

METABOLÔMICA, UMA ABORDAGEM OTIMIZADA PARA EXPLORAÇÃO DA BIODIVERSIDADE BRASILEIRA: ESTADO DA ARTE, PERSPECTIVAS E DESAFIOS

Cristiano Soleo Funari, Ian Castro-Gamboa, Alberto José Cavalheiro e Vanderlan da Silva Bolzani*

Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, 14800-900 Araraquara – SP, Brasil

Recebido em 9/9/13; aceito em 8/10/13; publicado na web em 24/10/13

METABOLOMICS, AN OPTIMIZED APPROACH FOR THE RATIONAL EXPLOITATION OF BRAZILIAN BIODIVERSITY: STATE OF THE ART, NEW SCENARIOS, AND CHALLENGES. Brazilian biodiversity is a colossal source of secondary metabolites with remarkable structural features, which are valuable in further biodiscovery studies. In order to fully understand the relations and interactions of a living system with its surroundings, efforts in natural product chemistry are directed toward the challenge of detecting and identifying all the molecular components present in complex samples. It is plausible that this endeavor was born out of recent technological sophistication in secondary metabolite identification with sensitive spectroscopic instruments (MS and NMR) and higher resolving power of chromatographic systems, which allow a decrease in the amount of required sample and time to acquire data. Nevertheless, the escalation of data acquired in these analyses must be sorted with statistical and multi-way tools in order to select key information. Chromatography is also of paramount importance, more so when selected compounds need to be isolated for further investigation. However, in the course of pursuing a “greener” environment, new policies, with an aim to decrease the use of energy and solvents, are being developed and incorporated into analytical methods. Metabolomics could be an effective tool to answer questions on how living organisms in our huge biodiversity work and interact with their surroundings while also being strategic to the development of high value bio-derived products, such as phytotherapeutics and nutraceuticals. The incorporation of proper phytotherapeutics in the so-called Brazilian Unified Health System is considered an important factor for the urgent improvement and expansion of the Brazilian national health system. Furthermore, this approach could have a positive impact on the international interest toward scientific research developed in Brazil as well as the development of high value bio-derived products, which appear as an interesting economic opportunity in national and global markets. Thus, this study attempts to highlight the recent advances in analytical tools used in detection of secondary metabolites, which can be useful as bioproducts. It also emphasizes the potential avenues to be explored in Brazilian biodiversity, known for its rich chemical diversity.

Keywords: biodiscovery; metabolite profile; analytical techniques.

INTRODUÇÃO

Esta revisão temática objetiva contribuir para a realização de um “Censo da Química no País” a partir da reflexão e da discussão acerca da área de Química no Brasil, sem, contudo, perder a perspectiva do mundo globalizado em que vivemos, como proposto pela diretoria da Sociedade Brasileira de Química.¹ Focaremos a nossa discussão na área da Química de Produtos Naturais, mais especificamente refletindo em como esta pode contribuir para a solução dos desafios brasileiros da atualidade,¹ tais como: (i) o de melhoria e de ampliação do sistema nacional de saúde, cujo modelo atual é considerado muito oneroso ao País e insuficiente para atender aos aproximadamente 200 milhões de brasileiros, heterogeneamente distribuídos em seu território, (ii) o de formação de recursos humanos com concepção de conhecimento integrado, uma vez que a busca de soluções por meio de abordagens reducionistas vem mostrando-se ineficiente, (iii) o de entender melhor os elementos da biodiversidade brasileira, uma vez que esta compreensão é de suma importância para se criar programas estratégicos de conservação, e desenvolvimento sustentável, (iv) o de direcionar o conhecimento científico armazenado sobre os produtos naturais no país para a pesquisa de desenvolvimento inovação, visando identificar produtos da nossa biodiversidade de alto valor agregado de interesse do setor industrial, e (v) o de melhorar a divulgação e o impacto dos resultados da investigação científica desenvolvida no Brasil no

exterior, contribuindo, assim, para uma ciência nacional impactante além de nossas fronteiras geográficas.

Os produtos naturais, mais especificamente os metabólitos secundários, notabilizados pela diversidade de tipos estruturais complexos, são substâncias essenciais ao desenvolvimento, regulação, equilíbrio e defesa dos organismos que os contêm. São também de grande utilidade para a espécie humana como fármacos, alimentos, fragrâncias, cosméticos e agroquímicos.²⁻⁶

Não obstante a tradição reportada às plantas úteis e aos produtos naturais, dados recentes sobre a descoberta e desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos a partir de plantas demonstram um acentuado declínio no interesse do setor farmacêutico por estas.² Todavia, a biodiversidade continua sendo uma fonte inigualável de substâncias com grande diversidade funcional e estrutural, portanto, de grande utilidade para a descoberta de novos fármacos e outros bioproductos.³

Outro dado a ressaltar é que os produtos naturais descritos até hoje foram isolados ou registrados a partir de menos de 10% da biodiversidade do mundo, sendo que para os relatos de atividades biológicas e/ou farmacológicas essa parcela é ainda menor. Este fato é em parte resultante do processo de biodescoberta e das estratégias experimentais usadas para este fim, ou seja, de como acessar essas bibliotecas naturais e identificar, numa quantidade enorme de substâncias naturais, aquelas biologicamente ativas de interesse medicinal ou outro qualquer.^{4,7,8}

O conhecimento sobre aspectos da biodiversidade brasileira vem evoluindo a passos largos. Especialmente a química de produtos

*e-mail: bolzaniv@iq.unesp.br

naturais, por ser uma área consolidada no país, pode contribuir para o desenvolvimento tecnológico nacional de maneira significativa. O quinto barômetro de biodiversidade da *Union Ethical BioTrade* (UEBT), realizado com apoio de importantes empresas e instituições nacionais e multinacionais, como Natura, Native, Aldivia, L'Oreal, Symrise, BMZ, Giz, IFC e Bayer, demonstra que 62% dos consumidores mundiais são sensíveis aos produtos oriundos da biodiversidade e que no Brasil esta consciência é ainda mais acentuada do que nos outros países pesquisados (EUA, Inglaterra, Suíça, França, Alemanha, China, Coreia do Sul, Japão, Índia e Peru).⁹ Nas economias emergentes, e em especial no Brasil, produtos da biodiversidade se apresentam como alternativas vantajosas de inovação.¹⁰ O Brasil de hoje é inovador em vários aspectos, conta com uma massa crítica de pesquisadores e um setor industrial apto aos desafios de pesquisa e desenvolvimento (P&D). A nossa biodiversidade é ainda pouco explorada e seu uso racional, se estruturado em pesquisa multidisciplinar e desenvolvimento tecnológico inovador, trará grande benefício econômico e social ao país.

Evidentemente, não é uma tarefa trivial e ainda temos um longo caminho a percorrer no que se refere à descoberta, industrialização e comercialização de produtos inovadores derivados da nossa biodiversidade. Aqui, é inevitável uma comparação com os países centrais, onde a inovação tecnológica tem como base um sistema de educação sólido, a geração de ciência de fronteira e um setor industrial apto a absorver esse conhecimento e transformá-lo em produtos úteis à sociedade. Esse modelo, consolidado desde o século XX, exige ação constante do Estado, das organizações empresariais, sociais e dos cidadãos, de modo a permitir uma colaboração duradoura entre o avanço científico e tecnológico, essencial para a geração de produtos inovadores e riqueza econômica.

Nas últimas décadas, a química de produtos naturais dita tradicional ou clássica vem sendo profundamente modificada. Isso deve-se, em parte, ao processo de descoberta de fármacos baseados em alvo molecular, os quais empregam grandes coleções de compostos naturais, sintéticos e seus derivados obtidos por química combinatória para se chegar aos *hits* (substâncias candidatas a princípio ativo) e *leads* (substâncias potencialmente candidatas a princípios ativos para o desenvolvimento de fármacos).¹¹ Com isto, o tempo necessário para o desenvolvimento de um produto farmacêutico e outros de interesse econômico, a partir de um extrato ou fração, é um processo ainda muito longo. Nos dias atuais, o tempo deste processo vem sendo significativamente reduzido pelo uso de tecnologias de triagem de alto desempenho (HTS, do inglês *High Throughput Screening*) usuais em grandes programas internacionais. Mesmo assim, o desafio ainda persiste na disponibilidade de grandes bibliotecas de substâncias para serem testadas. As bibliotecas de milhares de compostos obtidos por química combinatória foram bastante priorizadas nestes programas e, de certa forma, colocaram os produtos naturais em plano secundário nos grandes programas de biodescoberta, feitos por grandes empresas multinacionais no passado. Não obstante os altos investimentos nas estratégias HTS a partir dos anos 1980, esses esforços resultaram em apenas um fármaco, o inibidor de quinase registrado como sorafenidib (Nexavar®), aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) em 2005 para o tratamento de carcinoma renal.^{11,12}

Por outro lado, neste mesmo período a busca por novos modelos moleculares a partir da biodiversidade (terrestre ou marinha) por meio do fracionamento guiado de extratos ativos mencionados acima também foi considerada pouco produtiva. Até recentemente, muitos métodos de fracionamento e purificação de produtos naturais presentes num extrato constituído por centenas de substâncias, além de pouco sensíveis, frequentemente resultavam em substâncias já conhecidas, presentes em várias espécies ou gêneros.¹³ Estima-se que são necessários cerca de US\$ 50,000 e de três meses de trabalho

para isolar e identificar um composto inédito ativo a partir de uma espécie ou de um organismo.¹⁴ Portanto, métodos analíticos avançados capazes de mapear e identificar substâncias bioativas novas em quantidades mínimas de extrato, sem a necessidade de fracionamento e isolamento trabalhosos e custosos, são extremamente importantes desde o início da pesquisa de biodescoberta. As abordagens modernas permitem a seleção dos extratos potencialmente promissores para estudos adicionais de validação de atividade e de isolamento dirigido para as substâncias ativas de interesse, agilizando o processo de desenvolvimento de novos produtos.

DISCUSSÃO

Biologia Sistemática (*System Biology*) é a denominação dada para a pesquisa que utiliza conhecimentos multidisciplinares, tais como aqueles relacionados a biologia, matemática, engenharia, ciência da computação, física, química, e até mesmo a linguística, de forma integrada. O objetivo de tal abordagem é compreender os sistemas biológicos complexos, sinalizando um avanço no estudo dos organismos vivos dentro de uma visão holística em vez da reducionista. A abordagem reducionista, via de regra, é a mais usual na pesquisa sobre a farmacologia e toxicologia (baseada na pesquisa da eficácia de um determinada substância, sintética ou obtida de uma fonte natural, num alvo específico). A abordagem holística tenta entender o sistema biológico como um todo (composição química, metabolismo e funções), a partir não apenas do estudo das partes, mas principalmente das inter-relações entre elas que resultam no funcionamento dos organismos. Acredita-se que partindo deste princípio seja possível dar um passo adiante na pesquisa por novos medicamentos, onde a ação do protótipo ou do fármaco no sistema biológico é multifatorial. Aqui, as chamadas ciências ômicas, que buscam a caracterização e a quantificação coletiva de conjuntos de moléculas biológicas, tais como a genômica, a transcriptômica, a proteômica e a metabolômica, desempenham um papel central neste processo de conhecimento integrado dos organismos.

Focaremos a discussão a seguir em metabolômica (termo usado para definir o conjunto de dados qualitativos e quantitativos sobre todos os metabólitos secundários de uma determinada matriz de origem biológica), que é considerada uma das mais avançadas abordagens sobre o mapeamento químico de um organismo da biodiversidade.

A metabolômica é um enfoque muito versátil, podendo ser utilizada em diferentes tipos de estudos, tais como na investigação de alterações metabólicas de um organismo em resposta ao estresse induzido por agentes físicos (luz UV, calor, desidratação, etc.), químicos (como fármacos e agroquímicos) ou biológicos (patógenos ou outros). Nesses casos, a identificação do subconjunto de metabólitos que caracteriza a diferença entre as amostras obtidas em condições ecofisiológicas diferentes é priorizada. Pesquisas com esse enfoque vêm sendo aplicadas em vários estudos de plantas: caracterização de mutantes, relações taxonômicas e ecológicas, quimiosistemática, avaliação e comparação de plantas geneticamente modificadas, dentre outros.^{15,16} É, portanto, uma estratégia bastante útil também para a investigação metabólica de variedades vegetais de interesse agrícola e para o controle de qualidade de produtos naturais para consumo humano, cujas legislações tendem a ficar cada vez mais restritivas mundialmente, tais como fitoterápicos, suplementos alimentares e cosmecêuticos. Devido a esta ampla gama de aplicações, a metabolômica vem crescendo exponencialmente nas pesquisas que envolvem a química de produtos naturais, a julgar pelo incremento no número de publicações observado nessa área.¹⁷

Os estudos metabolômicos são realizados fundamentalmente a partir de análises comparativas sobre os perfis metabólicos individuais obtidos para as diferentes amostras. Um perfil metabólico

pode ser definido como um conjunto de sinais cromatográficos e/ou espectroscópicos adquiridos para uma amostra complexa de extratos vegetais, animais e microorganismos, de fluidos biológicos (urina, sangue, plasma, etc.) obtidos a partir de métodos analíticos que revelem todas as características químicas inerentes a determinados padrões funcionais e estruturais das classes de produtos naturais analisadas. Esse conjunto de informações analíticas é interpretado e deve refletir todos os metabólitos secundários detectáveis e presentes na amostra em estudo.^{15,18,19}

O estudo metabolômico aplicado à bioprospecção pode ser feito em duas etapas. A primeira envolve o cruzamento de informações relativas aos perfis metabólicos dos extratos investigados e das atividades biológicas observadas para estes. Havendo diferenças de atividades biológicas entre amostras, a segunda etapa envolve análises metabólicas mais detalhadas. Nesta fase, as técnicas de separação acopladas às espectrométricas de alto desempenho (essas técnicas serão discutidas mais adiante neste manuscrito), são realizadas para a obtenção das informações quali- e quantitativas sobre a maior quantidade possível de constituintes de cada amostra. Por exemplo, a comparação simples entre um extrato ativo e um extrato inativo pode indicar os metabólitos essenciais à atividade observada para o primeiro (aqueles associados aos sinais espectrométricos e/ou cromatográficos observados apenas na amostra ativa). Se a comparação envolver muitos extratos ativos e inativos em um ensaio específico, a possibilidade de localizar com mais precisão os compostos candidatos a princípios ativos (*hits*) aumenta significativamente, o que agiliza a pesquisa de descoberta de ativos da biodiversidade.

O mapeamento completo da constituição metabólica de uma espécie exige, necessariamente, o uso de instrumentos e de técnicas analíticas avançadas de alto desempenho, pois o número de compostos micromoleculares em um extrato à base de plantas ou de outros materiais de origem biológica pode chegar a milhares. Por isso, o acoplamento de uma técnica que leve à separação dos constituintes de uma amostra com uma ou mais técnicas espectroscópicas que deem informações sobre a estrutura destes constituintes é frequentemente utilizado para o estabelecimento dos perfis metabólicos de amostras.

Dentre as técnicas de separação mencionadas destacam-se a cromatografia gasosa de alta resolução (HRGC) e a cromatografia líquida (LC) de alta e de ultra-alta eficiência (HPLC e UHPLC, respectivamente), sendo as duas últimas as mais aplicadas em estudos metabolômicos por serem adequadamente compatíveis com qualquer tipo de analito. Mesmo possuindo algumas vantagens, como colunas com elevada capacidade de picos e não utilizar solventes, a HRGC exige compostos volatilizáveis e termoestáveis a aproximadamente 350 °C. Além disso, HPLC e UHPLC são instrumentos de fácil manuseio, podem ser totalmente automatizados e exibem boa resolução, reprodutibilidade e seletividade.^{15,20-22} Apesar dos recentes avanços tecnológicos em colunas cromatográficas e fases estacionárias em LC (geração de colunas com menos de 2 µm de diâmetro, totalmente porosas ou com superfícies porosas e centros compactos, com altura de pratos teóricos da ordem de 3.4-3.5 µm) e em instrumentação (equipamentos comerciais de última geração operando a pressões de até 1200 bar), incluindo os sistemas multi-dimensionais (2D-LC), ainda pode ocorrer co-eluição de um número significativo de substâncias na análise de uma amostra complexa devido às limitações em capacidade de picos e tempo de análise.^{18,19,23,24} Além disso, o impacto causado pelo descarte dos solventes também é apontado como uma grande desvantagem da LC. Estima-se que cerca de 34 milhões de litros de efluentes são gerados anualmente, no mundo, pelas análises feitas por HPLC, sendo os solventes nocivos acetonitrila (MeCN) e metanol (MeOH) notadamente os mais usados em tais análises.^{25,26} Mesmo com evidências de que o contato frequente com solventes nocivos pode afetar negativamente a saúde dos analistas, assim como

o ecossistema de onde as análises são efetuadas, até agora poucos esforços foram dirigidos pelos especialistas em cromatografia líquida para substituir ou eliminar os solventes usuais utilizados nesta técnica, por outros menos tóxicos ou pelos preferencialmente limpos.^{25,27-31} Para atenuar o problema ambiental, a redução do consumo de solventes por meio da miniaturização dos cromatógrafos e, principalmente, das colunas são alternativas apropriadas. Com relação à escolha de um solvente menos danoso ao meio ambiente, etanol (EtOH) é vantajoso para utilização nas fases móveis e na preparação de amostras. É um produto biodegradável, não tóxico e pode ser obtido a partir de recursos renováveis por fermentação. Adicionalmente, o EtOH apresentando propriedades solventes e cromatográficas similares ao MeOH, pode ser um substituto altamente benéfico.^{24,25,32,33} O Brasil, sendo o maior produtor de etanol do mundo a partir de cana-de-açúcar, pode sair na dianteira viabilizando o uso corriqueiro deste solvente em análises por LC.

O nosso grupo de pesquisa, o Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais (NuBBE), vem desenvolvendo estratégias para a substituição de solventes nocivos nas investigações sobre produtos naturais da biodiversidade brasileira por LC. O uso de “solventes verdes” estão sendo priorizados nas análises de rotina do laboratório visando estabelecer as “impressões digitais” cromatográficas de inúmeras amostras de plantas. Tal enfoque é particularmente útil para análise de plantas medicinais devido ao programa criado pelo Ministério da Saúde para viabilizar o uso de fitoterápicos pelo Sistema Único de Saúde (SUS),³⁴⁻³⁶ e atender aos regulamentos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para o seguro de fitoterápicos. Além disso, uma estratégia geral para a otimização de métodos menos impactantes para fins de impressão digital de amostras complexas vem sendo realizadas.³⁵⁻³⁶

Já entre as técnicas espectrométricas, a espectrofotometria no ultravioleta-visível com arranjo de diodos (DAD-UV/Vis), a espectrometria de massas de alta resolução (HRMS) e a ressonância magnética nuclear (NMR 1D e 2D) destacam-se para a obtenção de perfis metabólicos de amostras complexas.^{15,37} Detectores DAD-UV/Vis são os mais comumente acoplados a HPLC e UHPLC, pois apresentam alta sensibilidade e boa linearidade e são técnicas relativamente insensíveis a mudanças no fluxo e na temperatura da fase móvel. Portanto, bastante confiáveis, fáceis de operar e podem prover informações estruturais sobre os constituintes da amostra se detectores com arranjo de diodos forem utilizados. No entanto, só os analitos que absorvem na região UV/Visível são detectados. Já o uso da NMR vem crescendo exponencialmente nos últimos anos devido a sua robustez e alta sensibilidade na quantificação dos núcleos orgânicos ativos mais populosos: ¹H, ¹³C, ¹⁵N, ³¹P. Seu uso pode ser feito a partir de hifenação com LC em fluxo contínuo (*on-flow*) para determinação dos constituintes majoritários, ou por coleta de frações em micro colunas de extração de fase sólida (SPE) permitindo a realização de espectros bidimensionais (*off-line*) e a detecção dos compostos minoritários. Além disto, por meio do uso de sequências de pulso adequadas, é possível a detecção *in situ* de compostos conhecidos por meio da obtenção de espectros de NMR de moléculas individuais em mistura sem haver a necessidade de separação.³⁷ No entanto, além dos problemas inerentes da técnica, em especial aqueles dos isótopos menos abundantes como o ¹³C, a sobreposição dos sinais em espectros de alta complexidade continua sendo um desafio. A incorporação de experimentos bidimensionais ou *n*-dimensionais é uma alternativa interessante para vencer esse obstáculo, assim como o uso de ferramentas estatísticas comentadas mais adiante neste manuscrito.³⁸ No entanto, de acordo com publicação recente, a combinação de UHPLC acoplada à HRMS com ionização por *electrospray* e analisador por tempo de voo (ISE-ToF) e/ou a espectrometria de massas *tandem* (MSⁿ) é a abordagem que fornece, atualmente, a melhor relação

custo-benefício.¹⁵ A HRMS é uma técnica extremamente sensível, demandando quantidades mínimas de amostra, menor tempo de análise e menor custo instrumental, proporcionando um arsenal de informações valiosas quanto à estrutura dos metabólitos de interesse.¹⁵ Contudo, é importante ressaltar que os resultados adquiridos em um espectrômetro de massas específico dificilmente são reproduzidos em sua integridade em outro instrumento com as mesmas características (tipos de fonte de ionização e analisador, por exemplo). Por vezes, essa dificuldade em reprodutibilidade é observada até mesmo entre instrumentos do mesmo modelo e do mesmo fabricante. Em resumo, pode-se dizer que cada uma das técnicas analíticas acima descritas possui vantagens e limitações. Após a obtenção de dados de uma amostra por meio das técnicas de separação e espectrométricas, outras análises qualitativas mais robustas devem ser desenvolvidas, especialmente para evitar o trabalho sobre algumas matrizes com muitas informações já conhecidas, evitando assim desperdício de tempo e custo financeiro.

O alto custo e o tempo despendido para as análises de produtos naturais impulsionaram muitas pesquisas sobre a racionalização metodológica para tais fins. A definição de *desrepliação* (do inglês, *dereplication*, e que significa “não replicar”) foi introduzida na literatura científico-acadêmica no início dos anos 90, tendo sido definida como uma etapa crucial no processo de triagem de extratos a fim de evitar o isolamento e a determinação estrutural de substâncias já conhecidas por meio dos métodos convencionais.³⁹ Na verdade, trata-se de análise qualitativa em misturas complexas. As técnicas de *desrepliação* atualmente disponíveis utilizam plataformas acopladas, sendo, em sua maioria, compostas por um elemento de separação de alta eficiência acoplado a uma detector com capacidade de varredura espectrométrica.⁴⁰

Por exemplo, recentemente uma estratégia genérica de *desrepliação* de extratos de plantas foi proposta a partir de métodos desenvolvidos para se obter o perfil metabólico de dois extratos de *Lippia salvialifolia* (Verbenaceae) e do uso de informações disponíveis na literatura científica, por vezes subutilizadas.⁴¹ Neste estudo, as técnicas UHPLC-DAD-UV acopladas a espectrômetro de massas de alta resolução com analisador por tempo de voo (ToF) foram utilizadas para investigar quinze extratos de diferentes órgãos de plantas do gênero *Lippia*, levando à identificação de substâncias em todos os extratos pesquisados sem a necessidade de dispendiosos trabalhos de reisolamento. O uso de análise multivariada de dados permitiu, ainda, o agrupamento de amostras por semelhanças na produção de metabólitos especiais selecionados.⁴¹ Posteriormente, El-Elmat e colaboradores aplicaram semelhante estratégia para a *desrepliação* de extratos citotóxicos de fungos, porém utilizando UHPLC-DAD-UV acoplado a espectrômetro de massas de alta resolução com analisador do tipo armadilha de íons de Kingdon (Orbitrap), tendo identificado mais de 170 metabólitos.⁴²

A geração de muitos dados que podem ser coletados a partir do uso das técnicas analíticas modernas, em estudos metabolômicos exige, necessariamente, além da estratégia de *desrepliação* acima mencionada, a associação de técnicas e de abordagens estatísticas.^{37,43} Muitas vezes é necessário tratar os dados cromatográficos previamente, pois perfis metabólicos estão sujeitos a erros experimentais inerentes do método analítico que devem ser corrigidos antes da análise de dados. Quando, por exemplo, análises de perfis cromatográficos de metabólitos são replicadas observam-se variações nos tempos de retenção para um determinado pico. Essas variações podem ser causadas por erros experimentais, mas também pelo contínuo processo de envelhecimento da coluna cromatográfica.⁴³ Como técnicas quimiométricas costumam incluir cálculos matriciais, elas só funcionarão adequadamente quando o tempo de retenção de uma determinada substância for o mesmo nos diferentes cromatogramas.⁴³

Assim, uma correção deve ser realizada para alinhar os picos correspondentes, por meio das chamadas técnicas de deformação.⁴³ A partir do pré-tratamento dos dados, sejam aqueles obtidos por técnicas de separação e/ou espectroscópicas, técnicas quimiométricas capazes de selecionar informações relevantes poderão ser usadas para diferentes propósitos. Por exemplo, comparações de amostras para efeito de acesso de identidade podem ser feitas por meio de coeficientes de correlação ou calculando-se o grau de similaridade entre uma amostra e aquela de referência.⁴³ Já para estudos taxonômicos e de quimiossistemática, ou para correlacionar um perfil metabólico a uma determinada atividade biológica, a aplicação de técnicas quimiométricas de análise multivariada é recomendada.^{37,41,43} Elas permitem a classificação ou a formação de conglomerados de dados ou *clusters*, por meio da análise de componentes principais (PCA) ou de análise hierárquica de agrupamentos (HCA), *mínimos quadrados parciais* (PLS), análises discriminantes, análises de correlações, etc.^{37,43}

Cabe mencionar, ainda, que outro emprego crescente de um perfil metabólico envolve a avaliação de identidade e de qualidade dos materiais a base de plantas e de seus produtos derivados, como fitoterápicos, fitofármacos, suplementos alimentares, cosméticos, etc. O controle de matéria prima de origem vegetal nos dias atuais torna-se cada vez mais necessário, dado que as espécies, mesmo dentro de um mesmo grupo taxonômico ou afins, podem apresentar perfis metabólicos diferentes no que se refere a classes e também na concentração de tais metabólitos. O perfil metabólico característico de uma amostra é chamado de impressão digital ou *fingerprint*.^{15,20} Assim, o *fingerprint* (quali e/ou quantitativo) de uma amostra com as características desejadas pode ser utilizado como referência para, por exemplo, avaliar o controle de qualidade de extratos vegetais ou para verificação da estabilidade de produtos acabados, sendo uma estratégia recomendada pela Organização Mundial da Saúde para o controle de qualidade de produtos fitoterápicos.⁴⁴ O controle de qualidade de produtos bio-derivados para fins terapêuticos ganha cada vez mais força pelo entendimento de que a mera presença de um marcador (ou de um número de marcadores) em um produto ou matéria-prima com composição complexa não reflete necessariamente as suas propriedades biológicas totais. Estas podem estar fundamentadas em efeitos sinérgicos entre vários constituintes, em quantidades específicas (mesmo aqueles presentes em pequenas quantidades), atuando em diferentes receptores de um organismo (lembrando que as doenças são, dentro de uma visão mais holística, em geral, causa multifatorial).^{20,44}

CONCLUSÃO

O desafio de identificar todos os componentes em uma amostra complexa e de entender as suas inter-relações e interações em corpos vivos, seja no organismo que o produz, seja no organismo que o ingere, evidentemente persiste. Uma abordagem sistêmica em investigações científicas dessa natureza, bem como o desenvolvimento e o acesso a técnicas analíticas (incluindo quimiométricas) eficientes são mais que necessários, são exigências regulamentadas por leis, em países do mundo inteiro.

Devido ao aumento da preocupação e da regulamentação ambiental em diversos países, a inclusão de parâmetros ambientais nas rotinas de trabalho do investigador envolvido em tais desafios é uma tendência e vem influenciando desde o desenvolvimento de métodos até o de tecnologias e técnicas analíticas em geral.^{25,28,45} O consumo de energia e ou de solventes durante a análise, bem como no processo de preparo de amostras a serem investigadas, despertam a atenção de muitos pesquisadores, empresas e órgãos regulamentadores, que seguem em busca de alternativas menos impactantes e mais eficientes.^{26,35,36,45-47} Essa preocupação deve despertar especial atenção do

químico de produtos naturais, uma vez que a sua prática laboratorial pode, no limite, impactar diretamente sobre o meio-ambiente de onde obtém o seu objeto de estudo.³⁶

O uso de desreplicação e comparações de amostras em escala reduzida, como critério importante na decisão da escolha de alvos potencialmente inovadores em extrato complexos, é um caminho a ser priorizado. Aliado a isso, uma gama imensa de ensaios moleculares, que também demandem quantidades mínimas de extratos e substâncias, deve ser utilizada preferencialmente antes da decisão pelo isolamento de um composto alvo.

A abordagem metabômica para avaliar ativos da biodiversidade reforça a importância de pesquisa de vanguarda na área de produtos naturais, bem como do acesso a técnicas e instrumentação analíticas de última geração. Essas abordagens de prospecção molecular contribuirão para aumentar o impacto da pesquisa realizada por cientistas brasileiros na área de produtos naturais, bem como para alavancar o processo de inovação e o avanço tecnológico relacionados aos produtos da biodiversidade. Essa estratégia vai de encontro ao decreto presidencial no. 5.813, de 22 de junho de 2006, que instituiu a Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos como prioridade nacional. Os princípios norteadores do referido decreto enfatizam a necessidade do uso sustentável da biodiversidade brasileira, dado que plantas medicinais de uso tradicional selecionadas, com procedimentos de controle de qualidade bem estabelecidos e executados, poderiam ampliar o leque de opções terapêuticas e, assim, contribuir para a ampliação e melhoria do Sistema Único de Saúde (SUS). Esses esforços fortalecerão toda a cadeia de produção de fitoterápicos e de outros produtos derivados da biodiversidade com alto valor agregado, hoje um mercado substancial nos países centrais e com grande potencial de crescimento no Brasil.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Programa Biota-FAPESP), o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelos suportes financeiros, projetos SISBIOTA Brasil Edital MCT/CNPq/MMA/MEC/CAPES/FNDCT – Ação Transversal/FAPs Nº 47/2010 e FAPESP 2010/52327-5 e bolsas de produtividade em pesquisa para V. da S. Bolzani, I. Castro-Gamboa, A. J. Cavalheiro e pós-doutorado FAPESP para C. S. Funari (proc. FAPESP 2012/15844-7).

REFERÊNCIAS

- Pinto, A. C.; Zucco, C.; Galembeck, F.; de Andrade, J. B.; Vieira, P. C.; *Quim. Nova* **2012**, *35*, 2092.
- Mishra, B. B.; Tiwari, V. K.; *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 4769
- Cragg, G. M.; Newman, D. J.; *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1830*, 3670.
- Haefner, B.; *Drug Discovery Today* **2003**, *8*, 536.
- Butler, M. S.; *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 2141.
- Hicks, S.; *Desert Plants and People*, The Naylor Co.: San Antonio, 1966, cap. 1.
- Kinghorn, A. D.; Chin, Y. W.; Swanson, S. M.; *Curr. Opin. Drug Discovery Dev.* **2009**, *12*, 189.
- Kinghorn, A. D.; Pan, L.; Fletcher, J. N.; Chai, H.; *J. Nat. Prod.* **2011**, *74*, 1539.
- www.ethicalbiotrader.org, acessada em Agosto 2013.
- Funari, C. S.; Ferro, V. O.; *Rev. Bras. Farmacogn.* **2005**, *15*, 178.
- Ojima, I.; *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 2587.
- Newman, D. J.; *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 2589.
- Sashidhara, K. V.; Rosaiah, J. N.; *Nat. Prod. Commun.* **2007**, *2*, 193.
- Cordell, G. A.; Shin, Y. G.; *Pure Appl. Chem.* **1999**, *71*, 1089.
- Wolfender, J. L.; *Nat. Prod. Commun.* **2009**, *10*, 1417.
- Kim, H. K.; Choi, Y. H.; Verpoorte, R.; *Trends Biotechnol.* **2011**, *29*, 267.
- Last, R. L.; Jones, A. D.; Shachar-Hill, H.; *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, *8*, 167.
- Jiang, Y.; David, B.; Tu, P.; Barbin, Y.; *Anal. Chim. Acta* **2010**, *657*, 9.
- Cieřla, L.; *Chromatogr. Res. Int.* **2012**, *2012*, 1.
- Tistaert, C.; Dejaegher, B.; Vander Heyden, H.; *Anal. Chim. Acta* **2011**, *690*, 148.
- Shi, Y. H.; Xie, Z. Y.; Wang, R.; Huang, S. J.; Li, Y. M.; Wang, Z. T.; *Int. J. Mol. Sci.* **2012**, *13*, 9035.
- Zhong, X. K.; Li, D. C.; Jiang, J. G.; *Curr. Med. Chem.* **2009**, *16*, 3064.
- Gritti, F.; Guiochon, G.; *J. Chromatogr. A* **2012**, *1228*, 2.
- Sandra, P.; Vanhoenacker, G.; David, F.; Sandra, K.; Pereira, A. S.; *LC-GC Europe* **2010**, *23*, 242.
- Welch, C. J.; Wu, N.; Biba, M.; Hartman, R.; Brkovic, T.; Gong, X.; Helmy, R.; Schafer, W.; Cuff, J.; Pirezada, Z.; Zhou, Z.; *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2010**, *29*, 667.
- Gaber, Y.; Törnvall, U.; Kumar, M. A.; Ali Amin, M.; Hatti-Kaul, R.; *Green Chem.* **2011**, *13*, 2021.
- Welch, C. J.; Brkovic, T.; Schafer, W.; Gong, X.; *Green Chem.* **2009**, *11*, 1232.
- Kaljurand, M.; Koel, M.; Em *Challenges in Green Analytical Chemistry*; Guardia, M.; Garrigues, S., eds.; Royal Society of Chemistry: Cambridge, 2011, cap. 7.
- Pritchard, J. D.; *Health Protection Agency Compendium of Chemical Hazards: Methanol*, Public Health England, 2011.
- Fritz, R.; Ruth, W.; Kragl, U.; *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2009**, *23*, 2139.
- Henderson, R. K.; Jiménez-González, C.; Constable, D. J. C.; Alston, S. R.; Inglis, G. A.; Fisher, G.; Sherwood, J.; Binks, S. P.; Curzons, A. D.; *Green Chem.* **2011**, *13*, 854.
- Vitha, M.; Carr, P. W.; *J. Chromatogr. A* **2006**, *1126*, 143.
- Ribeiro, R. L. V.; Bottoli, C. B. G.; Collins, K. E.; Collins, C. H.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2004**, *15*, 300.
- Relação Nacional de Plantas Mediciniais de Interesse ao SUS*, Ministério da Saúde do Brasil DAF/SCTIE/MS: Brasília, 2009.
- Funari, C. S.; Carneiro, R. L.; Andrade, A. M.; Hilder, E. F.; Cavalheiro, A. J.; (2013), submitted.
- Funari, C. S.; Carneiro, R. L.; Andrade, A. M.; Hilder, E. F.; Cavalheiro, A. J.; *J. Sep. Sci.*, in press.
- Verpoorte, R.; Choi, Y. H.; Kim, H. K.; *Phytochem. Rev.* **2007**, *6*, 3.
- Bro, R.; *Tese de Doutorado*, University of Amsterdam, Holanda, 1998.
- Ng, J.; Bandeira, N.; Liu, W. T.; Ghassemian, M.; Simmons, T. L.; Gerwick, W. H.; Linington, R.; Dorrestein, P. C.; Pevzner, P. A.; *Nat. Methods* **2009**, *6*, 595.
- Konish, Y.; Kyota, T.; Draghici, C.; Gao, J. M.; Yeboah, F.; Acoca, S.; Jarussophon, S.; Purisima, E.; *Anal. Chem.* **2002**, *79*, 2521.
- Funari, C. S.; Eugster, P. J.; Martel, S.; Carrupt, P. A.; Wolfender, J. L.; Silva, D. H. S.; *J. Chromatogr. A* **2012**, *1259*, 167.
- El-Elimat, T.; Figueroa, M.; Ehrmann, B. M.; Cech, N. B.; Pearce C. J.; Oberlies, N. H.; *J. Nat. Prod.* (2013), dx.doi.org/10.1021/np4004307.
- Vander Heyden, Y.; *LC-GC Europe* **2008**, *21*, 438.
- Gao, H.; Wang, Z.; Li, Y.; Qian, Z.; *Front. Med.* **2011**, *5*, 195.
- Tobiszewski, M.; Mechlinska, M.; Namiesnik, J.; *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 2869.
- Dai, Y.; Spronsen, J.; Witkamp, G. J.; Verpoorte, R.; Choi, Y. H.; *Anal. Chim. Acta* **2013**, *766*, 61.
- Dai, Y.; Witkamp, G. J.; Verpoorte, R.; Choi, Y. H.; *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 6272.