

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**“Análise Metabolômica via RMN: Amostras de Urina e  
Látex”**

**Eduardo Sanches Pereira do Nascimento\***

Tese apresentada como parte dos requisitos  
para obtenção do título de DOUTOR EM  
CIÊNCIAS, área de concentração: QUÍMICA.

**Orientador: Prof. Dr. Antonio Gilberto Ferreira**

**\* bolsista CAPES**

**São Carlos - SP  
2011**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

N244am

Nascimento, Eduardo Sanches Pereira do.

Análise metabólica via RMN : amostras de urina e  
látex / Eduardo Sanches Pereira do Nascimento. -- São  
Carlos : UFSCar, 2011.

152 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos,  
2011.

1. Ressonância magnética nuclear. 2. Quimiometria. 3.  
Diabetes mellitus. 4. Erva-mate. 5. Seringueira. 6. Clones. I.  
Título.

CDD: 543.0877 (20<sup>a</sup>)

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho a toda  
minha família e amigos por  
estarem sempre comigo em todos  
os momentos importantes da  
minha vida.*

## EPÍGRAFE

*"You can't always get what you want,  
But if you try sometimes, yeah,  
You just might find you get what you need"*

*"Você não pode ter sempre o que quer  
Mas se você tentar algumas vezes, sim,  
Encontrará o que precisa"*

*Keith Richards / Mick Jagger*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus,

A minha vó Rosa, minha mãe Fátima e minha irmã Eloisa, por todo amor, força e dedicação em todos os momentos da minha vida.

Ao Prof. Dr. Antonio Gilberto Ferreira pela amizade, orientação e conhecimentos transmitidos durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Tiago Venâncio pela amizade, sugestões e críticas sobre este trabalho.

A todos os amigos do Laboratório de RMN, Chicão, Claudimar, Daniele, Darlene, Elenilson, Elisangela, Liege, Lorena, Luiz, Goiano, Katyúscia, Maiara, Sheraz e Sergio pela colaboração, discussões e amizade.

Aos técnicos do Laboratório de RMN, Luciana e Paulo pela amizade e momentos de descontração.

A Inara pela ajuda na elaboração da tese e principalmente por todo carinho, atenção, incentivo e conhecimento dedicado nesse árduo período de escrita.

A todos meus familiares, pela alegria que sentem em todas as minhas conquistas e por tudo que sempre fizeram por mim.

A todos meus amigos de Mirandópolis e São Carlos, por estarem ao meu lado nos momentos mais importantes da minha vida.

As funcionárias da secretaria de pós-graduação Ariane, Cristina e Luciani pelo atendimento atencioso.

A todos os professores e funcionários do DQ-UFSCar que de alguma forma colaboraram para o desenvolvimento deste trabalho.

A CAPES pela bolsa concedida.

---

---

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	IV
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	VI
<b>LISTA DE TABELAS</b>	X
<b>RESUMO</b>	XI
<b>ABSTRACT</b>	XIII
<b>CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO GERAL</b>	<b>1</b>
1.1.1. RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR	2
1.1.1.1. SPINS E ESTADOS DE ENERGIA	2
1.1.1.2. ORIGEM DO SINAL DE RMN	4
1.1.1.3. VETOR MAGNETIZAÇÃO RESULTANTE E PULSO DE RADIOFREQUÊNCIA	5
1.1.1.4. RELAXAÇÃO	7
1.1.1.5. DESLOCAMENTO QUÍMICO	8
1.1.1.6. DETECÇÃO EM QUADRATURA	10
1.1.1.7. TRANSFORMADA DE FOURIER	12
1.1.1.8. CORREÇÃO DE FASE	13
1.1.1.9. EXPERIMENTOS PULSADOS	14
1.1.1.10. SUPRESSÃO DO SINAL DA ÁGUA	15
1.1.1.11 PROCESSAMENTO DOS ESPECTROS DE RMN	19
1.1.2. ANÁLISE METABOLÔMICA	20
1.1.3. ANÁLISE DE URINA VIA RMN DE <sup>1</sup> H	21
1.1.3.1. FATORES QUE AFETAM O DESLOCAMENTO QUÍMICO DOS METABÓLITOS	23
1.1.4. QUIMIOMETRIA APLICADA À RMN DE <sup>1</sup> H	25
1.1.4.1. ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA)	26
1.1.4.2. ANÁLISE DE AGRUPAMENTO HIERÁRQUICO (HCA)	28
1.1.4.3. PREPROCESSAMENTO DOS DADOS	29
<b>CAPÍTULO 2 – ANÁLISE VIA RMN DE URINA DE HUMANOS DIAGNOSTICADOS COM DIABETES MELLITUS TIPO 2 (DMT2) E PRÉ-DIABETES (IGT) E SUBMETIDOS A UM TRATAMENTO COM INFUSÃO DE ERVA-MATE (<i>ILEX PARAGUARIENSIS</i>)</b>	<b>31</b>
2.1. INTRODUÇÃO	32

---

2.1.1. DIABETES MELLITUS TIPO 2 (DMT2)	32
2.1.2. ERVA-MATE ( <i>ILEX PARAGUARIENSES</i> )	36
2.2. OBJETIVOS	41
2.2.1. OBJETIVOS GERAIS	41
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
2.3. MATERIAIS E MÉTODOS	42
2.3.1. AMOSTRAS DE ERVA-MATE	42
2.3.2. PREPARAÇÃO DO EXTRATO DE ERVA-MATE	42
2.3.3. CRITÉRIOS DE SELEÇÃO DOS PACIENTES	42
2.3.4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	44
2.3.5. AMOSTRAS DE URINA	45
2.3.6. PREPARO DA SOLUÇÃO TAMPÃO	46
2.3.7. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE URINA	46
2.3.8. OBTENÇÃO DOS ESPECTROS DE RMN DE <sup>1</sup> H	46
2.3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA	48
2.4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	49
2.4.1. PERFIL METABÓLICO DAS AMOSTRAS DE URINA DE HUMANOS	49
2.4.2. ANÁLISE QUANTITATIVA	56
2.4.3. ANÁLISE MULTIVARIADA DOS DADOS	61
2.4.3.1. DIABETES MELLITUS TIPO 2	61
2.4.3.2. INTOLERÂNCIA A GLICOSE	76
2.5. CONCLUSÃO	91
<b>CAPÍTULO 3 – ANÁLISE DE AMOSTRAS DE LÁTEX VIA RMN</b>	92
3.1. INTRODUÇÃO	93
3.1.1. LÁTEX	93
3.1.2. BORRACHA NATURAL	97
3.1.3. CLONAGEM E ENXERTIA	99
3.2. OBJETIVOS	101
3.2.1. OBJETIVOS GERAIS	101
3.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	101
3.3. MATERIAIS E MÉTODOS	102

---

---

3.3.1. AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO PORTA-ENXERTO SOBRE ENXERTO ATRAVÉS DA ANÁLISE DO LÁTEX	102
3.3.1.1. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	102
3.3.2. AVALIAÇÃO DO LÁTEX DOS DIFERENTES CLONES DE SERINGUEIRA	103
3.3.2.1. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	103
3.3.3. AVALIAÇÃO DO LÁTEX DE ALTA E BAIXA PRODUÇÃO DE POLIISOPRENO DO MESMO CLONE	105
3.3.3.1. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	105
3.3.4. PREPARO DAS AMOSTRAS DE LÁTEX	105
3.3.5. OBTENÇÃO DOS ESPECTROS DE RMN	106
3.3.6. ANÁLISE MULTIVARIADA	107
3.4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	108
3.4.1. PERFIL METABÓLICO DAS AMOSTRAS DE LÁTEX	108
3.4.2. AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE PORTA-ENXERTO SOBRE ENXERTO ATRAVÉS DA ANÁLISE DO LÁTEX	117
3.4.2.1. ANÁLISE MULTIVARIADA E QUANTIFICAÇÃO	117
3.4.3. AVALIAÇÃO DO LÁTEX DOS DIFERENTES CLONES DE SERINGUEIRA	127
3.4.3.1. ANÁLISE MULTIVARIADA E QUANTIFICAÇÃO	127
3.4.4. AVALIAÇÃO DO LÁTEX DE ALTA E BAIXA PRODUÇÃO DE POLI-ISOPRENO PROVENIENTES DO MESMO CLONE	136
3.4.4.1. ANÁLISE MULTIVARIADA E QUANTIFICAÇÃO	136
3.5. CONCLUSÕES	143
<b>4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>144</b>
<b>APÊNDICE</b>	<b>151</b>

---

**LISTA DE ABREVIATURAS**

$\sigma$	Constante de blindagem
$\delta$	Deslocamento químico
<b>APTA</b>	Pólo Regional de Desenvolvimento Tecnológico dos Agronegócios do Centro-Norte da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios
<b>aq</b>	Tempo de aquisição
<b>B<sub>0</sub></b>	Campo magnético externo
<b>B<sub>1</sub></b>	Campo magnético gerado pelo pulso de radiofrequência
<b>B<sub>ef</sub></b>	Campo magnético efetivo
<b>d1</b>	Tempo de espera entre as aquisições
<b>d8</b>	Tempo de mistura
<b>DD</b>	Grupo de pacientes diagnosticados com DMT2 e que foram submetidos a uma intervenção dietética
<b>DDE</b>	Grupo de pacientes diagnosticados com DMT2 e que foram submetidos a uma intervenção dietética e ingestão de chá-mate
<b>DE</b>	Grupo de pacientes diagnosticados com DMT2 e que foram submetidos a ingestão de chá-mate
<b>DM</b>	Diabete Mellitus
<b>DMA</b>	Dimetilamina
<b>DMT1</b>	Diabete Mellitus Tipo 1
<b>DMT2</b>	Diabete Mellitus Tipo 2
<b>FID</b>	<i>Free Induction Decay</i> – Decaimento livre por indução
<b>GABA</b>	Ácido gama-aminobutírico
<b>gCOSY</b>	<i>gradient - Correlation Spectroscopy</i>
<b>gHSQC</b>	<i>gradient - Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
<b>HCA</b>	<i>Hierarchical Clusters Analysis</i> - Análise de Agrupamentos Hierárquicos
<b>IAC</b>	Instituto Agronômico Campinas
<b>ID</b>	Grupo de pacientes diagnosticados com IGT e que foram submetidos a uma intervenção dietética

---

<b>IDE</b>	Grupo de pacientes diagnosticados com IGT e que foram submetidos a uma intervenção dietética e ingestão de chá-mate
<b>IE</b>	Grupo de pacientes diagnosticados com IGT e que foram submetidos a ingestão de chá-mate
<b>IGT</b>	<i>Impaired Glucose Tolerance</i> - Intolerância a Glicose
<b>J</b>	Constante de acoplamento
<b>Ib</b>	Multiplicação exponencial aplicada ao FID
<b>M<sub>x</sub></b>	Componente x do vetor magnetização transversal
<b>M<sub>y</sub></b>	Componente y do vetor magnetização transversal
<b>M<sub>z</sub> = M<sub>0</sub></b>	Vetor magnetização resultante
<b>ns</b>	Número de varreduras
<b>p0</b>	Duração do pulso de radiofrequência – Pulso aleatório
<b>p1</b>	Duração do pulso de radiofrequência – Pulso de 90°
<b>PC</b>	<i>Principal Component</i> - Componente Principal
<b>PCA</b>	<i>Principal Component Analysis</i> - Análise de Componentes Principais
<b>pI9</b>	Atenuação do pulso de pré-saturação
<b>RF</b>	Radiofrequência
<b>RMN</b>	Ressonância Magnética Nuclear
<b>si</b>	Número de pontos utilizados no processamento dos espectros
<b>swH</b>	Janela espectral em Hertz
<b>T<sub>1</sub></b>	Tempo de relaxação spin-rede (longitudinal)
<b>T<sub>2</sub></b>	Tempo de relaxação spin-spin (transversal)
<b>td</b>	Número de pontos utilizados na aquisição do espectro
<b>TMAO</b>	N-óxido de trimetilamina
<b>TMS</b>	Tetrametilsilano
<b>TMSP-d<sub>4</sub></b>	Trimetilsililpropionato de sódio

---

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1.1. Representação dos estados de energia dos núcleos com spin $I = \frac{1}{2}$ .....	3
Figura 1.2. Representação do vetor magnetização resultante ( $M^0$ ) sob a influência de um campo magnético externo $B^0$ na direção do eixo z.....	6
Figura 1.3. Diagrama de coordenadas mostrando a bobina de RF e detecção, e a magnetização transversal obtida após a aplicação de um pulso de 90 graus. ....	7
Figura 1.4. Exemplo da evolução de dois spins relativo à frequência carreadora. Um tem uma frequência maior e o outro menor do que a frequência carreadora. ....	11
Figura 1.5. Sistema de detecção em quadratura para dois spins com frequência $+\nu$ e $-\nu$ ... ..	12
Figura 1.6. Os sinais de ressonância no modo absorptivo e dispersivo. ....	13
Figura 1.7. Experimento de um único pulso. ....	15
Figura 1.8. Sequência de pulso de pré-saturação, a qual irradia o sinal do solvente durante o tempo de espera.....	16
Figura 1.9. Sequência de pulso ZGCPPR.....	18
Figura 1.10. Sequência de pulso NOESYPR1D.....	19
Figura 1.11. Sequência de pulso NOESYGPPR1D.....	19
Figura 1.12. Representação gráfica dos resultados da análise de PCA. a) Gráfico de escores b) Gráfico de pesos.....	27
Figura 1.13. Dendograma fictício apresentado pela análise de agrupamentos hierárquicos.....	29
Figura 2.1 Estrutura química das principais metilxantinas encontradas na erva-mate.....	37
Figura 2.2. Estrutura química das principais saponinas agliconas encontradas na erva-mate. ....	38
Figura 2.3. Estrutura química dos ácidos cafeoilquínico e dicafeoilquínico, principais compostos fenólicos encontrados na erva-mate. ....	39
Figura 2.4. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ típico de uma amostra de urina de humano diagnosticado com DMT2. ....	49
Figura 2.5. Espectro de RMN de gCOSY típico de uma amostra de urina de humano diagnosticado com DMT2. ....	50
Figura 2.6. Espectro de RMN de gHSQC típico de uma amostra de urina de humano diagnosticado com DMT2. ....	50

Figura 2.7. Gráfico de linhas dos dados de RMN de $^1\text{H}$ das amostras de urina do grupo DD analisadas por PCA. ....	62
Figura 2.8. Gráfico de escores PC4 (5,5%) x PC2 (7,1%) das amostras de urina do grupo DD. ....	63
Figura 2.9. Gráfico de outliers da análise de PCA das amostras de urina do grupo DD. ....	64
Figura 2.10. Gráfico de escores PC4 (5,0%) x PC2 (7,3%) das amostras de urina do grupo DD após a retirada da amostra 298T20. ....	64
Figura 2.11. Gráfico de pesos da componente PC4 das amostras de urina do grupo DD destacando as variáveis que foram importantes para o resultado obtido. ....	66
Figura 2.12. Gráfico de linhas dos dados de RMN de $^1\text{H}$ das amostras de urina do grupo DE analisadas por PCA. ....	68
Figura 2.13. Gráfico de escores PC2 (10,3%) x PC3 (8,5%) das amostras de urina do grupo DE. ....	69
Figura 2.14. Gráfico de pesos das componentes PC2 e PC3 das amostras de urina do grupo DE destacando as variáveis que foram importantes para o resultado obtido. ....	70
Figura 2.15. Gráfico de linhas dos dados de RMN de $^1\text{H}$ das amostras de urina do grupo DDE analisadas por PCA. ....	72
Figura 2.16. Gráfico de escores PC4 (5,3%) x PC2 (8,0%) das amostras de urina do grupo DDE. ....	73
Figura 2.17. Gráfico com os outliers da análise de PCA das amostras de urina do grupo DDE. ....	73
Figura 2.18. Gráfico de escores PC4 (6,3%) x PC2 (8,5%) das amostras de urina do grupo DDE após a retirada das amostras 161T20 e 210T0. ....	74
Figura 2.19. Gráfico de pesos da componente PC4 das amostras de urina do grupo DDE destacando as variáveis que foram importantes para o resultado obtido. ....	75
Figura 2.20. Gráfico de linhas dos dados de RMN de $^1\text{H}$ das amostras de urina do grupo ID analisadas por PCA. ....	77
Figura 2.21. Gráfico de escores PC1 (28,1%) x PC2 (14,9%) das amostras de urina do grupo ID. ....	78
Figura 2.22. Gráfico de pesos da componente PC1 das amostras de urina do grupo ID destacando as variáveis que foram importantes para o resultado obtido. ....	79
Figura 2.23. Gráfico de linhas dos dados de RMN de $^1\text{H}$ das amostras de urina do grupo IE analisadas por PCA. ....	80

Figura 2.24. Gráfico de escores PC3 (9,2%) x PC2 (16,4%) das amostras de urina do grupo IE.....	81
Figura 2.25. Gráfico de outliers da análise de PCA das amostras de urina do grupo IE.....	82
Figura 2.26. Gráfico de escores PC3 (10,5%) x PC2 (17,2%) das amostras de urina do grupo IE após a retirada da amostra 296T-15.....	82
Figura 2.27. Gráfico de pesos das componentes PC2 e PC3 das amostras de urina do grupo IE destacando as variáveis que foram importantes para o resultado obtido.....	84
Figura 2.28. Gráfico de linhas dos dados de RMN de <sup>1</sup> H das amostras de urina do grupo IDE analisadas por PCA.....	85
Figura 2.29. Gráfico de escores das amostras de urina do grupo IDE a) Gráfico 3D [PC1 (31,8%) x PC2 (17,7%) x PC3 (6,8%)] b) Gráfico 2D [PC1 (31,8%) x PC3 (6,8%)]......	87
Figura 2.30. Gráfico de pesos das componentes PC2 e PC3 das amostras de urina do grupo IDE destacando as variáveis que foram importantes para o resultado obtido.....	89
Figura 3.1. Principais etapas envolvidas na biossíntese do poliisopreno [tese sa].....	96
Figura 3.2. Espectro típico de RMN de <sup>1</sup> H de uma amostra de látex.....	109
Figura 3.3. Espectro típico de RMN <i>g</i> COSY de uma amostra de látex.....	110
Figura 3.4. Espectro típico de RMN <i>g</i> HSQC de uma amostra de látex.....	110
Figura 3.5. Espectro de RMN de <sup>1</sup> H do látex com os sinais do quebrachitol em destaque.....	111
Figura 3.6. Estruturas químicas e deslocamentos químicos dos carboidratos rafinose e sacarose.....	115
Figura 3.7. Gráfico de linhas dos dados de RMN de <sup>1</sup> H das amostras de látex dos grupos RR e GG analisadas por PCA.....	118
Figura 3.8. Gráfico de escores PC1 (41,3%) x PC2 (15,8%) das amostras de látex dos grupos RR e GG.....	119
Figura 3.9. Gráfico de pesos da componente PC1 das amostras de látex dos grupos RR e GG destacando-se as variáveis mais importantes na separação.....	120
Figura 3.10. Dendograma referente à análise por HCA dos dados de RMN de <sup>1</sup> H das amostras de látex dos grupos RR e GG.....	121
Figura 3.11. Gráfico de escores PC1 (32,5%) x PC2 (15,7%) das amostras de látex dos grupos RR, GG, RG e GR.....	122
Figura 3.12. Gráfico de pesos PC1 (linha preta) e PC2 (linha vermelha), das amostras de látex dos grupos RR, GG, RG e GR.....	124

---

Figura 3.13. Gráfico de linhas dos dados de RMN de $^1\text{H}$ das amostras de látex dos diferentes clones de seringueira analisadas por PCA. ....	128
Figura 3.14. Gráfico de escores das amostras de látex dos diferentes clones de seringueira. a) Todos os clones PC1 (57,8%) x PC2 (8,1%) b) Clones IAC 501, IAC 503, IAC 504 e RIMM 600 PC1 (56,8%) X PC2 (10,7%) c) Clones IAC 500, IAC 502, IAC 505 e RIMM 60130	
Figura 3.15. Espectros de RMN de $^1\text{H}$ das amostras de látex do clone IAC 502.....	131
Figura 3.16. Gráfico de pesos PC1 (linha preta) e PC2 (linha vermelha), das amostras de látex dos diferentes tipos de clones. ....	133
Figura 3.17. Gráfico de linhas dos dados de RMN de $^1\text{H}$ das amostras de látex dos diferentes clones de seringueira analisadas por PCA. ....	137
Figura 3.18. Gráfico de escores PC2 (8,3%) x PC3 (4,1%) das amostras de látex de alta (A) e baixa (B) produção pertencentes ao mesmo tipo de clone (IAC 235).....	138
Figura 3.19. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ das amostras de látex do grupo B (baixa produção).139	
Figura 3.20. Gráfico de pesos, PC2 (linha preta) e PC3 (linha vermelha), das amostras de látex de alta e baixa produção de poli-isopreno pertencentes ao mesmo tipo de clone (IAC 235). ....	140

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 2.1 Os 10 países com o maior número de pessoas adultas diagnosticadas com DM em 2010 e estimativa para 2030.....	35
Tabela 2.2. Divisão dos grupos dos pacientes de acordo com o modelo de ingestão de erva-mate e intervenção dietética. ....	45
Tabela 2.3. Metabólitos identificados nas amostras de urina de humanos diagnosticados com diabetes e pré-diabetes.....	52
Tabela 2.4. Quantificação relativa (área do metabólito/área do TMSP-d4) dos metabólitos presentes nas amostras de urina de humano diagnosticado com diabetes mellitus tipo 2. ...	57
Tabela 2.5. Quantificação relativa (área do metabólito/área do TMSP-d4) dos metabólitos presentes nas amostras de urina de humano diagnosticado com pré-diabetes. ....	57
Tabela 3.1. Delineamento experimental das amostras de látex de enxerto e porta-enxerto. ....	103
Tabela 3.2. Parentais dos novos clones da série IAC 500 no Pólo Regional da APTA em Votuporanga/SP. ....	104
Tabela 3.3. Compostos identificados nas amostras de látex.....	112
Tabela 3.4. Quantificação relativa (área do metabólito/área do TSP-d4) dos metabólitos presentes nas amostras de látex de porta-enxerto e enxerto.....	126
Tabela 3.5. Quantificação relativa (área do metabólito/área do TMSP-d4) dos metabólitos presentes nas amostras de látex de diferentes clones de seringueira. ....	135
Tabela 3.6. Quantificação relativa (área do metabólito/área do TMSP-d4) dos metabólitos presentes nas amostras de látex de alta e baixa produção de poliisopreno provenientes do mesmo clone. ....	141

---

---

## RESUMO

ANÁLISE METABOLÔMICA VIA RMN: AMOSTRAS DE URINA E LÁTEX. A primeira parte desse trabalho teve como objetivo aplicar o conceito de análise metabolômica em amostras de urina de humanos diagnosticados com diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) e pré-diabetes (IGT) e que foram submetidos a um tratamento com infusões de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) utilizando a técnica de ressonância magnética nuclear. A DMT2 é o tipo de diabetes mais frequente e corresponde a aproximadamente 85-90% dos casos de DM. O Brasil é o quinto país com o maior número de pessoas diagnosticadas com DM e estima-se que em 2010 em torno de 40 mil pessoas no Brasil morreram por causa de diabetes. A erva-mate (*Ilex paraguariensis*) é uma árvore da família das aquifoliáceas, originária da região subtropical da América do Sul. A erva-mate é constituída por diversos fitoquímicos sendo que os mais importantes são os compostos fenólicos, as saponinas e as metilxantinas. O uso da erva-mate como alimento funcional é relativamente recente e estudos anteriores relataram que os extratos de *Ilex paraguariensis*, ricos em polifenóis, são capazes de inibir a formação dos produtos finais da glicação avançada. A técnica de ressonância magnética nuclear (RMN de  $^1\text{H}$  e bidimensionais) mostrou-se uma importante ferramenta na identificação e quantificação relativa dos principais metabólitos presentes nas amostras de urina dos pacientes diagnosticados com DMT2 e IGT. Os resultados obtidos para a quantificação relativa dos metabólitos alanina, DMA, citrato, creatinina, betaína e TMAO indicam que a ingestão de infusões de erva-mate pode auxiliar no tratamento da DM. A segunda parte desse trabalho teve como objetivo aplicar o conceito de

---

análise metabolômica em amostras de látex utilizando a ressonância magnética nuclear como ferramenta analítica para avaliar a influência de porta-enxerto sobre enxerto; a qualidade do látex de diferentes clones de seringueira e o látex de alta e baixa produção de poliisopreno do mesmo tipo de clone. A produção e o consumo de borracha natural no Brasil crescem gradativamente, no entanto a taxa de consumo é superior à produção gerando déficits e importações crescentes do produto. Os clones de seringueira no Brasil foram criados e estudados com a principal finalidade de se combater o mal das folhas da seringueira, no entanto trabalhos recentes visam também desenvolver clones com elevada produção de borracha assim como resistência a quebra pelo vento, maior precocidade e resistência às enfermidades do painel. A técnica de ressonância magnética nuclear (RMN de  $^1\text{H}$  e bidimensionais) mostrou-se uma importante ferramenta na identificação e quantificação relativa dos principais metabólitos presentes nas amostras de látex. No estudo da influência do porta-enxerto sobre enxerto foi possível verificar uma diferença entre as amostras de látex dos grupos RR e GG. As amostras de látex do grupo GR se assemelharam às amostras do grupo RR enquanto as amostras do grupo RG ficaram dispersas entre os grupos RR e GG. Dos diversos clones estudados nesse trabalho verificou-se que o clone IAC 505 foi o que mais se assemelhou ao clone testemunha do experimento RRIM 600. Através da análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  das amostras de látex do clone IAC 235, foi possível verificar que a principal diferença existente no perfil metabólico das amostras de alta e baixa produção de poliisopreno é a concentração de sacarose.

---

**ABSTRACT**

METABOLOMIC ANALYSES BY NMR: URINE AND LATEX SAMPLES. The aim of the first part of this work was to apply the concept of metabolomic analyses in urine samples obtained from humans diagnosed with type 2 diabetes mellitus (T2DM) and impaired glucose tolerance (IGT) and treated with yerba-mate (*Ilex paraguariensis*) infusions using nuclear magnetic resonance. T2DM is the most recurrent type of diabetes and corresponds to about 85-90% of DM cases. Brazil is the fifth country with the largest number of people diagnosed with DM and it was estimated that in 2010 about 40 thousand people died due to diabetes. Yerba-mate (*Ilex paraguariensis*) is a tree which belongs to the family aquifoliaceas and it is originated from the subtropical region of South America. Among several phytochemicals present in yerba-mate the most important are phenolic compounds, saponins and methylxanthines. The use of yerba-mate as a functional food is relatively recent and earlier studies have shown that aqueous extracts of *Ilex paraguariensis*, which are rich in phenolic compounds, are capable of inhibit the formation of the advanced glycation end-products. Nuclear magnetic resonance ( $^1\text{H}$  NMR and two-dimensional experiments) was capable of identify and quantify the major metabolites present in the human urine samples diagnosed with T2DM and IGT. The relatively quantification of the metabolites alanine, DMA, citrate, creatinine, betaína and TMAO showed that the intake of yerba-mate infusions could assist in the treatment of DM. The aim of the second part of this work was to apply the concept of metabolomic analyses in latex samples using the nuclear magnetic resonance technique as an analytical tool to evaluate the influence of rootstock on grafting, the quality of latex from different

rubber tree clones and the latex with high and low production of poliisoprene belonging to the same clone. The production and consumption of natural rubber in Brazil is gradually growing, however the consumption rate is superior to the production rate causing deficits and rising imports of the product. The rubber tree clones in Brazil were created and studied in order to fight South America Leaf Blight, however the focus of recent works have been the developments of clones with high poliisoprene production, wind resistance, better precocity, and panel disease resistance. Nuclear magnetic resonance ( $^1\text{H}$  NMR and two-dimensional experiments) was capable of identify and quantify the major metabolites present in the latex samples. In the study of the influence of rootstock on grafting was possible to distinguish the latex samples from the RR and GG groups. The latex samples from GR group are similar to the latex samples of RR group while the latex samples of RG group are spread between the RR and GG groups. From the several clones studied in this work it was possible to verify that the IAC 505 clone is the most similar to the experiment witness clone RIMM 600. Through the analysis of the  $^1\text{H}$  NMR spectrum of the IAC 235 latex samples was possible to verify that the most important difference between the latex samples with high and low production of poliisoprene is the concentration of sucrose.

# Capítulo 1

Introdução Geral

## 1.1. Introdução

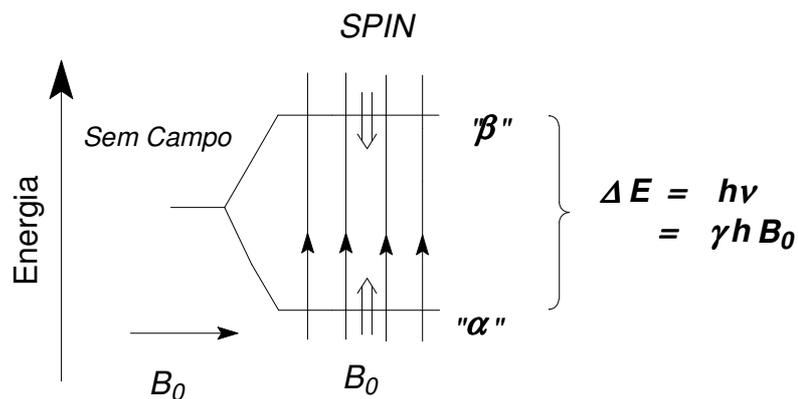
### 1.1.1. Ressonância Magnética Nuclear<sup>1-3</sup>

A teoria da espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foi introduzida em meados de 1930 pelo físico alemão Gorter<sup>4</sup>, mas somente em 1945 os físicos americanos Bloch e Purcell<sup>5,6</sup> descobriram a RMN na forma em que se aplica nos dias atuais. O uso da RMN na área de química não era apreciada até 1950 quando Proctor e Yu<sup>7</sup> introduziram os conceitos de deslocamento químico, contribuindo assim para elucidação estrutural de compostos orgânicos. O interesse principal da química é a elucidação estrutural de moléculas complexas e, especialmente para a análise de proteínas em solução, a RMN é uma ferramenta indispensável e seu uso como uma técnica analítica expandiu-se apenas nos últimos 20 anos.

#### 1.1.1.1. Spins e estados de energia

A espectroscopia de RMN se baseia nas propriedades magnéticas do núcleo atômico. As propriedades magnéticas de um núcleo são baseadas nos conceitos de spin nuclear e momento magnético do núcleo. Aproximadamente dois terços de todos os isótopos possuem momento magnético nuclear, entre eles  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{23}\text{Na}$  e  $^{31}\text{P}$ , e são caracterizados por um número quântico de spin  $I = \frac{1}{2}$  ou incrementos de  $\frac{1}{2}$ . A maioria dos isótopos estudados em RMN possuem número quântico de spin  $I = \frac{1}{2}$  como, por exemplo os isótopos  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{19}\text{F}$  e  $^{31}\text{P}$ .

Os núcleos dos isótopos com número quântico de spin  $I = 1/2$  possuem apenas dois estados de energia, comumente chamados de estado  $\alpha$  ou “alinhado com o campo magnético principal” onde  $I = 1/2$  e estado  $\beta$  ou “no sentido oposto ao estado  $\alpha$ ” onde  $I = -1/2$ . Na ausência de um campo magnético externo esses dois estados possuem o mesmo nível de energia e são ditos degenerados. No entanto, quando esses núcleos são expostos a um campo magnético estacionário externo ( $B_0$ ) ocorre uma separação de energia entre os estados  $\alpha$  e  $\beta$ , com uma pequena predominância do estado  $\alpha$ , estado de menor energia (**Figura 1.1**).



**Figura 1.1.** Representação dos estados de energia dos núcleos com spin  $I = 1/2$

Os núcleos em equilíbrio em um campo magnético serão distribuídos entre dois estados de energia de acordo com a equação de distribuição de Boltzmann.

$$\frac{N_{-1/2}}{N_{1/2}} = \exp\left(-\frac{\Delta E}{kT}\right)$$

Nesta equação  $N_{-\frac{1}{2}}$  e  $N_{\frac{1}{2}}$  representam as populações nos estados  $\beta$  e  $\alpha$ , respectivamente,  $k$  é a constante de Boltzmann e  $T$  é a temperatura absoluta. De acordo com esta distribuição haverá um pequeno excesso de núcleos no estado  $\alpha$ , uma vez que este estado é energeticamente mais favorável. É este excesso que é medido em RMN e um cálculo simples mostra que em um campo de 14,1T (frequência equivalente a 600 MHz para o hidrogênio) o excesso no estado  $\alpha$  será de aproximadamente 50 hidrogênios em um milhão. Uma vez que são esses 50 hidrogênios que fazem o sinal de RMN surgir, um grande número de hidrogênios é requerido para gerar um sinal apreciável, tornando assim a RMN uma técnica pouco sensível comparada a outras técnicas espectroscópicas. Além disso, a diferença de energia entre os dois estados, e que obviamente depende do campo magnético e da temperatura, é baixa e da ordem de 0,07 calorias/mol.

#### 1.1.1.2. Origem do sinal de RMN

Sob a influência de um campo magnético externo os spins começam a precessar em torno da direção do campo magnético de acordo com a equação:

$$\nu^0 = \frac{\gamma \cdot B_0}{2 \cdot \pi}$$

Onde,  $\nu^0$  é a frequência de precessão e  $\gamma$  é a razão magnetogírica. Para spins nucleares,  $\nu^0$  é chamada frequência de Larmor. A frequência de Larmor é proporcional à força do campo magnético aplicado ( $B_0$ ).

A diferença de energia entre os estados  $\alpha$  e  $\beta$  é regida pela equação de Planck-Einstein da mecânica quântica:

$$\Delta E = h\nu$$

Assim como em todas as formas de espectroscopia, um núcleo em um estado de baixa energia (estado  $\alpha$ ) pode absorver um fóton de energia eletromagnética e ser promovido a um estado de maior energia (estado  $\beta$ ). O fóton deve possuir a energia exata existente entre a diferença entre os dois estados de energia. Essa energia corresponde a uma frequência específica de radiação eletromagnética, a frequência de Larmor.

Assim combinado as duas equações se obtém:

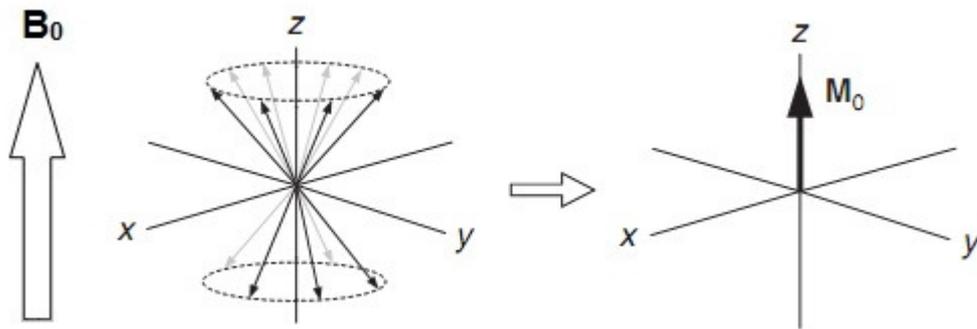
$$\Delta E = h\nu = \frac{h \cdot \gamma \cdot B_0}{2 \cdot \pi}$$

a equação da ressonância magnética nuclear, onde se evidencia que a diferença de energia entre os estados  $\alpha$  e  $\beta$  é proporcional ao campo magnético aplicado.

### 1.1.1.3. Vetor magnetização resultante e pulso de radiofrequência

A magnetização resultante, ou magnetização longitudinal, é a soma da contribuição da precessão de todos os spins em seus respectivos estados de energia (**Figura 1.2**). Uma vez que os spins são randomicamente distribuídos em

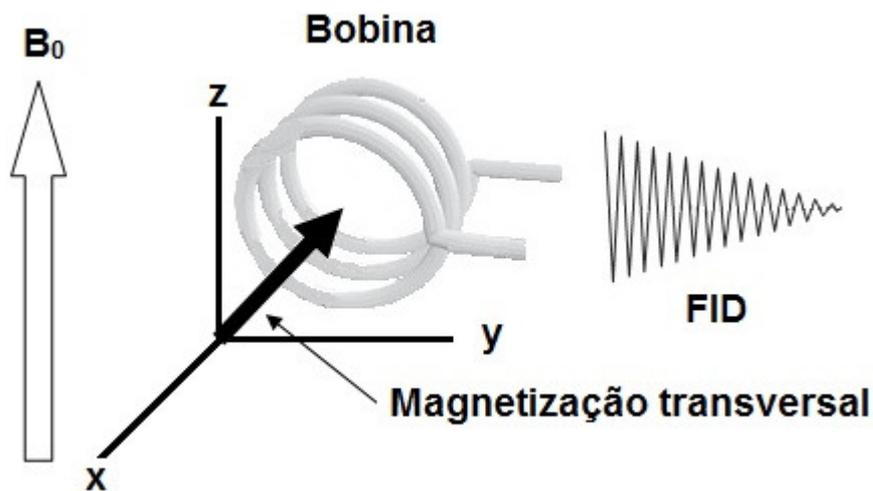
torno de  $B_0$ , o vetor magnetização resultante ( $M_z = M_0$ ) é posicionado exatamente na direção do eixo de  $B_0$ . É comum descrever a magnetização resultante na direção do eixo  $z$  em um sistema de coordenadas  $xyz$ , onde o plano  $xy$  é ortogonal a  $B_0$  e é de fato o local onde o sinal é detectado depois de uma perturbação com um pulso de radiofrequência (RF).



**Figura 1.2.** Representação do vetor magnetização resultante ( $M^0$ ) sob a influência de um campo magnético externo  $B^0$  na direção do eixo  $z$ .

Quando uma amostra está em equilíbrio em um campo magnético não há sinal observável uma vez que o vetor magnetização resultante,  $M_0$ , não tem componente no plano  $xy$  ( $M_x = M_y = 0$ ). O objetivo de um pulso de radiofrequência é perturbar o sistema para se obter um sinal observável de RMN, convertendo a magnetização no eixo  $z$  em magnetização no plano  $xy$ , chamada de magnetização transversal. Um pulso de RF com duração precisa e suficiente para rotacionar o vetor magnetização resultante para plano  $xy$  irá gerar o maior sinal possível. Este pulso é conhecido como pulso de  $90^\circ$  e um pulso com duração longa o suficiente

para rotacionar o vetor magnetização resultante para o eixo z negativo (-z) é conhecido como pulso de 180°. Uma vez no plano xy, e terminado o efeito do pulso de radiofrequência, o vetor magnetização transversal precessando em torno de  $B_0$  irá retornar ao seu estado inicial, induzindo assim um sinal oscilante no detector localizado no plano xy (**Figura 1.3**). A corrente elétrica oscilante induzida pela perda de coerência do vetor magnetização transversal (plano xy), é que irá originar o sinal de RMN ou FID (*free induction decay* - decaimento livre por indução).



**Figura 1.3.** Diagrama de coordenadas mostrando a bobina de RF e detecção, e a magnetização transversal obtida após a aplicação de um pulso de 90 graus<sup>1</sup>.

#### 1.1.1.4. Relaxação

Depois que um sistema em equilíbrio é perturbado por um pulso de RF o sistema de spins começará a perder coerência no plano xy, um processo conhecido como relaxação spin-spin ou relaxação transversal. A perda de coerência

é exponencial e é descrita por uma constante de tempo conhecida como  $T_2$ . Este processo ocorre devido à troca de energia entre os spins e também devido à falta de homogeneidade do campo magnético externo ( $B_0$ ), o qual afetará moléculas com hidrogênios que possuem labilidade e altas taxas de difusão como a molécula da água. Simultaneamente com a perda de coerência no plano  $xy$  os hidrogênios retornam a sua condição de equilíbrio ao longo do eixo  $z$  devido à influência do campo magnético externo ( $B_0$ ). O tempo necessário para os núcleos retomarem sua distribuição inicial de equilíbrio entre os dois estados de energia depende da probabilidade de troca de energia entre os spins e o sistema (rede). Este processo é caracterizado por um mecanismo de relaxação conhecido como relaxação spin-rede ou relaxação longitudinal descrito por uma constante de tempo  $T_1$ .

#### **1.1.1.5. Deslocamento químico**

Os núcleos em diferentes posições de uma molécula não experimentam exatamente a mesma influência do campo magnético externo ( $B_0$ ) devido a um efeito conhecido como blindagem e desblindagem. Quando colocado em um campo magnético a movimentação dos elétrons gera um campo magnético induzido, que dependendo da sua intensidade e posição, podem ser contrário ou favorável ao campo magnético principal ( $B_0$ ). Assim, diferentes valores de blindagem refletem diferentes ambientes com diferentes densidades eletrônicas da molécula. Com isso, núcleos em diferentes ambientes eletrônicos manifestam diferentes campos magnéticos efetivos ( $B_{ef}$ ) e, portanto ressonam em frequências ligeiramente diferentes um dos outros, cujo fenômeno é conhecido como deslocamento químico.

A relação entre o grau de blindagem/desblindagem e a frequência de ressonância resultante é dada por:

$$\nu = \frac{\gamma \cdot B_0}{2 \cdot \pi} * (1 - \sigma)$$

O termo  $\sigma$  é um número pequeno adimensional conhecido como constante de blindagem.

A frequência de precessão de um determinado núcleo é proporcional à força do campo magnético aplicado ( $B_0$ ). Desse modo, o valor da frequência de precessão de um dado núcleo em um campo de 9,4 Tesla (400 MHz para a frequência do hidrogênio), terá o seu valor dobrado quando passamos para um equipamento de 18,8 Tesla (800 MHz para a frequência do hidrogênio). Portanto a frequência de precessão dos núcleos não é um parâmetro prático para se trabalhar. Ao invés de se trabalhar com a frequência de precessão, se trabalharmos com o deslocamento químico, expresso pela equação abaixo, onde se leva em consideração a frequência de precessão e a frequência de uma referência convenientemente escolhida ( $\nu_{ref}$ ), multiplicado por  $10^6$  (um milhão), teremos uma medida adimensional e que não depende do campo magnético externo ( $B_0$ ) aplicado. Esse valor adimensional é reportado em ppm e é representado pelo símbolo delta ( $\delta$ ).

$$\delta = \frac{(\nu - \nu_{ref}) \times 10^6}{\nu_{ref}}$$

O composto de referência geralmente utilizado é o tetrametilsilano (TMS) por apresentar diversas vantagens. O TMS é quimicamente inerte, simétrico, volátil (ponto de ebulição, 27°C) e solúvel na maioria dos solventes orgânicos. Além disso, possui apenas um sinal de absorção, é relativamente fino, intenso e seus hidrogênios são mais blindados que a maioria dos hidrogênios encontrados para os compostos orgânicos de uma maneira geral. Para solventes como a água o TMS não pode ser utilizado devido à sua baixíssima solubilidade e assim utiliza-se outro padrão de referência, como por exemplo, [trimetilsililpropionato de sódio (TMSP-d<sub>4</sub>)]. Tanto o TMS quanto TMSP-d<sub>4</sub> são referenciados como  $\delta = 0$  ppm.

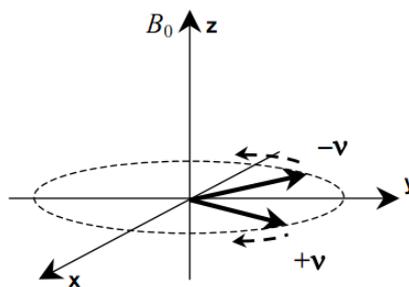
Os valores dos deslocamentos químicos permitem distinguirmos núcleos em diferentes ambientes eletrônicos e torna a espectroscopia de RMN uma ferramenta poderosa para a determinação das estruturas das moléculas e como uma ferramenta analítica geral.

#### **1.1.1.6. Detecção em quadratura**

O sinal detectado em RMN é uma corrente induzida na bobina de detecção pela perda de coerência do vetor magnetização transversal. A frequência de Larmor não é uma medida interessante, mas sim a diferença no valor da constante de blindagem e conseqüentemente o valor do deslocamento químico. Assim, no detector, a frequência de Larmor (alguns MHz) é subtraída da frequência detectada para cada spin, resultando em um sinal de áudio (frequências dos deslocamentos químicos, alguns kHz). Na prática é a frequência chamada de frequência carreadora que está posicionada no centro das frequências de interesse

que é subtraída de cada spin, de modo que se obtêm frequências positivas e negativas de diferentes spins nas moléculas.

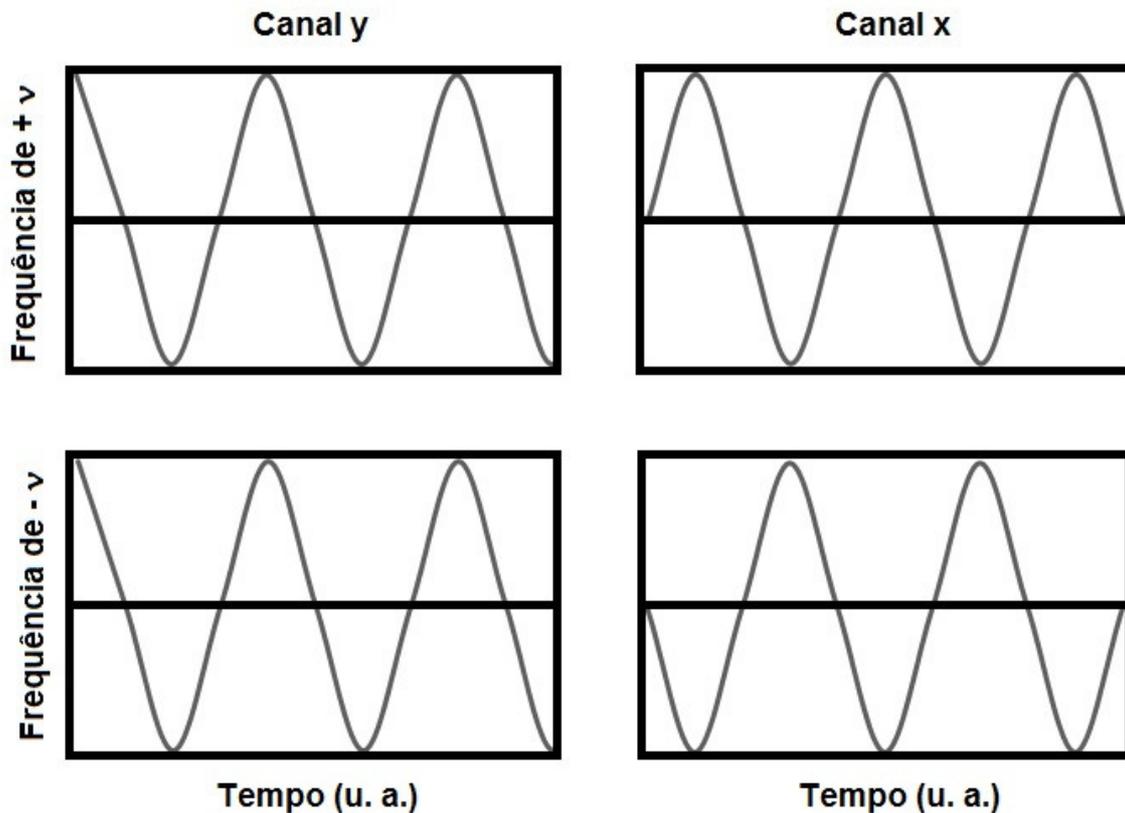
A **Figura 1.4** ilustra um exemplo onde dois spins têm uma frequência  $+v$  e outro  $-v$  com relação à frequência carreadora. Para o detector isso significa que os spins possuem movimento no sentido horário e anti-horário no plano  $xy$ , e esta é a razão para se usar um sistema de detecção com dois canais simultâneos, os quais são mutuamente defasados de  $90^\circ$ .



**Figura 1.4.** Exemplo da evolução de dois spins relativo à frequência carreadora. Um tem uma frequência maior e o outro menor do que a frequência carreadora.

Este sistema é chamado detecção em quadratura e permite a discriminação entre um spin com uma frequência  $+v$  e outro  $-v$ , o qual não seria possível sem o uso deste artifício. Isso é ilustrado na **Figura 1.5** onde os sinais de dois spins com frequência  $-v$  e  $+v$  em cada um dos canais são detectados. Por questão de simplicidade os sinais são mostrados como se o processo de relaxação não ocorresse. Como pode ser observado, os sinais do detector localizado no canal

y são idênticos para os dois spins enquanto os sinais no canal defasado de  $90^\circ$  (canal x) são diferentes permitindo assim a diferenciação entre os dois sinais.



**Figura 1.5.** Sistema de detecção em quadratura para dois spins com frequência  $+\nu$  e  $-\nu$ .

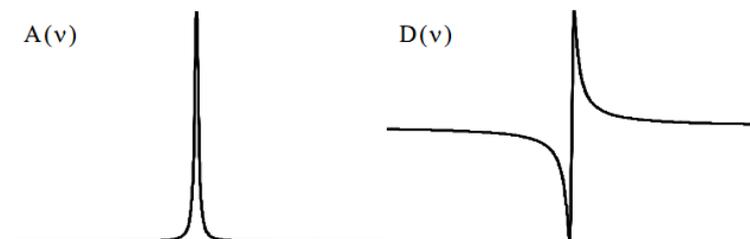
#### 1.1.1.7. Transformada de Fourier

Nos equipamentos de RMN modernos, os sinais são medidos no domínio do tempo, ou seja, como uma função do tempo. Como este sinal é uma superposição de ondas senoidais que perdem sua intensidade devido ao processo de relaxação, um artifício matemático denominado transformada de Fourier é utilizado para se obter um espectro no domínio da frequência. Os sinais dos dois

canais são conhecidos como parte real e imaginária de um sinal complexo, permitindo o uso da transformada de Fourier complexa. Antes e depois da transformada de Fourier várias operações matemáticas são utilizadas de modo a se obter um espectro com melhor relação sinal-ruído, melhor resolução entre picos e correção de artefatos, tais como variações da linha de base. Tais operações incluem preenchimento com zeros (*zero filling*), funções de apodização (*window function*), entre outros.

#### 1.1.1.8. Correção de fase

Aplicando-se a transformada de Fourier complexa o resultado que se obtém é também complexo e consiste de duas partes, uma real e outra imaginária,  $S(\nu) = R(\nu) + i.I(\nu)$ . Convencionalmente  $R(\nu)$  se refere ao espectro de absorção,  $A(\nu)$ , e  $I(\nu)$  se refere ao espectro de dispersão,  $D(\nu)$ , as formas dos quais são mostradas na **Figura 1.6**.



**Figura 1.6.** Os sinais de ressonância no modo absorptivo e dispersivo.

Os espectros de absorção e dispersão são combinações lineares dos sinais reais e imaginários e se relacionam de acordo com a equação:

$$A(\nu) = R(\nu) \cos(\phi) + I(\nu) \sin(\phi)$$

$$D(\nu) = -R(\nu) \sin(\phi) + I(\nu) \cos(\phi)$$

O termo  $\phi$  é chamado erro de fase e surge devido à diferença de fase entre o detector e a frequência carreadora. O erro de fase não é constante para o espectro todo e conseqüentemente é dependente da frequência conforme a equação:

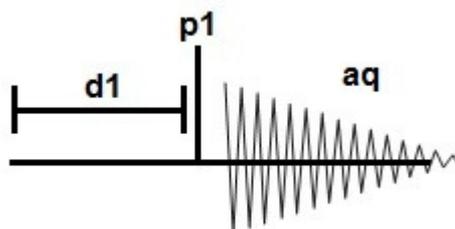
$$\phi(\nu) = \phi_0 + \nu \cdot \phi_1$$

Os termos  $\phi_0$  e  $\phi_1$  são chamados valores de correção de fase de ordem zero e primeira ordem, respectivamente. Na prática a correção de fase é feita através de programas de processamento onde, o operador tenta obter um espectro real com sinal no modo absorptivo através do ajuste dos valores de  $\phi_0$  e  $\phi_1$ .

#### 1.1.1.9. Experimentos pulsados

A possibilidade de desenvolver experimentos pulsados para a seleção de sinais específicos é a base para a grande diversidade de aplicações da RMN. O experimento pulsado mais simples é o experimento de um único pulso não seletivo.

Este experimento pulsado é utilizado quando a proposta do experimento é obter uma visão geral de todos os núcleos de um dado tipo em uma amostra e é esquematicamente descrito na **Figura 1.7**.



**Figura 1.7.** Experimento de um único pulso<sup>8</sup>.

O experimento consiste de um tempo de espera ( $d1$ ) necessário para que os spins atinjam a condição de equilíbrio. Em seguida aplica-se um pulso de radiofrequência ( $p1$ ) de  $90^\circ$ , por exemplo, acompanhado por um tempo de medida do sinal ( $aq$ ), o qual decresce exponencialmente devido aos processos de relaxação. A notação  $90_x$  implica que um pulso de RF de  $90^\circ$  na direção do eixo  $x$  positivo foi aplicado. A escala de tempo da **Figura 1.7** não reflete os tempos utilizados nos experimentos, uma vez que os tempos  $d1$  e  $aq$  são da ordem de segundos enquanto  $p1$  são alguns poucos microssegundos.

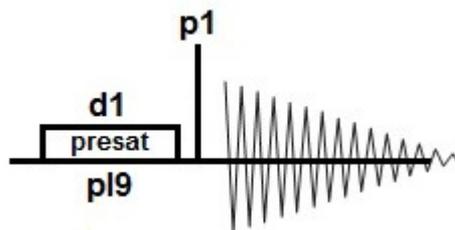
#### 1.1.1.10. Supressão do sinal da água

Os solventes utilizados em RMN frequentemente apresentam um pico muito intenso e largo, interferindo na observação dos outros sinais presentes na amostras. As maiorias das amostras biológicas contem grande quantidade de água

e conseqüentemente produzem um sinal muito intenso correspondente a aproximadamente 110M em hidrogênios. Isto pode gerar várias dificuldades, por exemplo, alguns sinais podem ser sobrepostos pelo sinal intenso da água, e não é possível fazer a integração dos sinais perto do sinal da água, pois o programa de processamento de espectros tem dificuldades em processar sinais pouco intensos junto com sinais intensos. A supressão do sinal da água pode ser realizada de várias maneiras, dependendo da sequência de pulso utilizada.

Muitas técnicas diferentes foram desenvolvidas para suprimir o sinal da ressonância da água no espectro de RMN de  $^1\text{H}$ . O método geralmente utilizado para observar os sinais da amostra em soluções aquosas é o método da pré-saturação. Este método se baseia em diminuir o vetor magnetização resultante da água antes do pulso de observação (p1).

As técnicas de pré-saturação irradiam (saturam) o sinal do solvente durante o tempo de espera (d1) antes que pulso de observação seja aplicado (**Figura 1.8**).



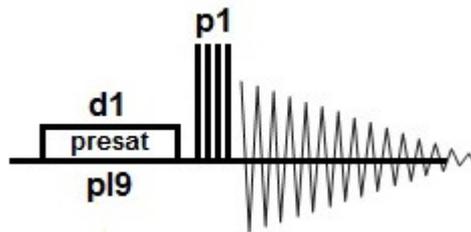
**Figura 1.8.** Sequência de pulso de pré-saturação, a qual irradia o sinal do solvente durante o tempo de espera<sup>8</sup>.

As sequências de pulso de pré-saturação utilizam um pulso de radiofrequência relativamente longo e de baixa potência para seletivamente saturar uma frequência específica, neste caso a água. Este pulso contínuo de baixa potência excita o sinal dos hidrogênios da água de tal maneira que nenhum sinal pode ser completamente acumulado e detectado. Talvez a única desvantagem da pré-saturação é que as ressonâncias de todos os hidrogênios que apresentam troca química com a água serão saturados também (por exemplo, hidrogênios de amida, ácidos carboxílicos, aminas e hidroxilas, os quais, em ambientes predominantemente aquosos, não podem mais serem observados via RMN).

O experimento mais simples de pré-saturação utiliza a sequência de pulso ZGPR (denominação Bruker) (**Figura 1.8**). Após a aplicação de um pulso de baixa potência na frequência da água durante o tempo de espera ( $d_1$ ), um pulso de RF de duração muito curta ( $\sim 10 \mu\text{s}$ ) é aplicado na frequência de ressonância dos hidrogênios que não foram pré-saturados, o qual rotaciona o vetor magnetização resultante  $M_0$  para o plano  $xy$ . O sinal resultante é detectado e somente um pequeno resíduo do sinal da água é observado.

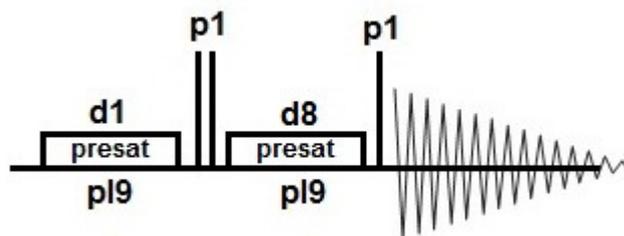
As três sequências de pulso para a pré-saturação do sinal da água mais utilizadas são: ZGCPPR, NOESYPR1D, e NOESYGPPR1D (denominação Bruker). A sequência de pulso ZGCPPR difere da sequência de pulso ZGPR somente na segunda sessão do experimento (**Figura 1.9**). Ao invés de um único pulso, uma série de pulsos de  $90^\circ$ , todos com a mesma duração, porém com fases diferentes, é aplicada. Isto resulta no mesmo ângulo de rotação, mas com maior tolerância a erros causados por falta de homogeneidade de  $B_1$  ou precisão na frequência de ressonância. No final, um sinal residual de água bastante fino

permanecerá e substâncias com deslocamentos químicos nas suas vizinhanças podem ser melhores observados.



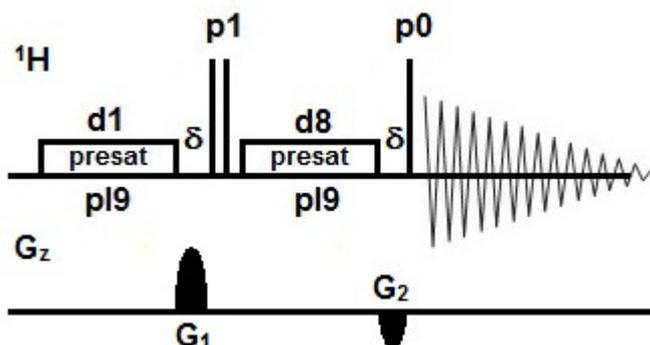
**Figura 1.9.** Sequência de pulso ZGCPPR<sup>8</sup>

As sequências de pulso NOESY, assim como as sequências de pulso ZG apresentadas anteriormente, suprimem o sinal da água pela aplicação de um pulso de baixa potência na frequência dos hidrogênios da água durante o tempo de espera (d1). Depois do tempo de espera dois pulsos curtos de 90° (~10 μs) conectados em série são aplicados na frequência de ressonância dos hidrogênios, transferindo a magnetização inicial do eixo z positivo para o eixo z negativo. Para reduzir interferências do sinal do solvente, pré-saturação na frequência de ressonância da água é também feita durante todo o tempo de mistura (d8). Um pulso final de 90° é aplicado para que a magnetização seja transferida para o plano xy e o sinal seja medido (**Figura 1.10**). Os ciclos de fase dos três pulsos de 90° e a bobina de detecção são pré-configurados de tal maneira que o sinal da água é eficientemente suprimido e o espectro é praticamente ausente de artefatos.



**Figura 1.10.** Sequência de pulso NOESYPR1D<sup>8</sup>.

A única diferença entre as sequências NOESYPR1D e NOESYGPPR1D é a presença de pulsos de gradientes aplicados logo após os dois períodos de pré-saturação (d1 e d8) conforme ilustrado na **Figura 1.11**. Estes pulsos de gradiente são uma ferramenta extra para suprimir eficientemente o sinal intenso da água nos experimentos de RMN para amostras utilizando esse solvente.



**Figura 1.11.** Sequência de pulso NOESYGPPR1D<sup>8</sup>.

#### 1.1.1.11 Processamento dos espectros de RMN

Variações experimentais na obtenção de espectros de RMN para a construção de um banco de dados causam dificuldades na determinação quantitativa da altura e ou da área do sinal e complicações nas análises

quimiométricas. Pequenas variações experimentais incluem pequenas diferenças na fase dos espectros, na resolução dos picos (*shimming*), na linha de base e nos valores de deslocamento químico. Estas variações resultam de alterações quimicamente induzidas, instabilidade instrumental e falta de homogeneidade do campo magnético externo ( $B_0$ ). Por esta razão o processamento dos espectros de RMN é absolutamente importante quando se deseja trabalhar com RMN quantitativa onde irá se aplicar ferramentas estatísticas.

As correções das variações espectrais podem ser feitas de modo manual ou automática sendo que a correção manual demanda muito tempo quando se trabalha com grandes bancos de dados. Vários algoritmos e a maioria dos programas computacionais comerciais de RMN incluem métodos para se corrigir automaticamente as flutuações da linha de base e os ajustes de erros de fase<sup>9-11</sup>. No entanto estes métodos parecem funcionar corretamente apenas para regiões espectrais com ressonâncias bem resolvidas e não no caso de regiões com muitos sinais sobrepostos, como os espectros de matrizes biológicas. Por esta razão os ajustes de fase e flutuações da linha de base destes complexos espectros de RMN são frequentemente corrigidos manualmente.

### **1.1.2. Análise metabolômica**

A metabolômica é uma das ciências “ômicas” emergente que consiste no estudo do metaboloma de um ser vivo. O metaboloma é definido como o conjunto de todos os compostos de baixa massa molecular (< 1500 Daltons) que são sintetizados ou modificados por uma célula viva ou um organismo. A metabolômica

---

quando combinada a informação de sequenciamento genômico ou a qualquer outra abordagem sistêmica (transcriptômica, proteômica ou fluxômica), se torna uma ferramenta única na ciência biológica moderna.

A análise metabolômica é definida como a identificação e quantificação de todos os metabólitos presentes em um sistema biológico. Na prática o que se observa é que a maioria dos estudos metabolômicos se restringe ao uso de técnicas analíticas capazes de fornecer uma visão geral dos metabólitos produzindo assim uma impressão digital metabólica do sistema (do inglês *metabolic fingerprinting*) e buscando fatores discriminantes entre os grupos estudados através da quimiometria<sup>12</sup>.

Diversas técnicas de detecção têm sido empregadas nas análises metabolômicas, entre as quais as que mais se destacam são a espectrometria de massas e a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)<sup>13,14</sup>. Essas técnicas ou são utilizadas em sua forma direta ou hifenadas a sistemas de separação como a cromatografia líquida ou gasosa. A principal vantagem da espectrometria de massas é sua alta sensibilidade e a capacidade de detecção de centenas de metabólitos em uma única medida. A RMN se destaca por sua reprodutibilidade, curto tempo de análise e principalmente por sua capacidade de identificação estrutural.

### **1.1.3. Análise de urina via RMN de <sup>1</sup>H**

A urina humana, assim como a urina de outros animais, é um líquido produzido pelo corpo por um processo de filtração do sangue. É composta

---

principalmente de água (95% em média) e é o produto final resultante da excreção renal. Os rins exercem uma função importante na homeostase do corpo e regulam a eliminação de substâncias orgânicas e inorgânicas. O ambiente interno do corpo é mantido constante através da variação do perfil de eliminação da urina. Variações na composição da urina indicam uma multiplicidade de processos bioquímicos no rim e conseqüentemente no corpo inteiro. A presença em quantidades excessiva de substâncias na urina como açúcar, albumina e também variações nas concentrações de substâncias habituais, podem ser indicativos de algumas doenças. Assim a urina apresenta um alto potencial de diagnóstico. Sendo a urina um fluido corporal facilmente acessível, sua análise via espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$  tem sido extensivamente investigada com muitos resultados clinicamente relevantes<sup>15-17</sup>.

A urina é constituída de uma solução aquosa de resíduos metabólicos, tais como uréia, sais dissolvidos e material orgânico. Devido à grande quantidade de água o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  apresenta um sinal intenso e largo. Este efeito pode ser minimizado através da aplicação de uma sequência de pulso específica que suprime a ressonância dos hidrogênios da água (seção 1.1.10).

O preparo de amostra é geralmente limitado à remoção de sobrenadantes (por exemplo, proteínas), centrifugação (remoção de resíduos sólidos), padronização do pH (adição de solução tampão) e a adição de um padrão interno (geralmente TMSP- $\text{d}_4$ )

A sensibilidade da técnica está na faixa de micro molar para a maioria dos metabolitos estudados.

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  das amostras de urina são bastante complexos, uma vez que centenas de substâncias de baixa massa molecular são

---

detectadas simultaneamente. Assim, para uma sinalização precisa dos sinais dos metabólitos e para uma eficiente comparação entre espectros, problemas adicionais, tais como a forte dependência do pH de várias substâncias não podem ser ignorados.

### **1.1.3.1. Fatores que afetam o deslocamento químico dos metabólitos**

Um grande problema na espectroscopia de RMN é a variação do deslocamento químico dos metabólitos presentes na amostras. Esta variação é induzida por vários fatores, de modo que algumas considerações devem ser feitas antes da obtenção dos espectros.

Os valores esperados de pH de amostras de urina de humanos saudáveis estão na faixa de 5,5-6,5. No entanto, o pH da urina frequentemente varia, como por exemplo em situações de estresse fisiológico, levando a uma extensão da faixa de pH para 4,6-8,0<sup>18</sup>. De acordo com Bales e colaboradores<sup>19</sup> esta variação de pH afeta principalmente o deslocamento químico dos metabólitos com valores de  $pK_a$  próximos a esta faixa, tais como citrato e creatina. Em solução aquosa esses metabólitos se ionizam e devido à sua alta constante dielétrica formam ligações de hidrogênio com as moléculas de água. Assim a densidade eletrônica ao redor dos átomos envolvidos é deformada e conseqüentemente seu campo local é afetado. Em solventes polares os hidrogênios ácidos tendem a ser mais polarizados, ou seja, serão mais desblindados em relação ao campo magnético externo ( $B_0$ ) e apresentarão maiores valores de deslocamento químico.

A variação do deslocamento químico dos metabólitos induzidos pela variação do pH é corrigido na maioria das vezes através da adição de uma solução tampão com valor de pH conhecido. Assim a sinalização dos metabólitos e comparação entre espectros só podem ser realizadas em amostras que foram adquiridas com as mesmas condições experimentais.

Outro fator que altera o deslocamento químico dos metabólitos em amostras de urina é a concentração de íons metálicos. A presença de sal na água altera sua constante dielétrica e conseqüentemente a solução se torna mais polar, de modo que os hidrogênios ácidos serão mais polarizados. Estudos anteriores mostraram que a força iônica da urina de humanos saudáveis difere de um fator de aproximadamente  $10^{20}$ . A primeira medida a ser tomada é durante o preparo da amostra. A solução tampão adicionada na urina é preparada com uma concentração elevada de eletrólitos de modo que sua concentração inicial possa ser desprezada. Outra medida é o ajuste de *tunning* e *matching* do circuito RF da sonda do espectrômetro.

As amostras de urina geralmente apresentam baixa concentração de proteínas e raramente surgem dificuldades experimentais devido à sua presença. No entanto, se a urina contem altas concentrações de proteínas, como no caso de proteinúria, isto pode resultar no alargamento dos sinais dos compostos de baixa massa molar que se ligam a estas proteínas<sup>20</sup>. Moléculas com alta massa molar como as proteínas, as quais apresentam maiores tempos de correlação comparado aos metabólitos, possuem tempo de relaxação transversal ( $T_2$ ) mais curto. Sendo assim seus spins relaxam mais rápidos resultando no alargamento dos seus sinais e conseqüentemente de moléculas que se ligam a ela<sup>21</sup>. As proteínas são removidas

das amostras de urina através da retirada do sobrenadante e durante a etapa de centrifugação.

A temperatura altera a viscosidade da solução, que por sua vez altera o deslocamento químico dos metabólitos presentes no meio. Assim durante a aquisição dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  deve se trabalhar com a temperatura controlada.

#### **1.1.4. Quimiometria aplicada à RMN de $^1\text{H}$ <sup>22,23</sup>**

Antes de se analisar um espectro de RMN de  $^1\text{H}$  algumas considerações devem ser feitas. Um espectro de RMN de  $^1\text{H}$  é amplamente informativo uma vez que cada sinal do espectro reflete uma posição e ambiente eletrônico único de cada molécula. Os sinais são normalmente muito finos e contém informação dos hidrogênios de sua vizinhança, os quais se manifestam através da multiplicidade do sinal original (*splitting*). Apesar da grande quantidade de substâncias presentes em uma amostra complexa como a urina, estes sinais são normalmente separados na linha de base, de acordo com seus respectivos deslocamentos químicos.

A obtenção de espectros de RMN de  $^1\text{H}$  são experimentos relativamente rápidos, uma vez que seus núcleos são um dos mais abundantes em RMN e fornecem conseqüentemente alta relação sinal-ruído, permitindo assim a análise de variados tipos de amostras. Em questão de minutos é possível se obter um espectro com centenas de sinais com boa dispersão e alta sensibilidade.

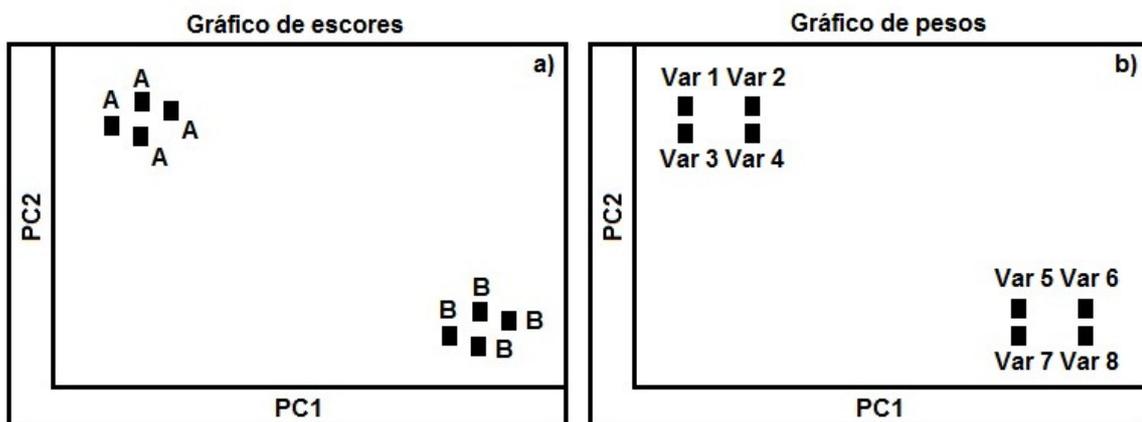
Calcula-se que em torno de 300 frequências de ressonância estejam presentes em um espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de uma amostra complexa como a urina. Uma vez que o número de amostras necessário para se construir um banco de dados robusto é bastante extenso (em torno de 100 amostras em triplicata), a análise destes espectros se torna bastante laboriosa. Estes espectros muitas vezes contêm informações que não são perceptíveis através da simples inspeção visual. Assim, o uso de programas computacionais estatísticos tem auxiliado na obtenção desses resultados. Uma estratégia amplamente empregada nesses estudos são os métodos quimiométricos.

A quimiometria é uma ferramenta estatístico-matemática, que em conjunto com diferentes métodos químico-analíticos, possibilita a análise de um grande número de variáveis presentes em um banco de dados. Neste trabalho foi realizada apenas uma análise exploratória do banco de dados. A análise exploratória é utilizada primeiramente para fazer uma avaliação inicial dos dados e revelar quais amostras são semelhantes ou diferentes entre si através da visualização de agrupamentos. Dentre as diversas técnicas quimiométricas exploratórias encontradas na literatura as que foram utilizadas neste trabalho são: Análise de Componentes Principais (PCA, *Principal Component Analysis*) e Análise de Agrupamentos Hierárquicos (HCA, *Hierarchical Cluster Analysis*).

#### **1.1.4.1. Análise de Componentes Principais (PCA)**

A PCA é um procedimento matemático que converte um banco de dados de variáveis possivelmente correlacionadas em um novo banco de dados com

dimensionalidade reduzida e variáveis não correlacionadas, chamadas componentes principais (PC). Essa conversão é feita através de uma combinação linear das variáveis originais de modo que a primeira componente principal possua a maior variância possível do banco de dados e por sua vez cada componente sucessiva possua maior variância que a próxima e com a condição de serem ortogonais entre si (não correlacionada). No novo sistema de coordenadas, onde cada eixo é representado por uma componente principal, cada amostra possui um valor (*score*) determinado em cada PC, de acordo com o processo de combinação linear. A **Figura 1.12a** apresenta um gráfico de escores hipotético definido pelas componentes principais PC1 e PC2. O gráfico de pesos, apresentado na **Figura 1.12b**, indica a contribuição de cada variável original de acordo com a PC representada.



**Figura 1.12.** Representação gráfica dos resultados da análise de PCA. a) Gráfico de escores b) Gráfico de pesos.

#### 1.1.4.2. Análise de Agrupamento Hierárquico (HCA)

Na análise de agrupamento hierárquico distâncias entre pares de amostras (variáveis) são calculados e comparados. Quando a distância entre as amostras são relativamente pequenas significa que as amostras são semelhantes entre si. Amostras não-semelhantes serão separadas por longas distâncias. Essa semelhança é dependente do método utilizado para se calcular a distância entre as amostras. O método pra se calcular a distância entre as amostras mais utilizado e a distância euclidiana. A distância euclidiana é definida como a distância geométrica em espaço multidimensional e é calculada de acordo com a seguinte fórmula:

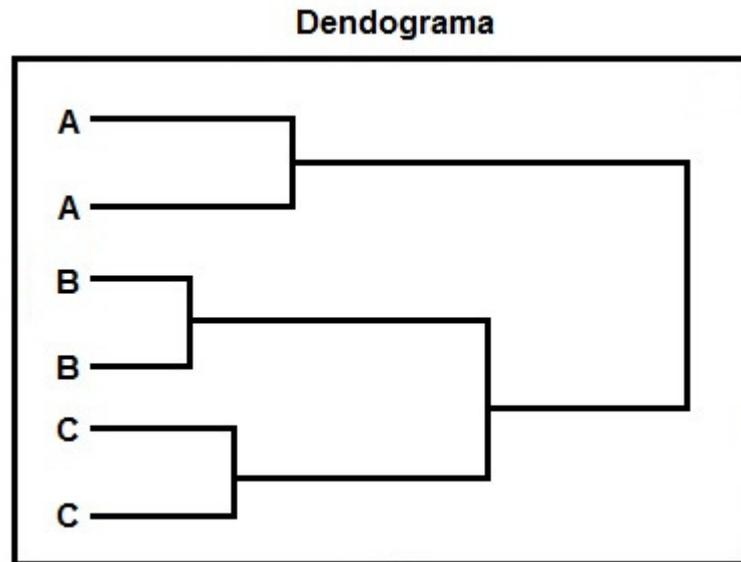
$$\text{distância}(x,y) = \left\{ \sum_i (x_i - y_i)^2 \right\}^{1/2}$$

A conexão entre os grupos de amostras é feita pelo método de ligação. Vários métodos de ligação são utilizados, entre eles destaca-se: Ligação simples, Ligação completa e *incremental*. A equação utilizada no método de ligação incremental é apresentada abaixo:

$$d_{AB \Rightarrow C} = \left( \frac{(n_A + n_C)d_{AC}^2 + (n_B + n_C)d_{BC}^2 - n_C d_{AB}^2}{n_A + n_B + n_C} \right)^{1/2}$$

Os resultados da análise de agrupamentos hierárquicos são apresentados sob a forma de dendogramas, onde pode ser observado o grau de

similaridade existente entre as amostras. Um dendograma hipotético é apresentado na **Figura 1.13**.



**Figura 1.13.** Dendograma hipotético apresentado pela análise de agrupamentos hierárquicos.

#### 1.1.4.3. Preprocessamento dos dados

A etapa de preprocessamento dos dados é muito importante em qualquer análise quimiométrica e é definida como qualquer manipulação matemática realizada nos dados antes da utilização do tratamento estatístico em si. O preprocessamento é utilizado para reduzir ou remover fontes irrelevantes de variações (sistemáticas e randômicas) as quais não podem ser consideradas na análise quimiométrica. Estas ferramentas normalmente são escolhidas de acordo com o banco de dados utilizado.

As ferramentas de preprocessamento são divididas em dois grupos dependendo se elas são aplicadas nas amostras (linhas) ou nas variáveis (colunas). As

ferramentas de pré-processamento das amostras operam em cada amostra separadamente considerando todas as variáveis ao mesmo tempo enquanto as ferramentas de pré-processamento de variáveis operam em cada variável separadamente considerando todas as amostras ao mesmo tempo. Dentre as várias ferramentas de pré-processamento de amostras existentes as mais utilizadas são normalização e correção da linha de base e dentre as ferramentas de pré-processamento de variáveis as mais utilizadas são centralização na média e a ponderação de variáveis.

O processo denominado auto-escalamento se refere ao pré-processamento aplicado em ambos os conjuntos, amostras e variáveis. Esse processo utiliza as ferramentas de centralização na média e normalização das amostras (dividir pelo desvio padrão), de modo que cada variável do banco de dados tenha média zero e variância igual a um

# Capítulo 2

**Análise via RMN de urina de humanos diagnosticados com diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) e pré-diabetes (IGT) e submetidos a um tratamento com infusão de erva-mate (*Ilex paraguariensis*)**

## **2.1. Introdução**

### **2.1.1. Diabetes mellitus tipo 2 (DMT2)<sup>24</sup>**

Diabetes mellitus (DM) é uma doença metabólica caracterizada pela elevação de glicose ou açúcar no sangue e está associada a defeitos na secreção ou na ação do hormônio insulina, que é produzido no pâncreas pelas chamadas células beta. A principal função da insulina é promover a entrada de glicose nas células do organismo, de forma que ela possa ser aproveitada em outras atividades celulares. A falta da insulina ou um defeito na sua ação implica em um acúmulo de glicose no sangue, um processo conhecido como hiperglicemia.

A presença da diabetes é detectada através de três testes realizados em laboratório. Em caso positivo esses testes devem ser realizados novamente para confirmação. Esses testes são:

\*Concentração em massa de glicose por volume de sangue.

- Glicemia de jejum > 126mg/dL (jejum de 8 horas)
- Glicemia casual > 200mg/dL (colhida em qualquer horário do dia, independente da refeição realizada)
- Glicemia > 200mg/dL (após sobrecarga oral com 75g de glicose)

A diabetes mellitus é dividida em grupos de acordo com as condições que levaram ao desenvolvimento do distúrbio metabólico. Hoje se conhecem vários

---

tipos de diabetes, porém a grande maioria é dividida em apenas dois: diabetes mellitus tipo 1 e diabetes mellitus tipo 2.

A diabetes mellitus tipo 1 (DMT1) resulta da destruição das células beta pancreáticas por um processo imunológico, ou seja, pela formação de anticorpos pelo próprio organismo contra as células beta, levando à deficiência de insulina. Nesse caso pode-se detectar a presença desses anticorpos através de exames de sangue. Esses anticorpos são: ICA, IAAs, GAD e IA-2 e que estão presentes em aproximadamente 85-90% dos casos de DMT1 no momento do diagnóstico. Em geral costuma acometer crianças e jovens, mas pode ser desencadeado em qualquer faixa etária.

Nos pacientes diagnosticados com diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) a insulina é produzida pelo pâncreas, porém sua ação é dificultada, caracterizando um quadro de resistência insulínica. A resistência insulínica levará a um aumento da produção de insulina para tentar manter a glicose em níveis normais. Quando isso não é possível surge o diabetes. Seus principais sintomas são: sede, aumento da diurese, dores nas pernas e alterações visuais. O desenvolvimento do quadro é lento e pode demorar vários anos até que os sintomas sejam perceptíveis. Caso os sintomas não sejam reconhecidos e tratados a tempo, o quadro pode se tornar grave e levar ao coma.

Ao contrário da DMT1, a DMT2 está geralmente associada com um aumento de peso e obesidade, acometendo principalmente adultos a partir dos 50 anos. No entanto tem-se observado continuamente o desenvolvimento deste quadro em crianças e jovens. O principal agravante desse quadro é o aumento do consumo

de gorduras e carboidratos aliados à falta de atividade física. Quanto mais cedo é detectado esse quadro, mas fácil é prevenir as complicações agudas e as crônicas.

A DMT2 é o tipo de diabetes mais frequente e corresponde a aproximadamente 85-90% dos casos. É um tipo de diabetes muito frequente em adultos, no entanto sua ocorrência em crianças e adolescentes tem aumentado. Esse aumento é atribuído a vários fatores<sup>25</sup>:

- Envelhecimento da população com fatores predisponentes;
- Alterações dietéticas, com crescente substituição dos alimentos ricos em fibras, vitaminas e minerais por produtos industrializados;
- Sedentarismo, favorecido por mudanças na estrutura de trabalho e avanços tecnológicos;
- Obesidade;
- Tabagismo, entre outros;

De acordo com os dados do IDF (*International Diabetes Federation*)<sup>26</sup> a prevalência mundial de diabetes na população adulta (entre 20 e 79 anos) era de 6,6%, o que representa 285 milhões de pessoas no mundo diagnosticadas com DM. A estimativa é que esse número aumente para 7,8% em 2030 caso nenhum programa preventivo seja adotado.

A **Tabela 2.1** apresenta os 10 países com o maior número de pessoas diagnosticadas com DM (Tipo 1 e Tipo 2). O Brasil é o quinto país com o maior número de pessoas diagnosticadas com DM, representando 9,6 milhões de pessoas. Estima-se que em 2010 em torno de 40 mil pessoas no Brasil morreram

por causa de diabetes. Sendo que 10 mil pessoas se encontram na faixa etária de 60 a 79 anos.

**Tabela 2.1.** Os 10 países com o maior número de pessoas adultas diagnosticadas com DM em 2010 e estimativa para 2030.

<b>País/Território</b>	<b>2010 Milhões</b>	<b>País/Território</b>	<b>2030 Milhões</b>
<b>1 Índia</b>	<b>50,8</b>	<b>1 Índia</b>	<b>87,0</b>
<b>2 China</b>	<b>43,2</b>	<b>2 China</b>	<b>62,6</b>
<b>3 USA</b>	<b>26,8</b>	<b>3 USA</b>	<b>36,0</b>
<b>4 Rússia</b>	<b>9,6</b>	<b>4 Paquistão</b>	<b>13,8</b>
<b>5 Brasil</b>	<b>7,6</b>	<b>5 Brasil</b>	<b>12,7</b>
<b>6 Alemanha</b>	<b>7,5</b>	<b>6 Indonésia</b>	<b>12,0</b>
<b>7 Paquistão</b>	<b>7,1</b>	<b>7 México</b>	<b>11,9</b>
<b>8 Japão</b>	<b>7,1</b>	<b>8 Bangladesh</b>	<b>10,4</b>
<b>9 Indonésia</b>	<b>7,0</b>	<b>9 Rússia</b>	<b>10,3</b>
<b>10 México</b>	<b>6,8</b>	<b>10 Egito</b>	<b>8,6</b>

Fonte: IDF<sup>26</sup>

Pacientes que apresentam glicemia de jejum maior que 110mg/dL e menor que 126mg/dL e ainda glicemia 2 horas após sobrecarga oral com 75g de glicose entre 140mg/dL e 200mg/dL são diagnosticados com pré-diabetes. O estágio de pré-diabetes, conhecido como intolerância a glicose (IGT, *Impaired Glucose Tolerance*), apresenta destaque merecido, pois os pacientes com IGT têm risco significativo de desenvolverem DMT2. Estima-se que em 2010 a prevalência mundial de IGT em pessoas adultas era de 7,9%, representando 344 milhões de pessoas<sup>26</sup>.

### 2.1.2. Erva-mate (*Ilex paraguariensis*)

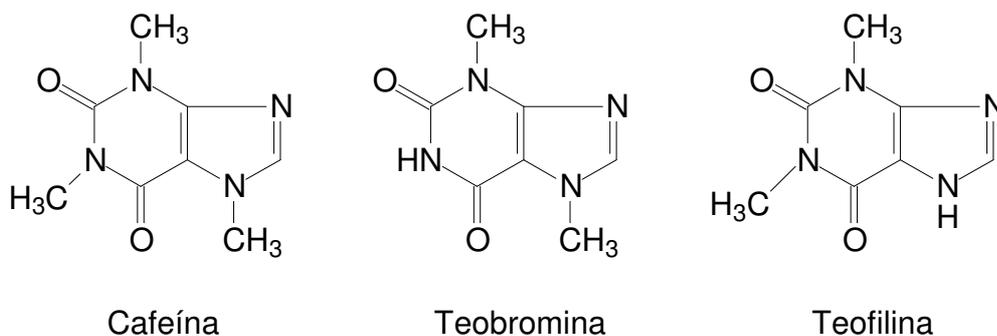
A erva-mate (*Ilex paraguariensis*) é uma árvore da família das aquifoliáceas, originária da região subtropical da América do Sul, presente na região sul e centro-oeste do Brasil, norte da Argentina, Paraguai e Uruguai. Cerca de 80% da área de ocorrência pertence ao Brasil, sendo distribuída entre os estados de Mato Grosso do Sul, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. O processamento e comercialização da erva-mate são realizados principalmente por pequenos produtores que se reúnem em cooperativas, sendo que a região sul se destaca como a maior produtora<sup>27</sup>.

Existem relatos de que os indígenas das nações Guarani e Quíchua tinham o hábito de beber infusões com as folhas de erva-mate. Este hábito continua popular em alguns países sendo consumido como chá quente ou chá gelado (sudeste do Brasil), chimarrão (sul do Brasil, Argentina e Uruguai) e tereré (alguns estados do Brasil e Paraguai)<sup>28,29</sup>. Estima-se que em torno de 1 milhão de pessoas consumam de 1 a 2 litros da bebida por dia.

De acordo com a medicina popular a erva-mate é indicada em diversas situações, tais como: artrite, dor de cabeça, constipação, reumatismo, hemorróidas, obesidade, fadiga, retenção de líquidos, hipertensão, digestão lenta e desordens hepáticas. Devido a essas propriedades, a erva-mate está inclusa em importantes farmacopéias como a Martingdale e a British Herbal Pharmacopoeia<sup>30</sup>.

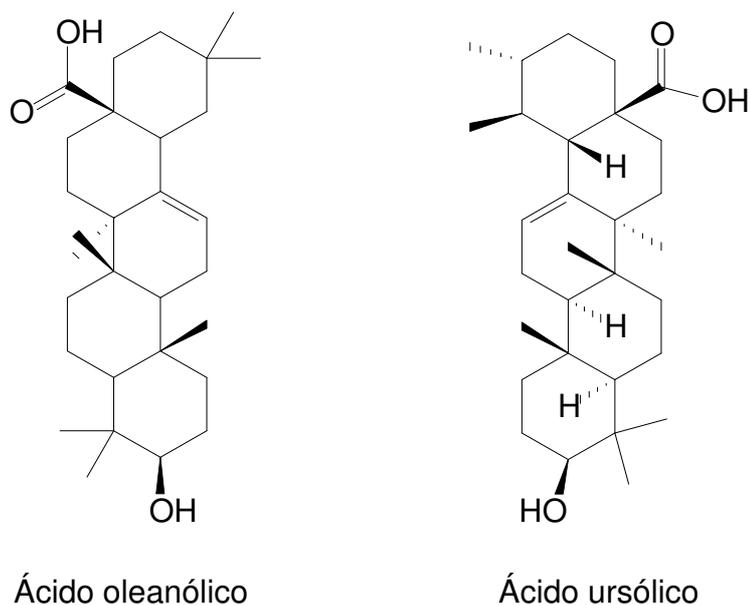
A erva-mate é constituída por diversos fitoquímicos sendo que os mais importantes são os compostos fenólicos, as saponinas e as metilxantinas. As metilxantinas são substâncias de ação reconhecida sobre o sistema nervoso central, sendo lhes atribuída a ação estimulante da erva-mate. A **Figura 2.1** apresenta a

estrutura química das principais metilxantinas encontradas na erva-mate como: cafeína, teobromina e teofilina<sup>31</sup>.



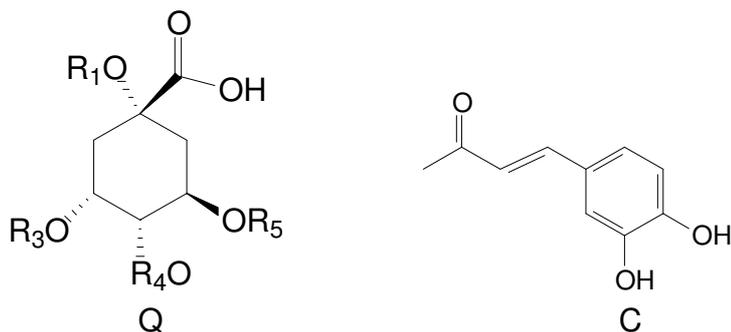
**Figura 2.1** Estrutura química das principais metilxantinas encontradas na erva-mate.

As saponinas são os constituintes presentes na erva-mate responsáveis pelo sabor amargo e formação de espuma na bebida. Além de outras atividades biológicas, a atividade antiinflamatória da erva-mate é atribuída a estas substâncias. Dentre as saponinas presentes na erva-mate as que mais se destacam são as saponinas triterpenóides (em torno de 10%) tendo como principal aglicona o ácido ursólico e seu isômero ácido oleanólico (**Figura 2.2**)<sup>32</sup>.



**Figura 2.2.** Estrutura química das principais saponinas agliconas encontradas na erva-mate.

Os compostos fenólicos são conhecidos por sua ação adstringente e principalmente por sua ação antioxidante. Entre os compostos fenólicos presentes na erva-mate destaca-se o elevado conteúdo de derivados cafeoilquínicos, como o ácido clorogênico e seus isômeros (**Figura 2.3**)<sup>33</sup>. Além do ácido clorogênico, os flavonóides rutina, quercetina, diglicosídeo de luteolina, taninos e cafeoilglicose também estão presentes no extrato aquoso de *Ilex paraguariensis*<sup>34</sup>.



Nome	R1	R3	R4	R5
Ácido 1-O-cafeoilquínico	C	H	H	H
Ácido 3-O-cafeoilquínico	H	C	H	H
Ácido 4-O-cafeoilquínico	H	H	C	H
Ácido 5-O-cafeoilquínico	H	H	H	C
Ácido 1,3-di-O-cafeoilquínico	C	C	H	H
Ácido 1,4-di-O-cafeoilquínico	C	H	C	H
Ácido 1,5-di-O-cafeoilquínico	C	H	H	C
Ácido 3,4-di-O-cafeoilquínico	H	C	C	H
Ácido 3,5-di-O-cafeoilquínico	H	C	H	C
Ácido 4,5-di-O-cafeoilquínico	H	H	C	C

Q = Ácido quínico; C = Ácido caféico

**Figura 2.3.** Estrutura química dos ácidos cafeoilquínico e dicafeoilquínico, principais compostos fenólicos encontrados na erva-mate.

O uso da erva-mate como alimento funcional é relativamente recente. Os primeiros trabalhos realizados com extratos de erva-mate foram publicados na década de 90. Nesses trabalhos foi demonstrada a atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* de infusões de erva-mate verde e seca<sup>35-37</sup>. Em estudo recente Bastos e colaboradores<sup>38</sup> demonstraram que os extratos de erva-mate verde e tostada apresentam atividade antioxidante *in vitro* superior à do chá-verde (*Camellia sinesis*). Alguns trabalhos sobre a atividade antioxidante *in vitro* da erva-mate foram publicados relatando a inibição ou não do processo de oxidação da LDL (*Low*

*Density Lipoprotein* - Lipoproteínas de baixa densidade), o que poderia contribuir para a prevenção da aterosclerose e câncer<sup>39,40</sup>.

Lunceford e Gugliucci<sup>41</sup> relataram que os extratos de *Ilex paraguariensis*, ricos em polifenóis, são capazes de inibir a formação dos produtos finais da glicação avançada (AGEs, *Advanced Glycation End-products*). A glicação, também conhecida como glicosilação não-enzimática, é o resultado da ligação entre uma proteína e um carboidrato e está diretamente relacionada com as complicações diabéticas devido à hiperglicemia.

## **2.2. Objetivos**

### **2.2.1. Objetivos gerais**

Aplicar o conceito de análise metabolômica em amostras de urina de humanos utilizando a ressonância magnética nuclear como ferramenta analítica e a utilização da quimiometria nos resultados obtidos por RMN de  $^1\text{H}$ .

### **2.2. Objetivos específicos**

Avaliar o perfil metabólico de pacientes diagnosticados com diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) e pré-diabetes (IGT) e que foram submetidos a um tratamento com extrato aquoso de *Ilex paraguariensis*.

Correlacionar a variação de alguns metabólitos específicos presentes nas amostras de urina com o potencial uso da erva-mate no auxílio ao tratamento da diabetes.

Tratamento quimiométrico dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  com a finalidade de se verificar se há diferença estatística no perfil metabólico das amostras de urina dos pacientes diagnosticados com DMT2 e IGT

## **2.3. Materiais e métodos**

### **2.3.1. Amostras de erva-mate**

As amostras de erva-mate foram fornecidas pela empresa Leão Junior SA (Curitiba-PR, Brasil) e são comercialmente disponíveis sob a forma de folhas de erva-mate tostada. Uma amostra de erva-mate foi coletada em Iraty-PR, Brasil, e uma espécie da planta foi identificada como *Ilex paraguariensis* legítima pelo Departamento de Botânica da Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC (Florianópolis-SC, Brasil).

### **2.3.2. Preparação do extrato de erva-mate**

As infusões de erva-mate foram preparadas adicionando-se aproximadamente 6,6 g de folhas secas tostadas de *Ilex paraguariensis* em 330 mL de água fervente. A concentração final da infusão foi 20 mg/mL e representa a quantidade e concentração usual consumida pela população. Após 10 minutos de extração a mistura foi filtrada e imediatamente consumida pelos pacientes.

### **2.3.3. Critérios de seleção dos pacientes**

Os pacientes diagnosticados com DMT2 e IGT foram selecionados através de um anúncio postado na UFSC solicitando voluntários para participar do estudo. A condição de saúde geral e o quadro de hiperglicemia dos voluntários

foram verificados através da aplicação de um formulário padrão e medidas dos parâmetros bioquímicos e hematológicos, tais como perfil lipídico, glicose, uréia, creatinina, enzimas hepáticas (aspartato aminotransferase – AST, alanina aminotransferase – ALT, fosfatase alcalina e gama-glutamil-transferase – GGT) e hemograma completo (contagem de células sanguíneas vermelhas, células sanguíneas brancas, plaquetas e nível de hemoglobina).

Considerou-se como critério de inclusão para a participação no estudo a presença de glicemia de jejum alterada ( $> 100$  mg/dL e  $< 125$  mg/dL) para os indivíduos com pré-diabetes, sem uso de medicamentos, ou de diabetes mellitus tipo 2, sendo que os indivíduos deveriam ser alfabetizados e os diabéticos deveriam estar em uso de hipoglicemiantes orais e/ou secretagogos.

Os critérios de exclusão foram a presença de doenças hepáticas ou renais, neoplasias, desordens tireoidianas, alcoolismo ou obesidade mórbida. Além disso, foram excluídos os participantes que apresentaram resultados dos exames laboratoriais de rotina fora dos valores de referência, os quais sugeriam desordens hematológicas, hepáticas ou renais. Após o início do estudo, foram excluídos os participantes que introduziram ou modificaram o uso de medicamentos, que alteraram o nível de atividade física, que apresentaram intolerância ao chá mate, ou que interromperam a ingestão do chá mate por três dias consecutivos ou mais.

Todos os participantes foram orientados a não modificar o estilo de vida durante o estudo, mantendo a mesma alimentação de costume e o mesmo nível de atividade física, exceto aqueles que receberam intervenção dietética. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFSC, denominado “Efeito hipocolesterolêmico, hipoglicêmico, antiinflamatório e

---

antioxidante da erva-mate (*Ilex paraguariensis*) em seres humanos”, sob número de protocolo 140/80. A participação dos voluntários no estudo se deu mediante a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

#### **2.3.4. Delineamento experimental**

De acordo com os critérios de exclusão foram selecionados 22 pacientes diagnosticados com DMT2 (4 homens e 18 mulheres) e 23 pacientes diagnosticados com IGT (6 homens e 17 mulheres). Os pacientes foram divididos em 3 grupos de acordo com cada quadro diagnosticado (DMT2 ou IGT) conforme a **Tabela 2.2**. No **APÊNDICE 1** encontra-se uma tabela detalhada com os códigos dos pacientes e amostragem. O tempo basal corresponde a um período de trinta dias no qual os pacientes seguiram com seu estilo de vida habitual (dieta e atividade física). Pelo menos duas semanas antes do período de contagem e durante todo o período basal os pacientes tiveram que parar de consumir bebidas que contivessem erva-mate e qualquer tipo de remédio, exceto no caso dos pacientes com DMT2 que consumiam remédio para controlar a diabetes. Para verificar os efeitos da ingestão prolongada da infusão de erva-mate nas amostras de urina, os pacientes foram instruídos a preparar a infusão de erva-mate diariamente, conforme descrito no item 2.3.2, sem a adição de açúcar ou adoçantes, e consumir 330 mL da bebida 3 vezes ao dia, durante ou imediatamente após as 3 refeições principais (café da manhã, almoço e jantar).

**Tabela 2.2.** Divisão dos grupos dos pacientes de acordo com o modelo de ingestão de erva-mate e intervenção dietética.

Condição		Procedimento adotado durante o tempo de intervenção	Tempo (dias)					
			-30	-15	0	20	40	60
DMT2 (D)	IGT (I)	Intervenção dietética (D) Erva-mate (E) Intervenção dietética + erva-mate (DE)	Tempo basal			Tempo de intervenção		

Dessa maneira os pacientes diagnosticados com DMT2 foram assim divididos: 7 pacientes no grupo intervenção dietética (grupo DD, 29 amostras), 8 pacientes no grupo erva-mate (grupo DE, 21 amostras) e 7 pacientes no grupo intervenção dietética/erva-mate (grupo DDE, 27 amostras). A divisão dos pacientes diagnosticados com IGT foi: 6 pacientes no grupo intervenção dietética (grupo ID, 13 amostras), 9 pacientes no grupo erva-mate (grupo IE, 29 amostras) e 8 pacientes no grupo intervenção dietética/erva-mate (grupo IDE, 24 amostras). Como pode ser observado não foram coletadas amostras em todos os períodos de tempo para cada paciente.

### 2.3.5. Amostras de Urina

As amostras de urina foram coletadas antes (período basal; -30, -15 e 0 dias) e após (período de intervenção; 20, 40 e 60 dias) a ingestão da infusão de erva-mate. As amostras foram imediatamente armazenadas em refrigerador e mantidas a -20 °C após a coleta.

**2.3.6. Preparo da solução tampão**

Foi preparada uma solução tampão de fosfato de potássio 1,5 M em D<sub>2</sub>O, pH 7,0, contendo 0,1% de TMSP-d<sub>4</sub> e 2 mM de NaN<sub>3</sub>. O tampão foi preparado dissolvendo-se 5,1 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> em 20 mL de D<sub>2</sub>O. Quantidade suficiente de KOH foi adicionada de modo a se obter pH 7,0. 25 mg de TMSP-d<sub>4</sub> foram dissolvidas separadamente em aproximadamente 3 mL de D<sub>2</sub>O. Juntou-se a solução de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e TMSP-d<sub>4</sub> e completou-se o volume para 25 mL. Aproximadamente 3,25 mg de NaN<sub>3</sub> foram dissolvidas na solução tampão de modo a obter a concentração de 2 mM.

**2.3.7. Preparação das amostras de urina**

As amostras de urinas foram centrifugadas por 10 minutos a 12.000 rpm para remoção de resíduos sólidos. Depois de centrifugada, uma alíquota de 900 µL de urina foi misturada com 100 µL de solução tampão fosfato de potássio. O pH da amostra foi ajustado para 7,0 adicionando quantidade suficiente de solução KOH 4 M ou HCl 4 M. Uma alíquota de 600 µL da amostra de urina foi colocada em um tubo de RMN de 5 mm de diâmetro externo.

**2.3.8. Obtenção dos espectros de RMN de <sup>1</sup>H**

Todas as medidas de RMN foram obtidas em um espectrômetro DRX 400 Bruker de 9,4 Tesla (400,13 MHz para a frequência do hidrogênio), localizado

no Laboratório de RMN do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos – UFSCar. As medidas foram realizadas em uma sonda BBI de 5 mm de diâmetro interno, com detecção inversa e bobinas geradoras de gradiente de campo na coordenada z.

Todos os espectros foram adquiridos a uma temperatura de 303 K utilizando a sequência de pulso de pré-saturação do solvente NOESYGPPR1D para suprimir o sinal da água. Foram realizadas 64 varreduras (ns), tempo de espera entre cada aquisição de 4 s (d1), tempo de aquisição de 3,85 s (aq) com 64 Kb pontos durante a aquisição (td), atenuação do pulso de pré-saturação de 50 dB (pl9) e duração do pulso de 90° de 12,75  $\mu$ s (p1). Os tubos foram girados a 20 Hz e foi utilizado um tempo de mistura de 10 ms (d8). O processamento desses espectros foi efetuado com 64 Kb pontos (si), utilizando uma multiplicação exponencial (lb = 0,3 Hz) e correção manual de fase e linha de base.

Os experimentos bidimensionais com gradiente de campo (*g*COSY e *g*HSQC) foram realizados empregando as sequências de pulso COSYGPPRQF e HSQCETPRGP (denominação Bruker), com ns 16 e 128 e largura espectral (swh) em F1 8012 e 21638 Hz, respectivamente. Os seguintes parâmetros foram os mesmos para as duas medidas: d1 2 s, td em F2 de 4 Kb, td em F1 de 256 e swh em F2 8012 Hz. O processamento dos espectros foi efetuado com 4 Kb de pontos em F2 e 1 Kb de pontos em F1 (si).

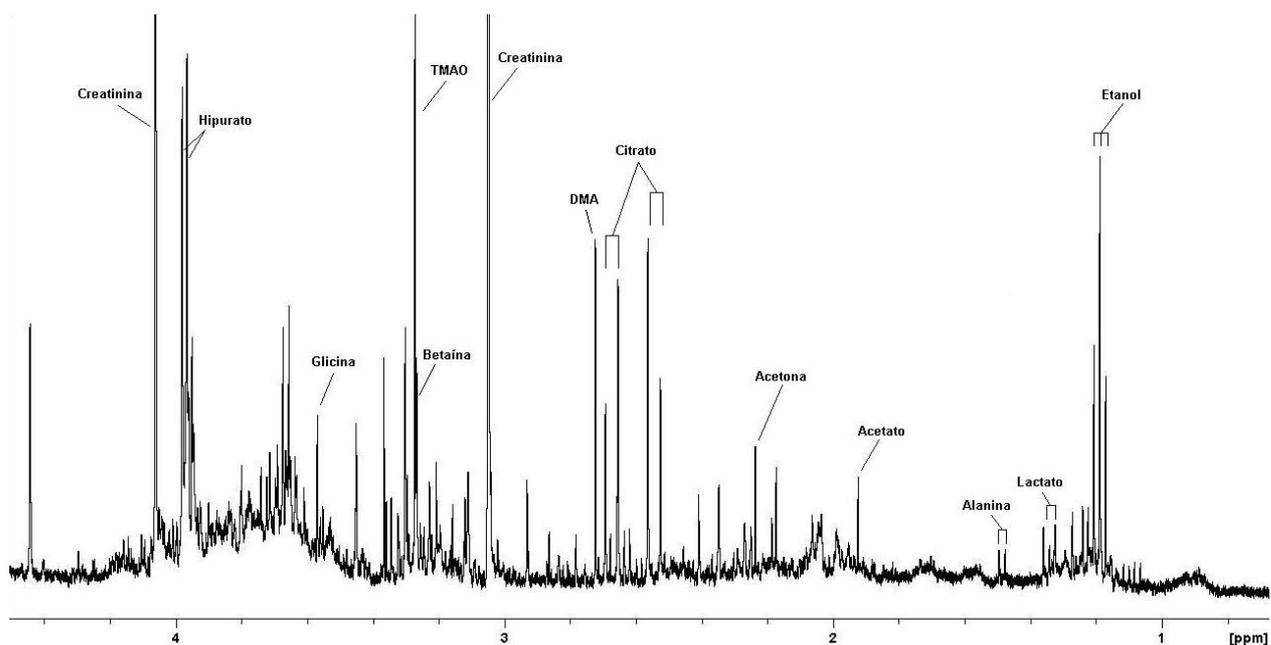
**2.3.9. Análise estatística**

As análises multivariadas dos dados foram realizadas utilizando os programas The Unscrambler<sup>®</sup> v. 9.7 (CAMO SOFTWARE AS) e *Pirouette*<sup>®</sup> v. 4.0 (Infometrix, Inc). Para a construção da matriz dos dados de RMN de <sup>1</sup>H as regiões referentes ao sinal residual da água, da uréia, da acetona e do TMSP-d<sub>4</sub> foram removidas. Excluíram-se também os ruídos presentes nas laterais dos espectros. Na matriz final todas as amostras referem-se às linhas e os deslocamentos químicos referem-se às colunas. Na etapa de pré-processamento das análises todos os dados foram normalizados e autoescalados com relação à área total do espectro.

## 2.4. Resultados e discussões

### 2.4.1. Perfil metabólico das amostras de urina de humanos

Um espectro típico de RMN de  $^1\text{H}$  de uma amostra de urina é apresentado na **Figura 2.4**. As atribuições dos vários metabólitos foram realizadas baseando-se em dados da literatura<sup>42,43</sup> e através da análise dos espectros bidimensionais *g*COSY e *g*HSQC (**Figuras 2.5 e 2.6**).



**Figura 2.4.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  típico de uma amostra de urina de humano diagnosticado com DMT2.

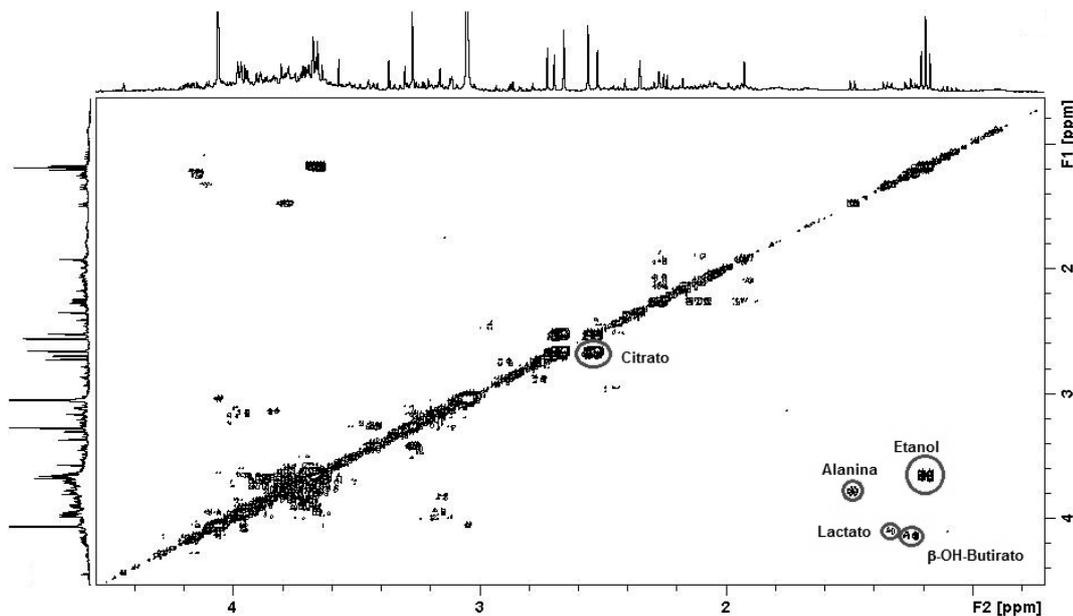


Figura 2.5. Espectro de RMN *g*COSY típico de uma amostra de urina de humano diagnosticado com DMT2.

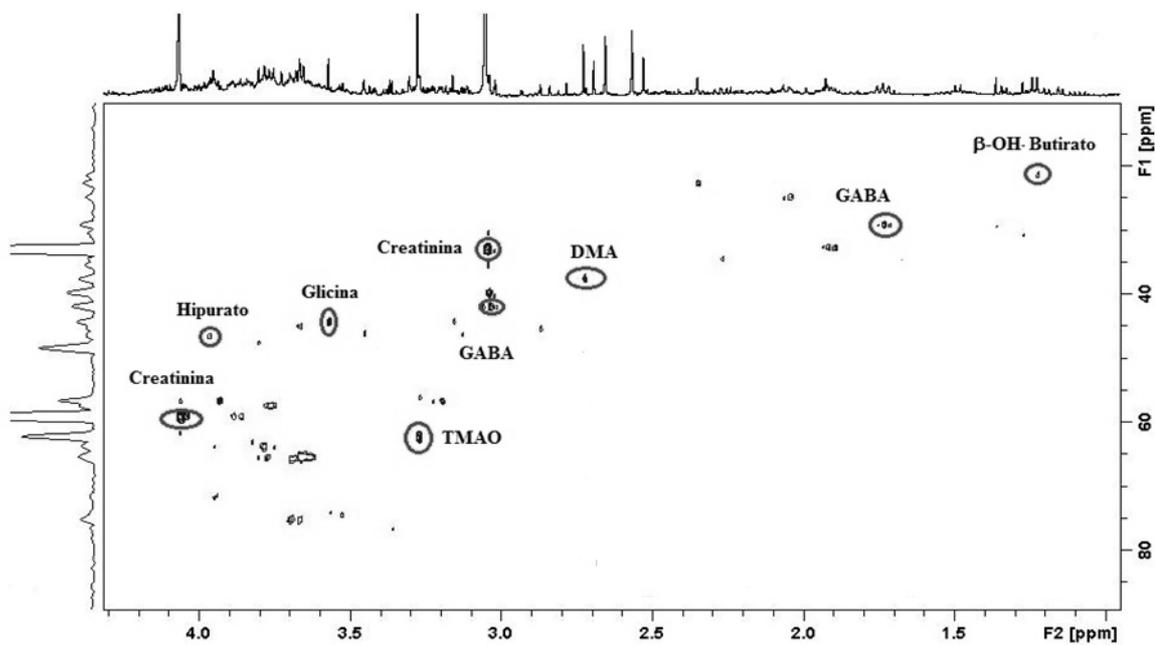
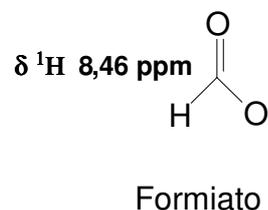
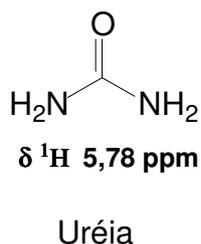
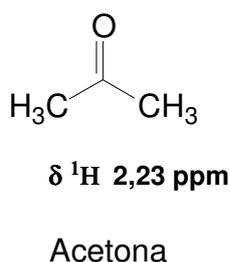


Figura 2.6. Espectro de RMN *g*HSQC típico de uma amostra de urina de humano diagnosticado com DMT2.

A **Tabela 2.3** lista os metabólitos identificados nas amostras de urina e seus respectivos deslocamentos químicos. No total foram identificados 21 metabólitos presentes nas amostras de urina. Os sinais mais intensos presentes no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  são referentes aos metabólitos creatinina, N-óxido de trimetilamina, betaína, hipurato e citrato, sendo que uma grande variedade de outros metabólitos presentes em menor quantidade pode ser observada na **Figura 2.4**.

Os metabólitos acetona [ $\delta \text{ } ^1\text{H} = 2,23 \text{ ppm (s)}$ ], uréia [ $\delta \text{ } ^1\text{H} = 5,78 \text{ ppm (sl)}$ ] e formiato [ $\delta \text{ } ^1\text{H} = 8,46 \text{ ppm (s)}$ ] apresentam apenas um sinal singlete no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  e portanto não podem ser confirmados via análise de RMN *g*COSY. Os acoplamentos dos sinais do hidrogênio com carbono dos metabólitos acetona e formiato não foram identificados no espectro *g*HSQC. A uréia não apresenta sinal no espectro de RMN *g*HQSC uma vez que não possui hidrogênio ligado diretamente a carbono. Esses metabólitos foram identificados baseando-se apenas nos dados da literatura<sup>42,43</sup>.

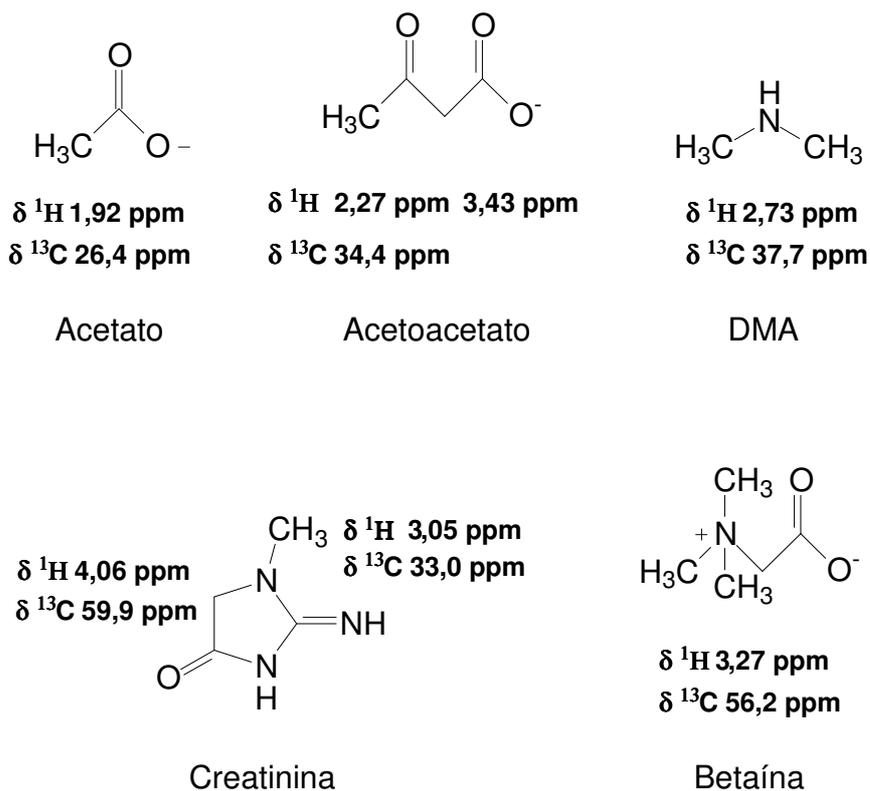


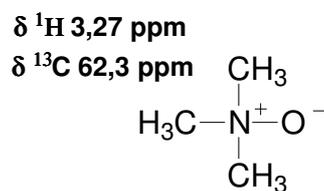
**Tabela 2.3.** Metabólitos identificados nas amostras de urina de humanos diagnosticados com DMT2 e IGT.

Código	Metabólitos	$\delta^1\text{H}$ ppm (multiplicidade, J Hz)	gCOSY	gHSQC ( $\delta^{13}\text{C}$ ppm)
1	Etanol	1,19 (t, 7,10)	3,67	-
		3,67 (q, 7,10)	1,19	-
2	$\beta$ -OH-Butirato	1,24 (d, 6,56)	4,00-4,10	21,5
		4,00-4,10 (m)	1,24	-
3	Lactato	1,33 (d, 7,00)	4,12	24,6
		4,12 (q, 7,00)	1,33	-
4	Alanina	1,48 (d, 7,20)	3,78	-
		3,78 (q, 7,20)	1,48	-
5	GABA	1,69-1,78 (m)	3,01-3,06 2,16-2,22	29,2
		2,16-2,22 (m)	1,69-1,78	34,5
		3,01-3,06 (m)	1,69-1,78	42,0
6	Acetato	1,92 (s)	-	26,4
7	Acetona	2,23 (s)	-	-
8	Acetoacetato	2,27 (s)	-	34,4
		3,43 (s)	-	-
9	Citrato	2,54 (d, 15,2)	2,67	48,5
		2,67 (d, 15,2)	2,54	48,5
10	DMA	2,73 (s)	-	37,7
11	Creatinina	3,05 (s)	-	33,0
		4,06 (s)	-	59,4
12	Taurina	3,24	3,45	-
		3,45	3,24	-
13	Betaína	3,27 (s)	-	56,2
14	TMAO	3,27 (s)	-	62,3
15	Glicina	3,57 (s)	-	44,4
16	Hipurato	3,95 (d)	-	46,9
		7,81-7,87 (m)	7,52-7,60	129,9
		7,52-7,60 (m)	7,81-7,87 7,61-7,68	131,7
		7,61-7,68 (m)	7,52-7,60	134,9
17	$\alpha$ -Glucose	5,24 (d, 3,80)	3,56	-
		3,56 (m)	5,24	74,2
18	Uréia	5,78 (sl)	-	-
19	Tirosina	6,87 (d, 8,60)	7,17	-
		7,17 (d, 8,60)	6,87	-
20	Trigonelina	4,44 (sl)	-	-
		8,08 (t, 7,00)	8,83 8,83	-
		8,83 (m)	8,08	-
		8,83 (m)	8,08	-
21	Formiato	9,12 (sl)	-	-
		8,46 (s)	-	-

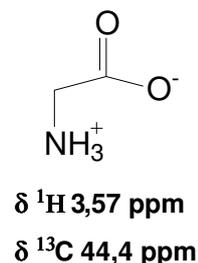
s-singlete, sl-singlete largo, d-dupleto, dd-duplo dupleto, m-multiplete, t-triplete.

Os sinais característicos dos metabólitos acetato [ $\delta^1\text{H} = 1,92$  ppm (s)], acetoacetato [ $\delta^1\text{H} = 2,27$  ppm (s)], DMA (dimetilamina) [ $\delta^1\text{H} = 2,73$  ppm (s)], creatinina [ $\delta^1\text{H} = 3,05$  ppm (s) e  $4,06$  ppm (s)], betaína [ $\delta^1\text{H} = 3,27$  ppm (s)], TMAO (N-óxido de trimetilamina) [ $\delta^1\text{H} = 3,27$  ppm (s)] e glicina [ $\delta^1\text{H} = 3,57$  ppm (s)] também são singletos e conseqüentemente não podem ser confirmados pelo espectro de RMN *g*COSY. Os acoplamentos dos sinais desses metabólitos com o carbono foram confirmados através da análise do espectro de RMN *g*HSQC e comparados com os dados da literatura<sup>42,43</sup>.



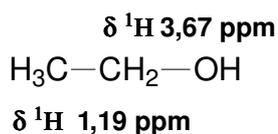


TMAO

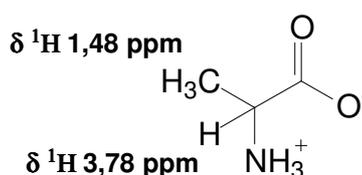


Glicina

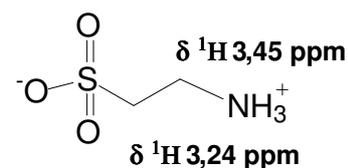
Os acoplamentos dos sinais do hidrogênio com o carbono dos metabólitos etanol [ $\delta^1\text{H}$  = 1,19 ppm (t) e 3,67 ppm (q)], alanina [ $\delta^1\text{H}$  = 1,48 ppm (d) e 3,78 ppm (q)], taurina [ $\delta^1\text{H}$  = 3,24 ppm (t) e 3,45 ppm (t)], tirosina [ $\delta^1\text{H}$  = 6,87 ppm (d) e 7,17 ppm (d)] e trigonelina [ $\delta^1\text{H}$  = 8,08 ppm (t) e 8,83 ppm (m)] não foram identificados. A confirmação desses sinais foi realizada através da análise do espectro de RMN *g*COSY e através dos dados da literatura<sup>42,43</sup>.



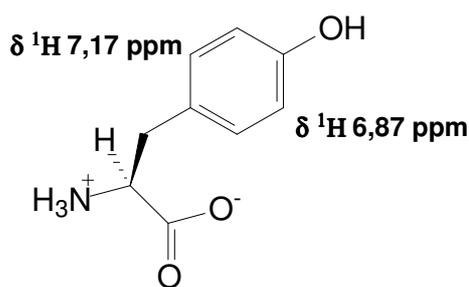
Etanol



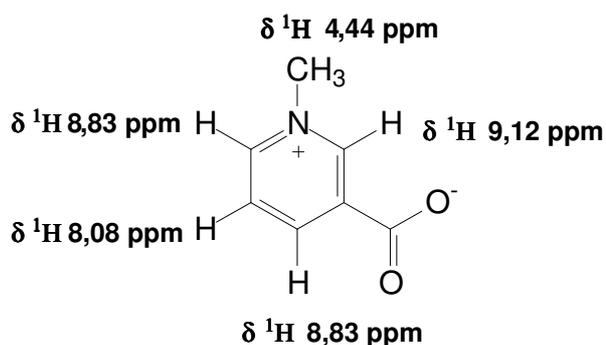
Alanina



Taurina

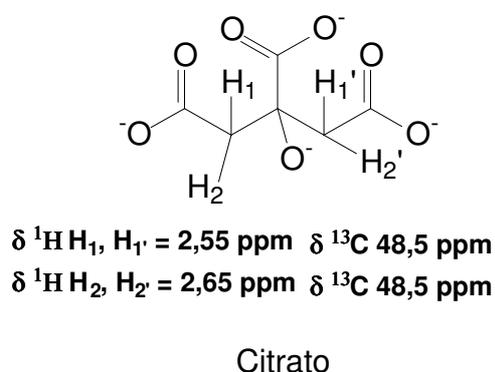
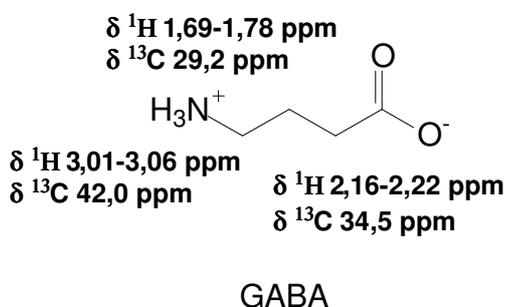
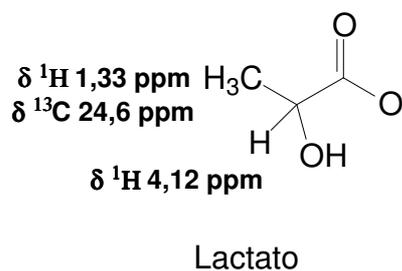
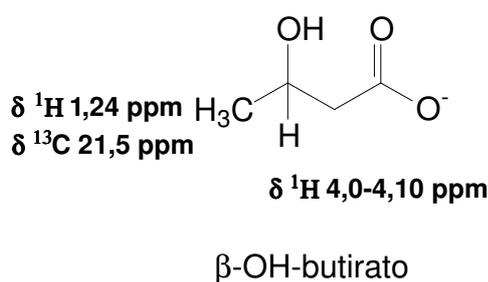


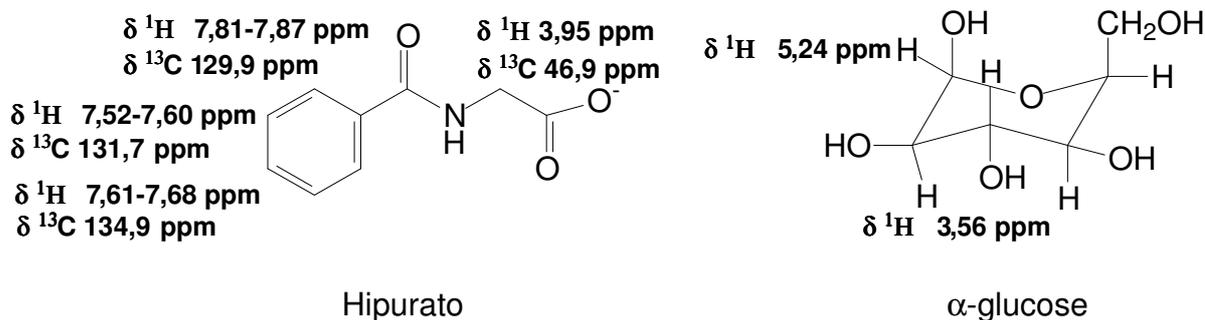
Tirosina



Trigonelina

Os metabólitos  $\beta$ -OH-butirato [ $\delta^1\text{H} = 1,24$  ppm (d) e 4,00-4,10 ppm (m)], lactato [ $\delta^1\text{H} = 1,33$  ppm (d) e 4,12 ppm (q)], GABA (ácido gama-aminobutírico) [ $\delta^1\text{H} = 1,69$ -1,78 ppm (m), 2,16-2,22 (m) e 3,01-3,06 ppm (m)], citrato [ $\delta^1\text{H} = 2,55$  ppm (d) e 2,65 ppm (d)], hipurato [ $\delta^1\text{H} = 3,95$  ppm (d), 7,52-7,60 ppm (m), 7,61-7,68 ppm (m) e 7,81-7,87 ppm (m)] e  $\alpha$ -glucose [ $\delta^1\text{H} = 5,24$  ppm (d) e 3,56 ppm (m)] foram todos confirmados através da análise dos acoplamentos  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  no espectro de RMN  $g\text{COSY}$  e dos acoplamentos  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  no espectro de RMN  $g\text{HSQC}$ . Os deslocamentos químicos desses metabólitos foram confirmados com os dados da literatura<sup>42,43</sup>.





#### 2.4.2. Análise quantitativa

As **Tabelas 2.4** e **2.5** listam as concentrações relativas dos principais metabólitos encontrados nas amostras de urina de humano diagnosticados com DMT2 e IGT, respectivamente. O valor encontrado para cada sinal foi obtido através da divisão da área do metabólito pela área do padrão TMSP- $d_4$  que foi adicionado sempre na mesma quantidade para todas as amostras. As áreas dos metabólitos e do padrão foram obtidas através do método de deconvolução utilizando o programa TOPSPIN 2.1 (Bruker Biospin).

**Tabela 2.4.** Quantificação relativa (área do metabólito/área do TMSp-d4) dos metabólitos presentes nas amostras de urina de humano diagnosticado com diabetes mellitus tipo 2.

<b>Grupo Diabetes Mellitus Tipo 2 (DMT2)</b>						
<b>Metabólitos</b>	<b>Tempo Basal</b>			<b>Tempo de intervenção</b>		
	<b>DD</b>	<b>DE</b>	<b>DDE</b>	<b>DD</b>	<b>DE</b>	<b>DDE</b>
<b>Alanina</b>	0,143	0,154	0,137	0,109	0,105	0,100
<b>DMA</b>	0,395	0,436	0,462	0,364	0,248	0,284
<b>Citrato</b>	1,40	0,865	1,52	0,716	0,731	0,937
<b>Creatinina</b>	8,27	6,67	9,74	5,86	5,67	4,11
<b>Betaína</b>	0,416	0,314	0,391	0,284	0,340	0,286
<b>TMAO</b>	1,33	2,27	2,06	0,845	1,51	1,14

**Tabela 2.5.** Quantificação relativa (área do metabólito/área do TMSp-d4) dos metabólitos presentes nas amostras de urina de humano diagnosticado com pré-diabetes.

<b>Grupo Pré-diabetes (IGT)</b>						
<b>Metabólitos</b>	<b>Tempo Basal</b>			<b>Tempo de intervenção</b>		
	<b>ID</b>	<b>IE</b>	<b>IDE</b>	<b>ID</b>	<b>IE</b>	<b>IDE</b>
<b>Alanina</b>	0,183	0,0796	0,170	0,123	0,0683	0,0778
<b>DMA</b>	0,396	0,320	0,367	0,354	0,235	0,248
<b>Citrato</b>	1,38	0,736	1,38	1,04	0,512	0,662
<b>Creatinina</b>	7,56	5,99	6,58	5,73	4,35	4,79
<b>Betaína</b>	0,949	0,289	1,16	0,246	0,164	0,441
<b>TMAO</b>	1,81	0,801	1,23	0,939	0,647	0,836

Conforme pode ser observado na **Tabela 2.4**, as concentrações de cada metabólito no tempo basal de acordo com cada grupo (DD, DE e DDE) não tiveram grandes variações, exceto para o citrato. Esses resultados são esperados uma vez que no tempo basal não houve nenhum tipo de interação com os pacientes

e a única variável foi o tempo. Porém, assim como o citrato, a maioria dos valores obtidos para os metabólitos no tempo basal do grupo pré-diabetes (**Tabela 2.5**) apresentou algumas variações demonstrando a complexidade em se trabalhar com amostras de urina de humanos, um sistema no qual é bastante difícil controlar as variáveis em estudo. No entanto as comparações dentro do mesmo grupo podem ser realizadas uma vez que a maioria das amostras estudadas foi obtida do mesmo paciente, evitando assim a interpretação errônea dos resultados.

Os valores obtidos para alanina tanto no grupo DMT2 quanto no grupo IGT foram reduzidos após o tempo de intervenção. A concentração de alanina em amostras de urina de humanos diabéticos normalmente é maior do que a encontrada em pacientes saudáveis<sup>42,44</sup>. Esse aumento pode ser associado à baixa concentração de aminoácidos presentes no plasma com uma reduzida supressão mediada pela insulina e também um indicativo de dano tubular renal inicial<sup>45,46</sup>. Nesse caso tanto a intervenção dietética quanto a ingestão de chá reduziram a concentração desse metabólito nas amostras de urina.

Estudos em ratos que foram submetidos a desenvolverem os sintomas característicos da DMT2<sup>47</sup>, como aumento da concentração da glicose sanguínea e resistência insulínica, e subsequentemente tratados com infusão de erva-mate apresentaram melhor resposta à administração de insulina e que poderia justificar a diminuição nos valores encontrados para a alanina.

Os metabólitos TMAO e DMA são osmólitos sintetizados nas células do rim com a função de estabilizar as perturbações protéicas produzidas pela alta concentração de uréia<sup>48,49</sup>. Em pacientes com diabetes a excreção aumentada desses metabólitos pode ser associada ao efeito hiperosmótico da glicose ou um

indicativo de uma disfunção papilar<sup>46,50</sup>. Neste estudo os níveis desses metabólitos foram reduzidos nos grupos DMT2 e IGT após a intervenção dietética e consumo de chá.

Betaína é outro osmólito importante observado nos espectros de RMN de <sup>1</sup>H de pacientes diagnosticados com diabetes e apresenta elevada concentração quando comparado à pacientes saudáveis<sup>42,44,51</sup>. De acordo com Lever e colaboradores<sup>52</sup> o aumento do nível de betaína em diabéticos pode ser atribuído a três possíveis mecanismos: **1)** uma produção excessiva de sorbitol, outro osmólito renal; **2)** glicação do sistema de transporte de betaína e **3)** uma resposta secundária a uma disfunção tubular. A presença de sorbitol é difícil de ser detectada no espectro de RMN de <sup>1</sup>H de amostras de urina, pois os sinais aparecem na região de 3,60 a 3,80 ppm, região com muita sobreposição de sinais no espectro e também devido à sua multiplicidade, o sinal do metabólito tem intensidade reduzida. No grupo DMT2 não foi verificado um efeito pronunciado no nível de betaína nos pacientes tratados com chá e assim a diminuição observada no grupo DDE se deve principalmente ao processo de intervenção dietética. No grupo IGT verificou-se uma diminuição na concentração deste metabólito tanto no grupo ID quanto no grupo IE e conseqüentemente no grupo IDE.

De acordo com os dados das **Tabelas 2.4 e 2.5** o nível de citrato nas amostras de urina foi bastante influenciado pela intervenção dietética. Ao analisar os valores obtidos para os grupos DD e ID se observa uma redução de quase 50% após o período de intervenção. Esse efeito não foi tão influenciado pelos pacientes que consumiram apenas o chá (grupos DE e IE). Assim pode-se concluir que a redução observada para os grupos DDE e IDE se deve principalmente à dieta

proposta aos pacientes e não ao tratamento com o chá. Em amostras de urina de pacientes diagnosticados com diabetes observa-se uma alta excreção desse metabólito<sup>42,44</sup>. Este efeito pode ser relacionado com a elevada produção de citrato pelas células tubulares e ou pela reduzida reabsorção de citrato do fluído tubular ocasionado pelo excesso de glicose<sup>53</sup>.

As variações encontradas nas concentrações dos metabólitos TMAO, DMA, betaína e citrato estão diretamente relacionadas com a alta concentração de glicose sanguínea característica dos pacientes diagnosticados com DM2. De acordo Arçari e colaboradores<sup>47</sup>, referência citada anteriormente, estudos em ratos demonstraram uma redução no valor de glicose após a ingestão de infusão de erva-mate e corrobora com os dados obtidos nesse estudo.

A creatinina é um produto de eliminação da creatina, encontrada principalmente no tecido muscular na forma de fosfocreatina. A creatinina é normalmente produzida a uma taxa constante pelo corpo e por isso muitas vezes é utilizada como um padrão interno<sup>54</sup>. De acordo com a literatura a concentração de creatinina em pacientes diagnosticados com diabetes é diminuída<sup>42,51</sup>. A variação de creatinina está relacionada há uma variedade de motivos tais como variações da massa muscular e consumo de alimentos calóricos. No entanto essa diminuição pode ser relacionada a um declínio na taxa de filtração glomerular renal associada a uma nefropatia diabética<sup>55-57</sup>. Neste estudo observou-se que a intervenção dietética e a ingestão de chá diminuíram os níveis de creatinina nos pacientes diagnosticados com diabetes mellitus tipo 2 e pré-diabetes.

Arçari e colaboradores<sup>47</sup> em seus estudos também demonstraram que a ingestão de infusão de erva-mate é capaz de reduzir o índice de massa corpórea

em ratos, que poderia explicar a redução de creatinina encontrada nas amostras de urina em humanos.

### **2.4.3. Análise multivariada dos dados**

#### **2.4.3.1. Diabetes mellitus tipo 2**

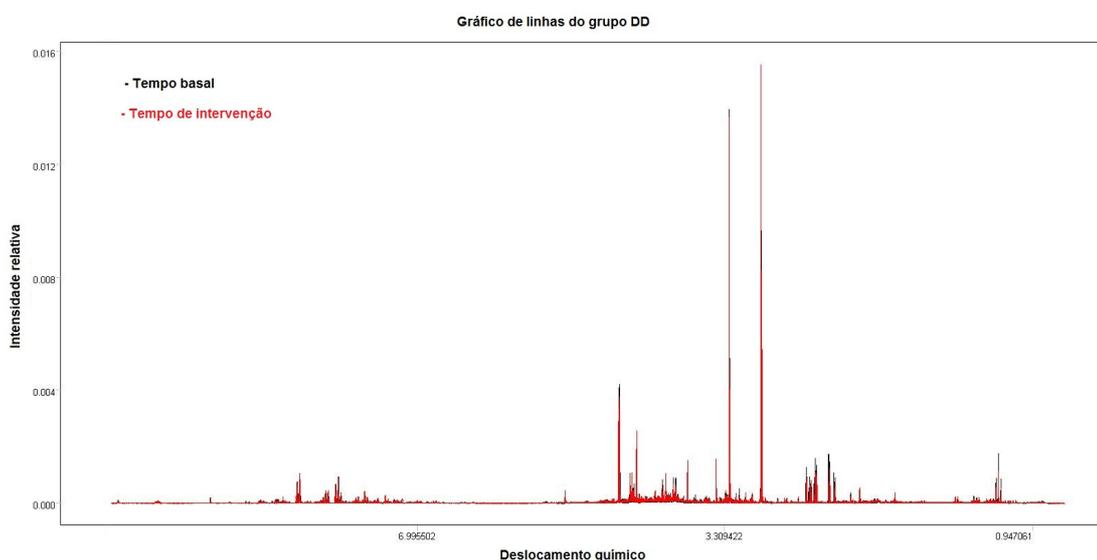
As amostras de urina dos pacientes diagnosticados com DMT2 foram divididas em três grupos (DD, DE e DDE), sendo esses grupos divididos em dois tempos (tempo basal e tempo de intervenção). O objetivo da análise multivariada nesse trabalho foi verificar se houve uma diferença no perfil metabólico das urinas entre o tempo basal e o tempo de intervenção de cada grupo.

Considerando primeiramente as amostras de urina do grupo DD uma análise exploratória dos dados foi realizada utilizando PCA com o intuito de verificar se há uma distinção entre o tempo basal e o tempo de intervenção. A análise de PCA permite a visualização de grupos formados por amostras que possuem as mesmas características, nesse caso, os grupos são formados por amostras com mesmo perfil metabólico.

Analisando os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  individualmente observou-se que as amostras 119T-30, 119T0, 119T20 e 119T40 (os códigos são apresentados no **APÊNDICE 1**) apresentaram quantidades significativamente superiores de  $\alpha$ -glucose quando comparadas às outras amostras do grupo DD. As amostras 125T0 e 192T40 apresentaram perfis espectrais bastante distintos do restante do grupo, com

sinais anômalos na região de hidrogênios aromáticos, açúcares e aminoácidos. Essas seis amostras não foram incluídas nas análises por PCA.

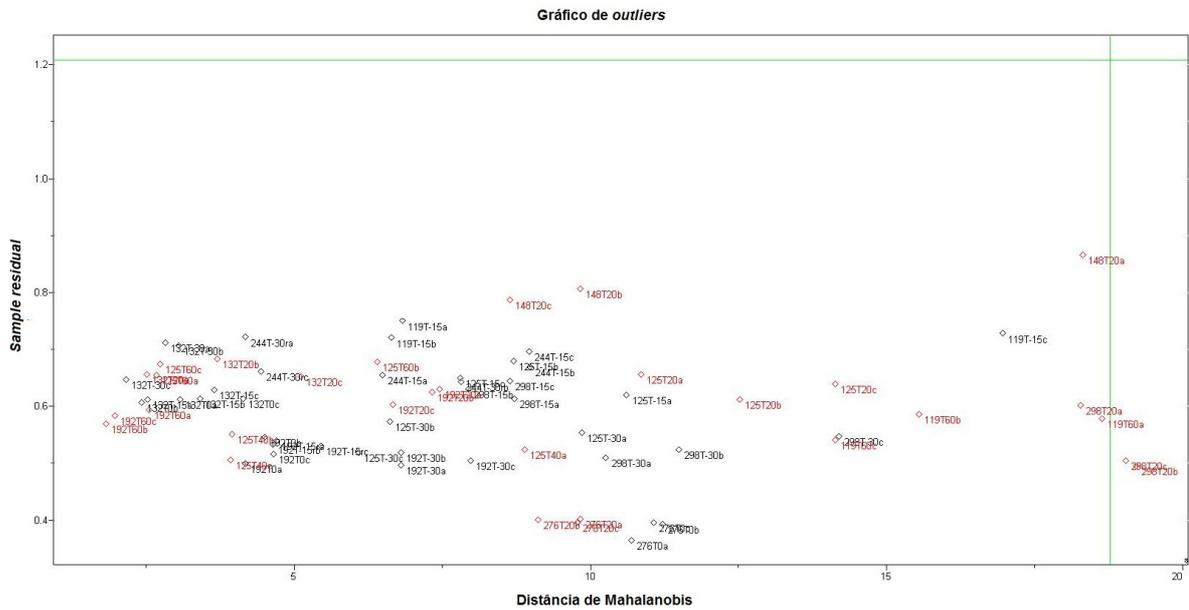
A matriz gerada após as exclusões das amostras e das regiões interferentes do espectro continha 69 linhas (23 amostras em triplicatas) e 31028 colunas (variáveis). A visualização de todas as variáveis, após as exclusões e pré-tratamento, encontra-se no gráfico de linhas apresentado na **Figura 2.7**.



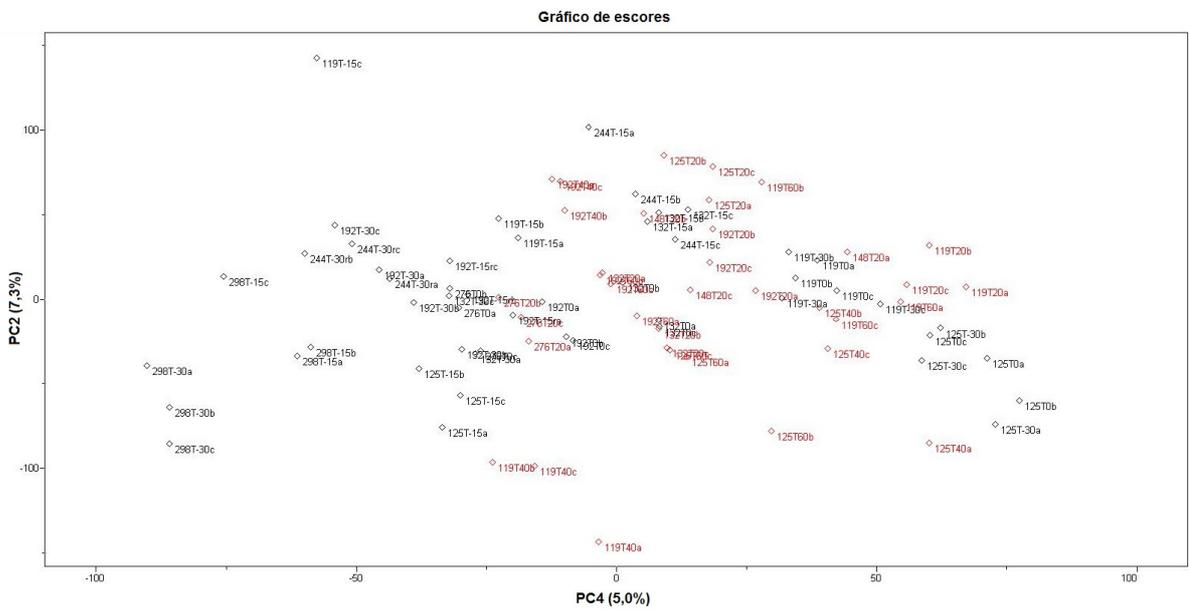
**Figura 2.7.** Gráfico de linhas dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  das amostras de urina do grupo DD analisadas por PCA.

A **Figura 2.8** apresenta o gráfico de escores das amostras de urina do grupo DD. Observa-se no gráfico que a amostra 298T20 ficou bastante afastada das outras amostras do grupo e através da análise do gráfico de *outliers* verificou-se que essa amostra pode ser classificada como *outlier* (**Figura 2.9**). Uma nova análise de PCA foi realizada excluindo a amostra 298T20. A **Figura 2.10** apresenta o gráfico de escores das amostras de urina do grupo DD após a retirada da amostra 298T20. A





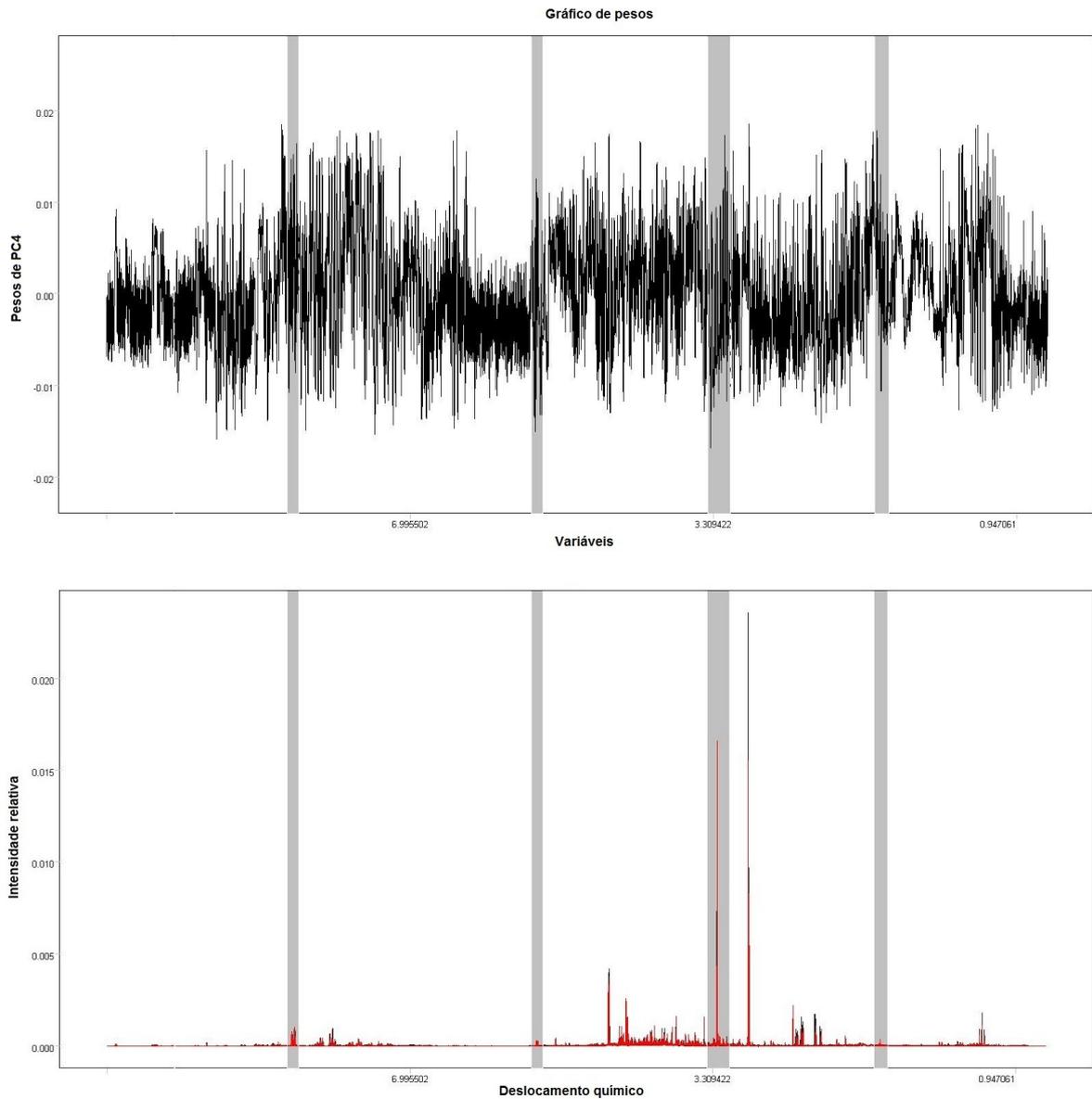
**Figura 2.9.** Gráfico de *outliers* da análise de PCA das amostras de urina do grupo DD.



**Figura 2.10.** Gráfico de escores PC4 (5,0%) x PC2 (7,3%) das amostras de urina do grupo DD após a retirada da amostra 298T20.

Apesar de haver uma melhora no resultado obtido pela análise por PCA não se observa na **Figura 2.10** uma separação evidente entre os tempos de intervenção e basal do grupo DD. Observa-se que as amostras do tempo de intervenção tendem a se agrupar no eixo dos valores positivos de PC4 enquanto as amostras do tempo basal encontram-se espalhadas por todo o gráfico.

A **Figura 2.11** apresenta o gráfico de pesos da análise de PCA das amostras de urina do grupo DD. Algumas regiões dos espectros que mais contribuíram para o resultado obtido estão destacadas em cinza na **Figura 2.11**. Através da análise do gráfico de pesos da quarta componente principal observa-se que os sinais do hipurato,  $\alpha$ -glucose, TMAO e do acetato foram alguns dos sinais que mais contribuíram para os resultados obtidos.



**Figura 2.11.** Gráfico de pesos da componente PC4 das amostras de urina do grupo DD destacando as variáveis que foram importantes para o resultado obtido.

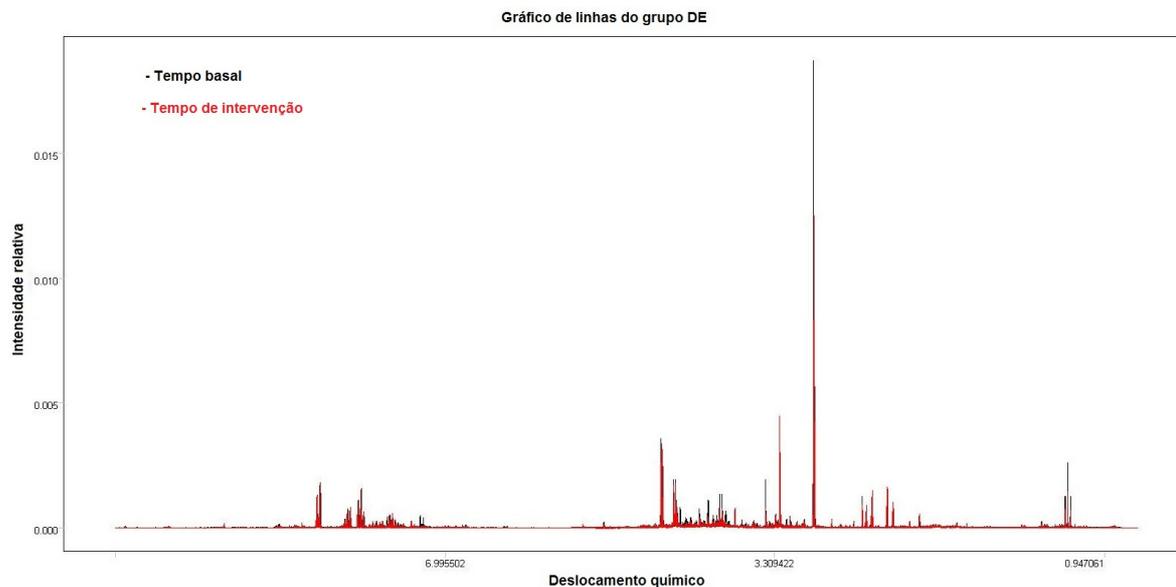
A explicação de 50% do total da variância do banco de dados significa que apenas metade da informação contida no banco de dados foi utilizada e a principal consequência é que os resultados apresentados pela análise de PCA tornam-se pouco robustos. No entanto, acredita-se que não houve separação entre

os grupos tempo basal e tempo de intervenção em virtude de que os pacientes diagnosticados com diabetes devem apresentar uma alimentação balanceada, de modo que a intervenção dietética não apresentou mudanças significativas no perfil metabólico de suas urinas.

Considerando agora as amostras de urina do grupo DE uma análise exploratória dos dados foi realizada utilizando PCA com o intuito de verificar se há uma distinção entre o tempo basal e o tempo de intervenção.

Analisando os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  individualmente observou-se que as amostras 294T-30, 294T-15, 294T0, 294T40 e 290T0 apresentaram quantidades significativamente superiores de  $\alpha$ -glucose quando comparadas às outras amostras do grupo DE. A amostra 295T-30 apresentou altos valores de trigonelina e outros sinais distintos na região de hidrogênios aromáticos e a amostra 209T-30 continha sinais no formato de “multipletos sobrepostos” na região de 1,0 a 4,0 ppm indicando uma possível presença de sinais de resíduo de proteínas. Essas sete amostras não foram incluídas nas análises por PCA.

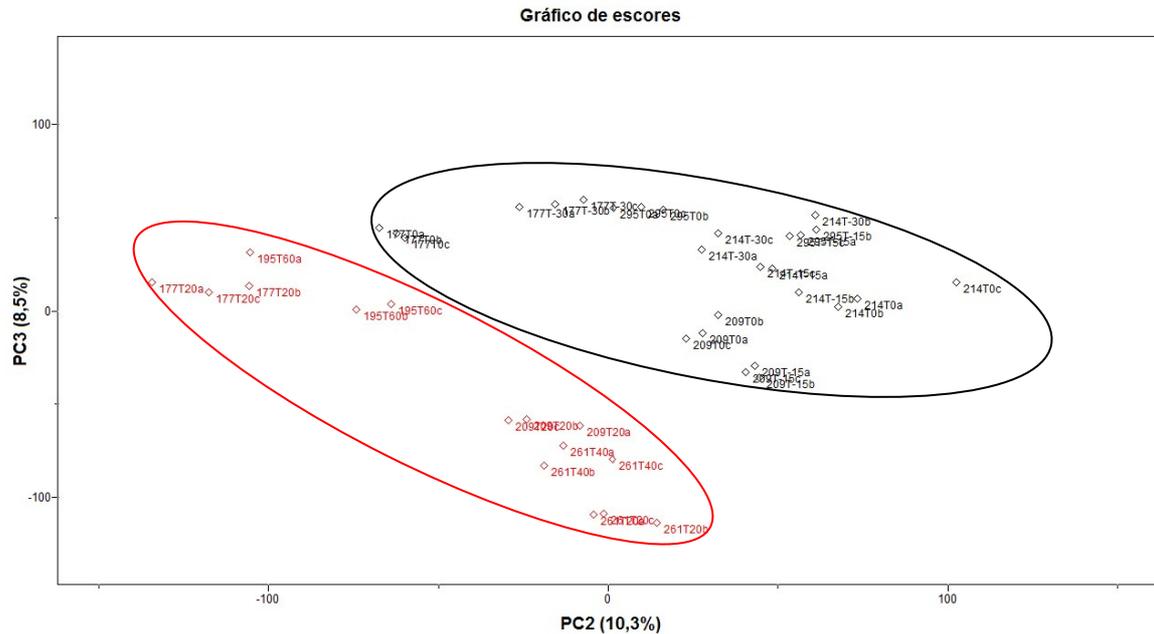
A matriz gerada após as exclusões das amostras e das regiões interferentes do espectro continha 42 linhas (14 amostras em triplicatas) e 31028 colunas (variáveis). A visualização de todas as variáveis, após as exclusões e pré-tratamento, encontra-se no gráfico de linhas apresentado na **Figura 2.12**.



**Figura 2.12.** Gráfico de linhas dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  das amostras de urina do grupo DE analisadas por PCA.

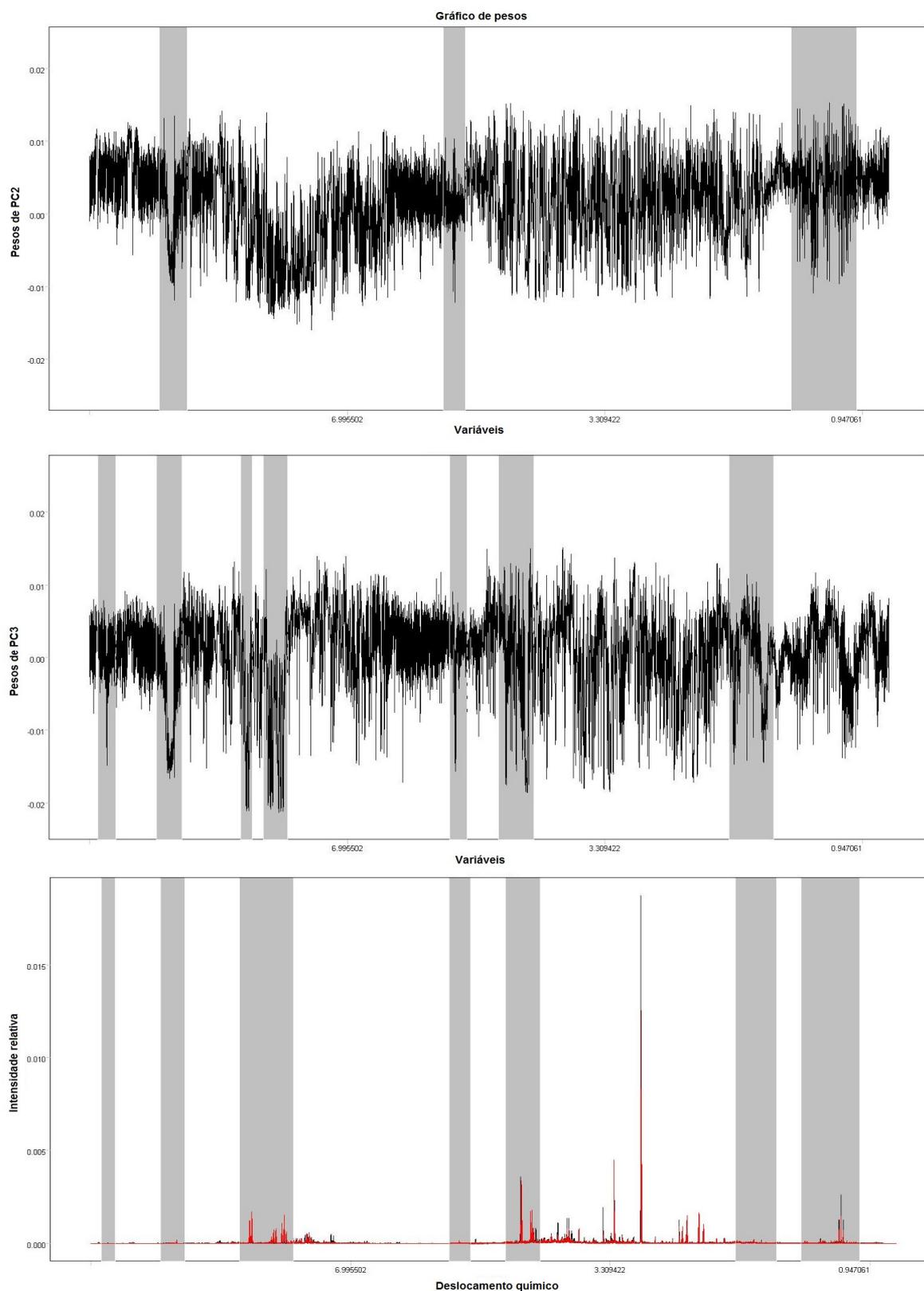
A **Figura 2.13** apresenta o gráfico de escores das amostras de urina do grupo DE. A soma dos valores obtidos para as cinco primeiras componentes principais (PC1 (28%), PC2 (10%), PC3 (8%), PC4 (6%) e PC5 (5%)) apresentaram uma explicação de 55% do total da variância do banco de dados.

Conforme pode ser observado na **Figura 2.13** existe uma forte tendência de agrupamento entre as amostras do tempo basal e do tempo de intervenção do grupo DE. As amostras do grupo do tempo de intervenção tendem a se agrupar com os valores negativos de PC2 e PC3, enquanto as amostras do grupo do tempo basal tendem a se agrupar com os valores positivos de PC2 e PC3. Pode-se notar que as replicatas dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  apresentaram-se bastante próximas entre si, evidenciando a reprodutibilidade da técnica.



**Figura 2.13.** Gráfico de escores PC2 (10,3%) x PC3 (8,5%) das amostras de urina do grupo DE.

A **Figura 2.14** apresenta o gráfico de pesos da análise de PCA das amostras de urina do grupo DE. As regiões dos espectros que mais contribuíram para o resultado obtido estão destacadas em cinza na **Figura 2.14**. No gráfico de pesos da PC2 observa-se que os sinais que mais contribuíram para a separação obtida foram os sinais dos metabólitos formiato,  $\alpha$ -glucose e a região de 1,0 a 5,0 ppm onde se encontram os sinais do etanol,  $\beta$ -OH-Butirato, lactato e alanina. Os metabólitos que tiveram maior influência no gráfico de pesos da PC3 foram a trigonelina, formiato, hipurato,  $\alpha$ -glucose, creatinina, GABA e acetato.



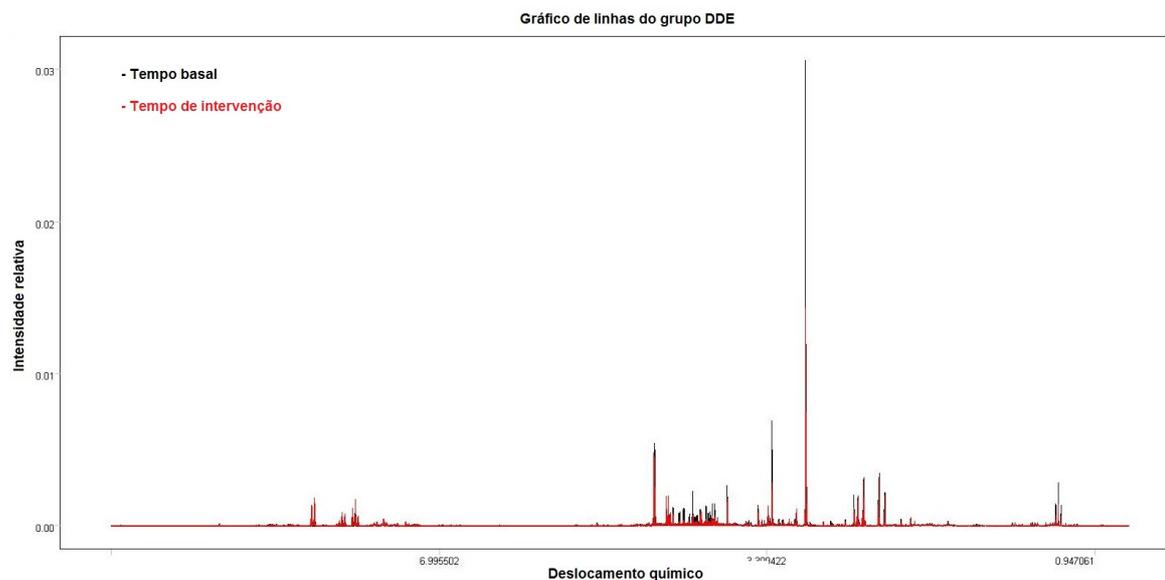
**Figura 2.14.** Gráfico de pesos das componentes PC2 e PC3 das amostras de urina do grupo DE destacando as variáveis que foram importantes para o resultado obtido.

Conforme mostrado na **Tabela 2.4** as amostras de urina do grupo DE apresentaram uma redução na concentração de creatinina após o tratamento com a erva-mate. A análise de PCA mostrou que existe uma diferença estatística no perfil metabólico das urinas dos pacientes diagnosticados com DMT2 após o tratamento com a erva-mate.

Considerando por último as amostras de urina do grupo DDE uma análise exploratória dos dados foi realizada utilizando PCA com o intuito de verificar se há uma distinção entre o tempo basal e o tempo de intervenção.

Analisando os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  individualmente observou-se que as amostras 200T0 e 200T40 apresentaram quantidades significativamente superiores de  $\alpha$ -glucose quando comparadas às outras amostras do grupo DDE. A amostra 246T-30 apresentou altos valores de etanol e outros sinais distintos na região de hidrogênios aromáticos e a amostra 200T20 apresentou altos valores de hipurato e também sinais distintos na região de hidrogênios aromáticos. Essas quatro amostras não foram incluídas nas análises por PCA.

A matriz gerada após as exclusões das amostras e das regiões interferentes do espectro continha 69 linhas (23 amostras em triplicatas) e 31028 colunas (variáveis). A visualização de todas as variáveis, após as exclusões e pré-tratamento, encontra-se no gráfico de linhas apresentado na **Figura 2.15**.



**Figura 2.15.** Gráfico de linhas dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  das amostras de urina do grupo DDE analisadas por PCA

A **Figura 2.16** apresenta o gráfico de escores das amostras de urina do grupo DDE. Após a análise do gráfico de *outliers* (**Figura 2.17**) observou-se que as amostras 161T20 e 210T0 ficaram bastante afastadas das outras amostras do grupo DDE e, portanto possuem uma forte tendência de serem classificadas como *outliers*. Uma nova análise de PCA foi realizada excluindo as amostras 161T20 e 210T0. A **Figura 2.18** apresenta o gráfico de escores das amostras de urina do grupo DDE após a retirada das amostras 161T20 e 210T0. A soma dos valores obtidos para as cinco primeiras componentes principais [PC1 (25%), PC2 (8%) PC3 (8%), PC4 (6%) e PC5 (4%)] apresentou uma explicação de 51% do total da variância do banco de dados.

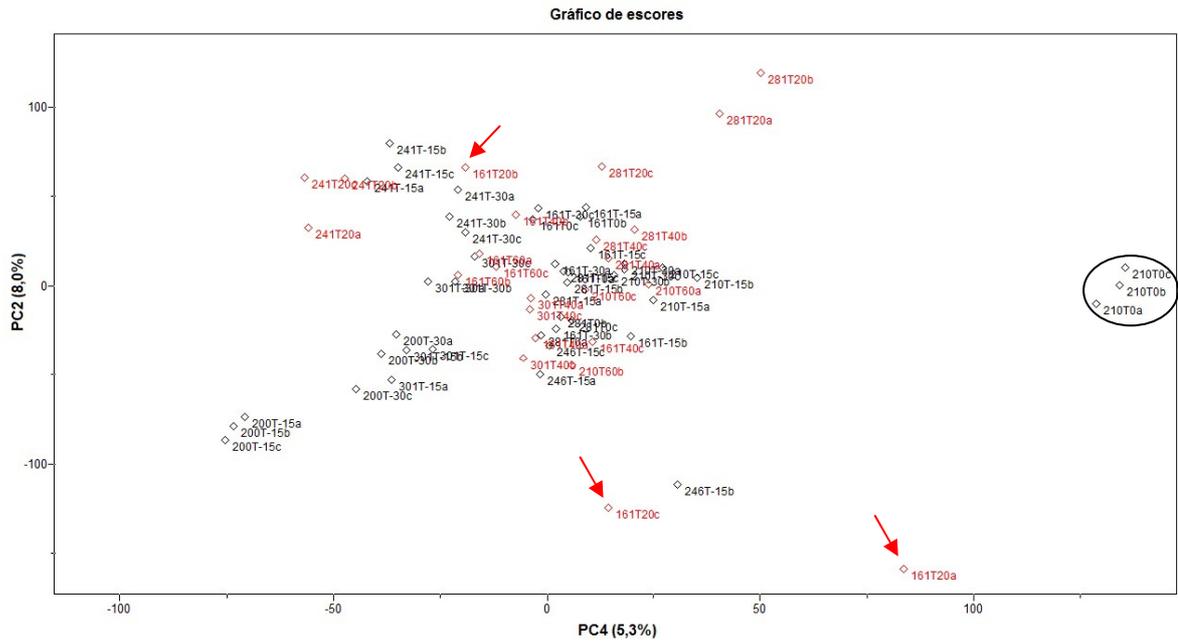


Figura 2.16. Gráfico de escores PC4 (5,3%) x PC2 (8,0%) das amostras de urina do grupo DDE.

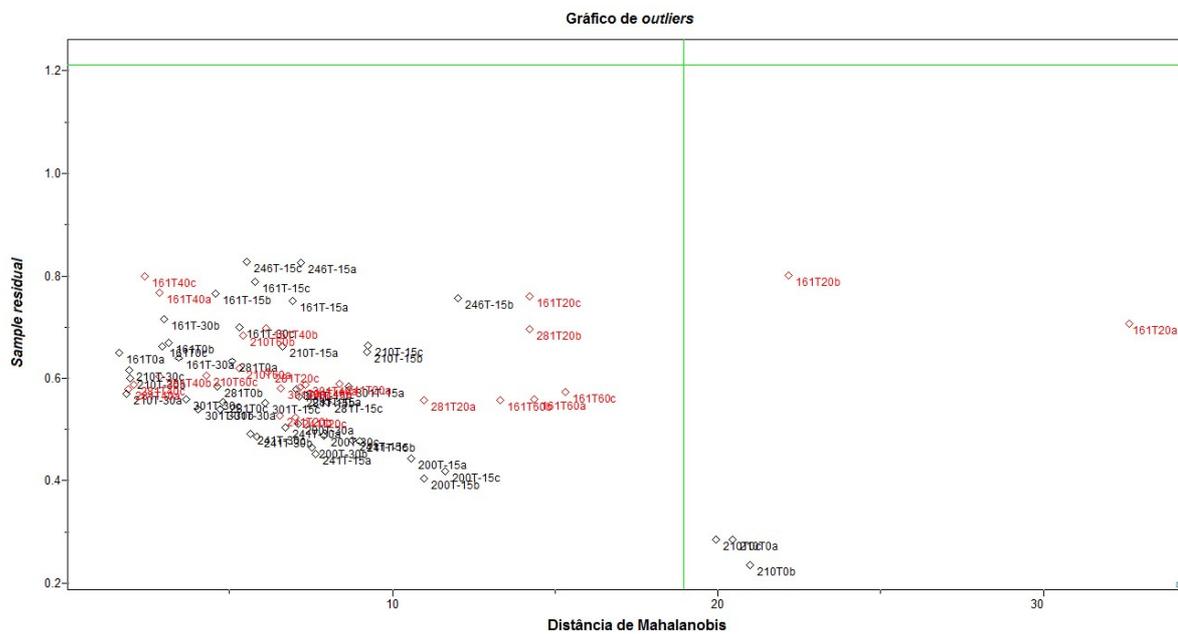
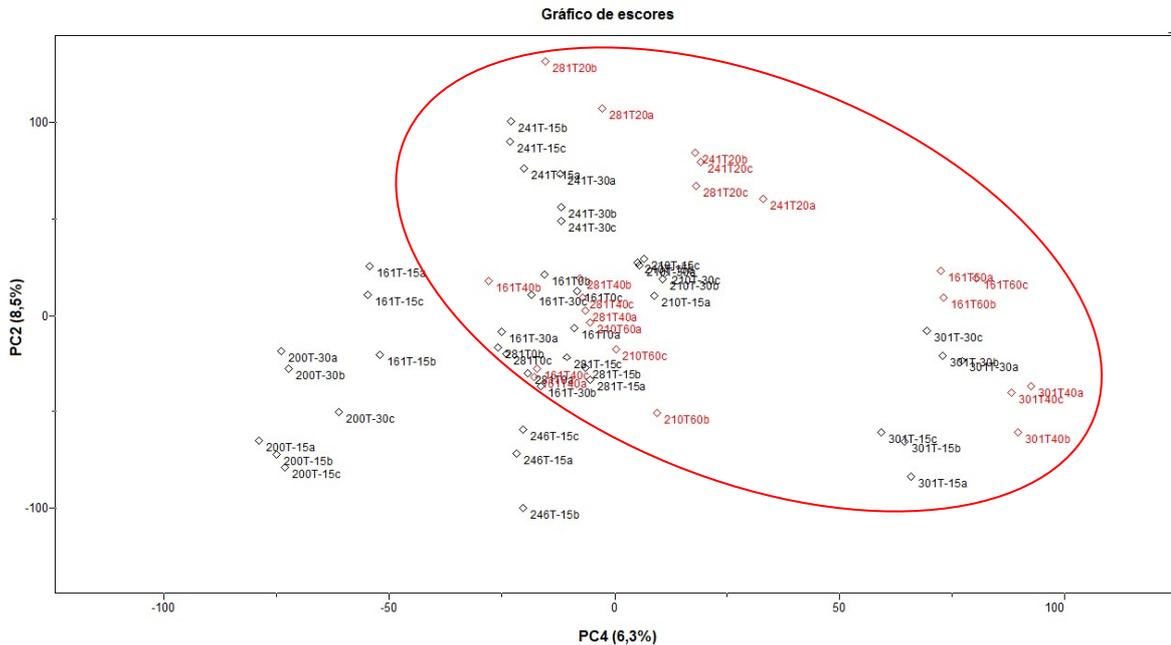


Figura 2.17. Gráfico de outliers da análise de PCA das amostras de urina do grupo DDE.

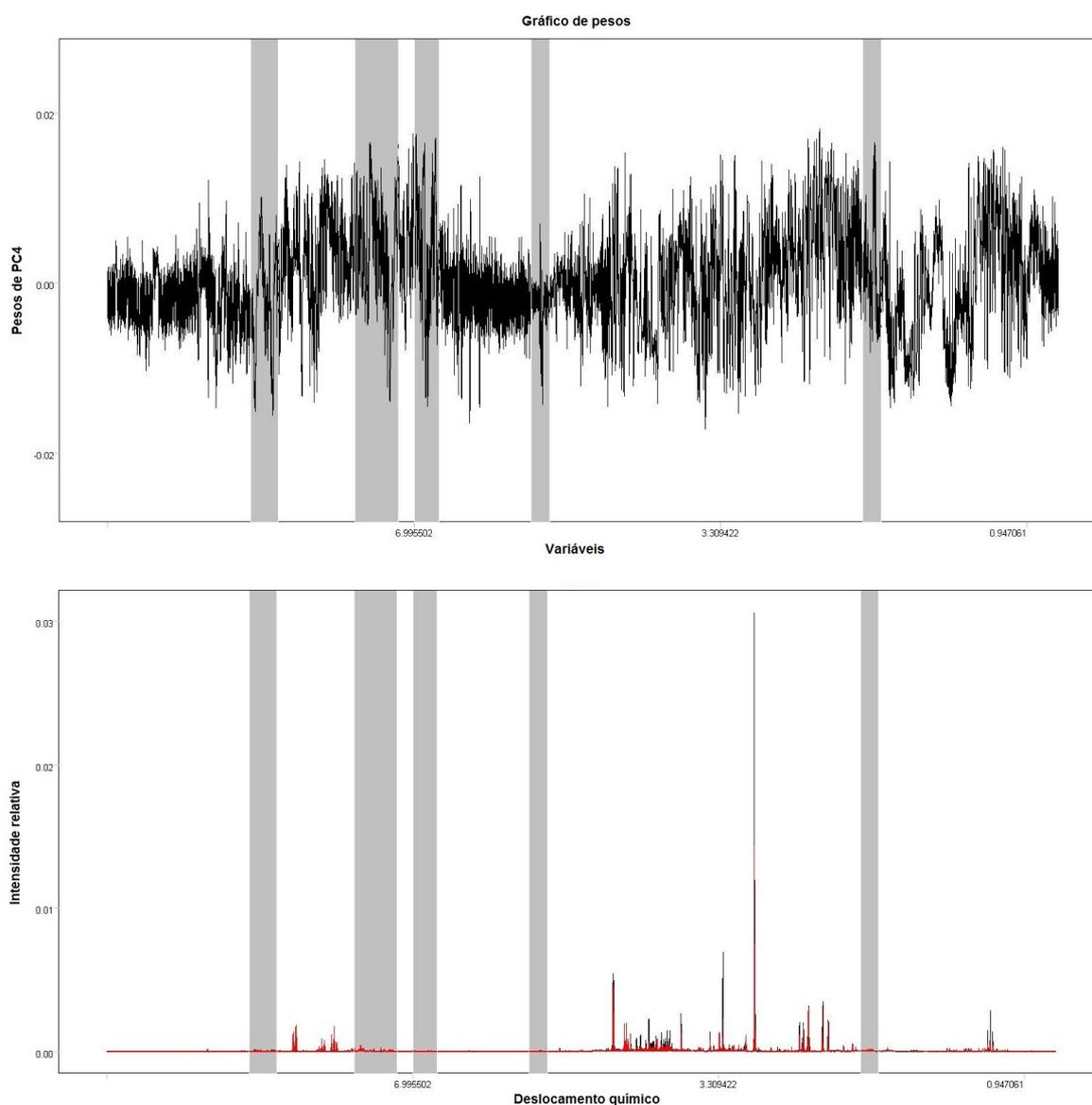


**Figura 2.18.** Gráfico de escores PC4 (6,3%) x PC2 (8,5%) das amostras de urina do grupo DDE após a retirada das amostras 161T20 e 210T0.

Após a retirada das amostras consideradas *outliers* houve uma melhora tanto na separação quanto na variância explicada pela PCA. No entanto não se observa um agrupamento nítido das amostras do grupo DDE. Observa-se que as amostras do tempo de intervenção tendem a se agrupar no eixo dos valores positivos de PC4 enquanto as amostras do tempo basal encontram-se espalhadas por todo o gráfico.

A **Figura 2.19** apresenta o gráfico de pesos da análise de PCA das amostras de urina do grupo DDE. Algumas regiões dos espectros que mais contribuíram para o resultado obtido estão destacadas em cinza na **Figura 2.19**. Através da análise do gráfico de pesos da quarta componente principal observa-se

que os sinais dos hidrogênios da trigonelina,  $\alpha$ -glucose e acetato foram alguns dos sinais que mais contribuíram para os resultados obtidos.



**Figura 2.19.** Gráfico de pesos da componente PC4 das amostras de urina do grupo DDE destacando as variáveis que foram importantes para o resultado obtido.

Apesar das amostras do grupo DDE não possuírem um agrupamento nítido como no caso das amostras do grupo DE, as amostras do grupo DDE possuem uma melhor separação quando comparadas às amostras do grupo DD, evidenciando a mudança no perfil metabólico decorrente da ingestão da erva-mate.

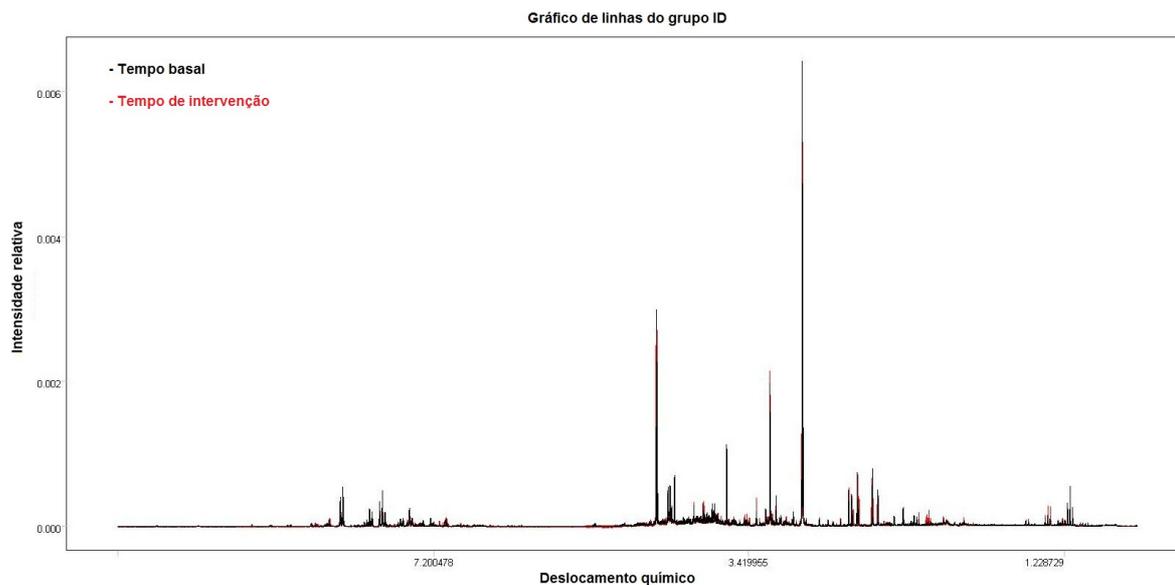
#### **2.4.3.2. Intolerância a glicose**

As amostras de urina dos pacientes diagnosticados com intolerância a glicose também foram divididas em três grupos (ID, IE e IDE), sendo esses grupos divididos em dois tempos (tempo basal e tempo de intervenção). O objetivo da análise multivariada nesse trabalho foi verificar se houve uma diferença no perfil metabólico das urinas entre o tempo basal e o tempo de intervenção de cada grupo.

Considerando primeiramente as amostras de urina do grupo ID, uma análise exploratória dos dados foi realizada utilizando PCA com o intuito de verificar se há uma distinção entre o tempo basal e o tempo de intervenção.

Analisando os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  individualmente observou-se que as amostras 117T20 e 309T0 apresentaram sinais bastante largos quando comparados com os espectros das outras amostras do grupo ID. Essas duas amostras não foram incluídas nas análises por PCA.

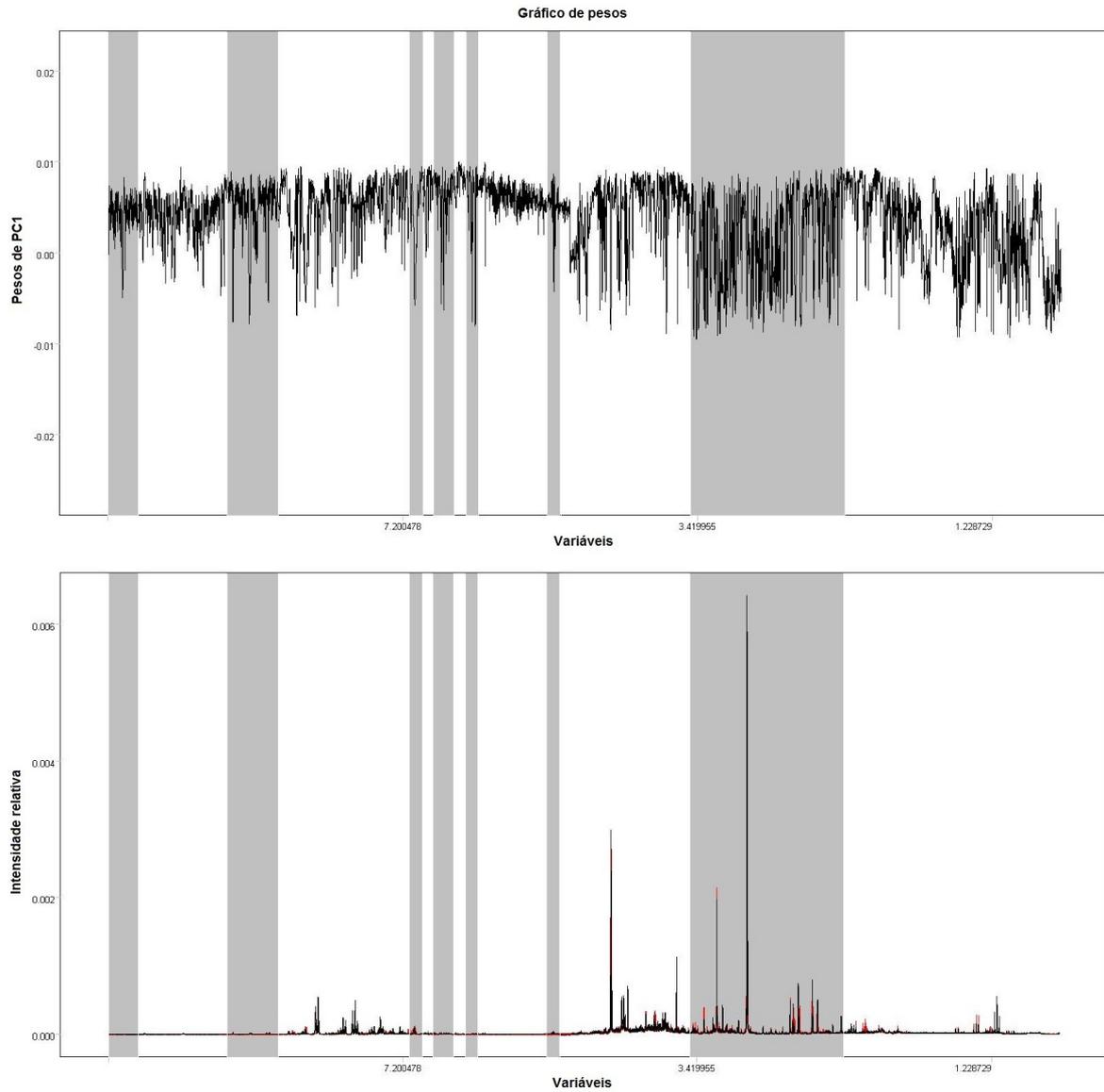
A matriz gerada após as exclusões das amostras e das regiões interferentes do espectro continha 33 linhas (11 amostras em triplicatas) e 31028 colunas (variáveis). A visualização de todas as variáveis, após as exclusões e pré-tratamento, encontra-se no gráfico de linhas apresentado na **Figura 2.20**.



**Figura 2.20.** Gráfico de linhas dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  das amostras de urina do grupo ID analisadas por PCA.

A **Figura 2.21** apresenta o gráfico de escores das amostras de urina do grupo ID. A soma dos valores obtidos para as cinco primeiras componentes principais (PC1 (28%), PC2 (15%), PC3 (10%), PC4 (8%) e PC5 (6%)) apresentaram uma explicação de 67% do total da variância do banco de dados.



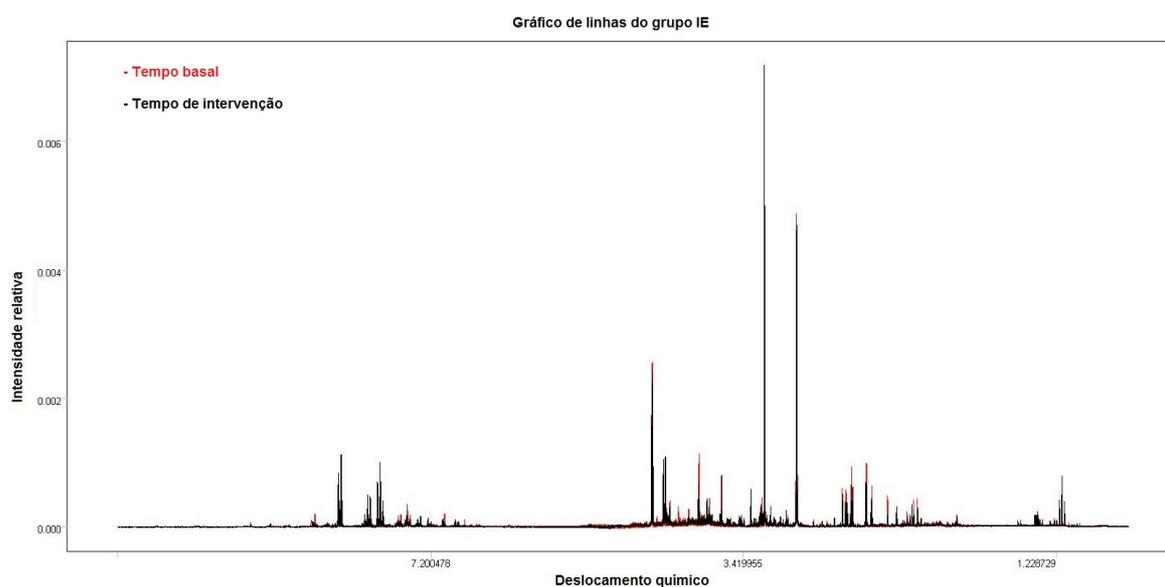


**Figura 2.22.** Gráfico de pesos da componente PC1 das amostras de urina do grupo ID destacando as variáveis que foram importantes para o resultado obtido.

Considerando agora as amostras de urina do grupo IE uma análise exploratória dos dados foi realizada utilizando PCA com o intuito de verificar se há uma distinção entre o tempo basal e o tempo de intervenção.

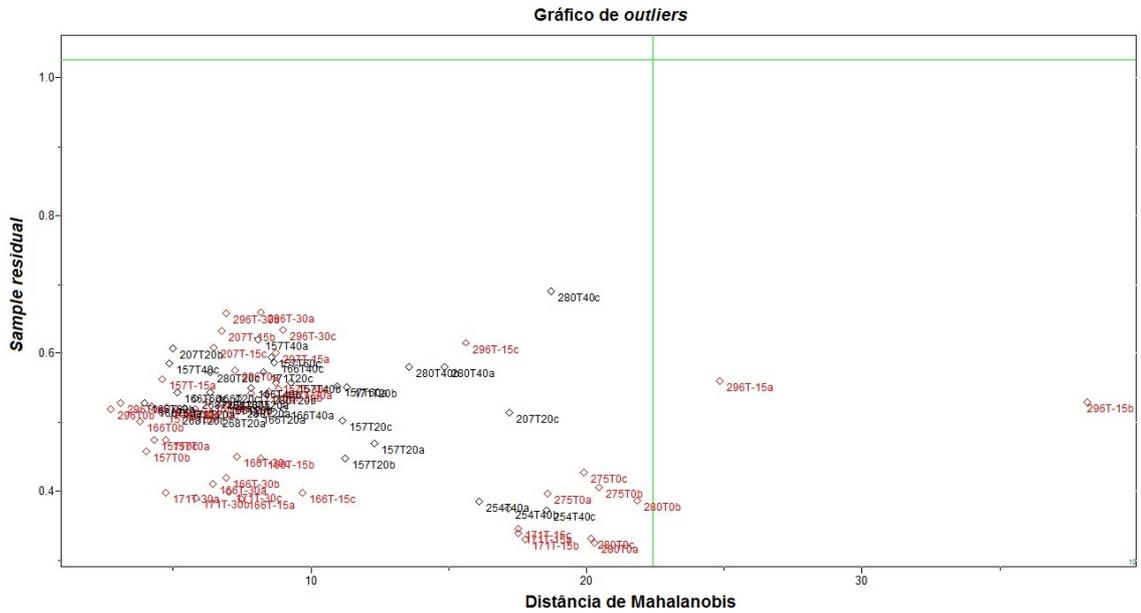
Analisando os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  individualmente observou-se que a amostra 207T0 continha a presença de um metabólito não identificado e em alta concentração com sinais característicos em 6,80 ppm (d), 6,63 ppm (s), 6,22 (s), 5,29 ppm (d), 3,84 ppm (s), 3,77 ppm (s) e 2,41 ppm (d). A amostra 268T-15 apresentou altos valores de trigonelina, creatinina e citrato, e também outros sinais distintos na região de hidrogênios aromáticos. Essas duas amostras não foram incluídas nas análises por PCA.

A matriz gerada após as exclusões das amostras e das regiões interferentes do espectro continha 81 linhas (27 amostras em triplicatas) e 31028 colunas (variáveis). A visualização de todas as variáveis, após as exclusões e pré-tratamento, encontra-se no gráfico de linhas apresentado na **Figura 2.23**.

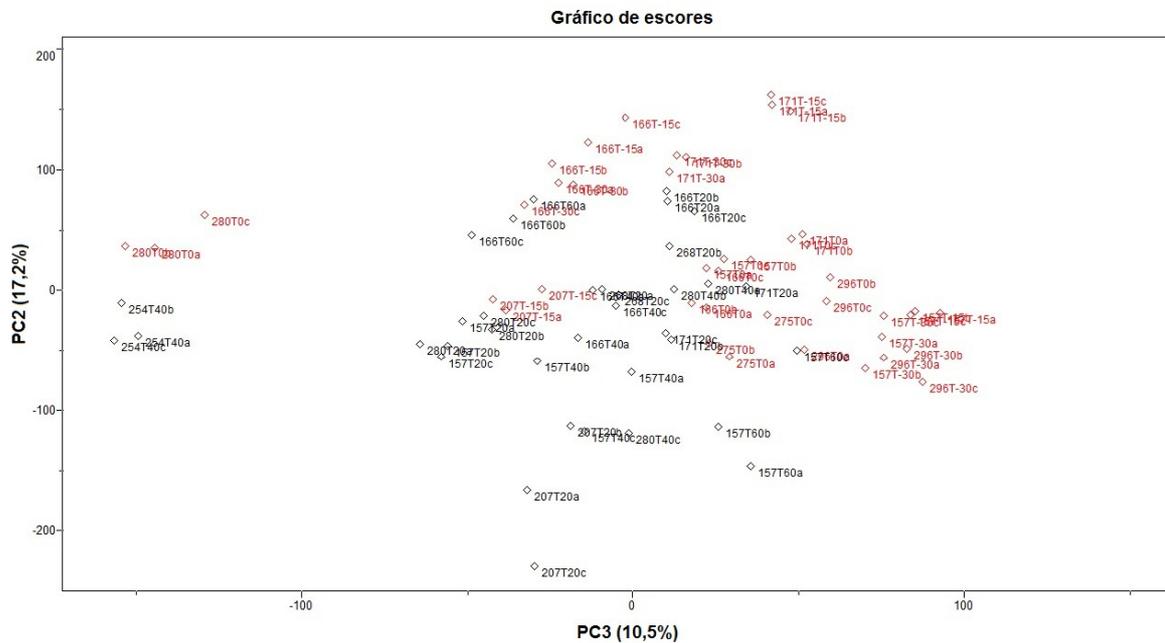


**Figura 2.23.** Gráfico de linhas dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  das amostras de urina do grupo IE analisadas por PCA.





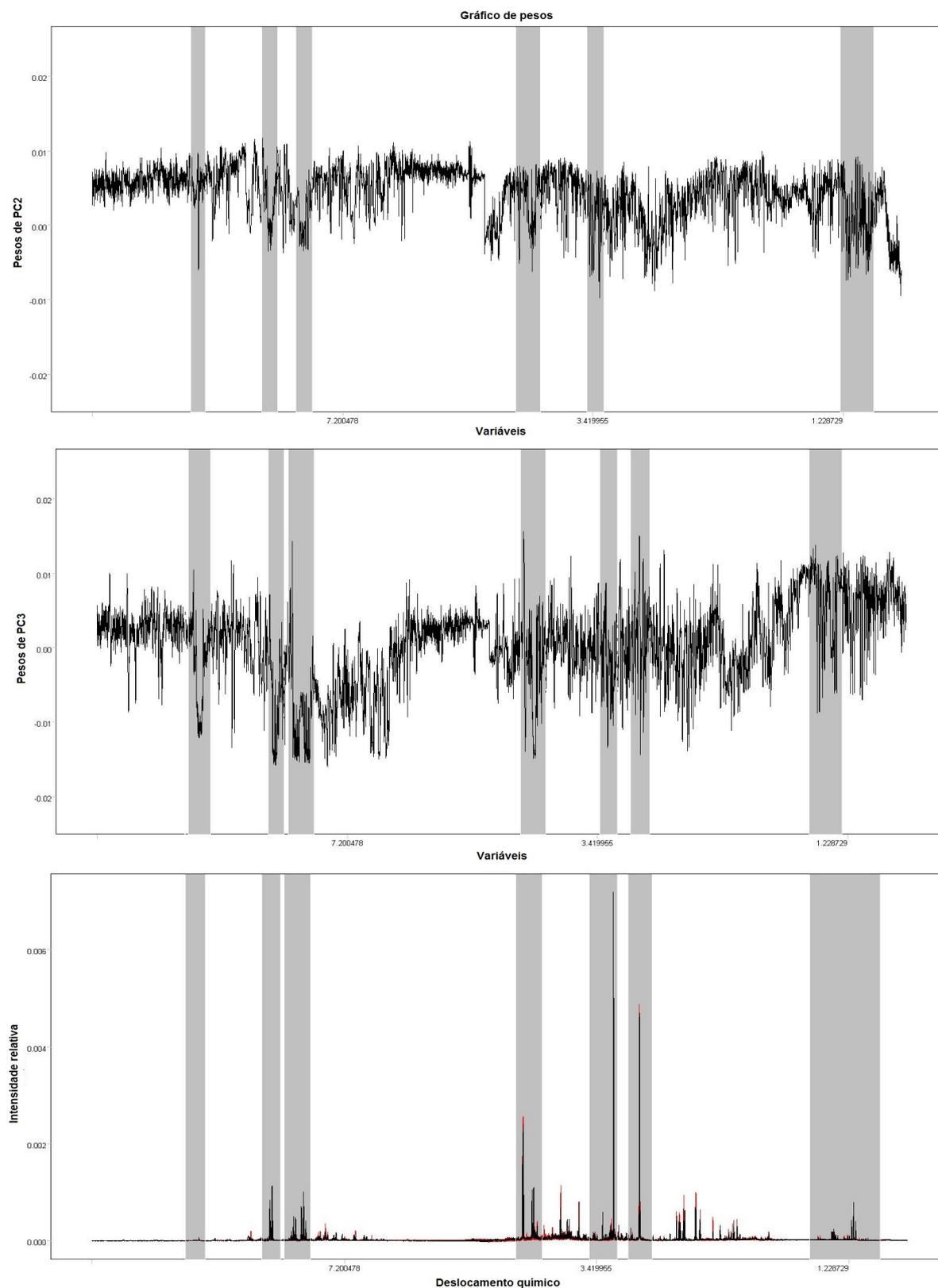
**Figura 2.25.** Gráfico de *outliers* da análise de PCA das amostras de urina do grupo IE.



**Figura 2.26.** Gráfico de escores PC3 (10,5%) x PC2 (17,2%) das amostras de urina do grupo IE após a retirada da amostra 296T-15.

Após a retirada da amostra 296T-15 do banco de dados do grupo IE a porcentagem de variância explicada pela análise de PCA é aumentada e nota-se que houve um melhor agrupamento das amostras. No entanto, não se observa na **Figura 2.26** uma separação evidente entre as amostras do tempo de intervenção e do tempo basal. Pode-se notar que as amostras de urina do tempo basal tendem a se agrupar com os valores positivos de PC2 e PC3 enquanto as amostras do tempo de intervenção tendem a se agrupar com os valores negativos de PC2 e PC3.

A **Figura 2.27** apresenta o gráfico de pesos da análise de PCA das amostras de urina do grupo IE. As regiões dos espectros que mais contribuíram para o resultado obtido estão destacadas em cinza na **Figura 2.27**. Através da análise do gráfico de pesos observa-se que os metabólitos que mais contribuíram para a separação foram o formiato, hipurato, creatinina, TMAO, betaína e a região de 1,0 a 5,0 ppm onde se encontram os sinais do etanol,  $\beta$ -OH-Butirato, lactato e alanina.

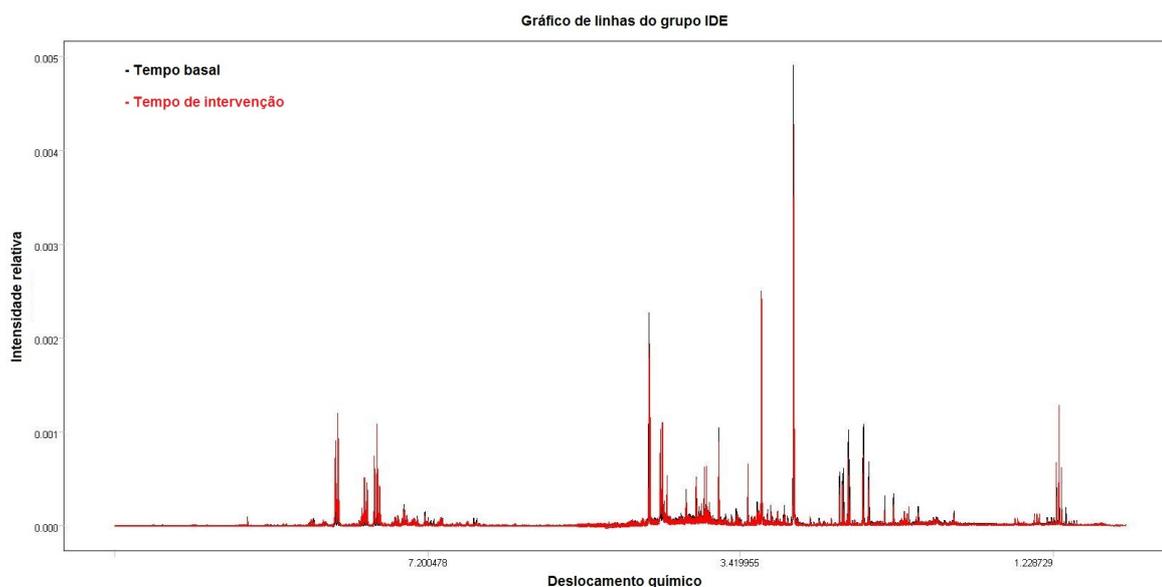


**Figura 2.27.** Gráfico de pesos das componentes PC2 e PC3 das amostras de urina do grupo IE destacando as variáveis que foram importantes para o resultado obtido.

Por último as amostras de urina do grupo IDE foram submetidas a uma análise exploratória dos dados utilizando PCA com o intuito de verificar se há uma distinção entre o tempo basal e o tempo de intervenção.

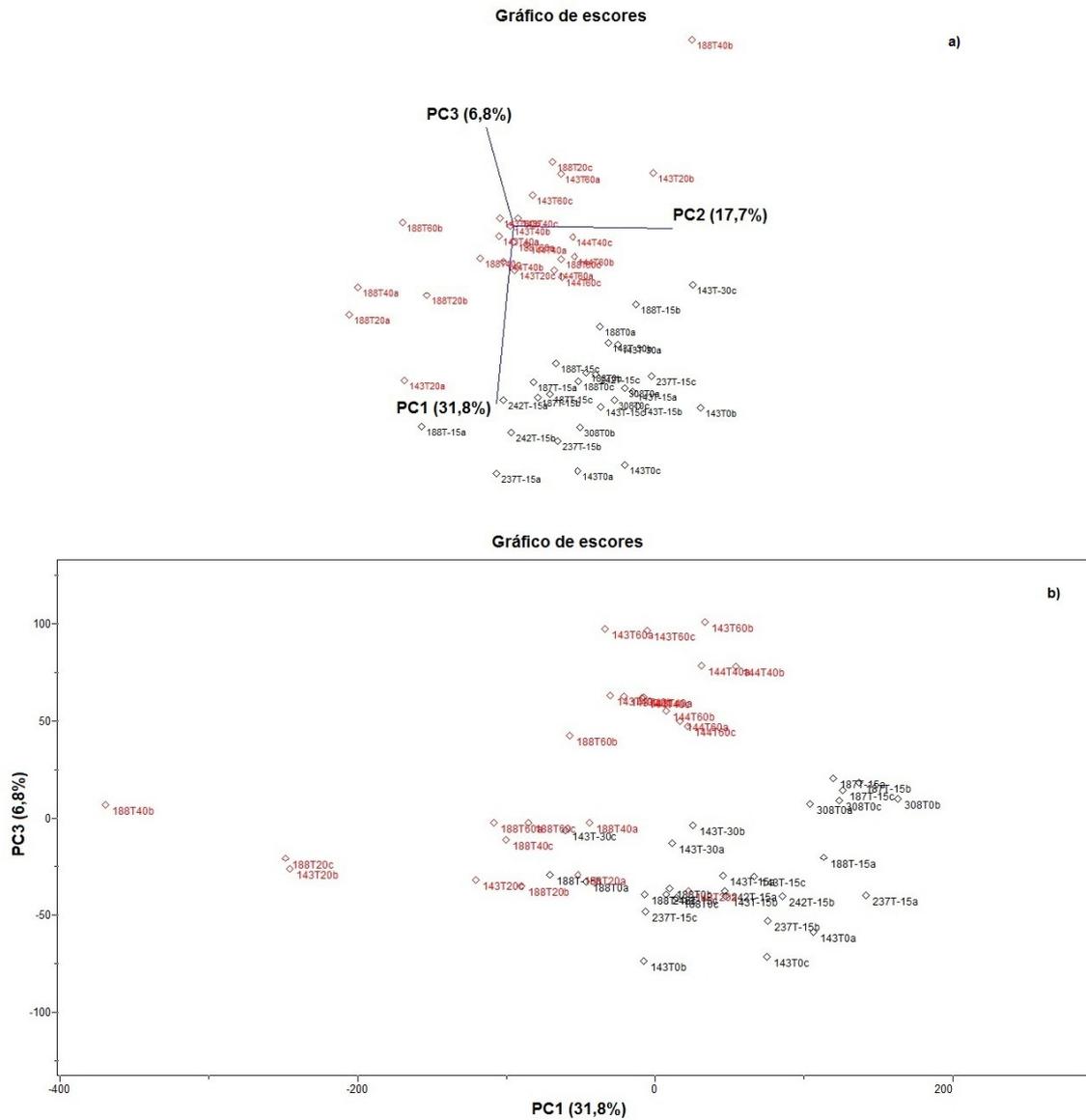
Analisando os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  individualmente observou-se que as amostras 211T-30, 211T-15, 211T0 e 211T40 apresentaram sinais muito alargados quando comparadas às outras amostras do grupo IDE. As amostras 144T-30, 144T0 e 242T20 apresentaram vários sinais distintos na região de hidrogênios aromáticos e na região de 1 a 4 ppm. Essas sete amostras não foram incluídas nas análises por PCA.

A matriz gerada após as exclusões das amostras e das regiões interferentes do espectro continha 51 linhas (17 amostras em triplicatas) e 31028 colunas (variáveis). A visualização de todas as variáveis, após as exclusões e pré-tratamento, encontra-se no gráfico de linhas apresentado na **Figura 2.28**.



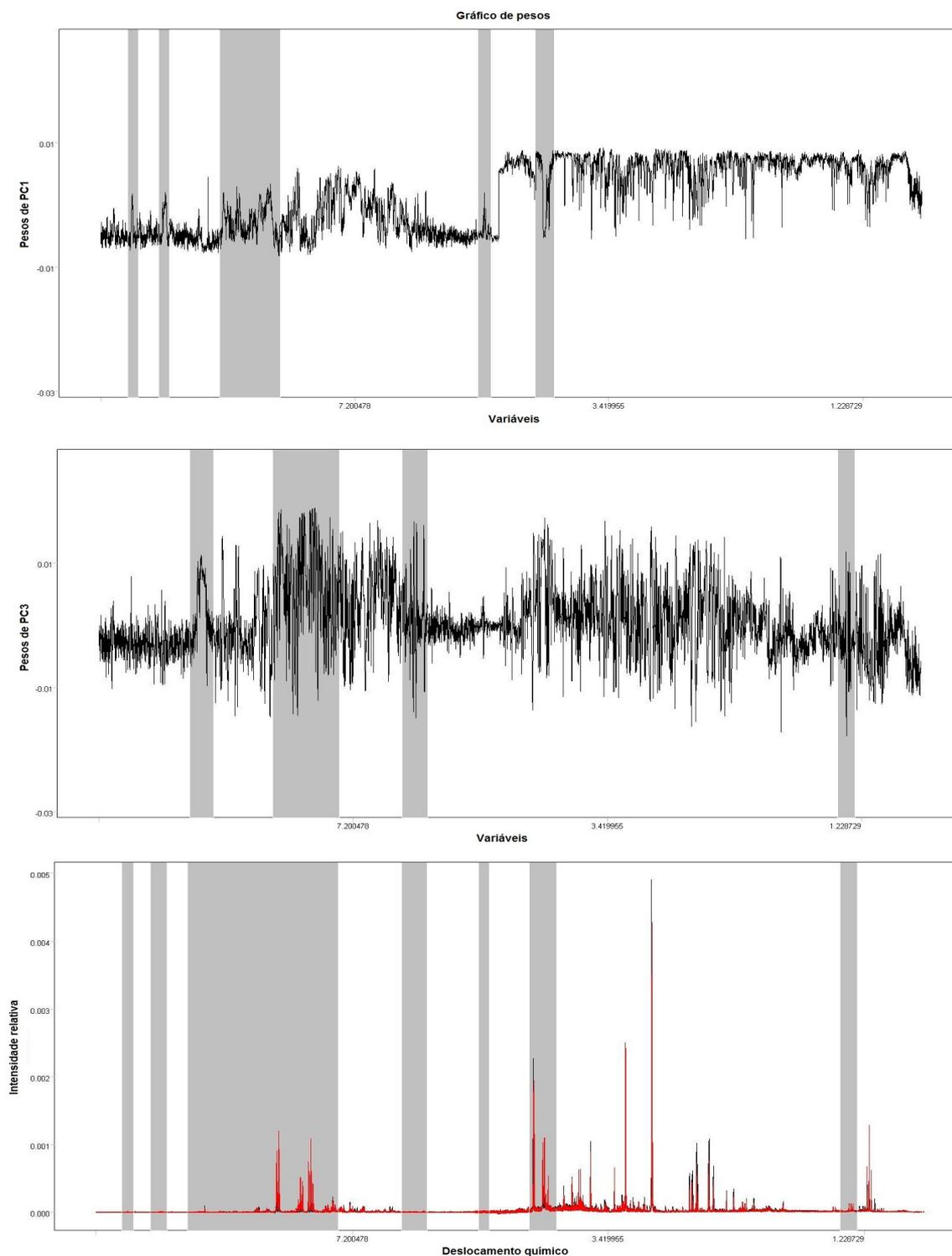
**Figura 2.28.** Gráfico de linhas dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  das amostras de urina do grupo IDE analisadas por PCA.

A **Figura 2.29** apresenta o gráfico de escores das amostras de urina do grupo IDE. A soma dos valores obtidos para as cinco primeiras componentes principais [PC1 (32%), PC2 (18%), PC3 (7%), PC4 (6%) e PC5 (5%)] apresentaram uma explicação de 68% do total da variância do banco de dados. Conforme pode ser observado **Figura 2.29**, existe uma forte tendência de agrupamento entre as amostras do tempo de intervenção e do tempo basal do grupo IDE. O gráfico de escores no formato 3D mostra claramente essa separação. No gráfico de escores 2D observa-se que as amostras de urina do tempo basal tendem a se agrupar com os valores positivos de PC1 e negativos de PC3, enquanto as amostras de urina do tempo de intervenção se agrupam com as valores negativos de PC1 e positivos de PC3.



**Figura 2.29.** Gráfico de escores das amostras de urina do grupo IDE, a) Gráfico 3D [PC1 (31,8%) x PC2 (17,7%) x PC3 (6,8%)] b) Gráfico 2D [PC1 (31,8%) x PC3 (6,8%)].

A **Figura 2.30** apresenta o gráfico de pesos da análise de PCA das amostras de urina do grupo IDE. As regiões dos espectros que mais contribuíram para o resultado obtido estão destacadas em cinza na **Figura 2.30**. O gráfico de pesos mostra que as variáveis que foram importantes para o resultado obtido são os sinais dos metabólitos trigonelina, hipurato, formiato,  $\alpha$ -glucose, creatinina e alanina.



**Figura 2.30.** Gráfico de pesos das componentes PC1 e PC3 das amostras de urina do grupo IDE destacando as variáveis que foram importantes para o resultado obtido.

Em todas as análises de PCA das amostras de urina de pacientes diagnosticados com IGT observou-se um melhor agrupamento das amostras do tempo basal e do tempo de intervenção quando comparado às amostras de urina de pacientes diagnosticados com DMT2. A melhor separação obtida para amostras de urina dos pacientes com IGT foi a condição de intervenção dietética aliada ao consumo de erva-mate. Esse resultado mostra que tanto a intervenção dietética quanto o consumo do chá de erva-mate causaram mudanças no perfil metabólico dos pacientes diagnosticados com IGT.

## **2.5. Conclusão**

Pode-se concluir que a técnica de ressonância magnética nuclear (RMN de  $^1\text{H}$  e bidimensionais) mostrou-se como uma importante ferramenta na identificação e quantificação relativa dos principais metabólitos presentes nas amostras de urina de humanos. Através da quantificação relativa dos metabólitos identificados nas amostras de urina foi possível fazer algumas considerações com relação ao tratamento de pacientes diagnosticados com DMT2 e IGT e que foram submetidos ao tratamento com infusões de erva-mate. Os testes bioquímicos usuais dos laboratórios de análise normalmente não detectam nenhuma variação neste tipo de tratamento. A técnica de RMN se mostrou sensível o suficiente para detectar essas mudanças. Os dados fornecidos pelos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  aliados a análise multivariada mostrou que existe uma diferença no perfil metabólico das urinas dos pacientes. No caso do grupo IDE verificou-se que os pacientes que foram submetidos à intervenção dietética e tratamento com erva-mate apresentaram um perfil metabólico bastante diferenciado das amostras no tempo basal. No caso do grupo de diabetes verificou-se que o tratamento utilizando apenas erva-mate apresenta uma melhor distinção das amostras do tempo basal. A técnica de RMN aliada à análise quimiométrica apresenta um grande potencial de diagnóstico e pode futuramente ser empregada como rotina em tratamentos usuais

# **Capítulo 3**

**Análise de amostras de látex via RMN**

### 3.1. Introdução

#### 3.1.1. Látex

O látex pode ser definido como uma dispersão coloidal estável de uma substância polimérica (partículas de borracha) em um meio essencialmente aquoso chamado de soro. Outros componentes estão presentes minoritariamente na composição do látex, tais como proteínas, carboidratos, lipídios, sais minerais, entre outros. O látex apresenta uma grande variedade de substâncias químicas em diferentes concentrações e que dependem de uma série de fatores e dentre eles: o tipo de cultivo, solo, fertilizante utilizado e processo de extração do látex<sup>58</sup>.

O látex é extraído da *Hevea brasiliensis*, uma planta pertencente à família Euforbiácea, originária da Amazônia, e popularmente conhecida como seringueira. Dentre as 11 espécies de *Hevea* existentes a *brasiliensis* é a que mais se destaca por apresentar maior produtividade de látex e variabilidade genética para resistência a doenças. A *Hevea brasiliensis* fornece aproximadamente 99% da produção mundial de borracha natural<sup>59</sup>.

O processo de extração do látex da seringueira é realizado através da sangria, que consiste em fazer uma incisão na casca, para cortar os anéis de vasos laticíferos que se encontram na porção interna do floema, em torno do câmbio. O corte é feito da esquerda para a direita em um ângulo de 30° em meia circunferência ao redor do tronco e no ponto mais baixo é inserida uma cânula de metal por onde o látex escorre para dentro de pequenos potes<sup>60</sup>. A aplicação de estimulantes para aumentar a produção de látex é usual. É comum, por exemplo, o uso de Ethephon<sup>®</sup>,

cujo ingrediente ativo é o ácido 2- cloroetanofosfônico, que libera gás etileno, responsável por aumentar o tempo no qual o látex flui e assim aumenta a produção com uma frequência de sangria reduzida<sup>61</sup>.

A preservação do látex deve ser realizada para se evitar o processo de coagulação espontânea. A coagulação espontânea ocorre quando o pH do látex inicialmente entre 7,0 e 7,2 cai para 5,0 em um período de poucas horas. Entre as hipóteses que explicam a causa desse processo ocorrer pode-se citar a ação de microorganismos que reagem com os compostos responsáveis pela estabilização da borracha, diminuindo sua estabilidade e a liberação de ânions de ácidos graxos através da hidrólise de várias substâncias lipídicas presentes no látex<sup>61</sup>. A adição de NH<sub>4</sub>OH (hidróxido de amônio) é muito utilizada quando há necessidade de preservar o látex por um longo período. Sua adição é feita na concentração de 0,7% em relação à massa de látex, pois em concentrações acima de 0,35% em massa o hidróxido de amônio é um bactericida muito eficiente e não necessita da adição de preservativos auxiliares. Se o látex é resfriado a 5 °C imediatamente após a coleta não coagula, evitando assim a adição de preservativos<sup>61</sup>.

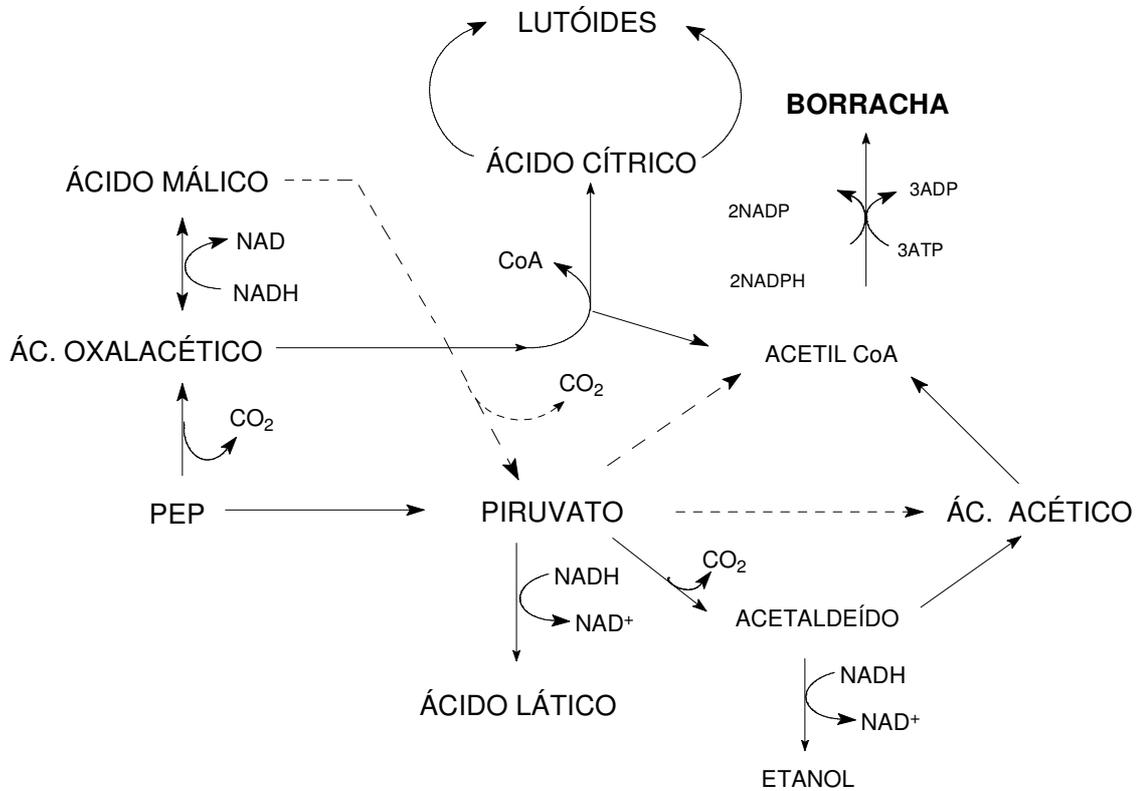
Quando o látex obtido através do processo de sangria é submetido ao processo de centrifugação é possível observar a formação de três fases principais: uma fase superior constituída essencialmente de borracha (poliisopreno), responsável por cerca de 37% do volume total; uma fase intermediária aquosa denominada de soro citoplasmático, que representa cerca de 48% do volume total; e uma fração de fundo denominada de soro de sedimentação que representa cerca de 15% do volume total, e que é constituída por diversas partículas, sendo as principais os lutóides<sup>62</sup>.

Os lutóides são vesículas ou vacúolos envoltos por uma membrana frágil, semi-permeável e que contém em seu interior um líquido denominado soro B, com pH em torno de 5,5 e é constituído de proteínas de alto ponto isoelétrico enriquecidas de cátions divalentes ( $Mg^{2+}$  e  $Ca^{2+}$ ) sendo capaz de provocar a floculação de partículas de borracha quando liberado. Tais partículas têm papel importante na estabilidade coloidal e no fluxo do látex<sup>62</sup>.

O poliisopreno é um polímero constituído por uma cadeia de unidades isoprênicas de cinco carbonos e representa em torno de 90% da fração superior do látex centrifugado sendo os outros 10% composto por proteínas e lipídeos. A função biológica do poliisopreno presente no látex das plantas não é bem conhecida mas, no entanto, algumas teorias descrevem o uso desse polímero como reserva de energia nas plantas e/ou produto final da respiração anaeróbica<sup>61</sup>.

O poliisopreno é sintetizado bioquimicamente no sistema laticífero das plantas. A presença isolada do isopreno em plantas produtoras de poliisopreno nunca foi relatada e por isso acredita-se que o isopreno não seja um precursor da biossíntese do poliisopreno. Além do que nenhuma rota biossintética foi estabelecida para a produção de isopreno a partir de substâncias simples<sup>61</sup>.

A **Figura 3.1** apresenta as principais etapas envolvidas na biossíntese do poliisopreno. A sequência dessa via pode ser resumida em duas etapas principais: a primeira é o catabolismo de carboidratos através da glicólise transformando sacarose em acetato e produzindo energia na forma de ATP; a segunda é anabolismo isoprênico propriamente dito, a partir do acetato (ou acetil CoA), com a energia sob a forma de NADPH, e que permite a elaboração do isopentil difosfato, unidade base da policondensação da borracha<sup>63</sup>.



**Figura 3.1.** Principais etapas envolvidas na biossíntese do poliisopreno<sup>63</sup>.

No soro do látex natural são encontradas diferentes espécies químicas, tais como carboidratos, sais minerais, proteínas e aminoácidos. O carboidrato presente em maior quantidade no soro do látex é o quebrachitol (1R,2S,4S,5R)-6-methoxycyclohexane-1,2,3,4,5-pentol), um poliol cíclico estereoisômero do inositol. O quebrachitol é produzido no citoplasma dos laticíferos e sua concentração no látex situa-se na faixa de 1,2% (m/v). Seu envolvimento na síntese da borracha ainda não é completamente conhecido, no entanto o quebrachitol contribui significativamente para a formação e manutenção da pressão de turgor dos laticíferos<sup>64</sup>. Caso o látex não seja adequadamente armazenado os carboidratos presentes no soro podem ser

oxidados microbiologicamente a ácidos voláteis como o fórmico, acético e propiônico.

As principais proteínas encontradas no soro são a  $\alpha$ -globulina e a heveína e as bases nitrogenadas como a colina que também já foram relatadas. Os ácidos cítrico e málico, correspondem a 90% dos ácidos orgânicos presentes no látex<sup>62</sup>.

### **3.1.2. Borracha natural**

A borracha natural contém muitas substâncias provenientes da extração natural o que lhe confere propriedades únicas em relação aos polímeros sintéticos, como elasticidade, flexibilidade, resistência à abrasão e à corrosão, fácil adesão a tecidos e aço e impermeabilidade, podendo ser utilizado em diversos processos industriais. O uso mais conhecido da borracha é na fabricação de pneumáticos e estima-se que cerca de 70% da produção mundial seja destinada a esse setor. No entanto outras centenas de aplicações da borracha são conhecidas, tais como: adesivos, luvas descartáveis, material cirúrgico (tubos intravenosos, seringas, estetoscópios, cateteres e esparadrapos), preservativos, pisos e revestimentos de borracha, impermeabilização de fios e tecidos entre outros<sup>58</sup>.

O aumento da produção mundial de borracha é notável sendo que nos três primeiros trimestres de 2003 chegou a 5,7 milhões de toneladas, enquanto o consumo foi de 5,9 milhões<sup>58</sup>. A demanda foi suprida devido ao processo de estocagem de borrachas provenientes de outros anos. O consumo de borracha natural nos próximos anos tende a crescer mais do que a produção em função do

---

crescimento econômico dos países altamente populosos, especialmente China e Índia. Se o atual ritmo de produção e consumo de borracha natural for mantido, em 2035 esse déficit pode ser de 40 milhões de toneladas<sup>65</sup>.

A produção e o consumo de borracha natural no Brasil crescem gradativamente, no entanto a taxa de consumo é superior à produção gerando déficits e importações crescentes do produto. Entre o período de 1992 e 2002 o Brasil importou 1,2 milhões de toneladas de borracha natural, sendo que a produção interna não chegou a 700 mil toneladas. Isto implica que o Brasil gastou mais de US\$1 bilhão nessa década com a importação de borracha natural. Só no ano de 2005 foram importados aproximadamente 200 mil toneladas de borracha e diante do consumo anual de 300 mil toneladas, a produção interna atingiu apenas o valor de 100 mil toneladas<sup>66</sup>.

Em 2003 o Brasil era o 9º produtor mundial de borracha natural, atrás de Tailândia, Indonésia, Malásia, Índia, China e Vietnã<sup>58</sup>. Os estados de São Paulo e Mato Grosso são os maiores produtores de borracha natural do país com uma área cultivada de 45.000 e 44.700ha, respectivamente<sup>65</sup>.

A heveicultura emprega uma pessoa a cada quatro hectares plantados, ao passo que nas atividades agrícolas, pecuárias e florestais tradicionais essa proporção é de um para dez hectares. O número de pessoas hoje envolvidas com a heveicultura ultrapassa 80 mil no Brasil e, se o país conseguisse produzir as 160 mil toneladas que importa, poderia gerar cerca de 40 mil empregos diretos no campo<sup>65</sup>.

### 3.1.3. Clonagem e enxertia

Os clones de seringueira no Brasil foram criados e estudados com a principal finalidade de se combater o mal das folhas da seringueira. O mal das folhas é causado pelo *Microcyclus ulei*, um fungo originário da Amazônia, e caracteriza-se pelo desfolhamento prematuro de árvores adultas, facilitando a incidência de outras doenças e podendo levar as plantas a morte. O mal das folhas é o responsável pelo insucesso da heveicultura nas áreas tradicionais de cultivo no Brasil e constituiu-se em um dos principais fatores limitantes à expansão da heveicultura no país e em toda a América Latina<sup>67</sup>. Trabalhos recentes visam também desenvolver clones com elevada produção de borracha assim como resistência a quebra pelo vento, maior precocidade e resistência às enfermidades do painel.

Um clone se constitui de um grupo de plantas obtidas através da propagação vegetativa de uma planta matriz. Os clones, como material para implantação de um seringal, apresentam várias vantagens: a mais importante delas é a uniformidade exibida pelos seus indivíduos por possuírem a mesma constituição genética. Todas as árvores de um mesmo clone, sob as mesmas condições ambientais, apresentam baixa variabilidade com relação a diferentes características, como vigor, espessura de casca, produção, propriedade do látex, senescência anual de folhas, nutrição e tolerância às doenças<sup>68</sup>.

Os clones costumam ser classificados em primários, secundários e terciários baseando-se nos parentais utilizados nos cruzamentos para obtenção da árvore matriz. Clones oriundos de parentais desconhecidos são chamados clones primários. Essas árvores matrizes apresentam características singulares e, portanto, são utilizadas para dar origem ao clone através de multiplicação vegetativa. Os

clones primários mais conhecidos são: Tjir 1, Tjir 16, PR 107, PB 86 e GT 1. Os clones secundários são obtidos através de cruzamentos controlados entre dois clones primários. As árvores matrizes são então multiplicadas vegetativamente do mesmo modo que os clones primários. Os clones secundários mais modernos são: RRIM 600 (Tjir 1 x PB 86), IAN 873 (PB 86 x F 717), IAN 717 (PB 86 x F 4542) e Fx 25 (F 351 x AVROS 49). Os clones terciários são obtidos de cruzamentos onde pelo menos um dos parentais é secundário. O clone RRIM 701, por exemplo, resulta do cruzamento do clone primário 44/553 com o secundário RRIM 501 (Pil A 44 x Lun N). Muitos dos clones mais recentes, tais como IAC 41, IAC 15, IAC 35, RRIM 703, RRIM 707 e PB 260 são exemplos de clones terciários. O clone mais utilizado mundialmente pelos heveicultores é o RIMM 600 <sup>69</sup>.

As sementes de seringueira apresentam grande variabilidade vegetativa e produtiva, e por isso, não são utilizadas para plantios no campo. O processo adotado na propagação da planta é a propagação assexuada através da enxertia. A enxertia é o processo de união de duas plantas de modo que os tecidos de uma planta são inseridos em outra e passam a formar uma nova planta, que pode ser dividida em duas partes: o enxerto (garfo) e o porta-enxerto (cavalo). Tradicionalmente na heveicultura são utilizadas sementes não-selecionadas para a formação de porta-enxertos e os enxertos utilizados são clones bem definidos como o PB 235, GT 1 e RRIM 600 <sup>70</sup>.

O processo de enxertia não garante que o enxerto de um bloco monoclonal seja isogênico, o que se observa é que na maioria dos seringais essa uniformidade esperada pela propagação vegetativa não ocorre <sup>71</sup>.

## **3.2. Objetivos**

### **3.2.1. Objetivos gerais**

Aplicar o conceito de análise metabolômica em amostras de látex utilizando a ressonância magnética nuclear como ferramenta analítica e a utilização da quimiometria nos resultados obtidos por RMN de  $^1\text{H}$ .

### **3.2.2. Objetivos específicos**

Avaliação da influência de porta-enxerto sobre enxerto; da qualidade do látex de diferentes clones de seringueira e do látex de alta e baixa produção de poliisopreno do mesmo tipo de clone, através da análise metabolômica de amostras de látex pela aplicação da técnica de RMN e tratamento quimiométrico dos dados de RMN de  $^1\text{H}$ .

### **3.3. Materiais e métodos**

#### **3.3.1. Avaliação da influência do porta-enxerto sobre enxerto através da análise do látex**

##### **3.3.1.1. Delineamento experimental**

As amostras foram coletadas na antiga Estação Experimental de Pindorama do Instituto Agrônômico (IAC), atualmente Pólo Regional de Desenvolvimento Tecnológico dos Agronegócios do Centro-Norte da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA), em Pindorama, Estado de São Paulo<sup>71</sup>.

Neste estudo foram analisadas um total 24 amostras de látex, descritas de acordo com a **Tabela 3.1**. As sangrias foram realizadas em 4 amostras de porta-enxerto RIMM 600 (Tijir 1 x PB 86) e 4 de GT1 (clone primário). As outras 16 amostras foram coletas de modo a se obter 8 amostras de enxerto RIMM 600 (sendo 4 com porta-enxerto RIMM 600 e 4 GT 1) e 8 amostras de enxerto GT 1 (sendo 4 com porta-enxerto RIMM 600 e 4 GT 1). As amostras dos grupos RR e GG podem ser consideradas como testemunha (branco) uma vez que o porta-enxerto e o enxerto pertencem ao mesmo tipo de clone. Com o intuito de se obter amostras homogêneas os efeitos de borda da plantação foram eliminados.

**Tabela 3.1.** Delineamento experimental das amostras de látex de enxerto e porta-enxerto.

Amostras	Enxerto				Porta-enxerto <sup>a</sup>
	Porta-enxerto		Enxerto		Código
	RIMM 600 <sup>b</sup>	GT 1 <sup>c</sup>	RIMM 600 <sup>b</sup>	GT 1 <sup>c</sup>	
<b>RR09</b>	X	-	X	-	-
<b>RR10</b>	X	-	X	-	-
<b>RR11</b>	X	-	X	-	CR03
<b>RR12</b>	X	-	X	-	CR04
<b>RG13</b>	X	-	-	X	CR01
<b>RG14</b>	X	-	-	X	CR02
<b>RG15</b>	X	-	-	X	-
<b>RG16</b>	X	-	-	X	-
<b>GR17</b>	-	X	X	-	CG05
<b>GR18</b>	-	X	X	-	-
<b>GR19</b>	-	X	X	-	-
<b>GR20</b>	-	X	X	-	-
<b>GG21</b>	-	X	-	X	-
<b>GG22</b>	-	X	-	X	CG06
<b>GG23</b>	-	X	-	X	CG07
<b>GG24</b>	-	X	-	X	CG08

<sup>a</sup> As amostras de látex de porta-enxerto foram retiradas das próprias amostras de enxerto estudadas.

<sup>b</sup> RIMM 600 (Tijir 1 x PB 86)

<sup>c</sup> GT1 (clone primário)

X Presente

- Ausente

### 3.3.2. Avaliação do látex dos diferentes clones de seringueira

#### 3.3.2.1. Delineamento experimental

As sangrias foram realizadas em 4 árvores de cada um dos seis novos clones da série IAC 500 (IAC 500, IAC 501, IAC 502, IAC 503, IAC 504 e IAC 505) e

de um clone testemunha do experimento (RRIM 600) no Pólo Regional do Desenvolvimento Tecnológico dos Agronegócios do Noroeste Paulista, em Votuporanga/SP, a 20°20'S de latitude, 49°58'W de longitude e 510 m de altitude, em solo podzólico vermelho escuro, latossólico eutrófico A moderado, textura arenosa média.

As árvores foram plantadas com espaçamento de 7,0 m entre linhas e de 3,0 m entre plantas. Predomina nesta região o clima com estação seca definida, temperatura média anual de 22 °C, intervalo médio de 18,4 °C a 23,9 °C, umidade relativa média anual em torno de 70,0% com extremos de 77,1% em fevereiro e 59,0% em agosto. A pluviosidade média anual é em torno de 134,4 mm, com regime tropical, sendo 74% de outubro a março e 26% de abril a setembro.

A **Tabela 3.2** apresenta os parentais dos novos clones da nova série IAC 500 e do clone testemunha do experimento (RRIM 600).

**Tabela 3.2.** Parentais dos novos clones da série IAC 500 no Pólo Regional da APTA em Votuporanga/SP.

Clones	Parentais	Código
IAC 500	RRIM 600 (Tjir 1 x PB 86) ill.	I01-I04
IAC 501	RRIM 526 (Pil B 58 x Pil D 65) ill.	I05-I08
IAC 502	IAC 41[RRIM 608(Tjir33 x Tjir1) x AVROS 1279 (AVROS 256 x AVROS 374)] ill.	I09-I12
IAC 503	Fx 3899 (F 4542 x AVROS 363) ill.	I13-I16
IAC 504	RRIM 600 (Tjir 1 x PB 86) ill.	I17-I20
IAC 505	IAN 873(PB 86 x FA 1717) ill.	I21-I24
RRIM 600	Tjir 1 x PB 86	R25-R28

### **3.3.3. Avaliação do látex de alta e baixa produção de poliisopreno do mesmo clone**

#### **3.3.3.1. Delineamento experimental**

As amostras de látex foram coletadas no Pólo Regional do Desenvolvimento Tecnológico dos Agronegócios do Noroeste Paulista, em Votuporanga/SP (ver seção 3.3.2.1)

Neste estudo foram analisadas no total 10 amostras de látex, sendo 5 amostras de baixa produção e 5 amostras de alta produção. Estas amostras pertencem ao mesmo tipo de clone [IAC 235] e de modo a se obter amostras homogêneas os efeitos de borda da plantação foram eliminados.

#### **3.3.4. Preparo das amostras de látex**

As árvores foram sangradas de acordo com o sistema  $\frac{1}{2}$  S d/4 5d/7, ET 2,5%, 8/y (corte em meia espiral, sangradas duas vezes por semana) e estimuladas com Etefon a 2,5% por pincelamento no painel de sangria.

As amostras de látex foram preparadas adicionando-se 500  $\mu$ L de D<sub>2</sub>O em 500  $\mu$ L de amostra de látex. A solução de D<sub>2</sub>O foi preparada adicionando-se quantidade conhecida do padrão TMSP-d<sub>4</sub> (2,2,3,3-d<sub>4</sub>-(3-trimetilsililpropionato de sódio) utilizado como referência interna. As amostras foram centrifugadas por 10 min. a 10.000 rpm à temperatura ambiente. O processo de centrifugação separou a amostra em quatro frações bem definidas conforme já descrito na literatura<sup>62</sup>. A

fração intermediária corresponde ao citosol do látex. Para as análises de RMN 600  $\mu\text{L}$  da fração intermediária foram coletados e transferidos para um tubo de RMN de 5 mm de diâmetro externo.

### 3.3.5. Obtenção dos espectros de RMN

Todas as medidas de RMN foram executadas em um espectrômetro Bruker Avance III “Nanobay” de 9,4 Tesla (400,21 MHz para a frequência do hidrogênio), localizado no Laboratório de RMN do Departamento de Química – UFSCar. As medidas foram realizadas em uma sonda BBFO de 5 mm de diâmetro interno (detecção direta) e bobinas geradoras de gradiente de campo na coordenada z.

Todos os espectros foram adquiridos a uma temperatura de 303K utilizando a sequência de pulso de pré-saturação do solvente NOESYGPPR1D para suprimir o sinal da água. Foram realizadas 64 varreduras (ns), tempo de espera entre cada aquisição de 4 s (d1), tempo de aquisição de 3,98 s (aq) com 64 Kb de pontos durante a aquisição (td), atenuação do pulso de pré-saturação de 41,40 dB (pldb9). O tempo de mistura utilizado foi 10 ms (d8) e a duração do pulso de 90° foi de 9,98  $\mu\text{s}$  (p1). O processamento dos espectros foi efetuado com 64 Kb de pontos (si), utilizando uma multiplicação exponencial com  $\text{lb} = 0,3 \text{ Hz}$  e a correção de fase e linha de base foi feito manualmente.

Os experimentos bidimensionais com gradiente de campo (*g*COSY e *g*HSQC) foram realizados empregando as sequências de pulso COSYGPPRQF e HSQCETPRGP (denominação Bruker), com ns 16 e 148, d1 2 s e 1 s, e largura

espectral (swh) em F1 8012 e 21638 Hz, respectivamente. Os seguintes parâmetros foram os mesmos para as duas medidas: td em F2 de 4 Kb, td em F1 de 256 e swb em F2 8012 Hz. O processamento dos espectros foi efetuado com 4 Kb de pontos em F2 e 1 Kb de pontos em F1 (si).

### **3.3.6. Análise multivariada**

As análises multivariadas dos dados foram realizadas utilizando os programas The Unscrambler<sup>®</sup> v. 9.7 (CAMO SOFTWARE AS) e *Pirouette*<sup>®</sup> v. 4.0 (Infometrix, Inc). Para a construção da matriz dos dados de RMN de <sup>1</sup>H as regiões referentes ao sinal residual da água, do poliisopreno e do TMSP-d<sub>4</sub> foram removidas. Excluíram-se também os ruídos presentes nas laterais dos espectros. Na matriz final todas as amostras referem-se às linhas e os deslocamentos químicos referem-se às colunas.

Na etapa de pré-processamento das análises todos os dados foram normalizados e autoescalados com relação à área total do espectro. Para a análise por agrupamento hierárquico (HCA) utilizou-se a distância euclidiana.

### **3.4. Resultados e discussões**

#### **3.4.1. Perfil metabólico das amostras de látex**

Um espectro típico de RMN de  $^1\text{H}$  de uma amostra de látex é mostrado na **Figura 3.2**. As atribuições dos vários metabólitos foram realizadas baseando-se em dados da literatura<sup>72,73</sup> e através da análise dos espectros bidimensionais *g*COSY e *g*HSQC (**Figuras 3.3 e 3.4**, respectivamente). A **Tabela 3.2** lista os metabólitos identificados nas amostras de látex e seus respectivos deslocamentos químicos.

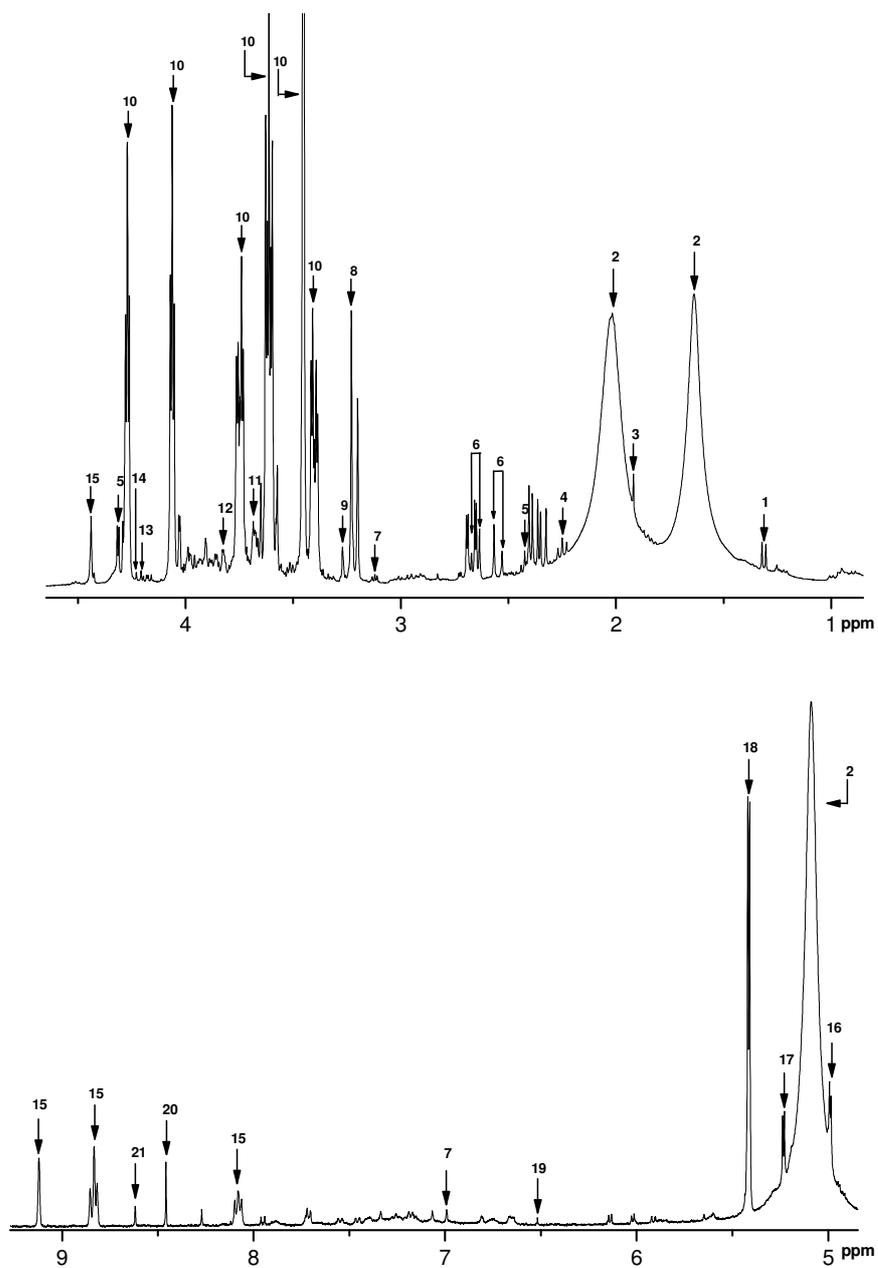


Figura 3.2. Espectro típico de RMN de  $^1\text{H}$  de uma amostra de látex.

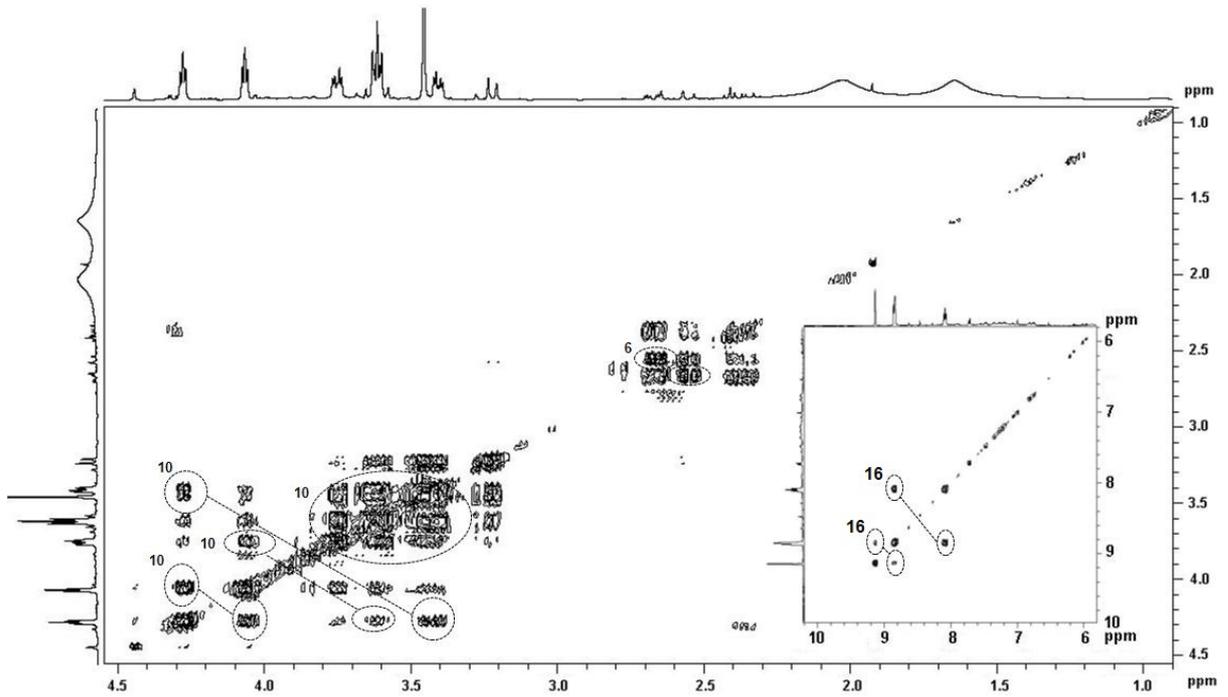


Figura 3.3. Espectro típico de RMN *g*COSY de uma amostra de látex.

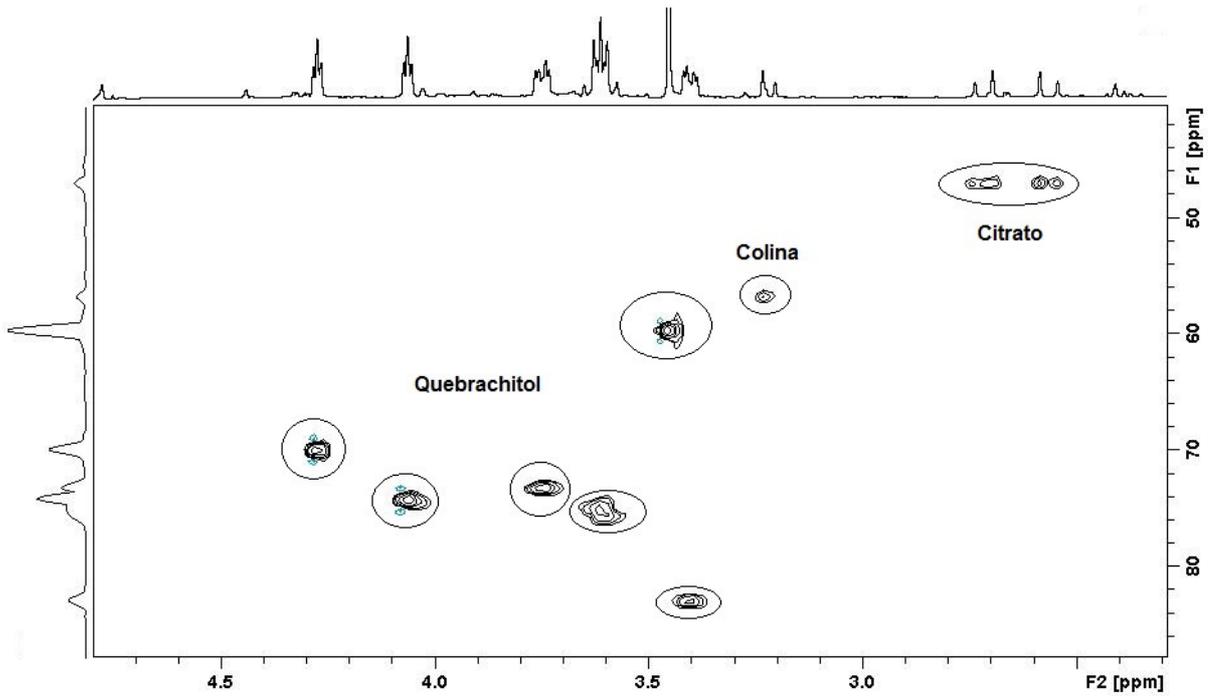
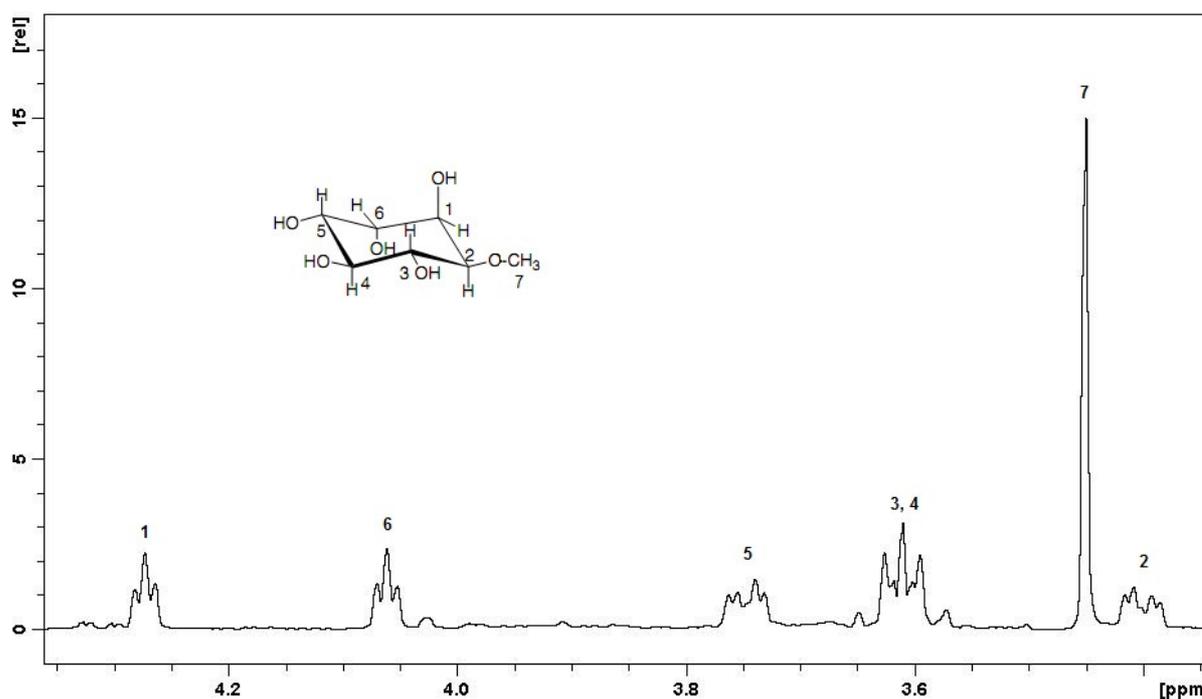


Figura 3.4. Espectro típico de RMN *g*HSQC de uma amostra de látex.

No total foram identificados 16 metabólitos presentes no citosol do látex. Conforme pode ser observado na **Figura 3.2** o metabólito presente em maior quantidade é o quebrachitol, concordando com os dados da literatura<sup>64</sup>. A **Figura 3.5** mostra o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do látex com sinais do quebrachitol em destaque.



**Figura 3.5.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do látex com os sinais do quebrachitol em destaque.

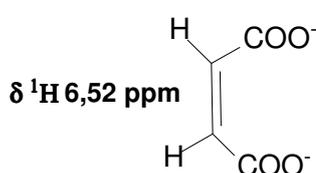
Os dois sinais largos presentes na região de 1,1 a 2,3 ppm e o sinal em 5,09 ppm, numerados com o número 2 na **Figura 3.2**, são sinais residuais do poliisopreno que não pôde ser removido completamente durante a etapa de centrifugação. A região de 1,0 a 3,0 ppm é característica de hidrogênio de aminoácidos, porém não foi possível fazer a identificação destes sinais devido a presença dos sinais residuais do poliisopreno.

Tabela 3.3. Metabólitos identificados nas amostras de látex.

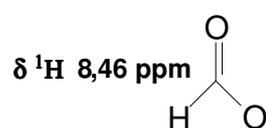
Código	Metabólitos	$\delta^1\text{H}$ ppm (multiplicidade, J Hz)	gCOSY	gHSQC ( $\delta^{13}\text{C}$ ppm)
1	Lactato	1,33 (d, 7,1)	-	21,5
		4,12 (d, 7,1)	-	-
2	Poliisopreno	1,64 (sl)	-	26,0
		2,02 (sl)	-	29,3 34,9
		5,09 (sl)	-	127,8
3	Acetato	1,92 (s)	-	26,2
4	Acetoacetato	2,26 (s)	-	36,4
		3,43 (s)	-	-
5	Malato	2,36 (d, 10,0)	4,31	45,4
		2,66 (d, 3,1)	4,31	45,4
		4,31 (dd, 3,1 10,0)	2,36 2,66	73,1
6	Succinato	2,40 (s)	-	37,0
7	Citrato	2,55 (d, 15,2)	2,65	46,9
		2,65 (d, 15,2)	2,55	46,9
8	Colina	3,23 (s)	-	56,8
9	Betaína	3,27 (s)	-	54,8
10	Quebrachitol	3,40 (dd, 3,2 e 9,5)	3,61 4,27	83,0
		3,45 (s)	-	59,6
		3,61 (m)	3,40	74,8
		3,61 (m)	3,74	75,6
		3,74 (dd, 3,2 9,6)	3,61 4,06	73,2
		4,06 (dd)	3,74 4,27	74,2
		4,27 (dd)	3,45 4,06	69,8
11	Desconhecido	3,47 (s)	-	-
12	Desconhecido	3,68 (s)	-	-
13	Desconhecido	3,83 (d)	-	-
14	Desconhecido	4,20 (s)	-	-
15	Desconhecido	4,22 (s)	-	-
16	Trigonelina	4,44 (sl)	9,12	51,1
		8,08 (t, 7,0)	8,83 9,12	130,5
		8,83 (m)	8,08 9,12	147,8
		8,83 (m)	8,08 9,12	148,7
		9,12 (sl)	8,08 8,83	148,6
17	Rafinose	4,99 (d, 3,80)	-	101,0
		5,41 (d, 3,80)	3,57	95,0
18	$\alpha$ -Glucose	5,24 (d, 3,80)	-	-
19	Sacarose	5,41 (d, 3,80)	3,57	95,0
20	Fumarato	6,52 (s)	-	-
21	Formiato	8,46 (s)	-	-
22	Desconhecido	8,62 (s)	-	-

s-singlete, sl-singlete largo, d-duplete, dd-duplo duplete, m-multiplete, t-triplete.

Os metabólitos fumarato ( $\delta^1\text{H}$  6,52 ppm) e formiato ( $\delta^1\text{H}$  8,46 ppm) apresentam apenas um sinal no espectro de  $^1\text{H}$ , um singleto, e conseqüentemente seus sinais não podem ser confirmados pelo espectro de *g*COSY. A presença desses sinais no espectro de *g*HSQC não foi detectada e portanto a caracterização desses compostos foi realizada baseando-se apenas nos dados da literatura<sup>72,73</sup>.

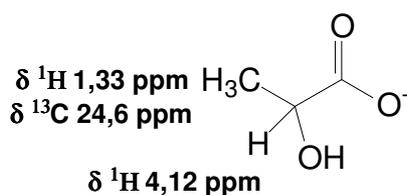


Fumarato

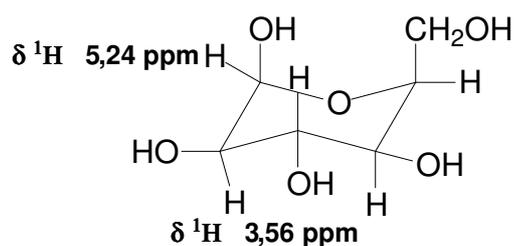


Formiato

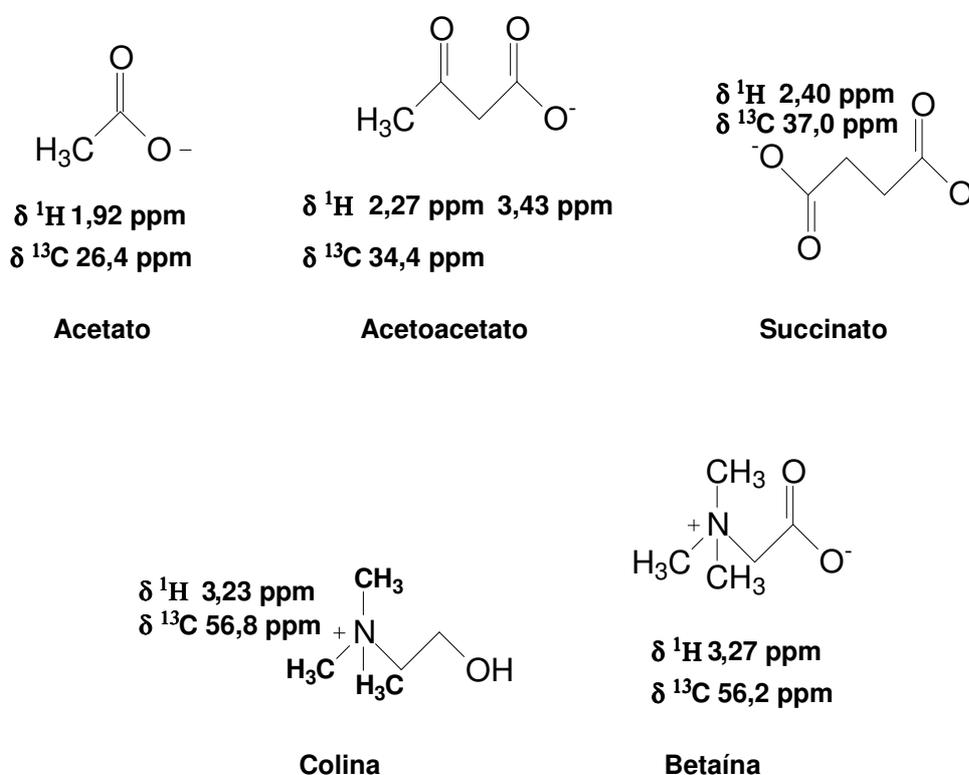
O sinal característico do lactato, um grupo  $\text{CH}_3$  com multiplicidade de um duplete em 1,33 ppm acoplado com CH em 4,12 ppm, e o sinal da  $\alpha$ -glucose, com o hidrogênio anomérico multiplicidade duplete em 5,24 ppm acoplado com CH em 4,81 ppm, não foram confirmados no espectro de *g*COSY. O sinal do lactato em 1,33 ppm acoplado a uma ligação com o carbono em 21,5 ppm foi confirmado no espectro de *g*HSQC. Os acoplamentos dos hidrogênios da  $\alpha$ -glucose no espectro *g*HSQC não foram observados e portanto a caracterização desse composto também foi realizada baseando-se apenas nos dados da literatura<sup>72,73</sup>.



Lactato

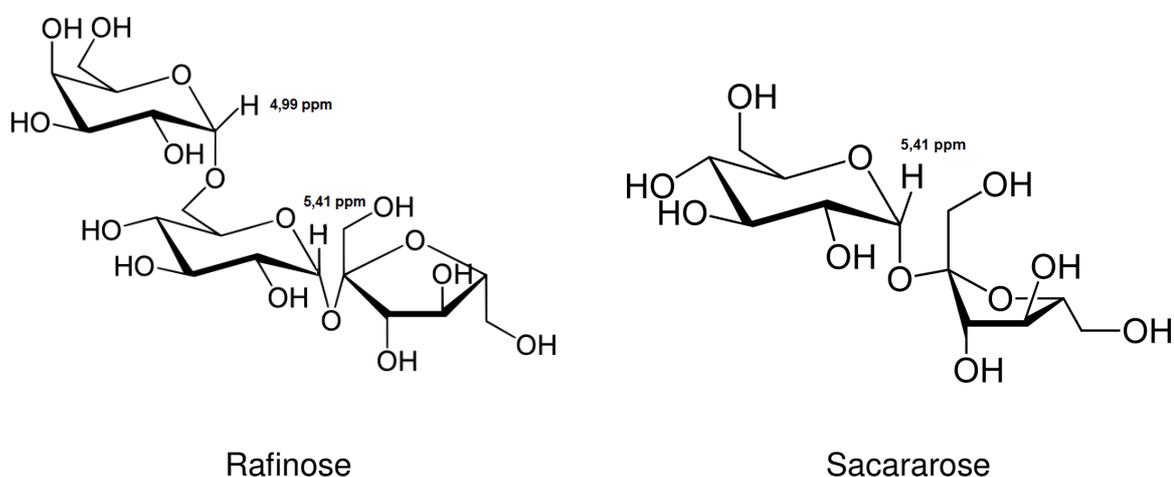
 $\alpha$ -glucose

Os sinais característicos dos metabólitos acetato ( $\delta^1\text{H}$  1,92 ppm), acetoacetato ( $\delta^1\text{H}$  2,26 ppm), succinato ( $\delta^1\text{H}$  2,40 ppm), colina ( $\delta^1\text{H}$  3,23 ppm) e betaína ( $\delta^1\text{H}$  3,27 ppm) no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  são singletos e suas estruturas foram confirmadas através da análise do espectro bi-dimensional *g*HSQC e através dos dados da literatura<sup>72,73</sup>.



A **Figura 3.6** apresenta as estruturas químicas dos carboidratos rafinose e sacarose. A rafinose é um trissacarídeo composto pela galactose, frutose e glucose e a sacarose é um dissacarídeo composto pela frutose e glucose. O sinal característico da sacarose no espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , um duplete em 5,41 ppm, é o sinal correspondente ao hidrogênio anomérico da ligação entre a glucose e a frutose. Esse sinal também está presente no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da rafinose,

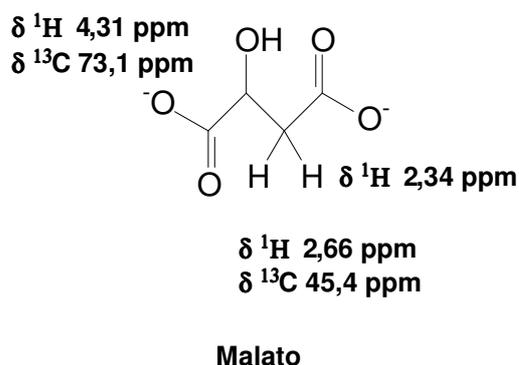
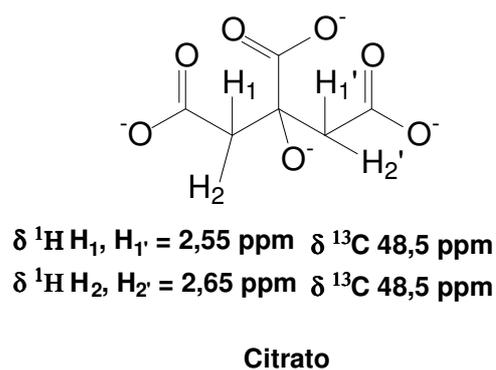
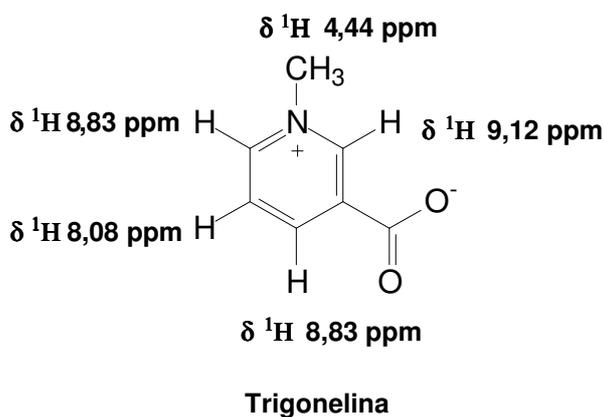
uma vez que esse carboidrato apresenta o mesmo tipo de ligação. No entanto a rafinose apresenta um sinal característico no espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , duplete em 4,99 ppm, devido a presença do hidrogênio anomérico da ligação entre a galactose e a glucose. Através da comparação das áreas dos dois sinais fica evidente a presença dos dois carboidratos, no entanto a quantificação do sinal da sacarose não pode ser feita de maneira direta.



**Figura 3.6.** Estruturas químicas e deslocamentos químicos dos carboidratos rafinose e sacarose.

A presença da rafinose não pôde ser confirmada através da análise do espectro *g*COSY, porém seu acoplamento com o carbono ( $\delta$   $^{13}\text{C}$  101,0 ppm) no espectro *g*HSCQ foi verificado. O duplete em 5,41 referente à rafinose e à sacarose foi confirmado no espectro *g*COSY (acoplamento com H's em 3,5 e 3,7 ppm) e no espectro *g*HSQC ( $\delta$   $^{13}\text{C}$  95,0 ppm).

Entre os compostos nitrogenados identificados destaca-se a presença da trigonelina com sinais característicos na região de heteroaromáticos (8,0 a 9,2 ppm). O citrato apresenta dois sinais intensos no espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , dupletos em 2,55 ppm e 2,65 ppm. O malato possui três sinais característicos no espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , um duplete em 2,36 ppm, um duplete em 2,66 ppm e um duplo duplete em 4,31 ppm. Os acoplamentos da trigonelina, citrato e malato no espectro  $g\text{COSY}$  e  $g\text{HSQC}$  foram confirmados.



Os metabólitos malato, succinato, citrato e fumarato são compostos oriundos do ciclo de Krebs, atuando ativamente no processo de respiração celular. O ciclo de Krebs atua na conversão de carboidratos e lipídeos a dióxido de carbono e

água gerando energia para o meio. O ciclo de Krebs está intimamente relacionado com a formação de acetil-CoA, precursor da síntese da borracha. Dentre os metabólitos citados observa-se na **Figura 3.2** que o malato e o citrato se encontram em maior quantidade, conforme relatado na literatura<sup>62</sup>.

Os metabólitos lactato, formiato, acetato e acetoacetato são subprodutos do metabolismo do piruvato. O lactato e o formiato são formados diretamente do piruvato já o acetato e o acetoacetato são derivados da acetil-CoA<sup>74</sup>.

A sacarose e a rafinose são sacarídeos cuja função principal é o fornecimento dos açúcares glucose, frutose e galactose para o meio, que são posteriormente metabolizados via glicólise. A colina e a betaína são subprodutos do metabolismo da serina<sup>74</sup>.

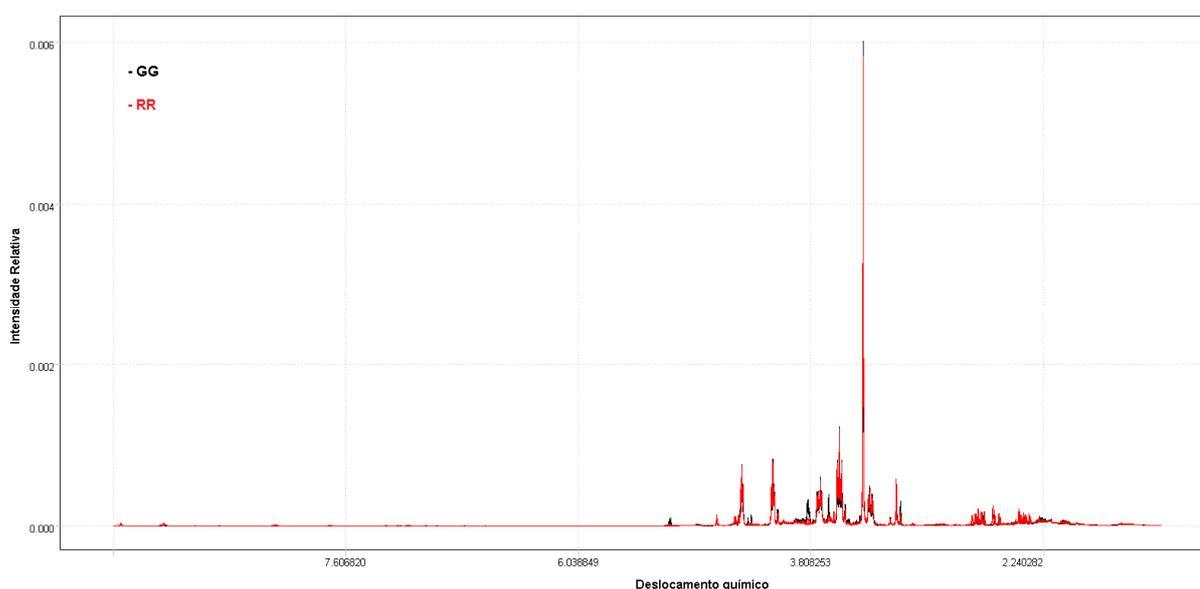
A trigonelina é um alcalóide presente em plantas como café, tomate e batata<sup>75-77</sup>. Sua presença em amostras de látex é relatada<sup>78</sup>, porém sua função é desconhecida.

### **3.4.2. Avaliação da influência de porta-enxerto sobre enxerto através da análise do látex**

#### **3.4.2.1. Análise multivariada e quantificação**

As amostras dos grupos RR e GG (**Tabela 3.1**) podem ser consideradas como padrões uma vez que possuem o mesmo tipo de porta-enxerto e enxerto. Com o intuito de verificar se há uma distinção entre esses grupos uma análise exploratória dos dados foi realizada utilizando PCA. A análise de PCA

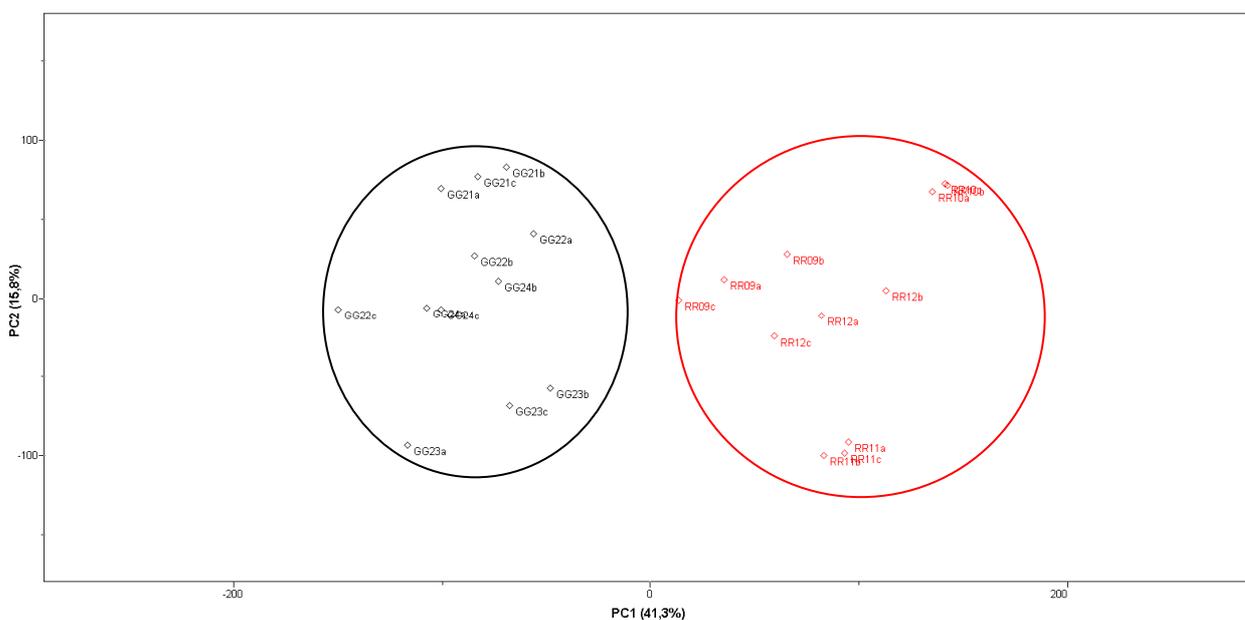
permite a visualização de grupos formados por amostras que possuem as mesmas características, nesse caso, os grupos são formados por amostras com mesmo perfil metabólico. A matriz gerada após as exclusões continha 24 linhas (8 amostras em triplicatas) 22553 colunas (variáveis). A visualização de todas as variáveis, após as exclusões e pré-tratamento, encontra-se no gráfico de linhas apresentado na **Figura 3.7**.



**Figura 3.7.** Gráfico de linhas dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  das amostras de látex dos grupos RR e GG analisadas por PCA.

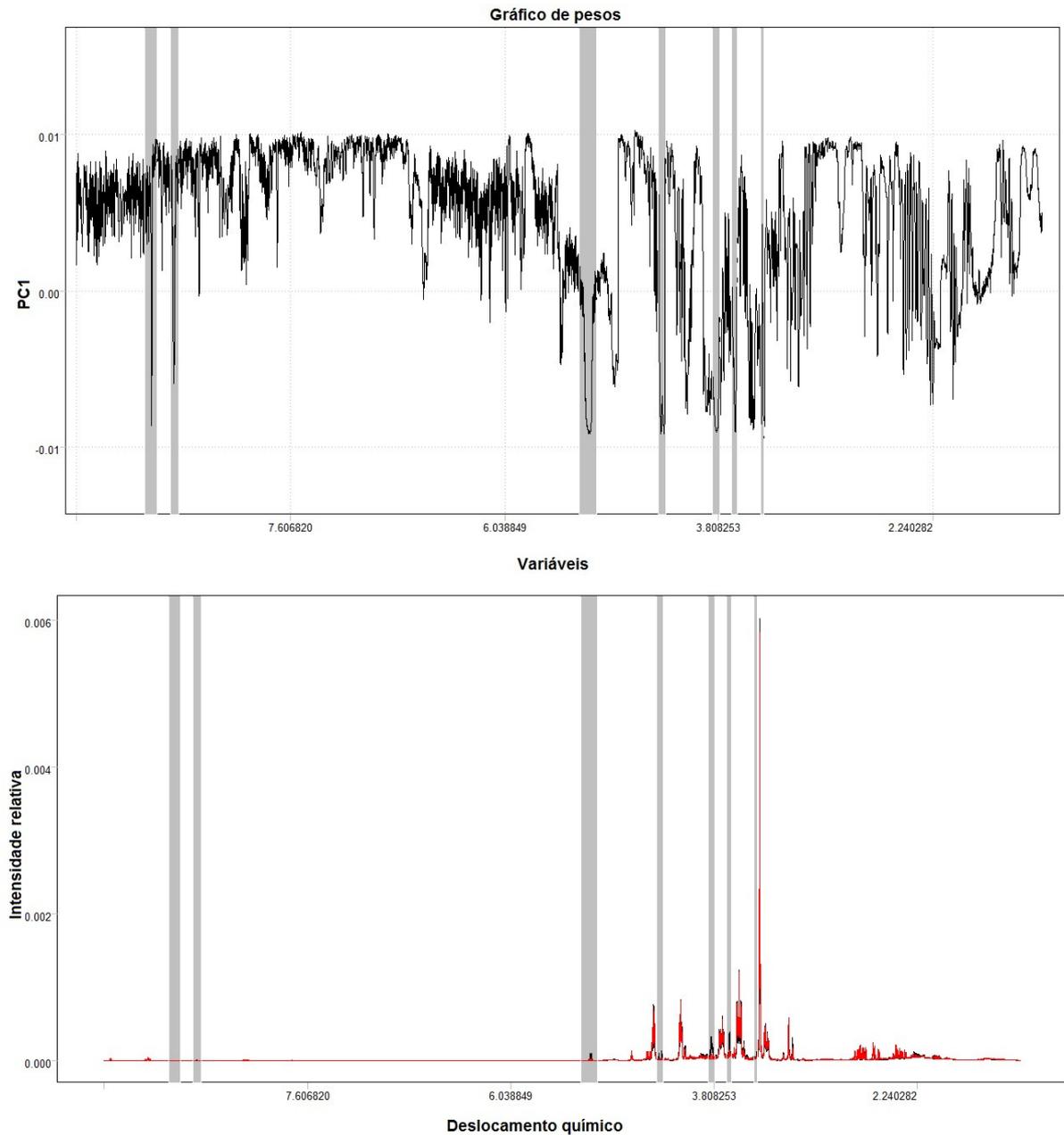
A **Figura 3.8** apresenta o gráfico de escores das amostras de látex dos grupos RR e GG. A soma dos valores obtidos para as quatro primeiras componentes principais [(PC1 (41%), PC2 (16%) PC3 (12%) e PC4 (7%)] apresentou uma explicação de 76% do total da variância do banco de dados. Conforme pode ser observado existe uma forte tendência de agrupamento entre as amostras do grupo RR e GG. A componente principal PC1 foi responsável por essa separação, sendo

que os valores positivos de PC1 tiveram maior influência para as amostras do grupo RR e os valores negativos de PC1 influenciaram mais o grupo GG. Pode-se notar que as replicatas dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  apresentaram-se bastante próximas entre si, evidenciando a reprodutibilidade da técnica.



**Figura 3.8.** Gráfico de escores PC1 (41,3%) x PC2 (15,8%) das amostras de látex dos grupos RR e GG.

O gráfico de pesos (**Figura 3.9**) apresenta as regiões dos espectros que mais contribuíram para a sua separação. Uma vez que a primeira componente principal foi responsável pelo agrupamento, apenas esta PC é apresentada na **Figura 3.9**. As variáveis destacadas em cinza representam os principais metabólitos responsáveis pela separação.

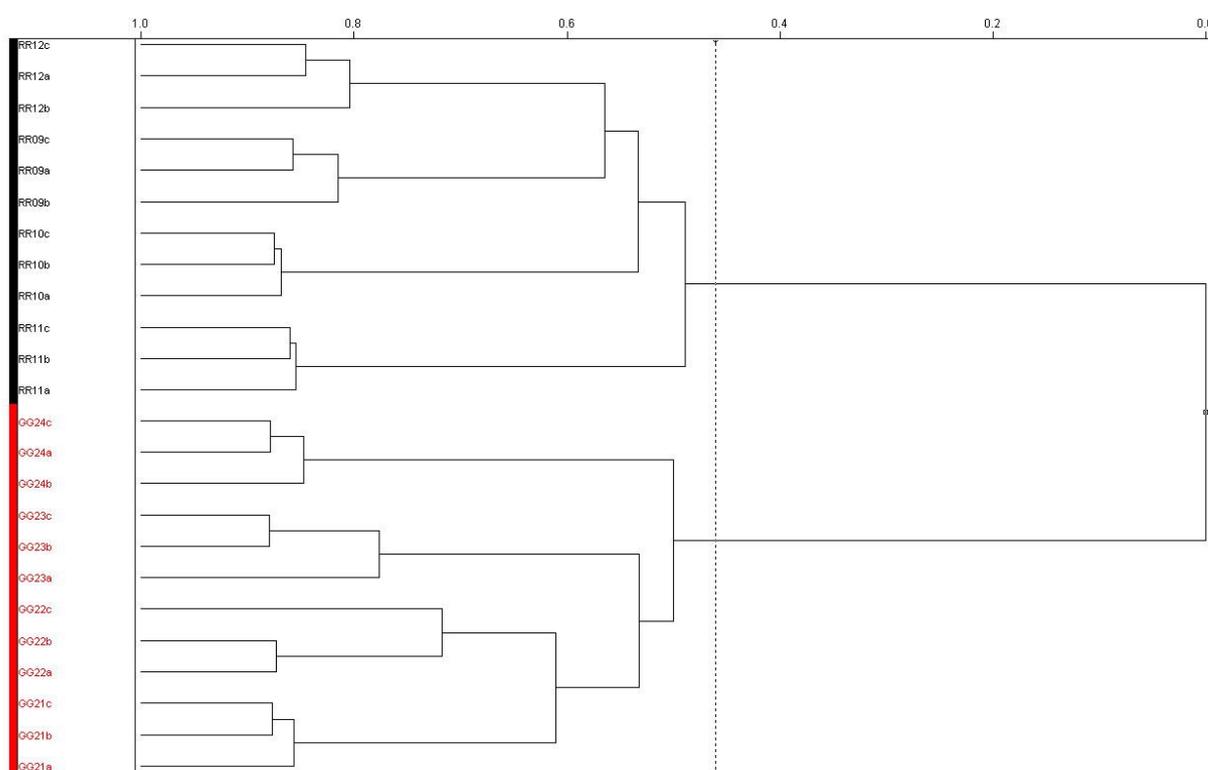


**Figura 3.9.** Gráfico de pesos da componente PC1 das amostras de látex dos grupos RR e GG destacando-se as variáveis mais importantes na separação.

De acordo com a **Figura 3.9** os metabólitos que mais contribuíram para a separação obtida foram o formiato (8,46 ppm), o sinal em 5,41 ppm referente à sacarose e a rafinose, e os sinais dos metabólitos 21 (8,62 ppm), 14 (4,23 ppm), 13

(4,21 ppm), 12 (3,83 ppm), 11 (3,68 ppm) e 10 (3,47 ppm) que não foram identificados.

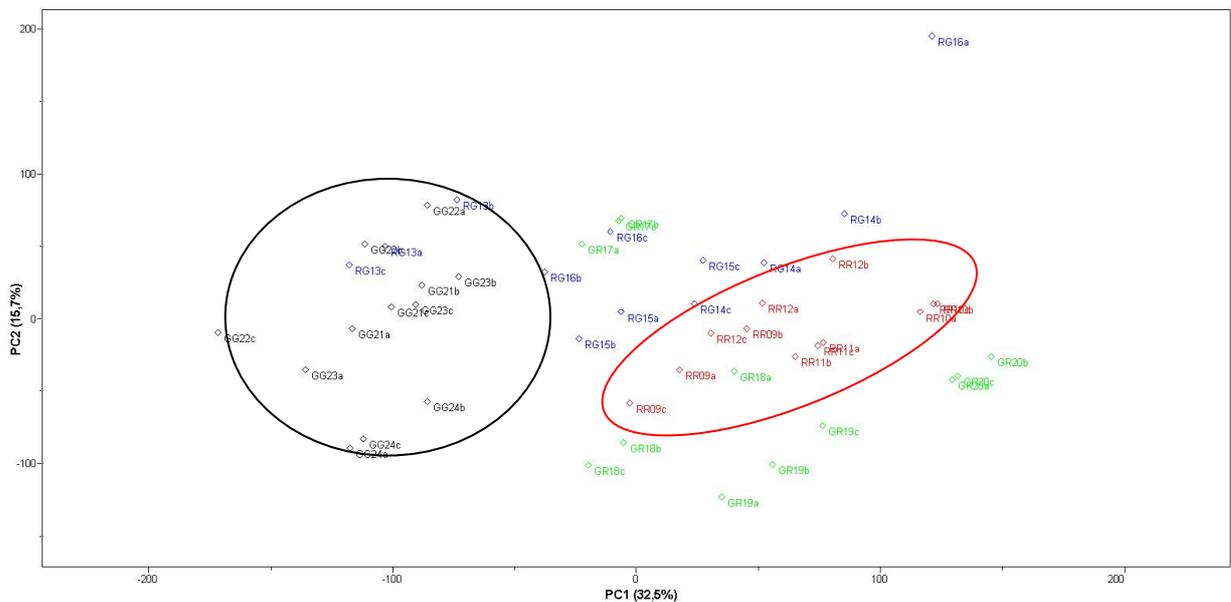
HCA também foi utilizada para verificar a semelhança entre os grupos. A **Figura 3.10** mostra o dendograma obtido utilizando o método de ligação *incremental* e índice de similaridade de 0,489.



**Figura 3.10.** Dendrograma referente à análise por HCA dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  das amostras de látex dos grupos RR e GG.

Com a finalidade de se verificar a influência do porta-enxerto sobre o enxerto uma nova análise de PCA foi realizada considerando os grupos RR, GG, RG e GR. A nova matriz passou a ser constituída por 48 linhas (16 amostras em triplicata) e o mesmo número de colunas (22553 variáveis). A **Figura 3.11** apresenta

o gráfico de escores desta análise e a soma dos valores obtidos para as cinco primeiras componentes principais [(PC1 (32%), PC2 (16%), PC3 (12%), PC4 (9%) e PC5 (5%)] apresentaram uma explicação de 74% do total da variância do banco de dados.



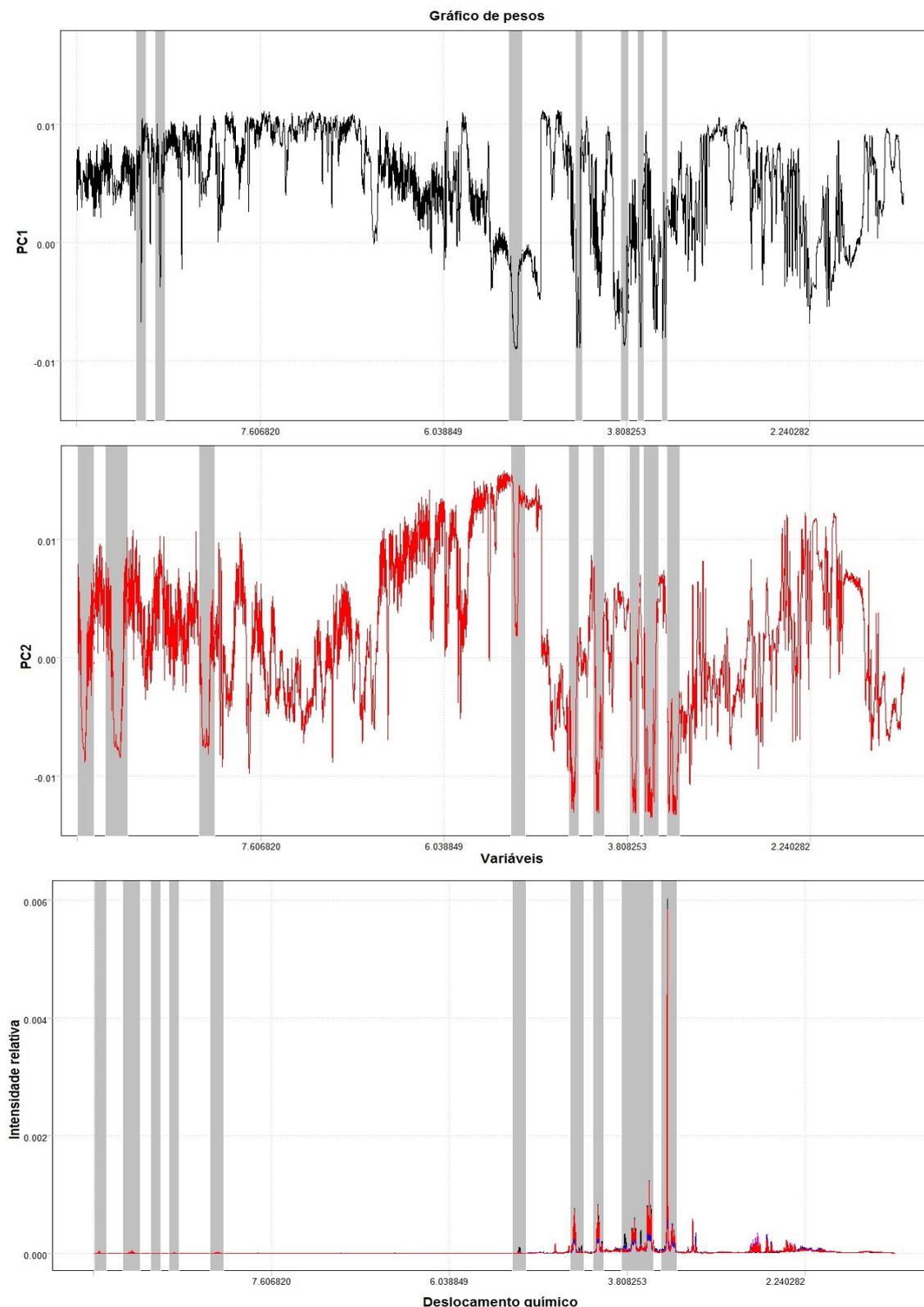
**Figura 3.11.** Gráfico de escores PC1 (32,5%) x PC2 (15,7%) das amostras de látex dos grupos RR, GG, RG e GR.

Na **Figura 3.11** novamente observa-se a formação de grupos para as amostras RR e GG conforme análise anterior (**Figura 3.8**). Pode-se visualizar também que a primeira componente principal foi responsável pela separação dos grupos RR e GG, e novamente as amostras do grupo GG tiveram maior influência dos valores negativos de PC1 enquanto as amostras do grupo RR foram influenciadas pelos valores positivos de PC1.

As amostras do grupo RG possuem uma forte tendência em se agrupar entre os grupos RR e GG, enquanto as amostras do grupo GR se agruparam preferencialmente com as amostras do grupo RR.

Apesar de não haver uma separação clara, as amostras do grupo GR tendem a se separar das amostras do grupo RG no eixo da segunda componente principal, sendo que as amostras do grupo RG são diferenciadas por valores positivos de PC2 e as amostras do grupo GR diferenciadas por valores negativos de PC2.

O gráfico de pesos para as amostras RR, GG, RG e GR é apresentado na **Figura 3.12**. Nesse caso a figura apresenta os valores para as duas primeiras componentes principais. As variáveis destacadas em cinza foram as principais responsáveis pela separação. Nota-se que para a primeira componente principal os mesmos sinais que foram responsáveis pela separação das amostras RR e GG também tiveram bastante influência nesta separação. Em PC2 observa-se que os sinais do quebrachitol e da trigonelina foram os que tiveram maior influência.



**Figura 3.12.** Gráfico de pesos PC1 (linha preta) e PC2 (linha vermelha), das amostras de látex dos grupos RR, GG, RG e GR.

Com o intuito de se verificar a variabilidade dos metabólitos nas diferentes amostras de látex foi realizada uma quantificação relativa para o sinal em 5,41 ppm (sacarose e rafinose), formiato, trigonelina e quebrachitol, variáveis que foram importantes para a separação dos grupos da análise de PCA (**Tabela 3.4**).

As considerações feitas a seguir são baseadas apenas nos valores médios dos metabólitos encontrados para cada grupo, uma vez que não há quantidade suficiente de amostras para fornecer informação significativa em uma análise estatística univariada. As amostras dos grupos GG apresentaram quantidades maiores de sacarose e formiato quando comparadas às amostras do grupo RR. A diferença na concentração desses metabólitos está relacionada com a boa separação obtida nas análises de PCA entre esses grupos.

Os valores encontrados para o quebrachitol e a trigonelina não foram significativamente diferentes, o gráfico de peso (**Figura 3.8**) da PCA confirma essa informação mostrando que esses metabólitos não tiveram influência na separação obtida para os grupos RR e GG. As amostras do grupo GR apresentaram quantidades similares de sacarose e formiato às apresentadas pelo grupo RR, indicando o motivo dessas amostras se agruparem na análise de PCA. As amostras do grupo RG apresentaram valores intermediários de sacarose e formiato e por essa razão esse grupo situa-se entre os grupos RR e GG.

De acordo com a **Figura 3.12** os metabólitos quebrachitol e trigonelina tiveram bastante influência na segunda componente principal, onde se observa uma tendência de separação entre os grupos RG e GR. Os dados da **Tabela 3.4** mostram que a concentração de quebrachitol no grupo RG é 24% menor do que no grupo GR e que a concentração de trigonelina do grupo GR é três vezes maior que a

concentração no grupo RG. Essa diferença observada na concentração dos metabólitos quebrachitol e trigonelina para os grupos RG e GR concorda com o resultado obtido na **Figura 3.11**.

**Tabela 3.4.** Quantificação relativa (área do metabólito/área do TMSP-d4) dos metabólitos presentes nas amostras de látex de porta-enxerto e enxerto.

Amostras	Sacarose + rafinose	Média	Formato	Média	Quebrachitol	Média	Trigonelina	Média
CR01	0,149	0,0713	0,00275	0,00458	3,784	3,94	0,0133	0,0376
CR02	0,0880		0,00519		2,705		0,0116	
CR03	0,0220		0,00328		4,400		0,0255	
CR04	0,0260		0,00710		4,878		0,100	
CG05	0,0300	0,0923	0,00441	0,00595	4,776	4,57	0,0533	0,0491
CG06	0,203		0,00420		4,739		0,0792	
CG07	0,106		0,00535		4,159		0,0373	
CG08	0,0300		0,00985		4,591		0,0266	
RR09	0,0190	0,0427	0,00266	0,00299	5,539	5,09	0,0357	0,0542
RR10	0,0590		0,00478		5,861		0,0674	
RR11	0,0500		0,00340		4,461		0,0424	
RR12	ND		0,00111		4,495		0,0714	
RG13	0,0890	0,0645	0,00608	0,00722	3,735	3,57	0,0170	0,0235
RG14	0,0680		0,0100		2,875		0,0114	
RG15	0,0340		0,00459		4,403		0,0396	
RG16	0,0670		0,00821		3,273		0,0259	
GR17	0,0440	0,0280	0,00254	0,00211	4,370	4,65	0,0790	0,0778
GR18	0,0230		0,00176		4,810		0,0802	
GR19	0,0170		0,00261		4,427		0,0762	
GR20	ND		0,00152		4,976		0,0757	
GG21	0,217	0,209	0,0117	0,00700	4,625	4,81	0,0347	0,0397
GG22	0,277		0,00675		4,426		0,0595	
GG23	0,157		0,00549		4,629		0,0208	
GG24	0,184		0,00404		5,554		0,0437	

ND Não detectado.

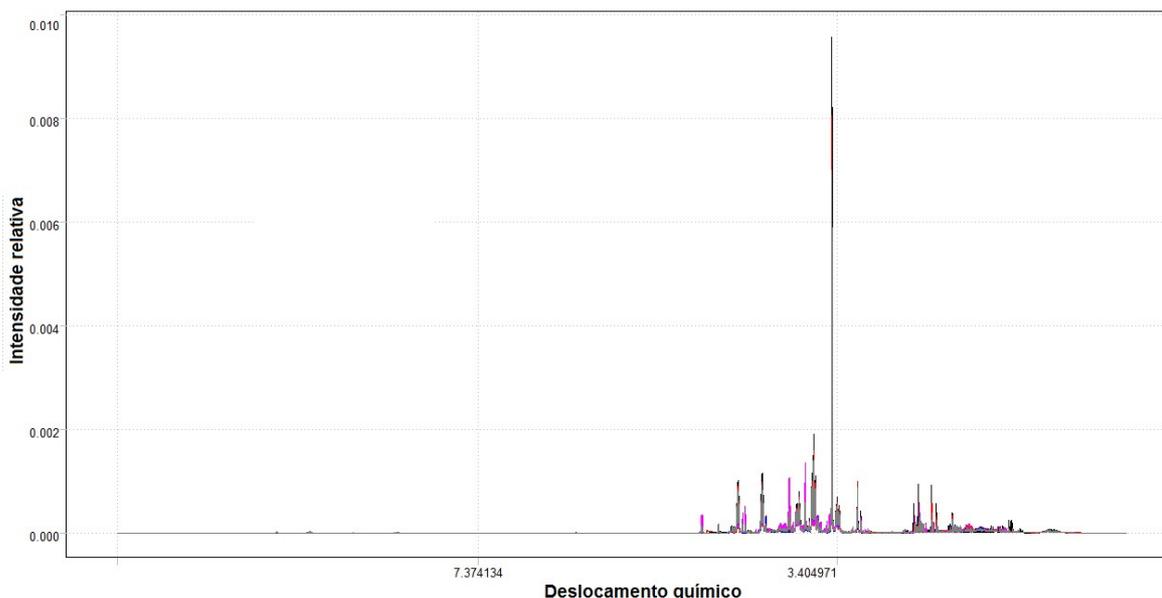
As amostras de porta-enxerto CR01 e CR02 apresentaram quantidades maiores de sacarose e menores de quebrachitol quando comparadas às amostras

do mesmo grupo CR03 e CR04. Essa diferença pode ser explicada pelo fato das amostras CR01 e CR02 possuírem como enxerto o clone GT 1 enquanto as amostras CR03 e CR04 foram enxertadas com RRIM 600, indicando uma possível influência do enxerto sobre o porta-enxerto. As amostras de porta-enxerto CG06 e CG07 enxertadas com GT 1 possuem quantidades maiores de sacarose quando comparadas à amostra CG05 enxertada com RRIM 600. De um modo geral observa-se que as amostras de porta-enxerto enxertadas com GT 1 apresentaram quantidades maiores de sacarose do que as amostras enxertadas com RRIM600.

### **3.4.3. Avaliação do látex dos diferentes clones de seringueira**

#### **3.4.3.1. Análise multivariada e quantificação**

No total foram analisados sete (7) tipos de clones, sendo seis (6) da série IAC 500 e um (1) clone testemunha do experimento RIMM 600. Com o intuito de verificar se há uma distinção entre esses grupos uma análise exploratória dos dados foi realizada utilizando PCA. A matriz gerada após as exclusões continha 84 linhas (28 amostras em triplicatas) e 28034 colunas (variáveis). A visualização de todas as variáveis, após as exclusões e pré-tratamento, encontra-se no gráfico de linhas apresentado na **Figura 3.13**.

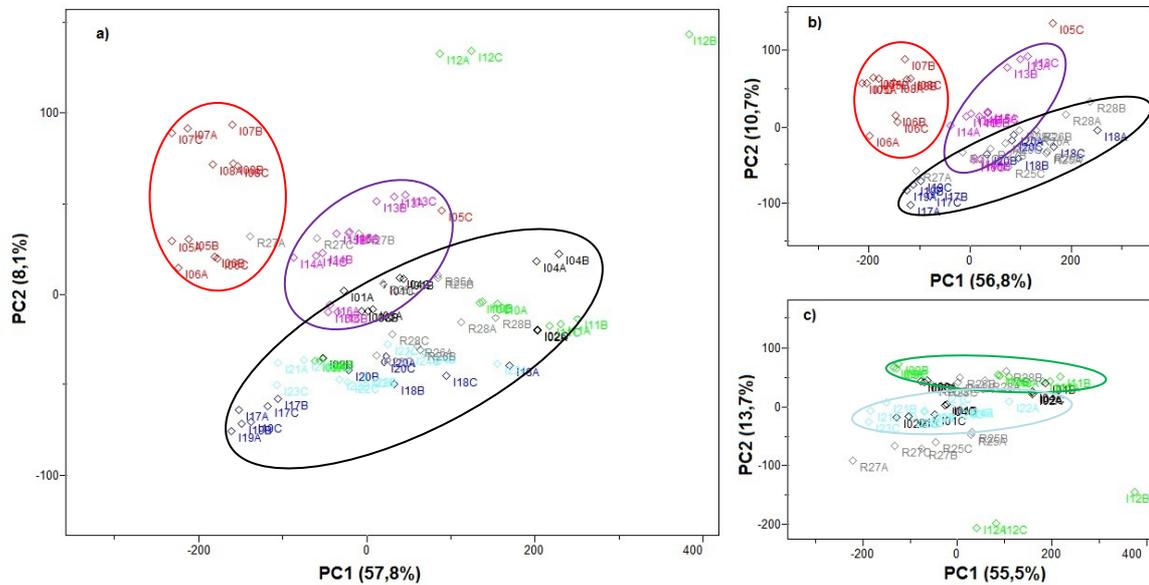


**Figura 3.13.** Gráfico de linhas dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  das amostras de látex dos diferentes clones de seringueira analisadas por PCA.

A **Figura 3.14a** apresenta o gráfico de escores das amostras de látex dos diferentes clones de seringueira. A soma dos valores obtidos para as cinco (5) primeiras componentes principais [(PC1 (58%), PC2 (8%), PC3 (8%), PC4 (6%) e PC5 (4%)] apresentou uma explicação de 84% do total da variância do banco de dados. Devido ao grande número de grupos presentes na matriz a visualização de formação de grupos fica comprometida e assim optou-se por fazer uma nova análise de PCA onde a matriz foi separada em dois grupos e o clone testemunha (RIMM 600) foi incluído em ambas as análises. A **Figura 3.14b** apresenta o gráfico de escores das amostras de látex dos clones IAC 501, IAC 503, IAC 504 e RIMM 600. A soma dos valores obtidos para as quatro primeiras componentes principais (PC1 (57%), PC2 (11%) PC3 (8%) e PC4 (5%)) apresentou uma explicação de 81% do total da variância do banco de dados.

Conforme pode ser observado na **Figura 3.14b** as amostras de látex do clone IAC 504 se agruparam preferencialmente com as amostras do clone RIMM 600. As amostras de látex dos clones IAC 501 e IAC 504 se agruparam separadamente dos outros clones e assim observou-se a formação de três (3) grupos distintos. As amostras do clone IAC 501 se agruparam preferencialmente no quadrante dos valores negativos de PC1 e positivos de PC2 se diferenciando das demais amostras. As amostras dos clones IAC 504 e RIMM 600 se agruparam preferencialmente no quadrante dos valores negativos de PC1 e PC2 e as amostras do clone IAC 503 situam-se no meio dos dois outros grupos sendo influenciadas pelos valores positivos e negativos de PC1 e PC2.

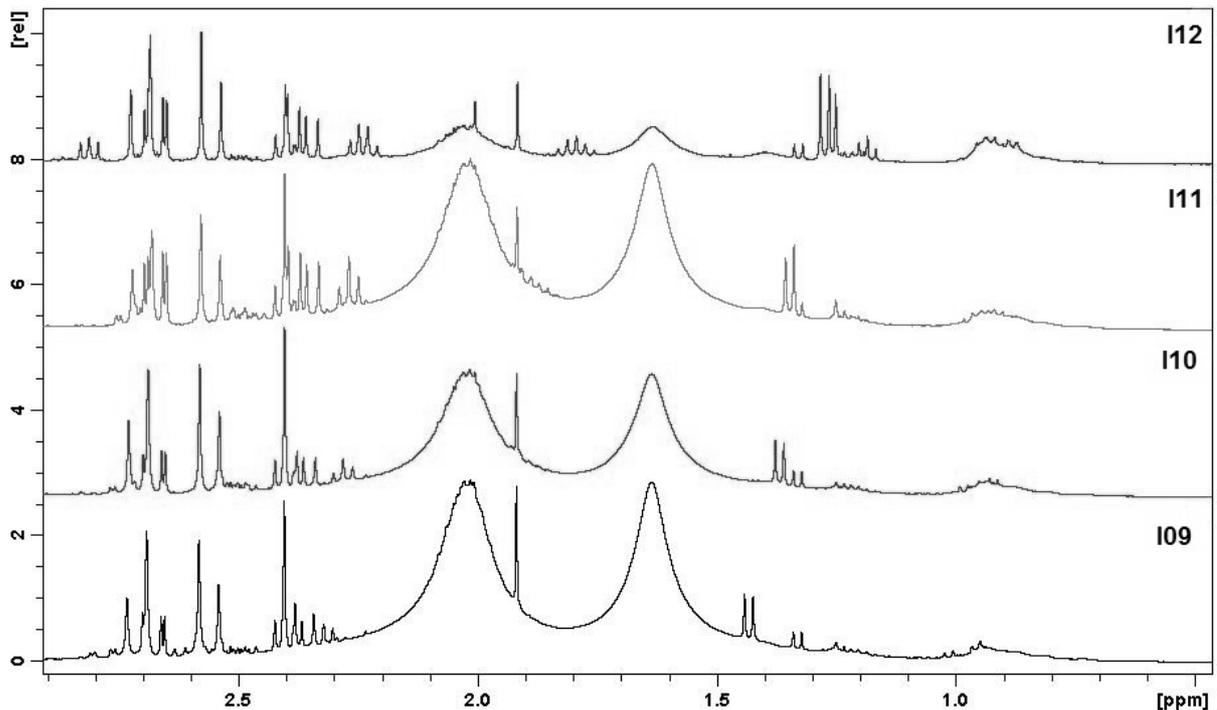
A **Figura 3.14c** apresenta o gráfico de escores das amostras de látex dos clones IAC 500, IAC 502, IAC 505 e RIMM 600. A soma dos valores obtidos para as quatro primeiras componentes principais (PC1 (55%), PC2 (14%) PC3 (9%) e PC4 (5%)) apresentou uma explicação de 83% do total da variância do banco de dados. Conforme pode ser observado na **Figura 3.14c** não houve uma separação eficiente entre os clones analisados, e as amostras se agruparam com o clone testemunha RIMM 600. Há uma tendência de separação entre as amostras do clone IAC 502 e as amostras do clone IAC 505. Esses grupos se separam no eixo da segunda componente principal, sendo as amostras do clone IAC 502 influenciadas pelos valores positivos de PC2 e amostras do clone 505 influenciadas pelos valores negativos de PC2.



**Figura 3.14.** Gráfico de escores das amostras de látex dos diferentes clones de seringueira. a) Todos os clones PC1 (57,8%) x PC2 (8,1%) b) Clones IAC 501, IAC 503, IAC 504 e RIMM 600 PC1 (56,8%) X PC2 (10,7%) c) Clones IAC 500, IAC 502, IAC 505 e RIMM 600.

Nota-se que no grupo IAC 502 a amostra I12 (a, b e c) apresentou-se bastante distinta das demais amostras. Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  das amostras de látex do clone IAC 502 é apresentado na **Figura 3.15**. Observa-se no espectro da amostra I12 que a quantidade de poliisopreno residual é menor quando comparado às outras amostras do grupo e conseqüentemente os sinais dos hidrogênios de aminoácidos na região de 1 a 3 ppm na RMN de  $^1\text{H}$  tornaram-se evidente, diferenciando essa amostra do restante do grupo.

Pode-se notar novamente que as replicatas dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  apresentaram-se bastante próximas entre si, evidenciando a reprodutibilidade da técnica.

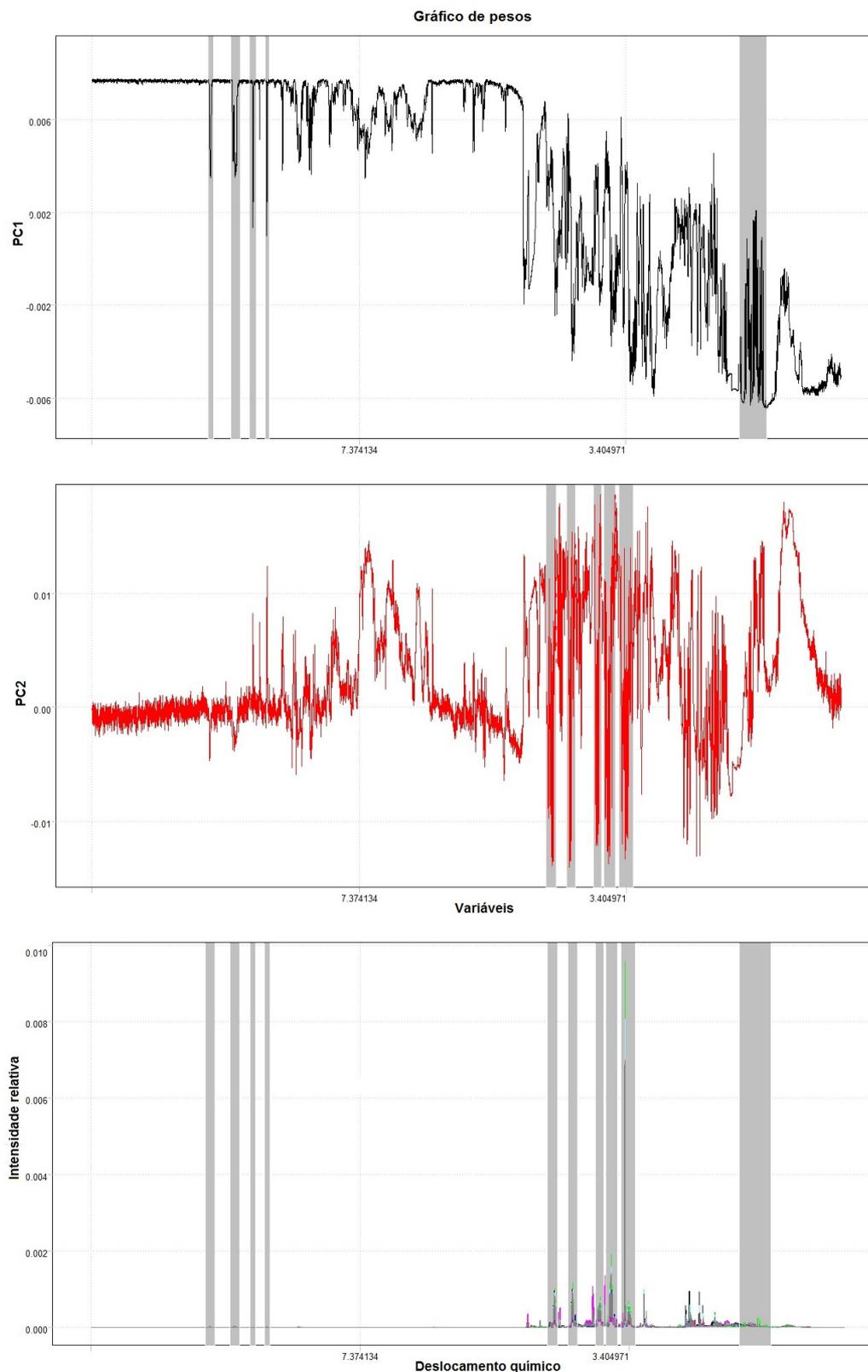


**Figura 3.15.** Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  das amostras de látex do clone IAC 502.

Apesar da visualização dos agrupamentos ser mais evidente nas **Figuras 3.14b e 3.14c**, não se observa de fato uma melhoria na formação de grupos e assim essas figuras são apenas uma forma mais efetiva de se visualizar o que mostra a **Figura 3.14a**, onde todos os clones são considerados. Essa informação foi confirmada através da análise dos gráficos de pesos das análises de PCA, onde os gráficos das análises dos grupos separados se mostraram bastante semelhante ao gráfico de pesos onde todos os clones são analisados juntos. Assim apenas o

gráfico de pesos da análise de PCA onde todos os clones são considerados será analisado (**Figura 3.16**).

A **Figura 3.16** apresenta o gráfico de pesos das amostras de látex dos diferentes clones analisados. As regiões dos espectros que mais contribuíram para o resultado obtido estão destacadas em cinza na **Figura 3.16**. Através da análise do gráfico de pesos da primeira componente principal observa-se que os sinais da trigonelina e do formiato foram alguns dos sinais que mais contribuíram para os valores positivos de PC1 e a região de hidrogênios de aminoácidos contribuiu significativamente para os valores negativos de PC1. O gráfico de pesos da segunda componente principal mostra que os sinais do quebrachitol destacam-se dos outros sinais nessa componente principal.



**Figura 3.16.** Gráfico de pesos PC1 (linha preta) e PC2 (linha vermelha), das amostras de látex dos diferentes tipos de clones.

Com o intuito de se verificar a variabilidade dos metabólitos nas diferentes amostras de látex provenientes dos diferentes clones de seringueira foi realizada uma quantificação relativa para os sinais em 5,41 ppm (sacarose e rafinose), formiato, quebrachitol e trigonelina, variáveis que foram importantes para os resultados obtidos na análise de PCA (**Tabela 3.5**). As considerações feitas a seguir são baseadas apenas nos valores médios dos metabólitos encontrados para cada grupo, uma vez que não há quantidade suficiente de amostras para fornecer informação significativa em uma análise estatística univariada.

Analisando as amostras de látex de acordo com o agrupamento utilizado para as análises de PCA observa-se que a principal diferença entre os clones IAC 501 e IAC 503 está nos valores encontrados para os metabólitos formiato e trigonelina, compostos que tiveram maior influência na primeira componente principal. As amostras do clone IAC 501 apresentaram baixos valores de formiato e trigonelina quando comparado ao clone IAC 503.

As amostras dos clones IAC 501 e IAC 503 separaram-se das amostras dos clones IAC 504 e RIMM 600 no eixo da segunda componente principal, componente onde o quebrachitol teve maior influência. Ao analisar os valores encontrados para o quebrachitol observa-se que as amostras dos clones IAC 501 e IAC 503 possuem praticamente a metade do valor encontrado para o quebrachitol quando comparado com as amostras dos clones IAC 504 e RRIMM 600.

**Tabela 3.5.** Quantificação relativa (área do metabólito/área do TMSp-d4) dos metabólitos presentes nas amostras de látex de diferentes clones de seringueira.

Clones	Código	Sacarose + rafinose	Média	Formiato	Média	Quebrachitol	Média	Trigonelina	Média
IAC 500	I01	0,0102	0,0106	0,005600	0,00513	5,38	5,42	0,0501	0,0527
	I02	0,00864		0,00447		6,23		0,0542	
	I03	ND		0,00583		5,04		0,0622	
	I04	0,0129		0,00463		5,01		0,0441	
IAC 501	I05	0,115	0,159	0,00798	0,00812	2,76	2,89	0,00633	0,0182
	I06	0,113		0,00547		3,52		0,0108	
	I07	0,203		0,00984		2,47		0,0196	
	I08	0,203		0,00919		2,81		0,0361	
IAC 502	I09	ND	0,0674	0,00827	0,00694	5,10	4,12	0,0508	0,0343
	I10	0,0332		0,00902		4,59		0,0435	
	I11	0,0871		0,00537		4,53		0,0323	
	I12	0,0819		0,00508		2,25		0,0105	
IAC 503	I13	0,145	0,378	0,0130	0,0125	3,07	2,69	0,0552	0,0431
	I14	0,418		0,0146		2,49		0,0414	
	I15	0,332		0,00941		2,69		0,0436	
	I16	0,618		0,0129		2,52		0,0323	
IAC 504	I17	0,00462	0,0273	0,00230	0,00313	4,66	4,55	0,0179	0,0272
	I18	0,00948		0,00320		4,61		0,0249	
	I19	0,00586		0,00330		4,53		0,0209	
	I20	0,0892		0,00370		4,40		0,0452	
IAC 505	I21	0,148	0,177	0,00851	0,00734	5,53	5,64	0,0452	0,0491
	I22	0,137		0,00820		5,71		0,0436	
	I23	0,168		0,00658		5,22		0,0459	
	I24	0,255		0,00607		6,09		0,0615	
RIMM 600	R25	0,147	0,161	0,00722	0,00794	4,21	4,47	0,0595	0,0599
	R26	0,0627		0,0102		4,56		0,0588	
	R27	0,118		0,00671		3,13		0,0356	
	R28	0,316		0,00761		5,98		0,0855	

ND Não detectado.

Para o outro grupo analisado, clones IAC 500, IAC 502, IAC 505 e RRIM 600, observou-se apenas uma tendência de separação entre os clones IAC 502 e IAC 505. A principal diferença encontrada nesses clones esta na concentração do sinal em 5,41 ppm referente aos hidrogênios da sacarose e da rafinose. O clone

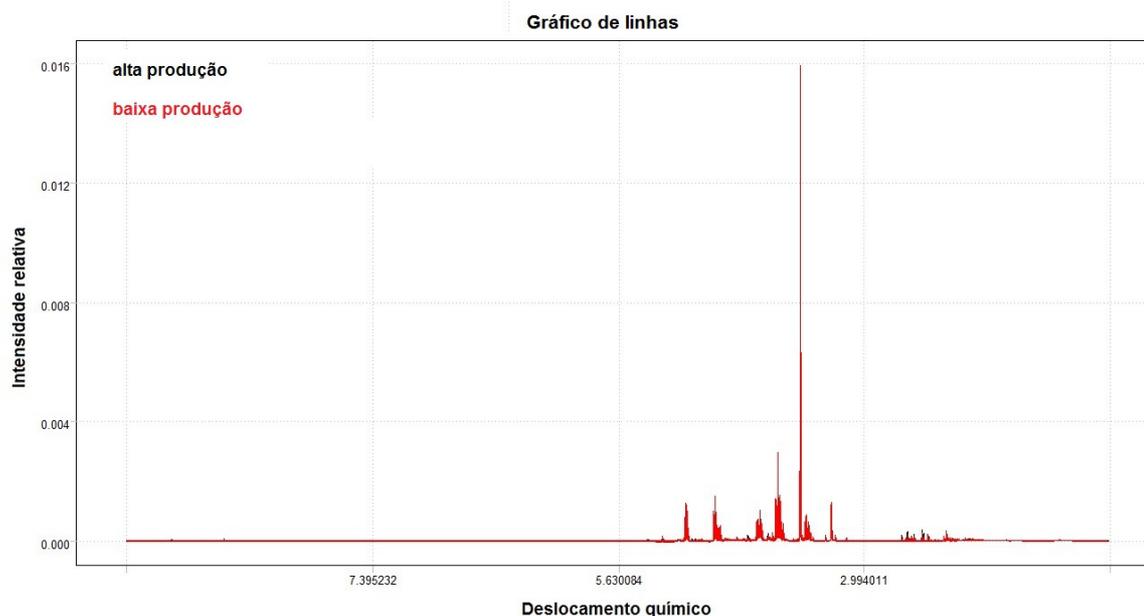
IAC 505 apresenta concentração duas vezes maior para esse sinal se comparado ao clone IAC 502 e valor semelhante ao encontrado para o clone RIMM 600. Nota-se ainda que a amostra I12 pertencente ao clone IAC 502 apresentou valores distintos para os metabólitos quebrachitol e trigonelina quando comparado às outras amostras do grupo.

Baseando-se nos metabólitos quantificados observa-se que as amostras do clone IAC 505 são as que mais se assemelham às amostras do clone testemunha do experimento RIMM 600.

#### **3.4.4. Avaliação do látex de alta e baixa produção de poliisopreno provenientes do mesmo clone**

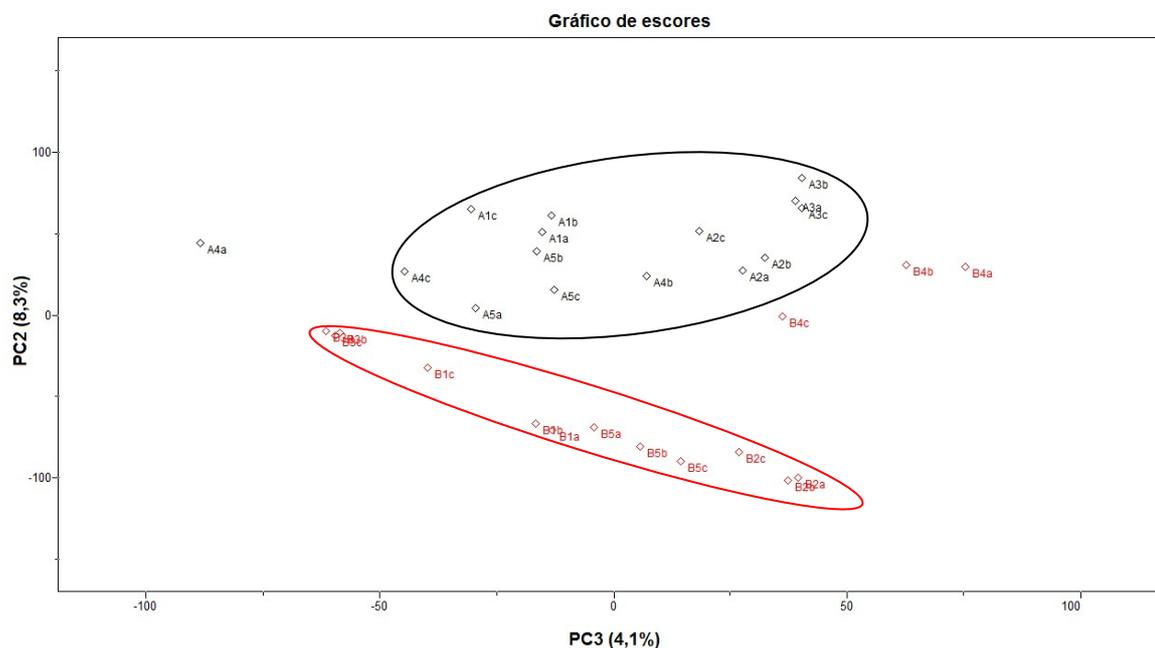
##### **3.4.4.1. Análise multivariada e quantificação**

Neste experimento foram analisadas no total 10 amostras de látex, sendo cinco (5) de alta produção e cinco (5) de baixa produção de poliisopreno. Com o intuito de verificar se há uma distinção entre esses grupos uma análise exploratória dos dados foi realizada utilizando PCA. A matriz gerada após as exclusões continha 30 linhas (10 amostras em triplicatas) e 39926 colunas (variáveis). A visualização de todas as variáveis, após as exclusões e pré-tratamento, encontra-se no gráfico de linhas apresentado na **Figura 3.17**.



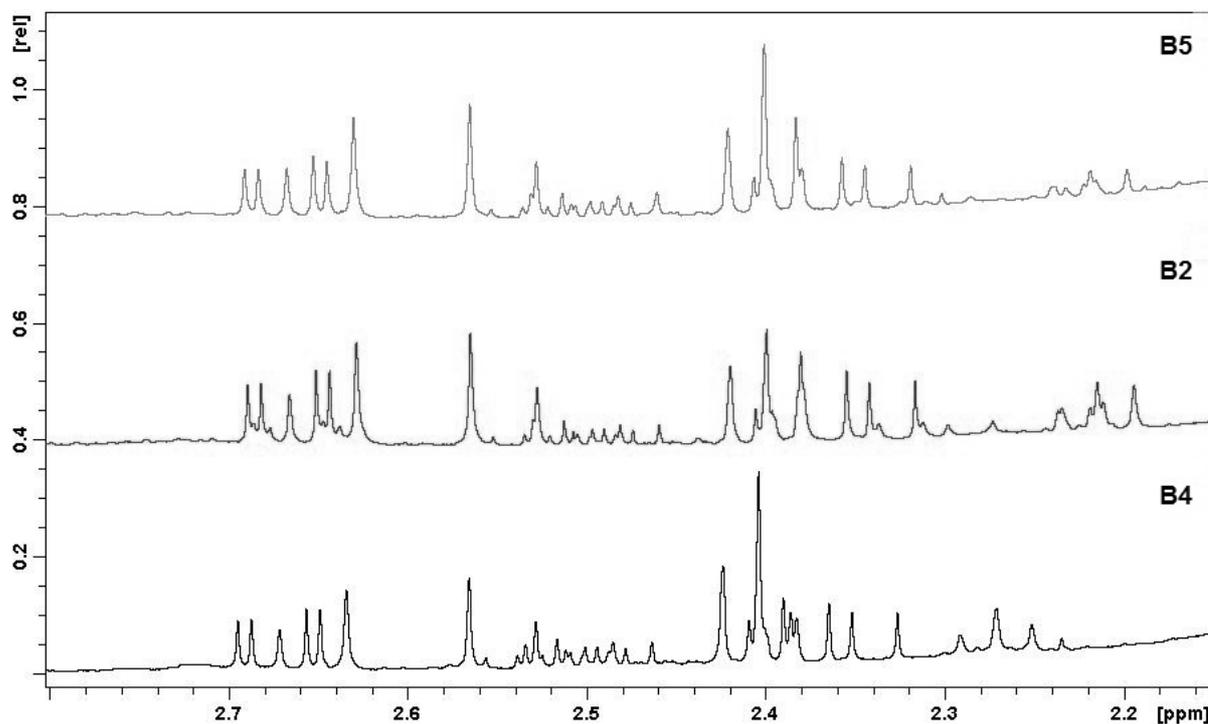
**Figura 3.17.** Gráfico de linhas dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  das amostras de látex dos diferentes clones de seringueira analisadas por PCA.

A **Figura 3.18** apresenta o gráfico de escores das amostras de látex de alta e baixa produção de poliisopreno pertencentes ao mesmo tipo de clone (IAC 235). A soma dos valores obtidos para as quatro primeiras componentes principais (PC1 (72%), PC2 (8%) PC3 (4%) e PC4 (3%)) apresentou uma explicação de 87% do total da variância do banco de dados. Conforme pode ser observado existe uma forte tendência de agrupamento entre amostras do grupo A (alta produção) e B (baixa produção). A componente principal PC2 foi responsável por essa separação, sendo que os valores positivos de PC2 tiveram maior influência para as amostras do grupo A e os valores negativos de PC2 influenciaram mais o grupo B. Pode-se notar que as replicatas dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  apresentaram-se bastante próximas entre si, evidenciando a reprodutibilidade da técnica.



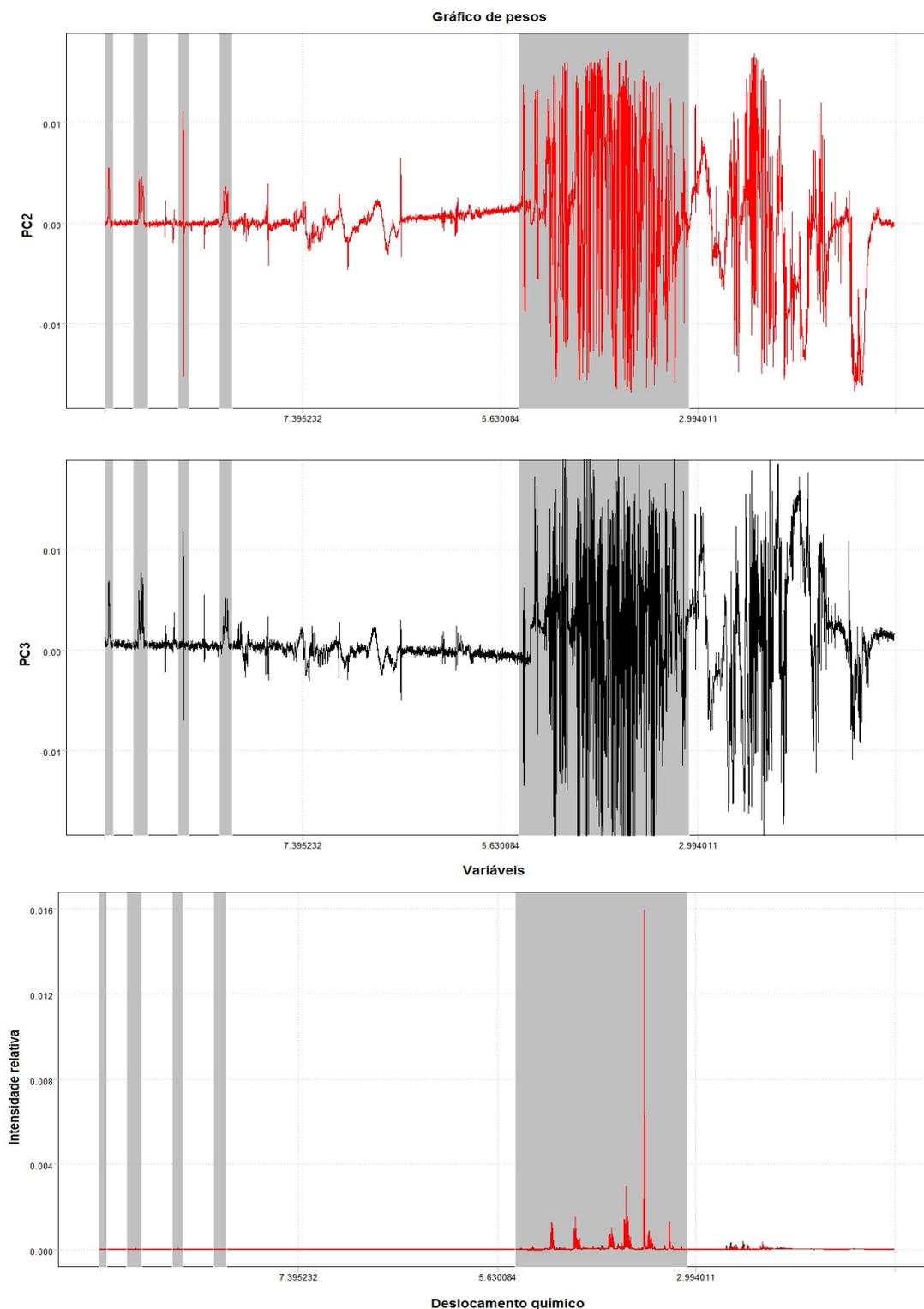
**Figura 3.18.** Gráfico de escores PC2 (8,3%) x PC3 (4,1%) das amostras de látex de alta (A) e baixa (B) produção pertencentes ao mesmo tipo de clone (IAC 235).

Conforme pode ser observado na **Figura 3.18** a amostra B4 não se agrupou com as amostras do grupo B. A amostra B4 foi a primeira amostra de látex utilizada neste trabalho. Essa amostra foi utilizada para se estabelecer o protocolo de análise e possivelmente houve mudanças em sua composição original. Acredita-se que possa ter ocorrido um princípio de coagulação através da análise visual da amostra. A amônia adicionada durante a etapa de coleta provavelmente evaporou e a principal consequência é a mudança do pH do meio. A **Figura 3.19** apresenta a região hidrogênios de ácidos orgânicos do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  das amostras de látex do grupo B (B4, B2 e B5). Nota-se principalmente um deslocamento dos sinais, como no caso do citrato, e também o surgimento de novos sinais nessa região.



**Figura 3.19.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H das amostras de látex do grupo B (baixa produção).

A **Figura 3.20** apresenta o gráfico de pesos das amostras de látex de alta e baixa produção de poliisopreno pertencentes ao mesmo tipo de clone (IAC 235). As variáveis destacadas em cinza foram as regiões do espectro que mais contribuíram para o resultado obtido. As componentes principais, dois (2) e três (3) apresentaram o mesmo perfil de contribuição, pois as mesmas contribuem pouco com a variância do banco de dados, apesar de serem responsáveis pela separação no gráfico de escores. A análise da **Figura 3.20** mostra que os sinais que mais contribuíram para se obter a separação foram o formiato, a trigonelina e a região dos sinais da sacarose e quebrachitol.



**Figura 3.20.** Gráfico de pesos, PC2 (linha vermelha) e PC3 (linha preta), das amostras de látex de alta e baixa produção de poliisopreno pertencentes ao mesmo tipo de clone (IAC 235).

Com o intuito de se verificar a variabilidade dos metabólitos nas diferentes amostras de látex foi realizada uma quantificação relativa para o sinal em 5,41 ppm (sacarose e rafinose), formiato, quebrachitol e trigonelina, variáveis que foram importantes para a separação dos grupos na análise de PCA (**Tabela 3.6**). As considerações feitas a seguir são baseadas apenas nos valores médios dos metabólitos encontrados para cada grupo, uma vez que não há quantidade suficiente de amostras para fornecer informação significativa em uma análise estatística univariada.

**Tabela 3.6.** Quantificação relativa (área do metabólito/área do TMSp-d4) dos metabólitos presentes nas amostras de látex de alta e baixa produção de poliisopreno provenientes do mesmo clone.

Amostras	Sacarose + rafinose	Média	Formiato	Média	Quebrachitol	Média	Trigonelina	Média
A1	0,394	0,439	0,0998	0,132	30,0	27,8	0,610	0,375
A2	0,305		0,155		29,4		0,345	
A3	0,423		0,113		26,6		0,331	
A4	0,750		0,162		28,0		0,132	
A5	0,325		0,128		25,1		0,459	
B1	0,149	0,181	0,129	0,144	27,8	26,6	0,190	0,288
B2	0,213		0,159		24,2		0,249	
B3	0,198		0,127		28,6		0,312	
B4	0,165		0,145		27,4		0,340	
B5	0,181		0,161		24,9		0,349	

Como pode ser observado na **Tabela 3.6** o metabólito que apresentou maior variação entre os grupos de alta e baixa produção de poliisopreno foi o sinal em 5,41 ppm referente aos hidrogênios da sacarose e da rafinose. Esses sinais foram importantes na separação dos grupos na análise de PCA conforme pode ser observado no gráfico de pesos (**Figura 3.20**). Conforme mostrado na **Figura 3.1** a

sacarose está diretamente relacionada com a produção do poliisopreno. Alguns autores afirmam que a quantidade excessiva de sacarose presente no látex pode significar uma baixa utilização desse açúcar durante o metabolismo de regeneração do látex e conseqüentemente uma baixa produtividade de poliisopreno<sup>63</sup>. Essa informação não condiz com os dados obtidos nesse trabalho. O que se observa é que uma quantidade elevada de açúcar presente no soro do látex se traduz em suprimento para a posterior regeneração dos vasos laticíferos permitindo assim uma alta produtividade. Os outros metabólitos (formiato, quebrachitol e trigonelina) não apresentaram variação significativa nos valores encontrados para os grupos de alta e baixa produção de poliisopreno.

### **3.5. Conclusões**

Podemos concluir que a técnica de ressonância magnética nuclear (RMN de  $^1\text{H}$  e bidimensionais) mostrou-se como uma importante ferramenta na identificação e quantificação relativa dos principais metabólitos presentes em amostras de látex. Os dados fornecidos pelos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  aliados a análise multivariada permitiu distinguir as amostras de látex em grupos nos diferentes casos estudados neste trabalho. No estudo da influência do porta-enxerto sobre enxerto foi possível verificar uma diferença entre as amostras de látex dos grupos RR e GG. As amostras de látex do grupo GR se assemelharam às amostras do grupo RR enquanto as amostras do grupo RG ficaram dispersas entre os grupos RR e GG. Dos diversos clones estudados nesse trabalho verificou-se que o clone IAC 505 foi o que mais se assemelhou ao clone testemunha do experimento RRIM 600. Através da análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  das amostras de látex do clone IAC 235 foi possível verificar a diferença existente no perfil metabólico das amostras de alta e baixa produção de poliisopreno. A análise de RMN aliada a análise quimiométrica demonstrou ser eficiente na avaliação de alguns dos diversos problemas encontrados na heveicultura brasileira e pode futuramente ser empregada na resolução de casos onde as ferramentas tradicionais de análise não sejam eficientes.

#### 4. Referências Bibliográficas

1. LEVITT, M. H. Spin dynamics : basics of nuclear magnetic resonance. Editora John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, 714 p., 2008.
2. JACOBSEN, N. E. NMR spectroscopy explained : simplified theory, applications and examples for organic chemistry and structural biology. Editora Wiley-Interscience, Hoboken, N.J., 668 p., 2007.
3. CLARIDGE, T. D. W. High-resolution NMR techniques in organic chemistry. Editora Pergamon, New York, 382 p., 1999.
4. GORTER, C. J. Negative results of an attempt to direct nuclear magnetic spins. *Physica*, 3:995-998, 1936.
5. BLOCH, F. Nuclear Induction. *Physical Review*, 70:460-474, 1946.
6. PURCELL, E. M.; BLOEMBERGEN, N.; POUND, R. V. Resonance Absorption by Nuclear Magnetic Moments in a Single Crystal of  $\text{CaF}_2$ . *Physical Review*, 70:988-988, 1946.
7. PROCTOR, W. G.; YU, F. C. The Dependence of a Nuclear Magnetic Resonance Frequency Upon Chemical Compound. *Physical Review*, 77:717-717, 1950.
8. PARELLA, T., NMRGuide 4.0 - TOPSPIN 1.3. Copyright © 1998-2004 Bruker Biospin.
9. WITJES, H.; MELSEN, W. J.; ZANDT, H. J. A. I.; VAN DER GRAAF, M.; HEERSCHAP, A.; BUYDENS, L. M. C. Automatic correction for phase shifts, frequency shifts, and lineshape distortions across a series of single resonance lines in large spectral data sets. *Journal of Magnetic Resonance*, 144:35-44, 2000.
10. WITJES, H.; PEPERS, M.; MELSEN, W. J.; BUYDENS, L. M. C. Modelling phase shifts, peak shifts and peak width variations in spectral data sets: its value in multivariate data analysis. *Analytica Chimica Acta*, 432:113-124, 2001.
11. OBER, R. J.; WARD, E. S. Correcting for Phase-Distortion of Nmr-Spectra Analyzed Using Singular-Value Decomposition of Hankel-Matrices. *Journal of Magnetic Resonance Series A*, 114:120-123, 1995.
12. SCHRIPSEMA, J. Application of NMR in Plant Metabolomics: Techniques, Problems and Prospects. *Phytochemical Analysis*, 21:14-21, 2010.

13. DUNN, W. B.; BAILEY, N. J. C.; JOHNSON, H. E. Measuring the metabolome: current analytical technologies. *Analyst*, 130:606-625, 2005.
14. JONSSON, P.; GULLBERG, J.; NORDSTROM, A.; KUSANO, M.; KOWALCZYK, M.; SJOSTROM, M.; MORITZ, T. A strategy for identifying differences in large series of metabolomic samples analyzed by GC/MS. *Analytical Chemistry*, 76:1738-1745, 2004.
15. BOLLARD, M. E.; STANLEY, E. G.; LINDON, J. C.; NICHOLSON, J. K.; HOLMES, E. NMR-based metabonomic approaches for evaluating physiological influences on biofluid composition. *Nmr in Biomedicine*, 18:143-162, 2005.
16. HOLMES, E.; NICHOLLS, A. W.; LINDON, J. C.; CONNOR, S. C.; CONNELLY, J. C.; HASELDEN, J. N.; DAMMENT, S. J. P.; SPRAUL, M.; NEIDIG, P.; NICHOLSON, J. K. Chemometric models for toxicity classification based on NMR spectra of biofluids. *Chemical Research in Toxicology*, 13:471-478, 2000.
17. HOLMES, E.; LOO, R. L.; STAMLER, J.; BICTASH, M.; YAP, I. K. S.; CHAN, Q.; EBBELS, T.; DE IORIO, M.; BROWN, I. J.; VESELKOV, K. A.; DAVIGLUS, M. L.; KESTELOOT, H.; UESHIMA, H.; ZHAO, L. C.; NICHOLSON, J. K.; ELLIOTT, P. Human metabolic phenotype diversity and its association with diet and blood pressure. *Nature*, 453:396-U350, 2008.
18. SIMERVILLE, J. A.; MAXTED, W. C.; PAHIRA, J. J. Urinalysis: A comprehensive review. *American Family Physician*, 71:1153-1162, 2005.
19. BALES, J. R.; HIGHAM, D. P.; HOWE, I.; NICHOLSON, J. K.; SADLER, P. J. Use of High-Resolution Proton Nuclear Magnetic-Resonance Spectroscopy for Rapid Multi-Component Analysis of Urine. *Clinical Chemistry*, 30:426-432, 1984.
20. LINDON, J. C.; NICHOLSON, J. K.; EVERETT, J. R. NMR spectroscopy of biofluids. *Annual Reports on Nmr Spectroscopy, Vol 38*, 38:1-88, 1999.
21. CROCKFORD, D. J.; KEUN, H. C.; SMITH, L. M.; HOLMES, E.; NICHOLSON, J. K. Curve-fitting method for direct quantitation of compounds in complex biological mixtures using H-1 NMR: Application in metabonomic toxicology studies. *Analytical Chemistry*, 77:4556-4562, 2005.
22. BEEBE, K. R.; PELL, R. J.; SEASHOLTZ, M. B. Chemometrics : a practical guide. Editora Wiley, New York, 348 p., 1998.
23. PIROUETTE®. User Guide, versão 4.0. Infometrix, Inc., 1985-2007.,

24. SBEM - Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia. O que é Diabetes? <http://www.endocrino.org.br/o-que-e-diabetes/> (Acessado em: 04/07/2011)
25. GUIDONI, C. M.; OLIVERA, C. M. X.; DE FREITAS, O.; PEREIRA, L. R. L. Diabetes help in the Brazilian Healthcare System: analysis of a current model. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 45:37-48, 2009.
26. IDF - International Diabetes Federation <http://www.idf.org/> (Acessado em: 04/07/2011)
27. HECK, C. I.; DE MEJIA, E. G. Yerba Mate tea (*Ilex paraguariensis*): A comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. *Journal of Food Science*, 72:R138-R151, 2007.
28. ESMELINDRO, M. C.; TONIAZZO, G.; WACZUK, A.; DARIVA, C.; OLIVEIRA, D. Caracterização físico-química da erva mate: influência das etapas do processamento industrial. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 22:199-204, 2002.
29. BASTOS, D. H. M.; TORRES, E. A. F. S. Bebidas a base de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) e saúde pública. *Nutrire*, 26:77-89, 2003.
30. ANESINI, C.; FERRARO, G.; FILIP, R. Peroxidase-like activity of *Ilex paraguariensis*. *Food Chemistry*, 97:459-464, 2006.
31. ALIKARIDIS, F. Natural Constituents of *Ilex* Species. *Journal of Ethnopharmacology*, 20:121-144, 1987.
32. GNOATTO, S. C. B.; DASSONVILLE-KLIMPT, A.; DA NASCIMENTO, S.; GALERA, P.; BOUMEDIENE, K.; GOSMANN, G.; SONNET, P.; MOSLEMI, S. Evaluation of ursolic acid isolated from *Ilex paraguariensis* and derivatives on aromatase inhibition. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 43:1865-1877, 2008.
33. CARDOZO, E. L.; FERRARESE-FILHO, O.; CARDOZO, L.; FERRARESE, M. D. L.; DONADUZZI, C. M.; STURION, J. A. Methylxanthines and phenolic compounds in mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) progenies grown in Brazil. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20:553-558, 2007.
34. FILIP, R.; LOPEZ, P.; GIBERTI, G.; COUSSIO, J.; FERRARO, G. Phenolic compounds in seven South American *Ilex* species. *Fitoterapia*, 72:774-778, 2001.
35. GUGLIUCCI, A.; STAHL, A. J. C. Low-Density-Lipoprotein Oxidation Is Inhibited by Extracts of *Ilex Paraguariensis*. *Biochemistry and Molecular Biology International*, 35:47-56, 1995.

36. GUGLIUCCI, A. Antioxidant effects of *Ilex paraguariensis*: Induction of decreased oxidability of human LDL in vivo. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 224:338-344, 1996.
37. CAMPOS, A. M.; ESCOBAR, J.; LISSI, E. A. The total reactive antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity (TAR) of *Ilex paraguayensis* extracts and red wine. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 7:43-49, 1996.
38. BASTOS, D. H. M.; SALDANHA, L. A.; CATHARINO, R. R.; SAWAYA, A. C. H. F.; CUNHA, I. B. S.; CARVALHO, P. O.; EBERLIN, M. N. Phenolic antioxidants identified by ESI-MS from yerba mate (*Ilex paraguariensis*) and green tea (*Camelia sinensis*) extracts. *Molecules*, 12:423-432, 2007.
39. GUGLIUCCI, A.; MENINI, T. Three different pathways for human LDL oxidation are inhibited in vitro by water extracts of the medicinal herb *Achyrocline satureoides*. *Life Sciences*, 71:693-705, 2002.
40. MIRANDA, D. D. C.; ARCARI, D. P.; PEDRAZZOLI, J.; CARVALHO, P. D.; CERUTTI, S. M.; BASTOS, D. H. M.; RIBEIRO, M. L. Protective effects of mate tea (*Ilex paraguariensis*) on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced DNA damage and DNA repair in mice. *Mutagenesis*, 23:261-265, 2008.
41. LUNCEFORD, N.; GUGLIUCCI, A. *Ilex paraguariensis* extracts inhibit AGE formation more efficiently than green tea. *Fitoterapia*, 76:419-427, 2005.
42. SALEK, R. M.; MAGUIRE, M. L.; BENTLEY, E.; RUBTSOV, D. V.; HOUGH, T.; CHEESEMAN, M.; NUNEZ, D.; SWEATMAN, B. C.; HASELDEN, J. N.; COX, R. D.; CONNOR, S. C.; GRIFFIN, J. L. A metabolomic comparison of urinary changes in type 2 diabetes in mouse, rat, and human. *Physiological Genomics*, 29:99-108, 2007.
43. WISHART, D. S.; KNOX, C.; GUO, A. C.; EISNER, R.; YOUNG, N.; GAUTAM, B.; HAU, D. D.; PSYCHOGIOS, N.; DONG, E.; BOUATRA, S.; MANDAL, R.; SINELNIKOV, I.; XIA, J. G.; JIA, L.; CRUZ, J. A.; LIM, E.; SOBSEY, C. A.; SHRIVASTAVA, S.; HUANG, P.; LIU, P.; FANG, L.; PENG, J.; FRADETTE, R.; CHENG, D.; TZUR, D.; CLEMENTS, M.; LEWIS, A.; DE SOUZA, A.; ZUNIGA, A.; DAWE, M.; XIONG, Y. P.; CLIVE, D.; GREINER, R.; NAZYROVA, A.; SHAYKHUTDINOV, R.; LI, L.; VOGEL, H. J.; FORSYTHE, I. HMDB: a knowledgebase for the human metabolome. *Nucleic Acids Research*, 37:D603-D610, 2009.
44. MESSANA, I.; FORNI, F.; FERRARI, F.; ROSSI, C.; GIARDINA, B.; ZUPPI, C. Proton nuclear magnetic resonance spectral profiles of urine in type II diabetic patients. *Clinical Chemistry*, 44:1529-1534, 1998.
45. TESSARI, P. Effects of Insulin on Whole-Body and Regional Amino-Acid-Metabolism. *Diabetes-Metabolism Reviews*, 10:253-285, 1994.

46. LUNDINA, T. A.; KNUBOVETS, T. L.; SEDOV, K. R.; MARKOVA, S. A.; SIBELDIN, L. A. Variability of Kidney Tubular Interstitial Distortions in Glomerulonephritis as Measured by H-1-Nmr Urinalysis. *Clinica Chimica Acta*, 214:165-173, 1993.
47. ARCARI, D. P.; BARTCHEWSKY, W.; DOS SANTOS, T. W.; OLIVEIRA, K. A.; DEOLIVEIRA, C. C.; GOTARDO, E. M.; PEDRAZZOLI, J.; GAMBERO, A.; FERRAZ, L. F. C.; CARVALHO, P. D.; RIBEIRO, M. L. Anti-inflammatory effects of yerba mate extract (*Ilex paraguariensis*) ameliorate insulin resistance in mice with high fat diet-induced obesity. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 335:110-115, 2011.
48. BALABAN, R. S.; BURG, M. B. Osmotically Active Organic Solutes in the Renal Inner Medulla. *Kidney International*, 31:562-564, 1987.
49. HOLMES, E.; BONNER, F. W.; SWEATMAN, B. C.; LINDON, J. C.; BEDDELL, C. R.; RAHR, E.; NICHOLSON, J. K. Nuclear-Magnetic-Resonance Spectroscopy and Pattern-Recognition Analysis of the Biochemical Processes Associated with the Progression of and Recovery from Nephrotoxic Lesions in the Rat Induced by Mercury(II) Chloride and 2-Bromoethanamine. *Molecular Pharmacology*, 42:922-930, 1992.
50. GARTLAND, K. P. R.; BONNER, F. W.; NICHOLSON, J. K. Investigations into the Biochemical Effects of Region-Specific Nephrotoxins. *Molecular Pharmacology*, 35:242-250, 1989.
51. CHEN, P.; LIU, J. C. Metabonomics and diabetes Mellitus. *Advances in Therapy*, 24:1036-1045, 2007.
52. LEVER, M.; SIZELAND, P. C. B.; BASON, L. M.; HAYMAN, C. M.; CHAMBERS, S. T. Glycine Betaine and Proline Betaine in Human Blood and Urine. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects*, 1200:259-264, 1994.
53. NICHOLSON, J. K.; TIMBRELL, J. A.; SADLER, P. J. Proton Nmr-Spectra of Urine as Indicators of Renal Damage - Mercury-Induced Nephrotoxicity in Rats. *Molecular Pharmacology*, 27:644-651, 1985.
54. WYSS, M.; KADDURAH-DAOUK, R. Creatine and creatinine metabolism. *Physiological Reviews*, 80:1107-1213, 2000.
55. CHUNG, Y. L.; RIDER, L. G.; BELL, J. D.; SUMMERS, R. M.; ZEMEL, L. S.; RENNEBOHM, R. M.; PASSO, M. H.; HICKS, J.; MILLER, F. W.; SCOTT, D. L.; ACTIV, J. D. D. Muscle metabolites, detected in urine by proton spectroscopy, correlate with disease damage in juvenile idiopathic inflammatory myopathies. *Arthritis & Rheumatism-Arthritis Care & Research*, 53:565-570, 2005.
56. LEON, C. A.; RAIJ, L. Interaction of haemodynamic and metabolic pathways in the genesis of diabetic nephropathy. *Journal of Hypertension*, 23:1931-1937, 2005.

57. STELLA, C.; BECKWITH-HALL, B.; CLOAREC, O.; HOLMES, E.; LINDON, J. C.; POWELL, J.; VAN DER OUDERAA, F.; BINGHAM, S.; CROSS, A. J.; NICHOLSON, J. K. Susceptibility of human metabolic phenotypes to dietary modulation. *Journal of Proteome Research*, 5:2780-2788, 2006.
58. RIPPEL, M. M.; BRAGANÇA, F. D. Natural Rubber and Nanocomposites with Clay. *Química Nova*, 32:818-826, 2009.
59. IAC - Instituto Agrônomo Campinas. Programa seringueira.  
[http://www.iac.sp.gov.br/Centros/Centro\\_cafe/seringueira/](http://www.iac.sp.gov.br/Centros/Centro_cafe/seringueira/) (Acessado em: 04/07/2011)
60. D'AUZAC, J. Tapping systems and area of drained bark. IN: *Physiology of Rubber Tree Latex : The Laticiferous Cell and Latex : A Model of Cytoplasm*. D'AUZAC, J.; JACOB, J.-L.; CHRESTIN, H. (Eds.). Boca Raton, Fla., CRC Press, 1989. p. 221-232.
61. RIPPEL, M. M. Caracterização Microestrutural de Filmes e Partículas de Látex de Borracha Natural Campinas, Programa de Pós-Graduação em Físico-Química - UNICAMP, 2005. Tese de Doutorado.
62. D'AUZAC, J.; JACOB, J.-L. The composition of latex from *Hevea brasiliensis* as a laticiferous cytoplasm. IN: *Physiology of Rubber Tree Latex : The Laticiferous Cell and Latex : A Model of Cytoplasm*. D'AUZAC, J.; JACOB, J.-L.; CHRESTIN, H. (Eds.). Boca Raton, Fla., CRC Press, 1989. p. 59-96.
63. SÁ, T. D. A. Avaliação Ecofisiológica de Seringueiras (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.), Submetidas a Diferentes Intensidades de Sangria, em Ambientes Contrastantes do Estado de São Paulo. Campinas, Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal - UNICAMP, 1991. Tese de Doutorado.
64. DUSOTOIT-COUCAUD, A.; PORCHERON, B.; BRUNEL, N.; KONGSAWADWORAKUL, P.; FRANCEL, J.; VIBOONJUN, U.; CHRESTIN, H.; LEMOINE, R.; SAKR, S. Cloning and Characterization of a New Polyol Transporter (HbPLT2) in *Hevea brasiliensis*. *Plant and Cell Physiology*, 51:1878-1888, 2010.
65. SOUZA, I. A. Avaliação de clones de seringueira (*Hevea* spp.) em Piracicaba-SP. Piracicaba, Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia - USP, 2007. Dissertação de Mestrado.
66. APABOR - Associação Paulista de Produtores e Beneficiadores de Borracha.  
<http://www.apabor.org.br> (Acessado em: 04/07/2011)
67. LE GUEN, V.; GARCIA, D.; MATTOS, C. R. R.; DOARE, F.; LESPINASSE, D.; SEGUIN, M. Bypassing of a polygenic *Microcyclus ulei* resistance in rubber tree, analyzed by QTL detection. *New Phytologist*, 173:335-345, 2007.

68. Grupo Hevea Brasil Seringueira. O que é um clone de seringueira?  
<http://www.heveabrasil.com/noticias/clones.pdf> (Acessado em: 04/07/2011)
69. IAC - Instituto Agronômico Campinas. Recomendação de clones de seringueira para o estado de São Paulo.  
[http://www.iac.sp.gov.br/centros/centro\\_cafe/seringueira/PubPDF/Recomendacao\\_clones.PDF](http://www.iac.sp.gov.br/centros/centro_cafe/seringueira/PubPDF/Recomendacao_clones.PDF)  
(Acessado em: 04/07/2011)
70. SANTANA, O. J. F. Látex. Sumaré, Curso técnico em química - Escola Politécnica das Faculdades Network, 2010. Trabalho de Conclusão de Curso.
71. CARDINAL, A. B. B.; GONÇALVES, P. D. S.; MARTINS, A. L. M. Influence of Six Rootstocks on Yield of Superior Rubber Tree Clones. *Bragantia*, 66:277-284, 2007.
72. SOBOLEV, A. P.; BROSIO, E.; GIANFERRI, R.; SEGRE, A. L. Metabolic profile of lettuce leaves by high-field NMR spectra. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 43:625-638, 2005.
73. CUI, Q.; LEWIS, I. A.; HEGEMAN, A. D.; ANDERSON, M. E.; LI, J.; SCHULTE, C. F.; WESTLER, W. M.; EGHBALNIA, H. R.; SUSSMAN, M. R.; MARKLEY, J. L. Metabolite identification via the Madison Metabolomics Consortium Database. *Nature Biotechnology*, 26:162-164, 2008.
74. HATTORI, M.; OKUNO, Y.; GOTO, S.; KANEHISA, M. Development of a chemical structure comparison method for integrated analysis of chemical and genomic information in the metabolic pathways. *Journal of the American Chemical Society*, 125:11853-11865, 2003.
75. KY, C. L.; LOUARN, J.; DUSSERT, S.; GUYOT, B.; HAMON, S.; NOIROT, M. Caffeine, trigonelline, chlorogenic acids and sucrose diversity in wild *Coffea arabica* L. and *C-canephora* P. accessions. *Food Chemistry*, 75:223-230, 2001.
76. LE GALL, G.; COLQUHOUN, I. J.; DAVIS, A. L.; COLLINS, G. J.; VERHOEYEN, M. E. Metabolite profiling of tomato (*Lycopersicon esculentum*) using H-1 NMR spectroscopy as a tool to detect potential unintended effects following a genetic modification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51:2447-2456, 2003.
77. DEFERNEZ, M.; GUNNING, Y. M.; PARR, A. J.; SHEPHERD, L. V. T.; DAVIES, H. V.; COLQUHOUN, I. J. NMR and HPLC-UV profiling of potatoes with genetic modifications to metabolic pathways. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52:6075-6085, 2004.
78. SHRESTHA, T.; BISSET, N. G. Quaternary Nitrogen-Compounds from South-American Moraceae. *Phytochemistry*, 30:3285-3287, 1991.

## APÊNDICE 1

Pacientes diagnosticados com Diabetes Mellitus Tipo 2 (DMT2).

<b>DMT2 – Intervenção dietética (Grupo DD)</b>						
Código dos pacientes	Tempo basal			Tempo de intervenção		
	-30	-15	0	20	40	60
119	X	X	X	X	X	X
125	X	X	X	X	X	X
132	X	X	X	X	-	-
192	X	X	X	X	X	X
244	X	X	-	-	-	-
276	-	-	X	X	-	-
298	X	X	-	X	-	-

X = Presente; - = Ausente

<b>DMT2 – Erva-mate (Grupo DE)</b>						
Código dos pacientes	Tempo basal			Tempo de intervenção		
	-30	-15	0	20	40	60
177	X	-	X	X	-	-
195	-	-	-	-	-	X
209	X	X	X	X	-	-
214	X	X	X	-	-	-
261	-	-	-	X	X	-
290	-	-	X	-	-	-
294	X	X	X	-	X	-
295	X	X	X	-	-	-

X = Presente; - = Ausente

<b>DMT2 – Intervenção dietética + erva-mate (Grupo DDE)</b>						
Código dos pacientes	Tempo basal			Tempo de intervenção		
	-30	-15	0	20	40	60
161	X	X	X	X	X	X
200	X	X	X	X	X	-
210	X	X	X	-	-	X
241	X	X	-	X	-	-
246	X	X	-	-	-	-
281	-	X	X	X	X	-
301	X	X	-	-	X	-

X = Presente; - = Ausente

Pacientes diagnosticados com Intolerância a Glicose (IGT).

<b>IGT – Intervenção dietética (Grupo ID)</b>						
<b>Código dos pacientes</b>	<b>Tempo basal</b>			<b>Tempo de intervenção</b>		
	<b>-30</b>	<b>-15</b>	<b>0</b>	<b>20</b>	<b>40</b>	<b>60</b>
<b>117</b>	-	-	X	X	X	X
<b>133</b>	-	X	-	-	-	-
<b>284</b>	-	-	-	X	-	-
<b>288</b>	-	-	X	X	-	-
<b>289</b>	-	-	X	X	X	X
<b>309</b>	-	-	X	-	-	-

X = Presente; - = Ausente

<b>IGT – Erva-mate (Grupo IE)</b>						
<b>Código dos pacientes</b>	<b>Tempo basal</b>			<b>Tempo de intervenção</b>		
	<b>-30</b>	<b>-15</b>	<b>0</b>	<b>20</b>	<b>40</b>	<b>60</b>
<b>157</b>	X	X	X	X	X	X
<b>166</b>	X	X	X	X	X	X
<b>171</b>	X	X	X	X	-	-
<b>207</b>	-	X	X	X	-	-
<b>254</b>	-	-	-	-	X	-
<b>268</b>	-	X	-	X	-	-
<b>275</b>	-	-	X	-	-	-
<b>280</b>	-	-	X	X	X	-
<b>296</b>	X	X	X	-	-	-

X = Presente; - = Ausente

<b>IGT – Intervenção dietética + erva-mate (Grupo IDE)</b>						
<b>Código dos pacientes</b>	<b>Tempo basal</b>			<b>Tempo de intervenção</b>		
	<b>-30</b>	<b>-15</b>	<b>0</b>	<b>20</b>	<b>40</b>	<b>60</b>
<b>143</b>	X	X	X	X	X	X
<b>144</b>	X	-	X	-	X	X
<b>187</b>	-	X	-	-	-	-
<b>188</b>	-	X	X	X	X	X
<b>211</b>	X	X	X	-	X	-
<b>237</b>	-	X	-	-	-	-
<b>242</b>	-	X	-	X	-	-
<b>308</b>	-	-	X	-	-	-

X = Presente; - = Ausente