

## Diversidade química em diversas espécies de pequenos frutos

Alexandre Foito<sup>1</sup>, Regina Menezes<sup>2,3</sup>, Artem Sorokin<sup>5</sup>, Pilar Banados<sup>6</sup>, Lingsheng Wang<sup>7</sup>, Sabine Freitag<sup>1</sup>, Ines Costa<sup>2</sup>, Carolina Jardim<sup>2</sup>, Goncalo Garcia<sup>2</sup>, Rita Ramos<sup>2</sup>, Cláudia N. Santos<sup>2,3</sup> & Derek Stewart<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Environmental and Biochemical Sciences, The James Hutton Institute, Invergowrie, DD2 5DA Dundee, Scotland, UK. [alexandre.foito@hutton.ac.uk](mailto:alexandre.foito@hutton.ac.uk)

<sup>2</sup>Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica, Lisboa

<sup>3</sup>Instituto de Tecnologia Química e Biológica António Xavier, Lisboa

<sup>4</sup>School of Engineering and Physical Sciences, Heriot Watt University, Edimburgo, Escócia

<sup>5</sup>Vavilov All-Russian Research Institute of Plant Industry, Bolshaya Morskaya, St. Petersburg, Russia

<sup>6</sup>Pontificia Universidad Católica de Chile, Avenida Libertador Bernardo O'Higgins, Chile

<sup>7</sup>Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Nanxincun, Xiangshan, Beijing, China

### Resumo

Historicamente, as plantas têm sido utilizadas não só como uma fonte importante de nutrientes e energia na dieta humana, mas também como uma fonte de compostos fitoquímicos com aplicação na medicina moderna e tradicional. Estimativas atuais sugerem que o reino Plantae produz cerca de 200 000 compostos químicos diferentes, muitos deles com potenciais aplicações medicinais. Isto reflete-se no elevado número de medicamentos produzidos com base em compostos fitoquímicos como o Paclitaxel e diversos opióides. Entre as diversas classes de compostos químicos produzidos por plantas, os (poli)fenóis destacam-se pela sua enorme diversidade e pela sua presença num elevado número de plantas. A presença de certos (poli)fenóis encontra-se associada à bioactividade para várias doenças cardiovasculares e neurodegenerativas e, em anos recentes, este fato tem ganho interesse científico e popular. Os pequenos frutos encontram-se entre os alimentos mais ricos e diversos em compostos (poli)fenólicos. Apesar de existirem inúmeras publicações científicas focadas em espécies individuais ou (poli)fenóis específicos, existe um número muito limitado de publicações que incluem a caracterização química simultânea de pequenos frutos de diferentes espécies. Neste estudo, serão apresentados os resultados de uma caracterização metabólica de 112 espécies/variedades que incluem espécies dos géneros *Rubus*, *Ribes*, *Vaccinium*, *Lonicera*, entre outras. A caracterização química foi realizada com recurso a uma análise de espectrometria de massa que inclui 1506 e 384 massas únicas, em modos positivo e negativo, respetivamente. Esta abordagem, em conjunto com dados de bioatividades, constitui uma ferramenta poderosa com potencial para descobrir novos (poli)fenóis em pequenos frutos, com bioatividades para várias doenças.

**Palavras-chave:** *Rubus*, Polifenóis, Diversidade, Bioatividade.

### Abstract

Historically, plants have been used not only as an important source of nutrients and energy in human diet but also an important source of phytochemicals with

application in modern and traditional medicine. The Plantae kingdom has been estimated to produce up to 200.000 different chemical compounds, which include compound with potential medical applications. This can be reflected in the high number of pharmaceuticals produced based in plant natural products, such as Paclitaxel and several opioids. Among the different classes of secondary metabolites (poly)phenols stand out due to their sheer diversity and ubiquity in the plant kingdom. The presence of such compounds has often been associated with potential bioactivities for several cardiovascular and neurological diseases, which in recent years, has led to an increased interest from the scientific community and the general public. Berry fruits, in particular, are among the most (poly)phenol-rich foods available not only in quantity but also diversity. Despite several publications focusing in individual species or specific (poly)phenolic compounds, there is a limited body of literature documenting a broad-scale profiling of a diverse sample-set of species. In the present study, the results of a high-throughput metabolic profiling of 112 species/varieties from diverse genera (*Rubus*, *Ribes*, *Vaccinium*, etc) will be presented. The metabolomic profiling approach (LC-MS) resulted in the characterisation of 1506 and 384 unique mass spectral features for positive and negative modes, respectively. Using an unsupervised statistical analysis, most chemically diverse extracts were selected for bioactivity screening. The bioactivity data combined with an untargeted dataset was then utilised as a powerful tool for bioprospecting novel bioactive (poly)phenolics for several diseases.

**Keywords:** *Rubus*, Polyphenols, Diversity, Bioactivity.

### Introdução

Os (poli)fenóis constituem uma classe vasta de metabolitos secundários caracterizados pela sua presença num elevado numero de espécies de plantas. Os pequenos frutos, em particular, encontram-se entre os alimentos mais ricos e diversos em compostos (poli)fenólicos. Apesar de existirem inúmeras publicações científicas focadas em espécies individuais ou (poli)fenóis específicos, um número muito limitado inclui a caracterização química simultânea de pequenos frutos de diferentes espécies. Adicionalmente, a presença de certos (poli)fenóis encontra-se associada à bioatividade para várias doenças cardiovasculares e neurodegenerativas e, em anos recentes, este fato tem ganho interesse científico e popular. Apesar de um aumento significativo no número de artigos documentando a bioatividade de diversos compostos presentes em pequenos frutos, a descoberta de novos compostos bioativos pode ser limitada pela influência do conhecimento *a priori* da composição química dos extratos testados e pela quantificação relativa de cada composto presente no extrato. Esta influência, pode induzir o investigador a focar-se numa subclasse de compostos em detrimento de outras ou focar-se nos compostos de maior abundância no extrato. O desenvolvimento de metodologias para análise metabolómica com recurso a algoritmos e processamento automático permite reduzir a influência do investigador na descoberta de potenciais compostos bioativos. Este estudo tem o objetivo de identificar novos compostos com potencial bioatividade através da caracterização metabolómica de diferentes espécies de pequenos frutos.

### Materiais e métodos

*Amostragem e extração* - Aproximadamente 200 g de pequenos frutos de 112 espécies/variedades dos géneros *Rubus*, *Ribes*, *Vaccinium*, *Lonicera*, *Aristotelia*, *Berberis*, *Ugni* e *Lycium* foram recolhidos em diversas localizações (Chile, China,

Portugal, Reino Unido e Rússia). Após recolha, as amostras foram transferidas e mantidas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  até ao momento de extração. Para cada 50 g ( $\pm 1$  g) de cada espécie de fruto congelado foram adicionados 150 mL de uma solução fria ( $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) de metanol (0,2% ácido fórmico) contendo 50 ppm de morin. O método de extração para análise de bioatividade é semelhante, com a omissão de morin. As amostras foram subsequentemente homogeneizadas num liquidificador à prova de solvente, seguido de filtração para remover o material insolúvel. Os extratos foram alíquotados (1 mL), o solvente removido utilizando-se um *speed-vac* e a fase aquosa liofilizada. As alíquotas foram mantidas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  até a análise por espectrometria de massa, para evitar degradação dos compostos químicos presentes nos extratos.

*Análise por espectrometria de massa* – Três alíquotas de cada amostra foram ressuspendidas em 2 mL de metanol:dH<sub>2</sub>O:ácido fórmico (75:25:0.1) e 500  $\mu\text{L}$  foram subsequentemente filtrados em frascos de HPLC e transferidos para o *autosampler*. As amostras foram subsequentemente analisadas num sistema de espectrometria de massa associada à cromatografia líquida (LC-MS), em modo positivo e negativo, ao longo de um total 18 sequências. O sistema utilizado inclui uma bomba quaternária (Agilent 1260), um detetor *diode array* (DAD) (Agilent 1260), termostato (Agilent 1290) associado a um espectrómetro de massa Agilent 6224 ToF. Um volume de 5  $\mu\text{L}$  de amostra foi injetado numa coluna C18 (Phenomenex 2x150mm 4  $\mu\text{m}$ ). As amostras e a coluna foram mantidas a 4 e 30  $^{\circ}\text{C}$ , respetivamente, durante o processo de análise. As amostras foram corridas num gradiente de dH<sub>2</sub>O para acetonitrilo durante 40 min a um *flow rate* de 0.3 ml.min<sup>-1</sup>, como descrito em Mazur et al., 2014.

*Processamento de dados* – O *Profiler* versão B.06.00 (Agilent) foi utilizado para análise dos resultados de LC-MS. Este método permite a extração de características cromatográficas de pequenas moléculas, o alinhamento de cromatogramas, a compilação de métodos de processamento e a integração de picos cromatográficos de forma automática. A extração de características cromatográficas foi restrita a banda entre 2.1-38mins da cromatografia com intensidades superiores a 6000 e potenciais adutos de H<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> para modo positivo, e -H e Cl<sup>-</sup> para modo negativo. Um total de 1506 e 384 massas únicas foram adquiridas em modos positivo e negativo, respetivamente.

*Análise estatística* – A análise multivariada foi utilizada para analisar o conjunto de dados (utilizando uma transformação logarítmica) do modo positivo e do modo negativo utilizando GenStat v15.3.0.9425. A Análise do Componente Principal (*Principal Component Analysis* - PCA) foi escolhida como método não supervisionado para a análise dos perfis metabolómicos das diferentes espécies analisadas. O PCA da análise metabolómica em modo positivo foi efetuado utilizando dados relativos a três triplicados técnicos para 112 espécies/variedades diferentes sem a inclusão de amostras de referência e brancos para 1506 variáveis obtidas em modo positivo. O PCA da análise metabolómica em modo negativo foi efetuado utilizando dados relativos a três triplicados técnicos para 112 espécies/variedades diferentes sem a inclusão de amostras de referência e brancos para 384 variáveis obtidas em modo negativo.

## Resultados e discussão

O processamento automático da caracterização metabolómica resultou na seleção e integração de 1506 e 386 picos cromatográficos nos modos positivo e negativo, respetivamente.

Os primeiros 4 componentes do PCA dos dados relativos ao modo positivo explicam 9.79, 7.59, 6.69 e 5.54% da variação respetivamente (fig. 1A e 1B). O

primeiro componente principal (PC) explica a separação entre *Aristotelia chilensis* e as restantes espécies, em particular *Rubus occidentalis* (cv Huron). O PC2 explica a separação entre *Berberis buxifolia* e *Vaccinium vitis-idaea*. Adicionalmente, o gráfico representando PC1 vs. PC2 (fig. 1A) permite diferenciar outras espécies como *Lonicera caerulea*, *Rubus armeniacus* e *Ribes fuscences* no PC2, ou várias espécies de *Rubus* (endémicas de Portugal) separadas de *Ugni molinae* e *Ribes spp.* (cv. Muravushka) no PC1. O PC3 indica uma clara separação entre *Vaccinium vitis-idaea*, *Ribes nevadense*, *Ribes spp.* (Chile), *Ugni molinae* e *Ribes grossularoides*, *Rubus occidentalis*, *Rubus spp.* (B13 and B14) e *Rubus loganobaccus* (cv. Loganberry) e as restantes amostras. O PC4 explica a separação entre *Lycium chinense*, *Vaccinium vitis-idaea*, *Rubus occidentalis*, *Ribes fuscensens*, *Ribes petraeum*, *Ribes nevadense*, *Ribes spp.* (644217), *Ugni molinae* e *Ribes grossularoides* das restantes amostras.

Os primeiros 4 componentes do PCA dos dados relativos ao modo positivo explicam 13.20, 10.30, 10.20 e 7.66% da variação respectivamente (fig. 2A e 2B). O primeiro componente principal (PC) explica a separação entre *Aristotelia chilensis* e *Ugni molinae*, e as restantes espécies, em particular *Rubus occidentalis*. O PC2 explica a separação entre *Aristotelia chilensis* e as restantes amostras, em particular *Ribes grossularia* (9492). O PC3, no entanto, explica a separação entre *Rubus fruticosus agg.* (cv. Ashton Cross), *Ribes fuscences*, *Ribes bethmontii*, *Ribes spp.* (Chile), *Rubus spp.* (espécies endémicas de Portugal) e as restantes amostras. O PC3 vs. PC4 explica a separação *Ribes spp.* (Chile, 2292, 1126), *Ribes fuscences*, *Vaccinium vitis-idaea*, *Ribes petraeum*, *Ribes rubrum*, *Ribes saundersii*, *Ribes bethmontii*, *Ribes nevadense*, *Rubus fruticosus agg.* (Fantasia e Aston Cross), *Rubus spp.* (espécies endémicas de Portugal, B14) e as restantes amostras.

Os primeiros 4 componentes do PCA da análise metabolómica em modo positivo e negativo que explicam 29.61 e 41.36% da variação, respetivamente, foram utilizados para fazer a seleção das espécies que representam a maior diversidade química presente nas amostras analisadas. Adicionalmente, variedades de *Rubus idaeus* (Octavia e Prestige) foram incluídas na seleção como amostras que não aparentam ter separação nos gráficos de PCA. Utilizando-se esta metodologia foi possível reduzir o número de espécies, de 112 para 34, para serem testadas quanto as suas bioatividades (quadro 1).

Novos extratos destas espécies foram preparados (sem uso de padrão interno) e subsequentemente testados para bioatividade em modelos de levedura humanizadas para diversas doenças. No caso do estudo de espécies do género *Rubus*, foi possível observar que pelo menos um dos extratos selecionados apresenta bioatividade para todos os modelos de doença estudados (quadro 2). A diversidade de respostas observadas nos ensaios de bioatividade para diversas doenças é um reflexo da diversidade química presente nos vários extratos testados. Conclui-se que o uso de análises metabolómicas pode constituir uma ferramenta poderosa para apoiar estudos de bioatividade. Adicionalmente, a natureza da informação presente em dados de metabolómica pode ser utilizada para caracterizar a abundância relativa de metabolitos específicos na coleção de espécies descritas neste estudo e desta forma determinar quais as espécies com maior abundância em compostos de interesse (exemplo na fig. 3).

## Conclusões

Conclui-se que o uso de análise metabolómica de um número vasto de diferentes espécies/variedades pode ser utilizado para otimizar a escolha de espécies em estudos de bioatividade.

**Agradecimentos:**

Este estudo faz parte do projeto “BacHBerry”, financiado pela Comissão Europeia no 7<sup>th</sup> Framework Programme (Projeto N° FP7-613793)

**Quadros e figuras**

Quadro 1 – Lista de espécies selecionadas para ensaios de bioatividade com base na PCA dos resultados de metabolómica

<b>Especie</b>	<b>Variedade/linha</b>	<b>Local de recolha</b>
<i>Aristotelia chilensis</i>	-	Chile
<i>Berberis buxifolia</i>	-	Chile
<i>Lonicera caerulea</i>	S322-23	Rússia
<i>Lycium chinense</i>	-	China
<i>Ribes grossularia</i>	9294	UK
<i>Ribes grossularoides</i>	-	UK
<i>Ribes nevadense</i>	-	UK
<i>Ribes spp.</i>	644217	UK
<i>Ribes spp.</i>	1126	UK
<i>Ribes spp.</i>	2292-1	UK
<i>Ribes spp.</i>	Muravushka	Rússia
<i>Ribes spp.</i>	-	Chile
<i>Ribes petraeum</i>	-	UK
<i>Ribes saundersii</i>	-	UK
<i>Ribes bethmontii</i>	-	UK
<i>Ribes rubrum</i>	S11-3-36	UK
<i>Rubus spp.</i>	B14	UK
<i>Rubus armeniacus</i>	Himalayan Giant	UK
<i>Rubus occidentalis</i>	Huron	UK
<i>Rubus loganobaccus</i>	Sunberry	UK
<i>Rubus loganobaccus</i>	Tayberry	UK
<i>Rubus fruticosus agg.</i>	Ashton Cross	UK
<i>Rubus fruticosus agg.</i>	Fantasia	UK
<i>Rubus brigantinus</i>	-	Portugal
<i>Rubus genevierii</i>	-	Portugal
<i>Rubus henriquesii</i>	-	Portugal
<i>Rubus hochstetterorum</i>	-	Portugal
<i>Rubus sampaioanus</i>	-	Portugal
<i>Rubus vagabundus</i>	-	Portugal
<i>Rubus idaeus</i>	Octavia	UK
<i>Rubus idaeus</i>	Prestige	UK
<i>Ugni molinae</i>	-	Chile
<i>Vaccinium uliginosum</i>	-	China
<i>Vaccinium vitis-idaea</i>	-	China

Quadro 2 – Resultados de testes de bioatividade utilizando extratos de frutos de diversas espécies do género *Rubus* para cada modelo de doença. A presença de bioatividade para uma doença num extrato encontra-se representada por + enquanto que extratos sem bioatividade para a doença encontram-se representados por -.

Espécies do género <i>Rubus</i>	Modelos de doença					
	Parkinson's	Alzheimer's	Huntigton's	Esclerose amiotrofica lateral	Cancro	Inflamação
<i>R. vagabundus</i>	-	-	-	-	-	-
<i>R. brigitinus</i>	-	-	+	-	-	+
<i>R. sampaioanus</i>	-	-	-	-	-	+
<i>R. genevierii</i>	-	-	-	+	-	-
<i>R. hochstetterorum</i>	-	-	+	-	-	+
<i>R. henriquesii</i>	-	-	+	-	-	+
<i>R. loganobaccus</i> cv Tayberry	-	-	-	-	+	-
<i>R. loganobaccus</i> cv Sunberry	-	+	+	-	-	+
<i>R. fruticosus</i> agg. cv. Fantasia	-	-	-	-	-	-
<i>R. fruticosus</i> agg. cv. Ashton Cross	-	-	-	-	-	+
<i>R. idaeus</i> cv. Prestige	-	-	+	+	+	+
<i>R. idaeus</i> cv. Octavia	+	-	-	+	-	+
<i>R. occidentalis</i> cv. Huron	-	-	-	-	+	+
<i>R. armeniacus</i> cv. Himalayan Giant	-	-	-	-	+	+
<b>Rubus spp. B14</b>	-	-	-	-	+	-

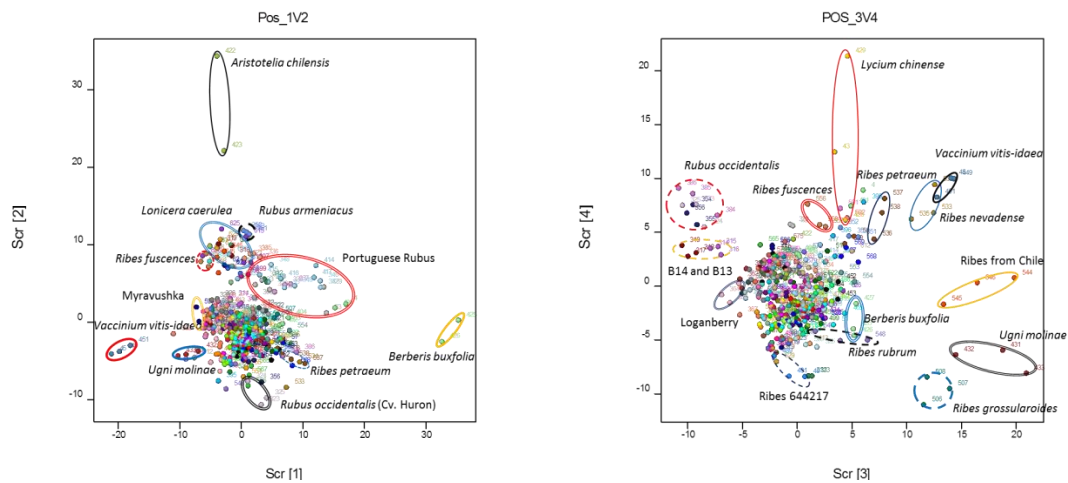


Figura 1 – Gráficos de PCA representando as quatro primeiras PCs dos dados em modo positivo explicando 9.79, 7.59, 6.69 e 5.54% da variação, respectivamente. Os pontos no gráfico representam cada uma das amostra analisada, coloridas de acordo com a espécie correspondente a esse perfil metabólico. As espécies separadas encontram-se anotadas no gráfico. (A) Gráfico representando PC1 vs. PC2; (B) Gráfico representando PC3 vs. PC4.

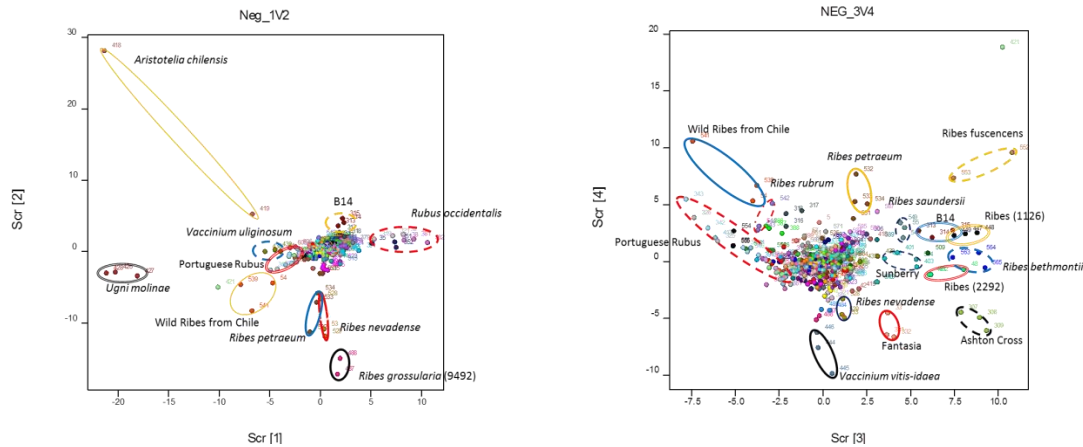


Figura 2 – Gráficos de PCA representando as quatro primeiras PCs dos dados em modo positivo explicando 13.20, 10.30, 10.20 e 7.66% da variação, respetivamente. Os pontos no gráfico representam cada uma das amostras analisadas, coloridas de acordo com a espécie correspondente a esse perfil metabólico. As espécies separadas em cada gráfico encontram-se anotadas. (A) Gráfico representando PC1 vs. PC2; (B) Gráfico representando PC3 vs. PC4.

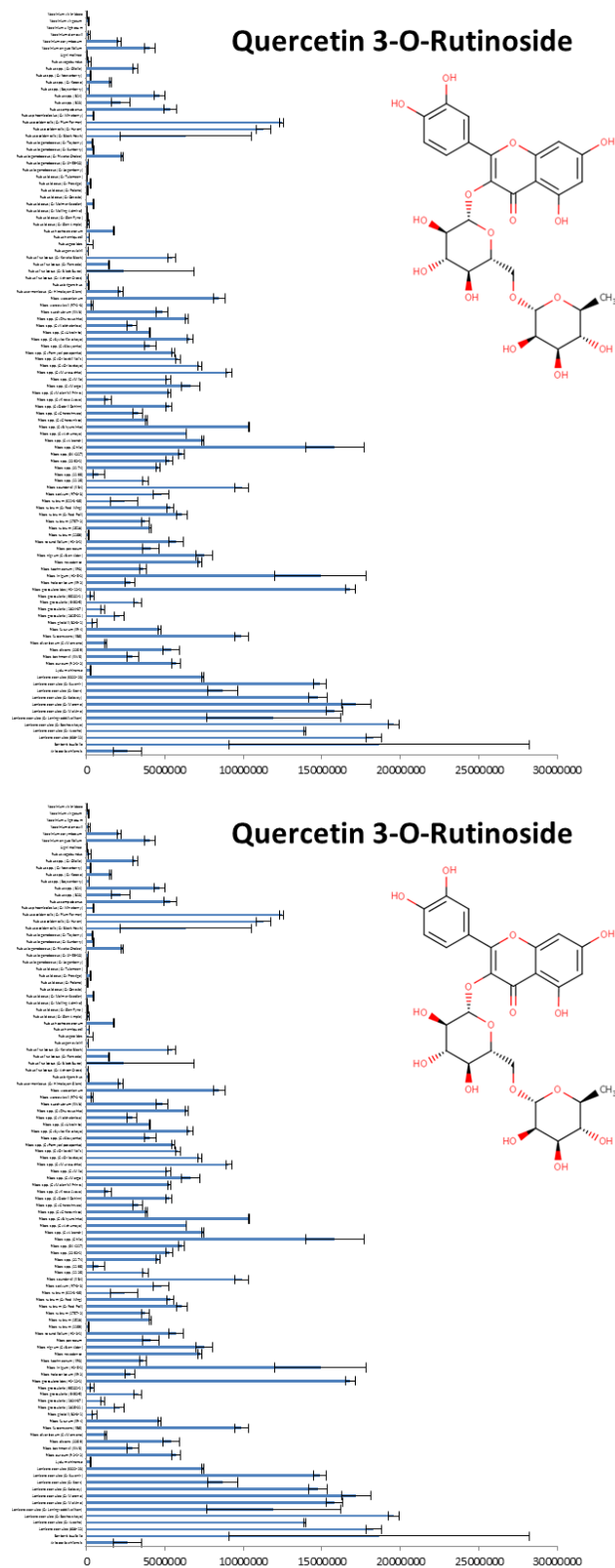


Figura 3 – Gráfico de barras representando a abundância (eixo-x) de Quercetin 3-O-rutinoside para cada uma das 112 espécies/variedades presentes neste estudo (eixo-y)