

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA – NÍVEL DE MESTRADO E DOUTORADO

TERMO DE DEFESA

() – Dissertação (X) – Tese () – Qualificação

ALUNA
DEISY DOS SANTOS FREITAS

TÍTULO DO TRABALHO
Metabolômica Aplicada ao Estudo da Dioícia no Buriti (<i>Mauritia flexuosa</i> L.f.)

Defesa de Tese de Doutorado submetida à Comissão Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Química – Nível de Mestrado e Doutorado (Resolução nº 20/2018) da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos necessários para titulação no curso.

COMISSÃO EXAMINADORA		
NOME	INSTITUIÇÃO DE ENSINO	ASSINATURA
Glaucia Braz Alcantara	UFMS	
Neli Kika Honda	UFMS	
Adilson Beatriz	UFMS	
Thiago Inácio Barros Lopes	IFMS	
Maria Rita Marques	UFMS	

Campo Grande, 26 de fevereiro de 2018.



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



METABOLÔMICA APLICADA AO ESTUDO DA DIOICIA NO BURITI (*MAURITIA FLEXUOSA* L.f.)

Deisy dos Santos Freitas

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Glaucia Braz Alcantara

Campo Grande – 2018

Instituto de Química – UFMS
Cidade Universitária, s/n – Fone xx067 3345-7011
Av. Senador Filinto Müller nº 1555 – CEP: 79074-460 – Campo Grande (MS)
<http://www.ufms.br> – e-mail: pgquimica.propp@ufms.br



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



METABOLÔMICA APLICADA AO ESTUDO DA DIOICIA NO BURITI (*MAURITIA FLEXUOSA* L.f.)

Deisy dos Santos Freitas

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química – Nível de Doutorado – da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul para obtenção do título de Doutora em Química (Área de concentração: Química).

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Glaucia Braz Alcantara

Campo Grande – 2018

Instituto de Química – UFMS
Cidade Universitária, s/n – Fone xx067 3345-7011
Av. Senador Filinto Müller nº 1555 – CEP: 79074-460 – Campo Grande (MS)
<http://www.ufms.br> – e-mail: pgquimica.propp@ufms.br

Dedico este trabalho às mulheres fortes que sempre são fonte de inspiração na minha vida: minhas avós Maria e Maria de Lurdes, minha mãe Doralice, minha irmã Daiane, minha orientadora de iniciação científica Profa. Neli e minha orientadora do mestrado e doutorado Profa. Glaucia.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e por me dar forças para sempre seguir em frente...

Aos meus pais queridos, Doralice e Adriano, pelo amor incondicional e pelo apoio em todos os momentos...

Aos meus irmãos, Devair e Daiane, por todo carinho e alegria que trazem para minha vida...

Aos meus avós, Severino, Maria de Lurdes, Valdemar e Maria por serem fundamentais na minha formação, pelo carinho e por todo amor que sempre me deram...

Ao meu noivo, Rogers Espinosa de Oliveira, por sempre acreditar e torcer por mim... Por sempre estar ao meu lado e por todo o amor... É uma dádiva compartilhar a vida com você...

À Profa. Dra. Glaucia Braz Alcantara, pela orientação e pela incrível jornada em 6 anos de pós-graduação. Serei eternamente grata por todos os ensinamentos e por contribuir de forma sempre positiva para a minha formação. Obrigada por sempre acreditar em mim... É uma honra tê-la como orientadora e como um exemplo de ser humano e de profissional...

À Profa Dra. Neli Kika Honda, por toda a contribuição para minha formação ao longo da graduação e pós-graduação, por todos os ensinamentos e pela disposição em sempre ajudar...

Ao Dr. Arnildo Pott, por gentilmente nos esclarecer aspectos relacionados à dioícia no buriti...

Aos responsáveis pelo Parque Ecológico Anhanduí, Sônia dos Santos Boiarenco Amorim e Osmar Martins, pela gentil recepção no Parque... Agradeço pelo auxílio nas coletas das amostras, que foi fundamental para a realização deste trabalho...

A todos os funcionários do Parque Ecológico Anhanduí, pela disposição em sempre contribuir para as coletas...

Ao Prof. Dr. Luciano Morais Lião pela realização dos experimentos bidimensionais de HSQC, HMBC e TOCSY...

Aos membros do Grupo de Pesquisa em RMN, Metabolômica e Quimiometria do LP2: Rafael, Luciana, Tainara, Juliana, Luan, Jéssica, Monaliza, Letícia, Thiago, Carol, Elba e Wilian pela cumplicidade, apoio e por tornarem os dias sempre mais agradáveis...

A Tatiana Matayoshi, pela amizade e pelo apoio durante o doutorado...

Ao Rafael do Prado Aparecido, pela amizade desde a graduação, por toda ajuda durante as coletas das amostras e por aguentar as dores musculares após cada coleta... Obrigada!

A todos os amigos do LP2 e do INQUI...

Aos professores e técnicos do INQUI...

Aos órgãos de fomento, CAPES e CNPq, pelo suporte financeiro...

A todos que, de alguma forma, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho...

RESUMO

Mauritia flexuosa L.f. (buriti) é uma espécie nativa da Amazônia. Sua ocorrência está amplamente distribuída na América do Sul, sendo que no Brasil pode ser encontrada nos biomas Cerrado, Amazônia e Pantanal, cujo desenvolvimento se dá em regiões onde há solo úmido durante o ano todo como, por exemplo, em margens de rios ou córregos e veredas. O buriti é uma espécie dióica na qual as flores femininas e masculinas estão presentes em indivíduos separados e somente as fêmeas produzem frutos. O buriti demora muitos anos para atingir a fase reprodutiva, sendo que antes da primeira floração não é possível a identificação do gênero dos buritis jovens. Neste trabalho, a técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) associada a abordagens metabolômicas foi empregada para avaliar as possíveis diferenças nos perfis metabólicos dos extratos aquosos e metanólicos das folhas de buritis machos e fêmeas. As amostras foram avaliadas a partir de *pool* (agrupamento) das folhas para cada gênero, além da análise individual das folhas de cada planta. Com o intuito de encontrar indícios do gênero em buritis jovens, um modelo de classificação de OPLS-DA (*Orthogonal signal correction Partial Least Squares - Discriminant Analysis*) foi construído para predição do sexo nestes indivíduos. Diferentes perfis espectrais foram observados para os buritis fêmeas, machos e jovens. Os extratos aquosos apresentaram alto conteúdo de carboidratos, além de pequenas proporções de ácidos orgânicos e aminoácidos. Os extratos metanólicos apresentaram majoritariamente conteúdos de carboidratos e ácidos graxos (ácidos linoleico e linolênico). Variações significativas foram encontradas para os teores de carboidratos, *myo*-inositol e malato nos extratos aquosos, enquanto que nos extratos metanólicos a maior variação encontrada foi em relação aos teores de ácidos graxos. Devido à diferenciação na alocação de recursos metabólicos para as funções reprodutivas, é possível que os buritis fêmeas possuam uma maior demanda energética para a manutenção das suas atividades metabólicas. Adicionalmente, as variações observadas também podem estar envolvidas em sistemas específicos de resposta/sinalização para cada gênero. A predição do gênero dos buritis jovens não forneceu resultados conclusivos, possivelmente os indivíduos jovens possuem processos metabólicos e prioridades na alocação de recursos diferentes das plantas em fase reprodutiva.

Palavras-chave: *Mauritia flexuosa*, buriti, dioícia, RMN, quimiometria.

ABSTRACT

Mauritia flexuosa L.f. (buriti) is a native species from the Amazon. Its occurrence is widely distributed in South America, and in Brazil it can be found in the Cerrado, Amazon and Pantanal biomes, which it grows in areas with flooded soil throughout the year. Buriti is a dioecious species in which female and male flowers are present in separate individuals and only females produce fruits. This species takes many years to reach the reproductive phase, and before the first flowering it is not possible to identify the gender of young plants. In this work, Nuclear Magnetic Resonance (NMR) associated with metabolomic approaches was applied to evaluate the possible differences in the metabolic profiles of aqueous and methanolic extracts of male and female buriti leaves. The samples were evaluated from pooled leaf samples for each gender, besides the individual analysis of the leaves for each plant. In order to find evidence of gender in young buritis, a classification model of OPLS-DA (Orthogonal signal correction Partial Least Squares - Discriminant Analysis) was constructed to predict the gender in these plants. Different spectral profiles were found for females, males, and young plants. The aqueous extracts showed a high content of carbohydrates, and small proportions of organic acids and amino acids. The methanolic extracts showed the presence of carbohydrates and fatty acids (linoleic and linolenic acids). Significant variations were found in the carbohydrate, *myo*-inositol and malate contents for the aqueous extracts. For the methanolic extracts, the greatest variation was found in the fatty acid content. Due to the differentiation in the allocation of metabolic resources to the reproductive functions, it is possible that the female plants have a greater energy demand for the maintenance of their metabolic activities. In addition, the observed metabolic variations may be associated with specific signaling pathways for each gender. The prediction of the gender for young buritis did not provide conclusive results, probably the young plants have metabolic processes and priorities in the allocation of resources different from those in the reproductive phase.

Keywords: *Mauritia flexuosa*, buriti, dioecious plant, NMR, chemometrics.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CPPR	Composite Pulse Presaturation
d	Dupleto
DMSO-d ₆	Dimetil-sulfóxido deuterado
D ₂ O	Óxido de deutério (água deuterada)
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
TOCSY	<i>Total Correlation Spectroscopy</i>
<i>J</i>	Constante de Acoplamento, em Hertz
m	Multipeto
<i>M. flexuosa</i>	<i>Mauritia flexuosa</i>
p	Probabilidade de erro
PCA	Análise de Componentes Principais, do inglês, <i>Principal Component Analysis</i>
PLS-DA	<i>Partial Least Squares - Discriminant Analysis</i>
OPLS-DA	<i>Orthogonal signal correction Partial Least Squares - Discriminant Analysis</i>
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
s	Simpleto
t	Tripleto
TMSP-d ₄	2,2,3,3-d ₄ -3-(trimetilsilil) propionato de sódio

SUMÁRIO

1 – Introdução	9
1.1 – <i>Mauritia flexuosa</i> L.f.	9
1.2 – Sistemas reprodutivos nas angiospermas.....	14
1.2.1 – Reprodução assexuada.....	14
1.2.2 – Reprodução sexuada	16
1.3 – Dioicia.....	18
1.4 – Metabolômica	22
1.5 – RMN e Quimiometria	24
2 – Objetivos	26
2.1 – Objetivo geral	26
2.2 – Objetivos específicos.....	26
3 – Material e métodos.....	27
3.1 – Obtenção das amostras	27
3.2 – Procedimentos de extração.....	28
3.3 – Análises de RMN.....	29
3.4 – Análise multivariada e estatística	29
4 – Resultados e discussão.....	31
4.1 – Perfil espectral das folhas de buriti.....	31
4.2 – Análise multivariada	37
4.2.1 – Análise a partir do <i>pool</i> de plantas em estágio reprodutivo	37
4.2.2 – Análise individual das plantas em estágio reprodutivo	41
4.2.3 – Classificação de plantas em estágio vegetativo (indivíduos jovens)	45
4.3 – Dioicia no buriti.....	49
4.3.1 – Tipo de abordagem no estudo metabolômico da dioicia no buriti.....	49
4.3.2 – Dioicia e metabolismo	51
5 – Conclusões.....	58
Referências	59
Apêndices	69

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – *Mauritia flexuosa* L.f. (Arecaceae)

Mauritia flexuosa L.f. é uma palmeira nativa da Amazônia. Por vezes, esta espécie também é referida como *Mauritia vinifera* Mart., no entanto, consideram-se estes dois nomes sinônimos (DELGADO, COUTURIER & MEJIA, 2007; MARTINS, SANTELLI & FILGUEIRAS, 2006). Vários nomes populares são associados à *M. flexuosa*, dentro os quais estão buriti, miriti, muriti e palmeira-do-brejo. Sua ocorrência está amplamente distribuída na América do Sul em países como Bolívia, Peru, Equador, Colômbia, Venezuela, Trindade e Tobago, Guiana, Suriname e Guiana Francesa (DELGADO, COUTURIER & MEJIA, 2007; SAMPAIO, 2011). No Brasil, o buriti pode ser encontrado nos biomas Cerrado, Amazônia e Pantanal (SAMPALIO, 2011). Grandes aglomerações de buritis são conhecidas como buritizais. A Figura 1.1 mostra um buritizal na região urbana de Campo Grande - MS. O buriti se desenvolve em regiões onde há solo úmido durante o ano todo como, por exemplo, em margens de rios ou córregos e veredas, podendo chegar até 40 metros de altura (SAMPALIO, 2011). No Cerrado, os buritis são frequentemente encontrados nas regiões de veredas, cujas vegetações seguem os cursos d'água (SAMPALIO, 2011). A presença de grande concentração de buritis é um indicativo da presença de água e, por vezes, esta espécie também é associada à manutenção da quantidade de água nas veredas (SAMPALIO, 2011; MARTINS, SANTELLI & FILGUEIRAS, 2006).

Figura 1.1. Buritizal localizado na região urbana de Campo Grande - MS, na Avenida José Barbosa Rodrigues (S 20°26'17,402"; W 54°40'33,953"). Imagem obtida em outubro de 2014. Fonte: Próprio autor.



O buriti é uma espécie dióica na qual as flores femininas e masculinas estão presentes em indivíduos separados (Figura 1.2A e 1.2B). Os buritis fêmeas e machos produzem flores, no entanto, somente as plantas fêmeas produzem frutos (SAMPAIO, 2011; DELGADO, COUTURIER & MEJIA, 2007). O buriti demora muitos anos para atingir a fase reprodutiva, sendo que durante a fase vegetativa não é possível a identificação do gênero em indivíduos jovens (Figura 1.2C) (DELGADO, COUTURIER & MEJIA, 2007; MARTINS, SANTELLI & FILGUEIRAS, 2006). A polinização no buriti decorre da ação de insetos como abelhas nativas, besouros e moscas. Estes polinizadores transportam o pólen das flores masculinas até as flores femininas. Em regiões onde há grande concentração de insetos, a produção de frutos geralmente é maior (SAMPAIO, 2011). O período de floração do buriti depende da região, sendo que no Cerrado ocorre de novembro a abril. O amadurecimento e queda dos frutos maduros ocorre em aproximadamente um ano após a floração (SAMPAIO, 2011). Em determinados períodos do ano, é possível a observação de buritis fêmeas com novas inflorescências e cachos ainda com frutos (Figura 1.3).

M. flexuosa é uma espécie de grande importância para a fauna e flora, além de ter grande valor econômico regional. O buriti é, por vezes, referido como árvore da vida já que dele tudo se aproveita. Diversos animais se alimentam dos seus frutos na natureza e os buritizais servem de refúgio para muitas espécies. Populações locais

também consomem o buriti em sua alimentação. O beneficiamento dos frutos para a produção de doces e óleos e a utilização da palha para a confecção de artesanato gera renda para muitas famílias. O óleo do buriti é muito apreciado por suas características nutricionais e também por suas propriedades medicinais (SAMPAIO, 2011; DELGADO, COUTURIER & MEJIA, 2007; MARTINS, SANTELLI & FILGUEIRAS, 2006).

Estudos que visam a avaliação da composição dos frutos do buriti e suas atividades biológicas são reportados na literatura. A composição das folhas de buriti, em relação aos flavonoides, também tem sido relatada (de OLIVEIRA et al., 2013). Atividades antioxidantes e antimicrobianas são descritas para os carotenoides e compostos fenólicos presentes nos frutos. Estas propriedades ressaltam o potencial do buriti como um alimento rico em nutrientes (CÂNDIDO, SILVA & AGOSTINI-COSTA, 2015; KOOLEN et al., 2013).

Figura 1.2. Buritis fêmeas (A), machos (B) e jovens (C) localizados no Parque Ecológico Anhanduí, em Campo Grande – MS (S 20°30'25,212"; W 54°38'30,909"). Imagens obtidas em fevereiro e agosto de 2015. Fonte: Próprio autor.

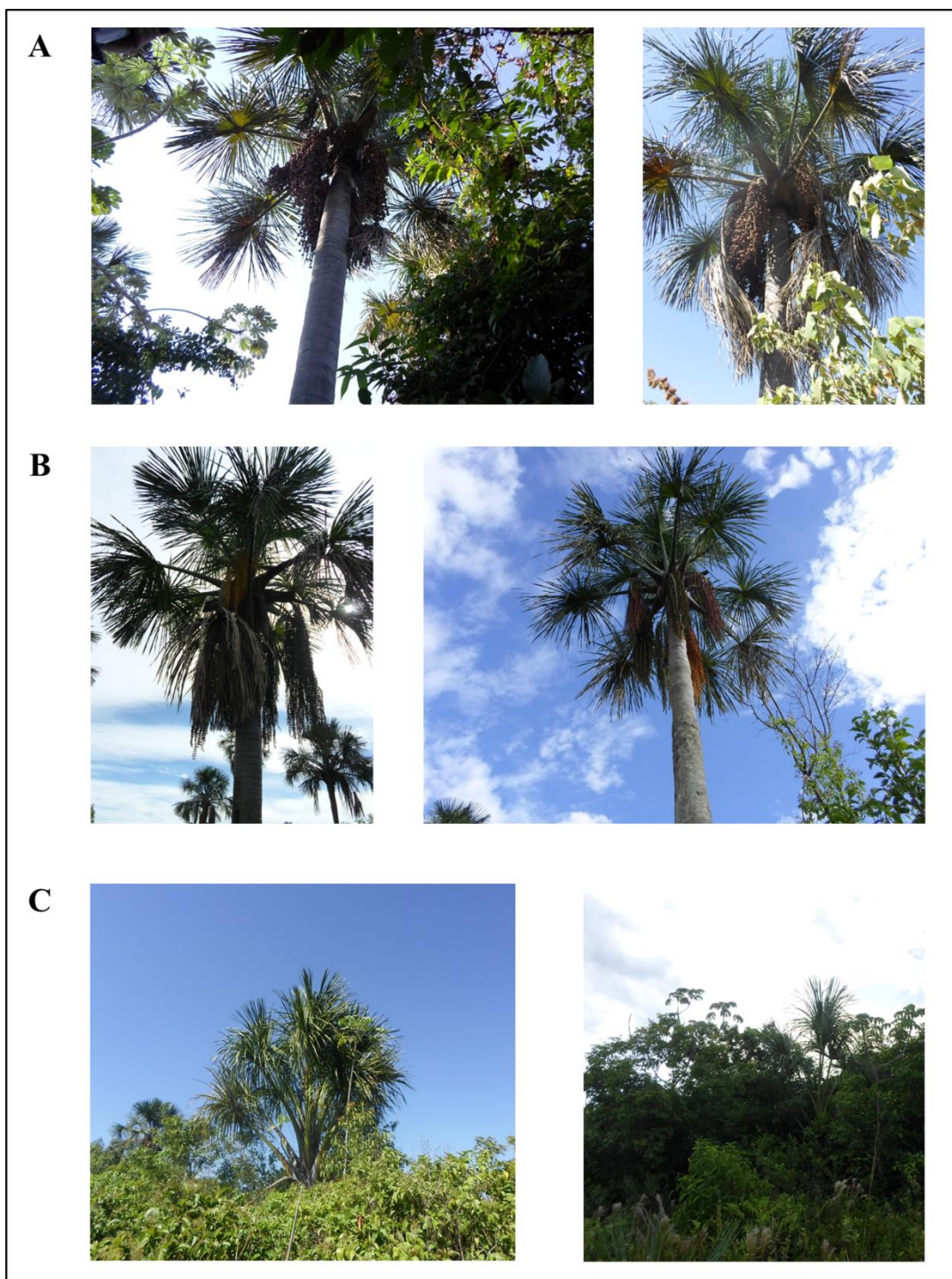
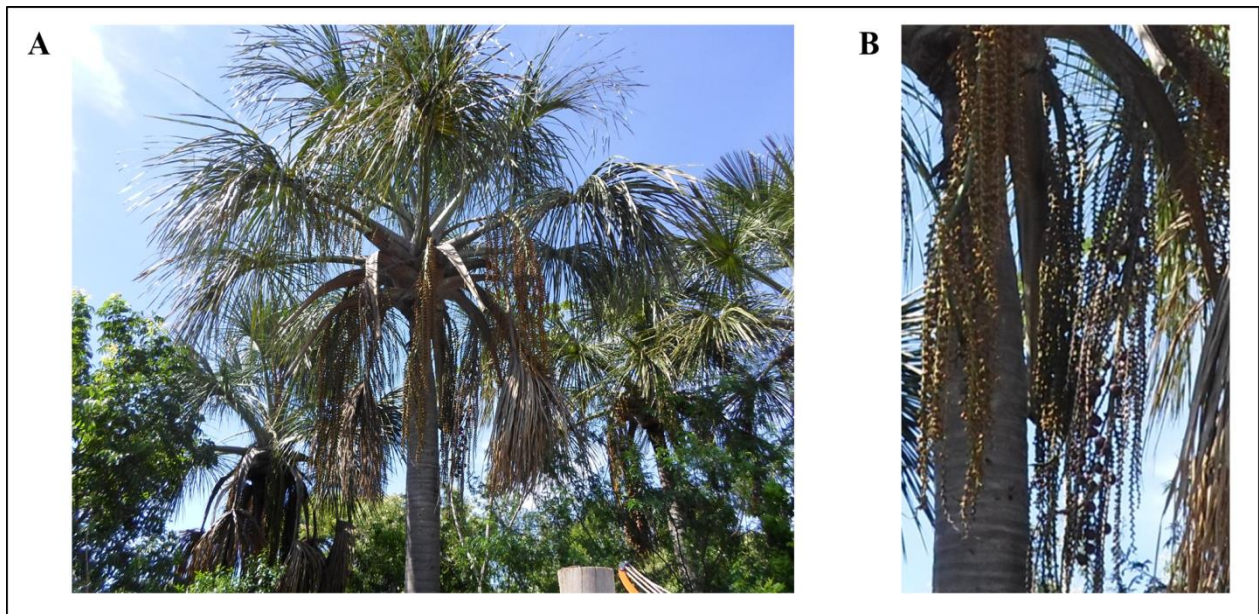


Figura 1.3. (A) Buriti fêmea localizada no Parque Ecológico Anhanduí (S 20°30'25,212"; W 54°38'30,909"), em fevereiro de 2015, durante o período da floração. (B) Ampliação da imagem das inflorescências femininas e dos cachos com frutos. Fonte: Próprio autor.



A população de buritis tem diminuído consideravelmente em diversas regiões onde ocorrem naturalmente, principalmente devido à degradação de áreas de floresta Amazônica e Cerrado. O Cerrado é um dos biomas mais degradados nos últimos anos, principalmente devido à utilização das áreas para a agricultura ou para a pecuária. A degradação desses biomas tem impacto direto na fauna e flora e prejudica todo o ecossistema (SAMPAIO, 2011). Outrossim, o extrativismo inadequado de folhas e frutos tem contribuído para a diminuição das populações naturais de buritis. A remoção das folhas de buriti para a confecção de artesanato tem impacto no desenvolvimento e manutenção das atividades reprodutivas das plantas. Por vezes, a colheita dos frutos é efetuada a partir do corte da palmeira toda, como relatado em algumas regiões da Amazônia (DELGADO, COUTURIER & MEJIA, 2007). Neste caso, são formados buritizais compostos predominantemente por buritis machos, causando grande impacto sobre a variabilidade genética para a espécie (DELGADO, COUTURIER & MEJIA, 2007).

O buriti é uma das espécies nativas recomendadas para recuperação das áreas degradadas e reposição da vegetação. O seu plantio é recomendado para regiões com solos encharcados e matas ciliares (POTT & POTT, 2002). Devido à sua importância para o meio ambiente, o buriti é uma espécie com potencial para utilização em agroflorestas (MARTINS, SANTELLI & FILGUEIRAS, 2006). O cultivo comercial do buriti tem potencial para a proteção da espécie, bem como para indústria, uma vez que seus frutos possibilitam uma vasta gama de aplicações. No entanto, o plantio comercial do buriti não é amplamente explorado por uma série de fatores. Em 2007, haviam duas plantações particulares de buritis no Peru, com perspectivas de crescimento neste país (DELGADO, COUTURIER & MEJIA, 2007). Dentre os possíveis fatores responsáveis pela baixa exploração desta espécie, estão o elevado tempo para atingir a fase reprodutiva e a necessidade de metodologias adequadas de plantio. O buriti atinge a maturidade sexual em 7-8 anos, sendo que o período anterior à primeira floração é chamado de fase vegetativa da planta. Nesta fase, o gênero das plantas não é perceptível.

A identificação precoce do sexo em plantas dióicas é pouco comum, porém, estudos realizados com a espécie *Silene latifolia* mostraram que existem diferentes expressões gênicas relacionadas ao sexo foram identificadas, demonstrando a diferenciação sexual das plantas ainda em fase vegetativa (ZLUVOVA et al., 2010). Estudos de base com foco na diferenciação sexual do buriti, bem como na identificação precoce do sexo das plantas, podem contribuir para um melhor aproveitamento comercial desta espécie, além de garantir sua preservação. Informações relacionadas às características metabólicas específicas em plantas machos e fêmeas podem ser úteis na compreensão da reprodução nesta espécie.

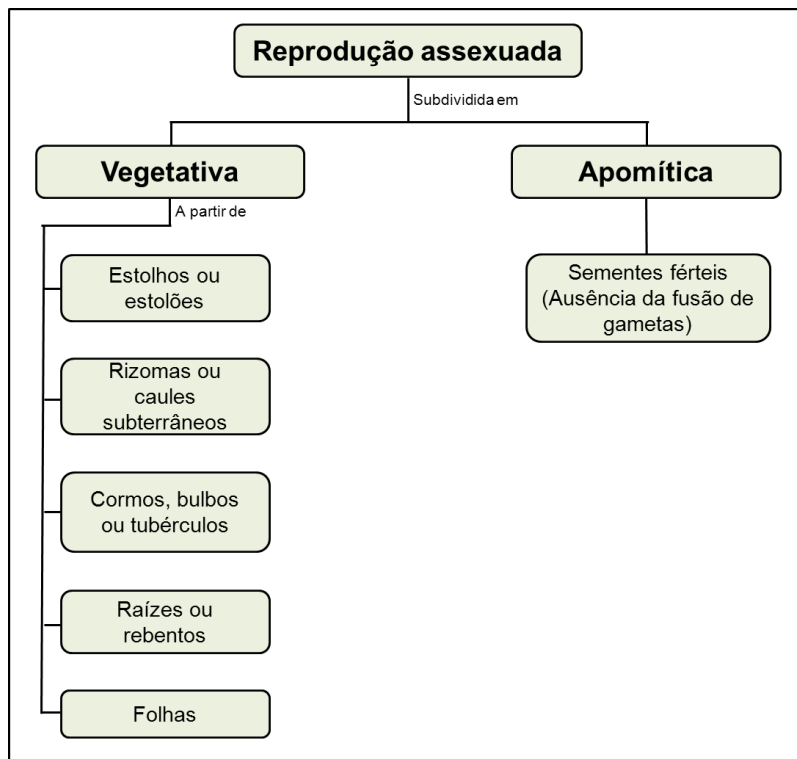
1.2 – Sistemas reprodutivos nas angiospermas

As angiospermas são dominantes na flora terrestre e possuem uma infinidade de estratégias para reprodução. Seus sistemas reprodutivos podem ser divididos em processos assexuados e sexuados.

1.2.1 – Reprodução assexuada

Na reprodução assexuada não há envolvimento de gametas masculinos e femininos. Desta forma, a prole gerada é idêntica à planta mãe. A reprodução assexuada pode ser vegetativa, na qual partes da planta mãe originam novas plantas. Neste caso, a reprodução pode ocorrer a partir de estolhos ou estolões; rizomas ou caules subterrâneos; cormos, bulbos ou tubérculos; raízes ou rebentos e folhas (KARASAWA et al., 2009). Outra forma de reprodução assexuada é a apomítica, na qual sementes férteis podem ser formadas mesmo sem a combinação de gametas femininos e masculinos. Em todos estes processos, as plantas geradas são clones da planta mãe. A Figura 1.4 resume os processos assexuados de reprodução (KARASAWA et al., 2009).

Figura 1.4. Resumo esquemático dos processos de reprodução assexuada nas angiospermas.



1.2.2 – Reprodução sexuada

A reprodução sexuada envolve a combinação de gametas sexuais e, diferentemente da reprodução assexuada, possibilita a variabilidade genética. Os sistemas de cruzamento nos quais as plantas se autofecundam são chamados de autógamos. Os sistemas de cruzamentos nos quais as plantas possuem fertilização cruzada são chamados de alógamos. Há sistemas nos quais estes dois processos podem ocorrer, sendo chamados de mistos (KARASAWA et al., 2009).

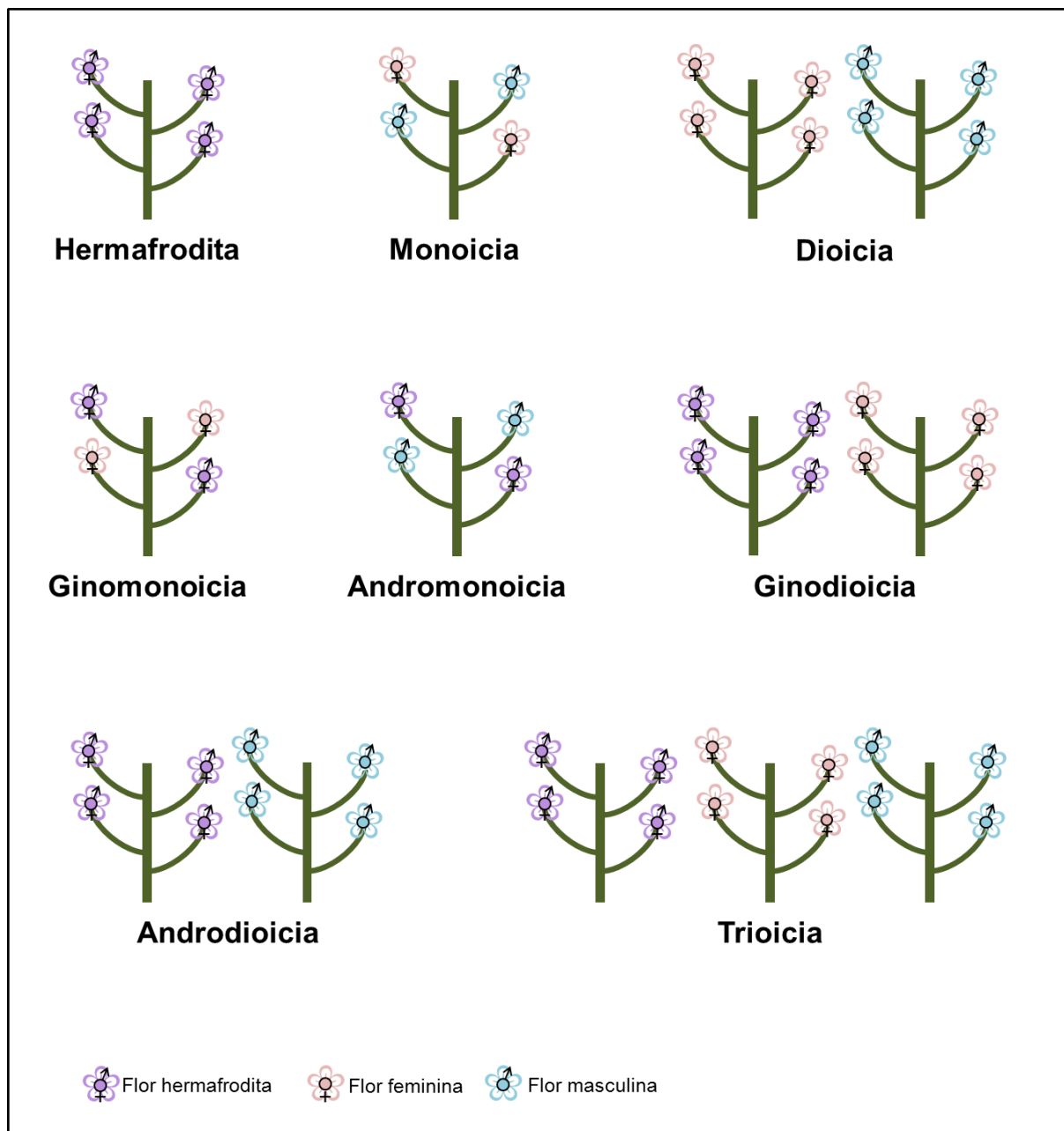
As flores são as estruturas que comportam os órgãos sexuais das angiospermas. Uma flor considerada “perfeita” possui, dentre outras estruturas, androceu e gineceu. O androceu é o órgão masculino da flor e é constituído por estames. O estame é constituído de filete e antera, sendo que nas anteras se formam os grãos de pólen. O gineceu é o órgão feminino da flor e é composto por carpelos. Os carpelos podem ter um ou mais pistilos e cada pistilo possui ovário, óvulos, estilete e estigma. O ovário irá originar o fruto e os óvulos se tornarão as sementes (VIEIRA & FONSECA, 2014).

As flores que possuem androceu e gineceu são chamadas de hermafroditas e a ausência ou esterilidade de um destes órgãos sexuais originam flores unissexuais. Flores que possuem somente o androceu funcional são chamadas de flores masculinas ou estaminadas. Flores que possuem somente o gineceu funcional são chamadas de flores femininas ou pistiladas. O reconhecimento dos tipos florais nas angiospermas permite a identificação de diversas formas de expressão sexual (VIEIRA & FONSECA, 2014).

As angiospermas são, em sua maioria, hermafroditas. Nestas plantas, as flores são estaminadas e pistiladas. Um número menor de espécies possui flores unissexuais. Espécies nas quais as flores unissexuais femininas ou masculinas estão presentes na mesma planta são chamadas de monóicas. Espécies nas quais as flores unissexuais estão dispostas em indivíduos separados são chamadas de dióicas. Outras condições sexuais intermediárias também são encontradas na natureza. Espécies ginomonóicas possuem flores femininas e hermafroditas na mesma planta, enquanto que espécies andromonóicas possuem flores masculinas e hermafroditas no mesmo indivíduo. Espécies que possuem flores femininas e hermafroditas em indivíduos separados são

denominadas de ginodióicas, enquanto que espécies que possuem flores masculinas e hermafroditas em plantas distintas são chamadas androdioicas. Espécies nas quais estão presentes flores hermafroditas, femininas e masculinas em indivíduos separados são chamadas de trióicas (KARASAWA et al., 2009; VIEIRA & FONSECA, 2014). A Figura 1.5 resume os diferentes tipos de expressões sexuais nas angiospermas.

Figura 1.5. Representação dos tipos de estratégias reprodutivas nas angiospermas.



As espécies que apresentam dimorfismo sexual, ou seja, estruturas florais diferentes em indivíduos separados (dioicia, ginodioicia, androdioicia e trioicia) são extremamente dependentes da ação dos polinizadores para a continuidade da espécie. A polinização pode ser dividida em autopolinização e polinização cruzada. A autopolinização decorre da proximidade entre os órgãos sexuais femininos e masculinos na mesma flor, sendo que só pode ocorrer em indivíduos hermafroditas. Este tipo de polinização pode ocorrer de forma espontânea ou, eventualmente, pela visita de vetores de pólen. A polinização cruzada pode ocorrer entre flores diferentes na mesma planta, neste caso é chamada de geitonogamia. Quando a polinização ocorre entre flores alocadas em indivíduos separados para uma mesma espécie é chamada de xenogamia. Vários mecanismos reprodutivos tendem a evitar a autopolinização nas espécies hermafroditas, favorecendo o cruzamento. Estes mecanismos podem envolver barreiras físicas entre os órgãos sexuais na mesma flor ou o amadurecimento dos órgãos reprodutivos em tempos diferentes. Outro mecanismo para evitar a autopolinização é a autoincompatibilidade, ou seja, a impossibilidade genética de fecundação com o próprio pólen (VIEIRA & FONSECA, 2014).

1.3 – Dioicia

A dioicia compreende o dimorfismo sexual no qual os indivíduos de uma mesma espécie possuem flores unissexuais femininas ou masculinas em plantas separadas (Figura 1.5). Os sistemas reprodutivos dimórficos não são frequentes na natureza e a maioria das angiospermas é hermafrodita. A dioicia é reportada em aproximadamente 6% das angiospermas (RENNER & RICKLEFS, 1995) e, por vezes, é associada à alocação ótima de recursos para as funções sexuais separadas e também para evitar a endogamia (BARRET, 2002; AINSWORTH, PARKER & BUCHANAN-WOLLASTON, 1998). Segundo Ainsworth (2000), a dioicia pode ser considerada um dos mecanismos mais drásticos para evitar os efeitos nocivos oriundos de uma prole endogâmica. Na natureza, os sistemas que promovem a polinização cruzada, inclusive para plantas hermafroditas, são sempre favorecidos (DARWIN, 1876). No entanto, somente o fato de promover maior variabilidade genética devido ao cruzamento não justifica a baixa

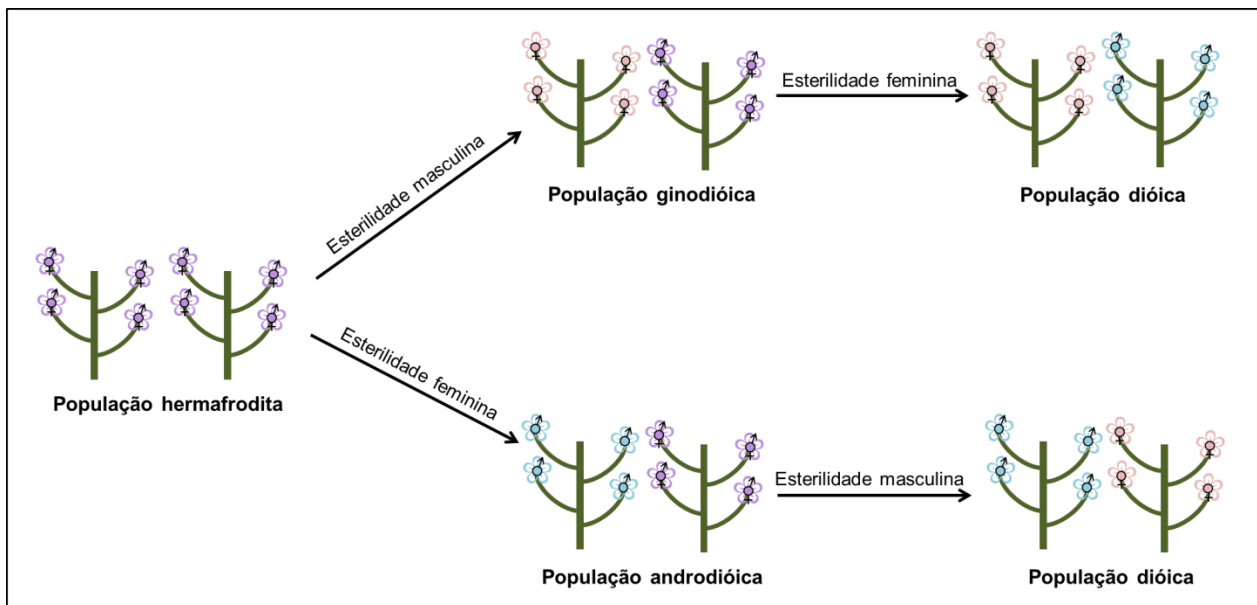
incidência de plantas dióicas na natureza e outros fatores devem estar envolvidos (AINSWORTH, 2000).

As espécies hermafroditas, em termos da alocação de recursos para as funções reprodutivas, podem ter limitações em uma das funções sexuais, uma vez que os recursos metabólicos devem ser direcionados para ambas as funções (femininas e masculinas) numa mesma flor. Em espécies dióicas, estes recursos podem ser alocados com maior eficiência, pois são direcionados apenas para uma função sexual em cada indivíduo (AINSWORTH, 2000; AINSWORTH, PARKER & BUCHANAN-WOLLASTON, 1998). Os sistemas sexuais de diversas plantas, incluindo as dióicas, possuem certa flexibilidade sexual. Este fato pode ser oriundo de uma insuficiência no controle de uma determinada função sexual em um ambiente complexo e a flexibilidade sexual também pode agregar benefícios adaptativos para as espécies (AINSWORTH, 2000; CHARNOV & BULL, 1977; KORPELAINEN, 1998). Barret (1998) associa as condições de estresse em determinados ambientes como uma força evolutiva capaz de favorecer o surgimento da dioicia. A limitação de recursos para a manutenção de ambas as funções sexuais em hermafroditas e os efeitos deletérios da depressão endogâmica também podem favorecer a dioicia (BARRET, 1998). A dioicia não é absoluta para muitas espécies, ou seja, rudimentos do sexo oposto podem ser encontrados em flores unissexuais (DURAND & DURAND, 1984).

Três possíveis rotas evolutivas são associadas ao surgimento de populações dióicas: a partir de espécies hermafroditas, a partir da monoicia e a partir da distilia. O surgimento de uma população dióica a partir de um ancestral hermafrodita provavelmente ocorreu por meio de mutações que produzem esterilidade feminina em certas plantas, gerando machos, e esterilidade masculina em outras plantas, gerando fêmeas. No entanto, é pouco provável que duas mutações desta natureza possam ocorrer simultaneamente e o mais provável é que a dioicia evoluiu a partir de hermafroditas por meio de mutações parciais. As mutações parciais podem ocorrer gerando, inicialmente, fêmeas ou machos em uma população hermafrodita (ginodioicia ou androdioicia). A androdioicia é uma condição muito rara na natureza e o mais aceitável é que o intermediário na evolução da dioicia tenha sido populações ginodióicas, ou seja, com a presença de plantas fêmeas e plantas hermafroditas.

Posteriormente, uma nova mutação deve produzir esterilidade feminina nos hermafroditas e, desta forma, produzir machos (Figura 1.6) (AINSWORTH, 2000; AINSWORTH, PARKER & BUCHANAN-WOLLASTON, 1998; BARRET, 1998; FREEMAN et al., 1997).

Figura 1.6. Representação da evolução da dioicia a partir de uma população hermafrodita.



A dioicia também pode ter evoluído a partir de populações monóicas. Espécies monóicas já possuem flores unissexuais, porém estão alocadas no mesmo indivíduo. Neste caso, a evolução para a dioicia envolve mutações que alteram as proporções das flores femininas e masculinas. Estas mutações originam, gradualmente, a separação sexual em indivíduos distintos (Figura 1.7) (AINSWORTH, 2000; CHARLESWORTH & CHARLESWORTH, 1978). A terceira possível rota evolutiva para a dioicia é partir da distília. A distília é uma condição em que uma espécie possui duas estruturas diferentes em suas flores hermafroditas. Estas estruturas diferem entre si quanto à posição das anteras e dos estigmas nas flores e a supressão de um destes órgãos pode ocasionar o surgimento de uma população dióica (Figura 1.8) (AINSWORTH, 2000; KARASAWA et al., 2009; LLOYD, 1979). A evolução da dioicia em algumas espécies pode estar relacionada com a evolução de cromossomos sexuais. Estes cromossomos parecem ter

evoluído independentemente entre as espécies e diferentes sistemas de diferenciação sexual dos cromossomos são reportados (AINSWORTH, 2000).

Figura 1.7. Representação da evolução da dioicia a partir de uma população monóica.

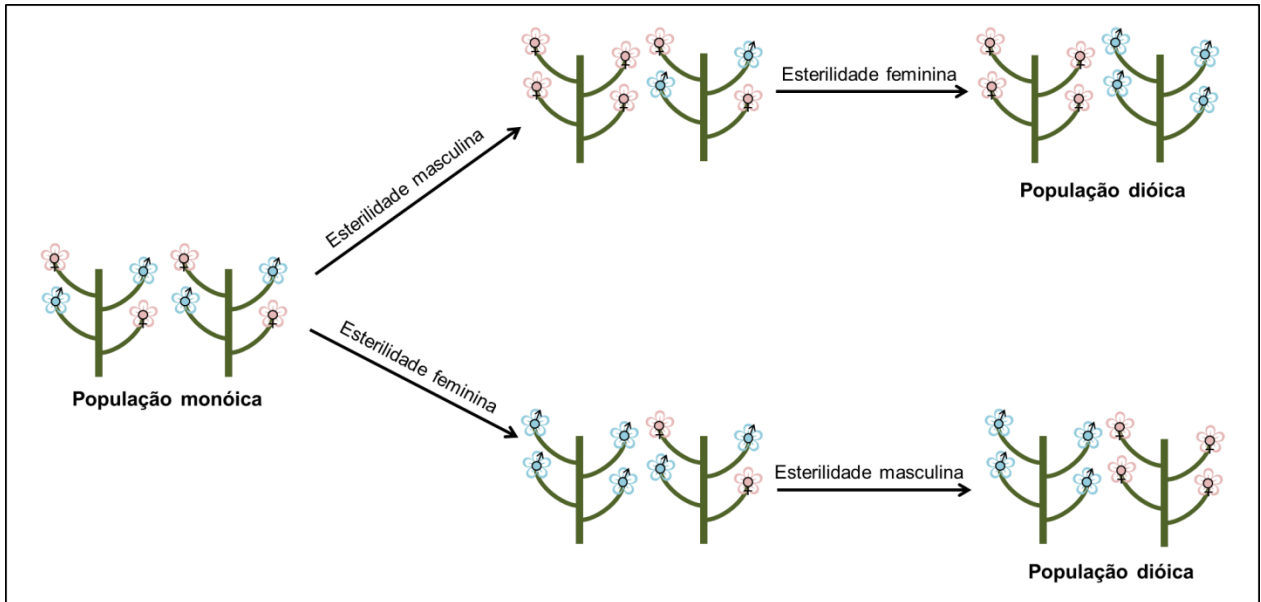
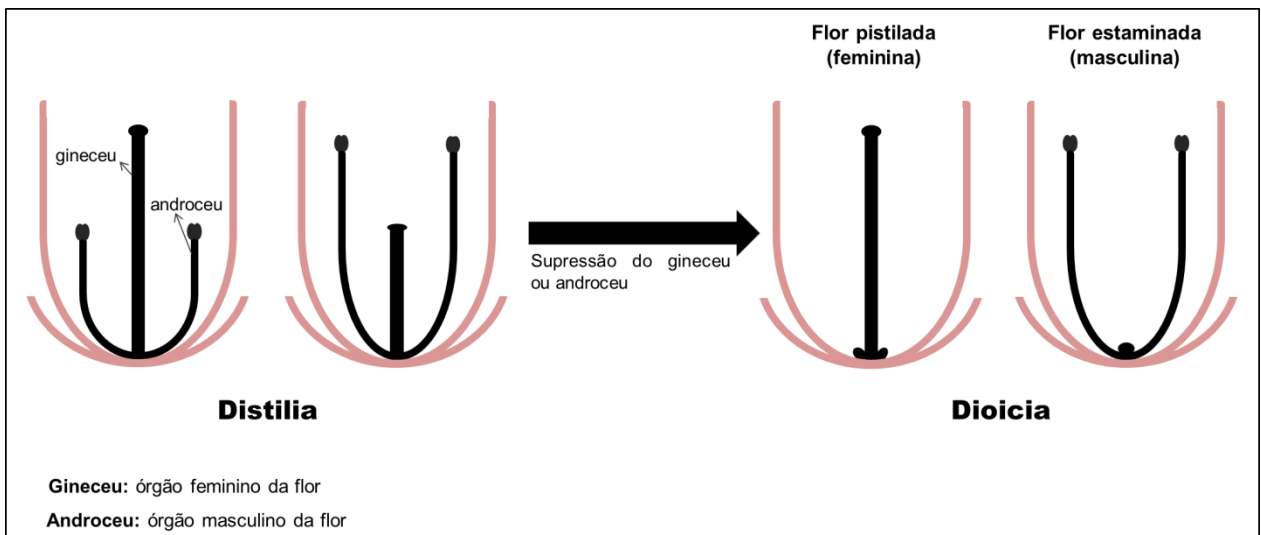


Figura 1.8. Representação da evolução da dioicia a partir da distília.



A dioicia tem um impacto direto na alocação de recursos para as funções reprodutivas. Neste sentido, são esperadas variações metabólicas nestas plantas em

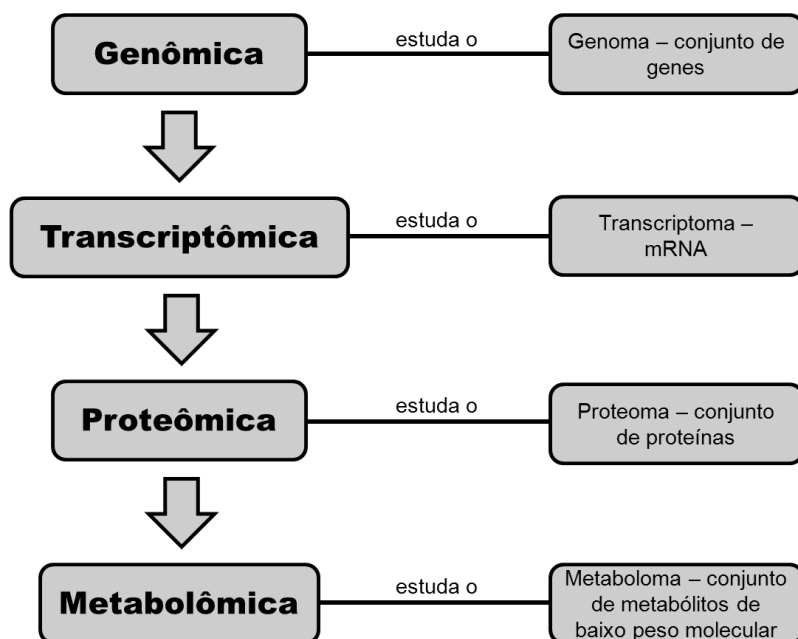
virtude das diferentes formas de direcionamento dos recursos em plantas fêmeas e machos para uma mesma espécie (SIMPSON, 2013). Estudos com foco nas variações metabólicas decorrentes da dioicia são reportados na literatura para as espécies *Pipper betle* e *Tinospora cordifolia* (BAJPAI et al. 2012; BAJPAI et al. 2016; CHOUDHRY et al. 2014; SHARMA, AMIN & PK, 2015). As folhas de *Pipper betle* são amplamente utilizadas para fins culturais, recreativos e medicinais. A análise das folhas desta espécie por meio da técnica de DARTMS (*Direct Analysis in Real Time Mass Spectroscopy*) indicou diferenças entre os perfis espectrais de plantas fêmeas e machos (BAJPAI et al. 2012). Os autores ressaltam a importância da busca por estratégias que possam contribuir para o conhecimento do gênero das plantas ainda em fase vegetativa, principalmente para espécies de interesse econômico (BAJPAI et al. 2012). *Tinospora cordifolia* é uma planta comumente utilizada com fins fitoterápicos. Variações significativas foram encontradas no conteúdo dos fitoconstituintes desta espécie entre diferentes estações do ano e entre os diferentes gêneros (CHOUDHRY et al. 2014). Outros estudos também apontaram variações na composição química (BAJPAI et al. 2016) e em parâmetros físico-químicos para esta espécie (SHARMA, AMIN & PK, 2015).

1.4– Metabolômica

Diversos estudos com abordagens metabolômicas são relatados na literatura para plantas e animais (APPARECIDO et al., 2017; BECERRA-MARTÍNEZ et al., 2017; de FALCO et al., 2017; FREITAS et al., 2015; HUO et al., 2017; LOPES et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2014; PONTES et al., 2016; SANTOS et al., 2018; ZABEK et al., 2016). As variações metabólicas de um determinado organismo sob uma condição específica podem ser avaliadas por uma abordagem metabolômica. As pequenas moléculas compõem o metaboloma e a identificação e quantificação do maior número possível de metabólitos constitui o campo de estudo da metabolômica (KIM, CHOI & VERPOORTE, 2011; PATTI, YANES & SIUZDAK, 2012). Neste sentido, é importante ressaltar que, por vezes, a quantificação dos metabólitos é efetuada de forma relativa a fim de permitir a identificação de variações associadas a condições específicas.

Diversas técnicas têm sido empregadas para estudos metabolômicos, destacando-se a Ressonância Magnética Nuclear (RMN), CLAE-EM (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – Espectrometria de Massas) e CG-EM (Cromatografia Gasosa – Espectrometria de Massas) (LIU & LOCASALE, 2017). A metabolômica é a ponta final das ciências “ômicas”, que englobam a genômica, transcriptômica e proteômica (Figura 1.9). A genômica tem por objetivo o estudo dos genes, enquanto que a transcriptômica tem por objetivo o estudo da transcrição destes genes em termos da composição de mRNA (HORGAN & KENNY, 2011).

Figura 1.9. Ciências “ômicas” e seus campos de estudo.



A metabolômica pode ser aplicada ao estudo de diversas condições nos seres vivos, incluindo situações ambientais de estresse e doenças. A identificação de perfis metabólicos diferentes para os organismos sob tais condições, em um determinado ponto do seu metabolismo, permite a observação de padrões metabólicos (biomarcadores). Neste sentido, a abordagem metabolômica tem sido empregada com sucesso no estudo de doenças e pragas em plantas (APPARECIDO et al., 2017;

CEVALLOS-CEVALLOS et al., 2012; FREITAS et al., 2015; PONTES et al., 2016; UAWISETWATHANA et al., 2015), variações sazonais (FALASCA et al., 2014; SCOGNAMIGLIO et al., 2014), classificação de espécies (CHOI et al., 2005), equivalência química de plantas geneticamente modificadas (OLIVEIRA et al., 2014) e caracterização de alimentos (GARCÍA-GARCÍA et al., 2018).

Uma vez que a metabolômica se propõe a investigar o maior número de metabólitos possível em um sistema, a seleção dos métodos de extração para as análises é de extrema importância. Os organismos vivos possuem uma infinidade de metabólitos em suas células e a utilização de sistemas combinados de extração propicia uma visão mais abrangente dos perfis metabólicos (CHOI & VERPOORTE, 2014). As análises metabolômicas podem ser direcionadas ou não-direcionadas. As abordagens direcionadas são efetuadas a partir da análise de um conjunto pré-estabelecido de metabólitos, enquanto que as abordagens não-direcionadas avaliam o perfil geral de todos os metabólitos em um sistema (PATTI, YANES & SIUZDAK, 2012).

O fenômeno da dioicia é uma condição particularmente interessante nas angiospermas e pouco compreendido em muitas espécies. Estudos metabolômicos com espécies dióicas podem contribuir para a compreensão deste tipo de expressão sexual em plantas e quais suas implicações no cultivo e utilização agrônômica destas espécies.

1.5 – RMN e Quimiometria

A RMN é empregada com frequência em análises metabolômicas. A técnica é extremamente versátil, pois possibilita a identificação e quantificação de diversos metabólitos numa mistura sem a necessidade de procedimentos laboriosos para o preparo das amostras. Os substratos avaliados em análises metabolômicas podem ser líquidos ou semissólidos e os dados gerados são muito reprodutíveis. No entanto, a técnica é pouco sensível quando comparada com outros métodos analíticos (KIM, CHOI & VERPOORTE, 2011; MARKLEY et al., 2017; PONTES et al., 2017).

As análises de RMN para um grande número de amostras geralmente produz um sistema complexo, devido à natureza multivariada dos dados. Nestes casos, a

identificação de pequenas diferenças e o reconhecimento de padrões se torna uma tarefa extremamente laboriosa. Com o intuito de reduzir a dimensionalidade dos dados, a RMN é frequentemente associada a análises quimiométricas (KIM, CHOI & VERPOORTE, 2011; PONTES et al.; 2017).

A quimiometria utiliza a matemática e a estatística para otimizar a investigação de sistemas químicos que possuem uma grande quantidade de variáveis. Diversos métodos quimiométricos podem ser aplicados a dados analíticos como, por exemplo, reconhecimento de padrões, classificação e calibração multivariada. A Análise de Componentes Principais (PCA, do inglês, *Principal Component Analysis*) é um método de análise exploratória amplamente empregada em metabolômica a partir de dados de RMN. Trata-se de um método não supervisionado de análise, no qual a informação sobre a qual grupo (classe) as amostras pertencem não é informada ao gerar os dados. Os métodos supervisionados de análise, por sua vez, necessitam da informação da classe das amostras para gerar o modelo (BEEBE, PELL & SEASHOLTZ, 1998), cujo algoritmo de PLS-DA (*Partial Least Squares - Discriminant Analysis*) tem sido empregado em diversos tipos de estudos metabolômicos.

A dioícia oferece um vasto campo de estudo sobre a sexualidade nas angiospermas e a compreensão dos fatores que favorecem a dioícia podem contribuir com novos conhecimentos sobre a reprodução em plantas, especialmente em espécies de interesse comercial. Estudos com foco nas variações metabólicas entre plantas machos e fêmeas, bem como sobre o momento no qual ocorre a manifestação sexual em indivíduos jovens, são extremamente valiosos. Neste contexto, este trabalho se propôs a empregar a RMN de ^1H , aliada a abordagens metabolômicas, para avaliar possíveis diferenças entre os perfis metabólicos de plantas machos, fêmeas e jovens de *Mauritia flexuosa*.

2 – OBJETIVOS

2.1 – Objetivo geral

Avaliar as diferenças nos perfis metabólicos dos extratos aquosos e metanólicos das folhas de buriti machos e fêmeas por meio de técnicas de RMN utilizando uma abordagem metabolômica.

2.2 – Objetivos específicos

- Identificar os metabólitos presentes nos extratos aquosos e metanólicos das folhas de buriti.
- Comparar a análise da dioicia no buriti a partir de *pool* de plantas para cada grupo de plantas machos e fêmeas e a partir da análise individual das plantas.
- Desenvolver modelo de classificação para predição do sexo em buritis jovens.
- Relacionar as possíveis diferenças dos perfis metabólicos com processos metabólicos distintos para buritis fêmeas e machos.

3 – MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Obtenção das amostras

Amostras de folhas de 20 árvores de buritis em fase reprodutiva (10 fêmeas e 10 machos) foram coletadas no Parque Ecológico Anhanduí, localizado em Campo Grande – MS (S 20°30'25,212"; W 54°38'30,909"), em fevereiro de 2015, durante o período de floração das plantas. A distinção entre as plantas machos e fêmeas foi realizada por meio da observação do gênero das flores em cada indivíduo (Figuras 3.1 e 3.2). Também foram coletadas folhas de 7 plantas em estágio vegetativo (jovens), ou seja, antes do estágio de floração e, portanto, sem manifestação do gênero.

Figura 3.1. Buriti fêmea e ampliações das imagens das flores femininas. Fonte: Próprio autor.



Figura 3.2. Buriti macho e ampliações das imagens das flores masculinas. Fonte: Próprio autor.



3.2 – Procedimentos de extração

Duas abordagens foram empregadas para a análise das folhas de buriti fêmeas e machos. A primeira consistiu no agrupamento das folhas dos 10 indivíduos machos e 10 fêmeas para a produção de um *pool* de plantas para cada gênero, retirando-se 10 replicatas analíticas. A segunda consistiu na análise de cada planta individualmente, com 3 replicatas analíticas para cada planta. As folhas de buritis jovens foram somente analisadas por indivíduos, já que para estas plantas não há manifestação observável do gênero. Em ambos os casos a folhas foram pulverizadas em nitrogênio líquido.

As extrações foram conduzidas com aproximadamente 100 mg de folhas pulverizadas em dois sistemas de extração independentes. O primeiro consistiu na

utilização de 1 mL de solução 0,05% de 2,2,3,3-d₄-3-(trimetilsilil) propionato de sódio (TMSP-d₄) em tampão fosfato (0,09 mol/L) produzido com água deuterada (D₂O), com pH final de 6,4. O segundo consistiu na utilização de 5 mL de metanol grau HPLC. Em ambos os casos as amostras foram mantidas em ultrassom por 20 minutos, filtradas com algodão, centrifugadas por 5 minutos a 2500 rpm e novamente filtradas. Os extratos aquosos foram imediatamente acondicionados em refrigeração até o momento das análises por RMN, enquanto os extratos metanólicos foram secos em capela de exaustão e posteriormente acondicionados em dessecador. Os extratos metanólicos secos foram ressolubilizados em 500 µL de solução 0,05% TMSP-d₄/DMSO-d₆ para as análises de RMN.

3.3 – Análises de RMN

As medidas de RMN foram efetuadas em espectrômetro Bruker DPX 300 (7,05 T), operando a 300,13 MHz para o ¹H. A sequência de pulso utilizada foi a *Composite Pulse Presaturation* (CPPR) para supressão do sinal residual da água em 4,83 ppm para os extratos aquosos e em 3,48 ppm para os extratos metanólicos ressolubilizados em DMSO. Os experimentos de RMN de ¹H foram adquiridos com 128 varreduras, 64k pontos, tempo de aquisição de 3,64s, tempo de espera de 2s, ganho do receptor de 90,5 e janela espectral de 8.992,81 Hz. Posteriormente, os dados foram processados com 64k pontos, multiplicação exponencial de 0,30 Hz e correções manuais de fase e linha de base (Apêndice A). O sinal do TMSP foi utilizado como referência interna para calibração dos espectros. Experimentos bidimensionais de TOCSY, HSQC e HMBC foram obtidos para auxiliar na identificação estrutural dos compostos (Apêndice B).

3.4 – Análise multivariada e estatística

Os dados de RMN de ¹H das folhas de buriti foram inicialmente analisados por PCA, utilizando-se o programa AMIX 3.8 Bruker. Os buckets foram construídos de forma retangular simples, com largura de 0,03 ppm. Os dados foram integrados pela soma das intensidades absolutas e escalados pela intensidade total. Para os extratos

aquosos, a região analisada foi de 0,70-7,60 ppm, com exclusão da região entre 4,40-5,20 referente ao sinal residual da água. Para os extratos metanólicos ressolubilizados em DMSO, a região avaliada foi de 0,48-10,0 ppm, com exclusão das regiões entre 2,36-2,71 ppm e 3,33-3,62 ppm, referentes aos sinais residuais do DMSO e da água, respectivamente. As variáveis foram centradas na média.

Os dados de RMN de ^1H para as análises das plantas por indivíduos foram submetidos à modelagem utilizando o algoritmo de PLS, com análise discriminante (DA, do inglês, *Discriminant Analysis*) e correções ortogonais de sinais (OSC, do inglês, *Orthogonal signal correction*) com o objetivo de remover a variação não correlacionada com a classe. Os modelos de PLS construídos com análise discriminante e correções ortogonais são referidos como modelos de OPLS-DA. As variáveis foram pré-processadas com Pareto e duas correções ortogonais foram aplicadas. O método foi validado por validação interna cruzada ($n=10$) e por validação externa. A validação externa foi conduzida por meio da construção de um modelo com 2/3 das amostras, utilizando o 1/3 restante para predição. A sensibilidade e especificidade do modelo foram mensuradas como descrito por Bylesjo et al. (2006), por meio do verdadeiro positivo (TP), verdadeiro negativo (TN) e falso positivo (FP). A sensibilidade e especificidade foram obtidas de acordo com as fórmulas $\text{TP}/(\text{TP} + \text{FN})$ e $\text{TN}/(\text{FP} + \text{TN})$, respectivamente.

Os metabólitos de maior peso para a distinção das amostras foram submetidos à análise de variância por meio do teste Two-Sample t-Test. As integrais dos sinais, em referência ao sinal do TMSP, foram utilizadas para a comparação entre as médias. Teste de correlação de Pearson foi aplicado para a observação de correlações lineares entre as variáveis. Os dados foram avaliados com um intervalo de confiança de 95%, no qual uma probabilidade de erros (P) menor que 0,05 indica variação significativa.

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – Perfil espectral das folhas de buriti

Os espectros de RMN de ^1H possibilitaram a observação de diferentes perfis metabólicos para buritis fêmeas, machos e jovens em ambos os sistemas de extração. Os espectros provenientes do *pool* de plantas mostraram grande homogeneidade dentro de cada grupo, uma vez que a abordagem por *pool* de plantas minimiza as variações relacionadas às características particulares de cada indivíduo. Por outro lado, os espectros provenientes da análise individual das plantas são bem menos homogêneos dentro de cada gênero e as características inerentes de cada planta são evidenciadas. Os perfis espectrais para os buritis fêmeas, machos e jovens nos dois sistemas de extração empregados são mostrados nas Figuras 4.1, 4.2, e 4.3. Os extratos aquosos são compostos predominantemente por sinais referentes a carboidratos e, em menores proporções, de derivados ionizados de ácidos orgânicos, aminoácidos e metanol (possivelmente oriundo de processos de degradação). Nos extratos metanólicos são observados sinais de carboidratos e ácidos graxos (ácidos linoleico e linolênico). A elucidação estrutural dos compostos foi efetuada por meio de comparação com dados da literatura (POPESCU et al., 2015; BHARTI et al., 2011; PÉREZ et al., 2010; PICCIONI et al., 2009; SON et al., 2009), experimentos bidimensionais, testes por adição de padrão e comparação com espectros de substâncias padrão. Os compostos identificados nos espectros das folhas de buriti nos dois sistemas de extração empregados, bem como seus deslocamentos químicos, estão dispostos na Tabela 4.1.

Figura 4.1. Perfis espectrais representativos de RMN de ^1H dos extratos aquosos provenientes do *pool* de folhas de buritis fêmeas (A) e machos (B) e da análise individual das plantas fêmeas (C) e machos (D).

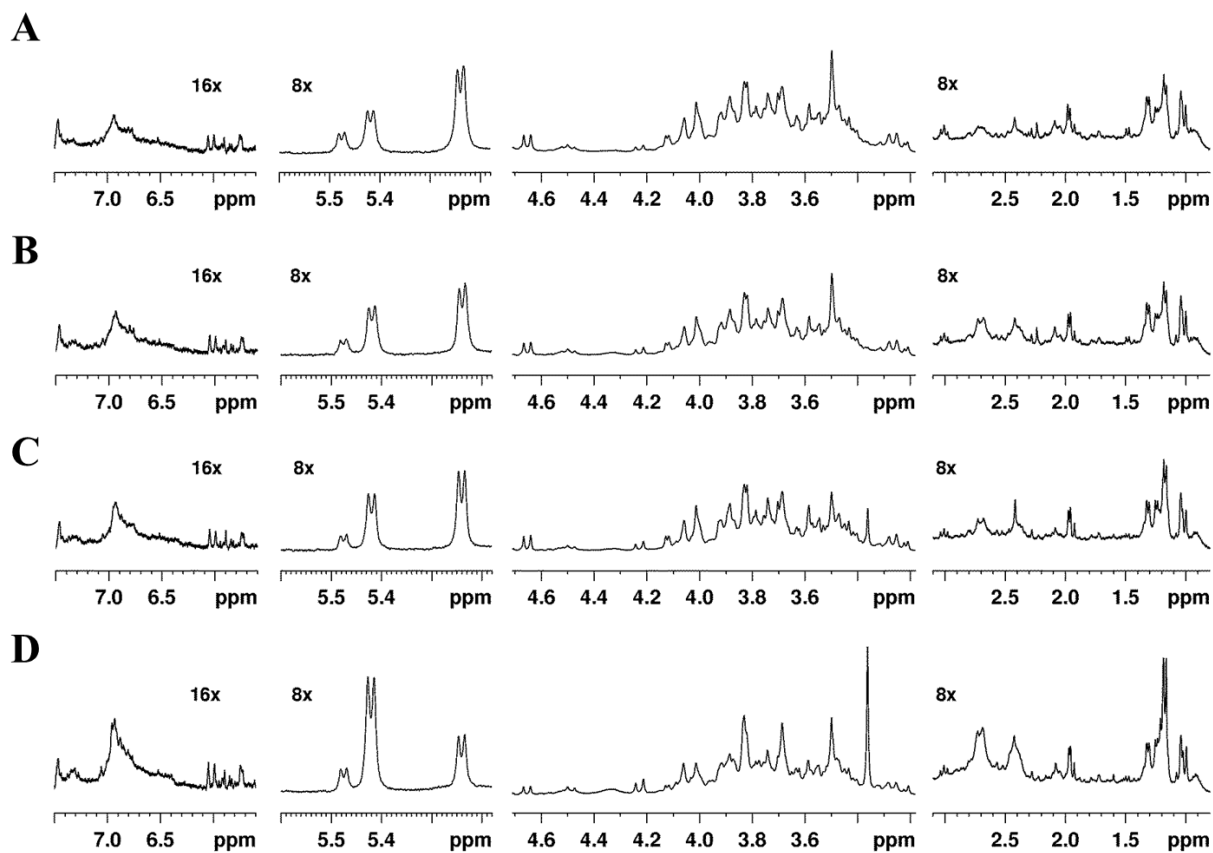


Figura 4.2. Perfis espectrais representativos de RMN de ^1H dos extratos metanólicos provenientes do *pool* de folhas de buritis fêmeas (A) e machos (B) e da análise individual das plantas fêmeas (C) e machos (D).

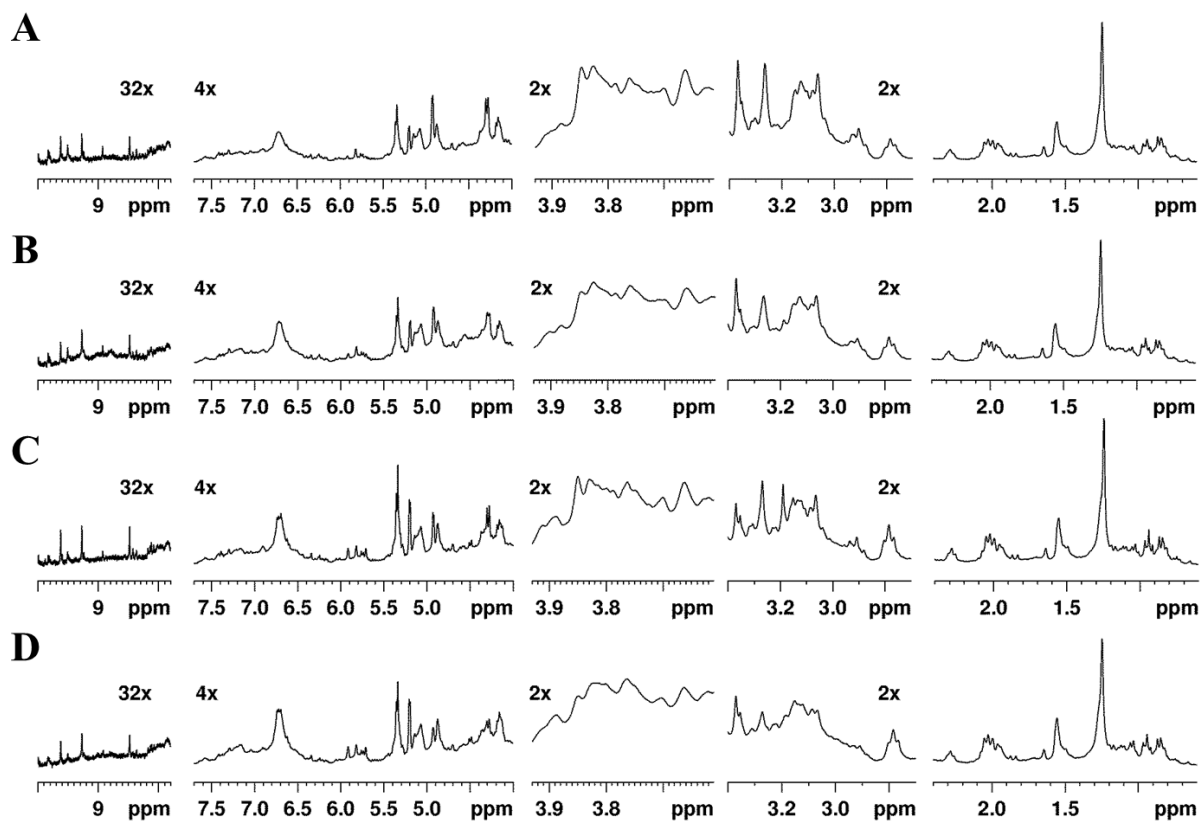


Figura 4.3. Perfis espectrais representativos de RMN de ^1H dos extratos aquosos (A) e metanólicos (B) das folhas de buritis jovens.

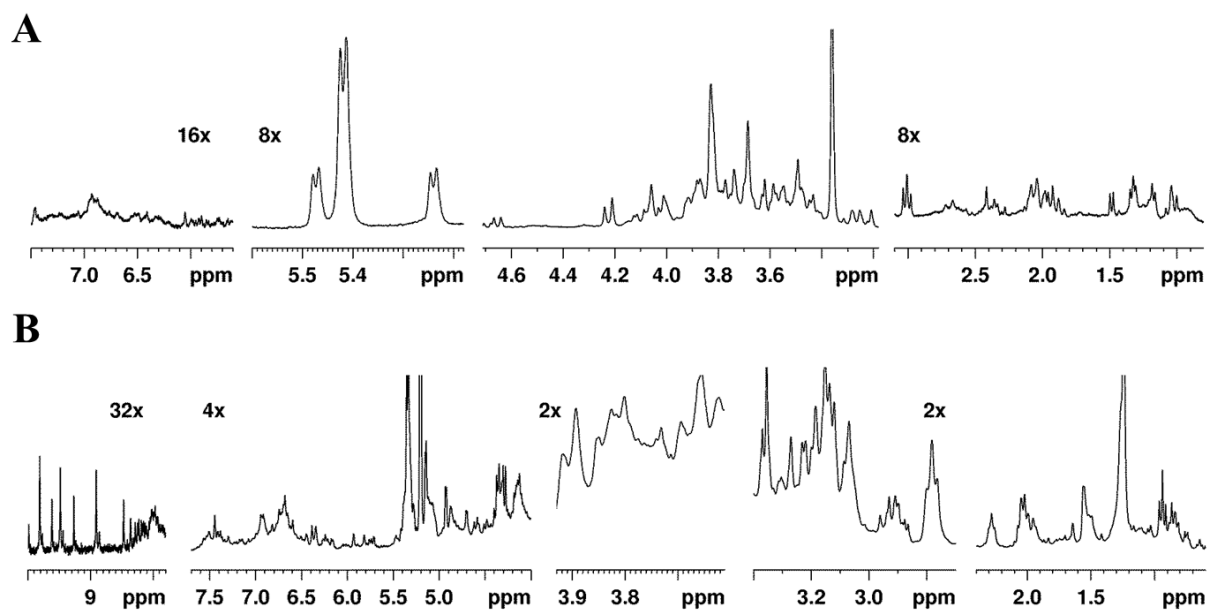


Tabela 4.1. Deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C dos compostos identificados nos extratos aquosos e metanólicos das folhas de buritis fêmeas, machos e jovens. s: simpleto, d: duplete, t: tripleto, m: multiplete.

Compostos	Assinalamento	$\delta\ ^1\text{H}$	Multiplicidade [J (Hz)]	$\delta\ ^{13}\text{C}$
<i>Extrato aquoso</i>				
Acetato	CH_3	1,93 ^b	s	
Formato	HCOOH	8,46 ^b	s	
Malato	$\alpha\text{-CH}$	4,33		72,9
	$\beta\text{-CH}$	2,69 ^c		45,1
	$\beta'\text{-CH}$	2,41		45,1
Alanina	$\beta\text{-CH}_3$	1,48	d [7,24]	
Colina	CH_3	3,21	s	56,8
Frutose	C3-H/C4-H	4,12 ^c		77,45
		3,52-3,60 ^a		
		3,62-3,94 ^a		
		3,98-4,03 ^a		
		4,06 ^a		
$\alpha\text{-glucose}$	C1-H	5,24 ^c	d [3,65]	94,8
	C2-H/C4-H	3,37-3,57 ^a	m	
	C3-H/C5-H/C6-H	3,68-3,95 ^a	m	
$\beta\text{-glucose}$	C1-H	4,65	d [7,89]	98,7

	C2-H	3,25 ^c		77,0
	C3-H/C4-H/C5-H	3,37-3,49 ^a	m	
	C6-H	3,91 ^a	m	
Metanol	CH ₃	3,36	s	51,6
Myo-inositol	C1-H/C3-H	3,59-3,68 ^a	m	
	C2-H	3,28 ^c		
	C4-H/C6-H	3,50-3,57 ^a	m	
	C5-H	4,04-4,09 ^a	m	
Sacarose	C1-H	5,42 ^c	d [3,72]	94,8
	C2-H	3,55		73,8
	C3-H	3,80		
	C7-H	4,23	d [8,74]	79,1
	C8-H	4,06		76,5
	C10-H ₂	3,68	s	64,0
	C11/12-H ₂	3,83	m	65,0; 62,7

Extrato metanólico

Ácido linoleico	-CH=CH-	5,34		
	-CH=CH-CH ₂ -CH=CH-	2,77		
	-CH ₂ -CH=CH-	2,02		
	(CH ₂) _n	1,26 ^c		
	-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₃	0,86		
Ácido linolênico	-CH=CH-	5,34		
	-CH=CH-CH ₂ -CH=CH-	2,77		
	-CH ₂ -CH=CH-	2,02		
	(CH ₂) _n	1,26 ^c		

	-CH=CH-CH ₂ -CH ₃	0,94		
Colina	CH ₃	3,19	s	
β-glucose	C1-H	4,29 ^{bc}	d [7,68]	98,7
	C2-H	2,91 ^b		
	C3-H/C4-H/C5-H	3,03-3,14 ^b	m	
	C6-H	3,65-3,71 ^b	m	
Myo-inositol	C1-H/C3-H	3,37 ^b		
	C2-H	2,93 ^b	t [9,01]	76,6
	C4-H/C6-H	3,14 ^b		
	C5-H	3,73 ^b		

^a Sinais em região de grande sobreposição/multiplicidade complexa

^b Sinal confirmado por meio de análises por adição de padrão.

^c Sinal usado para a determinação da proporção relativa

4.2 – Análise multivariada

4.2.1 – Análise a partir do *pool* de plantas em estágio reprodutivo

Os gráficos de escores e pesos de PCA para os extratos aquosos e metanólicos do *pool* de plantas são mostrados nas Figuras 4.4 e 4.5, respectivamente. Nos dois sistemas de extração empregados é possível observar a clara distinção entre as amostras de folhas de buritis fêmeas e machos no eixo PC1. Em ambos os casos, as duas primeiras componentes principais descrevem mais de 90% da variância total do sistema. No gráfico de pesos das variáveis dos extratos aquosos, é possível observar que a região entre 3,25-4,15 ppm é responsável por alocar as amostras de buritis fêmeas em valores negativos de PC1. A região entre 2,25-3,00 ppm e os sinais em 3,83 e 5,42 ppm são responsáveis por alocar as amostras de buritis machos em valores

positivos de PC1. No gráfico de pesos das variáveis dos extratos metanólicos, pode-se observar que as regiões entre 2,90-3,30 ppm, 3,60-3,90 ppm e o sinal em 1,24 ppm foram responsáveis por alocar as amostras de buritis fêmeas em valores negativos de PC1. As regiões entre 4,40-5,40 ppm e 5,50-7,00 ppm foram responsáveis por alocar as amostras de buritis machos em valores positivos de PC1.

Figura 4.4. Gráfico de escores (A) e pesos (B) de PCA para os extratos aquosos das folhas do *pool* de plantas de buritis fêmeas e machos.

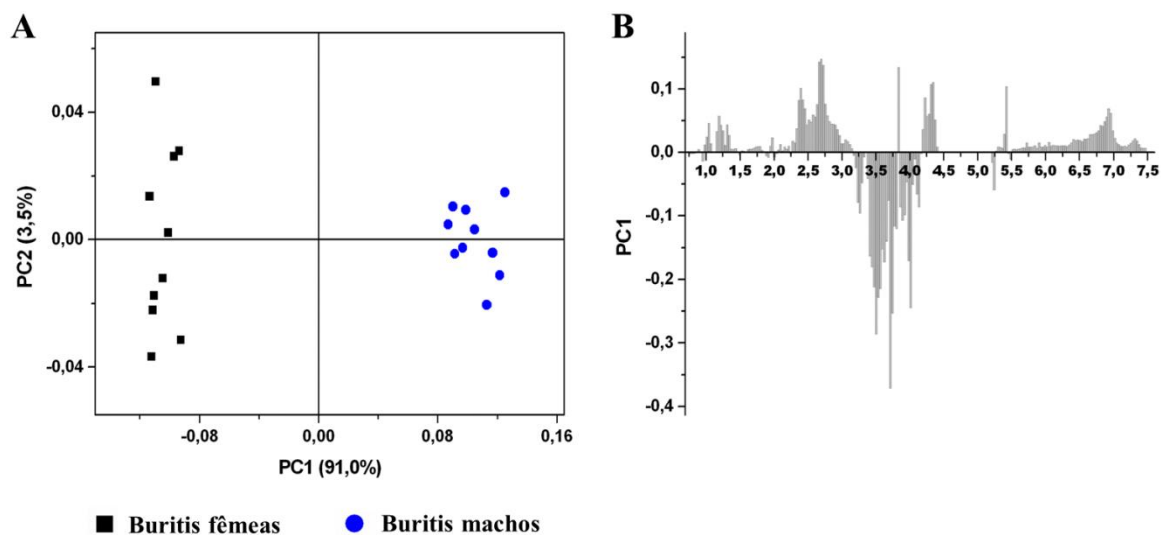
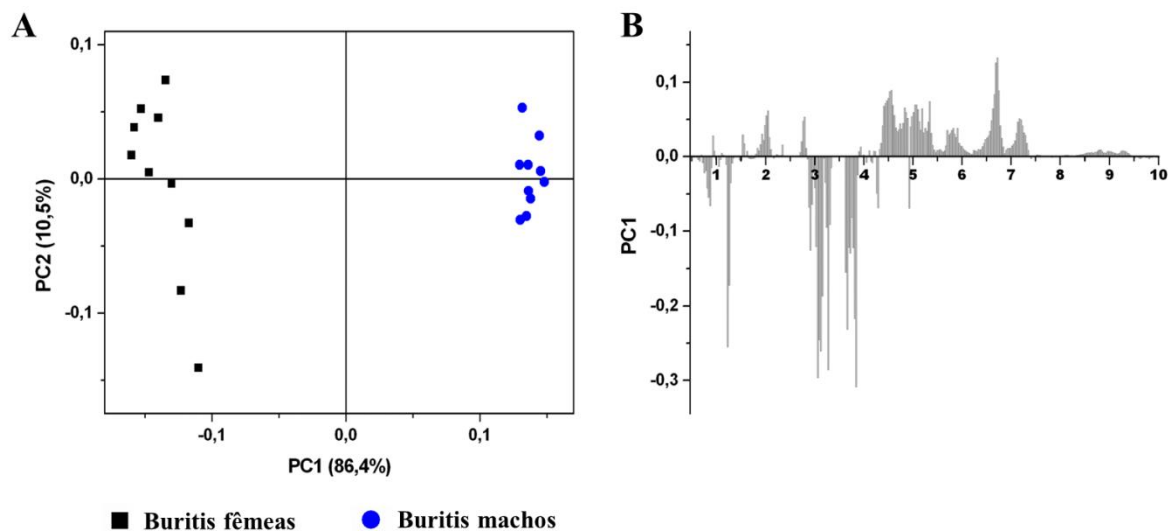
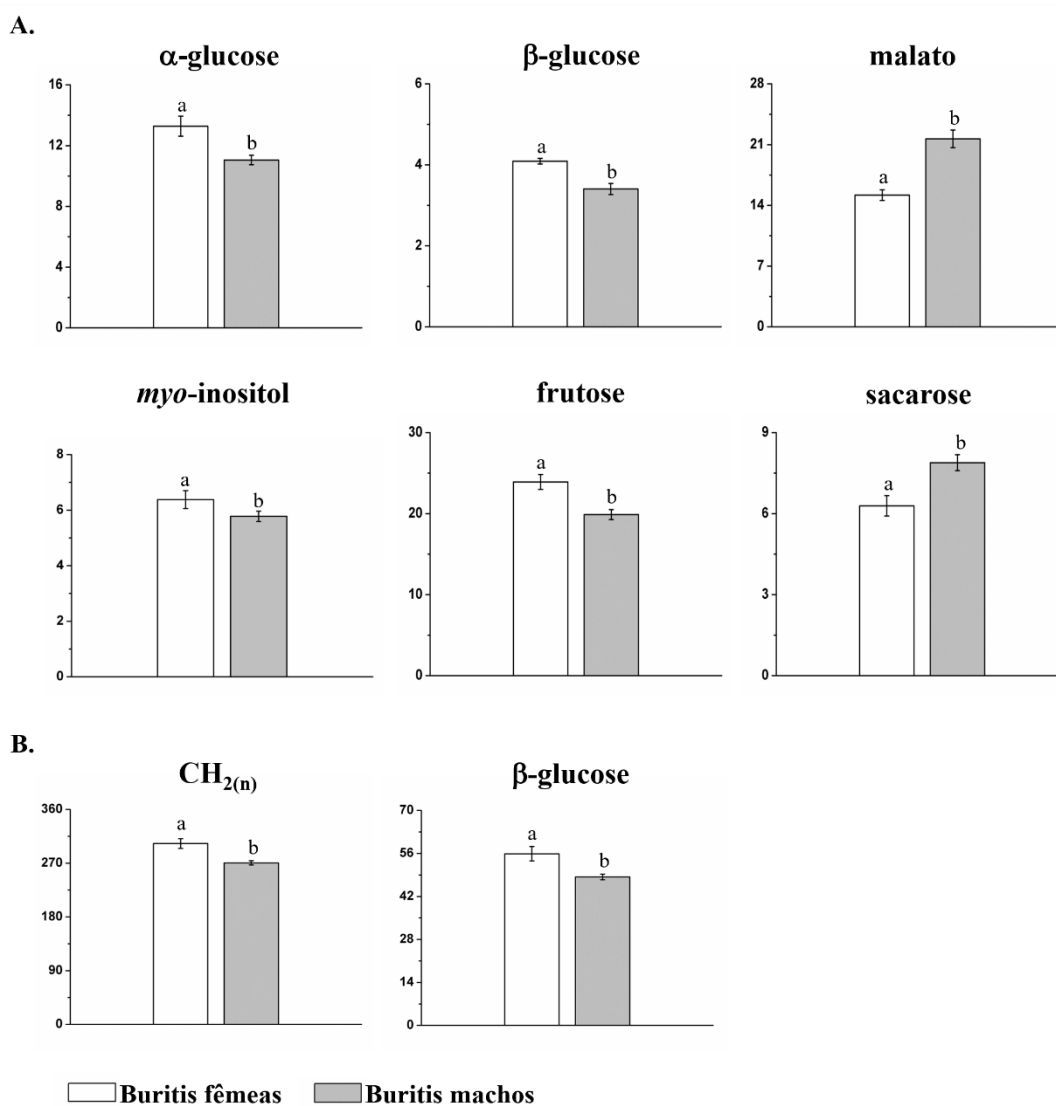


Figura 4.5. Gráfico de escores (A) e pesos (B) de PCA para os extratos metanólicos das folhas do *pool* de plantas de buritis fêmeas e machos.



Os sinais dos compostos destacados como pesos importantes para a distinção das amostras, em ambos os sistemas de extração, foram integrados para a comparação de suas médias nos grupos de amostras de buritis fêmeas e machos. Os gráficos de proporção relativa para α -glucose, β -glucose, malato, frutose, *myo*-inositol e sacarose dos extratos aquosos são mostrados na Figura 4.6A. Os gráficos de proporção relativa para β -glucose e sinal de CH_2 (referente a ácidos graxos) dos extratos metanólicos são mostrados na Figura 4.6B. Variações significativas foram observadas nos conteúdos de carboidratos em buritis fêmeas e machos. Nos extratos aquosos das folhas de buritis fêmeas, maiores conteúdos de α -glucose, β -glucose, frutose e *myo*-inositol foram encontrados. Maiores conteúdos de malato e sacarose foram observados nos extratos aquosos das folhas de buritis machos. Em relação aos extratos metanólicos, foram encontrados maiores conteúdos de β -glucose e sinal em CH_2 (referente a ácidos graxos) nas amostras de buritis fêmeas.

Figura 4.6. Proporção relativa dos compostos obtida a partir da integração dos sinais nos espectros de RMN de ^1H . O eixo y representa a área das integrais de interesse em relação à referência interna TMSP-d4 normalizada para 100%. (A) Conteúdos de α -glucose, β -glucose, malato, *myo*-inositol, frutose e sacarose dos extratos aquosos das folhas de buriti. (B) Conteúdos de ácidos graxos ($\text{CH}_{2(n)}$) e β -glucose para os extratos metanólicos das folhas de buriti. Os dados de proporção relativa estão apresentados na forma de média $\pm$ desvio padrão. Diferentes letras nas barras indicam diferença significativa entre as médias ($p < 0,05$).



4.2.2 – Análise individual das plantas em estágio reprodutivo

As amostras provenientes da análise individual de buritis machos e fêmeas foram, inicialmente, submetidas a análises de PCA. Os gráficos de escores e pesos para estas amostras são mostrados na Figura 4.7. Nenhuma tendência natural de agrupamento é observada entre as amostras de buritis fêmeas e machos para ambos os procedimentos de extração empregados. Em parte, este comportamento deriva da heterogeneidade das amostras dentro de cada grupo. Adicionalmente, as características particulares de cada indivíduo são ressaltadas numa análise individual de plantas. Neste sentido, o algoritmo de PLS-DA com correções ortogonais de sinais (OPLS-DA) foi aplicado aos dados com o objetivo de remover a maior parte da variação não correlacionada com a classificação das amostras. Nestas análises, o pré-processamento Pareto foi aplicado às variáveis com intuito de centrar os dados na média e compensar as diferentes magnitudes das variáveis, mas sem correr o risco de amplificar as variáveis de ruído. As correções ortogonais são realizadas no bloco X pré-processado (dados de RMN de ^1H), que possui muita informação não correlacionada com o bloco Y (classe das amostras). Nos dados obtidos a partir da análise individual dos buritis, foram aplicadas duas correções ortogonais. As matrizes de dados com o pré-processamento Pareto e após as correções ortogonais são mostradas nas Figuras 4.8 e 4.9, dos extratos aquosos e metanólicos, respectivamente.

Figura 4.7. Gráfico de escores de PCA dos extratos aquosos (A) e metanólicos (B) das folhas provenientes da análise individual de buritis fêmeas e machos.

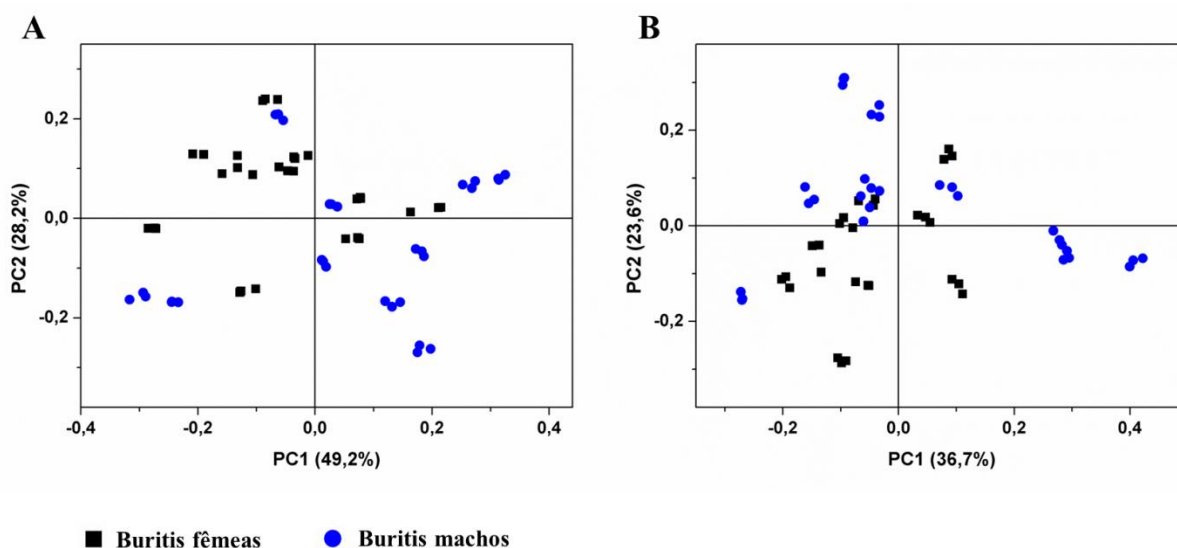


Figura 4.8. Gráfico de linhas para a matriz de dados dos espectros de RMN de ^1H dos extratos aquosos provenientes da análise individual das folhas de buritis fêmeas e machos. (A) Dados pré-processados com Pareto. (B) Dados tratados com duas correções ortogonais após pré-processamento com Pareto.

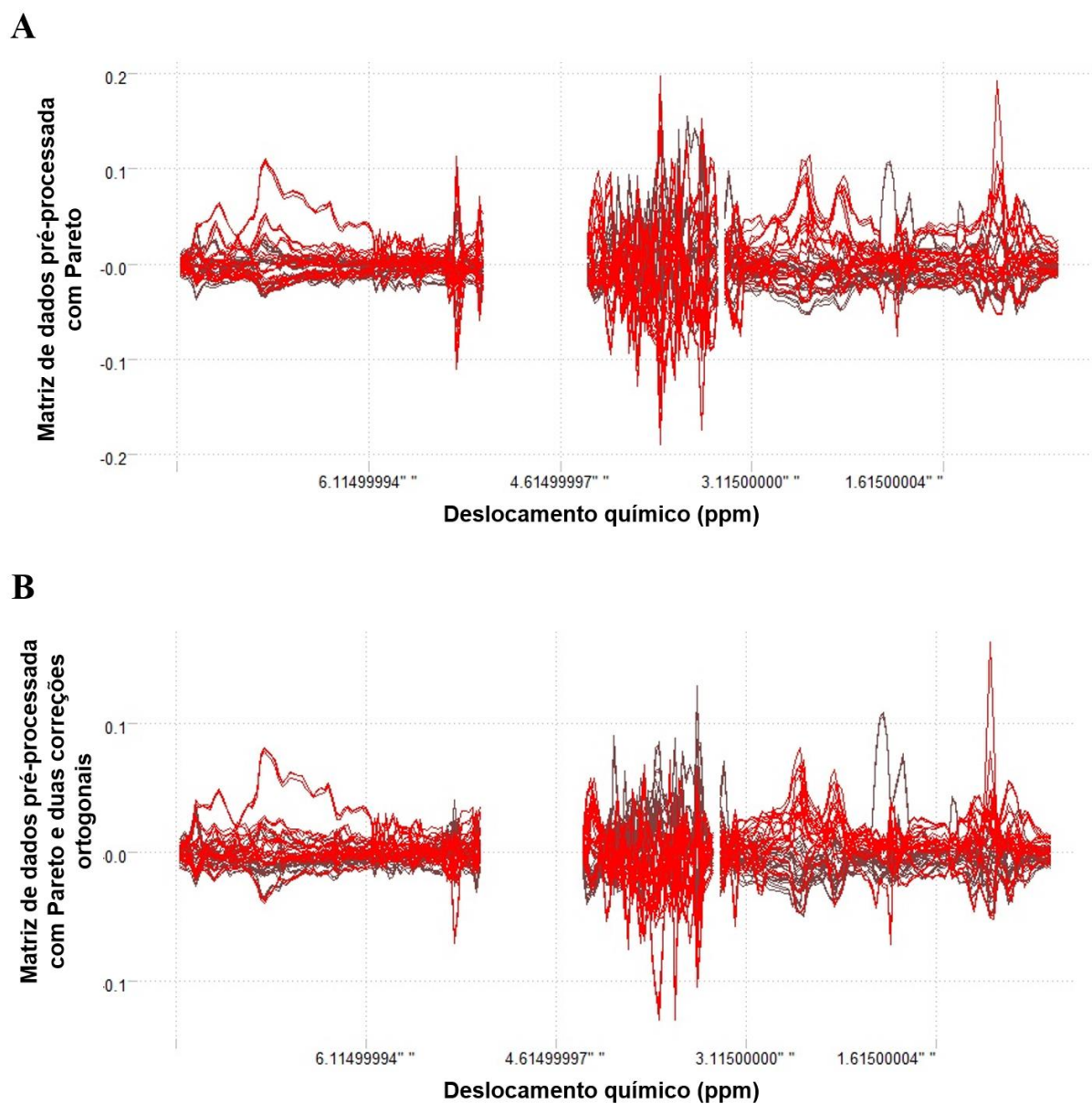
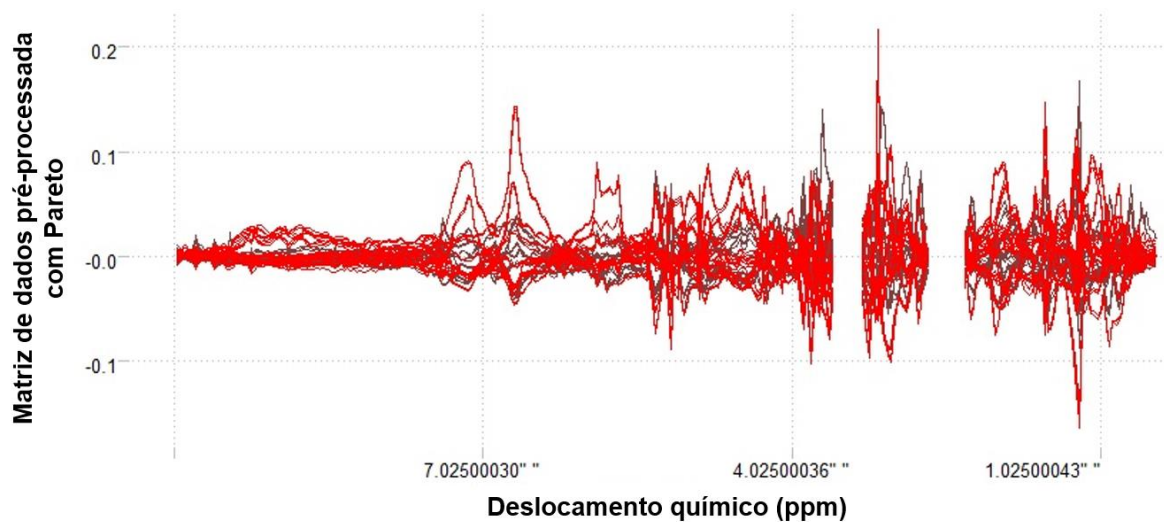
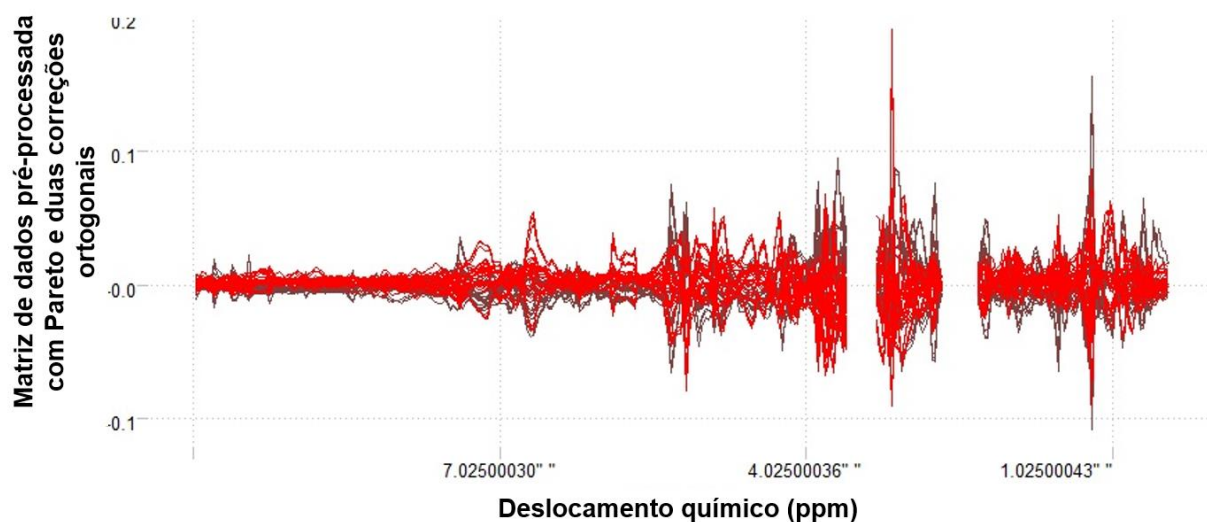


Figura 4.9. Gráfico de linhas para a matriz de dados dos espectros de RMN de ^1H dos extratos metanólicos provenientes da análise individual das folhas de buritis fêmeas e machos. (A) Dados pré-processados com Pareto. (B) Dados tratados com duas correções ortogonais após pré-processamento com Pareto.

A



B



Os gráficos de escores e pesos obtidos das análises de OPLS-DA nos dois sistemas de extração empregados são mostrados nas Figuras 4.10 e 4.11. Em ambos os sistemas há uma evidente distinção das amostras de buritis fêmeas e machos no primeiro fator. A partir do gráfico de pesos de PCA dos extratos aquosos é possível observar que as regiões entre 1,00-3,25 ppm, 4,25-4,40 ppm e 5,50-7,50 ppm são responsáveis por alocar as amostras de buritis machos em valores negativos de fator 1. As regiões entre 3,25-4,25 ppm e 5,38-5,50 ppm são responsáveis por alocar as amostras de buritis fêmeas em valores positivos de fator 1. Nos extratos metanólicos, os sinais em 1,24 ppm e 5,20 ppm e as regiões entre 2,80-3,30 ppm e 3,60-4,20 ppm são responsáveis por alocar as amostras de buritis fêmeas em valores positivos de fator 1. As regiões entre 1,00-1,20 ppm, 1,30-2,20 ppm, 4,50-5,10 ppm e 5,50-7,50 ppm são responsáveis por alocar as amostras de buritis machos em valores negativos de fator 1.

Figura 4.10. Gráfico de escores (A) e pesos (B) de OPLS-DA dos extratos aquosos das folhas provenientes da análise individual de buritis fêmeas e machos.

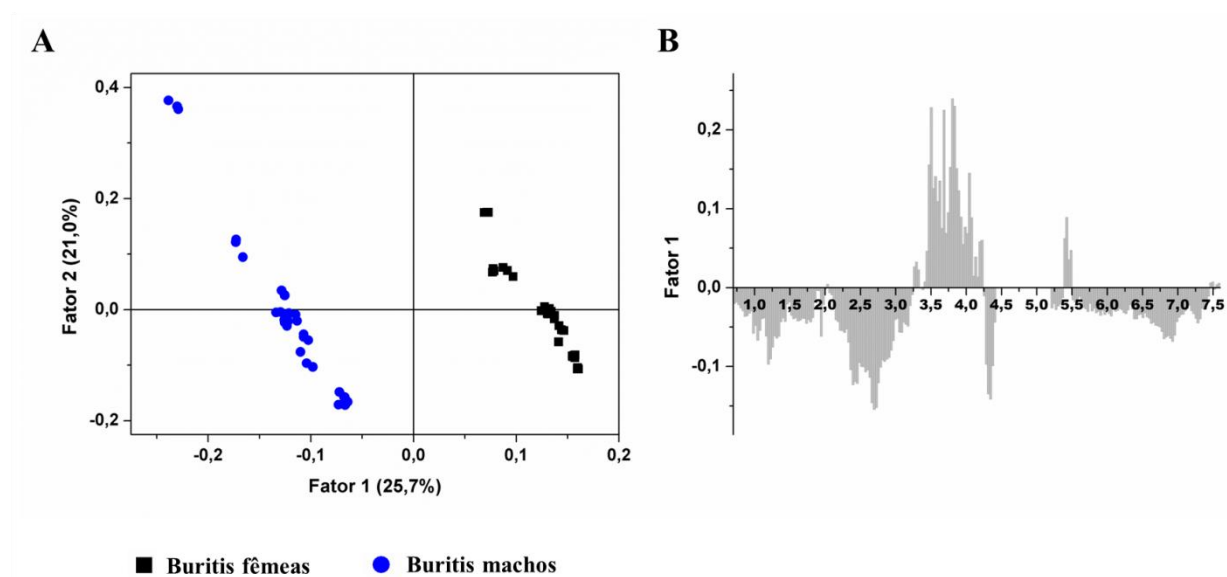
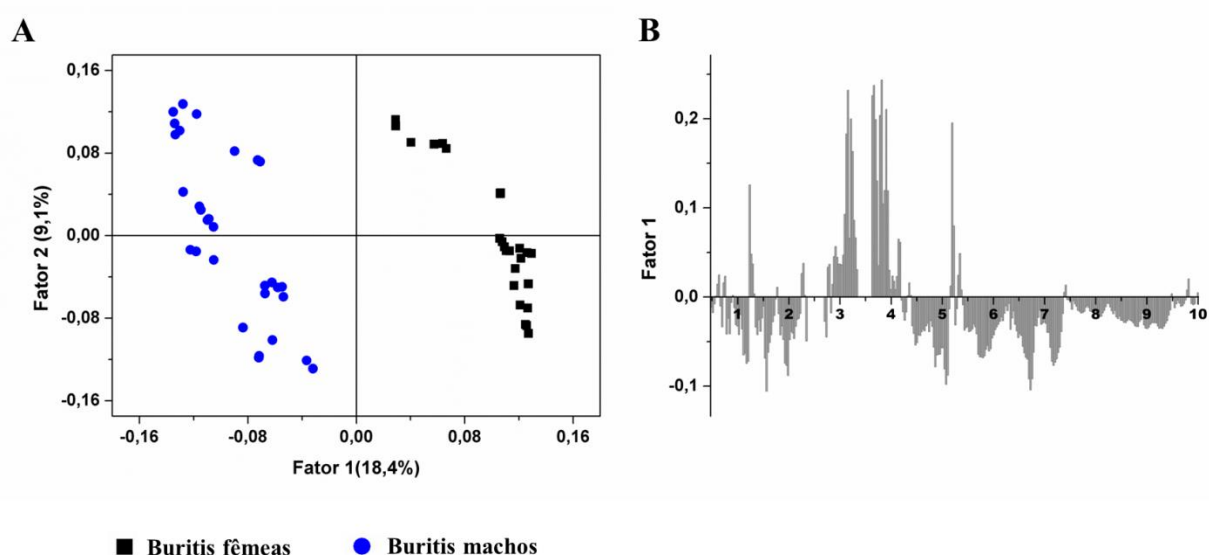


Figura 4.11. Gráfico de escores (A) e pesos (B) de OPLS-DA dos extratos metanólicos das folhas provenientes da análise individual de buritis fêmeas e machos.



4.2.3 – Classificação de plantas em estágio vegetativo (indivíduos jovens)

A Figura 4.12 mostra os gráficos de escores de PCA das amostras provenientes da análise individual de buritis fêmeas, machos e jovens nos dois sistemas de extração. Para estas comparações, nenhuma separação entre os grupos é observada e nenhum indício do gênero dos buritis jovens é evidente. As Figuras 4.13 e 4.14 mostram os gráficos de escores e pesos de OPLS-DA dos extratos aquosos e metanólicos, respectivamente, das amostras provenientes da análise individual de buritis fêmeas, machos e jovens. No gráfico de escores de OPLS-DA dos extratos aquosos, é possível observar a distinção das amostras de buritis fêmeas em relação aos demais grupos. Há uma pequena sobreposição entre as amostras de buritis machos e jovens. Em relação aos extratos metanólicos, não há nenhuma separação entre os três grupos de amostras.

Figura 4.12. Gráfico de escores de PCA dos extratos aquosos (A) e metanólicos (B) das folhas provenientes da análise individual de buritis fêmeas, machos e jovens.

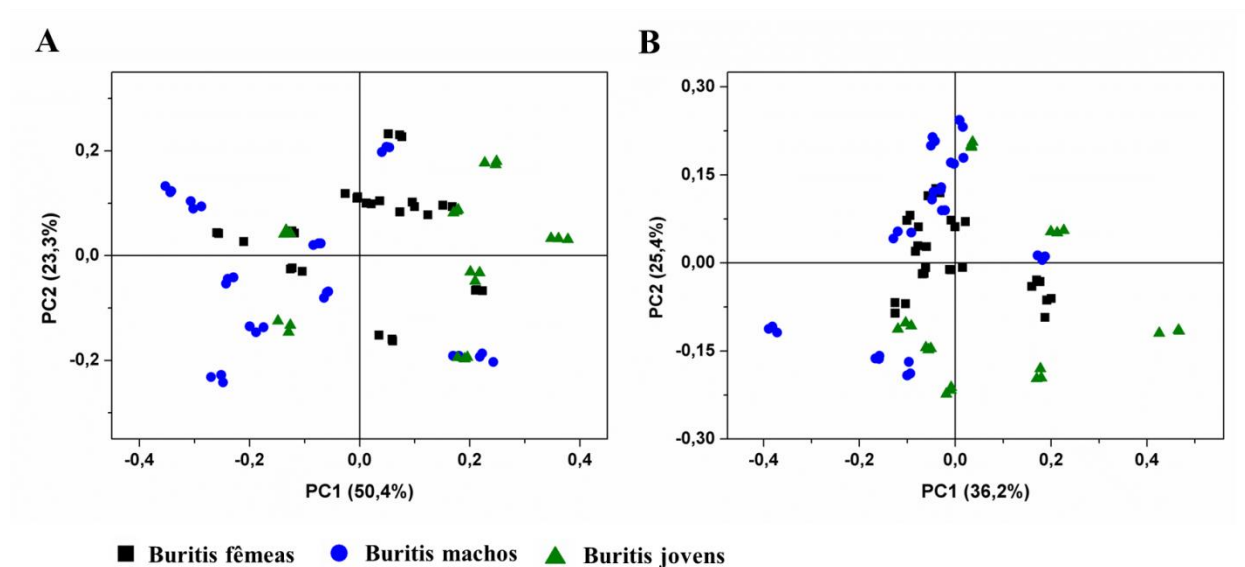


Figura 4.13. Gráfico de escores (A) e pesos (B) de OPLS-DA dos extratos aquosos das folhas provenientes da análise individual de buritis fêmeas, machos e jovens.

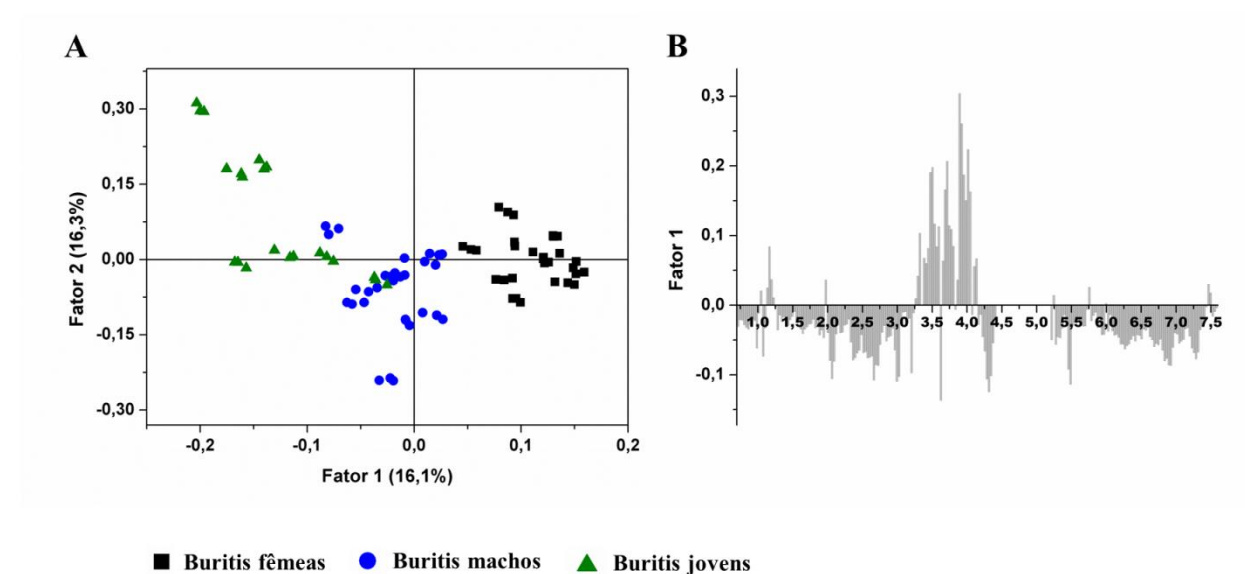
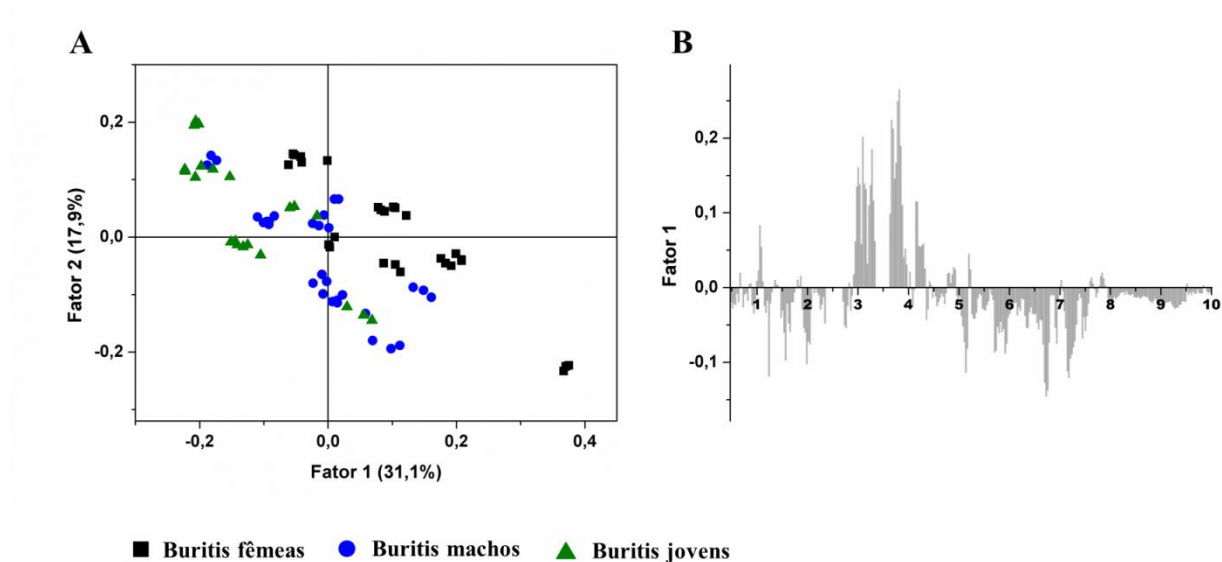


Figura 4.14. Gráfico de escores (A) e pesos (B) de OPLS-DA dos extratos metanólicos das folhas provenientes da análise individual de buritis fêmeas, machos e jovens.



As amostras de buritis jovens foram submetidas a teste de classificação a partir dos modelos de OPLS-DA construídos para os extratos aquosos e metanólicos mostrados nas Figuras 4.10 e 4.11. A sensibilidade e especificidade mensuradas para os modelos são descritas na Figura 4.15. O modelo desenvolvido a partir dos extratos aquosos possui alta especificidade para a classificação dos buritis fêmeas, porém uma sensibilidade menor para este gênero, enquanto que, para a classificação dos buritis machos, o modelo é altamente sensível, porém menos específico (Figura 4.15A). Em relação ao modelo desenvolvido a partir dos extratos metanólicos, há uma alta sensibilidade para a classificação dos buritis fêmeas, porém uma menor especificidade para este gênero, ao passo que o modelo é altamente específico para a classificação dos buritis machos, porém menos sensível (Figura 4.15B).

Os dados de classificação dos buritis jovens são mostrados na Tabela 4.2. No modelo desenvolvido a partir dos extratos aquosos, apenas três replicatas foram classificadas como buritis machos, sendo as demais não classificadas em nenhum grupo. Nos extratos metanólicos, duas replicatas foram classificadas como buritis fêmeas, sendo as demais não classificadas em nenhum grupo. As amostras de buritis jovens classificadas como machos no modelo dos extratos aquosos e as classificadas

como fêmeas no modelo dos extratos metanólicos correspondem à mesma planta. Sendo assim, os modelos de classificação de OPLS-DA para a predição do gênero dos buritis jovens não se mostraram eficientes com este método específico. É possível que para os buritis jovens os processos metabólicos e as prioridades de recursos sejam muito diferentes dos encontrados para as plantas em fase reprodutiva. Apesar das amostras de buritis jovens estarem alocadas mais próximas dos buritis machos, não há evidências suficientes que indiquem claramente o gênero destas plantas antes do aparecimento das flores femininas ou masculinas (fase reprodutiva). Os buritis jovens avaliados neste trabalho foram marcados no Parque Ecológico Anhanduí para posterior monitoramento.

Figura 4.15. Sensibilidade e especificidade dos modelos de classificação construídos a partir dos dados de RMN de ^1H dos extratos aquosos (A) e metanólicos (B) das folhas de buriti.

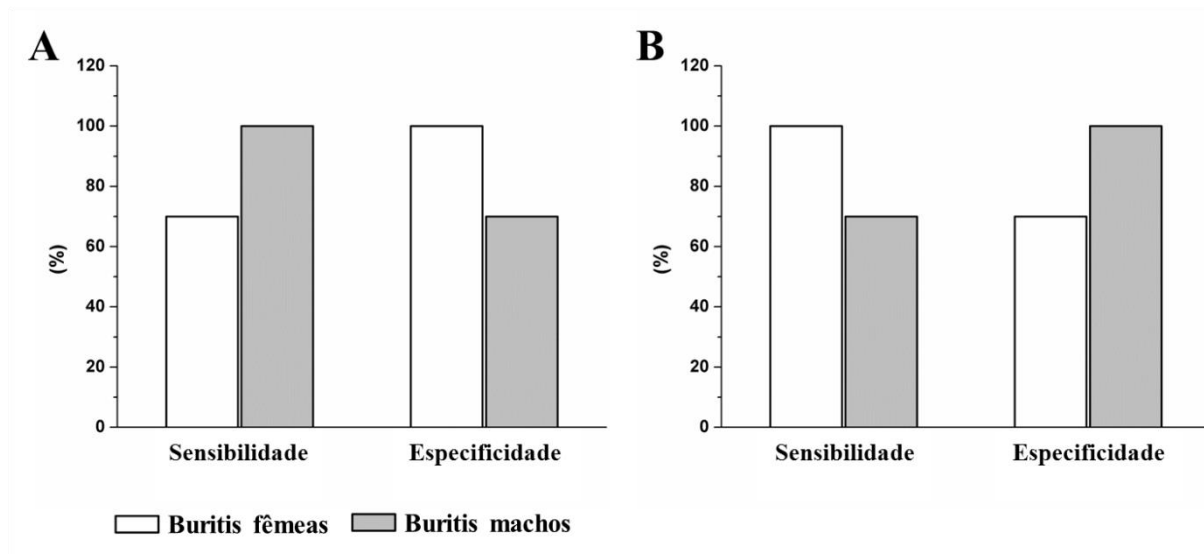


Tabela 4.2. Dados de predição para os extratos das folhas de buritis jovens.

Tipo de extrato	Amostras classificadas como buritis machos	Amostras classificadas como buritis fêmeas	Amostras não classificadas em nenhum grupo
Aquoso	3	0	18
Metanólico	0	2	19

4.3 – Dioicia no buriti

4.3.1 – Tipo de amostragem no estudo metabolômico da dioicia no buriti

Duas abordagens para o tratamento das folhas de buriti, antes dos procedimentos de extração, foram empregadas. A primeira consistiu no agrupamento das folhas dos 10 buritis fêmeas ou 10 machos para a produção do *pool* de plantas, com 10 replicatas analíticas para cada gênero. Neste tipo de abordagem há uma considerável homogeneidade dentro de cada grupo, pois as particularidades de cada planta são dispersadas. Devido a grande homogeneidade, a utilização de métodos não supervisionados para o reconhecimento de padrões, como PCA, se mostrou muito eficaz na distinção entre os grupos de buritis fêmeas e machos. Porém, quaisquer informações sobre as características individuais das plantas, que podem ser relevantes no estudo metabólico de uma condição específica, são perdidas com a produção de *pool* de plantas.

A segunda abordagem consistiu na análise individual de cada planta, com triplicatas analíticas. Neste caso, há uma reduzida homogeneidade dentro de cada grupo devido às características individuais de cada planta. Embora pertençam a um mesmo grupo de amostras, buritis fêmeas ou machos, cada planta pode responder aos estímulos do meio ambiente e ter um desenvolvimento diferente dos demais espécimes de sua população. Na análise individual das plantas, o método não supervisionado de

PCA não foi hábil para a distinção das amostras de buritis fêmeas e machos. A maior parte da variação não correlacionada com a classe (gênero) dos buritis foi removida pelo uso do algoritmo supervisionado de OPLS-DA, que permitiu a distinção entre os buritis fêmeas e machos para a análise individual das plantas. Apesar da necessidade do uso de diferentes métodos quimiométricos para o estudo da dioicia no buriti, é possível observar por meio dos gráficos de pesos que as variáveis de maior importância para a separação das amostras são similares nos dois casos.

A dioicia é uma condição particularmente interessante nas angiospermas e, muitas vezes, é associada com uma alocação ótima de recursos para as diferentes funções sexuais, bem como para evitar endogamia (AINSWORTH et al., 1998; BARRET, 2002). Há evidências de que muitas plantas, incluindo as espécies dióicas, possuem certa labilidade sexual. Esta situação pode ser derivada de uma insuficiência das espécies em controlar o sexo em ambientes complexos ou razões adaptativas possibilitando, assim, o aparecimento de indivíduos anômalos em uma população (AINSWORTH, 2000). A dioicia nem sempre é absoluta e há relatos da ocorrência de rudimentos do sexo oposto em flores unissexuais de espécies dióicas (ARYAL & MING, 2014). No caso específico do buriti, não há muitos trabalhos na literatura relacionados com a dioicia nesta espécie (DELGADO; COUTURIER; MEJIA, 2007; SAMPAIO, 2011; STORTI, 1993). Informações neste sentido seriam úteis na compreensão das alterações metabólicas observadas entre os buritis fêmeas e machos.

Considerando a complexidade da dioicia nas angiospermas, é necessário avaliar o tipo de abordagem em análises metabolômicas. É evidente que a análise a partir de um *pool* de plantas produz um sistema mais homogêneo, uma vez que as características individuais são minimizadas. No entanto, pela análise individual das plantas estas particularidades são evidenciadas e, muitas vezes, podem ser importantes no estudo de diversas condições em plantas permitindo a identificação de comportamentos anômalos. A escolha da melhor abordagem – *pool* de plantas ou análise individual das plantas – depende do tipo de estudo a ser realizado. No caso específico do estudo da dioicia no buriti, as variáveis responsáveis por distinguir as amostras de buritis fêmeas e machos foram similares nas duas abordagens.

4.3.2 – Dioicia e metabolismo

Nos extratos aquosos das folhas de buriti, uma grande variação foi encontrada nos teores de carboidratos. Os organismos fotossintéticos reduzem CO_2 para produzir carboidratos por meio das reações descritas no ciclo de Calvin. A partir deste ciclo são formadas as trioses fosfato que, posteriormente, irão originar uma gama de outros compostos (Figura 4.16). A energia gerada a partir da atividade fotossintética pode ser estocada na forma de amido ou translocada pelo floema na forma de sacarose. Uma das funções das reservas de energia é o fornecimento de carbono para o crescimento e desenvolvimento dos organismos, sendo que a sacarose é uma forma estável de carboidrato que pode ser transportado pelo floema (TAIZ & ZEIGER, 2015). No entanto, outras funções para carboidratos como sacarose, glucose e frutose, por exemplo, são relatadas. Estes açúcares podem estar envolvidos em uma vasta rede de sinalização/resposta nos organismos e níveis variáveis de carboidratos podem influenciar na transcrição de diversos genes (LASTDRAGER, HANSON & SMEEKENS, 2014; MOGHADDAM & VAN DEN ENDE, 2013). A sacarose pode ser catabolizada pela ação de invertases, originando glucose e frutose que também pode atuar como sinalizadores (WIND, SMEEKENS & HANSON, 2010; CHO & YOO, 2011). Além de estarem envolvidos em rotas de sinalização/resposta ao crescimento e condições de estresse, os carboidratos também podem ser importantes na sinalização e consequente indução da floração (MOGHADDAM & VAN DEN ENDE, 2013). Em *Arabidopsis*, por exemplo, uma das rotas que controlam a floração é associada com o metabolismo de sacarose, sendo que este açúcar estimula a floração (BLÁZQUEZ, 2000).

No buriti, o período que compreende o início da floração e o completo amadurecimento dos frutos dura em torno de um ano. Sendo assim, durante um período de floração é possível a observação de novas inflorescências e frutos não completamente maduros na mesma planta. Maiores conteúdos de glucose e frutose foram encontrados nas amostras de buritis fêmeas e maior conteúdo de sacarose foi encontrado nas amostras de buritis machos. O teste de correlação de Pearson foi aplicado para a verificação de algum tipo de correlação linear entre os teores destes carboidratos (Figura 4.17). Uma forte correlação linear direta foi observada entre

glucose e frutose para buritis fêmeas ($r=0,89$ e $P=4,93E-4$) e machos ($r=0,92$ e $P=1,40E-4$), enquanto que nenhuma correlação significativa foi encontrada entre a sacarose e estes compostos. Uma hipótese para as variações observadas nos teores de carboidratos e as correlações encontradas é que os buritis fêmeas possuem uma grande demanda energética devido ao período de floração, mas também devido ao fato de possuírem frutos em fase de amadurecimento. Estes dois processos simultâneos podem demandar um maior consumo de sacarose, que pode ser observado pelo menor conteúdo deste composto nos extratos aquosos das folhas de buritis fêmeas. Aparentemente, não há uma dependência linear entre os conteúdos de glucose e frutose em relação à sacarose e, provavelmente, estes metabólitos podem estar envolvidos em uma rede complexa de processos metabólicos.

Figura 4.16. Esquema das rotas metabólicas de assimilação de carbono (ciclo de Calvin), glicólise, ciclo do ácido cítrico e produção de ácidos graxos em organismos vegetais (rotas metabólicas adaptadas de TAIZ & ZEIGER, 2015).

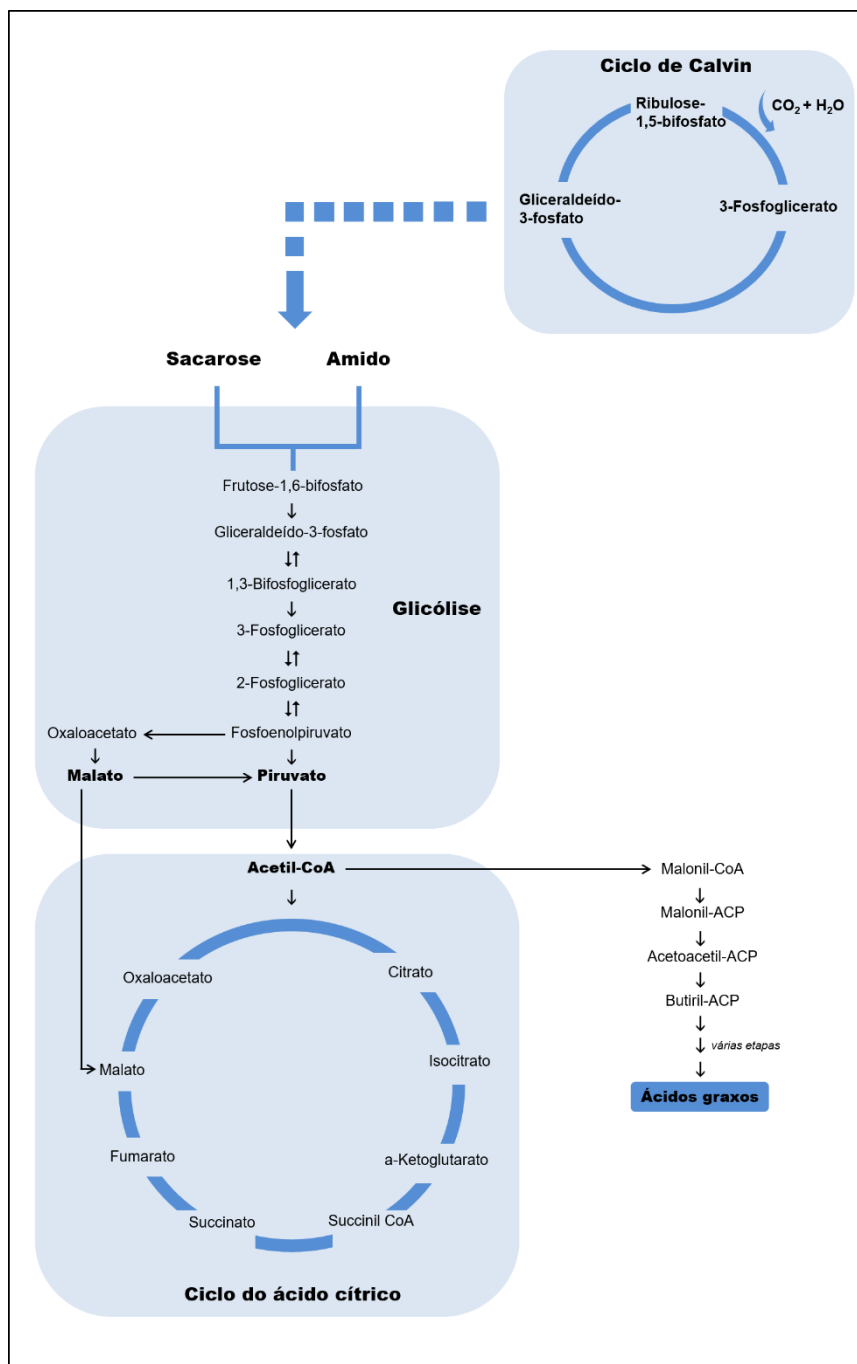


Figura 4.17. Teste de correlação de Pearson para os compostos α -glucose, frutose e sacarose provenientes dos extratos aquosos das folhas de buritis fêmeas (A) e machos (B).

A ☐ *Pearson Correlations*

		alfa-glucose	frutose	sacarose
alfa-glucose	Pearson Corr.	1	0,89357	0,35279
	Sig.	--	4,92779E-4	0,31736
frutose	Pearson Corr.	0,89357	1	0,44697
	Sig.	4,92779E-4	--	0,19529
sacarose	Pearson Corr.	0,35279	0,44697	1
	Sig.	0,31736	0,19529	--
2-tailed test of significance is used				

B ☐ *Pearson Correlations*

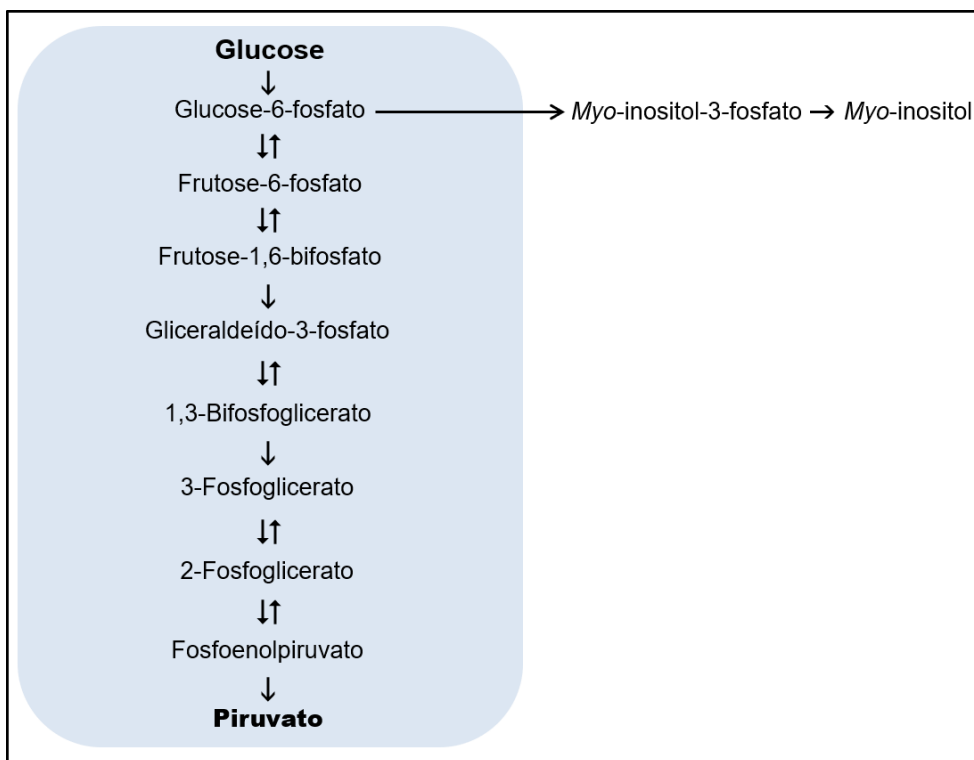
		alfa-glucose	frutose	sacarose
alfa-glucose	Pearson Corr.	1	0,92303	-0,19363
	Sig.	--	1,39789E-4	0,59196
frutose	Pearson Corr.	0,92303	1	-0,03446
	Sig.	1,39789E-4	--	0,9247
sacarose	Pearson Corr.	-0,19363	-0,03446	1
	Sig.	0,59196	0,9247	--
2-tailed test of significance is used				

Os extratos aquosos das folhas de buritis fêmeas apresentaram menor teor de malato. Plantas e animais degradam carboidratos por meio da via glicolítica, tendo como produto final o piruvato. Uma rota glicolítica alternativa é observada em plantas, na qual malato é produzido a partir do fosfoenolpiruvato (Figura 4.16). O malato formado pode ser armazenado ou transportado para a mitocôndria, onde pode ingressar no ciclo do ácido cítrico. O malato é um intermediário do ciclo do ácido cítrico, sendo assim, sua produção a partir do fosfoenolpiruvato pode atuar reestabelecendo níveis apropriados deste metabólito no ciclo. Adicionalmente, o malato pode contribuir para a reposição de piruvato a partir da ação da enzima NAD-málica, garantindo níveis adequados de acetil-CoA para a manutenção das atividades do ciclo do ácido cítrico

(Figura 4.16) (HELDT & PIECHULLA, 2004; TAIZ & ZEIGER, 2015). Menor conteúdo de malato nos extratos aquosos das folhas de buritis fêmeas também pode indicar uma maior demanda energética nestas plantas, devido às funções reprodutivas.

Outra rota alternativa da via glicolítica é a que produz *myo*-inositol a partir de glucose-6-fosfato (Figura 4.18). Este composto é comumente chamado de açúcar álcool e atua em diversos processos metabólicos nos organismos vegetais. As plantas podem acumular *myo*-inositol em condições de estresse abiótico, como salinidade e seca. O acúmulo deste açúcar álcool também pode contribuir para o turgor das células e estabilização de proteínas, uma vez que atua como osmoprotetor (AL-SUOD et al., 2017; LOEWUS & MURTHY, 2000; MERCHANT et al., 2006). Maior proporção de *myo*-inositol em plantas fêmeas pode indicar uma resposta específica do gênero a algum estresse ambiental, uma vez que estas plantas estavam em uma reserva natural. No entanto, o maior conteúdo de *myo*-inositol também pode estar envolvido em algum aspecto relativo a dioicia no buriti, conferindo às plantas fêmeas uma maior capacidade osmoprotetora.

Figura 4.18. Esquema da via glicolítica e rota de formação de *myo*-inositol (Rotas metabólicas adaptadas de TAIZ & ZEIGER (2015) e LIU et al. (2016)).



Nos extratos metanólicos, a maior variação observada foi em relação ao sinal em 1,24 ppm referente aos sinais de $(CH_2)_n$ de ácidos graxos saturados e insaturados. A biossíntese dos ácidos graxos em plantas ocorre nos plastídios a partir do precursor acetil-CoA. Os ácidos graxos fazem parte da composição de lipídeos de membrana e podem ser consumidos para a produção de compostos de sinalização como, por exemplo, o jasmonato. Estes compostos sinalizadores podem ativar mecanismos de defesa das plantas ou regular processos de crescimento ou desenvolvimento (WEBER, 2002; TAIZ & ZEIGER, 2015). Menor conteúdo de ácidos graxos foi encontrado nas amostras de buritis machos. A relação destes compostos e a dioicia no buriti não é muito clara. Uma possível explicação é que os ácidos graxos possam estar envolvidos em processos de sinalização ou indução da floração. Adicionalmente, estes compostos podem ser mobilizados nas plantas fêmeas para a produção dos frutos. No entanto, estudos mais específicos são necessários para a compreensão do papel destes ácidos

para a reprodução em plantas dióicas, bem como seu envolvimento em outros tipos de interações das plantas com o meio ambiente.

A separação sexual nas angiospermas tem um impacto direto na alocação de recursos para garantir o sucesso reprodutivo (AINSWORTH, 2000). Quando comparamos espécies dióicas e hermafroditas, devemos considerar que a alocação de recursos nos hermafroditas pode limitar umas das funções sexuais (feminina ou masculina), pois estes recursos são alocados para duas funções distintas na mesma planta. Já para espécies dióicas, os recursos podem ser direcionados apenas para uma função sexual em cada planta, resultando numa distribuição mais eficiente de recursos metabólicos (AINSWORTH, PARKER & BUCHANAN-WOLLASTON, 1998). A diferente distribuição de recursos para as funções reprodutivas nas espécies dióicas provavelmente resulta em diferentes proporções de metabólitos em indivíduos machos e fêmeas. Tais diferenças metabólicas também podem alterar rotas específicas de sinalização/resposta nas plantas. Estas variações podem ser oriundas dos diferentes tipos de inflorescências e das estruturas das flores para os machos e fêmeas. No caso do buriti, há relato na literatura de que as inflorescências masculinas possuem cerca de 125 vezes mais flores do que as femininas. Além disso, as flores femininas são maiores que as masculinas no buriti (STORTI, 1993).

5 – CONCLUSÕES

A técnica de RMN, associada aos métodos quimiométricos de análise, se mostrou eficaz no estudo metabolômico da dioicia no buriti. As duas abordagens empregadas para o tratamento das folhas – a partir do *pool* de plantas e pela análise individual das plantas – mostraram vantagens e desvantagens que dependem do tipo de estudo a ser desenvolvido com plantas dióicas.

Os extratos aquosos e metanólicos das folhas de buriti apresentaram perfis metabólicos diferentes para indivíduos machos e fêmeas, os quais foram evidenciados pelas análises de PCA e OPLS-DA. As maiores variações encontradas foram nos conteúdos de carboidratos, *myo*-inositol, malato e ácidos graxos. As plantas fêmeas apresentaram menores teores de sacarose e malato, enquanto que os teores de glucose, frutose e ácidos graxos foram menores nos buritis machos. Uma possível justificativa para as variações encontradas é que, devido às características particulares do buriti e às funções reprodutivas, há uma maior demanda energética nas fêmeas. No entanto, as variações nestes metabólitos também podem estar associadas a rotas específicas de sinalização/resposta destas plantas. Em relação aos buritis jovens, os modelos de OPLS-DA construídos para predição do gênero não se mostraram eficazes.

A dioicia é uma condição especialmente interessante nas angiospermas e as forças evolutivas que propiciaram a separação sexual são amplamente debatidas e confrontadas. Neste trabalho, variações metabólicas significativas foram encontradas entre os buritis fêmeas e machos. As diferenças metabólicas observadas para as folhas de buritis machos e fêmeas indicam que, possivelmente, estas plantas possuam diferenças em seu genoma e estudos com foco na base genética para a dioicia no buriti serão extremamente valiosos na compreensão da separação sexual nesta espécie.

REFERÊNCIAS

AINSWORTH, C. Boys and Girls Come Out to Play: The Molecular Biology of Dioecious Plants. **Annals of Botany**, v. 86, p. 211-221, 2000.

AINSWORTH, C.; PARKER, J.; BUCHANAN-WOLLASTON, V. Sex Determination in Plants. **Current Topics in Developmental Biology**, v. 38, p. 167-223, 1998.

AL-SUOD, H.; LIGOR, M.; RATIU, I.; RAFINSKA, K; GÓRECKI, R.; BUSZEWSKI, B. A window on cyclitols: Characterization and analytics of inositols. **Phytochemistry Letters**, v. 20, p. 507-519, 2017.

APPARECIDO, R. P.; CARLOS, E. F.; LIÃO, L. M.; VIEIRA, L. G. E.; ALCANTARA, G. B. NMR-based metabolomics of transgenic and non-transgenic sweet orange reveals different responses in primary metabolism during citrus canker development. **Metabolomics**, v. 13, 2017.

ARYAL, R.; MING, R. Sex determination in flowering plants: Papaya as a model system. **Plant Science**, v. 217-218, p. 56-62, 2014.

BAJPAI, V.; PANDEY, R.; NEGI, M. P. S.; BINDU, K. H.; KUMAR, N.; KUMAR, B. Characteristic differences in metabolite profile in male and female plants of dioecious *Piper betle* L. **Journal of Biosciences**, v. 37, p. 1061-1066, 2012.

BAJPAI, V.; SINGH, A.; CHANDRA, P.; NEGI, M. P. S.; KUMAR, N.; KUMAR, B. Analysis of phytochemical variations in dioecious *Tinospora cordifolia* stems using HPLC/QTOF MS/MS and UPLC/QqQ_{LIT}-MS/MS. **Phytochemical Analysis**, v. 27, p. 92-99, 2016.

BARRETT, S. C. H. The evolution of mating strategies in flowering plants. **Trends in Plant Science**, v. 3, p. 335-341, 1998.

BARRETT, S. C. H. The Evolution of Plant Sexual Diversity. **Nature Reviews: Genetics**, v. 3, p. 274-284, 2002.

BECERRA-MARTÍNEZ, E.; FLORENTINO-RAMOS, E.; PÉREZ-HERNÁNDEZ, N.; ZEPEDA-VALLEJO, L. G.; VILLA-RUANO, N.; VELÁZQUEZ-PONCE, M.; GARCÍA-MENDOZA, F.; BAÑUELOS-HERNÁNDEZ, A. E. ¹H NMR-based metabolomic fingerprinting to determine metabolite levels in serrano peppers (*Capsicum annum* L.) grown in two different regions. **Food Research International**, v. 102, p. 163-170, 2017.

BEEBE, K. R.; PELL, R. J.; SEASHOLTZ, M. B. **Chemometrics: A Practical Guide**. New York: Wiley & Sons, 1998.

BHARTI, S. K.; BHATIA, A.; TEWARI, S. K.; SIDHU, O. P.; ROY, R. Application of HR-MAS NMR spectroscopy for studying chemotype variations of *Withania somnifera* (L.) Dunal. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 49, p. 659-667, 2011.

BLÁQUEZ, M. A. Flower development pathways. **Journal of Cell Science**, v. 113, p. 3547-3548, 2000.

BYLESJO, M.; RANTALAINEN, M.; CLOAREC, O.; NICHOLSON, J. K.; HOLMES, E.; TRYGG, J. OPLS discriminant analysis: combining the strengths of PLS-DA and SIMCA classification. **Journal of Chemometrics**, v. 20, p. 341-351, 2006.

CÂNDIDO, T. L. N.; SILVA, M. R.; AGOSTINI-COSTA, T. S. Bioactive compounds and antioxidant capacity of buriti (*Mauritia flexuosa* L.f.) from the Cerrado and Amazon biomes. **Food Chemistry**, v. 177, p. 313-319, 2015.

CEVALLOS-CEVALLOS, J. M., FUTCH, D. B., SHILTS, T., FOLIMONOVA, S. Y., REYES-DE-CORCUERA, J. I. GC-MS metabolomic differentiation of selected citrus

varieties with different sensitivity to citrus huanglongbing. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 53, p. 69-76, 2012.

CHARLESWORTH, D.; CHARLESWORTH, B. Population genetics of partial male-sterility and the evolution of monoecy and dioecy. **Heredity**, v. 41, p. 137-153, 1978.

CHARNOV, E. L.; BULL, J. When is sex environmentally determined? **Nature**, v. 266, p. 828-830, 1977.

CHO, Y.; YOO, S. Signaling Role of Fructose Mediated by FINS1/FBP in *Arabidopsis thaliana*. **PLoS Genetics**, v. 7, p. 1-10, 2011.

CHOI, Y. H.; SERTIC, S.; KIM, H. K.; WILSON, E. G.; MICHPOULOS, F.; LEFEBER, A. W. M.; ERKELENS, C.; KRICUN, S. D. P.; VERPOORTE, R. Classification of *Ilex* Species Based on Metabolomic Fingerprinting Using Nuclear Magnetic Resonance and Multivariate Data Analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 1237-1245, 2005.

CHOI, Y. H.; VERPOORTE, R. Metabolomics: What You See is What You Extract. **Phytochemical Analysis**, v. 25, p. 289-290, 2014.

CHOUDHRY, N.; SINGH, S.; SIDDIQUI, M. B.; KHATOON, S. Impact of Seasons and Dioecy on Therapeutic Phytoconstituents of *Tinospora cordifolia*, a Rasayana Drug. **BioMed Research International**, doi: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/902138>, 2014.

DARWIN, C. R. **The effects of cross and self fertilisation in the vegetable kingdom**. London: John Murray, 1876. Disponível em: <http://darwin-online.org.uk/converted/published/1881_Worms_F1357/1876_CrossandSelfFertilisation_F1249/1876_CrossandSelfFertilisation_F1249.html>. Acesso em 08 jun. 2017.

de FALCO, B.; INCERTI, G.; BOCHICCHIO, R.; PHILLIPS, T. D.; AMATO, M.; LANZOTTI, V. Metabolomic analysis of *Salvia hispanica* seeds using NMR spectroscopy and multivariate data analysis. **Industrial Crops and Products**, v. 99, p. 86-96, 2017.

de OLIVEIRA, C. S.; CARLOS, E. F.; VIEIRA, L. G. E.; LIÃO, L. M.; ALCANTARA, G. B. HR-MAS NMR metabolomics of 'Swingle' citrumelo rootstock genetically modified to overproduce proline. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 52, p. 422-429, 2014.

de OLIVEIRA, D. M.; SIQUEIRA, E. P.; NUNES, Y. R. F.; COTA, B. B. Flavonoids from leaves of *Mauritia flexuosa*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 23, p. 614-620, 2013.

DELGADO, C.; COUTURIER, G.; MEJIA, K. *Mauritia flexuosa* (Arecaceae: Calamoideae), an Amazonian palm with cultivation purposes in Peru. **Fruits**, v. 62, p. 157-169, 2007.

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

FALASCA, A.; MELCK, D.; PARIS, D.; SAVIANO, G.; MOTTA, A.; IORIZZI, M. Seasonal changes in the metabolic fingerprint of *Juniperus communis* L. berry extracts by ¹H NMR-based metabolomics. **Metabolomics**, v. 10, p. 165-174, 2014.

FREEMAN, D. C.; DOUST J. L.; EL-KEBLAWY, A.; MIGLIA K. J.; MCARTHUR, E. D. Sexual specialization and inbreeding avoidance in the evolution of dioecy. **The Botanical Review**, v. 63, p. 65-92, 1997.

FREITAS, D. S.; CARLOS, E. F.; GIL, M. C. S. S.; VIEIRA, L. G. E.; ALCANTARA, G. B. NMR-Based Metabolomic Analysis of Huanglongbing-Asymptomatic and -Symptomatic Citrus Trees. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, p. 7582-7588, 2015.

GARCÍA-GARCÍA, A. B.; LAMICHHANE, S.; CASTEJÓN, D.; CAMBERO, M. I.; BERTRAM, H. C. ^1H HR-MAS NMR-based metabolomics analysis for dry-fermented sausage characterization. **Food Chemistry**, v. 240, p. 514-523, 2018.

HELDT, H.; PIECHULLA, B. **Plant Biochemistry**. Amsterdam: Elsevier, 2005.

HORGAN, R. P.; KENNY, L. C. 'Omic' technologies: genomics, transcriptomics, proteomics and metabolomics. **The Obstetrician & Gynaecologist**, v. 13, p. 189-185, 2011.

HUO, Y.; KAMAL, G. M.; WANG, J.; LIU, H.; ZHANG, G.; HU, Z.; ANWAR, F.; DU, H. ^1H NMR-based metabolomics for discrimination of rice from different geographical origins of China. **Journal of Cereal Science**, v. 76, p. 243-252, 2017.

KARASAWA, M. M. G.; OLIVEIRA, G. C. X.; WILLIAMS, J. H.; VEASEY, E. A. Cap. 1 - Evolução das plantas com ênfase na forma de reprodução. KARASAWA, M. M. G.; DORNELAS, M. C.; de ARAÚJO, A. C. G.; OLIVEIRA, G. C. X. Cap. 2 - Biologia e genética dos sistemas reprodutivos. In: KARASAWA, M. M. G. **Diversidade Reprodutiva de Plantas**. Ribeirão Preto: SBG, 2009.

KIM, H. K.; CHOI, Y. H.; VERPOORTE, R. NMR-based plant metabolomics: where do we stand, where do we go?. **Trends in Biotechnology**, v. 29, p. 267-275, 2011.

KOOLEN, H. H. F.; da SILVA, F. M. A.; GOZZO, F. C.; de SOUZA, A. Q. L.; de SOUZA, A. D. L. Antioxidant, antimicrobial activities and characterization of phenolic compounds from buriti (*Mauritia flexuosa* L. f.) by UPLC-ESI-MS/MS. **Food Research International**, v. 51, p. 467-473, 2013.

KORPELAINEN, H. Labile sex expression in plants. **Biological Reviews**, v. 73, p. 157-180, 1998.

LASTDRAGER, J.; HANSON, J.; SMEEKENS, S. Sugar signals and the control of plant growth and development. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, p. 799–807, 2014.

LIU, X.; LOCASALE, J. W. Metabolomics: A Primer. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 42, p. 274-284, 2017.

LIU, Y.; GONG, X.; WANG, C.; DU, G.; CHEN, J.; KANG, Z. Production of glucaric acid from *myo*-inositol in engineered *Pichia pastoris*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 91, p. 8-16, 2016.

LLOYD, D. G.. Evolution towards dioecy in heterostylous plants. **Plant Systematics and Evolution**, v. 131, p. 71-80, 1979.

LOEWUS, F. A.; MURTHY, P. P. N. *myo*-Inositol metabolism in plants. **Plant Science**, v. 150, p. 1-19, 2000.

LOPES, T. I. B.; GELONEZE, B.; PAREJA, J. C.; CALIXTO, A. R.; FERREIRA, M. M. C.; MARSAIOLI, A. J. Blood Metabolome Changes Before and After Bariatric Surgery: A ¹H NMR-Based Clinical Investigation. **OMICS: A Journal of Integrative Biology**, v. 19, p. 318-327, 2015.

MARTINS, R. C.; SANTELLI, P.; FILGUEIRAS, T. S. Buriti. In: VIEIRA, R. F.; COSTA, T. S. A.; da SILVA, D. B.; FERREIRA, F. R.; SANO, S. M. (Editores Técnicos). **Frutas Nativas da Região Centro-Oeste do Brasil**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006, cap. 6.

MERCHANT, A.; TAUSZ, M.; ARNDT, S. K.; ADAMS, M. A. Cyclitols and carbohydrates in leaves and roots of 13 *Eucalyptus* species suggest contrasting physiological responses to water deficit. **Plant, Cell and Environment**, v. 29, p. 2017-2029, 2006.

MOGHADDAM, M. R. B.; VAN DEN ENDE, W. Sugars, the clock and transition to flowering. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, p. 1-6, 2013.

PATTI, G. J.; YANES, O.; SIUZDAK, G. Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. **Nature Reviews: Molecular Cell Biology**, v. 13, p. 263-269, 2012.

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.

PICCIONI, F.; CAPITANI, D.; ZOLLA, L.; MANNINA, L. NMR metabolic profiling of transgenic maize with the Cry1A(b) gene. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 6041-6049, 2009.

PONTES, J. G. M.; BRASIL, A. J. M.; CRUZ, G. C. F.; de SOUZA, R. N.; TASIC, L. NMR-based metabolomics strategies: plants, animals and humans. **Analytical Methods**, v. 9, p. 1078-1096, 2017.

PONTES, J. G. M.; OHASHI, W. Y.; BRASIL, A. J. M.; FILGUEIRAS, P. R.; ESPÍNDOLA, A. P. D. M.; SILVA, J. S.; POPPI, R. J.; COLETTA-FILHO, H. D.; TASIC, L. Metabolomics by NMR Spectroscopy in Plant Disease diagnostic: Huanglongbing as a Case Study. **Chemistry Select**, v. 6, p. 1176-1178, 2016.

POPESCU, R.; COSTINEL, D.; DINCA, O. R.; MARINESCU, A.; STEFANESCU, I.; IONETE, R. E. Discrimination of vegetable oils using NMR spectroscopy and chemometrics. **Food Control**, v. 48, p. 84-90, 2015.

POTT, A.; POTT, V. J. **Plantas Nativas para Recuperação de Áreas Degradadas e Reposição de Vegetação em Mato Grosso do Sul**. Comunicado Técnico 75, EMBRAPA, 2002. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/104648/1/Plantas-nativas-para-recuperacao.pdf>>. Acesso em 02 jun. 2017.

RENNER, S. S.; RICKLEFS, R. E. Dioecy and its Correlates in the Flowering Plants. **American Journal of Botany**, v. 82, p. 596-606, 1995.

SAMPAIO, M. B. **Boas práticas de manejo para o extrativismo sustentável do buriti**. Brasília: Instituto Sociedade, População e Natureza, 2011. Disponível em: <<http://www.ispn.org.br/arquivos/Cartilha-Buriti-Web.pdf>>. Acesso em 02 jun. 2017.

SANTOS, A. D. C. FONSECA, F. A.; DUTRA, L. M.; SANTOS, M. F. C.; MENEZES, L. R. A.; CAMPOS, F. R.; NAGATA, N.; AYUB, R.; BARISON, A. ¹H HR-MAS NMR-based metabolomics study of different persimmon cultivars (*Diospyros kaki*) during fruit development. **Food Chemistry**, v. 239, p. 511-519, 2018.

SCOGNAMIGLIO, M.; D'ABROSCA, B.; FIUMANO, V.; GOLINO, M.; ESPOSITO, A.; FIORENTINO, A. Seasonal phytochemical changes in *Phillyrea angustifolia* L.: Metabolomic analysis and phytotoxicity assessment. **Phytochemistry Letters**, v. 8, p. 163-170, 2014.

SHARMA, R.; AMIN, H.; PK, P. Physicochemical evaluation of male and female plants of Guduchi (*Tinospora cordifolia* (Willd.) Miers). **The Journal of Phytopharmacology**, v. 4, p. 116-120, 2015.

SIMPSON, B. S. Dioecy in Plants – Is It an Important Factor for Phytochemists to Consider?. **Planta Medica**, v. 79, p. 613–615, 2013.

SON, H.; HWANG, G.; AHN, H.; PARK, W.; LEE, C.; HONG, Y. Characterization of wines from grape varieties through multivariate statistical analysis of ^1H NMR spectroscopic data. **Food Research International**, v. 42, p. 1483–1491, 2009.

STORTI, E. F. Biologia floral de *Mauritia flexuosa* LIN. FIL, na região de Manaus, AM, Brasil. **Acta Amazonica**, v. 23, p. 371-381, 1993.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. Sunderland: Sinauer, 2002.

UAWISETWATHANA, U.; GRAHAM, S. F.; KAMOLSUKYUNYONG, W.; SUKHAKET, W.; KLANCHUI, A.; TOOJINDA, T.; VANAICHIT, A.; KAROONUTHAISIRI, N.; ELLIOTT, C. T. Quantitative ^1H NMR metabolome profiling of Thai Jasmine rice (*Oryza sativa*) reveals primary metabolic response during brown planthopper infestation. **Metabolomics**, v. 11, p. 1640-1655, 2015.

VIEIRA, M. F.; FONSECA, R. S. **Biologia reprodutiva em angiospermas: síndromes florais, polinizações e sistemas reprodutivos sexuais**. Viçosa: Ed. UFV, 2014.

ZABEK, A.; SWIERKOT, J.; MALAK, A.; ZAWADZKA, I.; DEJA, S.; BOGUNIA-KUBIK, K.; MLYNARZ, P. Application of ^1H NMR-based serum metabolomic studies for monitoring female patients with rheumatoid arthritis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 117, p. 544-550, 2016.

ZLUVOVA J.; ZAK J.; JANOUSEK B.; VYSKOT B. Dioecious *Silene latifolia* plants show sexual dimorphism in the vegetative stage. **BMC Plant Biology**, v. 10, p. 1-5, 2010.

WEBER, H. Fatty acid-derived signals in plants. **Trends in Plant Science**, v. 7, p. 217-224, 2002.

WIND, J.; SMEEKENS, S.; HANSON, J. Sucrose: Metabolite and signaling molecule.
Phytochemistry, v. 71, p. 1610-1614, 2010.

**APÊNDICE A – Perfil espectral total e parâmetros de aquisição e processamento
dos experimentos de RMN de ^1H**

Figura A1 – Perfil espectral total representativo de RMN de ^1H dos extratos aquosos (D_2O , 300.13 MHz).

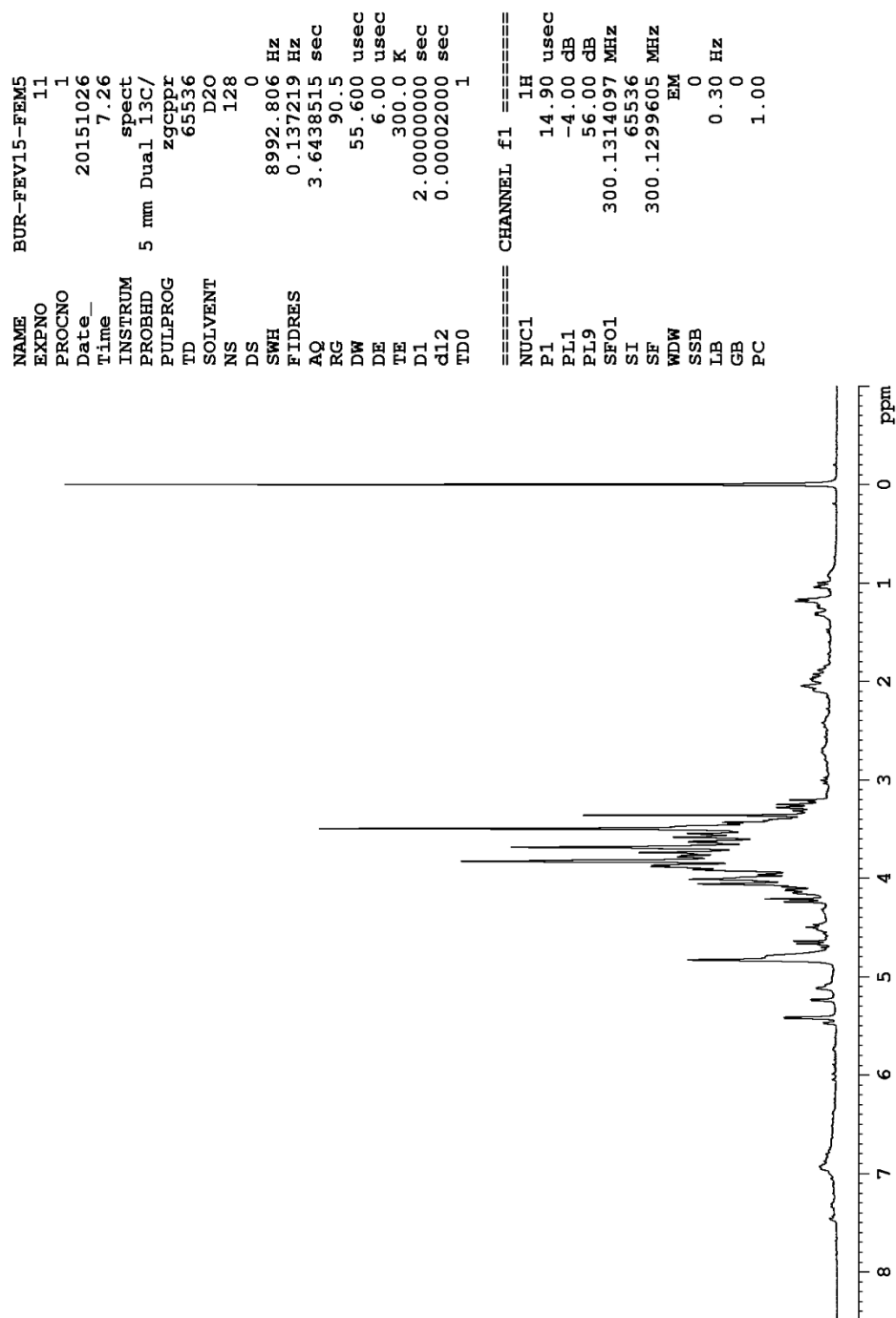
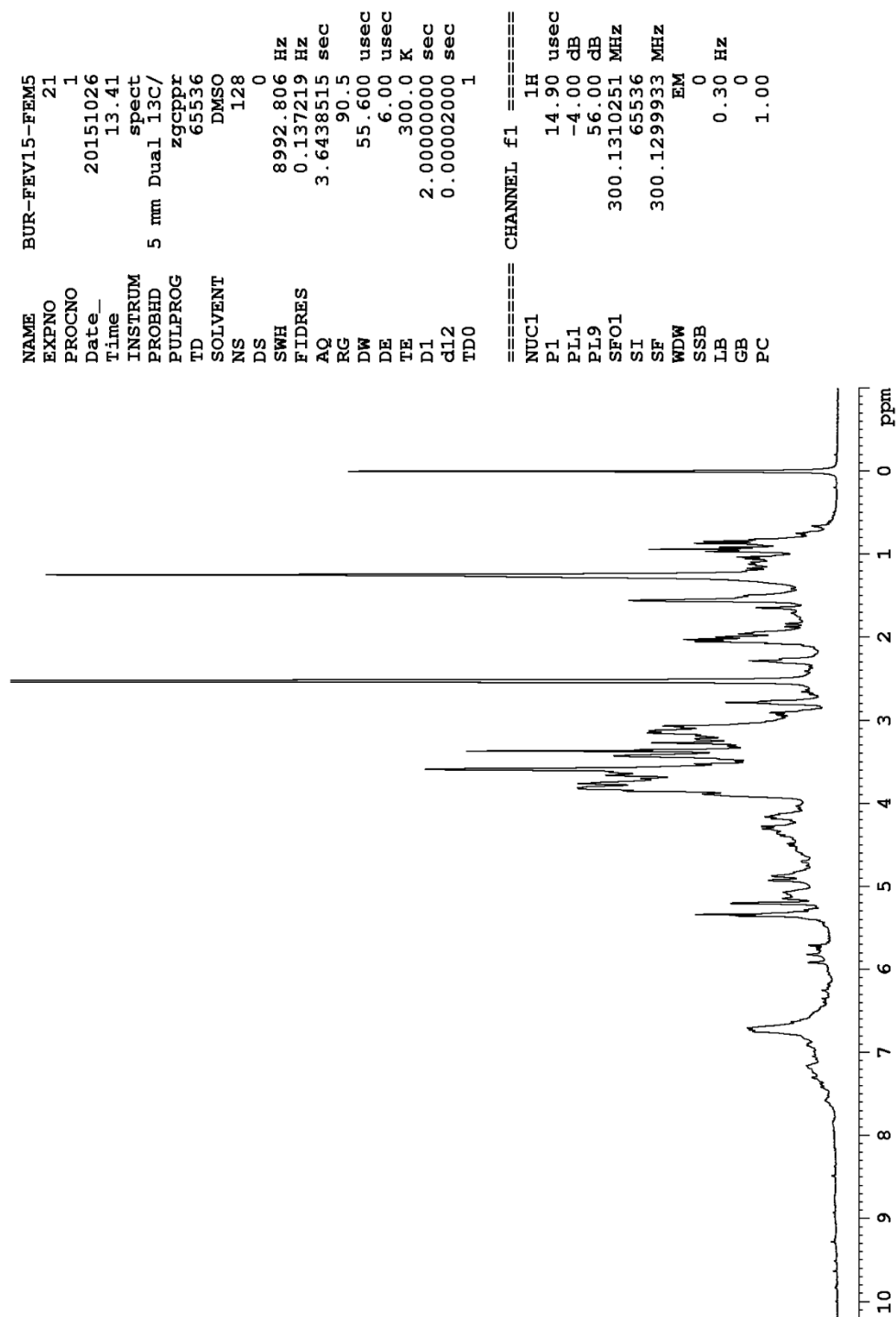


Figura A2 – Perfil espectral total representativo de RMN de ^1H dos extratos metanólicos (DMSO- d_6 , 300.13 MHz).



APÊNDICE B – Figuras dos experimentos de HSQC, HMBC e TOCSY

Figura B1. Mapa de correlação HSQC do extrato aquoso das folhas de *Mauritia flexuosa* (D₂O, 500.13 MHz).

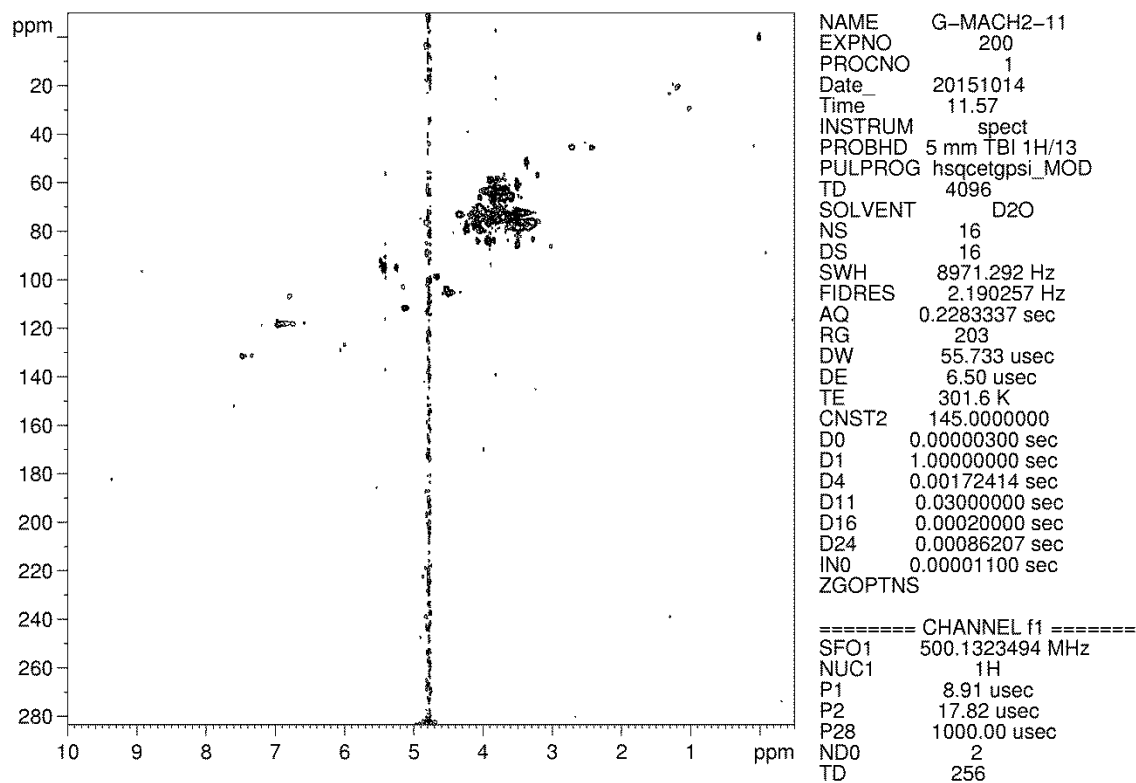


Figura B2. Mapa de correlação HMBC do extrato aquoso das folhas de *Mauritia flexuosa* (D₂O, 500.13 MHz).

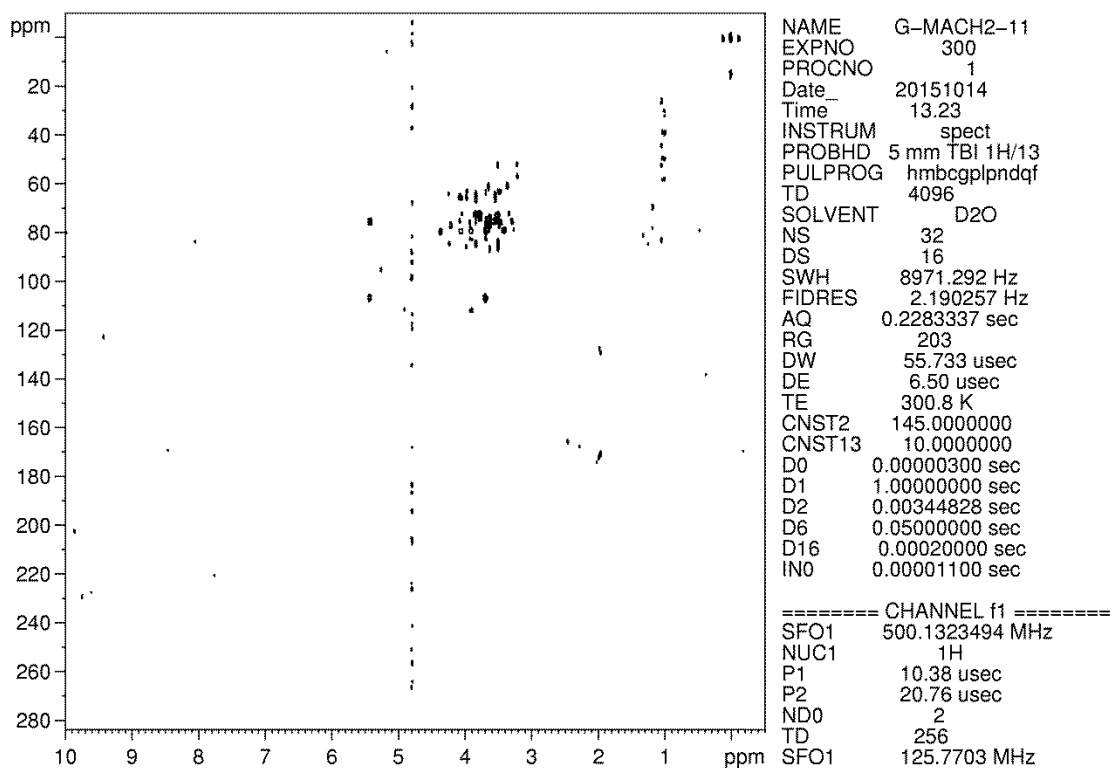


Figura B3. Mapa de correlação TOCSY do extrato aquoso das folhas de *Mauritia flexuosa* (D₂O, 500.13 MHz).

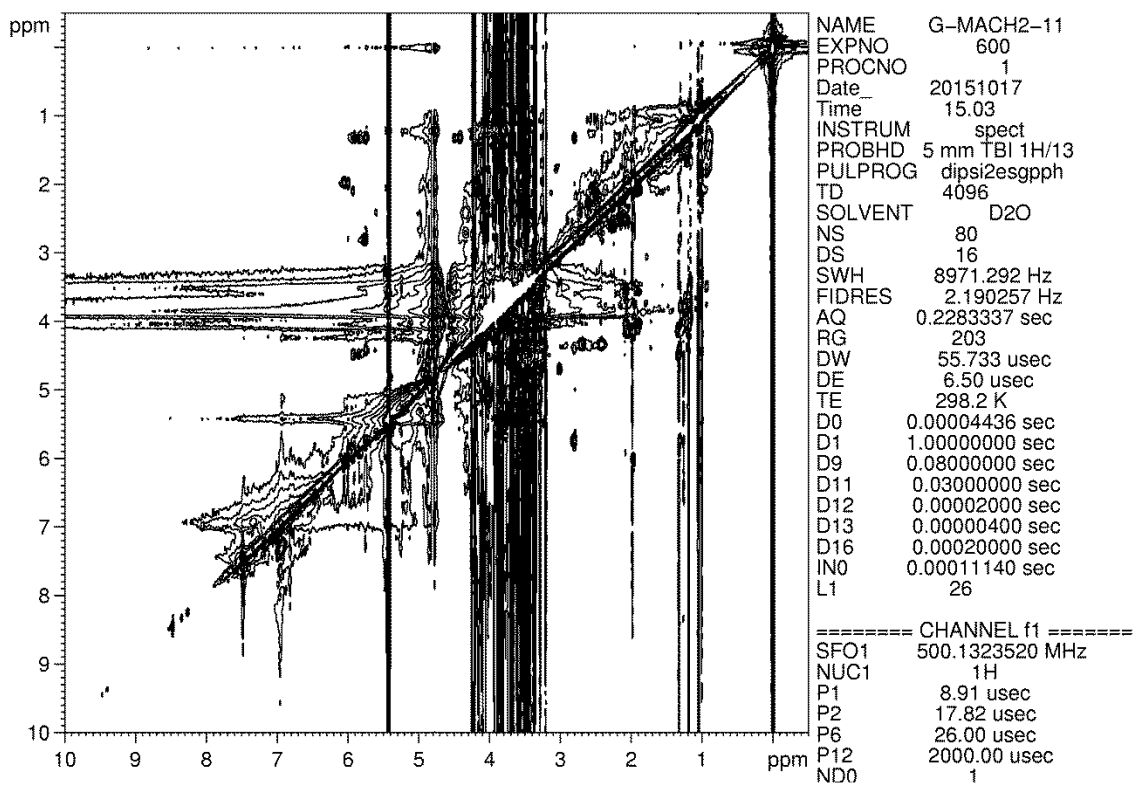


Figura B4. Mapa de correlação HSQC do extrato metanólico das folhas de *Mauritia flexuosa* (DMSO-d₆, 500.13 MHz).

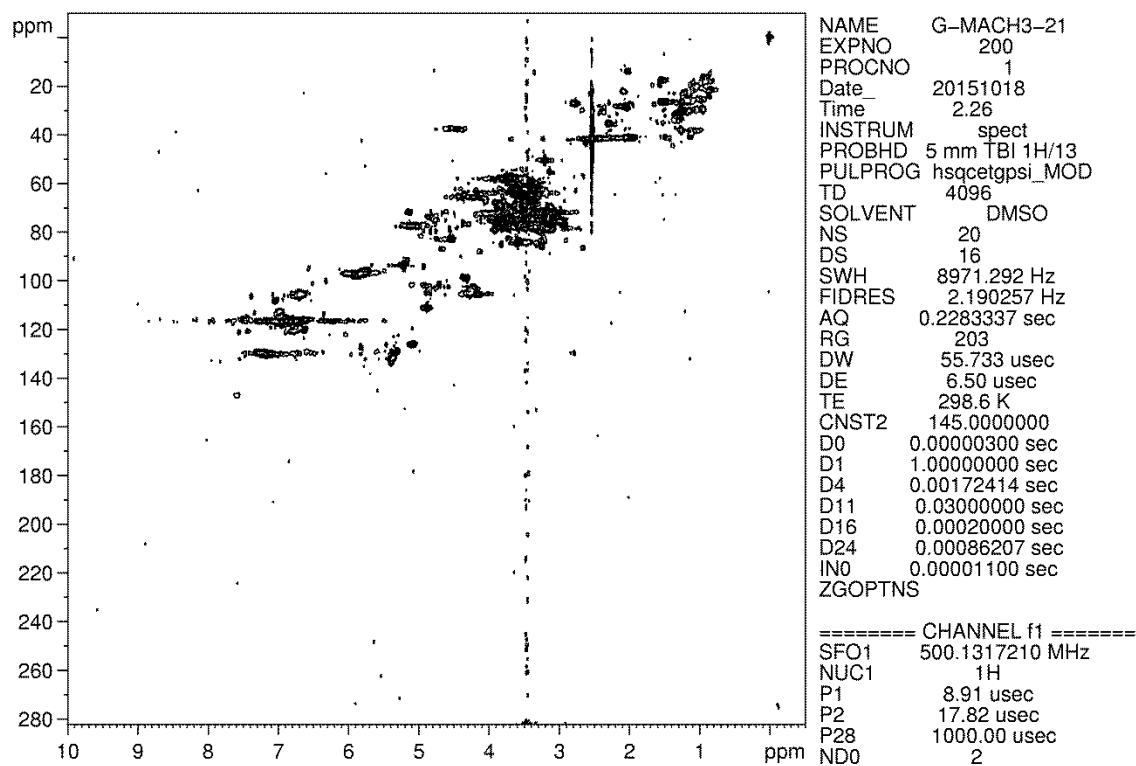


Figura B5. Mapa de correlação HMBC do extrato metanólico das folhas de *Mauritia flexuosa* (DMSO-d₆, 500.13 MHz).

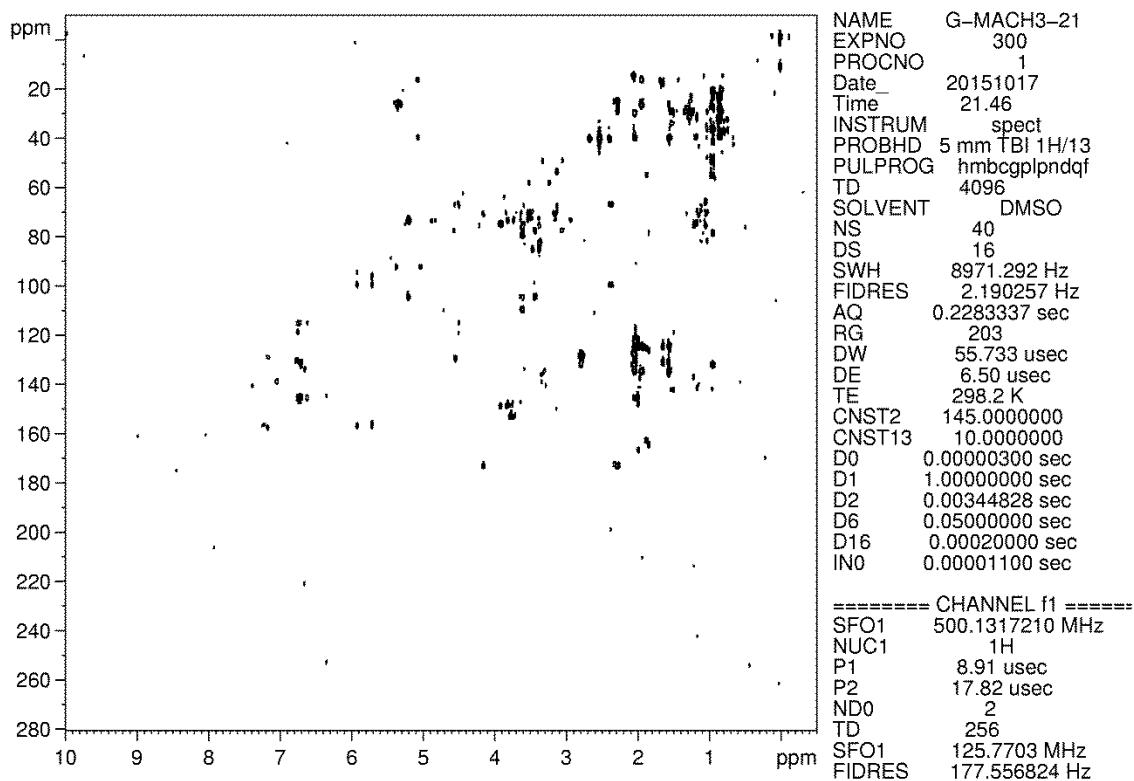
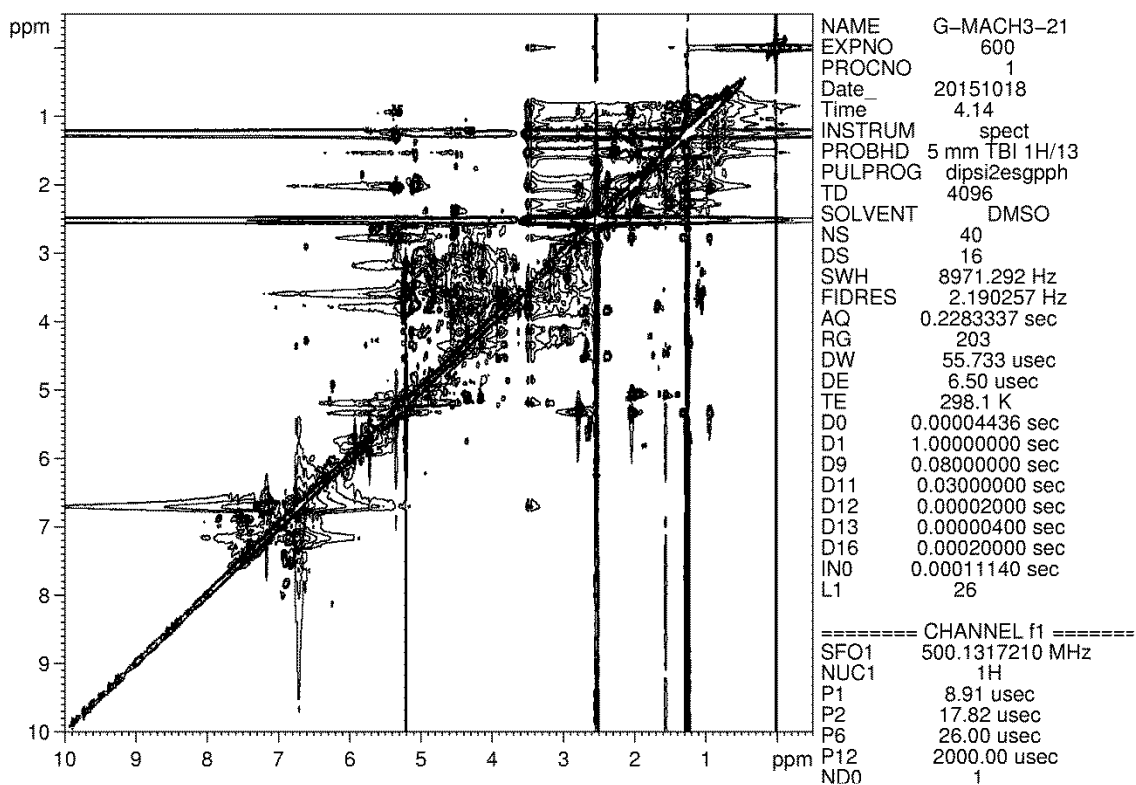


Figura B6. Mapa de correlação TOCSY do extrato metanólico das folhas de *Mauritia flexuosa* (DMSO-d₆, 500.13 MHz).



APÊNDICE C – Artigo publicado no periódico *Phytochemical Analysis*

Metabolic Study of Dioecy in *Mauritia flexuosa*: NMR-based and Chemometric Approaches

Deisy dos Santos Freitas and Glaucia Braz Alcantara* 

ABSTRACT:

Introduction – *Mauritia flexuosa* is a dioecious species native to the Amazon, and the gender identification can currently be determined through the differentiation between female and male flowers in the first flowering.

Objectives – To identify variations in the metabolome profiles of pooled and individual samples of leaves from female and male plants of *M. flexuosa* in reproductive phase, and the plant in its vegetative phase, using two extraction systems.

Material and Methods – Extractions of leaves were separately conducted using deuterated water and methanol. The extracts were evaluated by NMR spectroscopy and chemometric methods.

Results – Different NMR spectroscopic profiles were observed for females, males, and plants in the vegetative phase. Significant variations were found in the carbohydrate and fatty acid contents for the aqueous and methanolic extracts, respectively. Although principal component analysis (PCA) has not been efficient to distinguish the genders, orthogonal signal correction/partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA) was able to successfully differentiate male and female plants in the reproductive phase, independently on the sampling approach. For plants in the vegetative phase, OPLS-DA method from aqueous extracts of *M. flexuosa* leaves also distinguished female samples from the others and showed a small overlap between male and young plants, while the classification model was not able to be used for prediction.

Conclusions – NMR spectroscopy and chemometric-based approach was demonstrated to be useful in the metabolic study of dioecy in *M. flexuosa*. The extracts of the leaves allowed for differentiation between male and female plants; however, for plants in the vegetative phase, the identification of the gender was not effective. Copyright © 2018 John Wiley & Sons, Ltd.

 Additional Supporting Information may be found online in the supporting information tab for this article.

Keywords: *Mauritia flexuosa*; buriti; dioecious plant; NMR; chemometrics

Introduction

Mauritia flexuosa L.f. (Buriti) is a native palm tree from the Amazon that can be found in several countries, i.e. Brazil, Bolivia, Peru, Colombia, Venezuela, Ecuador, Guyana and French Guyana. Its occurrence is associated with regions that have flooded soils (Delgado *et al.*, 2007). In Brazil, this palm can be found in the Amazon, Cerrado and Pantanal biomes. The fruits of *M. flexuosa* can be used as food by several animals and are commercialized *in natura* or used to produce diverse foods (Endress *et al.*, 2013; Milanez *et al.*, 2016; Virapongse *et al.*, 2017). *Mauritia flexuosa* is a dioecious species and fruit production depends on the action of pollinating insects that carry the pollen from the male to the female flowers (Delgado *et al.*, 2007). However, gender identification can currently be determined as a result of differentiation between female and male flowers in the first flowering (Delgado *et al.*, 2007).

Due to the separate sexual functions in different plants, differentiation in the allocation of resources and variation in the metabolic profile for these species is expected (Simpson, 2013). Therefore, studies have been reported for dioecious plants, focusing on metabolic variations between male and female plants (Bajpai *et al.*, 2012; Choudhry *et al.*, 2014). For example, the phytochemical investigation of *Tinospora cordifolia* showed variations in the proportions of the metabolites in male and female plants (Bajpai *et al.*, 2016), and gender variations were also found in phytochemical profiles (Sharma *et al.*, 2015). Among the techniques that can be used for studying the metabolic profiles in plants, NMR spectroscopy is versatile and highly effective in investigations under various conditions (Kim *et al.*, 2011).

Early gender identification of dioecious plants in vegetative phase, including *M. flexuosa*, may be useful in strategies for cultivation and recovery of native areas of these species. In this context, studies focusing on the metabolic variations between male and female plants as well as on the time at which the sexual manifestation can be observed in young individuals are valuable. In this current study, an NMR spectroscopy and chemometric-based approach was applied to the analysis of individual and pooled samples of leaves of *M. flexuosa* to evaluate the differences in the metabolic profiles of males, females, and plants in the vegetative phase.

Experimental

Plant material

Approximately one-fifth of leaves (10–15 g) from 10 individual male and female plants of *M. flexuosa*, and from seven plants in the vegetative phase were collected in February 2015 during flowering from a naturally growing population in Anhanduí Ecological Park, located in Campo Grande city, Mato Grosso do Sul, Brazil. The leaves were immediately stored at –20°C during three months until processing.

* Correspondence to: Glaucia Braz Alcantara, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Instituto de Química, Av. Filinto Muller, 1555, CP 549, CEP 79074-460, Campo Grande, MS, Brazil.
Email: glaucia.alcantara@ufms.br

Instituto de Química, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), CP 549, CEP, 79074-460, Campo Grande, MS, Brazil

Sample preparation

Before processing, the leaves were thawed at room temperature; the excess of water was removed with the aid of a soft sheets of paper and the fresh leaves were fragmented and weighed. For the pooled analysis, 1 g of leaf samples from each 10 male and female plants were pulverized with liquid nitrogen giving 10 g for each gender. For the individual analysis, 1 g of leaves of each plant were independently pulverized with liquid nitrogen. Extractions were conducted with 100.4 ± 0.2 mg of powdered leaves performing 10 analytical replicates for each gender from pooled samples and three analytical replicates for each plant from individual analysis. Two extraction systems were employed. The first was performed with deuterated water containing 0.05% TMSP- d_4 (3-(trimethylsilyl)propionic-2,2,3,3- d_4 acid sodium salt) in phosphate buffer at pH 6.4 (1 mL), prepared with 0.1000 g, 2.4496 g and 1.6149 g of TMSP- d_4 , KH_2PO_4 (potassium dihydrogen phosphate) and Na_2HPO_4 (sodium hydrogen phosphate), respectively, for a final volume of 200 mL. The second was conducted with methanol (5 mL). In both cases, the samples were sonicated for 20 min (ultrasonic cleaner 40 kHz/70 W at room temperature), filtered and centrifuged at 2500 rpm for 5 min. The aqueous extracts were directly inserted into 5-mm NMR tubes, while the methanolic extracts were naturally dried in a fume hood and redissolved in 0.05% TMSP- d_4 /DMSO- d_6 (500 μL) for NMR analysis.

NMR spectroscopy

The NMR measurements were performed on a Bruker DPX 300 (7.05 T) spectrometer, which operates at 300.13 MHz for ^1H . The NMR spectra were acquired with a composite pulse presaturation sequence for suppression of both the residual water signal in 4.83 ppm for aqueous extracts and 3.48 ppm for methanolic extracts redissolved in DMSO- d_6 (dimethyl sulfoxide). All ^1H -NMR data were acquired with 128 scans, 65536 points, acquisition time of 3.64 s, relaxation delay of 2 s, spectral window of 8992.81 Hz, and receiver gain of 90.5. Data processing was performed with 65536 points in the Fourier transformation, manual phase and baseline corrections and exponential multiplication of 0.30 Hz. In both evaluated extraction systems, the TMSP- d_4 signal was used as a reference for calibration. In addition, ^{13}C and two-dimensional (2D) NMR experiments of TOCSY (total correlated spectroscopy), HSQC (heteronuclear single quantum correlation) and HMBC (heteronuclear multiple bond correlation) were obtained to facilitate compound identification. All these acquisition parameters can be found in the Supporting Information.

Multivariate analysis and statistics

NMR data were initially subjected to PCA (principal component analysis) using the AMIX program (3.8 Bruker). Buckets were constructed with a simple rectangular form and 0.03 ppm of width. The integration mode was the sum of absolute intensities, scaling by the total intensity. For aqueous extracts, the evaluated spectrum region was 0.70–7.60 ppm, excluding the region between 4.40 and 5.20 ppm for the residual water signal. The spectrum region above 7.60 ppm for aqueous extracts is mainly composed of noise and was not used for chemometric analyzes. For the methanol extracts redissolved in DMSO- d_6 , the evaluated region was 0.48–10.01 ppm, excluding the 2.36–2.71 ppm and 3.33–3.62 ppm regions that refer to the non-deuterated residual signals from DMSO- d_6 and water, respectively. The variables were mean-centered for aqueous and methanolic extracts.

OPLS-DA (orthogonal signal correction/partial least squares-discriminant analysis) was applied using the Pirouette program (4.0 Infomatrix) for analysis of individual plants. This supervised method of analysis removes the variation that is uncorrelated with the classification. The variables were pre-processed with Pareto scaling, and two orthogonal corrections were applied to the data matrix. The method was validated by internal cross-validation ($n = 10$) (Supporting Information Figures S1–S8). Additionally, external validation was performed by constructing a model with two-thirds of the female and male samples in both extraction systems while using the remaining one-third of the samples for prediction. The sensitivity and specificity of the model were measured by the true positive (TP), true negative

(TN), and false positive (FP). The sensitivity was calculated using $\text{TP}/(\text{TP} + \text{FN})$, and the specificity was calculated using $\text{TN}/(\text{FP} + \text{TN})$ (Supporting Information Figure S9) (Bylesjo *et al.*, 2006).

The metabolites highlighted in the chemometric analysis were subjected to analysis of variance using the two-sample *t*-test. For this, the signals of the metabolites were integrated in relation to the signal of the internal standard TMSP- d_4 . Pearson's correlation test was applied to identify the linear correlation between the variables that were highlighted as important loadings. The data were evaluated with a 95% confidence interval in which a probability of errors (*p*) less than 0.05 represents statistical significance.

Results and discussion

NMR spectroscopic profile

Slightly different NMR profiles were observed for females, males and plants in the vegetative phase for both aqueous (Figure 1) and methanolic (Figure 2) extracts. NMR spectra showed greater homogeneity within each gender for pooled analyses, while differences among plants of the same gender were clearly observed for individual plant analysis, whose peculiarities of each plant were evidenced.

The structural elucidation of compounds was performed from a comparison with the literature data, 2D NMR experiments, and spiked samples. The compounds identified in both extracts and their respective chemical shifts are reported in Table 1. Thus, the aqueous extracts predominantly consist of carbohydrate signals with lower proportions of organic acids, amino acids, and methanol. In the methanolic extracts, signals of carbohydrates and fatty acids, such as linoleic and linolenic acids, are present. The drying procedure for the methanol extracts removed the methanol naturally present in the samples.

Multivariate analysis

Analysis of pooled samples

The ^1H -NMR spectra from pooled samples were subjected to PCA. In both extraction systems (Figure 3A.1–3A.4) it is possible to observe clear distinction in the female and male samples in the first principal component (PC1) axis. In the loading plot of the aqueous extracts (Figure 3A.2), glucose and fructose, for which there are signals between 3.25 and 4.15 ppm, were responsible for locating the female samples in the negative PC1 values, while malate in the region between 2.25 and 3.00 ppm, and sucrose signals at 3.83 and 5.42 ppm located the male samples in positive PC1 values. For the methanolic extracts, it is possible to observe that the fatty acid signal at 1.24 ppm, and signals for unknown compounds between 2.90 and 3.30 ppm, and at 3.60 and 3.90 ppm, are responsible for locating the female samples in negative PC1 values in the loading plot (Figure 3A.4). The signals between 4.40 and 5.40 ppm as well as between 5.5 and 7.00 ppm are responsible for locating the male samples on the positive PC1 axis. In both extraction systems, the first two principal components describe more than 90% of the total variance.

The NMR signals highlighted in the loading plots for the two extraction systems were integrated for comparison of the means of these metabolites for female and male samples (Figure 4A and 4B). Higher contents of α - and β -glucose and fructose are found in female plant leaf samples from aqueous extracts. However, malate and sucrose contents were higher in male plant leaf samples from aqueous extracts. In the methanolic extracts of *M. flexuosa*

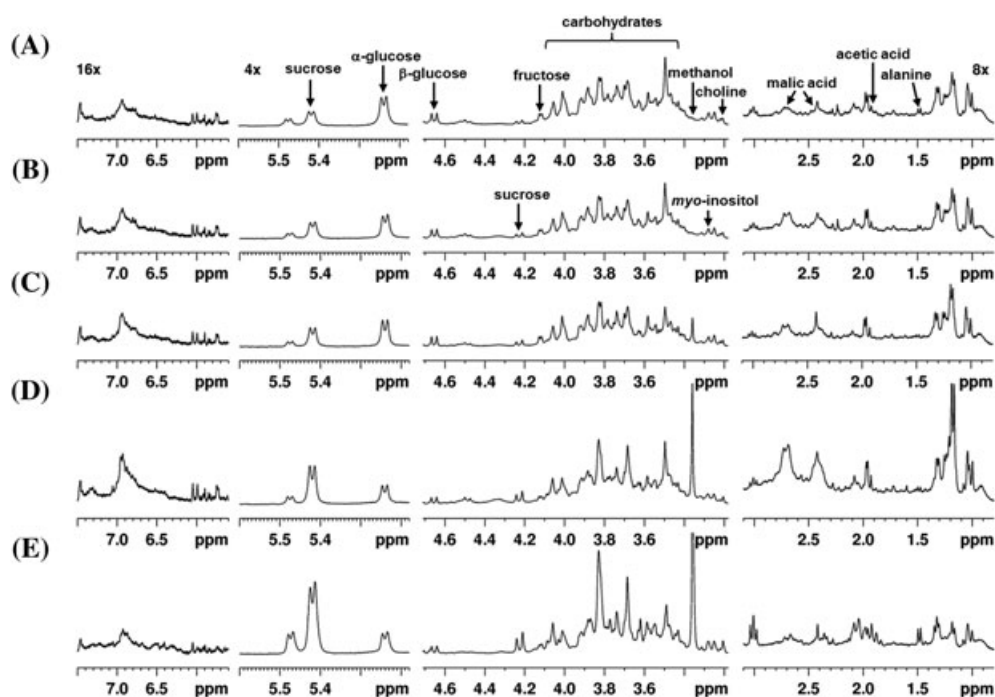


Figure 1. Representative ^1H -NMR spectroscopic profile from aqueous extracts for *Mauritia flexuosa* leaves: pooled female (A) and male (B) samples; female (C), male (D) and plants in the vegetative phase (E) from individual analysis of samples

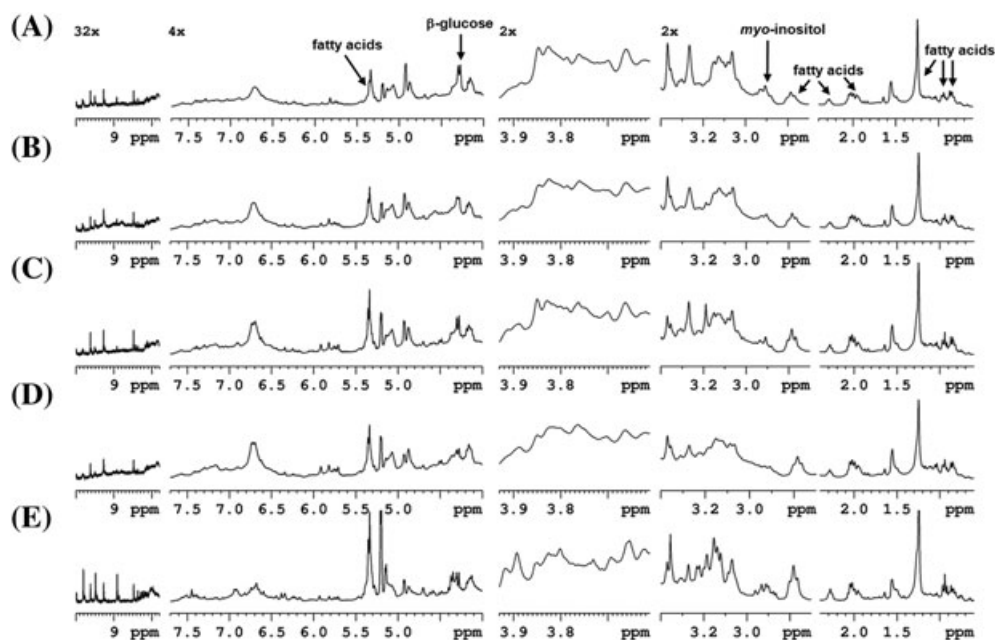


Figure 2. Representative ^1H -NMR spectroscopic profile from methanolic extracts for *Mauritia flexuosa* leaves: pooled female (A) and male (B) samples; female (C), male (D) and plants in the vegetative phase (E) from individual analysis of samples

leaves, the contents of β -glucose and the CH_2 signal of the fatty acids showed higher proportions from female plants.

Analysis of individual female and male plants

No distinction was observed in the PCA plot scores for female and male samples with this unsupervised method in both extraction types (Figure 3B). This is due to non-homogeneity within each

group of samples in addition to the particular characteristics of each plant. Thus, OPLS-DA method was applied in the data matrix for elimination of the variation not correlated with the classification in the aqueous and methanolic extracts (Figure 5). In both cases, it is possible to observe the distinction between female and male plants in the first factor of the score plots (Figure 5A.1 and 5A.3). For aqueous extracts, signals between 1.00 and 3.25 ppm which include signals referring to malate and the signals

Table 1. NMR chemical shift assignments of the compounds identified in the two extraction systems from *Mauritia flexuosa* leaves

Compound ^a	Assignment	δ ¹ H ^b	Multiplicity [J (Hz)]	δ ¹³ C ^c
<i>Aqueous extracts</i>				
acetate	CH ₃	1.93	s	
formate	HCOOH	8.46 ^d	s	
malate	α -CH	4.33	m	72.9
	β -CH	2.69 ^e	m	45.1
	β' -CH	2.41	m	45.1
alanine	β -CH ₃	1.48 ^d	d [7.24]	
choline	CH ₃	3.21	s	56.8
fructose	C3-H; C4-H	4.12 ^{d, e}	m	77.7
	C1-H	3.52–3.60 ^{d, f}	m	
	C6-H	3.62–3.94 ^{d, f}	m	
	C5-H	3.98–4.03 ^{d, f}	m	
	C5-H (α -fructose)	4.06 ^{d, f}	m	
α -glucose	C1-H	5.24 ^e	d [3.65]	94.8
	C2-H; C4-H	3.37–3.57 ^f	m	
	C3-H; C5-H; C6-H	3.68–3.95 ^f	m	
β -glucose	C1-H	4.65	d [7.89]	98.7
	C2-H	3.25 ^e	t	77.0
	C3-H; C4-H; C5-H	3.37–3.49 ^f	m	
methanol	C6-H	3.91 ^f	m	
	CH ₃	3.36	s	51.6
<i>myo</i> -inositol	C1-H; C3-H	3.59–3.68 ^f	m	
	C2-H	3.28	t	
	C4-H; C6-H	3.50–3.57 ^f	m	
	C5-H	4.04–4.09 ^f	m	
sucrose	C1-H	5.42 ^e	d [3.72]	94.8
	C2-H	3.55	m	73.8
	C3-H	3.80	m	
	C7-H	4.23	d [8.74]	79.1
	C8-H	4.06	m	76.5
	C10-H ₂	3.68	s	64.0
	C11;12-H ₂	3.83	m	65.0;62.7
<i>Methanolic extracts</i>				
linoleic acid	1-COOH	—	—	172.9
	2-CH ₂	2.28	m	35.2
	3-CH ₂	1.51	m	26.2
	4 to 7, 15 to 17-CH ₂	1.21–1.33 ^e	m	26.3–32.7
	8 and 14-CH ₂	2.03	m	28.1
	9, 10, 12, 13-CH	5.34	m	129.5–131.5
	11-CH ₂	2.78	m	27.0
	18-CH ₃	0.86	t	16.0
	1-COOH	—	—	172.9
linolenic acid	2-CH ₂	2.28	m	35.2
	3-CH ₂	1.51	m	26.2
	4 to 7-CH ₂	1.21–1.33 ^e	m	30.6–32.8
	8-CH ₂	2.03	m	28.1
	9, 10, 12, 13, 15, 16-CH	5.34	m	129.5–131.5
	11 and 14-CH ₂	2.78	m	27.0
	17-CH ₂	2.07		22.0
	18-CH ₃	0.94	t	16.2
choline	CH ₃	3.19	s	
β -glucose	C1-H	4.29 ^{d, e}	d [7.68]	98.7
	C2-H	2.91 ^d	m	
	C3-H; C4-H; C5-H	3.03–3.14 ^d	m	
	C6-H	3.65–3.71 ^d	m	

(Continues)

Table 1. (Continued)

Compound ^a	Assignment	δ ¹ H ^b	Multiplicity [<i>J</i> (Hz)]	δ ¹³ C ^c
<i>myo</i> -inositol	C1-H; C3-H	3.37 ^d	m	76.6
	C2-H	2.93 ^d	t [9.01]	
	C4-H; C6-H	3.14 ^d	m	
	C5-H	3.73 ^d	m	

Note: s: singlet, d: doublet, t: triplet, and m: multiplet.

^aReferences used to support the identification of compounds: (Bharti *et al.*, 2011; Fan, 1996; Pérez *et al.*, 2010; Piccioni *et al.*, 2009; Popescu *et al.*, 2015; Sobolev *et al.*, 2005; Wishart *et al.*, 2013).

^bThe correlations were confirmed by TOCSY experiment (Supporting Information Figures S10 and S11).

^cThe chemical shifts were assigned by two-dimensional (2D) NMR experiments (HSQC and HMBC) and ¹³C and DEPT-135 NMR spectra (Supporting Information Figures S12–S17).

^dConfirmed by analysis of spiked samples.

^eSignal used to quantify the compound.

^fSignals in the region of overlap/complex multiplicity.

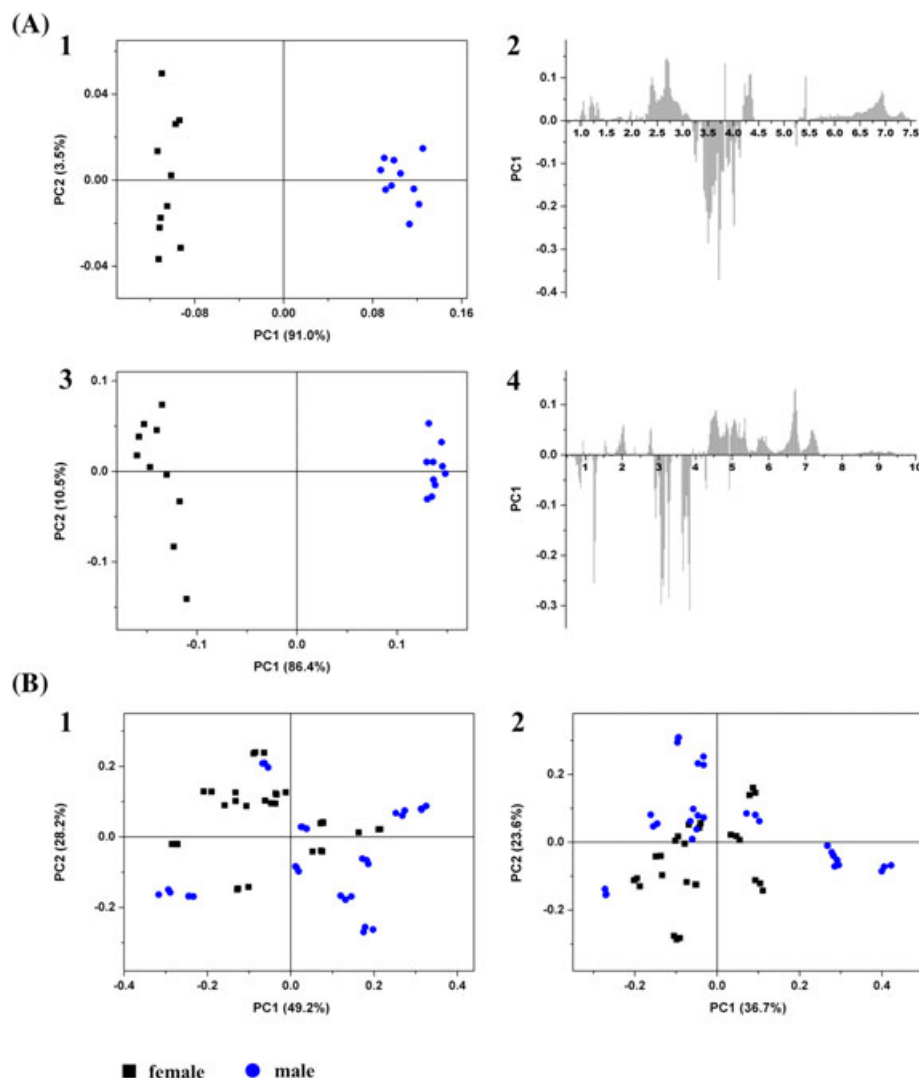


Figure 3. (A) Principal component analysis (PCA) score and loading plots from NMR data of the aqueous (1 and 2) and methanolic extracts (3 and 4) for the pooled female and male samples. (B) PCA score plots from NMR data of the aqueous (1) and methanolic extracts (2) for the individual analysis of female and male plants [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

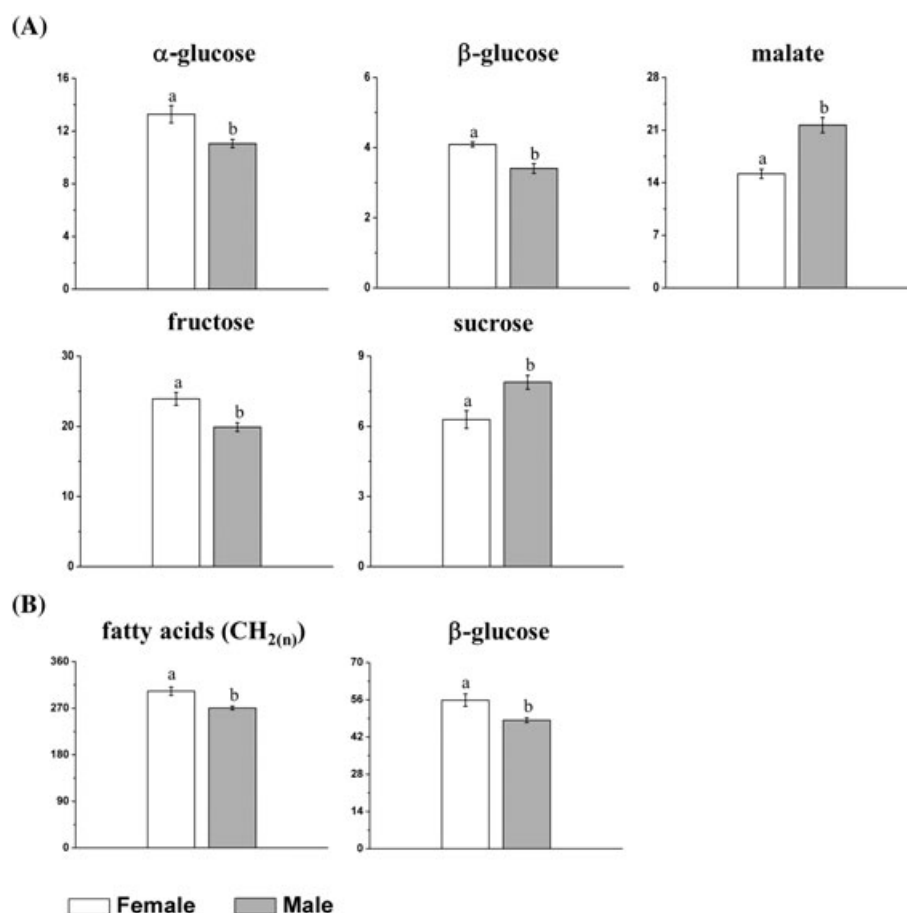


Figure 4. Relative ratio of compounds obtained by integration of the signals from the $^1\text{H-NMR}$ spectra for pooled samples ($n = 10$) in reference to the TMS- d_4 signal. (A) α -Glucose, β -glucose, malate, fructose, and sucrose for aqueous extracts. (B) Saturated and unsaturated fatty acids ($\text{CH}_{2(n)}$ signal) and β -glucose for methanolic extracts. Different letters on the bars indicate significant differences ($p < 0.05$)

between 4.25 and 4.40 ppm, and 5.50 and 7.50 ppm are responsible for locating male samples in negative values of factor 1, while glucose and fructose (signals between 3.25 and 4.25 ppm), and sucrose (5.38 and 5.50 ppm) are responsible for locating female samples in positive values of factor 1 (Figure 5A.2). For methanolic extracts, the signal at 1.24 ppm corresponding to fatty acids, the signals between 2.80 and 3.30 ppm, 3.60 and 4.20 ppm, and the signal at 5.20 ppm are responsible for locating female samples in positive values of factor 1, while signals between 1.25 and 2.25 ppm, 4.50 and 5.00 ppm, and 5.50 and 7.50 ppm are responsible for locating male samples in negative values of factor 1 (Figure 5A.4).

Classification of *Mauritia flexuosa* plants in the vegetative phase

PCA score plots for individual analysis of females, males, and plants in the vegetative phase showed no distinction among groups in both extraction systems (Figure 6). For OPLS-DA method from aqueous extracts of *M. flexuosa* leaves (Figure 5B.1 and 5B.2), the female samples were distinguished from the others in the first factor and a small overlap was observed between the males and plants in the vegetative phase (Figure 5B.1). For the methanolic extracts (Figure 5B.3 and 5B.4), no evident separation is observed for these three groups of samples.

Classification of the samples in the vegetative phase was conducted with the OPLS-DA model for both extraction systems. For the aqueous extracts, the model is very sensitive for the classification of males, but the specificity is lower. For females, the model is less sensitive, but it is very specific. For methanolic extracts, the model is less sensitive for the classification of males, but the specificity is high. However, for females, the model is very sensitive but less specific (Supporting Information Figure S9). Table S1 (Supporting Information) reports the classification of plants in the vegetative phase in the two constructed models. For the aqueous extraction system, only three replicates from young plants were predicted as male samples, while the others were not predicted in any group. For the methanolic extraction system, two replicates from young plants were predicted as female samples, while the others were not predicted in any group. Considering the tendency of distinction of female, male and plants in vegetative phase (Figure 5B.1), besides their NMR spectroscopic profiles to be slightly different (Figures 1 and 2), the classification model was not able to successfully predict the gender of all samples of young *M. flexuosa* plants, since they appear to have different metabolic processes from those found in plants in the reproductive phase. Nevertheless, these young plants were marked in the Ecological Park Anhanduí for future monitoring since the first inflorescence only occurs when *M. flexuosa* are 7–8 years old.

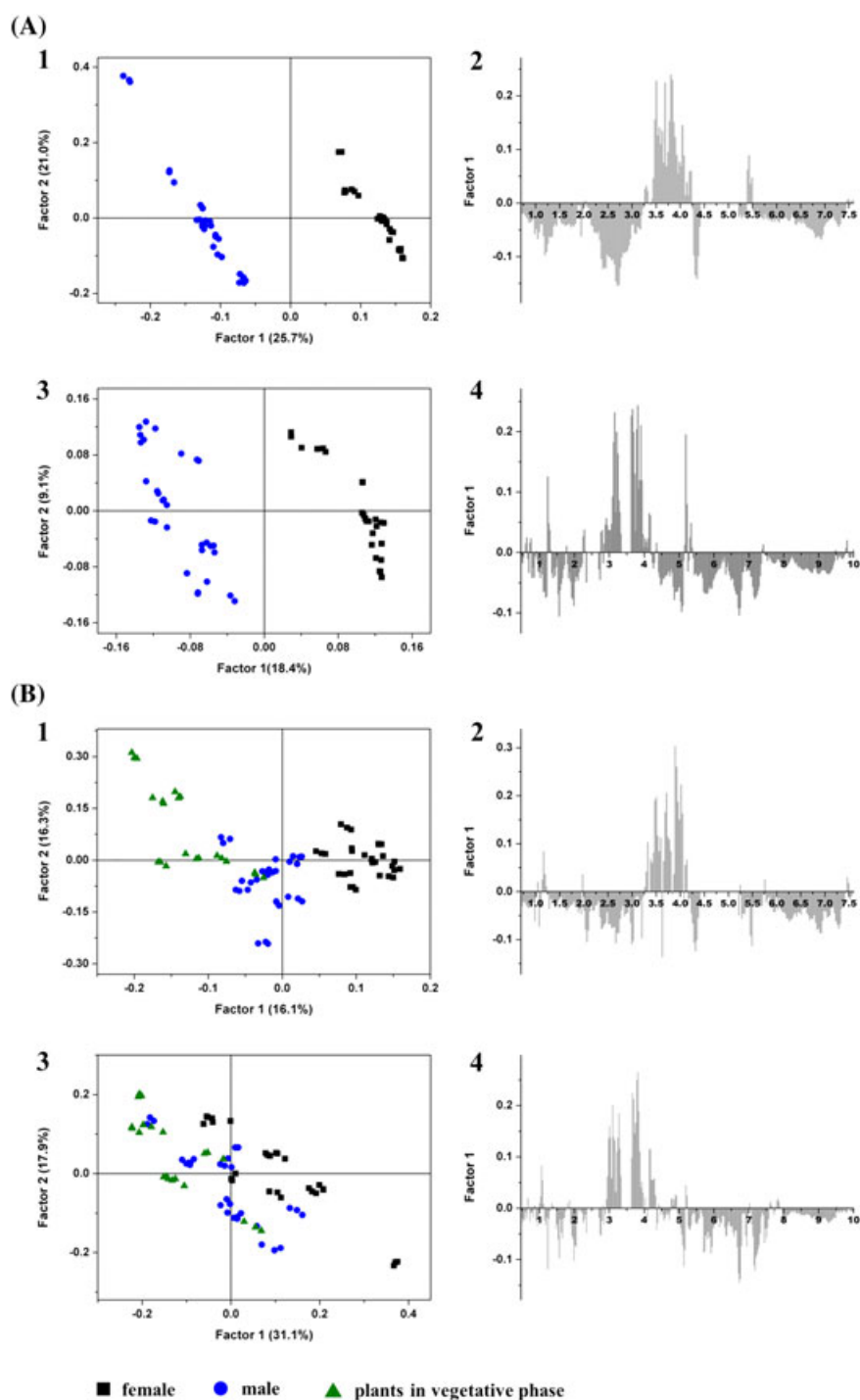


Figure 5. (A) Orthogonal signal correction/partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA) score and loading plots for analysis by individual female and male plants from aqueous (1 and 2) and methanolic extracts (3 and 4). (B) OPLS-DA score and loading plots for analysis by individual females, males, and plants in the vegetative phase from aqueous (1 and 2) and methanolic extracts (3 and 4) [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

Dioecy in *Mauritia flexuosa*

Method of analysis of samples

In the case of the pooled samples, there is considerable homogeneity within the 10 replicates of each gender group because the particularities of each plant are dispersed. This greater homogeneity allows for the use of unsupervised pattern recognition methods, such as PCA, to be effective in observing grouping and

natural distinction of the samples. In the case of analysis of samples from individual plants, as expected there is reduced homogeneity within each gender group due to the inherent differences in each plant. Therefore, for analysis of individual plants, the PCA method was not able to distinguish between males and females. Most of the variation that was uncorrelated with the classification for these samples can be removed by the OPLS-DA method, enabling distinction between the two genders. Despite of the need for different chemometric methods to analyze different

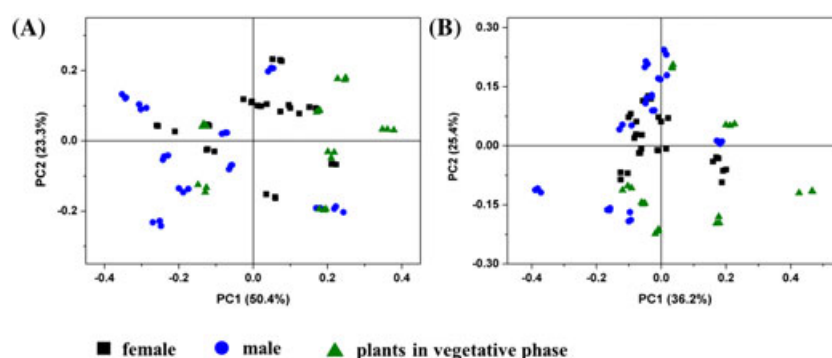


Figure 6. Principal component analysis (PCA) score plots from individual analysis of females, males, and plants in the vegetative phase from aqueous (A) and methanolic (B) extracts [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

approaches for studying dioecy in *M. flexuosa*, it is possible to observe that the variables of greater importance for separation of samples are similar in both situations based on the loading plots in both cases, indicating that the choice of the best approach will depend on the type of study to be developed with dioecious plants.

Metabolism and dioecy

For the aqueous extracts of *M. flexuosa* leaves, there was a significant variation in the contents of carbohydrates. The period from flowering to the complete maturation of fruits occurs around one year, making it possible to observe both almost ripe fruits and new inflorescences in the flowering period within the same plant. Higher levels of glucose and fructose were found in female samples and higher levels of sucrose in male samples. Pearson's correlation test showed a strong direct linear correlation between glucose and fructose for both males and females ($r \geq 0.89$, $P \leq 4.93E-4$), while no significant linear correlation was observed with respect to glucose and fructose for sucrose. One hypothesis for such observations is that female plants have a greater energy requirement due to the flowering period but also because they have fruits in the ripening stage. These two simultaneous processes may require a higher consumption of sucrose, which is observed by a decrease in its content in female leaves. Apparently, there is no correlation between the glucose and fructose levels and sucrose, and these two sugars may be involved in a complex network of signaling in various metabolic processes, including flowering. Additionally, the lower malate levels in female plants may also indicate a greater energy requirement from reproductive activities.

In methanolic extracts, the greatest observed variation was in relation to the signal between 1.21 and 1.33 ppm, which can be attributed to the $(CH_2)_n$ signals of saturated or unsaturated fatty acids. Lower fatty acid contents were found in male plants. The relationship between these acids and dioecy in *M. flexuosa* is not clear, and studies evaluating the function of these compounds in floral stimulation and signaling are needed.

Mauritia flexuosa plants in the vegetative phase

The model constructed for the classification of plants in the vegetative phase could not successfully predict the gender of these plants. It seems that for *M. flexuosa*, sexual manifestation is not perceptible by the analysis of the extracts from the leaves of plants in the vegetative phase, and there is no evidence of characteristics

that indicate the gender of these plants. The identification of sexual separation in plants in the vegetative phase is uncommon. For dioecious *Silene latifolia* plants, different gene expression associated with sex was found for plants in the vegetative stage, suggesting that the same could be found for other dioecious species (Zluvova *et al.*, 2010). Some future perspectives in the study of *M. flexuosa* include combined "omics" approaches to understand how the gender can be expressed before the appearance of male and female flowers. The knowledge of the gender of young individuals may be useful in the use of this species for the recovery of native areas.

The NMR-based approach combined with chemometric methods was demonstrated to be useful in the metabolic study of dioecy in *M. flexuosa*. The extracts of the leaves allowed for differentiation between male and female plants; however, for plants in the vegetative phase, the identification of the gender was not effective. Significant variations were found in the carbohydrate, malate, and fatty acid contents. It is possible that female plants have a greater energy requirement due to the reproductive functions of these plants. These findings indicate differentiation in the allocation of resources to female and male plants, which may generate different proportions of other metabolites, such as secondary metabolites. Thus, the dioecy should be considered when bioactive compounds are obtained from dioecious plants.

References

- Bajpai V, Pandey R, Negi MPS, Bindu KH, Kumar N, Kumar B. 2012. Characteristic differences in metabolite profile in male and female plants of dioecious *Piper betle* L. *J Biosci* **37**: 1061–1066.
- Bajpai V, Singh A, Chandra P, Negi MPS, Kumar N, Kumar B. 2016. Analysis of phytochemical variations in dioecious *Tinospora cordifolia* stems using HPLC/QTOF MS/MS and UPLC/QqQ_{LT}-MS/MS. *Phytochem Anal* **27**: 92–99.
- Bharti SK, Bhatia A, Tewari SK, Sidhu OP, Roy R. 2011. Application of HR-MAS NMR spectroscopy for studying chemotype variations of *Withania somnifera* (L.) Dunal. *Magn Reson Chem* **49**: 659–667.
- Bylesjo M, Rantalainen M, Cloarec O, Nicholson JK, Holmes E, Trygg J. 2006. OPLS discriminant analysis: Combining the strengths of PLS-DA and SIMCA classification. *J Chemom* **20**: 341–351.
- Choudhry N, Singh S, Siddiqui MB, Khatoon S. 2014. Impact of seasons and dioecy on therapeutic phytoconstituents of *Tinospora cordifolia*, a Rasayana drug. *Biomed Res Int* **2014**: 902138. <https://doi.org/10.1155/2014/902138>.
- Delgado C, Couturier G, Mejia K. 2007. *Mauritia flexuosa* (Arecaceae: Calamoideae), an Amazonian palm with cultivation purposes in Peru. *Fruits* **62**: 157–169.
- Endress BA, Horn CM, Gilmore MP. 2013. *Mauritia flexuosa* palm swamps: Composition, structure and implications for conservation and management. *Forest Ecol Manag* **302**: 346–353.

- Fan TWM. 1996. Metabolite profiling by one- and two-dimensional NMR analysis of complex mixtures. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc* **28**: 161–219.
- Kim HK, Choi YH, Verpoorte R. 2011. NMR-based plant metabolomics: Where do we stand, where do we go? *Trends Biotechnol* **29**: 267–275.
- Milanez JT, Neves LC, da Silva PMC, Bastos VJ, Shahab M, Colombo RC, Roberto SR. 2016. Pre-harvest studies of buriti (*Mauritia flexuosa* L.F.), a Brazilian native fruit, for the characterization of ideal harvest point and ripening stages. *Sci Hortic* **202**: 77–82.
- Pérez EMS, Iglesias MJ, Ortiz FL, Pérez IS, Galera MM. 2010. Study of the suitability of HRMAS NMR for metabolic profiling of tomatoes: Application to tissue differentiation and fruit ripening. *Food Chem* **122**: 877–887.
- Piccioni F, Capitani D, Zolla L, Mannina L. 2009. NMR metabolic profiling of transgenic maize with the Cry1A(b) gene. *J Agric Food Chem* **57**: 6041–6049.
- Popescu R, Costinel D, Dinca OR, Marinescu A, Stefanescu I, Ionete RE. 2015. Discrimination of vegetable oils using NMR spectroscopy and chemometrics. *Food Control* **48**: 84–90.
- Sharma R, Amin H, Prajapati PK. 2015. Physicochemical evaluation of male and female plants of Guduchi (*Tinospora cordifolia* (Willd.) Miers). *J Phytopathol* **4**: 116–120.
- Simpson BS. 2013. Dioecy in plants – is it an important factor for phytochemists to consider? *Planta Med* **79**: 613–615.
- Sobolev AP, Brosio E, Gianferri R, Segre AL. 2005. Metabolic profile of lettuce leaves by high-field NMR spectra. *Magn Reson Chem* **43**: 625–638.
- Virapongse A, Endress BA, Gilmore MP, Horn C, Romulo C. 2017. Ecology, livelihoods, and management of the *Mauritia flexuosa* palm in South America. *Glob. Ecol Conserv* **10**: 70–92.
- Wishart DS, Jewison T, Guo AC, Wilson M, Knox C et al. 2013. HMDB 3.0 — The human metabolome database in 2013. *Nucleic Acids Res* **41**(D1): 801–807.
- Zluvova J, Zak J, Janousek B, Vyskot B. 2010. Dioecious *Silene latifolia* plants show sexual dimorphism in the vegetative stage. *BMC Plant Biol* **10**: 1–5.

Supporting information

Additional Supporting Information may be found online in the supporting information tab for this article.