



10 ANOS DO LMOPN-EMBRAPA: A QUÍMICA DE PRODUTOS NATURAIS DE INTERESSE AGROINDUSTRIAL

**Kirley M. Canuto^{a,*}, Cleberson de F. Fernandes^a,
Edy S. Brito^b, Guilherme J. Zocolo^a, Hilton Cesar R.
Magalhães^a, Lorena Mara A. Silva^a, Marcos José A.
Viana^c, Natália F. Martins^a e Paulo Riceli V. Ribeiro^a**

^aEmbrapa Agroindústria Tropical, 60135-410 Fortaleza-CE

^bEmbrapa Alimentos e Territórios, 57020-050 Maceió-AL

^cEmbrapa Milho e Sorgo, 35701-970 Sete Lagoas-MG

*e-mail: kirley.canuto@embrapa.br

Palavras-chave: plantas bioativas; metabolômica; desreplcação.

INTRODUÇÃO

O Laboratório Multiusuário de Química de Produtos Naturais (LMQPN) é o laboratório de referência da Embrapa dedicado à temática de Produtos Naturais. O LMQPN está localizado na Embrapa Agroindústria Tropical (Fortaleza-CE) e foi concebido com a finalidade de potencializar o aproveitamento dos recursos naturais brasileiros, especialmente aqueles da biodiversidade, viabilizando pesquisas que demandem instrumentação analítica especializada e grande porte, tais como cromatógrafos gasosos e líquidos, acoplados ou não, com poderosos espectrômetros de massas, de ressonância magnética nuclear e de infravermelho. A equipe é formada por 5 pesquisadores, 4 analistas, 28 estudantes de graduação e pós-graduação provenientes de universidades públicas e privadas, sobretudo da região Nordeste. Em 10 anos de funcionamento, o LMQPN colaborou diretamente com a formação de 17 doutores e 21 mestres, além de mais de uma centena de artigos científicos. O laboratório tem sido demandado intensamente para o estudo de produtos naturais de misturas complexas ou substâncias puras, principalmente metabólitos secundários, usando principalmente desreplicação e metabolômica como abordagens analíticas, além do estudo de macromoléculas como polissacarídeos e ligninas. Neste ínterim, foram desenvolvidos projetos em diversas linhas de pesquisa: (I) bioprospecção de extratos vegetais e microbianos com atividades biológicas e farmacológicas para fins agropecuários e farmacêuticos; (II) avaliação da variabilidade química de espécies silvestres e produtos agrícolas/agroindustriais causada por fatores genéticos, geográficos, condições de cultivo de e/ou processamento (III) estudos de ecologia química para determinação de semioquímicos envolvidos na atração ou repelência de pragas; (IV) desenvolvimento de métodos analíticos e (V) caracterização química de macromoléculas para valorização de resíduos agroindustriais. Estes projetos foram realizados em colaboração com outras 23 unidades da Embrapa, 16 universidades, 10 institutos de pesquisa e empresas espalhadas pelo Brasil, além de algumas cooperações internacionais. Neste trabalho, nós apresentaremos um histórico das pesquisas desenvolvidas pela equipe do LMQPN destacando-se alguns

dos principais resultados alcançados nas diferentes linhas de pesquisa bem como uma perspectiva sobre futuros projetos, entre os quais a aplicação de ensaios de triagem virtual e o desenvolvimento de formulações nanométricas.

BIOPROSPECÇÃO E DESREPLICAÇÃO DE EXTRATOS VEGETAIS E MICROBIANOS

Os Produtos Naturais, substâncias oriundas de plantas, animais e micro-organismos, são reconhecidamente uma fonte prolífica de compostos biologicamente ativos, sendo por isso largamente empregados nas indústrias farmacêutica e agroquímica. Recentemente, um levantamento cobrindo o período de 1981-2019 mostrou que mais de 30% de todas as drogas aprovadas pelo FDA são genuinamente naturais, derivadas de produtos naturais e/ou sintetizadas a partir de um modelo existente na natureza (esqueleto básico ou grupos farmacofóricos). Da mesma forma, produtos naturais ocupam um lugar de destaque no setor agroquímico, representando nos EUA cerca de 1/3 das vendas de inseticidas e de fungicidas (ex.: estrobilurinas), além de 12 % herbicidas.¹⁻² Historicamente, as pesquisas com produtos naturais têm sido realizadas por meio de sucessivos fracionamentos cromatográficos até o isolamento e purificação de um constituinte químico, sendo posteriormente feita a elucidação estrutural por meio de vários métodos físicos (rotação óptica e ponto de fusão) e espectrométricos (RMN, EM-AR, espectroscopias de infravermelho e ultravioleta). No caso de pesquisas para descoberta de fármacos, os testes biológicos são basicamente aplicados de duas formas: (1) composto puro qualquer isolado de um extrato bioativo (2) composto-alvo purificado de frações biologicamente mais potentes oriundas de um extrato bioativo (fracionamento bio-guiado). Em ambas as abordagens, a identificação química do composto bioativo somente é alcançada após um longo e oneroso processo, o qual pode culminar na obtenção de uma substância cuja atividade farmacológica/biológica já seja descrita na literatura, frustrando as expectativas de retorno financeiro. Então, a fim de evitar esforços desnecessários e resultados frustrantes, atualmente labora-

tórios farmacêuticos (ex.: Wyeth; Sequoia Sciences, MerLion Pharmaceuticals) têm implementado uma estratégia mais racional e eficiente chamada de desreplcação, que minimiza o tempo e o custo de identificação de moléculas conhecidas (compostos já relatados na literatura), permitindo o foco na descoberta de novas entidades químicas. A desreplcação tira proveito do fato que moléculas estruturalmente similares exibem propriedades biológicas parecidas e que elas podem ser reconhecidas em uma mistura complexa (extrato ou fração) combinando-se as informações obtidas experimentalmente por técnicas cromatográficas e espectrométricas ortogonais tais como tempo de retenção (tr), perfil de absorbância no ultravioleta (UV), padrões de fragmentação na Espectrometria de Massas (EM), deslocamentos químicos na Ressonância Magnética Nuclear (RMN), além de comparação com suas respectivas bases de dados domésticas, de domínio público ou comerciais. De fato, a desreplcação se tornou tecnicamente viável graças em parte aos recentes avanços tecnológicos da instrumentação analítica usada em química de produtos naturais: cromatógrafos operando a pressões mais altas e munidos de colunas com maior poder de separação resultando em menores tempos de corrida (UPLC), espectrômetros de massas com maior poder de resolução e sensibilidade bem como espectrômetros de RMN com magnetos mais potentes e acoplados a criossondas se tornaram incrivelmente mais sensíveis. As bases de dados de produtos naturais são também uma fonte extremamente úteis para identificação de compostos conhecidos (AntiBase, MarinLit, Dictionary of Natural Products, SciFinder, Madison Metabolomics Consortium Database- MMCD). Além disso, programas computacionais de predição *in silico* de propriedades espectrométricas com simultânea comparação com dados experimentais aceleram a caracterização química de compostos presentes em um grande volume de amostras (ACD/LAbs, Metfrag, NAPROC-C13, PlantMAT, CSI:Finger ID etc.).³⁻⁴

Em razão disso, o LMQPN desenvolveu um protocolo de desreplcação (**Figura 1**) para descobertas de substâncias bioativas validando-se o modelo na avaliação de atividade citotóxica de extratos de quebra-pedra (*Phyllanthus niruri* e *P. amarus*), que são ervas medicinais usadas popularmente para

o tratamento de várias doenças entre as quais problemas renais e hepáticos.⁵ O processo consiste nos seguintes procedimentos:

(1) **Extração**- foram testados diferentes métodos de extração (partição líquido-líquido assistida e extração por líquido pressurizado) e solventes de extração;

(2) **Concentração de analitos** em cartucho de fase sólida, também denominada de pré-fracionamento ou “clean-up”, foram avaliados cartuchos de diferentes fabricantes, variando-se o a quantidade e o tipo de adsorvente, além dos eluentes. Esta etapa visa remover substâncias interferentes que não contribuem para a atividade biológica (ex. sais, açúcares, lipídeos, clorofila);

(3) **Fracionamento** por cromatografia líquida de fase reversa com detector de ultravioleta (CLAE-UV), empregando-se um gradiente de eluição amplo, variando-se o percentual de solvente orgânico (MeOH) gradativamente de 2-100%, a fim de separar tanto moléculas altamente hidrofílicas como lipofílicas. Os métodos de concentração e de fracionamento foram baseados na regra dos 5 de Lipinski, que é um conjunto de características físico-químicas comuns aos fármacos comerciais;

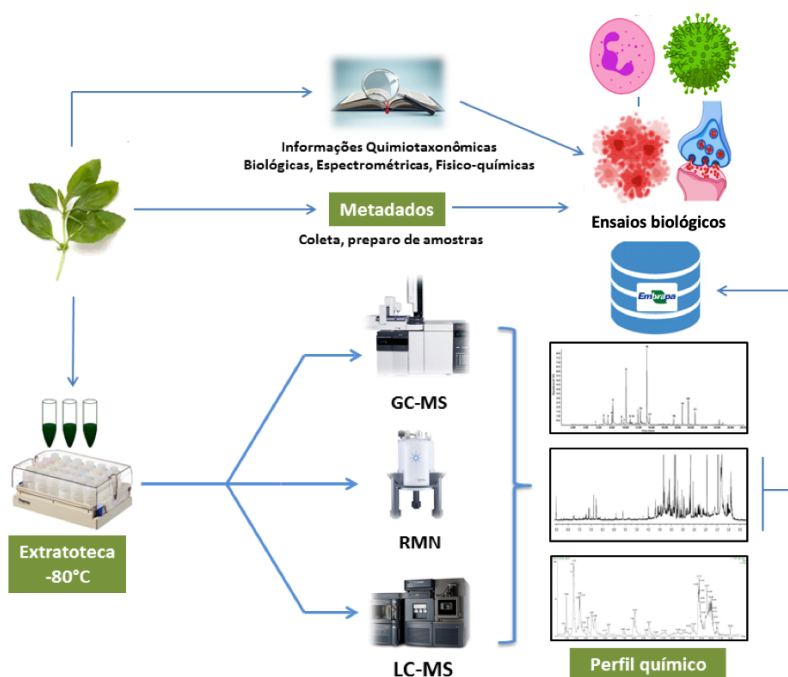
(4) **Análises químicas**- foram definidos parâmetros cromatográficos e espectrométricos para as análises de CLUE-EM e de RMN. O método cromatográfico usado no CLUE-EM foi uma adaptação daquele usado na etapa de fracionamento para que fosse possível uma correlação entre os perfis químicos obtidos em sistemas diferentes. As condições de ionização por *electrospray* foram otimizadas para os modos positivo e negativo;

(5) **Desrepliação**- caracterização química de substâncias conhecidas usando banco de dados de RMN e EM locais e informações quimiotaxonômicas obtidas de levantamentos bibliográficos em grandes bases de dados (Scifinder e Web of Science);

(6) **Ensaio biológico** conduzido em teste *in vitro* contra linhagens células cancerígenas.

Dessa forma, com os procedimentos padronizados e os dados de EM e RMN sistematizados, é possível hoje se identificar substâncias conhecidas presentes em amostras de qualquer matriz ou procedência, comparando-se um conjunto de dados de um determinado sistema entre si e/ou explorando-se a complementaridade das informações geradas nos diferentes sistemas. Por exemplo, o composto X, cuja ocorrência só foi descrita em uma certa planta, pode ser quimicamente caracterizado em uma outra espécie do mesmo gênero/família sem a necessidade de isolamento, desde que o extrato e/ou frações da primeira tenham sido previamente analisados em nossos instrumentos e a presença dele tenha sido identificada de modo inequívoco.

Figura 1. Processo de desrepliação no LMQPN.



A abordagem de desrepliação tem sido aplicada cotidianamente nos estudos de bioprospecção de planta e micro-organismos realizados pelo

LMQPN tanto para a caracterização dos constituintes químicos dos extra-
tos/frações bioativos como também para a descoberta dos compostos res-
ponsáveis pelas atividades farmacológicas e biológicas (**Tabela 1**). Relatos
prévios na literatura e/ou testes biológicos indicam quais são os compostos
biologicamente ativos. Dessa forma, foram identificados os seguintes com-
postos bioativos: rotenóide tefrosina (**1**) de *Pseudofusicoccum stromaticum*,
o macrolídeo Sch-642305 (**2**) de *Biscogniauxia* sp.; o flavonoide ternatina
(**3**) e os diterpenos ácido centipédico (**4**) e tanabalina (**5**) de *Egletes viscosa*,
os biflavonoides urundeuvinas de *Myracrodruon urundeuva*, a naftoquinona
fusarubina de *Fusarium solani* (**6-10**), os alcaloides galantamina, sanguinina,
licorina e 11,12-dehidro-2-metoxi-assoanina de *Hippeastrum elegans*. Para
aplicação agropecuária, foram identificados o iridoide plumierideo com
ação inseticida de *Himatanthus drasticus* (**Figura 2**).⁶⁻¹³ Para as demais espé-
cies, as investigações sugeriram um efeito sinérgico envolvendo compostos
de uma ou mais classes químicas.

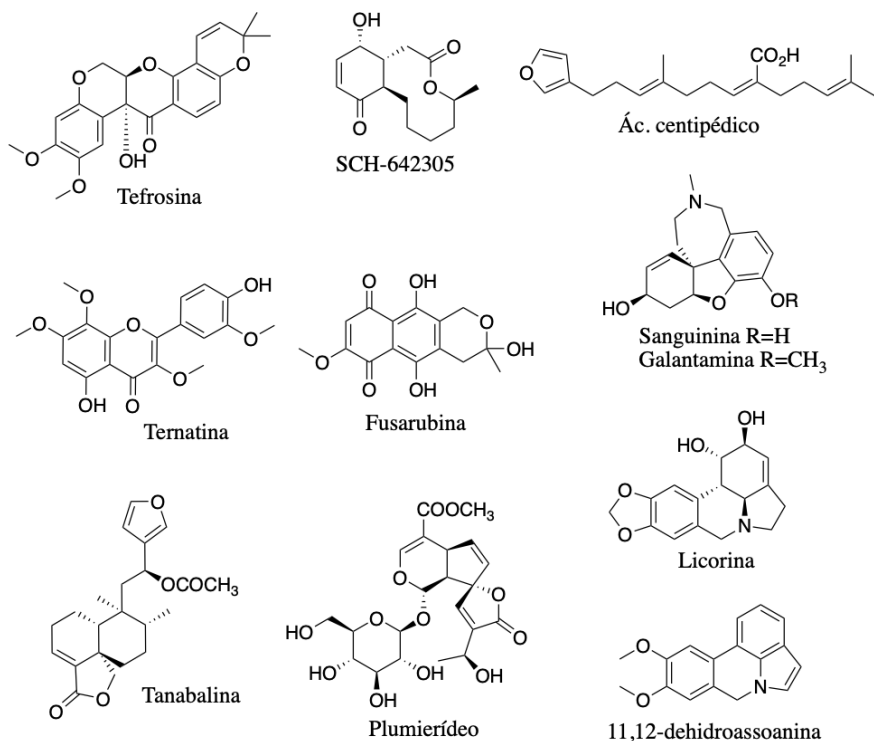
Além disso, o LMQPN atuou intensamente em projetos de caracteri-
zação química de óleos essenciais (OE) com propriedades biológicas: anti-
helmíntica contra parasitas de peixe (*Alpinia zerumbet*), acaricida contra
carrapato bovino (*A. zerumbet*, *Varronia curassavica*, *Croton conduplicatus*,
C. grewioides, *C. pulegioidorus*, *Egletes viscosa*, *Lippia schaueriana*, *Mesos-
phaerum suaveolens*, *Ocimum gratissimum*, *Psidium guajava*); inseticida
contra mosca-do-chifre (*M. suaveolens*, *A. zerumbet*), antibacteriana para
bactérias causadoras de mastite bovina (*A. zerumbet*, *P. guajava*, *V. curras-
savica*), doenças em camarões (*M. suaveolens*, *O. gratissimum*) (**Tabela 1**).¹⁴⁻¹⁶

ESTUDOS METABOLÔMICOS PARA AVALIAÇÃO DA VARIABILIDADE QUÍMICA DE ESPÉCIES SILVESTRES E PRODUTOS AGRÍCOLAS/AGROINDUSTRIAIS

A metabolômica compreende a análise abrangente e quantitativa do
metaboloma, ou seja, o conjunto de todos os metabólitos de baixa massa mo-

lecular (até 1500 Da) de um sistema biológico. Poderosos métodos analíticos eficientes, como cromatografia líquida de alta eficiência, espectrometria de massas de alta resolução, e programas computacionais capazes de processar grandes conjuntos de dados analíticos gerados viabilizaram o rápido desenvolvimento da metabolômica. Os metabólitos são produtos intermediários ou finais do metabolismo em uma amostra biológica. Existem duas abordagens analíticas utilizadas para a análise dos metabólitos: metabolômica direcionada (*targeted metabolomics*)- análise quantitativa de um ou mais metabólitos pré-selecionados de uma classe química, e metabolômica não-alvo (do inglês, *untargeted metabolomics*), que analisa o conjunto completo de metabólitos conhecidos ou não de um determinado sistema biológico.

Figura 2. Estruturas químicas dos compostos bioativos identificados por desreplicação.



A análise por RMN tem uma grande vantagem em relação a outras técnicas, pois é não destrutiva e não requer o uso de substâncias de referências de alto grau de pureza para obtenção de concentração dos compostos, as quais são necessárias para EM ou condições cromatográficas (fase estacionária, fase móvel, temperatura). A CG-EM é uma das técnicas de análise mais empregadas em estudos metabolômicos, apresentando alta robustez e reprodutibilidade. Essa técnica requer que os analitos sejam voláteis e termicamente estáveis, condições que excluem muitos metabólitos secundários importantes das plantas. Entretanto, grande parte dos metabólitos que compõem o metaboloma podem ser derivatizados, para que se tornem voláteis a baixas temperaturas. A combinação da cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE), acoplada à espectrometria de massa de alta resolução (EMAR), é a técnica analítica de separação mais eficiente para aquisição de perfis cromatográficos atualmente, podendo ser acoplada a diferentes analisadores e detectores.

A enorme quantidade de dados gerados na Metabolômica impõe um grande desafio analítico no mapeamento completo da constituição metabólica de um organismo biológico, uma vez que existe uma grande diversidade química de metabólitos, com diferentes funções biológicas e com níveis de concentrações diferentes, não existindo nenhuma técnica analítica capaz de promover a identificação e quantificação de todo o metaboloma de um determinado sistema biológico. Por isso, é comum nos estudos metabolômicos o emprego de mais de uma técnica analítica, além de análise estatística multivariada, também denominada quimiometria. Os métodos quimiométricos podem ser supervisionados e não supervisionados. As análises não supervisionadas (análise exploratória) visam o entendimento global da natureza do dado mostrando tendências, agrupamentos ou padrões: a análise de componente principal (PCA) e análise de cluster hierárquica (HCA). Por outro lado, as análises supervisionadas (análise discriminatória) têm como objetivo principal obter uma correlação de variáveis químicas e um conjunto de dados para a determinação de compostos discriminantes, às vezes denominados de biomarcadores: Análise Discriminante de Mínimos Quadrados Parciais

(PLS-DA) e Análise Discriminante de Mínimos Quadrados Parciais Ortogonais (OPLS-DA).

No LMQPN, a metabolômica tem sido empregada em espécies silvestres, culturas agrícolas e produtos agroindustriais para avaliação de variabilidade química causada por fatores genéticos, geográficos, condições de cultivo de e/ou processamento, além de estudos de ecologia química.

Tabela 1. Estudos de bioprospecção de plantas e microorganismos para fins farmacêuticos e agropecuários.

Espécie	Parte	Atividade biológica	Compostos caracterizados
<i>Anacardium occidentale</i>	pedúnculo	anti-helmíntica	Flavonoides glicosilados
<i>Azadiracta indica</i>	folhas	antiviral	Flavonoides e limonoides
<i>Biscogniauxia sp</i>	caldo	citotóxica	Policetídeos, isocumarinas; terpenoides
<i>Egletes viscosa</i>	capítulos florais	gastroprotetora	Flavonoides e diterpenos
<i>Fusarium solani</i>	caldo	anti-inflamatória	Naftoquinonas e antraquinonas
<i>Gossypium hirsutum</i>	Folhas	antifúngica	Flavonoides glicosilados; fenilpropanoides
<i>Himatanthus drasticus</i>	látex	inseticida	iridoides
<i>Hippeastrum elegans</i>	bulbos	anti-inflamatória; anticolinesterase	Alcaloides
<i>Hylocereus polyrhizus</i>	fruto	ansiolítica	Flavonoides glicosilados e betalainas
<i>Licania tomentosa</i>	fruto	antioxidante	Flavonoides e lignanas
<i>Mangifera indica</i>	fruto	anti-inflamatória	Flavonoides e xantonas glicosilados
<i>Melia azedarach</i>	folhas	antiviral	Flavonoides e limonoides
<i>Myracrodruon urundeuva</i>	Parte aérea	gastroprotetora	Biflavonoides; galotaninos

continua_

Espécie	Parte	Atividade biológica	Compostos caracterizados
<i>Passiflora tenuifila</i>	fruto	ansiolítica, anticonvulsivante	Flavonoides glicosilados
<i>Phyllanthus niruri</i> e <i>P. amarus</i>	folhas	citotóxica	Galotaninos e flavonoides glicosilados
<i>Pseudofusicoccum stromaticum</i>	caldo	citotóxica	Rotenoides, ciclopeptídeos; policetídeos
<i>Schinopsis brasiliensis</i>	planta	citotóxica	Flavonoides glicosilados; galotaninos
<i>Senecio brasiliensis</i>	planta	anti-helmíntica	Alcaloides

Em estudos para investigação de fatores genéticos, foram avaliados materiais de diferentes espécies e variedades submetidos a estresses bióticos ou abióticos, a fim de se conhecer as respostas fisiológicas e os mecanismos de defesa das plantas, bem como determinar marcadores químicos associados à resistência/tolerância a agentes biológicos (micro-organismos fitogênicos e insetos-praga) ou físico-químicos (salinidade, seca). Em materiais de *Phyllanthus amarus* e *P. niruri*, nós encontramos que o estresse hídrico induziu níveis mais altos de ácidos orgânicos (ácidos málico, succínico e cítrico) e aminoácidos (prolina, GABA, alanina e valina) em ambas as espécies. *P. amarus* mostrou-se mais tolerante à escassez hídrica, porém *P. niruri* produz mais do tanino corilagina como uma estratégia de aclimação.¹⁷ Adicionalmente, nós utilizamos mudas de *E. viscosa* para demonstrarmos os efeitos benéficos do ácido salicílico para aliviar a ação do estresse salino.¹⁸ Para materiais de videira, nós encontramos que o genótipo tolerante à fusariose (Paulsen P1103) continha maiores teores de ácido glicérico, prolina, sorbitol, galactose e 1,3-dihidroxiacetona do que o genótipo susceptível (BDMG573) durante o período de infecção pelo fitopatógeno *Fusarium oxysporum*.¹⁹ Na avaliação de cultivares de *Opuntia spp* (palma-forrageira) ao ataque de colchonilha de carmim, nós identificamos os flavonoides quercetina-3-O-2',6'-dirhamnosilglucosídeo, quercetina-rhamnosil dihexosídeo e isorhamnetina-3-sophorosídeo-7-rhamnosídeo como biomarcadores de resistência a esta

praga.²⁰ Portanto, a metabolômica tem demonstrado ser uma ferramenta muito útil em programas de melhoramento genético para seleção de variedades resistentes a pragas, doenças e a condições edafoclimáticas adversas.

A metabolômica pode auxiliar também na escolha das melhores condições de cultivo ou de processamento baseada nos teores de compostos bioativos, funcionais ou sensoriais. A época de colheita dos bulbos de *Hippastrum elegans* foi determinada com base nos maiores teores de alcaloides, entre os quais a galantamina, que é um fitofármaco utilizado para o tratamento do Mal de Alzheimer.¹¹ O efeito do estágio de maturação da acerola e da uva para produção de vinho foi investigado combinando-se técnicas espectrométricas com quimiometria. Para vinhos, adicionalmente, avaliamos a variedade da uva, a época de colheita, o tempo de maceração e o tipo de porta-enxerto, correlacionado a composição química com propriedades sensoriais e/ou estabilidade química.²¹⁻²³

Propriedades sensoriais de frutas podem ser avaliadas através de marcadores químicos determinados por metabolômica. A adstringência do caju pôde ser atribuída à presença de ácidos anacárdicos comparando-se o perfil químico de diferentes genótipos, enquanto a perda de adstringência do caqui foi monitorada pela liberação de compostos voláteis. A combinação de técnicas cromatográficas com quimiometria tem sido empregada também para investigações botânicas.²⁴⁻²⁵ A avaliação metabolômica revelou flavonoides e triterpenos como marcadores quimiotaxômicos de espécies de Mirtáceas, além de flavonoides e galotaninos para discriminação das espécies *Spondias mombim* e *S. tuberosa*.²⁶

A abordagem metabolômica tem se mostrado muito útil para o estabelecimento de condições de processamento bem como para o controle de qualidade e a estabilidade de produtos alimentícios, monitorando-se componentes nutricionais, além de constituintes com propriedades funcionais ou sensoriais. Neste sentido, em nosso laboratório temos avaliado o efeito de processos de conservação sobre sucos de fruta tais como caju, camu-camu, maçã e maracujá.²⁷ Tendo em vista que os resíduos agroindustriais são em geral descartados de maneira inadequada, eles representam um problema

ambiental. No entanto, muitos dessas biomassas são fontes de compostos bioativos e corantes que poderiam ser melhor aproveitados para aplicações nutraceuticas, cosméticas e na indústria de alimentos, propiciando não só sustentabilidade ambiental como sócio-econômica a alguns modelos de negócio, principalmente naqueles pautados em Bioeconomia. Para isto, empregamos métodos de extração de Química Verde tais como extração por líquido pressurizado (PLE), ultrassom (UAE) e fluido super-crítico (SFE). No LMQPN, otimizamos os parâmetros de extração com foco nos maiores rendimentos de compostos bioativos/corantes: ácidos clorogênicos de batata-doce, antocianinas de jabuticaba e jambolão, flavonoides de ora-pro-nobis e acerola, além de fenólicos e taninos de quebra-pedra e tamarindo (**Tabela 2**).²⁸⁻³²

Tabela 2. Estudos metabolômicos para avaliação de efeitos agronômicos e de processamento para culturas agrícolas e produtos derivados.

Espécie	Parte/ Produto	Efeito avaliado	Técnica Analítica	Método Químio-métrico	Compostos Analisados
<i>A. occidentale</i> caju	suco da fruta	Processo de conservação	CLUE-EM, RMN, CG-EM	PCA	MP, fenólicos, voláteis
	pedúnculo	Genótipos; Adstringência; Encapsulamento;	CLUE-EM, RMN,	PCA; PLS-DA	MP, flavonoides; ac.anacárdicos;
<i>Diospyros</i> spp. caqui	fruto	Adstringência	CG-EM	PCA e PLS	voláteis
<i>E. viscosa</i> macela-da-terra	folhas	Estresse salino	CG-EM	PCA	voláteis
<i>Eugenia, Myrciaria, Psidium, Plinia</i> spp, (Mirtaceae)	folhas	Taxonômico	CLUE-EM,	PLS-DA	Flavonoides, triterpenos
<i>Ipomoea batatas</i> batata-doce	raízes	Extração	CLUE-EM	PCA e PLS-DA	Ác. clorogênicos
<i>H. elegans</i>	bulbos	Época de colheita	CLUE-EM, CG-EM	PCA, PLS-DA	alcaloides

continua_

Espécie	Parte/ Produto	Efeito avaliado	Técnica Analítica	Método Químio- métrico	Compostos Analisados
<i>Malpighia emarginata</i> acerola	fruto	Maturação	RMN	PCA	MP
		Extração	CLUE-EM	-	Flavonoides, vitamina C
<i>Malus domestica</i> maçã	suco da fruta	Processo de conservação	RMN, CG- EM	PCA, PLS- DA	MP; voláteis
Manhihot esculenta- mandioca	raízes	Genótipo e época de colheita	RMN	PCA	MP e ligninas
<i>Myrciaria cauliflora</i> jabuticaba	fruto	Extração	CLUE-EM	-	Cianidina-3- glicosídeo e ác. elágico
<i>Myrciaria dubia</i> camu-camu	suco da fruta	Processo de conservação	RMN, CG- EM	PCA, PLS- DA	MP; voláteis
<i>Opuntia spp.</i> palma	cladódio	Resistência a praga	CLUE-EM	PCA e OPLS-DA	flavonoides
<i>Passiflora edulis</i> maracujá	suco da fruta	Processo de conservação	RMN	PCA	MP
<i>Paulinia cupana</i> guaranã	frutos	Geográfico	CLUE-EM, RMN	PCA e PLS-DA	Cafeína, cate- quinas, proanto- cianidinas
<i>Pereskia aculeata</i> ora-pro-nobis	folhas	Extração	CLUE-EM	-	flavonoides
<i>Phaseolus vulgaris</i> feijão	semente	Armazena- mento	RMN e CLUE-EM	PCA e OPLS-DA	MP, flavonoides, taninos e saponinas
<i>P. niruri</i> <i>P. amarus</i> quebra-pedra	folhas	Estresse hídrico; Extração	CLUE-EM e RMN	PCA, OPLS-DA	MP e fenólicos
<i>Spondias spp</i>	folhas	Taxonômico	CLUE-EM	PCA, OPLS-DA	Galotaninos e flavonoides
<i>Syzygium cumini</i> - jambolão	fruto	Extração	CLUE-EM	-	Antocianinas
<i>Tamarindus indica</i> tamarindo	sementes	Extração	CLUE-EM	-	Catequinas e procianidinas

continua_

Espécie	Parte/ Produto	Efeito avaliado	Técnica Analítica	Método Químio- métrico	Compostos Analisados
Vitis spp videira	parte aérea e raiz	Fitopatógeno- hospedeiro	CG-EM	PCA	MP
	vinho	Sazonalidade, enológicos	RMN, CLUE-EM	PCA, PLS- DA	MP e fenólicos

*MP= metabólitos primários (açúcares, aminoácidos e/ou ácidos orgânicos)

ESTUDOS DE ECOLOGIA QUÍMICA

O estudo sobre a interação química de diferentes espécies entre si pode ser elucidada através da metabolômica. Em uma das pesquisas, nós avaliamos a variabilidade dos metabólitos primários e dos compostos voláteis de seivas do floema de 10 espécies diferentes de *Pinus* (pinheiro) usando RMN e MEFS-CG-EM, a fim de correlacionar a composição química desses materiais com a predileção de consumo do macaco-prego por eles. No sul do Brasil, o macaco-prego causa danos à madeira e perdas financeiras quando remove a casca de algumas espécies de *Pinus* para se alimentar dos tecidos vasculares subjacentes. A análise mostrou açúcares e α -pineno (odor de pinho resinoso) como compostos atraentes para macacos. Por outro lado, os baixos teores de açúcares e alto teor de β -felandreno (odor cítrico) foram observados em espécies de *Pinus* menos atacadas (*P. patula*). Assim, *P. elliottii* foi uma árvore evitada mesmo com alto teor de açúcares possivelmente devido ao seu alto teor de β -felandreno (odor cítrico). Os resultados são úteis para estudos comportamentais adicionais para determinar o papel que cada metabólito destacado desempenha nas interações animal-planta quimicamente mediadas.³³ Com relação à interação planta-polinizador, nós investigamos a influência dos compostos voláteis das inflorescências de diferentes espécies de *Elaeis guineensis* (dendê africano, amazônico Caiaué e o híbrido interespecífico BRS-Manicorê) no processo reprodutivo. Os fenilpropanóides, terpenóides e os hidrocarbonetos alifáticos foram as classes predominantes em inflorescências de dendezeiros e o composto majoritário

foi o estragol. Este resultado está correlacionado com a atração de polinizadores *Elaidobius*, uma vez que estes insetos não foram atraídos por Caiaué, que emitiu estragol em quantidades ínfimas.³⁴

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Nos projetos desenvolvidos no LMQPN, para alguns deles foram necessários o estabelecimento e a validação de métodos analíticos que garantissem exatidão e reprodutibilidade nas análises, visto que não estavam disponíveis na literatura. Neste sentido, desenvolvemos métodos de quantificação de componentes presentes em diferentes partes do caju para avaliação de genótipos existentes no Banco de Germoplasma da Embrapa (**Tabela 3**): (I) ácidos anacárdicos por CLAE-UV no líquido da casca da castanha de caju (LCC), (II) selenometionina na amêndoa usando CLUE-EM, além de açúcares no pedúnculo por infravermelho próximo.³⁵⁻³⁶

Um método analítico para uma cepa de *Bacillus subtilis* com ação antifúngica contra fitopatógenos (CNPMS22) foi desenvolvido e validado para quantificar três famílias de lipopeptídeos (iturinas, fengicinas e surfactinas) e suas isoformas, empregando-se CLUE-EM. O método foi pensado para monitorar e otimizar o processo fermentativo da bactéria bem como para a seleção de cepas produtoras de lipopeptídeos bioativos.³⁷

Para *E. viscosa*, foram criados métodos para quantificar os princípios ativos ternatina, ácido centipédico e tanabalina por CLUE-EM e RMN, além de métodos não destrutivos para discriminação dos quimiotipos através de infravermelho próximo e CG-EM acoplada com Microextração em fase Sólida (MEFS). Neste último caso, as condições de MEFS foram otimizadas para reproduzir o perfil de compostos voláteis do óleo essencial obtido por hidrodestilação. Com isso foi possível utilizar uma quantidade de biomassa 300x menor e realizar a análise em um tempo 30x mais curto. Um método de MEFS-CG-EM foi também desenvolvido para análise dos compostos vo-

lâteis emitidos pelas flores do meloeiro (*Cucumis melo*) para entendermos o processo de polinização.³⁸⁻³⁹

O CLUE-EM foi desenvolvido para quantificação de quatro alcalóides (galantamina, sanguinina, pseudolicorina, narciclasina) em espécies de amarilidáceas brasileiras, visando a prospecção de novas fontes de compostos bioativos, sobretudo de galantamina em razão do seu uso clínico para o Mal de Alzheimer.⁴⁰

Tabela 3. Métodos analíticos quantitativos desenvolvidos e validados.

Espécie	Parte	Técnica Analítica	Compostos Analisados
<i>A. occidentale</i>	LCC	CLAE-UV	Ácidos anacárdicos
	castanha	CLUE-EM	Selenometionina
	pedúnculo	IV próximo	Açúcares
<i>Bacillus subtilis</i>	Caldo	CLUE-EM	Iturinas, fengicinas e surfactinas
<i>Cucumis melo</i>	flores	CG-EM	Compostos voláteis
<i>E. viscosa</i>	Capítulos florais	CLUE-EM, RMN	Ternatina, ác. centipedico e tanabalina
		CG-EM, IVp	Compostos voláteis
Amarilidáceas	bulbos	CLUE-EM	Alcaloides

CARACTERIZAÇÃO DE MACROMOLÉCULAS

Além dos compostos de baixo peso molecular, o LMQPN também investiga macromoléculas naturais com propriedades bioativas para aplicação farmacêutica ou propriedades físico-químicas interessantes para a indústria química. Da alga marinha *Hypnea pseudomusciformis*, nós caracterizamos um polissacarídeo sulfatado com atividade antinociceptiva. Ligninas de resíduos agroindustriais também foram objetos de estudo porque são alternativas “verdes” ao fenol derivado da indústria de petróleo. Neste sentido, nós caracterizamos e quantificamos as unidades básicas de ligninas extraídas

dos bagaços de caju e de cana-de-açúcar usando técnicas bidimensionais de RMN, principalmente HSQC.⁴¹⁻⁴²

NOVAS LINHAS: NANOFORMULAÇÕES E TRIAGEM VIRTUAL

As nanotecnologias são um novo e revolucionário conjunto de tecnologias, que trabalham na bilionésima parte do metro, elaborando produtos novos nas mais diversas áreas. Adicionadas a produtos naturais as nanoformulações funcionalizadas são capazes de potencializar o efeito dos compostos naturais e realizar a entrega aos alvos de forma mais eficaz e com significativa diminuição de dose. As nanopartículas acopladas a compostos naturais são capazes de incrementar a atividade biológica e a especificidade, contudo a natureza dos compostos a serem nanoformulados é uma questão relevante. Para trazer soluções para a questão, aplicam-se tecnologias e simulações computacionais capazes de antecipar a atividade desses compostos. Simulações como a triagem virtual (VS), a ancoragem molecular e a dinâmica molecular de sistemas moleculares contribuem para identificar novos compostos ativos nas mais diversas aplicações em medicina e igualmente na agricultura. A triagem virtual é uma técnica computacional usada para identificar, a partir de uma grande biblioteca de compostos, aqueles que se ligam a um alvo específico, geralmente uma enzima ou receptor. Já a ancoragem molecular é uma ferramenta na biologia molecular estrutural e no desenho de fármacos. O objetivo do docking ligante-proteína é prever o(s) modo(s) de ligação predominante(s) de um composto ligado a uma proteína de estrutura tridimensional conhecida. A partir de bibliotecas virtuais de compostos naturais, é possível identificar potenciais ligantes ou inibidores de enzimas e receptores-chaves. Por exemplo, o desenho de nematocidas em plantas foi realizado através do estudo de receptores ligados a proteínas G (GPCR) com moléculas alvo disponíveis em uma biblioteca de mais de 16.000 produtos naturais, aplicando-se a metodologia de triagem virtual com base no modo de ligação previsto de lunidonina. Os modos de ligação

e as características estruturais desses inibidores contribuirão para o desenvolvimento inovador de compostos nematocidas para controlar nematóides na agricultura.⁴³ Mais cedo, a equipe do LMQPN já havia desenvolvido uma nanoformulação contendo óleo essencial de *Lippia sidoides* (alecrim-pimenta), que devido às suas propriedades antifúngicas e antibacterianas poderia ser usada no controle de doenças de plantas.⁴⁴

As perspectivas para os próximos anos estão na agregação de várias tecnologias, incluindo ferramentas analíticas aprimoradas, estratégias de mineração e engenharia de genomas etc., para abordar os desafios do uso de produtos naturais. Assim, abrem-se novas oportunidades no interesse em produtos naturais, revitalizando seu uso, particularmente para combater doenças e pragas de interesse mundial. Neste cenário destacam-se promissoras aplicações como fenotipagem em larga escala, metabolômica, genômica e edição gênica. No tocante à metabolômica, o LMQPN deverá se envolver gradativamente em projetos de avaliação de propriedade funcionais de alimentos/bebidas, investigando material biológico (urina, fezes, soro) de animais submetidos a dietas com esses produtos tal como foi feito no estudo da fibra de caju.⁴⁶

AGRADECIMENTOS

Os nossos agradecimentos às agências financiadores pelo suporte financeiro e de bolsas (Embrapa, FUNCAP, CAPES, CNPQ, BNDES e FINEP) e às instituições parceiras, em especial à Universidade Federal do Ceará, Universidade Estadual do Ceará e Universidade Regional do Cariri.

REFERÊNCIAS

1. Newman, D. J.; Cragg, G. M.; *J. Nat. Prod.* **2020**, 83, 770.
2. Sparks, T.C.; Hahn, D.R.; Garizi, N.V.; *Pest Manag. Sci.* **2017**, 73, 700.
3. Gaudêncio, S.P.; Pereira, F.; *Nat. Prod. Rep.* **2015**, 32, 779.
4. Harvey, A. L.; Edrada-Ebel, R.; Quinn, R. J.; *Nature Rev. Drug Discov.* **2015**, 14, 111.

5. Silva, M.F.S.; Silva, L.M.A.; A.Q.; Santos, A.G.; Silva, F.A.N.; Oliveira, F.C.E.O.; et al.; *J. Chromatogr. B* **2019**, *1120*, 51.
6. Sobreira, A. C.; Pinto, F. C. L.; Florêncio, K. G. D.; Wilke, D. V.; Staats, C. C.; Streit, R. A. S.; et al.; *RSC Adv.* **2018**, *8*, 35575
7. Pedra, N. S.; Galdino, K. C. A.; Silva, D. S.; Ramos, P. T.; Bona, N. P.; Soares, M. S. P.; et al.; *Front. Oncol.* **2018**, *8*, 476.
8. Santos, F.A.; Viana, A.F.S.C.; Nunes, P.I.G.; Portela, B.Y.M.; Alves, A.P.N.N.; Viana, D.A.; et al.; *J. Ethnopharmacol.* **2023**, *309*, 116348.
9. Galvão, W. R. A.; Braz-Filho, R.; Canuto, K. M.; Ribeiro, P. R. V.; Campos, A. R.; Moreira, A. C. O. M.; et al.; *J. Ethnopharmacol.* **2018**, *222*, 177.
10. Menezes, B.S.; Solidade, L.S.; Conceição, A.A.; Santos-Junior, M.N.; Leal, P.L.; Brito, E.S.; et al.; *AMB Expr* **2020**, *10*, 117.
11. Paiva, J.R.; Souza, A.S.Q.; Pereira, R.C.A.; Ribeiro, P.R.V.; Alves-Filho, E.G.; Silva, L.M.A.; et al.; *Phytochem. Lett.* **2021**, *43*, 27.
12. Souza, A.S.Q.; Sousa, J.A.C.; Pinto, C.S.; Alves-Filho, E.G.; Pereira, R.C.A.; Brito, E.S.; et al.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2021**, *199*, 114061.
13. Morais, F.S.; Canuto, K.M.; Ribeiro, P.R.V.; Silva, A.B.; Pessoa, O.D.L.; Freitas, C.D.T.; et al.; *J. Agric. Food Chem.* **2021**, *69*, 5049.
14. Luz, J. G. R.; Nogueira, J. N.; Alves, C. M. G.; Videira, M. N.; Canuto, K. M.; Castro, K. N. C.; et al.; *Aquacult. Res.* **2021**, *52*, 5340
15. Castro, K. N. C.; Chagas, A.C.S.; Costa, L.M.; Canuto, K. M.; Brito, E. S.; Rodrigues, T. H. S.; et al.; *Rev. Bras. Farmacogn.* **2019**, *29*, 811.
16. Santos, L.G.A.; Reis, R.B.; Souza, A.S.Q.; Canuto, K. M.; Castro, K.N.C.; Pereira, A. M. L.; et al.; *J. Essent. Oil Res.* **2022**, *34*, 313.
17. Alves-Filho, E.G.; Braga, L. N., Silva, L.M.A.; Miranda, F.R.; Silva, E.O.; Canuto, K. M.; et al.; *Sci Rep.* **2018**, *8*, 15141.
18. Batista, V.C.V.; Pereira, I.M.C.; Paula-Marinho; S.O.; Canuto, K.M.; Pereira, R.C.A.; Rodrigues, T.H.S.; et al.; *Environ. Exper. Bot.* **2019**, *167*, 103870.
19. Costa, I.R.S.; Cavalcante, F.L.P.; Cavalcanti, F.R.; Fernandes, C. F.; Gomes-Filho, E.; Canuto, K.M.; et al. *Physiol. Plant.* **2023**, *175*, e13918.
20. Matos, T.K.B.; Guedes, J.A.C.; Alves-Filho, E.G.; Luz, L. R.; Lopes, G. S.; Nascimento, R. F. et al.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2021**, *32*, 1617.

21. Santos, C. P.; Batista, K. D. C.; Roque, A. L. M.; Miranda, R. S.; Silva, L. M. A.; *et al.*; *Plant Mol. Biol.* **2019**, *101*, 269–296
22. Alves-Filho, E. G.; Silva, L. M. A.; Ribeiro, P. R. V.; Brito, E. S.; Zocolo, G. J.; Souza-Leão, P. C.; *et al.*; *Food Chem.* **2019**, *289*, 558.
23. Alves-Filho, E. G.; Silva, L. M. A.; Lima, T. O.; Ribeiro, P. R. V.; Vidal, C. S.; Carvalho, E. S. S.; *et al.*; *Food Chem.* **2022**, *382*, 132359.
24. Braga, D. C.; Alves-Filho, E. G.; Ribeiro, P. R. V.; Araújo, I.M.S.; Brito, E.S.; Garruti, D. S.; *Food Biosci.* **2021**, *41*, 100931.
25. Amorim, C.; Alves-Filho, E. G.; Bender, R. J.; Rodrigues, T. H. S.; Canuto, K. M.; Garruti, D. S.; *et al.*; *Food Res. Int.* **2020**, *136*, 109570
26. Guedes, J. A. C.; Santiago, Y. G.; Luz, L. R.; Silva, M. F. S.; Ramires, C.M.C; Lima, M.A.C.; *Phytochem. Lett.* **2020**, *40*, 26.
27. Soares, M. V. L.; Alves-Filho, E. G.; Silva, L. M. A.; Novotny, E. H.; Canuto, K. M.; Wurlitzer, N. J.; *et al.*; *Food Chem.* **2017**, *219*, 01.
28. Alves-Filho, E. G.; Sousa, V. M.; Rodrigues, S.; Brito, E. S.; Fernandes, F.A.N.; *Ultrasonics Sonochem.* **2020**, *63*, 104911.
29. Mesquita, P.C.; Rodrigues, L.G.G.; Mazzutti, S.; Ribeiro, P. R. V.; Brito, E.S.; Lanza, M.; *Food Chem.* **2022**, *397*, 133718
30. Sabino, L.B.S.; Alves-Filho, E. G.; Fernandes, F. A. N.; Brito, E. S.; Júnior, I. J. S.; *Food Bioprod Process* **2021**, *127*, 77.
31. Torres, T. M. S; Guedes, J. A. C.; Brito, E. S.; Mazzutti, S.; Ferreira, S. R. S.; *J. Supercrit. Fluids* **2022**, *181*, 105514.
32. Sousa, A. D.; Maia, A. I. I.; Rodrigues, T. H. S.; Canuto, K. M.; Ribeiro, P. R. V.; Pereira, R. C. A.; *et al.*; *Ind. Crops Prod.* **2016**, *79*, 91
33. Silva, L. M. A.; Alves-Filho, E. G.; Rodrigues, T. H. S.; Louredo, F.J.C.; Zocolo, G. J.; Canuto, K. M.; *et al.*; *J. Chem. Ecol.* **2022**, *48*, 660. 34. Alves-Filho, E. G.; Brito, R.; Rodrigues, T. H. S.; Silva, L. M. A.; Brito, E. S.; Canuto, K. M.; *et al.*; *Chem. Biodivers.* **2019**, *16*, e1900050.
35. Alves-Filho, E. G.; Silva, L. M. A.; Lima, Y.; Ribeiro, P. R. V.; Silva, E. O.; Zocolo, G. J.; *et al.*; *Metabolites* **2019**, *9*, 121.
36. Filho, F. O.; Zocolo, G. J.; Canuto, K. M., Junior, I. J. S, Brito, E. S.; *Sep Sci. Plus* **2019**, *2*, 192.
37. Souza, C. G.; Martins, F. I. C. C.; Zocolo, G. J.; Figueiredo, J. E. F.; Canuto, K. M.; Brito, E. S.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2018**, *410*, 6827.

38. Carvalho, K. R.; Souza, A. S. Q.; Alves-Filho, E. G.; Silva, L. M. A.; Silva, E. O.; Pereira, R. C. A.; *et al.*; *Food Res. Int.* **2020**, 138, 109759.
39. Carvalho, K. R.; Zocolo, G. J.; Brito, E. S.; Silveira, E.R.; Canuto, K. M.; *Microchem. J.* **2021**, 168, 106434.
40. Paiva, J.R.; Souza, A.S.Q.; Pereira, R.C.A.; Ribeiro, P.R.V.; Zocolo, G. J.; Brito, E. S.; *et al.*; *J. Braz. Chem. Soc.* **2020**, 31, 265.
41. Souza, C.A.P; Oliveira, B.A.; Santos, S.A.R; Batista, F.L.A.; Andrade, F.R.N; Neto, E.J.R.; *et al.*; *Inflammopharmacol.* **2019**, 27, 261.
42. Serpa, J. F.; Silva, J. S.; Reis, C.L.B.; Micoli, L.; Silva, L. M. A.; Canuto, K. M.; *et al.*; *Biomass Bioenerg.* **2020**, 141, 105728
43. Bresso, E.; Fernandes, D.; Amora, D. X.; Noel, P.; Petitot, A. S., Sá, M. L.; *et al.*; *Molecules* **2019**, 24, 3798.
44. Pinto, N.O.F.; Rodrigues, T. H.S.; Pereira, R.C.A.; Silva, L.M.A.; Cáceres, C.A., Azeredo, H. M.C.; *et al.*; *Ind. Crops Prod.* **2016**, 86, 279.
45. Atanasov, A. G.; Zotchev, S.B.; Dirsch, V. M.; Supuran, C. T.; *Nat Rev. Drug Discov.* **2021**, 20, 200.
46. Carvalho, D.; Silva, L. M. A.; Alves-Filho, E. G.; Santos, F.A.; Lima, R.; Viana, A.F.S.C.; *et al.*; *Food Funct.* **2019**, 10, 16.