* tiveram as fases corrigidas pelo programa ACD NMR Manager. Neste mesmo *software* os espectros foram transformados para arquivos ASCII. A partir desses arquivos foi construída uma matriz com deslocamento químico *versus* intensidade. Essa matriz foi então submetida ao tratamento multivariado de dados com o método de análise de componentes principais (PCA), empregando-se o *software* Pirouette 3.1. Todos os dados foram centrados na média e, antes das análises, as regiões δ 4,75-4,95 e δ 3,20-3,40 foram removidas para eliminar qualquer variabilidade devida à supressão do sinal da água e do metanol.

2.3.7 Análise por cromatografia líquida de alta eficiência

Alíquotas dos extratos clorofórmicos das raízes de *A. muricata* foram analisadas em um cromatógrafo Shimadzu LC10 com sistema de bombeamento isocrático, detector UV-Vís SPD-20A e coluna analítica ODS Hypersil C₁₈ (partículas de 5 μm , dimensão 250 x 10 mm). As

análises foram feitas utilizando os eluentes (A) metanol e (B) água como fase móvel contendo 75% de A e 25 % de B em um intervalo de 0,0 a 60,0 min. O volume de injeção foi de 20 µL, injetado manualmente, com manutenção do fluxo constante a uma taxa de 1,0 mL/min. Todos os dados cromatográficos foram analisados nos comprimentos de onda de 220 e 354 nm.

2.3.8 Análise por espectrometria de massas de alta resolução

Os extratos clorofórmicos, dissolvidos em metanol grau HPLC, foram injetados manualmente em um aparelho Shimadzu LCMS-IT-TOF. O extrato foi analisado no modo de Ionização Química a Pressão Atmosférica (IQPA), sob as seguintes condições: voltagem do detector, 1,70 kV; temperatura da interface 400 °C; temperatura do bloco de aquecimento, 200 °C; fluxo do gás de nebulização (N₂), 2,5 L / min e faixa de detecção de 40 a 1000 m/z.

2.3.9 Teste de mortalidade de *Meloidogyne javanica*

Os experimentos com o nematoide *Meloidogyne javanica* foi realizado na Universidade Federal de Lavras no laboratório de Nematologia sob a supervisão do Prof. Dr Vicente Paulo Campos. Os extratos das raízes e folhas de *A. muricata* (item 2.3.4, pág. 36) foram concentrados em evaporador rotatório, congelados e liofilizados. Os resíduos foram então dissolvidos em solução aquosa de Tween 80 a 1% (p/v) numa concentração de 2000 µg/mL. Em placas de Elisa com cavidade de 300 µL, foram depositados 20 µL da suspensão aquosa contendo de 20 a 30 nematoides J2 de *M. javanica* e, em seguida, adicionaram-se 100 µL dos extratos de *A. muricata*. Empregaram-se quatro repetições para cada extrato avaliado. Como testemunha foi utilizado o

solvente das amostras (Tween 80 a 1% p/v) e água. A placa foi mantida em estufa a 25,5 °C por 48 h. A seguir, uma gota de solução de NaOH 1,0 mol/L foi adicionada ao conteúdo de cada cavidade e os nematoides foram contados. Aqueles retos e imóveis foram considerados mortos, enquanto os retorcidos e móveis foram considerados vivos. Os valores obtidos foram transformados em percentagem de J2 mortos e submetidos à análise de variância, empregando-se o programa computacional SISVAR. As médias foram comparadas segundo o teste de Scott e Knott.

2.4 Resultados e Discussão

2.4.1 Análise por HR-MAS

Inicialmente o perfil químico das folhas de *A. muricata* foi investigado por RMN de ^1H , utilizando a técnica de HR-MAS. O espectro (Figura 2.1, pág. 43) foi adquirido usando a sequência de pulsos cpmgpr para remover os sinais das moléculas com tempo de relaxação transversal (T_2) curto, que surgem devido à presença de proteínas e macromoléculas. Assim, é possível uma melhor visualização dos sinais de moléculas com baixa massa molecular (Bhartir *et al.*, 2011, Lião *et al.*, 2010).

A atribuição dos metabólitos foi realizada por comparação dos espectros com aqueles dos compostos de referência disponíveis no banco de dados do programa Chenomx Suite 7.0. Além do banco de dados do programa, empregaram-se também espectros disponíveis no Biological Magnetic Resonance Data Bank (<http://www.bmrb.wisc.edu>), Colmar Suite of Web Servers (<http://spinportal.magnet.fsu.edu>), além de valores descritos na literatura (Bhartir *et al.*, 2011).

A aplicação de HR-MAS possibilitou a identificação dos seguintes metabólitos: colina, betaína, glicose, glicina, ácido guanidoacético, inositol e manitol. Dentre essas substâncias, vale destacar a presença da betaína (Figura 2.2, pág. 43), que pode contribuir significativamente para resistência de plantas a nematoides, pois dados da literatura indicam a redução de 44% do número de ovos de *M. javanica* em *Arabidopsis thaliana* tratadas com betaína (Wu *et al.*, 1998). Ademais, Tyihák e colaboradores (1988) descreveram a correlação entre as concentrações de betaínas e a resistência de *Solanum lycopersicum* ao fungo *Fusarium oxysporum*.

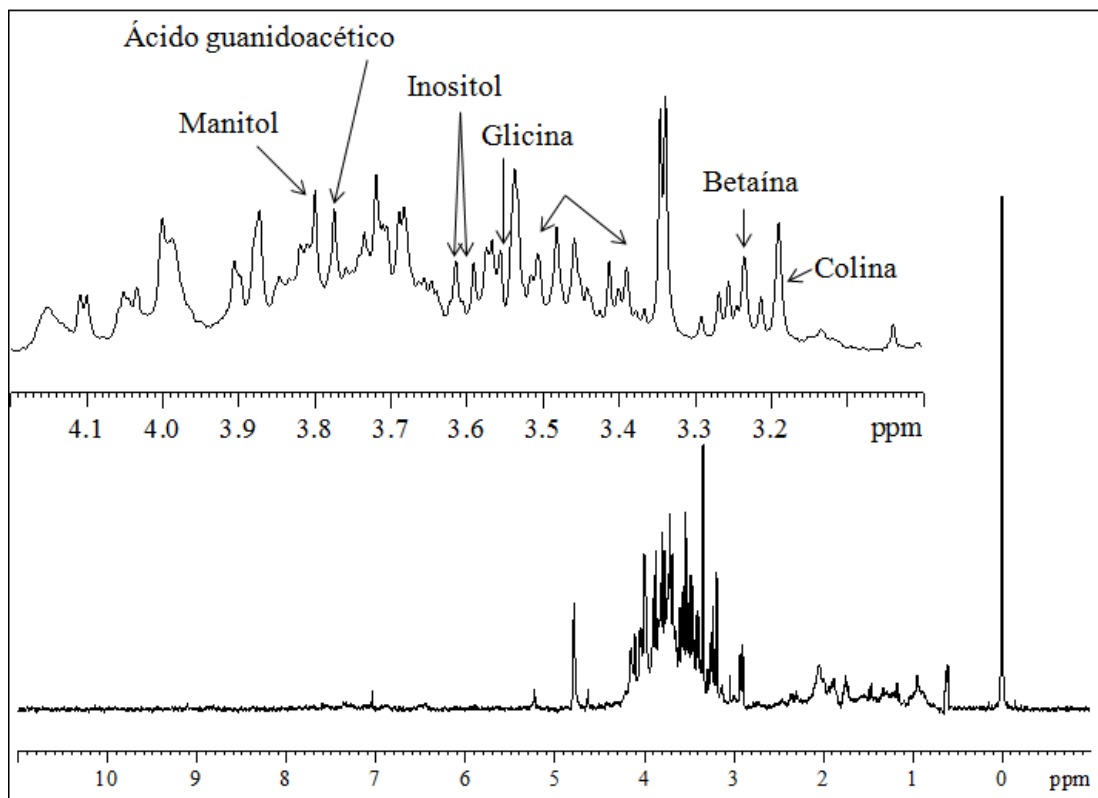


Figura 2.1 - Espectro de RMN HR-MAS de ¹H das folhas de *Annona muricata* (400 MHz, 2 gotas de uma solução de D₂O contendo 1 % de DSS). Ampliação na região de δ 3,20- 4,10.

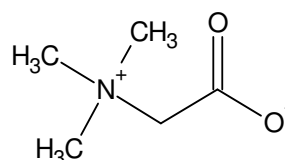


Figura 2.2 - Fórmula estrutural da betaína identificada nas folhas de *Annona muricata*.

Embora a técnica de HR-MAS tenha se mostrado promissora para o objetivo deste trabalho, não foi possível manter a mesma massa de amostra no rotor, fato que inviabilizaria a análise metabolômica. Frente a esse problema optou-se por trabalhar apenas com os

experimentos em solução. Além disso, a resolução do espectro em solução é maior, que a obtida em fase heterogênea na sonda de HR-MAS (Figura 2.3).

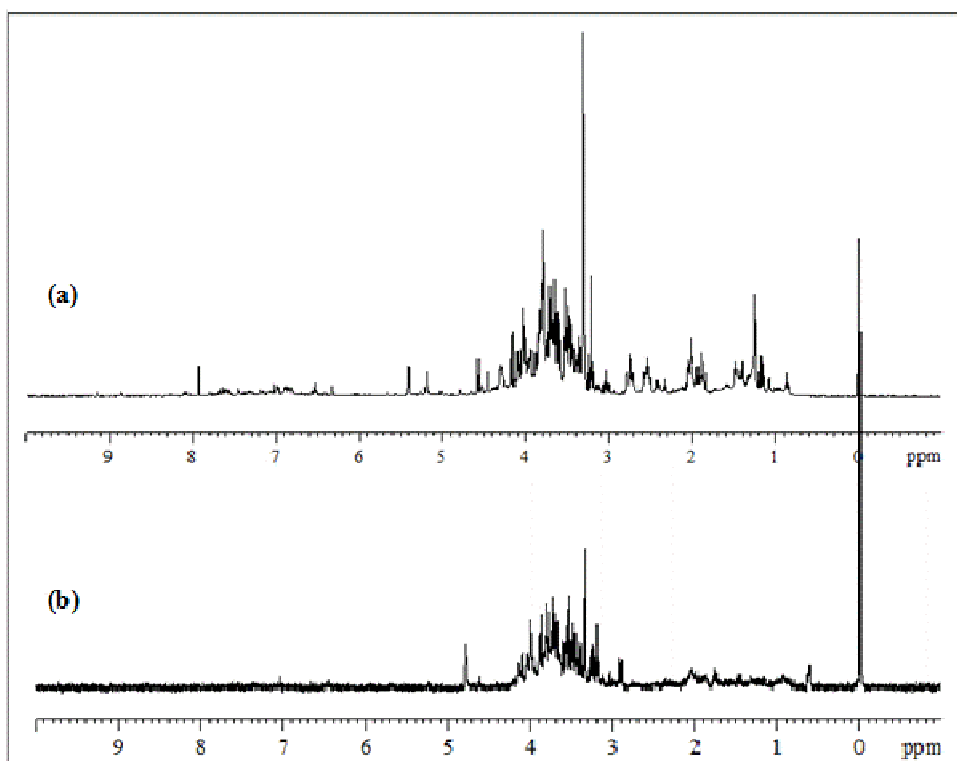


Figura 2.3 – (a) Espectros de RMN de ^1H do extrato das folhas de *Annona muricata* (400 MHz, metanol- d_4 /tampão KH_2PO_4 em D_2O , pH=6). (b) Espectro de HR-MAS de ^1H das folhas de *Annona muricata* (400 MHz, 2 gotas de uma solução em D_2O contendo 1 % de DSS).

2.4.2 Análise multivariada

Para o estudo em solução das amostras dos extratos das raízes e folhas de *A. muricata*, com e sem inoculação por *M. javanica*, foi utilizado como solvente uma mistura de metanol- d_4 e solução de KH_2PO_4 em D_2O (1:1, pH= 6), que foi escolhida por tem sido adequada para extração de inúmeros metabólitos (Verpoorte *et al.*, 2007).

2.4.2.1 Análise multivariada dos extratos das raízes

Para o conjunto de dados obtidos a partir da análise dos extratos polares das raízes de *A. muricata*, 99,61 % da variância foi explicada com um modelo de 12 componentes principais, com os três primeiros componentes explicando 71,17 % da variância. Analisando primeiramente o gráfico de escores para PC1 *versus* PC2 (Figura 2.4, pág. 46), observa-se uma diferenciação das plantas, conforme os dias avaliados. Esse resultado pode estar relacionado ao processo de maturação natural da planta, que é acompanhado por mudanças metabólicas.

Os principais deslocamentos químicos que contribuem para separação apresentada no gráfico de escores podem ser visualizados no gráfico de peso da componente PC1 (Figura 2.5, pág. 47). Para menores tempos de experimentos observam-se sinais intensos na região de δ 3,00-4,50, devidos a ressonâncias de grupos alquila ligados a heteroátomos, característicos de carboidratos. Nas plantas, em geral, as reservas de carboidratos não-estruturais mudam qualitativa e quantitativamente durante os estágios de crescimento. A sacarose, por exemplo, é o principal substrato para a respiração, que mantém o vegetal vivo e ativo. Uma vez translocada a locais não fotossintetizantes, como as raízes, a sacarose é rapidamente convertida em frutose e glicose por enzimas invertases (Borba *et al.*, 2005). Mais ainda, os carboidratos são de grande valia para o estudo da resistência de plantas, pois, além de regularem a expressão de genes do metabolismo primário de plantas, eles também podem regular a expressão de genes específicos de proteínas relacionadas com os ataques por fitopatógenos (Sadka *et al.*, 1994; Ehness *et al.*, 1997).

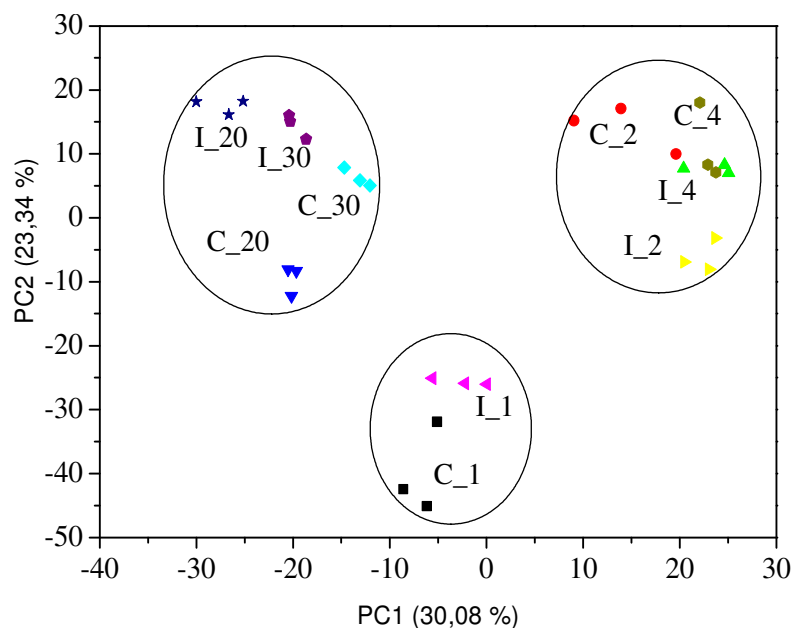


Figura 2.4 - Gráfico de escores da análise de componentes principais (PC1 versus PC2) dos espectros de RMN de ^1H dos extratos das raízes de *Annona muricata* (400 MHz, metanol- d_4 / tampão KH_2PO_4 em D_2O , pH=6). C_x, sendo “C” correspondente às plantas controle e “x” [x = 1(■), 2 (●), 4 (▲), 20 (▼) e 30 (◆)] o tempo após o início do experimento e I_x, correspondente às plantas inoculadas e “x” [x = 1(◀), 2 (▶), 4 (●), 20 (★) e 30 (◆)] o tempo após o início do experimento.

Outra diferenciação marcante pode ser observada na região entre δ 6,60-7,30, típica de compostos fenólicos. Essas substâncias são amplamente utilizadas por plantas como parte do seu mecanismo de defesa contra fitoparasitas. Em decorrência, vários fenóis apresentam potencial para uso no controle de fitonematoides. Outra importante diferenciação está na região entre δ 7,90-8,00, onde são evidenciados sinais característicos de compostos purínicos. Esses compostos são poderosos aleloquímicos naturais que podem repelir e inibir o desenvolvimento de fitoparasitas (Anaya *et al.*, 1982).

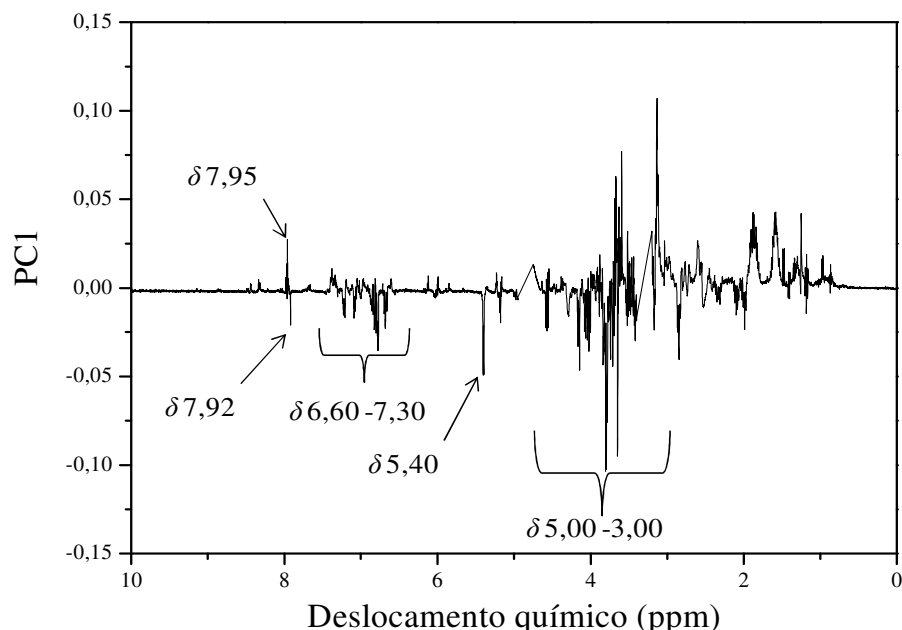


Figura 2.5 - Gráfico de peso obtido a partir dos espectros de RMN de ^1H dos extratos das raízes de *Annona muricata* (400 MHz, metanol- d_4 / tampão KH_2PO_4 em D_2O , pH=6).

O gráfico de escores da PC1 versus PC3 (Figura 2.6, pág. 48), mostra que em relação ao eixo da PC3 ocorre a separação das plantas controle daquelas inoculadas com o nematoide após 1 dia. As plantas controle apresentam valores positivos para a PC3 e as plantas expostas ao nematoide apresentaram valores negativos para a PC3. Para os demais experimentos em diferentes tempos de inoculação não foram observadas diferenças significativas entre as plantas controle e aquelas inoculadas.

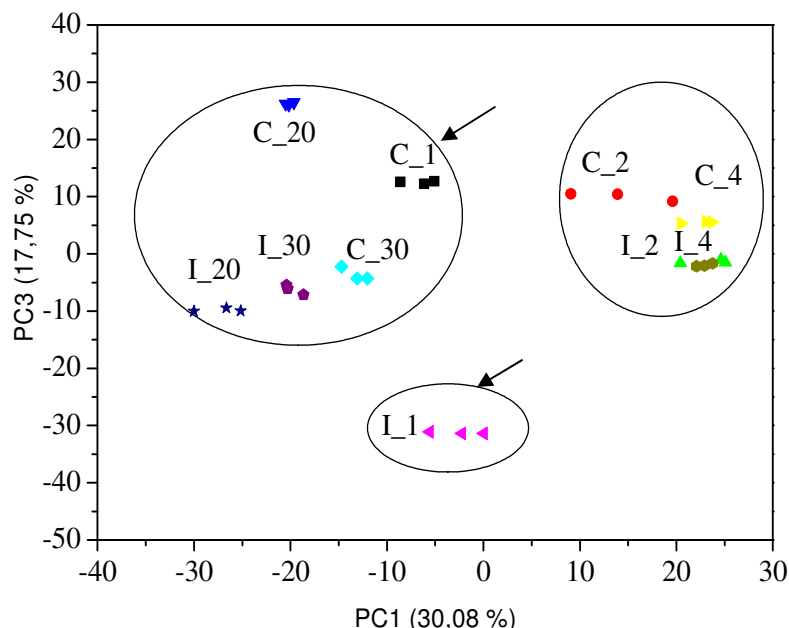


Figura 2.6 - Gráfico de escores da análise de componentes principais (PC1 *versus* PC3) dos espectros de RMN de ^1H dos extratos das raízes de *Annona muricata* (400 MHz, metanol- d_4 / tampão KH_2PO_4 em D_2O , pH=6). C_x, sendo “C” correspondente às plantas controle e “x” [x = 1(■), 2 (●), 4 (▲), 20 (▼) e 30 (◆)] o tempo após o início do experimento e I_x, correspondente às plantas inoculadas e “x” [x = 1(◀), 2 (▶), 4 (●), 20 (★) e 30 (◆)] o tempo após o início do experimento.

Esse resultado sugere que uma resposta de defesa ocorre rapidamente no local da infestação, conhecida como reação de hipersensibilidade (HR) (Stakawicz *et al.*, 1995). Nessa reação, há produção de intermediários reativos de oxigênio, conhecidos como ‘Espécies Ativas de Oxigênio’ (EAO’s), (Hegedus *et al.*, 2001). As EAO’s desempenham um papel importante na defesa da planta e, durante o ataque de patógenos, as plantas produzem mais EAO’s, sendo que o acúmulo desses componentes leva a reação de hipersensibilidade em células vegetais. Esta hipótese pode ser reforçada pela análise do gráfico de peso da componente PC3 (Figura 2.7, pág.

49), que revela uma alteração na região de compostos purínicos e compostos fenólicos, para as plantas controle e aquelas inoculadas após 1 dia. Uma análise detalhada desses sinais nos espectros de RMN de ^1H (Figura 2.8a e b, pág. 50) e a comparação com aqueles dos compostos de referência disponível no banco de dados do programa Chenomx Suite 7.0 e também dos espectros disponíveis no Biological Magnetic Resonance Data Bank (<http://www.bmrb.wisc.edu>), permitiu a identificação de dois compostos, a xantina e a dopamina (Figura 2.8d e 2.8e, pág. 50).

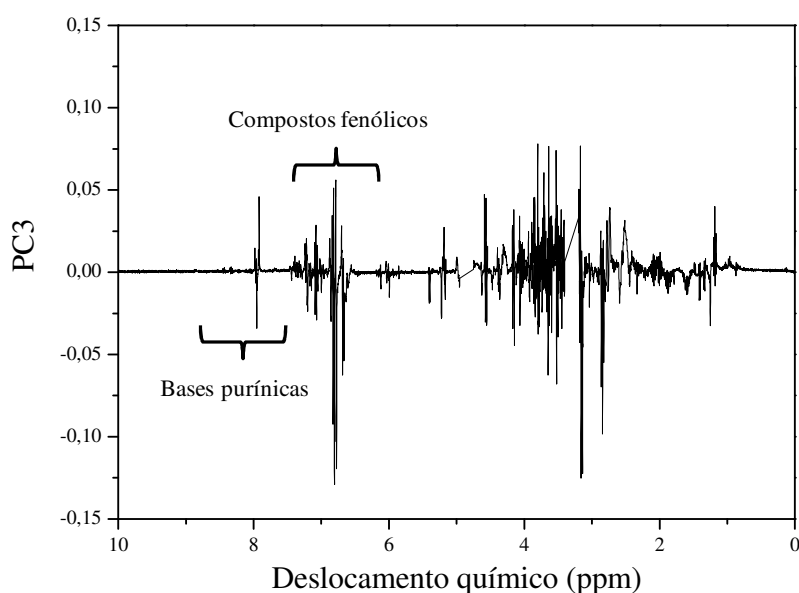


Figura 2.7 - Gráfico do peso da PC3 obtido a partir dos espectros de RMN de ^1H dos extratos das raízes de *Annona muricata* (400 MHz, metanol- d_4 / tampão KH_2PO_4 em D_2O , pH=6).

A xantina é um dos metabólitos envolvidos na via da xantina oxidase, uma enzima que catalisa a conversão da hipoxantina em xantina, para formação do ácido úrico. A formação das EAO's pode ser melhor compreendida pela observação da sequência metabólica apresentada na Figura 2.9 (pág.51).

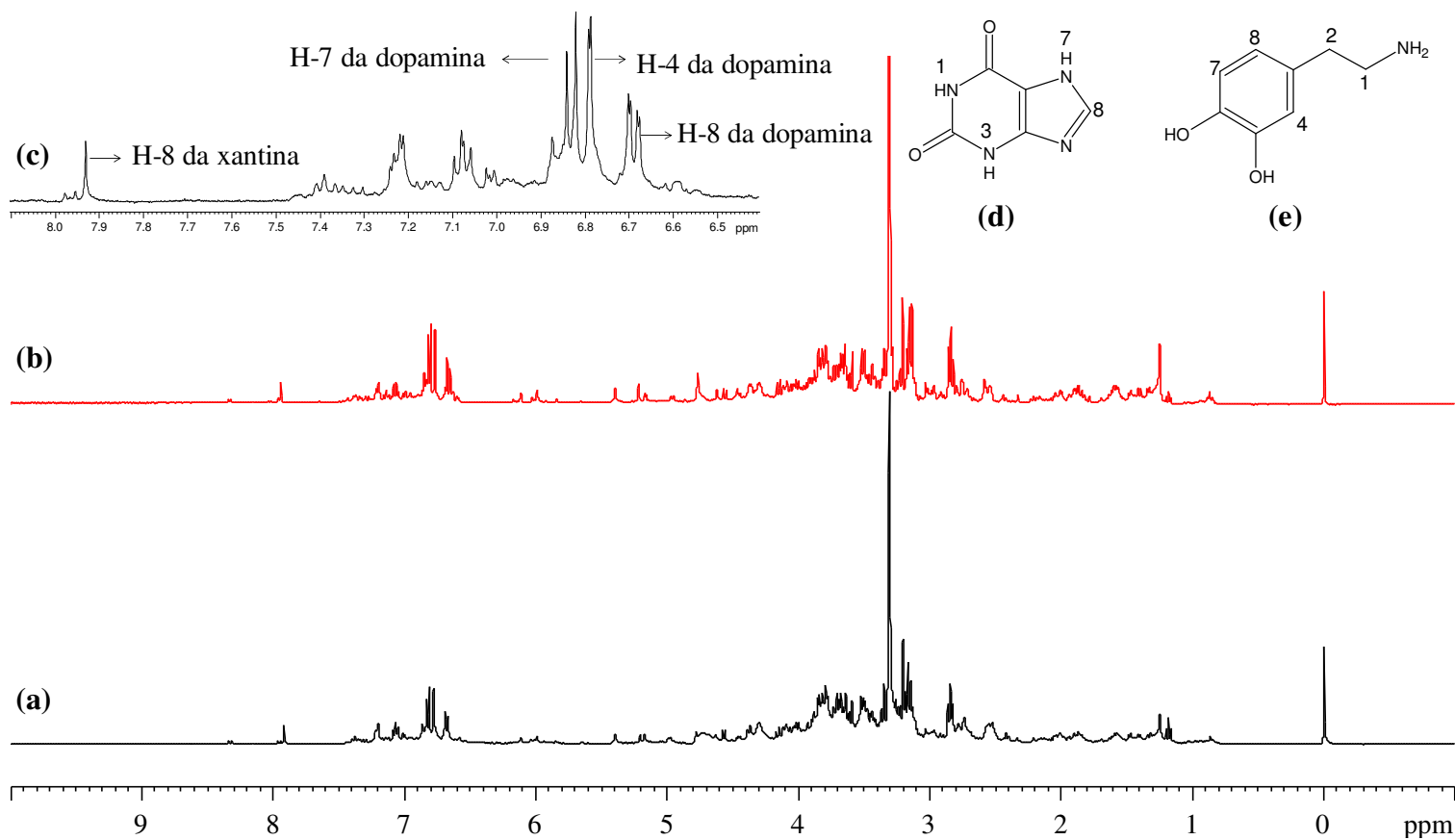


Figura 2.8 - Espectros de RMN de ^1H dos extratos das raízes de *Annona muricata* (400 MHz, metanol- d_4 / tampão KH_2PO_4 em D_2O , pH=6). (a) Após 24 horas do início do experimento sem exposição ao nematoide *Meloidogyne javanica*. (b) Após 24 horas de contato com o nematoide *Meloidogyne javanica*. (c) Expansão do espectro de RMN de ^1H na região entre δ 6,5-8,5 do extrato da raiz após 24 horas de contato com o nematoide *Meloidogyne javanica*. (d) Fórmula estrutural da xantina. (e) Fórmula estrutural da dopamina.

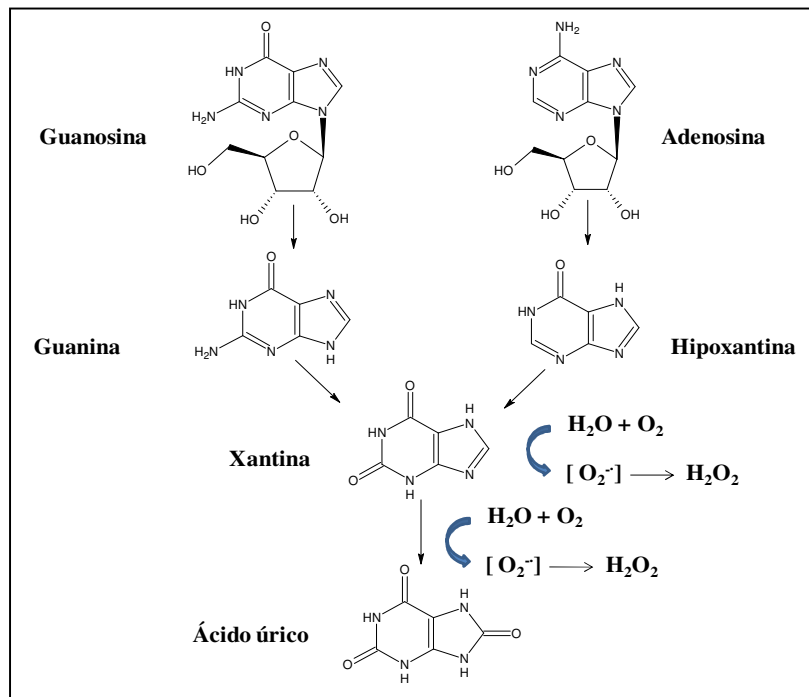


Figura 2.9 - Via metabólica da xantina oxidase. Adaptado de Mori e Schroeder, 2004.

Já a dopamina se apresenta como potencial barreira química contra o ataque por fitonematoides. Neste trabalho foram observados níveis mais elevados desse metabólito nas raízes das plantas expostas aos nematoides. Este resultado está em consonância com aqueles de Wuyts e colaboradores (2007), que observaram níveis mais elevados desse metabólito nas raízes de cultivares de banana (*Musa spp.*), resistentes a fitonematoides. Além disso, a dopamina é um bom substrato para as polifenoloxidasas, que são enzimas que catalisam duas reações distintas: a hidroxilação de monofenóis para *o*-difenóis e a oxidação desses compostos para as respectivas *o*-quinonas. As quinonas produzidas pela ação dessas enzimas são mais tóxicas aos microorganismos que os compostos fenólicos (Agrios, 2005). Também vale mencionar, que a dopamina é um intermediário na rota biossintética dos alcaloides isoquinolínicos, os quais podem apresentar atividade nematicida (Wang *et al.*, 2012).

2.4.2.2 Análise multivariada dos extratos das folhas

O conjunto de espectros dos extratos polares das folhas de *A. muricata*, também foi analisado pela PCA. Uma variância de 97,27 % pode ser explicada com um modelo de 12 componentes principais, com os dois primeiros componentes explicando 58,01 % (Figura 2.10). De forma similar ao observado para os extratos das raízes, o gráfico de escores para PC1 *versus* PC2, tanto às amostras controle, quanto as amostras inoculadas estão bem próximas. Esse mesmo padrão de classificação foi observado no gráfico de escores de PC1 *versus* PC3 (Figura 2.11, pág. 53).

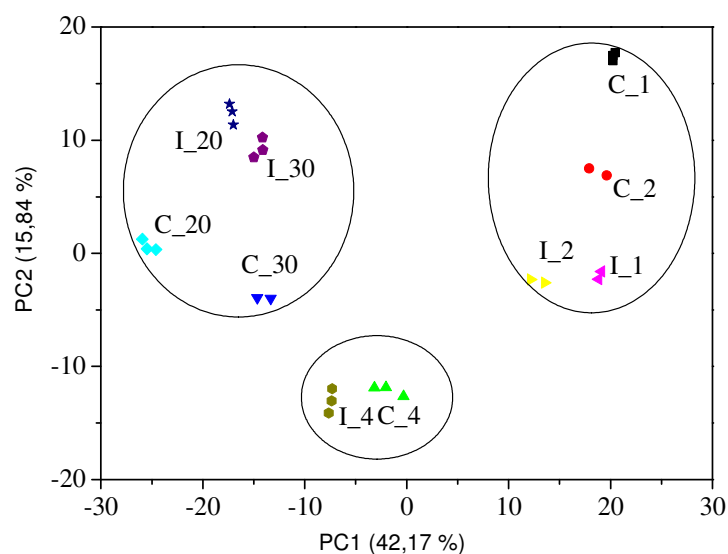


Figura 2.10 - Gráfico de escores da análise de componentes principais (PC1 *versus* PC2) dos espectros de RMN de ^1H dos extratos das folhas de *Annona muricata* (400 MHz, metanol- d_4 / tampão KH_2PO_4 em D_2O , pH=6). C_x, sendo “C” correspondente às plantas controle e “x” [x = 1 (■), 2 (●), 4 (▲), 20 (▼) e 30 (◆)] o tempo após o início do experimento e I_x, correspondente às plantas inoculadas e “x” [x = 1 (◀), 2 (▶), 4 (●), 20 (★) e 30 (◆)] o tempo após o início do experimento.

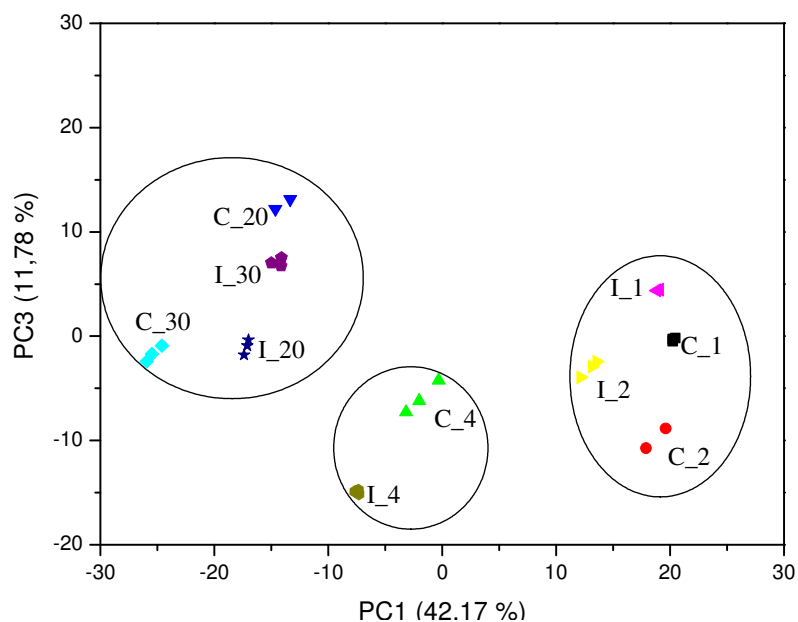


Figura 2.11 - Gráfico de escores da análise de componentes principais (PC1 *versus* PC3) dos espectros de RMN de ^1H dos extratos das folhas de *Annona muricata* (400 MHz, metanol- d_4 / tampão KH_2PO_4 em D_2O , pH=6). C_x, sendo “C” correspondente às plantas controle e “x” [x = 1 (■), 2 (●), 4 (▲), 20 (▼) e 30 (◆)] o tempo após o início do experimento e I_x, correspondente às plantas inoculadas e “x” [x = 1 (◀), 2 (▶), 4 (◐), 20 (★) e 30 (◑)] o tempo após o início do experimento.

A análise do gráfico de peso de PC1 (Figura 2.12, pág. 54) mostra que as plantas analisadas nas primeiras 48 horas apresentaram níveis diferenciados na região dos compostos aromáticos devido à presença dos sinais de ressonância em δ 6,32 [H-6; d; 2,0 (Hz)], δ 6,53 [H-8; d; 2,0 (Hz)], δ 6,98 [H-5'; d; 8,5 (Hz)], δ 7,62 [H-6'; dd; 8,5 e 2,1 (Hz)], δ 7,69 [H-2'; d; 2,1 (Hz)], δ 5,01 [H-1'; d; 7,7 (Hz)]. Uma análise mais detalhada para estes sinais nos espectros de RMN de ^1H apoiada por COSY (Figura 2.13a) permitiu a identificação do glicosídeo rutina (Figura 2.13b, pág. 54).

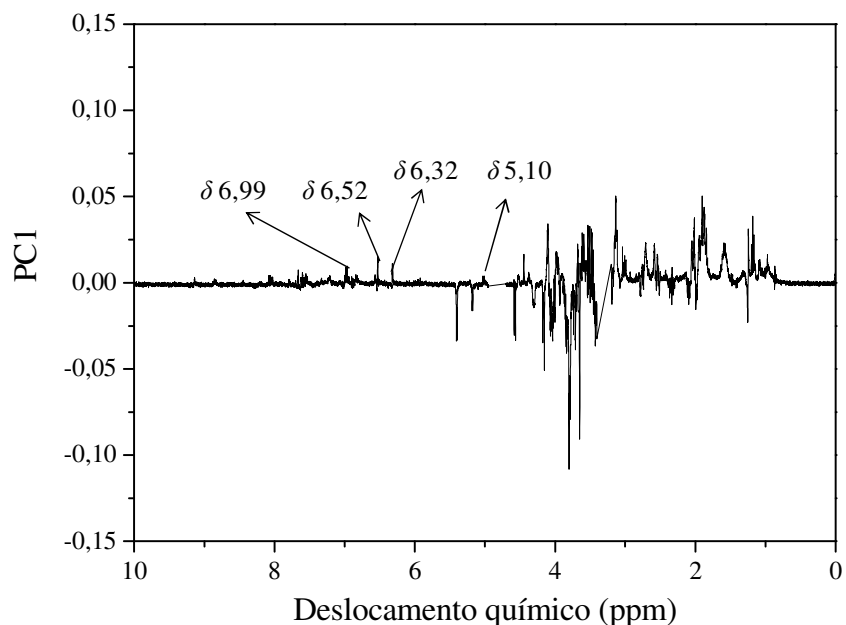


Figura 2.12 - Gráfico de peso obtido a partir dos espectros de RMN de ^1H dos extratos das folhas de *Annona muricata* (400 MHz, metanol- d_4 / tampão KH_2PO_4 em D_2O , pH=6).

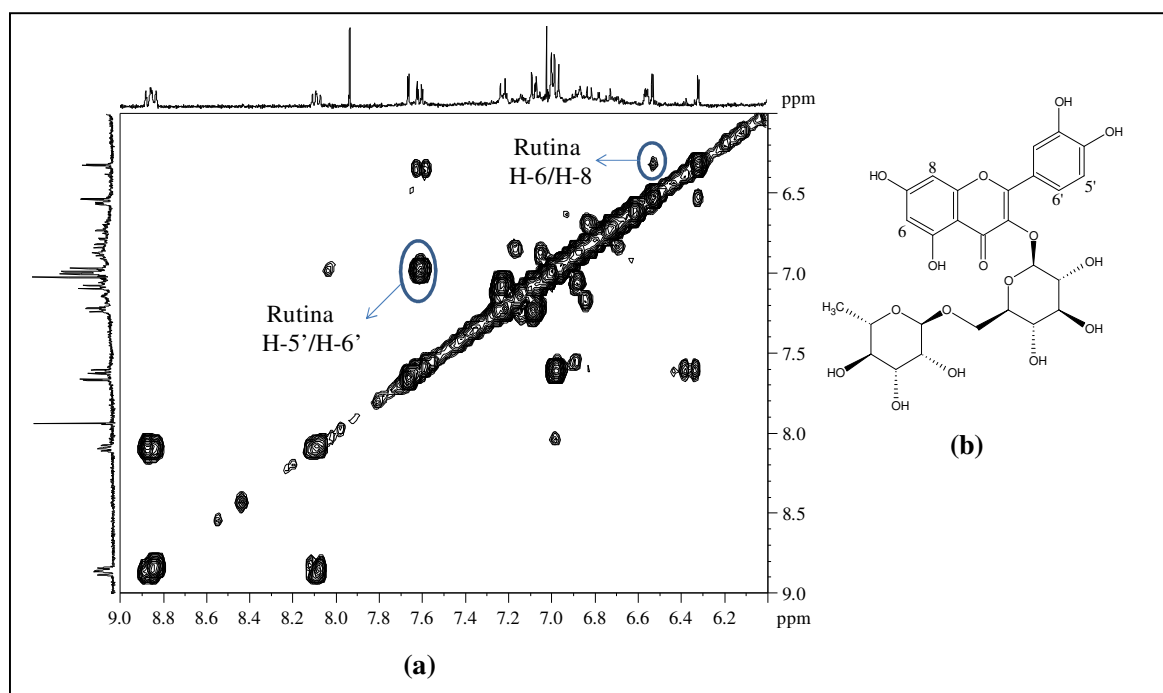


Figura 2.13 – (a) Mapa de contornos COSY do extrato das folhas de *Annona muricata* (400 MHz, metanol- d_4 / tampão KH_2PO_4 em D_2O , pH=6). (b) Fórmula estrutural do glicosídeo rutina.

2.4.3 Identificação dos metabólitos presentes nas raízes e folhas de *Annona muricata*

O perfil metabólico e atividade nematicida dos extratos das raízes e folhas de *A. muricata* foram avaliados frente ao nematoide *M. javanica*. Para caracterização do perfil metabólico, foram selecionados solventes de baixa e média polaridade como o hexano e o clorofórmio, respectivamente (item 2.2.4.3), bem como a combinação de solventes de alta polaridade como a combinação da solução tampão de KH_2PO_4 em D_2O e metanol- d_4 (item 2.3.4.1, pág. 36).

2.4.3.1 Perfil metabólico do extrato polar das raízes e folhas

A Tabela 2.1 (pág.56) apresenta os metabólitos identificados no extrato das raízes e folhas de *Annona muricata*. Embora, vários sinais estivessem sobrepostos, alguns metabólitos puderam ser identificados, comparando-se os espectros com os dados dos sinais de RMN daqueles comuns disponíveis na literatura (Ali *et al.*, 2007; Abdel-Farid *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2010; Ali *et al.*, 2011; Pimenta *et al.*, 2013), tendo realizado a confirmação pela análise dos espectros *J*-resolvido, COSY e ^1H - ^{13}C HSQC. Na região de δ 0,80-4,00, relacionado à presença de aminoácidos e ácidos orgânicos, foram assinalados sinais de hidrogênios das substâncias alanina, treonina, glicina, ácido 4-aminobutírico, betaína, colina, inositol, ácido succínico (Tabela 2.2, pág. 56). Na região entre δ 4,00-5,50, a região de sinais de hidrogênios de carboidratos, foram observados os sinais dos hidrogênios anoméricos da β -glicose δ 4,58 [d; 7,9 (Hz)], α -glicose δ 5,17 [d; 3,8 (Hz)] e da sacarose δ 5,39 [d; 3,9 (*J*/ Hz)].

Como mencionado anteriormente, nos espectros de RMN de ^1H dos extratos das raízes, foi possível identificar a dopamina (Figura 2.7e, pág. 50), devido ao registro dos sinais em δ 6,66

[H-8, dd, 8,5 e 2,0 (Hz)], δ 6, 75 [H-4, d, 2,0 (Hz)], e em δ 6,80 [H-7, d, 8,0 (Hz)]. O mapa de contornos ^1H - ^{13}C HSQC permitiu atribuir inequivocamente os valores de deslocamento químico dos carbonos hidrogenados da dopamina (Figura 2.14, pág. 57). A análise do mapa de contornos COSY mostrou o acoplamento entre os hidrogênios H-1 e H-2 e entre os hidrogênios H-7 e H-8, confirmando a estrutura deste metabólito.

Tabela 2.1 - Metabólitos identificados nos extratos das raízes e folhas de *Annona muricata*.

Substâncias	Deslocamento químico (δ); multiplicidade; [constante de acoplamento escalar (J/Hz)]	<i>A. muricata</i>	
		raiz	folha
Alanina	1,48; d; [7,2]	-	+
Glicina	3,55; s	+	+
Treonina	1,32; d; [6,6]	+	+
Colina	3,24; s	+	+
Sacarose	5,40; d; [3,8]; 4,17; d; [8,5]	+	+
α -glicose	5,18; d; [3,8]	+	+
β -glicose	4,58; d; [7,8]	+	+
Inositol	3,61; t; [9,9]; 3,24; t; [9,3]	-	+
Ácido 4-aminobutírico	2,30; t; [7,2]; 3,01, t, [7,5]	-	+
Betaína	3,25; s	+	+
Ácido succínico	2,53; s	+	+
Rutina	6,99; d; [8,4]; 6,54; d; [2,0]; 6,32; d; [2,0]; 7,69; d; [2,0]	-	+
Trigonelina	9,14; s; 8,87; m	+	+
Xantina	7,92; s	+	+
Dopamina	6, 66 [dd, 8,5 e 2,0 (Hz)]; 6, 75 [d, 2,0] (Hz); 6,80 [d, 8,0 (Hz)]	+	-

* Metabólito detectado (+); metabólito não detectado (-).

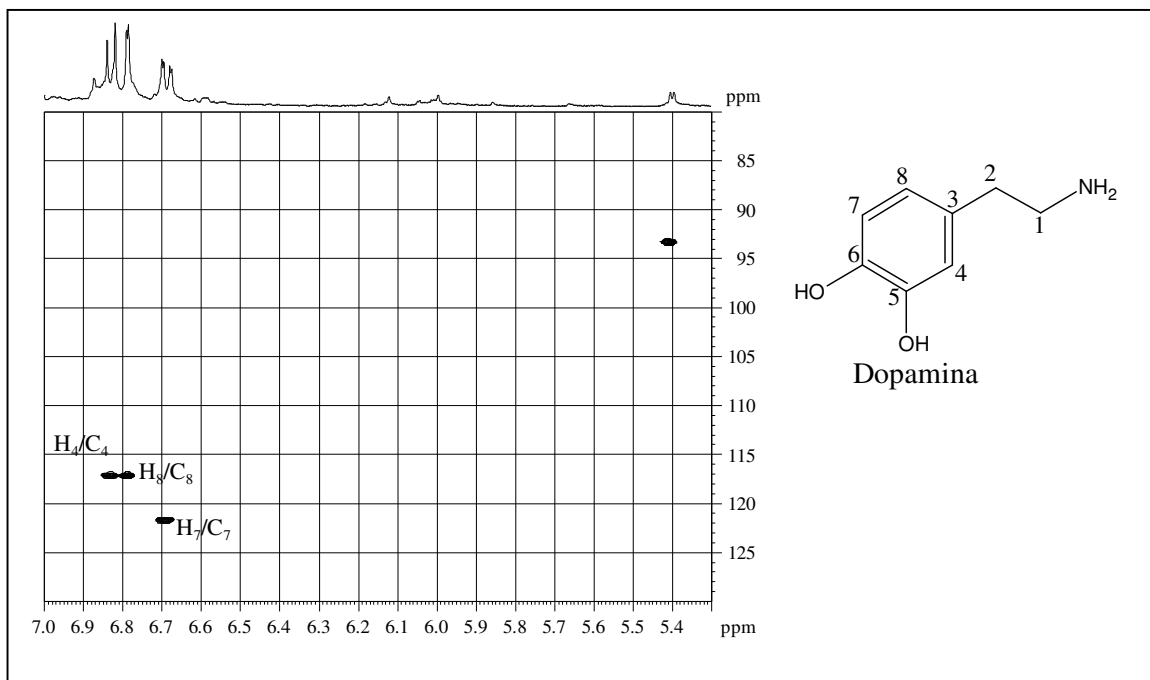


Figura 2.14 - Expansão do mapa de contornos ^1H - ^{13}C HSQC do extrato das raízes de *Annona muricata* (400 MHz, metanol- d_4 / tampão KH_2PO_4 em D_2O , pH=6).

Também foram detectados nos extratos das raízes e folhas de *A. muricata* a base purínica xantina, devido à presença do sinal de ressonância em δ 7,92 (H-8, s). Ainda na região dos compostos aromáticos foi identificado tanto nos extratos das raízes quanto naqueles das folhas, o alcaloide mesoiônico trigonelina (Tabela 2.1, pág. 56), a partir do registro dos sinais dos hidrogênios aromáticos em δ 8,09 [H-6'; dd; 8,5 e 2,1 (Hz)], em δ 8,85 (H-4 e H-6, m) um multiplete e um simpleto em δ 9,14 (H-2, s). Os hidrogênios do grupo N-metílico deste alcaloide foram registrados em δ 4,44 (H-8, s).

Dentre as substâncias detectadas pelo emprego da RMN de ^1H , vale destacar a trigonelina, que, segundo dados da literatura, pode induzir a resistência de plantas a fitoparasitas (Kraska e Schonbeck, 1993). O uso da RMN de ^1H também permitiu identificar o ácido 4-aminobutírico

(Tabela 2.1, pág. 56), que pode estar relacionado à resistência de plantas a nematoide, por causar paralisia dos músculos destes animais (McLean, 2003). A presença da substância rutina também pode ser relacionada à resistência das plantas, pois várias substâncias fenólicas apresentam atividade nematicida (Gupta *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2006). Além disto, sabe-se que algumas plantas resistentes a nematoides aumentam a produção de compostos fenólicos quando inoculadas com tais fitoparasitas.

Embora, vários compostos com potencial atividade nematicida tenham sido identificados nos extratos polares das raízes e folhas de *Annona muricata*, esses extratos, quando submetidos ao teste de mortalidade de *M. javanica*, não apresentaram atividade nematicida $ED_{50} > 2000$ mg.mL⁻¹.

2.4.3.2 Perfil metabólico dos extratos de baixa e média polaridade das raízes

O espectro de RMN de ¹H do extrato hexânico das raízes de *A. muricata* apresentou sinais correspondentes a ácidos graxos, ceras, e sinais característicos de carotenos ou compostos similares. Esse extrato foi submetido ao teste de mortalidade de *M. javanica*, mas não apresentou atividade nematicida com $ED_{50} > 2000$ mg.mL⁻¹.

A Figura 2.15 (pág. 59) ilustra o espectro do extrato clorofórmico da raiz de *A. muricata*. Observam-se sinais em δ 7,18, 6,98, 5,05 e 1,40, que indicam a presença de acetogéninas, metabólitos comuns em Annonaceae. Esse extrato foi submetido ao teste de mortalidade de *M. javanica*, o qual apresentou atividade nematostática com ED_{50} de 351,26 mg.mL⁻¹. O extrato clorofórmico da raiz também foi analisado por CLAE analítica em fase reversa e EM-IQPA. O cromatograma obtido (Figura 2.16, pág. 59) apresentou picos com tempo de retenção entre 5 e 25

minutos, que somente apresentaram absorção no comprimento de onda de 220 nm. Esses dados, associados às informações dos espectros de RMN de ^1H , indicaram a presença de grupos γ -lactona α,β -insaturadas de acetogeninas de anonáceas.

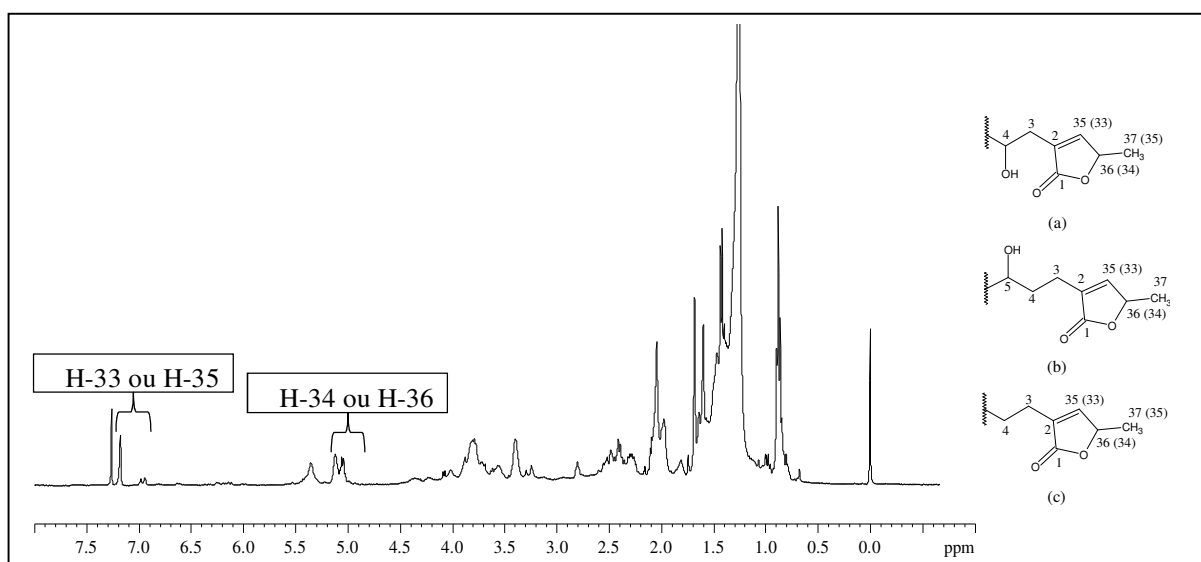


Figura 2.15 - Espectro de RMN de ^1H do extrato clorofórmico das raízes de *Annona muricata* (400 MHz, CDCl_3). Subunidades γ -lactona α,β -insaturadas encontradas em acetogeninas (a, b e c).

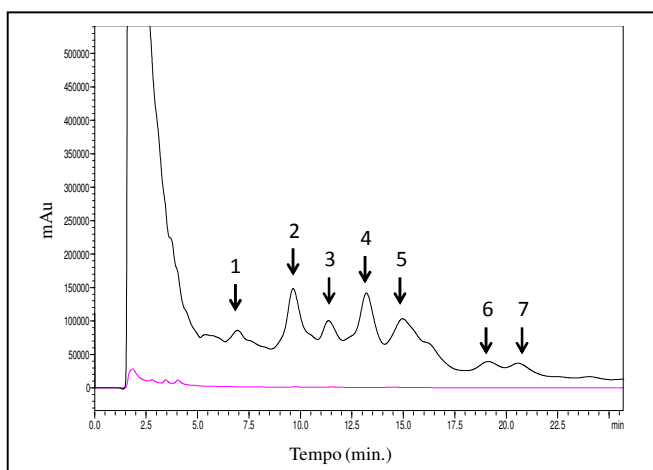


Figura 2.16 - Cromatograma do extrato clorofórmico das raízes de *Annona muricata*, obtido com o uso de uma coluna ODS Hypersil C_{18} (5 μm , 250 x 10 mm), utilizando os eluentes metanol e água como fase móvel. Detecção: $\lambda = 220 \text{ nm}$ (preto) e $\lambda = 354 \text{ nm}$ (rosa).

Na figura (Figura 2.17) é mostrado o espectro massas do extrato clorofórmico das raízes de *A. muricata*, no qual se pode observar a presença de íons em m/z 641,4433, 611,4454 e 595,4477, referentes a acetogeninas, cujas fórmulas moleculares são, respectivamente, $C_{37}H_{68}O_8$, $C_{35}H_{64}O_8$ e $C_{35}H_{64}O_7$.

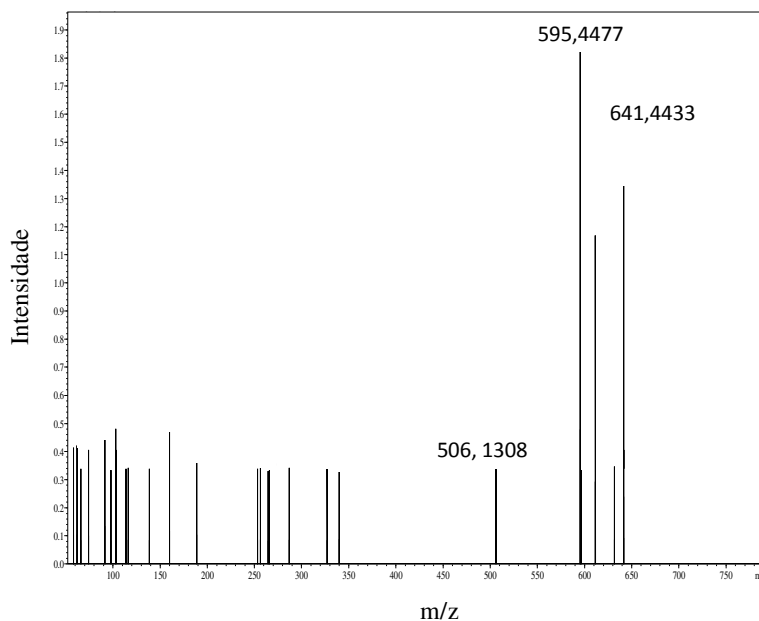


Figura 2.17 - EM-IQPA do extrato clorofórmico das raízes de *Annona muricata*.

Para cada fórmula molecular encontrada, várias acetogeninas podem estar associadas, devido à grande diversidade estrutural destes metabólitos. A figura 2.18 (pág. 61) apresenta as fórmulas estruturais para algumas acetogeninas, que corroboram os valores de massas moleculares encontrados (Figura 2.17). Esses exemplos foram escolhidos em relação, principalmente, à sua presença detectada por estudos fitoquímicos em *Annona muricata*.

As acetogeninas têm atraído a atenção de muitos pesquisadores, pois exibem notável atividade antitumoral e pesticida. Esses metabólitos foram encontrados em várias espécies da família Annonaceae, e são derivadas de ácidos graxos de cadeia longa, sendo aparentemente de

origem policetídica (C₃₅-C₃₇), possuindo ou não anéis tetra-hidrofurano e um grupo terminal γ -lactona. Algumas delas possuem atividade contra larvas do mosquito *Aedes aegypti*, broca do milho, besouros e nematoides (Zhou *et al.*, 2012).

Portanto, é possível inferir que as acetogeninas também estejam associadas à resistência de *Annona muricata* ao nematoide *Meloidogyne javanica*. Esses metabólitos podem atuar como uma barreira química à meloidogynose, apresentando-se como potencial alternativa aos nematicidas sintéticos.

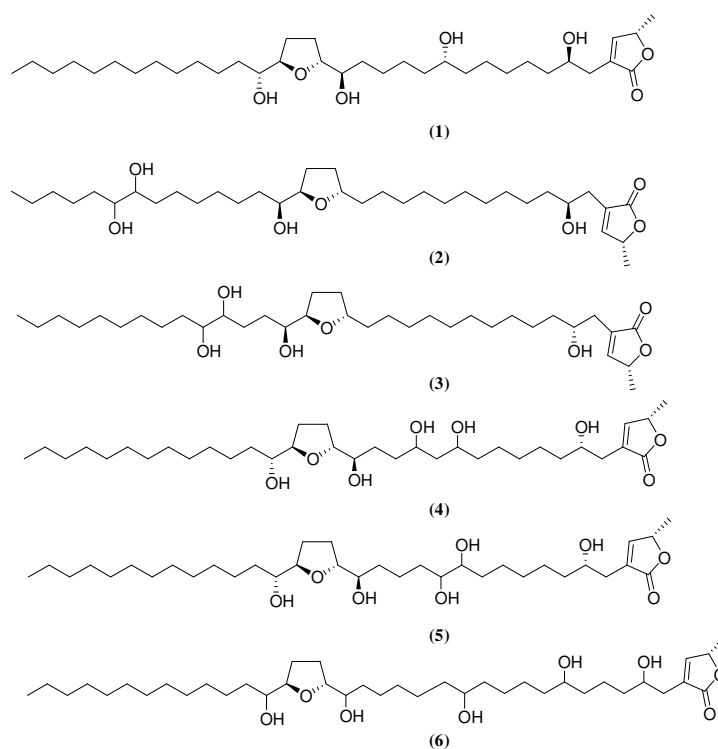


Figura 2.18 - Fórmulas estruturais para algumas acetogeninas com massas moleculares correspondentes aos picos de íons registrados na análise de EM-IQPA. As acetogeninas (1) annonacina (C₃₅H₆₄O₇), (2) muricina-B (C₃₅H₆₄O₇), (3) muricina-C (C₃₅H₆₄O₇), (4) annomuricina-C (C₃₅H₆₄O₈) e (5) muricatocina-C (C₃₅H₆₄O₈) foram isoladas de *Annona muricata*. (6) Montanacina (C₃₇H₆₈O₈), foi isolada de *Annona montana*. (Le Vem, 2012).

Os resultados apresentados sugerem que a produção das EAO's, dopamina e acetogéninas nas raízes de *Annona muricata* estão envolvidas nos mecanismos de defesa contra o nematoide *Meloidogyne javanica*. De fato, têm sido relatados dois tipos de mecanismos de resistência de plantas contra os nematoides do gênero *Meloidogyne*. O primeiro é do tipo mecanismo pré-formado, onde os nematoides não podem entrar nas raízes das plantas, incluindo-se os efeitos repelentes e/ou nematicida de determinadas substâncias químicas, presentes no exsudato radicular de algumas espécies. O segundo tipo de resistência é a pós-formada, no qual os nematoides são capazes de penetrar as raízes, mas não se desenvolvem. Esse tipo de resistência pós-formada é frequentemente associada com a reação de hipersensibilidade, em que a morte celular evita a formação do sítio de alimentação do nematoide, conduzindo à resistência (Das *et al.*, 2008).

Assim, é possível que os juvenis de segundo estágio de *M. javanica* não tenham estabelecido o sítio de alimentação nas raízes de *A. muricata*, pois não foram observadas alterações significativas no metabolismo da planta após o segundo dia de infestação. De fato, Oliveira e colaboradores (1991), após infestarem mudas de *A. muricata*, não observaram quaisquer estágios dos nematoides *M. incognita* e *M. arenaria*. Silva e colaboradores (2012) também não observaram o desenvolvimento do nematoide *M. enterolobii* nas espécies *A. muricata* e *A. squamosa*. Também vale mencionar o levantamento realizado por Silveira e colaboradores (2008) em pomares de *A. muricata* localizados nos Estados de Minas Gerais e Bahia, sendo que não foram encontrados nematoides do gênero *Meloidogyne* nas raízes das plantas e nos solos dos pomares.

O uso da RMN de ^1H combinado com PCA revelou que a resistência de *A. muricata* ao nematoide *M. javanica* pode estar associada às reações de hipersensibilidade e ao aumento da concentração de dopamina, que ocorrem durante as primeiras horas de exposição da planta ao

parasita. No entanto, não se pode descartar a hipótese de um mecanismo de defesa pré-existente, pois, foram encontradas toxicidades para o extrato da raiz rico em acetogeninas.

2.5 Conclusão

Os resultados obtidos neste trabalho podem auxiliar o desenvolvimento de novas cultivares resistentes aos nematoides de galhas, bem como no desenvolvimento de novos nematicidas menos tóxico ao homem e ao ambiente.

2.6 Referências Bibliográficas

- Abdel-Farid, I.B., Kim, H.K., Choi, Y.H., Verpoorte, R. Metabolic characterization of *Brassica rapa* leaves by NMR spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.55, p. 7936-43, 2007.
- Agrios, G. N. Plant pathology. Burlington, MA: Elsevier Academic, 2005. 922p.
- Ali, K., Maltese, F., Fortes, A.M., Pais, M.S., Choi, Y.H., Verpoorte, R. Monitoring biochemical changes during grape berry development in Portuguese cultivars by NMR spectroscopy. *Food Chemistry*, v.124, p. 1760-1769, 2011.
- Ali, K., Maltese, F., Zyprian, E., Rex, M., Choi, Y.H., Verpoorte, R. NMR metabolic fingerprinting based identification of *Grapevine* metabolites associated with downy *Mildew* resistance. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.57, p. 9599-9606, 2007.
- Anaya, A.L., Ruy-Ocotla, G., Ortiz, L.M., Ramos, L. Potencial alelopático de las principales plantas de un cafetal. In: Jimenez Avila, E., Gómez-Pompa, A. (eds.). Estudios ecológicos en el agroecosistema cafetalero. Continental, p.85-94, 1982.
- Bharti, S.K., Bhatia, A., Tewari, S.K., Sidhu, O.P., Roy, R. Application of HR-MAS NMR spectroscopy for studying chemotype variations of *Withania somnifera* (L.) Dunal. *Magnetic Resonance in Chemistry*, v.49, p.659-67, 2011.
- Borba, M.R.C., Scarpate Filho, J.A., Kluge, R.A. Teores de carboidratos em pessegueiros submetidos a diferentes intensidades de poda verde em clima tropical. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v.27, p. 68-72, 2005.
- Campos, V. A. C., Machado, A. R. T., Oliveira, D. F., Chagas, R. C. R., Nunes, A. S.; Campos, V.P. Changes in metabolites in plant roots after contact with *Meloidogyne incognita*. *Nematology*, v.14, p. 579-588, 2012.

- Chatterjee, S., Srivastava, S., Khalid, A., Singh, N., Sangwan, R.S., Sidhu, O.P., Roy, R., Khetrupal, C.L., Tuli, R. Comprehensive metabolic fingerprinting of *Withania somnifera* leaf and root extracts. *Phytochemistry*, v.71, p. 1085-94, 2010.
- Chitwood, D. J. Phytochemical based strategies for nematode control. *Annual Review of Phytopathology*, v.40, p. 221-249, 2002.
- Dang, Q.L., Kim, W.K., Nguyen, C.M., Choi, Y.H., Choi, G.J., Jang, K.S., Park, M.S., Lim, C.H., Luu, N.H., Kim, J.C. Nematicidal and antifungal activities of Annonaceous acetogenins from *Annona squamosa* against various plant pathogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.59, p. 11160-7, 2011.
- Das, S., DeMason, D.A., Ehlers, J.D., Close, T.J., Roberts, P.A. Histological characterization of root-knot nematode resistance in cowpea and its relation to reactive oxygen species modulation. *Journal of Experimental Botany*, v. 59, p. 1305-1313, 2008.
- Ehness, R., Ecker, M., Godt, D., Roitsch, T. Glucose and stress independently regulate source/sink relations and defense mechanisms via signal transduction pathways involving protein phosphorylation. *Plant Cell*, v.9, p.1825–1841, 1997.
- Fechine, I.M., Lima, M.A., Navarro, V.R., Cunha, E.V.L., Silva, M.S., Barbosa-Filho, J.M., Maia, J.G.S. Alcalóides de *Dugueti atrunciflora* Maas (Annonaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.12, p.17-19, 2002.
- Gupta, R.L., Prasad, D. Thukral, R. Quantitative structure activity relationship study for the fungicidal and nematicidal activity of phenols. *Pesticide Research Journal*, v.17, p. 15-20, 2005.
- Hall, R.D. Plant metabolomics: from holistic hope, to hype, to hot topic. *New Phytologist*, v.169, p.453-468, 2006.

- Hegedus A., Erdei S., Horváth G. Comparative studies of H₂O₂ detoxifying enzymes in green and greening barley seedlings under cadmium stress. *Plant Science*, v.160, p. 1085-1093, 2001.
- Hussey, R. S., Barker, K. R. A comparison of methods for collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. *Plant Disease Reporter*, v. 57, p. 1025-1028, 1973.
- Kim, H.K.; Choi, Y.A.; Verpoorte, R. NMR-based metabolomic analysis of plants. *Nature Protocols*, v.5, p. 36-49, 2010.
- Kraska, T., Schonbeck, F. About changes in the chromatin structure after resistance induction in *Hordeum vulgare* L. *Journal of Phytopathology*, v. 137, p. 10-14, 1993.
- Le Ven, J. Contribution à l'étude du lien entre Annonaceae et parkinsonisme : identification et quantification d'acétogénines par déréplication; métabolisation de phase I et approche de la distribution de l'annonacine. Tese de doutorado, Université Paris Sud - Paris XI, 2012.
- Li, G., Li, L., Duan, M. Zhang, K. The chemical constituents of the fungus *Stereum* sp. *Chemistry & Biodiversity*, v.3, 210-216, 2006.
- Lião, L. M., Choze, R., Cavalcante, P.P.A., Santos, S.C., Ferri, P.H., Ferreira, A.G. Perfil químico de cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris*) pela técnica de high resolution Magic angle spinning (HR-MAS). *Química Nova*, v.33, p. 634-638, 2010.
- Machado, A. R. T. Desenvolvimento de novos métodos para controle de nematóides fitoparasitas. Lavras, UFLA, 2010. Dissertação de mestrado, 101p.
- McLean, M.D., Yevtushenko, D.P., Deschene, A., Van Cauwenberghe, O.R., Makhmoudova, A., Potter, J.W., Bown, A.W., Shelp, B.J. Overexpression of glutamate decarboxylase in transgenic tobacco plants confers resistance to the northern root - knot nematode. *Molecular Breeding*, v.11, p. 277-285, 2003.

- Monteiro, A.R., Oliveira, C.M.G., Kuroki, A. Reação da pinha (*Annona squamosa* L.) a três espécies de fitonematóides. *Scientia Agricola*, v.53, p. 223-225, 1996.
- Mori, I.C., Schroeder, J.I. Reactive oxygen species activation of plant Ca²⁺ channels: a signaling mechanism in polar growth, hormone transduction, stress signaling, and hypothetically mechanotransduction. *Plant Physiology*, v.135, p. 702-708, 2004.
- Oliveira, C. M.G., Goulart, A.M.C., Ferraz, L.C.C.B., Monteiro, A.R. Resistência da gravioleira (*Annona muricata*) a *Meloidogyne arenaria* e *M. incógnita*. *Nematologia Brasileira*, v.15, 204-205, 1991.
- Pimenta, L. P. S., Kim, H. K., Verpoorte, R., Choi, Y.H. NMR-Based Metabolomics: A Probe to Utilize Biodiversity. In: Ute Roessner; Daniel Anthony Dias (eds.). *Methods in Molecular Biology*. 1^a ed. Clifton, N.J.: Humana Press, v.1055, p. 117-127, 2013.
- Rossi, C.E. Levantamento, reprodução e patogenicidade de nematóides a fruteiras de clima subtropical e temperado. Piracicaba, ESALQ, 2002. Tese de Doutorado, 114p.
- Sadka, A., DeWald, D.B., May, G.D., Park, W.D., Mullet, J.E. Phosphate modulates transcription of soy bean VspB and other sugar-inducible genes. *Plant Cell*, v.6, p.737-749, 1994.
- Silva, G.S., Krasuski, A.I. Reação de algumas espécies frutíferas tropicais a *Meloidogyne enterolobii*, v.36, p. 83-86, 2012.
- Silveira, A., Jucá, F.F., Melo, P.A., Sacramento, C.K. Fitonematóides associados à gravioleira (*Annona muricata*) no Sul da Bahia. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v.30, p. 838-840, 2008.
- Staskawicz, B.J., Ausubel, F.M., Baker, B.J., Ellis, J.G., Jones, J.D.G. Molecular genetics of plant disease resistance. *Science*, v.268, p. 661-67, 1995.

- Tyihak, E., Sarhan, A.R.T., Cong, N.T., Barna, B., Kiraly, Z. The level of trigonelline and other quaternary ammonium compounds in tomato leaves in ratio to the changing nitrogen supply. *Plant and Soil*, v.109, p. 285-287, 1988.
- Verpoorte, R., Choi, Y.H., Kim, H.K. NMR-based metabolomics at work in phytochemistry. *Phytochemistry Reviews*, v.6, p. 3-14, 2007.
- Wang, K., Luo, C., Liu, H., Xu, J., Sun, W., Zhou, W. Nematicidal activity of the alkaloids from *Macleaya cordata* against certain nematodes. *African Journal of Agricultural Research*, v.7, p. 5925-5929, 2012.
- Wu, Y., Jenkins, T., Blunden, G., Von Mende, N., Hankins, S.D. Suppression of fecundity of the root-knot nematode, *Meloidogyne javanica*, in monoxenic cultures of *Arabidopsis thaliana* treated with an alkaline extract of *Ascophyllum nodosum*. *Journal of Applied Phycology*, v.10, p. 91-94, 1998.
- Wuyts, N., Lognay, G., Verscheure, M., Marlier, M., De Waele, D., Swennen, R. Potential physical and chemical barriers to infection by the burrowing nematode *Radopholus similis* in roots of susceptible and resistant banana (*Musa* spp.). *Plant Pathology*, v.5, p. 878-890, 2007.
- Zhou, L., Wang, J., Wang, K., Xu, J., Zhao, J., Shan, T., Luo, C. Chapter 3 - Secondary metabolites with antinematodal activity from higher plants, In: Atta-ur-Rahman, (eds.). *Studies in Natural Products Chemistry*, Elsevier, v.37, p.67-114, 2012.

Capítulo 3

**APLICAÇÃO DA RMN DE ^1H E ESTATÍSTICA
MULTIVARIADA PARA O “*SCREENING*” DA ATIVIDADE EM
MISTURAS COMPLEXAS**

3.1 Introdução

A caracterização ou elucidação estrutural, modificação química, a atividade biológica e o estudo do mecanismo de ação de metabólitos bioativos sempre foram feitos após a purificação dos metabólitos. No entanto, os processos envolvidos na obtenção destes compostos na sua forma pura são bastante longos e tediosos. Além disso, mesmo as análises fitoquímicas biodirecionadas, frequentemente levam a altos índices de re-isolamento de substâncias já caracterizadas (Clardy e Walsh, 2004). Dessa forma, é de grande valia o desenvolvimento de metodologias que sejam capazes de relacionar as informações a respeito da composição química com as atividades biológicas de um extrato bruto.

Neste contexto, alguns autores propõem a aplicação de técnicas quimiométricas a dados espectroscópicos para construção de modelos de previsão de atividades biológicas para extratos brutos. Bailey e colaboradores (2004) apresentaram modelos quimiométricos para previsão da atividade antiplasmódica dos extratos de *Artemisia annua*. Outro exemplo pode ser encontrado no trabalho de Roos e colaboradores (2004), que demonstra a utilização de modelos quimiométricos para previsão da atividade farmacológica dos extratos de *Hypericum perforatum*. Também vale mencionar, o trabalho de Yuliana e colaboradores (2011), que empregou os dados de RMN de ^1H para construção de modelos quimiométricos, objetivando-se a previsão da atividade dos extratos de *Orthosiphon stamineus* frente ao receptor de Adenosina A1.

O isolamento de produtos naturais orientados por estudos biológicos oferece à pesquisa uma forma rápida e objetiva de realizar o isolamento de interesse. O teste larvicida sobre *Artemia salina* destaca-se nesse contexto sendo utilizado na detecção de substâncias com potencial atividade citotóxica, anticancerígena e pesticida. Entretanto, o ensaio poderia ser usado para

prever outras diferentes atividades biológicas, quando se considera a premissa que uma substância ativa pode ser tóxica dependendo da dose. Esse teste é simples, de baixo custo e pode ser realizado no próprio laboratório de fitoquímica.

A associação do perfil metabólico à atividade larvicida sobre *A. salina* poderia fornecer informações relevantes, permitindo detectar mais facilmente substâncias com atividade biológicas.

3.2 Objetivos

Fazer uma análise exploratória do perfil metabólico e da atividade larvicida sobre *Artemia salina* dos extratos das folhas de *Annona muricata*, bem como construir modelos multivariados capazes de prever a atividade biológica de diferentes espécimes.

3.3 Procedimentos experimentais

3.3.1 Material vegetal

O material proveniente das folhas de espécimes de *A. muricata*, com diferentes parâmetros dendrométricos, foram coletados no campus da Universidade Federal de Minas Gerais, no mês de fevereiro do ano de 2014. Imediatamente após a coleta, as folhas foram congeladas em nitrogênio líquido, em seguida, moídas e secas em liofilizador. A Tabela 3.1 apresenta a altura e o diâmetro dos espécimes coletados.

Tabela 3.1 - Parâmetros dendrométricos para os espécimes de *Annona muricata*.

<i>Annona muricata</i>	Altura / m	Diâmetro / m
Espécime 1	4,0	1,03
Espécime 2	4,5	0,93
Espécime 3	6,0	0,65
Espécime 4	3,5	0,52
Espécime 5	4,0	0,58
Espécime 6	4,0	0,98
Espécime 7	4,0	1,03
Espécime 8	4,0	0,98
Espécime 9	3,5	0,44

3.3.2 Preparo dos extratos

Os extratos foram preparados a partir da adaptação do método descrito por Gromova e Roby (2010). 1,0 g das folhas liofilizadas, foi mantido à temperatura ambiente em 24 mL de uma mistura de metanol/clorofórmio/água (3:1:1). Após 24 horas, a mistura foi filtrada e a fase líquida foi submetida a partição com clorofórmio. A fase clorofórmica foi separada e o solvente, removido em rotaevaporador.

3.3.3 Análise por RMN

Os extratos clorofórmicos (item 3.3.2), provenientes dos diferentes espécimes de *A. muricata* (Tabela 3.1, pág. 72), foram solubilizadas em CDCl_3 (1,00 mL), contendo 0,03% (v/v) de TMS. As soluções foram transferidas para tubos de RMN com diâmetro de 5 mm. Os espectros de RMN de ^1H foram obtidos, em triplicata, com janela espectral de 20 ppm, 16 promediações e com 65k pontos adquiridos e tempo de espera (d1) de 1,5 s. Para o processamento foi utilizado o alargamento de linha de 0,3 Hz, anterior à transformada de Fourier. As fases e linhas de base foram corrigidas utilizando o programa TopSpin 1.3 e por fim o espectro foi calibrado pelo sinal do TMS em δ 0,00. Também foram conduzidos experimentos bidimensionais, tais como *J*-resolvido, COSY e HSQC seguindo os parâmetros descritos no capítulo 2 (item 2.3.5.2, pág. 38). Ademais, foi adquirido o experimento ^1H , ^{13}C -HSQC-TOCSY com tempo de mistura de 60 ms, janelas espectrais F1 e F2 de 22 KHz e 8 KHz respectivamente. Foram coletados 1024 incrementos em F1 com 8 promediações.

3.3.3.1 Quantificação de acetogeninas totais

Para quantificação do teor de acetogeninas, nos extratos clorofórmicos dos espécimes de *Annona muricata*, foi desenvolvido um método utilizando a RMN de ^1H . As análises quantitativas por RMN de ^1H são baseadas na medida da área de um sinal registrado, que é diretamente proporcional ao número de hidrogênios que absorvem energia na radiofrequência referente a este sinal. Dessa forma, para se obter uma informação quantitativa através dos espectros de RMN de ^1H , é realizada a determinação relativa, na qual a razão molar entre dois compostos pode ser calculada (Santos e Colnago, 2013).

Aos extratos clorofórmicos (item 3.3.2, pág. 73) foram adicionados 1,00 mg do padrão interno antraceno e as amostras foram dissolvidas em 1,00 mL de CDCl_3 . O antraceno foi escolhido por ser estável e não volátil. Inicialmente foram determinados os tempos de relaxação (T_1), pelo método de inversão-recuperação, para os hidrogênios α -H do antraceno e para os hidrogênios H-33 ou H-35 das acetogeninas γ -lactona α,β -insaturada (Figura 3.1), utilizando-se intervalos de tempos através de uma lista pré definida (vdlist) de 40, 30, 20, 10, 5, 3, 2, 1; 0,7, 0,40, 0,1, 0,05 e 0,01s, com 16 promediações e tempo de recuperação de 30 s.

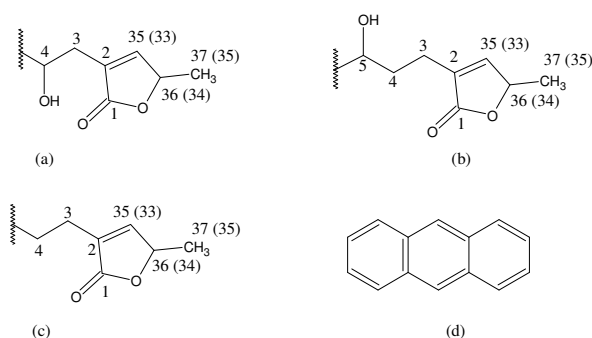


Figura 3.1 - Subunidades γ -lactona α,β -insaturadas encontradas em acetogeninas (a, b e c) e fórmula estrutural do antraceno (d).

Os espectros de RMN de ^1H foram obtidos com janela espectral de δ 20,00, tempo de aquisição (AQ) de 4,1 s, 32 promediações, com 64 k pontos adquiridos e tempo de espera (d1) de 28 s. Para o processamento foi utilizado o alargamento de linha (lb) de 0,3 Hz, anterior à transformada de Fourier. As fases e linhas de base foram corrigidas utilizando-se o programa TopSpin 1.3. Os teores de acetogeninas foram determinados utilizando a equação 3.2.

$$C = \frac{\left[\frac{I_T \times M_T}{I_{PI} \times M_{PI}} \times \text{massa (mg, PI)} \right]}{\text{massa (g, Folhas)}} \quad (1)$$

Onde I_T e I_{PI} são as intensidades das integrais dos hidrogênios das acetogeninas e do padrão interno, respectivamente. M_T representa a massa molar por número de hidrogênio em δ 7,18 ou δ 6,98 e M_{PI} é a massa molar do antraceno por hidrogênios, na região de δ 8,00-8,04. Essa metodologia se baseia na determinação das acetogeninas γ -lactona α,β -insaturadas, usando-se annonacina e solamina (Figura 3.2) como referências. Dessa forma, os resultados foram expressos em mg.g^{-1} de annonacina ou mg.g^{-1} de solamina.

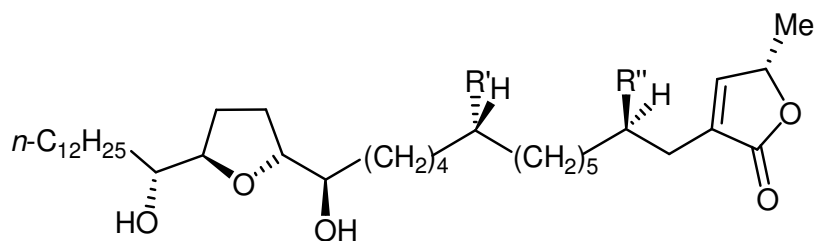


Figura 3.2 - Annonacina ($R'=R''=\text{OH}$); Solamina ($R'=R''=\text{H}$).

3.3.4 Análise por cromatografia líquida de alta eficiência

Os extratos clorofórmicos foram submetidos a análise por CLAE nas mesmas condições descritas no item 2.3.7 do capítulo 2 (pág. 39).

3.3.5 Avaliação da atividade larvicida frente *Artemia salina*

Seguindo-se metodologia descrita por Pimenta e colaboradores (2003), em 100 mL de solução salina, adicionaram-se cerca de 10 mg de ovos de *Artemia salina*, sendo deixado sob iluminação artificial a 28 °C. A eclosão ocorreu após aproximadamente 24 horas. Os náuplios (estágio da *Artemia salina* após 24 h), foram coletados e transferidos para outro aquário para atingirem o estágio de metanáuplii. Foram preparadas as soluções-mãe de lapachol (substância referência) e das amostras-teste (extratos clorofórmicos) dissolvidos em DMSO. O teste foi realizado em triplicata utilizando-se cinco concentrações diferentes (0,5-100 mg.L⁻¹). As soluções foram distribuídas em tubos de ensaio contendo concentração adequada de solução. Preparou-se um grupo controle negativo, pela utilização de solução marinha contendo 1% de DMSO (v/v). As larvas no estágio metanáuplio (estágio da *Artemia salina* após 48 h) foram adicionadas às soluções a serem testadas, sendo colocadas aproximadamente dez larvas em cada tubo de ensaio. Toda bateria de ensaio foi mantida em local fresco durante 24 horas. Após esse período, fez-se a leitura pela contagem de larvas sobreviventes e mortas, a olho nu, sendo usado um fundo branco para melhor contraste. A determinação da DL₅₀ (com intervalo de confiança de 95%) foi feita utilizando-se o método Probitos de análise. Em todos os ensaios realizados, o lapachol, foi utilizado como controle positivo e apresentou DL₅₀ entre 40 e 72 µg/mL.

3.3.6 Análise multivariada

Os espectros de RMN de ^1H dos diferentes espécimes de *A. muricata* foram convertidos, em uma tabela de área versus intervalo de $\delta 0,04$. Para tanto, as intensidades dos sinais na região de $\delta 0,00-10,00$ foram escalonadas em relação à intensidade total dos sinais e reduzidas a regiões integradas de $\delta 0,04$ cada. As conversões dos espectros em buckets foram realizadas com o auxílio do programa computacional AMIX®. Foram realizadas análises de componentes principais (PCA) e de agrupamentos hierárquicos (HCA). Também foi construído um modelo de regressão por mínimos quadrados parciais (PLS), para previsão da atividade larvicida dos extratos de *A. muricata*. As áreas dos buckets (matriz X) e os valores encontrados para DL₅₀ (DL₅₀, matriz Y) foram então utilizadas como variáveis de entrada para as análises. Para avaliar o desempenho do modelo de calibração, foram calculados os erros médios de validação cruzada RMSECV ("Root Mean Square Error of Cross-validation") e de previsão RMSEP ("Root Mean Square Error of Prediction"), conforme a Equação 3.1 (Ferrão *et al.*, 2007):

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=0}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n}} \quad 3.1$$

Onde n é o número de espectros, \hat{y}_i representa o valor previsto pelo modelo multivariado e y_i representa o valor referência.

Todos os dados foram centrados na média, tendo sido a região de $\delta 7,22-7,30$ previamente removida, para se eliminar qualquer variabilidade devido ao sinal do solvente. As análises foram obtidas utilizando-se o software Pirouette 3.11.

3.4 Resultados e Discussão

3.4.1 Perfil metabólico

Os perfis dos extratos clorofórmicos das folhas dos diferentes espécimes de *Annona muricata* foram determinados, utilizando-se a RMN de ^1H . Os espectros apresentaram uma grande semelhança. A figura 3.3 mostra o espectro de RMN de ^1H do espécime 1, onde os sinais em δ 6,98 e δ 7,18 sugerem a presença de acetogeninas possuindo a subunidade γ -lactona α,β -insaturadas dos tipos a-c (Figura 3.1, pág. 74). Com auxílio dos experimentos bidimensionais (COSY e ^1H - ^{13}C -HSQC) foi possível confirmar a presença dessa classe de metabólitos, que são comuns em espécies da família Annonaceae (Cavé *et al.*, 1997).

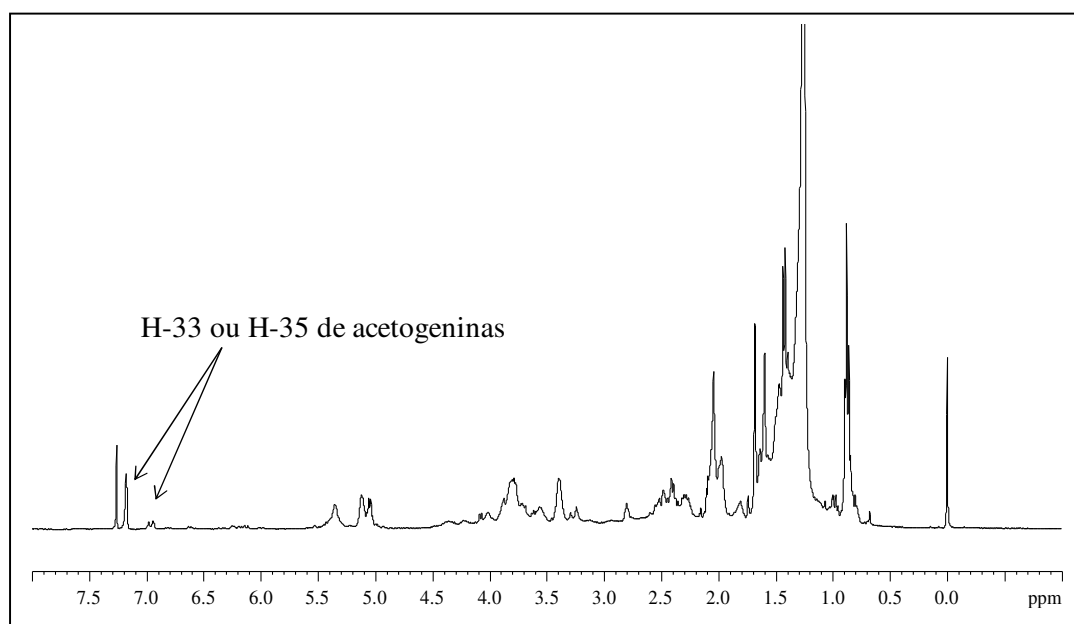


Figura 3.3 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do extrato clorofórmico das folhas de *Annona muricata*.

Através do mapa de contornos $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HSQS-TOCSY (Figura 3.4) foi possível identificar os sinais dos carbonos diretamente ligados da subunidade γ -lactona α,β -insaturadas, através das correlações observadas entre δ_{H} 7,18 (δ_{C} 151,9), δ_{H} 5,06 (δ_{C} 78,1), δ_{H} 2,52 (33,1) e 40 δ_{H} 1,40 (δ_{C} 19,1).

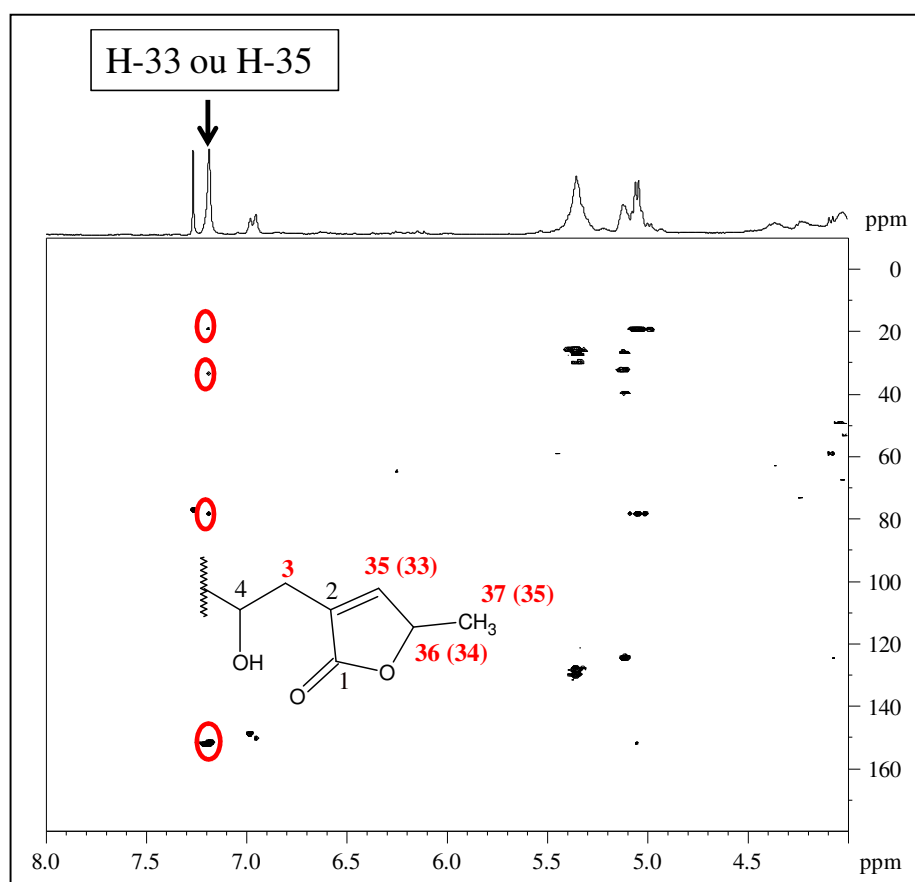


Figura 3.4 – Seção expandida do mapa de contornos $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ - HSQC-TOCSY (400 MHz, CDCl_3) do extrato clorofórmico das folhas *Annona muricata* na região de δ 4,00-8,00.

O extrato clorofórmico também foi analisado por CLAE analítica em fase reversa. O cromatograma obtido (Figura 3.5, pág. 80) apresentou bandas com tempos de retenção entre 5 e

25 minutos, que somente apresentaram absorção no comprimento de onda de 220 nm, comuns do grupo γ -lactona α,β -insaturadas. As análises por CLAE foram realizadas para investigar a presença de misturas desses metabólitos nos extratos, além de se constatar a presença da annonacina (Figura 3.2, pág. 75), a acetogenina predominante em *A. muricata*. Os extratos foram analisados com a coinjeção do padrão dessa acetogenina, o que permitiu a sua identificação.

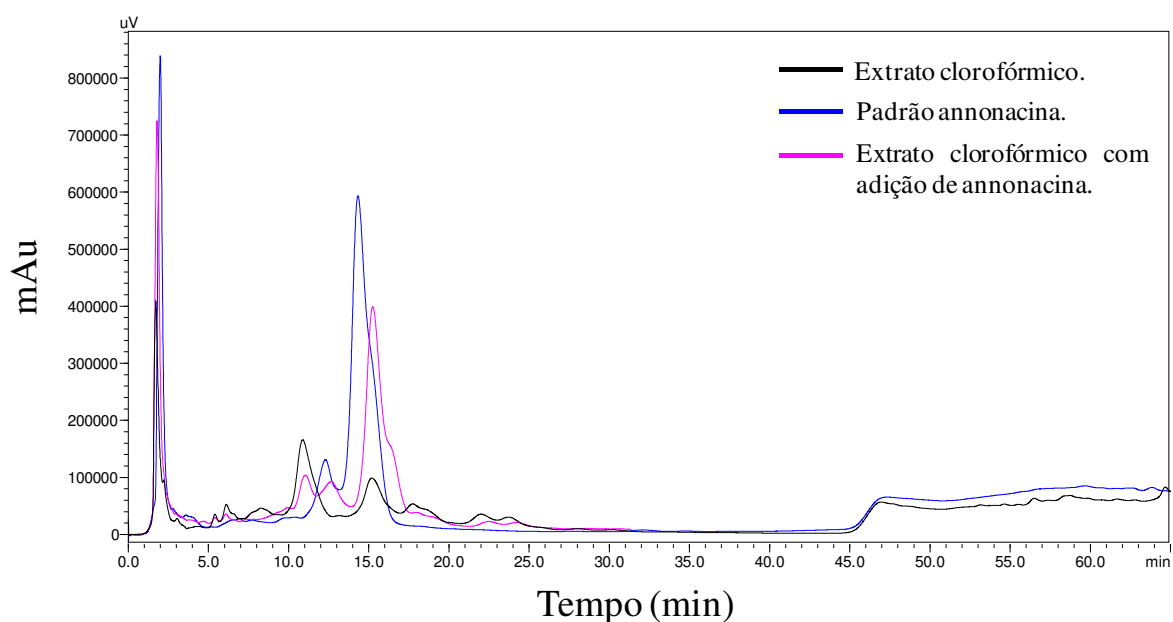


Figura 3.5 - Cromatogramas ($\lambda = 220$ nm) obtidos com o uso de uma coluna ODS Hypersil C₁₈ (5 μ m, 250 x 10 mm), utilizando os eluentes metanol e água como fase móvel.

3.4.2 Atividade larvídica frente a *Artemia salina*

Os extratos clorofórmicos foram testados quanto à toxicidade geral utilizando o ensaio de letalidade frente a *Artemia salina* Leach (Pimenta *et al.*, 2003). A toxicidade à *Artemia salina*, foi determinada através da dose letal de 50% (DL₅₀) para os microcrustáceos. A Tabela 3.2 (pág. 81) apresenta os valores de DL₅₀ obtidos e os respectivos intervalos de confiança.

Todos os extratos se mostraram ativos, tendo as atividades se mostrado mais acentuadas nos extratos dos espécimes 6 e 9. Esses resultados são atraentes, uma vez que existe uma boa correlação entre as atividades frente *A. salina* e outras atividades biológicas tais como antifúngica, viruscida, antimicrobiana, parasiticida, tripanossomicida, bem como atividade antitumoral (Siqueira *et al.*, 1998).

Tabela 3.2 - Valores de DL₅₀ obtidos frente a *Artemia salina* para os extratos de diferentes espécimes de *Annona muricata*.

<i>Annona muricata</i>	DL ₅₀ (mg.L ⁻¹)	Intervalo de confiança
Espécime 1	1,88	1,12 < x < 3,16
Espécime 2	2,52	1,96 < x < 2,40
Espécime 3	1,5	0,98 < x < 2,30
Espécime 4	1,6	1,15 < x < 2,23
Espécime 5	2,37	1,62 < x < 3,48
Espécime 6	1,09	0,71 < x < 1,68
Espécime 7	2,6	2,08 < x < 3,24
Espécime 8	2,92	2,39 < x < 3,57
Espécime 9	1,24	0,79 < x < 1,93
Lapachol	54,11	40,36 < x < 72,54

3.4.3 Análise multivariada

A análise visual dos espectros de RMN de ¹H dos extratos dos diferentes espécimes de *A. muricata* revelou pouca ou quase nenhuma diferença. Entretanto, o teste de toxicidade (Tabela 3.2) mostrou diferenças nos valores de DL₅₀ obtidos a partir desses extratos. Assim, faz-se

necessário a aplicação de técnicas multivariadas tais como PCA, HCA e PLS, que permitem maximizar a obtenção das informações presentes no espectro de RMN de ^1H .

Para as análises multivariadas, os espectros de RMN de ^1H dos extratos clorofórmicos de todos os espécimes de *A. muricata* foram transformados em dados numéricos e organizados em uma matriz, na qual as linhas representam as amostras e as colunas as variáveis, que, em RMN de ^1H , correspondem ao deslocamento químico (δ). Para submeter os espectros à análise multivariada, o número de variáveis foi reduzido, dividindo-se os espectros em intervalos de δ 0,04, conhecidos como “buckets”. A Figura 3.6 apresenta os espectros da matriz após a transformação em “buckets”.

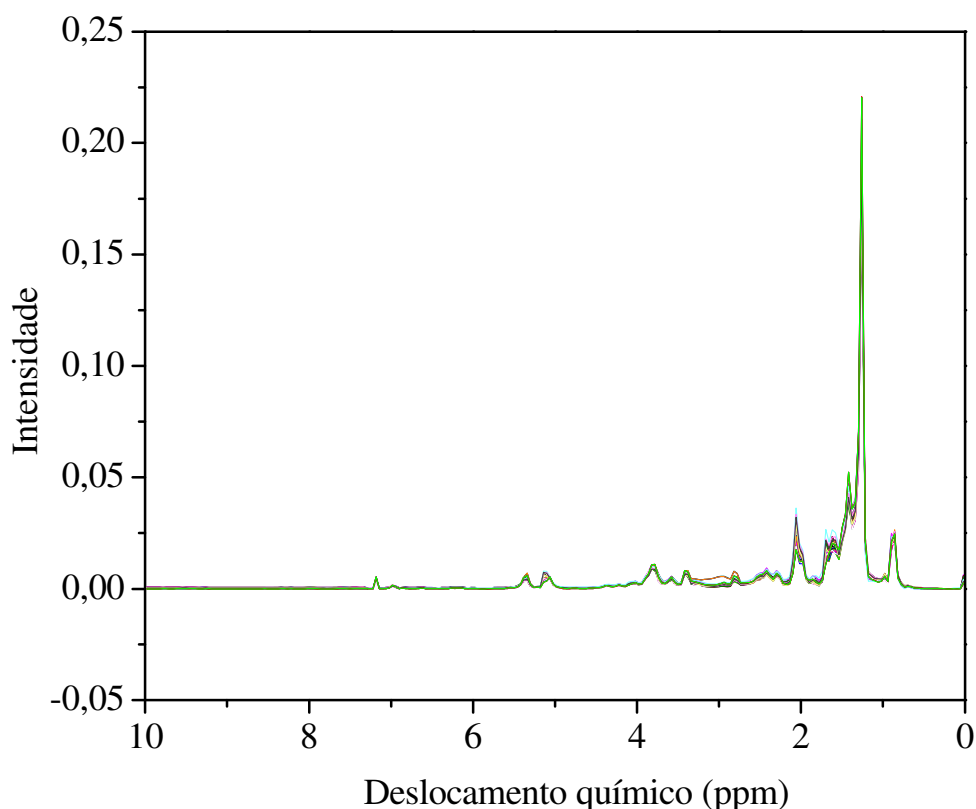


Figura 3.6 – 27 espectros de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) sobrepostos dos extratos clorofórmicos das folhas dos diferentes espécimes de *Annona muricata* após o “buckets”.

3.4.3.1 Análise de componentes principais

Inicialmente, o conjunto de dados foi submetido à PCA, com objetivo de se averiguarem diferenças ou semelhanças no perfil metabólico, obtido por RMN de ^1H , dos diferentes espécimes de *Annona muricata*. Nessa análise foram selecionados 5 PCs, que correspondem a 95,30 % da variância total dos dados. A PCA mostrou que a PC1 explica 64,79 % da variância total dos dados e a PC2 explica 11,88 %. A Figura 3.7 mostra o gráfico da variância explicada em cada PC. Esse gráfico é útil para selecionar o número ótimo de PCs a ser avaliado (Martins, 2008). Nesta figura, pode-se observar que, a partir do PC5, não há uma variação muito grande da variância. Dessa forma, ao se aplicar a PCA, foi possível efetuar uma simplificação ao reduzir a dimensão original dos dados de 256 (256 variáveis/dimensões) para 5 componentes principais.

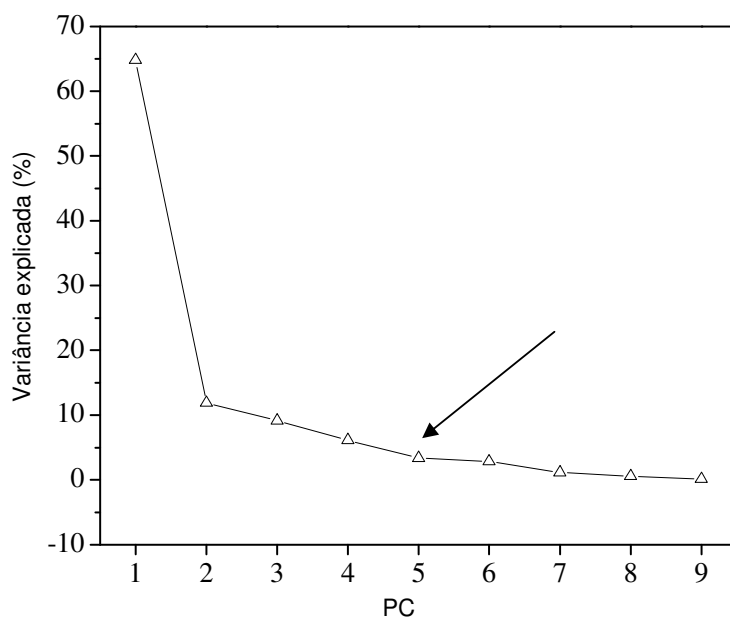


Figura 3.7 - Percentual da variância explicada para cada componente principal (PC). A seta indica o número ótimo de componentes principais para representar os dados originais.

Na Figura 3.8, é mostrado o gráfico de escores através da projeção da PC1 *versus* PC2. Esse gráfico apresenta informações sobre as amostras e se pode observar a formação de três grupos, denominados de grupos A, B, C. O grupo A foi formado pelos espécimes 2, 5, 7 e 8, no grupo B foi agrupado os espécimes 1, 3, e 4 e o grupo C foi composto pelos espécimes 6 e 9. Pode-se verificar também semelhanças entre os espécimes pertencentes aos grupos B e C, posicionados negativamente na PC1, sendo esses grupos compostos por espécimes, que apresentaram os menores valores de DL₅₀ (Tabela 3.2, pág. 81), enquanto que no grupo A, posicionados positivamente na PC1, foram agrupados os espécimes com maiores valores de DL₅₀ (Tabela 3.2, pág. 81).

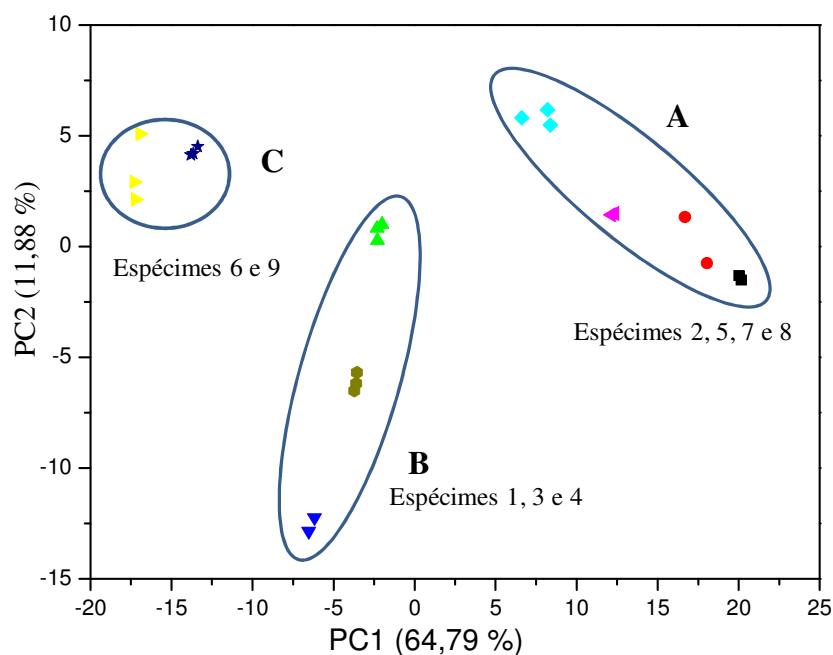


Figura 3.8 - Gráfico de escores da análise de componentes principais (PC1 *versus* PC2) dos espectros de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) dos extratos clorofórmicos das folhas de *Annona muricata*. Grupo A composto pelos espécimes 2, 5, 7 e 8. Grupo B composto pelos espécimes 1, 3, e 4. Grupo C composto pelos espécimes 6 e 9.

Na Figura 3.9 é mostrado o gráfico de peso, que traz informações sobre as variáveis (deslocamento químico), o qual é analisado em conjunto com o gráfico de escores. Observa-se que os deslocamentos químicos (δ 7,18, 6,97 e 5,05) contribuíram para a separação dos espécimes do grupo A, daqueles dos grupos B e C. Conforme exposto anteriormente (item 3.4.1, pág. 78), esses sinais são característicos de acetogeninas, substâncias que possuem forte atividade larvicida frente ao microcrustáceo *Artemia salina* (Pimenta *et al.*, 2003).

Portanto, com a PCA, foi possível agrupar os espécimes de *A. muricata*, que apresentaram os melhores resultados no teste contra *A. salina*, sendo que as variáveis mais significativas para esse agrupamento estão relacionadas com as acetogeninas γ -lactona α,β -insaturadas.

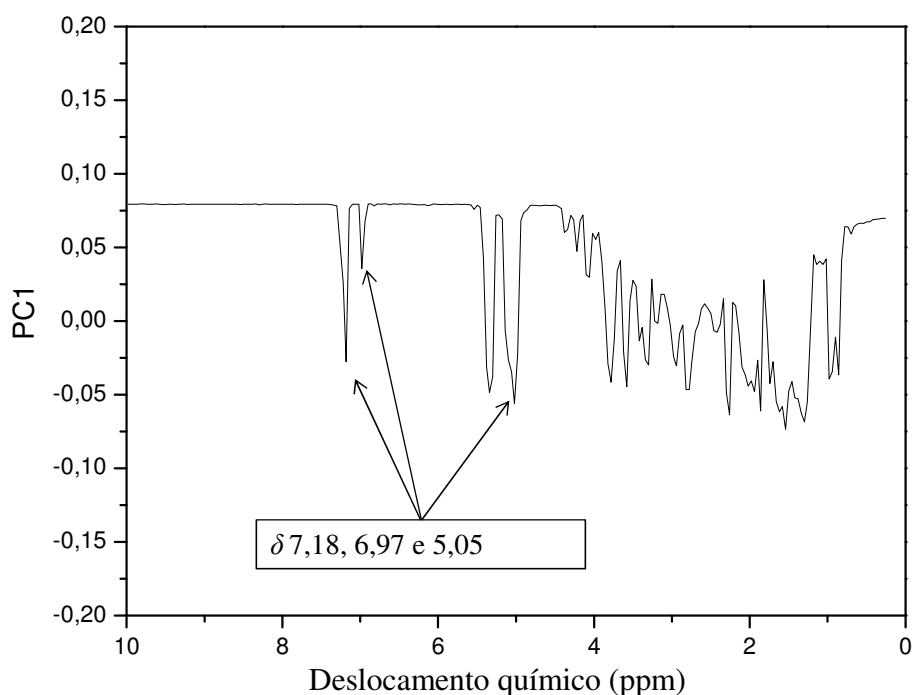


Figura 3.9 - Gráfico de pesos da análise de componentes principais (PC1) dos espectros de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) dos extratos clorofórmicos das folhas de *Annona muricata*.

3.4.3.2 Análise de agrupamentos hierárquicos

A HCA (Análise de agrupamentos hierárquicos) é um método de classificação, que busca agrupar as amostras em classes, produzindo um dendograma onde as amostras semelhantes, segundo as variáveis escolhidas, são agrupadas entre si (Prata *et al.* 2011). Os resultados encontrados na HCA corroboram os resultados da PCA, conforme demonstra o dendograma da Figura 3.10, uma vez que esse também indicou a formação de três grupos.

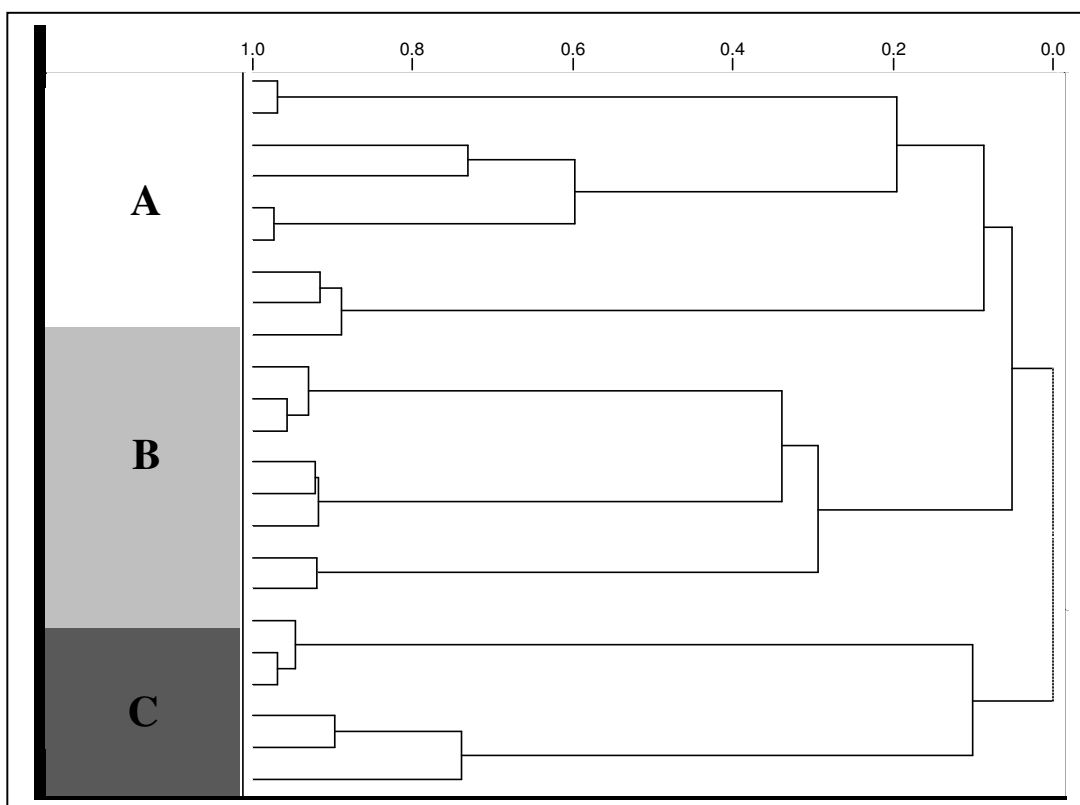


Figura 3.10 - Dendograma obtido da análise de agrupamento hierárquico, com base na distância euclidiana média dos espectros de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) dos extratos clorofórmicos das folhas de *Annona muricata*. Grupo A composto pelos espécimes 2, 5, 7 e 8. Grupo B composto pelos espécimes 1, 3, e 4. Grupo C composto pelos espécimes 6 e 9.

3.4.3.3 Regressão por mínimos quadrados parciais

Para se avaliar a possibilidade do uso da RMN de ^1H como ferramenta para previsão da atividade larvicida dos extratos de *A. muricata*, foi construído um modelo multivariado de calibração, utilizando-se toda a região espectral e a técnica de regressão por mínimos quadrados parciais (PLS). Assim, todos os metabólitos presentes nos extratos foram incorporados à análise. O modelo foi desenvolvido a partir de um conjunto de calibração composto por 37 espectros (obtidos dos 9 espécimes de *A. muricata*), sendo que 10 espectros foram utilizados para validação externa do modelo. Após a obtenção da matriz **X** (item 3.4.3, pág. 81) e da matriz **Y** (valores de DL_{50} , Tabela 3.2, pág. 81), foi avaliado o número ideal de variáveis latentes a ser utilizado no modelo, analisando-se o menor valor da raiz do erro quadrático médio de validação cruzada (RMSECV) em função do número de variáveis latentes do modelo (Figura 3.11). Portanto, verificou-se que o número de variáveis latentes adequado para construção do modelo foi 7.

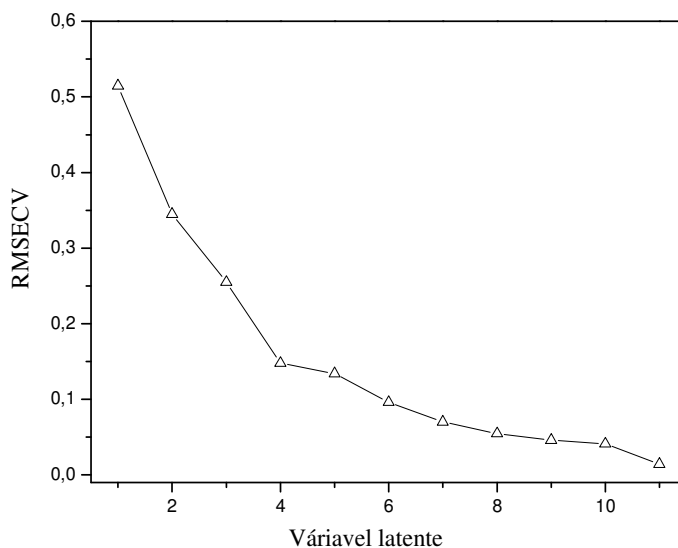


Figura 3.11 - Gráfico de variáveis latentes *versus* o erro quadrático médio de validação cruzada (RMSECV).

A presença de amostras anômalas foi verificada pela avaliação do gráfico de resíduos de Student *versus* "Leverage" (Figura 3.12). Amostras com altos resíduos, mas com baixa "Leverage" provavelmente possuem algum erro nos valores da DL₅₀. Essas amostras devem ser analisadas novamente ou excluídas do modelo (Ferreira *et al.*, 1999). Nessa avaliação, uma das amostras do espécime 8 apresentou um valor de resíduo superior ao limite (2,5). Dessa forma, optou-se por excluir essa amostra.

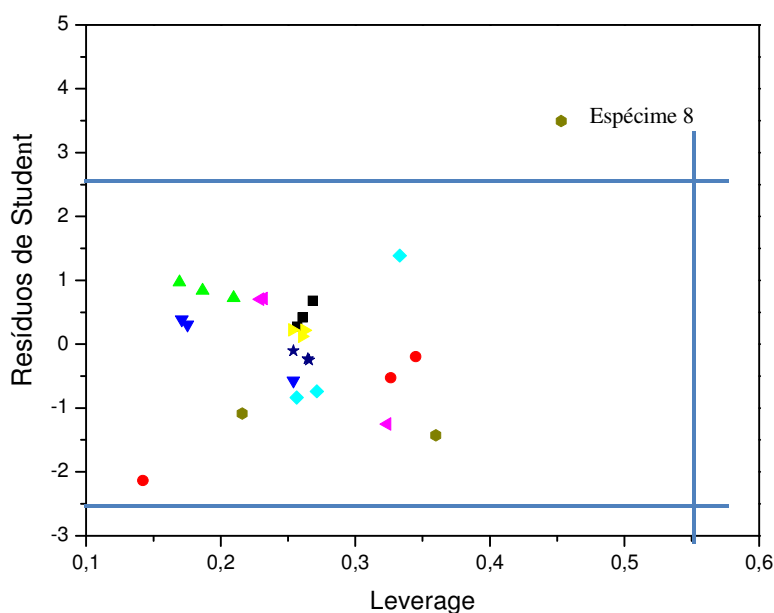


Figura 3.12 - Gráfico de "Leverage" *versus* resíduos de Student para a identificação de amostras anômalas. As linhas azuis indicam os limites aceitos pela literatura.

O modelo PLS, construído a partir de 7 variáveis latentes, permitiu descrever quase toda a informação contida nos dados originais, que foram utilizados na calibração. A Tabela 3.3 (pág. 89) apresenta os valores de variância para cada variável latente (VL).

Tabela 3.3 - Percentagem de variância obtida para cada variável latente do modelo PLS.

Váriavel latente	Variância (%)	Variância acumulada (%)
1	45,10	45,10
2	28,07	73,17
3	3,83	77,00
4	4,05	81,06
5	6,32	87,38
6	3,99	91,37
7	5,56	96,93

A Figura 3.13 (pág. 90) mostra o gráfico dos valores experimentais *versus* valores previstos para as amostras do conjunto de calibração. O coeficiente de regressão (R^2) foi igual a 0,99 indicando uma boa correlação entre os valores experimentais e os valores previstos. Na Tabela 3.4 (pág. 90) são mostrados os resultados da validação do modelo de calibração, utilizando-se um conjunto de 10 espectros, relativos aos extratos dos diferentes espécimes de *A. muricata*. Também é apresentada uma comparação com os valores encontrados nos ensaios contra *A. salina*, através do cálculo do erro relativo percentual. Observa-se que o modelo obtido prevê satisfatoriamente os valores de DL_{50} para os extratos, uma vez que as mesmas apresentaram erro percentual abaixo de 13 %. No entanto, vale destacar que esse modelo não deve ser considerado como resultado definitivo e sim como um indicativo do potencial das técnicas empregadas. Para construção de um modelo que possa ser aplicado a sistemas reais de avaliação é necessário um número maior de amostras. Desta forma, é possível se obterem modelos representativos, nos quais sejam consideradas variações metabólicas dos espécimes decorrentes da variabilidade sazonal, do processamento e da região geográfica de coleta, bem

como é necessária a realização de um número maior de testes biológicos, para que se possam incluir variações genéticas das populações dos microcrustáceos de *Artemia salina*.

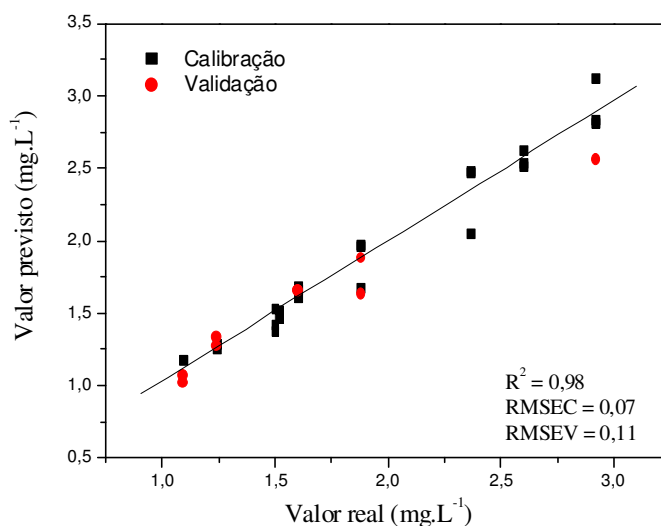


Figura 3.13 - Valor real *versus* valor previsto para DL₅₀ contra *Artemina salina* dos extratos das folhas de *Annona muricata*.

Tabela 3.4 - Resultados para a previsão da DL₅₀ frente *Artemia salina*, para as amostras do conjunto de validação.

Extratos	DL ₅₀ (mg.L ⁻¹)	DL ₅₀ prevista pelo modelo de calibração (mg.L ⁻¹)	Erro percentual (%)
1	1,88	1,64	12,66
2	1,60	1,66	4,31
3	1,60	1,67	4,52
4	1,88	1,89	0,15
5	2,92	2,57	12,09
6	1,09	1,03	5,68
7	1,09	1,08	0,99
8	1,24	1,34	8,06
9	1,24	1,28	3,11
10	1,24	1,28	3,05

3.4.4 Quantificação do teor de acetogeninas γ -lactona α,β -insaturadas

A PCA revelou que as diferenças observadas nos valores de DL_{50} pode estar associada aos diferentes teores de acetogeninas γ -lactona α,β -insaturadas presentes em cada espécime. Para averiguar melhor essa relação, foi desenvolvido um método por RMN de 1H para a quantificação do teor total destas acetogeninas. A aplicação RMN de 1H quantitativa exige que pelo menos um dos sinais, para quantificação do composto de interesse, esteja disponível para a integração sem qualquer sobreposição. O mapa de contornos J -resolvido (Figura 3.14) confirmou as multiplicidades dos sinais dos hidrogênios olefínicos presentes na porção γ -lactona α,β -insaturada das acetogeninas, bem como confirmou a ausência de sobreposição com outros sinais.

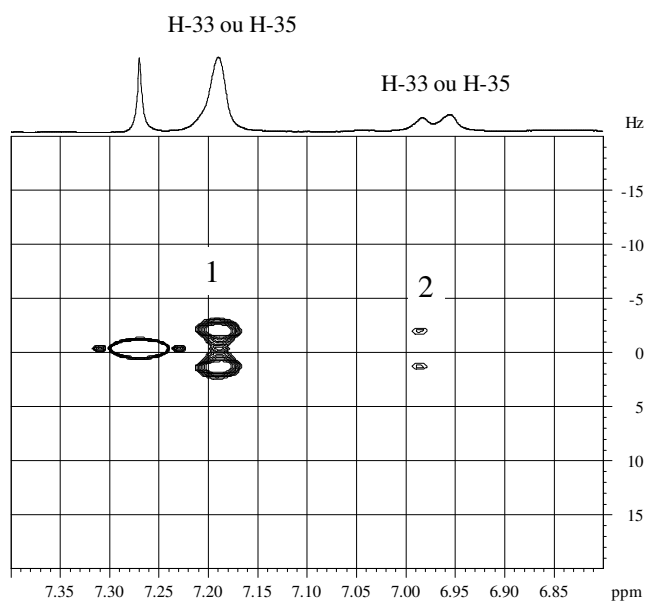


Figura 3.14 - Expansão do mapa de contornos J -resolvido (400 MHz, $CDCl_3$) do extrato clorofórmico das folhas de *Annona muricata* para a região em δ 6,8-7,4. (1) Acetogeninas do tipo annonacina e (2) acetogeninas do tipo solamina.

Assim, os sinais de H-33 ou H-35 em δ 7,18 e 6,97 podem ser integrados e, a partir da razão da área da linha de ressonância correspondente ao padrão interno e da área dos sinais em δ 7,18 e 6,97, pode se efetuar o cálculo descrito na Equação 3.2 (pág. 75). O espectro de RMN de ^1H (Figura 3.15) mostra um multipletto na região de δ 8,00-8,04, atribuído aos hidrogênios do antraceno, o qual não apresenta sobreposição com outros sinais dos extratos. Dessa forma, esse sinal foi selecionado para a integração.

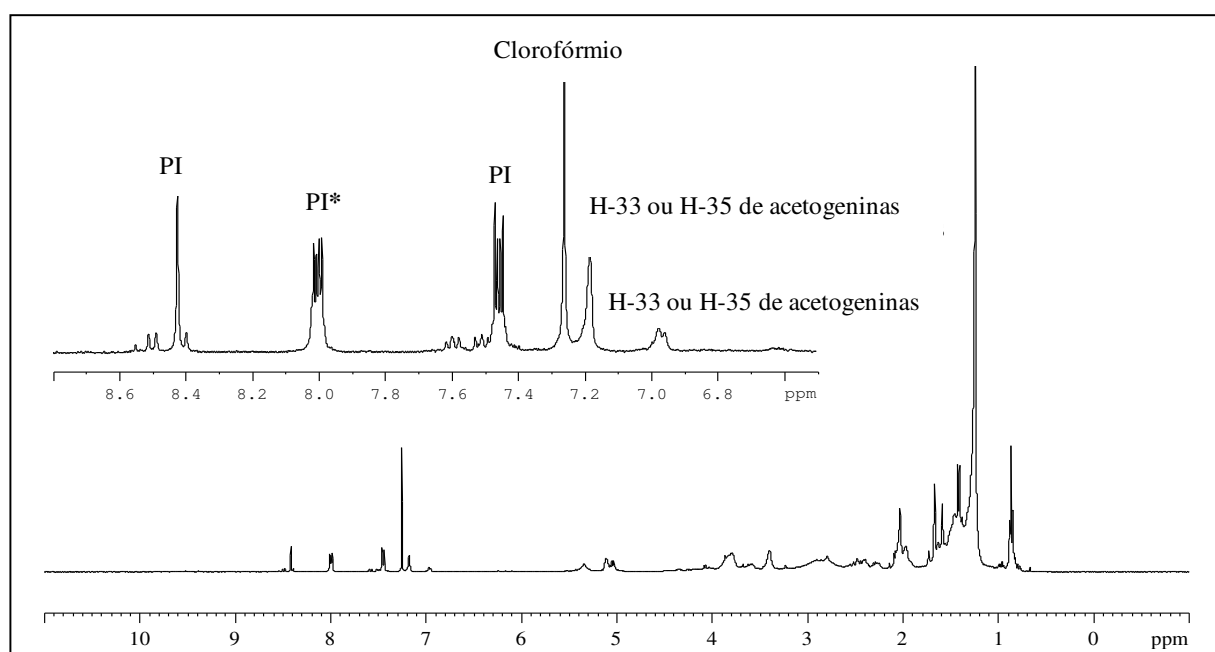


Figura 3.15 - Espectros de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do extrato clorofórmico das folhas de *Annona muricata* com o padrão interno antraceno.

A Tabela 3.5 (pág. 93) mostra as concentrações de acetogeninas totais nos extratos clorofórmicos dos diferentes espécimes de *Annona muricata*. As concentrações de acetogeninas variaram de 2,23 a 12,91 mg/g, de acordo com os espécimes estudados. Essas variações podem ser associadas às diferenças dendrométricas (Tabela 3.1, pág. 72) entre os espécimes. Pode se

observar também que a concentração de acetogeninas é diretamente proporcional a atividade do extrato contra *A. salina*, corroborando os resultados obtidos na PCA.

Tabela 3.5 - Concentração de acetogeninas γ -lactona α,β -insaturadas das folhas de *Annona muricata*.

Espécime	Concentração de acetogeninas	Concentração de acetogeninas	DL ₅₀
	(mg/g) de folhas expressa em annonacina	(mg/g) de folhas expressa em solamina	
1	9,92	3,38	1,88
2	9,10	2,45	2,52
3	10,65	3,52	1,50
4	10,09	3,50	1,60
5	8,83	3,12	2,37
6	12,91	4,10	1,09
7	7,36	2,23	2,60
8	8,35	3,46	2,92
9	11,43	2,99	1,24

3.5 Conclusão

Os resultados obtidos demonstram o potencial da RMN de ¹H no desenvolvimento de metodologias para previsão de atividades biológicas. Esses modelos multivariados, obtidos a partir dos espectros RMN de ¹H de extratos vegetais sem prévia purificação, implicam em inúmeras vantagens, principalmente às relacionadas à redução de tempo e custos de análises.

3.6 Referências Bibliográficas

- Adeyemi, O.D., Komolafe, O.A., Adewole, O.S., Obuotor, E.M., Adenowo, T.K. Anti hyperglycemic activities of *Annona muricata* (Linn). *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative*, v.6, p. 62-69, 2008.
- Bailey, N.J., Wang, Y., Sampson, J., Davis, W., Whitcombe, I., Hylands, P.J., Croft, S.L., Holmes, E. Prediction of anti-plasmodial activity of *Artemisia annua* extracts: application of ¹H NMR spectroscopy and chemometrics. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.35, p. 117-126, 2004.
- Cavé, A., Cortes, D., Figadère, A., Laurens, A., Pettit, G. R. In Progress in the Chemistry of Organic Natural Products, Herz, W., Kirby, G., Moore, R., Steglich, W., Tamm, C., eds.; Springer-Verlag: Wien and New York 1997, 330p.
- Clardy, J., Walsh, C. Lessons from natural molecules. *Nature*, v.432, p. 829-837, 2004.
- De Sousa, O.V., Vieira, GD-V., de Pinho, J.J.R.G., Yamamoto, C.H., Alves, M.S. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of the ethanol extract of *Annona muricata* L. leaves in animal models. *International Journal of Molecular Sciences*, v.11, p. 2067-2078, 2010.
- Ferrão M.F., Mello, C., Borin, A., Maretto, D.A., Poppi, R.J.LS-SVM: Uma nova ferramenta quimiométrica para regressão multivariada. Comparação de modelos de regressão LS-SVM e PLS na quantificação de adulterantes em leite em pó empregando NIR. *Química Nova*, v.30, p. 852-59, 2007.

- Ferreira, L.E., Castro, P.M.N., Chagas, A.C.S., França, S.C., Belebony, R.O. In vitro anthelmintic activity of aqueous leaf extract of *Annona muricata* L. (Annonaceae) against *Haemonchus contortus* from sheep. *Experimental Parasitology*, v.143, p. 327-332, 2013.
- Ferreira, M.M.C., Antunes, A.M., MEIgo, M.S., Volpe, P.L. Quimiometria I: Calibração multivariada, um tutorial. *Química Nova*, v.22, p. 724-731, 1999.
- Gromova, M., Roby, C. Toward Arabidopsis thaliana hydrophilic metabolome: assessment of extraction methods and quantitative ¹H-NMR. *Physiologia Plantarum*, v.140, p.111-127, 2010.
- Liaw, C.C., Chang, F.R., Lin, C.Y., Chou, C.J., Chiu, H.F, Wu, M.J., Wu, Y.C. New cytotoxic monotetrahydrofuran annonaceous acetogenins from *Annona muricata*. *Journal of Natural Product*, v.65, p. 470-475, 2002.
- Martins, L.R.R. Perfil Cromatográfico e Análise Multivariada para o controle de aualidade de amostras comerciais do gênero *Phyllanthus* (quebra-pedra). São Carlos, UFSCar, 2008. Tese de Doutorado, 154p.
- Oberlies, N.H., Chang, C.J., McLaughlin, J.L. Structure-activity relationships of diverse Annonaceous acetogenins against multidrug resistant human mammary adenocarcinoma (MCF-7/Adr) cells. *Journal of Medicinal Chemistry*, v.20, p. 2102-2106, 1997.
- Pimenta, L. P. S., Pinto, G. B., Takahashi, J. A., Silva, L. G. F., Boaventura, M. A. D. Biological screening of Annonaceous Brazilian medicinal plants using *Artemia salina*. *Phytomedicine*, v.10, p. 209-212, 2003.
- Prata, V.M., Emídio, E.S., Dórea, H.S. Aplicação de métodos quimiométricos na caracterização de charutos utilizando extração por dispersão da matriz em fase sólida e análise por

- cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. *Química Nova*, v.34, p. 53-58, 2011.
- Roos, G., Roeseler, C., Bueter, K.B., Simmen, U. Classification and correlation of St. John's wort extracts by nuclear magnetic resonance spectroscopy, multivariate data analysis and pharmacological activity. *Planta Medica*, v.70, p. 771-777, 2004.
- Santos, M.S., Colnago, L.A. Validação de método quantitativo por RMN de ¹H para análises de formulações farmacêuticas. *Química Nova*, v.36, p. 324-330, 2013.
- Siqueira, J. M., Bomm, M. D., Pereira, N. F. G., Garcez, W. S., Boaventura, M. A. D. Estudo fitoquímico de *Unonopsis lindmanii* (Annonaceae) biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre a *Artemia salina* Leach. *Química Nova*, v.21, p. 37-45, 1998.
- Takahashi, J.A., Pereira, C.A., Pimenta, L. P. S., Boaventura, M. A. D., Silva, L. G. F. Antibacterial activity of eight Brazilian annonaceous plants. *Natural Product Research*, v. 20, p. 21-26, 2006.
- Yuliana, N.D., Khatib, A., Verpoorte, R., Choi, Y.H. comprehensive extraction method integrated with nmr metabolomics: a new bioactivity screening method for plants, adenosine a1 receptor binding compounds in *Orthosiphon stamineus* Benth. *Analytical Chemistry*, v.83, p. 6902-6906, 2011.

Capítulo 4

**PERFIL METABÓLICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
NEMATICIDA DOS EXTRATOS DE *Annona crassiflora***

4.1 Introdução

Diversos gêneros de plantas têm se apresentado como fontes de várias substâncias com potencial para serem empregados no controle de nematoides (Chiwood, 2002). Dentre esses, pode-se destacar o gênero *Annona*, pois os extratos de diferentes espécies apresentaram atividades nematicidas contra diversos nematoides, tais como: *Haemonchus*, *Bursaphelenchus* e *Meloidogyne* (Alawa *et al.*, 2003; Dang *et al.*, 2011; Ferreira *et al.*, 2013). Em particular, a *Annona crassiflora* Mart é uma espécie arbórea nativa dos cerrados brasileiros, que apresenta vários compostos bioativos (Pimenta *et al.*, 1994; Pimenta *et al.*, 1996). Entretanto, o estudo do seu potencial nematicida tem recebido pouca atenção. Desse modo, a identificação de metabólitos de *A. crassiflora* com propriedades nematicidas pode ser de grande valia para o desenvolvimento de novos produtos, que objetivem o controle de nematoides.

Para avaliação da atividade nematicida *in vitro* de extratos vegetais podem-se utilizar tanto nematoides fitoparasitas quanto aqueles parasitas de animais. No entanto, muitos pesquisadores optam por realizar ensaios com nematoides de vida livre, como o *Caenorhabditis elegans* (Camurça Vasconcelos *et al.*, 2005). A utilização de testes *in vitro* sobre esse nematoide é um método consagrado para a descoberta de novos nematicidas de amplo espectro, pois se um composto apresentar atividade contra nematoides de vida livre, esse resultado pode ser relevante a um parasita de uma diferente ordem. Ademais, o método é rápido barato e muito conveniente, já que possui um manuseio simples, fato que reforça o uso deste modelo como método de “*screening*” para substâncias nematicidas (McGaw *et al.*, 2007).

4.2 Objetivos

Avaliar a atividade nematicida *in vitro* dos extratos de *A. crassiflora*, utilizando-se como modelo o nematoide de vida livre *Caenorhabditis elegans*, bem como analisar o perfil metabólico daquela espécie.

4.3 Procedimentos experimentais

4.3.1 Materiais e reagentes

Os solventes e reagentes utilizados tiveram grau de pureza P.A. Para os experimentos de cromatografia em camada delgada (CCD) e para os experimentos de cromatografia em coluna (CC) utilizou-se sílica-gel 70-230 mesh (Sigma Aldrich). As análises cromatográficas em camada delgada foram realizadas em placas de SiO₂ (Sigma-Aldrich) com 0,25 mm. Para revelação das placas foram empregadas lâmpadas de UV (254 e 365 nm) e solução etanólica de vanilina 5 % (p/v) seguida de uma solução etanólica a 5% (v/v) de ácido sulfúrico.

4.3.2 Material vegetal

Folhas de *Annona crassiflora* foram coletadas no município de Itatiaiuçu, Minas Gerais. Uma exsicata da espécie foi incorporada ao acervo do Herbário do Instituto de Ciências Biológicas (BHCB, nº 22.988) da Universidade Federal de Minas Gerais. As folhas foram limpas, secas e moídas.

4.3.3 Estudo metabolômicos dos extratos das folhas de *Annona crassiflora*

Para o estudo metabolômico das folhas de *A. crassiflora*, as amostras foram preparadas, os espectros adquiridos e processados, conforme descrito na capítulo 2 (item 2.3.4.1, pág. 36) para a espécie *A. muricata*.

4.3.4 Extração e isolamento dos metabólitos

As folhas secas e moídas (500 g) foram submetidas a extração exaustiva, por percolação com hexano à temperatura ambiente. O extrato obtido foi concentrado, usando-se evaporador rotatório sob pressão reduzida para obtenção do extrato hexânico (2,3 % m/m). O resíduo vegetal obtido da extração foi submetido à extração exaustiva com uma solução hidroalcoólica (EtOH: H₂O, 8/2 v/v) e concentrado em evaporador rotatório sob pressão reduzida, para a obtenção do extrato hidroalcoólico bruto (35,2% m/m). Aproximadamente 10 g do extrato hidroalcoólico foram submetidos a partição com solventes de polaridade crescente, obtendo-se as seguintes frações e seus respectivos rendimentos: diclorometano (1,7 % m/m), acetato de etila (1,5 % m/m), metanol (89,7 % m/m) e água (3,2 % m/m).

O extrato hidroalcoólico também foi submetido à marcha química para alcaloides. Para tanto, aproximadamente dez gramas desse extrato foram solubilizados em 200 mL de uma solução aquosa de metanol (80 % v/v), filtrados em algodão e transferidos para um funil de separação. A solução resultante foi acidificada com HCl (0,1 mol.L⁻¹). Extraíu-se então por três vezes com 100 mL de CHCl₃, obtendo-se a fração clorofórmica I. Em seguida, a fração aquosa foi alcalinizada com NH₄OH (0,1 mol.L⁻¹), e se obteve a fração clorofórmica II (fração alcaloídica) por extração com CHCl₃.

Todos os extratos foram submetidos ao teste de atividade nematicida (item 4.3.7.2, pág.104) para seleção do material a ser estudado. As frações diclorometânica e acetatoetífica apresentaram melhores resultados, tendo sido então combinadas e submetidas ao fracionamento por cromatografia em coluna de sílica gel, que foi eluída com hexano/acetato de etila em gradiente de polaridade de 5 a 100% (v/v). As frações resultantes desse processo foram

combinadas de acordo com o perfil cromatográfico (CCD). Foram isoladas a quercetina e o kaempferol, além de um óleo que foi analisado por CG-EM (item 4.3.5), sendo identificado o palmitato de metila como componente majoritário, além de outros compostos voláteis minoritários tais como: palmitato de etila, oleato de metila, estearato de metila, 2-isopropil-5-metilciclohexan-1-ol e γ -dodelactona.

O extrato alcaloídico também foi submetido ao fracionamento por cromatografia em coluna de sílica gel, eluída com acetato de etila/metanol em gradiente de polaridade de 100 a 10 % (v/v). As frações resultantes desse processo foram combinadas de acordo com o perfil cromatográfico (CCD). O alcaloide aterospermidina foi a única substância isolada.

4.3.5 Análise por CG-EM

A análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) foi realizada em um cromatógrafo Shimadzu GCMS-QP2010 Plus equipado com sistema automático de injeção AOC-10. No experimento, empregou-se uma coluna capilar Rxi-1 (100% polidimetilsiloxano), 30 m de comprimento, diâmetro interno de 0,25 mm, espessura do filme de 0,25 μ m. As condições da análise foram: temperatura do injetor 250 °C, temperatura inicial do forno 150 °C, a qual foi elevada até 300 °C, a uma taxa de 3 °C/min. O volume injetado foi de 1 μ L. A injeção se deu no modo *split* na razão de 10:1, o gás de arraste usado foi o He (hélio) e o fluxo do gás foi de 2,07 mL/min. A análise de EM foi realizada em um quadrupolo sistema MS (QP-2010plus) operando a 70 eV sob as mesmas condições descritas acima. A identificação dos compostos foi realizada por comparação com os dados espectrais de massas das bibliotecas NIST 62 e NIST 12.

4.3.6 Síntese de ésteres metílicos

A um balão de 150 mL, adaptado a um condensador de refluxo, contendo 1,00 g dos padrões (ácido palmítico e ácido esteárico), foi adicionado 20 mL de hexano e 80 mL de uma solução metanólica de H₂SO₄ 2 % (v/v), deixando-se a mistura obtida mantida sob refluxo por 1 hora. Após resfriamento, o material foi transferido para um funil de decantação e lavado com 100 mL de solução de NaCl 10 % (p/v). A camada orgânica separada foi lavada com água e seca com Na₂SO₄ anidro. Após filtração, o solvente foi retirado a vácuo. A identidade dos produtos foi confirmada por CG-EM (item 4.3.5, pág. 102).

4.3.7 Avaliação da atividade nematicida

Os ensaios com *Caenorhabditis elegans* foram realizados no Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos do Instituto de Ciências Biológicas/UFMG coordenado pelo professor Dr. Ricardo Toshio Fujiwara.

4.3.7.1 Cultivo das larvas de *Caenorhabditis elegans*

As larvas de *C.elegans* foram cultivadas em placas de NGM 8P, segundo a metodologia descrita por Brenner (1974). Após sete dias de cultivo das placas em BOD 20 °C, essas foram lavadas com meio M9 (KH₂PO₄ 22 mM; Na₂HPO₄ 42 mM; NaCl 85,5 mM; MgSO₄ 1 mM) e então passadas através de três tamises com aberturas de 40 µm, 30 µm e 20 µm, respectivamente. As larvas retidas no tamis de 20 µm foram recolhidas e lavadas duas vezes por centrifugação

(700xg por 4 minutos) em M9 (Stiernagle, 2006). As dimensões médias das larvas obtidas foram 527 μ m (n=8 fator de correção 6,826) de comprimento por 23,3 μ m (n=8 fator de correção 1,712) de diâmetro. O material foi ressuspenso em meio M9 e aproximadamente 1000 larvas para cada 100 μ L foram utilizadas em cada ensaio.

4.3.7.2 Teste de mobilidade

Em uma placa de Elisa com 96 poços foram adicionados 100 μ L de suspensão de larvas para cada poço. Logo em seguida, 100 μ L de uma solução aquosa de DMSO (0,5 % v/v) dos extratos, ou das frações ou dos compostos puros, foram adicionados a cada poço numa concentração final de 1000 mg.L⁻¹. As placas contendo as amostras e as larvas foram acondicionadas em BOD a 20 °C. Após 72 horas, 10 μ L de cada poço foi retirado para análise e quantificação. A observação foi feita em microscópio óptico no aumento de 40X. As larvas foram consideradas paralisadas, quando apresentavam corpo retilíneo e sem nenhum movimento (Mukhtar e Pervaz, 2003). Os valores da percentagem média de nematoides imóveis foram submetidos à análise de variância, empregando-se o programa computacional SISVAR. As médias foram comparadas segundo o teste de Scott e Knott ($P \leq 0,05$). Os cálculos da ED₅₀ foram realizados por regressão não-linear utilizando-se, o modelo sigmoidal, disponibilizado pelo software Origin 6.0.

4.3.7.3 Avaliação da viabilidade celular de *C.elegans*

Após o período de 72 horas (item 4.3.7.2), foram adicionados às placas os marcadores iodeto de propídeo (Invitrogen) e Sytox (Invitrogen), nas concentrações finais de 5 μ M e 20 μ M, respectivamente (Gill *et al.* 2003; Hunt *et al.* 2012). As placas foram agitadas por 15 minutos em agitador horizontal de bancada e em seguida levadas para leitura em microscópio óptico (Leica DM500).

4.4 Resultados e discussão

4.4.1 Análise do perfil metabólico por RMN de ^1H

Inicialmente, o extrato das folhas de *A. crassiflora*, obtido conforme descrito por Kim e colaboradores (2010), foi caracterizado por RMN de ^1H . A análise inicial do espectro permite identificar sinais característicos de aminoácidos e ácidos orgânicos na região entre δ 0,80 e 4,00, carboidratos na faixa entre δ 4,00 e 5,50 e de compostos aromáticos entre δ 5,50 e 8,50 (Figura 4.1).

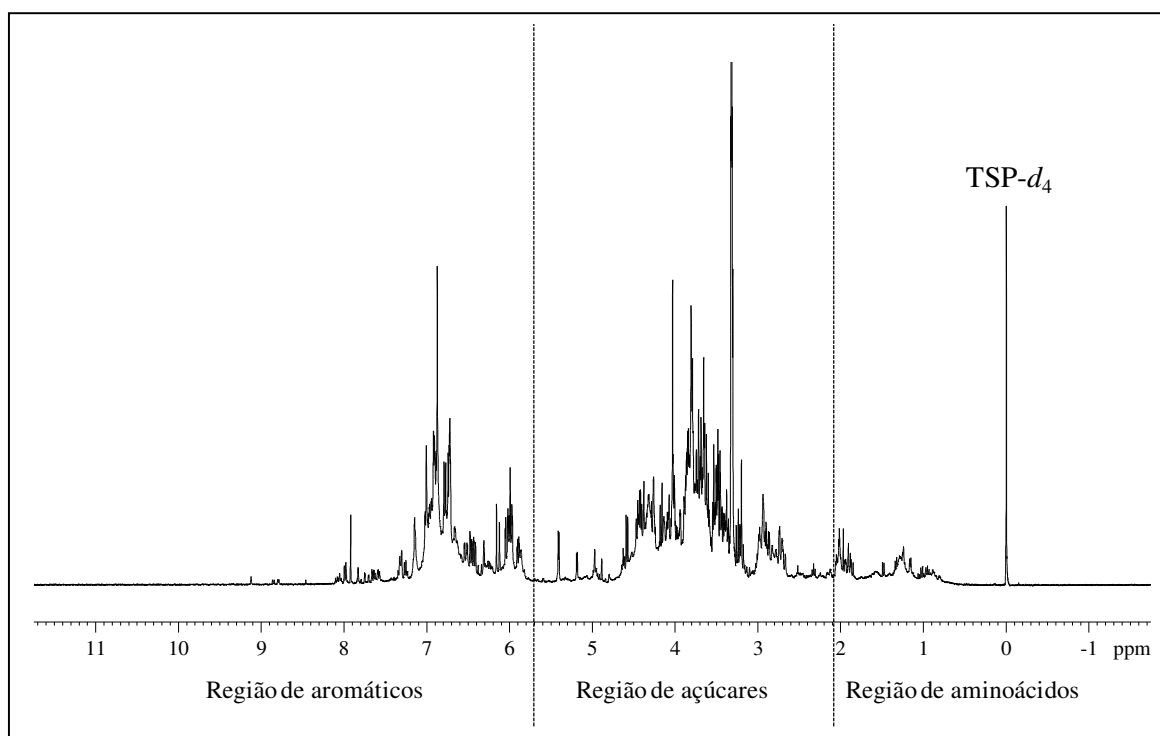


Figura 4.1 - Espectro de RMN de ^1H do extrato das folhas de *Annona crassiflora* (400 MHz, metanol- d_4 / tampão KH_2PO_4 em D_2O , pH=6).

Comparando-se os sinais obtidos com os dados de RMN de ^1H de metabólitos comuns disponíveis na literatura (Ali *et al.*, 2009; Abdel-Farid *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2010; Ali *et al.*, 2011; Pimenta *et al.*, 2013) e ainda com uso das técnicas HSQC, *J*-resolvido e COSY foi possível a identificação de vários compostos em uma única análise (Tabela 4.1).

Tabela 4.1 - Metabólitos identificados no extrato das folhas de *Annona crassiflora* por RMN.

Substâncias	Deslocamento químico (δ); multiplicidade; [constante de acoplamento escalar (<i>J</i> /Hz)]
Alanina	1,48; d; [7,2]
Treonina	1,32; d; [6,6]
Valina	1,00; d; [7,0]; 1,05; d; [7,0]; 2,3;m
Colina	3,24; s
Sacarose	5,40; d; [3,8];4,17; d; [8,5]
α -glicose	5,18; d; [3,8]
β -glicose	4,58; d; [7,8]
Ácido ferúlico	7,56; d; [15,9]; 7,19; d; [2,1]; 7,10; dd; [8,4 e 2,1]; 6,88; d; [8,4]; 7,15; d; [2,8];6,33; d; [15,9]
Ácido fórmico	8,46; s
Ácido 4-aminobutírico	2,30; t; [7,2]; 3,01, t; [7,5]
(+)-catequina	5,91; d; [2,2]; 6,71; dd; [8,0 e 2,0]; 6,75; d; [8,5]; 6,88; d; [2,0]
Quercetina	7,70; d; [2,0]; 7,66; dd;[8,6 e 2,0]; 6,99;d;[8,6]; 6,52; d;[2,0]; 6,32; d; [1,8]
Trigonelina	9,14; s; 8,87; m
Xantina	7,92; s

Conforme apresentado na Figura 4.1 e na Tabela 4.1 (pág. 106 e 107), o espectro de RMN de ^1H apresentou sinais pertencentes a diferentes metabólitos. Na região entre δ 1,0-2,0, os sinais de alguns aminoácidos foram detectados e suas multiplicidade confirmadas com experimento *J*-resolvido (Figura 4.2). Nessa região foram observados um duplete em δ 1,48 [d; 7,2 (Hz)], característico da alanina, juntamente com um duplete em δ 1,32 [d; 6,6 (Hz)], pertencente à treonina.

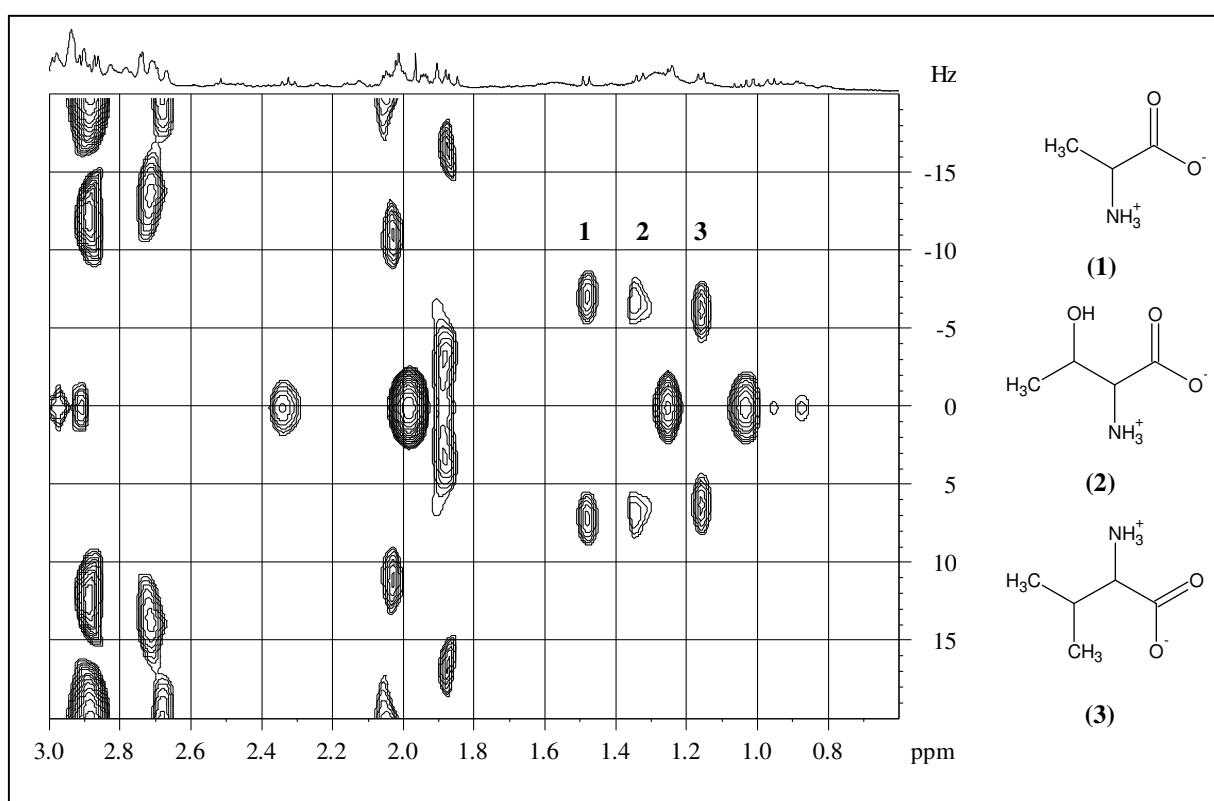


Figura 4.2 - Expansão do mapa de contornos *J*-resolvido do extrato das folhas de *Annona crassiflora* (400 MHz, metanol- d_4 / tampão KH_2PO_4 em D_2O , pH=6) para a região em δ 1,0-3,0. (1) alanina, (2) treonina e (3) valina.

Os sinais nas regiões de carboidratos, embora intensos, apresentaram-se sobrepostos. Entretanto, os sinais dos hidrogênios anoméricos de alguns açúcares, como da α -glicose em δ 5,18 [d; 3,60 (Hz)], β -glicose em δ 4,57 [d; 8,10 (Hz)] e sacarose em δ 5,40 [d; 3,60 (Hz)] e δ 4,16 [d; 4,70 (Hz)] foram claramente identificados, utilizando-se o experimento J -resolvido (Figura 4.3).

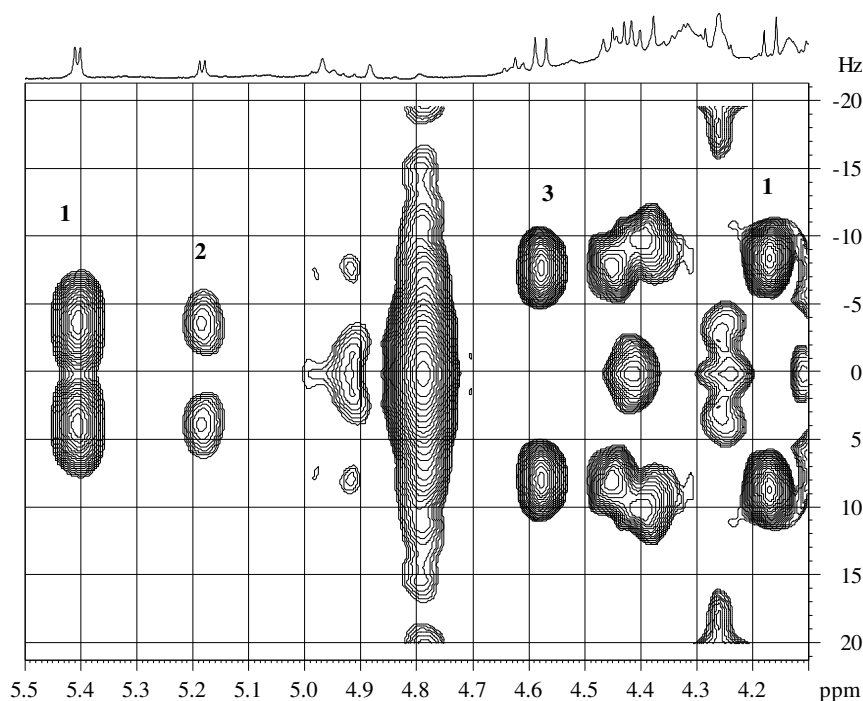


Figura 4.3 - Expansão do mapa de contornos J -resolvido do extrato das folhas de *Annona crassiflora* (400 MHz, metanol- d_4 / tampão KH_2PO_4 em D_2O , pH=6) para a região em δ 4,1-5,2. (1) sacarose, (2) α -glicose e (3) β -glicose.

Na região aromática foram observados vários sinais, tendo sido identificadas as ressonâncias características da quercetina e do ácido ferúlico (Tabela 4.2). Com auxílio do experimento J -resolvido (Figura 4.4, pág. 110) foi possível a determinação dos valores das

constantes de acoplamentos para alguns sinais que estavam sobrepostos, confirmando-se assim as multiplicidades dos mesmos.

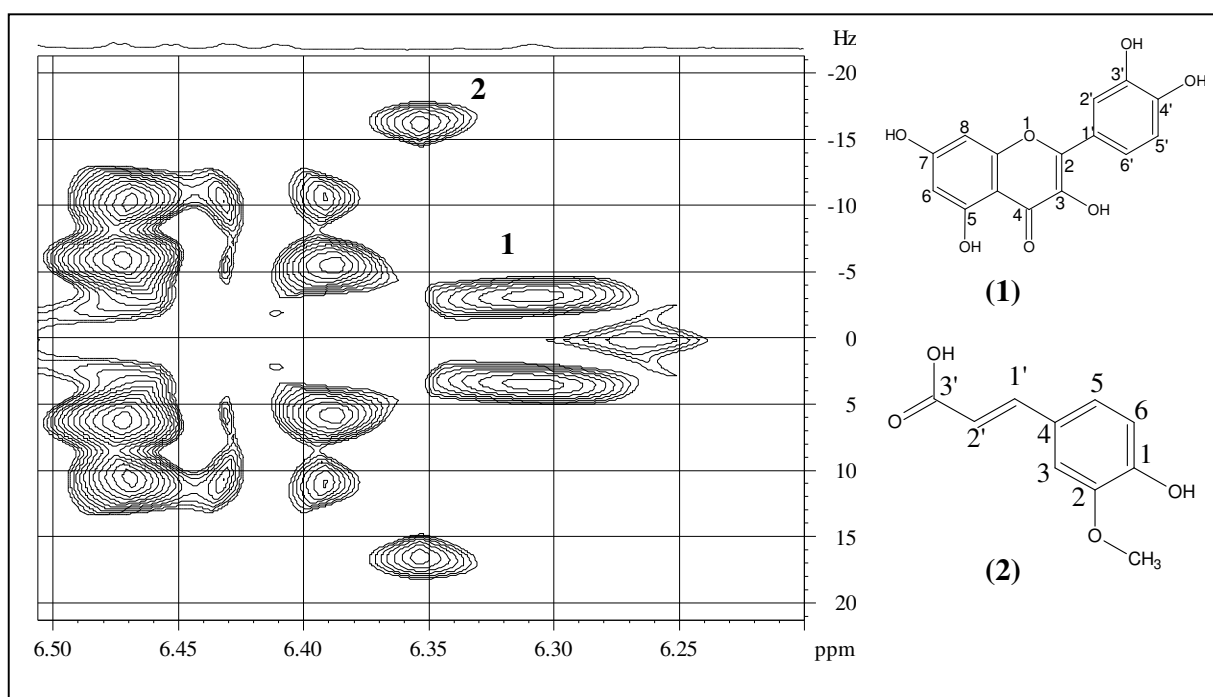


Figura 4.4 - Expansão do mapa de contornos *J*-resolvido do extrato das folhas de *Annona crassiflora* (400 MHz, metanol-*d*₄/ tampão KH₂PO₄ em D₂O, pH=6) para a região em δ 6,5-8,2. Fórmulas estruturais (1) da quercetina e (2) do ácido ferúlico.

No mapa de contornos COSY (Figura 4.5, pág. 111); observou-se a correlação do sinal em δ 6,53 [H-8; d; 1,8 (*J*/Hz)] com o sinal em δ 6,32 [H-6; d; 1,8 (*J*/Hz)], bem como a correlação entre o sinal δ 7,66 [H-6'; dd, 8,6 e 2,0 (*J*/Hz)] com sinal em δ 6,99 [H-5'; d; 8,6 (*J*/Hz)], confirmando-se a estrutura da quercetina. Ainda na região dos hidrogênios aromáticos, foram registrados sinais característicos do ácido ferúlico (Figura 4.5, pág. 111). As correlações observadas no mapa de contornos COSY confirmaram os acoplamentos entre H-7 com o H-8 e

entre o H-5 com H-6. Também foram registrados sinais característicos da betaína trigonelina, identificada pela primeira vez nesta espécie.

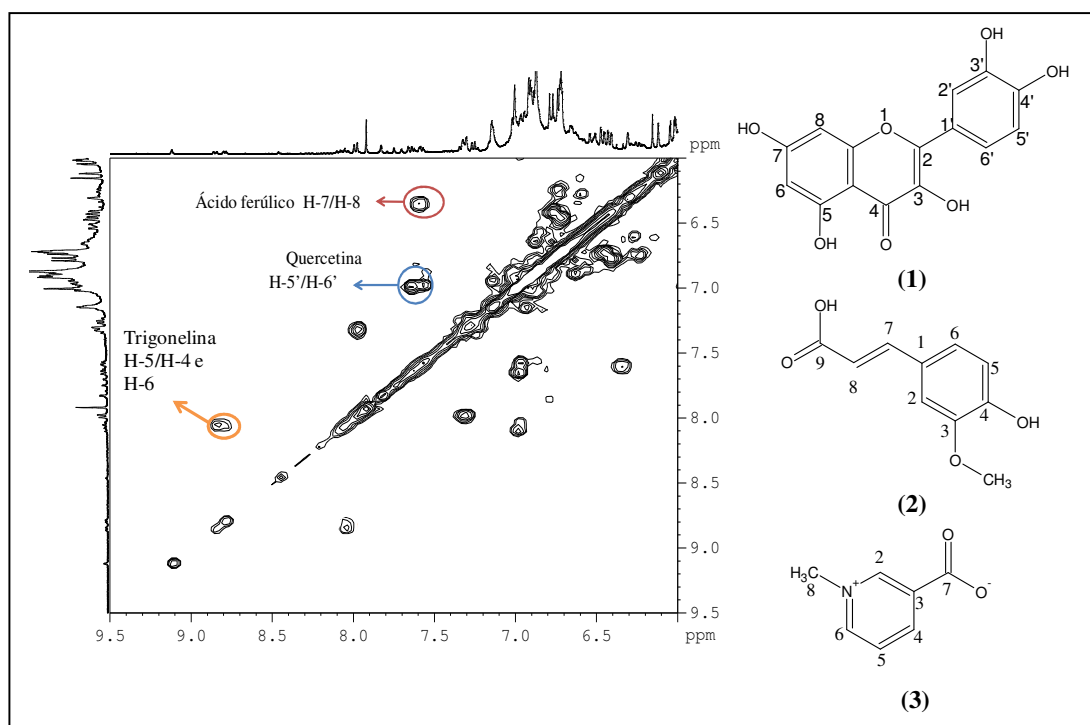


Figura 4.5 - Expansão do mapa de contornos COSY do extrato das folhas de *Annona crassiflora* (400 MHz, metanol- d_4 / tampão KH_2PO_4 em D_2O , pH=6) para a região em δ 6,0-9,5. Fórmulas estruturais (1) da quercetina; (2) do ácido ferúlico e (3) da trigonelina.

A análise metabolômica por RMN de ^1H do extrato hexânico das folhas de *A. crassiflora* (Figura 4.6, pág. 112) revelou a presença de ácidos graxos saturados, devido ao registro dos sinais em δ 1,60 e δ 2,30, característicos do grupo $\beta\text{-CH}_2$ e $\alpha\text{-CH}_2$ destes metabólitos (Knothe e Kenar, 2004). Os sinais dos outros hidrogênios da cadeia de hidrocarbônica foram registrados em δ 1,30. Também foram registrados sinais típicos de ácidos graxos insaturados em δ 2,07 e δ 5,35, característicos dos hidrogênios alílicos e olefinicos, respectivamente. Os sinais de grupos metila

terminais desses metabólitos foram registrados em δ 0,90. Também vale destacar o registro de sinais entre δ 4,10 e 4,40, característicos de triacilgliceróis (Annarao *et al.*, 2008).

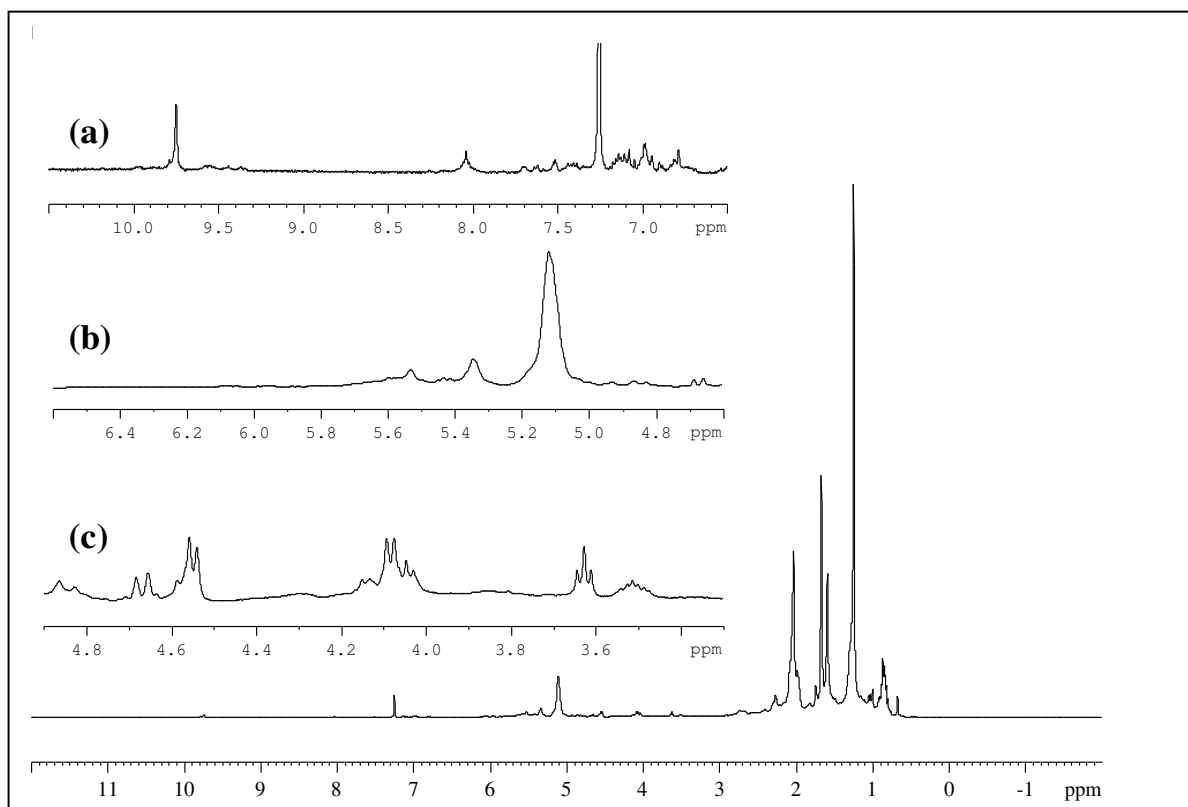


Figura 4.6 - Espectro de RMN de ^1H da fração hexânica das folhas de *Annona crassiflora* (400 MHz, CDCl_3). Região de expansão (a) entre δ 6,00-11,00; (b) entre δ 4,70-6,50 e (c) entre δ 3,30 - 4,90.

A análise do espectro de RMN de ^1H dos extratos em diclorometano (Figura 4.7, pág. 113) e em acetato de etila (Figura 4.8, pág. 114) revelaram a presença de feofitinas, pois foram registrados sinais em δ 3,17, δ 3,40 e δ 3,62, concordantes com as metilas do núcleo porfirínico desses metabólitos. Os sinais em δ 7,96 [dd; 17,79 e 11,54 (Hz)]; δ 6,26 [dd; 17,79 e 1,50 (J/Hz)]; δ 6,16 [dd; 11,79 e 1,50 (Hz)] confirmam a presença de um grupo de hidrogênios vinílicos.

Ademais, foram observados sinais de hidrogênios em δ 9,37 (H-5), δ 9,54 (H-10) e δ 8,63 (H-20). Com base nesses resultados e ainda por comparação com dados da literatura (Schwikkard *et al.*, 1998; Chatterjee *et al.*, 2010) foi possível identificar nos extratos em diclorometano e em acetato de etila a presença da feofitina a (Figura 4.9a, pág. 114). Também foram registrados sinais em δ 11,38 e δ 10,36, que por comparação com dados da literatura (Schwikkard *et al.*, 1998; Chatterjee *et al.*, 2010) confirmam a presença de outra estrutura porfirínica, a feofitina b (Figura 4.9b, pág. 114).

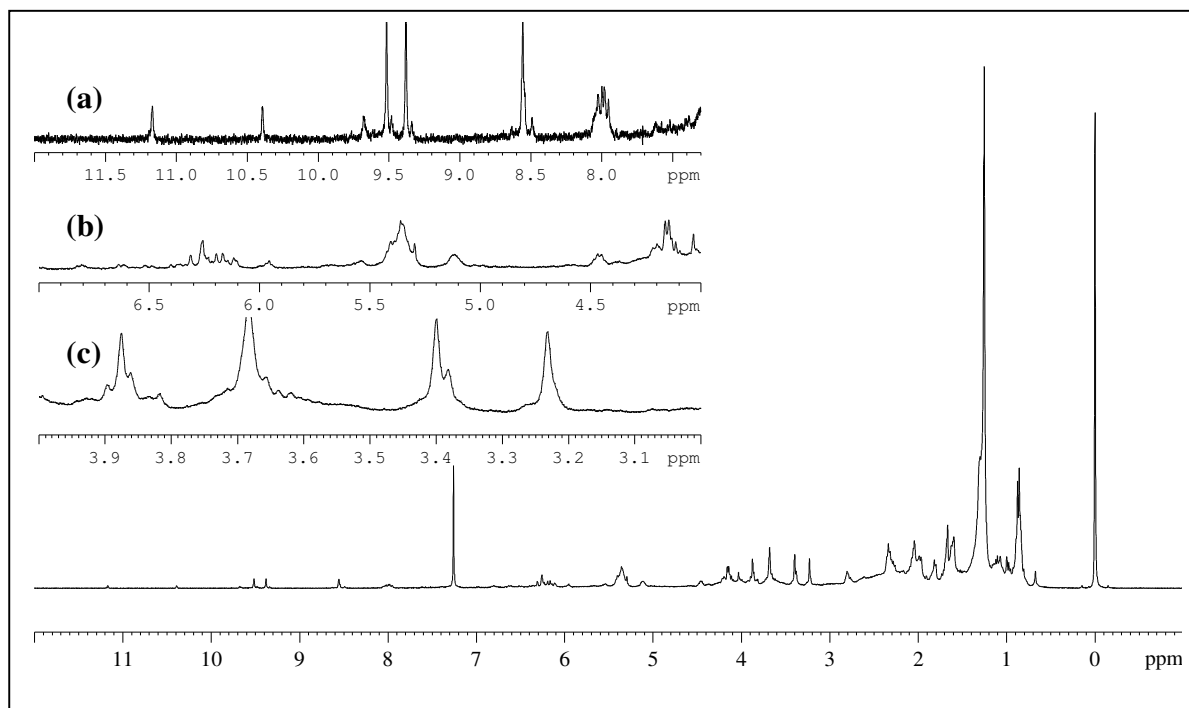


Figura 4.7 - Espectro de RMN de ^1H da fração diclorometânica das folhas de *Annona crassiflora* (400 MHz, CDCl_3). Região de expansão (a) entre δ 6,00-11,00; (b) entre δ 4,70-6,50 e (c) entre δ 3,30-4,90.

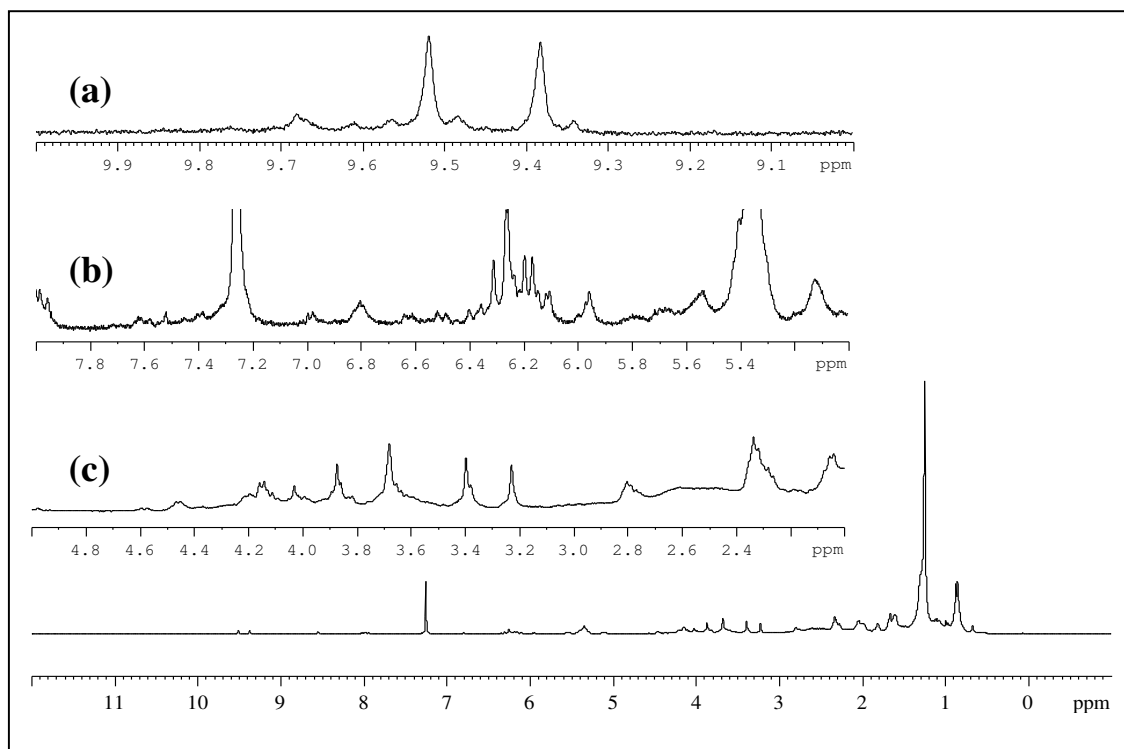
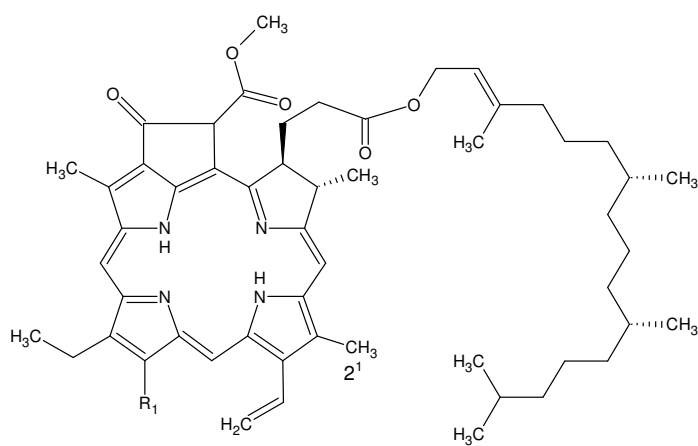


Figura 4.8 - Espectro de RMN de ^1H da fração acetoiética das folhas de *Annona crassiflora* (400 MHz, CDCl_3). Região de expansão (a) entre δ 6,00-11,00; (b) entre δ 4,70-6,50 e (c) entre δ 3,30-4,90.



(a) Feofítina a $\text{R}_1 = \text{CH}_3$

(b) Feofítina b $\text{R}_1 = \text{COH}$

Figura 4.9 - Fórmulas estruturais da feofítina a (a) e feofítina b (b).

4.4.2 Atividade nematicida e purificação dos metabólitos

O extrato hidroacoólico apresentou atividade sobre a mobilidade do nematoide *C. elegans* (Tabela 4.2). Dessa forma, esse extrato foi submetido à partição com CH₂Cl₂, acetato de etila, MeOH e H₂O. Observou-se que a atividade se concentrou nos extratos em acetato de etila e em diclorometano (Tabela 4.2). Também foi observada uma atividade moderada para o extrato alcaloídico (Tabela 4.2).

Tabela 4.2 - Percentagem de nematoides imóveis após exposição aos extratos e frações das folhas de *Annona crassiflora*.

Extrato e frações	Nematoides imóveis (%)*
Extrato hidroacoólico	78,60 d
Fração aquosa	66,16 c
Fração metanólica	43,53 b
Fração acetatoetílica	89,66 e
Fração diclorometano	98,13 e
Extrato alcaloídico	60,00 c
Solução aquosa de DMSO (1 % v/v)	4,56 a

* Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott-Knot ($P \leq 0,05$).

As frações diclorometânica e acetoetílica foram analisadas por CCD e RMN de ¹H (Figura 4.7 e 4.8, pág. 113 e 114), observando-se um perfil metabólico semelhante. Em decorrência, essas frações foram combinadas e fracionadas por cromatografia em coluna de sílica (CC, pág. 102), da

qual foram obtidos os flavonoides quercetina (2,4 mg; Figura 4.5, pág. 111) e kaempferol (2,7 mg; Figura 4.10), os quais tiveram suas estruturas confirmadas por comparação dos dados de RMN 1D e 2D com dados da literatura (Abdel-Sattar *et al.*, 2009; Dhasan *et al.*, 2008; Thakur *et al.*, 2009; Adebayo *et al.*, 2010). Esse é o primeiro relato do isolamento dessas substâncias na espécie *A. crassiflora*.

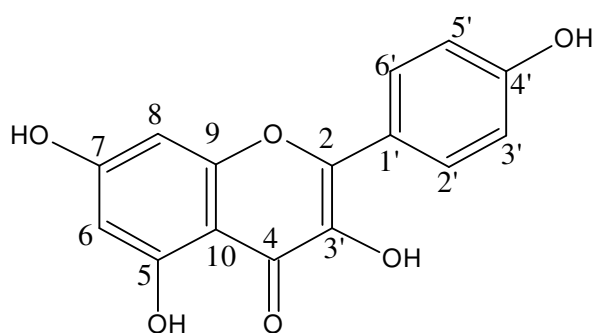


Figura 4.10 - Fórmula estrutural do kaempferol.

Também foi isolado um óleo, cuja análise por CG-EM e RMN de ^1H permitiu identificar o palmitato de metila como componente majoritário. A Tabela 4.3 (pág. 117) apresenta os componentes identificados através da comparação dos espectros de massas com os dados da biblioteca do aparelho, considerando o índice de similaridade igual ou maior que 85 % (Figura 4.11, pág. 117).

Tabela 4.3 - Composição química do óleo isolado das folhas de *Annona crassiflora*.

Composto	Tempo de retenção (min)	Percentagem relativa (%)
Palmitato de metila (1)	6,24	48,14
2-isopropil-5-metilciclohexan-1-ol (2)	6,56	2,39
γ -dodelactona (3)	6,72	3,94
Palmitato de etila (4)	6,83	5,20
Oleato de metila (5)	7,75	7,74
Estearato de metila (6)	7,99	11,60

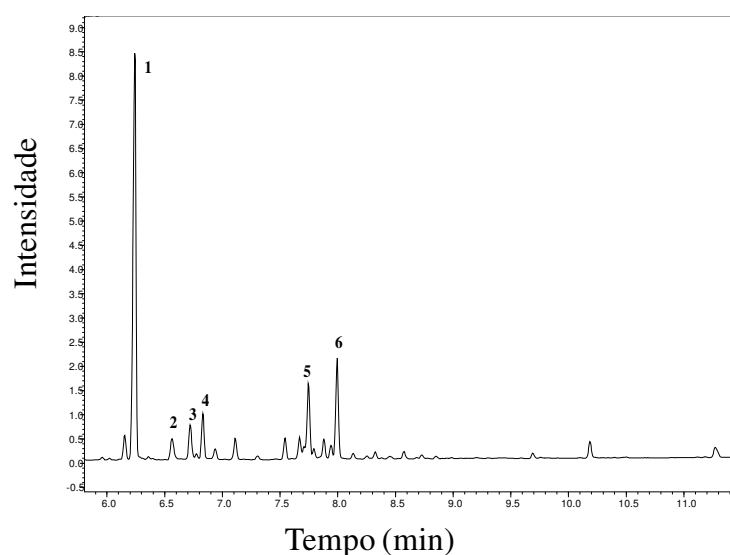


Figura 4.11 - Cromatograma de íons totais (TIC) do óleo isolado das folhas de *Annona crassiflora*.

O extrato alcaloídico das folhas de *A. crassiflora*, também demonstrou atividade contra o nematoide *C. elegans* (Tabela 4.2, pág. 115). Esse extrato foi caracterizado por RMN de ^1H (Figura 4.12, pág. 118), tendo sido identificados sinais característicos de alcaloides do tipo aporfínicos e oxaporfínicos. Por exemplo, os sinais de substituintes metileno-dioxi (δ 6,20-6,30),

os sinais de hidrogênios aromáticos (δ 6,50-8,90) e os sinais de hidrogênios de grupos metoxilas (δ 3,80-4,00).

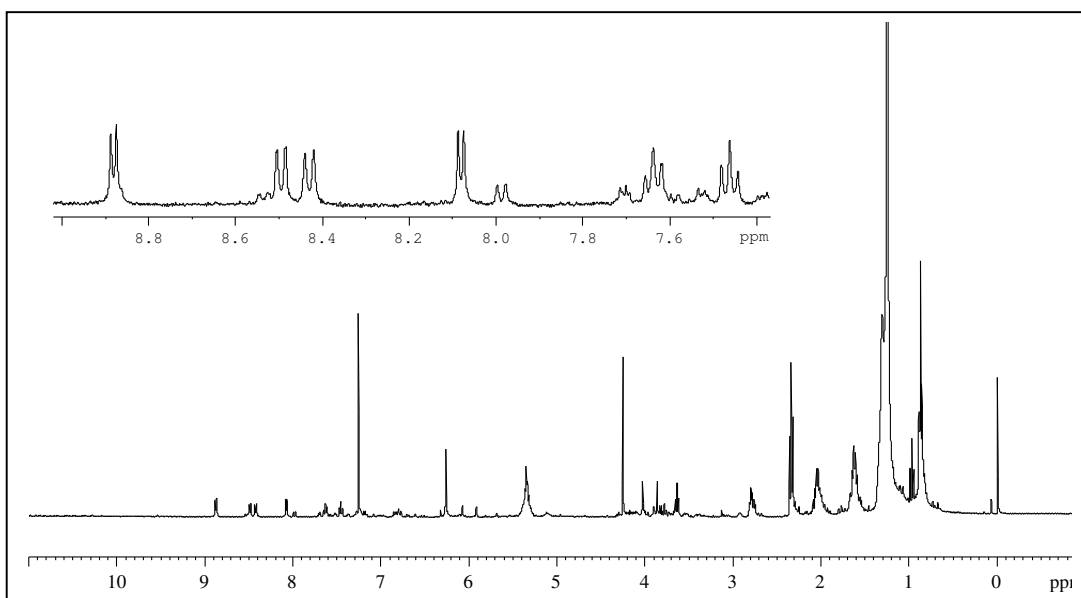


Figura 4.12 - Espectro de RMN de ¹H do extrato alcaloídico das folhas de *Annona crassiflora* (400 MHz, CDCl₃).

O extrato alcaloídico foi também submetido à cromatografia em coluna de sílica (pág.102), o que resultou na obtenção de um material sólido (3,0 mg), que se apresentou como uma única mancha em CCD. Esse material foi caracterizado por RMN 1D e 2D.

A classe dos alcaloides, especialmente aporfínicos e oxaporfínicos é a mais conhecida e explorada na família Annonaceae. A análise do espectro de RMN de ¹H (Figura 4.13, pág. 119), permitiu observar principalmente sinais de hidrogênios aromáticos, de grupos metoxila e hidrogênios de grupos metilenodioxi (Cavé *et al.*, 1987). O sinal em δ 6,21, atribuído ao grupo -O-CH₂-O- aparece como um simpleto e este deslocamento químico e multiplicidade são

características de sinais de grupos metilenodioxí encontrados em anel A (Figura 4.14, pág. 119) de alcalóides oxaporfínicos. Em alcalóides aporfínicos eles se apresentam como dupletos. Dessa forma, foi proposta a estrutura de um alcalóide oxaporfínico com um grupo metilenodioxí em C1/C2 e um grupo metoxila a ser definido. Em alcalóides deste tipo, o sinal de H-5 aparece em valores maiores (δ 8,88-8,90), por estar próximo ao N do anel isoquinolínico, ao passo que H-4 ressona por volta de δ 7,60-7,80. A presença de uma metoxila em C-3 provoca um efeito γ -gauche em H-4, modificando seu deslocamento químico para valores maiores, próximos a δ 8,20.

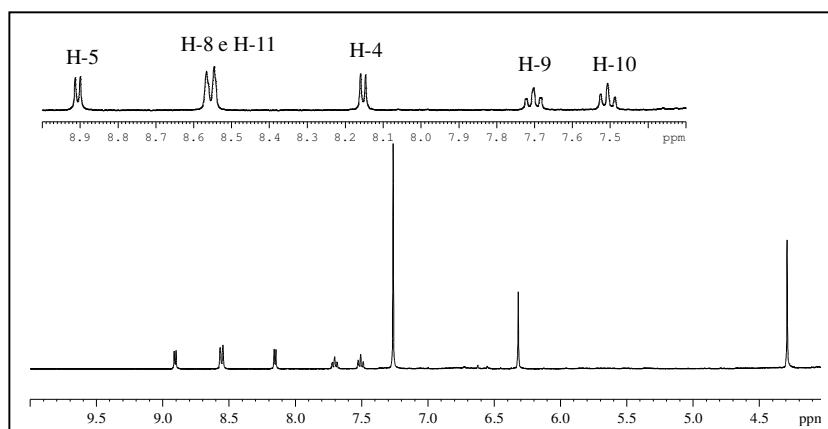


Figura 4.13 - Expansão do espectro de RMN de ¹H do alcaloide isolado do extrato alcaloídico das folhas de *Annona crassiflora* (400 MHz, CDCl₃).

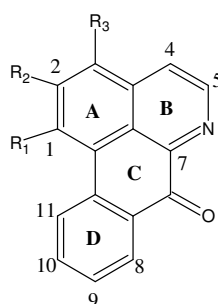


Figura 4.14 – Estrutura básica do esqueleto de alcaloide oxaporfínicos.

A análise do mapa de contornos COSY (Figura 4.15a) mostrou as correlações do sinal em δ 7,51 com os sinais em δ 7,72 e 8,53. Também foram observadas correlações entre o sinal em δ 8,15 e o sinal em δ 8,90, bem como entre o sinal em δ 8,55 e os sinais em δ 7,52 e δ 7,72. Pelo mapa de contornos HSQC (Figura 4.16a, pág. 121) foi possível verificar as seguintes correlações: δ_H 4,30/ δ_C 60,4; δ_H 6,32/ δ_C 102,3; δ_H 7,52/ δ_C 128,0; δ_H 7,72/ δ_C 134,0; δ_H 8,15/ δ_C 119,4; δ_H 8,55/ δ_C 126,7; δ_H 8,55/ δ_C 128,8 e δ_H 8,91/ δ_C 144,6. A comparação dos dados de RMN obtidos com os relatados por Castro e colaboradores (1996), levaram a propor a estrutura do composto como sendo o alcaloide oxaporfínico aterospermidina (Figura 4.15b).

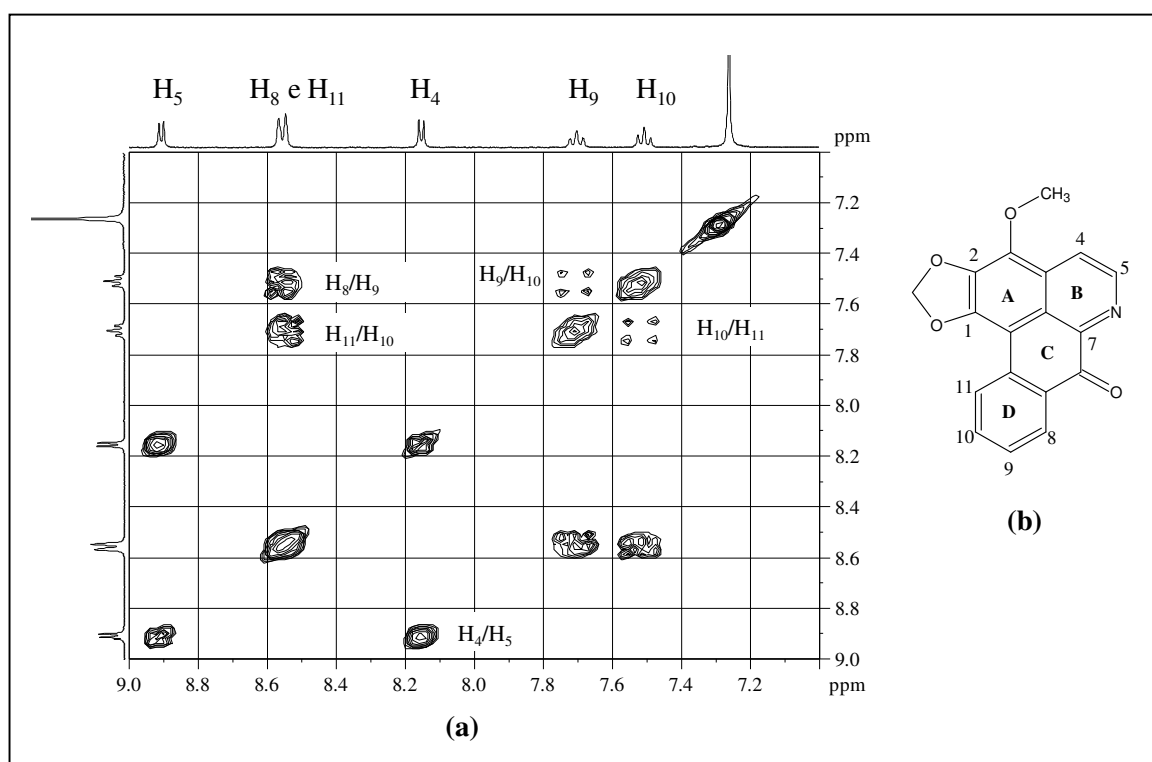


Figura 4.15 – (a) Expansão do mapa de contornos COSY (região de δ 7,0 e 9,0) para o alcaloide isolado das folhas de *Annona crassiflora* (400 MHz, CDCl₃). (b) Fórmula estrutural do alcaloide aterospermidina.

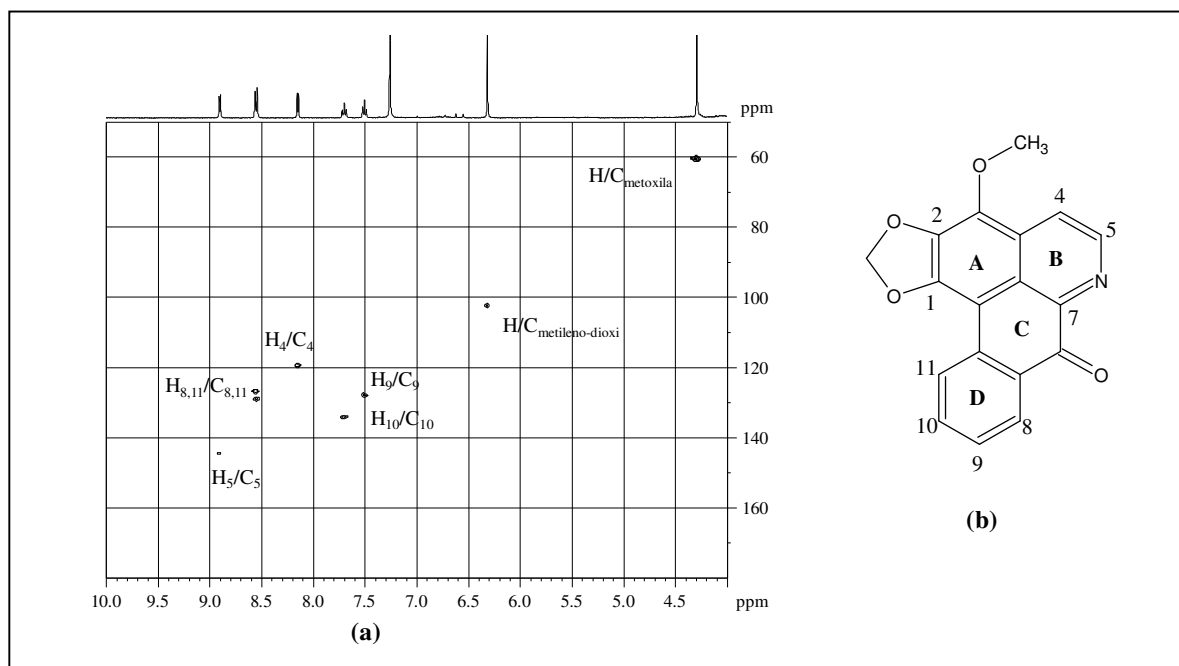


Figura 4.16 - (a) Expansão do mapa de contornos HSQC (região de δ 4,0 e 10,0) para o alcaloide isolado das folhas de *Annona crassiflora* (400 MHz, CDCl_3). (b) Fórmula estrutural do alcaloide atrypermidina.

Dentre os compostos isolados a partir dos extratos estudados, somente o óleo e o alcaloide atrypermidina foram submetidos à avaliação da atividade nematocida, pois já é descrito na literatura que os flavonoides, como a quercetina e o kaempferol, podem aumentar a expectativa de vida de *C. elegans* (Kampkötter *et al.*, 2008; Saul *et al.*, 2008). Também foram avaliadas as atividades dos seguintes compostos: palmitato de metila, estearato de metila e do padrão comercial 2-isopropil-5-metilciclohexan-1-ol. Os ésteres metílicos presentes no óleo não apresentaram atividades contra as larvas de *C. elegans*. Para os demais compostos avaliados, os resultados indicaram que as percentagens de mobilidade das larvas foram diretamente proporcionais à concentração das substâncias testadas (Figura 4.17, pág. 122). O óleo, 2-

isopropil-5-metilciclohexan-1-ol e o alcaloide aterospermidina apresentaram ED₅₀ com valores de 350, 113 e 938 µg.mL⁻¹, respectivamente.

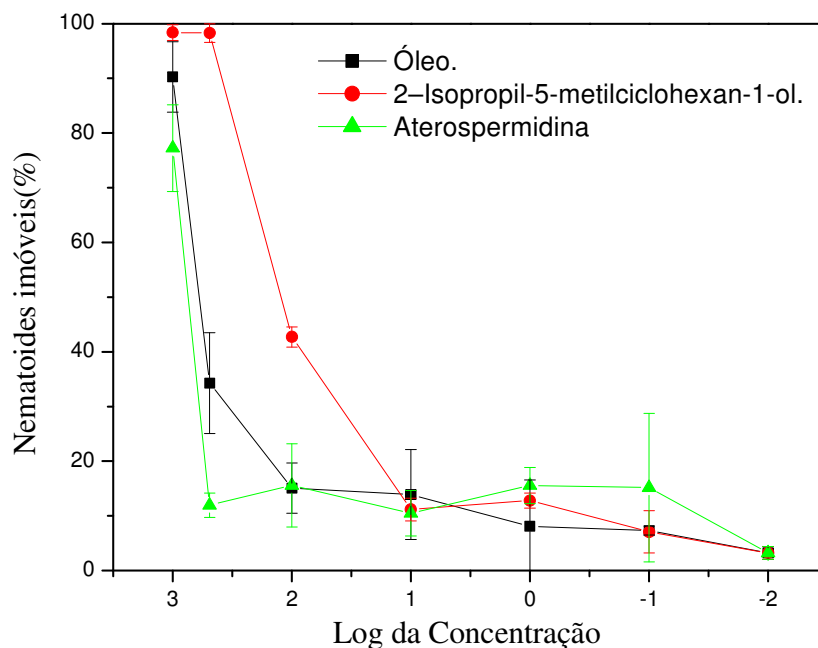


Figura 4.17 - Efeito dos compostos presentes nas folhas de *Annona crassiflora* sobre a mobilidade de *Caenorhabditis elegans*.

Na tentativa de se determinar um possível mecanismo de ação do 2-isopropil-5-metilciclohexan-1-ol contra as larvas de *C.elegans*, o marcador molecular Sytox (Fig. 4.18a) foi utilizado para avaliar a integridade da membrana citoplasmática de *C.elegans*, sendo o resultado obtido apresentado na Figura 4.18b (pág. 123). Outro teste empregado para avaliar a ação do 2-isopropil-5-metilciclohexan-1-ol sobre as larvas de *C.elegans*, foi a utilização do marcador molecular iodeto de propídeo (Fig. 4.18c), sendo o resultado obtido apresentado na Figura 4.18d (pág. 123). Esses ensaios sugerem que o 2-isopropil-5-metilciclohexan-1-ol, além de causar uma redução na mobilidade das larvas, também causou danos à integridade da membrana celular, bem como interferiu no processo celular de exclusão de moléculas exógenas, pois foram observados a

fluorescência para ambos marcadores. O Sytox é incapaz de atravessar membranas plasmáticas de células viáveis enquanto o iodeto de propídio é capaz de passar através das membranas celulares intactas, no entanto, é expulso por células que têm o seu mecanismo de excreção de moléculas exógenas viáveis (Gill *et al.*, 2003; Hunt *et al.*, 2012). De fato, estudos com *C. elegans* têm mostrado que o 2-isopropil-5-metilciclohexan-1-ol e outros monoterpênicos apresentam atividades superiores às do nematicida comercial oxamil (Tsao e Yu, 1997).

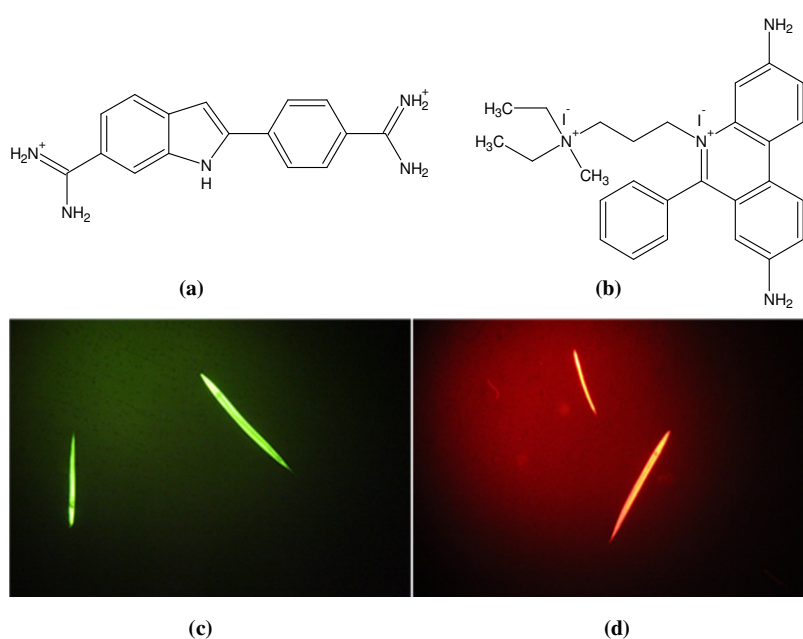


Figura 4.18 – (a) Fórmula estrutural do marcador Sytox. (b) Fórmula estrutural do iodeto de propídeo. (c) Larvas (13) mortas marcadas com Sytox. (d) Larvas (13) mortas marcadas com iodeto de propídeo.

4.5 Conclusão

No presente estudo foi revelada a atividade contra *C. elegans* para os extratos das folhas de *Annona crassiflora*. O potencial nematicida do extrato hidroalcoólico pode ser devido à presença de alguns compostos nematicidas. Dentre esses, destaca-se a presença do ácido fórmico,

já que são observados efeitos tóxicos a nematoides, quando expostos a esta substância (Djian *et al.*, 1994). Também vale mencionar a presença do ácido 4-aminobutírico, o qual, segundo relatos, pode causar paralisia nos músculos de nematoides (Perry e Maule, 2004). Ainda no extrato das folhas de *A. crassiflora*, foi possível identificar por RMN de ^1H , a betaína trigonelina, que possui um importante papel na resistência de plantas a fitopatógenos.

A caracterização química do óleo isolado revelou a presença de vários compostos de natureza graxa, sendo o éster metílico do ácido palmítico o composto majoritário. Gu e colaboradores (2005), ao estudarem o efeito de ácidos graxos e derivados sobre a mobilidade de *C. elegans* não observaram atividade nematicida para o palmitato de metila e o estearato de metila na concentração de $150 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Neste trabalho, também não foram observadas atividades para esses compostos na concentração de $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Esses resultados sugerem que os compostos minoritários do óleo podem estar correlacionados com a atividade nematicida observada ($\text{ED}_{50} = 350 \mu\text{g.mL}^{-1}$).

Concluindo, este é o primeiro relato da atividade nematicida dos extratos de *Annona crassiflora*, os resultados apresentados apontam esta espécie como uma fonte promissora para o desenvolvimento de novos produtos para o controle de nematoides.

4.6 Referências Bibliográficas

- Abdel-Farid, I.B., Kim, H.K., Choi, Y.H., Verpoorte, R. Metabolic characterization of Brassica rapa leaves by NMR spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.55, p. 7936-43, 2007.
- Adebayo, A.H., Tan, N.H., Akindahunsi, A.A., Zeng, G.Z., Zhang, Y.M. Anticancer and antiradical scavenging activity of *Ageratum conyzoides* L. (Asteraceae). *Pharmacognosy Magazine*, v.6, p. 62-66, 2010.
- Ali, K., Maltese, F., Fortes, A.M., Pais, M.S., Choi, Y.H., Verpoorte, R. Monitoring biochemical changes during grape berry development in Portuguese cultivars by NMR spectroscopy. *Food Chemistry*, v.124, p. 1760-69, 2011.
- Ali, K., Maltese, F., Zyprian, E., Rex, M., Choi, Y.H., Verpoorte, R. NMR metabolic fingerprinting based identification of *Grapevine* metabolites associated with downy *Mildew* resistance. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.57, p. 9599-9606, 2007.
- Annarao, S., Sidhu, O.P., Roy, R., Tuli, R., Khetrapal, C.L., Lipid profiling of developing *Jatropha curcas* L., seeds using ¹H NMR spectroscopy. *Bioresource Technology*, v.99, p. 9032-9035, 2008.
- Brenner, S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, v.77, p. 71-94, 1974.
- Caboni, P., Ntalli, N.G., Aissani, N., Cavoski, I., Angioni, A. Nematicidal activity of (*E,E*)-2,4-decadienal and (*E*)-2-decenal from *Ailanthus altissima* against *Meloidogyne javanica*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.60, p. 1146-1151, 2012.

- Camurça-Vasconcelos, A.L.F., Morais, S.M., Santos, L.F.L., Rocha, M.F.G., Bevilaqua, C.M.L. Validação de plantas medicinais com atividade anti-helmíntica. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v.7, p.97-106, 2005.
- Castro, I. Villegas-Aguilar, J.R., Soeder, B., Castro-Castillo, O., Soeder, O.C.B. Oxoaporphine alkaloids from *Annona purpurea* wood. *Fitoterapia*, v.67, p. 181-182, 1996.
- Cavé, A., Leboeuf, M., Waterman, P. G. The aporphinoid alkaloids of the Annonaceae. In: *Alkaloids: chemical and biological perspectives*. New York: John Wiley, 1987. p. 134-270.
- Chatterjee, S., Srivastava, S., Khalid, A., Singh, N., Sangwan, R.S., Sidhu, O.P., Roy, R., Khetrpal, C.L., Tuli, R. Comprehensive metabolic fingerprinting of *Withania somnifera* leaf and root extracts. *Phytochemistry*, v.71, p. 1085-94, 2010.
- Chitwood, D. J. Phytochemical based strategies for nematode control. *Annual Review of Phytopathology*, v.40, p. 221-249, 2002.
- Dang, Q.L., Kim, W.K., Nguyen, C.M., Choi, Y.H., Choi, G.J., Jang, K.S., Park, M.S., Lim, C.H., Luu, N.H., Kim, J.C. Nematicidal and antifungal activities of Annonaceous acetogenins from *Annona squamosa* against various plant pathogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.59, p. 11160-7, 2011.
- Dhasan, P.B., Jegadeesan, M., Kavimani, S. Cucurbitacins isolated from the fruits of *Momordica cymbalaria* Hook f. *Pharmacognosy Magazine*, v.4, p. 96-100, 2008.
- Djian, C., Ponchet, M., Cayrol, J.C. Nematocidal properties of carboxylic acids and derivatives. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v.50, p. 229-239, 1994.
- Ferreira, L.E., Castro, P.M.N., Chagas, A.C.S., França, S.C., Beleboni, R.O. *In vitro* anthelmintic activity of aqueous leaf extract of *Annona muricata* L. (Annonaceae) against *Haemonchus contortus* from sheep. *Experimental Parasitology*, v.143, p. 327-332, 2013.

- Gill, M.S., Olsen, A., Sampayo, J.N., Lithgow, G.J. An automated high-throughput assay for survival of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 35, p. 558-565, 2003.
- Gu, J.Q., Eppler, C.M., Montenegro, G., Timmins, S.D., Timmermann, B.N. Identification of nematicidal fatty acids and triglycerides from seeds of *Jubaea chilensis* by GC-EI-MS and chemical transformation methods. *Zeitschrift für Naturforschung C*, v.60, p. 527-33, 2005.
- Hunt, P.R., Olejnik, N., Sprando, R.L. Toxicity ranking of heavy metals with screening method using adult *Caenorhabditis elegans* and propidium iodide replicates toxicity ranking in rat. *Food and Chemical Toxicology*, v.50, p. 3280-3290, 2012.
- Kampkötter, A., Timpel, C., Zurawski, R.F., Ruhl, S., Chovolou, Y., Proksch, P., Wätjen, W. Increase of stress resistance and lifespan of *Caenorhabditiselegans* by quercetin. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, v.149, p. 314-323, 2008.
- Kim, H.K.; Choi, Y.A.; Verpoorte, R. NMR-based metabolomic analysis of plants. *Nature Protocols*, v.5, p. 36-49, 2010.
- Knothe, G., Kenar, J.A. Determination of the fatty acid profile by ¹H NMR spectroscopy. *European Journal of Lipid Science and Technology*, v.106, p. 88-96, 2004.
- McGaw, L.J., Van der Merwe, D., Eloff, J.N. *In vitro* anthelmintic, antibacterial and cytotoxic effects of extracts from plants used in South African ethnoveterinary medicine. *The Veterinary Journal* v. 173, p. 366-372, 2007.
- Mukhtar, T., Pervaz, I. In vitro evaluation of ovicidal and larvicidal effects of culture filtrate of *Verticillium chlamyosporium* against *Meloidogyne javanica*. *International Journal of Agricultural and Biological*, v.4, p.576-579, 2003.

- Perry, R.N., Maule, A.G. Physiological and biochemical basis behaviour. In: Gauler, R. & L. Bilgrami (ed). Nematode Behaviour. CABI Publishing, New Jersey, p. 197-238, 2004.
- Pimenta, L. P. S., Kim, H. K., Verpoorte, R., Choi, Y.H. NMR-Based Metabolomics: A Probe to Utilize Biodiversity. In: Ute Roessner; Daniel Anthony Dias (eds.). Methods in Molecular Biology. 1^a ed. Clifton, N.J.: Humana Press, v.1055, p. 117-127, 2013.
- Pimenta, L.P.S., Boaventura, M.A.D., Cassady, J.M., Oliveira, A.B. Grossamide and n-trans-caffeoyltyramine from *Annona crassiflora* seeds. *Planta Medica*, v.62, p. 76, 1996.
- Pimenta, L.P.S., Boaventura, M.A.D., Oliveira, A.B. Crassiflorina, uma acetogenina tetra-hidrofurânica citotóxica de *Annona crassiflora* (araticum). *Química Nova*, v.17, p. 387-391, 1994.
- Saul, N., Pietsch, K., Menzel, R., Steinberg, C.E. Quercetin-mediated longevity in *Caenorhabditiselegans*: is DAF-16 involved? *Mechanisms of Ageing and Development*, v.129, p. 611-3, 2008.
- Scott, A.J., Knott, M.A.A. Cluster analyses method for grouping means in the analyses of variance. *Biometrics*, v.30, p. 502-512, 1974.
- Stiernagle T, Maintenance of *C. elegans*. WormBook, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook.doi/10.1895/wormbook.1.101.1, 2006.
- Thakur, A., Jain, V., Hingorani, L., Laddha, K.S. Phytochemical studies on *Cissus quadrangularis* Linn. *Pharmacognosy Research*, v.1, p. 213–215, 2009.
- Torina, A., Dara, S., Marino, A.M., Sparagano, A.O., Vitale, F., Reale, S., Caracappa, S. Study of gastrointestinal nematodes in sicilian sheep and goats. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v.1026, p. 187-194, 2004.

Tsao, R., Yu, Q. Nematicidal activity of monoterpenoid compounds against economically important nematodes in agriculture. *Journal of Essential Oil Research*, v. 12, p. 350-354, 2000.

Waller, P.J., Larsen, M. The role of nematophagous fungi in the biological control of nematode parasites of livestock. *International Journal for Parasitology*, v.23, p. 539-546, 1993.

Capítulo 5

**ANÁLISE QUANTITATIVA DA BETAÍNA TRIGONELINA EM
ESPÉCIES DE *Annona* POR ESPECTROSCOPIA DE RMN DE ^1H E
AVALIAÇÃO DA SUA ATIVIDADE NEMATICIDA**

5.1 Introdução

As betaínas são derivados de aminoácidos contendo um nitrogênio quaternário. Os compostos desta classe têm sido encontrados em animais, plantas, algas, fungos e bactérias (Blunden *et al.*, 1986). Fisiologicamente, as betaínas têm uma ação osmorregulatória e são doadores de grupos metila (Rochfort *et al.*, 2008). Dentre essas substâncias mesoiônicas, a trigonelina (Figura 5.1) apresenta vários efeitos benéficos para a saúde, tais como atividade hipoglicemiante, hipocolesterolêmica, antitumoral, anti-enxaqueca, antisséptica (Corol *et al.*, 2012; Sánchez-Hernández, *et al.*, 2010). Ademais, tem sido demonstrado que a trigonelina tem um importante papel na resistência de plantas ao ataque de patógenos (Tyihak *et al.*, 1988).

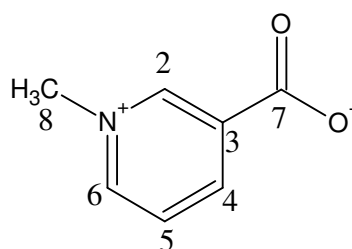


Figura 5.1 - Fórmula estrutural da betaína trigonelina.

A trigonelina está amplamente distribuída em plantas terrestres, estando geralmente presente em espécies herbáceas de habitat salino e seco (Dini *et al.*, 2006) e foi isolada pela primeira vez a partir das folhas de *Trigonella foenum graecum*, também conhecida por alforva (Johns, 1885). Machado e colaboradores (2012), utilizando RMN de ^1H , observaram um teor máximo de $1,20 \text{ mg.g}^{-1}$ em raízes de cultivares de *Coffea arabica*. Mantur e Kamal (2012), utilizando CLAE, quantificaram em várias partes de *Moringa olerifera*, onde o teor máximo foi

observado em vagens ($3,55 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$), seguido de folhas ($2,60 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$), raízes ($2,15 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$), haste ($1,90 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$) e flores ($1,60 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$). Várias técnicas analíticas já foram utilizadas para identificação e quantificação da trigonelina. Dentre essas técnicas, pode-se destacar a RMN de ^1H , que possibilita em uma única etapa a identificação e quantificação simultânea do composto de interesse (Machado *et al.*, 2012).

5.2 Objetivos

Propor uma metodologia para a identificação e quantificação da trigonelina nos extratos de diferentes espécies do gênero *Annona*, utilizando espectroscopia por RMN. Também foi objetivo deste trabalho avaliar a atividade nematicida desta betaína utilizando o nematoide de vida livre *Caenorhabditis elegans* como modelo.

5.3 Procedimentos experimentais

5.3.1 Material vegetal

As folhas das espécies *Annona crassiflora*, *A. coriacea*, *A. dolabripetala* e *A. cherimolia* foram coletadas na Fundação Zoobotânica, Jardim Zoológico de Belo Horizonte. A espécie *A. muricata* foi coletada no campus Pampulha da UFMG, as espécies *A. neolaurifolia* coletadas no Parque Ecológico do Campus Pampulha da UFMG e a *A. sylvatica* foi coletada em Lagoa Santa, Minas Gerais. As folhas de todas as espécies coletadas foram congeladas imediatamente em nitrogênio líquido. Todas as espécies foram identificadas pelo Prof. Dr. João Renato Stehman e depositadas no herbário do ICB.

5.3.2 Preparo dos extratos

Para a obtenção dos extratos, utilizou-se a metodologia de Kim e colaboradores (2010) descrita no capítulo 2.3.4.1 (pág. 36).

5.3.3 Quantificação por RMN de ^1H

Inicialmente foram determinados os valores para o tempo de relaxação (T_1), através do método de inversão-recuperação utilizando-se intervalos de tempos a partir de uma lista pré-definida (vdlist) de 20, 10, 5, 3, 2, 1; 0,7, 0,40, 0,1, 0,05 e 0,01s, com 8 promediações e tempo de recuperação de 10 s. Após a determinação do T_1 para o núcleo mais lento, o melhor tempo de espera (d1) foi estimado multiplicando o valor encontrado por cinco (Pieri *et al.*, 2011).

Os espectros de RMN de ^1H foram adquiridos a 25 °C com janela espectral de 16 ppm, número de pontos 32k, com pré-saturação do sinal de HDO, 32 promediações, tempos de aquisição (AQ) e recuperação (d1) de 3,0 e 1,5, respectivamente. Todos os espectros foram obtidos utilizando-se a sequência de pulsos zgcppr. Para o processamento foi utilizado o alargamento de linha de 0,3 Hz, anterior à transformada de Fourier. As fases e linhas de base foram corrigidas utilizando o programa TopSpin 1.3 e por fim os espectros foram calibrados pelo sinal do TSP- d_4 em δ 0,00.

Para a quantificação da trigonelina nas espécies de *Annona*, foram utilizados dois métodos distintos. O primeiro método empregado baseia-se na preparação de uma curva de calibração, construída com o padrão de trigonelina (Sigma-Aldrich, 99%), tendo sido a área do sinal do padrão interno TSP- d_4 em δ 0,00 relacionada à área do hidrogênio H-2 da trigonelina. No segundo método, foram realizados cálculos diretos, utilizando-se somente a proporcionalidade do sinal de interesse da trigonelina (H-2) e o sinal dos hidrogênios do TSP- d_4 . A concentração da trigonelina foi determinada utilizando a equação 3.2 descrita no capítulo 3, item 3.3.3.1 (pág. 75).

As correlações homonucleares ^1H - ^1H COSY, foram registradas com uma sequência de pulsos padrão de 90°-90° e gradientes de campo na direção do eixo z. Esses experimentos foram adquiridos com tempo de recuperação de 1s e sob a janela espectral de 8 KHz, tendo sido adquiridos 1024 incrementos com 8 promediações. A transformada de Fourier foi aplicada e os dados transformados foram então simetrizados.

5.3.4 Análise estatística

Os valores para a concentração de trigonelina nas folhas foram transformados em $\sqrt{x + 0,5}$ e submetidos à análise de variância, empregando-se o programa computacional SISVAR. As médias foram comparadas segundo o teste de Scott e Knott, 1974.

5.3.5 Avaliação da atividade nematicida da betaína trigonelina

Para avaliação da atividade nematicida da trigonelina sobre o nematoide *C. elegans*, seguiram-se os procedimentos descritos no Capítulo 4, item 4.3.7 (pág. 103).

5.4 Resultados e discussão

5.4.1 Identificação da trigonelina

Nos espectros de RMN de ^1H dos extratos das diferentes espécies de *Annona* foram assinalados sinais característicos dos átomos de hidrogênios aromáticos da trigonelina que, devido à desblindagem de alguns dos seus hidrogênios, apresenta sinais de hidrogênios em uma região pouco congestionada do espectro (δ 8,0-10,0). Nessa região foram registrados os sinais dos hidrogênios aromáticos em δ 8,09 (H-5, dd), um multipletto em δ 8,85 (H-4 e H-6) e um simpleto em δ 9,14 (H-2, s). Os hidrogênios do grupo *N*-metílico foram registrados em δ 4,44 (H-8, s). A Figura 5.2a ilustra um dos espectros obtidos e os sinais atribuídos à trigonelina. No mapa de contornos COSY (Figura 5.2b) foi possível observar a correlação de H-5 com H-6 e H-4.

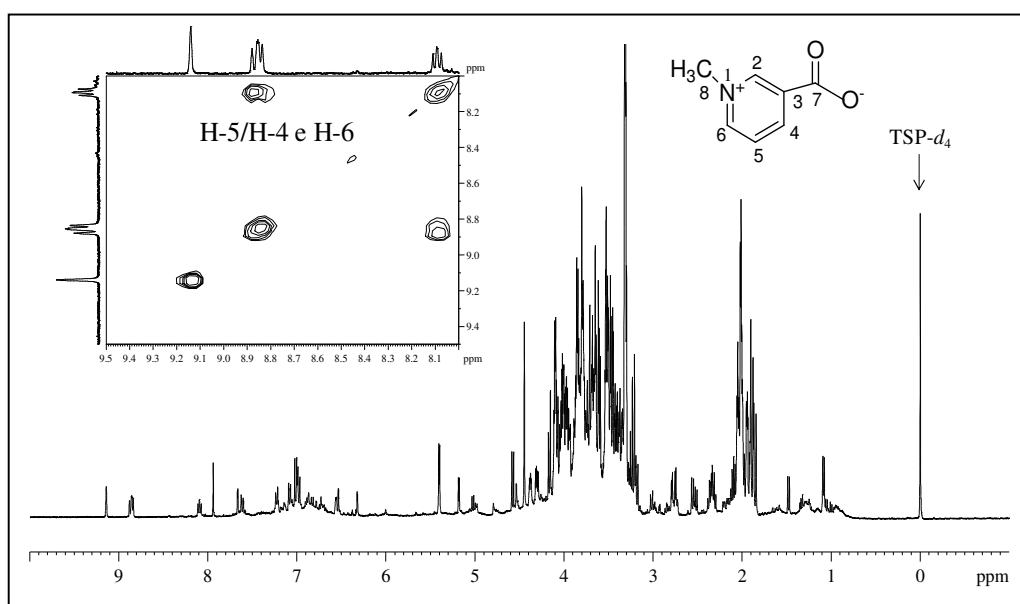


Figura 5.2 - (a) Espectro de RMN de ^1H do extrato das folhas de *Annona sylvatica* (400 MHz, metanol- d_4 / tampão KH_2PO_4 em D_2O , pH=6). (b) A inserção mostra a expansão do mapa de contorno COSY.

Para efeitos de comparação, na Figura 5.3 (pág. 138) são apresentados dois espectros de RMN de ^1H dos extratos das folhas de *Annona sylvatica*, sendo um deles com adição do padrão trigonelina, no qual se observa claramente o aumento na intensidade dos sinais atribuídos a essa betaína.

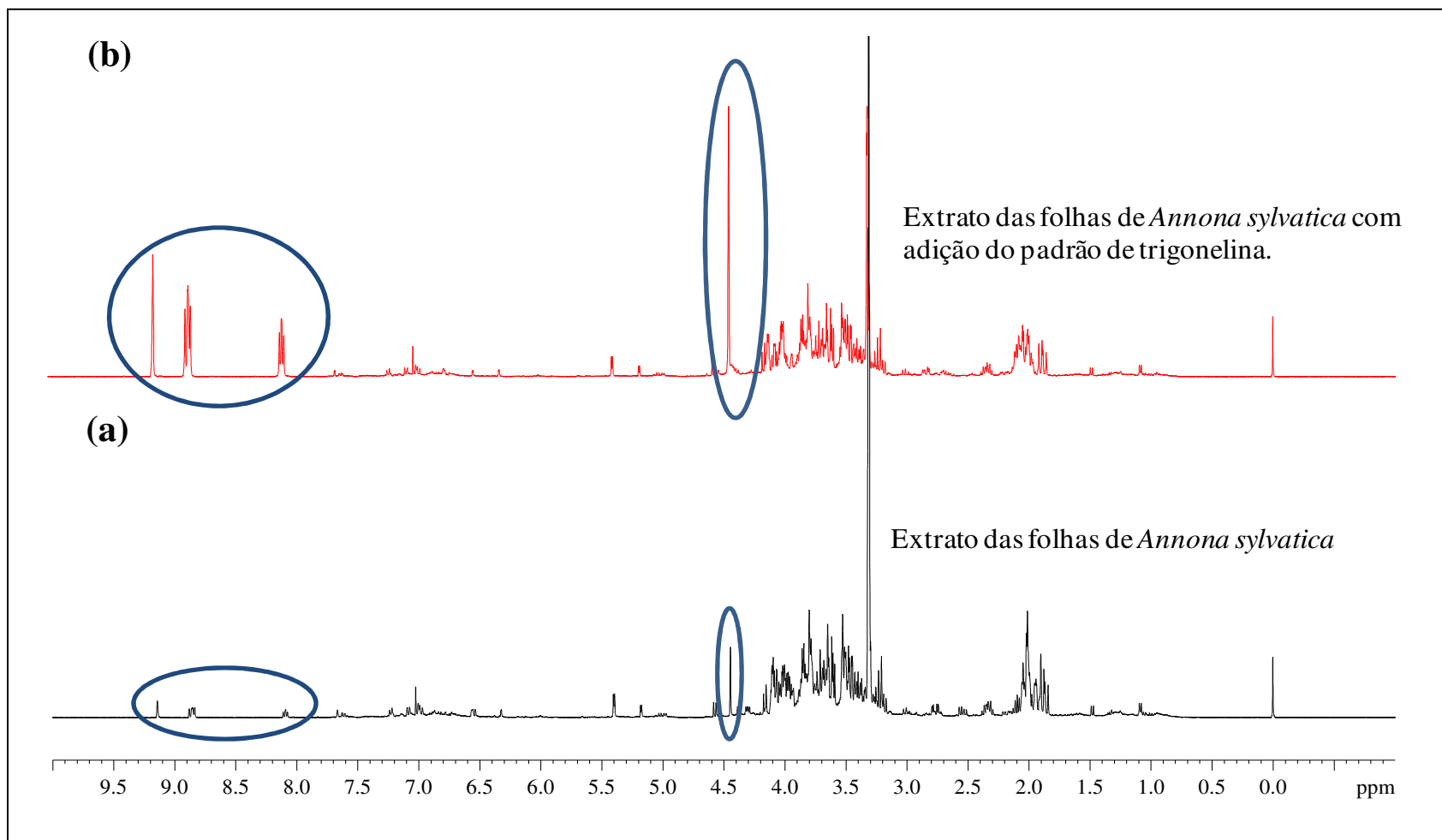


Figura 5.3 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, metanol- d_4 / tampão KH_2PO_4 em D_2O , pH=6) do extrato das folhas de *Annona sylvatica* (a) e com a adição do padrão trigonelina (b)

5.4.2 Quantificação da trigonelina nos extratos das folhas de *Annona*

De modo geral, os métodos que empregam a ressonância magnética nuclear quantitativa (RMNq) não descrevem o comportamento da relaxação longitudinal (T_1) do padrão interno e dos hidrogênios da amostra, um importante requisito para a otimização do tempo de espera (d1) (Pieri *et al.*, 2011). Esse tempo é necessário para permitir que os spins, que foram excitados, relaxem na quase totalidade ao equilíbrio de Boltzman. Assim, para um tempo de espera inferior $5 \times T_1$, haverá influência na intensidade dos sinais. Portanto, foram determinados os valores de T_1 para os hidrogênios do grupo metila do TSP- d_4 e para o H-2 da trigonelina. As Figuras 5.4 e 5.5 (pág. 139) ilustram os resultados obtidos no experimento de inversão recuperação. Observa-se que a relaxação quase total ocorre para um tempo próximo de $5 \times T_1$, sendo que o valor de T_1 calculado para o sinal do TSP- d_4 foi de 4,05 s e para o H-2 da trigonelina o T_1 calculado foi de 3,06 s. Desse modo, com objetivo de se garantir a relaxação efetiva dos núcleos dos hidrogênios, foi utilizado um tempo de espera (d1) de 21s durante a aquisição dos espectros.

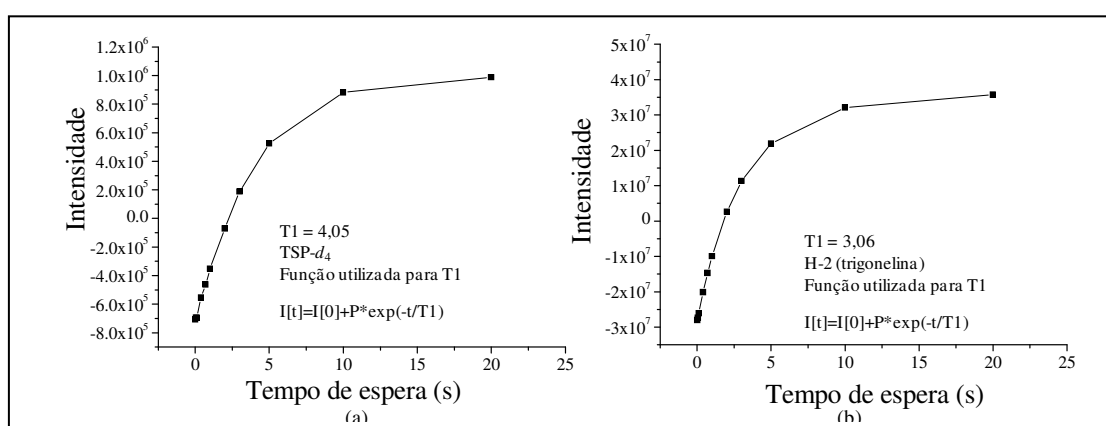


Figura 5.4 - Tempo de relaxação longitudinal para o TSP- d_4 (a) e para trigonelina (b).

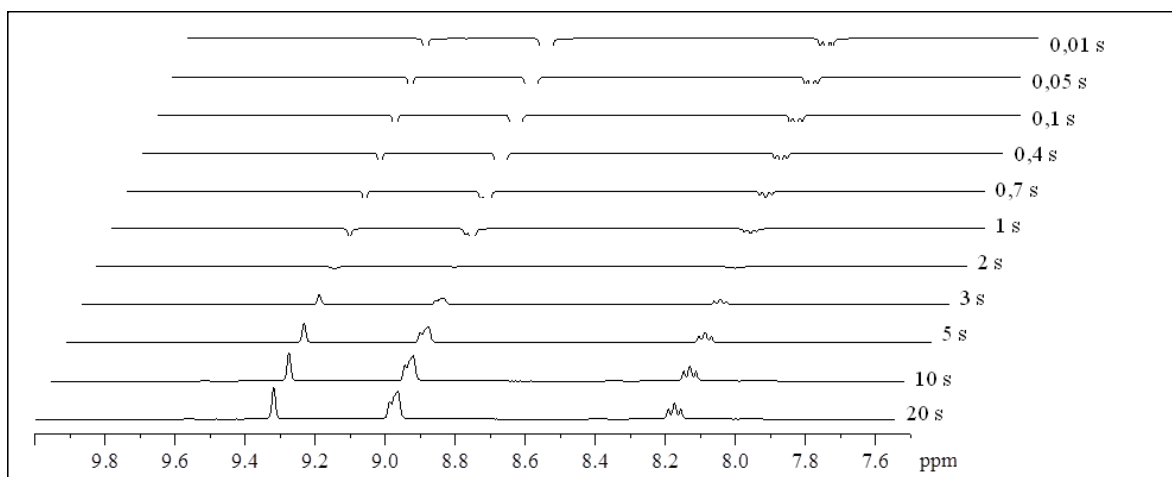


Figura 5.5 - Evolução temporal da magnetização longitudinal do espectro de ^1H da trigonelina em função de uma variação τ .

Após a aquisição e o processamento dos espectros de RMN de ^1H , a integral do sinal em δ 9,14, referente H-2 da trigonelina, foi relacionada à integral do sinal dos hidrogênios do TSP- d_4 em δ 0,00. A determinação da concentração da trigonelina utilizando a RMN de ^1H foi realizada com base na linearidade do método, que foi avaliada através da construção de uma curva de calibração (Figura 5.6, pág. 141). As expansões dos espectros de RMN de ^1H da trigonelina, em diferentes concentrações, podem ser visualizadas na Figura 5.7 (pág. 141). A curva de calibração apresentou linearidade com coeficiente de correlação igual a 0,998 no intervalo de 0,12-1,12 mg.mL^{-1} .

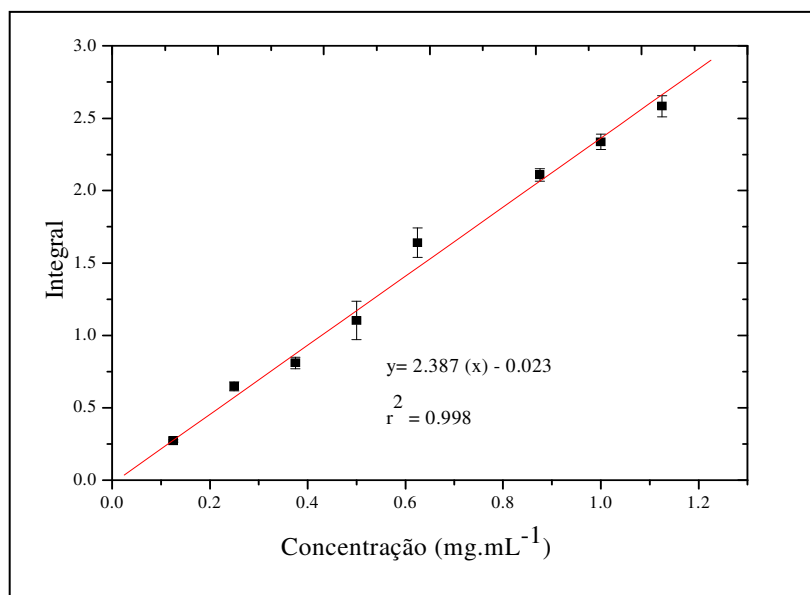


Figura 5.6 - Curva de calibração para determinação da concentração de trigonelina.

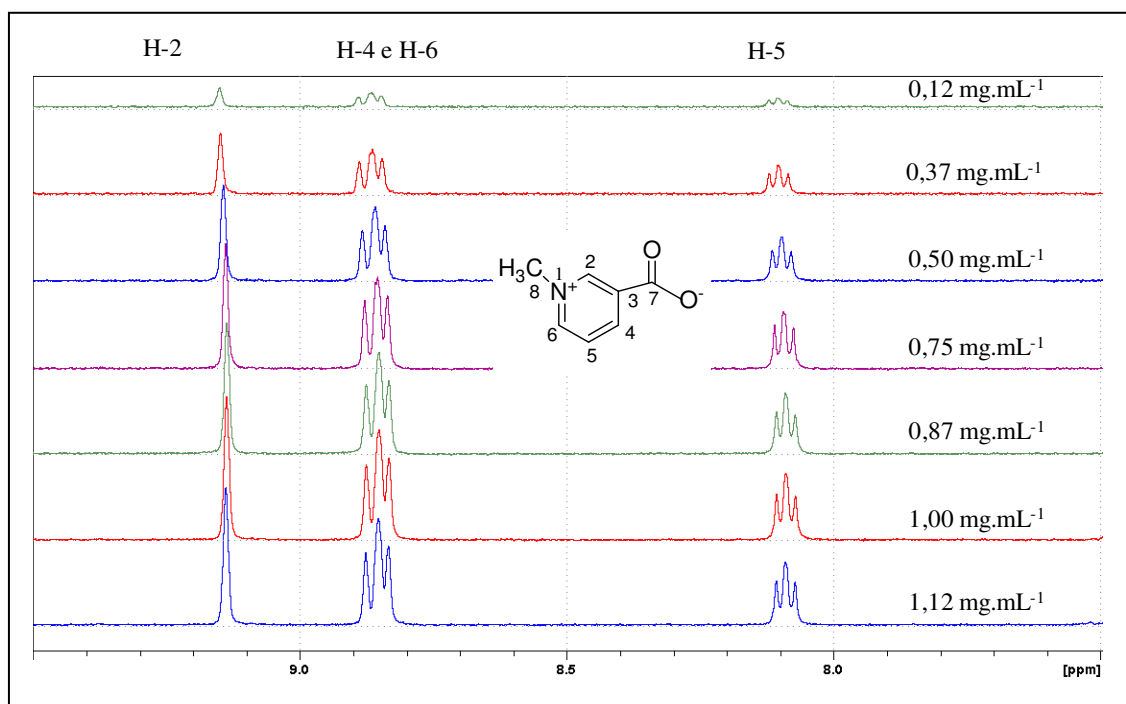


Figura 5.7 - Expansão do espectro de RMN de ¹H da betaína trigonelina (400 MHz, metanol-*d*₄/ tampão KH₂PO₄ em D₂O, pH=6).

Desta forma, pode-se confirmar que esse método pode ser usado para a quantificação de trigonelina. Com base nesses resultados, foram avaliadas sete espécies de *Annona*, com objetivo de quantificar por RMN de ^1H o teor de trigonelina. Os valores médios obtidos são apresentados na Tabela 5.1, junto com o desvio padrão para cada espécie. Para efeito de comparação, os valores obtidos através do cálculo direto também são apresentados. Esses valores não diferem estatisticamente daqueles obtidos pelo emprego da curva de calibração (Tabela 5.1), comprovando que essa abordagem por RMN de ^1H não depende de calibração externa, o que representa uma vantagem em comparação com as abordagens tradicionais baseadas em CLAE. Observa-se também que, *A. neolaurifolia* foi a espécie que apresentou maior valor médio para a concentração de trigonelina. Esse resultado aponta esta *Annona* como potencial produtivo de fitoterápicos, devido às atividades biológicas já relatada para trigonelina (Corol *et al.*, 2012; Sánchez-Hernández, *et al.*, 2010). Ademais, o conteúdo desta betaína em *A. neolaurifolia* apresentou-se na mesma ordem de grandeza dos valores encontrados para a principal fonte natural de trigonelina, a *Trigonella foenum graecum* L (Satheeshkumar *et al.*, 2010).

Tabela 5.1 - Concentração de trigonelina em espécies de *Annona*.

Espécie	Parte	Concentração (mg.g ⁻¹), determinada pelo método direto.	Concentração (mg.g ⁻¹), determinada com uso de uma curva de calibração.
<i>Annona muricata</i>	Folha	0,67 ± 0,04 b	0,90 ± 0,03 b
<i>Annona neolaurifolia</i>	Folha	10,04 ± 0,40 g	9,61 ± 0,37 g
<i>Annona dolabripetala</i>	Folha	4,94 ± 0,25 d	4,86 ± 0,24 d
<i>Annona sylvatica</i>	Folha	6,56 ± 0,04 f	6,39 ± 0,36 f
<i>Annona cherimola</i>	Folha	5,65 ± 0,27 e	5,51 ± 0,25 e
<i>Annona coriacea</i>	Folha	2,11 ± 0,36 c	2,23 ± 0,34 c
<i>Annona crassiflora</i>	Folha	1,16 ± 0,04 a	1,26 ± 0,03 a

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si de acordo com teste *Scott-knott* ($P \leq 0,05$).

5.4.3 Avaliação da atividade nematicida da betaína trigonelina

Motivado pelos resultados descritos na literatura da atividade nematicida de outras betaínas (Wu *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 1997) e ainda pela atividade inibitória da trigonelina frente a enzima acetilcolinesterase (Satheeshkumar *et al.*, 2010), uma enzima que atua na terminação dos impulsos nervosos e alvo de vários nematicidas comerciais, era de se esperar que fosse encontrada para trigonelina um resultado positivo nos testes de mobilidade com o nematoide de vida livre *Caenorhabditis elegans*. Entretanto, no presente trabalho, a trigonelina não se mostrou ativa contra esse verme, quando testada no intervalo de concentrações de 0,01 a 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figura 5.8).

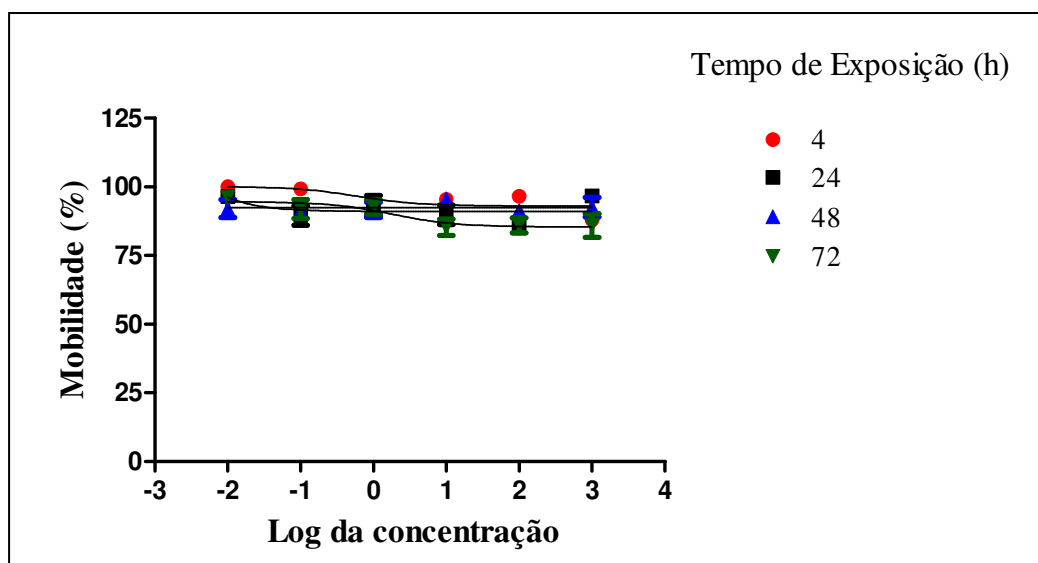


Figura 5.8 - Mobilidade de *Caenorhabditis elegans* expostos a diferentes concentrações de trigonelina.

5.5 Conclusão

Neste trabalho foi identificada e quantificada a betaína trigonelina em sete espécies do gênero *Annona* (*A. muricata*, *A. neolaurifolia*, *A. dolabripetala*, *A. sylvatica*, *A. cherimolia*, *A. coriacea*, *A. crassiflora*). O potencial da espectroscopia de RMN como uma ferramenta analítica foi, mais uma vez demonstrado, com as suas particularidades, isto é, não específico, não dispendioso, não necessita de curva de calibração e não demandando longo tempo no preparo da amostra. No teste de mobilidade do nematoide *Caenorhabditis elegans* nenhum efeito foi observado para tal substância o que sugere que seu mecanismo de ação não atinge a mobilidade do nematoide.

5.6 Referências Bibliográficas

- Blunden, G., Cripps, A.L., Gordon, S.M., Mason, T.G., Turner, C.H. The characterisation and quantitative estimation of betaines in commercial seaweed extracts. *Botanica Marina*, v.29, p. 155-160, 1986.
- Corol, D.I., Ravel, C., Raksegi, M., Bedo, Z. G., Charmet Beale, M.H., Shewry, P.R., Ward, J.L. Effects of genotype and environment on the contents of betaine, choline, and trigonelline in cereal grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.60, p. 5471-5481., 2012.
- Dini, I., Tenore, G.C., Trimarco, E., Dini, A. Two novel betaine derivatives from *Kancolla* seeds.(Chenopodiaceae). *Food Chemistry*, v.98, p. 209-213, 2006.
- Johns E. Ueber die alkaloide des bockshornsamens. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, v.18, p. 2518-23, 1885.
- Kim, H.K.; Choi, Y.A.; Verpoorte, R. NMR-based metabolomic analysis of plants. *Nature Protocols*, v.5, p. 36-49, 2010.
- Machado, A. R. T. ; Campos, V. A. C. ; Silva, W.R.J ; Campos, V.P. ; Zeri, A.C.M ; Oliveira, D. F. . Metabolic profiling in the roots of coffee plants exposed to the coffee root-knot nematode, *Meloidogyne exigua*. *European Journal of Plant Pathology*, v.134, p. 431-441, 2012.
- Mathur, M., Kamal, R. Studies on *trigonelline* from *Moringa oleifera* and its *in vitro* regulation by feeding precursor in cell cultures. *Revista brasileira Farmacognosia*, v.22, p. 994-1001, 2012.
- Pieri, V., Belancic, A., Morales, S., Stuppner, H. Identification and quantification of major steviol glycosides in *Stevia rebaudiana* purified extracts by ¹H NMR spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.59, p. 4378-4384, 2011.

- Rochfort, S., Parker, A. J., Dunshea, F. R., Plant bioactives for ruminant health and productivity. *Phytochemistry*, v.69, p.299-322, 2008.
- Sánchez-Hernández, L., Castro-Puyana, M., García-Ruiz, C., Crego, A. L., Marina, M. L. Determination of trigonelline in seeds and vegetable oils by capillary electrophoresis as a novel marker for the detection of adulterations in olive oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.120, p. 921-928, 2010.
- Satheeshkumar, N., Mukherjee, P.K., Bhadra, S., Saha, B.P. Acetylcholinesterase enzyme inhibitory potential of standardized extract of *Trigonella foenum graecum* L and its constituents. *Phytomedicine*, v.17, p. 292-295, 2010.
- Tyihak, E., Sarhan, A.R.T., Cong, N.T., Barna, B., Kiraly, Z. The level of trigonelline and other quaternary ammonium compounds in tomato leaves in ratio to the changing nitrogen supply. *Plant and Soil*, v.109, p.285-287, 1988.
- Wu, Y., Jenkins, T., Blunden, G., Whapham, C., Hankins, S.D. The role of betaines in alkaline extracts of *Ascophyllum nodosum* in the reduction of *Meloidogyne javanica* and *M. incognita* infestations of tomato plants. *Fundamental & Applied Nematology*, v.20, p. 99-102, 1997.
- Wu, Y., Jenkins, T., Blunden, G., Von Mende, N., Hankins, S.D. Suppression of fecundity of the root-knot nematode, *Meloidogyne javanica*, in monoxenic cultures of *Arabidopsis thaliana* treated with an alkaline extract of *Ascophyllum nodosum*. *Journal of Applied Phycology*, v.10, p. 91-94, 1998.

Capítulo 6

CONCLUSÃO GERAL

Atualmente existe uma pressão por parte da sociedade para que o uso dos nematicidas sintéticos seja cada vez mais restrito. Desta forma, faz-se necessário buscar novas metodologias menos onerosas e que não contaminem o ambiente com essas substâncias. Diante desta perspectiva, o presente trabalho teve como objetivo introduzir o estudo metabolômico, utilizando a ressonância magnética nuclear de hidrogênio como ferramenta analítica, no estudo de plantas do gênero *Annona*, consideradas resistentes à infestação por nematoides de galhas.

Levando em consideração este objetivo geral o estudo metabolômico associado a resultados de testes nematicidas possibilitou a detecção de mudanças metabólicas na planta *Annona muricata* após 24 horas de exposição ao nematoide *Meloidogyne javanica*. Este resultado sugere que ocorra uma resposta de defesa rápida no local da infestação, conhecida como reação de hipersensibilidade (HR), que se encontra associada ao aumento da concentração de xantina e dopamina no metaboloma das plantas inoculadas em relação às aquelas não inoculadas. Foi também detectada a presença de acetogeninas de anonáceas na raiz e constatada sua toxicidade ao nematoide, levando a propor que pode haver um mecanismo sinérgico de proteção da planta ao ataque do nematoide. Faz-se necessário que mais estudos sejam conduzidos para uma completa elucidação dos mecanismos de resistência de *Annona muricata* ao nematoide *Meloidogyne javanica*.

Partindo-se da observação que *Annona crassiflora* apresentou atividade nematicida *in vitro*, utilizando como modelo o nematoide de vida livre *Caenorhabditis elegans*. Foi detectado que a atividade nematicida se deve a compostos de média polaridade, dentre eles destacam-se o monoterpene 2-isopropil-5-metilciclohexan-1-ol (mentol) e o alcaloide aporfínico aterospermidina.

Em virtude da escolha da RMN de ^1H como ferramenta analítica, foram desenvolvidas metodologias, utilizando a RMN de ^1H , para quantificação do teor total das acetogeninas γ -

lactona- α,β -insaturada e da betaína trigonelina. O potencial da RMN de ^1H combinada com regressão por mínimos quadrados parciais, para previsão da atividade larvicida dos extratos das folhas de *Annona muricata*, foi avaliado validando mais uma vez o uso da RMN de ^1H no desenvolvimento de metodologias para previsão de atividades biológicas.

Dentro deste contexto, informações a respeito do metaboloma de plantas do gênero *Annona* foram obtidas. Tais conhecimentos são de fundamental importância para correlacionar a composição química destas plantas com as suas propriedades biológicas.

Por fim, os resultados aqui descritos são de grande importância, pois visam relacionar as propriedades biológicas de algumas anonáceas com o metaboloma destas espécies. Eles podem, por exemplo, contribuir para a obtenção de cultivares que, ao mesmo tempo, sejam resistentes aos nematoides e apresentem produções agrícolas de qualidade e em quantidade equivalente ou superior cultivares suscetíveis. Além disso, o estudo da metaboloma de plantas relacionado com as propriedades nematocidas pode ser uma etapa para o desenvolvimento de novos nematocidas de origem natural.