

Universidade Estadual de Campinas – Instituto de Biologia
Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal

Descobrimo novas ‘superfrutas’: da taxonomia a fitoquímica de frutos brasileiros

Bolsas Funbio - Conservando o Futuro - Doutorado

Proponente:

Msc. Karinne Sampaio Valdemarin
Mestra em Ciências
<http://lattes.cnpq.br/8002996348083277>
Av. Pádua Dias, 11, Cx. Postal 9
CEP 13418-900 - Piracicaba – SP

Orientador:

Coorientadora:
Profa. Dra. Maria Luiza Faria Salatino
Doutora em Ciências Biológicas (Botânica)
Professora doutora IB/USP
<http://lattes.cnpq.br/6864401803361183>
Rua do Matão, 277, Cid. Universitária
CEP 05508-900 - São Paulo - SP

Prof. Dr. Vinícius Castro Souza
Doutor em Ciências Biológicas (Botânica)
Professor doutor ESALQ/USP Orientador
no PPG em Biologia Vegetal <http://lattes.cnpq.br/2457247935703929> Av.
Pádua Dias, 11, Cx. Postal 9
CEP 13418-900 - Piracicaba – SP

Descobrimo novas ‘superfrutas’: da taxonomia a fitoquímica de frutos brasileiros

1. Introdução e justificativa

O termo ‘superfrutas’, o qual tem se popularizado nos últimos anos, é utilizado para denominar frutas que possuem benefícios a saúde, principalmente pela elevada concentração de vitaminas e antioxidantes. Atualmente, muitos dados estão disponíveis na literatura sobre a composição nutricional e benefícios para a saúde de frutas nativas da Europa e América do Norte, estudos contemplando a diversidade de frutos de países da região tropical, entretanto, ainda são escassos quando comparados com o potencial da biodiversidade existente na região (BFG 2018). No Brasil, o país com a maior biodiversidade de plantas do mundo, ultrapassando 46 mil espécies conhecidas em sua flora (BFG 2018), a grande maioria das plantas utilizadas na alimentação diária de sua população são espécies de origem exótica. Porém, dentre tantas espécies existentes na flora brasileira, não estaria a biodisponibilidade de ‘superfrutas’ subestimada?

Dentre as plantas com potencial alimentício, as espécies pertencentes a família Myrtaceae se destacam em grande parte dos estudos abordando as ‘superfrutas’ (Bolson et al. 2015, Tribess et al. 2015, Teixeira et al. 2018, Franzon et al. 2018, Souza et al. 2018, Jacomino et al. 2018). Mas, além da importância como fonte alternativa de recursos para alimentação humana, a família Myrtaceae também apresenta elevada importância na diversidade na flora brasileira. Com mais de mil espécies, Myrtaceae está entre as 10 famílias de angiospermas mais diversas do país (BFG 2015; WCSP 2018), além de possuir importância ainda maior na composição florística de áreas inseridas nos biomas da Mata Atlântica e Cerrado, considerados hotspots de biodiversidade (Reitz et al. 1978, Mori et al. 1983, Tabarelli & Mantovani 1999, Oliveira-Filho & Fontes 2000, Holst et al. 2003, Sobral 2007, Murray-Smith et al. 2009, BFG 2015, Lucas & Bünger 2015).

Dentre os gêneros pertencentes a família, *Eugenia* possui a maior representatividades entre suas espécies com potencial para uso. Suas espécies despertam o interesse de colecionadores de plantas frutíferas pelo mundo, são apresentadas nas listas de espécies de valor econômico atual ou potencial, denominadas “Plantas para o Futuro” (MMA 2011, 2016), e são relatadas

em guias sobre frutos nativos (Lorenzi et al. 2016). Mas além disso, o gênero está entre os mais diversos da flora brasileira, possuindo cerca de 400 espécies conhecidas (BFG 2015) com distribuição em todo território do país.

Alguns trabalhos na área fitoquímica, alimentícia e farmacêutica, descrevem os frutos de *Eugenia* como de alto potencial para obtenção de compostos bioativos com atividades anti-inflamatórias, antioxidantes, antidiabética, além de conter alto teor de carotenoides e ácido ascórbico, quando comparados com frutas tradicionalmente consumidas, sendo considerados novas ‘superfrutas’ (Celli 2011, Pereira et al. 2012, Siqueira et al. 2013, Infante et al. 2016, Pádua 2017). Entretanto, é importante salientar que as informações químicas disponíveis sobre os frutos de *Eugenia* são restritas a um pequeno número de espécies. Até o momento, foram encontrados trabalhos abordando 10 espécies do gênero, número que representa 2.5% da biodisponibilidade das espécies ocorrentes no Brasil. Dentre as espécies com estudos químicos de seus frutos disponíveis, encontram-se: *Eugenia astringens* - tratada como seu sinônimo, *E. umbelliflora* - (Kuskoski et al. 2003, Braga 2016), *E. brasiliensis* (Moreno et al. 2007, Reynertson et al. 2008, Flores et al. 2012, Infante et al. 2016, Sardi et al. 2017, Lazarini et al. 2018), *E. dysenterica* (Cardoso et al. 2011, Bailão et al. 2015, Donado-Pestana et al. 2015, Daza et al. 2017, Guedes et al. 2017), *E. involucrata* (Infante et al. 2016, Sardi et al. 2017, Schmidt 2018), *E. myrcianthes* (Infante et al. 2016, Sardi et al. 2017), *E. pyriformis* (Rufino et al. 2010, Ramirez et al. 2011, Pereira et al. 2012, Schmidt 2018), *E. puniceifolia* (Braga et al. 2016, Gonçalves et al. 2017), *E. stipitata* (Rogez et al. 2004, Garzón et al. 2012), *E. uniflora* (Lima et al. 2002, Melo et al. 2007, Lopes Filho 2007, Bagetti et al. 2011, Soares et al. 2014, Denardin et al. 2015, Bailão et al. 2015, Schmidt 2018), além de artigos mencionando *E. leitonii*, um nome não validamente publicado que pode se trata de *E. malacantha* (Larazini et al. 2016, Infante et al. 2016, Sardi et al. 2017). Desta forma, fica evidente que as espécies culturalmente mais utilizadas são as mais abordadas em tais estudos, o que leva a uma subamostragem da diversidade e potencial dos frutos do gênero em questão.

Outro grande desafio quanto aos dados existentes é que os protocolos para obtenção dos dados fitoquímicos não são padronizados e a grande maioria não apresentar material testemunho das espécies analisadas depositado em herbário, o que dificulta a compilação, comparação e confiabilidade quanto a identificação botânica das espécies estudadas. Neste sentido, o conhecimento taxonômico e filogenético do gênero, os quais avançaram nos últimos anos

(Mazine 2006, Mazine et al. 2014, Faria 2014, Büniger 2015, Büniger et al. 2016a, Büniger et al. 2016b, Coutinho 2018, Mazine et al. 2018, Giaretta 2019), podem ser utilizados para proporcionar um melhor entendimento da diversidade e presença de fitoquímicos nos frutos das espécies do gênero. Um entendimento sobre a relação entre as espécies com base em dados moleculares pode proporcionar uma busca mais acurada por padrões nos tipos e quantidades de substâncias químicas encontrados nos seus frutos (e.g. Bomfim-Patricio et al. 2001, Mayworm & Salatino 2002, Motta et al. 2009). Assim, seria possível prever espécies potenciais para a ocorrência de características fitoquímicas desejadas para a alimentação com base num estudo evolutivo.

Entende-se que estudos contemplando a diversidade, seja ela taxonômica ou fitoquímica, seja a primeira ação a ser tomada para seu posterior uso sustentável. Assim, este projeto pretende concretizar uma abordagem multidisciplinar, aliando o conhecimento taxonômico e filogenético do gênero com a investigação de características fitoquímicas de seus frutos. Tal abordagem proporcionará o entendimento da evolução dos frutos em *Eugenia*, através da identificação de possíveis sinapomorfias químicas para os agrupamentos de espécies, além de promover uma amostragem mais robusta de sua diversidade disponível em nossa flora, possibilitando a descoberta de novas ‘superfrutas’. Além disso, destaca-se que dados inéditos quanto à composição química de frutos nativos da flora brasileira serão produzidos, norteando futuros trabalhos na área fitoquímica, alimentícia e farmacêutica. Destaca-se também que não foram encontrados estudos similares na bibliografia especializada para a flora brasileira, caracterizando este projeto como original, além de ousado, dada a escolha de um dos maiores gêneros frutíferos da flora brasileira como foco do estudo.

2. Objetivos

Objetivo geral

- ✓ Realizar o primeiro estudo de características fitoquímicas de frutos brasileiros com base em dados moleculares, possibilitando a descoberta de novas ‘superfrutas’.

Objetivos específicos

- ✓ Produzir dados inéditos de compostos químicos presentes nos frutos de espécies nativas de *Eugenia* ainda não exploradas;

- ✓ Possibilitar a identificação de possíveis sinapomorfias químicas relacionadas aos frutos de *Eugenia*, contribuindo para a resolução das relações filogenéticas do gênero;
- ✓ Nortear estudos futuros na área alimentícia, farmacêutica e ecológica quanto ao potencial das espécies frutíferas de *Eugenia* negligenciadas na flora brasileira;
- ✓ Promover a disseminação de informações quanto ao potencial de consumo de espécies frutíferas nativas para a população em geral.

3. Metodologia a ser utilizada

3.1. Estratégia de amostragem: o grupo taxonômico escolhido é o gênero *Eugenia*, um dos mais diversos na flora brasileira. Será realizada uma amostragem de 10% da diversidade de espécies de *Eugenia* ocorrentes no Brasil (c. 40 espécies) para a realização do estudo, levando em consideração que esta amostragem seja mantida para os 10 grupos infragêneros conhecidos. Considera-se que para as análises químicas, cada espécie terá seus frutos coletados de três indivíduos distintos, e será considerado o valor médio para o desenvolvimento das análises de reconstrução de caracteres ancestrais.

3.2. Coleta de material em campo: os indivíduos estão sendo obtidos em áreas naturais ou cultivadas, sendo seus vouchers depositados em coleção de acesso público, Herbário ESA. As amostras são compostas por 200-500 g de frutos frescos, os quais são higienizados com água e tem suas partes não-comestíveis manualmente removidas (sépalas e sementes). Após a remoção das partes não comestíveis, 30 g de cada amostra está sendo separada, congelada à -80°C, liofilizada, triturada em moinho de bola e armazenada até as análises. Destaca-se que até o momento amostras de 21 espécies foram coletadas e seus frutos triturados se encontram armazenados à -80°C para o desenvolvimento das análises aqui propostas.

3.3. Obtenção de dados moleculares: serão utilizadas sequências de DNA das espécies de *Eugenia* disponíveis no GenBank. Para as espécies aqui amostradas que nunca tiveram suas sequências produzidas, a obtenção será realizada neste trabalho. Assim, a seguinte metodologia será utilizada: a partir de fragmentos de folhas conservados em sílica-gel (Chase & Hills 1991), será realizada a extração do DNA, com o kit “DNeasy Plant Mini Kit” (QIAGEN), seguindo o protocolo do fabricante. Serão analisadas cinco regiões, a região nuclear ITS, e as regiões de cloroplasto rpl16, psbA-trnH, rpl32-trnL e trnQ-5-rps16, seguindo estudos moleculares recentes em *Eugenia* (Faria 2014, Mazine et al. 2014, Bünger et al. 2016, Giaretta 2018, Mazine et al. 2018). Para a reação de PCR serão utilizados os iniciadores referidos em Sun et al. (1994)

para ITS; Jordan et al. (1996) para rpl16; Hamilton (1999) para psbA-trnH; Shaw et al. (2007) e Faria (2014) para rpl32-trnL; Shaw et al. (2007) e Murillo-A. et al. (2012) para trnQ-5-rps16. Em seguida sua qualidade será verificada em cuba de eletroforese em gel de agarose a 1%. O sequenciamento será realizado usando Sanger, seguindo o utilizado por Lucas et al. (2007). As sequências serão importadas e editadas usando o software Geneious, alinhadas usando o Muscle (Edgar 2004). Toda rotina de bancada será realizada nas dependências do Jodrell Laboratory, RBGKew, evidenciando que os recursos para tais atividades foram obtidos via 'grant' nomeado "Emily Holmes Memorial Scholarship" e bolsa de doutorado sanduíche no exterior "CAPES-Print-UNICAMP".

3.4. Obtenção de dados químicos

3.4.1. Açúcares solúveis: os açúcares solúveis serão extraídos a partir de 10 mg dos frutos liofilizados em 1,5 mL de etanol 80% por agitação regular a 80°C por 20 minutos em 1250 rpm. Após a centrifugação a 4°C por 10 min a 14000 rpm, os sobrenadantes serão transferidos para falcon de 15 mL e evaporados no speedvac a temperatura ambiente. O material será ressuspensionado em 1 mL de água miliQ e será adicionado 500 µL de clorofórmio no tubo para remover os pigmentos, sendo a solução centrifugada a 4°C por 10 min a 12000 rpm. Após este processo, 500 µL do sobrenadante será transferido para vials para a realização da análise cromatográfica (HPAEC-PAD); modificado de Cordenunsi et al. (2008).

3.4.2. Fenóis totais: os fenóis totais serão extraídos a partir de 50 mg dos frutos liofilizados em 1,5 mL de etanol 80% por agitação regular a 80°C por 20 minutos em 1250 rpm. Após a centrifugação a 4°C por 10 min a 14000 rpm, os sobrenadantes serão transferidos para falcon de 15 mL e evaporados no speedvac a temperatura ambiente. O material será ressuspensionado em 1 mL de etanol 80%, homogeneizado e 500 µL do extrato será transferido para vials para realização da análise cromatográfica líquida de alta eficiência (CLAE-DAD); modificado de Watermar & Mole (1994).

3.4.3. Taninos: os taninos serão extraídos a partir de 50 mg dos frutos liofilizados em 1 mL de etanol 50% por agitação regular a 40°C por 30 minutos a 12500 rpm. Após a centrifugação a 4°C por 10 min a 14000 rpm, os sobrenadantes serão transferidos para falcon de 15 mL e evaporados no speedvac a temperatura ambiente. O material será ressuspensionado em 500 µL de etanol 50%. O doseamento de taninos totais será realizado a partir de 60 µL do extrato obtido, adicionado de 120 µL de solução BSA e homogeneizado em vórtex. Após 15 minutos, a solução será centrifugada a 4°C por 10 min a 10000 rpm. O sobrenadante será descartado, 240

μL de solução detergente (SDS) será adicionada e homogeneizada ao pellet com auxílio do vórtex. Então, 60 μL de Cloreto Férrico 0.01 M será adicionado à solução e homogeneizado em vórtex. O volume final será transferido para microplacas do tipo Elisa e após 15 min se realizará a leitura em espectrofotômetro a 510 nm; modificado de Watermar & Mole (1994).

3.4.4. Carotenoides: os carotenoides totais serão extraídos exaustivamente a partir de 100 mg dos frutos liofilizados em 1 mL de acetona por agitação regular a temperatura ambiente por 20 min a 12500 rpm. Após a centrifugação a 4°C por 10 min a 8000 rpm, os sobrenadantes serão transferidos para uma bureta com 5 mL de solução 5% éter etílico em éter de petróleo. A mistura será então lavada com água miliQ até a água da lavagem ficar translúcida. Após 3 min, o volume do extrato de éter será medido e o doseamento de carotenoides totais será realizado a partir da transferência para microplacas do tipo Elisa e leitura em espectrofotômetro a 450 nm; modificado de Pacheco et al. (2014).

3.4.5. Ácido ascórbico: o ácido ascórbico será determinado a partir de 100 mg dos frutos liofilizados em 3 mL de solução 3% ácido metafosfórico por agitação regular a 4°C por 10 min a 12500 rpm. Após a centrifugação a 4°C por 20 min a 8000 rpm, será adicionado Ditiotreitól (DTT) para a redução do ácido dehidroascórbico. A quantificação será realizada por análise cromatográfica (HPLC-DAD) em coluna C18 (300 mm x 3.6 mm). A fase móvel consistirá em solução tampão KCl 2 mM, com pH 2.5 e fluxo de 1.5 mL/min e a detecção realizada em 254 nm. O ácido ascórbico será identificado pelo seu tempo de retenção e identidade de espectro, comparado com o padrão comercial. O ácido dehidroascórbico será calculado pela diferença entre o conteúdo de ácido ascórbico total (extrato com DTT) e de ácido ascórbico reduzido (sem DTT), sendo seu conteúdo expresso em mg 100g⁻¹ f.w.; modificado de Pasternak et al. (2005).

3.4.6. Atividade antioxidante (DPPH e Folin-Ciocalteu): o DPPH será obtido através de 100 μL de extrato de fenóis totais ressuspendido será transferido para microplacas do tipo Elisa, adicionado de 200 μL de uma solução metanólica do radical livre 1,1-difenil-2-picril-hidrazila (DPPH) em concentração 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Antes de utilizar a solução de DPPH, sua absorvância será ajustada para valor entre 0,7 e 0,8 a 517 nm, medida a partir de seu branco (200 μL da solução de DPPH + 100 μL de metanol), sendo este o controle. Após a adição do DPPH, as amostras serão agitadas e mantidas no escuro por 30 min. Será feita então a leitura da absorvância em espectrofotômetro a 517 nm. O sequestro dos radicais livres DPPH pelos extratos será avaliado por comparação com o controle (DPPH + metanol). Os resultados serão expressos como porcentagem de sequestro do radical livre DPPH (através de seu descoramento), de acordo com

a seguinte equação: $\% A_{aox} = \frac{Abs\ C - (Abs\ Am - Abs\ B)}{Abs\ C} \times 100$. Onde, Abs C = absorvância do controle; Abs Am = absorvância da amostra; Abs B = absorvância do branco; modificado de Moreno et al. (2000). O Folin-Ciocalteu será obtido através de 25 µL do extrato de fenóis totais ressuspendido será transferido para microplacas do tipo Elisa, adicionado de 200 µL de água miliQ, 25 µL de Folin-Ciocalteu, 25 µL de Na₂CO₃ 20% e incubado a temperatura ambiente sob proteção da luz. Após 40 min, será realizada a leitura em espectrofotômetro a 760 nm. Os resultados serão estimados em relação à curva padrão de ácido gálico e expressos em µg de equivalente de ácido gálico por mg de massa seca; modificado de Genovese et al. (2008).

3.5. Análises

3.5.1. Reconstrução filogenética: serão realizadas utilizando a abordagem da Inferência Bayesiana (Ronquist & Huelsenbeck 2003, Altekar et al. 2004) e Máxima Verossimilhança (Ren et al. 2009). As análises bayesianas serão executadas no MrBayes (Ronquist & Huelsenbeck 2003) e o suporte dos ramos estimado através do procedimento de probabilidade posterior (Huelsenbeck et al. 2002). As análises de máxima verossimilhança serão executadas com o RAxML (Stamatakis 2006) e o suporte dos ramos estimado através do “bootstrap” não-paramétrico (Felsenstein 1985). Os modelos evolutivos serão inferidos a partir dos próprios dados, deixando os parâmetros livres para serem estimados durante as análises pelo jModelTest (Posada 2008).

3.5.2. Reconstrução de caracteres ancestrais: será realizada para reconhecer se os padrões químicos surgiram de forma independente ou por descendência. Os sinais filogenéticos dos caracteres serão calculados pelo parâmetro lambda (Pagel 1999) através do uso do Software R e o pacote phytools (Revell 2012). Os caracteres discretos e contínuos (dados químicos dos frutos) serão mapeados na filogenia de *Eugenia*, a ser obtida neste estudo, através do Software R e o pacote phytools (Revell 2012). Esta função estima os estados ancestrais em cada nó usando análises de máxima verossimilhança e interpolando os estados ao longo dos ramos, seguindo Felsenstein (1985).

4. Atividades previstas

Dentre as atividades previstas para a execução da tese, encontram-se etapas relacionadas ao programa de pós-graduação, como a participação em disciplinas, realização de exame de qualificação, o desenvolvimento do estágio acadêmico no exterior (entre dezembro/2019 e

maio/2020), redação da tese e artigos científicos, defesa da tese e participação em eventos científicos. Porém, destacam-se a seguir as principais atividades a serem realizadas para a concretização do objetivo aqui proposto.

4.1. Levantamento bibliográfico: busca e consulta de todos os estudos que envolvam o tema aqui abordado, contemplando a elaboração de textos introdutórios e discussões dos resultados esperados. Serão consultadas principalmente bases de dados online como: BioOne, Flora do Brasil Online 2020, JSTOR, Kew Bibliographic Databases, Kew Records of Taxonomic Literature, Scopus, SpringerLink, The International Plant Names Index, Tropicos e Web of Science.

4.2. Coleta de material biológico em campo: considera-se a realização de novas expedições para a coleta de material biológico em áreas cultivadas e nativas (Brasília, Rio de Janeiro, Porto Alegre, Vitória), a fim de complementar as coletas realizadas até o momento, esperando-se atingir a amostragem desejadas de 10% da diversidade do gênero no Brasil.

4.3. Obtenção de dados químicos dos frutos: análise da composição fitoquímica dos frutos coletados em campo, as quais serão realizadas nas dependências do Laboratório de Fitoquímica – no IB/USP, respectivamente, seguindo a metodologia apresentada no item 3.4.

4.4. Obtenção de dados moleculares: obtenção das sequências de DNA a serem utilizadas nas análises filogenéticas que seguirão a metodologia descrita no item 3.3, através de reações de extração e amplificação de regiões do DNA a serem realizadas no Royal Botanic Gardens – Kew (Reino Unido).

4.5. Análises de reconstrução filogenética e reconstrução de caracteres ancestrais: serão realizadas análises segundo a metodologia descrita no item 3.5, a fim de gerar hipóteses filogenéticas das espécies amostradas e suas relações com as características fitoquímicas dos frutos no gênero. Tais análises serão realizadas principalmente através da parceria com o Royal Botanic Gardens – Kew (Reino Unido).

4.6. Discussão dos resultados: será realizada a interpretação evolutiva dos dados químicos dos frutos obtidos ao final do estudo, a fim de possibilitar a descoberta de novas ‘supefrutas’ brasileiras, e a viabilidade da replicação deste estudo para outros grupos de plantas.

5. Detalhamento da infraestrutura física e tecnológica a ser utilizada

A infraestrutura física e tecnológica principal a ser utilizada no desenvolvimento deste projeto envolve: **5.1.** Laboratório de Sistemática Vegetal e Herbário ESA da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – USP, o qual é coordenado pelo Orientador da proposta, Prof. Dr. Vinicius Castro Souza; **5.2.** o Royal Botanic Gardens – Kew (Reino Unido), pela parceria com a Dra. Eve Lucas, coorientadora no exterior; e **5.3.** o Laboratório de Fitoquímica do Instituto de Biologia – USP, o qual é também coordenado pela coorientadora da proposta, Profa. Dra. Maria Luiza Faria Salatino.

5.1. Laboratório de Sistemática Vegetal e Herbário ESA – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”/USP

Site do Laboratório: <http://splink.cria.org.br/manager/detail?resource=ESA>

O laboratório de sistemática vegetal e herbário ESA realizam trabalhos voltados para a identificação de espécies, levantamento florístico e taxonomia, contando com 9 salas, sendo que os principais equipamentos a serem utilizados são: material para coleta em campo, estufa de secagem, freezer, estereomicroscópio, câmera fotográfica, GPS e equipamentos básicos de informática.

5.2. Royal Botanic Gardens – Kew (Reino Unido)

Site da instituição: <https://www.kew.org/science/collections-and-resources>

O Royal Botanic Gardens, Kew - Reino Unido, apresenta renomada excelência e se destaca como uma das instituições mais importantes para estudo da flora no mundo. A parceria foi firmada para a execução do Doutorado Sanduíche da candidata durante o período de dezembro/2019 a maio/2020, que de forma direta contempla as etapas: i) obtenção de dados moleculares no “Jodrell Laboratory”, com os reagentes custeados pelo “Emily Holmes Memorial Scholarship” conquistado pela aluna; ii) consulta ao Herbário de Kew, uma das maiores coleções botânicas do mundo, para auxílio na correta identificação das espécies de *Eugenia* estudadas.

5.3. Laboratório de Fitoquímica – Instituto de Biologia/USP

Site do Laboratório: <http://www.ib.usp.br/pesquisa-botanica/69-depto-de-botanica/laboratorios/507laboratorio-de-recursos-humanos-vegetais.html>

O laboratório de fitoquímica realiza procedimentos de extração, purificação e isolamento de substâncias presentes em plantas, contando com 11 salas, sendo que os principais equipamentos a serem utilizados são: ultrafreezer, liofilizador, moinho de bola, termobloco, centrífuga, espectro de massas, cromatógrafo líquido de alto desempenho e leitor de microplacas Elisa.

6. Linhas gerais do Cronograma a ser cumprido

Atividades	Semestre					
	2°/2019	1°/2020	2°/2020	1°/2021	2°/2021	1°/2022
Levantamento bibliográfico	X	X	X			
Coleta de material biológico em campo	X		X	X		
Consulta aos herbários e identificação dos materiais botânicos	X	X	X	X		
Obtenção de dados químicos dos frutos	X		X	X		
Estágio acadêmico no exterior	X	X				
Obtenção de dados moleculares	X	X				
Análises: reconstrução filogenética		X	X	X		
Análises: reconstrução de caracteres ancestrais				X	X	
Exame de qualificação		X				
Discussão dos resultados				X	X	X
Redação da Tese e Artigos					X	X
Defesa da Tese						X
Participação em eventos científicos e divulgação das atividades	X		X		X	

7. Planilha de orçamento com estimativa dos gastos previstos

Bolsas Funbio - Conservando o Futuro

ANEXO I - Orçamento Detalhado

CHAMADA N º 02/2019

Título do projeto	Descobrimos novas 'superfrutas': da taxonomia a fitoquímica de frutos brasileiros	
Nome do Proponente	Karinne Sampaio Valdemarin	
Instituição de Ensino e Programa	Universidade Estadual de Campinas - Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal	
Tipo de Bolsa (Mestrado ou Doutorado)	Doutorado	
Total requisitado (R\$)	R\$ 24,476.00	

Orçamento da Pesquisa						
Categoria de despesa	Descrição dos itens	Material será cedido para Instituição (Sim ou Não)	Quantidade	Unidade (un; litro; metro; dia; km)	Valor Unitário (R\$)	Valor Total (R\$)
Uso e consumo	Ditiotreitol (DTT) - 25 g	sim	1	un	R\$ 1,300.00	1,300.00
	Éter Etílico PA 100% - 1000 mL	sim	1	un	R\$ 110.00	110.00
	Éter de Petróleo PA ACS 60-110 - 1000 mL	sim	1	un	R\$ 180.00	180.00
	Álcool etílico >99,9% PA - 1000 mL	sim	2	un	R\$ 140.00	280.00
	Acetona PA - 1000 mL	sim	1	un	R\$ 45.00	45.00
	Folin & Ciocalteu - 100 mL	sim	1	un	R\$ 850.00	850.00
	1,1-difenil-2-picril-hidrazila - 5 g	sim	1	un	R\$ 750.00	750.00
	Padrões Farmacopeicos (vitamina C e fenólicos)	sim	10	un	R\$ 250.00	2,500.00

	Sacos hermético 18 x 23 - 15un	sim	10	un	R\$ 9.00	90.00
	Tubo falcon 50 mL - 50un	sim	5	un	R\$ 50.00	250.00
	Sílica gel Azul PA - 1 kg	sim	3	un	R\$ 75.00	225.00
Serviço de terceiros Pessoa Física	Escalador para coleta botânica	sim	6	un	R\$ 350.00	2,100.00
Serviço de terceiros Pessoa Jurídica	Análises LC-MS/MS para a identificação das substâncias fitoquímicas	sim	25	un	R\$ 140.00	3,500.00
Viagens	Passagem aérea (São Paulo/Rio de Janeiro/São Paulo)	sim	1	un	R\$ 400.00	400.00
	Passagem aérea (São Paulo/Porto Alegre/São Paulo)	sim	1	un	R\$ 450.00	450.00
	Passagem aérea (São Paulo/Vitória/São Paulo)	sim	1	un	R\$ 400.00	400.00
	Passagem aérea (São Paulo/Brasília/São Paulo)	sim	1	un	R\$ 450.00	450.00
	Aluguel de automóvel	sim	30	dia	R\$ 140.00	4,200.00
	Combustível	sim	240	litro	R\$ 4.15	996.00
	Alimentação	sim	30	dia	R\$ 80.00	2,400.00
	Hospedagem	sim	30	dia	R\$ 100.00	3,000.00
TOTAL						24,476.00

8. Resultados esperados e impacto previsto do projeto

Dentre os resultados a serem gerados pela tese em questão, destaca-se a produção de dados primários sobre a biodiversidade brasileira. Tais dados são essenciais para o desenvolvimento da área na ciência brasileira, além de contribuírem para melhores tomadas de decisões no âmbito das políticas de conservação e uso sustentável dos recursos naturais. Uma das diretrizes do projeto é a disponibilização dos dados em plataformas de acesso público, possibilitando o acesso pela comunidade científica em geral dos resultados a serem obtidos. Assim, as novas coletas botânicas resultarão em novos registros de distribuição das espécies, as quais serão incorporadas nas coleções dos principais herbários do Brasil (Herbário ESA e RB) e se encontram indexados em plataformas de acesso público, como o “Splink” e “Herbário Virtual Reflora”. As novas sequências de DNA serão depositadas em plataformas também de acesso público, como o “GenBank” e “Bold Systems”. Os dados químicos referentes aos frutos das espécies estudadas serão publicados em revistas científicas e apresentados como materiais suplementares de tais artigos, frisando-se ainda que esforços serão realizados para a disponibilização deles na plataforma recém lançada “Biodiversidade & Nutrição” do SiBBR.

O principal produto do estudo é a produção de um estudo contemplando as características fitoquímicas de frutos brasileiros com base em dados moleculares (uma perspectiva evolutiva), possibilitando a descoberta de novas ‘superfrutas’. A escolha de *Eugenia* para enfoque neste estudo se baseou na sua importância entre as espécies frutíferas nativas, sua representatividade da flora brasileira (um dos maiores gêneros de angiospermas do país) e a carência de estudos que abordem os frutos no grupo quando comparado com a biodisponibilidade existente no país. Além disso, este estudo evolutivo proporcionará um modelo a ser replicado em outros grupos de plantas, acarretando a elucidação do potencial muitas vezes negligenciado da nossa flora.

O desenvolvimento do estudo gerará dados inéditos quanto aos compostos fitoquímicos presentes nos frutos de espécies nativas de *Eugenia* ainda não exploradas, o que proporcionará o conhecimento de novas frutíferas com potencial de uso sustentável na nossa flora. Além disso, tais dados poderão contribuir para a resolução de problemas nas relações filogenéticas do grupo, preenchendo lacunas do conhecimento científico. Entretanto, o principal resultado será um direcionamento para estudos futuros na área alimentícia, farmacêutica e de pós-colheita quanto ao potencial das espécies frutíferas negligenciadas na flora brasileira. Também se espera que os resultados do projeto aqui em andamento tragam impacto positivo nas comunidades tradicionais que já utilizam tais frutos no seu dia a dia, visto que a maior

visibilidade de tais frutos pela população em geral colaborará para uma maior procura destas espécies, e, conseqüentemente, geração de renda.

Vale destacar também que são esperadas publicação de artigos científicos em revistas indexadas (JCR, Web of Science e Scopus) como resultados deste projeto. Referente ao estudo evolutivo, espera-se a publicação da reconstrução do caráter ancestral, além de possíveis compilações de dados inéditos de compostos químicos presentes em frutos de espécies nativas de *Eugenia* ainda não exploradas, os quais poderão ser publicados em revistas como “Botanical Journal of the Linnean Society”, “PlosOne” e “Food Research International”. Espera-se ainda a realização de palestras em universidades e/ou escolas, a publicação de artigos de divulgação em jornais e revistas na área ambiental com circulação popular, buscando a divulgação das espécies frutíferas nativas para a população em geral. De maneira geral, almeja-se que os resultados a serem atingidos aqui não contribuam apenas para o melhor entendimento da evolução das características químicas dos frutos de um dos gêneros mais diversos da flora brasileira, mas que proporcionem uma ampla visibilidade, principalmente na divulgação e valorização do potencial fitoquímico dos frutos nativos, os quais são muitas vezes negligenciados frente ao tradicional consumo de frutas exóticas pelos brasileiros.

Referências bibliográficas

- Bagetti, E.M.P. Facco, J. Piccolo, G.E. Hirsch, D. Rodriguez-Amaya, C.N. Kobori, M. Vizzotto, T. Emanuelli (2011) Physicochemical characterization and antioxidant capacity of pitanga fruits (*Eugenia uniflora* L.) Ciênc. Tecnol. Aliment. 31: 147–154.
- Bailão, E.F.L.C. et al. (2015) Bioactive Compounds Found in Brazilian Cerrado Fruits. Int. J. Mol. Sci. 16: 23760–23783.
- Beech, E., Rivers, M., Oldfield, S. & Smith, P.P. (2017) GlobalTreeSearch: The first complete global database of tree species and country distributions. Journal of Sustainable Forestry 36 (5): 454–489.
- BFG - The Brazil Flora Group (2015) Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. Rodriguésia 66(4): 1085–1113.
- Bolson, M. et al. (2015) Ethno-medicinal study of plants used for treatment of human ailments, with residents of the surrounding region of forest fragments of Paraná, Brazil. Journal of Ethnopharmacology 161: 1–102.
- Braga, E.C.O. (2016) Caracterização Química de Substâncias Bioativas dos Frutos de duas Espécies do Gênero *Eugenia*. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, 114p.

- Braga, E.C.O. (2016) Caracterização Química de Substâncias Bioativas dos Frutos de duas Espécies do Gênero *Eugenia*. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, 114p.
- Bünger, M.O. (2015) Revisão, filogenia e biogeografia de *Eugenia* sect. *Phyllocalyx* (Myrtaceae). Tese de doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 154 pp.
- Bünger, M.O., Mazine, F.F., Lucas, E.J. & Stehmann, J.R. (2016) Circumscription and synopsis of *Eugenia* section *Speciosae* Bünger & Mazine (Myrtaceae). *PhytoKeys* 61: 73–80.
- Cardoso, L.M., Martino, H.S.D., Moreira, A.V.B., Ribeiro, S.M.R., Pinheiro-Sant’Ana, H.M. (2011) Cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.) of the Cerrado of Minas Gerais, Brazil: Physical and chemical characterization, carotenoids and vitamins. *Food Res. Int.* 44: 2151–2154.
- Celli, G.B. (2011) Comportamento Fisiológico e Bioquímico de Frutos da Pitangueira (*Eugenia uniflora* L.): características de interesse para o consumo humano. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 148p.
- Colombo, A.F. & Joly, C.A. (2010) Brazilian Atlantic Forest lato sensu: the most ancient Brazilian forest, and a biodiversity hotspot, is highly threatened by climate change. *Braz. J. Biol.* 70 (3): 697–708.
- Cordenunsi, B. R., Shiga, T. M., & Lajolo, F. (2008) Non-starch polysaccharide composition of two cultivars of banana (*Musa acuminata* L.: cvs Mysore and Nanicão). *Carbohydrate polymers* 71: 26-31.
- Daza, L.F. et al. (2017) Functional properties of encapsulated Cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.) fruit extract. *Food Bioscience* 18: 15–21.
- Denardin, C.C. et al. (2015) Antioxidant capacity and bioactive compounds of four Brazilian native fruits. *Journal of food and drug analysis* 23: 387-398.
- Donado-Pestana, C.M. et al. (2015) Phenolic compounds from cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.) fruit prevent body weight and fat mass gain induced by a high-fat, high-sucrose diet. *Food Research International* 77: 177–185. Edgar 2004
- Faria, J.E.Q. (2014) Revisão taxonômica e filogenia de *Eugenia* Sect. *Pilothecium* (Kiaersk.) D.Legrand (Myrteae, Myrtaceae). Tese de doutorado. Universidade de Brasília, Distrito Federal. 215 pp.
- Felsenstein, J. (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783–791.
- Flores, G., Dastmalchi, K., Paulino, S., Whalen, K., Dabo, A.J., Reynertson, K.A., Foronjy, R.F., Armiento, J.M.D. & Kennelly, E.J. (2012) Anthocyanins from *Eugenia brasiliensis* edible fruits as potential therapeutics for COPD treatment. *Food Chem.* 134(3): 1256–1262.
- Franzon, R.C., Carpenedo, S., Viñoly, M.D., Raseira, M. (2018) Pitanga— *Eugenia uniflora* L. In: Rodrigues, S., Silva, E.O. & Brito, E.S. (ed) *Exotic Fruits Reference Guide*. Academic Press. 488p.
- Garzón, G.A. et al. (2012) Determination of Carotenoids, Total Phenolic Content, and Antioxidant Activity of Arazá (*Eugenia stipitata* McVaugh), an Amazonian Fruit. *J. Agric. Food Chem.* 60 (18): 4709–4717.

- Genovese, M. I., Da Silva Pinto, M., De Souza Schmidt Gonçalves, A. E., & Lajolo, F. M. (2008) Bioactive compounds and antioxidant capacity of exotic fruits and commercial frozen pulps from Brazil. *Food Science and Technology International* 14(3): 207-214.
- Giaretta, A. (2018) Sistemática de *Eugenia* (Myrtaceae, Myrteae): evolução da flor e da inflorescência e implicações taxonômicas. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo. 238p.
- Gonçalves, N.P., Lucena, E.M.P., Bonilla, O.H. & Silveira, M.R.S. (2017) Polyphenols and antioxidant activity of four fruits native to the coast of Ceará under different maturation stages. *Rev. Bras. Frutic.* 39 (1): (e-460).
- Guedes, M.N.S. et al. (2017) Minerals and Phenolic Compounds of Cagaita Fruits at Different Maturation Stages (*Eugenia dysenterica*). *Rev. Bras. Frutic.*, 39 (1): (e-360).
- Infante, J., Rosalen, P.L., Lazarini, J.G., Franchin, M. & Alencar, S.M. (2016) Antioxidant and Anti-inflammatory activities of unexplored Brazilian native fruits. *Plos One* 11(4): 1–13.
- Jacomino, A.P, Silva, A.P.G., Freitas, T.P., Morais, V.S.P. (2018) Uvaia— *Eugenia pyriformis* Cambess. In: Rodrigues, S., Silva, E.O. & Brito, E.S. (ed) Exotic Fruits Reference Guide. Academic Press. 488p.
- Lazarini, J.G. et al. (2018) Bioprospection of *Eugenia brasiliensis*, a Brazilian native fruit, as a source of anti-inflammatory and antibiofilm compounds. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 102: 132–139.
- Leitão-Filho, H.F., Pagano, S.N., Cesar, O., Timoni, J.L. & Rueda, J.J. (1993) Ecologia da Mata Atlântica em Cubatão. EDUNESP/EDUNICAMP, São Paulo, 184 pp.
- Lima, V.L.A.G. et al. (2002) Fenólicos e Carotenóides totais em Pitanga. *Scientia Agricola* 59 (3): 447-450.
- Lopes Filho, G. (2007) Extração de carotenóides de pitanga liofilizada com dióxido de carbono supercrítico. Dissertação de Mestrado apresentado à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, 78p.
- Lorenzi, H., Lacerda, M.T.C. & Bacher, L.B. (2015) Frutas no Brasil Nativas e Exóticas (de consumo in natura). Instituto Plantarum, Nova Odessa, 768 pp.
- Lucas, E.J. & Bünger, M.O. (2015) Myrtaceae in the Atlantic forest: their role as a ‘model’ group. *Biodiversity and Conservation* 24: 2165–2180.
- Lucas, E.J., Harris, S.A., Mazine, F.F., Belsham, S.R., Nic Lughadha, E.M., Telford, A., Gasson, P.E. & Chase, M.W. (2007) Suprageneric phylogenetics of Myrteae, the generically richest tribe in Myrtaceae (Myrtales). *Taxon* 56: 1105–1128.
- Mazine, F.F. (2006) Estudos taxonômicos em *Eugenia* L. (Myrtaceae), com ênfase em *Eugenia* Sect. *Racemosae* O. Berg. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo. 239 pp.
- Mazine, F.F., Bünger, M.O., Faria, J.E.Q., Lucas, E. & Souza, V.C. (2016) Sections in *Eugenia* (Myrteae, Myrtaceae): nomenclatural notes and a key. *Phytotaxa* 289 (3): 225–236.
- Mazine, F.F., Souza, V.C., Sobral, M., Forest, F. & Lucas, E.J. (2014) A preliminary phylogenetic analysis of *Eugenia* (Myrtaceae: Myrteae), with a focus on neotropical species. *Kew Bulletin* 69: 1–14

- Melo, R.M. et al. (2007) Identification of Impact Aroma Compounds in *Eugenia uniflora* L. (Brazilian Pitanga) Leaf Essential Oil. *J. Braz. Chem. Soc.* 18 (1): 179-183.
- MMA (2011) Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro – Região Sul. Secretaria de Biodiversidade; Coradin, L, Alexandre Siminski, A., Reis, A. (Eds.), Brasília: MMA. 934p.
- MMA (2016) Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: Plantas para o Futuro: Região Centro-Oeste. Secretaria de Biodiversidade; Vieira, R.F., Camillo, J., Coradin, L. (Eds.), Brasília, MMA. 1.160 p.
- Moreno, M.I., Isla, M.I., Sampietro, A. R., Vattuone, M. A. (2000) Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *Journal of Ethnopharmacology* 71: 109–14.
- Moreno, P.R.H. et al. (2007) Essential Oil Composition of Fruit Colour Varieties of *Eugenia brasiliensis* Lam. *Sci. Agric. (Piracicaba, Braz.)* 64 (4): 428-432.
- Oliveira-Filho, A.T. & Fontes, M.A.L. (2000) Patterns of floristic differentiation among Atlantic Forests in Southeastern Brazil and the influence of climate. *Biotropica* 32: 793–810.
- Pacheco, S., Peixoto, F. M., Borguini, R. G., Nascimento, L. S. M., Bobeda, C. R. R., Santiago, M. C. P. A., & Godoy, R. L. O. (2014) Microscale extraction method for HPLC carotenoid analysis in vegetable matrices. *Scientia Agricola* 71: 416–419.
- Pádua, T. (2017) Pós-colheita de uvaia: caracterização de acessos e estádios de maturação. Dissertação de mestrado. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - Universidade de São Paulo, Piracicaba. 133p.
- Pagel, M. (1999) Inferring the historical patterns of biological evolution. *Nature* 401: 877-884.
- Pasternak, T., Potters, G., Caubergs, R., & Jansen, M. A. (2005) Complementary interactions between oxidative stress and auxins control plant growth responses at plant, organ, and cellular level. *Journal of Experimental Botany* 56: 1991-2001.
- Pereira, M.C., Steffens, R.S., Jablonski, A., Hertz, P.F., Rios A. de O., Vizzotto, M., Flôres, S.H. (2012) Characterization and antioxidant potential of Brazilian fruits from the Myrtaceae family. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60: 3061–3067.
- Reitz, R., Klein, R.M. & Reis, A. (1978) Projeto madeira de Santa Catarina. Florianópolis: Itajaí, 320 pp.
- Ren, F., Tanaka, H. & Yang, Z. (2009) A likelihood look at the supermatrix-supertree controversy. *Gene* 441: 119–125.
- Revell, L.J. (2012) phytools: An R package for phylogenetic comparative biology (and other things). *Methods Ecology & Evolution* 3: 217-223.
- Ruffino, M.S.M. et al. (2010) Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. *Food chemistry* 121: 996-1002.
- Sardi, J.C.O. et al. (2017) Unexplored endemic fruit species from Brazil: Antibiofilm properties, insights into mode of action, and systemic toxicity of four *Eugenia* spp. *Microbial pathogenesis* 280–287.

- Shaw, J. et al. (2007) Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III. *American Journal of Botany* 94 (3): 275–288.
- Shaw, J. et al. (2007) Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III. *American Journal of Botany* 94 (3): 275–288.
- Siqueira, E.M.A., Rosa, F.R., Fustinoni, A.M., Sant’Ana, L.P., Arruda, S.F. (2013) Brazilian savana fruits contain higher bioactive compounds content and higher antioxidant activity relative to the conventional red delicious apple. *Plos One* 8(8): 1–7.
- Soares, D.J, Walker, J., Pignitter, M., Walker, J.M., Imboeck, J.M., Ehrnhoefer-Ressler, M.M., Montenegro, B. & Somoza, V. (2014) Pitanga (*Eugenia uniflora* L.) fruit juice and two major constituents thereof exhibit anti-inflammatory properties in human gingival and oral gum epithelial cells. *Food Funct.* 5(11): 2981–2988.
- Stamatakis, A. (2006) RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 22: 2688–2690.
- Vasconcelos, T.N.C., Proença, C.E.B., Ahmad, B., Aguilar, D.S., Aguilar, R., Amorim, B.S., Campbell, K., Costa, I.R., De-Carvalho, P.S., Faria, J.E.Q., Giaretta, A., Kooij, P.W., Lima, D.F., Mazine, F.F., Peguero, B., Prenner, G., Santos, M.F., Soewarto, J., Wingler, A. & Lucas, E.J. (2017) Myrteae phylogeny, calibration, biogeography and diversification patterns: Increased understanding in the most species rich tribe of Myrtaceae. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 109: 113–137.
- Waterman, P.G.; Mole, S. (1994) *Analysis of phenolic plant metabolites*. Blackwell Scientific Publications, London.
- WCSP (2018) *World Checklist of Selected Plant Families*. Disponível em: <http://apps.kew.org/wcsp> (Acessado em 02 de abril de 2018).