



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA E FÍSICO-QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ROBSON MOREIRA MARTINS

ANÁLISE METABOLÔMICA DOS CLONES DE CAJUEIRO ANÃO (*Anacardium occidentale L.*): ASPECTOS MICROMOLECULARES DA TOLERÂNCIA A SECA

FORTALEZA

2021

ROBSON MOREIRA MARTINS

ANÁLISE METABOLÔMICA DOS CLONES DE CAJUEIRO ANÃO (*Anacardium occidentale L.*): ASPECTOS MICROMOLECULARES DA TOLERÂNCIA A SECA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química. Área de concentração: Química.

Orientador: Dr. Guilherme Julião Zocolo
Coorientadora: Profa. Dra. Dávila Zampieri.

FORTALEZA

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- M345a Martins, Robson Moreira.
Análise metabólica dos clones de cajueiro anão (*Anacardium occidentale* L.): aspectos micromoleculares da tolerância a seca / Robson Moreira Martins. – 2021.
105 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2021.
Orientação: Prof. Dr. Guilherme Julião Zocolo.
Coorientação: Profa. Dra. Dávila Zampieri..
1. *Anacardium occidentale* L. 2. estresse hídrico. 3. análises quimiométricas. 4. UPLC-QTOF-MSE.. I.
Título.

CDD 540

ROBSON MOREIRA MARTINS

ANÁLISE METABOLÔMICA DOS CLONES DE CAJUEIRO ANÃO (*Anacardium occidentale L.*): ASPECTOS MICROMOLECULARES DA TOLERÂNCIA A SECA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química. Área de concentração: Química.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Guilherme Julião Zocolo (Orientador)
Embrapa Agroindústria Tropical/ Embrapa Soja

Profª. Dra. Otília Deusdênia Loiola Pessoa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profª. Dra. Gisele Simone Lopes
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A mim.

À minha tia, Maria de Fátima, por todo o apoio
e admiração.

AGRADECIMENTOS

À minha família, em especial, minha tia, Maria de Fátima Moreira, por todo o apoio mesmo durante os momentos de crise. Obrigado por todo apoio, motivação e cuidado.

A todos meus amigos por todo companheirismo, paciência e incentivo em toda minha jornada na graduação. Não poderia citar nomes, pois acabaria esquecendo de alguém. Vocês sabem quem são.

Aos meus amigos da pós-graduação, em especial, Glady, Rodolfo e Cristine. Obrigado por tornar toda essa jornada maravilhosa.

Aos meus amigos do laboratório, Priscila, Sheila, Gisele e Yandra que me ajudaram em inúmeras etapas desse trabalho.

Ao meu orientador Guilherme Julião Zocolo, por confiar a mim esse trabalho grandioso.

À minha coorientadora, Dra. Dávila Zampieri, por tudo. Você se tornou um exemplo de competência e amizade para mim. Obrigado por todo o companheirismo, pelas saídas para descontração e conversas francas.

À CAPES e ao CNPQ, pela concessão da bolsa de mestrado e por apostarem nesse projeto de pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da UFC, ao qual devo minha formação, por toda ajuda e oferta de cursos/disciplinas que contribuíram significativamente para meu conhecimento.

À Universidade Federal do Ceará – UFC, pelo espaço cedido e por toda a infraestrutura emprestada a mim. Agradeço a instituição por toda o período que fiz parte do quadro de alunos, e por todas as amizades que surgiram dessa oportunidade.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

RESUMO

O cajueiro (*Anacardium occidentale L.*) é uma planta tropical, originária do litoral do Nordeste do Brasil, dispersa em quase todo o seu território. A cultura do cajueiro tem 98% da produção do país concentrada na região do semiárido, nos estados do Ceará, Rio Grande do Norte e Piauí. A principal característica que marca a região é o índice pluviométrico, baixo e mal distribuído, fazendo com que a vegetação sofra com a escassez hídrica. O semiárido brasileiro é uma região ímpar, um bioma de clima extremo, com condições edafoclimáticas, biológicas, ecológicas e econômico sociais únicos. Dessa forma, se faz necessário o desenvolvimento de cultivares de cajueiro tolerantes à seca, o que requer um conhecimento sólido dos processos metabólicos e bioquímicos envolvidos com diferentes mecanismos fisiológicos. Estudos sobre micromoléculas (metabólitos secundários e primários) que possam ser classificadas como biomarcadores de tolerância à seca, podem acelerar o processo de melhoramento genético. Dessa forma, o presente trabalho analisou o perfil metabólico de clones de cajueiro anão-precoce, tolerantes e susceptíveis à seca, valendo-se das técnicas de cromatografia a líquido de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas em alta resolução (UPLC-HRMS) e ressonância magnética nuclear (RMN). Foram utilizadas ferramentas quimiométricas, tais como: análise de componentes principais (PCA) e análise de mínimos quadrados ortogonais parciais (OPLS-DA) e PLS-DA. Para o clone tolerante à seca seis metabólitos conhecidos foram identificados como os mais importantes por 2 métodos diferentes, PCA e OPLS-DA. O aumento mais pronunciado no acúmulo de micromoléculas, em clones tolerantes à seca, devido ao estresse hídrico foi detectado pela técnica de UPLC-HRMS, identificando os seguintes biomarcadores: Catequina, Trigaloil glicose, Canferol hexosídeo I ou Luteolina hexosídeo I/Quercetina 3-*O*-ramnosídeo, Canferol hexosídeo II ou Luteolina hexosídeo II, Quercetina galoil pentosídeo I e Amnetoflavona ou Agatisflavona. As análises por RMN mostraram que clones tolerantes expressavam um perfil de metabólitos primários com maiores teores de glicose e frutose. Mudanças metabólicas à luz das condições de seca destacaram conjuntos de micromoléculas identificadas como biomarcadores de tolerância, que afetam o ajuste metabólico e fisiológico dos clones de cajueiro anão, reduzindo assim, os impactos da seca. Os dados gerados podem ser utilizados para o descarte de genótipos desfavoráveis aos sistemas de melhoramento genético para o desenvolvimento de novos clones adaptados com base na escolha de biomarcadores.

Palavras chaves: *Anacardium occidentale L.*; estresse hídrico; análises quimiométricas; UPLC-QTOF-MS^E.

ABSTRACT

The cashew tree (*Anacardium occidentale* L.) is a tropical plant, native to the coast of northeastern Brazil, dispersed throughout most of its territory. The cashew crop has 98% of the country's production concentrated in the semiarid region, in the states of Ceará, Rio Grande do Norte and Piauí. The main characteristic that marks the region is the rainfall index, which is low and poorly distributed, causing the vegetation to suffer from water scarcity. The Brazilian semiarid region is a unique region, an extreme climate biome, with unique edaphoclimatic, biological, ecological, and social economic conditions. Thus, the development of drought-tolerant cashew cultivars is necessary, which requires a solid knowledge of the metabolomic, and biochemical processes involved with different physiological mechanisms. Studies on micromolecules (secondary and primary metabolites) that can be classified as drought tolerance biomarkers can accelerate the process of genetic improvement. Thus, the present work analyzed the metabolomic profile of drought tolerant and susceptible dwarf cashew clones, using ultra-efficiency liquid chromatography techniques coupled with high resolution mass spectrometry (UPLC-HRMS) and nuclear magnetic resonance (NMR). Chemometric tools were used, such as: principal component analysis (PCA) and combined partial orthogonal analysis (OPLS-DA) and PLS-DA. For the drought tolerant clone six known metabolites were identified as the most important by two different methods, PCA and OPLS-DA. The most pronounced increase in micromolecule accumulation in drought-tolerant clones due to water stress was detected by the UPLC-HRMS technique, identifying the following biomarkers: Catechin, Trigaloyl Glucose, Camperol Hexoside I or Luteolin Hexoside I/Quercetin 3-*O*-Rhamnoside, Camperol Hexoside II or Luteolin Hexoside II, Quercetin Galoyl Pentoside I, and Ammentoflavone or Agatisflavone. Differentiated NMR analysis showed that tolerant clones expressed a profile of primary metabolites with higher levels of glucose and fructose. Metabolic changes considering drought conditions highlighted the sets of micromolecules identified as tolerance biomarkers, which affect the metabolic and physiological adjustment of dwarf cashew clones, thus ascertaining the impacts of drought. The data generated can be used to discard genotypes that are unfavorable to breeding systems for the development of new adapted clones based on the choice of biomarkers.

Keywords: *Anacardium occidentale* L.; drought stress; chemometric analysis; UPLC-QTOF-MS^E.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Distribuição taxonômicas das ocorrências de Anacardium L catalogadas até 2019 (a) no mundo; (b) no Brasil e (c) no nordeste	16
Figura 2	– Representação da cascata ômica.....	19
Figura 3	– Fluxograma básico para obtenção, tratamento e direcionamento dos dados gerados pelos estudos metabolômico.....	21
Figura 4	– Processo de desintoxicação do radical de oxigênio livre pelo sistema enzimático de defesa, suas fontes de origem e consequências do acúmulo de peróxido de hidrogênio nas células.....	30
Figura 5	– Síntese do ácido chiquímico, seus principais produtos e derivados.....	32
Figura 6	– Componentes de um espectrômetro de massas.....	34
Figura 7	– Procedimento operacional padrão (POP) desenvolvido e utilizado na EMBRAPA para microextrações líquido-líquido para UPLC-QTOF-MSE.....	42
Figura 8	– Médias de umidade do solo (% em volume) nas camadas de 0-20, 20-40 e 40-60 cm na zona radicular de plantas de cajueiro dos clones CCP 76 e BRS 226, irrigadas e em sequeiro, no período de seca (coleta realizada em 30/11/2018). Onde a legenda PM significa: ponto de murcha e CC: capacidade de campo.....	46
Figura 9	– Médias de umidade do solo (% em volume) nas camadas de 0-20, 20-40 e 40-60 cm na zona radicular de plantas de cajueiro dos clones CCP 76 e BRS 226, irrigadas e em sequeiro, na estação chuvosa (coleta realizada em 16/05/2019)..	47
Figura 10	– Cromatogramas em modo BPI (Base Peak Intensity) referentes aos clones CCP76 e BRS 226 de cajueiro anão-precoce analisados, onde a sigla S1 significa sequeiro primeira coleta e I1 irrigado primeira coleta.....	49
Figura 11	– Cromatogramas em modo BPI (Base Peak Intensity) referentes aos clones CCP76 e BRS 226 de cajueiro anão-precoce analisados, onde a sigla S2 significa sequeiro segunda coleta e I2 irrigado segunda coleta.....	50

Figura 12 – Padrões de fragmentação da Procianidina tipo B.....	57
Figura 13 – Principais fragmentações de procianidina do tipo B em modo negativo [M-H] ⁻ : (A) Fragmentação quinona metideo, (B) fissão heterocíclica do anel e (C) Retro Diels Alder.....	58
Figura 14 – Gráfico de scores (A) e loadings (B) para os extratos das folhas de Anacardium Occidentale L analisados por UPLC-QTOF-MSE.	65
Figura 15 – Gráfico de scores OPLS-DA para os extratos de folhas da Anacardium Occidentale L. do clone CCP76: (A) CCP76_S1 x CCP76_I1; (B) CCP76_S1 X CCP76_S2; (C) CCP76_S1 x CCP76_I2.....	68
Figura 16 – Análise de S-Plot e gráficos de barras das duas variáveis de clone: (A) CCP76_S1 x CCP76_I1; (B) CCP76_S1 x CCP76_S2; (C) CCP76_S1 x CCP76_I2.....	70
Figura 17 – Análise de S-Plot e gráficos de barras das duas variáveis de clone: (A) CCP76_S1 x BRS226_S1; (B) CCP76_S1 x BRS226_I1; (C) CCP76_S1 x BRS226_S2; (A') CCP76_S1 x BRS226_I2.; (B') BRS226_S1 x BRS226_S1 e (C') BRS226_S1 x BRS226_I2.....	76
Figura 18 – Compostos identificados por RMN ¹ H.....	80
Figura 19 – a) Sistema de coordenadas de escores LV1 × LV2 a partir da avaliação da sazonalidade e dos efeitos do estresse hídrico na variabilidade química das folhas de cajueiro dos genótipos CCP76; b) plotagem de influência da modelagem das amostras pelos resíduos T2 × Q de Hotelling; c) respectivos carregamentos plotados em linhas com os compostos relevantes para a discriminação de amostras obtida por análise VIP.....	82
Figura 20 – a) Sistema de coordenadas de escores LV1 × LV2 a partir da avaliação da sazonalidade e dos efeitos do estresse hídrico na variabilidade química das folhas de cajueiro dos genótipos BRS226; b) plotagem de influência da modelagem das amostras pelos resíduos T2 × Q de Hotelling; c) respectivos carregamentos plotados em linhas com os compostos relevantes para a discriminação de amostras obtida por análise VIP.....	84

Figura 21 – Quantificações das principais variáveis latentes observadas na RMN ¹ H, em mg/mL.....	85
Figura 22 – Quantificações das enzimas APX e SOD, respectivamente. Valores contidos em log10 para melhor visualização das diferenças. Teste de Tukey a 5 % de probabilidade.....	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Produção nacional de castanha de caju no Brasil, por região e importância no período de 2016 a 2020 em toneladas.....	18
Tabela 2	– Variedade de metabólitos encontrados em <i>Anacardium occidentale L.</i> ao redor do mundo.....	24
Tabela 3	– Perfil de metabólitos anotados em folhas de <i>Anacardium occidentale L</i> obtido via UPLC-QTOF-MSE.....	51
Tabela 4	– Compostos discriminantes da comparação dos clones CCP76_S1 e CCP76_I1.....	71
Tabela 5	– Compostos discriminantes da comparação dos clones CCP76_S1 e CCP76_S2.....	71
Tabela 6	– Compostos discriminantes da comparação dos clones CCP76_S1 e CCP76_S2.....	72
Tabela 7	– Compostos discriminantes da comparação dos clones CCP76_S1 x BRS226_S1.....	75
Tabela 8	– Compostos discriminantes da comparação dos clones CCP76_S1 x BRS226_I1.....	75
Tabela 9	– Compostos discriminantes da comparação dos clones CCP76_S1 x BRS226_S2.....	75
Tabela 10	– Compostos discriminantes da comparação dos clones CCP76_S1 x BRS226_I2.....	76
Tabela 11	– Compostos discriminantes da comparação dos clones BRS226_S1 x BRS226_I1.....	76
Tabela 12	– Compostos discriminantes da comparação dos clones BRS226_S2 x BRS226_I2.....	76
Tabela 13	– Estruturas dos compostos orgânicos identificados destacando deslocamento químico de RMN 1H e 13C nos clones de <i>Anacardium occidentale L.</i>	77

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1	Cajueiro.....	15
2.2	Aspectos Econômicos.....	17
2.3	Metabolômica.....	19
2.3.1	<i>Metabolismo Celular</i>	22
2.4	Estresse hídrico.....	25
2.4.1	<i>Estresse oxidativo</i>	26
2.4.2	<i>Fenólicos e estresse hídrico</i>	30
2.5	Métodos Analíticos.....	33
2.5.1	<i>UPLC-ESI-QTOF-MS^E</i>	33
2.5.2	<i>Ressonância Magnética Nuclear (RMN)</i>	35
2.5.3	<i>Quimiometria</i>	36
3	OBJETIVOS.....	39
3.1	Objetivo Geral.....	39
3.2	Objetivos Específicos.....	39
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
4.1	Metodologia de preparo para obtenção de amostras do solo.....	40
4.2	Coleta e preparo das amostras.....	41
4.3	Metodologia de extração.....	41
4.4	Condições de análise aplicadas ao sistema UPLC-QTOF-MS ^E	42
4.5	Metodologia utilizada no tratamento quimiométricos dos dados.....	43
4.6	Preparação de amostras e espectroscopia de RMN.....	43
4.7	Análise de classificação multivariada do conjunto de dados de RMN 1H....	44
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
5.1	Percentual relativo de água no solo nos períodos de seca e chuva.....	45
5.2	Perfil químico das micromoléculas via UPLC-QTOF-MSE dos extratos de folhas da <i>Anacardium Occidentale L</i> (Clones BRS226 e CCP76).....	47
5.3	Tratamento Quimiométrico.....	61
5.3.1	<i>Análises dos componentes principais (PCA) dos clones de cajueiro anão BRS226 e CCP76 sob diferentes níveis de estresse hídrico</i>	61

5.3.2	<i>Biomarcadores de tolerância à seca.....</i>	66
5.3.3	<i>Análise em OPLS-DA dos clones de cajueiro anão BRS226 e CCP76 sob diferentes níveis de estresse hídrico.....</i>	66
5.4	Análise estatística multivariada do conjunto de dados de RMN ¹H.....	77
5.5	Quantificação das enzimas antioxidantes APX, SOD, G-POD e CAT.....	85
6	CONCLUSÃO.....	88
	REFERÊNCIAS.....	89
	APÊNDICE A – RESULTADOS DOS TESTES DE ANOVA NOS DADOS DE ENZIMAS DE DEFESA.....	97

1 INTRODUÇÃO

As plantas são expostas a vários fatores bióticos e abióticos durante o seu desenvolvimento. Diversas das tensões ambientais observadas por esses indivíduos alteram em algum nível a sua produtividade. A sazonalidade e escassez de chuvas compromete em grande nível a fixação e duração de vida das plantas, visto que a água faz parte de 80-95% da biomassa fresca das plantas desempenhando papel crucial nos processos fisiológicos, de crescimento e metabolismo. Dentro do tema, é comum a notabilidade e importância dos impactos as lavouras causadas pelo estresse hídrico, particularmente em regiões onde o regime de chuvas não é regular. Afetar a produtividade não implica somente na diminuição da produção, mas também no aumento da insegurança alimentar mundial (SELEIMAN et al., 2021).

Apesar do déficit hídrico afetar diferentes aspectos comuns dos indivíduos, a tolerância a esse fator abiótico pode levar a vitória evolutiva desses vegetais. As plantas tolerantes, portanto, são capazes de resistir a condições mais adversas reduzindo a utilização de recursos obtidos ou modificando redes de nível molecular de transdução de pico, a fim de repassar o impacto externo para outros órgãos ou partes do vegetal. São exemplos dessas modificações a regulação estomática das plantas, com a direta atuação dos hormônios vegetais, as ações das enzimas de defesa e o papel importantíssimo do metabolismo de fenólicos (CANUTO et al., 2018).

Visando entender o funcionamento de modo mais completa das alterações biológicas causadas pelo meio externo nos indivíduos, papel importante comandado pelas ciências ômicas. As ciências ômicas buscar entender como o funcionamento celular atua nas modificações das alterações biológicas, aparecendo com a proposta de reunião e cruzamento de dados de diversas ciências, a saber: genômica (alterações dos genes), a transcriptômica (alteração da transcrição), proteômica (alteração da síntese ou das proteínas) e metabolômica (alterações do perfil metabólico). Esta última vem crescendo muito nas últimas décadas, uma vez que estudar o metaboloma, se comparado as outras ciências ômicas, é bem mais acessível, e traz respostas tão eficientes quanto as demais (GUO et al., 2018; RINSCHEN et al., 2019).

As ciências ômicas utilizam de duas grandes suportes para entendimento da problemática gerada: formas de obtenção de dados (extração, separação, identificação) e métodos estatísticos de análises de dados (quimiometria). Ferramentas como ressonância magnética nuclear, a cromatografia gasosa e em especial, quando acoplada a espectrometria de massas são as mais utilizadas atualmente, sendo capazes de fornecer grandes quantidades de

dados de metabólitos com grande sensibilidade, robustez e seletividade, além de fácil operação de seus equipamentos (HORGAN; KENNY, 2011). O presente trabalho teve por objetivo, identificar os principais motivos, do ponto de vista metabólico, que levam a clones de cajueiro anão a apresentarem diferentes estados adaptativos quando submetidos a estresse hídrico, uma vez que o entendimento da forma que o metabolismo geral dos desses indivíduos se comporta pode ajudar na construção de bancos de dados para um futuro melhoramento genético por cruzamento de clones.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cajueiro

O *Anacardium occidentale L.*, também conhecido como cajueiro tem sua origem associada as regiões tropicais da América do Sul. No Brasil, está presente em quase todo o território brasileiro, sendo abundante no litoral nordestino, principalmente nos estados de Piauí, Ceará e Rio Grande do Norte. Essa adaptação a climas bastante agressivos vem despertando interesse de estudiosos acerca dos fatores que tornam essa cultura tão expansiva, mesmo em épocas de grandes estiagens. (ALMEIDA; et al., 2017).

Apesar de nativa das regiões tropicais sul-americanas e sua origem associada a região central do Brasil, teve sua cultura difundida pelos portugueses e espanhóis na descoberta do Novo Mundo. A contribuição da cultura do cajueiro para as regiões nas quais foram inseridas é bastante diversificada. Na África e Ásia, a importância do fruto e pêndulo perduram a mais de três séculos, e tiveram seu apogeu por volta dos anos 2000 com o crescimento da demanda pela castanha de caju (NAIR, 2010).

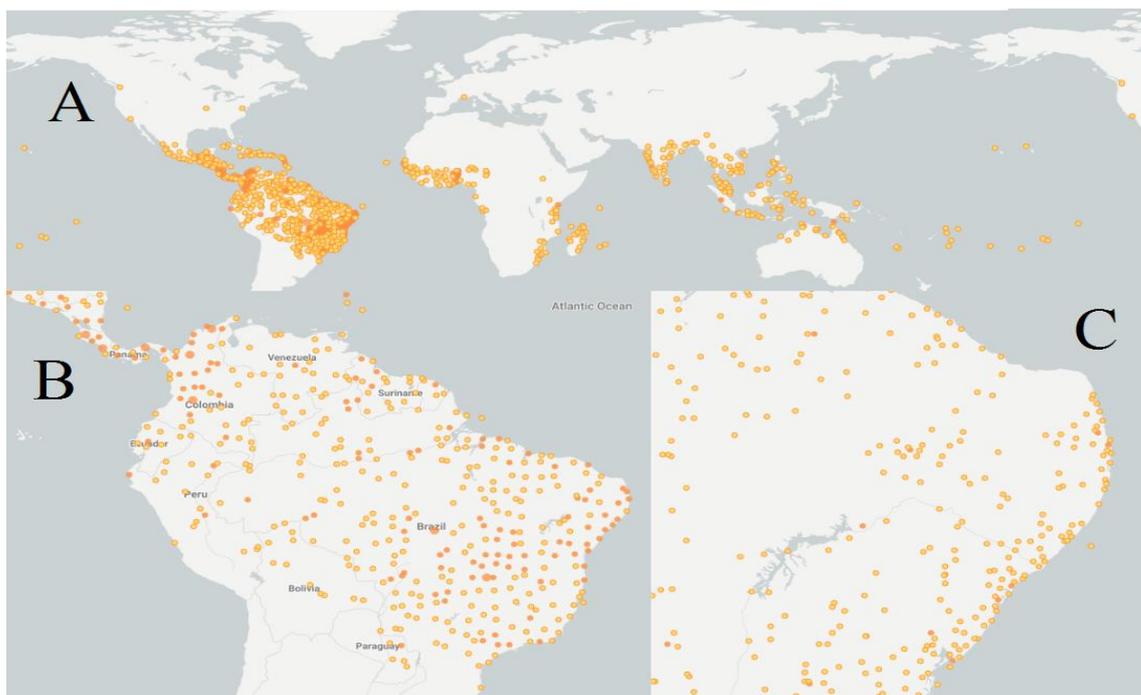
O cajueiro (*Anacardium occidentale L.*), pertence ao gênero *Anacardium* e à família Anacardiaceae é a mais cultivada de seu gênero. A denominação *occidentale* é botânica para distinguir a forma cultivada, do cajueiro silvestre denominado *Anacardium excelsum*. (ALEXANDRE; DE; MOTTA, 2013). A palavra "Anacardium" é de grego origem e significa coração invertido em alusão à forma do fruto. A *Anacardium occidentale* é cultivada em todo o mundo, tendo dois centros de diversidade: Amazônia e planalto brasileiro. Não é nativa do oeste da América do Sul, todavia exemplares do gênero cultivável podem ser encontradas nos Andes, excetuando-se Venezuela, Colômbia e Equador onde *Anacardium excelsum* é predominante (NAIR, 2021).

O cajueiro é considerado a espécie mais importante do seu gênero sendo, atualmente, o único cultivado em escala comercial no mundo. A família das Anacardiaceae é

considerada grande e formada 74 gêneros e mais de 600 espécies. Pertence a ordem a das *Sapindales* representada por famílias, a saber: *Anacardiaceae*, *Spondiaceae*, *Semecarpeae*, *Rhoaceae*, e *Dobineae*; sendo responsável por cerca de 40% das espécies do grupo. A tribo *Anacardiaceae* é constituída por oito gêneros: *Androtium*, *Buchanania*, *Bouea*, *Gluta*, *Swintonia*, *Mangifera*, *Fegimanra* e *Anacardium* (NAIR, 2021; OLIVEIRA et al., 2020).

São catalogadas pelo menos 21 espécies do gênero *Anacardium* L, a saber: *Anacardium amapaense* J.D.Mitch, *A. brasiliense* Barb.Rodr, *A. caracoli* Mutis, *A. caracoli* Mutis ex Alba, *A. corymbosum* Barb.Rodr, *A. cuneifolium* Buch.-Ham, *A. curatellifolium* A.St.-Hil, *A. encardium* Noronha 1790, *A. excelsum* (Bertero & Balb.) Skeels, *A. fruticosum* J.D.Mitch. & S.A.Mori, *A. germanicum*, *A. giganteum* Hancock ex Engl. *A. giganteum* J.Hancock, 1832, *A. humile* A.St.-Hil, *A. microsepalum* Loes, *A. nanum* A.St.-Hil, *A. occidentale* L, *A. parvifolium* Ducke, *A. peruvianum* Berry, 1924, *A. semecarpus* Buch.-Ham e *A. spruceanum* Benth. ex Engl, distribuídas em todo o mundo (Ver Figura 1). Todas as espécies do gênero *Anacardium* podem ser encontradas na américa do sul. No Brasil, por exemplo, podem ser encontradas, exceto: *A. coracoli*, *A. encardium*, *A. excelsum* e *A. rhinocarpu*. Sendo o tipo de maior expoente a *A. occidentale* L. (GLOBAL BIODIVERSITY INFORMATION FACILITY, 2019).

Figura 1 – Distribuição taxonômicas das ocorrências de *Anacardium* L catalogadas até 2019 (a) no mundo; (b) no Brasil e (c) no nordeste.



Fonte: Adaptado de (GLOBAL BIODIVERSITY INFORMATION FACILITY, 2019)

A. occidentale L. pode ser diferenciada a partir de diversas características, que podem ir da visualização dos frutos ao tamanho de suas árvores. São catalogados em regiões amazônicas exemplares que chegam a medir 40 metros de altura (*A. giganteum*) com pseudofrutos carnosos, porém pouco desenvolvidos a formas arbóreas não superior a 4 m (*A. othoniaum*). Atualmente, os exemplares mais cultivados são de pequeno a médio porte, também conhecido como cajueiro comum pertencente (*A. occidentale* Linn.) e tem sua monocultura difundida graças as suas condições biológicas mais favoráveis. (OLIVEIRA et al., 2020).

Seus frutos são apreciados e, economicamente, sua floração é de cerca de 1 ano e meio, quando comparada a 5 anos dos cajueiros de grande porte da Amazônia, torna a colheita mais rápida. Os grandes estudos e cruzamentos de espécies nativas ao redor do mundo tem proporcionado indivíduos cada vez mais produtivos, mesmo em períodos de seca (ANURUDH, 2018). Devido a halofilia do cajueiro, as baixas temperaturas afetam a floração e frutificação do caju, o que explica sua grande participação na caatinga brasileira. Apesar da rusticidade e fácil adaptação à seca, para produção em massa, o cajueiro não dispensa o uso de insumos agrícolas para se manter competitivo no mercado (OLIVEIRA et al., 2020b).

As flores são pequenas e pálidas, as quais possuem coloração que vão de vermelhas à púrpura, podendo estar presentes na planta de duas formas: estaminadas e hermafroditas. O fruto, também conhecido como castanha, é duro e cartilaginoso. Do fruto se obtêm dois principais produtos de industrialização: a amêndoa, rica em fibras, sais minerais, aminoácidos e proteína; e o líquido da castanha-de-caju, destinado a resinas, revestimentos, isolamentos térmicos, vernizes, pesticidas, fungicidas e inseticidas. São também destaques da castanha de caju a presença de diversos óleos de altíssima qualidade, como o ácido oleico e ácido linoleico, anarcadol e epicatequina. (BORGES, 2021; DENDENA; CORSI, 2014).

2.2 Aspectos Econômicos

A cajucultura possui enorme importância socioeconômica devido a sua ligação está associada a pequenos produtores rurais (ALMEIDA; et al., 2017). O principal produto comercializado é a castanha de caju, pois dela são retirados a amêndoa da castanha-de-caju (ACC) e o líquido da casca da castanha (LCC). O primeiro é bastante utilizado na indústria têxtil para a produção de tintas e vernizes, quanto o LCC tem comércio mais amplo, podendo ser destinado para a produção de lubrificantes e aditivos. O pedúnculo é muitas vezes atribuído

como fator preponderante para a queda do valor de produção, no entanto apresenta-se com valor agregado a indústria de produção de polpa, sucos, doces e para alimentação animal (AUGUSTO et al., 2016; VIDAL, 2017).

No Brasil a cultura do caju ocupa destaque econômico, em geral, associada tanto a produção da castanha como para consumo *in natura* em sucos e poupa. Em regiões como no Nordeste, o Cajueiro chegou a ocupar 26% da área de fruticultura e foi responsável por mais de 99% da produção nacional em 2020 (Ver Tabela 1). O Ceará o destacou-se com 57% da produção total com, aproximadamente, 271 mil hectares colhidos no mesmo ano. Apesar disso, o Ceará foi um dos estados que mais perdeu em área plantada nos últimos anos, mantendo sua produção alta graças a implementação de cajueiros anão precoce (IBGE, 2020).

Tabela 1 – Produção nacional de castanha de caju no Brasil, por região e importância no período de 2016 a 2020 em toneladas.

REGIÃO/ESTADO	PERÍODO (Anos)				
	2016	2017	2018	2019	2020
Norte	1453	1466	1826	731	766
Nordeste	73.019	132.049	139.495	138.572	129.777
Piauí	11.189	17.100	24.885	21.631	24.714
Ceará	30.898	81.098	83.036	87.711	74.284
Rio Grande do Norte	18.189	20.670	17.986	16.859	17.211
Pernambuco	2.906	2.491	4.018	4.111	4.037
Centro Oeste	96	93	97	80	87
Brasil	74.568	133.608	141.418	139.393	130.130

Fonte: IBGE, 2020 (Adaptado)

Apesar da queda associada aos últimos anos, a produtividade em kg/ha de castanha de caju aumentou 212% de 2012 a 2018. No Ceará, por exemplo, essa cultura teve crescimento de 217% perdendo apenas para o Piauí, com estratosféricos, 511%. Muito desse crescimento é acompanhado com a redução da utilização do cajueiro comum, cuja produtividade no Ceará em 2018 foi de 40 mil toneladas para 183 mil hectares de plantio. Valor superado por menos da metade da área plantada de cajueiro anão-precoce (CONAB, 2019).

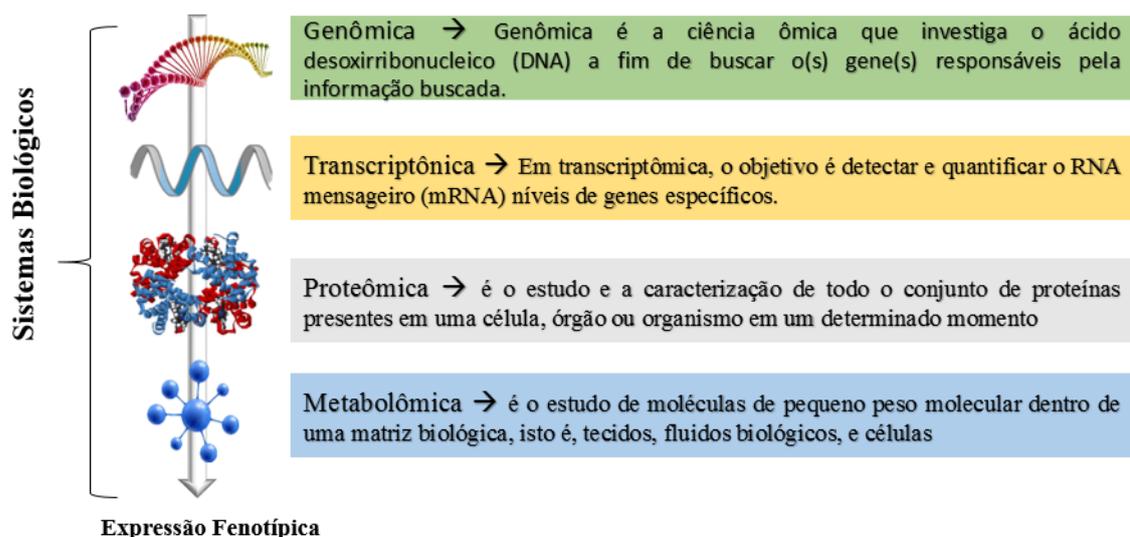
Representando uma indústria de mais de 30 derivados, a cajucultura apresenta-se com potencial para crescimento no mercado mundial e brasileiro. No entanto é importante ressaltar que por estar localizada em regiões tropicais e semiáridas, a cultura do caju acaba sofrendo decréscimos na produção devido aos regimes de chuvas. Além desse fato doenças como a antracnose e o mofo-preto são responsáveis por grandes perdas de quantidade e qualidade dos produtos advindo do cajueiro (ALMEIDA; et al., 2017; VIDAL, 2017). Frente a todos esses fatores, a busca de um maior equilíbrio econômico e produtividade por área

plantada, viabiliza o grande número de pesquisas para melhoramento genético das espécies de cajueiro, o qual se iniciou-se em 1956, no Brasil, precisamente no Campo Experimental de Pacajus – Ceará (PAIVA, 2004).

2.3 Metabolômica

As ciências ômicas adotam uma visão holística de que as interações e integração das moléculas presentes em uma amostra biológica devem ser responsáveis pela expressão de fenótipos observados. As ciências ômicas (Figura 2) são caracterizadas por seu estudo continuado ou em cascata e tem por base a identificação de genes (genômica), mRNA (transcriptômica), proteínas (proteômica) e metabólitos (metabolômica) e suas complexas interações dentro do sistema biológico (RINSCHEN et al., 2019). Essas estratégias de combinações da cascata ômica constroem inúmeras hipóteses e geram as mais diversas aplicações, por exemplo: o entendimento dos processos de resposta fisiológica causada por fatores abióticos e suscetibilidade a doenças (HORGAN; KENNY, 2011). Atualmente, as ciências ômicas impactam socialmente graças aos resultados obtidos em áreas como na medicina, farmácia, química (BEDIA, 2018).

Figura 2 – Representação da cascata ômica



Fonte: Adaptado (RAZZAQ et al., 2019)

A metabolômica é diretamente ligada as modificações do genômica, transcriptômica e proteômica das células, sendo assim o estudo do perfil metabólito de um organismo pode levar a compreensão do comportamento associado a perturbações externas, através do seu

metaboloma. Alterações nas composições dos metabólitos podem acarretar diferenças nos usos de nutrientes e conseqüentemente na composição elementar das plantas, de espécies em comunidades e funções de ecossistemas (KIM; HEYMAN, 2018). As investigações sobre o perfil metabólico são abrangentes por sua enorme complexidade e dinamicidade, variando de acordo com tempo, espaço e variabilidade ecológica (ORAVEC et al., 2015).

O perfil metabolômico pode ser entendido como conjunto de sinais obtidos em espectros ou sinais cromatográficos oriundos de extratos de vegetais, animais e microrganismos. Tida como uma ferramenta poderosa para estudar os fenótipos, influências do ambiente ou mudanças na expressão do gene, ajuda a entender e compreender como o organismo interage com o meio e por ele é modificado (BINO et al., 2004; PEREIRA; CARDOSO, 2012). Esse conjunto de sinais constitui o que se intitula de metaboloma, os quais são interpretados e muitas vezes comparados com perfis controle, para obtenção de dados que possam sinalizar os pontos de mudança de rota sintética ou achar biomarcadores para doenças (FUNARI et al., 2013).

Metaboloma é a denominação dada ao conjunto de todos os metabólitos produzidas por um organismo (perfil metabólico). A metabolômica é utilizada como uma “leitura” das transformações internas do indivíduo e as relações entre a genética e a expressão fenotípica. Muitas dessas moléculas presentes nos extratos retirados dos organismos, contém informações e propriedades químicas importantes, sendo utilizados para tratar as enfermidades humanas. São definidas que pelo menos 60% dos medicamentos utilizados atualmente são advindos diretamente das plantas ou baseados em moléculas obtidas em extratos vegetais (FANG; FERNIE; LUO, 2019).

Existem abordagens que buscam simplificar os dados obtidos nos estudos metabolômicos. Faz-se necessário, primeiramente, pontuar que tipos de dados devem ser retirados do material que se tem disponível, visto que uma série de metabólitos podem ser obtidos nas análises. Quando se faz necessário uma precisa quantificação de um ou pequeno grupo de moléculas de um perfil metabólico, utiliza-se a abordagem alvo (do inglês “*targeted*”). Se essa discriminação não é necessária ou o interesse é obter a maior quantidade de informações do perfil químico do indivíduo, utiliza-se a abordagem não-alvo (do inglês “*untargeted*”) (KRASTANOV, 2010).

As análises metabolômicas são de grande auxílio no entendimento do estresse abiótico em plantas, uma vez que essa metodologia consegue unir a grande quantidade de dados gerados para entender como os sistemas biológicos respondem às alterações genéticas e do

meio. As análises metabolômicas variam dependendo do foco adotado, mas tem como principal objetivo visualizar as digitais metabólicas e construir possíveis caminhos seguidos pelo organismo para sua adaptação, ou seu fracasso. São algumas metodologias utilizadas: espectrometria de massas, cromatografia líquida com transformada de Fourier e ressonância magnética nuclear (GUO et al., 2018).

Para que todos esses resultados sejam confiáveis, as ciências ômicas seguem critérios rigorosos sobre como suceder na geração dos dados a serem estudados. Após gerada a ideia do que se deseja, faz necessário buscar de maneira ampla as melhores formas de preparar o material de estudo, já que o material deve representar a população de indivíduos e gerar uma resposta mais global possível. A amostragem é, especialmente, pontuada nas análises metabolômicas devido às elevadas quantidades de erros que podem influenciar no resultado final. Utilizando-se as folhas e os raios solares como fatores de amostragem, para obter uma visão geral do metabolismo celular a amostragem deve ser feita de maneira que sejam colhidas folhas de toda copa da árvore, uma vez que dependendo da hora do dia os raios solares atingem essas folhas de maneiras diferentes, influenciando taxas de fotossíntese distintas. Fora a amostragem, abordagem metabolômica escolhida, definição das técnicas de análise e tratamento de dados, tipos de extratos, forma de extração e parte do indivíduo que irá ser utilizada no trabalho são essenciais para minimizar o erro experimental e assegurar ótimos procedimentos de obtenção dos sinais que serão formulados (PILON et al., 2020). O fluxograma completo está presente na Figura 3.

Figura 3 – Fluxograma básico para obtenção, tratamento e direcionamento dos dados gerados pelos estudos metabolômicos.



Fonte: Adaptado de (KRASTANOV, 2010)

2.3.1 Metabolismo celular

A adaptação é um dos preceitos para a longevidade de uma espécie. Diferentes pressões bióticas e abióticas impulsionam as modificações em indivíduos, que culminam ou não na sua fixação em determinado local. Como já descrito, essas modificações podem vir desde o DNA, o que condiciona a alteração de toda a cadeia de produção do metabolismo vegetal. Quando buscamos entender o metabolismo celular, as participações de diferentes compostos orgânicos e inorgânicos são discutidos a fim de entender como as contribuições dessas diferentes classes de compostos levam ao sucesso ou fracasso de um organismo (ZAYNAB et al., 2019).

Os metabólitos são classificados de duas formas a partir da sua participação nas rotas metabólicas: (1) metabólitos primários, como as proteínas, lipídios e açúcares, são comuns a todos os organismos e responsáveis pela síntese de componentes vitais e (2) secundários que abrangem toda a outra parcela de metabólitos que não são considerados primários. Apresentam-se com estrutura mais complexa e são responsáveis por realizar inúmeras funções no organismo, além de produzir compostos de adaptação do vegetal ao meio, o que o faz de bastante valia para os estudos de planta sob estresse abiótico (PEREIRA; CARDOSO, 2012).

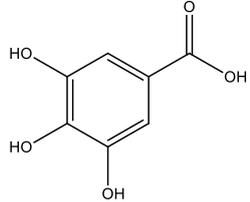
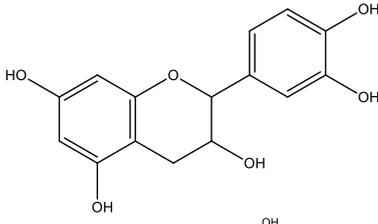
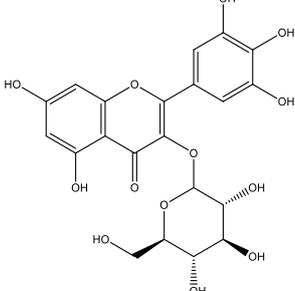
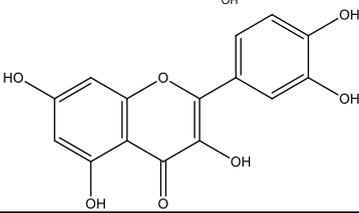
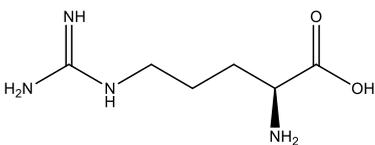
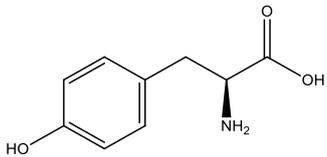
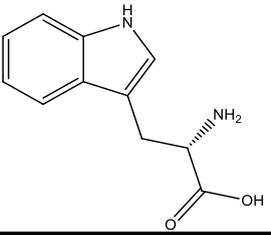
Os metabólitos primários são classificados como moléculas sinalizadoras, responsáveis por desencadear diversas respostas de defesa primária depois da identificação de alguma atividade abiótica ou patogênica. O metabolismo primário é necessário para o desenvolvimento e amadurecimento do vegetal, fornecendo energia e nutrientes necessários para o funcionamento do organismo (ZAYNAB et al., 2019). De maneira geral se acumulam nas células vegetais, porém a maioria dos metabólitos primários sinalizados são encontrados dentro de órgão e tecidos vegetais em determinadas fases do desenvolvimento ou no transcorrer de alguma atividade externa, como os efeitos abióticos. São classificados como metabólitos primários: carboidratos, lipídeos, sais minerais, vitaminas, aminoácidos, proteínas e ácidos nucleicos (FANG; FERNIE; LUO, 2019).

Os metabólitos secundários, diferentemente dos primários, englobam enorme variedades de compostos. Cada família, gênero e espécie possuem seu perfil de metabolismo secundário. Somado a isso, as condições do meio também são de fundamental importância na presença de maiores quantidade de determinadas classes de moléculas. Os metabólitos secundários são, por vezes, utilizados para promover a classificação taxonômica, medicinal e

aplicacional das plantas. Diferentemente dos primários que são compartilhados com todas as espécies, os compostos secundários são focados em necessidades especiais. É comum serem associados a processos adaptativos cruciais para a fixação da planta, como tolerância à seca, sendo criados por rotas metabólicas modificadas do metabolismo primário (FANG; FERNIE; LUO, 2019; KABERA et al., 2014).

Diversos compostos são descritos por toda a estrutura de *A. occidentale L.* As composições minerais de cálcio e fósforo são notáveis, tornando a amêndoa uma boa opção para tratamento e recuperação da composição óssea. Além disso, a presença do magnésio auxilia no melhoramento das funções nervosas e prevenindo a contração de músculos. (OLIVEIRA et al., 2020a). As folhas de caju e a casca são ricas em esteroides e flavanóides, fenóis, taninos e saponinas catalogados como poderosos estimulantes e antioxidantes. O pseudofruto, em tanino, ácidos orgânicos, proteínas e fibra, material bastante explorado para melhoramento de pastagem bovina. No pseudofruto é comum a presença de açúcares, carotenóides e vitaminas com percentuais que superam diversas outras variedades de frutas tropicais. Para se ter uma ideia, cada 100 g de caju possui 240 mg de vitamina C (5 vezes mais que o encontrado em laranjas), 3 mg de ferro. Diversos outros compostos importantes estão na Tabela 2, bem como a região nas quais ocorreram as catalogações (NAIR, 2021).

Tabela 2 - Variedade de metabólitos encontrados em *Anacardium occidentale L.* ao redor do mundo

Nomenclatura	Estrutura	Fórmula	Parte da planta
Compostos fenólicos			
ácido gálico		$C_7H_6O_5$	pedúnculo, bagaço
Catequina		$C_{15}H_{14}O_6$	casca, folha
miricetina-O-glicosídeo		$C_{21}H_{20}O_{13}$	folhas
Quercetina		$C_{15}H_{10}O_7$	fruto, flor e folha
Amino ácidos			
Arginina		$C_6H_{14}N_4O_2$	Castanha de caju, folhas
Tirosina		$C_9H_{11}NO_3$	Castanha de caju, folhas
Triptofano		$C_{11}H_{12}N_2O_2$	Castanha de caju, folhas

Fonte: Adaptado de (CHOUDHURY et al., 2017)

O cajueiro também é utilizado como planta medicinal, e suas propriedades amplamente divulgadas, a saber: tratamento de diabetes, ancilóstomo, leishmaniose, sífilis, higiene bucal, entre outras (BORGES, 2021). Além das aplicações anteriormente citadas, a atividade anti-inflamatória, antifúngica, antioxidante anti-hipertensiva e anti-hipoglicêmica tornam o cajueiro uma das plantas mais estudadas. Compostos fenólicos extraídos das folhas de cajueiro são identificados como responsáveis pela associação terapêutica do vegetal. São alguns dos mais citados os derivados de quercetina, quercetina-3-*O*-rhamnoside, miricetina, miricetina-3-*O*-rhamnoside e amentoflavonas (WEI et al., 2017).

2.4 Estresse hídrico

A água é um recurso natural cujo uso gera debates na comunidade científica. Sua disponibilidade em detrimento do aumento de habitantes terrestres e demanda por mais alimentos faz-se pensar sobre como a falta desse recurso deve afetar a vida de toda uma geração. Hoje mais de 70% de toda a água potável do planeta é voltada para o agronegócio, reiterando-se uma importantíssima fonte para a geração de alimentos (HUSSAIN et al., 2018). Atualmente, aumentar a variedade de espécies tolerantes a escassez hídrica, torna-se uma maneira viável de enfrentar a dependência à água. Estima-se que até 2050, 50% das plantas sofram com problemas de crescimento devido ao déficit de água (VURUKONDA et al., 2016). No entanto, o entendimento desses processos torna-se complexo quando são adicionados novos fatores abióticos ao meio que podem variar de clima e disponibilidade de água à composição, penetrabilidade e salinidade do solo (HUSSAIN et al., 2018).

Graças as modificações de temperatura global, os ecossistemas começam a enfrentar grandes variações de temperatura. Nem todas os indivíduos são adaptados a diferentes temperaturas, como já citado, o cajueiro possui ótima sensibilidade a baixas temperaturas. As culturas não adaptadas têm seu sistema fisiológico diretamente afetado, restringindo seu plantio a áreas cada vez menores. Pesquisas científicas afirmam que as modificações feitas a partir o grau de disponibilidade desse recurso já podem ser vislumbradas no cotidiano. As plantas continuam a desenvolver sistemas complexos com a finalidade de manter-se produtiva em períodos onde a captação de água é escassa. Estas adaptações são consequências de um fenômeno chamado de Estresse Hídrico (GONG et al., 2020).

Estresse hídrico é também conhecido como seca ou déficit de água, é um fenômeno gerado quando ocorre dificuldade de acesso a umidade necessária para que a planta conclua seu ciclo de vida (GUO et al., 2018). É considerado um efeito abiótico capaz de modificar diferentes

níveis de organização das plantas, como a fotossíntese, crescimento de caules, abertura e fechamento de estômatos, mecanismos de defesa, alteração dos hormônios vegetais, diminuição do turgor, aumento dos danos oxidativos. A seca também afeta o desenvolvimento das folhas, atividades enzimáticas e, como consequência final, redução da produção (NADEEM et al., 2019).

As respostas geradas pelas plantas submetidas são inúmeras e irão depender da duração e intensidade do déficit de água, bem como a espécie e o estágio de desenvolvimento na qual se encontra. De maneira geral a tolerância à seca pode ser categorizada de duas formas: tolerância, que diz respeito a manutenção dos processos totais mesmo com pequena disponibilidade de água devido a transformações em células fisiológicas e mecanismos bioquímicos, a saber: modificações nas rotas metabólicas no decorrer da fotossíntese, síntese da glicose e síntese hormonal.; e de prevenção, que está focada na capacidade da planta de armazenar água em seus tecidos por modificações morfológicas, como observado em cactos. (GUO et al., 2018; S. LISAR et al., 2012).

2.4.1 Estresse Oxidativo

A evolução, seja da fauna ou flora, está relacionada a como esses seres foram capazes de se adaptar as adversidades ao longo do tempo. A expansão da vida humana, as constantes variações naturais - quantidade de chuvas, salinidade e pH, por exemplo – são considerados fatores importantes quando se procura entender como determinadas plantas puderam sobreviver e prosperar (PANDEY et al., 2017). Assim como o estresse hídrico, o oxidativo faz parte dos parâmetros estudados quando se busca entender o comportamento da planta frente às modificações no meio. Um notável progresso foi feito no sentido da compreensão de como os mecanismos bioquímicos e moleculares sustentam as defesas. Hoje está bem estabelecido que as menores modificações bióticas ou abióticas elevam o estado oxidativo em algum grau, sendo a capacidade da planta em controlar essas variações um estado de tolerância (HE; HE; DING, 2018).

O oxigênio suporta a vida aeróbica concedendo aos organismos grandes benefícios energéticos, contrariamente, os desafia graças a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS). Dentre os mecanismos de ROS mais estudados destacam-se o oxigênio singlete (O_2), o ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o ânion hidroxila (OH^-) (MITTLER et al., 2011). É notório que o estado oxidativo nas células é um processo natural, comum e

regulado, desde que haja um equilíbrio entre os ROS e as moléculas antioxidantes os quais controlam a concentração de ROS intracelular (NADEEM et al., 2019).

As ROS são formas reduzidas ou ativas do oxigênio atmosférico. São consideradas comuns desde o aparecimento dos organismos fotossintetizantes, servindo de mecanismo de defesa a patógenos. O metabolismo das ROS é extremamente relevante para o entendimento da fisiologia vegetal, uma vez que se apresentam com características divergentes: em baixas concentrações agem como moléculas sinalizadoras relacionadas aos mecanismos de defesa do vegetal, em processos de germinação de sementes e crescimento foliar; em contrapartida se elevadas, causam danos como a morte de organelas celulares. Os ROS também são importantes na regulação das vias metabólicas, agindo inclusive no processo de transcrição de ABA nas células guarda (KAR, 2011; S. LISAR et al., 2012).

O controle de ROS em diferentes compartimentos celulares (acoplastes, cloroplastos, mitocôndrias, peroxissomos, citosol, vacúolos e núcleo) em busca da homeostase, podem ser usados para entender o estágio de estresse abiótico a qual o indivíduo está sendo submetido, em especial sua ligação com as proteínas. Dependendo do comportamento do estresse, os níveis medidos de ROS nesses ou em outros locais da célula podem determinar de que forma o estresse abiótico está afetando o indivíduo, uma vez que para manter a homeostase celular, os níveis de ROS são controlados a partir do equilíbrio entre sua produção e eliminação (CHOUDHURY et al., 2017).

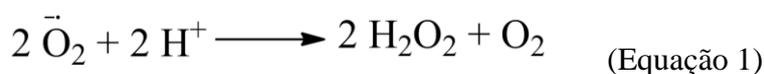
É necessário entender que cada subcompartimento celular possui sua própria barreira para níveis redox. Dependendo do radical formado, as estruturas intrínsecas das paredes celulares podem interagir com esses radicais e sofrer processos redox através dos grupos de ferro (Fe-S) de certas proteínas. Essas interações são específicas para cada compartimento celular, o que geraria um sinal característico de resposta. A sinalização dessas atividades visa controlar diretamente o estado redox das proteínas, visando o retorno ao estado normal de transcrição e tradução (CHOUDHURY et al., 2017). Além das proteínas, os ROS são capazes de danificar outras macromoléculas como lipídeos e açúcares.

O sistema antioxidativo é dividido em dois componentes: 1) enzimáticos que englobam diversas enzimas dentre as quais pode-se destacar superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX) e guaiacol peroxidase (GP) e 2) não enzimáticos, que são compostos químicos de diversas classes (ácidos, flavanóides, carotenóides e fenólicos) e atuam como substâncias tampão na eliminação dos ROS (PANDEY et al., 2017). No presente

trabalho, foram feitas medidas dos valores totais dos processos enzimáticos, sem distinção de compartilhamento celular.

2.4.1.1 Superóxido Dismutase (SOD)

É uma metaloenzima e linha de frente nas etapas de desintoxicação celular de todos os organismos anaeróbicos, uma vez que os radicais superóxido são produzidos nos processos de fotossíntese e respiração. Em razão de sua grande reatividade, os radicais de oxigênio precisam ser catalisados (Equação 1) (ALSCHER; ERTURK; HEATH, 2002).



A enzima superóxido dismutase (SOD) é considerada de papel crucial nos processos oxidativos, principalmente aos relacionados aos estresses bióticos e abióticos. As SODs podem ser divididas em três classes que variam de acordo com o metal a qual está associada, são elas: (1) manganeses (Mn-SODs), (2) Ferrosas (Fe-SOD) e (3) Cobre/Zinco (Cu/Zn-SOD). Podem ser encontradas em diversas organelas celulares como os cloroplastos, citosol, mitocôndria e peroxissomos e mesmo que pertencente de classes distintas, a atuação dos diferentes tipos de SODs é semelhante (ALSCHER; ERTURK; HEATH, 2002). A existência de classes de SOD pode estar associado a evolução da célula eucariótica, pois como o radical de oxigênio tem carga negativa não pode atravessar a membrana plasmática ficando restrito interiormente nessas organelas (MITTLER et al., 2011).

2.4.1.2 Catalases (CATs)

Catalases são enzimas tetraméricas que possuem 4 grupos de ferriprotoporfirina por molécula, sendo encontradas em todos os seres e responsáveis pela conversão de H_2O_2 em H_2O e O_2 . A CATs é capaz de converter 6 milhões de moléculas de peróxido/min e devido as condições internas que levam a produção de peróxido, a citar: o catabolismo, oxidação de ácidos graxos e fotorrespiração; a CATs pode ser encontrada em organelas que possuem formas de acumular peróxido. A catalase também participa da oxidação de substâncias tóxicas a células que incluem fenóis, ácido fórmico, formaldeídos e álcool (LÜCK, 1965). Pesquisas confirmam que dependendo do estresse sofrido pelo organismo, a CAT pode se comportar de diversas

formas. Por exemplo, quando sob constante estresse luminoso plantas com deficiências de CAT apresentavam morte celular, ao passo que, plantas saudáveis respondiam bem ao estresse (GANGWAR et al., 2014).

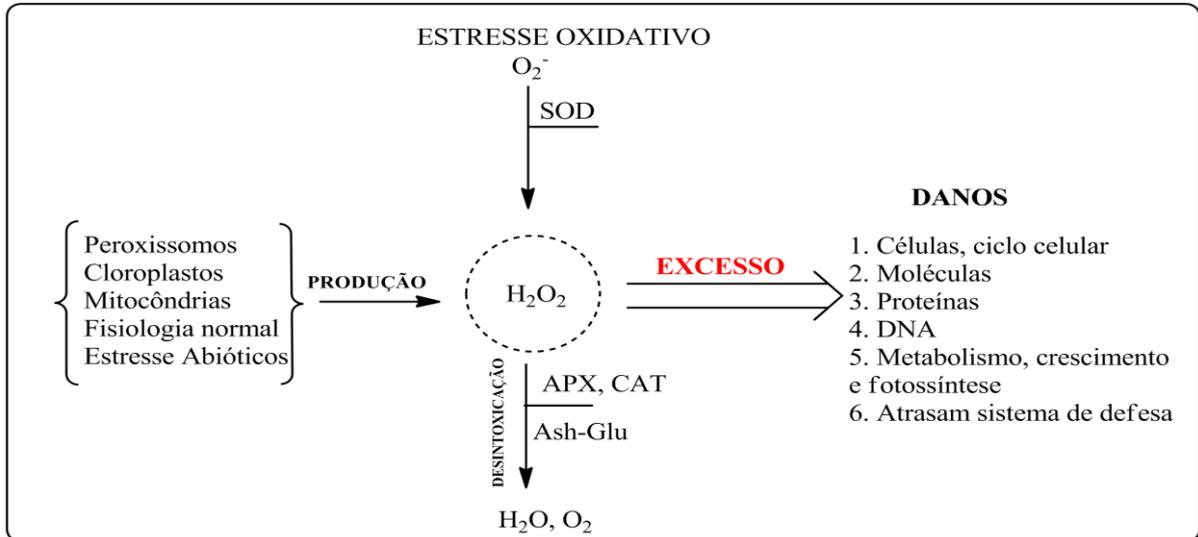
2.4.1.3 Ascorbato Peroxidase (APX)

As APXs pertencem a família de isoenzimas que contêm peroxidases que catalisam reações de oxidação dependente de H_2O_2 , sendo considerada indispensável para a proteção de organelas celulares como cloroplastos. Os ascorbato peroxidases estão presentes em grande parte das plantas e algas avançadas, sendo importante na regulação do crescimento vegetal e no controle dos ROS (AFZAL et al., 2014). As APXs possuem muita afinidade com os peróxidos sendo assim, comparadas a catalase, possuem maior importância na desintoxicação celular (INZÉ; MONTAGU, 1995).

Assim como observado na SOD, as APXs podem ser encontradas em diferentes compartimentos celulares, a citar: citosólico (cAPX), de membrana tilacóide (tAPX), microcorpo (mAPX) e aos cloroplastos (sAPX). Devido à grande variabilidade de plantas superiores, também podem ser observadas diferentes genes para APX. Em *Arabidopsis* (**italico**) são relatadas até 9 genes de APX e *Oryza sativa* 8 isoenzimas do tipo APX, divididas entre cloroplastos, citosol, peroxissomos e mitocôndrias. Importante citar que a eliminação de radicais oxidativos não é restrito a CAT, SOD e APX (GANGWAR et al., 2014).

As enzimas supracitadas apresentam correlação direta e primária com as etapas de desintoxicação celular sob estresse abiótico, participando de uma cadeia ainda maior de transformações como o ciclo de AsA-GSH (Ascorbato-Glutadiona). O ascorbato e glutadiona são dois antioxidantes não enzimáticos associados a respostas a déficit hídrico e salinidade, participando diretamente do controle e da manutenção da homeostase, manutenção da fotossíntese em condições adversas. Nesse ciclo a APX utiliza o ascorbato como doador de elétrons específico para catalisar a conversão de H_2O_2 , proveniente da reação com a SOD, em água nos cloroplastos (Figura 4) (PANDEY et al., 2017).

Figura 4 - Processo de desintoxicação do radical de oxigênio livre pelo sistema enzimático de defesa, suas fontes de origem e consequências do acúmulo de peróxido de hidrogênio nas células



Fonte: Adaptado de (PANDEY et al., 2017).

2.4.2 Fenólicos e Estresse Hídrico

É sabido que diversas adaptações foram responsáveis pelas modificações observadas nas plantas. Como o discorrido até o momento, a força motriz por trás dos fenótipos traz reorganizações internas capazes de elevar o indivíduo a um patamar superior ao anterior, levando-o ao sucesso adaptativo (GRIESSER et al., 2015). Dentre outros fatores associados a essas alterações, os metabólitos, em especial, os compostos fenólicos são descritos em tecidos e órgãos vegetais como principais compostos adaptativos das plantas quando acometidas por estresses abióticos. As plantas respondem a perturbações visando a homeostase, ou seja, as respostas tendem a amenizar os danos ao indivíduo. Os compostos fenólicos vegetais são metabólitos secundários variados e bastante abundantes (NAIKOO et al., 2019). Considerado um dos três maiores grupos de metabólitos secundários, os fenólicos foram divididos em cinco partes, a saber: flavonóides, ligninas, ácidos fenólicos, cumarinas e taninos (GRIESSER et al., 2015).

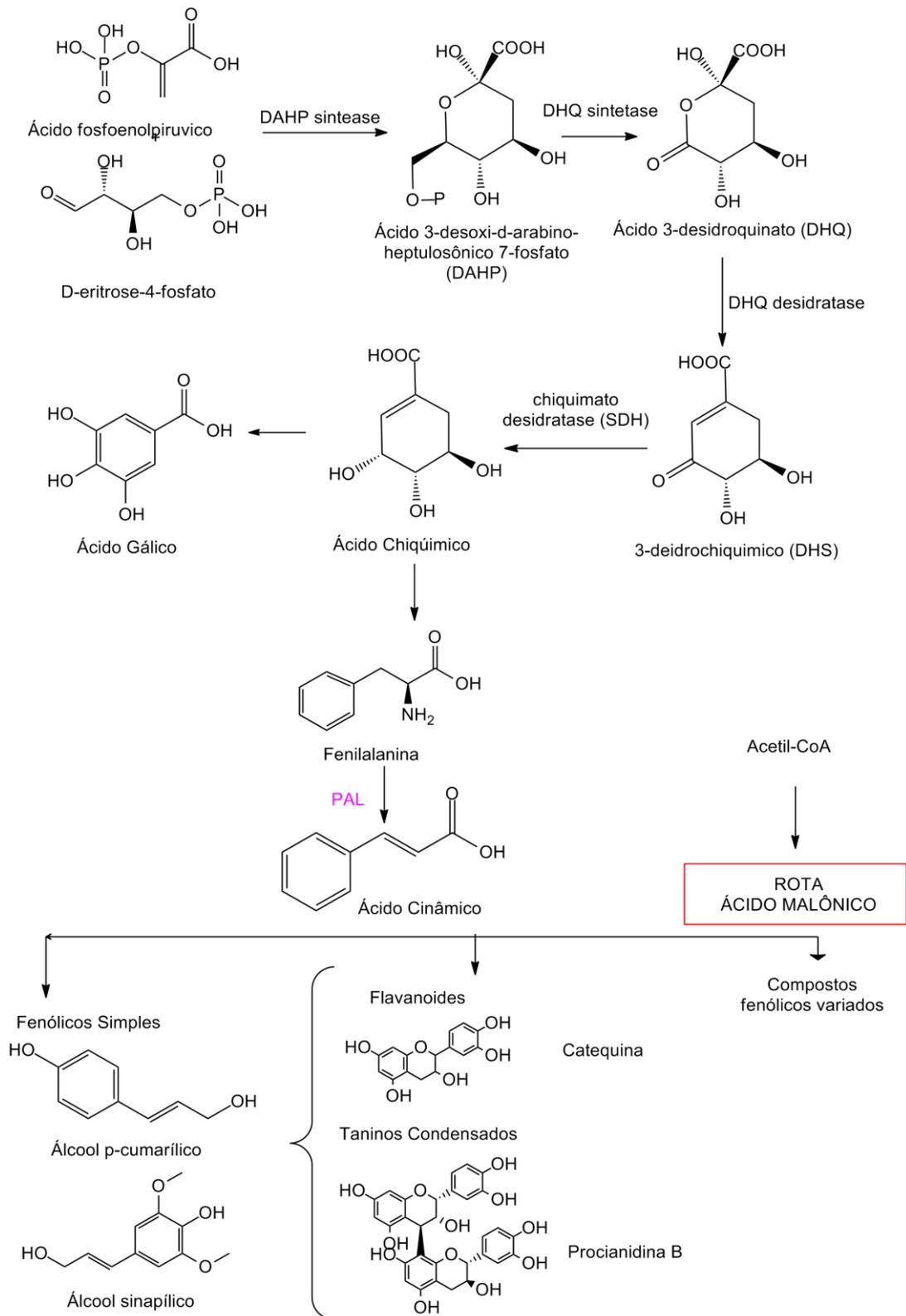
A biossíntese pode envolver as vias do ácido chiquímico e malônico, e suas modificações são influenciadas pelas interações com o meio. Os compostos fenólicos tem propriedades redox, uma vez que são capazes de catalisar reações de oxigenação, dificultando

a ação de algumas enzimas oxidantes. Além disso, são responsáveis por uma cadeia ainda maior que vai da absorção de nutrientes a síntese de proteínas (LONE; SHUAB; KAMILI, 2020).

A via do ácido chiquímico é comumente encontrado em plantas, fungos e bactérias. A via do chiquimato consiste em sete etapas de reação, começando com uma condensação do tipo aldol de ácido fosfoenolpirúvico (PEP) da via glicolítica e D-eritrose-4-fosfato, do ciclo de pentose fosfato, para produzir ácido 3-desoxi-d-arabino-heptulosônico 7-fosfato (DAHP). A conversão do DAHP em ácido 3-hidroquínico é dado pela formação da piranose, oxidação do C5, seguida de eliminação de fosfato, abertura da piranose, redução da C5, desestabilização do enol e consequente ciclização para gerar o ácido 3-deidroquínico. Essa reação é catalisada pela 3-deidroquinato sintetase. As duas últimas etapas são catalisadas por uma enzima que atua de duas diferentes formas. A deidroquinato desidratase (DHQs) / chiquimato desidratase (SDHs). Quando operando como DHQs causa uma hidrólise, convertendo o ácido DHQ em 3-desidrochiquímico (DHS). Quando grupo carbonila é reduzido pela ação da enzima chiquimato desidratase, forma-se o ácido chiquímico. A via é finalizada com a obtenção do ácido corísmico (Figura 5) (HAN; GOLEMAN, DANIEL; BOYATZIS, RICHARD; MCKEE, 2012)

Triptofano, tirosina e fenilalanina são apenas alguns dos compostos gerados a partir das modificações dos produtos da rota do ácido chiquímico, especificamente o ácido corísmico. A fenilalanina, por exemplo, servirá de base para maior subclasses de compostos aromáticos: os fenilpropanóides. Essa classe estará presente na produção de componentes de sustentação (ligninas) e diversos compostos fenólicos do metabolismo secundário (flavanóides e isoflavanóides). Outros compostos igualmente importantes são também produzidos a partir das vias derivadas do ácido chiquímico. (CUI et al., 2015). O ácido salicílico (SA) é um composto fenólico e sua síntese pode ocorrer de duas vias: o isochorismato (IC) e a via fenilalanina amônia-liase (PAL). O SA está associado ao crescimento e desenvolvimento das plantas, além de ser responsável pelas respostas a estresses abióticos (CRAMER et al., 2011). O SA também é associado as etapas de desintoxicação das plantas com a produção de superóxido dismutase e peroxidase, e juntamente com o ABA, regula as respostas as secas, participando da biossíntese de metabólitos secundários, como os álcoois sinapílico e cinamílico (FAHAD et al., 2015).

Figura 5 - Síntese do ácido chiquímico, seus principais produtos e derivados



Fonte: Adaptado (HAN; GOLEMAN, DANIEL; BOYATZIS, RICHARD; MCKEE, 2012)

2.5 Métodos Analíticos

2.5.1 UPLC-ESI-QTOF-MS^E

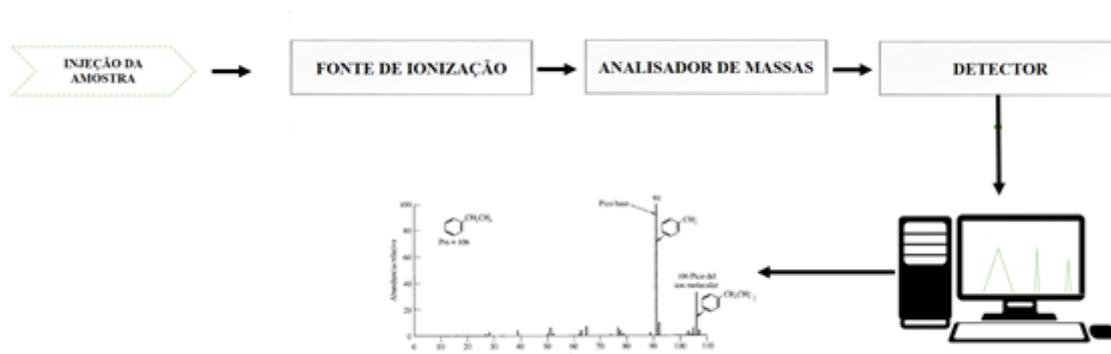
A cromatografia líquida é comumente usada como método laboratorial de separação dos compostos. São componentes básicos desse tipo de cromatografia: a coluna, na qual estará presente a fase estacionária; a fase móvel, que são solventes ou misturas de solventes; o detector e o analisador. De maneira geral, baseia-se nas afinidades químicas dos componentes da amostra com a fases estacionária e móvel do equipamento, em outras palavras, o tempo para que determinado composto saia da coluna e seja detectado e analisado está relacionado a quanto o mesmo fica retido na coluna (LANÇAS, 2009).

A cromatografia líquida de ultra pressão (UPLC – *Ultra Performance Liquid Chromatography*) e consolidou-se como uma técnica de análise poderosa nos últimos anos. O método se baseia na aplicação de uma alta pressão na coluna que diminui o tempo e interação do analito com a coluna, acarretando aumento da sensibilidade e a maior concentração destes na fonte de ionização. Esse procedimento leva a possibilidade de limites de detecção consideravelmente mais baixos se comparados a cromatografia líquida de alta performance. (TALEUZZAMAN et al., 2015).

As análises modernas de elucidação estrutural requerem muito mais comprovações experimentais. A utilização da técnica de cromatografia líquida, a qual faz uso do tempo de retenção para separar classes de compostos não seria suficiente para comprovar a presença de substâncias, já que compostos diferentes podem eluir a mesma taxa, fazendo-se necessário a junção com outras técnicas de análise como a espectrometria de massas (MS) (HARRIS, 2009).

A espectrometria de massas (MS – *Mass Spectrometry*) pode ser acoplado a sistemas de cromatografia. Destacando-se pela possibilidade de análises tanto qualitativas quanto quantitativas e de serem seletivos a compostos de interesse. Apesar de ser caracterizado como uma técnica destrutível, a espectrometria de massas é versátil e bastante abrangente, já que faz-se necessário apenas que a amostra a ser analisada seja ionizável (LANÇAS, 2009). A Figura 6, mostra o esquema básico de um espectrômetro de massas.

Figura 6 – Componentes de um espectrômetro de massas



Fonte: Autor (2021)

Nos estudos metabolômicos uma das fontes de ionização mais empregada é baseada na ionização por eletrospray (ESI) devido a fácil ionização de moléculas de média e alta polaridade. Após a chegada da amostra na fonte de ionização, a amostra líquida entra em um capilar juntamente com um fluxo de $N_{2(g)}$. A aplicação do potencial no capilar junto com o fluxo contínuo de gás forma uma nuvem de moléculas que em seguidas são nebulizadas sob aquecimento, gerando ao final íons carregados positivo $[M+H]^+$ ou negativamente $[M-H]^-$ que seguirão para o analisador (ALLWOOD; GOODACRE, 2010).

Dentre os mais utilizados entre os estudos metabolômicos, destacam-se: o quadrupolo e o analisador de vo. O quadrupolo é considerado o mais popular dentre os analisadores de massas graças ao seu custo benefício, respostas lineares durante as análises, fácil entendimento e combinação com outros analisadores. É formado por quatro (4) barras magnéticas dispostas em mantidos com cargas apostas (LANÇAS, 2009). Uma combinação de corrente contínua e radiofrequência é aplicado as barras tornando-as espécies de ímãs. Esses ímãs atraem então os íons, anteriormente gerados, a partir da sua polaridade e massa. A possibilidade de alteração da corrente e frequência aplicada faz com que o analisador quadrupolo possa agir como uma etapa seletiva (modo seletivo) ou de varredura – o qual são visualizados todos os íons gerados (ALLWOOD; GOODACRE, 2010).

A analisador tempo de voo (TOF - *Time of Flight*), da mesma forma que o quadrupolo, tem por base a separação dos íons. Nesse analisador, as partículas são isoladas, colocadas sob vácuo, aceleradas pela aplicação de potencial, adquirindo energia cinética igual a $\frac{1}{2}mv^2$. Íons de razão massa/carga (m/z) menor deslocam-se com maior velocidade que os íons

de m/z maior, organizando-os em ordem crescente de massa. A combinação dos analisadores quadrupolo – tempo de voo (Q-Tof) auxilia no aumento de sensibilidade, seletividade e na diminuição do tempo de análise sendo assim indispensável para uma análise quantitativa (TALEUZZAMAN et al., 2015).

2.5.2 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

O método se baseia na absorção de energia de radiofrequência (RF) por núcleos magnéticos postos em um campo B_0 , de determinada intensidade. Eles se alinham paralelamente ou antiparalelamente ao campo. A energia de cada núcleo é diretamente proporcional ao seu momento angular (μ) e à magnitude do campo magnético externo aplicado (B_0). O fenômeno RMN ocorre se um campo de RF é aplicado na direção perpendicular ao campo magnético externo B_0 a uma frequência que corresponda exatamente a frequência de Larmor (precessional), ocorrerá absorção e o núcleo irá “virar” sua orientação energética, e ao voltar ao estado normal, irá emitir. Essa emissão será medida (WONG, 2014).

Do ponto de vista de aplicação, o RMN é um método espectroscópico bastante importante e muitas vezes combinado com outras técnicas para elucidação estrutural. A RMN fornece informações dos núcleos magneticamente distintos presentes na molécula, sendo possível então a visualização geral da molécula no espectro. Além disso a evolução de técnicas de RMN 2D e 3D, faz com que a ressonância magnética tenha um campo muito mais amplo. Quando utilizado para catalogar metabólitos, a técnica pode obter resultados muito importantes, pois é capaz de captar, simultaneamente, sinais de diversas classes de compostos do metabolismo secundários (terpenos, flavanóides, alcalóides, entre outros) e primário (açúcares, ácidos orgânicos e aminoácidos) (KIM; CHOI; VERPOORTE, 2010).

No campo das ciências ômicas, especificamente a metabolômica, a ressonância magnética vem sendo considerada uma técnica clássica para a identificação e quantificação de metabólitos. Os sinais obtidos são diretamente relacionados a concentração molar das espécies no extrato, tornando possível a comparação direta das concentrações de todos os compostos obtidos, facilitando o estudo dos dados. Tendo em vista trabalhos laboratoriais, a técnica de RMN apresenta-se com fatores ímpares: caracteriza-se por não ser destrutiva, requer pouca ou nenhuma separação química e a preparação das amostras é relativamente simples. Quando

relacionada a metabólitos é particularmente associada a componentes pouco tratáveis para cromatografia líquida como açúcares, proteínas, aminoácidos e voláteis (WISHART, 2008).

2.5.3 Quimiometria

Os estudos metabolômicos, em alguns casos, são caracterizados pelo seu grande volume de dados obtidos e, dependendo de como a construção dos dados é feita, cresce também quantidade de valores, tabelas e variáveis. Portanto, as comparações visando a identificação de padrões numéricos tornam-se complicadas, podendo levar a conclusões errôneas acerca do que é observado. A quimiometria vem como a proposta de solucionar matematicamente e estatisticamente os agrupamentos dos dados obtidos, afim de direcionar o observador a respostas mais corretas e precisas (WIKLUND et al., 2008).

Nos estudos metabolômicos a quimiometria é comumente utilizada, principalmente, nos resultados que incluem a busca de biomarcadores, desenvolvimento de novas drogas e compreensão de perfis de metabólitos. Não possuindo definição muito abrangente, a quimiometria seria uma parte da química que busca compreender, investigar e descobrir moléculas de um sistema. Apesar dessa definição outros termos como análise multivariada vem sendo cada vez mais empregado, já que as referidas análises podem ser utilizadas nas mais diversas áreas (ERNST et al., 2014).

A quimiometria utiliza-se de análises multivariadas para o entendimento de padrões amostrais, e por meio desta, separá-las de acordo com as características observadas. As análises podem ser divididas em exploratórias (*untargeted*) e ou direcionadas (*targeted*). De maneira geral, as análises exploratórias são utilizadas quando não há conhecimento prévio ou caso se queira observar os padrões de separação/agrupamento entre as amostras. Por outra via, as análises direcionadas podem utilizar-se do resultado obtido no método *untargeted* ou mesmo do conhecimento prévio da amostra para determinar classes específicas de comparação. Destacando-se em geral os métodos análise de componentes principais (PCA), de regressão parcial por mínimos quadrados (PLS-DA) e discriminante ortogonal dos mínimos quadrados Parciais (OPLS-DA, do inglês *Orthogonal Projections to Latent Structures Discriminant Analysis*.) (TRYGG; WOLD, 2002) .

2.5.3.1 Análise de Componentes Principais (PCA)

A análise de componentes principais (PCA, do inglês *Principal Component Analysis*) é o método de classificação não supervisionado mais utilizado que visa extrair padrões presentes em uma complexa matriz dados, com mínima perda de informações (KHAKIMOV; GÜRDENIZ; ENGELSE, 2015). Os resultados derivados do PCA servem de amostragem para tendências esperadas nos dados, ou seja, estados de agrupamento em relação a proximidade de composição química, variação de tempo, plantio, área e etc. Por ser bastante sensível a artefatos e ruídos é usada como pré-tratamento para detecção de *outliers*. (WIKLUND et al., 2008).

O PCA baseia-se na projeção dos dados complexos e alta dimensionalidade em um sistema de coordenadas com menos dimensões, chamadas de componentes principais, com o intuito de avaliar o conteúdo global das informações. As componentes principais são combinações lineares das variáveis de origem que descrevem tanto a variação máxima de uma matriz de dados (PC1) como também a variância contida nesses dados (PC2). São calculadas em ordem decrescente de significância fazendo com que informações importantes das variáveis de origens sejam utilizadas para separar ortogonalmente os dados e discriminar relações (ALBERICE, 2014).

A representação gráfica é dada por gráficos de escores, os quais fornecem características das amostras e *loadings*, que é responsável pela separação das amostras. O PCA pode ser formulado segundo a Equação 2, que correlaciona a decomposição da matriz X de dados em componentes ortogonais entre si

$$X = TP + E, \quad (\text{Equação 2})$$

onde T é a matriz de pontuação máxima (observações referentes as amostras), P a matriz de cargas (observações das variáveis) e E são os resíduos estatísticos (KHAKIMOV; GÜRDENIZ; ENGELSE, 2015).

-

2.5.3.2 Mínimos Quadrados Parciais (PLS)

O PLS é uma das ferramentas de classificação mais poderosas e é normalmente a referência método em estudos supervisionados de classificação em adulteração e autenticidade de alimentos, rastreabilidade e efeitos dos alimentos na saúde humana. É caracterizado como um método discriminatório de classificação e diferentemente do PCA, o método de mínimos quadrados parciais caracteriza-se como um método de análise multivariada que utiliza dados e parâmetros conhecidos, ou seja, é um método supervisionado. Assim como PCA, o PLS permite a redução de dimensão, e através disso, maximiza a separação dos grupos selecionados (X) de acordo com variáveis latentes (Y). Estas variáveis são selecionadas se descreverem bem a base de dados visando a melhor separação dos dados (XIA; WISHART, 2011).

2.5.3.3 OPLS-DA

O OPLS-DA foi desenvolvido como uma extensão ao PLS. É considerado um método de regressão que utiliza filtro de correção ortogonal para promover a discriminação de dois ou mais grupos entre os dados (componente preditiva tp) (TRYGG; WOLD, 2002). Dessa forma o OPLS-DA tenta descrever as informações de classificação em um componente, reduz a complexidade da matriz por meio da remoção de variáveis não correlacionadas (componentes ortogonais), o que pode oferecer vantagens em termos de interpretação. É importante ressaltar que o excesso de ajuste nos métodos de OPLS-DA e PLS-DA é um perigo potencial na formação dos dados, pois, dependendo dos dados a serem tratados, existem inúmeras variáveis a serem consideradas irrelevantes, fazendo-se necessário métodos de validação que variam com a matriz a ser implementada (KHAKIMOV; GÜRDENIZ; ENGELSE, 2015; WORLEY; HALOUSKA; POWERS, 2013).

O modo mais fácil de visualizar o modelo OPLS-DA é pelo gráfico de *S-Plot*, uma vez que a plotagem é feita a partir da influência de determinadas variáveis em um modelo. O gráfico é composto por dois eixos, o $p[1]$ que está relacionado com a magnitude de cada variável X, e o $p(\text{corr})$ que mostra a confiabilidade de cada variável descrita em X. Esse tipo de abordagem é muito relatada da predição de biomarcadores em dados de ressonância magnética e cromatografia gasosa e líquida (ALBERICE, 2014; WIKLUND et al., 2008).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar possíveis biomarcadores de tolerância ao estresse hídrico a partir dos extratos de folhas em clones de cajueiro empregando métodos quimiométricos.

3.2 Objetivos Específicos

Determinar, e quantizar as enzimas oxidativas presentes nos extratos dos diferentes clones de cajueiro;

Identificar os componentes dos metabolitos primário e secundário presentes nos diferentes extratos dos clones de Caju a partir das técnicas de RMN ^1H e UPLC-QTOF-MS^E

Estabelecimento de principais diferenças presentes nos clones tolerantes e suscetíveis ao estresse hídrico a partir de técnicas quimiométricas de Análise de Componente Principal (PCA) e Análise Discriminante por Projeções Ortogonais a Mínimos Quadrados (OPLS-DA), utilizando-se dos resultados obtidos pelas análises de UPLC-QTOF-MS^E e RMN.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Metodologia de preparo para obtenção de amostras do solo

Foram utilizadas plantas de cajueiro-anão (*Anacardium occidentale*), com três anos de idade, de um experimento de irrigação conduzido no Campo Experimental da Embrapa Agroindústria Tropical, em Pacajus-CE (Lat. 4°11'34" S, Long. 38°29'50" O, Alt. 84 m). O solo da área experimental é classificado como Argissolo Amarelo Distrófico, de textura arenosa, profundo e bem drenado. O experimento era conduzido no delineamento experimental de blocos casualizados, com parcelas subdivididas e quatro repetições, em que foram avaliados dois tratamentos de irrigação nas parcelas: a) irrigação com 100% da evapotranspiração da cultura (ETc) durante o período de seca (junho-dezembro) e b) sem irrigação. Nas subparcelas foram avaliados os genótipos de cajueiro-anão BRS226, considerado tolerante ao déficit hídrico, e CCP 76, considerado sensível ao déficit hídrico. Cada subparcela foi constituída por oito plantas (duas fileiras de quatro plantas), com espaçamento de 8 m x 4 m (312 plantas ha⁻¹).

No tratamento com irrigação, as plantas foram irrigadas com frequência diária, utilizando 16 gotejadores por planta, distribuídos em duas linhas laterais por fileira de plantas, espaçadas de 1,2 m entre si. As coletas das amostras de folhas e do solo foram realizadas em 30/11/2018, durante a estação seca e em 16/05/2019, durante a estação chuvosa. Em cada coleta foram amostradas 2 a 3 plantas de cada subparcela, totalizando 10 plantas. De cada planta amostrada foram retiradas 16 folhas, quatro em cada direção cardinal, na porção média da copa dos cajueiros. No momento das coletas, as folhas de cada planta foram acondicionadas em papel alumínio, armazenadas em caixa de isopor com gelo seco e transportadas para o Laboratório Multiusuários de Química de Produtos Naturais (LMQPN), da Embrapa Agroindústria Tropical.

Simultaneamente à coleta das folhas, foram determinadas a condutância estomática e as taxas de transpiração e fotossíntese das plantas, utilizando o Infrared Gas Analyser-IRGA. No momento das coletas de folhas foram coletadas amostras para a determinação do teor de umidade do solo na projeção da copa de quatro plantas de cada tratamento. As amostras de solo foram coletadas utilizando um trado tipo sonda, nas camadas de 0-0,2; 0,2-0,4 e 0,4-0,6 m. As amostras foram acondicionadas em latas de alumínio, seladas e posteriormente pesadas em balança analítica com precisão de 0,01 g, para a determinação da massa de solo úmido. As amostras foram colocadas para secar em estufa de ventilação forçada, à temperatura de 105 °C por 72 h e pesadas novamente para a determinação das massas secas de solo.

4.2 Coleta e preparo das amostras

Foram utilizadas plantas de cajueiro-anão (*Anacardium occidentale*), com três anos de idade, de um experimento de irrigação conduzido no Campo Experimental da Embrapa Agroindústria Tropical, em Pacajus-CE (Lat. 4°11'34" S, Long. 38°29'50" O, Alt. 84 m). O solo da área experimental é classificado como argissolo amarelo distrófico, de textura arenosa, profundo e bem drenado. O experimento era conduzido no delineamento experimental de blocos casualizados, com parcelas subdivididas e quatro repetições, em que eram avaliados dois tratamentos de irrigação nas parcelas: a) irrigação com 100% da evapotranspiração da cultura (ETc) durante o período de seca (junho-dezembro) e b) sem irrigação. Nas subparcelas foram avaliados os genótipos de cajueiro-anão BRS 226, considerado tolerante ao déficit hídrico, e CCP 76, considerado sensível ao déficit hídrico. Cada subparcela foi constituída por oito plantas (duas fileiras de quatro plantas), com espaçamento de 8 m x 4 m (312 plantas ha⁻¹).

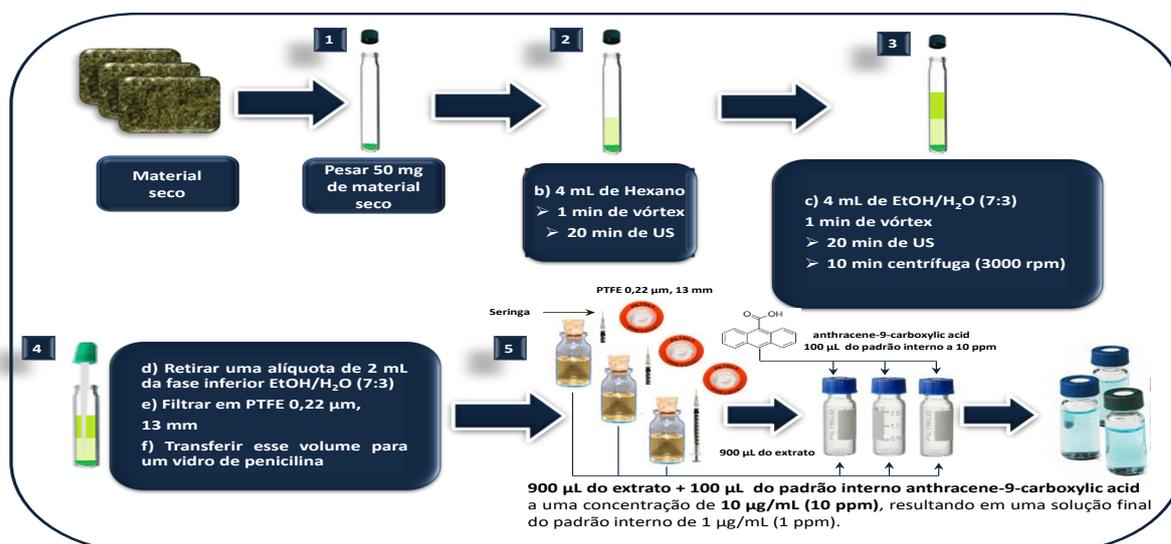
No tratamento com irrigação, as plantas foram irrigadas com frequência diária, utilizando 16 gotejadores por planta, distribuídos em duas linhas laterais por fileira de plantas, espaçadas de 1,2 m entre si. As coletas das amostras de folhas e do solo foram realizadas em 30/11/2018, durante a estação seca e em 16/05/2019, durante a estação chuvosa. Em cada coleta foram amostradas 2 a 3 plantas de cada subparcela, totalizando 10 plantas. De cada planta amostrada foram retiradas 16 folhas, quatro em cada direção cardinal, na porção média da copa dos cajueiros. No momento das coletas, as folhas de cada planta foram acondicionadas em papel alumínio, armazenadas em caixa de isopor com gelo seco e transportadas para o Laboratório de Química e Tecnologia da Biomassa, da Embrapa Agroindústria Tropical.

4.3 Metodologia de extração

Após os procedimentos de coleta, secagem e moagem do material coletado, pesou-se aproximadamente 50 mg de cada clone em frascos de vidro. Após a pesagem e identificação dos frascos, foi adicionado 4 mL de hexano com o intuito de realizar um clean up por meio da extração de componentes apolares presentes no tecido vegetal da planta que pode comprometer a qualidade da análise química. As amostras foram homogeneizadas em vórtex por 1 minuto e postos em banho ultrassônico por 20 minutos. Em seguida, adicionou-se 4mL de uma solução etanol/água (7:3). O mesmo procedimento de vórtex foi realizado nessa etapa, com posterior extração em banho ultrassônico. Finalizado o processo de extração, a separação das fases foi

concluída com o auxílio de uma centrífuga. O procedimento durou 10 minutos a uma rotação de 3000 rpm e, por fim, a fase de interesse foi coletada em vidros de penicilina. Um volume de 900 μL do extrato etanólico foi transferido para uma seringa acoplada a filtro PTFE 0,20 μm . O extrato filtrado foi recolhido em *vials*, previamente identificados. À solução contida nos *vials* adicionou-se 100 μL de padrão interno de genistéina em uma concentração de 10,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (10,0 ppm) resultando ao final do processo de diluição em uma solução final de 1,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Todos os procedimentos foram feitos em quintuplicata biológica, totalizando 40 extrações. Os fracos então foram armazenados em ultrafreezer (-80°C) para conservação até a análise. A visualização do procedimento está na Figura 7.

Figura 7 – Procedimento operacional padrão (POP) desenvolvido e utilizado na EMBRAPA para microextrações líquido-líquido para UPLC-QTOF-MS^E.



4.4 Condições de análise aplicadas ao sistema UPLC-QTOF-MS^E

A análise foi realizada em um sistema *Acquity* UPLC (Waters), acoplada com um sistema de Quadrupolo/TOF (Waters) pertencente a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA. Foi utilizando uma coluna *Acquity* UPLC BEH (150 x 2,1 milímetros, 1,7 μm) com a temperatura fixada em 40 $^{\circ}\text{C}$. As fases móveis foram água com 0,1% de ácido fórmico (A) e acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico (B), com gradiente variando 0-15 min (2-95%) de B; (15,1-17) min (100%) de B; (17,1-19,1) min (2%) de B, vazão de 0,4 mL min^{-1} e volume de injeção da amostra de 5 μL .

O modo ESI foi adquirido na faixa de m/z 110 – 1180, temperatura da fonte fixa de 120°C, temperatura de dessolvatação 350°C. O fluxo do gás dessolvatação foi de 500 L h⁻¹. A voltagem capilar foi de 2,6 kV. Leucina encefalina foi utilizada como lock mass. O espectrômetro foi operado com modo de aquisição MS^E centroide utilizando uma rampa de tensão de 20 a 40V. O instrumento foi controlado pelo software Masslynx 4.1 (Waters Corporation).

4.5 Metodologia utilizada no tratamento quimiométricos dos dados

Os dados advindos do item 4.3 foram analisados utilizando o *software* MarkerLynx (Waters) com o intuito de selecionar os possíveis biomarcadores na matriz de amostras. Ao todo 20 amostras de cada período de coleta foram adicionadas ao programa, totalizando 40 amostras. O intervalo de tempo analisado foi de 0,7 – 18 min, em intervalo de massas compreendido entre 110-1190 Da. O erro admitido para as massas detectadas foi de 0,05 Da com os tempos de retenção (t_R) e massa carga (m/z). Anteriormente à análise estatística dos dados, construiu-se a Tabela 1 contendo os picos tentativamente anotados com seus respectivos pares $t_R - m/z$. Todos os dados da tabela foram utilizados na escolha de discriminantes gerados pelo *software*.

Devido ao grande número de dados, foi feita previamente uma análise não-supervisionada via Análise de Componentes Principais (PCA - *Principal Component Analysis*), usando a escala de Pareto com o intuito de analisar os principais agrupamentos no conjunto de dados alocados no sistema. Posteriormente, foram feitas análises supervisionadas através da aplicação da análise discriminante ortogonal por mínimos quadrados parciais (OPLS-DA – *Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis*). Dos dados gerados por OPLS-DA, foi possível a construção de *S-Plot*, que continham os principais pares $t_R - m/z$, e, portanto, os possíveis biomarcadores. A escolha das moléculas discriminantes entre os clones foi fundada na importância de projeção (VIP) com grau maior que 1 e $p_{\text{value}} < 0.05$.

4.6 Preparação de amostras e espectroscopia de RMN

Para os experimentos de RMN, 50,0 mg de material seco foram utilizados, foram preparados extratos aquosos dose genótipos susceptíveis e tolerantes tendo como parte da planta

analisada as folhas de genótipos de cajueiro (CCP76 e BRS226). Para tanto, utilizou-se uma alíquota de 700 μL de D_2O (99,9%) 1% de sódio-3-trimetilsilil propionato (TMSP-d4). Em seguida, a solução final foi inserida em tubo de RMN de 5 mm. Os experimentos de RMN foram realizados em um espectrômetro Agilent 600 MHz equipado com um One Probe TM de detecção inversa de 5 mm (H-F / 15N-31P) com gradiente Z ativamente protegido. As aquisições de RMN de ¹H foram realizadas sob parâmetros quantitativos: pulso forte calibrado a 90 ° (8,20 μs); tempo de aquisição de 1,704 s e retardo de relaxamento de 1,00 s; e valor de ganho de receptor fixo para 30 para todas as aquisições, a fim de receber os sinais na mesma amplitude; temperatura controlada a 298 K. O TMSP-d4 foi usado como um padrão interno (simplet a 0,0 ppm). Os espectros foram processados aplicando multiplicação exponencial do FID por um fator de 0,3 Hz e transformação de Fourier de 16384 pontos. A correção de fase foi realizada manualmente e a correção da linha de base foi aplicada em toda a faixa espectral. A identificação dos constituintes foi realizada através de experimento de RMN 2D como ¹H-¹H gCOSY, ¹H-¹³C gHSQC e ¹H-¹³C gHMBC. Os resultados foram comparados com os dados existentes em bancos de dados de acesso aberto (www.hmdb.ca) e relatórios da literatura.

Os experimentos de RMN bidimensionais (2D) foram adquiridos usando as sequências de pulso da biblioteca do espectrômetro padrão. Experimentos ¹H-¹H COSY foram obtidos com largura espectral de 18.028,1 Hz em ambas as dimensões; Matriz de dados 1442 \times 200; 32 varreduras por incremento t1 e retardo de relaxamento de 1,0 s. Os experimentos de uma ligação 1H-13C HSQC foram adquiridos com um atraso de evolução de 1,7 ms para uma média de 1J (C, H) de 145 Hz; Matriz de dados 1442 \times 200; 80 varreduras por incremento t1; larguras espectrais de 9615,4 Hz em f2 e 30.165,9 Hz em f1 e retardo de relaxação de 1,0 s. Os experimentos de 1H-13C HMBC foram registrados com um atraso de evolução de 50,0 ms para LRJ (C, H) de 10 Hz; Matriz de dados 1442 \times 200; 180 varreduras por incremento t1; larguras espectrais de 9615,4 Hz em f2 e 30.165,9 Hz em f1 e retardo de relaxação de 1,0 s.

4.7 Análise de classificação multivariada do conjunto de dados de RMN ¹H

Uma análise multivariada supervisionada por (PLS-DA) foi desenvolvida para investigar a influência da irrigação de acordo com a sazonalidade na variabilidade química de folhas de cajueiro de diferentes genótipos (CCP76 e BRS226). Portanto, uma matriz numérica contendo os dados de RMN ¹H foi construída para cada genótipo separadamente. Para a construção de matrizes, cada espectro foi convertido para o Código Padrão Americano para

Intercâmbio de Informações (ASCII) e importado pelo programa Origin TM 9.4. As matrizes numéricas resultantes foram posteriormente exportadas para o software Excel TM (2010) e, em seguida, importadas pelo programa PLS Toolbox TM (versão 8.6.2, Eigenvector Research Incorporated, Manson, WA EUA) para desenvolver a análise quimiométrica. Anteriormente, a área afetada pela supressão de água não deuterada de acordo com o perfil de saturação (entre δ 4,70 e 5,15) era excluída de cada matriz. Para análise de classificação multivariada por PLS-DA, algoritmos para correção de linha de base (com peso mínimo automático ponderado, ordem 1), alinhamento de variáveis usando COW (Correlation Optimized Warping) com segmento de 50 pontos de dados e uma folga de 5 pontos de dados e normalização para área foram aplicadas antes da decomposição das matrizes.

O pré-tratamento centrado na média sobre as amostras proporcionou melhores diferenças entre a composição das folhas do cajueiro, não permitindo que ruídos e pequenos sinais não identificados afetassem negativamente a distribuição das amostras. Para a decomposição de matrizes originais em scores, loadings, erros (resíduos Q) e influências de amostras na modelagem (T2 de Hotelling), o algoritmo PLS simplificado (SIMPLS) foi aplicado. Esses tratamentos de dados aumentaram as diferenças entre a composição das folhas de cajueiro, e o número de variáveis latentes (LV) foi escolhido de acordo com a classificação e decréscimo de erros de validação cruzada (RMSEC e RMSECV respectivamente) e variância capturada com base em cada LV sob nível de confiança de 95 %. O método de validação cruzada foi desenvolvido usando o método venetian blinds (BALLABIO, 2015; STEDMON; BRO, 2008)

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

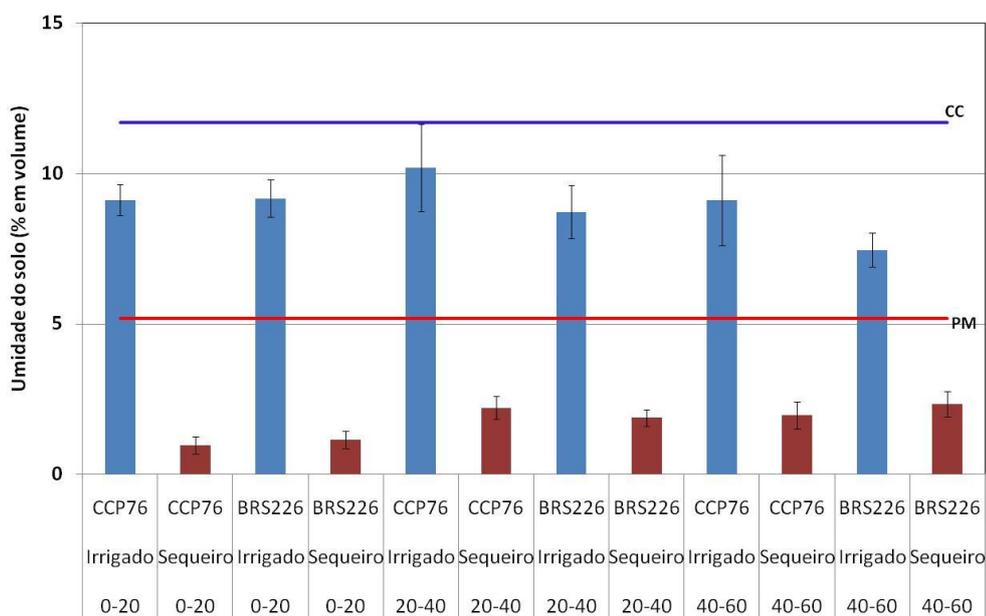
5.1 Percentual relativo de água no solo nos períodos de seca e chuva

Os experimentos de avaliação das variações metabólica e fisiológicas realizados durante a estação seca (com e sem irrigação) e durante a estação chuvosa com os clones BRS226 e CCP76 foram realizados de forma que as condições das plantas submetidas ou não ao estresse hídrico foram inteiramente controladas. Nas Figuras 8 e 9 são apresentados as médias de umidade do solo nas camadas de 0-20, 20-40 e 40-60 cm de profundidade, na zona radicular de plantas de cajueiro dos clones CCP76 e BRS226, irrigadas e em sequeiro, no período de seca e

chuvoso. Na coleta realizada no período de seca (Figura 8), o teor de umidade do solo variou entre 7 e 10% em volume, na zona radicular das plantas irrigadas de ambos os clones de cajueiro. Ou seja, entre o ponto de murcha permanente (PM=5,2% em volume) e a capacidade de campo (CC=11,7% em volume), na profundidade efetiva da zona radicular dos cajueiros (0-60 cm), podendo-se inferir que a umidade do solo não foi limitante para a transpiração e a fotossíntese das plantas.

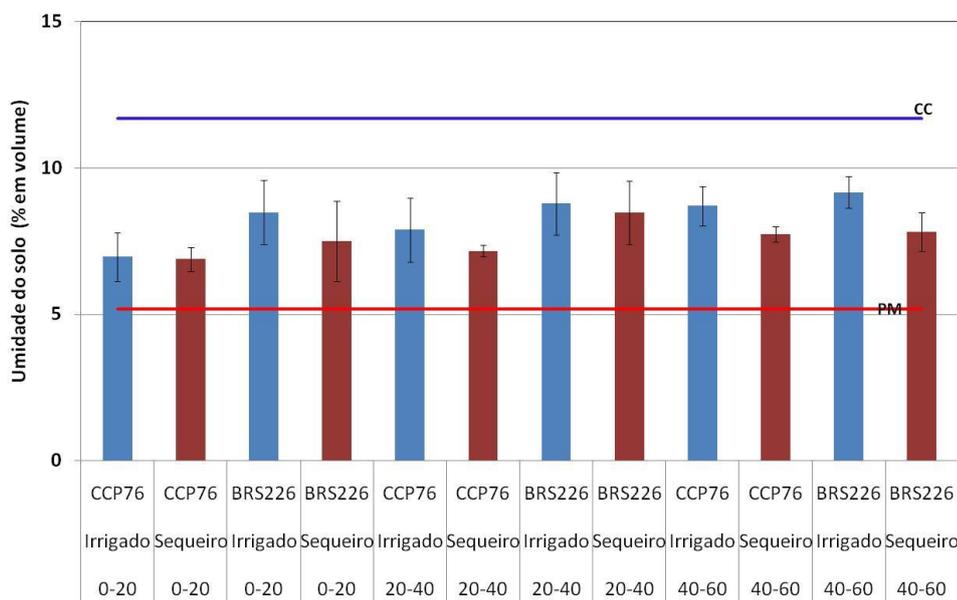
Por outro lado, nas plantas não irrigadas, a umidade do solo na profundidade efetiva da zona radicular de ambos os clones de cajueiro, variou de 1,0 a 2,3%, ou seja, bem abaixo do ponto de murcha permanente, mostrando que as plantas realmente estavam sob déficit hídrico severo no solo. Na coleta realizada no período chuvoso (Figura 9) a umidade do solo nas diferentes camadas ficou entre 7,0 e 9,2% em volume, tanto nas plantas irrigadas, quanto nas de sequeiro. Ou seja, em ambos os tratamentos as plantas de cajueiro não estavam sob déficit hídrico no solo na profundidade efetiva do sistema radicular do cajueiro.

Figura 8 - Médias de umidade do solo (% em volume) nas camadas de 0-20, 20-40 e 40-60 cm na zona radicular de plantas de cajueiro dos clones CCP 76 e BRS 226, irrigadas e em sequeiro, no período de seca (coleta realizada em 30/11/2018). Onde a legenda PM significa: ponto de murcha e CC: capacidade de campo.



Fonte: Autor (2021).

Figura 9 - Médias de umidade do solo (% em volume) nas camadas de 0-20, 20-40 e 40-60 cm na zona radicular de plantas de cajueiro dos clones CCP 76 e BRS 226, irrigadas e em sequeiro, na estação chuvosa (coleta realizada em 16/05/2019).



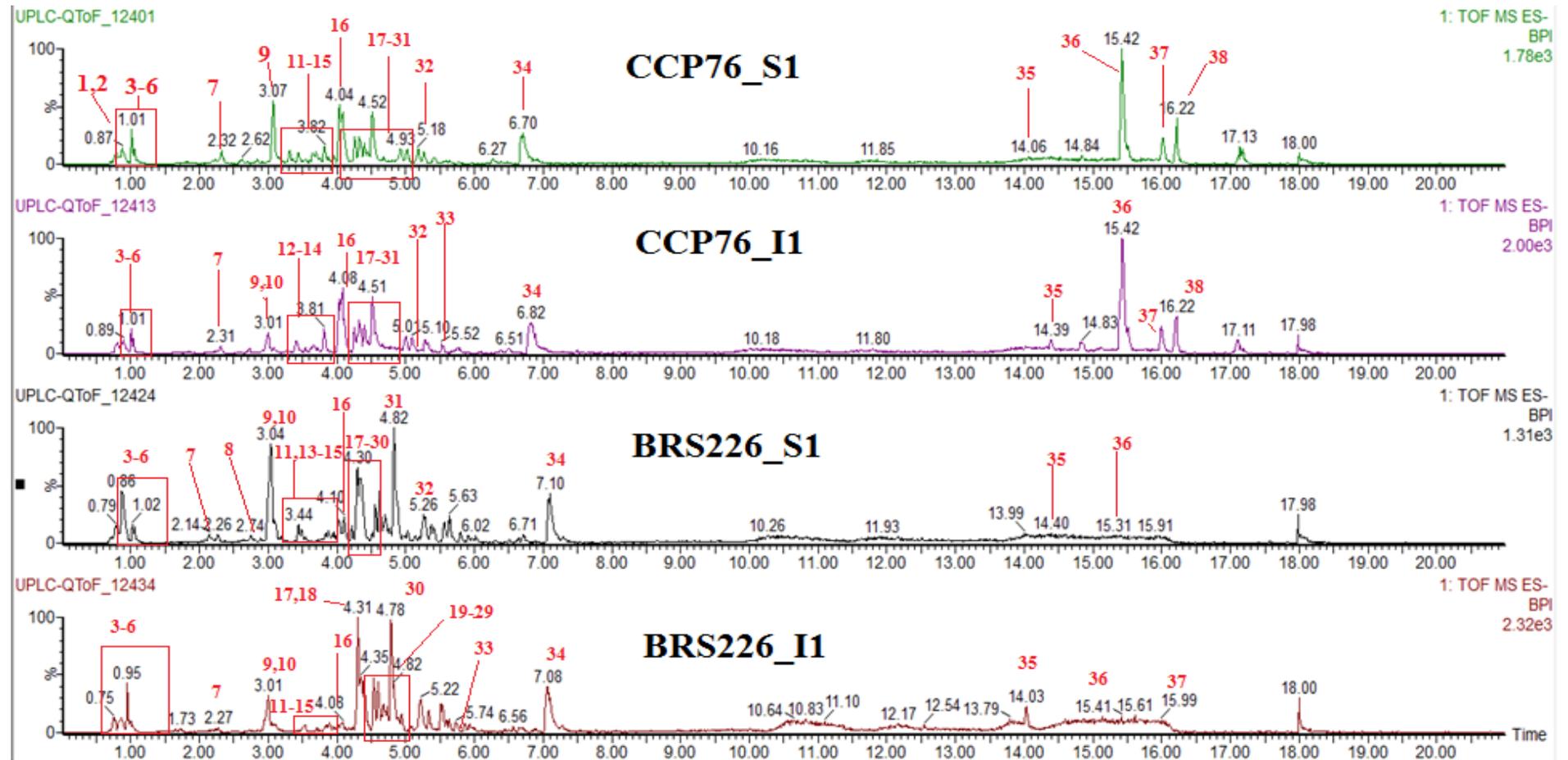
Fonte: Autor (2021).

5.2 Perfil químico das micromoléculas via UPLC-QTOF-MS^E dos extratos de folhas da *Anacardium Occidentale* L (Clones BRS226 e CCP76).

Após a etapa de microextração líquido-líquido, os extratos etanólicos obtidos foram analisados por UPLC-QTOF-MS^E, de acordo com os parâmetros descritos no item 4.3. Os cromatogramas e espectros de massas em alta resolução dos clones de cajueiro anão-precoce foram obtidos em modo negativo. Nas Figuras 10 e 11 estão presentes oito cromatogramas dos dois períodos de coleta, estação seca, onde foram coletados clones sobre condição de sequeiro e clones irrigados e na segunda coleta onde foram coletados clones que naturalmente não estavam e condições de estresse hídrico. Os clones BRS 226 e CCP 76 foram identificados e os respectivos picos foram anotados e numerados de acordo com dados da Tabela 3. Os metabólitos/micromoléculas foram tentativamente identificados e 38 compostos foram anotados, baseando-se em extensas pesquisas bibliográficas, acesso a bancos de dados tais como, Scifinder, *PubChem* e *ChemSpider*. Os compostos identificados na Tabela 3 apresentam as fórmulas moleculares obtidas via espectros de MS com respectivos valores de erros em parte por milhão (ppm). Por sua vez o estágio MS² tornou possível a anotação tentativa das

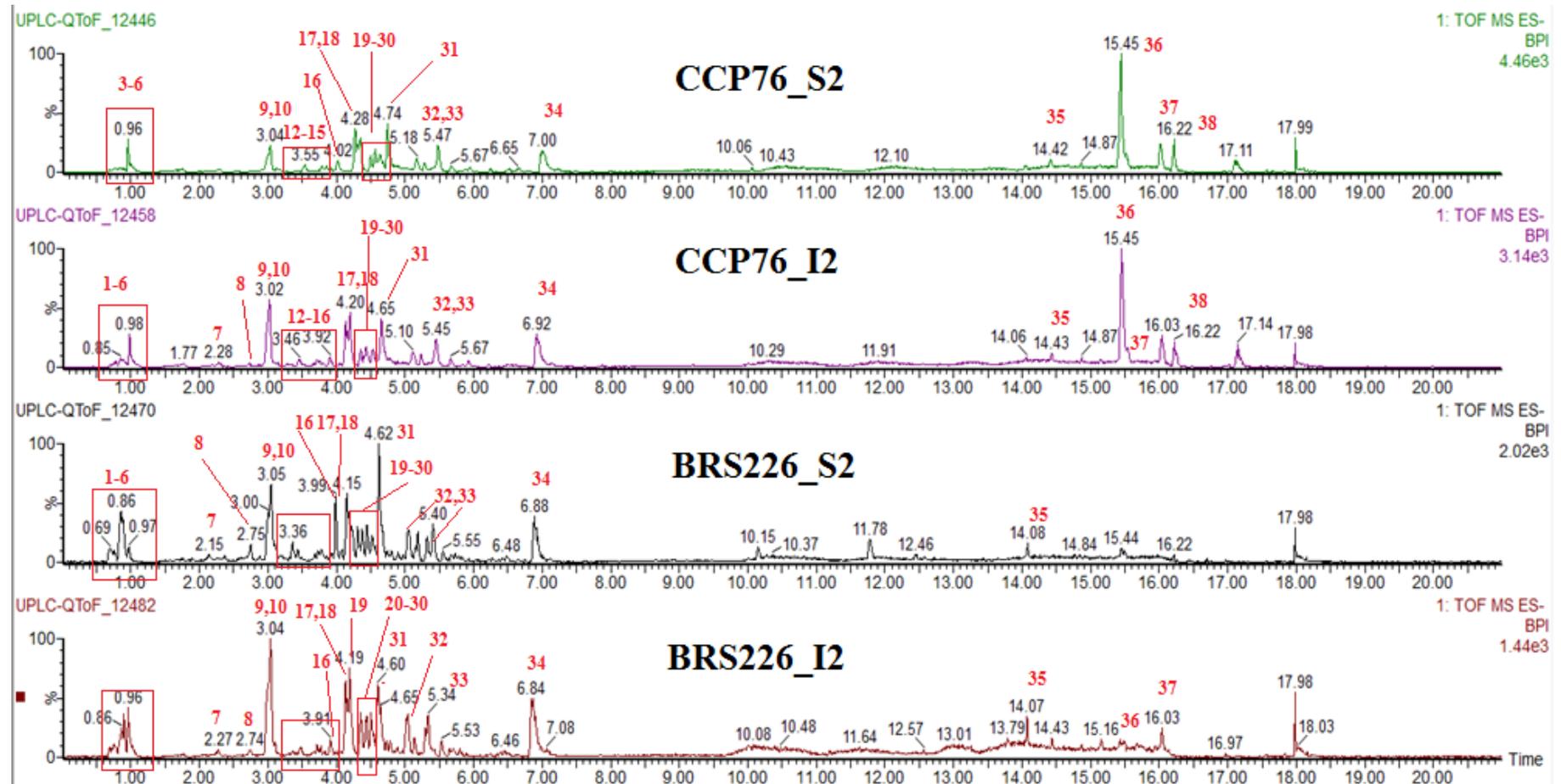
respectivas estruturas químicas em duas dimensões. Os espectros em estágio MS² possuem correlação com as rotas de fragmentação. Tais dados foram confrontados com a literatura (Sempre levando em consideração os aspectos quimiotaxômicos no momento da anotação dos picos via desreplicação). Os compostos não identificados recebem a sigla N.I.

Figura 10 - Cromatogramas em modo BPI (Base Peak Intensity) referentes aos clones CCP76 e BRS 226 de cajueiro anão-precoce analisados, onde a sigla S1 significa sequeiro primeira coleta e I1 irrigado primeira coleta.



Fonte: Elaborado pelo Autor (2020).

Figura 11 - Cromatogramas em modo BPI (Base Peak Intensity) referentes aos clones CCP76 e BRS 226 de cajueiro anão-precoce analisados, onde a sigla S2 significa sequeiro segunda coleta e I2 irrigado segunda coleta.



Fonte: Elaborado pelo Autor (2020).

Tabela 3 – Perfil de metabólitos anotados em folhas de *Anacardium occidentale* L obtido via UPLC-QTOF-MS^E.

Pico	t _R (min)	[M-H] ⁻ Calculado	[M-H] ⁻ Observado	Fragmentos (MS/MS)	Fórmula Molecular	Erro ppm	Anotação dos picos	Referências
1	0,87	377,0873	377,0836	191,0555; 267,0721 165,0398	C ₁₈ H ₁₈ O ₉	-5,8	N.I	-
2	0,90	341,1084	341,1087	179,0512; 161,0568 143,0374; 89,0253	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	-0,9	α-D-glucopiriosídico	(KIM et al., 2011)
3	0,95	133,0142	133,0137	115,0405	C ₄ H ₆ O	-7,5	Ácido Málico	(ABU-REIDAH et al., 2015; YAN et al., 2014)
4	0,97	173,0450	173,0452	165,0416; 111,0463	C ₇ H ₁₀ O ₅	1,2	Ácido Chiquímico	(AVULA et al., 2009)
5	0,98	191,0192	191,0174	173,0423; 111,0076	C ₆ H ₈ O ₇	-9,4	Ácido cítrico	
6	0,98	331,0665	331,0664	169,0058; 125,0196	C ₁₃ H ₁₆ O ₁₀	-0,3	Galoil hexosídeo	(ABU-REIDAH et al., 2015; SANTOS et al., 2017)
7	2,24	305,0661	305,0672	219,0633; 165,0117 179,0441	C ₁₅ H ₁₄ O ₇	-2,6	Galocatequina ou Epigalocatequina	(HOKKANEN et al., 2009; LIU et al., 2016; YAN et al., 2014)
8	2,70	577,1371	577,1371	451,0972; 425,1124 407,1081; 289,0881	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	0,0	Procianidina tipo-B dímero	(DOU et al., 2007; YAN et al., 2014)
9	3,03	289,0712	289,0700	245,0827; 205,0558	C ₁₅ H ₁₄ O ₁₂	-2,4	Catequina	(DOU et al., 2007; YAN et al., 2014)

10	3,08	453,1033	453,1023	313,0522; 179,0203 169,0180, 125,0260	C ₂₀ H ₂₂ O ₁₂	-2,2	Hidroxi-metoxifenil- <i>O</i> -(<i>O</i> -galiol)-hexose	(ABU-REIDAH et al., 2015a)
11	3,48	635,0884	635,090	465,0568; 313,0619; 169,0190; 125,0236	C ₂₇ H ₂₄ O ₁₈	2,7	Trigaloil Glicose	(BOULEKBACHE-MAKHLOUF et al., 2010; REGAZZONI et al., 2013)
12	3,54	457,0771	457,0751	169,0135; 125,0245	C ₂₀ H ₂₂ O ₁₂	-4,4	Epigalocatequina galato	(ABU-REIDAH et al., 2015; BRACA et al., 2003)
13	3,81	729,1456	729,1527	407,0810; 289,0737	C ₃₇ H ₃₀ O ₁₆	9,7	Monogalato de dímero de procianidina	(DOU et al., 2007; ROCKENBACH et al., 2012; YAN et al., 2014)
14	3,84	479,0826	479,0847	317,0508; 316,0214	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₃	4,4	Miricetina 3- <i>O</i> -glicosídeo	(ABU-REIDAH et al., 2015; DOU et al., 2007; REGAZZONI et al., 2013; SHUKRI; ALAN, 2010)
15	3,88	631,0935	631,0956	479,0898; 317,0226 169,0326; 125,0178	C ₂₈ H ₂₄ O ₁₇	3,3	Miricetina galoil-hexosídeo	(ABU-REIDAH et al., 2015; ERŞAN et al., 2016)
16	4,09	787,0994	787,0979	635,0909; 617,0732 169,0326; 125,0178	C ₃₄ H ₂₈ O ₂₂	-1,4	Tetra- <i>O</i> -galoil glicosídeo	(BERARDINI; CARLE; SCHIEBER, 2004; DORTA et al., 2014; REGAZZONI et al., 2013)

Pico	t_R(min)	[M-H]⁻ Calculado	[M-H]⁻ Observado	Fragmentos (MS/MS)	Fórmula Molecular	Erro ppm	Anotação dos picos	Referências
17	4,31	463,0877	463,0861	317,0286; 316,0216	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	-3,5	Miricetina 3- <i>O</i> -ramnosídeo	(ERŞAN et al., 2016; SHUKRI; ALAN, 2010)

18	4,31	463,0877	463,0850	301,0314; 300,0231	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	-5,8	Quercetina 3- <i>O</i> -galactosídeo	(DORTA et al., 2014; ERŞAN et al., 2016; SHUKRI; ALAN, 2010a)
19	4,39	463,0877	463,0887	301,0341; 300,0268	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	0,0	Quercetina 3- <i>O</i> -glicosídeo	(ERŞAN et al., 2016; REGAZZONI et al., 2013; SHUKRI; ALAN, 2010)
20	4,39	615,0986	615,0988	463,0871; 301,0316	C ₂₈ H ₂₄ O ₁₆	0,3	Quercetina galoil hexosídeo	(ERŞAN et al., 2016; FRAIGE et al., 2018; SALDANHA; VILEGAS; DOKKEDAL, 2013)
21	4,42	939,1104	939,1084	770,0993; 769,0919 617,0893; 169,0115	C ₄₁ H ₃₂ O ₂₆	-2,8	Pentagaloil hexosídeo	(ABU-REIDAH et al., 2015; DORTA et al., 2014)
22	4,59	433,0771	433,0774	301,0315; 300,0251	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₁	0,7	Quercetina 3- <i>O</i> -xilósídeo	(BERARDINI; CARLE; SCHIEBER, 2004; SHUKRI; ALAN, 2010)
23	4,62	447,0927	447,0902	285,0414; 284,0353	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	-5,6	Canferol hexosídeo I ou Luteolina hexosídeo I	(ABU-REIDAH et al., 2015; DOU et al., 2007; ENGELS et al., 2012; SCHULZE-KAYSERS; FEUEREISEN; SCHIEBER, 2015; SHUKRI; ALAN, 2010)
24	4,62	447,0927	447,0909	301,0329; 300,0241 255,0238; 197,0730	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	-5,6	Quercetina 3- <i>O</i> -ramnosídeo	(DORTA et al., 2014; HOKKANEN et al., 2009; SALDANHA; VILEGAS; DOKKEDAL, 2013; SHUKRI; ALAN, 2010)
25	4,65	433,0771	433,0773	301,0402; 300,0322	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₁	0,5	Quercetina 3- <i>O</i> -arabinopiranosídeo	(BERARDINI; CARLE; SCHIEBER, 2004; SHUKRI; ALAN, 2010)

Pico	t _R (min)	[M-H] ⁻ Calculado	[M-H] ⁻ Observado	Fragmentos (MS/MS)	Fórmula Molecular	Erro ppm	Anotação dos picos	Referências
26	4,65	1091,1213	1091,1217	939,1111; 769,0948 617,0761, 169,0104	C ₄₈ H ₃₆ O ₃₀	0,4	Hexagaloil hexosídeo	(GRACE et al., 2016a)

27	4,72	433,0771	433,0771	301,0331; 300,0184	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₁	0,0	Quercetina 3- <i>O</i> -arabinofuronosídeo	(ABU-REIDAH et al., 2015; BERARDINI; CARLE; SCHIEBER, 2004; SHUKRI; ALAN, 2010)
28	4.72	285.0405	285.0399	217.0488; 199.0355; 175.0304; 151.0304	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	3.2	Luteolina	(ABU-REIDAH et al., 2015; FUNARI et al., 2012)
29	4,74	599,1037	599,1019	285,0389; 169,0181 125,0063	C ₂₈ H ₂₄ O ₁₅	-3,0	Cianidina 3- <i>O</i> -(2''galoil)-galactosídeo	(ABU-REIDAH et al., 2015)
30	4,83	447,0927	447,0904	285,0365; 284,0330	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	-5,1	Canferol hexosídeo II ou Luteolina hexosídeo II	(ABU-REIDAH et al., 2015 ; DOU et al., 2007; ENGELS et al., 2012; SCHULZE-KAYSERS; FEUEREISEN; SCHIEBER, 2015; SHUKRI; ALAN, 2010)
31	4,87	585,0880	585,0836	301,0329; 169,0142	C ₂₇ H ₂₂ O ₁₅	-6,0	Quercetina galoil pentosídeo I	(ABU-REIDAH et al., 2015; ERŞAN et al., 2016)
32	5,43	585,0880	585,0896	301,0367; 169,0030	C ₂₇ H ₂₂ O ₁₅	2,7	Quercetina galoil pentosídeo II	(ABU-REIDAH et al., 2015)
33	5,59	349,0560	349,0565	198,0853; 197,0518 169,0060; 124,0166	C ₁₆ H ₁₄ O ₉	-1,4	2,4-di-hidroxi-3-(3,4,5-tri-hidroxi benzoil) oxibenzoato de etilo	(DORTA et al., 2014)

Pico	t _R (min)	[M-H] ⁻ Calculado	[M-H] ⁻ Observado	Fragmentos (MS/MS)	Fórmula Molecular	Erro ppm	Anotação dos picos	Referências
34	7,14	537,0822	537,0805	417,0501; 375,0417	C ₃₀ H ₁₈ O ₁₀	-3,4	Amnentoflavona ou Agatisflavona	(ABU-REIDAH et al., 2015; BAGGETT et al., 2005)
35	14,04	341,2117	341,2127	297,2204; 119,0547 106,0334	C ₂₂ H ₃₀ O ₃	2,9	Ácido anacárdico (15:3)	(ERŞAN et al., 2016)
36	15,43	369,2430	369,2436	325,2305	C ₂₄ H ₃₃ O ₃	1,6	Ácido anacárdico (17:3)	(ERŞAN et al., 2016)

37	16,01	345,2430	345,2407	301,2507	$C_{22}H_{34}O_3$	-6,7	Ácido anacárdico (15:1)	(ERŞAN et al., 2016)
38	16,20	371,2586	371,2582	327,2690	$C_{24}H_{36}O_3$	-1,6	Ácido anacárdico (17:2)	(ERŞAN et al., 2016)

O pico **1** ($t_R = 0,87$ min) trata-se de uma molécula não identificada, sendo que nenhuma informação foi encontrada a respeito de sua estrutura de acordo com a pesquisa bibliográfica, que se baseou nos dados quimiotaxômicos da planta, ou seja, nos parâmetros utilizados na busca dentro da mesma família, gênero e espécie da planta. Essa molécula possui íon desprotonado de m/z 377,0836, sendo obtida a fórmula molecular $C_{18}H_{18}O_9$. Quanto aos padrões de fragmentação em MS^2 , foram observados íons de m/z 267,0721, 191,0555 e 165,0398. O íon fragmento 267,0721 Da não foi explicado através de seu mecanismo de fragmentação em fase gasosa, portanto não se pôde sugerir nenhuma estrutura equivalente. Os valores m/z 191,0555 e 165,0398 são típicos de perdas de galoil seguidas de água, respectivamente.

O pico **2** ($t_R = 0,90$ min) mostrou um íon $[M-H]^-$ em m/z 341.1084, correspondente a fórmula molecular $C_{12}H_{22}O_{11}$. A anotação do sinal da molécula foi atribuída como α -glicopirissodídeo foi feita a partir dos padrões de fragmentação dos espectros de massa descritos por KIM *et al* (2011). Esse composto apresentou quatro íons fragmentos em MS^2 : m/z 179,0512 gerado pela perda de uma unidade de glicose, m/z 161,0568 proveniente da perda de uma molécula de água, m/z 143,0374 e 89,0252.

O pico **3** ($t_R = 0,95$ min) foi anotado como ácido málico, os dados espectrométricos demonstraram íon desprotonado em $[M-H]^-$ em m/z 133,0142 (C_4H_6O) com espectro MS^2 produzindo íon fragmento em m/z 115,0405 correspondente a $[M-H-H_2O]^-$, os mesmos fragmentos foram descritos por ABU- Reidah *et al.* (2015) e YAN *et al.* (2014), dados que corroboram a nossa proposta estrutural.

O pico **4** ($t_R = 0,97$ min), anotado como ácido chiquímico, apresentou $[M-H]^-$ em m/z 173,0405 ($C_7H_{10}O_5$), com íons fragmentos característicos em MS^2 de m/z 165,0416 e 111.0480. As informações espectrais foram comparadas com dados da literatura e tanto os espectros em MS quanto MS^2 foram análogos aos de AVULA *et al* (2009).

Os picos **5** e **6** apresentaram o mesmo tempo de retenção ($t_R = 0,98$ min), sendo possível a anotação de dois compostos: ácido cítrico (5) e galoil hexosídeo (6).

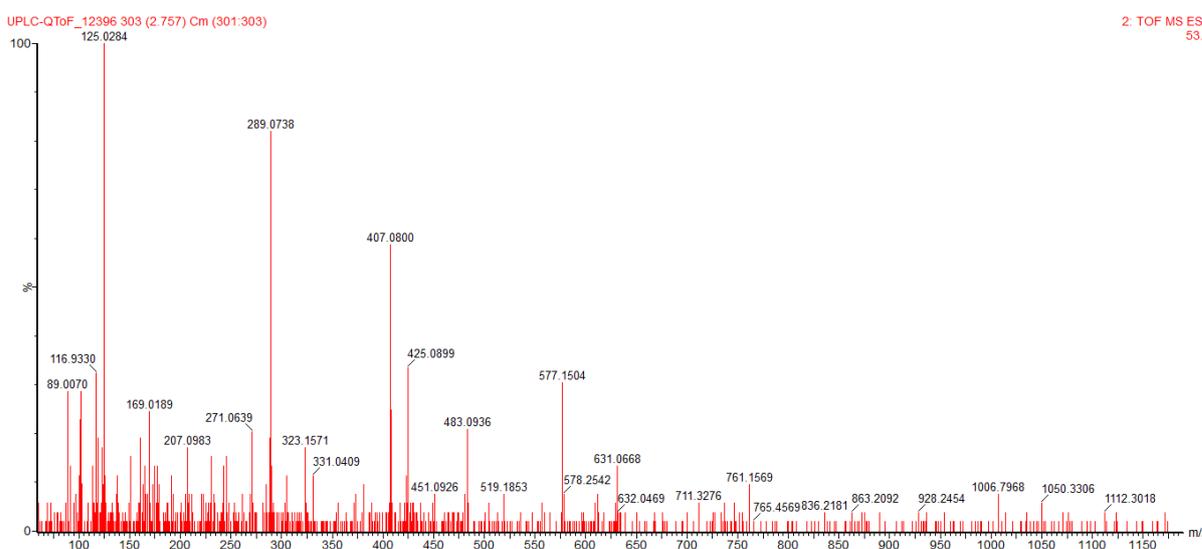
O ácido cítrico apresentou íon percussor $[M-H]^-$ em m/z 191,0192 ($C_6H_8O_7$), descrito por NG *et al* (2004), e íons fragmentos em m/z 173,0423 proveniente da perda de uma molécula de água e o outro em m/z 111,0076, correspondente a perdas neutras sucessivas de CO_2 e H_2O $[M-H-CO_2-2H_2O]^-$.

A molécula **6**, galoil hexosídeo, foi confirmada pelas comparações com os artigos

de ABU-REIDAH *et al.* (2014) e SANTOS *et al.* (2017), o íon dessprotonado do galoil hexosídeo apresentou m/z 331.0141, tendo sido associado a fórmula molecular $C_{13}H_{16}O_{10}$. Na etapa de fragmentação, espectros em estágio MS^2 , obteve-se fragmentos em m/z 169.0058, proveniente a perda de uma unidade de hexose, e m/z 125.0196, correspondente a uma descarboxilação por perda neutra [$169.0058 - CO_2$].

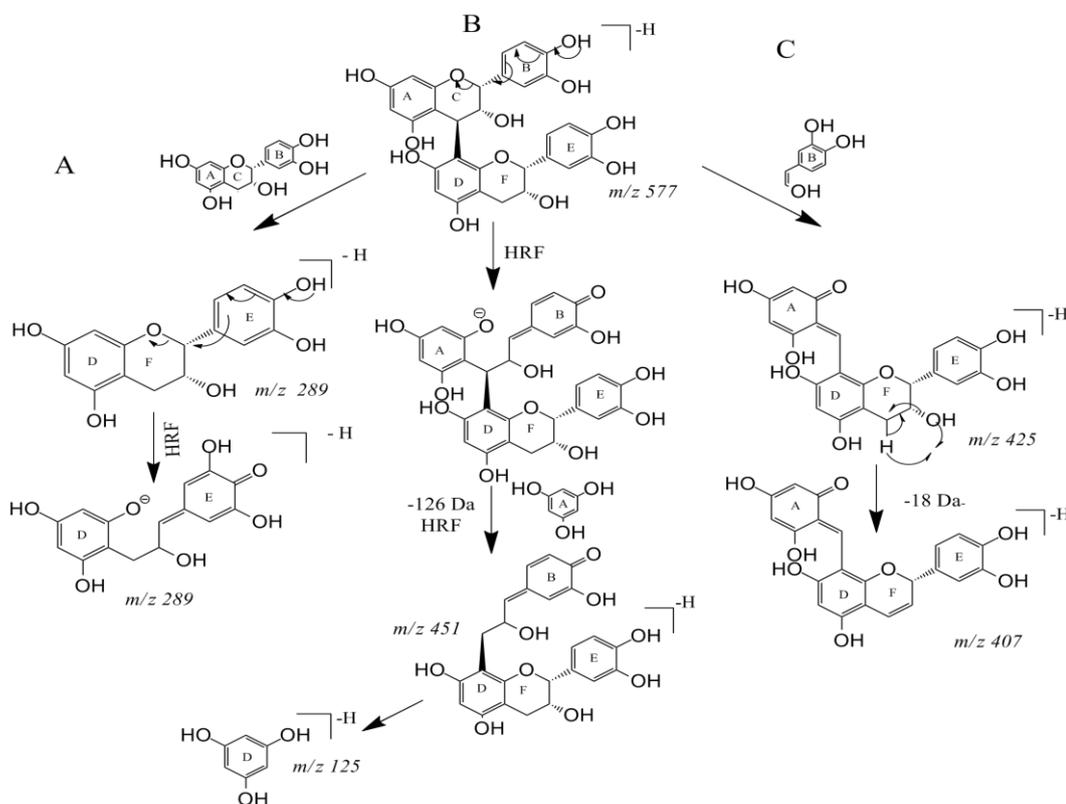
O pico **8** ($t_R = 2,70$ min) apresentou $[M-H]^-$ em m/z 577.1371 ($C_{30}H_{26}O_{12}$), foi anotado como procianidina do tipo B, a identificação do pico foi feita de acordo com a comparação dos dados espectrais em relação ao trabalho publicado por DOU *et al.* (2007) e YAN *et al.* (2014). Moléculas dessa classe geram um padrão de fragmentos característicos que podem ser melhor entendidos de acordo com as correlações de dados contidos nas Figuras 12 e 13. As principais rotas de fragmentação em fase gasosa desses compostos são fissões do tipo quinona-metíneo (QM), fissão com reação retro Diels-Alder (RDA) e fissão heterocíclica do anel (HRF) e tais mecanismos estão demonstradas na Figura 13. Os principais íons fragmentos encontrados nesse caso foram: 451, 425, 407 e 289 Da. O íon m/z 289 é gerado pela QM, onde ocorre a perda de uma (epi)catequina pela clivagem da ligação interflavanólica. Para formação do íon de m/z 451 é necessário a clivagem do anel C por HRF com concomitante eliminação de uma molécula neutra de 1,3,5-tri-hidroxibenzeno. O rearranjo do anel C por RDA libera uma molécula neutra de m/z 152, levando a formação do íon de m/z 425. Em sequência à RDA, a eliminação de uma molécula de água gera o íon fragmento de m/z 407. A rota de fragmentação em fase gasosa, pode ser vista na Figura 13.

Figura 12 - Padrões de fragmentação da Procianidina tipo B.



Fonte: Elaborado pelo Autor (2020).

Figura 13 - Principais fragmentações de procianidina do tipo B em modo negativo $[M-H]^-$: (A) Fragmentação quinona metídeo, (B) fissão heterocíclica do anel e (C) Retro Diels Alder.



Fonte: Adaptado de (HAMED et al., 2014, RUE; RUSH; VAN BREEMEN, 2018).

Os picos **7**, **9** e **12** são catequinas derivadas de flavan-3-ol; o Pico 7 ($t_R = 2.24$ min), apresentou duas possibilidades, sendo anotado como galocatequina ou epigalocatequina, a distinção dessas moléculas só poderia ser feita utilizando as técnicas de cromatografia quirállica e/ou mobilidade iônica. O pico 7 apresentou íon desprotonado $[M-H]^-$ em m/z 305.0672 ($C_{15}H_{14}O_7$), o estágio MS^2 apresentou fragmentos em m/z 219.0633, 179.0441 e 165.0117 Da advindos da perda de $C_4H_6O_2$, $C_6H_6O_3$, $C_7H_8O_3$, respectivamente. A perda de $C_4H_6O_2$ foi devido à clivagem do anel A do flavan-3-ol. A perda de $C_6H_6O_3$ ocorreu devido à fissão heterocíclica do anel e $C_7H_8O_3$ ocorreu por fissão retro-Diels-Alder. Segundo HOKKANEN et al (2009), LIU et al. (2016) e YAN et al. (2014) esse composto pode ser identificado como galocatequina ou epigalocatequina.

O pico **9** ($t_R = 3,03$ min) com íon desprotonado $[M-H]^-$ em m/z 289,0712 ($C_{15}H_{14}O_{12}$) foi anotado como catequina. Os padrões de fragmentação em m/z 245,0827 e 205,0558, proveniente de descarboxilação e da clivagem do anel A do flavon-3-ol, respectivamente. Os padrões descritos estão de acordo com o modelo identificado por (SALDANHA; VILEGAS; DOKKEDAL, 2013).

O Pico **12** ($t_R = 3,54$ min) foi anotado como a epigalocatequina galato possuindo íon desprotonado $[M-H]^-$ em m/z 457.0771 ($C_{20}H_{22}O_{12}$), em relação aos íons fragmentos (MS^2) foram formados íons produtos em m/z 169.0135 (Ácido gálico) e 125.0245 ($169.0135 - CO_2$), esta proposta encontra-se de acordo com o proposto por ABU-REIDAH *et al.* (2014).

Os picos **10**, **11** e **21** e **26**; ($t_R = 3,08$; $3,48$; $4,42$ e $4,65$ min) são espécies glicosídicas galoiladas. Apresentam íons desprotonados $[M-H]^-$ em m/z 453.1023 ($C_{20}H_{22}O_{12}$), 635.0890 ($C_{27}H_{24}O_{18}$), 939.1104 ($C_{41}H_{32}O_{26}$) e 1091.1217 ($C_{48}H_{36}O_{30}$), sendo descritos por (ABU-REIDAH *et al.*, 2015a; REGAZZONI *et al.*, 2013) e (GRACE *et al.*, 2016b) como hidroximetoxifenil-*O*-(*O*-galiol)-hexose, trigaloil glicose, pentagaloil hexosídeo e hexagaloil hexosídeo, respectivamente. Na comparação com os dados da literatura os quatro compostos anotados possuem padrões de fragmentação similares aos apresentados na Tabela 2. O fragmento m/z 169, é comum as quatro moléculas, provém da fragmentação do ácido gálico.

Foram anotados nove flavanóides glicosilados derivados da quercetina. Os compostos possuem íons desprotonados $[M-H]^-$ em m/z 463.0850 (pico **18**), m/z 463.0887 (pico **19**), m/z 615,0988 (pico **20**), m/z 433,0774 (pico **22**), m/z 477,0909 (pico **24**), m/z 433,0773 (pico **25**), m/z 433,0771 (pico **27**), m/z 585,0836 (pico **31**) e m/z 585,0896 (pico **32**). As moléculas supracitadas possuem em suas estruturas glicosídeos, os quais nas etapas de fragmentação geram perdas associadas a glicoses e pentoses, por exemplo. A substituição desses grupos glicosilados pode ser atribuída a fragmentações da ligação acetal entre a quercetina (m/z 301) e a unidade de açúcar.

Os compostos **17** e **18** ($t_R = 4,31$ min) são isômeros e possuem íons desprotonados $[M-H]^-$ m/z 463 ($C_{21}H_{20}O_{12}$), foram anotados como miricetina 3-*O*-ramnosídeo e quercetina 3-*O*-galactosídeo. Por sua vez os compostos **22**, **25** e **27** ($t_R = 4,59$; $4,65$ e $4,72$ min) que também são isômeros apresentam íons desprotonados m/z 433 ($C_{20}H_{18}O_{11}$). Estes foram identificados como quercetina 3-*O*-galactosídeo, quercetina 3-*O*-glucosídeo, quercetina 3-*O*-xilósídeo, quercetina 3-*O*-arabinopiranosídeo e quercetina 3-*O*-arabinofuronosídeo, respectivamente, os dados coincidem com os íons fragmentos da literatura sendo corroborados pelos trabalhos de (DORTA *et al.*, 2014b; ERŞAN *et al.*, 2016; SHUKRI; ALAN, 2010b). Os íons fragmentos descritos apresentam fragmentações idênticas geradas pela perda dos grupos de glicosídeos (açúcares) associados, gerando íons fragmento de m/z 301 e 300 Da.

Os picos **14**, **15** e **17** foram identificados como derivados da miricetina (ABU-REIDAH *et al.*, 2015a; DOU *et al.*, 2007; ERŞAN *et al.*, 2016; SHUKRI; ALAN, 2010b). Os picos **14** ($t_R = 3,84$ min) e **17** ($t_R = 4,31$ min) apresentaram íons desprotonados $[M-H]^-$ e- m/z

379.0847 Da ($C_{21}H_{20}O_{13}$) e m/z 463.0850 ($C_{21}H_{20}O_{12}$) e foram descritos como miricetina 3-*O*-glicosídeo e miricetina 3-*O*-ramnosídeo, respectivamente. Os dois compostos apresentam fragmentos em m/z 317.0508, devido à perda de uma unidade de glicose, e m/z 316.0214 advindo da saída do grupo $[M-H-Gli-2H]^-$. O pico **15** ($t_R = 3,88$ min) possui íon desprotonado $[M-H]^-$ em m/z 631.0956 ($C_{28}H_{24}O_{17}$) foi identificado como miricetina galoil-hexosídeo e apresentou fragmentos MS^2 de m/z 479.0898, pela perda de um galoil (152 Da), um íon e um fragmento relacionado ao ácido gálico [m/z 169 e 125 (169- CO_2), respectivamente)].

O pico **16** ($t_R = 4,09$ min) é descrito por (BERARDINI; CARLE; SCHIEBER, 2004; DORTA et al., 2014a) como tetra-*O*-galoil glicosídeo, apresentando íon desprotonado $[M-H]^-$ em m/z 787.0994 ($C_{34}H_{28}O_{22}$). Os íons fragmentos observados em MS^2 foram de m/z 635.0909, causada pela saída de uma unidade de galoil (152 Da), e m/z 617.0732 proveniente da perda do ácido gálico. As demais unidades presentes (169 e 125 Da) são fragmentações características de moléculas que possuem saída de ácido gálico, como descrito no pico **15**.

Os picos **23** e **30** ($t_R = 4,62$ e $4,83$ min) são isômeros possuindo os mesmos perfis espectrais nos estágios MS e MS^2 , com íon desprotonado $[M-H]^-$ em m/z 447 ($C_{21}H_{20}O_{11}$). Foram identificados por (ABU-REIDAH et al., 2015; DOU et al., 2007; ENGELS et al., 2012; SCHULZE-KAYSERS; FEUEREISEN; SCHIEBER, 2015) e foram anotados como canferol hexosídeo I ou luteolina hexosídeo I e canferol hexosídeo II ou luteolina hexosídeo II, respectivamente. O espectro de MS^2 possui fragmento em m/z 285 (aglicona), correspondendo a perda de uma unidade de hexose.

O pico **33** descrito por DORTA *et al.* (2014) possui íon desprotonado $[M-H]^-$ de m/z 349.0560 ($C_{16}H_{14}O_9$). Apresenta no espectro de MS^2 fragmentos de m/z 197.0853 e m/z 169.0060 referentes a perda de uma unidade de galoil e um molécula de água, respectivamente. O composto foi anotado como 2,4-di-hidroxi-3-(3,4,5-tri-hidroxi benzoil).

Foram identificados quatro metabólitos derivados de ácidos anacárdicos com diferentes cadeias laterais associadas à estrutura básica (**35**, **36**, **37**, **38**). Nas ramificações laterais podem ser encontradas 15 ou 17 carbonos com diferentes graus de insaturação. O pico **35** ($t_R = 14,04$ min) com íon desprotonado $[M-H]^-$ em m/z 341,2127 ($C_{22}H_{30}O_3$) foi descrito por (ERŞAN et al., 2016) como o ácido anacárdico (15:3), possuindo padrões de fragmentação em MS^2 m/z 297,2204 proveniente da perda de CO_2 do grupo carboxil fenólico. Também são relatados fragmentos em m/z 119,0547, advinda da fragmentação alil do anacárdico saturado e m/z 106,0334 gerado pela eliminação de grupo fenólico. Os picos **36**, **37** e **38** com íons desprotonados $[M-H]^-$ em m/z 369,2430 ($C_{24}H_{33}O_3$), m/z 345,2407 ($C_{22}H_{34}O_3$) e m/z 369,2430

(C₂₄H₃₆O₃) foram descritos por (ERŞAN et al., 2016) como anacárdicos do tipo (17:3), (15:1) e (17:2), respectivamente. Todos os padrões de fragmentações descritos desses ácidos assumem que as perdas de massas envolvidas, provém da saída de CO₂ do grupo carboxil fenólico.

5.3 Tratamento Quimiométrico

5.3.1 Análises dos componentes principais (PCA) dos clones de cajueiro anão BRS226 e CCP76 sob diferentes níveis de estresse hídrico

A PCA é um método de análise exploratória muito utilizado para reduzir a interpretação de dados multivariados de alta dimensionalidade das matrizes de dados complexos de amostras sem que haja grande perda de informações. Esse tipo de análise multivariada indica tendências sistemáticas dos dados amostrais através de agrupamentos que permitem interpretar e correlacionar as diferenças presentes nos dados (WORLEY; HALOUSKA; POWERS, 2013). O gráfico mostra a possível presença de observações atípicas, grupos, semelhanças, tendências e outros padrões nos dados, observações atípicas estão fora da elipse (MARCHETTI et al., 2015).

O presente estudo trata da diferença dos perfis metabolômicos de dois clones de cajueiro anão-precoce submetidos a estresse hídrico: o CCP76 (suscetível) e BRS226 (tolerante à seca). Assim como descrito no tópico 4.1, os clones foram submetidos a condições de irrigação (I) e sequeiro (S) em coletas distintas. O item 5.1 corresponde aos resultados de campo relacionados ao percentual de umidade do solo, apresentados as médias de umidade do solo nas camadas de 0-20, 20-40 e 40-60 cm de profundidade, na zona radicular de plantas de cajueiro dos clones CCP76 e BRS226, irrigadas e em sequeiro, no período de seca e chuvoso. Esses dados comprovam que os clones estudados estavam nas condições requeridas nesse estudo. A nomenclatura segue da seguinte forma: CCP76_S1 (clone suscetível, primeira coleta sem irrigação. – Em regime de sequeiro); CCP76_I1 (clone suscetível, irrigado, primeira coleta. O mesmo se aplica para os clones BRS226.

A hipótese levava em consideração a existência de diferenças no perfil metabólico dos clones tolerantes e susceptíveis à seca, ou seja, metabolicamente os clones deveriam se comportar distintamente, tanto em relação a sua tolerância à seca, quanto as condições de irrigação. Para tanto, a avaliação dos dados foi realizada via a aplicação de métodos multivariados de análise. O modelo obtido pelo gráfico de *scores* PCA-X (Ver Figura 14A) teve

uma variância explicada de 34.19% ($R^2X[1] = 0.2154$ e $R^2X[2] = 0.1265$), os dados foram submetidos a escala de Pareto.

Nas Figuras 14A e B são apresentados os scores e os loadings referentes a análise de PCA, os dados mostram agrupamentos distintos quando se compara o período de seca (1) com o período chuvoso (2). Durante o período de seca (1), houve experimentos em áreas não irrigadas (Em regime de sequeiro – representados pela abreviatura S1) e áreas irrigadas (Sem estresse hídrico – representadas pela letra I) para ambos os clones. Durante o período chuvoso (2), obviamente, as áreas de sequeiro (S) e irrigada (I), estavam sob as mesmas condições, ou seja, sob o mesmo volume de chuva, não fazendo sentido considerar que houvesse plantas em regime de estresse hídrico durante esse período. Vale ressaltar que a PCA mostrou um agrupamento restrito de amostras de controle de qualidade (QC), (dados não apresentados), o que indica que as diferenças nos regimes de irrigação e sequeiro durante nos dois períodos de coleta contam para a diferenciação entre grupos, em vez de variação instrumental ao longo das corridas cromatográficas.

A Figura 14A, mostra que em scores positivos de PC1, (período chuvoso), formaram-se dois agrupamentos distintos entre os clones BRS226 (tolerante) e CCP76 (susceptível à seca). Essas diferenças refletem as variações intrínsecas às respostas metabólicas dos clones durante o período chuvoso (2). Portanto, obviamente, as variações na constituição química (micromolecular), que levaram a formação desses dois agrupamentos, não são atribuídas ao fator seca, mas foram importantes para demonstrar que há diferenças na constituição micromolecular desses dois clones, mesmo quando submetidos as mesmas condições ambientais. De acordo com a Figura 14A, o clone CCP76_S2, possui uma maior dispersão de dados, ou seja, uma maior variabilidade pode ser vista em relação aos clones coletados no período chuvoso. O CCP76_S2, apresentou quatro de seus cinco exemplares situados em negativo de PC1, eixo que concentra a maior parte dos clones em período de seca. Esses dados demonstram uma dificuldade adaptativa da planta em estabelecer uma resposta metabólica específica, de maneira geral, o CCP76 apresenta dificuldades em produzir moléculas com especificidade e seletividade de resposta ao estresse hídrico. Outro ponto importante a se destacar é que o clone CCP76_I1, que corresponde a área irrigada, coletado no período de seca, foi agrupado juntamente aos clones coletados no período de chuva, de certa forma, esse resultado era esperado, pois trata-se de uma planta que não está sob efeito de estresse hídrico. Essa maior variabilidade do clone CCP76 pode estar relacionada a maior susceptibilidade à seca, o metaboloma da planta, parece não se adaptar a essa condição de

estresse, ao contrário do que ocorre com o clone tolerante à seca. No caso do BRS226, pode-se notar, que no período chuvoso os clones BRS226_S2 e BRS226_I2 possuem uma menor dispersão de amostras, formando um agrupamento mais homogêneo, podendo-se inferir que o BRS226 possui maior uniformidade de resposta metabólica quando comparado ao CCP76. No gráfico dos loadings (Figura 14B), em eixo positivo de PC1, do ponto de vista metabólico, para o período chuvoso, podemos atribuir a separação do clone CCP76 pelas altas concentrações de ácidos anacárdicos (17:2 e 17:3), enquanto o clone tolerante BRS226 apresentou maiores concentrações do flavonóide catequina.

Por outro lado, as amostras coletadas no período de seca (1), tanto em áreas não irrigadas, quanto nas áreas irrigadas se situaram em scores negativos de PC1 (Figura 14A). É interessante notar que o clone BRS226_S1 (Clone tolerante – Em condição de sequeiro) quando comparado ao seu congênere BRS226_I1 (Clone tolerante – Em condição de irrigação), formam agrupamentos muito próximos, o que demonstra que as respostas metabólicas desses clones são muito similares, apesar de estarem sob diferentes níveis de estresse hídrico. Esse fato aponta para a hipótese do clone BRS226 possuir uma tolerância constitutiva, específica, seletiva no que concerne ao perfil metabólico, para responder com maior eficiência aos danos causados pelo estresse hídrico. Em relação aos metabólitos que são responsáveis pela formação desses agrupamentos, o gráfico de loadings apresentado na Figura 14B demonstra que em negativo de PC1, temos biomarcadores que podem ter relação com a maior tolerância à seca, conferida ao clone BRS226, sendo eles o canferol hexosídeo I ou luteolina hexosídeo I/quercetina 3-*O*-ramnosídeo (23/24) e miricetina 3-*O*-ramnosídeo/quercetina 3-*O*-galactosídeo (17/18).

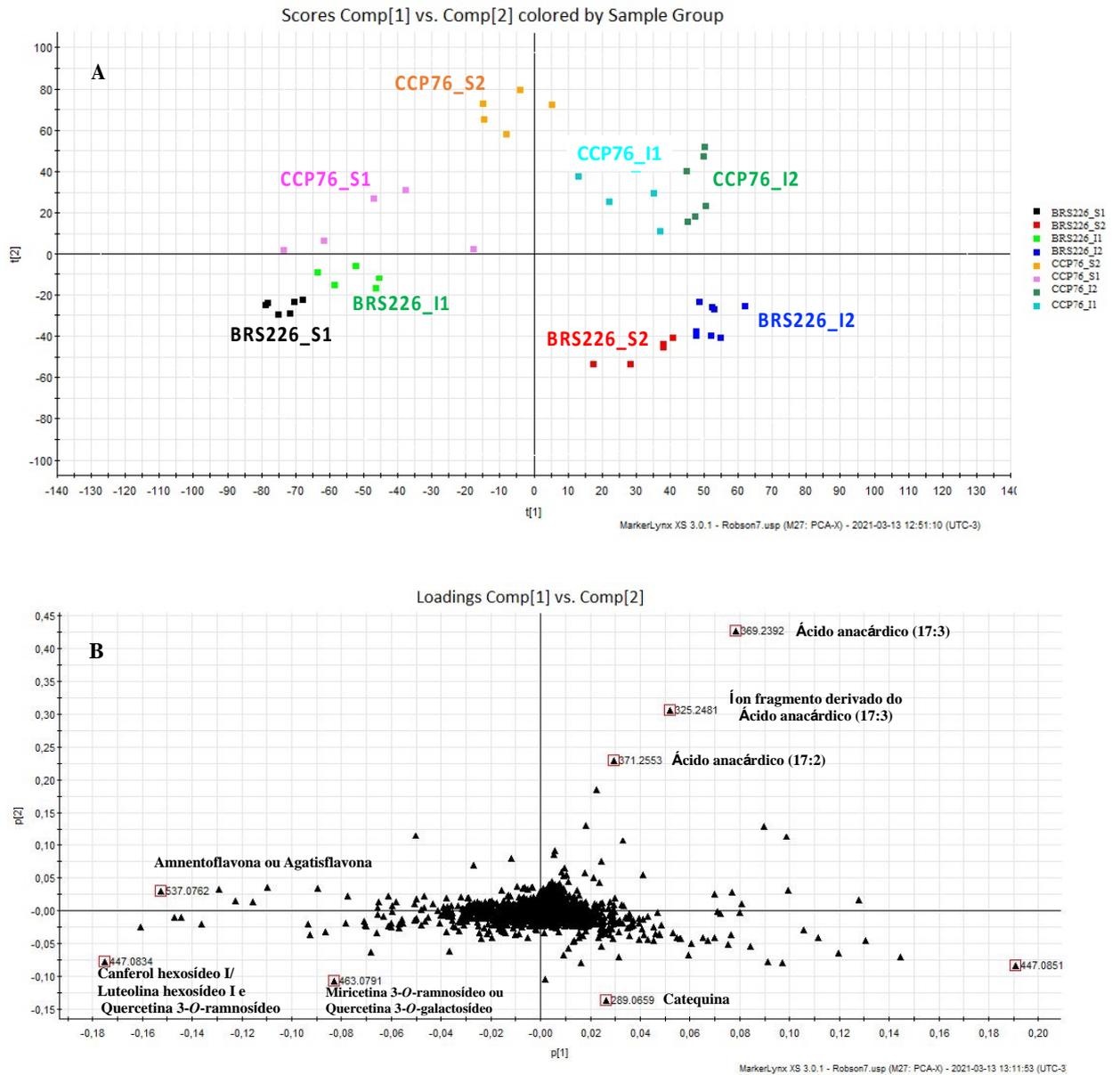
Com relação ao clone CCP76, no período de seca, representado pelo eixo negativo de PC1, o gráfico de loadings apresentou como biomarcador o conjunto de isômeros amentoflavona/agastiflavona (34), pode-se supor que, essas substâncias, apesar de serem biomarcadores descritos para o CCP76, elas também se aproximam muito do clone BRS226 (negativo de PC2), podendo se supor que também exista uma certa relação do marcador 34 com o clone tolerante.

Por sua vez, a separação apresentada no gráfico de scores em PC2 é caracterizada por demonstrar as diferenças entre os perfis metabólicos dos clones. Em positivo de PC2 temos os clones CCP76 e em negativo de PC2 encontram-se os clones BRS226. É notório também que o clone BRS226 (Tolerante à seca), possui menor dispersão de resposta metabólica. O gráfico de loadings (Figura 14B) apresenta um distinto perfil micromolecular para os dois clones, onde o CCP76 se distingue pelas maiores concentrações de ácidos anacárdicos (17:2 e

17:3) e amentoflavona/agastiflavona, enquanto o clone BRS226 apresenta perfis químicos que se destacam pela presença de catequina e flavonóides glicosilados derivados de canferol, quercetina, miricetina.

A literatura tem descrito os efeitos do estresse oxidativo em plantas, ocasionado pelo déficit hídrico, que levam à produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e dos respectivos mecanismos de ação metabólicos que as plantas dispõem para minimizar tais danos causados a planta. Nesse processo, flavonóides e polifenóis, são os compostos naturais, adaptáveis que permitem plantas combater as ROS (TREML; ŠMEJKAL, 2016). Os dados obtidos nesse trabalho, principalmente em relação ao clone tolerante, estão alinhados com estudos publicados. Em resposta à seca, Azhar e colaboradores, demonstraram um aumento do nível dos metabólitos secundários endógenos que foi notado em várias plantas medicinais. Por exemplo, um nível elevado de compostos fenólicos foi observado em *T. ammi* sob estresse hídrico (AZHAR et al., 2011). Em outro estudo, metabólitos secundários como rutina, quercetina, ácido betulínico e artemisinina foram observados em altas concentrações, em plantas como *Hypericum brasiliense* e *Artemisia* (VERMA; SHUKLA, 2015). Similarmente, em *Glechoma longituba*, flavonóides foram detectados em elevadas concentrações relativas sob condições de estresse hídrico e algumas plantas como *Ocimum americanum* e *Ocimum basilicum* apresentaram concentrações significativamente aumentadas de vários macronutrientes, óleos essenciais e prolinas sob estresse hídrico (ASHRAF et al., 2018; ZHANG et al., 2013). Na comparação dos resultados apresentados na literatura e com base nos perfis de biomarcadores obtidos para o clone tolerante, podemos inferir que os resultados obtidos para o clone BRS226 estão alinhados aos dados já publicados por grupos de pesquisa que estudam as variações metabólicas ligadas ao estresse hídrico.

Figura 14 – Gráfico de scores (A) e *loadings* (B) para os extratos das folhas de *Anacardium Occidentale* L analisados por UPLC-QTOF-MS^E.



Fonte: Elaborado pelo Autor (2021).

5.3.2 Biomarcadores de tolerância à seca

Biomarcadores são considerados moléculas responsáveis pela resposta bioquímica de um organismo ao estresse, sendo importantes formas de adaptação. A busca por biomarcadores em plantas tornou-se relevante com a grande procura de ampliação e melhoramento de colheitas, especialmente, em regiões secas e não propícias ao plantio (RINSCHEN et al., 2019). A partir desse contexto, e através dos dados obtidos e apresentados nas Figuras 15, 16 e 17, o estudo dos dados a seguir apontaram possíveis moléculas que seriam responsáveis pela maior tolerância à seca do clone BRS226 frente ao CCP76, bem como o perfil micromolecular de resposta dos clones suscetíveis utilizando-se de outras ferramentas estatísticas como o *S-Plot* e VIP obtidos dos dados OPLS-DA.

Os gráficos de *S-Plot* contêm as relações presentes entre as variáveis com maior variância entre os grupos, tornando possível a visualização do(s) metabólito(s) de maior importância. A identificação das variáveis foi feita por pontos, nos quais estão presentes as informações de (t_R) – tempo de retenção e (m/z) – razão massa/carga. Devido ao grande volume de dados utilizados nas matrizes geradas por cromatografia/espectrometria de massas, a escolha dos marcadores nos gráficos de dispersão, não podem ser sempre atribuídas aos pontos mais distantes do eixo central. Para isso, ferramentas estatísticas como o VIP são utilizadas para determinar quais daqueles pontos apresentam maior relevância no grupo de amostras. No presente estudo foram utilizados $VIP > 1$ e $p_{value} < 0,05$.

5.3.3 Análise em OPLS-DA dos clones de cajueiro anão BRS226 e CCP76 sob diferentes níveis de estresse hídrico

O modelo de análise OPLS-DA foi utilizado com objetivo de refinar os resultados obtidos através da análise por PCA e aprofundar a descoberta de mais biomarcadores, identificando as variáveis (Micromoléculas) que mais contribuíram para o entendimento do comportamento e separação os grupos. Para tanto, foram utilizados os gráficos de Scores, VIP e *S-Plot*. A identificação dos metabólitos surgiu a partir da comparação entre os clones considerando o período e a presença ou não de irrigação.

Os escores $t[1]$ (eixo x) e $[1]$ (eixo y) representam as duas novas variáveis mais importantes para separação dos dados. Cada ponto no gráfico corresponde a uma observação. Os grupos são mostrados em cores diferentes e a separação dos grupos é nítida. Os valores de $t[1]$ mostram a variação dentro de cada classe. Essa variação pode ser causada por modificações

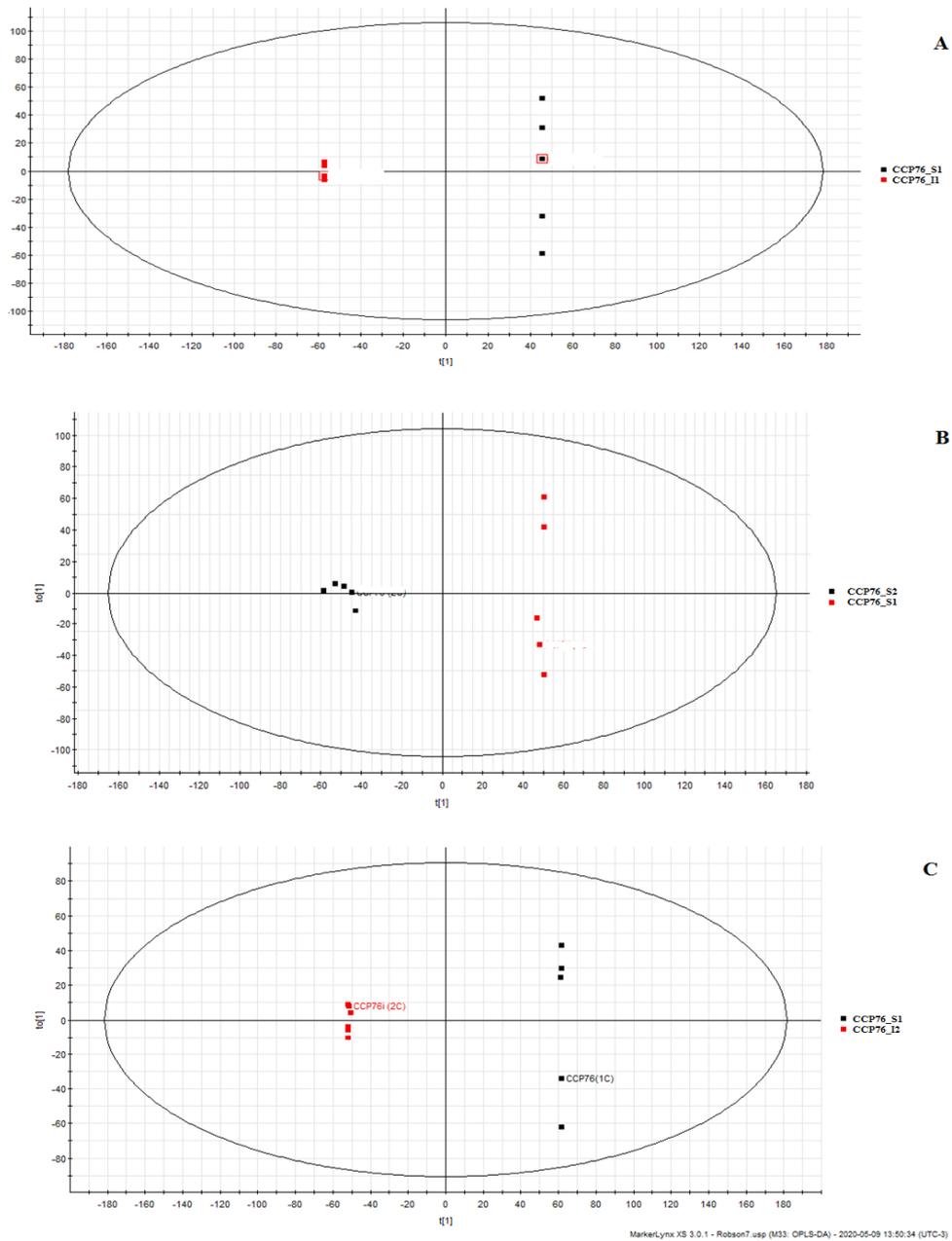
biológicas ou por alterações sistemáticas na configuração experimental. Como observado na Figura 15, todos os grupos foram separados em quadrantes distintos, apresentando similaridades e diferenças intra e intergrupos.

A precisão e confiabilidade do modelo aplicado foram medidas por dois parâmetros: a variável explicada (R^2Y) e variável predita (Q^2). De maneira mais abrangente os dois parâmetros são ajustes do modelo de previsão de comportamento amostral. O R^2Y busca demonstrar o quanto do modelo se aproxima dos dados originais enquanto o Q^2 busca predir a aproximação das variáveis. Para os modelos aplicados nos dados os valores foram maiores ou iguais a $R^2X = 0,98$ e Q^2 varia de 0,88 a 0,98, o que indica uma boa qualidade do modelo.

Nessa abordagem, os clones CCP76 e BRS226 foram comparados dois a dois, levando-se em consideração amostras coletadas no período de seca, onde clones nas condições de seca foram comparados a clones sob irrigação (S1 vs I1). O período de coleta, onde amostras coletadas na época de seca foram comparadas em relação àquelas coletadas no período chuvoso (S1 vs S2 e S1 vs I2). Da mesma forma, foram realizadas comparações para o clone BRS226 onde os gráficos de OPLS-DA foram obtidos (Dados não demonstrados).

Dessa forma pôde-se notar que os clones susceptíveis CCP76_S1, em condição de sequeiro e não irrigados (Figura 15A), apresentam uma maior dispersão em relação ao clone irrigado (CCP76_I1). Na Figura 15B podemos visualizar a comparação entre o período de seca e o período chuvoso, de acordo com o gráfico de OPLS-DA, podemos perceber que o clone CCP76_S1 (Período de seca) apresenta também uma maior variabilidade metabólica em relação ao CCP76_S2 (Período chuvoso). Novamente, a resposta metabólica, apresenta-se mais heterogênea, dessa vez em relação ao período de coleta. Por sua vez, na comparação da resposta entre o clone CCP76_S1 (Sequeiro) com o CCP76_I2 (Período chuvoso) o resultado da dispersão dos dados se repete, o que demonstra uma baixa capacidade do clone para se adaptar as condições de escassez hídrica.

Figura 15 - Gráfico de scores OPLS-DA para os extratos de folhas da *Anacardium Occidentale* L. do clone CCP76: (A) CCP76_S1 x CCP76_I1; (B) CCP76_S1 X CCP76_S2; (C) CCP76_S1 x CCP76_I2



Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

5.3.3.1 Análise por VIP e S-Plot do perfil nos clones suscetíveis (CCP76)

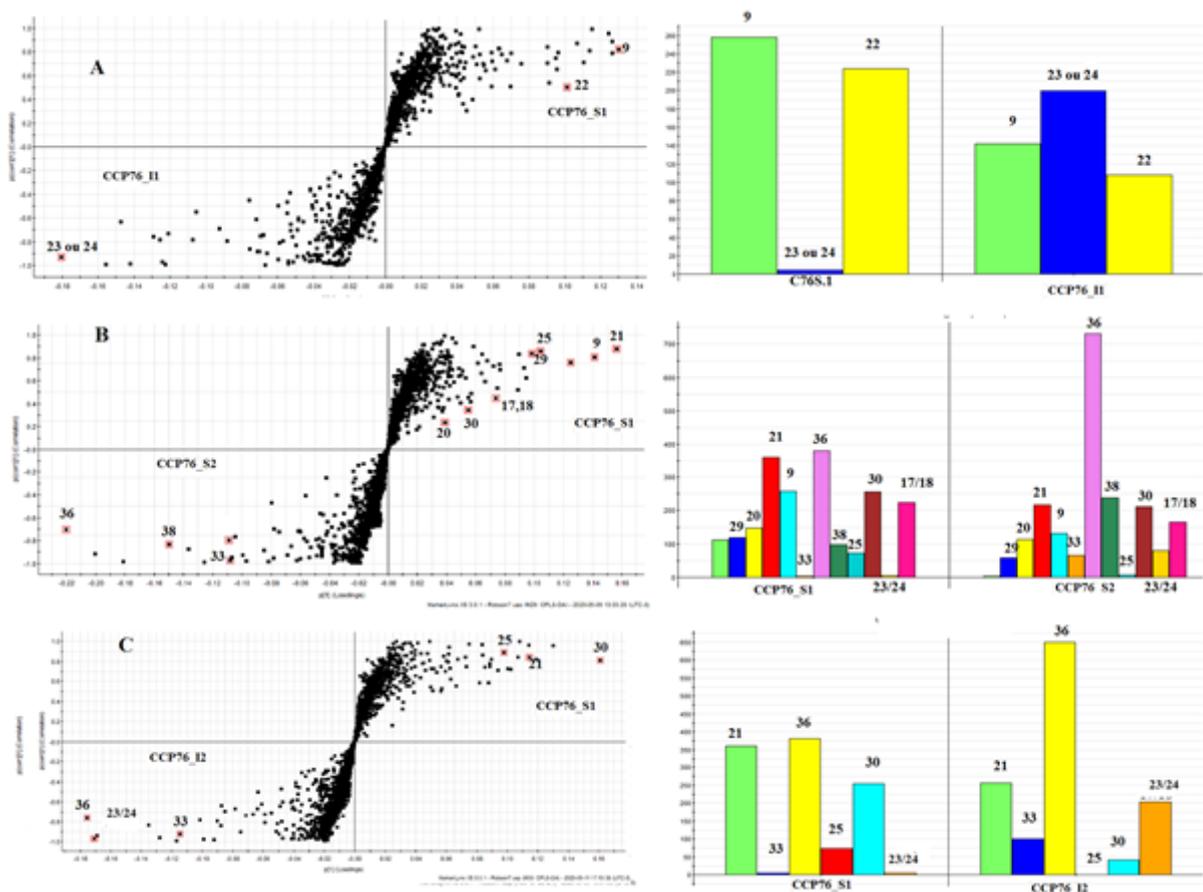
Na Figura 16A e Tabela 4, foram atribuídos possíveis biomarcadores, em relação ao clone que estava em regime de sequeiro e sem irrigação (CCP76_S1) em comparação ao clone irrigado (CCP76_I1). Para o CCP76_S1 as micromoléculas catequina (**9**) e a quercetina 3-*O*-xilósídeo (**22**) destacaram-se como biomarcadores de tolerância à seca. Por outro lado, o CCP76_I1, coletado no período de seca, porém em regime de irrigação, apresentou como biomarcador o canferol hexosídeo I ou Luteolina hexosídeo I /quercetina 3-*O*-ramnosídeo (**23/24**). Na Figura 16B, e Tabela 5, são apresentados os dados de comparação entre o clone CCP76_S1 (Período de seca, regime de sequeiro) e CCP76_S2 (Período de chuva), o resultado da análise por S-Plot demonstra que o clone CCP76_S1 possui como biomarcadores a Cianidina 3-*O*-(2''galoil)-galactosídeo (**29**), 2,4-di-hidroxi-3-(3,4,5-tri-hidroxi benzoil), (**9**) Catequina, (**17/18**) Miricetina 3-*O*-ramnosídeo ou Quercetina 3-*O*-galactosídeo, (**20**) Quercetina galoil hexosídeo, (**21**) Pentagaloil hexosídeo, (**30**) Canferol hexosídeo II ou Luteolina hexosídeo II.

As Figuras 16 (B) e (C) e Tabela 6, mostraram que as respostas do clone CCP76_S1 em condições de seca apresentam uma maior variação metabólica, quando comparamos seu metaboloma com sistemas irrigados e em período chuvoso. Na Figura 16B temos sete biomarcadores (**9, 17/18, 20, 21, 25, 29, 30**) e na Figura 16C temos três biomarcadores (**21, 25 e 30**).

Uma gama significativa dos biomarcadores identificados pertence à classe dos flavonóides, e compostos fenólicos, esses auxiliam na intolerância a uma vasta gama de estresses. Apesar do clone CCP76 ser susceptível à seca e, portanto, possivelmente não apresentar biomarcadores específicos ou em concentrações adequadas para tal função, as moléculas encontradas podem apresentar também outras funções além da tolerância à seca. A literatura relata para essa classe de moléculas o papel de proteção contra agentes estressores tais como frio, dessecação, alta luminosidade, toxicidade de metais, privação de nutrientes, pragas e patógenos ataque, senescência, estresse hídrico/salinidade e luz ultravioleta (ROBERTS, 2018). A biossíntese e acúmulo de metabólitos secundários ocorrem geralmente em determinados órgãos e tecidos estressados e são específicos do estágio de desenvolvimento da planta (YANG et al., 2018). Simultaneamente, substâncias aromáticas, como compostos fenólicos, são formadas através da via do ácido chiquímico (principalmente em plantas superiores) ou através da via mevalônica (KRZYZANOWSKA; CZUBACKA; OLESZEK, 2010).

Variações metabólicas são maiores quando se compara os clones em regime de sequeiro em ambas as coletas. A presença de maior umidade no solo e chuvas recorrentes podem causar um aumento na taxa metabólica devido a incidência de doenças e pragas durante esse período, o que dificulta o estabelecimento de uma correlação direta entre causa e efeito. A irrigação, mesmo em período de chuva, contribui para uma maior homogeneidade das respostas frente ao ambiente. Por outro lado, quando se tem uma situação de estresse hídrico, é possível que plantas susceptíveis tentem aumentar a taxa de biossíntese de moléculas para dar respostas em função dos danos sofridos pelo sistema celular. Entretanto, a capacidade de produzir moléculas que sejam eficientes do ponto de vista da biossíntese de moléculas com alta seletividade e especificidade na redução de danos causados pelo estresse oxidativo parece ser o grande limitador de resposta do clone CCP76.

Figura 16 - Análise de S-Plot e gráficos de barras das duas variáveis de clone: (A) CCP76_S1 x CCP76_I1; (B) CCP76_S1 X CCP76_S2; (C) CCP76_S1 x CCP76_I2.



Fonte: Elaborado pelo Autor (2021).

Tabela 4 – Compostos discriminantes da comparação dos clones CCP76_S1 e CCP76_I1

Composto	t_R	m/z	Average CCP76_S1	Average CCP76_I1	VIP
9. Catequina	3.03	289.0712	257.586	142.293	5.38685
22. Quercetina 3- <i>O</i> -xilósídeo	3.59	433.0771	73.3445	2.27E-06	4.20141
23/24. Canferol hexosídeo I ou Luteolina hexosídeo I e Quercetina 3- <i>O</i> -ramnosídeo	4.62	447,0927	4.81449	199.496	7.46071

Fonte: Elaborado pelo Autor (2021).

Tabela 5 – Compostos discriminantes da comparação dos clones CCP76_S1 e CCP76_S2.

Composto	t_R	m/z	Average CCP76_S1	Average CCP76_S2	VIP
9. Catequina	3.03	289.0712	257.586	131.147	6.45064
17/18. Miricetina 3- <i>O</i> -ramnosídeo ou Quercetina 3- <i>O</i> -galactosídeo	4.31	463,0877	223.683	165.557	3.1528
20. Quercetina galoil hexosídeo	4.39	615.0988	147.057	112.865	1.81081
21 Pentagaloil hexosídeo	4.42	939.1104	361.007	217.332	7.23355
23/24. Canferol hexosídeo I ou Luteolina hexosídeo I e Quercetina 3- <i>O</i> -ramnosídeo	4.62	447,0927	4.81449	79.8536	4.95141
25. Quercetina 3- <i>O</i> - arabinopiranosídeo	4.65	433.0773	73.3445	7.68492	4.83054
29. Cianidina 3- <i>O</i> -(2''galoil)- galactosídeo	4.74	599.1037	2.93069	52.4513	4.60078
30. Canferol hexosídeo II ou Luteolina hexosídeo II	4.83	447,0927	255.287	210.627	2.47972
33. 2,4-di-hidroxi-3-(3,4,5-tri- hidroxi benzoil) oxibenzoato de etila	5.59	349.0560	4.06418	65.7206	5.01479
36. Ácido anacárdico (17:3)	15.43	369.2430	381.162	730.412	10.1139
38. Ácido anacárdico (17:2)	16.20	371.2586	97.6822	238.178	7.05161

Fonte: Elaborado pelo Autor (2021)

Tabela 6 – Compostos discriminantes da comparação dos clones CCP76_S1 e CCP76_S2.

Composto	t _R	m/z	Average CCP76_S1	Average CCP76_S2	VIP
23/24. Canferol hexosídeo I ou Luteolina hexosídeo I e Quercetina 3- <i>O</i> -ramnosídeo	4.61	463,0877	4.81448	204.167	8.4031
21 Pentagalolil hexosídeo	4.42	939.1104	361.007	256.419	5.64348
25. Quercetina 3- <i>O</i> -arabinopiranosídeo	4.65	433.0773	73.3445	1.27082	4.82116
30. Canferol hexosídeo II ou Luteolina hexosídeo II	4.83	447,0927	255.287	41.8119	7.91372
33. 2,4-di-hidroxi-3-(3,4,5-tri-hidroxi benzoil) oxibenzoato de etilo	5.59	349.0560	5.34265	99.9215	5.64477
36. Ácido anacárdico (17:3)	15.43	369.2430	381.162	649.282	8.62291

5.3.3.2 Análise por VIP e S-Plot do perfil metabolômico dos clones tolerantes frente aos susceptíveis à seca.

As análises por S-Plot, demonstram comparações em pares, que resultaram, em um conjunto de moléculas que estavam em elevadas concentrações relativas nos clones CCP76 e BRS226 (Vide Figura 17). Esses clones foram submetidos a diferentes condições de estresse hídrico. Foi possível por essas comparações caracterizar os biomarcadores de resposta ao estresse hídrico. Os compostos mais importantes, caracterizados como biomarcadores, apresentam valores de VIP > 1, e estão descritos nas Tabelas de 7 a 10. As intensidades medidas são baseadas na média dos valores para cada composto no grupo.

Nas comparações demonstradas na Figura 17A e Tabela 7, entre os clones BRS226_S1 e CCP76_S1, ambos em condição de sequeiro, pode-se notar que quatro moléculas se apresentavam em maiores concentrações relativas no clone BRS226_S1 (**9, 30, 31 e 34** – biomarcadores de tolerância à seca), enquanto o clone CCP76_S1 apresentou cinco outros biomarcadores (**20, 21, 36, 37, 38**) que provavelmente foram produzidos em resposta à seca, porém não foram efetivamente eficientes no combate aos efeitos negativos na planta.

Na Figura 17B e Tabela 8, o BRS226_I1 foi coletado no período de seca, porém sob irrigação, nessas condições, cinco biomarcadores relacionados foram determinados (**17/18, 26, 30, 34, 35**), essas moléculas têm relação com o metabolismo basal do clone, portanto, nessa situação, não são candidatas a biomarcadores de tolerância à seca. O clone CCP76_S1,

apresentou seis biomarcadores em condição de sequeiro (**9, 21, 36, 37 e 38**), porém essas moléculas não foram em conjunto eficientes como fontes de tolerância à seca.

Na Figura 17C, Tabela 9, encontramos a comparação entre o BRS226_S2 coletado no período de chuva, apresentando como biomarcadores em nível basal as moléculas (**23/24**). Na comparação, o clone CCP76_S1, coletado no período de seca, o mesmo apresentou quatro biomarcadores (**21, 29, 36 e 38**), que per si não são caracterizados como moléculas eficazes no combate aos efeitos seca.

Sob o período chuvoso a Figura 17A' e Tabela 10, foi determinado para o BRS226_I2 os biomarcadores **23/24**, essas substâncias estão relacionadas a tolerância constitucional do clone, as substâncias **23/24** fazem parte do metabolismo basal desse clone. Por outro lado, o CCP76_S1 apresentou três biomarcadores, sendo eles **21, 36 e 38** como alternativa de combate ao estresse no período de seca, porém mais uma vez, as rotas biossintéticas escolhidas pelo CCP76 não foram bem-sucedidas.

Para avaliar a tolerância constitucional do clone BRS226, foram comparadas as respostas dos clones no período de seca, com os clones em regime de irrigação, e em situação de sequeiro (Figura 17B' e Tabela 11). Dessa forma o BRS226_S1 apresentou como biomarcadores específicos as moléculas **9, 11, 23/24 e 30**. Esse conjunto de biomarcadores possui moléculas em comum com outras comparações que foram realizadas, o que aponta para um alto grau de especificidade de resposta do clone BRS226 frente ao estresse hídrico. Isso reflete também os dados de menor dispersão de amostras encontrados ao longo das análises envolvendo estatística multivariada. O clone BRS226_I1, que estava sob sistema de irrigação, apresentou como biomarcadores de nível basal de metabolismo as moléculas **26 e 36**.

E por fim, a Figura 17 C' juntamente com a Tabela 12, trazem a comparação do BRS226_S2 (Período chuvoso) versus BRS226_S1 (período seco), onde encontramos como biomarcadores de tolerância à seca os metabólitos **30 e 34**, que também já haviam sido detectados como resposta ao estresse hídrico em comparações anteriores. Por outro lado, o clone BRS226_S2 apresentou os biomarcadores **23/24**, que também vem sendo detectado como resposta constante nos clones tolerantes, tanto em plantas estressadas como não estressadas, o que reforça o caráter de tolerância constitucional dessa molécula no BRS226.

Os padrões discutidos em relação aos biomarcadores de tolerância e de susceptibilidade dos clones apontam para a forte presença de moléculas discriminantes seguindo padrões parecidos com o observado na análise de PCA. Os dados apontam que quando

submetido à irrigação, o BRS226 apresenta, de forma geral, o seguinte conjunto de biomarcadores (**17/18, 23/24, 26, 30, 34, e 35**). Com relação aos biomarcadores de tolerância ao estresse hídrico do BRS226, foram determinados os seguintes biomarcadores, (**9, 11, 23/24, 30, 31 e 34**), quando se comparam os dados do período de coleta (Período seco – com e sem irrigação) e período chuvoso, se encontra uma interseção interessante, pois há forte presença dos biomarcadores **9, 23/24 e 30**, essas moléculas podem, portanto conferir uma resistência constitucional ao clone BRS226, pois elas se mantêm sob condições de estresse e na ausência dele.

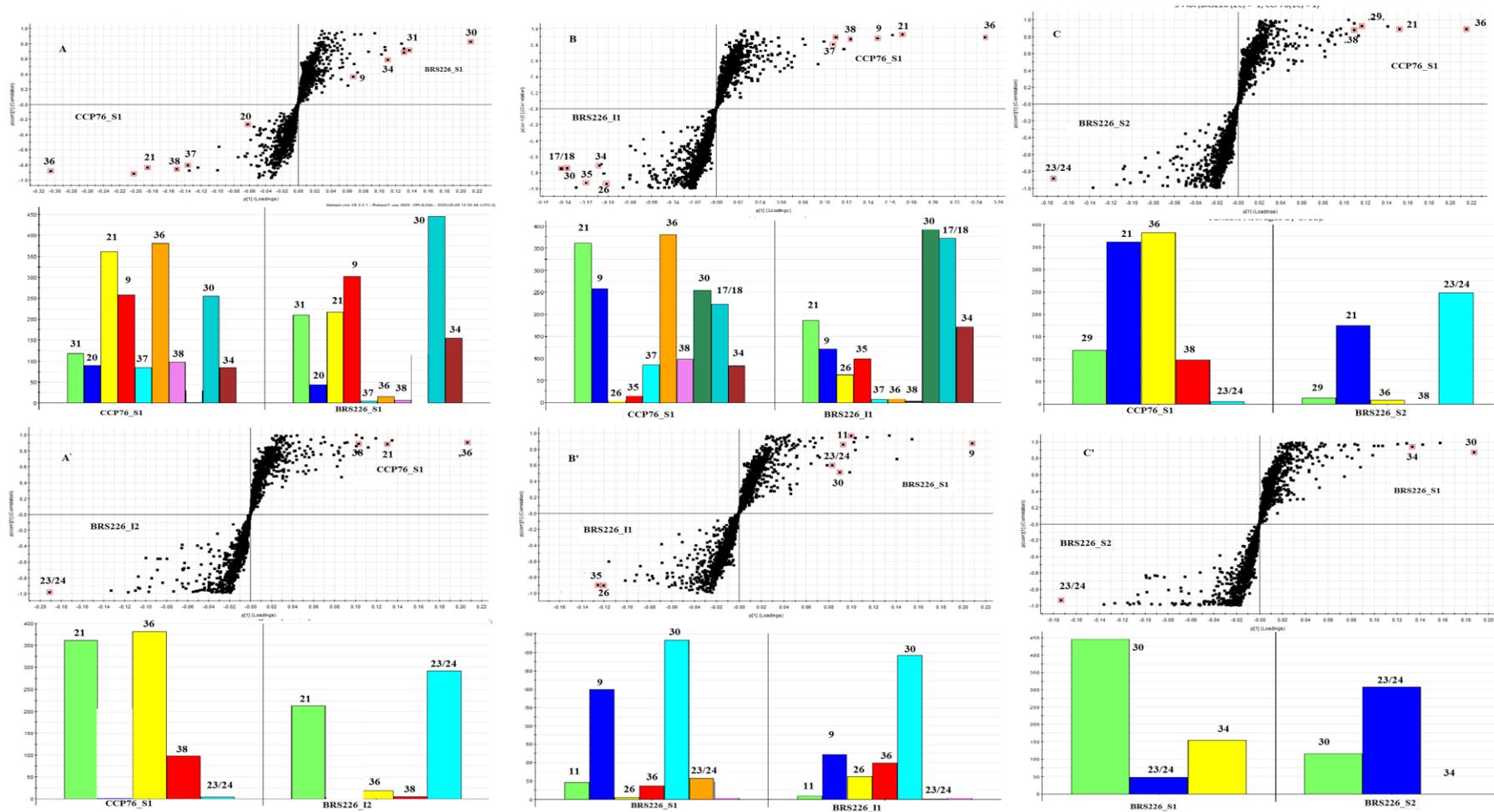
Pesquisas têm demonstrado a importância dos flavonóides nos processos de resistência ou de maior tolerância à seca. Estudos reportam um aumento no teor de flavonóides e polifenóis na samambaia *Salvia sinaloensis* (101% de flavonóides e 139% de fenol total foram relatados em 50%) (CASER et al., 2019). Quan e colaboradores relataram que uma cultivar de arroz denominada Q8, foi o mais tolerante entre 20 outras avaliadas. A cultivar possuía teores de metabólitos na ordem de 65,3 mg de ácido gálico equivalente e 37,8 mg de rutina equivalente, que foram significativamente maiores do que Q2 (mais suscetível à seca), que possuía 33,9 mg de ácido gálico equivalente e 27,4 mg de rutina equivalente (QUAN et al., 2016). Em estágios iniciais de seca, duas espécies de samambaias comestíveis *Matteuccias truthiopteris* (L.) Todar. e *Athyrium multidentatum* (Doll.), apresentaram maior resistência, que foi expressa como uma diminuição do conteúdo relativo de água na folha, seguida de um aumento nos níveis de metabólitos secundários (flavonóides, fenóis totais, conteúdo de proantocianidinas). Uma diminuição no conteúdo de sesamina, óleo e quercetina foi observada em *Sesamum indicum* L. sob a condição de estresse hídrico. No entanto, um aumento no conteúdo total de flavonóides, fenólicos e vários polifenólicos, bem como uma maior atividade de eliminação de radicais, foi observado na mesma planta sob estresse hídrico (KERMANI et al., 2019).

Quanto aos biomarcadores de resposta à seca, relacionados ao clone susceptível CCP76 podem ser sumarizados como as moléculas (**9, 20, 21, 29, 36, 37 e 38**), é interessante notar que existe uma forte presença de ácidos anacárdicos no clone CCP76. Pode-se supor que o CCP76 opte por essa rota Biosintética como forma de mitigar os efeitos do ROS, porém como observado em campo, esse clone não responde bem ao estresse hídrico. Portanto, infere-se que, principalmente a classe dos ácidos anacárdicos, não é suficientemente eficaz no combate dos efeitos da seca. Apesar dos ácidos anacárdicos (**36, 37 e 38**) serem um grupo molecular discriminante no clone CCP76, as maiores concentrações dessas moléculas são encontradas

especialmente em época chuvosa e em períodos de irrigação, o que indica que não há uma especificidade de resposta à seca por parte dessa classe de moléculas. Talvez elas sejam biossintetizadas em resposta a pragas e doenças. Os valores encontrados para essas moléculas em clones suscetíveis superam, em alguns casos, 10^6 vezes o encontrado em tolerantes. Importante ser citado que a produção desses ácidos pelos clones suscetíveis é inversamente proporcional ao encontrado tolerantes, e que nos clones do tipo CCP76 há um crescimento na produção de ácidos anacárdicos com o aumento da disponibilidade hídrica.

Por sua vez, há evidências de que a catequina (**9**) seja considerada uma forte candidata a marcador de estresse hídrico, pois está presente em quantidades relativas significativas em ambos os clones sob condições de estresse e sua participação efetiva decresce com a irrigação. Os compostos fenólicos são produzidos em maiores quantidades em plantas estressadas, são associadas a esse fato, a característica antioxidante dessas moléculas, que são capazes de oxidarem unilateralmente e pararem os radicais livres nas células, o que pode ser visto como uma forma de adaptação. São relatados em folha de tomate, folhas de salgueiro e folhas de trigo aumento excessivo da presença de flavonóides e ácidos fenólicos, quando eles são acometidos de falta d'água. (GRIESSER et al., 2015).

Figura 17 – Análise de S-Plot e gráficos de barras das duas variáveis de clone: (A) CCP76_S1 x BRS226_S1; (B) CCP76_S1 X BRS226_I1; (C) CCP76_S1 x BRS226_S2; (A') CCP76_S1 x BRS226_I2; (B') BRS226_S1 x BRS226_S1 e (C') BRS226_S1 x BRS226_I2.



Fonte: Elaborado pelo Autor (2021)

Tabela 7 - Compostos discriminantes da comparação dos clones CCP76_S1 x BRS226_S1.

Composto	t _R	m/z	Average CCP76_S1	Average BRS226_S1	VIP
9. Catequina	3.03	289.0659	257.586	301.674	3.12413
21 Pentagalolil hexosídeo	4.42	939.1104	361.007	217.372	8.53781
20. Quercetina galoil hexosídeo	4.39	615.0988	90.0004	43.6914	2.64701
30. Canferol hexosídeo II ou Luteolina hexosídeo II	4.83	447,0927	255.287	445.055	9.72756
31. Quercetina galoil pentosídeo	4,87	585,0880	117.651	209.339	6.3212
34. Amnentoflavona ou Agatisflavona	7,14	537,0822	83.9211	154.571	4.94653
36. Ácido anacárdico (17:3)	15.43	369.2430	381.162	15.46	14.0098
37. Ácido anacárdico (15:1)	16,01	345,2430	84.4123	5.12601	6.23034
38. Ácido anacárdico (17:2)	16.20	371.2586	97.6822	6.64118	6.88332

Fonte: Elaborada pelo autor (2020)

Tabela 8 - Compostos discriminantes da comparação dos clones CCP76_S1 x BRS226_I1.

Composto	t _R	m/z	Average CCP76_S1	Average BRS226_I1	VIP
9. Catequina	3.03	289.0659	257.586	121.421	6.89612
17/18. Miricetina 3- <i>O</i> -ramnosídeo ou Quercetina 3- <i>O</i> -galactosídeo	4.21	463.0791	223.683	372.868	6.72334
21 Pentagalolil hexosídeo	4.42	939.1104	361.007	186.599	8.09109
26. Hexagalolil hexosídeo	4,65	1091,1213	2.98676	61.9491	4.70342
30. Canferol hexosídeo II ou Luteolina hexosídeo II	4.83	447,0927	255.287	392.355	6.41105
34. Amnentoflavona ou Agatisflavona	7,14	537,0822	83.9211	170.614	4.92553
35. Ácido anacárdico (15:3)	14,04	341,2117	15.331	99.0256	5.57552
36. Ácido anacárdico (17:3)	15.43	369.2430	381.162	7.88991	11.5404
37. Ácido anacárdico (15:1)	16,01	345,2430	84.4123	6.08212	5.00491
38. Ácido anacárdico (17:2)	16.20	371.2586	97.6822	1.97522	5.79059

Fonte: Elaborada pelo autor (2021)

Tabela 9 - Compostos discriminantes da comparação dos clones CCP76_S1 x BRS226_S2.

Composto	t _R	m/z	Average CCP76S_1	Average BRS226_S2	VIP
21 Pentagalolil hexosídeo	4.42	939.1104	361.007	174.494	7.34713
23/24. Canferol hexosídeo I ou Luteolina hexosídeo I e Quercetina 3- <i>O</i> -ramnosídeo	4.62	447.0851	4.81448	248.351	8.37245
29. Cianidina 3- <i>O</i> -(2''galoil)- galactosídeo	4.72	599.0963	118.719	12.8211	5.65827
36. Ácido anacárdico (17:3)	15.43	369.2430	381.162	7.7413	10.3924
38. Ácido anacárdico (17:2)	16.20	371.2586	97.6822	1.57E-06	5.2805

Tabela 10 - Compostos discriminantes da comparação dos clones CCP76_S1 x BRS226_I2.

Composto	t_R	m/z	Average CCP76_S1	Average BRS226_I2	VIP
21 Pentagalolil hexosídeo	4.42	939.1104	361.007	212.184	6.82105
23/24. Canferol hexosídeo I ou Luteolina hexosídeo I e Quercetina 3-O-ramnosídeo	4.61	447.0851	4.81449	291.771	9.96319
36. Ácido anacárdico (17:3)	15.43	369.2430	381.162	18.7027	10.7068
38. Ácido anacárdico (17:2)	16.20	371.2586	97.6822	5.7027	5.34532

Fonte: Elaborado pelo Autor (2021).

Tabela 11 - Compostos discriminantes da comparação dos clones BRS226_S1 x BRS226_I1.

Composto	t_R	m/z	Average BRS226_S1	Average BRS226_I1	VIP
9. Catequina	3.03	289.0659	299,472	121,421	9,73487
23/24. Canferol hexosídeo I ou Luteolina hexosídeo I ^e Quercetina 3-O-ramnosídeo	4.61	447.0851	56,3077	1,05255	4,0879
26. Hexagalolil hexosídeo	4,65	1091,1213	4,93957	61,9491	5,61481
30. Canferol hexosídeo II ou Luteolina hexosídeo II	4.83	447,0927	433,03	392,355	3,79513
35. Ácido anacárdico (15:3)	14,04	341,2117	36,5308	99,0256	5,86365

Fonte: Elaborado pelo Autor (2021).

Tabela 12 - Compostos discriminantes da comparação dos clones BRS226_S2 x BRS226_I2.

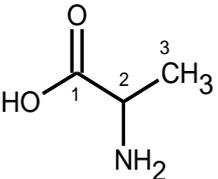
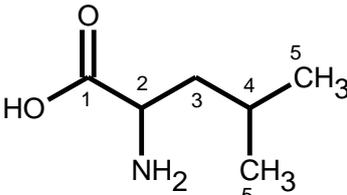
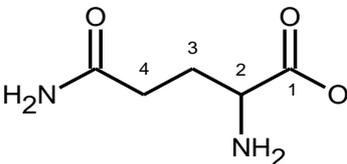
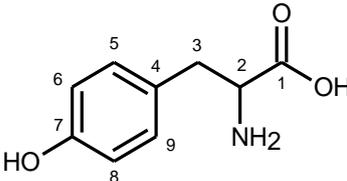
Composto	t_R	m/z	Average BRS226_S1	Average BRS226_I1	VIP
23/24. Canferol hexosídeo I ou Luteolina hexosídeo I e Quercetina 3-O-ramnosídeo	4.61	447.0851	445,055	115,026	4,0129
30. Canferol hexosídeo II ou Luteolina hexosídeo II	4.83	447,0927	47,8053	308,507	7,7885
34. Amnentoflavona ou Agatisflavona	7,14	537,0822	154,571	-1,19E-06	10,9674

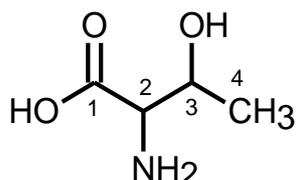
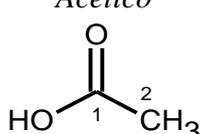
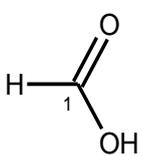
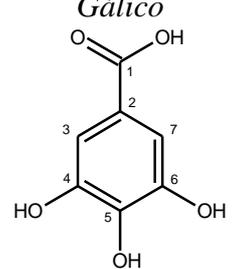
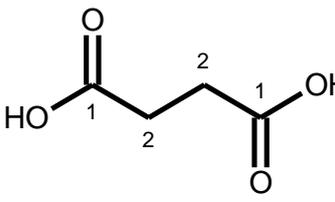
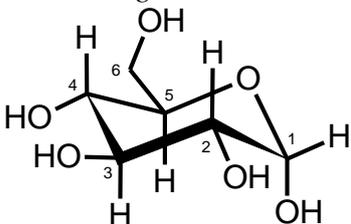
Fonte: Elaborado pelo Autor (2021).

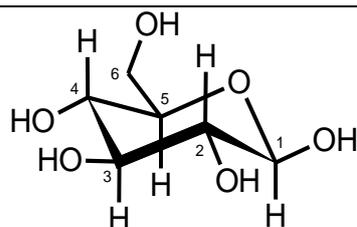
5.4 Análise estatística multivariada do conjunto de dados de RMN ^1H

A variabilidade da composição do extrato aquoso das folhas de dois genótipos de cajueiro (CCP76 e BRS226) foi avaliada de acordo com a influência da sazonalidade correlacionada à irrigação dos clones. As estruturas dos compostos, deslocamentos químicos ^1H e ^{13}C , multiplicidade, correlações e acoplamento constante são descritos na Tabela 13. Os sinais foram retirados dos espectros de ^1H obtidos dos extratos e comparados com bases nas referências de ALI et al. (2011); GODELMANN et al., (2013); LAGHI et al., (2014); LARSEN et al., (2006); NILSSON et al., (2004); OGRINC et al., (2003); PEREIRA et al., (2005); SON et al., (2009) e SIVAKUMAR et al, (2013).

Tabela 13 – Estruturas dos compostos orgânicos identificados destacando deslocamento químico de RMN ^1H e ^{13}C nos clones de *Anacardium occidentale L.*

Compostos/Estruturas	$\delta ^1\text{H}$ (multip.*, J em Hz)	$\delta ^{13}\text{C}$	Ref. ^1H	Ref. ^{13}C
AMINOÁCIDOS				
<i>Alanina</i>				
	3 – 1.48 (<i>d</i> 7.2) 2 – 4.31 (<i>o</i>)	19.1 53.5	1.52 (<i>d</i> , 7.3) 3.90 (<i>q</i> , 7.3)	19.1 53.4
<i>Leucina</i>				
	2 – no 3 – no 4 – no 5 – 0.90	no 42.0 27.6 29.2	3.74 1.70 1.71 0.96	56.2 42.6 26.8 24.8
<i>Glutamina</i>				
	4 - 2.47 (<i>m</i>) 3 - 2.14 (<i>o</i>) 2 - 3.80 (<i>o</i>)	34.1 29.5 57.2	2.45 (<i>m</i>) 2.12 (<i>m</i>) 3.77 (<i>o</i>)	33.9 29.3 57.2
<i>Tirosina</i>				
	6,8 – 6.94 (<i>m</i>) 5,9 – 7.09 (<i>m</i>)	118.8 134.2	6.89 (<i>m</i>) 7.19 (<i>m</i>)	118.9 133.5

<i>Treonina</i>				
	2 – 3.55 (o)	63.4	3.57 (<i>d</i> 4.87)	63.5
	3 – 4.14 (o)	68.6	4.24 (<i>m</i>)	68.9
	4 – 1.33 (o)	22.2	1.32 (<i>d</i> 6.58)	22.3
ÁCIDOS ORGNÂNICOS				
<i>Acético</i>				
	1 –	183.2		184.1
	2 – 1.97 (<i>s</i>)	26.0	2.08 (<i>s</i>)	26.0
<i>Fórmico</i>				
	1 – 8.20 (<i>s</i>)	no	8.39 (<i>s</i>)	172.4
<i>Gálico</i>				
	3 – 7.07	112.5	7.04	112.2
<i>Succínico</i>				
	2 – 2.51 (<i>s</i>)	35.1	2.39 (<i>s</i>)	36.8
CARBOIDRATOS				
<i>α-glicose</i>				
	1 – 5.23 (o)	95.0	5.25 (<i>d</i> 3.80)	95.4
	2 – 3.47 (<i>m</i>)	72.2	3.89-3.36 (o)	72.2
	3 – 3.77 (<i>m</i>)	75.5	n	76.0
	4 – 3.56 (<i>m</i>)	74.3	n	72.8
	5 – 3.72 (<i>m</i>)	63.5	n	64.2
	6 – 3.85 (<i>m</i>)	76.0	n	74.5
<i>β-glicose</i>				
	1 – 4.64 (o)	98.6	4.66 (<i>d</i> 8.10)	99.2
	2 – 3.26 (<i>m</i>)	77.1	3.25 (<i>t</i> 8.40)	77.6
	3 – 3.75 (<i>m</i>)	63.6	n	56.1
	4 – 3.48 (<i>m</i>)	78.9	n	79.0
	5 – 3.41 (<i>m</i>)	72.5	n	72.8
	6 – 3.90 (<i>m</i>)	63.9	n	63.1



**OUTROS
COMPOSTOS**

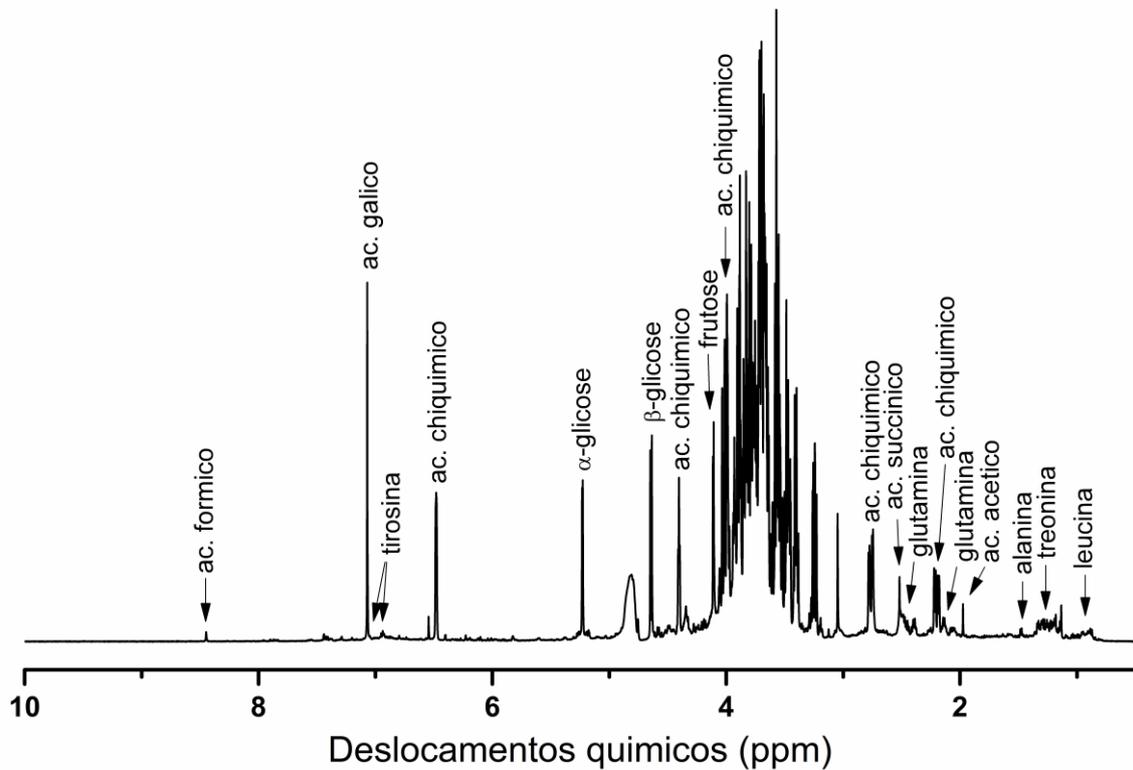
<p>shikimic acid</p>	3 – 6,48 (<i>m</i>)	134,2	
	4 – 4.40 (<i>tl</i> 4,4, 7.8)	69,2	
	5 – 4.00 (<i>o</i>)	69,9	
	6 – 3.72 (<i>o</i>)	67,7	20.2
	7a – 2,20 (<i>dd</i> 7,2 18,6)	35,5	74.0
	7b – 2,79 (<i>dd</i> 5,8, 18,6)	35,5	

Legenda: (s) – singlete; (m) -multiplete; (o) - overlay

Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

Inicialmente, foi realizada a identificação dos principais compostos orgânicos, e a Figura 18 ilustra um espectro de RMN de ^1H representativo com os compostos identificados nos extratos. Devido ao número de compostos identificados em extratos aquosos de folhas dos genótipos de caju CCP76 e BRS226 e à variabilidade experimental (sazonalidade e irrigação), um método de classificação supervisionado por PLS-DA foi desenvolvido em um conjunto de dados de RMN de ^1H para cada genótipo, separadamente. Portanto, a classificação foi desenvolvida com base na irrigação (com ou sem irrigação) e sazonalidade (estação chuvosa ou seca). As Figuras 19 e 20 ilustram os resultados da classificação multivariada de folhas dos genótipos de caju CCP76 e BRS226 respectivamente, com base em 4 LV.

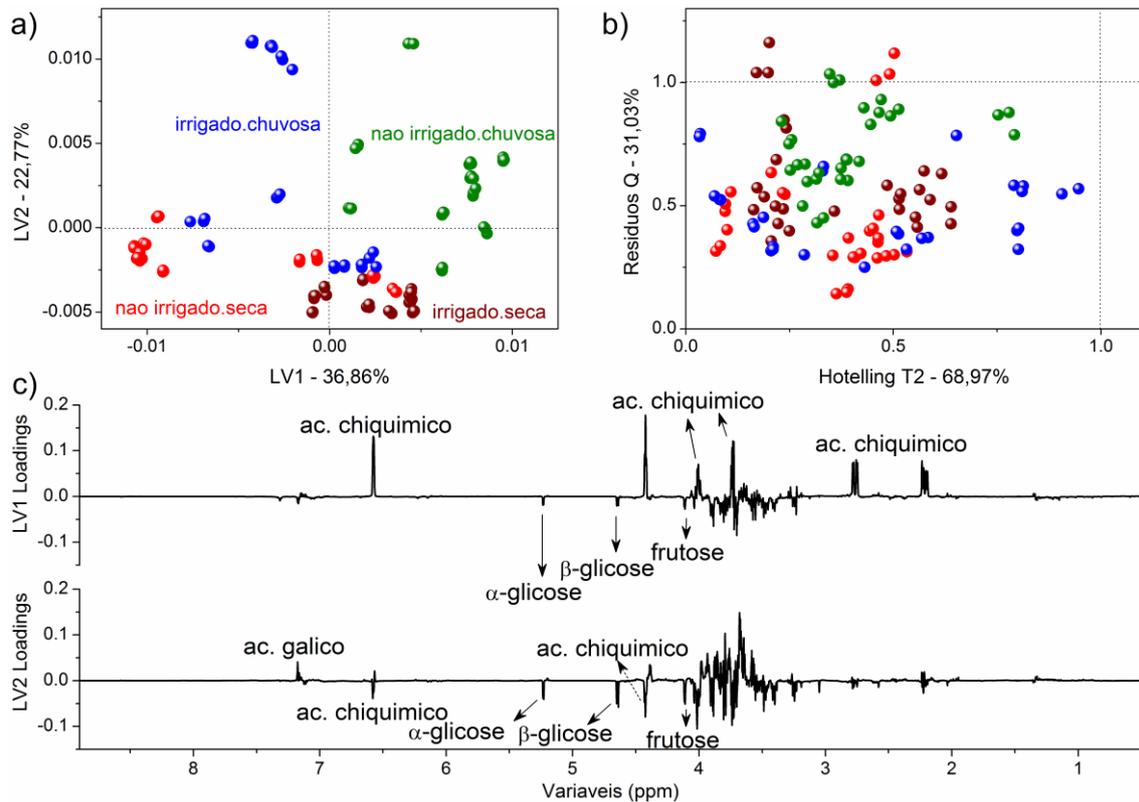
Figura 18 - Compostos identificados por RMN ^1H .



Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

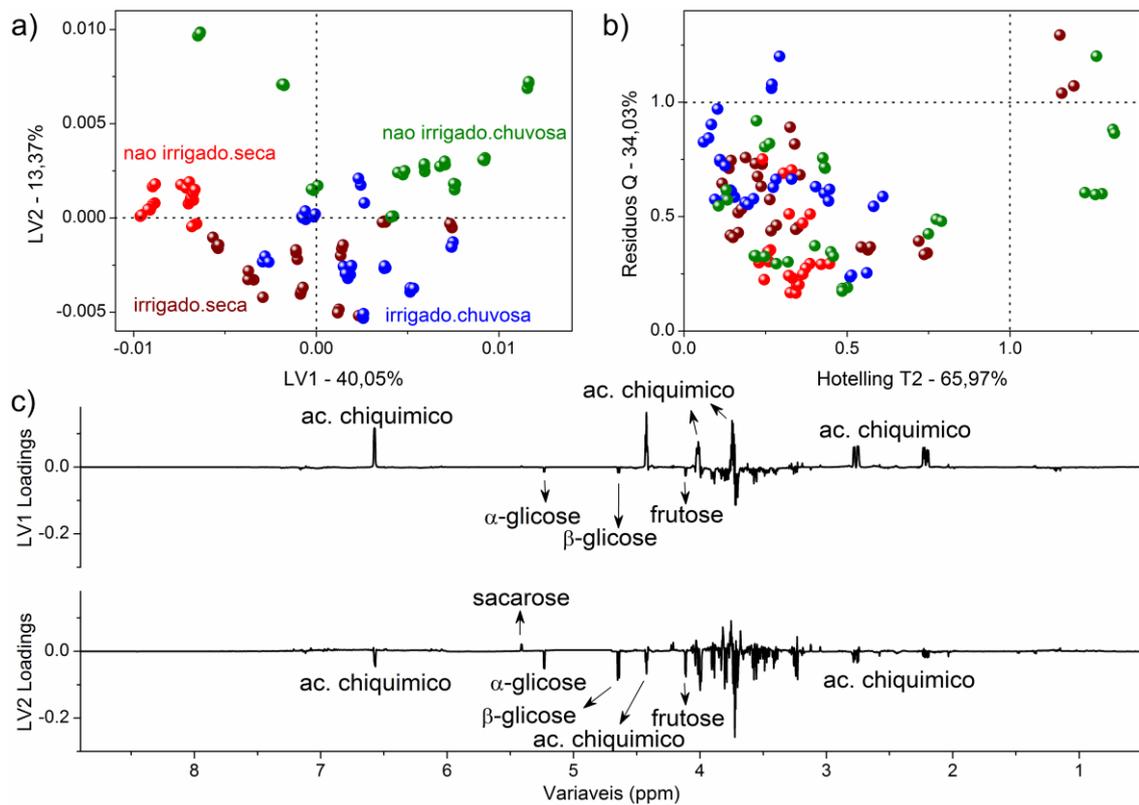
Amostras de cajueiros cultivados sob irrigação durante a estação chuvosa são ilustradas em azul, sem irrigação (Sem estresse hídrico) durante a estação chuvosa em verde, sem irrigação (regime de sequeiro) durante a estação seca em vermelho e irrigação durante a estação seca em vermelho escuro. O número de LV aplicado para cada modelagem foi escolhido de acordo com os erros de redução relacionados aos modelos de calibração e validação cruzada (RMSEC e RMSECV, respectivamente), porcentagem de variância capturada em cada LV e resultados da Matriz de Confusão. Os compostos relevantes identificados nos gráficos de carregamento (Fig. 19C e 20C) para a discriminação de amostras foram alcançados pela análise VIP (Importância das Variáveis para Projeção) (dados não mostrados).

Figura 19 – a) Sistema de coordenadas de escores LV1 \times LV2 a partir da avaliação da sazonalidade e dos efeitos do estresse hídrico na variabilidade química das folhas de cajueiro dos genótipos CCP76; b) plotagem de influência da modelagem das amostras pelos resíduos T2 \times Q de Hotelling; c) respectivos carregamentos plotados em linhas com os compostos relevantes para a discriminação de amostras obtida por análise VIP.



Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

Figura 20 - a) Sistema de coordenadas de escores LV1 \times LV2 a partir da avaliação da sazonalidade e dos efeitos do estresse hídrico na variabilidade química das folhas de cajueiro dos genótipos BRS226; b) plotagem de influência da modelagem das amostras pelos resíduos T2 \times Q de Hotelling; c) respectivos carregamentos plotados em linhas com os compostos relevantes para a discriminação de amostras obtida por análise VIP.



Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

Em geral, o gráfico de scores de ambos os genótipos (CCP76 e BRS226) ilustrou os cajueiros cultivados sob condição de sequeiro durante uma estação seca (cor vermelha) agrupando na maioria dos scores negativos de LV1 por altas quantidades de açúcares glicose e frutose, bem como baixas quantidades de ácido chiquímico. Por outro lado, os cajueiros cultivados sob condição de sequeiro (sem irrigação) durante a estação chuvosa (cor verde) acumulam no máximo escores positivos de LV1 por altas quantidades de açúcares e baixo teor de ácido chiquímico. Os cajueiros cultivados sob irrigação (nas cores azul e vermelho escuro) apresentaram comportamento intermediário de acordo com os compostos mencionados (açúcares e ácido chiquímico), principalmente aqueles cultivados na estação seca com quantidades relativamente elevadas de açúcares e ácido chiquímico de acordo com o eixo LV2.

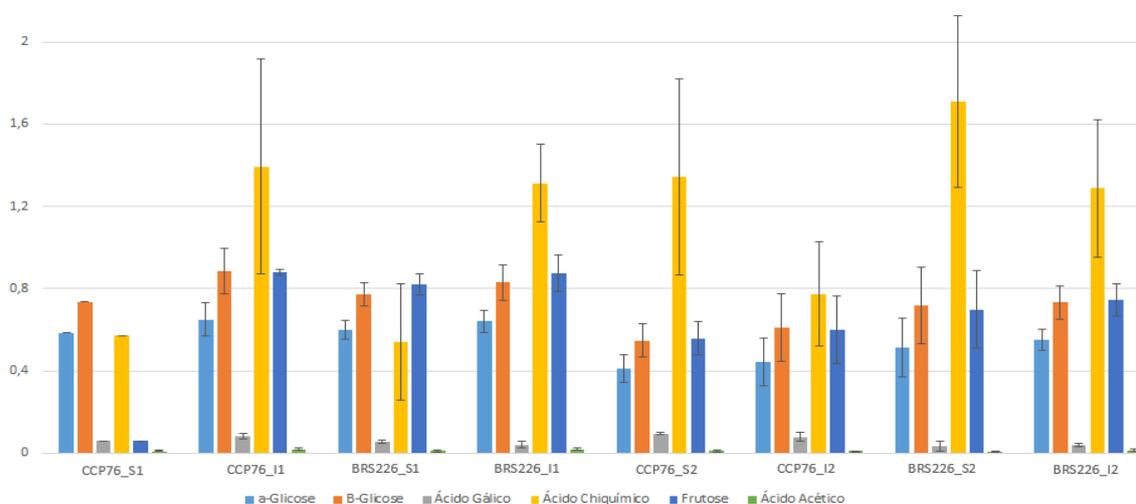
Em particular, o eixo LV2 da avaliação do genótipo CCP76 destacou os cajueiros cultivados durante a estação seca em scores negativos pelas quantidades relativamente altas de

açúcares (glicose e frutose) e ácido chiquímico e baixo de ácido gálico. No entanto, a avaliação do genótipo BRS226 destacou os cajueiros cultivados sob irrigação com grande quantidade de açúcares e ácido chiquímico e os cultivados em sequeiro com grande quantidade de sacarose.

A seca é descrita como um dos principais fatores abióticos que afetam as plantas. A ausência de água faz com que os indivíduos se reorganizem, interna e externamente, a fim de alcançar a sobrevivência (PAN; WELTI; WANG, 2008).

Como já visto até o momento, nas plantas essa resposta se dá em diferentes níveis. Um dos principais é o fechamento dos estômatos, com o intuito de sessar a evapotranspiração. No entanto, isso gera consequências, já que são nos estômatos ocorrem as trocas gasosas. Se as trocas gasosas cessam ou diminuem, isso deve então impactar diretamente o conteúdo dos produtos da fotossíntese (WEYERS; PATERSON, 2001). Vejamos, primeiramente, a quantidade de açúcares presentes nos diferentes tipos de clone. Na Figura 21 constam as quantificações dos principais metabólitos discrepantes nas análises de LV. Contendo as quantidades em mg/ml de cada um desses compostos.

Figura 21 - Quantificações das principais variáveis latentes observadas na RMN ^1H , em mg/mL.



Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

Os açúcares são compostos produzidos ao final da fotossíntese e são de suma importância para os processos celulares, metabolismo do carbono e energético. Apesar disso, os açúcares são descritos como moléculas sinalizadoras, capazes de influenciar a síntese molecular e transdução proteica, colocando o indivíduo em alerta. (POONAM et al., 2016) Quando ocorre um déficit de água, o indivíduo em si passa por uma desidratação, ou seja, para que as células e os órgãos vegetais não entrem em colapso, o organismo tende a concentrar seus

compostos internamente para garantir que a água chegue até as células por osmose (ROSA et al., 2009). Por conta disso, é comum em plantas estressadas que os açúcares solúveis (glicose, frutose e sacarose) estejam em maiores quantidades internamente, para manter a homeostase, como observados nos gráficos de importância das variáveis latentes e na Figura 20 (MARČEK et al., 2019).

De fato, isso foi observado em todos os indivíduos estudados. Os açúcares simples tiveram grau de importância maior nas LV do que os demais compostos identificados. Os clones suscetíveis (CCP76) apresentaram menor quantidade de compostos em geral, quando comparados com os tolerantes, mesmo que em diferentes coletas. Padrão que não é seguido pelos clones tolerantes (BRS226), que mantem basicamente a mesma forma de perfil metabolômico, o que corrobora com o apresentado nos dados de UPLC, referente a homogeneidade dos clones. O que implica que os tipos CCP76 podem apresentar dificuldades no armazenar açúcares simples em seu interior, fator que pode ser considerado uma fragilidade de adaptação.

Por conseguinte, o ácido chiquímico também carrega grande importância na separação entre os clones. Ocorre variações das presenças desse ácido nos clones. Os clones que passam por estresse hídrico (CCP76_S1 e BRS226_S1) apresentam menores valores de ácido chiquímico, quando comparados aos clones não estressados. Isso é válido apenas quando comparamos as plantas de uma mesma coleta, ou seja, as que passaram por um mesmo processo de irrigação. Logicamente, quando o processo de déficit é cessado (CCP76_I1 e BRS226_I1) ou feito pela chuva (CCP76 e BRS226 da segunda coleta) essas plantas acabam intensificando sua busca por nutrientes, o que leva a um aumento da concentração de metabólitos.

Como visto no tópico 2.4.1, uma pequena quantidade de ácido chiquímico implicaria diretamente nos processos de produção de metabólitos secundários, principalmente sinalizadores e protetores celulares. Sendo ele o responsável por grades percussores de moléculas antioxidantes, seria de se esperar que o clone suscetível obtivesse os menores valores de ácidos chiquímico. Nos clones tolerantes à seca, as plantas aparentemente biossintetizaram compostos fenólicos, a fim de amenizar a pressão celular, causada pela produção das enzimas de defesa. A mesma eficiência não é obtida em clones suscetíveis, que aparentam ter menores quantidades de ácido chiquímico, justificando a menor presença de fenólicos em clones suscetíveis à seca.

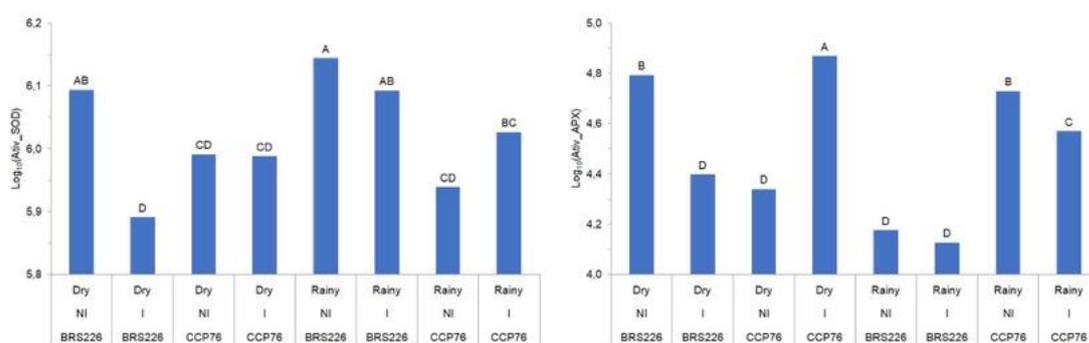
As Tabelas 4 a 10 mostraram que comparados com os clones tolerantes, o CCP76 apresentava menores quantidade de moléculas antioxidantes (compostos fenólicos), e esse dado

é explicado pela baixa quantidade de ácido chiquímico presente no metabolismo. Mesmo com níveis próximos ao observado em BRS226_S1 a baixa produção de ácido chiquímico em CCP76_S1 pode ser entendida como uma suscetibilidade à seca, uma vez que a grande presença de compostos fenólicos em BRS226 tenha contribuído para diminuição da concentração desse ácido.

5.5 Quantificação das enzimas antioxidantes APX, SOD, G-POD e CAT

Primeiramente, tentou-se compreender as respostas de cada clone à seca e como o metabolismo e processos fisiológicos dos indivíduos influenciam na fenotipagem final dos clones. Nessa etapa a observação parte de uma frente distinta: a dificuldade de resposta, uma vez que a adaptação de um indivíduo requer enormes modificações ao longo do tempo. Como no presente trabalho a avaliação dos clones visa entender o que leva o clone BRS226 apresentar tolerância à seca quando comparado ao clone CCP76. Portanto, é importante partir da definição de estresse oxidativo posta no item 2.4.1. Se em plantas o aumento da quantidade de ROS é observado quando a mesma é mantida em estresse, e se associarmos a isso que clones de cajueiro, historicamente, estão presentes nos climas extremos, é plausível compreender os grandes números de atividades de enzimas presentes no gráfico, por isso sua avaliação deve ser comparativa.

Figura 22 - Quantificações das enzimas APX e SOD, respectivamente. Valores contidos em \log_{10} para melhor visualização das diferenças. Teste de Tukey a 5 % de probabilidade.



Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

É possível notar que os clones suscetíveis à seca e estressados possuem uma maior dificuldade na eliminação de ROS, uma vez que apresentam menores valores dessas enzimas de defesa em suas folhas. Essa importância aumenta com a maior disponibilidade de água, o que nos leva a supor que esses clones suscetíveis ou tipo CCP76 utilizem o sistema de defesa como a forma principal de eliminação de ROS, e não as moléculas antioxidantes do

metabolismo secundário. Se observamos os clones BRS226 é evidente o comportamento mais homogêneo desse clone (Dados apresentados na seção de Anexos). Desde os resultados da cromatografia, foi possível notar que o metabolismo básico destes permanecem uniformes mesmo após sofrerem estresses, mantendo respostas rápidas e eficazes, como o aumento de compostos fenólicos, em especial a catequina (Figura 16), aliviando a pressão oxidativa, que apresenta queda com o aumento da disponibilidade de água.

A presença da catequina em organismos que passam por estresse que desencadeiam os ROS é muito recorrente. A catequina e seus diasteroisômeros, são essenciais para controle oxidativo, uma vez que podem atuar em diversas frentes de combate, entre elas acionando enzimas de defesa (indiretamente estimulando a produção de SOD, por exemplo) ou agindo como ponte doadora de elétrons para a captação dos radicais livres, pois suas moléculas ricas em hidroxilas são capazes de causar a eliminação de radicais diminuindo a pressão oxidativa e aliviando o sistema de defesa enzimática (BERNATONIENE; KOPUSTINSKIENE, 2018; MARČEK et al., 2019). Fatos que corroboram com o observado nas quantificações comparativas dos dados de HPLC, os quais mostram que os clones estressados (especialmente os tolerantes), independentemente da coleta, apresentavam maiores quantidades de catequina. Fator que pode ser interpretado como uma vantagem adaptativa dos clones tolerantes (Tabelas 7 a 10).

Por fim, A APX e a SOD participam da eliminação conjunta de radicais livres. Na Figura 21 e 22, podemos observar que nos clones tolerantes as duas enzimas possuíram valores mais elevados, mantendo um padrão básico de produção destas quando o estresse é cessado ou a irrigação é feita pela chuva (BRS226_I1 e BRS226_S2, respectivamente). Importante notar, que o clone suscetível e estressado (CCP76_S1) mantém níveis de enzimas bem próximas do clone BRS226_I1, mas não responde metabolicamente da mesma intensidade. Se olharmos as tabelas 4 a 10, os clones CCP76_S1 são os clones que apresentam menor composição fenólica dentre as comparações. Esse nível de enzimas somada a menor quantidade de ácido chiquímico (Figura 21) leva a supor que a pressão oxidativa nesse clone é maior do que nos seus demais estados. Conseqüentemente, a dispersão do impacto do estresse abiótico não é efetiva, levando a uma maior suscetibilidade.

Em muitos trabalhos, a participação dessas enzimas é discutida mas os valores de sua quantificação levantam dúvidas sobre a real participação dessas enzimas em estresses, principalmente, quando associados a maiores tempos de perturbações (AFZAL et al., 2014; ALSCHER; ERTURK; HEATH, 2002; MITTLER et al., 2011). Especulasse que a homeostase

do sistema leve uma produção básica de manutenção para buscar poupar energia. A literatura reforça que o aumento ou decréscimo da participação dessas enzimas nos processos fisiológicos não é única, mas sim uma das respostas conjuntas do indivíduo. Ou seja, existem seres que possuem decréscimo em número de enzimas mesmo com o avanço do estresse, como relatado por Zhang & Kirkham (1996) para plantas da família *Poaceae* (DE VASCONCELOS et al., 2009).

6 CONCLUSÃO

A metodologia de extração líquido-líquido utilizada demonstrou-se eficiente e rápida na extração de uma grande quantidade de compostos, especialmente fenólicos. Com os dados obtidos pela análise por UPLC-QTOF-MS(MS), identificou-se tentativamente 38 compostos nos dois clones de *Anacardium occidentale* L. Aliado com o estudo quimiométrico foi possível então separar os clones de acordo com as suas condições de adaptações e período de coleta.

Com o auxílio dos modelos estatísticos (PCA, OPLS-DA, VIP e *S-Plot*) catalogou-se 6 possíveis biomarcadores responsáveis pela tolerância à seca nos clones de *A. occidentale* L (BRS226). Os dados de OPLS-DA e *S-Plot* demonstraram que, ao sofrerem um estresse hídrico, os clones suscetíveis tendem a produzir compostos como catequina, derivados de quercetina e flavonoides. Dentre os clones estudados, os ácidos anacárdicos são moléculas marcantes nos clones suscetíveis, tendo pouca importância na composição dos clones tolerantes. Enquanto isso, os clones tolerantes apresentaram baixa variação de metabólitos para diferentes coletas, destacando-se a **(9)** Catequina, **(11)** Trigaloil glicose, **(23/24)** Canferol hexosídeo I ou Luteolina hexosídeo I/Quercetina 3-*O*-ramnosídeo, **(30)** Canferol hexosídeo II ou Luteolina hexosídeo II, **(31)** Quercetina galoil pentosídeo I e **(34)** Amnentoflavona ou Agatisflavona em seus processos adaptativos. Nos dados de metabolismo primário obtidos por ressonância magnética nuclear, observou-se que os clones tolerantes tinham maior capacidade de armazenamento de açúcares solúveis e ácido chiquímico.

Por fim, a atividade das enzimas de defesa APX e SOD nos clones tolerantes foi, em geral, menor nos clones suscetíveis, excetuando-se os clones suscetíveis irrigados. Essa configuração foi contrária em clones tolerantes, podendo-se concluir que os processos de controle do estresse abiótico dos clones CCP76 tem um peso maior para o sistema enzimático o que de alguma forma mostra que as moléculas presentes no metaboloma desse clone não são eficientes para conter os danos do estresse oxidativo causado pela seca.

Mudanças metabólicas à luz das condições de seca destacaram conjuntos de micromoléculas identificadas como biomarcadores de tolerância, que afetam o ajuste metabólico e fisiológico dos clones de cajueiro anão, reduzindo assim os impactos da seca. Por fim, é possível afirmar que os dados provindos deste trabalho podem ser um indicativo para o descarte de genótipos desfavoráveis. Trata-se de informações úteis aos sistemas de melhoramento genético do cajueiro, que podem ser aplicadas no desenvolvimento de novos clones adaptados à seca, com base na triagem de biomarcadores.

REFERÊNCIAS

- ABU-REIDAH, I. M. et al. HPLC-DAD-ESI-MS/MS screening of bioactive components from *Rhus coriaria* L. (Sumac) fruits. **Food Chemistry**, v. 166, p. 179–191, 2015.
- AFZAL, F. et al. Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Response to Pathogens and Wounding. In: *Oxidative Damage to Plants: Antioxidant Networks and Signaling*. Elsevier Inc., 2014. p. 397–424.
- ALBERICE, J. V. Avaliação Analítica de Potenciais Biomarcadores para Câncer de Bexiga em Urina. [s.l: s.n.].
- ALEXANDRE, F.; DE, T.; MOTTA, R. O cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) : de simbolo da cultura nordestina a arvore testemunha da mundialização da economia e dos modos de vida. **Revista do Instituto Arqueológico, Histórico e Geográfico Pernambucano**, v. 1, n. 68, p.13-42, mar., 2013.
- ALLWOOD, J. W.; GOODACRE, R. An introduction to liquid chromatography-mass spectrometry instrumentation applied in plant metabolomic analyses. **Phytochemical Analysis**, v. 21, n. 1, p. 33–47, 2010.
- ALMEIDA, L. H. F. DE et al. Viabilidade econômica da produção de caju (*Anacardium occidentale* L). **Nativa**, v. 5, n. 1, p. 9–15, 2017.
- ALSCHER, R. G.; ERTURK, N.; HEATH, L. S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n.3, p 1331-1341, 2002.
- ANURUDH, K. S. Early History of Crop Presence/Introduction in India: III. *Anacardium occidentale* L., Cashew Nut. **Asian Agri-History**, v. 22, n. 3, p. 1–6, 2018.
- ASHRAF, M. A. et al. Environmental Stress and Secondary Metabolites in Plants: An Overview. **Elsevier**, v.1, n.1, p. 159-165, 2018.
- AUGUSTO, L. et al. Sistema de Produção do Caju Aspectos econômicos da cultura do cajueiro. **EMBRAPA**, n. 2, p. 1–193, 2016.
- AVULA, B. et al. Determination of Shikimic Acid in Fruits of *Illicium* Species and Various Other Plant Samples by LC – UV and LC – ESI – MS. **Chromatographia**. v. 3, p. 307–314, 2009.
- AZHAR, N. et al. Water stress mediated changes in growth, physiology and secondary metabolites of desi ajwain (*trachyspermum ammi* l.). **Pakistan Journal of Botany**, p. 15–19, 2011.
- BAGGETT, S. et al. Bioactive benzophenones from *Garcinia xanthochymus* fruits. **Journal of Natural Products**, v. 68, n. 3, p. 354–360, 2005.
- BALLABIO, D. A MATLAB toolbox for Principal Component Analysis and unsupervised exploration of data structure. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 149, p. 1–9, 2015.

BEDIA, C. **Experimental Approaches in Omic Sciences**. 1. ed. [s.l.] Elsevier B.V., 2018. v. 82

BERARDINI, N.; CARLE, R.; SCHIEBER, A. Characterization of gallotannins and benzophenone derivatives from mango (*Mangifera indica* L. cv. 'Tommy Atkins') peels, pulp and kernels by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 18, n. 19, p. 2208–2216, 2004.

BERNATONIENE, J.; KOPUSTINSKIENE, D. M. The Role of Catechins in Cellular Responses to Oxidative Stress. **Molecules**, v. 23, n. 4, p. 1–11, 2018.

BINO, R. J. et al. Potential of metabolomics as a functional genomics tool. **Trends in Plant Science**, v. 9, n. 9, p. 418–425, 2004.

BORGES, J. Cashew tree (*Anacardium occidentale*): Possible applications in dermatology . . **Clinics in Dermatology**, 15 jan. 2021.

BOULEKBACHE-MAKHLOUF, L. et al. Analysis by High-Performance Liquid Chromatography Diode Array Detection Mass Spectrometry of Phenolic Compounds in Fruit of *Eucalyptus globulus* Cultivated in Algeria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 24, p. 12615–12624, 22 dez. 2010.

BRACA, A. et al. Chemical Composition and Antioxidant Activity of Phenolic Compounds from Wild and Cultivated *Sclerocarya birrea* (Anacardiaceae) Leaves. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 23, p. 6689–6695, 2003.

CANUTO, G. A. B. et al. METABOLÔMICA: DEFINIÇÕES, ESTADO-DA-ARTE E APLICAÇÕES REPRESENTATIVAS. **Quimica Nova**, v. 41, n. 1, p. 75–91, 2018.

CASER, M. et al. Drought stress adaptation modulates plant secondary metabolite production in *Salvia dolomitica* Codd. **Industrial Crops and Products**, v. 129, n. November 2018, p. 85–96, 2019.

CHOUDHURY, F. K. et al. Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. **Plant Journal**, v. 90, n. 5, p. 856–867, 1 jun. 2017.

CRAMER, G. R. et al. Effects of abiotic stress on plants: A systems biology perspective. **BMC Plant Biology**, v. 11, 2011.

CUI, M. et al. Ethylene increases accumulation of compatible solutes and decreases oxidative stress to improve plant tolerance to water stress in *Arabidopsis*. **Journal of Plant Biology**, v. 58, n. 3, p. 193–201, 2015.

DE VASCONCELOS, A. C. F. et al. Enzymatic antioxidant responses to biostimulants in maize and soybean subjected to drought. **Scientia Agricola**, v. 66, n. 3, p. 395–402, 2009.

DENDENA, B.; CORSI, S. Cashew, from seed to market: A review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 34, n. 4, p. 753–772, 2014.

- DORTA, E. et al. Screening of phenolic compounds in by-product extracts from mangoes (*Mangifera indica* L.) by HPLC-ESI-QTOF-MS and multivariate analysis for use as a food ingredient. **Food Research International**, v. 57, p. 51–60, 2014a.
- DOU, J. et al. Identification and comparison of phenolic compounds in the preparation of oolong tea manufactured by semifermentation and drying processes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 18, p. 7462–7468, 2007.
- ENGELS, C. et al. Characterization of phenolic compounds in jocote (*Spondias purpurea* L.) peels by ultra high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. **Food Research International**, v. 46, n. 2, p. 557–562, 2012.
- ERNST, M. et al. Mass spectrometry in plant metabolomics strategies: From analytical platforms to data acquisition and processing. **Natural Product Reports**, v. 31, n. 6, p. 784–806, 2014.
- ERŞAN, S. et al. Identification of phenolic compounds in red and green pistachio (*Pistacia vera* l.) hulls (exo- and mesocarp) by HPLC-DAD-ESI-(HR)-MS n. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 26, p. 5334–5344, 2016.
- FAHAD, S. et al. Phytohormones and plant responses to salinity stress: a review. **Plant Growth Regulation**, v. 75, n. 2, p. 391–404, 2015.
- FANG, C.; FERNIE, A. R.; LUO, J. Exploring the Diversity of Plant Metabolism. **Trends in Plant Science**, v. 24, n. 1, p. 83–98, 2019.
- FRAIGE, K. et al. Dereplication by HPLC-DAD-ESI-MS/MS and Screening for Biological Activities of *Byrsonima* Species (Malpighiaceae). **Phytochemical Analysis**, v. 29, n. 2, p. 196–204, 2018.
- FUNARI, C. S. et al. High resolution ultra high pressure liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry dereplication strategy for the metabolite profiling of Brazilian *Lippia* species. **Journal of Chromatography A**, v. 1259, p. 167–178, 2012.
- FUNARI, C. S. et al. Metabolômica, uma abordagem otimizada para exploração da biodiversidade brasileira: Estado da arte, perspectivas e desafios. **Química Nova**, v. 36, n. 10, p. 1605–1609, 2013.
- GANGWAR, S. et al. Plant Responses to Metal Stress: The Emerging Role of Plant Growth Hormones in Toxicity Alleviation. In: *Emerging Technologies and Management of Crop Stress Tolerance*. **Elsevier Inc.**, 2014. v. 2p. 215–248.
- GLOBAL BIODIVERSITY INFORMATION FACILITY. **Anacardium L.** Disponível em: <<https://www.gbif.org/pt/species/5421367>>. Acesso em: 2 abr. 2021.
- GONG, Z. et al. **Plant abiotic stress response and nutrient use efficiency**. **Science China Life Sciences** Science in China Press, , 31 maio 2020.
- GRACE, M. H. et al. Chemical composition, antioxidant and anti-inflammatory properties of pistachio hull extracts. **Food Chemistry**, v. 210, p. 85–95, 2016.

- GRIESSER, M. et al. Severe drought stress is affecting selected primary metabolites, polyphenols, and volatile metabolites in grapevine leaves (*Vitis vinifera* cv. Pinot noir). **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 88, p. 17–26, 2015.
- GUO, R. et al. Metabolic responses to drought stress in the tissues of drought-tolerant and drought-sensitive wheat genotype seedlings. **AoB PLANTS**, v. 10, n. 2, p. 1–13, 2018.
- HAMED, A. I. et al. Profiles analysis of proanthocyanidins in the argun nut (*Medemia argun* -an ancient Egyptian palm) by LC-ESI-MS/MS. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 49, n. 4, p. 306–315, 2014.
- HAN, E. S.; GOLEMAN, DANIEL; BOYATZIS, RICHARD; MCKEE, A. **Abiotic Stress Responses in Plants**. New York, NY: Springer New York, 2012. v. 53
- HE, M.; HE, C. Q.; DING, N. Z. Abiotic stresses: General defenses of land plants and chances for engineering multistress tolerance. **Frontiers in Plant Science**, v. 871, n. December, p. 1–18, 2018.
- HOKKANEN, J. et al. Identification of phenolic compounds from lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.), Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) and Hybrid Bilberry (*Vaccinium x intermedium* Ruthe L.) Leaves. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 20, p. 9437–9447, 2009.
- HORGAN, R. P.; KENNY, L. C. ‘Omic’ technologies: genomics, transcriptomics, proteomics and metabolomics. **The Obstetrician & Gynaecologist**, v. 13, n. 3, p. 189–195, 2011.
- HUSSAIN, M. et al. Drought stress in sunflower: Physiological effects and its management through breeding and agronomic alternatives. **Agricultural Water Management**, v. 201, n. September 2017, p. 152–166, 2018.
- INZÉ, D.; MONTAGU, M. VAN. Oxidative stress in plants. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 6, n. 2, p. 153–158, 1995.
- KABERA, J. et al. Plant Secondary Metabolites: Biosynthesis, classification, function and pharmacological properties. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 2, p. 377–392, 2014.
- KAR, R. K. Plant responses to water stress: Role of reactive oxygen species. **Plant Signaling and Behavior**, v. 6, n. 11, p. 1741–1745, 2011.
- KHAKIMOV, B.; GÜRDENİZ, G.; ENGELSE, S. B. Trends in the application of chemometrics to foodomics studies. **Acta Alimentaria**, v. 44, n. 1, p. 4–31, 2015.
- KIM, H. K.; CHOI, Y. H.; VERPOORTE, R. NMR-based metabolomic analysis of plants. **Nature Protocols**, v. 5, n. 3, p. 536–549, 25 mar. 2010.
- KIM, J. et al. Correlation between antioxidative activities and metabolite changes during cheonggukjang fermentation. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 75, n. 4, p. 732–739, 2011.
- KIM, Y. M.; HEYMAN, H. M. Mass spectrometry-based metabolomics. In: **Methods in Molecular Biology**. [s.l.] John Wiley & Sons, Ltd, 2018. v. 1775p. 107–118.

KRASTANOV, A. Metabolomics - The state of art. **Biotechnology and Biotechnological Equipment**, 2010.

KRZYŻANOWSKA, J.; CZUBACKA, A.; OLESZEK, W. Dietary Phytochemicals and Human Health. In: GIARDI, M. T.; REA, G.; BERRA, B. (Eds.). . **Bio-Farms for Nutraceuticals**. Advances in Experimental Medicine and Biology. Boston, MA: Springer US, 2010. v. 698p. 74–98.

LANÇAS, F. M. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: Finalmente “compatíveis”? **Scientia Chromatographica**, v. 5, n. 1, p. 27–46, 2009.

LIU, Z. et al. Function oolong tea , and black tea on gut microbiota in high-fat-induced obese mice †. p. 4869–4879, 2016.

LONE, R.; SHUAB, R.; KAMILI, A. N. **Plant Phenolics in Sustainable Agriculture**. [s.l: s.n.]. v. 1

LÜCK, H. Catalase. In: **Methods of Enzymatic Analysis**. Second Pri ed. [s.l.] Elsevier, 1965. p. 885–894.

MARČEK, T. et al. Metabolic response to drought in six winter wheat genotypes. **PLoS ONE**, v. 14, n. 2, p. 1–23, 2019.

MARCHETTI, M. et al. Retrieving visibility distance in fog combining infrared thermography, Principal Components Analysis and Partial Least-Square regression. **Infrared Physics and Technology**, v. 71, p. 289–297, 2015.

MITTLER, R. et al. ROS signaling: The new wave? **Trends in Plant Science**, v. 16, n. 6, p. 300–309, 2011.

NADEEM, M. et al. Research Progress and Perspective on Drought Stress in Legumes: A Review. **International journal of molecular sciences**, 2019.

NAIKOO, M. I. et al. Role and regulation of plants phenolics in abiotic stress tolerance: An overview. **Plant Signaling Molecules: Role and Regulation under Stressful Environments**, p. 157–168, 2019.

NAIR, K. P. Cashew Nut (*Anacardium occidentale* L.). In: **Tree Crops**. Cham: Springer International Publishing, 2021. p. 27–73.

NAIR, K. P. P. Cashew Nut (*Anacardium occidentale* L.). In: **The Agronomy and Economy of Important Tree Crops of the Developing World**. [s.l.] Elsevier, 2010. p. 21–66.

OLIVEIRA, N. N. et al. Cashew nut and cashew apple: a scientific and technological monitoring worldwide review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 57, n. 1, p. 12–21, 2020a.

OLIVEIRA, N. N. et al. Cashew nut and cashew apple: a scientific and technological monitoring worldwide review. **Journal of Food Science and Technology** Springer, , 1 jan. 2020b.

ORAVEC, M. et al. Warming differentially influences the effects of drought on stoichiometry and metabolomics in shoots and roots. **New Phytologist**, v. 207, n. 3, p. 591–603, 2015.

PAN, X.; WELTI, R.; WANG, X. Simultaneous quantification of major phytohormones and related compounds in crude plant extracts by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. **Phytochemistry**, v. 69, n. 8, p. 1773–1781, 2008.

PANDEY, S. et al. Abiotic stress tolerance in plants: Myriad roles of ascorbate peroxidase. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, n. April, p. 1–13, 2017.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. DAS G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 3, n. November, p. 146–152, 2012.

PILON, A. et al. METABOLÔMICA DE PLANTAS: MÉTODOS E DESAFIOS. **Química Nova**, v. 43, n. 3, p. 329–354, 2020.

POONAM et al. Sugar signalling in plants: A novel mechanism for drought stress management. **Water Stress and Crop Plants: A Sustainable Approach**, v. 1–2, p. 287–302, 2016.

QUAN, N. et al. Involvement of Secondary Metabolites in Response to Drought Stress of Rice (*Oryza sativa* L.). **Agriculture**, v. 6, n. 2, p. 23, 26 maio 2016.

RAZZAQ, A. et al. Metabolomics: A Way Forward for Crop Improvement. **Metabolites**, v. 9, n. 12, p. 303, 14 dez. 2019.

REGAZZONI, L. et al. A rapid profiling of gallotannins and flavonoids of the aqueous extract of *Rhus coriaria* L. by flow injection analysis with high-resolution mass spectrometry assisted with database searching. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 72, p. 202–207, 2013.

RINSCHEN, M. M. et al. Identification of bioactive metabolites using activity metabolomics. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 20, n. 6, p. 353–367, 2019.

ROBERTS, J. A. (ED.). **Annual Plant Reviews online**. 1. ed. [s.l.] Wiley, 2018.

ROCKENBACH, I. I. et al. Characterization of flavan-3-ols in seeds of grape pomace by CE, HPLC-DAD-MS n and LC-ESI-FTICR-MS. **Food Research International**, v. 48, n. 2, p. 848–855, 2012.

ROSA, M. et al. Soluble sugars-metabolism, sensing and abiotic stress a complex network in the life of plants. **Plant Signaling and Behavior**, v. 4, n. 5, p. 388–393, 2009.

RUE, E. A.; RUSH, M. D.; VAN BREEMEN, R. B. Procyanidins: a comprehensive review encompassing structure elucidation via mass spectrometry. **Phytochemistry Reviews**, v. 17, n. 1, p. 1–16, fev. 2018.

S. LISAR, S. Y. et al. Water Stress in Plants: Causes, Effects and Responses. In: **Water Stress**. [s.l.] InTech, 2012. p. 1–13.

- SALDANHA, L. L.; VILEGAS, W.; DOKKEDAL, A. L. Characterization of flavonoids and phenolic acids in *Myrcia bella* cambess. Using FIA-ESI-IT-MSⁿ and HPLC-PAD-ESI-IT-MS combined with NMR. **Molecules**, v. 18, n. 7, p. 8402–8416, 2013.
- SANTOS, C. C. DE S. et al. Isolation of antioxidant phenolics from *Schinopsis brasiliensis* based on a preliminary LC-MS profiling. **Phytochemistry**, v. 140, p. 45–51, 2017.
- SCHULZE-KAYSERS, N.; FEUEREISEN, M. M.; SCHIEBER, A. Phenolic compounds in edible species of the Anacardiaceae family - a review. **RSC Advances**, v. 5, n. 89, p. 73301–73314, 2015.
- SELEIMAN, M. F. et al. Drought Stress Impacts on Plants and Different Approaches to Alleviate Its Adverse Effects. **Plants**, v. 10, n. 2, p. 259, 28 jan. 2021.
- SHUKRI, M. A. M.; ALAN, C. Analysis of phenolics in *Anacardium occidentale* shoot extracts using a reversed-phase high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (RP-HPLC-MS). **journal of tropical agriculture and food science**, v. 38, n. 2, p. 221–230, 2010.
- STEDMON, C. A.; BRO, R. Characterizing dissolved organic matter fluorescence with parallel factor analysis: A tutorial. **Limnology and Oceanography: Methods**, v. 6(11), p. 572–579, 2008.
- TALEUZZAMAN, M. et al. Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) - A Review. **Austin J Anal Pharm Chem. Austin J Anal Pharm Chem**, v. 2, n. 2, p. 1056–6, 2015.
- TREML, J.; ŠMEJKAL, K. Flavonoids as Potent Scavengers of Hydroxyl Radicals: Flavonoids versus hydroxyl radical.... **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 15, n. 4, p. 720–738, jul. 2016.
- TRYGG, J.; WOLD, S. Orthogonal projections to latent structures (O-PLS). **Journal of Chemometrics**, v. 16, n. 3, p. 119–128, 2002.
- VERMA, N.; SHUKLA, S. Impact of various factors responsible for fluctuation in plant secondary metabolites. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v. 2, n. 4, p. 105–113, dez. 2015.
- VIDAL, M. F. Cajucultura nordestina continua em declínio. **Caderno Setorial ETENE**, v. 2, n. 22, p. 1–11, 2017.
- VURUKONDA, S. S. K. P. et al. Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growth promoting rhizobacteria. **Microbiological Research**, v. 184, p. 13–24, 2016.
- WEI, E. et al. Ulam herbs: A review on the medicinal properties of *Anacardium occidentale* and *Barringtonia racemosa* ARTICLE INFO ABSTRACT. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 7, n. 02, p. 241–247, 2017.
- WEYERS, J. D. B.; PATERSON, N. W. Plant hormones and the control of physiological processes. Tansley review no. 129. **New Phytologist**, v. 152, n. 3, p. 375–407, 2001.

WIKLUND, S. et al. Visualization of GC/TOF-MS-based metabolomics data for identification of biochemically interesting compounds using OPLS class models. **Analytical Chemistry**, v. 80, n. 1, p. 115–122, 2008.

WISHART, D. S. Quantitative metabolomics using NMR. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 27, n. 3, p. 228–237, 2008.

WONG, K. C. Review of NMR Spectroscopy: Basic Principles, Concepts and Applications in Chemistry NMR Spectroscopy: Basic Principles, Concepts and Applications in Chemistry; 3rd edition by Harald Günther Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 2013. xvi + 718 pp. ISBN 978-352733. **Journal of Chemical Education**, v. 91, n. 8, p. 1103–1104, 12 ago. 2014.

WORLEY, B.; HALOUSKA, S.; POWERS, R. Utilities for quantifying separation in PCA/PLS-DA scores plots. **Analytical Biochemistry**, v. 433, n. 2, p. 102–104, 2013.

XIA, J.; WISHART, D. S. Web-based inference of biological patterns, functions and pathways from metabolomic data using MetaboAnalyst. **Nature Protocols**, v. 6, n. 6, p. 743–760, 2011.

YAN, T. et al. Characterisation of proanthocyanidins from Schisandra Chinensis seed coats by UPLC-QTOF/MS. **Natural Product Research**, v. 28, n. 21, p. 1834–1842, 2014.

YANG, L. et al. Response of Plant Secondary Metabolites to Environmental Factors. **Molecules**, v. 23, n. 4, p. 762, 27 mar. 2018.

ZAYNAB, M. et al. **Role of primary metabolites in plant defense against pathogens** *Microbial Pathogenesis* Academic Press, , 1 dez. 2019.

ZHANG, W. et al. Unexpected Stable Stoichiometries of Sodium Chlorides. **Science**, v. 342, n. 6165, p. 1502–1505, 2013.

APÊNDICE A – RESULTADOS DOS TESTES DE ANOVA NOS DADOS DE ENZIMAS DE DEFESA

Mixed ANOVA for AtivSOD

The Mixed Procedure

Model Information

Data Set	WORK.ENZIMASCAJU
Dependent Variable	AtivSOD
Covariance Structure	Diagonal
Estimation Method	REML
Residual Variance Method	Profile
Fixed Effects SE Method	Model-Based
Degrees of Freedom Method	Residual

Class Level Information

Class	Levels	Values
Clone	2	BRS226 CCP76
Regime	2	irrig seq
Epoca	2	1seca 2chuvosa

Dimensions

Covariance Parameters	1
Columns in X	27
Columns in Z	0
Subjects	1
Max Obs Per Subject	80
Observations Used	80
Observations Not Used	0
Total Observations	80

Covariance Parameter
Estimates

Cov Parm Estimate

Residual 8.244E10

Fit Statistics

-2 Res Log Likelihood	2032.5
AIC (smaller is better)	2034.5
AICC (smaller is better)	2034.5
BIC (smaller is better)	2036.8

Mixed ANOVA for Atividade SOD

The Mixed Procedure

Type 3 Tests of Fixed Effects

Effect	Num	Den	DF	DF	F Value	Pr > F
Regime			1	72	2.81	0.0982
Clone			1	72	8.84	0.0040
Clone*Regime			1	72	9.79	0.0025
Epoca			1	72	5.26	0.0247
Regime*Epoca			1	72	3.91	0.0518
Clone*Epoca			1	72	6.08	0.0161
Clone*Regime*Epoca			1	72	0.17	0.6797

Mean separation for AtivSOD

----- ADJUSTMENT=TUKEY(.05) BYGROUP=1 Effect=**Regime** -----

Obs	Clone	Regime	Epoca	Standard Estimate	Error	Pr > DF	Let t Value	t	Grp
1		irrig		1012443	45398	72	22.30	<.0001	A
2		seq		1119994	45398	72	24.67	<.0001	A

----- ADJUSTMENT=TUKEY(.05) BYGROUP=2 Effect=**Clone** -----

Obs	Clone	Regime	Epoca	Standard Estimate	Error	Pr > DF	Let t Value	t	Grp
3	BRS226			1161636	45398	72	25.59	<.0001	A
4	CCP76			970800	45398	72	21.38	<.0001	B

----- ADJUSTMENT=TUKEY(.05) BYGROUP=3 Effect=**Clone*Regime** -----

Obs	Clone	Regime	Epoca	Standard Estimate	Error	Pr > DF	Let t Value	t	Grp
5	BRS226	irrig		1007394	64203	72	15.69	<.0001	B
6	BRS226	seq		1315879	64203	72	20.50	<.0001	A
7	CCP76	irrig		1017491	64203	72	15.85	<.0001	B
8	CCP76	seq		924109	64203	72	14.39	<.0001	B

----- ADJUSTMENT=TUKEY(.05) BYGROUP=4 Effect=**Epoca** -----

Obs	Clone	Regime	Epoca	Standard Estimate	Error	Pr > DF	Let t Value	t	Grp
9		1seca		992567	45398	72	21.86	<.0001	B
10		2chuvosa		1139870	45398	72	25.11	<.0001	A

----- ADJUSTMENT=TUKEY(.05) BYGROUP=5 Effect=Regime*Epoca -----

Obs	Clone	Regime	Epoca	Standard Estimate	Standard Error	Pr > DF	Let t Value	t	Grp
11	irrig	1seca		875301	64203	72	13.63	<.0001	B
12	irrig	2chuvosa		1149584	64203	72	17.91	<.0001	A
13	seq	1seca		1109832	64203	72	17.29	<.0001	A
14	seq	2chuvosa		1130155	64203	72	17.60	<.0001	A

----- ADJUSTMENT=TUKEY(.05) BYGROUP=6 Effect=Clone*Epoca -----

Obs	Clone	Regime	Epoca	Standard Estimate	Standard Error	Pr > DF	Let t Value	t	Grp
15	BRS226		1seca	1008855	64203	72	15.71	<.0001	B
16	BRS226		2chuvosa	1314417	64203	72	20.47	<.0001	A
17	CCP76		1seca	976278	64203	72	15.21	<.0001	B
18	CCP76		2chuvosa	965322	64203	72	15.04	<.0001	B

----- ADJUSTMENT=TUKEY(.05) BYGROUP=7 Effect=Clone*Regime*Epoca -----

Obs	Clone	Regime	Epoca	Standard Estimate	Standard Error	Pr > DF	Let t Value	t	Grp
19	BRS226	irrig	1seca	777815	90796	72	8.57	<.0001	D
20	BRS226	irrig	2chuvosa	1236973	90796	72	13.62	<.0001	AB
21	BRS226	seq	1seca	1239896	90796	72	13.66	<.0001	AB
22	BRS226	seq	2chuvosa	1391861	90796	72	15.33	<.0001	A
23	CCP76	irrig	1seca	972787	90796	72	10.71	<.0001	CD
24	CCP76	irrig	2chuvosa	1062195	90796	72	11.70	<.0001	BC
25	CCP76	seq	1seca	979769	90796	72	10.79	<.0001	CD
26	CCP76	seq	2chuvosa	868449	90796	72	9.56	<.0001	CD

The SAS System 13:28 Friday, January 25, 2002 5
 Check on Normality for AtivSOD

The UNIVARIATE Procedure
 Variable: Resid

Tests for Normality

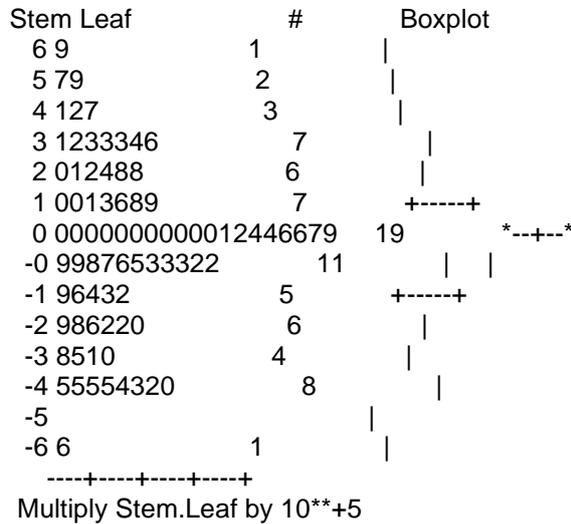
Test	--Statistic--	-----p Value-----
Shapiro-Wilk	W 0.983844	Pr < W 0.4104
Kolmogorov-Smirnov	D 0.078241	Pr > D >0.1500
Cramer-von Mises	W-Sq 0.103315	Pr > W-Sq 0.1002
Anderson-Darling	A-Sq 0.545341	Pr > A-Sq 0.1614

Extreme Observations

-----Lowest-----		-----Highest----	
Value	Obs	Value	Obs
-659401	62	420248	18

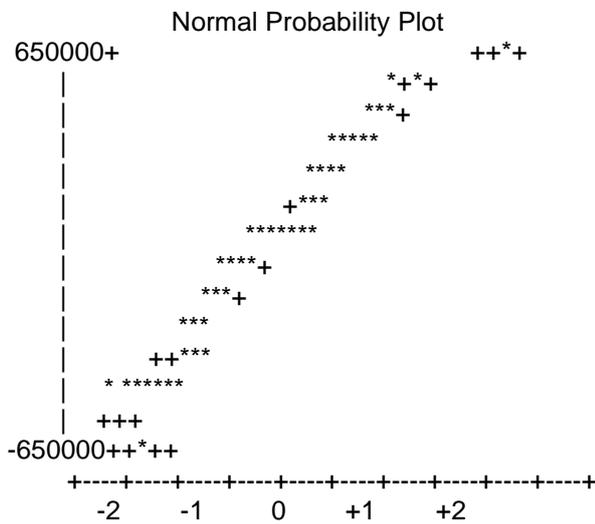
```

-453136 71 468329 39
-450619 11 568474 66
-446981 21 592247 10
-445035 40 693504 64
    
```



The SAS System 13:28 Friday, January 25, 2002 6
 Check on Normality for AtivSOD

The UNIVARIATE Procedure
 Variable: Resid



Check equality of stddev for AtivSOD

Obs	Clone	Regime	Epoca	nobs	rawmean	stddev	stderr	LeveneF_df	P
1	BRS226	irrig	1seca	10	777814.86	289380.78	91510.24	2.59(7,72)	0.019
2	BRS226	irrig	2chuvosa	10	1236973.15	274618.11	86841.87	.	.
3	BRS226	seq	1seca	10	1239895.65	219824.90	69514.74	.	.
4	BRS226	seq	2chuvosa	10	1391861.50	414588.37	131104.35	.	.
5	CCP76	irrig	1seca	10	972787.26	285435.54	90262.64	.	.

6	CCP76	irrig	2chuvosa	10	1062195.28	219804.04	69508.14	.
7	CCP76	seq	1seca	10	979768.92	378858.42	119805.55	.
8	CCP76	seq	2chuvosa	10	868448.82	82659.62	26139.27	.

Mixed ANOVA for **Atividade APX**

The Mixed Procedure

Model Information

Data Set	WORK.ENZIMASCAJU
Dependent Variable	AtivAPX
Covariance Structure	Diagonal
Estimation Method	REML
Residual Variance Method	Profile
Fixed Effects SE Method	Model-Based
Degrees of Freedom Method	Residual

Class Level Information

Class	Levels	Values
Clone	2	BRS226 CCP76
Regime	2	irrig seq
Epoca	2	1seca 2chuvosa

Dimensions

Covariance Parameters	1
Columns in X	27
Columns in Z	0
Subjects	1
Max Obs Per Subject	80
Observations Used	80
Observations Not Used	0
Total Observations	80

Covariance Parameter
Estimates

Cov Parm	Estimate
----------	----------

Residual	1.7252E8
----------	----------

Fit Statistics

-2 Res Log Likelihood	1588.3
AIC (smaller is better)	1590.3
AICC (smaller is better)	1590.4
BIC (smaller is better)	1592.6

Mixed ANOVA for AtivAPX

The Mixed Procedure

Type 3 Tests of Fixed Effects

Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
Regime	1	72	0.07	0.7906
Clone	1	72	36.74	<.0001
Clone*Regime	1	72	39.97	<.0001
Epoca	1	72	29.31	<.0001
Regime*Epoca	1	72	7.96	0.0062
Clone*Epoca	1	72	20.79	<.0001
Clone*Regime*Epoca	1	72	78.51	<.0001

Mean separation for AtivAPX

----- ADJUSTMENT=TUKEY(.05) BYGROUP=1 Effect=**Regime** -----

Obs	Clone	Regime	Epoca	Standard Estimate	Error	Pr > DF	Let t Value	t	Grp
1	irrig			37338	2076.76	72	17.98	<.0001	A
2	seq			38121	2076.76	72	18.36	<.0001	A

----- ADJUSTMENT=TUKEY(.05) BYGROUP=2 Effect=**Clone** -----

Obs	Clone	Regime	Epoca	Standard Estimate	Error	Pr > DF	Let t Value	t	Grp
3	BRS226			28828	2076.76	72	13.88	<.0001	B
4	CCP76			46631	2076.76	72	22.45	<.0001	A

----- ADJUSTMENT=TUKEY(.05) BYGROUP=3 Effect=**Clone*Regime** -----

Obs	Clone	Regime	Epoca	Standard Estimate	Error	Pr > DF	Let t Value	t	Grp
5	BRS226	irrig		19152	2936.98	72	6.52	<.0001	C
6	BRS226	seq		38504	2936.98	72	13.11	<.0001	B
7	CCP76	irrig		55524	2936.98	72	18.91	<.0001	A
8	CCP76	seq		37738	2936.98	72	12.85	<.0001	B

----- ADJUSTMENT=TUKEY(.05) BYGROUP=4 Effect=**Epoca** -----

Obs	Clone	Regime	Epoca	Standard Estimate	Error	Pr > DF	Let t Value	t	Grp
9		1seca		45680	2076.76	72	22.00	<.0001	A
10		2chuvosa		29780	2076.76	72	14.34	<.0001	B

----- ADJUSTMENT=TUKEY(.05) BYGROUP=5 Effect=**Regime*Epoca** -----

Obs	Clone	Regime	Epoca	Standard Estimate	Error	Pr > DF	Let t Value	t	Grp
11	irrig	1seca		49430	2936.98	72	16.83	<.0001	A
12	irrig	2chuvosa		25246	2936.98	72	8.60	<.0001	C

13	seq	1seca	41929	2936.98	72	14.28	<.0001	AB
14	seq	2chuvosa	34313	2936.98	72	11.68	<.0001	B

Mean separation for AtivAPX

----- ADJUSTMENT=TUKEY(.05) BYGROUP=6 Effect=**Clone*Epoca** -----

Obs	Clone	Regime	Epoca	Standard Estimate	Error	Pr > DF	Let t Value	t	Grp
15	BRS226		1seca	43474	2936.98	72	14.80	<.0001	A
16	BRS226		2chuvosa	14182	2936.98	72	4.83	<.0001	B
17	CCP76		1seca	47885	2936.98	72	16.30	<.0001	A
18	CCP76		2chuvosa	45377	2936.98	72	15.45	<.0001	A

----- ADJUSTMENT=TUKEY(.05) BYGROUP=7 Effect=**Clone*Regime*Epoca** -----

Obs	Clone	Regime	Epoca	Standard Estimate	Error	Pr > DF	Let t Value	t	Grp
19	BRS226	irrig	1seca	24929	4153.52	72	6.00	<.0001	D
20	BRS226	irrig	2chuvosa	13375	4153.52	72	3.22	0.0019	D
21	BRS226	seq	1seca	62020	4153.52	72	14.93	<.0001	B
22	BRS226	seq	2chuvosa	14988	4153.52	72	3.61	0.0006	D
23	CCP76	irrig	1seca	73931	4153.52	72	17.80	<.0001	A
24	CCP76	irrig	2chuvosa	37117	4153.52	72	8.94	<.0001	C
25	CCP76	seq	1seca	21839	4153.52	72	5.26	<.0001	D
26	CCP76	seq	2chuvosa	53638	4153.52	72	12.91	<.0001	B

Check on Normality for AtivAPX

The UNIVARIATE Procedure
Variable: Resid

Tests for Normality

Test --Statistic--- -----p Value-----

Shapiro-Wilk W 0.849907 Pr < W <0.0001
Kolmogorov-Smirnov D 0.204641 Pr > D <0.0100
Cramer-von Mises W-Sq 0.853815 Pr > W-Sq <0.0050
Anderson-Darling A-Sq 4.278862 Pr > A-Sq <0.0050

Extreme Observations

-----Lowest-----		-----Highest-----	
Value	Obs	Value	Obs
-28265.4	17	25052.3	52
-22228.8	47	28151.2	10
-20821.8	14	32757.6	48
-19575.8	30	42592.2	16
-17716.1	50	51164.8	18

Stem Leaf

#

Boxplot

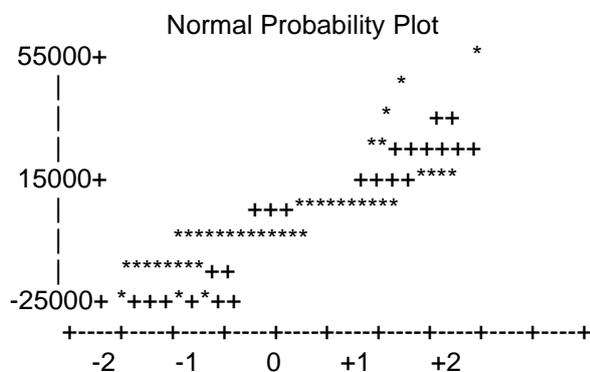
```

5 1          1          *
4 3          1          *
3 3          1          *
2 58         2          *
1 0266       4          0
0 0000000011233455556777          22      +---+---+
-0 999865544332222211111100000000000000 36      *-----*
-1 874433322          9          0
-2 8210         4          0
-----+-----+-----+-----+-----+
Multiply Stem.Leaf by 10**+4

```

Check on Normality for AtivAPX

The UNIVARIATE Procedure
Variable: Resid



Check equality of stddev for AtivAPX

Obs	Clone	Regime	Epoca	nobs	rawmean	Levene		LeveneF_df	P
						stddev	stderr		
1	BRS226	irrig	1seca	10	24928.76	8368.14	2646.24	3.198(7,72)	.005
2	BRS226	irrig	2chuvosa	10	13375.14	2738.85	866.10	.	.
3	BRS226	seq	1seca	10	62019.78	8794.95	2781.21	.	.
4	BRS226	seq	2chuvosa	10	14988.18	3720.77	1176.61	.	.
5	CCP76	irrig	1seca	10	73931.43	26501.62	8380.55	.	.
6	CCP76	irrig	2chuvosa	10	37117.21	10817.91	3420.92	.	.
7	CCP76	seq	1seca	10	21838.61	13315.67	4210.78	.	.
8	CCP76	seq	2chuvosa	10	53637.54	14654.16	4634.05	.	.