

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA GOIANO –  
CÂMPUS RIO VERDE

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROQUÍMICA

ANÁLISE QUIMIOTAXONÔMICA DE VARIEDADES DE *Hancornia  
speciosa* ATRAVÉS DA TÉCNICA DE RMN HR-MAS E  
QUIMIOMETRIA

Autor: Leonnardo Cruvinel Furquim

Orientador: Carlos Frederico de Souza Castro

Rio Verde – GO

agosto – 2015

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
GOIANO – CÂMPUS RIO VERDE  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROQUÍMICA

ANÁLISE QUIMIOTAXONÔMICA DE VARIEDADES DE  
*Hancornia speciosa* ATRAVÉS DA TÉCNICA DE RMN HR-  
MAS E QUIMIOMETRIA

Autor: Leonnardo Cruvinel Furquim

Orientador: Carlos Frederico de Souza Castro

Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM AGROQUÍMICA, ao Programa de Pós-Graduação em Agroquímica do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Câmpus Rio Verde - Área de concentração Agroquímica.

Rio Verde – GO

agosto – 2015

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação na (CIP)  
Elaborada por Izaura Ferreira Neta - Bibliotecária CRB1-2771**

	Furquim, Leonnardo Cruvinel.
F986a	Análise quimiotaxonômica de variedades de <i>hancornia speciosa</i> através da técnica de rnm hr-mas e quimiometria / Leonnardo Cruvinel Furquim. – Rio Verde. - 2015. 53f. : ils. figs, tabs.  Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Programa de Pós-Graduação em Agroquímica do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde, 2015. Orientador: Prof. Dr. Carlos Frederico de Souza Castro.  Biografia. Inclui índice de tabelas e figuras.  <i>1. Hancornia Speciosa. 2. Quimiometria. 3. Quimiotaxonomia. I.</i> Titulo. II. Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde.
	CDD: 630.98105

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
GOIANO – CÂMPUS RIO VERDE  
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROQUÍMICA

**ANÁLISE QUIMIOTAXONÔMICA DE VARIEDADES DE  
*Hancornia Speciosa* E SUA DIFERENCIAÇÃO ATRAVÉS  
DE RMN E FT-IR**

Autor: Leonnardo Cruvinel Furquim

Orientador: Carlos Frederico de Souza Castro

*TITULAÇÃO*: Mestre em Agroquímica – Área de concentração  
Agroquímica.

APROVADO em 14 de agosto de 2015.

Prof. Dr. Aristeu Gomes Tininis

*Avaliador externo*

Ministério da Ciência,  
Tecnologia e Inovação

Prof. Dr. Celso Martins Belisário

*Avaliador interno*

IF Goiano/RV

Prof. Dr. Carlos Frederico de Souza Castro

*Presidente da banca*

IF Goiano/RV

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por sua infinita bondade e bençãos, e a Nossa Senhora, por proteção;

Aos meus pais, Cleidionaldo e Vanuza, e a toda a minha família, pelo apoio recebido desde o começo dos estudos, pela compreensão em todos os momentos e pelo amor e carinho compartilhados.

Ao meu irmão e melhor amigo Cleidionaldo Filho, pelo envolvimento e coautoria em todas as etapas do mestrado;

À minha namorada Francine, pela compreensão;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Carlos Frederico de Souza Castro, pela orientação, dedicação, amizade e ensinamentos de sempre;

Ao prof. Dr. Igor Savioli Flores, pela coorientação e ensinamentos para o desenvolvimento do projeto;

À profa. Dra. Rosane Garcia Collevatti, pelo imprescindível apoio no fornecimento das amostras;

Ao prof. Dr. Luciano Morais Lião, pela imprescindível ajuda nas análises no RMN;

Aos meus gestores do Senar/AR-GO, José Mário, Eurípedes Bassamurfo e Flávio Henrique, pela disponibilidade possibilitada e, aos demais colegas de trabalho, pelo apoio;

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, pela dedicação, empenho e conhecimentos transmitidos;

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Câmpus Rio Verde e ao Programa de Pós Graduação em Agroquímica, pela oportunidade.

## BIOGRAFIA DO AUTOR

Natural de Rio Verde – GO, filho de Cleidionaldo Silva Furquim e Vanuza Cruvinel Cunha Furquim, Leonnardo Cruvinel Furquim nasceu em 08 de abril de 1990. Em 2008, iniciou a vida acadêmica cursando Bacharel e Licenciatura em Química e Engenharia Agrônoma, no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Câmpus Rio Verde, atuando na identificação da composição química de óleos essenciais, produção de biodiesel, análise de qualidade de óleos e atividade antioxidante e fenólica de extratos vegetais.

A partir de 2009, iniciou a formação como professor de Química no ensino médio e em cursos pré-vestibulares. Entre 2012 e 2013, estudou no Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa em Lisboa – Portugal pelo Programa Ciência Sem Fronteiras. Em 2013, iniciou o mestrado no Programa de Pós-Graduação em Agroquímica no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Câmpus Rio Verde e a atuação no Serviço Nacional de Aprendizagem Rural (Senar/AR-GO) como coordenador técnico em Agricultura.

## ÍNDICE

	Página
1. INTRODUÇÃO .....	3
1.1. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	15
2. OBJETIVOS.....	21
3. ANÁLISE QUIMIOTAXONÔMICA DE VARIEDADES DE <i>Hancornia speciosa</i> ATRAVÉS DA TÉCNICA DE RMN HR-MAS E QUIMIOMETRIA .....	22
3.1. INTRODUÇÃO .....	22
3.2. MATERIAIS E MÉTODOS .....	23
3.2.1. Cultivo e amostragem .....	23
3.2.2. Análises químicas .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
3.2.3. Ressonância Magnética Nuclear .....	25
3.2.4. Análise multivariada.....	25
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	26
3.4. CONCLUSÃO .....	33
3.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	34
APÊNDICE.....	37



## ÍNDICE DE TABELAS

	Página
Tabela 1 - Caracteres físicos de árvores e frutos de variedades botânicas de <i>Hancornia speciosa</i> do Cerrado .....	11

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Introdução	
Figura 1 – Cromatogramas de íons totais dos compostos voláteis hidrolisados da mangaba em três diferentes estágios de maturação .....	8
Figura 2 – Análise do agrupamento UPMA para 14 acessos de mangaba, utilizando marcadores RAPD .....	12
Figura 3 - Agrupamento padrão de oito subpopulações de mangaba definidas pelo método UPGMA .....	12
Figura 4 – Análise de Cluster gerado (a) e Análise das Coordenadas Principais (b) dos 20 genótipos de mangaba .....	13
Figura 5 – Análise de Cluster da distância genética de Nei e método de UPGMA (a) e a relação das distâncias geográficas e de Nei (b) das populações de mangaba .....	14
Figura 6 - Dendrograma de 55 genótipos de uma população natural de mangabeiras gerado pelo método UGPMA, tendo como medida de dissimilaridade a distância euclidiana média padronizada .....	15
ANÁLISE QUIMIOTAXONÔMICA DE VARIEDADES DE <i>Hancornia speciosa</i> ATRAVÉS DA TÉCNICA DE RMN HR-MAS E QUIMIOMETRIA	
Figura 1 – Médias dos espectros de HR-MAS RMN <sup>1</sup> H das variedades de mangaba .....	26
Figura 2 – Gráfico de PCA com toda informação espectral em PC1xPC2 autoescalado com a tendência de discriminação conforme a variedade .....	27

Figura 3 – Gráfico de PCA e pesos em PC1xPC2 centrado na média e sinais responsáveis pelo maior peso na discriminação das amostras entre  $\delta$  9,14 e 9,74 ppm ..... 28

Figura 4–Gráficos de PCA da região entre  $\delta$  5,58 e 8,39 ppm com a tendência de discriminação por variedades e estados autoescalados ..... 29

Figura 5 –Ampliação das faixas espectrais presentes na região entre  $\delta$  5,58 e 8,39 ppm do espectro de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$  usando metanol deuterado ..... 30

Figura 6 – Dendograma resultado de agrupamento hierárquico das variedades de *Hancornia speciosa*, utilizando a região entre  $\delta$  5,58 e 8,39 ppm do espectro ..... 31

Figura 7 – Gráfico de PCA em PC1xPC2 autoescalado e ampliação das faixas espectrais presentes na região entre  $\delta$  4,29 e 5,58 ppm do espectro de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$ , usando metanol deuterado ..... 32

Figura 8 – Gráfico de PCA da região 5 em PC1xPC2 autoescalado com a distinção por variedades..... 33

## ÍNDICE DE APÊNDICES

	Página
APÊNDICE A .....	37
Figura 9A – Mapa do Brasil com a distribuição das populações onde os indivíduos foram coletados para a implantação da coleção de germoplasma da mangaba .....	37
Tabela 1A – Localidades, coordenadas geográficas, altitudes e variedades botânicas das matrizes de <i>Hancornia speciosa</i> amostradas no Cerrado .....	38
APÊNDICE B .....	39
Tabela 2A – Variedade, família, origem e local no bloco na Coleção de Germoplasma dos 70 indivíduos utilizados no presente trabalho .....	39

## LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES

RMN	Ressonância Magnética Nuclear
ESI-MS	Espetrometria de massa de ionização “electrospray”
GC-MS	Cromatografias gasosas e líquidas acopladas ao espectrômetro de massas
RMN de <sup>1</sup> H	Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio
RI	Importância Relativa
ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6- sulphonic acid)
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power
HCT-8	Carcinoma do cólon
MDA-MB-435	Melanoma
SF-295	Glioblastoma
MTT	Azul de tiazolilo
PGE2	Prostaglandina 2
PI3K	Fosfatidil-inositol 3-quinase
HPLC-DAD	Cromatografia líquida de alta precisão com série de detectores de diodo
UPGMA	Agrupamento hierárquico da distância média
RAPD	Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso
<sup>1</sup> H-HR-MAS-RMN	Ressonância Magnética Nuclear de Alta Resolução em Rotação no Ângulo Mágico
EA/UFG	Coleção de Germoplasma da Escola de Agronomia da Universidade Federal de Goiás
T	Tesla

MHz	Megahertz
CMPGpr	Sequência de pontos Carr–Purcell– Meiboom–Gill
TMS	Tetrametilsilano
PCA	Análise de Componentes Principais
HCA	Análise hierárquica de agrupamentos

## RESUMO

FURQUIM, LEONNARDO CRUVINEL. Instituto Federal Goiano – Câmpus Rio Verde, agosto de 2015. **Análise quimiotaxonômica de variedades de *Hancornia speciosa* através da técnica de RMN HR-MAS e quimiometria.**

Orientador: Carlos Frederico de Souza Castro

Coorientador: Igor Savioli Flores

O objetivo do presente trabalho é a avaliação quimiotaxonômica das variedades de *Hancornia speciosa* e sua diferenciação por Ressonância Magnética Nuclear de Alta Resolução em Rotação no Ângulo Mágico ( $^1\text{H}$ -HR-MAS-RMN) e técnicas de quimiometria. Foram utilizadas folhas de 70 árvores oriundas de um banco de germoplasma composto pelas variedades *gardneri*, *speciosa*, *cuyabensis* e *pubescens* dos estados de Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Tocantins, Bahia e Minas Gerais. Em um rotor de 50  $\mu\text{L}$ , foram empacotadas 12 mg de amostra pulverizada com 40  $\mu\text{L}$  de metanol deuterado. Após o empacotamento, até o início da aquisição, esperou-se um tempo de uma hora para encharcamento do solvente na amostra. Os espectros foram obtidos em triplicada e todos os parâmetros de análise foram otimizados, sendo os resultados convertidos para a construção da matriz de dados. Foram feitas análise de componentes principais (PCA) para discriminar as amostras e análise hierárquica de agrupamentos (HCA) para visualizar o grau de semelhança. Os resultados foram avaliados com seleção de variáveis e sem essa seleção, centrados na média ou autoescalados, e pela similaridade conforme variedade, localização e família. A variedade *speciosa* agrupa-se em relação às demais com diferença de ésteres na composição química de suas folhas. Na variedade *gardneri*, foram observadas variações em sinais de aldeídos e agrupamentos correspondentes aos locais de coleta. A variedade *pubescens* apresentou agrupamentos distintos em relação à *speciosa*, enquanto a *cuyabensis* apresentou agrupamentos em todas as variáveis analisadas.

**PALAVRAS-CHAVES:** *Hancornia speciosa*; quimiometria; quimiotaxonomia; metabolômica; HR-MAS-RMN.

## ABSTRACT

FURQUIM, LEONNARDO CRUVINEL. Instituto Federal Goiano – Câmpus Rio Verde, august of 2015. **Chemotaxonomic analysis of *Hancornia speciosa* by RMN HR-MAS technique and chemometric.**

Orientador: Carlos Frederico de Souza Castro

Coorientador: Igor Savioli Flores

The objective of this study is the chemotaxonomic evaluation of *Hancornia speciosa* varieties and its differentiation by High Resolution Magic Angle Spinning Nuclear Magnetic Resonance ( $^1\text{H}$  HR-MAS-NMR) and chemometric techniques. Leaves were used from 70 trees produced in a germoplasm bank comprises by *gardneri*, *speciosa*, *cuyabensis* and *pubescens* varieties from the states of Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Tocantins, Bahia and Minas Gerais. In a rotor with 50  $\mu\text{L}$ , 12 mg of sample sprayed with 40  $\mu\text{L}$  of deuterated methanol were packed. After packaging and until the start of the acquisition, a time of one hour was expected to waterlogging the solvent in the sample. The spectra were obtained in triplicate, all analysis parameters were optimized, and the results were converted to the construction of the data matrix. It was held on principal component analysis (PCA) to discriminate samples and hierarchical cluster analysis (HCA) to display the degree of similarity. The results were evaluated with selection of variables and without this selection, focusing on medium or autoscaled and the similarity as variety, location and family. The variety *speciosa* groups in relation to others with esters difference in the chemical composition of the leaves. In *gardneri* variety, it was observed variations in sign aldehydes and corresponding clusters to collection sites. The variety *pubescens* showed distinct clusters to *speciosa*, while *cuyabensis* presented groupings in all variables.

KEYWORDS: *Hancornia speciosa*; chemometric; chemotaxonomic; metabolomic; HR-MAS-NMR



## 1. INTRODUÇÃO

Os metabólitos, como substratos, produtos ou cofatores nas reações bioquímicas, desempenham um papel muito importante na conexão das diferentes vias metabólicas que operam dentro de uma célula viva. O nível dos metabólitos de uma célula ou tecido é determinado pela concentração e propriedades das enzimas, sendo, portanto, função de um complexo sistema regulatório operante dentro das células, como, por exemplo, na regulação da transcrição e da tradução, regulação das interações proteína-proteína e regulação alostérica das enzimas através das suas interações com os metabólitos.<sup>1</sup>

Uma classificação das diversas abordagens analíticas disponíveis para a análise de metabólitos foi feita dividindo-as em quatro grupos principais: (i) análise direcionada; (ii) perfil metabólico; (iii) metabolômica; e (iv) “fingerprinting” metabólico.<sup>2</sup> Considerando ser uma classificação confusa e subjetiva, principalmente em relação à abordagem metabolômica referindo-se a uma análise química na qual todos os metabólitos de um organismo seriam supostamente identificados e quantificados, o que é dificultado pela grande complexidade e dinamismo do metaboloma, do ponto de vista analítico, há agora basicamente duas abordagens principais para analisar o metaboloma: (a) análise direcionada (determinação de um grupo de metabólitos predefinidos) e (b) perfil metabólico (conjunto de todos os metabólitos ou produtos derivados dos mesmos).<sup>3</sup> Normalmente, no perfil metabólico, faz-se uso de separações cromatográficas bastante eficientes, mas, muitas vezes, boas resoluções são obtidas usando poderosos detectores químicos empregados para classificar as amostras por análises de dados multivariados ou quimiometria, como a ressonância magnética nuclear (RMN), a espectroscopia de infravermelho usando transformação de Fourier (FT-IR) ou a espectrometria de massa de ionização “electrospray” (ESI-MS).<sup>4</sup>

O termo metaboloma tem sido usado para descrever o perfil químico ou a impressão digital dos metabólitos em tecidos inteiros.<sup>5</sup> Para a obtenção dos perfis metabolômicos completos, é necessário utilizar um amplo espectro de técnicas analíticas. Comparado os estudos metabolômicos com as cromatografias gasosas e líquidas acopladas ao espectrômetro de massas (GC-MS), a ressonância magnética nuclear (RMN) tem algumas vantagens, como a rapidez, não seletividade, reprodutividade e estabilidade.<sup>6</sup> Além disso, informações estruturais detalhadas dos metabólitos, incluindo deslocamentos químicos e constantes de acoplamentos, podem

ser diretamente obtidas. Essas características fazem do RMN uma técnica ideal para uma ampla gama de metabólitos vegetais.<sup>7</sup>

A ressonância magnética nuclear de prótons (RMN de  $^1\text{H}$ ) é uma técnica de grande utilidade para a metabolômica, uma vez que, a princípio, qualquer produto constituído por compostos químicos que contenham prótons emite sinais que podem ser captados pela técnica.<sup>8</sup> Através da RMN de  $^1\text{H}$  de um material, é possível identificar a composição e as semelhanças e explorar a variabilidade natural deste material.<sup>2,9</sup>

Avanços recentes em instrumentação analítica combinados à bioinformática permitiram a detecção de um grande conjunto de compostos de baixo peso molecular em um caminho compreensível, sem a seleção prévia dos compostos alvo individuais.<sup>10</sup> Chamadas de abordagens metabolômicas e, em especial, de impressão digital metabólica, tais abordagens permitiram a comparação da composição global dos metabólitos de amostras biológicas a um nível padrão em resposta a uma doença ou perturbações ambientais ou genéticas.<sup>11,12</sup>

RMN baseia-se no princípio de que o núcleo de certos átomos, quando colocado em um campo magnético, é capaz de absorver a radiação eletromagnética a uma frequência característica, dependendo da posição de cada um dos núcleos da molécula. Esta radiação é emitida e detectada mais tarde, produzindo um espectro de ressonância dos núcleos que foram excitados. A grande quantidade de informação em um RMN de  $^1\text{H}$ , relacionado à diversidade de compostos de frequências de ressonância obtidos no espectro, torna necessário o uso de programas computacionais estatísticos na obtenção de resultados com a análise multivariada dos dados.<sup>13,14</sup>

Diversos estudos evidenciam a utilização da ressonância magnética nuclear em várias áreas de interesse ligadas à metabolômica das plantas. RMN de  $^1\text{H}$  provou ser uma técnica eficiente na diferenciação entre amostras provenientes de diferentes tipos de porta-enxerto e enxerto e pode, futuramente, ser utilizada para prever a produção de borracha através da análise do látex;<sup>14</sup> revelou as diferenças químicas entre o botão de flor e o ráquis pela composição dos metabólitos secundários de *Tussilago farfara*;<sup>7</sup> possibilitou a caracterização química do óleo essencial, evidenciando uma prevalência de sesquiterpenos e elucidação da estrutura dos principais compostos de *Croton lechleri*;<sup>15</sup> permitiu a análise de líquen e a distinção satisfatória entre as famílias, gêneros e espécies,<sup>16</sup> entre outros.

Em um estudo de sucos de maçãs, os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  puderam ser usados para distinguir entre três tipos de maçãs com uma taxa de sucesso de até

100%,<sup>17</sup> bem como as comparações entre ecótipos de *Arabidopsis thaliana*,<sup>18</sup> entre genótipos selvagens e transgênicos de tomate<sup>19,20</sup> e ervilha, tendo o material selvagem de ervilha mostrado maior variação em comparação com o transgênico.<sup>21</sup> Investigações do material de plantas transgênicas têm destacado o valor potencial do “fingerprinting” do RMN como uma ferramenta para investigar a equivalência substancial entre a colheita mecanizada e tradicional.<sup>8</sup>

A análise da composição metabólica de um tecido com RMN de <sup>1</sup>H apresenta diversas vantagens: somente o extrato bruto, portanto, é necessária uma preparação mínima da amostra; uma vasta gama de compostos pode ser analisada, fornecendo uma informação estrutural definitiva sem restrições para volatilidade, polaridade ou a presença de cromóforos; o método é não destrutivo, permitindo uma análise subsequente por outros métodos; e o método pode ser aplicado com pouco conhecimento prévio da composição da amostra.<sup>22</sup> A combinação da técnica com cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas mostrou claras diferenças entre os exsudatos de diferentes espécies e genótipos, e isto possibilitou monitorar as mudanças na composição dos exsudatos provocadas por deficiência de ferro.<sup>23</sup>

A mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) é uma frutífera tropical da família *Apocynaceae*, promissora para a exploração comercial. Embora a mangabeira seja uma planta que produza látex, seu fruto, que tem sabor e aroma característicos, é o principal produto explorado, especialmente pelas indústrias de pasta, suco e sorvete. O fruto tem forma e cor de bagas variáveis, geralmente elipsoidal ou em forma arredondada, exocarpo amarelado ou esverdeado, com vermelho ou nenhuma pigmentação, amarelo, macio, doce, carnudo viscoso, polpa ácida, pesando 25 g em média.<sup>24</sup> A composição química dos grupos da mangaba é de: 10,02% de carboidratos totais, 3,4% de fibras, 1,2% de proteínas, 2,37% de lipídios e 0,58% de cinzas, com um valor calórico de 66,21 Kcal/100 g de poupa fresca.<sup>25</sup>

Com exceção de algumas partes do Sergipe e Paraíba, não existem áreas de cultivo técnico da mangabeira. No nordeste brasileiro, onde esta planta é explorada através de extrativismo (exploração dos recursos naturais de frutas), essas espécies têm sofrido um processo acelerado de erosão genética devido ao aumento de construções nos litorais e monocultura de cana-de-açúcar nos planaltos. A mangabeira inicia sua produção entre o terceiro e o quinto ano após o plantio, e 50 anos depois, continua a oferecer de 10 a 12 toneladas por hectare, porém, cultivares selecionadas ainda não

estão disponíveis. A mangaba é usada regionalmente para doces, xarope, compotas de frutas, vinho, vinagre, bebidas e produção de geleia, mas, principalmente, para suco e sorvete.<sup>26</sup>

A árvore da mangabeira é utilizada na medicina popular para sopros, inflamação do útero, dores de estômago, gastrite, veias varicosas, hérnia (abdominal), úlcera, inflamação, cicatrização, câncer, mioma uterino e inflamação da pele, via ingestão oral do látex em água, cascas do caule imergidas em água ou sucos da fruta. A espécie apresentou um valor de “RI” (importância relativa, em inglês) de 1,63, medida quantitativa que mostra a importância da espécie com base no número de propriedades medicinais, com um valor máximo de 2,00, sendo o 3º maior valor entre 68 espécies tradicionalmente medicinais.<sup>27</sup> As espécies consideradas mais importantes para os usuários são aquelas que têm ação para combater o maior número de problemas de saúde dentro de uma comunidade, e a mangaba mostrou grande versatilidade e alto consenso de conhecimento e/ou uso entre os informantes.<sup>28</sup>

Em uma avaliação dos compostos bioativos e atividade antioxidante de 11 frutos brasileiros (ciruela, jaca, mangaba, muruci, mamão, abacaxi, sapoti, graviola, pinha, tamarindo e umbu), a mangaba apresentou  $98,8 \pm 5,6$  mg de Equivalentes de Ácido Gálico por 100 g de massa fresca, abaixo apenas do murici, em fenóis totais. Em relação ao conteúdo de ácido ascórbico, a mangaba apresentou o maior valor de  $96,3 \pm 1,7$  mg de AA por 100 g, sendo maior que a laranja fresca – um dos alimentos mais consumidos como fonte de vitamina C. De acordo com os trabalhos de atividade antioxidante equivalentes à Vitamina C, a mangaba apresentou  $162,57 \pm 2,02$  e  $118,78 \pm 9,43$  mg por 100 g, para os radicais ABTS e DPPH, respectivamente, estando abaixo apenas do murici novamente, indicando ser uma boa fonte de antioxidantes.<sup>29</sup>

Em um estudo com 18 frutos não tradicionais do Brasil, foram avaliados os compostos bioativos e a atividade antioxidante da *Hancornia speciosa* juntamente com açai, acerola, bacuri, cajá, camu-camu, carnaúba, gurguri, jaboticaba, jambolão, juçara, murici, murta, puçá-coroa-de-frade, puçá-preto, umbu e avaiá. A mangaba apresentou, em mg/100 g de matéria fresca,  $190 \pm 1,91$  de vitamina C (4º maior),  $0,4 \pm 0,11$  de antocianinas totais (3º menor),  $15 \pm 1,1$  de flavonoides amarelos (5º menor) e  $0,3 \pm 0,05$  de carotenoides totais, menor resultado entre as demais, e não foi determinada a presença de clorofila nos frutos.<sup>30</sup> Seguindo o modelo de classificação proposto para

polifenóis extraíveis, a mangaba apresentou  $169 \pm 21,5$  mg de ácido gálico por 100 g de matéria fresca, sendo considerada na categoria média de fenóis (devido à umidade elevada de 90%, em matéria seca a classificação é baixa). Em relação à concentração de extrato de mangaba necessária para reduzir em 50% a quantidade inicial do radical livre DPPH, o resultado obtido foi de  $3385 \pm 349$  (6º maior) e  $890 \pm 69,1$  g/g DPPH (8º maior), em matéria fresca e seca, respectivamente.<sup>31</sup> Utilizando outros métodos de atividade antioxidante: para o ABTS, foram obtidos  $14,6 \pm 1,8$  para amostra úmida (4º menor) e  $65,6 \pm 7,4$   $\mu\text{mol Trolox/g}$  para amostra seca (5º menor); para o FRAP em amostra úmida, o resultado foi de  $18,3 \pm 1,6$  (4º menor) e para amostra seca, de  $163 \pm 11,7$   $\mu\text{mol Fe}_2\text{SO}_4/\text{g}$  (6º menor); e em relação ao branqueamento do  $\beta$ -caroteno, só foi possível identificar portentagem de inibição de oxidação significativa na amostra seca, de  $34,7 \pm 12,3\%$ .<sup>32</sup>

Os compostos voláteis são responsáveis pelos aromas e sabores das frutas. Entretanto, a composição química, incluindo a distribuição dos compostos aromáticos, é dependente das espécies, condições ambientais e estágio de maturação dos frutos. Um estudo evidenciou que as frutas na fase inicial (imatura) apresentam monoterpenos oxigenados tais como (Z)-óxidolinalool, (E)-óxido linalool e linalol em uma maior percentagem relativa (51,5%); enquanto os ésteres (6,5%), álcoois (18,4%), aldeídos (5,9%) e cetonas (0,5%) foram detectados em baixas percentagens. No entanto, os ésteres (40,9%) (principalmente acetato de 3-metil-1-butanil e acetato de 3-metil-3-buten-1-il), os álcoois (18,4%) (principalmente 3-metil-3-buten-1-ol e 3-metil-1-butanol), aldeídos (10,2%) (como o furfural) e cetonas (9,7%) (como o 3-hidroxi-2-butanona) predominaram nos frutos, na fase final (madura), enquanto a percentagem de monoterpenos oxigenados foi muito reduzida (1,9%). Finalmente, o perfil volátil dos frutos na fase intermediária apresentou ésteres (33,8%), álcoois (16,4%), aldeídos (25,3%) e cetonas (3,0%), como os encontrados nos frutos maduros, mas numa percentagem intermediária. Da mesma forma, verificou-se uma percentagem intermediária de monoterpenos contendo oxigênio (13,4%), sendo observado em quantidades mais elevadas em frutos imaturos. O perfil químico dos frutos da mangaba em diferentes estágios de maturação pode ser visualizado nos cromatogramas presentes na Figura 1.<sup>33</sup>

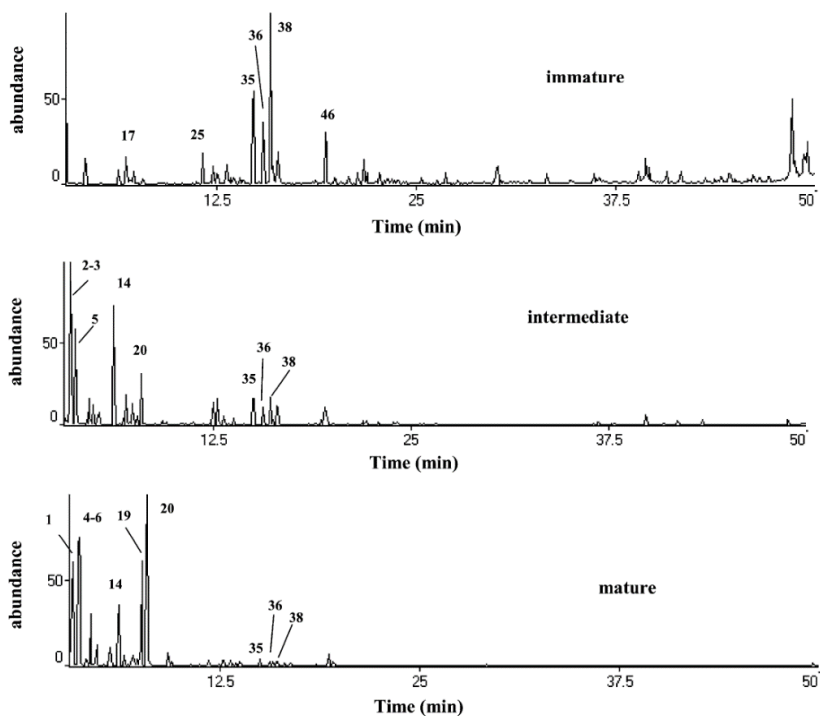


Figura 1 – Cromatogramas de íons totais dos compostos voláteis hidrolisados da manga em três diferentes estágios de maturação.<sup>33</sup>

Folhas, galhos, frutas e látex de manga foram coletados para avaliação do potencial de atividade citotóxica contra HCT-8 (carcinoma do cólon), MDA-MB-435 (melanoma), SF-295 (glioblastoma), e linhas de células de tumores humanos HL-60 (leucemia promielocítica), utilizando o teste de azul de tiazolilo (MTT). Os extratos não apresentaram nenhum efeito antiproliferativo expressivo, sendo que o melhor resultado foi para HCT-8, com uma porcentagem de inibição do crescimento celular de  $33,6 \pm 4,6\%$  para extratos de partições metanol/clorofórmio de frutos secos maduros.<sup>34</sup>

Outros autores têm resultados mais promissores para a manga: potencial atividade anti-hipertensiva de um extrato etanólico com inibição *in vitro* da enzima conversora da angiotensina, um componente do sistema de renina-angiotensina que desempenha um papel importante no mecanismo homeostático de mamíferos, que contribui para a manutenção da pressão arterial normal e para o equilíbrio eletrolítico, sendo envolvido na regulação e controle da pressão arterial.<sup>35</sup> As substâncias l-(+)-bornesitol, ácido quínico e rutina, como inibidores de NF-kappaB (fator de transcrição que promove a oncogênese e a resistência do câncer à terapia anti-neoplásica), foram

identificadas em mangaba, e os autores sugeriam ciclitóis, além de mio-inositol, como potencialmente úteis na condição de agentes quimiopreventivos.<sup>36</sup>

Devido ao interesse popular pelo uso do látex da mangaba, avaliaram-se os efeitos anti-inflamatórios e antinociceptivos desse material, obtido diretamente do tronco da árvore, tendo sido mostrada atividade anti-inflamatória significativa através da inibição da produção de óxido nítrico, de PGE2 (prostaglandina 2) e citoquinas.<sup>37</sup>

O extrato etanólico das folhas da mangaba promove efeitos vasorrelaxantes em aorta de ratos e mesentéricos arteriais pela produção endotelial de óxido nítrico (NO), via ativação da fosfatidil-inositol 3-quinase (PI3K). Os vasodilatadores são usados clinicamente para tratar a hipertensão, destacando o potencial de *Hancornia speciosa* como agente anti-hipertensivo.<sup>38</sup> A fração padronizada de folhas de mangaba reduziu a pressão sanguínea sistólica de ratos pela inibição da atividade plasmática da enzima conversora da angiotensina, diminuiu os níveis plasmáticos de angiotensina II e aumentou o nível plasmático de óxido nítrico, indicando a planta como potencial de uso para medicamentos anti-hipertensivos.<sup>39</sup>

Bornesitol é um ciclitol que contribui para os efeitos anti-hipertensivo e quimiopreventivo da mangaba. Desenvolveu-se um método para quantificação do bornesitol em extratos de *H. speciosa* por HPLC-DAD (cromatografia líquida de alta precisão com série de detectores de diodo), após derivatização química com cloreto de p-toluenosulfonil, usando pentaeritriol como padrão interno, mostrando concentrações entre  $5,77 \pm 0,09\%$  e  $8,87 \pm 0,14\%$  m/m.<sup>40</sup>

Os frutos de *H. speciosa* foram utilizados para avaliação das propriedades físico-químicas de filmes à base de amido, mangaba ou mangaba-amido, produzidos por processos de fundição, utilizando sucrose e propilenoglicol como plastificantes. As análises diferenciais térmicas, termogravimetria derivativa, espectroscopia no infravermelho, perfil mecânico e microscopia de varredura eletrônica mostraram que a forma misturada de mangaba-amido como material formador de filme apresentou melhores características térmicas e mecânicas que os filmes preparados com esses materiais separadamente e que as características da mangaba são predominantes no filme misturado.<sup>41</sup>

Foram avaliadas as progênies de mangaba da coleção de germoplasma da Universidade Federal de Goiás e estimados os parâmetros genéticos relacionados com

o desenvolvimento inicial a campo, com destaque para as variedades botânicas *cuyabensis* e *gardneri*, que apresentaram maior desenvolvimento em relação ao diâmetro do caule e altura das plantas.<sup>42</sup>

Uma caracterização de frutos e árvores de populações naturais de *Hancornia speciosa* Gomes, do Cerrado, foi feita, indicando que as populações e plantas de mangabeira apresentam grande variação na produção de frutos, com potencial para melhoramento e inserção em sistemas de cultivo. As matrizes de *H. speciosa* apresentam elevados níveis de variação fenotípica quanto a caracteres de frutos, sendo que a maioria dessa variação está entre populações. Há também uma grande variação fenotípica dentro das variedades botânicas: a variedade botânica *H. gardneri* apresenta porte mais alto que as demais; *Hancornia speciosa* var. *gardneri* e *H. speciosa* var. *pubescens* têm frutos maiores e mais pesados; nas variedades *gardneri* e *pubescens*, predominam frutos redondos e verde-claros, enquanto em *speciosa* e *cuyabensis*, predominam frutos de formato oblongo e coloração amarelo escura e verde-escura, respectivamente; as variedades *gardneri* e *pubescens* destacam-se como as de maior potencial para a utilização em cultivo com base em caracteres de tamanho e massa de frutos.<sup>43</sup> A Tabela 1 mostra os caracteres das variedades botânicas estudadas.

Tabela 1 - Caracteres físicos de árvores e frutos de variedades botânicas de *Hancorniaspeciosa* do Cerrado.<sup>43</sup>

Plantas		Árvores				Frutos						
		Altura (m)	Diâmetro (cm)	Número de frutos	Produção Estimada (kg)	Formato (%)		Cor (%)				
						Redondo	Oblongo	VE	VC	AC	AE	AL
Matrizes	Média	4,58	14,50	83,77	2,14	49,89	50,11	10,58	64,36	6,70	14,04	4,32
	Mínimo	1,50	5,73	2	0,04							
	Máximo	10,00	34,38	830	34,26							
<i>gardneri</i>	Média	5,65 a	17,59 a	76,98 a	2,52 a	60,17	39,83	12,45	85,48	2,07	-	-
	Mínimo	2,50	7,32	2	0,04							
	Máximo	10,00	34,38	830	34,26							
<i>pubescens</i>	Média	3,70 b	11,91 b	84,40 a	2,48 a	68,75	31,25	31,25	68,75	-	-	-
	Mínimo	2,00	7,96	7	0,32							
	Máximo	5,00	17,51	325	11,27							
<i>speciosa</i>	Média	3,50 b	10,86 b	110,60 a	1,67 a	28,80	71,20	3,20	8,00	20,80	52,00	16,00
	Mínimo	1,50	5,73	12	0,09							
	Máximo	6,00	20,69	416	7,89							
<i>cuyabensis</i>	Média	3,05 b	11,36 b	48,70 a	1,17 a	34,69	65,31	100	-	-	-	-
	Mínimo	2,00	6,05	4	0,04							
	Máximo	5,00	16,23	238	4,41							
CV%		41,57	40,51	147,87	186,65							

VE: verde-escuro; VC: verde-claro; AC: amarelo-claro; AE: amarelo-escuro; AL: alaranjado; Números seguidos de mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo Teste de Tukey, a 5% de probabilidade.



Um estudo comparativo sobre as propriedades tecnológicas do látex e da borracha natural de mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) e seringueira (*Hevea brasiliensis*) mostrou que o tamanho e as distribuições das partículas de borracha de látex natural foram bastante semelhantes, com um diâmetro médio de cerca de 1  $\mu\text{m}$ . Peso molecular, plasticidade de Wallace e os valores da viscosidade de Mooney foram aproximadamente os mesmos para ambas as borrachas. Picos característicos de borracha natural, tanto para a mangaba quanto para a seringueira, foram observados pela Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier. As diferenças medidas nas propriedades tecnológicas incluem valores mais baixos de *Hancornia* para o conteúdo de borracha seca para, % de cinzas, % de nitrogênio e índice de retenção de plasticidade, porém, valores maiores para o extrato de acetona. Curiosamente, o nitrogênio e o teor de proteína foram muito menores em *Hancornia*, sugerindo que pode ter importantes aplicações em usos de borracha não alérgicos. A borracha produzida pelo látex natural da mangaba contém um composto com elevado peso molecular (1,4-cis-poli-isopreno) com muitas propriedades tecnológicas equivalentes às da borracha natural de *Hevea*, sugerindo ser adequado para uso em aplicações industriais.<sup>44</sup>

Devido à grande redução na área original dos ecossistemas em que a mangaba ocorre, há a necessidade de adequá-la aos diferentes sistemas de produção, sendo necessários esforços dos programas de melhoramento genético para o desenvolvimento de genótipos superiores. Para alcançar esse objetivo, é imprescindível a existência de variabilidade genética no germoplasma disponível para o melhoramento. A partir dessa variabilidade, é possível programar a seleção para as mais variadas características, buscando o desenvolvimento de linhagens para a formação de híbridos ou a obtenção de variedades. Os autores caracterizaram a diversidade genética existente no Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Tabuleiros Costeiros, utilizando marcadores RAPD. A utilização de 12 iniciadores de síntese permitiu a obtenção de 106 bandas, sendo 92 delas polimórficas (86,79%). Foram detectados diferentes coeficientes de similaridade, e a média entre eles foi de 0,40 ( $\pm 0,04$ ), sendo que a amplitude genética variou entre 0,08 ( $\pm 0,04$ ) e 0,60 ( $\pm 0,05$ ). Os indivíduos M1 (Pará) e M14 (Bahia) foram os mais diferentes na população, e os pares de indivíduos M9 e M10 (Bahia) foram os mais semelhantes. Três pares de indivíduos foram identificados como mais divergentes (M2, M4 e M14) e poderão servir de base para o desenvolvimento de estratégias de seleção ou melhoria da cultura (Figura 2).<sup>45</sup>

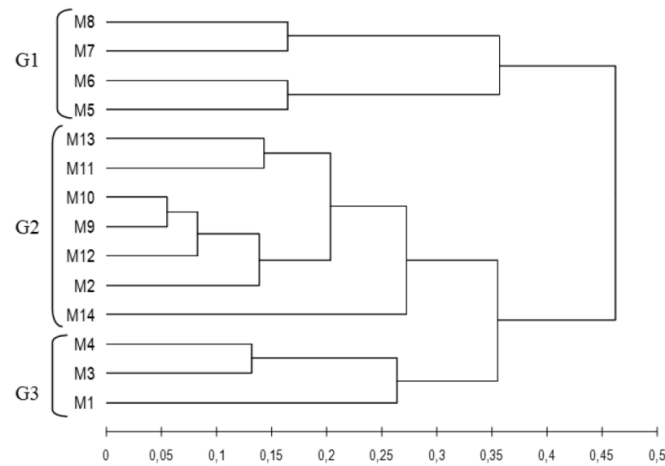


Figura 2 – Análise do agrupamento UPGMA para 14 acessos de mangaba, utilizando marcadores RAPD.<sup>45</sup>

Um estudo de caracterização da estrutura genética de subpopulações de mangabeira no Cerrado do Brasil Central foi feito utilizando marcadores RAPD em oito populações encontrados em Goiás, Bahia e Minas Gerais. A variância genética foi feita pela análise na variação dos dados moleculares (Figura 3). Uma proporção significativa de variância genética foi encontrada entre as populações, correspondendo a 19,6% da variação total. A correlação entre as matrizes de distâncias geográficas e genéticas não foi significativa, indicando que não há estrutura espacial da variabilidade genética entre as populações. A elevada variabilidade sugere que uma estratégia para conservação *in situ* e *ex-situ* deve ser baseada na amostragem de um grande número de populações locais.<sup>46</sup>

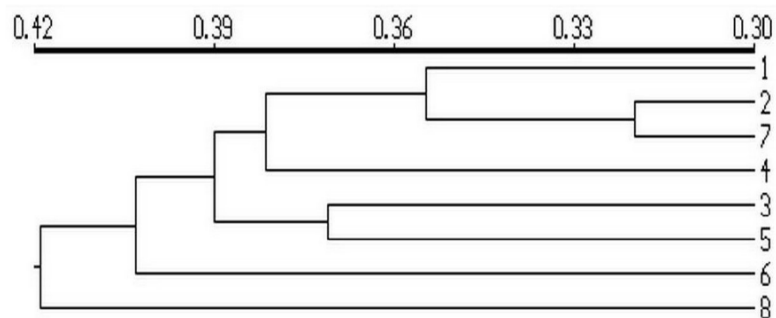


Figura 3 - Agrupamento padrão de oito subpopulações de mangaba definidas pelo método UPGMA.<sup>46</sup>

Vinte genótipos pertencentes a uma população natural de mangaba localizada na cidade de Itaporanga D'Ajuda (Estado de Sergipe - Brasil) foram submetidos à análise

de marcadores RAPD. Parâmetros de polimorfismo, estrutura e caracterização da diversidade genética das plantas foram determinados. Sessenta fragmentos de DNA foram gerados utilizando os 10 primers, dos quais 85% eram polimórficos. Os resultados mostram valor quantitativo da diversidade genética de 0,35 e índice de Shannon de 0,46 na população. A similaridade entre os genótipos, segundo o coeficiente de Jaccard, variou de 0,36 para 0,87. Usando análise de UPGMA, foi possível identificar possíveis três genótipos geneticamente diferentes. O PCoA formou quatro grupos, com três genótipos isolados de outros.<sup>47</sup> Houve variação genética entre os indivíduos, tendo sido possível identificar os genótipos mais divergentes nas amostras, conforme pode ser visualizado na Figura 4.

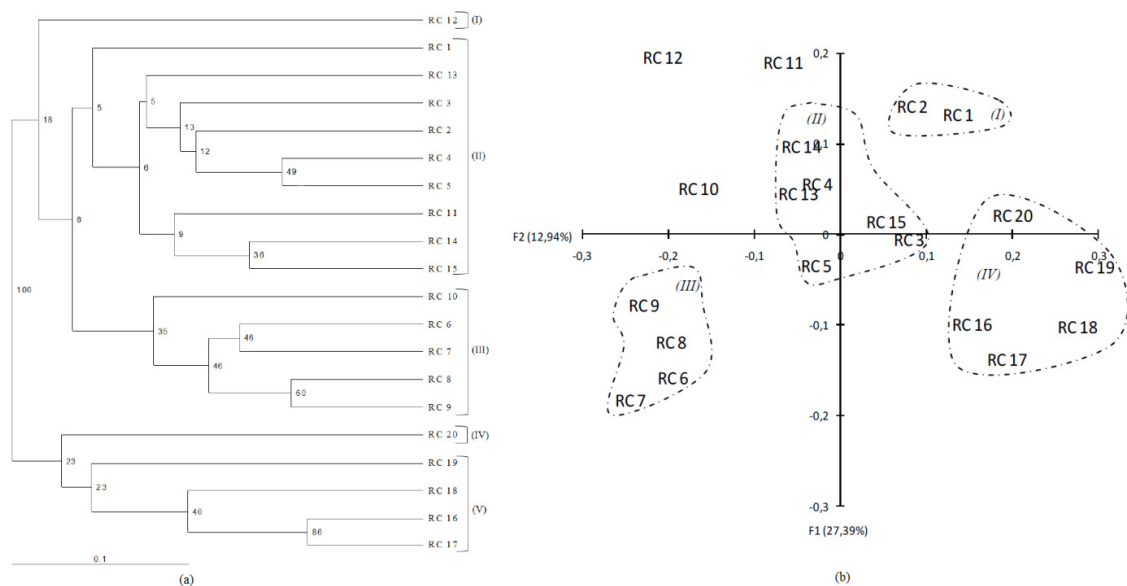


Figura 4 – Análise de Cluster gerado (a) e Análise das Coordenadas Principais (b) dos 20 genótipos de mangaba.<sup>47</sup>

Mangabeiras do nordeste brasileiro foram estudadas para avaliar a diversidade e a estrutura genética das populações naturais encontradas em Pernambuco e Alagoas, utilizando 11 locos isoenzimáticos, sendo avaliados 164 indivíduos. Os resultados mostraram um alto nível de diversidade genética dentro da espécie, sendo verificado que a maior parte da variabilidade genética está dentro das populações, com pequena diferenciação entre elas. A endogamia dentro das populações e entre elas foi baixa, variando de 2,20 a 13,18, valores considerados suficientes para evitar os efeitos da deriva genética e a diferenciação genética entre as populações. Os baixos índices de

fixação observados em seis populações mostram ausência de inbreeding (cruzamento com consanguinidade) e representa um resultado típico de uma espécie alógama. As análises multivariadas indicam que há relação entre distância genética e espaço geográfico (Figura 5).<sup>48</sup>

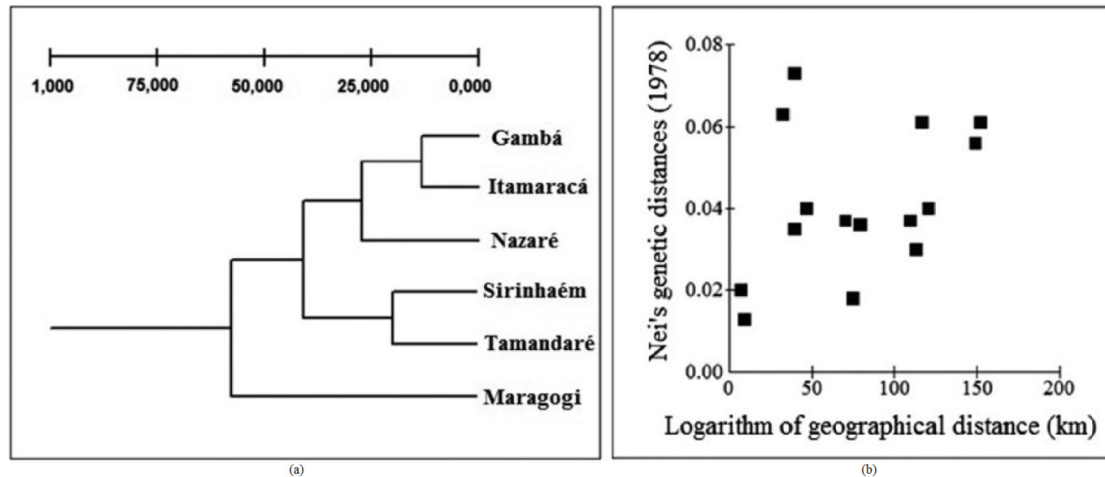


Figura 5 – Análise de Cluster da distância genética de Nei e método de UPGMA (a) e a relação das distâncias geográficas e de Nei (b) das populações de mangaba.<sup>48</sup>

Um trabalho semelhante foi desenvolvido com uma caracterização morfológica e uma estimativa da variabilidade fenotípica em uma população de mangaba em Tocantins. Observou-se considerável variabilidade na população em relação à altura da ramificação principal, volume de copa, massa de sementes, massa do fruto, massa da polpa e número de sementes. No dendrograma gerado pelo método UPGMA, considerando como ponto de corte as médias das distâncias da matriz de agrupamento(1,33), percebe-se a formação de cinco grupos maiores e alguns subgrupos (Figura 6). Segundo o autor, essa variabilidade ocorreu provavelmente pelo fato de a mangabeira ser uma espécie alógama, de flor hermafrodita e autoincompatível, portanto, de fecundação cruzada, e também por se tratar de uma população natural com pouca influência antrópica e aparentemente sem problemas de erosão genética. A população tem variabilidade suficiente para ser utilizada em programas de melhoramento genético e potencial para ser utilizada em atividades de extrativismo e agroindústria.<sup>49</sup>



4 - Villas-Bôas, S. G.; Mas, S.; Åkesson, M.; Smedsgaard, J.; Nielsen, J. Mass spectrometry in metabolome analysis. *Mass Spectrometry Reviews* **2005b**, 24, 613.

5 - Kim, H. K.; Choi, Y. H.; Erkelens, C.; Lefeber, A. W. M.; Verpoorte, R. Metabolic fingerprinting of Ephedra species using  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy and principal component analysis. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **2005**, 53, 105.

6 - Kooy, F. V. D.; Maltese, F.; Choi, Y. H.; Kim, H. K.; Verpoorte, R. Quality control of herbal material and phytopharmaceuticals with MS and NMR based on metabolic fingerprinting. *Planta Medica* **2009**, 75, 763.

7 - Li, Z.; Zhi, H.; Xue, S.; Sun, H.; Zhang, F.; Jia, J.; Xing, J.; Zhang, L.; Quin, X. Metabolomic profiling of the flower bud and rachis of *Tussilago farfara* with antitussive and expectorant effects on mice. *Journal of Ethnopharmacology* **2012**, 140, 83.

8 - Krishnan, P.; Kruger, N. J.; Ratcliffe, R. G. Metabolite fingerprinting and profiling in plants using NMR. *Journal of Experimental Botany* **2005**, 56, 410.

9 - Darbello, D. M.; Filho, O. G.; Zeri, A. C. M. *Resumos da VII Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil*. Araxá – MG, 2011.

10 - Riedl, J.; Kluender, C.; Sans-Piché, F.; Heilmeyer, H.; Altenburger, R.; Schmitt-Jansen, M. Spatial and temporal variation in metabolic fingerprints of field-growing *Myriophyllum spicatum*. *Aquatic Botany* **2012**, 102, 34.

11 - Dettmer, K.; Aronov, P. A.; Hammock, B. D. Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrometry Reviews* **2007**, 26, 51.

12 - Allwood, J. W.; Ellis, D. I.; Goodacre, R. Metabolomic technologies and their application to the study of plants and plant–host interactions. *Physiologia Plantarum* **2008**, 132, 117.

13 - Jacobsen N. E. *NMR spectroscopy explained: simplified theory, applications and examples for organic chemistry and structural biology*. John Wiley & Sons: Nova Jersey, 2007.

14 - Nascimento, E. S. P.; Oliveira, C. R.; Gonçalves, P. S.; Costa, R. B.; Moreno, R. M. B.; Mattoso, L. H. C.; Ferreira, A. G. Effect of rootstock on the scion of *Hevea brasiliensis* through metabolic analysis of latex samples by  $^1\text{H}$  NMR. *Crop Breed. Appl. Biotechnol.* **2011**, 11.

15 - Rossi, D.; Guerrini, A.; Maietti, S.; Bruni, R.; Paganetto, G. Poli, F.; Scalvenzi, L.; Radice, M.; Saro, K. Sacchetti, G. Chemical fingerprinting and bioactivity of Amazonian Ecuador *Croton lechleri* Müll. Arg. (Euphorbiaceae) stem bark essential oil: A new functional food ingredient? *Food Chemistry* **2011**, 126, 837.

16 - Alcantara, G. B.; Honda, N. K.; Ferrera, M. M. C.; Ferreira, A. G. Chemometric analysis applied in  $^1\text{H}$  HR-MAS NMR and FT-IR data for chemotaxonomic distinction of intact lichen samples. *Analytica Chimica Acta* **2007**, 595, 3.

17 - Belton P. S.; Colquhoun I. J.; Kemsley E. K.; Delgadillo I.; Roma P.; Dennis M. J.; Sharman M.; Holmes E.; Nicholson J. K.; Spraul M. Application of chemometrics to the  $^1\text{H}$  NMR spectra of apple juices: discrimination between apple varieties. *Food Chemistry* **1998**, 61, 207.

18 - Ward J. L.; Harris C.; Lewis J.; Beale M. H. Assessment of  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy and multivariate analysis as a technique for metabolite fingerprinting of *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* **2003**, 6, 62.

19 - Noteborn H. P. J. M.; Lommen A.; Van Der Jagt R. C.; Weseman J. M. Chemical fingerprinting for the evaluation of unintended secondary metabolic changes in transgenic food crops. *Journal of Biotechnology* **2000**, 77, 103.

20 - Le Gall, G.; Colquhoun I. J.; Davis, A. L.; Collins, G. J.; Verhoeven, M. E. Metabolite profiling of tomato (*Lycopersicon esculentum*) using  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy as a tool to detect potential unintended effects following a genetic modification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2003**, 51, 2447.

21 - Charlton A.; Allnut T.; Holmes S.; Chisholm J.; Bean S.; Ellis N.; Mullineaux P.; Oehlschlager S. NMR profiling of transgenic peas. *Plant Biotechnology Journal* **2004**, 2, 27.

22 - Fan, T. W. M. Metabolite profiling by one- and two-dimensional NMR analysis of complex mixtures. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **1996**, 28, 161.

23 - Fan, T. W. M.; Lane, A. N.; Shenker, M.; Bartley J. P.; Crowley D.; Higashi R. M. Comprehensive chemical profiling of gramineous plant root exudates using high-resolution NMR and MS. *Phytochemistry* **2001**, 57, 209.

24 - Silva Junior, J. F. A cultura da mangaba. *Revista Brasileira de Fruticultura* **2004**, 26, 1.

25 - Silva, J. A.; Silva, D. B.; Junqueira, N. T. V.; Andrade, L. R. M. *Frutas nativas dos cerrados*. Embrapa: Brasília, 1994.

26 - Clerici, M. T. P. S.; Carvalho-Silva, L. B.; Nutricional bioactive compounds and technological aspects of minor fruits grown in Brazil. *Food Research International* **2011**, 44, 1658.

27 - Bennett, B.C.; Prance, G.T., Introduced plants in the indigenous pharmacopoeia of Northern South America. *Economic Botany* **2000**, 54, 90.

28 - Ribeiro, D. A.; Oliveira, L. G. S.; Macêdo, D. G.; Menezes, I. R. A.; Costa, J. G. M.; Silva, M. A. P.; Lacerda, S. R.; Souza, M. M. A. Promising medicinal plants for bioprospection in a Cerrado área of Chapada do Araripe, Northeastern Brazil. *Journal of Ethnopharmacology* **2014**, 155, 1522.



29 - Almeida, M. M. B.; Souza, P. H. M.; Arriaga, Â. M. C.; Prado, G. M.; Magalhães, C. E. C.; Maia, G. A.; Lemos, T. L. G. Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. *Food research International* **2011**, 44, 2155.

30 - Rufino, M. S. M.; Alves, R. E.; Brito, E. S.; Pérez-Jiménez, J.; Saura-Calixto, F.; Mancini-Filho, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. *Food Chemistry* **2010**, 121, 996.

31 - Vasco, C.; Ruales, J.; Kamal-Eldin, A. Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. *Food Chemistry* **2008**, 111, 4, 816.

32 - Hassimotto, N. M. A.; Genovese, I. S.; Lajolo, F. M. Antioxidant activity of dietary fruits, vegetables, and commercial frozen fruit pulps. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2005**, 53, 2928.

33 - Sampaio, T. S.; Nogueira, P. C. L. Volatile components of mangaba fruit (*Hancornia speciosa* Gomes) at three stages of maturity. *Food Chemistry* **2006**, 95, 606.

34 - Ribeiro, S. S.; Jesus, A. M.; Anjos, C. S.; Silva, T. B.; Santos, A. D. C.; Jesus, J. R.; Andrade, M. S.; Sampaio, T. S.; Gomes, W. F.; Alves, P. B.; Carvalho, A. A.; Pessoa, C.; Moraes, M. O.; Pinheiro, M. L. B.; Prata, A. P. N.; Blank, A. F.; Silva-Mann, R.; Moraes, V. R. S.; Costa, E. V.; Nogueira, P. C. L.; Bezerra, D. P. Evaluation of the Cytotoxic Activity of Some Brazilian Medicinal Plants. *Planta Med* **2012**, 78, 1601.

35 - Serra, C.P.; Cortes, S.F.; Lombardid, J.A.; Oliveira, A.B.; Braga, F.C. Validation of a colorimetric assay for the in vitro screening of inhibitors of angiotensin-converting enzyme (ACE) from plant extracts. *Phytomedicine* **2005**, 12, 424.

36 - Endringer, D. C.; Pezzuto J. M.; Braga, F. C. NF-kappaB inhibitory activity of cyclitols isolated from *Hancornia speciosa*. *Phytomedicine* **2009**, 16, 1064.

37 - Marinho, D. G.; Alvianob, D. S.; Matheusa, M. E.; Alvianob, C. S.; Fernandes, P. D. The latex obtained from *Hancornia speciosa* Gomes possesses anti-inflammatory activity. *Journal of Ethnopharmacology* **2011**, 135, 530.

38 - Ferreira, H.C.; Serra, C.P.; Lemos, V.S.; Braga, F.C.; Cortes, S.F. Nitric oxide-dependent vasodilatation by ethanolic extract of *Hancornia speciosa* via phosphatidyl-inositol 3-kinase. *Journal of Ethnopharmacology* **2007**, 109, 161.

39 - Silva, G. C.; Braga, F. C.; Lima, M. P.; Pesquero, J. L.; Lemos, V. S.; Cortes, S. F. *Hancornia speciosa* Gomes induces hypotensive effect through inhibition of ACE and increase on NO. *Journal of Ethnopharmacology* **2011**, 137, 709.

40 - Pereira, A. B. D.; Veríssimo, T. M.; Oliveira, M. A.; Araujo, I. A.; Alves, R. J.; Braga, F. C. Development and validation of an HPLC-DAD method for quantification of bornesitol in extracts from *Hancornia speciosa* leaves after derivatization with p-toluenesulfonyl chloride. *Journal of Chromatography* **2012**, 887,137.

41 - Melo, M. S.; Santana, R. F.; Batista, C. M.; Pinheiro, M. S.; Albuquerque Jr., R. L. C.; Padilha, F. F.; Lima, Á. S.; Nunes, P. S.; Costa, L. P.; Araújo, A. A. S.; Cardoso, J. C. Thermal characterization of mangaba-based films. *J. Therm. Anal Calorim.*, **2013**, 111, 2097.

42 - Ganga, R. M. D.; Chaves, L. J.; Naves, R. V. Parâmetros genéticos em progênies de *Hancornia speciosa* Gomes do Cerrado. *Sci. For.* **2009**, 84, 395.

43 - Ganga, R. M. D.; Ferreira, G. A.; Chaves, L. J.; Naves, R. V.; Nascimento, J. L. Caracterização de frutos e árvores de populações naturais de *Hancornia speciosa* Gomes do Cerrado. *Rev. Bras. Frutic.* **2010**, 32, 101.

44 - Malmonge, J. A.; Camillo, E. C.; Moreno, R. M. B.; Mattoso, L. H. C.; McMahan, C. M. Comparative study on the technological properties of latex and natural rubber from *Hancornia speciosa* Gomes and *Hevea brasiliensis*. *Journal of Applied Polymer Science* **2009**, 111, 2986.

45 - Silva, A. V. C.; Santos, A. R. F.; Wickert, E.; Silva Júnior, J. F.; Costa, T. S. Divergência genética entre acessos de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). *Revista Brasileira de Ciências Agrárias* **2011**, 4, 572.

46 - Moura, N. F.; Chaves, L. J.; Venkovsky, R.; Naves, R. V.; Aguiar, A. V.; Moura, M. F. Genetic structure of mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) populations in the Cerrado region of Central Brazil. *Biosci. J.* **2011**, 3, 473.

47- Silva; A. V. C.; Rabbani, A. R. C.; Sena-Filho, J. G.; Almeida, C. S.; Feitosa, R. B. Genetic diversity analysis of mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes), an exotic brazilian tropical species. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* **2012**, 15, 217.

48 - Martins, G. V.; Martins, L. S. S.; Veasey, E. A.; Lederman, I. E.; Silva, E. F. Diversity and genetic structure in natural populations of *Hancornia speciosa* var. *speciosa* Gomes in northerastern Brazil. *Rev. Bras. Frutic.* **2012**, 4, 1143.

49 - Freitas, M. K. C.; Coimbra, R. R.; Aguiar, G. B.; Aguiar, C. B. N.; Chagas, D. B.; Ferreira, W. M.; Oliveira, R. J Variabilidade fenotípica e caracterização morfológica de uma população natural de *Hancornia speciosa* Gomes. *Biosci. J.* **2012**, 5, 833.

## 2. OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho é a avaliação quimiotaxonômica das variedades de mangaba (*Hancornia speciosa*) e sua diferenciação por Ressonância Magnética Nuclear de Alta Resolução em Rotação no Ângulo Mágico ( $^1\text{H}$ -HR-MAS-RMN), utilizando folhas de plantas cultivadas sob mesmas condições climáticas e técnicas de quimiometria, além de verificar a influência da localização de coleta na composição química das variedades avaliadas.

### 3. ANÁLISE QUIMIOTAXONÔMICA DE VARIEDADES DE *Hancornia speciosa* ATRAVÉS DA TÉCNICA DE RMN HR-MAS E QUIMIOMETRIA

#### 3.1. INTRODUÇÃO

A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é uma ferramenta poderosa e versátil na elucidação de compostos orgânicos, identificação de constituintes, reconhecimento de padrões e estudo metabólico de variabilidade natural de materiais vegetais. Além disso, o desenvolvimento de sondas de alta resolução com giro no ângulo mágico (HR-MAS) permitiu a análise em materiais próximos da situação *in natura*. Sua versatilidade se configura no desenvolvimento de diferentes sequências de pulso e análise de material em diferentes estados físicos. Medidas podem ocorrer em amostras de natureza heterogênea tal como tecidos vegetais sem a necessidade de nenhum pré-tratamento de extração e separação, e os sinais de várias frações (polares e apolares) são detectadas simultaneamente de forma não destrutiva.<sup>1</sup>

Há relato de diversos trabalhos que utilizaram essa técnica, como na diferenciação entre cidra e limão;<sup>2</sup> variação no conteúdo lipídico durante o enchimento do grão de cevada;<sup>3</sup> distinção entre amostras intactas de liquens;<sup>4</sup> respostas metabólicas em coração de moluscos expostos a herbicidas;<sup>5</sup> perfil metabólico de tomate e diferenciação de tecidos e amadurecimento de frutos de tomate;<sup>6</sup> rastreabilidade do alho italiano;<sup>7</sup> caracterização das variedades de tomate<sup>8</sup>; e comparação da qualidade metabólica de ginseng.<sup>9</sup>

A mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) é uma frutífera tropical da família *Apocynaceae*, promissora para exploração comercial. Embora a mangabeira seja uma planta que produz látex, seu fruto, que tem sabor e aroma característicos, é o principal produto explorado, especialmente pelas indústrias de pasta, suco e sorvete. A mangaba tem o terceiro maior valor de importância medicinal entre sessenta e oito frutas, sendo utilizada na medicina popular para sopros, inflamação do útero, dores de estômago, gastrite, veias varicosas, hérnia (abdominal), úlcera, inflamação, cicatrização, câncer, mioma uterino e inflamação da pele, via ingestão oral do látex em água, cascas do caule imergidas em água ou sucos da fruta.<sup>10</sup>

Diversos autores comprovaram as utilidades da mangaba na ciência: altos valores de fenóis totais, ácido ascórbico e atividade antioxidante;<sup>11</sup> atividade anti-

hipertensiva;<sup>12-14</sup> ação quimiopreventiva;<sup>15</sup> atividade anti-inflamatória<sup>16</sup>; e boa qualidade em filmes de plástico.<sup>17</sup> A ampla distribuição geográfica e de variedades existentes promove o interesse em identificar as características da mangaba, que são responsáveis pelas diferenciações morfológicas, químicas e genéticas.

Uma caracterização de frutos e árvores de populações naturais de mangaba do cerrado indicou que as populações e plantas de mangabeira apresentam grande variação na produção de frutos, com potencial para melhoramento e inserção em sistemas de cultivo. As matrizes de *H. speciosa* apresentam elevados níveis de variação fenotípica quanto a caracteres de frutos, sendo que a maioria dessa variação está entre populações, o que dificulta a identificação da variedade. Há também uma grande variação fenotípica dentro das variedades botânicas: a variedade botânica *gardneri* apresenta porte mais alto que as demais; *Hancornia speciosa* var. *gardneri* e *H. speciosa* var. *pubescens* têm frutos maiores e mais pesados; nas variedades *gardneri* e *pubescens*, predominam frutos redondos e verde-claros, enquanto em *speciosa* e *cuyabensis*, predominam frutos de formato oblongo e coloração amarelo escura e verde-escura, respectivamente; as variedades *gardneri* e *pubescens* destacam-se como as de maior potencial para a utilização em cultivo com base em caracteres de tamanho e massa de frutos.<sup>18</sup>

Considerando o potencial de utilização da técnica de <sup>1</sup>H-HR-MAS-RMN e a alta variação fenotípica entre as variedades de mangaba, o objetivo do presente trabalho é a avaliação quimiotaxonômica das variedades de *Hancornia speciosa* e sua diferenciação por Ressonância Magnética Nuclear de Alta Resolução em Rotação no Ângulo Mágico (<sup>1</sup>H-HR-MAS-RMN), utilizando folhas de plantas cultivadas sob mesmas condições climáticas e técnicas de quimiometria, além de verificar a influência da localização de coleta na composição química das variedades avaliadas.

## 3.2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.2.1. Cultivo e amostragem

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Química Tecnológica do Instituto Federal Goiano – Câmpus Rio Verde, em parceria com a Escola de Agronomia (EA) e o Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear da Universidade Federal de Goiás (UFG).

Em um projeto já implantado, as populações de *Hancornia speciosa* foram amostradas no Cerrado em outubro e novembro de 2004, abrangendo os estados de Goiás, Tocantins, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Bahia. As árvores matrizes foram encontradas nos respectivos locais de ocorrência por amostragem daquelas com bom aspecto fitossanitário e que dispunham de frutos para a coleta. A alocação das plantas dentro de uma mesma população considerou a distância máxima de 30 km entre elas.

Das plantas matrizes, foram retiradas amostras de até doze frutos maduros, coletados no chão ou na planta (desde que apresentassem sinais de maturação) e acondicionados em caixas de ovos para não se danificarem durante o transporte. Após o amadurecimento dos frutos colhidos, as sementes foram retidas manualmente para o plantio, e para separar as sementes da polpa, foram utilizadas peneira e água corrente. As sementes foram plantadas em tubetes contendo substrato pronto Quali Fibra (Chão Preto Misturadora Agrícola) em estufa telada.

A coleção de germoplasma de *Hancornia speciosa* foi implantada na Escola de Agronomia da Universidade Federal de Goiás em dezembro de 2005, utilizando mudas produzidas de sementes coletadas, sendo constituída por progênies de polinização aberta, originadas das plantas amostradas em 32 populações naturais.

Para o presente trabalho, foram utilizados 70 indivíduos de quatro variedades botânicas: 12 de *Hancornia speciosa* var. *pubescens*, 30 de *H. Speciosa* var. *gardneri*, 7 de *H. Speciosa* var. *speciosa* e 18 de *H. Speciosa* var. *cuyabensis* e 3 indefinidas. A coleção está localizada no município de Goiânia, GO (16° 35'12"S; 49° 21'14"W; 730 m de altitude), e os indivíduos da espécie estão distribuídos conforme delineamento experimental de blocos completos casualizados, com 57 tratamentos (progênies), quatro repetições e uma planta por parcela, no espaçamento de 5x6 m.

### 3.2.2. Preparo das amostras

Para a avaliação da quimiotaxonomia da *Hancornia speciosa*, foram utilizadas folhas de árvores oriundas da Coleção de Germoplasma da EA/UFG. As folhas foram armazenadas em temperatura ambiente por três dias para secagem, trituradas em moinho de facas, padronizadas em peneira de um mm e armazenadas em sacos plásticos para posterior análise.

### 3.2.3. Ressonância Magnética Nuclear

As análises de ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$  com rotação no ângulo mágico (RMNHR-MAS de  $^1\text{H}$ ) foram feitas com um espectrômetro Bruker Avance III 500 de 11.75 T (500,13 MHz para o isótopo de hidrogênio), no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás – Câmpus Goiânia.

Utilizando a técnica RMNHR-MAS de  $^1\text{H}$  e sonda de 4mm-HR-MAS, reduziu-se o número de pré-tratamentos da amostra, utilizando material sólido para análise. A amostra praticamente intacta é adicionada ao rotor, onde é suspensa em solvente deuterado adequado para dar mobilidade molecular. As amostras foram maceradas com  $\text{N}_2$  e, em um rotor de 50 $\mu\text{L}$ , foram empacotados 12 mg de amostra pulverizada com 40  $\mu\text{L}$  de metanol deuterado. Após o empacotamento até o início da aquisição, esperou-se um tempo de uma hora para o encharcamento do solvente na amostra.

Foram feitas a otimização dos parâmetros de análise bem como a sequência de supressão do sinal da água mais eficiente para este tipo de amostra: noesygppr1d, cpmgpr1d ou zg30; relação amostra solvente deuterado; parâmetros e aquisição e processamento; relação sinal-ruído; tempo de relaxação longitudinal – T1; parâmetros da sequência CMPGpr bem como o número de ciclos e tempo de mistura; tempo de aquisição; janela espectral e número de repetições.

Os espectros, obtidos em triplicata, foram processados e exportados do programa TopSpin™, versão 3.1. O processamento usado consistiu na correção nas distorções de fase e linha de base de forma manual: referenciou-se no 0,0 ppm pelo sinal do padrão interno tetrametilsilano (TMS) e usou-se da multiplicação exponencial *line-broadening* com um valor de 0,3.

### 3.2.4. Análise multivariada

Os dados foram convertidos para o aplicativo Origin® (versão OriginPro 8), onde foram construídas as matrizes de dados. Estas matrizes foram exportadas para o programa Matlab (versão R2014a), tendo sido experimentados diferentes pré-tratamentos. Neste programa, foi feita a análise de componentes principais (PCA) com intuito de discriminar as amostras de mangaba de diferentes variedades. Também se

usou a análise hierárquica de agrupamentos (HCA) para visualizar o grau de semelhança entre as amostras das diferentes variedades, pelo programa IBM SPSS 20,0.

Foram avaliados os dados espectrais sem e com a seleção de variáveis, baseando-se na estimativa de grupos encontrados em cada região, no propósito de facilitar a compreensão dos agrupamentos e identificar os sinais responsáveis pelos resultados. Assim, os resultados foram avaliados com a seleção de variáveis e sem essa seleção, centrados na média ou autoescalados, e pela similaridade conforme variedade, localização e família.

### 3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na otimização da técnica no  $^1\text{H}$ -HR-MAS-RMN, os melhores resultados foram obtidos, utilizando `cpmgpr1d` como pulso de supressão da água; 128 scans; tempo de aquisição de 6 segundos; tempo de espera de 3 segundos; e janela espectral de 20 ppm.

Os espectros alisados e normalizados foram plotados na média por variedade e sobrepostos para averiguar as diferenças entre *speciosa*, *cuyabensis*, *gardneri* e *pubescens* (Figura 1).

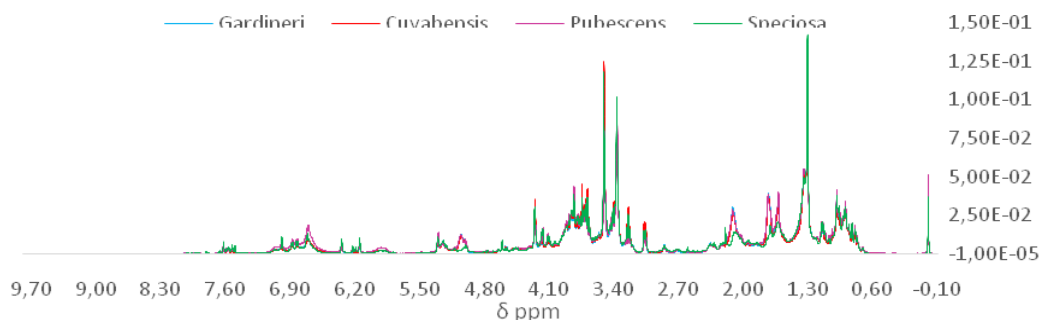


Figura 1 – Médias dos espectros de HR-MAS RMN  $\text{H}^1$  das variedades de mangaba.

Utilizando toda a informação espectral e fazendo a análise de componentes principais em um gráfico com as duas primeiras componentes principais, observa-se, na Figura 2, o agrupamento das amostras correspondentes às variedades. A PC1 continha a informação responsável pela distinção entre *speciosa*, *cuyabensis* e *pubescens* – escores positivos para as duas primeiras e negativo para a última. A variedade *gardneri*



concentra-se em PC2 positivo, porém apresenta amostras próximas à *cuyabensis* e *pubescens*.

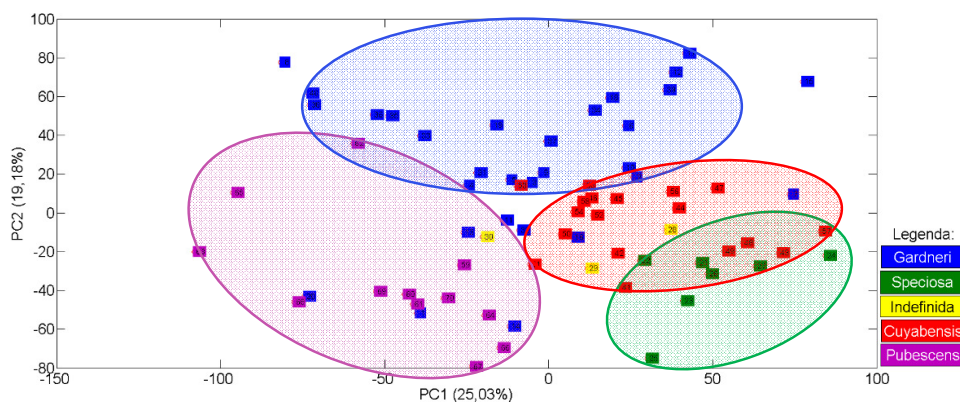


Figura 2 – Gráfico de PCA com toda informação espectral em PC1xPC2 autoescalonado com a tendência de discriminação conforme a variedade.

Para possibilitar a identificação dos sinais dos espectros responsáveis pelas separações, os resultados e a discussão serão abordados por variedade de *Hancornia speciosa*, com base nos pesos observados nas análises de componentes principais. Na Figura 3, é possível verificar os pesos que têm maior influência na separação dos PCAs da região entre  $\delta$  8,4 e 9,8 ppm e sua ampliação. Consta na Figura 3 a diferenciação existente entre a variedade *gardneri* das demais, com agrupamento em PC1 positivo e PC2 negativo, além de menor intensidade dos sinais em  $\delta$  9,16; 9,50 e 9,68 ppm, correspondentes a hidrogênios de grupos aldeídos.

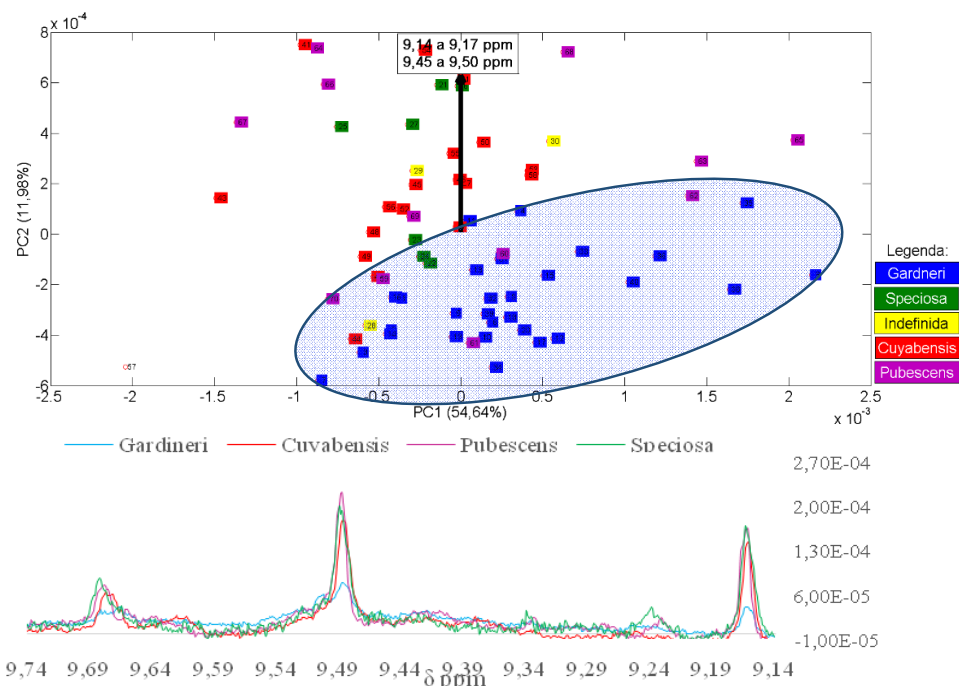


Figura 3 – Gráfico de PCA e pesos em PC1xPC2 centrado na média e sinais responsáveis pelo maior peso na discriminação das amostras entre  $\delta$  9,14 e 9,74 ppm.

Os gráficos de scores da região do espectro compreendida entre  $\delta$  5,58 e 8,39 ppm foram as que apresentaram melhores resultados na distinção dos grupamentos entre variedades, famílias e estados da mangaba. Na Figura 4 (a), observa-se essa distinção em PC1xPC2xPC3 autoescalonado de variedades e estados. A PC1 foi o principal responsável pelas separações: variedades *speciosa* e *cuyabensis* em PC1 positivo, *pubescens* em PC1 negativo. A PC2 positivo distinguiu as amostras da variedade *gardneri* das amostras de *speciosa* e *cuyabensis*, que se concentraram na parte negativa da componente principal. A PC3 negativo foi responsável pela separação das variedades *speciosa* e *cuyabensis*, negativo para a primeira e positivo para a segunda. Na Figura 4 (b), é possível distinguir entre as amostras da variedade *gardneri* de Goiás e Mato Grosso do Sul, pois a última se concentra e na região de PC2 positivo.

Na Figura 5, é possível observar os sinais de RMN  $^1\text{H}$ , que apresentaram diferenças entre  $\delta$  5,58 e 8,39 ppm no espectro. Essa região do espectro é composta por uma mistura de compostos fenólicos, como rutina e ácido clorogênico, e revela ser uma região espectral importante na diferenciação entre as variedades<sup>19</sup>.

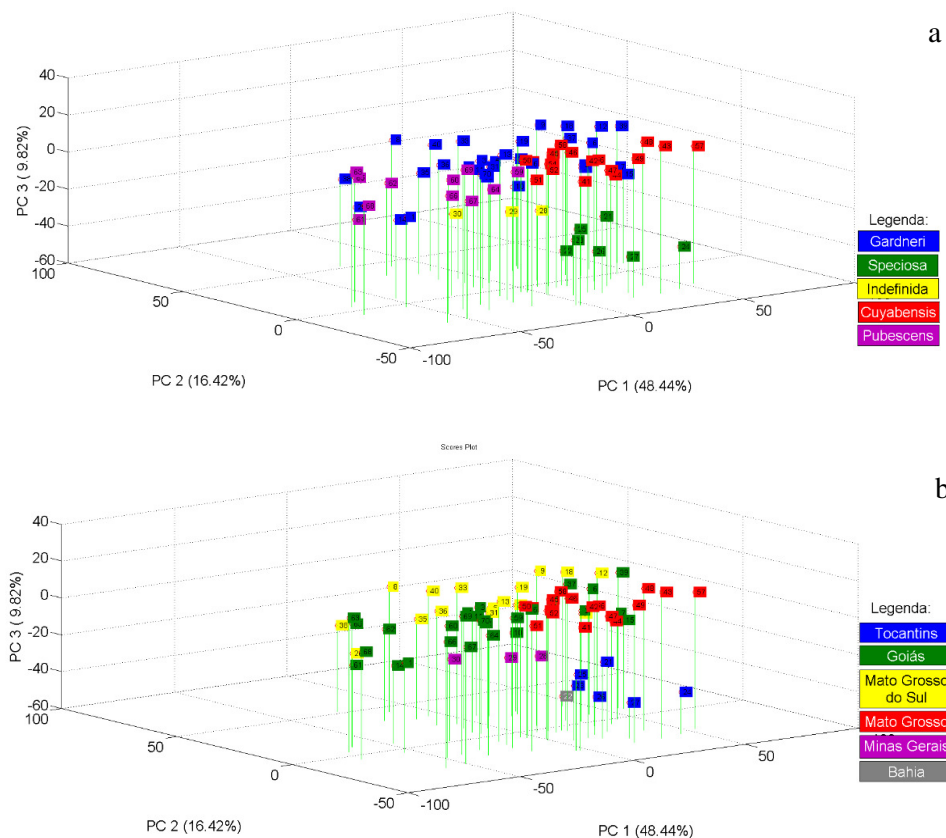


Figura 4—Gráficos de PCA da região entre  $\delta$  5,58 e 8,39 ppm com a tendência de discriminação por variedades e estados autoescalados.

A separação entre as variedades observada na PCA da Figura 4 pode ser comprovada pelo agrupamento hierárquico na Figura 6. As variedades *speciosa*, *cuyabensis* e *pubescens* diferenciaram-se em grupos individuais, e a *gardneri* permanece com uma distribuição mais ampla em dois grupos formados.

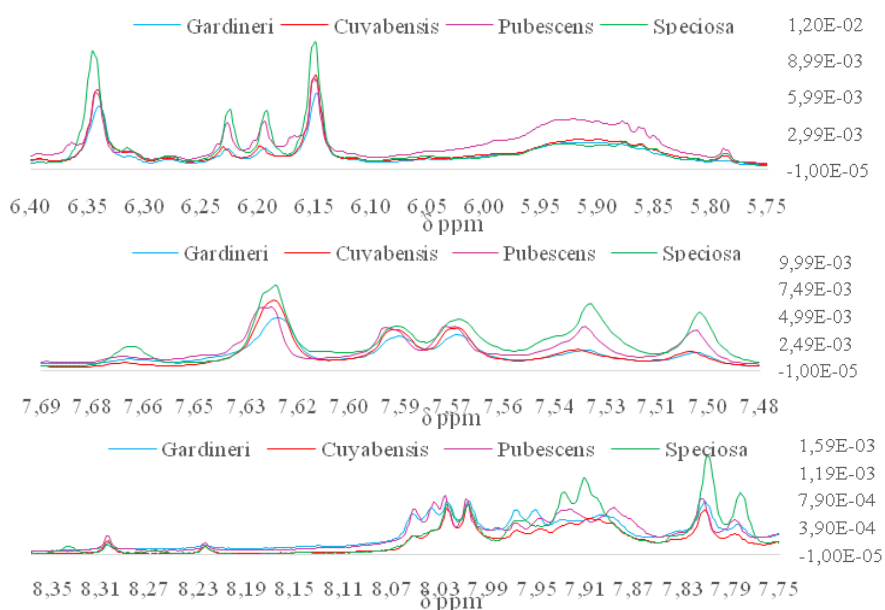


Figura 5 –Ampliação das faixas espectrais presentes na região entre  $\delta$  5,58 e 8,39 ppm do espectro de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$  usando metanol deuterado.

Na área do espectro de HR-MAS NMR  $^1\text{H}$  definida entre  $\delta$  4,28 a 5,6 ppm, a diferenciação da variedade *speciosa* das demais é justificada pela ausência de sinal entre  $\delta$  5,04 e 5,10 ppm, conforme pode ser observado na Figura 7. Esses sinais indicam presença de compostos triterpênicos  $3\beta$ -substituídos. Barros revelou presença de uma mistura de ésteres de  $\alpha$ - e  $\beta$ -amirina.<sup>19</sup> Gomes observou sinais de hidrogênios vinílicos nessas regiões, atribuídos a hidrogênios ligados a carbonos olefínicos de esqueleto ursado e oleano – obtendo-se  $\alpha$ -amirina,  $\beta$ -amirina e Lupeol. Esses resultados revelam uma diferenciação nos hidrogênios ligados a carbonos de esqueleto oleano da variedade *speciosa*.<sup>20</sup>

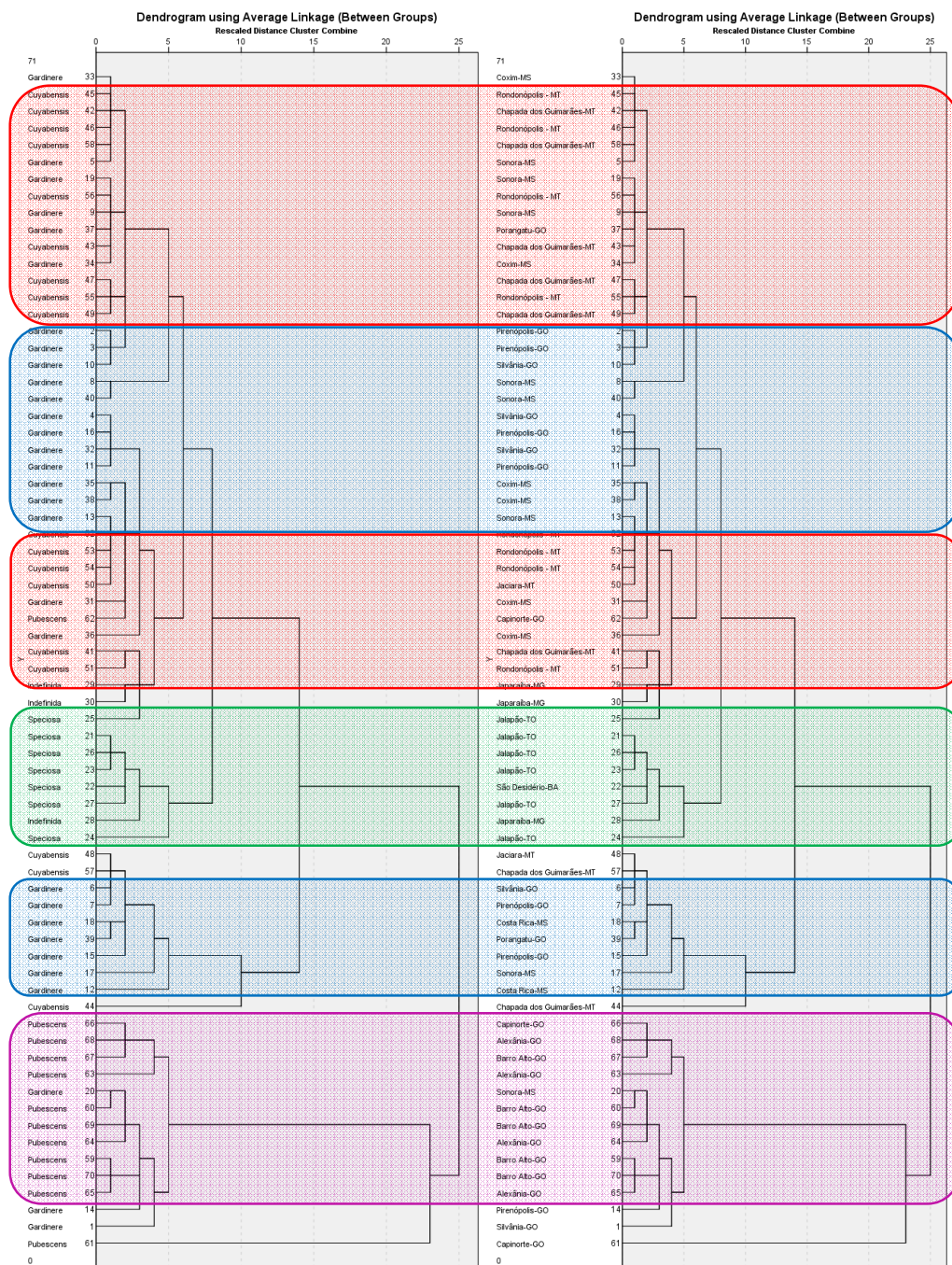


Figura 6 – Dendrograma resultado de agrupamento hierárquico das variedades de *Hancornia speciosa*, utilizando a região entre  $\delta$  5,58 e 8,39 ppm do espectro.

Não foi observado agrupamento entre variedades na região do espectro de  $\delta$  2,46 a 4,27 ppm, porém os hidrogênios oximetínicos na região de  $\delta$  3,5 ppm, juntamente

com com os hidrogênios olefínicos em  $\delta$  5,3 ppm, caracterizaram a presença do asteroide  $\beta$ -sitosterol.<sup>19</sup>

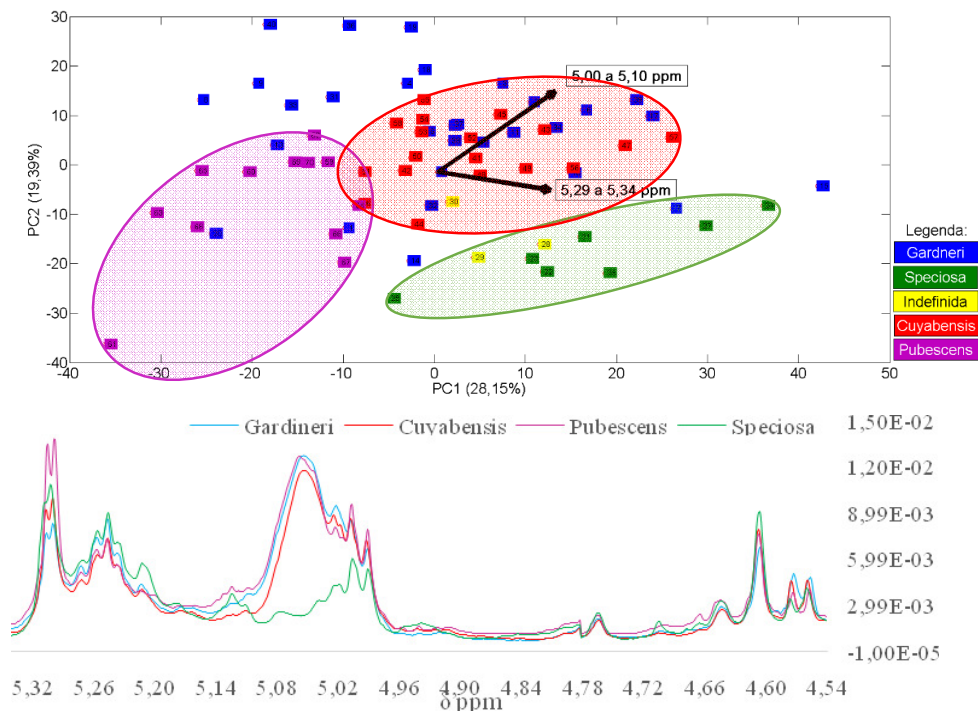


Figura 7 – Gráfico de PCA em PC1xPC2 autoescalado e ampliação das faixas espectrais presentes na região entre  $\delta$  4,29 e 5,58 ppm do espectro de RMN HR-MAS de  $^1\text{H}$ , usando metanol deuterado.

Na região do espectro entre  $\delta$  0,2 e 2,46 ppm, observou-se o agrupamento das variedades *speciosa*, *gardneri* e *cuyabensis*. As amostras da variedade *gardneri* apresentaram maior intensidade dos sinais nessa região espectral, mas a *speciosa* é que apresentou sinais com maior diferença sobre os demais: sinais fracos em  $\delta$  1,62 e 1,71; entre 2,07 e 2,16; e um sinal único em 2,19 ppm. Os sinais correspondentes a uma mistura de hidrocarbonetos, presentes nos espectros, não apresentaram distinção entre si em relação às variedades.<sup>19</sup> Os sinais próximos a  $\delta$  1,6 e 1,7 ppm foram encontrados na identificação de 3- $\beta$ -O-acil lupeol, e os resultados mostrados na Figura 8 indicam uma diferenciação na composição da variedade *speciosa* em relação a essa substância.<sup>21</sup>

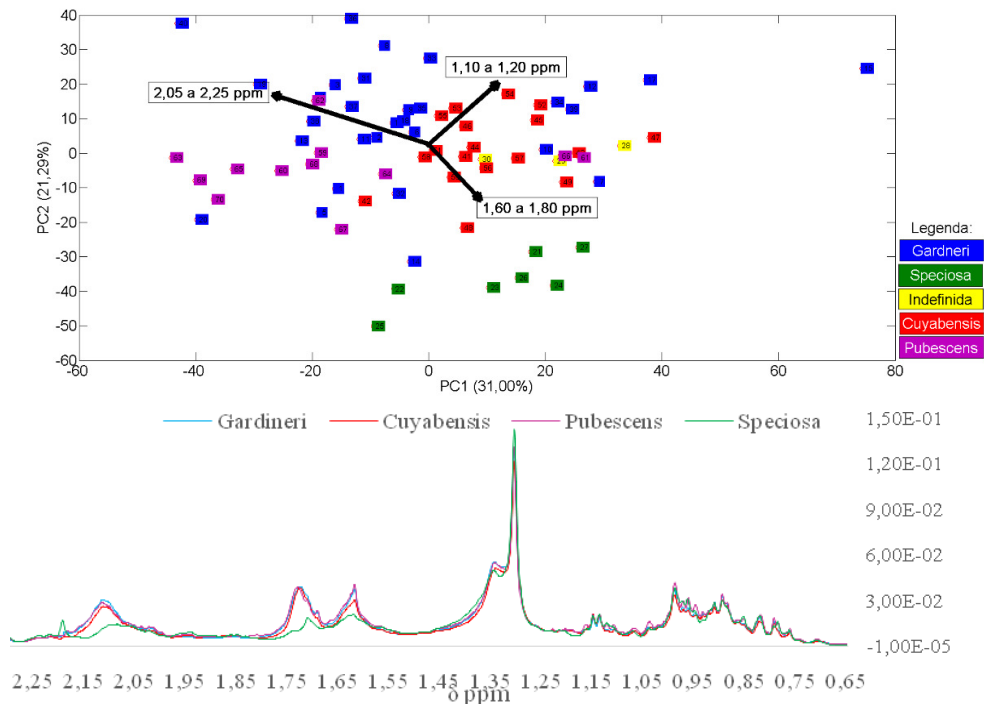


Figura 8 – Gráfico de PCA da região 5 em PC1xPC2 autoescalonado com a distinção por variedades.

A presença de sinais pode ser utilizada para diferenciar as variedades de mangaba. Para a variedade *speciosa*, sinais em  $\delta$  2,19 e 7,67 ppm são sinais presentes unicamente nessa variedade, da mesma forma que a ausência em 5,05 ppm. Para a variedade *cuyabensis*, é a ausência de sinais entre  $\delta$  7,89 a 7,98 e de um dubleto em 8,04 e 8,05 ppm. Sinais em  $\delta$  8,03 e 8,05 e em 7,95 e 7,97 ppm indicam a variedade *gardneri*, enquanto a presença de sinais em  $\delta$  7,50 e 7,53 e em 8,03 e 8,05 é encontrada na variedade *pubescens*.

### 3.4. CONCLUSÃO

Este trabalho mostrou que a ressonância magnética nuclear de hidrogênio de alta resolução com ângulo mágico, juntamente com a análise de componentes principais, é uma técnica eficiente na diferenciação das variedades de mangaba. A variedade *speciosa* agrupa-se em relação às demais com diferença de ésteres na composição

química de suas folhas. Na variedade *gardneri*, foram observadas variações em sinais de aldeídos e agrupamentos correspondentes aos locais de coleta. A variedade *pubescens* apresentou agrupamentos distintos da *speciosa*, e a *cuyabensis* apresentou agrupamentos em todas as variáveis analisadas. Esses resultados possibilitam a identificação da variedade de acordo com a composição química de suas folhas, através de uma técnica sem pré-tratamentos não destrutiva.

### 3.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - Li, Z.; Zhi, H.; Xue, S.; Sun, H.; Zhang, F.; Jia, J.; Xing, J.; Zhang, L.; Quin, X. Metabolomic profiling of the flower bud and rachis of *Tussilago farfara* with antitussive and expectorant effects on mice. *Journal of Ethnopharmacology* **2012**, v. 140, p. 83-90.
- 2 - Mucci, A.; Parenti, F.; Righi, V.; Schenetti, L. Citron and lemon under the lens of HR-MAS NMR spectroscopy. *Food Chemistry* **2013**, v. 141, p. 3167-3176.
- 3 - Seefeldt, H. F.; Larsen, F. H.; Viereck, N.; Petersen, M. A.; Engelsen, S. B. Lipid composition and deposition during grain filling in intact barley (*Hordeum vulgare*) mutant grains as studied by  $^1\text{H}$  HR MAS NMR. *Journal of Cereal Science* **2011**, v. 54, p. 442-449.
- 4 - Alcanta, G. B.; Honda, N. K.; Ferreira, M. M. C.; Ferreira, A. G. Chemometric analysis applied in  $^1\text{H}$  HR-MAS NMR and FR-IR data for chemotaxonomic distinction of intact lichen samples. *Analytica Chimica Acta*. **2007**, v. 595, p. 3-8.
- 5 - Hanana, H.; Simon, G.; Kervarec, N.; Mohammadou, B. A.; Cérantola, S. HRMAS NMR as a tool to study metabolic responses in heart clam *Ruditapes decussatus* exposed to Roundup. *Talanta* **2012**, v. 97, p. 425-431, 2012.
- 6 - Pérez, E. M. S.; Iglesias, M. J.; Ortiz, F. L.; Pérez, I. S.; Galera, M. M. Study of the suitability of HRMAS NMR for metabolic profiling of tomatoes: Application to tissue differentiation and fruit ripening. *Food Chemistry* **2010**, v. 122, p. 877-887.
- 7 - Ritota, M.; Casciani, L.; Han, B.; Cozzolino, S.; Leita, L.; Sequi, P.; Valentini, M. Traceability of Italian garlic (*Allium sativum* L.) by means of HRMAS-



NMRspectroscopy and multivariate data analysis. *Food Chemistry* **2012**, v. 135, p. 684-693.

8 - Pérez, E. M. S.; López, J. G.; Iglesias, M. J.; Ortiz, F. L.; Toresano, F.; Camacho, F. HRMAS-nuclear magnetic resonance spectroscopy characterization of tomato “flavorvarieties” from Almería (Spain). *Food Research Internacional* **2011**, v. 44, p. 3212-3221.

9 - Zhao, H.; Xu, J.; Ghebrazadik, H.; Hylands, P. J. Metabolomic quality control of commercial Asian ginseng, and cultivated and wild American ginseng using<sup>1</sup>H NMR and multi-stepPCA. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2015**, v. 114, p. 113-120.

10 - Bennett, B.C.; Prance, G.T., Introduced plants in the indigenous pharmacopoeia of Northern South America. *Economic Botany*. **2000**, n.54, p.90–102.

11 - Almeida, M. M. B.; Souza, P. H. M.; Arriaga, Â. M. C.; Prado, G. M.; Magalhães, C. E. de C.; Maia, G. A.; Lemos, T. L. G. Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. *Food research Internacional* **2011**, n.44, p.2155-2159.

12 - Serra, C.P.; Cortes, S.F.; Lombardid, J.A.; Oliveira, A.B.; Braga, F.C. Validation of a colorimetric assay for the in vitro screening of inhibitors of angiotensin-converting enzyme (ACE) from plant extracts *Phytomedicine*. **2005**, n.12, p.424.

13 - Ferreira, H.C.; Serra, C.P.; Lemos, V.S.; Braga, F.C.; Cortes, S.F. Nitric oxide-dependent vasodilatation by ethanolic extract of *Hancornia speciosa* via phosphatidylinositol 3-kinase. *Journal of Ethnopharmacology* **2007**, n. 109, p. 161–164.

14 - Silva, A. V. C.; Santos, A. R. F. dos; Wickert, E.; Silva Júnior, J. F. da; Costa, T. S. Divergência genética entre acessos de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). *Revista Brasileira de Ciências Agrárias* **2011**, v. 6, n. 4, p. 572-578.

15 - Endringer, D. C.; Pezzuto, J. M.; Braga, F. C. NF-kappa B inhibitory activity of cyclitols isolated from *Hancornia speciosa*. *Phytomedicine*. **2009**, n.16, p.1064–1069.

16 - Marinho, D. G.; Alvianob, D. S.; Matheusa, M. E.; Alvianob, C. S.; Fernandes, P. D. The latex obtained from *Hancornia speciosa* Gomes possesses anti-inflammatory activity. *Journal of Ethnopharmacology* **2011**, n. 135, p. 530-537.

17 - Melo, M. S.; Santana, R. F. de; Batista, C. M.; Pinheiro, M. S.; Albuquerque JR., R. L. C.; Padilha, F. F.; Lima, Á. S.; Nunes, P. S.; Costa, L. P.; Araújo, A. A. S.; Cardoso, J. C. Thermal characterization of mangaba-based films. *J. Therm. Anal Calorim.* **2013**, n. 111, p. 2097-2102.

18 - Ganga, R. M. D.; Ferreira, G. A.; Chaves, L.J.; Naves, R. V.; Nascimento, J. L. Caracterização de frutos e árvores de populações naturais de *Hancornia speciosa* Gomes do Cerrado. *Rev. Bras. Frutic* **2010**, v. 32, n. 1, p. 101-133.

19 - Barros, I. M. C. Contribuição ao estudo químico e biológico de *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae). *Dissertação de Mestrado*, Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

20 - Gomes, W. F. Estudo químico de recursos naturais renováveis do estado do Sergipe: *Hancornia speciosa*. *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2010.

21 - Sampaio, T. S. Estudo Fitoquímico de *Hancornia speciosa* Gomes: Isolamento, Determinação Estrutural e Atividade Biológica. *Dissertação de Mestrado em Química*, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2008.

## APÊNDICE

### APÊNDICE A – Locais de coleta para implantação do banco de germoplasma



Figura 9A – Mapa do Brasil com a distribuição das populações onde os indivíduos foram coletados para a implantação da coleção de germoplasma da mangaba.

Tabela 1A – Localidades, coordenadas geográficas, altitudes e variedades botânicas das matrizes de *Hancornia speciosa* amostradas no Cerrado.

MUNICÍPIO – ESTADO	LATITUDE (S)	LONGITUDE (O)	ALTITUDE (M)	VARIEDADE BOTÂNICA
Barro Alto – GO	14°46,157’	49°03,497’	549	<i>pubescens</i>
Campinorte – GO	14°16,808’	49°13,629’	488	<i>pubescens</i>
Porangatu – GO	13°06,162’	49°11,912’	342	<i>gardneri</i>
Jalapão – TO	10°30,923’	46°53,475’	444	<i>speciosa</i>
Jalapão – TO	10°24,571’	46°29,551’	484	<i>speciosa</i>
Jalapão – TO	10°37,332’	46°07,802’	752	<i>speciosa</i>
São Desidério – BA	12°33,002’	45°55,217’	811	<i>speciosa</i>
Alexânia – GO	16°12,754’	48°24,496’	970	<i>pubescens</i>
Silvânia – GO	16°34,349’	48°21,734’	951	<i>gardneri</i>
Pirenópolis – GO	15°48,332’	48°52,674’	1303	<i>gardneri</i>
Chapada dos Guimarães – MT	15°30,579’	55°17,448’	729	<i>cuyabensis</i>
Chapada dos Guimarães – MT	15°22,760’	55°47,479’	689	<i>cuyabensis</i>
Jaciara – MT	15°48,403’	55°15,960’	810	<i>cuyabensis</i>
Rondonópolis – MT	16°44,743’	54°38,935’	537	<i>cuyabensis</i>
Sonora – MS	17°49,688’	54°43,358’	459	<i>gardneri</i>
Coxim – MS	18°36,954’	54°46,358’	261	<i>gardneri</i>
Costa Rica – MS	18°23,604’	53°20,270’	735	<i>gardneri</i>

## APÊNDICE B – Banco de germoplasma da EA/UFG

Tabela 2A – Variedade, família, origem e local no bloco na Coleção de Germoplasma dos 70 indivíduos utilizados no presente trabalho.

Variedade	Família	Origem	Bloco na Coleção da EA/UFG
<i>pubescens</i>	15	Alexânia-GO	B1 L6 C6
<i>pubescens</i>	16	Alexânia-GO	B2 L3 C2
<i>pubescens</i>	16	Alexânia-GO	B3 L4 C5
<i>pubescens</i>	15	Alexânia-GO	B3 L9 C4
<i>pubescens</i>	1	Barro Alto-GO	B1 L4 C6
<i>pubescens</i>	1	Barro Alto-GO	B2 L1 C4
<i>pubescens</i>	2	Barro Alto-GO	B2 L2 C5
<i>pubescens</i>	2	Barro Alto-GO	B3 L8 C6
<i>pubescens</i>	1	Barro Alto-GO	B3 L9 C5
<i>pubescens</i>	4	Campinorte-GO	B1 L10 C4
<i>pubescens</i>	4	Campinorte-GO	B3 L6 C3
<i>pubescens</i>	4	Campinorte-GO	B4 L1 C1
<i>cuyabensis</i>	38	Chapada do Guimarães-MT	B1 L3 C2
<i>cuyabensis</i>	37	Chapada do Guimarães-MT	B1 L7 C4
<i>cuyabensis</i>	37	Chapada do Guimarães-MT	B2 L2 C1
<i>cuyabensis</i>	36	Chapada do Guimarães-MT	B2 L5 C1
<i>cuyabensis</i>	38	Chapada do Guimarães-MT	B2 L6 C6
<i>cuyabensis</i>	36	Chapada do Guimarães-MT	B3 L3 C3
<i>cuyabensis</i>	37	Chapada do Guimarães-MT	B3 L10 C3
<i>cuyabensis</i>	38	Chapada do Guimarães-MT	B3 L10 C4
<i>gardneri</i>	52	Costa Rica-MS	B2 L2 C6
<i>gardneri</i>	52	Costa Rica-MS	B3 L1 C6
<i>gardneri</i>	48	Coxim-MS	B1 L5 C1
<i>gardneri</i>	47	Coxim-MS	B1 L10 C5
<i>gardneri</i>	46	Coxim-MS	B2 L3 C3
<i>gardneri</i>	47	Coxim-MS	B2 L3 C4

<i>gardneri</i>	48	Coxim-MS	B2 L9 C6
<i>gardneri</i>	46	Coxim-MS	B3 L7 C4
<i>cuyabensis</i>	39	Jaciara-MT	B2 L7 C1
<i>cuyabensis</i>	39	Jaciara-MT	B3 L5 C2
<i>speciosa</i>	12	Jalapão-TO	B1 L2 C1
<i>speciosa</i>	6	Jalapão-TO	B1 L7 C5
<i>speciosa</i>	6	Jalapão-TO	B2 L1 C1
<i>speciosa</i>	6	Jalapão-TO	B3 L2 C6
<i>speciosa</i>	7	Jalapão-TO	B3 L8 C4
<i>speciosa</i>	7	Jalapão-TO	B4 L9 C3
<i>indefinida</i>	59	Japaraíba-MG	B3 L8 C3
<i>indefinida</i>	59	Japaraíba-MG	B2 L5 C5
<i>indefinida</i>	59	Japaraíba-MG	B1 L5 C2
<i>gardneri</i>	29	Pirenópolis-GO	B1 L6 C2
<i>gardneri</i>	29	Pirenópolis-GO	B2 L7 C6
<i>gardneri</i>	27	Pirenópolis-GO	B2 L8 C2
<i>gardneri</i>	28	Pirenópolis-GO	B3 L1 C1
<i>gardneri</i>	29	Pirenópolis-GO	B3 L10 C1
<i>gardneri</i>	28	Pirenópolis-GO	B4 L4 C6
<i>gardneri</i>	27	Pirenópolis-GO	B4 L10 C5
<i>gardneri</i>	5	Porangatu-GO	B2 L4 C2
<i>gardneri</i>	5	Porangatu-GO	B3 L4 C4
<i>cuyabensis</i>	42	Rondonópolis-MT	B1 L7 C6
<i>cuyabensis</i>	40	Rondonópolis-MT	B1 L9 C2
<i>cuyabensis</i>	42	Rondonópolis-MT	B2 L8 C5
<i>cuyabensis</i>	40	Rondonópolis-MT	B2 L7 C3
<i>cuyabensis</i>	41	Rondonópolis-MT	B2 L10 C1
<i>cuyabensis</i>	40	Rondonópolis-MT	B3 L3 C2
<i>cuyabensis</i>	41	Rondonópolis-MT	B3 L5 C1
<i>cuyabensis</i>	42	Rondonópolis-MT	B3 L6 C1
<i>speciosa</i>	13	São Desidério-BA	B4 L2 C6
<i>gardneri</i>	20	Silvânia-GO	B1 L1 C4
<i>gardneri</i>	19	Silvânia-GO	B2 L6 C4

<i>gardneri</i>	19	Silvânia-GO	B3 L7 C1
<i>gardneri</i>	20	Silvânia-GO	B3 L10 C6
<i>gardneri</i>	20	Silvânia-GO	B4 L9 C6
<i>gardneri</i>	44	Sonora-MS	B1 L3 C1
<i>gardneri</i>	45	Sonora-MS	B1 L1 C6
<i>gardneri</i>	43	Sonora-MS	B2 L1 C6
<i>gardneri</i>	44	Sonora-MS	B2 L4 C4
<i>gardneri</i>	45	Sonora-MS	B2 L10 C3
<i>gardneri</i>	43	Sonora-MS	B3 L5 C5
<i>gardneri</i>	44	Sonora-MS	B3 L7 C3
<i>gardneri</i>	45	Sonora-MS	B4 L6 C6