

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE QUÍMICA

**DIFERENCIAÇÃO SEXUAL DE *Araucaria angustifolia* POR RMN
HR-MAS E ANÁLISE MULTIVARIADA**

Brenda Gomes Carvalho

Orientadora: Profa. Dra. Glaucia Braz Alcantara
Co-orientador: Prof. Dr. Luciano Morais Lião

Goiânia
2012



TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS (TEDE) NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: **Dissertação** **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor (a):	Brenda Gomes Carvalho		
E-mail:	brendagcarvalho@gmail.com		
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página?	<input checked="" type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	
Vínculo empregatício do autor	Servidora do Estado de Goiás		
Agência de fomento:		Sigla:	
País:		UF:	
		CNPJ:	
Título:	DIFERENCIAÇÃO SEXUAL DE <i>Araucaria angustifolia</i> POR RMN HR-MAS E ANÁLISE MULTIVARIADA		
Palavras-chave:	<i>Araucaria angustifolia</i> ; RMN HR – MAS; diferenciação sexual		
Título em outra língua:	Sexual differentiation of <i>Araucaria angustifolia</i> by HR – MAS NMR and multivariate analysis.		
Palavras-chave em outra língua:	<i>Araucaria angustifolia</i> ; HR-MAS NMR; sexual differentiation		
Área de concentração:	Química		
Data defesa: (dd/mm/aaaa)	19/12/2012		
Programa de Pós-Graduação:	Programa de Pós-Graduação em Química		
Orientador (a):	Glaucia Braz Alcantara		
E-mail:	glabraz@yahoo.com.br		
Co-orientador (a):*	Luciano Morais Lião		
E-mail:	lucianoliao@yahoo.com.br		

*Necessita do CPF quando não constar no SisPG

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

Assinatura do (a) autor (a)

Data: ____ / ____ / ____

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE QUÍMICA

**DIFERENCIAÇÃO SEXUAL DE *Araucaria angustifolia* POR RMN
HR-MAS E ANÁLISE MULTIVARIADA**

Brenda Gomes Carvalho

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás como exigência parcial, para obtenção do título de Mestre em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Gláucia Braz Alcantara
Co-orientador: Prof. Dr. Luciano Morais Lião

Goiânia
2012

Ficha catalográfica elaborada automaticamente
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob orientação do Sibi/UFG.

Carvalho, Brenda Gomes
DIFERENCIAÇÃO SEXUAL DE *Araucaria angustifolia* POR RMN HR
MAS E ANÁLISE MULTIVARIADA [manuscrito] / Brenda Gomes
Carvalho. - 2012.
viii, 59 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Gláucia Braz Alcantara; co-orientador Dr.
Luciano Morais Lião.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de
Química (IQ), Programa de Pós-Graduação em Química, Goiânia, 2012.
Bibliografia.
Inclui siglas, abreviaturas, símbolos, tabelas, lista de figuras, lista de
tabelas.

1. *Araucaria angustifolia*. 2. RMN HR-MAS. 3. Diferenciação sexual. I.
Alcantara, Gláucia Braz, orient. II. Lião, Luciano Morais, co-orient. III.
Título.

Dedico esse trabalho a duas pessoas fundamentais para a conclusão desta etapa: Tiago, meu amor, melhor amigo e grande apoiador em tudo que eu me proponho a fazer; e Marilisa, minha psicóloga, amiga e mestre de Reiki que me ajudou a encontrar meu centro mental, emocional e espiritual.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida e pela oportunidade de aprender, evoluir, e poder usar os conhecimentos adquiridos para fazer o bem. Pela força quando tudo parecia tão difícil. Por colocar na minha vida as pessoas certas para cada etapa.

Agradeço aos meus pais, Conceição e Sebastião, pelo amor, apoio e cuidado, e por estarem sempre presentes mesmo à distância. Às minhas irmãs Ariadne e Mirella pela amizade.

Agradeço ao Tiago, meu maior companheiro, por todo o amor e compreensão. Por ser meu porto seguro, a pessoa com quem eu sempre posso e poderei contar.

Agradeço à Profa. Dra. Glaucia Braz Alcantara por ser muito mais do que a melhor orientadora que eu poderia ter tido, mas por ser também amiga, parceira, e acima de tudo um modelo como pessoa e profissional. Alguém que enxerga o ser humano por trás do aluno.

Ao Prof. Dr. Luciano Morais Lião pela compreensão com meus horários restritos e minha ausência no laboratório, e pela disposição interminável em ajudar seus alunos.

Ao Prof. Dr. Andersson Barison por fornecer as amostras usadas neste trabalho, e por suas contribuições durante seu desenvolvimento.

A todos os colegas do Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear pelas grandes contribuições para minha formação e para o desenvolvimento do meu trabalho. Ao Mábio Santana pelo auxílio sempre que solicitado. Aos

colegas Bruno César Barbosa Martinelli, Caroline Silva Oliveira e Igor Savioli Flores, companheiros de HR-MAS, pela troca de idéias e experiências. Agradeço de forma especial ao Bruno Martinelli que estava sempre pronto a me ajudar independente da hora, dia, noite, madrugada, finais de semana ou feriado.

Ao amigo Rodrigo Tanaka por me lembrar, sempre que eu reclamava do cansaço, que tudo valeria a pena, porque logo eu seria Mestre.

Aos amigos Dayanne Batista e Leonardo Lacerda Galler que mesmo à distância sempre torceram e se alegraram com as minhas conquistas.

À Marilisa Gualberto que vem me ajudando a encontrar o equilíbrio, e a levar a vida com mais leveza.

A todos os amigos e familiares que souberam entender minhas ausências, nervosismos e ansiedades.

À minha gerente Daniella Fabíola dos Santos, e a todos os colegas da equipe GVSAST-SUVISA por compreender e apoiar a realização do mestrado, mesmo que às vezes meu desempenho no trabalho ficasse comprometido.

Aos órgãos financiadores CT-INFRA/FINEP e CAPES pelas condições de realizar este trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	iv
LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS	v
LISTA DE SÍMBOLOS	vi
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
1 INTRODUÇÃO	01
1.1 <i>Araucaria angustifolia</i>	01
1.2 DIOICIA EM PLANTAS SUPERIORES	03
1.3 RMN E ANÁLISE METABOLÔMICA	07
2 OBJETIVOS	11
2.1 OBJETIVO GERAL	11
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
3 MATERIAIS E MÉTODOS	12
3.1 PREPARO DAS AMOSTRAS	12
3.1.1 PREPARO DO MATERIAL VEGETAL	14
3.1.2 PREPARO DO MATERIAL PARA A SONDA HR-MAS	14
3.2 AQUISIÇÃO DOS ESPECTROS	15
3.3 TRATAMENTO QUIMIOMÉTRICO	16
3.3.1 ANÁLISE EXPLORATÓRIA POR PONTO DE COLETA	16
3.3.2 CRIAÇÃO E VALIDAÇÃO DOS MODELOS	16
3.3.3 TESTE DE CLASSIFICAÇÃO DE AMOSTRAS COM	

SEXO DEFINIDO ENTRE GRUPOS	17
3.3.4 PREDIÇÃO DE ARAUCÁRIAS JOVENS COM SEXO INDEFINIDO	17
4 RESULTADOS	18
4.1 PERFIL ESPECTRAL DE RMN HR-MAS DE ¹ H	18
4.2 ANÁLISE QUIMIOMÉTRICA	26
4.2.1 ANÁLISE EXPLORATÓRIA POR PONTO DE COLETA	26
4.2.1.1 PONTO1 – AV. NOSSA SENHORA DA LUZ	26
4.2.1.2 PONTO 2 – PARQUE MUNICIPAL BARREIRINHA	32
4.2.1.3 PONTO 3 – ALMIRANTE TAMANDARÉ	36
4.2.1.4 PONTO4 – ZOOLOGICO DO PARQUE IGUAÇU	39
4.2.1.5 PONTO 5 – PIRAQUARA	45
4.2.2 RELAÇÃO ENTRE PONTOS DE COLETA E EXPRESSÃO SEXUAL DE ARAUCÁRIAS	48
4.2.3 PREDIÇÃO DAS AMOSTRAS COM ARAUCÁRIAS DE SEXO DEFINIDO ENTRE GRUPOS	50
4.2.4 PREDIÇÃO DE ARAUCÁRIAS JOVENS COM SEXO INDEFINIDO	52
5 CONCLUSÕES	58
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: <i>Araucaria angustifolia</i> ou pinheiro do Paraná.	2
Figura 1.2: a)Pinhão; b)Pinha	3
Figura 1.3: Estrutura reprodutiva feminina ou megatróbilos.	4
Figura 1.4: Estrutura reprodutiva masculina ou microtróbilos	4
Figura 3.1: Acessórios empregados na análise de RMN HR – MAS.	13
Figura 4.1: Espectros de RMN de ^1H de folhas de <i>A. angustifolia</i> utilizando a sequência de pulso CPMG.	19
Figura 4.2: Mapa de correlação direta ^1H - ^{13}C obtido através do experimento gHSQC utilizando a sonda HR-MAS.	21
Figura 4.3: Mapa de correlação a longa distância ^1H - ^1H obtido através do experimento TOCSY utilizando a sonda HR-MAS.	22
Figura 4.4: Mapa de correlação direta ^1H - ^{13}C obtido através do experimento gHSQC do extrato em “D ₂ O”, realizado com a sonda TBI 5mm.	23
Figura 4.5: Mapa de correlação a longa distância ^1H - ^{13}C obtido através do experimento gHMBC do extrato em “D ₂ O”, realizado com a sonda TBI 5mm.	24
Figura 4.6: Gráfico de escores da PCA das folhas de <i>A. angustifolia</i> macho (em azul) e fêmea (em preto) do Ponto 1, obtido a partir dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H .	27
Figura 4.7: Gráfico de <i>loadings</i> de PCA das folhas de <i>A. angustifolia</i> do Ponto 1, obtido a partir dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H .	28
Figura 4.8: Expansão dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H para a	

visualização das variações no deslocamento químico de alguns sinais.	29
Figura 4.9: a) Gráfico de escores da PCA das folhas de <i>A. angustifolia</i> do ponto 1 , macho (em azul) e fêmea (em preto); b) Gráfico de <i>loadings</i> da PCA das folhas de <i>A. angustifolia</i> do ponto 1, obtido a partir do pré-processamento centrado na média juntamente com o escalado pela variância.	30
Figura 4.10: Gráfico de escores da PCA das folhas de <i>A. angustifolia</i> macho (em azul) e fêmea (em preto) do Ponto 1, obtido a partir da região entre 3,43 e 3,49 ppm dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H .	32
Figura 4.11: Gráfico de escores de PCA das folhas de <i>A. angustifolia</i> do Ponto 2, macho (em azul) e fêmea (em preto), obtido a partir dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H .	33
Figura 4.12: Gráfico de influência (a) e <i>hotelling</i> (b) da PCA das folhas de <i>A. angustifolia</i> do Ponto 2, macho (em azul) e fêmea (em preto), obtido a partir dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H	34
Figura 4.13: Gráfico de <i>loadings</i> de PCA das folhas de <i>A. angustifolia</i> do Ponto 2, obtido a partir dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H .	35
Figura 4.14: Gráfico de escores da PCA das folhas de <i>A. angustifolia</i> macho (em azul) e fêmea (em preto) do Ponto 2, obtido a partir da região entre 3,43 e 3,49 ppm dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H .	36
Figura 4.15: a) Gráfico de escores da PCA das folhas de <i>A. angustifolia</i> do Ponto 3 , macho (em azul) e fêmea (em preto); b) Gráfico de <i>loadings</i> da PCA das folhas de <i>A. angustifolia</i> do Ponto 3, obtido a partir do pré-processamento centrado na média.	37
Figura 4.16: Gráfico de escores da PCA das folhas de <i>A. angustifolia</i> macho (em azul) e fêmea (em preto) do Ponto 3, obtido a partir da região entre 3,43 e 3,49 ppm dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H .	38
Figura 4.17: a) Gráfico de escores da PCA das folhas de <i>A. angustifolia</i> do Ponto 4 , macho (em azul) e fêmea (em preto); b) Gráfico de <i>loadings</i> da PCA das folhas de <i>A. angustifolia</i> do Ponto 4, obtido a partir do pré- processamento centrado na média.	40
Figura 4.18: a) Gráfico de escores da PCA das folhas de <i>A. angustifolia</i> do Ponto 4 , macho (em azul) e fêmea (em preto); b) Gráfico de <i>loadings</i> da PCA das folhas de <i>A. angustifolia</i> do Ponto 4, obtido a partir do pré-processamento autoescalado.	42
Figura 4.19: Gráfico de escores da PCA das folhas de <i>A. angustifolia</i> macho (em azul) e fêmea (em preto) do Ponto 4, obtido a partir da	

região entre 3,43 e 3,49 ppm dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H com pré-processamento centrado na média.	43
Figura 4.20: Gráfico de escores da PCA das folhas de <i>A. angustifolia</i> macho (em azul) e fêmea (em preto) do Ponto 4, obtido a partir da região entre 3,43 e 3,49 ppm dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H , com pré-processamento autoescalonado.	44
Figura 4.21: Gráfico de escores de PCA das folhas de <i>A. angustifolia</i> do Ponto 5, macho (em azul) e fêmea (em preto), obtido a partir dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H .	46
Figura 4.22: Gráfico de <i>loadings</i> de PCA das folhas de <i>A. angustifolia</i> do Ponto 5, obtido a partir dos espectros de RMN HR	47
Figura 4.23: Gráfico de escores da PCA das folhas de <i>A. angustifolia</i> macho (em azul) e fêmea (em preto) do Ponto 5, obtido a partir da região entre 3,43 e 3,49 ppm dos espectros de RMN HR	48
Figura 4.24: Comparação dos perfis metabólicos da árvore coletada na UFG e das árvores coletadas no Paraná.	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características dos locais de coleta e número de amostras de araucária analisadas.	13
Tabela 2: Teste de classificação de amostras com sexo conhecido entre grupos de diferentes pontos de coleta.	17
Tabela 3: Deslocamento químico de RMN de ^1H de compostos identificados nos espectros de folhas de araucária.	20
Tabela 4: Deslocamentos químicos de RMN do(s) composto(s) majoritário(s) não elucidado(s).	25
Tabela 5: Resultados do teste de classificação de amostras com sexo conhecido entre grupos de diferentes pontos de coleta, por KNN (K^{th} <i>Nearest Neighbor</i>).	51
Tabela 6: Predição do sexo de indivíduos jovens de araucária sem expressão sexual observável por KNN, nos cinco modelos criados.	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AQ	Tempo de Aquisição
CG	Cromatografia Gasosa
CL	Cromatografia Líquida
CPMG	<i>Carr-Purcell-Meiboom-Gill pulse sequence</i>
CPMGPR	<i>Carr-Purcell-Meiboom-Gill pulse sequence</i> com irradiação de onda contínua para pré-saturação do sinal do solvente
D1	Tempo de espera entre os ciclos de repetições da sequência de pulso
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EFS	Extração em Fase Sólida
EM	Espectrometria de Massas
FT-IR	Espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Fourier
gHSQC	<i>gradient Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
gTOCSY	<i>gradient Total Correlation Spectroscopy</i>
HR-MAS	<i>High Resolution Magic Angle Spinning</i>
Hz	Hertz
ITS2	<i>Internal Transcribed Spacer 2</i>
IUCN	União Internacional para a Conservação da Natureza e Recursos Naturais
KNN	<i>K-Nearest Neighbor</i>
LB	<i>line broadening</i> ; parâmetro utilizado na multiplicação exponencial
NS	Número de varreduras
PC1	Primeira componente principal
PC2	Segunda componente principal
PCA	Análise de componentes principais (<i>Principal Component Analysis</i>)
RAPD	<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SI	Número de pontos utilizados na construção dos espectros de RMN
SW	Janela espectral
TD	Número de pontos utilizados na aquisição dos espectros de RMN
TMSP-d4	2,2,3,3- <i>d</i> 4 3-(trimetilsilil)propionato de sódio

LISTA DE SÍMBOLOS

d	duplete
dd	duplo duplete
J	Constante de acoplamento
m	multiplete
s	simpleto
t	tripleto
δ	Deslocamento químico

RESUMO

Araucaria angustifolia é uma planta dióica, que se encontra ameaçada de extinção devido à sua extensiva exploração e às dificuldades de reflorestamento, relacionadas ao seu lento desenvolvimento e à inexistência de métodos para a determinação do sexo da planta antes de sua idade reprodutiva (15 a 20 anos). Através de análises de RMN HR-MAS de ^1H e análise multivariada foi possível propor um método para a predição do sexo da planta ainda jovem, através da avaliação do perfil metabólico de folhas *in natura*. Esta análise levou à identificação de regiões do espectro com maior influência na diferenciação entre machos e fêmeas, embora os metabólitos correspondentes não tenham sido elucidados.

ABSTRACT

Araucaria angustifolia is a dioecious plant, which is endangered due to their extensive exploitation and reforestation difficulties related to its slow development and lack of methods for determining the sex of the plant before its reproductive age (15 to 20 years). Through analysis of ^1H HR-MAS NMR and multivariate analysis was possible to propose a method to predict the sex of the plant still young, by assessing the metabolic profile of fresh leaves. This analysis led to the identification of regions of spectrum with higher influence on differentiation between males and females, although the corresponding metabolites have not been elucidated.

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Araucaria angustifolia*

Araucaria angustifolia (Bert.) O Kuntze (Figura 1.1) é uma conífera endêmica nas regiões sul e sudeste do Brasil (Yamaguchi & Kato, 2012), sendo juntamente com as espécies de *Podocarpus* as únicas gimnospermas nativas (Handro et al, 2003/4) no território brasileiro. Estudos evolucionários indicam que este gênero é o mais primitivo entre as coníferas, mostrando um padrão embriogenético que é diferente daquele conhecido para outras coníferas tais como *Pinus*, *Taxus* e *Sequóia* (Franco et al, 2005). É popularmente conhecida como “pinheiro do Paraná” ou “pinheiro brasileiro” (Simões et al, 2009) sendo a principal componente de uma floresta chamada “Mata de Araucárias” (Mascio et al, 2009).

Apesar de possuir um papel fundamental na elucidação de padrões de vegetação e de mudanças climáticas no hemisfério sul (Handro et al, 2003/4), e de ser reconhecida como uma espécie de grande importância econômica e ecológica (Simões et al, 2009), a fisiologia desta espécie é muito pouco conhecida. Os poucos estudos ecofisiológicos existentes para a araucária são focados em sua tolerância à sombra e no desenvolvimento de mudas sob condições controladas (Handro et al, 2003/4).

A araucária foi, durante anos, extensivamente explorada devido à boa qualidade de sua madeira, de modo que na década de 80 suas reservas naturais foram exauridas (Silva, 2001). Segundo Maak apud Silva* as reservas nativas que em 1968 eram estimadas em 21,6% da área do Estado de São Paulo, 36,67% da área do Estado do Paraná, 60,13% do estado de Santa Catarina e 17,38% do Estado do Rio Grande do Sul, foram reduzidas até 1980 a 4,3%, 3,2% e 1,4%, respectivamente das áreas dos Estados do

*MAACK, R. Banco de Desenvolvimento do Paraná / UFPR / Instituto de Biologia e Pesquisas Tecnológicas, 350 p. 1968.

Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Machado e Siqueira, 1980 apud Silva, 2001).



Figura 1.1 – *Araucaria angustifolia* ou pinheiro do Paraná (Fonte: Próprio autor, 2012).

Apesar da boa qualidade da madeira, a área reflorestada para essa espécie na região Sul era de 58.000 ha até 1978, área correspondente a 2,5% da área total reflorestada com outras espécies (Silva, 2001). Isso ocorre possivelmente devido a reflorestamentos insatisfatórios, relacionados à falta de conhecimento das exigências silviculturais da araucária e aos elevados custos iniciais, devido ao lento crescimento, o qual também está relacionado à má escolha do solo e às práticas culturais inadequadas (Silva, 2001).

Atualmente a araucária é classificada como espécie criticamente ameaçada na Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da União Internacional para a Conservação da Natureza e Recursos Naturais (*IUCN* em inglês)

devido à intensa exploração de sua madeira e ao grande consumo de suas sementes (Simões et al, 2009), as quais são popularmente conhecidas como “pinhão” (Figura 1.2). Além disso, diferentes partes da árvore são usadas na medicina popular brasileira. Tinturas dos nodos são tradicionalmente usadas oralmente ou topicamente para o tratamento de reumatismo. Infusões dos nodos são usadas oralmente para tratar doenças renais e sexualmente transmissíveis. Infusões das cascas são usadas topicamente para tratar tensões musculares e varizes. O xarope produzido com a resina é usado para o tratamento de infecções do trato respiratório. Infusões das folhas são usadas para tratar escrófula, fadiga, e anemia. Tinturas das folhas são usadas para pele ressecada, feridas e herpes (Simões et al, 2009).



Figura 1.2 – a)Pinhão; b) Pinhão na pinha.

1.2 DIOICIA EM PLANTAS SUPERIORES

As plantas podem se reproduzir de forma assexuada ou sexuada. Na reprodução assexuada ou vegetativa, novas plantas são formadas através de órgãos vegetativos especializados, tais como raízes, tubérculos, rizomas, entre outros. Já a reprodução sexuada se dá através da fusão de gametas (gerados através do processo de meiose) que irão originar um embrião, e posteriormente a semente.

As plantas que se reproduzem de forma sexuada podem ser classificadas em autógamias, intermediárias ou alógamas. Plantas autógamias são aquelas em que a autofecundação ocorre preferencialmente (acima de 95%), como para o feijão, soja e tomate. Plantas intermediárias são aquelas que possuem a porcentagem de fecundação cruzada entre 5 e 95%, sendo

exemplos desse tipo de planta o algodão e o café. Já as plantas alógamas são aquelas em que a polinização cruzada ocorre majoritariamente (acima de 95%).

As plantas alógamas podem ser divididas em três grupos de acordo com o tipo de flor que possuem. A flor pode ser hermafrodita, como ocorre no abacate e no maracujá; pode ser monóica apresentando flores unissexuais masculinas e femininas no mesmo indivíduo, como no milho e na seringueira; e pode ser dióica, com flores masculinas e femininas em indivíduos distintos como no mamão, kiwi e erva-mate (Bespalhok, Guerra e Oliveira, 2007).

A dioicia é considerada um mecanismo extremo para evitar a autofecundação (Souza, 2010), visto que isso pode maximizar a expressão de genes recessivos e causar a diminuição da variabilidade genética em uma população de plantas.

A araucária é uma planta dióica, que pode ser monóica em função de traumas e doenças (Murakami, 2002). Em suas árvores femininas são produzidos os cones, pinhas ou megatróbilos (Figura 1.3), onde estão contidos os gametófitos femininos. Nas árvores masculinas as flores são chamadas de amentilhos ou microtróbilos (Figura 1.4), e neles estão os grãos de pólen, que são os gametófitos masculinos (Bandel & Gurgel, 1967).



Figura 1.3 – Estrutura reprodutiva feminina ou megatróbilos.



Figura 1.4 – Estrutura reprodutiva masculina ou microtróbilos.

Após a fecundação, o período para a formação do tubo polínico no megastrobilo pode levar até dois anos e oito meses de acordo com Koscinski (1934), Shymoiá (1962) e Bandel (1966) apud Bandel*, 1967. E ainda o tempo para que as árvores atinjam a maturidade sexual e comecem a produzir frutos é de 15 a 20 anos de idade, quando já atingem entre 10 e 15 metros de altura. Essas características reprodutivas revelam alguns dos motivos pelos quais o reflorestamento desta espécie é bastante difícil e porque houve uma diminuição tão significativa das populações naturais de *A. angustifolia*.

A problemática do reflorestamento da Mata de Araucárias também encontra barreiras devido à falta de métodos para determinação do sexo da árvore antes que ela entre em idade reprodutiva. Esse é um problema duplo visto que, uma vez plantada, se não existirem árvores de ambos os sexos próximas entre si, a fecundação da espécie, a qual é polinizada principalmente pelo vento (dispersão anemofílica), pode não ocorrer (Souza, 2010).

Na década de 1960, enquanto faziam um levantamento da proporção do sexo em populações naturais de araucária, Bandel e Gurgel testaram hipóteses baseadas na forma e densidade da copa das árvores, e no sentido da rotação das acículas nos galhos para fazer a diferenciação sexual através de características morfológicas. No entanto, nenhuma dessas hipóteses se mostrou eficiente, sendo a determinação do sexo feita exclusivamente pela visualização dos órgãos florais. Esse levantamento mostrou um ligeiro excesso de machos em relação às fêmeas, 52,4 e 47,6% respectivamente (Bandel & Gurgel 1967).

Outros pesquisadores também tentaram fazer correlação entre o sexo da árvore e características como a densidade da madeira (Banzatto et al., 1968; Amaral et al., 1971) e a taxa de crescimento da árvore (Pinto, 1979), porém essas características eram independentes da dioicéia.

Bandel, G. **O Pinheiro Brasileiro, *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze.** Piracicaba. São Paulo. Edição do autor, 68p, 1966.

Koscinski, M. **O pinheiro brasileiro na Silvicultura Paulista.** São Paulo. Secretaria da Agricultura. Diretoria de Publicidade Agrícola, 56p, 1934.

Shymoiá, C. **Contribuição ao Estudo do Ciclo Biológico da *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze.**In: - *Experientiae*, v.2, n.2, p. 519-540, 1962.

Bandel (1970) estudou a cariótipo de duas espécies de araucária e verificou que ambas apresentam 13 pares de cromossomos ($n=13$), e em nenhuma delas foi possível observar os possíveis cromossomos sexuais ou identificar alguma estrutura cromossômica para a distinção do sexo.

Baseando-se em características fisiológicas, vários autores (Durand, 1984; Tanurdzic e Banks, 2004; Vyskot e Hobza, 2004) concordam que os agentes de expressão sexual são os reguladores de crescimento, e que hormônios vegetais como auxinas, giberelinas, citocininas, entre outros, podem modular o sexo em muitas plantas monóicas e dióicas das mais variadas maneiras em diferentes espécies (Vyskot e Hobza, 2004). No entanto, a literatura mostra a inexistência de hormônios sexuais específicos, uma vez que o mesmo hormônio pode induzir feminilização em uma espécie e masculinização em outra (Durand, 1984).

Murakami (2002) cita os trabalhos de Lloyd e Webb (1977), e Salisbury e Ross (1969), que postularam que o sexo de populações de angiospermas dióicas seria determinado através do balanço entre auxina e giberelina durante a diferenciação do botão floral, sendo que uma maior quantidade de giberelina indicaria uma tendência de formação de plantas masculinas. No entanto, Murakami (2002) pondera que este método não teria aplicação prática para a araucária visto que é dependente do início da floração, e descartaria a necessidade de métodos indiretos para a determinação do sexo da planta.

Considerando que, de acordo com Durand e Durand (1984), a diferenciação sexual em plantas superiores ocorre no momento da fecundação, é possível assumir que existam cromossomos sexuais em *A. angustifolia*, apesar de até o momento eles não terem sido identificados (Bandel, 1970).

Seguindo esse raciocínio, Murakami (2002) utilizou a técnica de marcadores moleculares do tipo RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) para identificar genes ou sequências de pares de base que estão ligados à

Lloyd, D. G., Webb, C. J. Secondary sex characters in plants. *The Botanical Review*, v. 43, n. 2, 1977.

Salisbury, F. B., Ross, C. *Plant Physiology*. Belmont, Califórnia, Wadsworth Publishing Company, 747 p, 1969.

determinação do sexo. Esta técnica já permitiu a determinação de um fragmento específico de DNA de plantas masculinas em *Atriplex garrettii* (Chenopodiaceae), uma espécie dióica e diplóide, na qual não foram detectados cromossomos sexuais heteromórficos através de análises citogenéticas. Todavia, para a araucária, não foi possível confirmar a presença de marcadores moleculares do tipo RAPD, concluindo-se que a(s) região(ões) do genoma envolvido(s) na determinação do sexo não é muito grande e, provavelmente, um único ou poucos genes estão envolvidos na expressão sexual; ou ainda o gene responsável pelo controle da expressão sexual está presente em uma região genômica não muito frequente em eventos de recombinação (Murakami, 2002).

1.3 RMN E ANÁLISE METABOLÔMICA.

O campo de estudo conhecido como “metabolômica” é uma área considerada emergente, e que possui como objetivo caracterizar completamente pequenas moléculas, os chamados metabólitos, presentes em sistemas biológicos (Creek, 2011).

O termo tem sido usado para descrever análises em que é possível fazer uma observação abrangente dos metabólitos presentes em uma amostra, a fim de identificar e caracterizar completamente as moléculas de baixo peso molecular existentes em células, tecidos e organismos como um todo (Wen, 2009; Kim, 2009).

Esse tipo de análise tem a propriedade de capturar a situação metabólica do organismo em um dado instante de modo que a análise de várias amostras pode fornecer informações sobre metabólitos característicos de uma espécie ou cultivar, um determinado estágio de desenvolvimento ou condições, tais como doenças, estresse, ou mudanças diárias e sazonais (Kim, 2011)

Na literatura são encontrados diversos trabalhos sobre análise metabolômica, e as principais técnicas analíticas utilizadas para esse fim são Espectrometria de Massas (EM) e a Ressonância Magnética Nuclear (RMN), devido principalmente à sua boa reprodutibilidade. EM e RMN também podem

ser acopladas a técnicas de separação cromatográfica para aumentar a resolução, tais como Cromatografia Líquida (CL), Cromatografia Gasosa (CG) e Extração em Fase Sólida (EFS) (Kim, 2011).

A RMN vem sendo considerada o principal método nas análises metabolômicas, uma vez que proporciona análises simples e não destrutivas, que podem fornecer informações sobre a razão entre os metabólitos em uma mistura, e que ainda pode ser usada para determinar a estrutura molecular dos metabólitos presentes na amostra, inclusive com detalhes estereoquímicos, mesmo se tratando de amostras complexas (misturas) (Kim, 2011; Zhao, 2011).

Esta técnica tem obtido diversas aplicações na metabolômica de plantas, como por exemplo, no controle de qualidade de alimentos, em estudos quimiotaxonômicos (seja na classificação ou na caracterização de um grupo de amostras), em análises de equivalência de substâncias químicas em plantas geneticamente modificadas, em interações com outros organismos e com o ambiente, entre outras.

Wen e colaboradores (2010) usaram a RMN como um meio para discriminar entre as diferentes fontes de cultivo dos cogumelos *Ganoderma lucidum*, visando especialmente determinar se eles haviam sido cultivados na China ou na Coreia. A equipe obteve os espectros de RMN em uma sonda criogênica de tri – nuclear, em um equipamento Bruker Avance III de 500 MHz e para auxiliar na visualização dos resultados foi realizada a análise multivariada dos dados. Dessa forma foi possível realizar a diferenciação entre os locais de cultivo dos cogumelos, resultando em um modelo robusto que pode ser aplicado para outros produtos terapêuticos à base de plantas.

Kirk e colaboradores (2011) caracterizaram variações metabólicas entre genótipos de uma família de híbridos intraespecíficos de *Jacobaea aquática* e *J. vulgaris* através da obtenção de espectros de RMN e análise multivariada (PCA). Apesar de possuir limitações com relação à sensibilidade, pois metabólitos que ocorrem em concentrações menores que $\sim 1 \mu\text{mol. mg}^{-1}$ não são detectados através desta técnica, a RMN possibilitou a identificação de uma grande quantidade de metabólitos entre primários e secundários, e ainda permitiu a quantificação de oito deles. Através desse estudo foi possível

identificar os metabólitos que diferenciam as plantas híbridas das plantas parentais, tornando possível o desenvolvimento de estudos para elucidar padrões ecológicos, fisiológicos e evolucionários.

Jégou e colaboradores (2010) usaram cromatografia líquida e RMN de alta resolução com giro no ângulo mágico (HR-MAS – *High Resolution Magic Angle Spinning*), associadas à quimiometria para realizar a discriminação taxonômica de algas do gênero *Cytoseira*. Ambos os métodos levaram a quatro perfis químicos entre cinco espécies, o que ocorreu devido às espécies *C. foeniculaceae* e *C. humilis* serem quimicamente semelhantes. Curiosamente não foi possível distinguir essas espécies nem através de sua composição lipofílica completa, obtida por cromatografia líquida, nem pela sua composição química global, obtida por RMN HR-MAS. Esses achados corroboram os resultados obtidos nas análises de *ITS2* (*Internal Transcribed Spacer 2*) que sugerem que o gênero *Cytoseira* seja polifilético. Os autores realçam as vantagens da RMN HR-MAS por ser um método não destrutivo e que fornece a impressão digital de uma amostra biológica, enquanto a cromatografia líquida é uma ferramenta crucial para a investigação mais profunda da composição química dos extratos obtidos.

Da mesma forma que para algas, a classificação taxonômica de líquens baseada somente em atributos morfológicos é difícil e por esse motivo análises químicas são frequentemente usadas. Alcantara e colaboradores (2007) utilizaram as técnicas de RMN HR-MAS de ^1H e espectroscopia na região do Infravermelho, com Transformada de Fourier (FT-IR), juntamente com análises quimiométricas, para realizar a classificação quimiotaxonômica de amostras intactas de líquens. De acordo com os autores a análise quimiométrica de ambos os conjuntos de dados foi capaz de evidenciar a distinção entre as espécies analisadas. Apesar da técnica de FT-IR ter fornecido melhores resultados devido à maior reprodutibilidade obtida em suas replicatas, a HR-MAS possibilitou a identificação de alguns dos metabólitos responsáveis pela distinção entre as espécies de líquens.

Desse modo, a RMN HR-MAS tem se mostrado uma técnica promissora na análise de amostras com o mínimo de pré-tratamento. Suas aplicações no estudo de organismos vegetais têm aliado potenciais

informações químicas às biológicas. A HR-MAS alia a boa resolução e sensibilidade da análise de RMN em fase líquida, com a praticidade da análise de RMN de sólidos. Por essa razão, essa técnica é bastante apropriada para a análise de amostras complexas, pois além de apresentar uma boa reprodutibilidade e requerer pequenas quantidades de amostra, a diminuição das etapas de pré-tratamento também minimiza a possibilidade de alterações químicas no material analisado.

Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo obter informações sobre o perfil metabólico de árvores macho e fêmea da *Araucaria angustifolia*, através da técnica RMN HR-MAS a fim de prever o sexo de plantas jovens, nas quais o sexo ainda não está expresso fenotipicamente.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar a distinção entre machos e fêmeas em indivíduos jovens da *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze através da técnica de RMN HR-MAS associada a análises multivariadas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar o perfil espectral de RMN HR-MAS de ^1H das amostras de folhas de indivíduos macho e fêmea de *A. angustifolia* com manifestação sexual observável (árvores adultas).
- Avaliar por quimiometria as diferenças e similaridades entre os perfis metabólicos importantes para a distinção de indivíduos adultos de sexo diferente.
- Construir modelos de predição a fim de classificar o sexo de amostras jovens que ainda não o expressaram fenotipicamente.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 PREPARO DAS AMOSTRAS

As amostras de folhas de *A. angustifolia* foram coletadas em Curitiba - PR pelo Prof. Dr. Andersson Barison e a mestrande Grazielli da Rocha da Universidade Federal do Paraná – UFPR, e identificadas por Joel M. da Silva do Museu Botânico Municipal de Curitiba. O sexo das plantas analisadas foi identificado através da visualização dos órgãos florais.

As características dos pontos de coleta bem como a distribuição das amostras coletadas são mostradas na Tabela 1.

Tabela 1 – Características dos locais de coleta e número de amostras de araucária analisadas.

Ponto de Coleta	Local	Características	Número de amostras coletadas		
			Macho	Fêmea	Jovem Indefinido
1	Av. Nossa Senhora da Luz	Distância de poucos metros entre as árvores amostradas, que estavam no canteiro central da avenida.	04	04	01
2	Parque Municipal Barreirinha	Cerca de 300 m entre as árvores amostradas, as quais se encontravam em um parque com densa vegetação.	08	08	-
3	Almirante Tamandaré	Cerca de 300 m entre as árvores amostradas, as quais se encontravam em uma região com pouca vegetação.	04	04	-
4	Zoológico do Parque Iguaçu	Média de 1.000 m entre as árvores amostradas, que estavam em meio a uma densa cobertura vegetal.	05	05	-
5	Piraquara	Média de 2.000 m entre as árvores amostradas, que estavam em uma região com pouca vegetação.	05	05	-
6	Campus Botânico da UFPR ^a	Distância de poucos metros entre as árvores amostradas (~ 10 m). Região com pouca vegetação.	-	-	05
7	Campus Botânico da UFPR ^b	Distância de poucos metros entre as árvores amostradas (~ 10 m). Região com pouca vegetação.	-	-	02
8	Campus Samambaia da UFG	Árvore fora da área de mata, isolada de outras araucárias.	-	-	01

a – Próximo ao Departamento de Engenharia Florestal

b – Próximo à passarela sobre a linha verde.

3.1.1 PREPARO DO MATERIAL VEGETAL

As amostras foram mantidas em geladeira (4°C) até o momento da moagem.

Antes de ser triturado, o material vegetal de *A. angustifolia* foi limpo para a retirada do material particulado de sua superfície. Em seguida, as folhas foram separadas dos ramos através de um corte em sua base, e então foram trituradas em moinho criogênico, utilizando nitrogênio líquido. Após a moagem, as amostras foram mantidas congeladas (-21°C) até o momento da análise na sonda HR-MAS. Nenhum outro pré-tratamento foi efetuado.

3.1.2 PREPARO DO MATERIAL PARA A SONDA HR-MAS

Pesou-se cerca de 12 mg da amostra, a qual foi hidratada com D₂O/TMSP-d₄ a 1mg/mL, e em seguida foi transferida para um rotor de zircônio, de 4 mm de diâmetro externo e 50 µL de volume. Após inserir a amostra no rotor (1) foi colocado o espaçador (2), que possui um orifício através do qual um possível excesso de água ou amostra é expelido. O parafuso (3) de vedação foi inserido no rotor para evitar que a amostra seja expelida devido ao giro de alta frequência. Só então um possível excesso de água e/ou amostra foram limpos. Por fim se inseriu a tampa seccionada (4), a qual funciona como uma hélice que proporciona o giro do rotor na velocidade desejada. Tanto a inserção quanto a retirada do espaçador são realizadas utilizando um parafuso grande (5).

Na figura 3.1 estão os acessórios empregados na sonda HR-MAS.

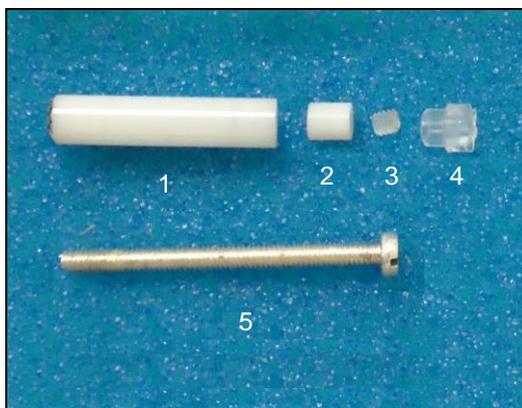


Figura 3.1 – Acessórios empregados na análise de RMN HR – MAS (Fonte: Próprio autor, 2012)..

3.2 AQUISIÇÃO DOS ESPECTROS

As análises de RMN foram adquiridas a 28 °C em um equipamento BRUKER Avance III 500, de 11,75 Tesla (500 MHz para a frequência do hidrogênio), localizado no Laboratório de RMN do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás. As medidas foram realizadas empregando-se uma sonda trinuclear HR-MAS 4 mm ($^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{31}\text{P}$), com gradiente de campo na coordenada z, e para a manutenção do giro da amostra em 5 kHz foram empregados unidade pneumática e fluxo de ar comprimido. Todas as amostras foram analisadas em triplicata para aumentar a confiabilidade do método. Para cada replicata realizada foi feita a inserção de material novo no espectrômetro.

Os experimentos de RMN HR-MAS de ^1H foram obtidos utilizando-se a sequência de pulsos CPMG, com a inserção de uma irradiação de onda contínua para suprimir o sinal do solvente (CPMGPR). Cada espectro foi adquirido com um número de varreduras (NS) igual a 256, tempo de espera entre cada aquisição de 4 s (d1), tempo de aquisição de 4,09s (AQ), um número de pontos de 64k (TD) e janela espectral de 16,02 ppm (SW). O processamento foi realizado no programa Topspin (versão 3.1), com número de pontos igual a 64k (SI), e aplicada a função exponencial lb: 0.3 Hz. Foi realizada correção manual da linha de base e calibração automática do sinal do TMSP-d₄ (0,00 ppm) como referência para os outros sinais.

A fim de auxiliar na atribuição dos sinais importantes nos espectros de RMN de ^1H obtidos na sonda HR-MAS foram realizadas três extrações em água, metanol e clorofórmio deuterados, através de imersão em banho com ultrassom durante um minuto. Em seguida os extratos foram filtrados, e transferidos para tubo de 500 µL para análise de ^1H na sonda TBI a fim de observar qual deles possuía os sinais de interesse em maior intensidade.

Foram realizados experimentos bidimensionais de *g*HSQC e *g*TOCSY utilizando a sonda HR-MAS. Também foram adquiridos experimentos bidimensionais na sonda TBI para os extratos obtidos: água deuterada – *g*HSQC e *g*HMBC; metanol deuterado: *g*HMBC.

3.3 TRATAMENTO QUIMIOMÉTRICO

A análise quimiométrica dos dados foi realizada através do programa AMIX Statistics, (v 3.8, Bruker), específico para o tratamento de dados de RMN, para a análise exploratória dos dados por PCA (*Principal Component Analysis*), e Pirouette (v. 4.0, Infometrix) para as análises supervisionadas de classificação por KNN (*kth Nearest Neighbor*).

Foi avaliada a região entre δ 0,72 e δ 7,21, com a exclusão da região referente à supressão do sinal da água e suas vizinhanças (δ 4,67-5,12) e regiões de ruídos (δ 5,33-6,0; 6,18-6,42). Durante o processo de otimização dos parâmetros foram testados diferentes tamanhos e formas de construção dos *buckets*, porém os melhores resultados foram obtidos com *buckets* retangulares simples, com largura de 0,03 ppm escalando pela intensidade total dos sinais.

3.3.1 ANÁLISE EXPLORATÓRIA POR PONTO DE COLETA

Para esta análise foi utilizado o pré-processamento centrado na média para as variáveis dos pontos de coleta 1 a 5, e autoescalonado para os pontos 1 e 4. No entanto é importante ressaltar que foram feitos testes utilizando os pré-processamentos centrado na média, autoescalonado e Pareto para todos os pontos de coleta previamente, a fim de observar quais deles apresentariam os melhores resultados.

3.3.2 CRIAÇÃO E VALIDAÇÃO DOS MODELOS

Modelos de classificação por KNN foram construídos de forma independente para cada um dos cinco pontos de coleta, utilizando as informações obtidas nos espectros de RMN de ^1H das amostras de árvores adultas, com sexo conhecido. Foi utilizado o conjunto integral de amostras de cada ponto de coleta na construção destes modelos.

A validação dos modelos foi obtida através do teste chamado “*cross validation*” que é realizado pelo programa *Pirouette* após a construção dos modelos.

3.3.3 TESTE DE CLASSIFICAÇÃO DE AMOSTRAS COM SEXO DEFINIDO ENTRE GRUPOS

Para avaliar a robustez dos modelos criados diante das variações ambientais, foi elaborado um teste no qual se utilizou o modelo construído a partir das amostras do Ponto de Coleta 1 para classificar as amostras dos outros quatro pontos de coleta, e avaliar seu grau de concordância com o sexo real das amostras analisadas. Esse teste foi feito para todos os modelos construídos, de acordo com o arranjo mostrado na Tabela 2, por KNN.

Tabela 2 – Teste de classificação de amostras com sexo conhecido entre grupos de diferentes pontos de coleta.

Modelo	Amostras que compõe os Grupos de Teste	Total de amostras controle interno
Ponto de Coleta 1	1: Pontos de Coleta 2,3,4,5	2
Ponto de Coleta 2	2: Pontos de Coleta 1,3,4,5	4
Ponto de Coleta 3	3: Pontos de Coleta 1,2,4,5	2
Ponto de Coleta 4	4: Pontos de Coleta 1,2,3,5	2
Ponto de Coleta 5	5: Pontos de Coleta 1,2,3,4	2

Não foi utilizado o conjunto integral de amostras na construção dos modelos deste teste. Algumas amostras foram selecionadas aleatoriamente para controle interno da classificação. O total de amostras de controle foi definido em função do número total de amostras de cada grupo (Tabela 2).

3.3.4 PREDIÇÃO DE ARAUCÁRIAS JOVENS COM SEXO INDEFINIDO

O sexo de dez árvores jovens sem expressão sexual observável foi predito em cada um dos modelos criados, usando a técnica de KNN. Dentre as amostras, nove foram coletados no Estado do Paraná e uma foi coletada no Estado de Goiás no Campus Samambaia da UFG.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PERFIL ESPECTRAL DE RMN HR-MAS DE ^1H

Os espectros de RMN HR-MAS de ^1H da *A. angustifolia* apresentaram grande sobreposição de sinais devido à complexidade da amostra, uma vez que suas folhas foram analisadas *in natura* com o único pré-processamento sendo a moagem e hidratação com água deuterada a fim de conferir mobilidade às substâncias químicas presentes na amostra.

Apesar da sobreposição dos sinais, foi obtida uma boa resolução nos espectros como pode ser visto na Figura 4.1.

A sequencia de pulso utilizada para aquisição dos dados de RMN foi a CPMG (Carr – Purcell – Meiboom – Gill), a qual também é conhecida como filtro de T_2 . Esta sequencia de pulso foi desenvolvida para medir o tempo de relaxação transversal natural T_2 , mas comumente é utilizada para editar o espectro através da eliminação de sinais de macromoléculas, que são alargados e sobrepõem os sinais de moléculas menores. Um pulso de pré-saturação pode ser adicionado a esta sequência um pulso para suprimir o sinal da água, ficando então conhecida como CPMGPR.

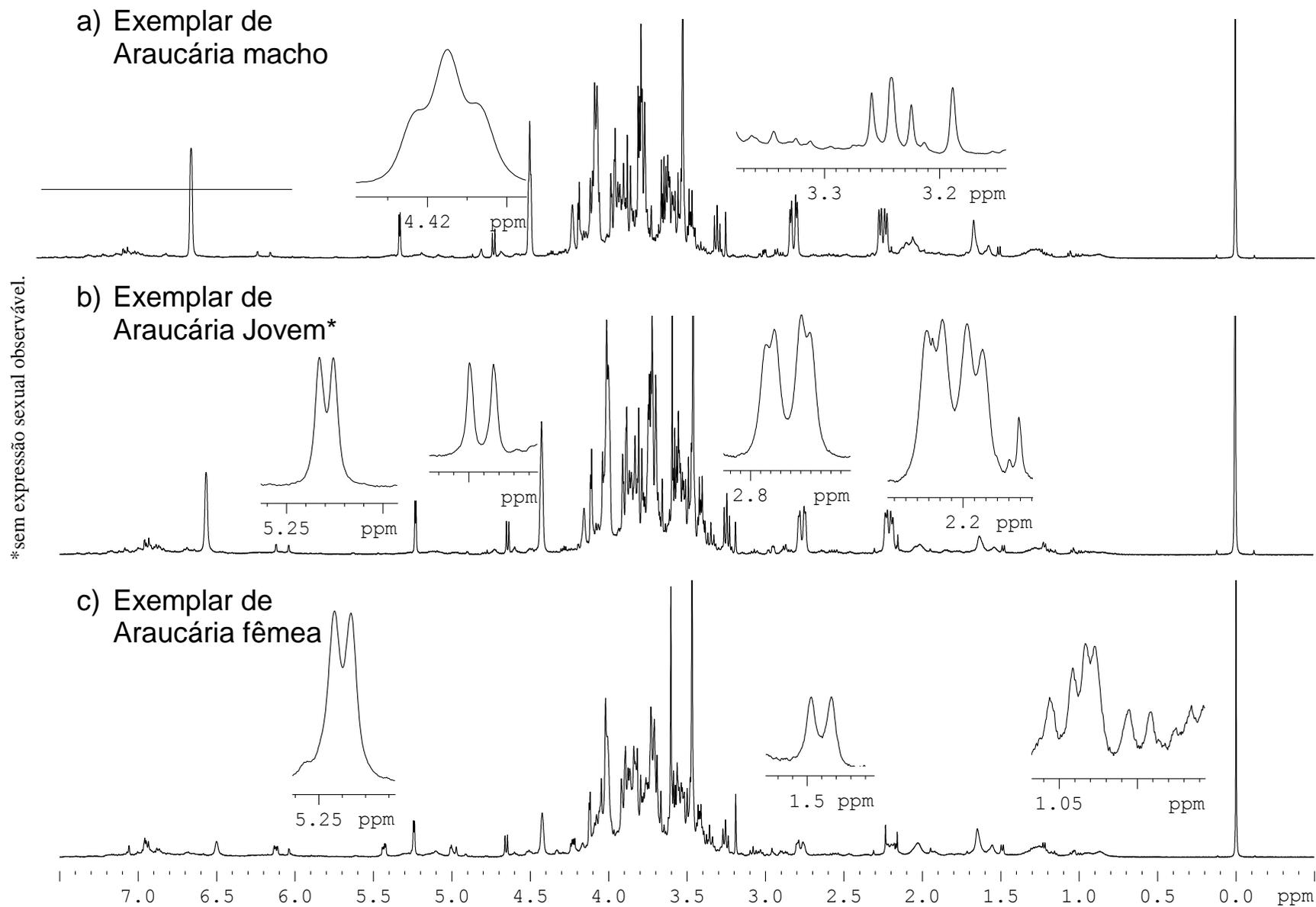


Figura 4.1 – Espectros de RMN de ^1H de replicatas das folhas de exemplar de *A. angustifolia* utilizando a sequência de pulso CPMGPR.

A boa resolução obtida tornou possível identificar alguns dos compostos presentes, os quais estão listados na Tabela 3. Os compostos foram identificados por comparação com dados da literatura (Perez, 2010) e elucidação dos experimentos bidimensionais HSQC (Figura 4.2) e TOCSY (Figura 4.3).

Tabela 3. Deslocamentos químicos de RMN dos compostos identificados nos espectros de folhas de araucária.

Atribuição		δ ¹ H	Multiplic/ J (Hz)	δ ¹³ C	δ ¹ H*	J*	δ ¹³ C*
Aminoácidos							
Alanina	β -CH ₃	1,48	d/7,2	^a	1,49	7,3	
Valina	γ -CH ₃	0,99	d/7,1	^a	1,00	6,9	
GABA	α -CH ₂	2,32	t/7,3	^a	2,30	7,1	35,20
Açúcares							
α	- C1H	5,23	d/3,6	95,0	5,25	d/3,7	92,98
glucose	C4H	3,42	m	^a	3,44		
	C2H	3,56	m	^a	3,57		
	C3H	3,71	m	^a	3,73		
	C6H	3,82	m	^a	3,88		
					^a	3,73	
β	- C1H	4,63	d/7,9	99,0	4,66	d/7,9	96,76
glucose	C2H	3,24	dd/9,1;8,3	77,45	3,27	dd/9,1;8,3	75,02
	C4H	3,41	s	73,18/	3,42		70,49
	C6H	3,88	m	75,04	3,88		61,63
			3,73	m		3,73	
Outros metabólitos							
Colina	NCH ₃	3,20	s	57,0	3,21	s	54,85

*Perez et al.(2010)

^a sinais não identificados pelo experimento de gHSQC (sobreposição de sinais)

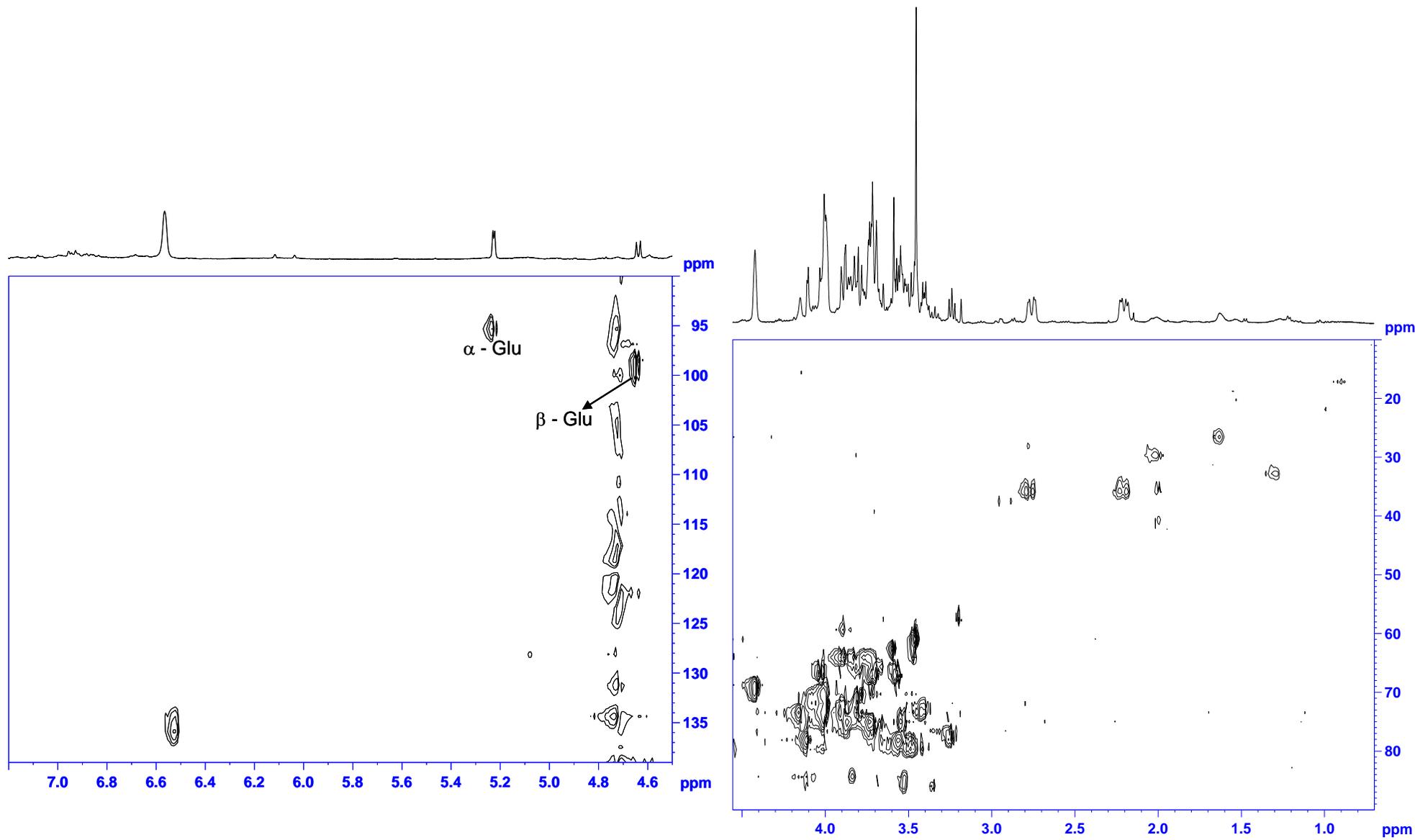


Figura 4.2 – Mapa de correlação direta ^1H - ^{13}C obtido através do experimento gHSQC utilizando a sonda HR-MAS.

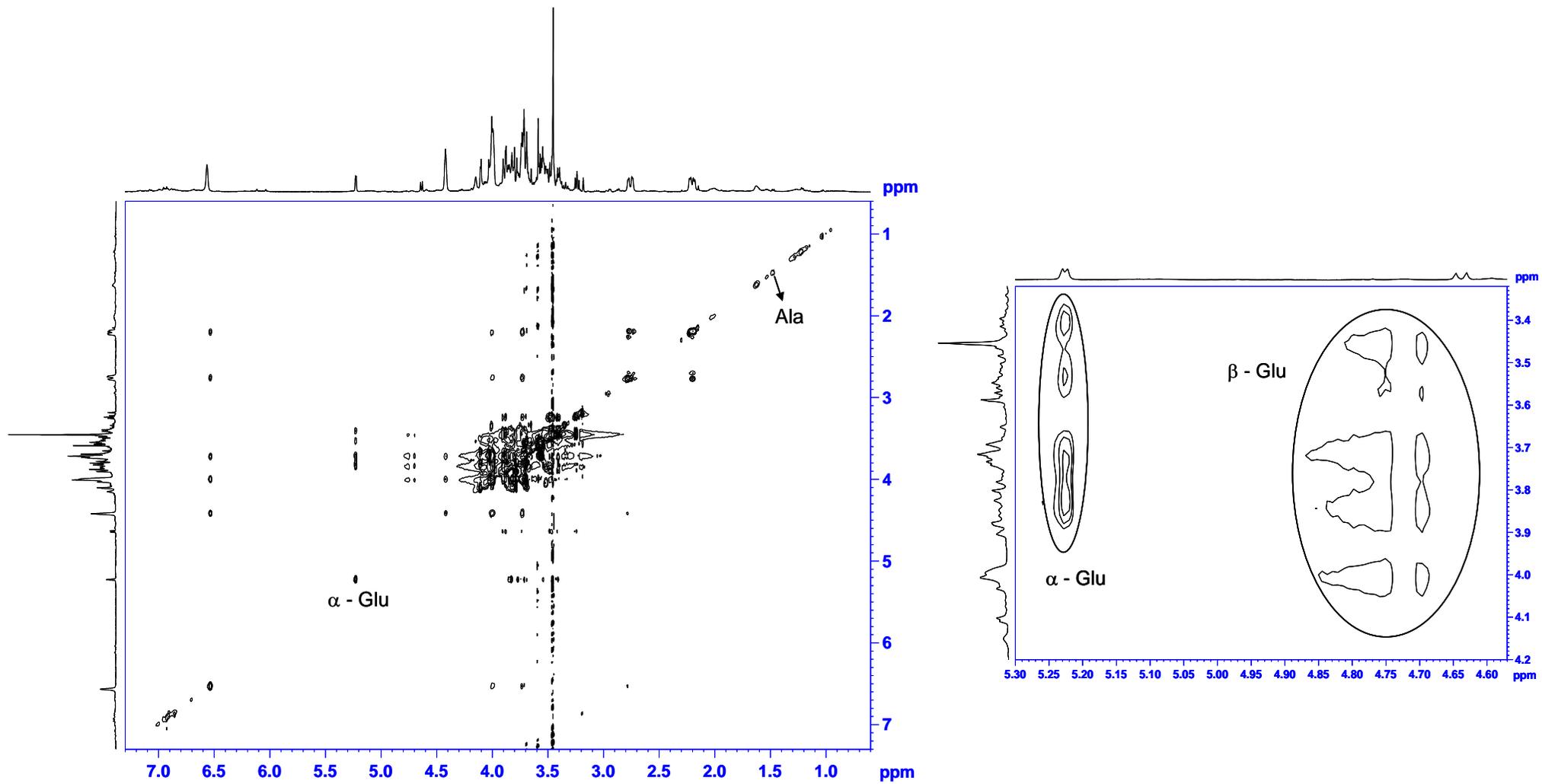


Figura 4.3: Mapa de correlação a longa distância ^1H - ^1H obtido através do experimento TOCSY utilizando a sonda HR-MAS.

Na tentativa de atribuir os sinais e elucidar os compostos majoritários do espectro de RMN HR-MAS de ^1H , foram realizadas extrações em D_2O , MeOD, e CDCl_3 , cujo resultado em D_2O foi equivalente ao obtido com a amostra *in natura* (sonda HR-MAS). O extrato foi analisado por RMN em solução, obtendo-se os mapas de correlação direta (*g*HSQC) e a longa distância (*g*HMBC) $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$. Embora a elucidação do componente majoritário não tenha sido completada, os experimentos encontram-se ilustrados nas Figuras 4.4 e 4.5 e as atribuições dos sinais correlacionados encontram-se destacados na Tabela 4.

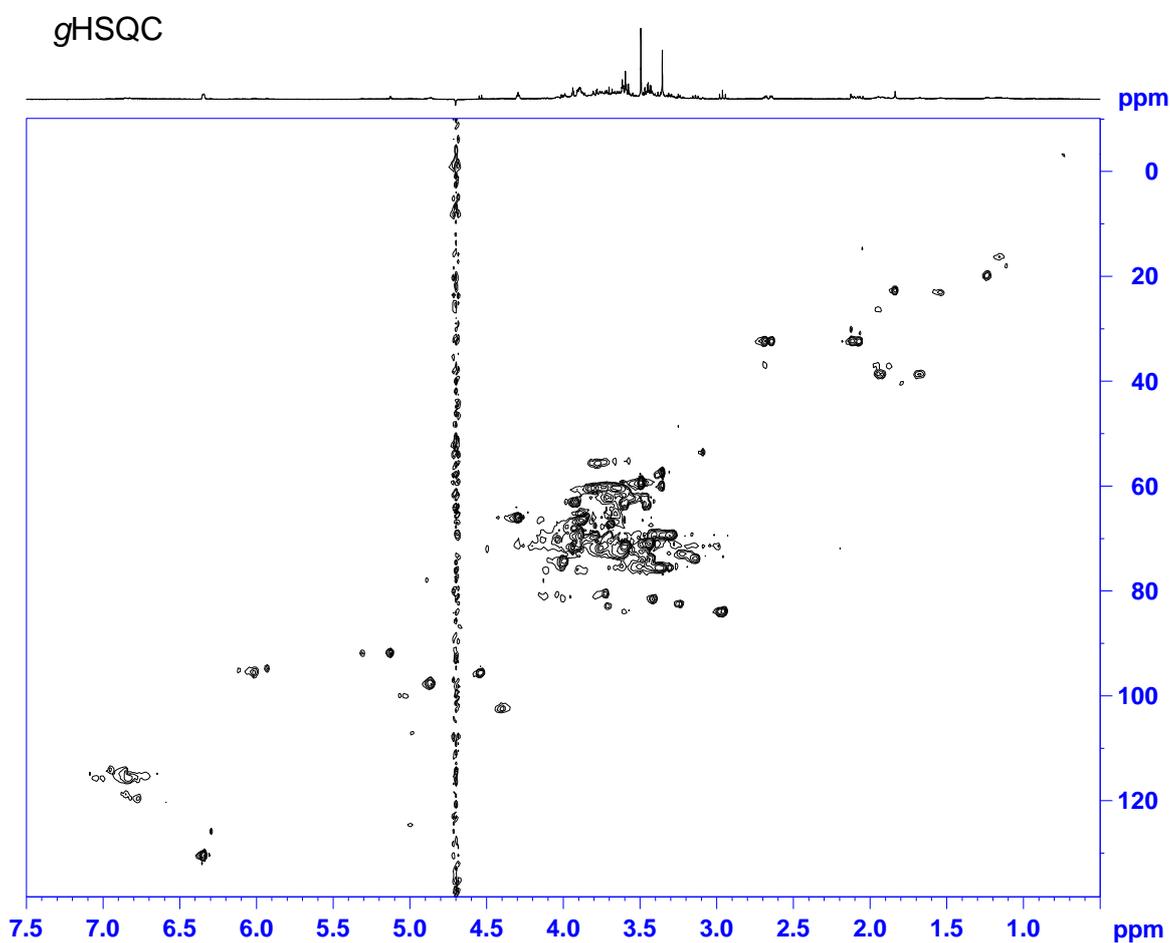


Figura 4.4 – Mapa de correlação direta $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ obtido através do experimento *g*HSQC do extrato em “ D_2O ”, realizado com a sonda TBI 5mm.

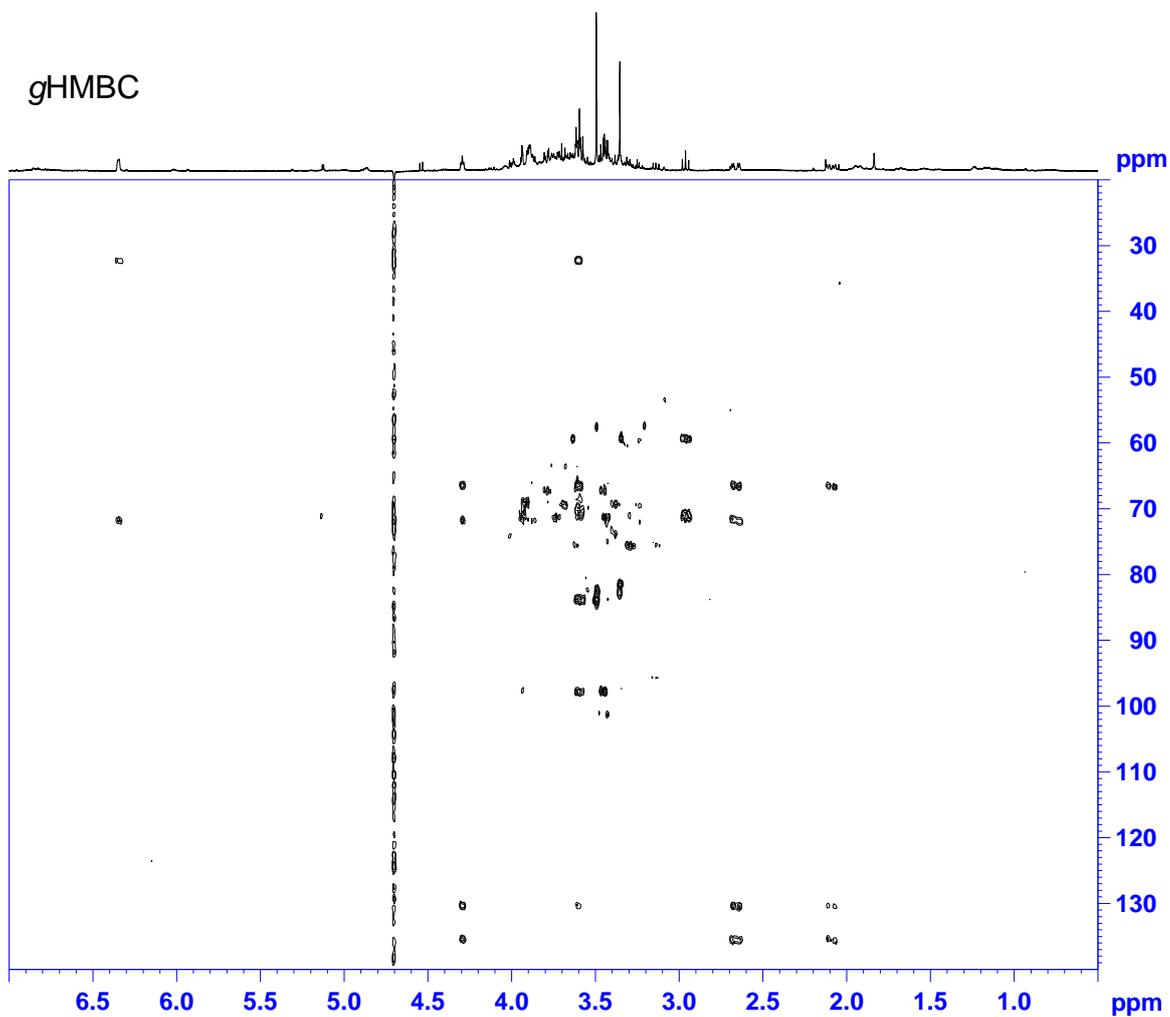


Figura 4.5 – Mapa de correlação a longa distância ^1H - ^{13}C obtido através do experimento gHMBC do extrato em " D_2O ", realizado com a sonda TBI 5mm.

Tabela 4. Deslocamentos químicos de RMN do(s) composto(s) majoritário(s) não elucidado(s).

δ ^1H	Multiplicidade/J (Hz)	δ $^{13}\text{C}^a$	$g\text{TOCSY}^b$	$g\text{HMBC}^c$
2,21	dd/18 e 6,7	35,8	2,76; 3,72; 3,99; 4,42 e 6,53	69,6; 134,0; 139,0
2,76	dd/18 e 6,7	35,8	2,21; 3,72; 3,99; 4,42 e 6,53	69,6; 75,0; 134,0; 139,0
3,72	m	67,2	2,21; 2,76; 4,42 e 6,53	35,8; 134,0
3,99	m	64,0	2,21; 2,76; 4,42 e 6,53	-
4,42	t/4,02	69,6	2,21; 2,76; 3,72 e 3,99	69,6; 75,0; 134,0; 139,0
6,53	sl	134,0	2,21; 2,76; 3,72; 3,99 e 4,42	35,8; 75,0
3,45	s	60,9	-	84,8
3,60	s	62,4	-	87,2

^a Obtido a partir do experimento de $g\text{HSQC}$, HR-MAS e em solução.

^b Obtido a partir das análises por RMN HR-MAS.

^c Obtido a partir das análises por RMN em solução.

De modo geral foi possível observar algumas diferenças entre os sinais das amostras macho e fêmea, como um deslocamento do simpleto na região de 3,4 ppm, que majoritariamente em amostras macho se encontrava em 3,45 ppm, e em amostras fêmeas se encontrava ligeiramente deslocado aparecendo em 3,48.

Observou-se também que o sinal na região de 6,4 ppm apresentou variação do deslocamento químico em função do sexo na maioria das amostras analisadas. Em amostras fêmeas ele aparece entre 6,46 e 6,48 ppm, já nas amostras macho ele aparece predominantemente acima de 6,50 ppm, sendo que em algumas amostras ele chegou até a 6,57 ppm. No entanto algumas amostras não seguiram essas tendências e outras nem mesmo apresentaram esse sinal.

Por isso a necessidade das análises quimiométricas, visto que a partir de uma análise visual não foi possível avaliar todas as variáveis e apontar somente um grupo de sinais, dado que amostras biológicas sofrem influências de diversos fatores como solo, clima, estresse hídrico, traumas e doenças, que podem influenciar no perfil metabólico da planta.

4.2 ANÁLISE QUIMIOMÉTRICA

4.2.1 ANÁLISE EXPLORATÓRIA POR PONTO DE COLETA

No tratamento quimiométrico as amostras foram avaliadas por ponto de coleta e observou-se diferentes padrões de agrupamento entre elas.

4.2.1.1 PONTO 1 – AV. NOSSA SENHORA DA LUZ

A PCA com pré-processamento centrado na média para as amostras do Ponto 1 (PC1 x PC2, 79,61 e 6,56%, respectivamente) apresentou um padrão de agrupamento entre os indivíduos do mesmo sexo no eixo de PC1 (Figura 4.6). As amostras de araucária macho agruparam-se em PC1 positivo e as amostras de araucária fêmea em PC1 negativo. Em PC2 as diferenças entre as amostras do mesmo grupo podem ser atribuídas às variações naturais de cada árvore, decorrentes de características como a idade da planta, doenças, predadores, etc. No entanto observa-se que as diferenças em PC2 são pouco significativas visto que a variação da escala e o percentual de variância explicada (6,56%) são menores. Além disso, nota-se que a diferenciação entre os sexos está ocorrendo em PC1.

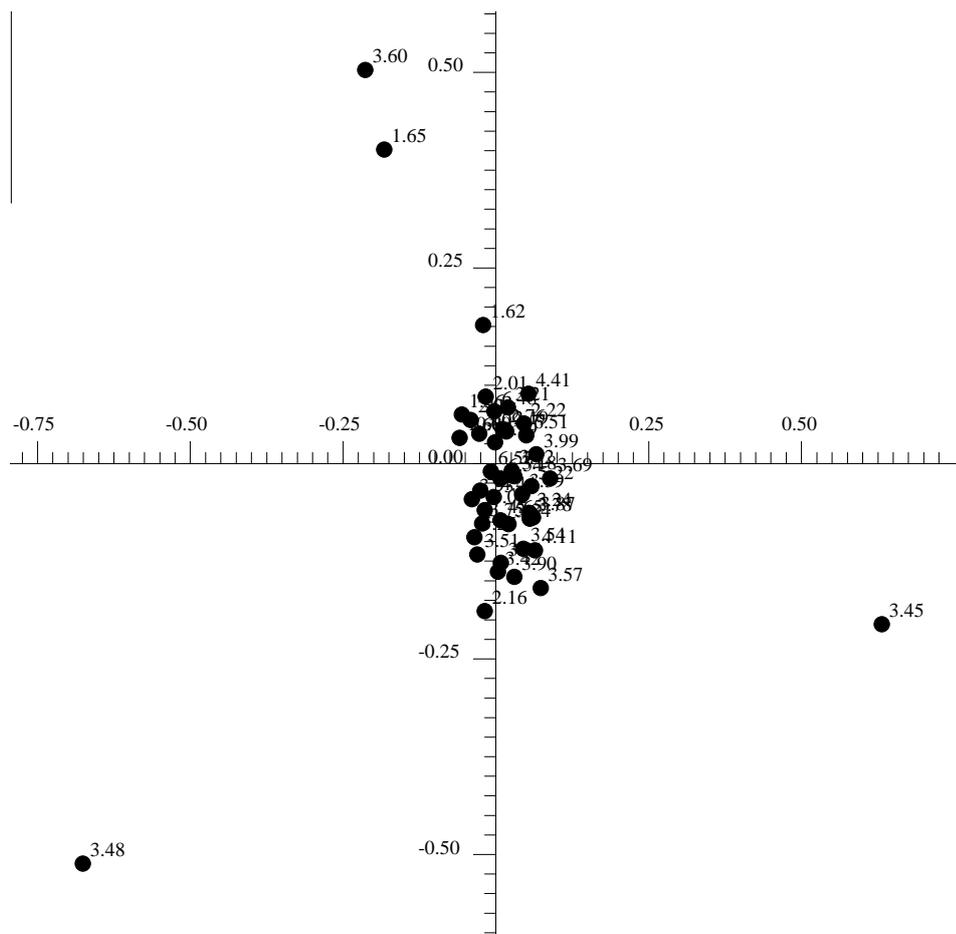


Figura 4.7 Gráfico de *loadings* de PCA das folhas de *A. angustifolia* do Ponto 1, obtido a partir dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H .

Embora os principais sinais responsáveis pela separação entre os grupos macho e fêmea (3,45 e 3,48 ppm) não tenham sido elucidados, podemos visualizar que estes sinais apresentaram variação em seu deslocamento químico, como destacado na figura 4.8. É importante ressaltar que as variações no deslocamento químico não foram causadas por variações na temperatura, pois esta foi devidamente controlada.

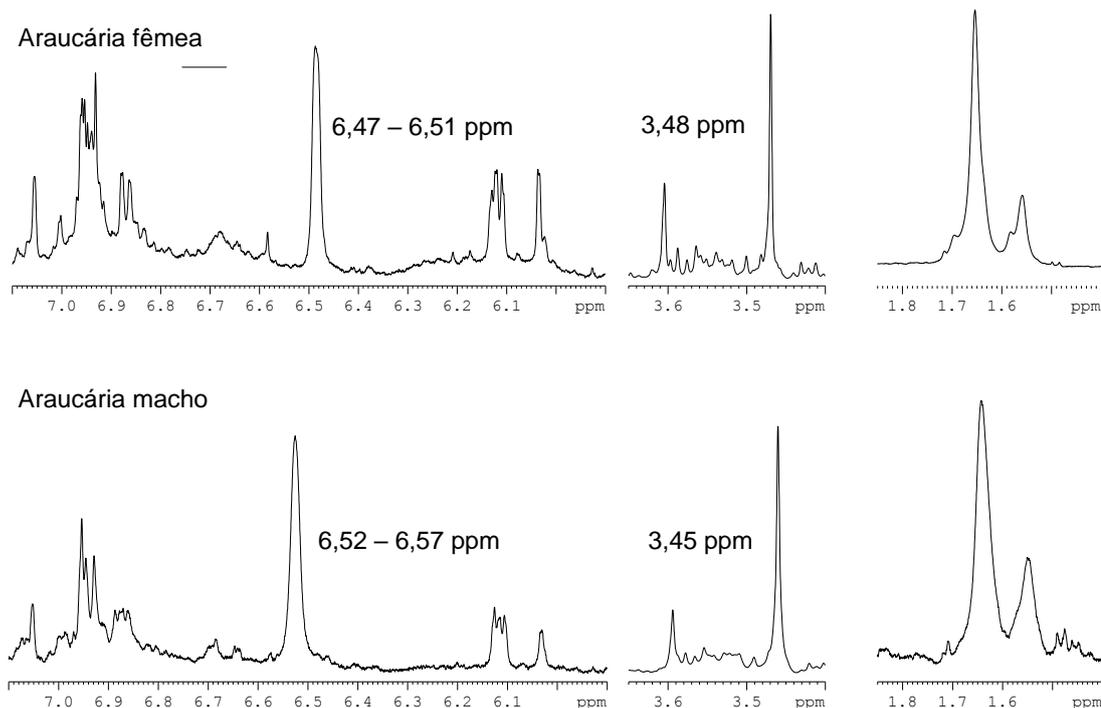


Figura 4.8 – Expansão dos espectros de RMN HR-MAS de ¹H para a visualização das variações no deslocamento químico de alguns sinais.

Com o pré-processamento autoescalonado, houve um decréscimo na variância explicada (PC1 x PC2, 62,53% no total) e a diferenciação entre os sexos se deu somente em PC2, com 22,71%, alocando machos em PC2 negativo e fêmeas em PC2 positivo (Figura 4.9a).

Embora essa PCA não tenha uma boa representatividade e não tenha sido selecionada para nortear as análises de classificação, os *loadings* observados foram importantes para acrescentar significância a outros sinais (Figura 4.9b), especialmente o simpleto largo na faixa de 6,45 a 6,50 ppm para fêmeas e 6,51 a 6,57 ppm para machos, os duplos-dupletos em 2,22 e 2,76 ppm para machos e o duplete anomérico da α e β -glucose em 5,23 e 4,63 ppm, respectivamente, para ambos os sexos, dentre outros sinais.

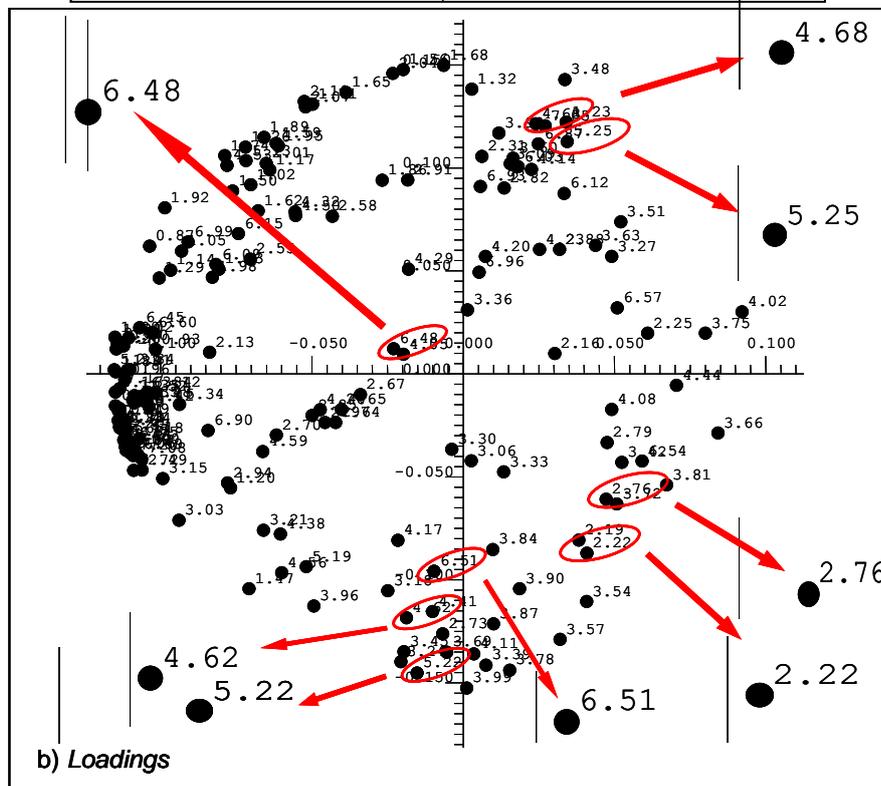
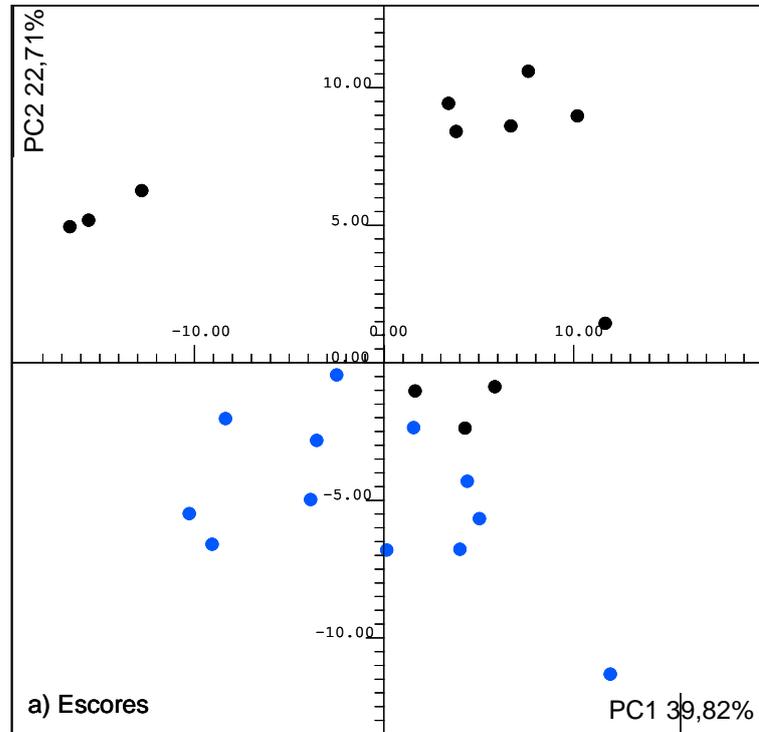


Figura 4.9 - a) Gráfico de escores da PCA das folhas de *A. angustifolia* do Ponto 1 , macho (em azul) e fêmea (em preto); b) Gráfico de *loadings* da PCA das folhas de *A. angustifolia* do Ponto 1, obtido a partir do pré-processamento autoescalonado.

Após a visualização dos principais sinais responsáveis por discriminar machos e fêmeas, foi realizada uma PCA com pré-processamento centrado na média, utilizando a região do espectro entre 3,43 a 3,49 ppm, por tratarem-se dos sinais majoritariamente responsáveis pela discriminação sexual.

O gráfico de escores obtido (Figura 4.10) mostra a separação entre os sexos ao longo de PC1, de forma semelhante ao resultado obtido com o espectro inteiro. No entanto nota-se uma menor dispersão em PC2, o que pode ser atribuído à exclusão de sinais relacionados às características intrínsecas de cada árvore, bem como de características espectrais associadas a parâmetros experimentais (*shimming*, preparo da amostra, etc.). Somente duas replicatas de fêmeas se localizaram em valores mais altos de PC2 no espaço amostral, o que pode ser atribuído principalmente a parâmetros experimentais, já que o empacotamento da amostra na HR-MAS é passível de problemas de reprodutibilidade.

Quanto à variância explicada observa-se que houve um aumento, com PC1 x PC2 99,82% no total.

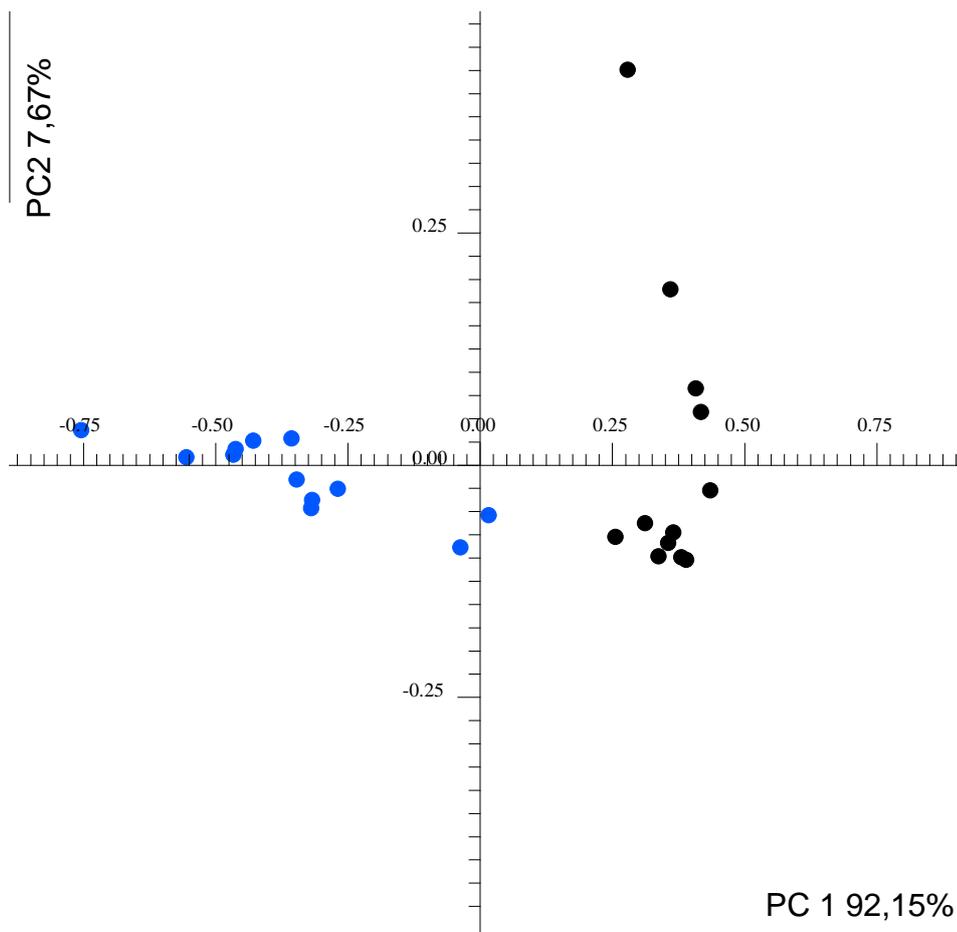


Figura 4.10 – Gráfico de escores da PCA das folhas de *A. angustifolia* macho (em azul) e fêmea (em preto) do Ponto 1, obtido a partir da região entre 3,43 e 3,49 ppm dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H .

4.2.1.2 PONTO 2 – PARQUE MUNICIPAL BARREIRINHA

Para o Ponto 2, a PCA (PC1 x PC2, 70,57 e 14,44%, respectivamente) apresentou uma tendência de separação entre os grupos macho e fêmea ao longo de PC1 (Figura 4.11). As amostras de araucária macho ficaram distribuídas em valores mais negativos de PC1, enquanto as fêmeas em valores mais positivos. Entretanto, embora o gráfico de *hotelling* e de influência (Figura 4.12) não tenha apontado *outliers* relevantes, exceto uma replicata de duas árvores distintas, não houve distinção clara entre os grupos, bem como diversas amostras ficaram alocadas em sobreposição.

Do mesmo modo que para o Ponto 1, a dispersão das amostras em PC2 foi interpretada como as diferenças experimentais e intrínsecas de cada indivíduo.

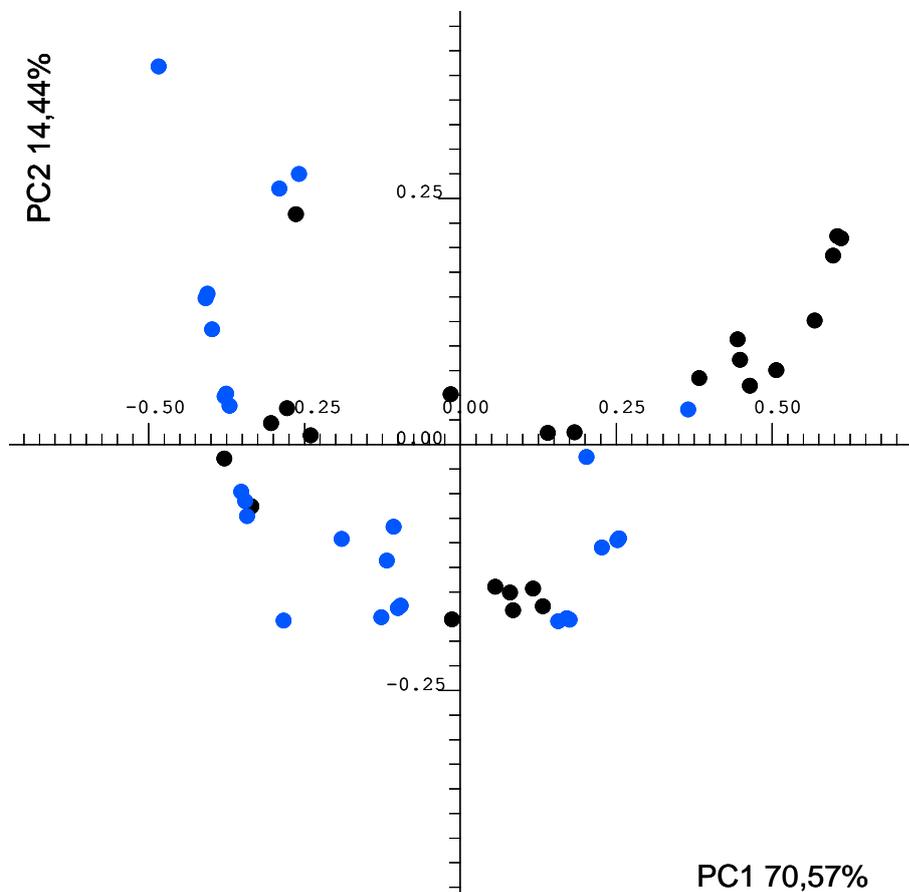


Figura 4.11– Gráfico de escores de PCA das folhas de *A. angustifolia* do Ponto 2, macho (em azul) e fêmea (em preto), obtido a partir dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H .

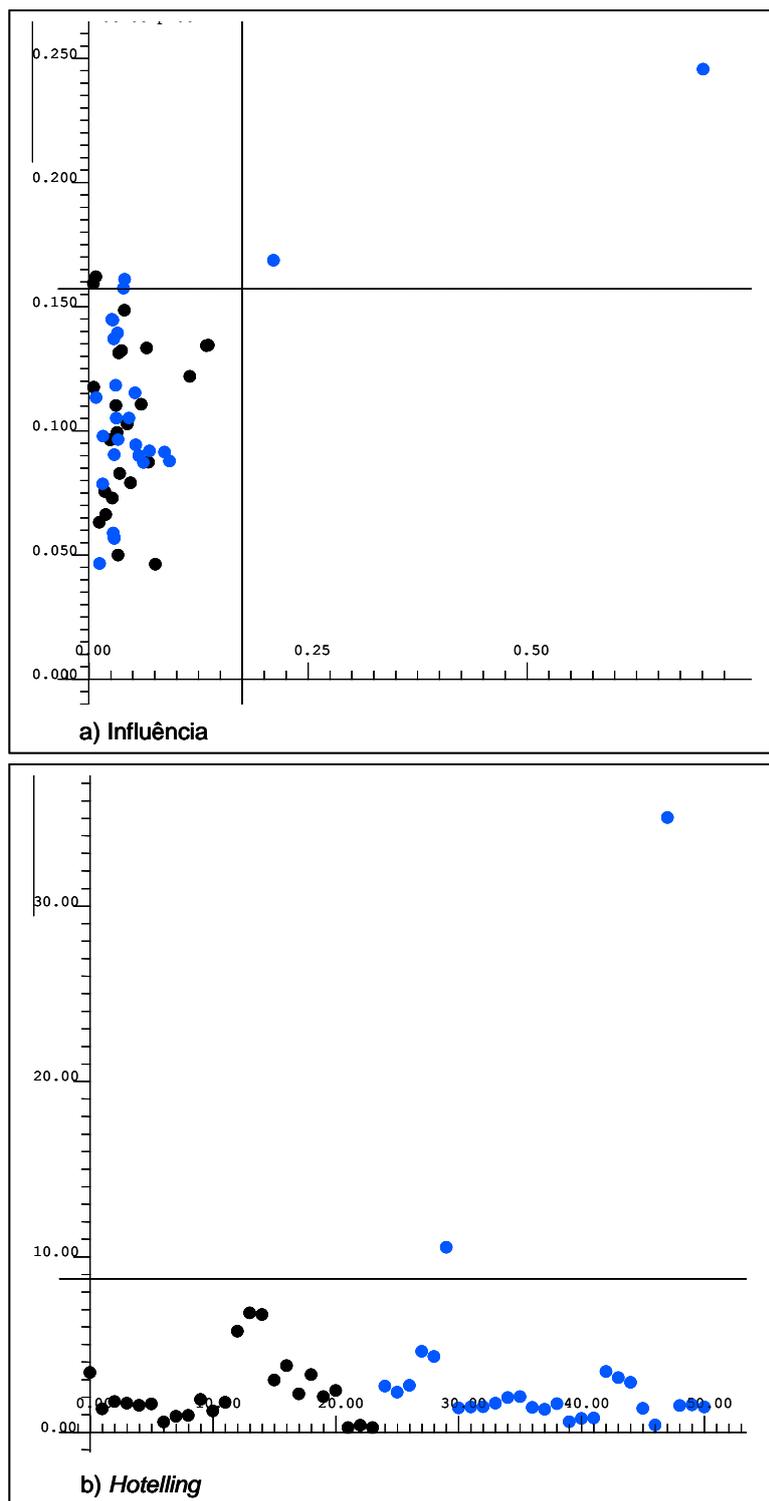


Figura 4.12 – Gráfico de influência (a) e *hotelling* (b) da PCA das folhas de *A. angustifolia* do Ponto 2, macho (em azul) e fêmea (em preto), obtido a partir dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H

A partir do gráfico de *loadings* (Figura 4.13), os mesmos sinais em 3,45 e 3,48 ppm, responsáveis pela separação dos grupos do Ponto 1, foram os responsáveis pela tendência de agrupamento no Ponto 2. Outros sinais que se destacam no gráfico de *loadings* são atribuídos a características ambientais, que podem ser responsáveis pela dispersão amostral observada em PC2.

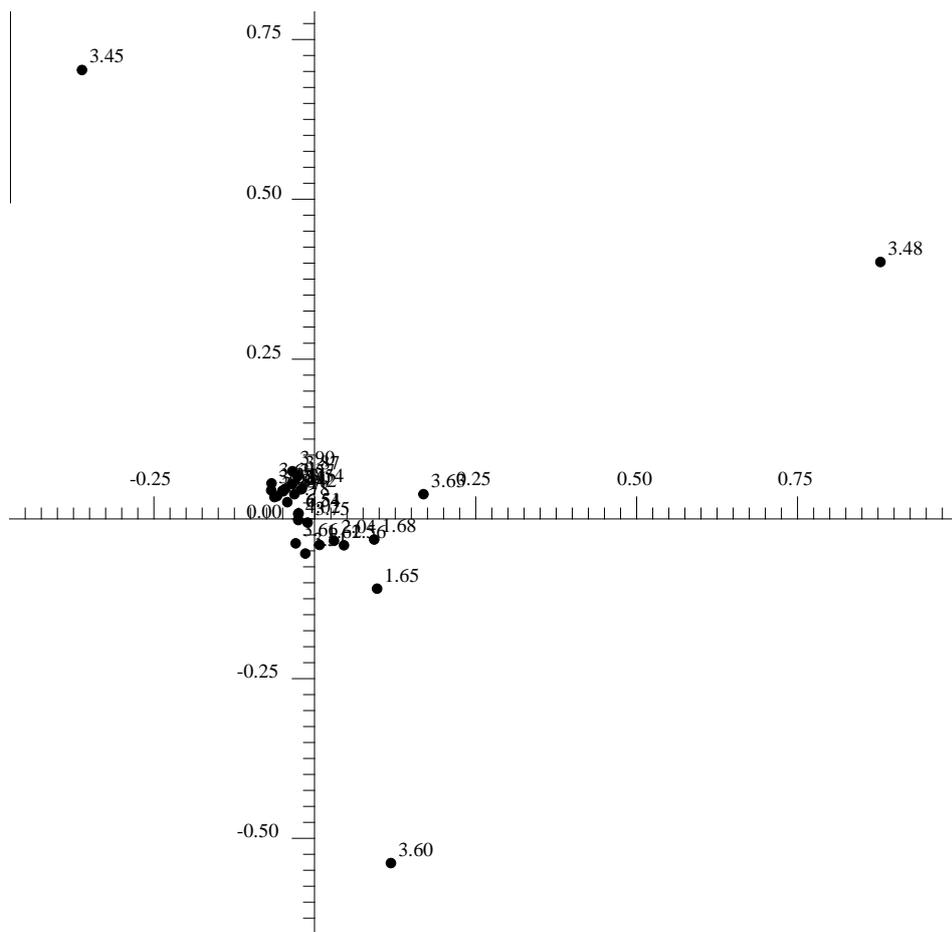


Figura 4.13 – Gráfico de *loadings* de PCA das folhas de *A. angustifolia* do Ponto 2, obtido a partir dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H .

Visando avaliar o agrupamento das amostras utilizando somente a região espectral que compreende os sinais mais importantes do gráfico de *loadings* (3,43 e 3,49 ppm), foi realizada uma análise exploratória dos dados desta estreita região com o mesmo conjunto amostral e o mesmo pré-processamento.

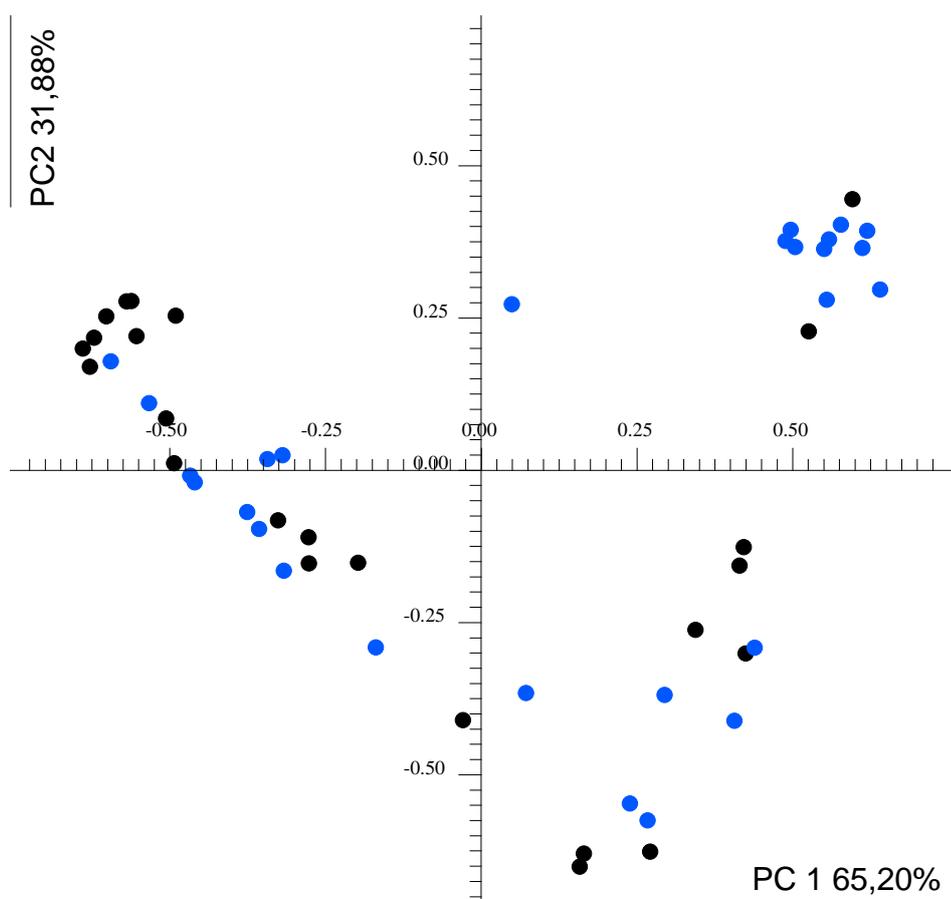


Figura 4.14 – Gráfico de escores da PCA das folhas de *A. angustifolia* macho (em azul) e fêmea (em preto) do Ponto 2, obtido a partir da região entre 3,43 e 3,49 ppm dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H .

O resultado mostrado na Figura 4.14 mostra que não houve melhora no agrupamento das amostras, e é possível observar um aumento na dispersão das mesmas em PC2. No entanto a variância explicada total (PC1 + PC2 = 97,08%) melhorou com relação à PCA com o espectro inteiro (PC1 + PC2 = 85,01%).

4.2.1.3 PONTO 3 – ALMIRANTE TAMANDARÉ

Para o Ponto 3, a discriminação entre os sexos da araucária foi observada através da correlação dos eixos de PC1 e PC2 (Figura 4.15a), os quais apresentaram 81,20 e 11,90% de informação sobre o sistema, respectivamente. No gráfico de *loadings* (Figura 4.15b) igualmente para os

Pontos 1 e 2, as variáveis em 3,45 e 3,48 ppm foram majoritariamente responsáveis pela separação dos sexos neste ponto de coleta.

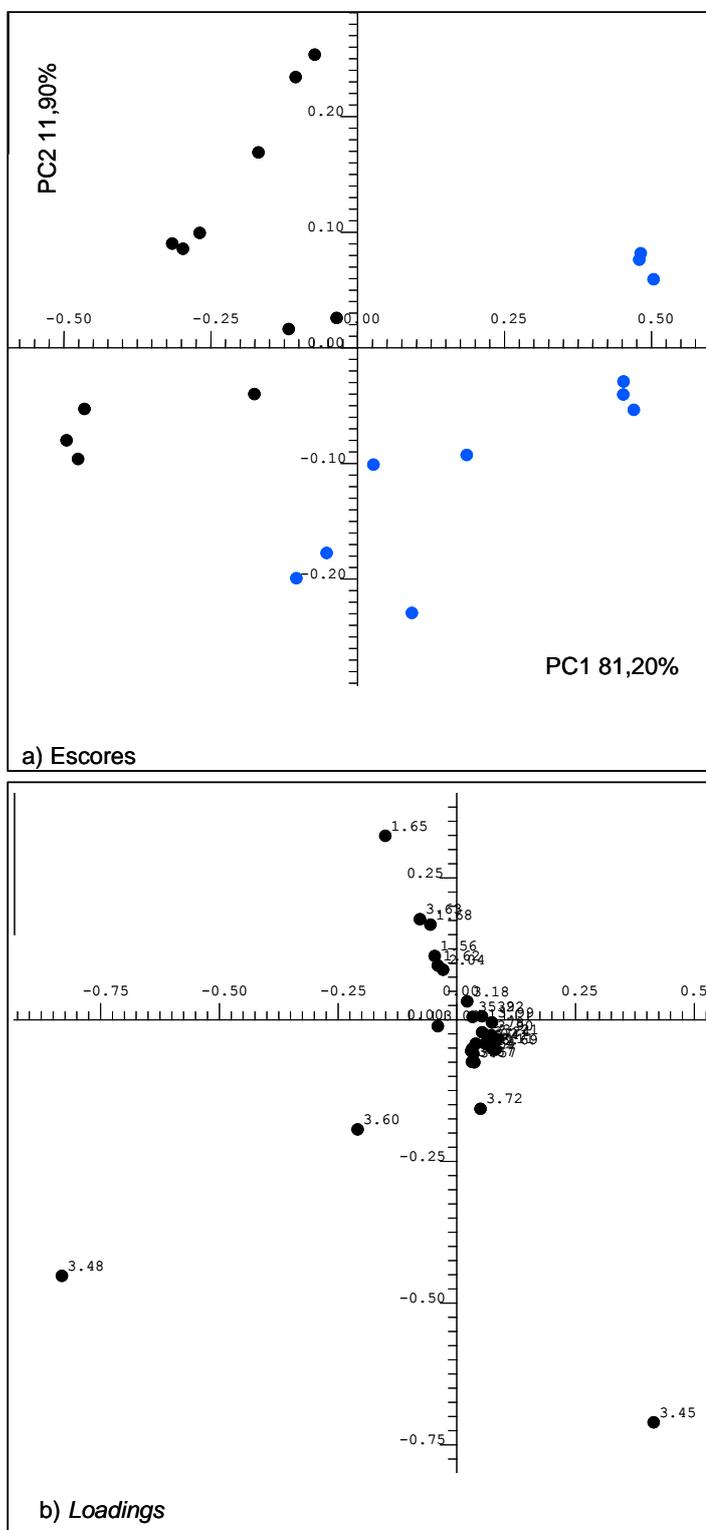
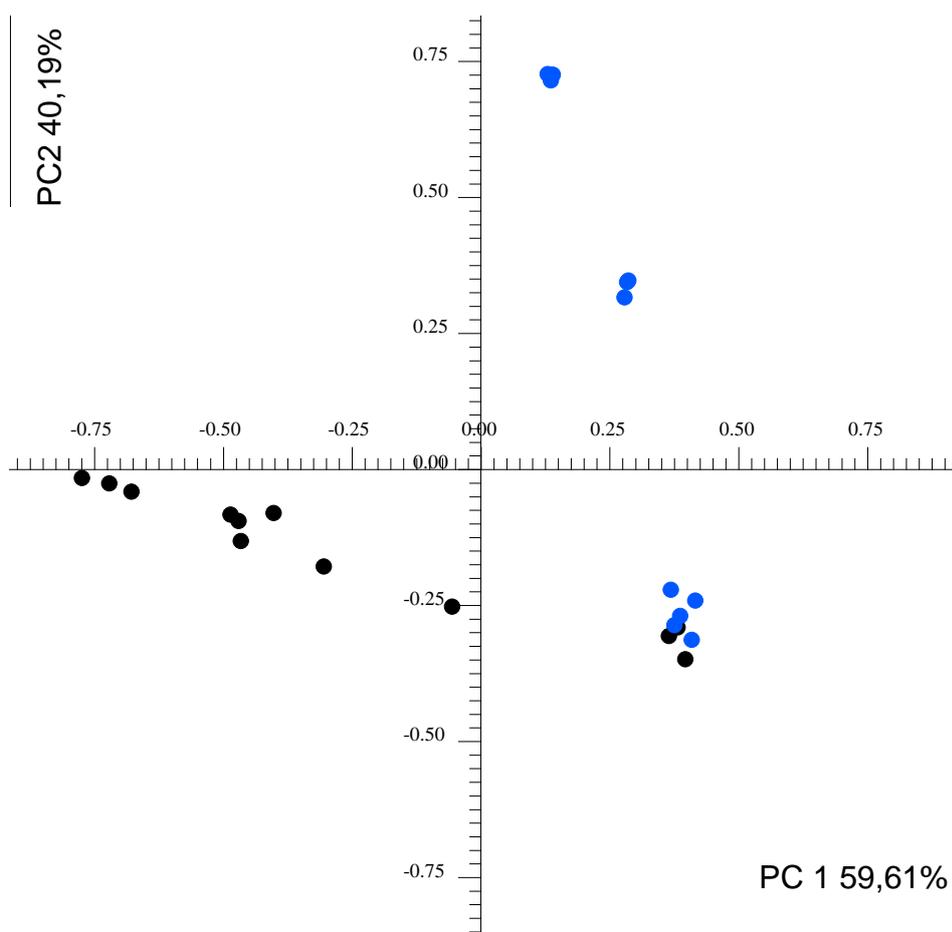


Figura 4.15 – a) Gráfico de escores da PCA das folhas de *A. angustifolia* do Ponto 3 , macho (em azul) e fêmea (em preto); b) Gráfico de *loadings* da

PCA das folhas de *A. angustifolia* do Ponto 3, obtido a partir do pré-processamento centrado na média.

Comparando-se os pontos de coleta 2 e 3, pode-se perceber que enquanto o primeiro apresentou somente uma tendência de separação em PC1, o Ponto 3 mostrou uma separação mais eficiente a partir da dependência entre os dois primeiros eixos (PC1+PC2, 93,10%).

Do mesmo modo, a comparação entre os Pontos 1 e 3 mostra que apesar de ambos apresentarem a discriminação entre os sexos, houve um perceptível acréscimo da variância explicada para o Ponto 3 (83,46% PC1 para o Ponto 1; 93,10% PC1+PC2 para o Ponto 3).



Ao observar a PCA realizada analisando somente a região entre 3,43 e 3,49 ppm (Figura 4.16) percebe-se a separação entre os sexos ocorrendo em PC1, com as fêmeas alocando-se em PC1 negativo e machos em PC1 positivo. Nota-se um aumento na variância explicada ($PC1+PC2 = 99,8\%$) em relação à PCA realizada para o espectro inteiro.

Observa-se que replicatas de uma árvore, descrita como fêmea duvidosa na coleta, agruparam – se com machos na PCA mostrada na Figura 4.16, enquanto a mesma se agrupou como fêmea na PCA realizada para o espectro inteiro (Figura 4.15a). Embora não seja possível concluir sobre tal comportamento é possível estimar que a informação dos outros sinais auxilia na discriminação sexual das araucárias.

4.2.1.4 PONTO 4 – ZOOLOGICO DO PARQUE IGUAÇU

Para o Ponto 4, assim como para o Ponto 1, dois tipos de pré-processamento foram realizados, visto que ambos apresentaram resultados relevantes.

Para a PCA com pré-processamento centrado na média, a variância explicada em PC1 e PC2 foi de 89,55%. Todavia, o gráfico de escores (Figura 4.17a) apresentou somente uma tendência em alocar indivíduos machos em PC1 negativo e fêmeas em PC1 positivo. Esta separação foi ocasionada pela influência majoritária dos sinais em 3,45 ppm para machos e 3,48 ppm para fêmeas (Figura 4.17b).

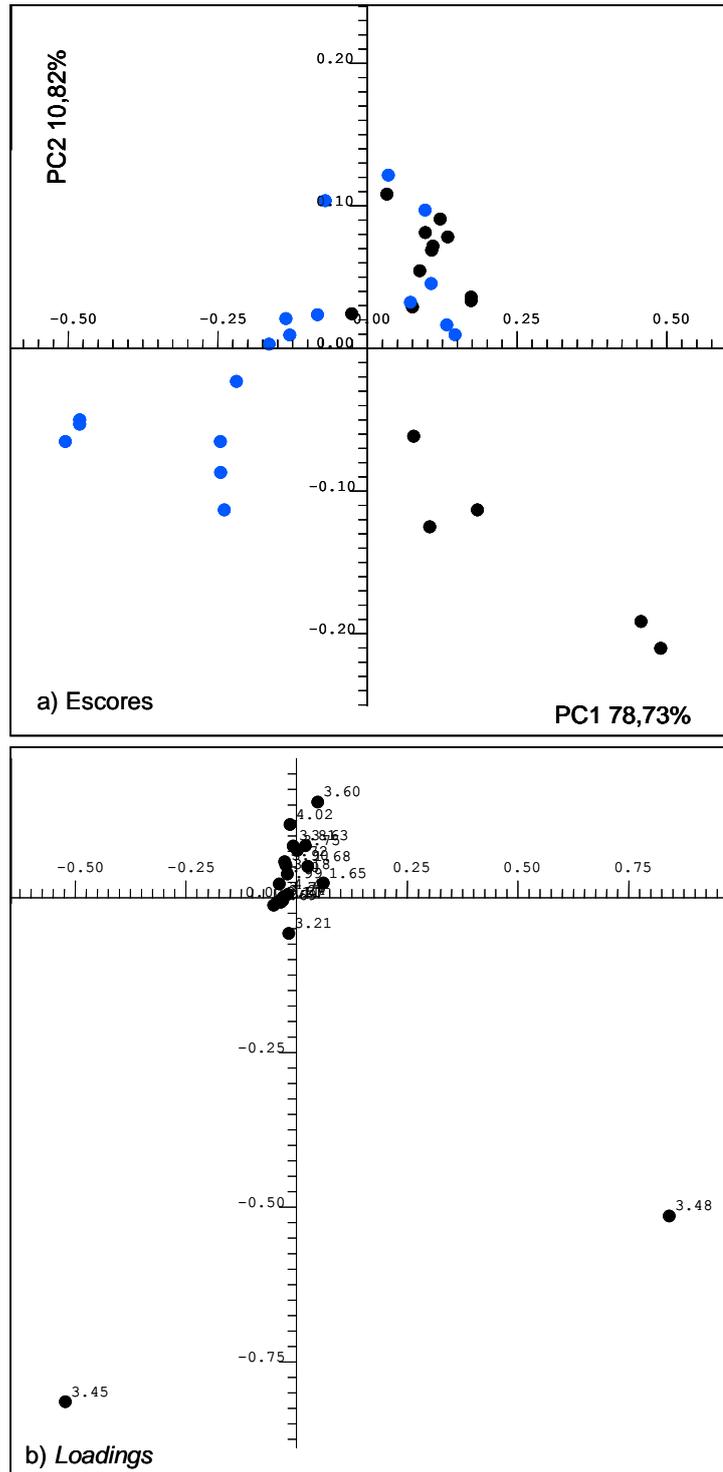


Figura 4.17 - a) Gráfico de escores da PCA das folhas de *A. angustifolia* do Ponto 4 , macho (em azul) e fêmea (em preto); b) Gráfico de *loadings* da PCA das folhas de *A. angustifolia* do Ponto 4, obtido a partir do pré-processamento centrado na média.

Por outro lado, com o pré-processamento autoescalonado, o gráfico de escores de PC1 e PC2 apresentou menor variância total, com 65,30% nos dois primeiros eixos. Porém a separação entre os sexos foi melhor observada ao longo de PC2, sendo negativo para machos e positivo para fêmeas (Figura 4.18a), mesmo com a fronteira pouco evidente entre os sexos. Tal qual para as variáveis do Ponto 1, diferentes *loadings* foram evidenciados (Figura 4.18b).

Deste modo, ambos os pré-processamentos foram empregados para as análises de KNN, visando avaliar a melhor classificação.

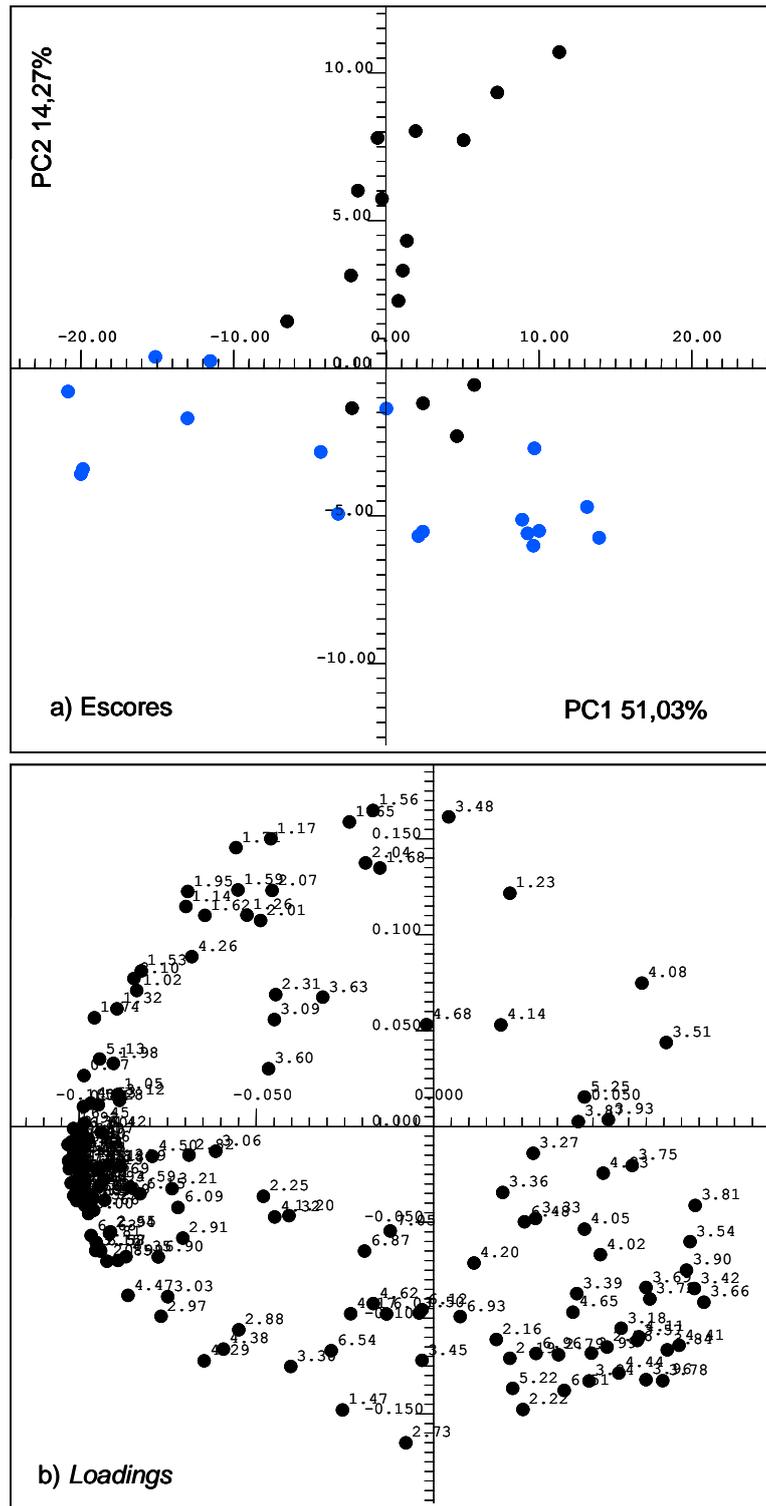


Figura 4.18 - a) Gráfico de escores da PCA das folhas de *A. angustifolia* do Ponto 4 , macho (em azul) e fêmea (em preto); b) Gráfico de *loadings* da PCA das folhas de *A. angustifolia* do Ponto 4, obtido a partir do pré-processamento autoescalonado.

A fim de observar o perfil de separação obtido quando somente os principais sinais observados nos *loadings* (3,45 e 3,48 ppm) são analisados, realizou-se a PCA com ambos os pré-processamentos para somente essa região dos espectros. Os gráficos de escores obtidos (Figura 4.19 e Figura 4.20) mostram que para o Ponto 4 a utilização dessa região espectral não foi suficiente para melhorar a separação entre machos e fêmeas.

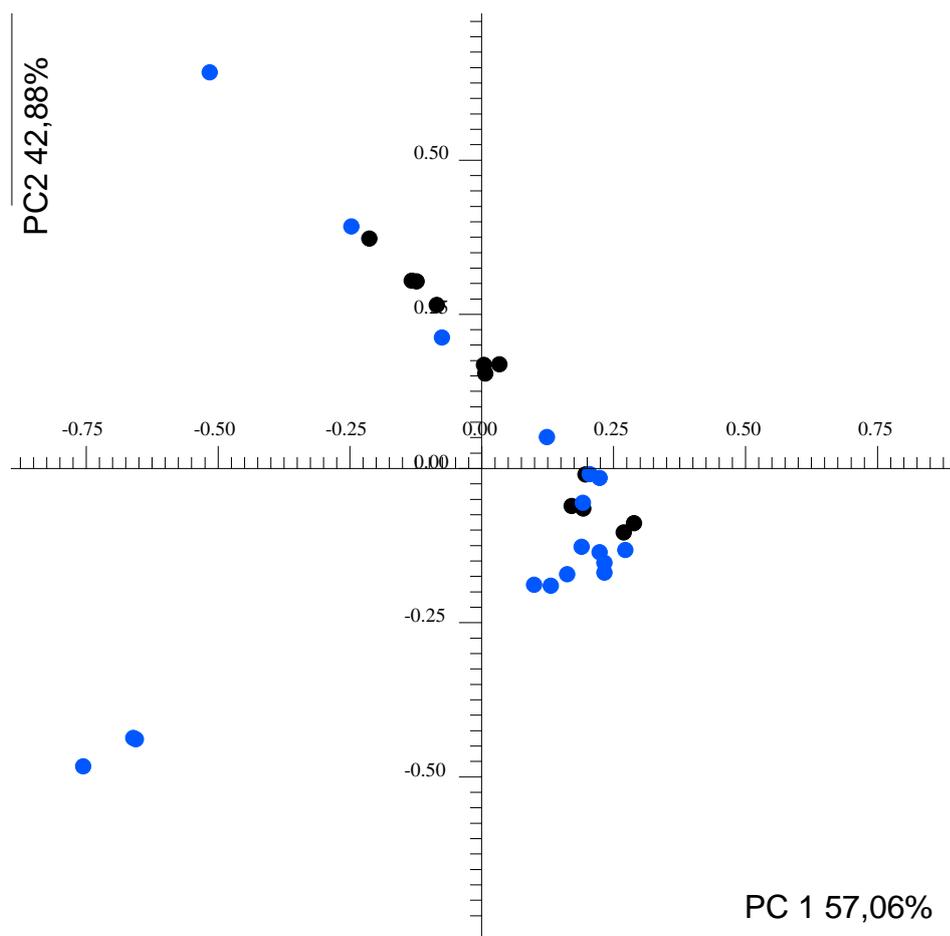


Figura 4.19 – Gráfico de escores da PCA das folhas de *A. angustifolia* macho (em azul) e fêmea (em preto) do Ponto 4, obtido a partir da região entre 3,43 e 3,49 ppm dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H com pré-processamento centrado na média.

Observa-se para o pré-processamento centrado na média o agrupamento de alguns machos em PC1 positivo, e uma região de correlação entre PC1 e PC2 na qual houve sobreposição de amostras machos e fêmeas, não sendo possível visualizar nenhuma fronteira entre os

sexos no espaço amostral. No entanto houve um aumento considerável na variância explicada em PC1 e PC2, comparando-se a PCA realizada com todos os sinais do espectro (PC1+PC2= 65,3%) e a PCA realizada com os sinais entre 3,43 e 3,49 ppm (PC1+PC2 = 99,94%).

Quando se comparam as PCAs obtidas com o pré-processamento autoescalonado verifica-se que a análise do espectro inteiro forneceu uma melhor separação entre machos e fêmeas, apesar de apresentar variância explicada inferior (PC1 51,03%; PC2 14,27%) à obtida com somente a região do espectral entre 3,43 e 3,49 ppm (PC1 53,88%; PC2 40,38%).

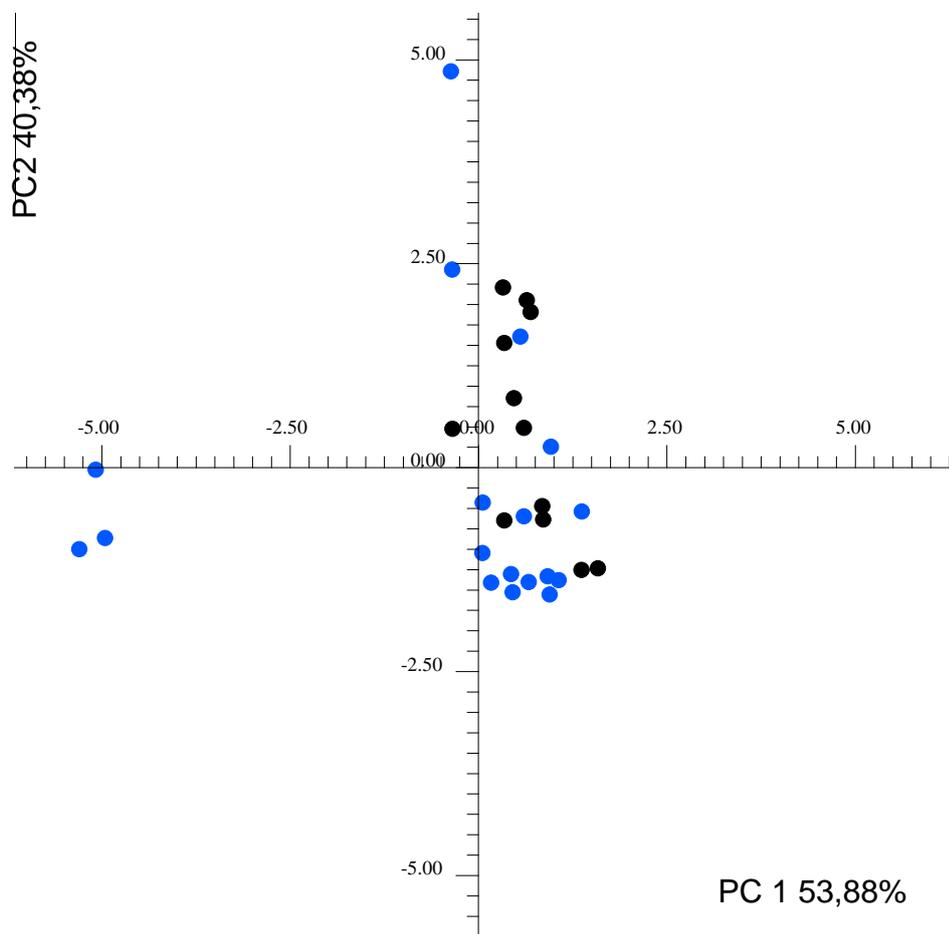


Figura 4.20 – Gráfico de escores da PCA das folhas de *A. angustifolia* macho (em azul) e fêmea (em preto) do Ponto 4, obtido a partir da região entre 3,43 e 3,49 ppm dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H , com pré-processamento autoescalonado.

4.2.1.5 PONTO 5 – PIRAQUARA

Para a PCA do Ponto 5 foi utilizado o pré-processamento centrado na média, e foi obtida uma variância explicada em PC1 e PC2 de 84,07%. Apesar de a variância explicada ter sido comparável aos valores obtidos para os Pontos 1 e 2, nos quais uma clara distinção entre os sexos e uma tendência de separação foram observadas, respectivamente, para o Ponto 5 a discriminação sexual por PCA não foi visualmente observada. O gráfico de escores (Figura 4.21) mostra que não foi possível visualizar nem mesmo uma tendência de separação entre as araucárias de sexos diferentes.

Considerando que no Ponto 5 as árvores coletadas estavam mais distantes entre si, chegando até a 2 km de distância entre as coletas, é possível inferir que existe uma maior variação nos fatores ambientais que podem influenciar nas características metabólicas da planta, em comparação aos demais pontos de coleta. Sendo assim é possível que características intrínsecas das árvores coletadas tenham inserido uma maior variabilidade na PCA, de modo que as similaridades metabólicas relacionadas ao sexo das árvores tenham sido suprimidas.

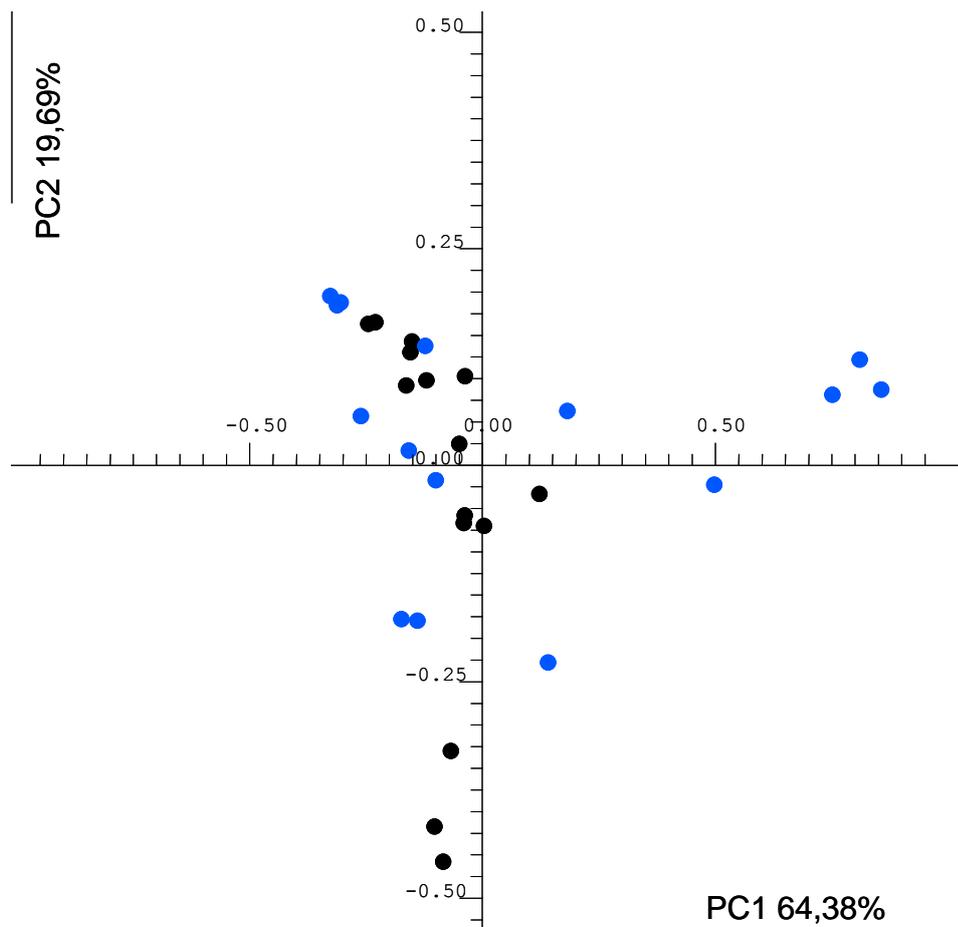


Figura 4.21 – Gráfico de escores de PCA das folhas de *A. angustifolia* do Ponto 5, macho (em azul) e fêmea (em preto), obtido a partir dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H .

Apesar de no gráfico de escores não ter sido possível a visualização da separação entre os indivíduos de sexo diferente, o gráfico de *loadings* revelou que os sinais importantes para a PCA foram os mesmos para todos os pontos de coleta (3,45; 3,48 ppm), demonstrando concordância com os resultados obtidos.

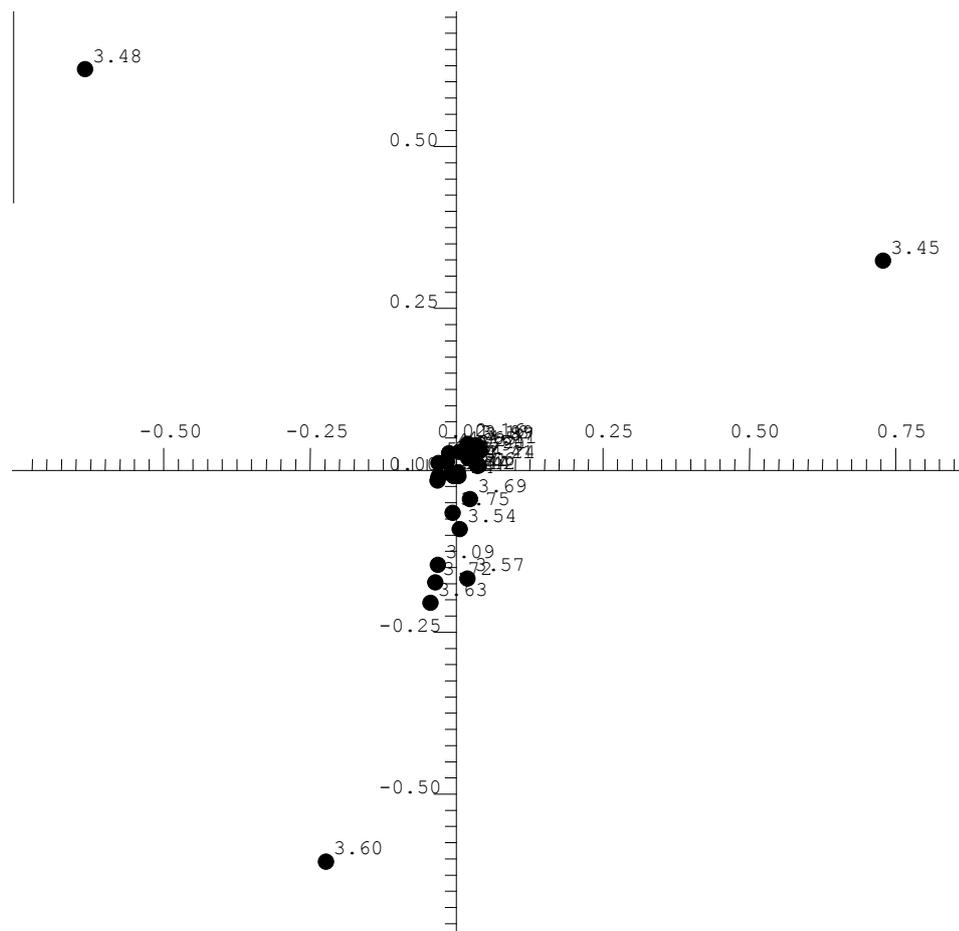


Figura 4.22 – Gráfico de *loadings* de PCA das folhas de *A. angustifolia* do Ponto 5, obtido a partir dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H .

A PCA para a região espectral entre 3,43 e 3,49 ppm foi obtida com o pré-processamento centrado na média. O gráfico de escores obtido é mostrado na Figura 4.22 e mostra que para o Ponto 5, assim como para os Pontos 2, 3 e 4, não houve melhora na separação entre os sexos. Isso corrobora que apesar dos sinais 3,45 e 3,48 ppm serem os sinais mais importantes para a separação entre os sexos no gráfico de *loadings*, existe a influência de outras regiões do espectro para que a separação entre os grupos seja mais efetiva.

Observou-se também que, de forma semelhante ao que aconteceu para os outros pontos de coleta, apesar de não ter sido possível observar visualmente a separação entre machos e fêmeas no gráfico de escores a variância explicada em PC1 e PC2 aumentou de 84,07% (PCA com toda a região espectral) para 99,71% (região entre 3,43 e 3,49 ppm).

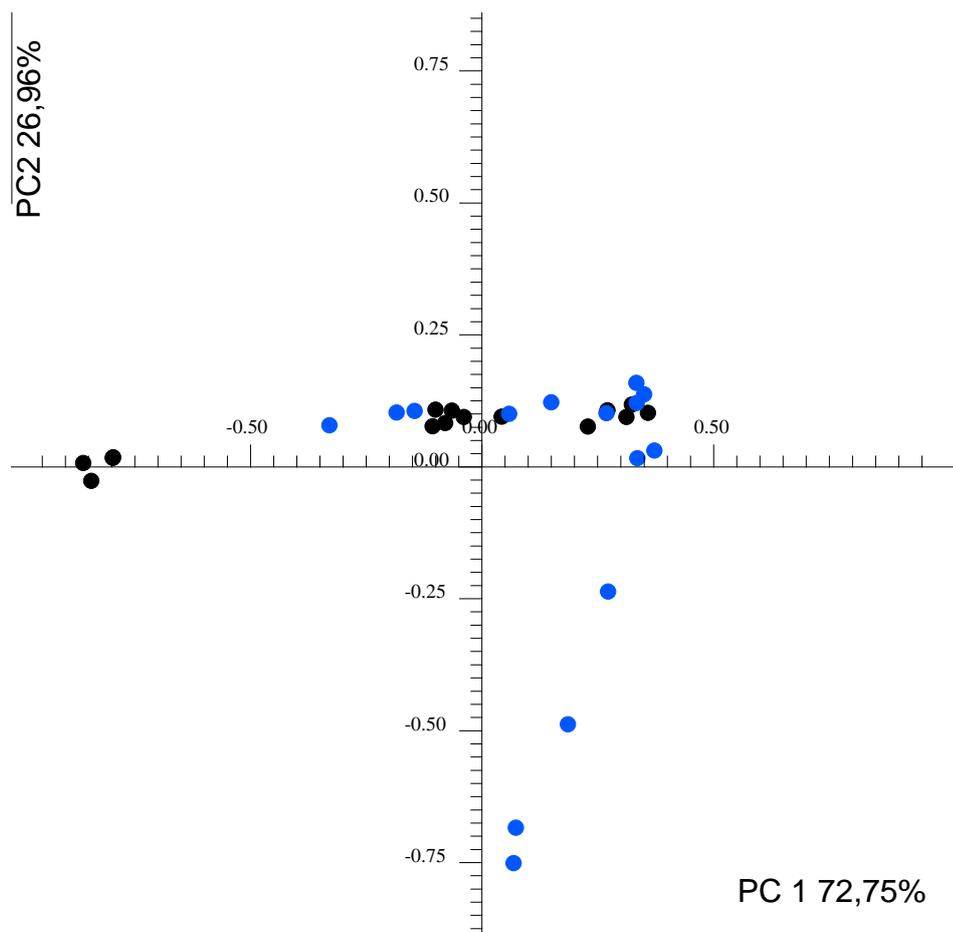


Figura 4.23 – Gráfico de escores da PCA das folhas de *A. angustifolia* macho (em azul) e fêmea (em preto) do Ponto 5, obtido a partir da região entre 3,43 e 3,49 ppm dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H .

4.2.2 RELAÇÃO ENTRE PONTOS DE COLETA E EXPRESSÃO SEXUAL DE ARAUCÁRIAS

Através das análises de PCA dos espectros de RMN HR-MAS obtidos para as amostras de *A. angustifolia* coletadas e das características locais de cada ponto de coleta, foi possível perceber uma relação entre a distância dos indivíduos coletados em cada ponto e o perfil metabólico da expressão sexual.

No Ponto 1 as árvores amostradas estavam a poucos metros de distância umas das outras. Por RMN HR-MAS de ^1H e quimiometria essas amostras apresentaram um excelente padrão de agrupamento entre indivíduos do mesmo sexo (Figura 4.6).

Nos Pontos 2 e 3 as árvores das quais foram coletadas as amostras estavam mais distantes entre si, com aproximadamente 300 m de distância umas das outras. No entanto, enquanto no Ponto 2 foi observada apenas uma tendência de separação (Figura 4.11), no Ponto 3 obteve-se o melhor percentual de variância explicada associada à excelente diferenciação entre os sexos (Figura 4.15a). Embora a distância entre os indivíduos nos pontos de coleta seja similar, o resultado obtido por PCA mostrou-se significativamente diferente, e considerando as características locais, uma diferença importante entre os pontos de coleta em questão é a maior densidade de outras espécies de plantas no Ponto 2.

A mesma tendência pode ser observada para o Ponto 4, onde a distância entre as árvores das quais amostras foram coletadas é maior e há grande densidade de outras plantas nesta região, ocasionando uma separação entre os sexos menos evidente (Figura 4.17a). Tal qual para o Ponto 5 que, mesmo não se tratando de região com grande densidade de plantas, a maior distância entre as árvores amostradas implicou numa PCA sem tendência visual de distinção dos grupos macho e fêmea (Figura 4.21).

Segundo Tanurdzic e Banks (2004), a expressão sexual em plantas é diversificada, podendo abranger desde cromossomos sexuais, como para *Marchantia polymorpha* e *Silene latifolia*, a regulação hormonal para *Zea mays* e *Cucumis sativa* e a comunicação química cruzada (feromônios) entre indivíduos de *Ceratopteris richardii*. De acordo com Durand e Durand (1984), a determinação do sexo de plantas superiores (Angiospermas e Gimnospermas) se dá no estágio da fertilização assim como para animais, quando ocorre a combinação dos genes para machos ou fêmeas no zigoto.

Machos ou fêmeas genéticas, por sua vez, desenvolvem hormônios reguladores dos fenótipos sexuais para a expressão das características secundárias. Nesse sentido, diversos trabalhos apresentam relatos dos hormônios reguladores da expressão sexual, tais como citocinina, giberilina, etileno e auxina, embora não exista especificidade, pois a relação entre a indução sexual e os hormônios depende da espécie da planta. Por exemplo, a administração de cinetina causa a feminilização de machos genéticos em *Vitis vinifera* (Negi e Olmo, 1966; Doazan e Cuellar, 1970) e a

masculinização de fêmeas genéticas em *Cannabis sativa* (Galoch, 1978); e a administração de ácido indol-3-acético (IAA) aumenta o percentual de fêmeas em mudas não enraizadas de *Cannabis sativa* (Chailakhyan e Khryanin, 1978) e causa a masculinização de fêmeas genéticas em *Mecurialis annua* cultivadas *in vitro* (Champault, 1969).

No caso das araucárias observou-se que nos locais em que os indivíduos coletados estavam mais distantes entre si houve maior região de sobreposição entre machos e fêmeas na PCA. Supõe-se que isso ocorra em função da menor indução hormonal devido à dificuldade na comunicação química cruzada (feromônios) à medida que cresce a separação geográfica entre os indivíduos macho e fêmea (araucárias dos Pontos 1, 3 e 5 sucessivamente). Do mesmo modo, para os indivíduos situados em locais em que havia grande densidade de outras plantas, a indução hormonal pode ter sido dificultada e as separações entre os sexos tornaram-se menos claras, mesmo que a distância entre os indivíduos coletados não seja tão grande, como no Ponto 4 por exemplo.

Adicionalmente, fatores ambientais como diferentes características do solo, disponibilidade de água, incidência solar, fotoperíodo, predação de espécies animais e vegetais, entre outros, bem como a variabilidade genética podem interferir na maior dispersão entre os agrupamentos em função da distância entre as araucárias coletadas.

Todavia, em todos os casos, os resultados obtidos por RMN HR-MAS de ^1H e quimiometria indicam que os mesmos marcadores químicos (perfis metabólicos) foram majoritariamente responsáveis pela diferenciação dos sexos das araucárias. Portanto, a completa elucidação destes indica fortemente uma alternativa para o conhecimento do sexo das árvores, mesmo quando esta ainda não tenha manifestado seus caracteres sexuais secundários (megastróbilos e microstróbilos).

4.2.3 TESTE DE CLASSIFICAÇÃO DE AMOSTRAS COM SEXO DEFINIDO ENTRE GRUPOS

Um teste foi elaborado com o objetivo de avaliar a robustez dos modelos criados diante das diferentes condições ambientais existentes em

diferentes pontos de coleta. Neste teste, foi utilizado o modelo criado com as amostras de um dado ponto de coleta para classificar as amostras dos outros quatro pontos de coleta, utilizando KNN.

Considerando que os gráficos de escores de PCA apontaram diferentes agrupamentos para cada ponto de coleta, tanto os modelos quanto os grupos de teste foram construídos de forma independente. Desta forma, os modelos são representativos desde situações em que há melhor tendência de agrupamento (Pontos 1 e 3) até situações nas quais os agrupamentos são menos evidentes (Pontos 2, 4 e 5).

Os percentuais de acerto para cada modelo juntamente com o seu grupo de teste correspondente são mostrados na Tabela 5. Foram obtidos diferentes percentuais de acerto para machos e fêmeas em cada modelo. No entanto, a partir do percentual total é possível correlacionar as características locais ao comportamento observado. Para isso, temos três situações distintas: baixa densidade arbórea para distâncias variáveis, densidade variável para distâncias constantes e alta densidade arbórea para distâncias variáveis.

Tabela 5 – Resultados do teste de classificação de amostras com sexo conhecido entre grupos de diferentes pontos de coleta, por KNN (K^{th} Nearest Neighbor).

Modelo/Número de vizinhos mais próximos utilizados (NN)	Grupo de Teste	Percentual de acerto (%)		
		Machos	Fêmeas	Geral
Ponto de Coleta 1/ 5NN	Teste 1	37,83%	89,39%	62,14%
Ponto de Coleta 2/ 1NN	Teste 2	34,43%	71,93%	52,54
Ponto de Coleta 3/ 3NN	Teste 3	68,00%	74,24%	70,92%
Ponto de Coleta 4 ^a / 1NN	Teste 4	79,41%	46,97%	63,43%
Ponto de Coleta 4 ^b / 1NN	Teste 4	77,94%	48,49%	63,43%
Ponto de Coleta 5/ 1NN	Teste 5	39,68%	74,65%	58,21%

a – pré-processamento centrado na média; b – pré-processamento autoescalonado

Para pontos de coleta onde a densidade arbórea é menor, o fator distância entre as árvores foi mais importante para corroborar a validade do modelo. O aumento da distância entre as araucárias (Pontos 1 e 3) aumentou o percentual de acerto para o conjunto de validação (62,14 e 70,92 %, respectivamente). No entanto, quando a distância entre as árvores coletadas era muito maior (5 km x 300m), houve decréscimo no percentual de acerto do modelo. Estes fatos podem ser explicados pela diminuição da especificidade do modelo com o aumento considerável da área amostrada, o qual passa a englobar uma grande quantidade de variáveis dependentes do ambiente, bem como potenciais variabilidades genéticas intrínsecas.

Para pontos de coleta em que a densidade arbórea é variável e a distância entre as araucárias amostradas é a mesma (Pontos 2 e 3), houve um ganho de acerto nos modelos quando a densidade de outras plantas é menor (52,54 e 70,92 % para os Pontos 2 e 3, respectivamente). Diferentemente do que foi exposto para distâncias variáveis, a dispersão na comunicação cruzada imposta pela maior densidade de organismos vegetais distintos produz competições ambientais naturais, visto que plantas diferentes produzem sinalizadores químicos diversos, o que pode induzir uma maior variabilidade nos metabólitos da planta.

Por outro lado, quando as araucárias estão dispostas em alta densidade de plantas para distâncias variáveis (Pontos 2 e 4), o modelo no qual as árvores coletadas eram mais distantes obteve o maior percentual de acerto (52,54 e 63,43% para os grupos 2 e 4, respectivamente). Isso pode ser atribuído ao fato de que árvores mais distantes englobam maiores variabilidades genéticas e ambientais, de modo que o modelo do Ponto 4 foi capaz de prever com maior índice de acerto o sexo de amostras dos outros pontos de coleta.

4.2.4 PREDIÇÃO DE ARAUCÁRIAS JOVENS COM SEXO INDEFINIDO

Os cinco modelos criados com amostras de araucária com sexo conhecido foram utilizados para prever o sexo de dez árvores jovens sem expressão sexual observável (ausência dos órgãos reprodutores).

Todas as amostras foram coletadas no estado do Paraná, exceto a amostra nomeada “i8a” que foi coletada no campus Samambaia da UFG.

Os resultados da predição por KNN dos indivíduos jovens sem expressão sexual são mostrados na Tabela 6.

Tabela 6 – Predição do sexo de indivíduos jovens de araucária sem expressão sexual observável por KNN, nos cinco modelos criados.

Amostra	Ponto 1 5NN	Ponto 2 1NN	Ponto 3 3NN	Ponto 4 1NN	Ponto 5 1NN	Sexo
i1A	M	M	M	M	M	M
i6A	M	F	M	M	M	M
i6B	F	F	F	M	F	F
i6C	M	F	M	M	M	M
i6D	F	F	M	M	M	M
i6E	F	M	F	M	M	M
i6F	F	F	F	M	M	F
i7A	F	M	M	M	F	M
i7B	F	M	F	M	F	F
i8A	M	M	M	M	F	M

De todas as amostras testadas somente uma apresentou concordância em sua predição perante todos os modelos testados. Para as outras árvores a indicação do sexo foi feita por meio da classificação majoritária entre os modelos testados.

A amostra i1a foi coletada na Av. Nossa Senhora da Luz (Ponto 1), e foi a única que apresentou 100% de concordância na predição de seu sexo em todos os modelos testados.

Dentre as amostras do Ponto 6 as amostras i6a, i6b e i6c foram preditas respectivamente como macho, fêmea e macho em quatro dos cinco modelos testados. Já as amostras i6d e i6e foram preditas majoritariamente como macho, enquanto a amostra i6f foi majoritariamente fêmea para três dos cinco modelos.

Dentre as amostras do Ponto 7, a amostra i7a foi predita majoritariamente como macho em três dos cinco modelos, enquanto a amostra i7b foi considerada majoritariamente fêmea na mesma proporção.

A amostra i8a, que é a árvore coletada na UFG, foi predita majoritariamente como macho.

Apesar da árvore da UFG estar sujeita a condições de clima, incidência solar, solo, predadores, etc, bastante distintas em relação às aquelas coletadas no Estado do Paraná, observou-se grande semelhança entre os perfis metabólicos obtidos por RMN HR-MAS (Figura 4.24). Em todas as amostras de árvores jovens analisadas foi possível observar o simpleto na região de 3,4 ppm, e a pequena variação em seu deslocamento (entre 3,45 e 3,48 ppm) a qual se mostrou bastante importante na separação entre machos e fêmeas nos modelos testados.

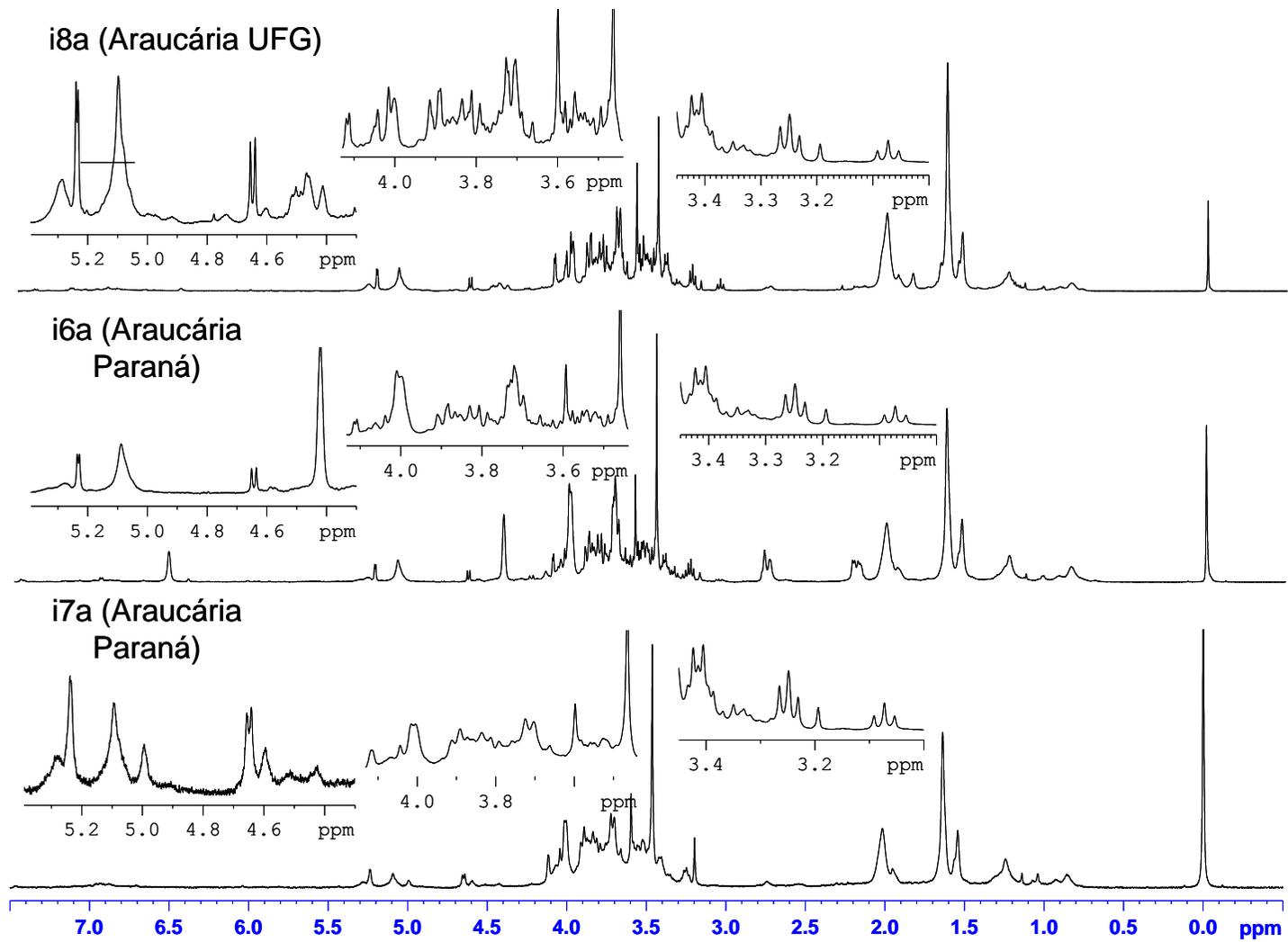


Figura 4.24 – Comparação dos perfis metabólicos da árvore coletada na UFG e das árvores coletadas no Paraná.

Através da análise da Figura 4.24 é possível observar que existem algumas diferenças nas intensidades e proporções de alguns sinais.

Na região entre 0,7 e 1,9 ppm não foram identificadas diferenças significativas entre as amostras obtidas no Paraná e em Goiás.

Na região entre 1,9 e 3,0 ppm observa-se, no espectro da amostra coletada na UFG (i8a), que os duplo-dubletos em 2,21 e 2,76 ppm possuem intensidade baixa em relação aos outros sinais de modo que quase não são perceptíveis. No espectro obtido da amostra i6a estes sinais são bastante proeminentes, apesar do sinal em 2,21 ppm não ter mostrado sua multiplicidade claramente. Já para a amostra i7a, estes sinais possuem intensidade relativa semelhante à obtida para a araucária da UFG.

Na região entre 3,0 e 3,46 ppm verifica-se a presença dos mesmos sinais, independentemente do local de coleta. Na região entre 3,4 e 4,1 ppm notam-se diferenças na proporção da intensidade dos sinais em 3,45 e 3,60 ppm entre as amostras i6a (2:1) e as amostras i7a e i8a (1,5:1).

A região entre 4,3 e 5,4 ppm mostra diferenças significativas entre as amostras em questão, podendo estar relacionada a diversos fatores que não foram mensurados neste trabalho.

Percebe-se então que as diferenças observadas entre as amostras coletadas em Goiás e no Paraná não são maiores do que as observadas entre as amostras coletadas em diferentes localidades dentro do mesmo estado. Isto reforça que os metabólitos observáveis através da análise de RMN HR-MAS de ^1H são comuns independentemente do local de coleta da araucária.

Considerando que a determinação do sexo ocorre na fertilização (Durand e Durand, 1984), todas as células subseqüentes também vão conter essa informação, a qual age desde cedo na planta e que poderá ser observada principalmente quando os caracteres sexuais secundários aparecem, ou quando os órgãos reprodutores se desenvolvem.

Apesar de só ter havido concordância entre todos os modelos na classificação de uma amostra (i1a), é possível verificar que a metodologia proposta pode ser utilizada como um meio de predizer o sexo de araucárias jovens, mesmo que o percentual de acerto não seja de 100%. Através da

otimização deste método e de um maior controle de variáveis que não foram mensuradas neste trabalho (como a idade da planta) pode ser possível obter percentuais de acerto maiores, aumentando a confiabilidade deste método.

5. CONCLUSÕES

Os espectros de RMN de ^1H e experimentos bidimensionais obtidos através da utilização da sonda HR-MAS apresentam boa resolução e sensibilidade, e possibilitam a visualização de sinais com deslocamento químico diferentes (3,48 ppm para as araucárias fêmeas e 3,45 para araucárias macho), os quais foram os principais responsáveis pela diferenciação do sexo nos experimentos de PCA. Esta variação no deslocamento químico dos sinais está relacionada a pequenas diferenças estruturais, ou ainda a diferenças no pH endógeno das plantas de sexo diferente.

Apesar de existirem regiões do espectro com grande sobreposição de sinais alguns metabólitos já foram identificados. A elucidação do composto responsável pela separação dos sexos está em andamento.

A avaliação da abrangência (robustez) dos modelos desenvolvidos mostrou que, de modo geral, as diferenças metabólicas relacionadas a características ambientais, individuais e experimentais não foram suficientes para suprimir as características relacionadas ao sexo, de modo que os percentuais de acerto na predição do sexo das amostras entre grupos variou entre 52,54% (Ponto 2) e 70,92% (Ponto 3) (Tabela 5).

Quanto à predição das árvores jovens sem expressão sexual observável foi possível prever o sexo através da comparação de seu perfil metabólico com o de plantas com sexo conhecido através da utilização do teste KNN (Tabela 5). Apesar de ter havido 100% concordância entre os cinco modelos testados apenas para uma das amostras, o mínimo de concordância obtido foi de 60% (3 entre 5 modelos).

6. Referências Bibliográficas

Alcantara, G.B. Aplicação das técnicas espectroscópicas de RMN e IV e de métodos quimiométricos na quimiotaxonomia de líquens. Tese de Doutorado. UFSCar, 2007.

Alcantara, G.B.; Honda, N. K.; Ferreira, M. M. C., Ferreira, A. G. Chemometric analysis applied in ¹H HR-MAS NMR and FT-IR data for chemotaxonomic distinction of intact lichen samples. *Analytica Chimica Acta*, n. 595, 3-8, 2007.

Amaral, A.C.B.; Ferreira, M.; Bandel, G. Variação da densidade básica da madeira produzida pela *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze no sentido medula-casca em árvores do sexo masculino e feminino. *IPEF, Piracicaba*, n. 2/3, p. 119-127, 1971.

Balbuena, T.S.; Silveira, V.; Junqueira, M.; Dias, L. L. C.; Santa-Catarina, C.; Shevchenko, A., Floh, E. I.S. Changes in the 2-DE protein profile during zygotic embryogenesis in the Brazilian Pine (*Araucaria angustifolia*). *Journal of Proteomics*, n. 72, p.337– 352, 2009.

Bandel, G. Os cromossomos da *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. e da *Araucaria araucana* (Molina) Kovich. *O Solo*, n. 2, p. 69 – 72, 1970.

Bandel, G.; Gurgel, J.T.A. Proporção do sexo em Pinheiro Brasileiro. *Silvicultura em São Paulo*, v. 6, p. 209 – 220, 1967.

Banzatto, A.C.; et al. Variação da densidade básica da madeira de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. *O Solo*, n. 2, p. 43-45. 1969.

Bespalhok, J. C. F., Guerra, E. P., Oliveira, R. Sistemas Reprodutivos de Plantas Cultivadas. In: Bespilhok F., J.C.; Guerra, E.P.; Oliveira, R. Melhoramento de Plantas. Disponível em <http://www.bespa.agrarias.ufpr.br/paginas/livro/capitulo%204.pdf>, p. 11-18, 2007. Acesso em: 03 de out. de 2012.

Chailakhyan, M. Kh.; Khryanin, V.N. The role of roots in sex expression in hemp plants. *Planta*, v. 138, p. 185 - 187, 1978.

Champault, A. Masculinisation d'inflorescences femelles de *Mercurialis annua* L. (2n - 16) par culture *in vitro* de noeuds isolés en présence d'auxines. *C.R. Acad. Sci. Paris Ser. D.*, v. 269, p. 1948 - 1950, 1969.

Creek, D. J.; Jankevics, A.; Breitling, R.; Watson, D. G.; Barrett, M. P.; Burgess, K. E. V. Toward Global Metabolomics Analysis with Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography Mass Spectrometry: Improved Metabolite Identification by Retention Time Prediction. *Analytical Chemistry*, v. 83, n. 2, p.8703-8710, 2011.

Doazan, J. P.; Cuellar, V. Modification artificielle de l'expression du sexe dans le genre *Vitis*. *Annual Amelior. Plant.*, v. 20, p. 79 - 86, 1970.

Durand, R.; Durand, B. Sexual differentiation in higher plants. *Physiologia Plantarum*, v. 60, p. 267-274, 1984.

Franco, A. C.; Duarte, H. M.; Geßler, A.; Mattos, E. A. de; Nahm, M.; Rennenberg, H.; Ribeiro, K. T.; Scarano, F. R.; Lüttge, U. In situ measurements of carbon and nitrogen distribution and composition, photochemical efficiency and stable isotope ratios in *Araucaria angustifolia*. *Trees – Structure and Function*, v. 19, n. 4, p.422-430, 2005.

Galoch, E. The hormonal control of sex differentiation in dioecious plants of hemp (*Cannabis sativa*). *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*. XLVII, p. 135 - 161, 1978.

Guerra, M. P. et al. Evolução, ontogênese e diversidade genética em *Araucaria angustifolia*. In: Rosa Lia Barbieri; Elisabeth Regina Tempel Stumpf. (Org.). *Origem e Evolução de Plantas Cultivadas*. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2008, v., p. 149-184.

Handro, W.; Astarita, L. V.; FLOH, E. I. S. Free amino acid, protein and water content changes associated with seed development in *Araucaria angustifolia*. *Biologia Plantarum* v.47, n.1, p. 53-59, 2003/4.

Jègou, C.; Culioli G.; Kervarec, N.; Simon, G.; Stiger-Pouvreau, V. LC/ESI⁺ and 1H HR-MAS NMR analytical methods used as useful taxonomical tools within the genus *Cytoseira* C. Agardh (Fucales; Phaeophyceae). *Talanta*, v. 83, n.2, p.613-622, 2010.

Kim, H. K., Choi, Y. H., Verpoorte, R. NMR-based metabolomics: where do we stand, where do we go? *Trends in Biotechnology*, v. 29,

n. 6, p. 267 - 275, 2011.

Kim, H. S.; Kim, S. W.; Park, Y. S., Kwon, S. Y., Liu, J. R.; Joung, H.; Jeon, J. H. Metabolic Profiles of Genetically Modified Potatoes using a Combination of Metabolite Fingerprinting and Multivariate Analysis. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, v. 14, p.738-747, 2009.

Kirk, H.; Cheng D.; Choi, Y. H.; Vrieling, K.; Klinkhamer P. G. L. Transgressive segregation of primary and secondary metabolites in F2 hybrids between *Jacobaea aquatica* and *J. vulgaris*. *Metabolomics*, n. 8, p. 211-219, 2012.

Koscinski, M. O pinheiro brasileiro na Silvicultura Paulista. São Paulo. Secretaria da Agricultura. Diretoria de Publicidade Agrícola, p. 56, 1934.

Lião, L.M. et al Perfil químico de cultivares de feijão (*phaseolus vulgaris*) pela técnica de *high resolution magic angle spinning* (HR-MAS). *Química Nova*, v.33, n. 3, 2010.

Maack, R. Geografia física do Estado do Paraná. Curitiba: Banco de Desenvolvimento do Paraná / UFPR / Instituto de Biologia e Pesquisas Tecnológicas, 1968. 350 p.

Machado, S. do A.; Siqueira, J.D.P. Distribuição natural de *Araucaria angustifolia*(Bert.) O. Ktze. In: IUFRO MEETING ON FORESTRY PROBLEMS OF THE GENUS ARAUCARIA, 1., 1979, Curitiba. *Forestry problems of the genus Araucaria*. Curitiba: FUPEF, 1980. p.4-9.

Murakami, M. H. Identificação de Marcador Molecular Ligado à Expressão Sexual em *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. Curitiba, 2002. 63p. Dissertação (Mestrado) - UFPR

Negi, S. S.; Olmo, H.P. Sex conversion in a male *Vitis vinifera* L. by a kinin. *Science*, v. 152, p. 1624 - 1625, 1966.

Neto, B. B.; Scarminio, I. S.; Bruns, R. E. Como fazer experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. 4. ed. Porto Alegre, Bookman, 2010.

Pérez, E.M.S. ; Iglesias, M. J.; Ortiz, F. L.; Pérez, I. S.; Galera, M. M. Study of the suitability of HRMAS NMR for metabolic profiling of tomatoes: Application to tissue differentiation and fruit ripening. *Food Chemistry*, v. 122, p. 877-887, 2010.

Pinto, S.A.A. Influência da dioicia no diâmetro e na altura de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. e suas implicações na formação de áreas

de produção de sementes na região de Quedas do Iguaçu. Curitiba, Paraná, 1979. p.61 Dissertação (Mestrado), Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.

Shymoia, C. Contribuição ao estudo do ciclo biológico da *Araucaria angustifolia*(Bert.) O. Ktze. In: *Experientiae*, v. 2, n. 2, p. 519 - 540, 1962.

Silva, H. D.; Bellote, A. F. J.; Ferreira, C. A.; Bognola, I. A. Recomendação de solos para *Araucaria angustifolia* com base nas suas propriedades físicas e químicas. Boletim de Pesquisa Florestal, Colombo, n. 43, p. 61-74, 2001.

Simões, C. M. O.; Freitas, A. M.; Almeida, M. T. R.; Andrighetti-Fröhner, C. R.; Cardozo, F. T. G. S.; Barardi, C. R. M.; Farias, M. R. Antiviral activity-guided fractionation from *Araucaria angustifolia* leaves extract. Journal of Ethnopharmacology, n. 126, p. 512 – 517, 2009.

Souza de, V. A. ; et al. Sistemas de produção, n. 7, 2a edição, Versão eletrônica, 2010. Disponível em http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Araucaria/CultivodaAraucaria_2ed/; acesso em 01/07/2012.

Tanurdzic, M.; Banks, J. A. Sex-determining Mechanisms in Land Plants. The Plant Cell, n. 16, p. S61 - S71, 2004.

Vyskot e Hobza, Sex-Determining Mechanisms in Land Plants. Trends in genetics, v. 20, n. 9, p. 432-438, 2004.

Wen, H.; Kang, S.; Song, Y.; Song, Y.; Sung, S. H.; Park, S. Differentiation of Cultivation Sources of *Ganoderma lucidum* by NMR-based Metabolomics Approach. Phytochemical Analysis, n. 29, p. 73-79, 2010.

Zhao, J.; Avula, B.; Chan, M.; Clément C.; Kreuzer, M.; Khan, I. A. Metabolomic Differentiation of Maca (*Lepidium meyenii*) Accessions Cultivated under Different Conditions Using NMR and Chemometric Analysis. Planta Medica, n. 78, p.90-101, 2012.

Yamaguchi, L. F.; Kato, M. J.; Mascio, P. Di; Biflavonoids from *Araucaria angustifolia* protect against DNA UV-induced damage. Phytochemistry, v. 70, p. 615-620, 2009.

Yamaguchi, L.F.; Kato, M.J. Diurnal and seasonal changes in biflavonoids biosynthesis in *Araucaria angustifolia* needles. Global Journal of Biochemistry, n. 3, p. 1-7, 2012.