



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

**FRANCISCO WENDELL MOREIRA DO NASCIMENTO**

**ESTUDO DA DIVERSIDADE QUÍMICA DAS FOLHAS DE *Spondias tuberosa***  
**DURANTE OS ESTÁDIOS DE EVOLUÇÃO FENOLÓGICOS: ABORDAGENS**  
**METABOLÔMICA E QUIMIOMÉTRICA ASSOCIADAS AS ATIVIDADES**  
**ANTIOXIDANTE E ANTIGLICANTE**

**FORTALEZA**

**2024**

FRANCISCO WENDELL MOREIRA DO NASCIMENTO

ESTUDO DA DIVERSIDADE QUÍMICA DAS FOLHAS DE *Spondias tuberosa* DURANTE  
OS ESTÁDIOS DE EVOLUÇÃO FENOLÓGICOS: ABORDAGENS METABOLÔMICA E  
QUIMIOMÉTRICA ASSOCIADAS AS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E  
ANTIGLICANTE

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: Analítica.

Orientador: Pesquisador Dr. Guilherme Julião Zocolo.

Coorientador: Prof. Dr. Jhonyson Arruda Carvalho Guedes.

FORTALEZA

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Sistema de Bibliotecas

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

---

- N195e Nascimento, Francisco Wendell Moreira do.  
Estudo da diversidade química das folhas de *Spondias tuberosa* durante os estádios fenológicos:  
Abordagens metabolômica e quimiometria associadas as atividades antioxidante e antiglicante. / Francisco  
Wendell Moreira do Nascimento. – 2024.  
93 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação  
em Química, Fortaleza, 2024.  
Orientação: Prof. Dr. Guilherme Julião Zocolo .  
Coorientação: Prof. Dr. Jhonyson Arruda Carvalho Guedes.
1. *Spondias tuberosa*. 2. UPLC-Qtof-MSE. 3. Antioxidante. 4. Antiglicante. 5. Metabolômica. I. Título.  
CDD 540
-

FRANCISCO WENDELL MOREIRA DO NASCIMENTO

ESTUDO DA DIVERSIDADE QUÍMICA DE FOLHAS *Spondias tuberosa* DURANTE OS  
ESTÁDIOS DE EVOLUÇÃO FENOLÓGICOS: ABORDAGENS METABOLÔMICA E  
QUIMIOMÉTRICA ASSOCIADAS AS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E  
ANTIGLICANTE

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: Analítica.

Aprovada em: \_\_/\_\_/\_\_\_\_.

BANCA EXAMINADORA

---

Pesquisador. Dr. Guilherme Julião Zocolo (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Jhonyson Arruda Carvalho Guedes (Coorientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

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

---

Profª. Dra. Debora Bezerra de Sousa  
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará – IFCE (Campus Crateús)

A Deus.

Aos meus pais, Francisco Wellington e  
Damiana.

## AGRADECIMENTOS

A Deus e a espiritualidade por ter me dado forças e equilíbrio para conseguir chegar até aqui.

Aos meus pais, pelo esforço para sempre garantirem a melhor condição e educação possível para mim.

A minha família e principalmente a minha avó por sempre me colocar em suas orações e acreditar tanto no meu potencial.

A minha melhor amiga Bárbara por estar sempre presente na minha vida e me dar forças e conselhos sábios nos momentos de maior precisão.

As minhas amigas Lara, Laís, Letícia, Clara, Beatriz e Andreza por estarem comigo e fazerem a minha vida mais leve e feliz para que eu conseguisse passar por todo o processo e não desistisse.

Ao Dr. Guilherme Julião Zocolo, pela excelente orientação e pelo diversos ensinamentos que me engrandeceram muito e que com certeza levarei para o resto da minha vida, sendo um exemplo de profissional no qual eu me inspiro.

Ao Prof. Dr. Jhonyson Arruda Carvalho Guedes, pela coorientação, ensinamentos e pela paciência com meus diversos questionamentos.

Aos professores participantes da banca examinadora Dra. Debora Bezerra de Sousa e Dra. Gisele Simone Lopes pelo tempo, pelas valiosas colaborações e sugestões que com certeza enriqueceu o conteúdo do meu trabalho.

À Embrapa Agroindústria Tropical, pelo suporte e infraestrutura para o desenvolvimento do trabalho, e aos membros do LMQPN, Paulo, Lorena e Tigressa, que tiveram paciência e contribuíram para o desenvolvimento do trabalho.

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

“Insanidade é continuar fazendo sempre a mesma coisa e esperar resultados diferentes.”  
(Albert Einstein)

## RESUMO

*Spondias tuberosa* Arr. Cam. popularmente conhecida como umbuzeiro, é uma espécie endêmica da Caatinga, pertencente à família Anacardiaceae. As espécies alimentícias de umbuzeiro apresentam estudos que abrangem áreas da ciência, tais como a Química de Produtos Naturais, Farmacologia, apresentando atividades biológicas relevantes e de interesse da indústria. Nesse contexto, a busca de substâncias antioxidantes e anti-aging pela indústria de cosméticos se justifica pela necessidade de protetores de pele mais eficazes, capazes de inibir a deterioração oxidativa dos ingredientes lábeis, como ácidos graxos insaturados ou outros ingredientes ativos da pele, propensos à oxidação. Existe um grande gargalo dos estudos químicos para esse gênero que está relacionado às variações metabólicas de uma mesma espécie durante os diferentes estádios de evolução fenológico. A técnica de cromatografia líquida de ultra performance acoplada à espectrometria de massas de alta resolução UPLC-QToF-MS<sup>E</sup> no modo de ionização negativo foi utilizada para traçar o perfil químico das folhas de *S. tuberosa* em diferentes estádios fenológicos, e ainda com o auxílio de ferramentas de quimioinformática foi concebido um estudo químico, a fim de obter o máximo de informação em relação ao desenvolvimento fenológico nas três fases da folha sendo essas: a fase pós-floração (folha jovem), plena produção e senescência. Das classes dos metabólitos anotados, destacam-se os compostos fenólicos, que se apresentaram como a maioria, tais como flavonóides glicosilados e aglicona, elagitaninos e ácidos anacárdicos. O ensaio de atividade antiglicante revelou uma potencial inibição das formações de AGE's das folhas nos diferentes estádios de desenvolvimento fenológicos, que por meio de uma análise de variância (ANOVA), foi possível afirmar que não houve diferença significativa entre as médias de atividade de cada fase. A atividade antioxidante mostrou-se satisfatória e concordante com resultados já reportados anteriormente. O estudo pôde destacar o potencial uso das folhas de umbuzeiro como fonte alternativa de antioxidantes naturais, aplicáveis em formulações anti-aging, viabilizando a utilização das folhas dessa espécie, que hoje são totalmente descartadas, podendo proporcionar o aumento do valor agregado ao cultivo de umbuzeiro, estimulando a agricultura familiar e a recuperação da densidade arbórea em áreas degradadas.

**Palavras-chave:** *Spondias tuberosa*; metabolômica; antioxidantes; antiglicantes.

## ABSTRACT

*Spondias tuberosa* Arr. Cam. popularly known as umbuzeiro, is an endemic species of the Caatinga, belonging to the Anacardiaceae family. Umbuzeiro food species present studies that cover areas of science, such as Chemistry of Natural Products, Pharmacology, presenting relevant biological activities of interest to the industry. In this context, the search for antioxidant and anti-aging substances by the cosmetics industry is justified by the need for more effective skin protectors, capable of inhibiting the oxidative deterioration of labile ingredients, such as unsaturated fatty acids or other skin active ingredients, prone to oxidation. There is a major bottleneck in chemical studies for this genus, which is related to the metabolic variations of the same species during different stages of phenological evolution. The ultra-performance liquid chromatography technique coupled to high-resolution mass spectrometry UPLC-QToF-MSE in negative ionization mode was used to trace the chemical profile of *S. tuberosa* leaves at different phenological stages, and also with the aid of chemoinformatics tools a chemical study was designed in order to obtain maximum information regarding the phenological development in the three phases of the leaf, namely: the post-flowering phase (young leaf), full production and senescence. Of the classes of metabolites noted, phenolic compounds stand out, which were the majority, such as glycosylated flavonoids and aglycone, ellagitannins and anacardic acids. The antiglycant activity assay revealed a potential inhibition of the formation of AGEs in the leaves at different stages of phenological development, which, through an analysis of variance (ANOVA), made it possible to state that there was no significant difference between the means of AGE activity in each phase. The antioxidant activity was satisfactory and in agreement with previously reported results. The study was able to highlight the potential use of umbuzeiro leaves as an alternative source of natural antioxidants, applicable in anti-aging formulations, making it possible to use the leaves of this species, which are currently completely discarded, and can provide an increase in added value to umbuzeiro cultivation. , stimulating family farming and the recovery of tree density in degraded areas.

**Keywords:** *Spondias tuberosa*; metabolomics; antioxidants; antiglycants.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Conexões biossintéticas entre o metabolismo primário e o especializado. As rotas biossintéticas responsáveis pela produção de metabólitos especializados ocorrem através das seguintes vias: (1) via dos aminoácidos, (2) via do chiquimato, (3) via dos policetídeos, (4) via do ácido mevalônico e (5) via do metileritritol fosfato (MEP) .....	23
Figura 2 – Estrutura básica dos flavonóides .....	25
Figura 3 – Unidade básica de construção dos terpenos .....	26
Figura 4 – Abrangência do bioma segundo a proposta de delimitação político-administrativa nacional da Caatinga .....	28
Figura 5 – <i>Spondias tuberosa</i> Arruda .....	33
Figura 6 – Representação de diferentes comprimentos de onda (nm) e respectiva penetração na pele humana .....	40
Figura 7 – Precursores dicarbonílicos glicoxal (G), Metilglicoxal (MG) e 3-deoxiglicoxona (3-DG) produzidos intracelularmente .....	41
Figura 8 – Esquema simplificado do procedimento operacional de microextrações sólido-líquido para UPLC-ESI-QTOF-MS <sup>E</sup> .....	46
Figura 9 – Cromatograma do QC 1 das folhas de <i>Spondias tuberosa</i> obtido no sistema UPLS-ESI-QTOF-MS <sup>E</sup> .....	53
Figura 10 – Representação estrutural dos metabólitos anotados das folhas de <i>Spondias tuberosa</i> .....	55
Figura 11 – Análise de Componentes Principais (PCA) em 2D dos extratos das folhas de <i>Spondias tuberosa</i> .....	59
Figura 12 – Cromatogramas do espécime (BGU 16) nos estágios fenológicos de Folhas Jovens (a), Plena Produção (b) e Senescência (c) .....	62
Figura 13 – Pontuações de Hotelling's T <sup>2</sup> para PCA de <i>Spondias tuberosa</i> .....	62
Figura 14 – Gráficos das análises das folhas de <i>Spondias tuberosa</i> : (a) OPLS-DA folhas jovens vs senescência; (b) S-Plot folhas jovens v.s. senescência; (c) OPLS-DA folhas jovens v.s. grupo 1(plena produção); (d) S-Plot folhas jovens v.s. grupo 1(plena produção); e (e) Variação média dos marcadores químicos do extrato etanólico das folhas de <i>Spondias tuberosa</i> .....	68
Figura 15 – Porcentagens de Inibição de AGE's (a) Jovens Jovens; (b) Plena Produção e (c) Senescência .....	70

Figura 16 – Flavonoides que apresentam atividade antiglicante .....	72
Figura 17 – Distribuição dos marcadores químicos das folhas de umbuzeiro onde (1) miricetina- <i>O</i> -rutinosideo; (2) quercetina-3- <i>O</i> -rutinosideo (rutina); (3) kaempferol 3- <i>O</i> -rutinosideo e (4) quercetina .....	73
Figura 18 – Gráficos das análises das folhas de <i>Spondias tuberosa</i> (a) OPLS-DA A27 <i>v.s.</i> A34; (b) S-Plot A27 <i>v.s.</i> A34; (c) Variação média dos marcadores químicos do A34 em relação ao A27; (7) rutina e (9) kaempferol-3- <i>O</i> -rutinosídeo .....	77

## **LISTA DE QUADROS**

Quadro 1 – Cronologia da descoberta de fármacos a partir de plantas .....	19
---	----

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais Vias Metabólicas do Metabolismo Basal.....	22
Tabela 2 – Distribuição de Gêneros e Espécies nas Tribos da Família Anacardiaceae.....	29
Tabela 3 – Metabólitos primários e especializados encontrados em <i>Spondias</i> spp.....	31
Tabela 4 – Subcategorias de estudos metabolômicos alvo e não alvo .....	36
Tabela 5 – Compostos anotados nas amostras de folhas de <i>Spondias tuberosa</i> (umbu) ....	57
Tabela 6 – Discriminantes dos estádios fenológicos das folhas de <i>Spondias tuberosa</i> .....	65
Tabela 7 – Tabela de ANOVA para a comparação da atividade antiglicante nos diferentes estágios fenológicos.....	71
Tabela 8 – Capacidade antioxidante sequestradora de radicais (DPPH) para os extratos das folhas de <i>S. tuberosa</i> . * folhas jovens; ** plena produção e *** senescência .....	74
Tabela 9 – Comparação de Atividade Antiglicante com Atividade Antioxidante .....	76

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3-DG	3-Deoxiglicosona
AGE	<i>Advanced Glycation Endproducts</i>
ANOVA	Análise de Variância
BGU	Banco de Germoplasma de Umbu
BHA	Butilhidroxianisol
BHT	Butilhidroxitolueno
BSA-MG	Albumina Sérica Bovina - Metilglioxal
CG-MS	Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas
DMAPP	Difosfato de Dimetilalila
DOX	1-desóxi-D-xilulose
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ESI <sup>-</sup>	Ionização por Eletrospray em Modo Negativo
ESI <sup>+</sup>	Ionização por Eletrospray em Modo Positivo
G	Glioxal
HPLC-MS/MS	Cromatografia Líquida de Alta Performance Acoplada à Espectrometria de Massas em Tandem
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IPP	Difosfato de Isopentila
LabFitoBio	Laboratório de Fitoquímica e Biomoléculas
LabPIM	Laboratório de Polímeros e Inovação de Materiais
LMQPN	Laboratório de Química de Produtos Naturais
MG	Metilglioxal
OPLS-DA	Análise Discriminante de Quadrados Mínimos Parciais Ortogonais
PCA	Análise de Componente Principal
Q <sup>2</sup>	Varição Predita
QC	Controle de Qualidade
R <sup>2</sup> Y	Varição Explicada
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
TBHQ	Terc-Butilhidroquinona
UPLC-QToF-MS <sup>E</sup>	Cromatografia Líquida de Alta Performance Acoplada à Espectrometria de Massa de Alta Resolução
VIP	Importância da Variável na Projeção

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	14
2	OBJETIVOS .....	17
2.1	Objetivo Geral .....	17
2.2	Objetivos específicos .....	17
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	18
3.1	Produtos Naturais .....	18
3.2	Metabolismo Vegetal .....	20
3.2.1	<i>Metabolismo Primário</i> .....	21
3.2.2	<i>Metabolismo Especializado ou Secundário</i> .....	22
3.2.3	<i>Compostos Fenólicos</i> .....	24
3.2.3.1	<i>Flavonoides</i> .....	24
3.2.4	<i>Terpenos</i> .....	25
3.2.5	<i>Alcaloides</i> .....	26
3.3	A Caatinga e sua diversidade .....	27
3.4	A Família <i>Anacardiaceae</i> .....	29
3.5	<i>Spondias</i> ssp .....	30
3.6	<i>Spondias tuberosa</i> Arruda .....	33
3.7	Metabolômica .....	34
3.7.1	<i>Pré-processamento de dados e Quimiometria</i> .....	36
3.8	Radicais Livres e Atividade Antioxidante .....	38
3.9	Formação de AGEs e Atividade Antiglicante .....	41
4	METODOLOGIA .....	44
4.1	Instrumentação .....	44
4.2	Reagentes, solventes e materiais utilizados .....	44
4.3	Coleta de amostras .....	45
4.4	Preparo de extrato para análise em UPLC .....	45
4.5	Preparo de extrato para atividades biológicas .....	46
4.6	Condições de análise aplicadas ao sistema UPLC-ESI-QTOF-MS <sup>E</sup> .....	47
4.7	Processamento de dados e análise estatística .....	48
4.8	Anotação dos metabólitos .....	49
4.9	Ensaio biológicos <i>in vitro</i> realizados com os extratos etanólicos de <i>Spondias tuberosa</i> .....	50

4.9.1	<i>Atividade Antiglicante</i> .....	50
4.9.2	<i>Atividade Antioxidante</i> .....	50
5	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	52
5.1	<b>Análise do perfil químico das folhas de <i>Spondias tuberosa</i></b> .....	52
5.2	<b>Análise Multivariada</b> .....	59
5.2.1	<i>Análise de Componentes Principais (PCA)</i> .....	59
5.2.2	<i>OPLS-DA e Análise de S-Plot</i> .....	63
5.2.3	<i>Avaliação das distribuição dos marcadores químicos nas folhas de <i>Spondias tuberosa</i></i> .....	66
5.3	<b>Atividade Antiglicante</b> .....	69
5.4	<b>Atividade Antioxidante</b> .....	74
6	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	79
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	81

## 1 INTRODUÇÃO

A humanidade faz o uso de produtos naturais desde tempos muito antigos. A busca na natureza pela cura e alívio de algumas doenças acompanha o homem pela sua história. Várias civilizações antigas ganharam destaque pela utilização de recursos naturais na medicina como a civilização Egípcia, Greco-Romana e Chinesa. Até os tempos modernos, a medicina tradicional chinesa desperta a curiosidade por sua grandiosidade e eficiência, impulsionando a busca pelo entendimento por trás das propriedades dos vegetais utilizados em tal medicina (VIEGAS; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

O Brasil apresenta uma posição privilegiada para a ciência dos produtos naturais, por sua enorme biodiversidade e por possuir um numeroso grupo de pesquisadores de química de produtos naturais (BERLINCK *et. al.*, 2017). Nesse contexto, ocupando uma área de cerca de 11% do território brasileiro, a Caatinga é um bioma rico em biodiversidade, apresentando um clima semiárido e vegetação xerófila (DUTRA *et. al.*, 2017). Mesmo sofrendo diretamente diversas ameaças e influência antrópica, a Caatinga apresenta apenas 9,16% de sua extensão resguardada por Unidades de Conservação (UCs) de Proteção Integral (CNUC/MMA, 2023).

A Caatinga cobre totalmente o Ceará e parte dos estados do Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Alagoas, Sergipe, Bahia e uma faixa seguindo o Rio São Francisco em Minas Gerais. Apresenta diversas paisagens e tipos de vegetação, formada por espécies que desenvolveram mecanismos para sobreviver em ambientes com pouco índice pluviométrico e baixa umidade. Toda a diversidade da Caatinga é representada por mais de duas mil espécies, destacando-se aproximadamente 130 espécies endêmicas. Quando comparada aos outros biomas brasileiros, a Caatinga é provavelmente a menos conhecida e a mais desvalorizada, devido a reduzida exploração sustentável dos recursos naturais e a elevada proporção de terras desmatadas para pecuária (PRADO, 2003; QUEIROZ, 2011; BEZERRA *et al.* 2014).

O umbuzeiro (*Spondias tuberosa* Arr. Cam.) é uma espécie endêmica desse tipo de vegetação, apresentando grande importância econômica, principalmente nos períodos de seca. O umbu, fruto do umbuzeiro, é colhido entre os meses de janeiro e abril, proporcionando uma renda extra aos pequenos agricultores, pois essa colheita se compreende em um período entressafra de outras culturas tradicionais. Com uma produção de 14.200 toneladas em 2022, o Brasil é considerado o maior produtor de Umbu, sendo a Bahia o estado com maior produção, com 41% de todo umbu produzido, contando ainda com a produção de Minas Gerais (36%), Paraíba (13%), Rio Grande do Norte (4%), Pernambuco (3%), Alagoas (2%) e Piauí (1%) (IBGE, 2023).

O umbu é fonte de vitaminas do complexo B (B1, B2 e B3), vitamina A, vitamina C e minerais tais como o cálcio, fósforo e potássio além disso, a literatura relata diversas propriedades farmacológicas associadas ao umbu, dentre as quais podemos citar: atividade antibacteriana, ação anti-inflamatória, propriedades antimicrobianas e antioxidantes (SILVA *et al.*, 2012). A presença de metabólitos secundários como os taninos e antocianinas, do grupo dos compostos fenólicos, podem justificar a ação antioxidante (DA COSTA CORDEIRO *et al.*, 2018). As folhas do umbuzeiro também são utilizadas na medicina popular visando o tratamento de uma série de doenças, tais como o diabetes, inflamações, dor uterina, dor no estômago e constipação (NARAIN *et al.*, 1992; ROCHA *et al.*, 2013).

Naturalmente, os antioxidantes são encontrados no nosso corpo, contudo, com hábitos irregulares de vida como exposição sem proteção ao sol, tabagismo e consumo de bebidas alcoólicas, a quantidade de radicais livres supera a capacidade do corpo de se livrar das espécies reativas, gerando o que é chamado de estresse oxidativo. Esse desequilíbrio acelera o envelhecimento cutâneo devido à morte e ao mal funcionamento das células presentes na pele que sofrem ataques dos radicais livres, gerando reações danosas que em casos mais avançados pode levar ao aparecimento de câncer. Faz-se então, necessária a busca por antioxidantes naturais efetivos tanto para a proteção antioxidante dos componentes das fórmulas dos cosméticos como para a proteção da pele (GUARATINI; MEDEIROS; COLEPICOLO, 2007).

Os Produtos de Glicação Avançada (AGEs, do inglês *Advanced Glycation Endproducts*) são um grupo heterogêneo e complexo de moléculas formadas pela reação entre um grupo amino livre de uma proteína e o grupo carbonil de um açúcar redutor, levando à formação de ligações cruzada com proteínas, escurecimento e fluorescência. A glicação das proteínas é um processo espontâneo, ainda podendo envolver intermediários carbonílicos como a 3-deoxiglucosona (3-DG) (AHMED, 2005).

Estudos de caracterização das plantas permitem então a identificação de compostos bioativos com potenciais atividades biológicas a serem estudadas, como por exemplo, os flavonoides que apresentam uma grande importância farmacológica, pois agem na prevenção de doenças degenerativas (DA COSTA CORDEIRO *et al.*, 2018). A busca pelo entendimento das funções dos metabólitos provenientes tanto do metabolismo primário quanto do secundário (especializado) vem sendo alvo de estudo de diferentes áreas da Ciência, com ênfase nas áreas da Bioquímica e Química dos Produtos Naturais. Nesse contexto, o estudo dos metabólitos que constituem um dado organismo biológico pode ser concebido através de uma abordagem metabolômica. Essa abordagem pode ser utilizada para investigar a totalidade da expressão qualitativa e quantitativa do metabolismo primário e/ou secundário dos organismos e

estabelecer o entendimento dos organismos através de análise comparativa de perfis metabólicos entre indivíduos e/ou populações sujeitos a diferentes condições genéticas, ambientais ou patológicas (PILON *et. al*, 2020).

A investigação do metabolismo secundário em diferentes organismos biológicos requer técnicas analíticas diversificadas, nas quais, de modo geral, devem apresentar alta eficiência e grande poder de resolução. Nesse caso, podemos destacar as técnicas cromatográficas acopladas as técnicas de espectrometria de massas, as quais são essenciais na aquisição de dados. Sendo assim, tem-se, por exemplo, cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-MS) e cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas HPLC-MS/MS (BORGES *et. al*, 2017).

Dessa forma, utilizando técnicas analíticas como cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massa (UPLC-QTOF-MSE) este estudo visa realizar uma análise metabolômica das folhas do umbuzeiro em diferentes fases fenológicas. Além disso, o trabalho tem como objetivo avaliar as atividades antioxidantes e antiglicantes dos extratos hidroetanólicos e correlacionar essas atividades biológicas com os perfis químicos estabelecidos.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Caracterizar o perfil metabólico dos extratos hidroetanólicos das folhas do umbuzeiro (*Spondias tuberosa* Arruda) em três fases fenológicas: pós-floração, plena produção e senescência. Além disso, pretende-se avaliar as atividades antioxidante e antiglicante desses extratos em cada fase, identificando os marcadores químicos com potencial antienvhecimento (anti-aging).

### 2.2 Objetivos específicos

- Identificar os compostos químicos dos extratos hidroetanólicos das folhas de umbuzeiro nas três fases fenológicas;
- Testar a atividade antioxidante pelo método de varredura do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil);
- Testar atividade antiglicante pelo Sistema BSA-MG;
- Obter informações a respeito das diferenças e semelhanças entre os perfis químicos das três fases da folha do umbuzeiro, a partir dos dados de análise quimiométrica (PCA);
- Listar as variáveis ou compostos discriminantes que influenciam a diferenciação entre os extratos mediante a separação dos grupos através da OPLS-DA e S-Plot;
- Correlacionar os perfis químicos com as atividades biológicas durante as três fases fenológicas através de análises quimiométricas, visando identificar os compostos ou grupos de compostos responsáveis por essas atividades.
- Determinar qual a melhor fase fenológica para a coleta das folhas, de acordo com os valores de atividades antioxidante e antiglicante.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Produtos Naturais

A química dos produtos naturais, com suas origens traçadas até os tempos da alquimia, constitui a subárea mais antiga da química orgânica e possui uma rica trajetória de desenvolvimento. Este campo viu um avanço significativo a partir da introdução de técnicas hífenadas e do surgimento de ferramentas de biologia molecular, o que impulsionou seu desenvolvimento, antes lento até os anos 1960 (BORGES *et al.*, 2017).

Além de buscar curas para doenças, os seres humanos exploraram os recursos naturais para expressar cultura e assegurar sobrevivência. Isso incluiu o uso de corantes, substâncias alucinógenas em práticas religiosas e mágicas, além dos curares. Estes últimos são drogas derivadas de diversas plantas com propriedades de bloqueio neuromuscular, usadas para impregnar flechas utilizadas na caça e na pesca (VIEGAS; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

Apesar das diversas estratégias e metodologias disponíveis no mercado para a síntese de novos fármacos, a química de produtos naturais ainda representa uma alternativa de grande sucesso. Várias fontes de matéria prima de substâncias biologicamente ativas podem ser citadas como plantas, fungos, insetos, organismos marinhos e bactérias. E devido a sua rica biodiversidade, o Brasil pode ser considerado uma fonte de substâncias biologicamente ativas, ressaltando ainda mais a importância da preservação dessa enorme riqueza biológica que apresenta um grande potencial para a produção de novos fármacos (BARREIRO; BOLZANI, 2009).

Em 2006, foi aprovado no Brasil pelo Ministério da Saúde, portaria nº 648, a Política Nacional de Atenção Básica que inclui a plantas medicinais no SUS e pelo decreto nº 5.813 de 2006, a Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos, estabelecendo diretrizes para garantir o uso seguro e racional das plantas medicinais e fitoterápicos ressaltando também a sustentabilidade e desenvolvimento do complexo produtivo da saúde (SÁ-FILHO *et al.*, 2021).

Com o passar do tempo foi percebido que o conhecimento sobre as propriedades terapêuticas dos vegetais é cumulativo e tem sobrevivido ao longo do tempo, sendo repassado através das gerações até os dias de hoje (DE BARROS SILVA *et al.*, 2019). Atualmente, 48% dos medicamentos utilizados na terapêutica são provenientes direta ou indiretamente da exploração de produtos naturais, tendo como destaque as plantas medicinais através do conhecimento etnofarmacológico (SÁ *et al.*, 2021).

Desde a década de 1970, a importância e a necessidade da medicina tradicional como primeira fonte de tratamento de doenças em cerca de 60-80% das regiões do mundo foi estimulada e ressaltada pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Vários fatores contribuíram para essa conquista, desde a disponibilização das espécies vegetais com potencial terapêutico na natureza até o conhecimento etnofarmacológico resultando no sucesso do isolamento das substâncias biologicamente ativas para a produção de medicamentos (OLIVEIRA *et. al.*, 2004; YUAN *et al.*, 2016).

Segundo o Fórum Nacional de 1986 em Washington, EUA, a biodiversidade, também conhecida como diversidade biológica, é definida como a variabilidade entre organismos vivos de todas as origens. Isso inclui não apenas os ecossistemas terrestres e aquáticos, mas também os complexos ecológicos aos quais pertencem, abrangendo a diversidade dentro e entre espécies e entre os próprios ecossistemas (SIMÕES *et al.*, 2017).

O Brasil é reconhecido como um dos países com a maior biodiversidade do planeta, ostentando o status de ser o país com a maior riqueza de plantas do mundo, com um registro de 34,916 espécies identificadas (SIMÕES *et al.*, 2017). A diversidade e a complexidade de seus biomas, juntamente com a extensa cobertura de florestas tropicais, concentradas principalmente na Floresta Amazônica, são os principais fatores para essa distinção (PIMENTEL *et al.*, 2015).

Este vasto patrimônio biológico possui um valor econômico e estratégico imenso para diversos setores como o agronegócio, a indústria têxtil e o setor energético. No entanto, sua maior utilidade parece estar na exploração de novos agentes bioativos, apesar de apenas uma pequena fração (15%) ter sido efetivamente estudada cientificamente para avaliar seus benefícios farmacoterapêuticos (CALIXTO, 2003; SIMÕES *et al.*, 2017).

A pesquisa em produtos naturais, especialmente nos séculos XVIII e XIX, teve um impacto notável na medicina, levando ao desenvolvimento de vários medicamentos que se originaram de práticas medicinais tradicionais (MARIA *et al.*, 2010; SIMÕES *et al.*, 2017).

**Quadro 1** – Cronologia da descoberta de fármacos a partir de plantas.

Ano de Descoberta	Fármaco	Origem Natural	Uso Principal
1805	Morfina	Papoula do ópio ( <i>Papaver somniferum</i> )	Analgésico
1820	Quinina	Casca da árvore de quina ( <i>Cinchona spp.</i> )	Tratamento da malária
1833	Atropina	<i>Atropa</i>	Anticolinérgico
1864	Fisostigmina	<i>Physostigma</i>	Anticolinesterásico
1875	Pilocarpina	<i>Pilocarpus</i>	Colinérgico

Ano de Descoberta	Fármaco	Origem Natural	Uso Principal
1887	Efedrina	Ephedra	Adrenérgico
1895	Cocaína	Erythroxylon	Anestésico local
1895	Tubocurarina	Chondrodendron	Bloqueador neuromuscular
1899	Aspirina (ácido acetilsalicílico)	Casca do salgueiro ( <i>Salix alba</i> )	Anti-inflamatório, analgésico e antipirético
1941	Dicumarol	Melilotus	Anticoagulante
1949	Cortisona	Raízes da planta Yucca	Tratamento de inflamações
1952	Reserpina	<i>Rauwolfia serpentina</i>	Anti-hipertensivo
1987	Taxol (Paclitaxel)	Casca do teixo do Pacífico ( <i>Taxus brevifolia</i> )	Quimioterápico contra câncer
2004	Artemisinina	<i>Artemisia annua</i>	Tratamento da malária

Fonte: Adaptado de SIMÕES *et al.*, 2017.

### 3.2 Metabolismo vegetal

A vida dos organismos vivos desde o nascimento até a morte é assegurada e controlada pelas transformações químicas realizadas pelos metabolismos primário e secundário. O metabolismo primário é o responsável por fornecer as substâncias que participam das funções básicas essenciais da vida celular como a respiração e biossíntese de aminoácidos e outras substâncias necessárias para a vida da célula. Os metabólitos secundários são específicos das espécies e participam de interações intra- e intercelular do próprio organismo ou com células de outro organismo. Além de isso, atuam em processos relacionados à reprodução como a polinização, e contribuem para a defesa contra pestes e outras doenças além de possibilitarem ajustes necessários à convivência e sobrevivência ambiental (BRAZ FILHO, 2010).

Os metabólitos secundários se apresentam em grande número, sendo sintetizados por meio de quatro vias de biossíntese, sendo elas: via do acetato malonato, do ácido mevalônico (MEV), metileritritol fosfato (MEP) e do ácido chiquímico, sendo os produtos dessas vias os três principais grupos de metabólitos secundários: terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados (VIZZOTTO; KROLOW; WEBER, 2010).

Diferentemente dos metabólitos primários, os metabólitos secundários se apresentam em baixas concentrações e em determinados grupos de plantas. Geralmente possuem uma estrutura complexa, baixo peso molecular e possuem atividades biológicas marcantes, despertando grande interesse não só por conta das atividades biológicas, mas também pela imensa atividade farmacológica que possuem, sendo de grande importância

comercial não apenas na área farmacêutica, mas também nas áreas alimentar, agrônômica, perfumaria e outras (PEREIRA; CARDOSO, 2012).

Por representarem de fato uma interface química entre as plantas e o ambiente, os metabólitos secundários têm sua síntese frequentemente afetada por condições ambientais. Alguns fatores que podem coordenar ou alterar a taxa de produção dos metabólitos secundários são a sazonalidade, o ritmo circadiano, o desenvolvimento da planta, temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, nutrientes, altitude, poluição atmosférica e ataque de patógenos. Além disso, alguns fatores apresentam correlação entre si, como o desenvolvimento e a sazonalidade, índice pluviométrico e sazonalidade, temperatura e altitude, entre outros. Alguns exemplos de metabólitos que são relatados por sua variação sazonal são os flavonoides, os óleos essenciais, os alcalóides, as saponinas, entre outros (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

### **3.2.1 *Metabolismo Primário***

O metabolismo primário, também conhecido como metabolismo basal, é essencial para a vida e reprodução dos organismos. Os compostos envolvidos neste tipo de metabolismo são vitais para todos os seres vivos, desempenhando funções como divisão celular, crescimento, respiração, armazenamento e reprodução. Entre esses compostos estão aminoácidos, açúcares, nucleotídeos, vitaminas e ácidos graxos (HUSSEIN & EI-ANSSARY, 2019; SIMÕES *et al.*, 2017).

Os metabólitos primários são altamente conservados entre diferentes espécies, apresentando grande similaridade. Essa semelhança pode ser observada em vários aspectos, como o fornecimento e armazenamento de energia, principalmente por meio de moléculas de ATP; síntese e armazenamento de substâncias como gorduras, carboidratos e proteínas através de vias metabólicas semelhantes; utilização de enzimas para catalisar reações metabólicas; e um código genético idêntico entre os organismos. A tabela 1 abaixo exemplifica essas vias metabólicas (DEBORDE *et al.*, 2017; FANG, FERNIE & LUO, 2019; SIMÕES *et al.*, 2017; WENG, 2014).

**Tabela 1**– Principais Vias Metabólicas do Metabolismo Basal.

<b>Metabolismo</b>	<b>Biossíntese</b>	<b>Degradação</b>
<b>Carboidratos</b>	Fotossíntese, ciclo de Calvin, ciclo dos ácidos C-4, gliconeogênese	Clivagem hidrolítica de carboidratos, glicólise, ciclo da pentose-fosfato
<b>Gorduras</b>	Síntese de lipídeos, complexo ácido graxo-sintase, acilglicerídeos, fosfolipídeos, glicolipídeos, carotenoides, esteróis	Clivagem hidrolítica de lipídeos, $\beta$ -oxidação de ácidos graxos
<b>Proteínas</b>	Biossíntese de aminoácidos e proteínas (processo de tradução)	Clivagem hidrolítica de proteínas, degradação e conversão dos aminoácidos
<b>Acetil-coenzima A</b>	Carboidratos, ácidos graxos, aminoácidos, cetogênese, terpenos, esteroides	Ciclo de Krebs, cadeia respiratória, ciclo do glioxilato
<b>Ácidos nucleicos</b>	Biossíntese de nucleotídeos do RNA a partir de bases púricas e pirimídicas, replicação de DNA, formação de flavinas e pteridinas a partir de GTP	Clivagem de DNA e RNA

Fonte: Adaptado de Simões *et al.*, 2017.

A partir dessas quatro vias metabólicas principais, com precursores provenientes do metabolismo primário que envolvem síntese, degradação e conversão, é produzido um segundo grupo de metabólitos que serão discutidos posteriormente: os metabólitos secundários ou especializados (DOS SANTOS, 2015; GALDEANO & KLEINGESINDS, 2013).

### 3.2.2 *Metabolismo Especializado ou Secundário*

Os metabólitos especializados, também conhecidos como metabólitos secundários, possuem distribuição limitada e são encontrados apenas em certas espécies. Esses compostos não estão diretamente ligados aos processos primários de crescimento e desenvolvimento das plantas (DEBORDE *et al.*, 2017; FANG, FERNIE & LUO, 2019; GALDEANO & KLEINGESINDS, 2016; SIMÕES *et al.*, 2017).

Por muito tempo, acreditou-se que esses metabólitos eram apenas subprodutos do metabolismo primário sem funções específicas. Contudo, pesquisas posteriores mostraram que esses compostos desempenham funções essenciais nas plantas, que utilizam rotas biossintéticas complexas e energeticamente intensivas para sintetizá-los (SIMÕES *et al.*, 2017).

Diferente do metabolismo basal, o metabolismo especializado se distingue pelas diversas vias metabólicas dos organismos, resultando em alta variabilidade e múltiplas funções, apesar de seus produtos serem encontrados em baixas concentrações (DOS SANTOS, 2015; SIMÕES *et al.*, 2017).

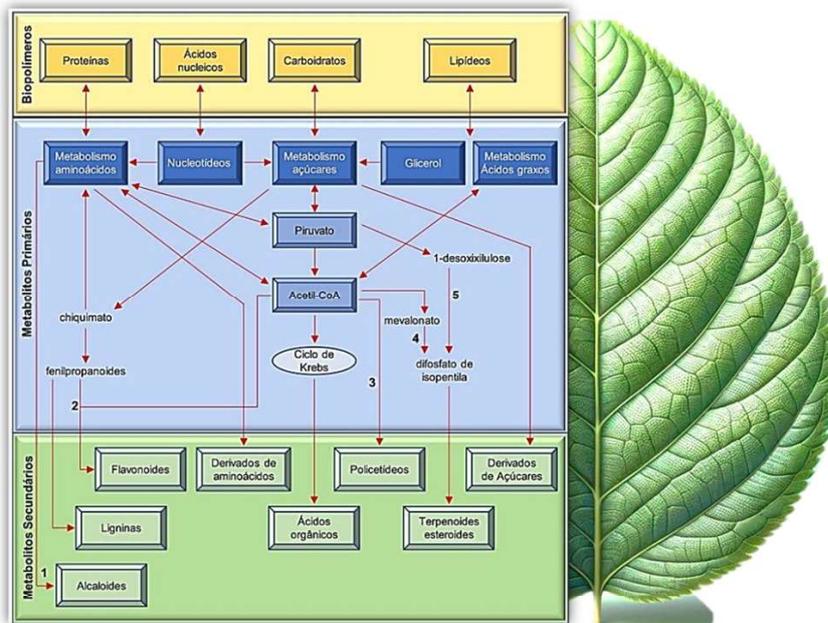
Esses compostos atuam principalmente na defesa das plantas, protegendo-as de

predadores e patógenos, e preservando os frutos até a maturação das sementes. Uma estratégia comum é a produção de substâncias com sabor amargo que desestimulam os herbívoros. Em contraste, alguns metabólitos secundários atraem animais que promovem benefícios para as plantas, como a polinização (SIMÕES *et al.*, 2017).

Além disso, esses compostos podem estar envolvidos na reprodução das plantas, na proteção contra radiação ultravioleta e espécies reativas de oxigênio (ERO), e em efeitos alelopáticos, onde as plantas competem entre si em resposta a estresses bióticos e abióticos. Muitos metabólitos especializados ainda não têm suas funções completamente conhecidas, sendo que mais de 50.000 já foram descritos em angiospermas (DEBORDE *et al.*, 2017; VIZZOTTO; KROLOW; WEBER, 2010; SIMÕES *et al.*, 2017).

Todos os metabólitos especializados são derivados de componentes do metabolismo basal, utilizados fora dos processos de geração de energia da fotossíntese, glicólise e ciclo de Krebs, fornecendo intermediários biossintéticos. Os precursores mais importantes para sua biossíntese incluem acetil-coenzima A, ácido chiquímico, ácido mevalônico e 1-desoxi-D-xilulose-5-fosfato (DOS SANTOS, 2015; KABERA, 2014).

**Figura 1** - Conexões biossintéticas entre o metabolismo primário e o especializado. As rotas biossintéticas responsáveis pela produção de metabólitos especializados ocorrem através das seguintes vias: (1) via dos aminoácidos, (2) via do chiquimato, (3) via dos poliketídeos, (4) via do ácido mevalônico e (5) via do metileritritol fosfato (MEP).



Fonte: Adaptado de (SIMÕES *et al.*, 2017 e GUEDES, 2018).

Embora sejam conhecidos cerca de 100.000 metabólitos especializados de plantas, apenas algumas rotas biossintéticas são utilizadas para sua produção, envolvendo cinco principais vias: (1) via dos aminoácidos, (2) via do chiquimato, (3) via dos policetídeos, (4) via do ácido mevalônico e (5) via do metileritritol fosfato (MEP) (Figura 1) (SIMÕES *et al.*, 2017).

As vias biossintéticas descritas na Figura 1 resultam na formação de grupos de metabólitos especializados, classificados de acordo com suas estruturas químicas e aspectos biogénéticos: compostos fenólicos, terpenóides e alcaloides (SIMÕES *et al.*, 2017).

### 3.2.3 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos sejam fenóis simples ou polifenóis, são um grupo de metabólitos secundários produzidos pelas plantas e participam do mecanismo de defesa destas contra agressões externas, podendo funcionar como atrativos ou repelentes de insetos, exercendo influência na cor, na estabilidade oxidativa e no sabor da planta ou alimento (ARNOSO; DA COSTA; SCHMIDT, 2019).

Quimicamente falando, os compostos fenólicos são substâncias que possuem pelo menos um anel aromático no qual ao menos um hidrogênio é substituído por uma hidroxila. São sintetizados a partir de duas rotas metabólicas principais: a via do ácido chiquímico e a via do ácido mevalônico (VIZZOTTO; KROLOW; WEBER, 2010). Esse grupo se destaca das outras classes de metabólitos secundários porque são amplamente distribuídos e por possuírem várias funções ecológicas e inúmeras atividades farmacológicas cientificamente comprovadas, sendo muito bem representadas por taninos, flavonoides e cumarinas (LIMANETO *et al.*, 2015).

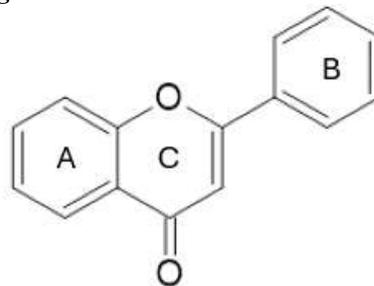
#### 3.2.3.1 Flavonoides

Da classe dos polifenóis, os flavonoides são um grande grupo de metabólitos secundários de baixo peso molecular encontrados em diversas espécies vegetais (MARCUCCI *et al.*, 2021). Possuem como estrutura básica dois anéis benzênicos, A e B, conectados através de uma pirona, anel C (Figura 2) (ARNOSO; DA COSTA; SCHMIDT, 2019). As atividades bioquímicas dos flavonoides estão diretamente relacionadas a sua estrutura química, que pode variar a partir de substituições incluindo hidrogenação, hidroxilações, metilações, sulfatações e glicosilações (MACHADO *et al.*, 2008).

Os flavonoides são classificados em classes pelo nível de oxidação e no padrão de substituição do anel C, enquanto os compostos individuais, dentro de um mesmo grupo são

diferenciados pelo padrão de substituição dos anéis A e B (LIMA; BEZERRA, 2012). Dentro desse grupo, diferentes classes podem ser encontradas como as chalconas, flavonas, flavanonas, flavonóis, di-hidroflavonóis, isoflavonas, antocianinas, antocianidinas, auronas, entre outras. Por absorverem radiação eletromagnética na faixa do ultravioleta (UV) e do visível, apresentam papéis de defesa das plantas frente à radiação solar, além disso, podendo representar uma barreira química de defesa contra microrganismos, insetos e outros animais herbívoros (MARCUCCI *et. al.*, 2021). Além das funções relatadas nas plantas, muitos desses compostos possuem também importantes propriedades farmacológicas relatadas na literatura (SANTOS; RODRIGUES, 2017).

**Figura 2** - Estrutura básica dos flavonoides.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2024.

Os flavonoides podem se apresentar em diferentes concentrações dependendo do filo, ordem, família e espécie, onde em uma mesma espécie, a concentração pode sofrer alteração, dependendo parte da planta que se encontra (MACHADO *et. al.*, 2008).

Os compostos fenólicos, um dos maiores grupos de metabólitos secundários das plantas, são sintetizados pela via do ácido chiquímico (2). A maioria dessas substâncias deriva da *L*-fenilalanina ou, raramente, da *L*-tirosina. Esses compostos passam por desaminação oxidativa, catalisada pela fenilalaninaliase na biossíntese do ácido cinâmico, resultando na formação de ácidos fenólicos e fenóis simples por meio da degradação oxidativa de sua cadeia lateral (COHEN; KENNEDY, 2010; KABERA, 2014; SIMÕES *et al.*, 2017).

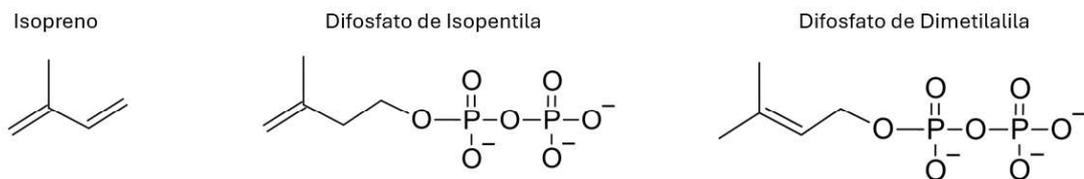
Devido a processos coevolutivos que resultaram em uma maquinaria biossintética sofisticada, os metabólitos secundários apresentam uma grande diversidade estrutural e muitas vezes atividades biológicas e farmacológicas relevantes (SIMÕES *et al.*, 2017).

### 3.2.4 Terpenos

Os terpenos são produzidos pelas vias do ácido mevalônico (4) e do MEP (5). A organização desses metabólitos segue a regra do isopreno (unidades de cinco carbonos, C-5),

baseada em observações de química orgânica. O bloco de construção de todos os terpenos é o difosfato de isopentila (IPP), que é um isopreno ativo em equilíbrio com seu isômero, o difosfato de dimetilalila (DMAPP) mostrados na Figura 3 (DOS SANTOS, 2015; SIMÕES *et al.*, 2017).

**Figura 3** – Unidades básicas de construção dos terpenos.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2024.

Na via do ácido mevalônico, a biossíntese dos terpenóides se inicia com a condensação de três moléculas de acetil-CoA, seguida pela participação do fosfato e descarboxilação subsequente. A via alternativa do MEP leva à formação de dois intermediários-chave a partir da glicose: 1-desóxi-D-xilulose (DOX) e 2-metileritritol fosfato, que eventualmente formam IPP e DMAPP. Esta via resulta em hemiterpenos (C-5), monoterpenos (C-10), diterpenos (C-20) e tetraterpenos (C-40) (DOS SANTOS, 2015; SIMÕES *et al.*, 2017).

### 3.2.5 Alcaloides

Os alcaloides, geralmente caracterizados pela presença de um átomo de nitrogênio em um anel heterocíclico, são sintetizados pela via dos aminoácidos (1). A regra dos aminoácidos aplica-se à maioria desses compostos, afirmando que todos os alcaloides verdadeiros derivam desses precursores (OLIVOTO *et al.*, 2017; SIMÕES *et al.*, 2017).

O grupo aminico dos aminoácidos origina o átomo de nitrogênio heterocíclico dos alcaloides. A descarboxilação inicial de um aminoácido forma uma amina biogênica, que promove a biossíntese dos alcaloides. No entanto, nem todos os alcaloides seguem essa regra, como os alcaloides acridônicos, esteroidais, imidazólicos e púricos (OLIVOTO *et al.*, 2017; SIMÕES *et al.*, 2017).

Esses compostos naturais representam uma valiosa biblioteca de compostos bioativos selecionados naturalmente. Podem ser usados *in natura*, em preparações galênicas simples, em formulações farmacêuticas mais elaboradas, ou como substâncias puras, os ingredientes ativos dos medicamentos (SIMÕES *et al.*, 2017; WINK, 2015).

Esses compostos também podem servir como base para a síntese parcial de

moléculas farmacologicamente ativas, visando melhorar propriedades biofarmacêuticas ou como modelos para o planejamento e síntese total de novos medicamentos (SIMÕES *et al.*, 2017; WINK, 2015).

Muitos desses metabólitos são extraídos de plantas já utilizadas na medicina popular, como a cajazeira, típica do Nordeste do Brasil, usada no tratamento de diversas infecções (CORADIN; CAMILLO; PAREYN, 2018; WINK, 2015).

### 3.3 A Caatinga e sua diversidade

Ocupando uma área de 912.000 km<sup>2</sup> e representando cerca de 13% do território nacional, a Caatinga é um bioma exclusivo do território brasileiro (FERNANDES; QUEIROZ, 2018). A palavra Caatinga originou-se do tupi-guarani que significa mata branca, sendo também conhecida como sertão, agreste, cariri, seridó e carrasco, sendo denominações populares para as diferentes formações vegetais do bioma (MAIA *et al.*, 2017). A vegetação da Caatinga é composta predominantemente por plantas lenhosas, espinhosas e caducifólias (AB'SÁBER, 1974). O ecossistema pode ser classificado em 12 tipos diferentes, baseando-se em fatores abióticos como altitude, continentalidade e características do solo (ALVES; ARAÚJO; NASCIMENTO, 2009). Este bioma tem enfrentado constantes ameaças devido ao desmatamento vinculado à extração de madeira e à agricultura (RIBEIRO *et al.*, 2015), o que resulta em impactos negativos na biodiversidade, como fragmentação de habitats (ANTONGIOVANNI *et al.*, 2020) e processos de desertificação (HAUFF, 2010).

Rica em diversidade e endemismo, apresenta a ocorrência de 3.150 espécies, distribuídas em 950 gêneros e 152 famílias de angiospermas, incluindo 29 gêneros endêmicos do bioma (FERNANDES; QUEIROZ, 2018).

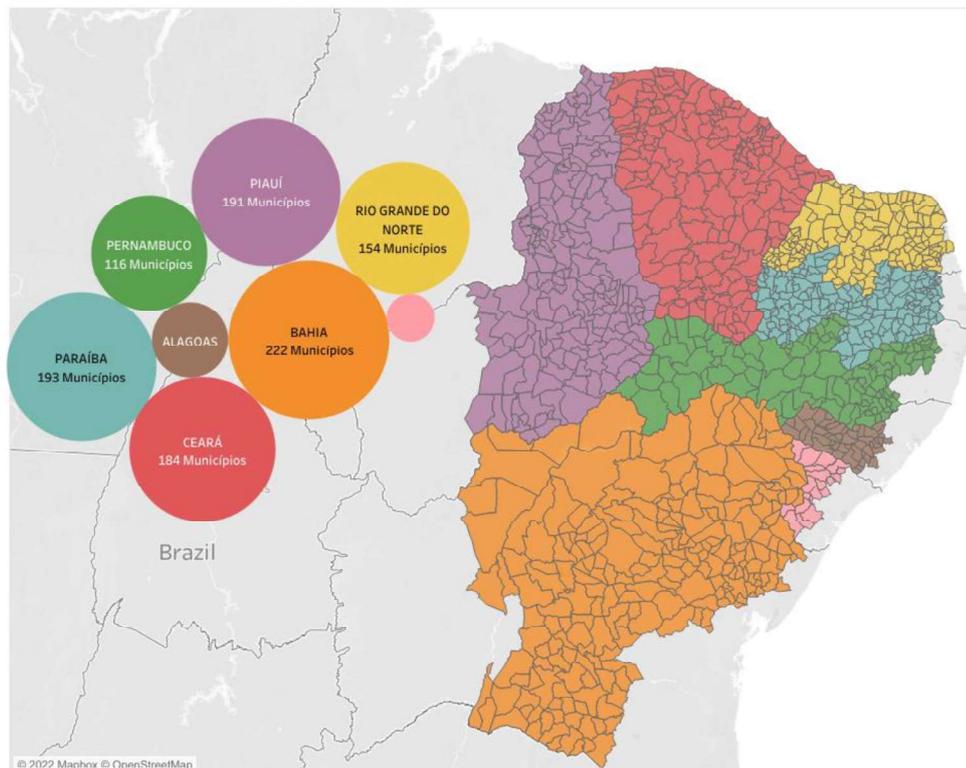
Com baixo índice pluviométrico na maior parte de sua extensão, concentrada em poucos meses do ano, de três a seis, e com baixa evapotranspiração e altas temperaturas, a Caatinga é um domínio fitogeográfico brasileiro adaptado a condições de semiaridez. E devido a influência do clima, apresenta uma vegetação decídua, variando no porte desde caatinga arbustiva até caatinga arbórea de porte mais elevado (LIMA *et al.*, 2022).

Devido ao desmatamento, a Caatinga vem sofrendo um rápido processo de deterioração ambiental. A principal estratégia para a manutenção da biodiversidade e dos serviços ecossistêmicos, diante da crescente destruição e degradação dos ambientes naturais, é a criação de áreas protegidas (APs), podendo ser de dois tipos: de Proteção Integral (PI) que permite apenas o uso restrito dos recursos naturais e de Uso Sustentável (US) que autoriza o

uso e extração dos recursos naturais. Além de ser o bioma menos estudado e menos protegido do Brasil, a Caatinga ainda é tratada com baixa prioridade de investimento em conservação. Até 2008, 45% da Caatinga havia sido desmatado, por ser sensível, essa área sofre além da ação antrópica, alterações resultantes das mudanças climática globais (OLIVEIRA; SILVA; MOURA, 2019).

A sugestão de delimitação da Caatinga, apresentada pelo IBGE e pelo Ministério do Meio Ambiente em 2004, baseou-se na metodologia descrita no estudo de Fernando Luís Garagorry e Roberto de Camargo Penteado Filho. Essa abordagem resultou na criação de uma proposta para a definição político-administrativa do bioma Caatinga, conforme ilustrado na Figura 4.

**Figura 4** - Abrangência do bioma segundo a proposta de delimitação político-administrativa nacional da Caatinga.



Fonte: EMBRAPA TERRITORIAL. Sistema de Inteligência Territorial Estratégica do Bioma Caatinga. Campinas, 2023. Disponível em: <https://caatingaamecasbiologicas.com.br/caatinga-3/>. Acesso em: 11/07/2024.

Menos de 10% da área da Caatinga está incluída em Unidades de Conservação (CNUC/MMA, 2023). Cerca de 30% da biodiversidade da Caatinga ocorre fora de áreas protegidas, destacando lacunas significativas na proteção, pesquisa e gestão das espécies vegetais dessa região (FONSECA *et al.*, 2018).

A Caatinga fornece diversos recursos que contribuem para qualidade de vida das populações locais, como, por exemplo, as plantas que são utilizadas para fins terapêuticos. Devido à falta de assistência médica e a necessidade, as populações locais recorrem ao uso dos recursos vegetais na preparação de seus fármacos, ocasionando na evolução e acúmulo dos saberes populares com relação as práticas do uso dos vegetais (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

O uso de diversas espécies endêmicas da Caatinga na medicina popular tem sido amplamente documentado na literatura. Conseqüentemente, o estudo desse uso tem recebido crescente atenção devido à vasta quantidade de informações e esclarecimentos proporcionados pela ciência (ARNOUS *et. al*, 2005).

### 3.4 A Família *Anacardiaceae*

A família *Anacardiaceae* Lindley é constituída por aproximadamente 600 espécies agrupadas em 80 gêneros, sendo dividida em cinco tribos: *Anacardieae*, *Rhoeae*, *Spondiadeae*, *Semecarpeae* e *Dobineae*, uma classificação baseada em características morfológicas. O termo "Anacardium" origina-se da combinação de palavras gregas que passaram por um processo de latinização. Ele deriva de ἀνά (aná), que significa 'voltado para cima' ou 'superior', e καρδία (kardía), que significa 'coração'. A escolha desse nome foi inspirada pela forma característica dos frutos dessa família, que lembram um coração, como visto em espécies populares como a castanha de caju e a manga (CORREIA; DAVID; DAVID, 2006; WANNAN, 2006).

A Tabela 2 apresenta o número de gêneros e espécies alocadas a essas tribos (SCHULZE-KAYSERS; FEUEREISEN; SCHIEBER, 2015), distribuídas predominantemente em regiões subtropicais.

**Tabela 2** – Distribuição de Gêneros e Espécies nas Tribos da Família *Anacardiaceae*.

<b>Tribo</b>	<b>Número de Gêneros</b>	<b>Número de Espécies</b>
<i>Dobineae</i>	2	3
<i>Semecarpeae</i>	5	80
<i>Anacardieae</i>	8	120
<i>Spondiadeae</i>	17	140
<i>Rhoeae</i>	40	300

Fonte: (SCHULZE-KAYSERS; FEUEREISEN; SCHIEBER, 2015).

Os membros da família *Anacardiaceae* são reconhecidos por seus frutos e sementes comestíveis, como manga, caju e cajá, além de sua madeira valiosa e produção de verniz natural. Uma característica marcante das espécies de *Anacardiaceae* é a presença de condutos resinosos no córtex e no lenho, resultando na formação de resina nessas áreas, embora a exsudação também ocorra em folhas, flores e frutos de maneira semelhante (FONSECA *et al.*, 2018). As espécies deste grupo têm sido alvo de extensas pesquisas devido aos seus metabólitos secundários, com destaque para estudos focados na atividade medicinal de fenólicos, ésteres e taninos (LACCHIA *et al.*, 2016; PELL *et al.*, 2010).

### 3.5 *Spondias* ssp

*Spondias* é um gênero tropical pertencente à família *Anacardiaceae* e possui cerca de 14 a 20 espécies mundialmente distribuídas e dentre essas, 4 a 7 espécies são descritas nas Américas. Dentro deste gênero, as espécies que merecem destaque são: cajá (*Spondias mombin* L.), siriguela (*Spondias purpurea* L.), umbu (*Spondias tuberosa* Arr Câmara), cajarana (*Spondias dulcis*), cajá-umbu (*S. mombin* x *S. tuberosa*) e umbuguela (*S. tuberosa* x *S. purpurea*), sendo a *Spondias tuberosa* nativa de regiões semiáridas e suas ocorrências são restritas no Nordeste do Brasil (NASCIMENTO *et. al.*, 2022).

Os membros do gênero *Spondias* são amplamente investigados na etnofarmacologia devido à sua utilização no tratamento de diversas doenças, como dor de estômago, diarreia, diabetes, demência, anemia e disenteria, entre outras (SAMEH *et al.*, 2018).

Os frutos de *Spondias dulcis* são consumidos por comunidades rurais em Bangladesh para melhorar a visão e prevenir infecções oculares, enquanto os de *Spondias tuberosa* são apreciados no Brasil por seu alto valor nutricional. Na Nigéria, os frutos de *Spondias mombin* são usados como diuréticos, e na Índia, o pó do fruto maduro de *Spondias pinnata* é empregado como antídoto para venenos de flechas (SAMEH *et al.*, 2018).

As folhas de *Spondias purpurea*, quando frescas e preparadas em infusão, são utilizadas no México para aliviar dores de estômago e flatulência, e a casca dessa mesma espécie é aplicada no tratamento de anemia, diarreia, disenteria e infecções de pele. Em Belize, a decocção das folhas de *Spondias mombin* é usada para tratar diarreia e disenteria, assim como na Nigéria, Benin e Togo, onde é consumida para manter a memória em bom estado (SAMEH *et al.*, 2018).

Na Índia, a goma de *Spondias pinnata* é utilizada para tratar disenteria, úlceras, diarreia e doenças de pele, atuando também como demulcente em casos de bronquite. Além

disso, a casca é empregada para aliviar dores articulares, prevenir vômitos e tratar diarreia e disenteria (SAMEH *et al.*, 2018).

No Brasil, especialmente nas regiões Norte e Nordeste, destacam-se como frutíferas de relevância socioeconômica o umbuzeiro (*Spondias tuberosa* Arruda), a cajazeira (*Spondias mombin* L.), a serigueleira (*Spondias purpurea* L.), a cajaraneira (*Spondias dulcis* Parkinson) e seus híbridos naturais, todas exploradas de forma extrativista ou em pomares domésticos (FONSECA *et al.*, 2018).

As espécies de *Spondias* são ricas em diversos metabólitos primários e secundários, incluindo compostos fenólicos, esteróis, triterpenos, saponinas, óleos essenciais, aminoácidos e polissacarídeos (Tabela 3).

**Tabela 3** – Metabólitos primários e especializados encontrados em *Spondias* spp.

Classes de metabólitos	Metabólitos	Espécie	Parte Encontrada	Tipo de Extrato
<b>Taninos e Pseudotaninos</b>	Geranina	<i>S. mombin</i> L.	Folhas e caules	80% EtOH
	Galoil-geranina	<i>S. mombin</i> L.	Folhas e caules	80% EtOH
	Galoil-glicose	<i>S. purpurea</i> L.	Frutos	Acetona
<b>Flavonoides</b>	Ramnetina	<i>S. purpurea</i> L.	Frutos	Acetona
	Isoramnetina	<i>S. purpurea</i> L.	Frutos	Acetona
	Canferol	<i>S. purpurea</i> L.	Frutos	Acetona
	Canferide	<i>S. purpurea</i> L.	Frutos	Acetona
	Astragalina	<i>S. purpurea</i> L.	Frutos	Acetona
	Isoquercetina	<i>S. purpurea</i> L.	Frutos	Acetona
	Quercetina dihidratada	<i>S. purpurea</i> L.	Frutos	Acetona
	Rutina	<i>S. venulosa</i> (Engl.) Engl.	Folhas	80% MeOH
	Ramnetina-3-O- $\beta$ -D-rutinosídeo	<i>S. venulosa</i> (Engl.) Engl.	Folhas	80% MeOH
	Quercetina-3-O-[ $\alpha$ -ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)]- $\alpha$ -ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -glicopiranosídeo	<i>S. venulosa</i> (Engl.)	Folhas	80% MeOH
<b>Fenólicos e Derivados</b>	Ácido gálico	<i>S. purpurea</i> L.	Frutos	Acetona
	3-cafeoil ácido quínico	<i>S. purpurea</i> L.	Frutos	Acetona
	Galato de metila	<i>S. pinnata</i> (L. f.) Kurz	Casca	70% MeOH
<b>Esteróis e Terpenóides</b>	$\beta$ -amirina	<i>S. pinnata</i> (L. f.) Kurz	Fruto	MeOH
	Ácido oleanólico	<i>S. pinnata</i> (L. f.) Kurz	Fruto	MeOH
	24-metilenocicloartanona	<i>S. pinnata</i> (L. f.) Kurz	Partes aéreas	EtOH
	Estigmast-4-en-3-ona	<i>S. pinnata</i> (L. f.) Kurz	Partes aéreas	EtOH
	$\beta$ -sitosterol	<i>S. pinnata</i> (L. f.) Kurz	Partes aéreas	EtOH
	Ácido lignocérico	<i>S. pinnata</i> (L. f.) Kurz	Partes aéreas	EtOH

Classes de metabólitos	Metabólitos	Espécie	Parte Encontrada	Tipo de Extrato
	$\beta$ -sitosterol- $\beta$ -D-glicosídeo	<i>S. pinnata</i> (L. f.) Kurz	Partes aéreas	EtOH
	Estigmast-9-en-3,6,7-triol	<i>S. mombin</i> L.	Casca	MeOH
	3-hidróxi-22-epóxistigmastano	<i>S. mombin</i> L.	Casca	MeOH
	Ergosteril triterpeno 1	<i>S. pinnata</i> (L. f.) Kurz	Casca	CHCl <sub>3</sub> /MeOH
	Ergosteril triterpeno 2	<i>S. pinnata</i> (L. f.) Kurz	Casca	CHCl <sub>3</sub> /MeOH
	Lupeol	<i>S. mombin</i> L. e <i>S. purpurea</i> L.	Folhas	Hidrodestilação
	Ácido equinocístico-3-O- $\beta$ -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 5)-O- $\beta$ -D-xilofuranosídeo	<i>S. pinnata</i> (L. f.) Kurz	Raízes	EtOH
	$\alpha$ -pineno	<i>S. mombin</i> L. e <i>S. purpurea</i> L.	Folhas	Hidrodestilação
	$\beta$ -pineno	<i>S. mombin</i> L. e <i>S. purpurea</i> L.	Folhas	Hidrodestilação
	Cariofileno	<i>S. mombin</i> L. e <i>S. purpurea</i> L.	Folhas	Hidrodestilação
	Humuleno	<i>S. mombin</i> L. e <i>S. purpurea</i> L.	Folhas	Hidrodestilação
	Indeno	<i>S. mombin</i> L. e <i>S. purpurea</i> L.	Folhas	Hidrodestilação
	Cadineno	<i>S. mombin</i> L. e <i>S. purpurea</i> L.	Folhas	Hidrodestilação
<b>Aminoácidos e Carboidratos</b>	Glicina	<i>S. pinnata</i> (L. f.) Kurz	Frutos	Aquoso
	Cisteína	<i>S. pinnata</i> (L. f.) Kurz	Frutos	Aquoso
	Serina	<i>S. pinnata</i> (L. f.) Kurz	Frutos	Aquoso
	Alanina	<i>S. pinnata</i> (L. f.) Kurz	Frutos	Aquoso
	D-galactose	<i>S. pinnata</i> (L. f.) Kurz	Frutos	Aquoso
	D-xilose	<i>S. pinnata</i> (L. f.) Kurz	Frutos	Aquoso
	L-arabinose	<i>S. pinnata</i> (L. f.) Kurz	Frutos	Aquoso
	2,3,4,6-tetra-O-metilglicose	<i>S. pinnata</i> (L. f.) Kurz	Frutos	Aquoso
	2,3,6-tri-O-metilglicose	<i>S. pinnata</i> (L. f.) Kurz	Frutos	Aquoso
	2,3-di-O-metilglicose	<i>S. pinnata</i> (L. f.) Kurz	Frutos	Aquoso
	3-O-metilglicose	<i>S. pinnata</i> (L. f.) Kurz	Frutos	Aquoso
	Propan-1,2-dióico	<i>S. pinnata</i> (L. f.) Kurz	Frutos	Aquoso
	Ácido 3-carboxil- $\beta$ -D-glicopiranosil-(6' $\rightarrow$ 1'')- $\beta$ -D-glicofuranosídeo	<i>S. pinnata</i> (L. f.) Kurz	Frutos	EtOH

Fonte: Adaptado de SAMEH *et al.*, 2018.

### 3.6 *Spondias tuberosa* ARRUDA

*Spondias tuberosa* Arruda, que é popularmente conhecida como umbuzeiro, sendo um representante arbóreo e tropical, é uma importante árvore frutífera da região semiárida do Nordeste, possuindo grande importância socioeconômica para essa região (CAVALCANTI; RESENDE; BRITO, 2005). Nas últimas décadas, o interesse econômico tem crescido consideravelmente, pois o umbu passou de simples pasto para os animais e consumo sazonal das famílias, para a venda externa (DRUMOND *et. al*, 2016). Os frutos do umbuzeiro são muito apreciados na região Nordeste, sendo comercializados em feiras livres, mercados, nas ruas das cidades e nas estradas (DUTRA *et. al*, 2017).

O umbuzeiro (*S. tuberosa* Arr) é uma xerófita que perdura por mais de 30 anos, com altura média em torno de 6 metros, podendo atingir até 15 metros de diâmetro, servindo de abrigo e proteção dos animais e do solo, durante as horas com maior incidência solar (Figura 5). Possui um sistema radicular que pode atingir até 1 metro de profundidade e longas raízes laterais, com caules subterrâneos, denominados de xilopódios, que são responsáveis por realizar o controle de respiração da árvore, podendo armazenar água e nutrientes como proteínas, fibra bruta e entre outros, sendo fundamentais para a nutrição vegetal e sua sobrevivência durante o período de estiagem, garantindo a sobrevivência da planta. Tais características permitem o umbuzeiro crescer em regiões com variações de temperatura, de umidade, exposição solar e volume de chuva. Essa espécie costuma nascer a partir da polinização de insetos, o que caracteriza sua forma nativa, tornando-se de extrema importância para o bioma, visto que é utilizada por polinizadores e dispersores durante a estação seca, período em que ocorre a frutificação dessa espécie (MOREIRA *et. al*, 2021).

**Figura 5** – *Spondias tuberosa* Arruda



Fonte: LIMA FILHO, 2011

O umbu possui coloração amarela esverdeada quando maduro, gosto ácido e refrescante e textura aveludada, é rico em vitamina C e compostos bioativos. É geralmente consumido e comercializado *in natura*, como polpa congelada, suco, sorvete, doce, geleia ou como a tradicional “umbuzada” que consiste no cozimento da polpa da fruta com leite e açúcar (XAVIER *et. al.*, 2022).

Apesar dos frutos do umbuzeiro serem o principal produto, as folhas e as cascas são utilizadas na medicina popular para o tratamento de diversas doenças como o diabetes, distúrbios lipídicos, diarreia, doenças venéreas, inflamação, conjuntivite, cólica menstrual, infecção renal, infecções na garganta, utilizados para tratar ânsia de vômito e para expulsão da placenta após o parto (BARBOSA *et. al.*, 2016). A presença de diversos compostos bioativos como os compostos fenólicos, dentre eles, rutina, quercetina, kaempferol e ácidos anacárdicos presentes nas folhas (GUEDES *et al.*, 2020), conferem as atividades farmacológicas reportadas pela população.

Apesar de ser amplamente utilizada na medicina tradicional, o que indica que essa espécie é fonte de novas moléculas para a produção de novos fármacos, as análises e estudos farmacológicos nesses tópicos são escassas (BARBOSA *et. al.*, 2018). Embora o umbuzeiro apresente funções ecológicas, importância econômica e farmacológica, diferentes causas têm contribuído para a diminuição de áreas preservadas com umbuzeiro na Caatinga. Devido a sua reduzida capacidade de regeneração apontadas em alguns estudos, o umbuzeiro pode sofrer diminuição em sua população natural levando ao perigo de extinção da espécie, tornando-se cada vez mais crescente a demanda por formas sustentáveis de manejo para a continuidade do aproveitamento da espécie (AIDAR *et. al.*, 2021).

### **3.7 Metabolômica**

As ciências ômicas buscam a compreensão desde a identificação até a quantificação de substância proveniente do funcionamento celular e suas alterações biológicas. Fazem parte desse conjunto de ciências, a genômica (estudo da alteração dos genes), a transcriptômica (estudo das alterações dos transcritos), a proteômica (estudo das alterações das proteínas), e a metabolômica (estudo das alterações dos metabólitos) (CANUTO *et. al.*, 2018).

Devido a sua importância, aplicabilidade e respostas obtidas pelos experimentos, a metabolômica possui enorme potencial de expansão mundial, utilizando de instrumentação sofisticada como espectrometria de massas (MS), espectroscopia de ressonância magnética

nuclear (NMR) e fluorescência induzida por laser (LIF). Devido ao desenvolvimento de técnicas analíticas de alta sensibilidade, seletividade e precisão, uma maior diversidade de técnicas é encontrada para a realização dos estudos metabolômicos, utilizando por exemplo, cromatografia de ultra-alta pressão em análises diretas e imagem química por espectrometria de massas (Imaging MS), podendo também utilizar técnicas acopladas, como MS acoplada a técnicas de separação como cromatografia e eletroforese capilar (LEI; HUHMAN; SUMNER, 2011).

A metabolômica é considerada um estudo bastante versátil podendo ser utilizada na investigação de alterações metabólicas de um organismo em resposta à estímulos físicos (luz UV, calor, desidratação etc.), químicos (como fármacos, agroquímicos) ou biológicos (patógenos ou outros). Esse estudos são realizados basicamente a partir de análises comparativas dos perfis metabólicos obtidos para cada amostra, podendo esses perfis serem definidos como um conjunto de sinais cromatográficos e/ou espectroscópicos adquiridos para uma amostra, podendo ser de extratos vegetais, animais, micro-organismos e fluidos biológicos, utilizando métodos analíticos que relevem as características correspondentes a determinados padrões funcionais e estruturais das classes de produtos naturais analisadas (FUNARI *et. al*, 2013).

Inicialmente os estudos metabolômicos eram divididos em dois tipos: estudos alvo (do inglês, *targeted*), onde é realizada a análise de um grupo específico de metabólitos, sendo esse grupo relacionado a uma via metabólica específica ou a uma classe de compostos, e os estudos não-alvo (do inglês, *untargeted*) onde se avalia qualitativamente todo o conjunto de substâncias sem alguma especificação e é geralmente utilizada como ferramenta de triagem para discriminar amostras de diferentes estados biológicos ou origem. A principal vantagem dos estudos não-alvo em relação aos estudos alvo é que a primeira permite que novas áreas do metabolismo sejam identificadas. Atualmente, visando os diferentes objetivos e especificidades dos estudos metabolômicos, foram criadas subcategorias desses estudos (Tabela 4) (BELINATO *et. al*, 2019; PILON *et. al*, 2020).

A definição do problema a ser estudado é a primeira etapa no desenvolvimento do estudo metabolômico, pois é determinado o tipo de abordagem a ser empregada (alvo ou não-alvo), e após essa escolha, as etapas do planejamento experimental e análise química são definidas e o experimento metabolômico é conduzido. No desenvolvimento dos estudos metabolômicos, sejam eles alvo ou não-alvo, recomenda-se seguir uma série de etapas. De forma geral, inicia-se com a etapa do preparo de amostra, onde é realizado a extração, derivatização, limpeza da amostra e estocagem. Dando sequência, na próxima etapa é realizada

a aquisição de dados, com o auxílio das técnicas de análises, e logo após, os dados gerados a partir das análises que são em grande número e complexidade, são processados por ferramentas adequadas para tratamento de dados, onde nessa etapa envolve o pré-processamento e análise dos dados por meio de *softwares* de análise estatística, bancos de dados de metabólitos, *softwares* de bioinformática e estratégias para transformar dados brutos em resultados úteis (BELINATO *et. al.*, 2019).

**Tabela 4** – Subcategorias de estudos metabolômicos alvo e não alvo.

<b>Tipo</b>	<b>Abordagem</b>	<b>Descrição</b>
<b><i>Metabolic Fingerprint</i></b>	Não-alvo	Análise da composição metabolômica de um organismo. A quantificação é usualmente relativa entre amostras controle e tratada visando a comparação e análise discriminatória. Classifica e/ou agrupa informações relativas aos metabólitos (que podem ou não ser anotados) como resposta às diferentes condições experimentais aplicadas ao conjunto amostral.
<b><i>Plant Metabolomics</i></b>	Não-alvo	Contempla a tentativa não enviesada de identificar e quantificar o maior número possível de metabólitos presentes em tecidos, órgãos vegetais ou na planta como um todo.
<b><i>Metabolic Profiling</i></b>	Alvo	Em oposição ao <i>metabolic fingerprint</i> , o <i>metabolic profiling</i> visa identificar e quantificar metabólitos/classes responsáveis pela discriminação entre grupos tratados e controle. Estas substâncias (anotadas) podem formar então as bases para as hipóteses entre as diferenças genéticas e fenotípicas.
<b><i>Target Analysis</i></b>	Alvo	Visa a detecção ou descrição de substâncias/ grupos específicos que compartilham propriedades químicas similares (e.g., aminoácidos) ou uma rota metabólica em comum (e.g., alcalóides). Os métodos usualmente consideram dados quantitativos e qualitativos.

Fonte: Adaptado de PILON *et. al.*, 2020.

### 3.7.1 Pré-processamento de dados e Quimiometria

O pré-processamento de dados é um passo crítico para a otimização dos resultados analíticos, que permite a detecção e quantificação precisas dos picos através da transformação dos dados em uma matriz consolidada. Este processo crucial ajuda a eliminar variações indesejadas causadas por diferenças na amostra ou no equipamento, como variações na concentração de sais, temperatura e pH (PILON *et al.*, 2020). As operações de pré-processamento, aplicáveis em diferentes contextos analíticos, como os sinais cromatográficos de LC-MS, incluem técnicas como filtragem de ruídos, correção de linha de base, alinhamento de sinais, deconvolução, seleção de picos e normalização, todas essenciais para garantir a integridade e utilidade dos dados coletados (CUBERO-LEON;PENÁLVER; MAQUET, 2014;

PILON *et al.*, 2020).

**Filtragem de Ruído:** Este passo inicial remove os ruídos dos dados brutos, utilizando algoritmos específicos para distinguir sinais úteis dos ruídos de fundo em técnicas como a espectrometria de massas (LC-MS) ou ressonância magnética nuclear (RMN).

**Correção da Linha de Base:** Após a remoção de ruídos, a correção da linha de base ajusta as variações do espectro que não correspondem a componentes químicos, normalizando assim a linha de base e facilitando comparações precisas entre amostras.

**Alinhamento de Sinais:** Esta fase ajusta discrepâncias de tempo de retenção em cromatografia ou desvios de campo em RMN, assegurando que os picos sejam comparados corretamente entre diferentes amostras.

**Deconvolução:** Essencial para separar sinais sobrepostos, esta técnica resulta em espectros mais claros e definidos, facilitando a identificação e quantificação dos metabólitos.

**Peak Picking:** Após a deconvolução, os picos significativos são anotados e catalogados, baseando-se em critérios como intensidade, área e forma, para futuras análises.

**Normalização:** A etapa final de normalização ajusta a intensidade dos picos para corrigir variações de concentração entre amostras, utilizando padrões internos ou controles de qualidade.

A coesão entre essas etapas de pré-tratamento e a quimiometria é fundamental para garantir uma correta interpretação biológica dos estudos. O uso de quimiometria nos estudos metabolômicos é uma das estratégias utilizadas para o melhor entendimento dos dados obtidos nas análises, com o auxílio de ferramentas matemáticas, computacionais e estatísticas. Vista como uma grande aliada, a estatística multivariada é capaz de reduzir dados de alta dimensionalidade em dados mais facilmente interpretáveis, mostrando não apenas as diferenças entre grupos de amostras, mas também a similaridade entre as amostras. A análise de componentes principais (PCA) é muitas vezes utilizada como primeiro passo da análise exploratória de dados, gerando gráficos de fácil interpretação, já o mínimos quadrados parciais (PLS), análise discriminante de quadrados mínimos parciais (PLS-DA) e análise discriminante de quadrados mínimos parciais ortogonais (OPLS-DA) são métodos supervisionados, cujo objetivo é distinguir os perfis metabólicos que estão fortemente associados a determinados conjuntos de amostras (MANICKAM *et al.*, 2023; PIASECKA.; KACHLICKI; STOBIECKI, 2019).

A quimiometria, por meio de ferramentas estatísticas e suas variantes, transforma dados complexos em informações compreensíveis, destacando tanto as diferenças quanto as similaridades entre grupos de amostras, facilitando assim o entendimento dos perfis

metabólicos associados a condições específicas. Esta integração entre pré-processamento e análise quimiométrica é vital para a precisão e confiabilidade dos resultados em pesquisas metabolômicas, permitindo *insights* profundos sobre as vias metabólicas estudadas (PILON *et al.*, 2020).

### 3.8 Radicais livres e Atividade Antioxidante

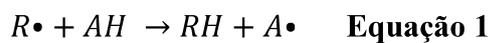
A produção de energia necessária para as atividades essenciais das células é realizada através de processos metabólicos de oxidação, levando à produção de radicais livres (ROESLER *et al.*, 2007). Diversos fatores como hábitos de vida inapropriados como consumo de álcool, tabagismo, dietas inadequadas, exposição à radiação não ionizante ultravioleta, além de condições ambientais impróprias como temperatura elevada e poluição ambiental e domiciliar, podem causar o desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio, nitrogênio e enxofre, e a remoção destas pelos sistemas químicos e enzimáticos de defesa antioxidante, levando ao *stress* oxidativo (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

Radicais livres são pequenas moléculas que possuem um ou mais elétrons desemparelhados, ou seja, possui o orbital externo incompleto, o que explica sua instabilidade e reatividade elevada (SALVEMINI; CUZZOCREA, 2002). O orbital incompleto permite a transferência de elétrons com o meio, assim, podendo agir como agentes aceptores ou doadores de elétrons causando modificações no ambiente molecular a sua volta. Porém, radical livre não é um termo que pode ser utilizado para todas as espécies que participam das reações nos processos metabólicos, pois algumas dessas espécies não possuem elétrons desemparelhados na sua última camada, sendo nomeados de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) e Espécies Reativas de Nitrogênio (ERN) (CAVALCANTE; BRUIN, 2009).

As espécies reativas formadas pelos processos metabólicos atuam como mediadores de elétrons e em vários processos bioquímicos. Porém, quando produzidas em concentrações superiores as necessárias, essas espécies podem causar efeitos potencialmente importantes como danos celulares, ao atacar membranas, proteínas, polissacarídeos e ácidos nucleicos causando alteração funcional e prejuízo das funções vitais em diversos tecidos como adiposo, vascular e cerebral, além de órgãos como músculo e fígado, além de ativar caminhos de sinalização específicos, podendo levar ao desenvolvimento de doenças crônicas e degenerativas como o câncer, doenças cardíacas e Alzheimer, estando também envolvidos no processo de envelhecimento (OLIVEIRA *et al.*, 2009; ROESLER *et al.*, 2007).

Os compostos antioxidantes têm como característica principal a capacidade de doar átomos de hidrogênio e/ou receber elétrons, ou seja, são agente redutores, e são capazes de

estabilizar ou desativar os radicais livres (Equação 1) antes de causarem danos nas células, onde os radicais formados a partir dos antioxidantes não são reativos para propagar reação em cadeia, podendo ser neutralizados por reação com outro radical, formando produtos estáveis ou ser reciclados por outro antioxidante. Podendo ser de origem sintética ou natural, os antioxidantes podem ser originados endogenamente, como por exemplo a enzima superóxido dismutase, ou ser provenientes da ingestão de alimentos ou outras fontes. Dentre os antioxidantes de origem exógena, destacam-se tocoferóis (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C), polifenóis, selênio e carotenoides (SOUSA *et. al.*, 2007).



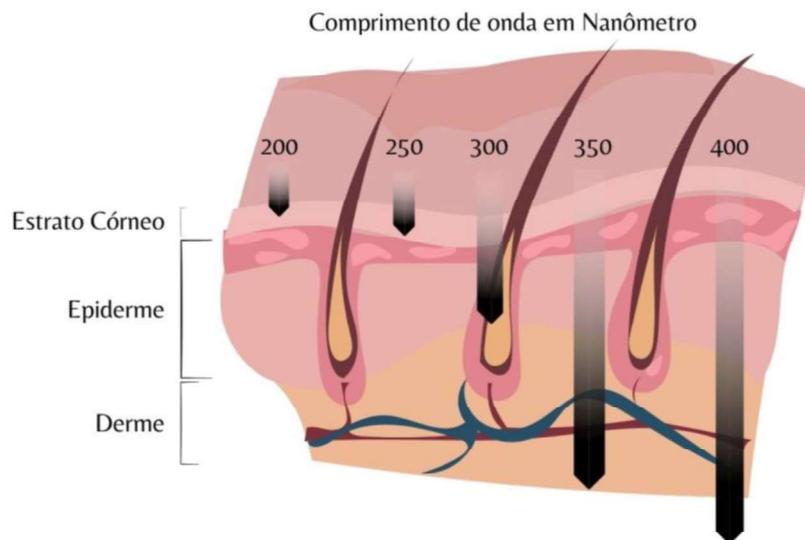
A pele é considerada um órgão complexo, sendo formada por diferentes estruturas e diversos tipos celulares, atuando como barreira protetora dos órgãos internos ao ambiente, e por ser o órgão mais externo do corpo humano, torna-se a interface entre corpo e meio ambiente, estando constantemente exposta à radiação UV, considerada a maior mediadora exógena de danos (GUARATINI *et. al.*, 2007). Mais que qualquer outro tecido, a pele é exposta a inúmeros agentes químicos, físicos e microbiológicos, que induzem a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN), que são fundamentais para a manutenção dos processos fisiopatológicos e bioquímicos, mantendo a sobrevivência e homeostase celular. Porém quando há um desequilíbrio entre a formação e remoção dessas espécies reativas, ocorre o *stress* oxidativo (SELIM *et al.*, 2017).

Quando utilizados topicamente, os antioxidantes reduzem os danos induzidos pela radiação UV, que pode ser separada em UVA (320-400 nm), UVB (290-320 nm) e UVC (180-290 nm). A radiação UVC praticamente não atinge a superfície terrestre, sendo retida pela camada de ozônio, porém as radiações UVA e UVB, quando juntas são mais danosas pelo nível de penetração na pele (Figura 6) (SCOTTI *et. al.*, 2007).

Os antioxidantes são agentes de grande importância na tecnologia farmacêutica. Além da inovação, esforços são feitos para atingir formulações que garantam a eficácia e segurança final do produto (BRASIL, 2022). A estabilidade de tais formulações pode ser expressa pela sua integridade, a qual será determinante para a liberação de seus ativos e efetividade. Estudos de estabilidade devem ser realizados para testar alterações nas formulações diante de fatores para evitar a degradação das formulações que podem resultar em características organolépticas desagradáveis, níveis de contaminação microbiana elevados, redução no teor de ativos e/ou formação de impurezas tóxicas. Os antioxidantes são empregados

nas formulações atuando na remoção de elementos propagadores da oxidação, interrompem a cadeias de reação, exercem mecanismo preventivos evitando a formação de radicais livres (LANGE; HEBERLÉ; MILÃO, 2009).

**Figura 6.** Representação de diferentes comprimentos de onda (nm) e respectiva penetração na pele humana.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2024.

Embora sejam os mais utilizados, os antioxidantes fenólicos sintéticos como o BHA (Butilhidroxianisol), BHT (Butilhidroxitolueno) e TBHQ (Terc-butilhidroquinona), vêm sendo apontados em estudos recentes quanto às suas toxicidades (LANIGAN; YAMARIK, 2002; FREITAS; FATIBELLO-FILHO, 2010). Dentre os efeitos observados, o BHA pode exercer efeitos desreguladores endócrinos, incluindo baixa atividade estrogênica, perturbação na esteroidogênese e interferência nas funções reprodutivas (JEONGS *et al.*, 2005). Além disso, o BHT e o TBHQ apresentam uma potencial indução na produção de peróxidos e danos ao DNA, exibindo assim efeitos carcinogênicos (ESKANDANI; HAMISHEHKAR; DOLATABADI, 2014; YANG *et al.*, 2018).

A oxidação lipídica pode ser usada para exemplificação de reações que podem ocorrer nas formulações dos cosméticos, pois se trata de um fenômeno espontâneo e inevitável que causa a deterioração dos lipídios e substâncias graxas. É uma reação que não pode ser evitada ou paralisada completamente, podendo ser então reduzida de tal forma que se obtenha um aumento significativo da estabilidade e vida útil do produto (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999).

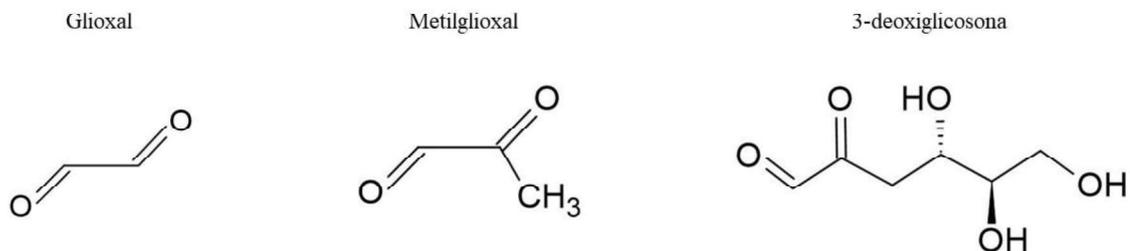
Para a determinação da atividade antioxidante em formulações cosméticas são utilizados métodos como a inibição da peroxidação lipídica, inibição da quimiluminescência e o sequestro do radical DPPH, entre outros métodos, sendo o método do DPPH considerado o mais prático, rápido e estável. Há então um grande interesse por parte das indústrias em medir e comprovar a atividade antioxidante de seus produtos, para que seja possível uma agregação de valor comercial e terapêutico aos produtos (SINGH *et al.*, 2019; BRUDZYŃSKA *et al.*, 2022).

### 3.9 Formação dos AGEs e Atividade Antiglicante

O fenômeno da glicação foi descrito pela primeira vez em 1912 por Louis Camille Maillard (1878-1936) em seus estudos sobre reações entre aminoácidos e carboidratos. Esse fenômeno era então responsável pelo escurecimento e odor característico no cozimento de alimentos, ficando conhecido também por reação de Maillard (HENLE; MIYATA, 2018).

Os Produtos de Glicação Avançada (AGEs, do inglês *Advanced Glycation Endproducts*) são um grupo heterogêneo de moléculas formadas a partir de reações não enzimáticas entre grupamentos amino e carbonilo, sendo a carboximetilisina e a pentosidina exemplos de produtos de glicação avançada identificados em alimentos e *in vivo*. Os AGEs são formados principalmente no organismo, através de precursores dicarbonílicos como o glioxal (G), metilglioxal (MG) e 3-deoxiglicosona (3-DG), derivados da glicose produzidos intracelularmente (Figura 7) (GAENS; STEHOUWER; SCHALKWIJK, 2013; THORNALLEY; LANGBORG; MINHAS, 1999).

**Figura 7** – Precursores dicarbonílicos glioxal (G), metilglioxal (MG) e 3-deoxiglicosona (3-DG) produzidos intracelularmente.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2024.

A formação dos AGEs pode ocorrer por meio de diversas vias. A primeira delas conhecida como via clássica da reação de Maillard, gerada a partir da condensação de um grupamento carbonila de um açúcar redutor, como a glicose, com um grupamento amina proveniente por exemplo do aminoácido Lisina que é bem susceptível à reação, após alguns

rearranjos, ocorre a formação de produtos de Amadori ou produtos iniciais da glicação que é mais estável. A via alternativa que leva à formação de glioxal e metilglioxal, compostos carbonílicos 20 mil vezes mais reativos que a glicose, a partir a auto oxidação da glicose e de lipídios é chamada de via do estresse carbonílico. A formação dos AGEs ainda conta com mais uma via envolvendo neutrófilos, monócitos e macrófagos, que através de processos inflamatórios produzem mieloperoxidase e a enzima NADPH oxidase, que induzem a formação de AGEs pela oxidação de aminoácidos (HUEBSCHMANN *et al.*, 2006).

Vários estudos recentemente demonstraram que a formação dos AGEs é prejudicial ao organismo de maneira geral, possuindo a capacidade de modificar as propriedades químicas e funcionais de diversas estruturas biológicas devido à geração de radicais livres, formação de ligações cruzadas com proteínas ou de interações com receptores celulares (NEDIĆ *et al.*, 2013).

A formação dos AGEs é acelerada sob condições de hiperglicemia ou estresse oxidativo, dessa forma, nos diabéticos as concentrações séricas de AGEs são expressivamente mais elevadas do que em não diabéticos (TAN *et al.*, 2003). Sob condições fisiológicas, essa formação ocorre lentamente e exerce importante papel no processo de envelhecimento, pois compromete moléculas com meia-vida longa como o colágeno. Apesar de serem majoritariamente formados endogenamente, os AGEs podem ser inseridos no organismo através de fontes exógenas, como por exemplo pelo fumo que volatiliza as espécies reativas de AGEs ou ingestão de alimentos com métodos de preparo em altas temperaturas como frituras e grelhados, potencializando a formação de AGEs (CERAMI *et al.*, 1997; HUEBSCHMANN *et al.*, 2006).

Além do escurecimento da cor, a fluorescência é uma propriedade exibida por alguns AGE's, sendo geralmente utilizada em várias aplicações analíticas, incluindo a detecção e quantificação dessas estruturas. Porém, os AGE's que apresentam essa propriedade representam apenas uma parte das estruturas formadas, sendo a maioria formada por espécies não fluorescentes (ULRICH; CERAMI, 2001).

A capacidade de inibir a formação dos AGEs pode ser definida como atividade antiglicante. Na literatura há muitas metodologias descritas para avaliação da atividade antiglicante de uma substância, e isso se deve à complexidade do mecanismo de formação e a existência de várias rotas possíveis para a formação dos AGEs ou compostos dicarbonílicos. O primeiro agente antiglicante explorado em testes clínicos que consta na literatura foi a aminoguanidina para a prevenção de retinopatia diabética, porém não apresentou sucesso devido aos efeitos colaterais como a deficiência de vitamina B6 e neurotoxicidade (JAKUS; RIETBROCK, 2004). Atualmente a busca por agentes antiglicantes que atuem nos vários

processos da formação de AGEs este sendo bastante explorada pelo mundo, desde substâncias sintéticas como a metformina, bastante utilizada no tratamento de diabetes tipo 2 (RAHBAR *et al.*, 2000), até substâncias de origem natural provenientes de extratos de plantas, frutas e vegetais, como os flavonoides, polifenóis, alcaloides, pigmentos e carotenoides, dentre eles a rutina, quercetina, kaempferol entre outros (VIJAYKRISHNARAJ; WANG, 2021).

A remoção dos produtos de glicação avançada também pode ocorrer por meio de mecanismos de defesa do próprio corpo, através da ação realizada por macrófagos derivados de monócitos que possuem receptores de superfície celular de alta afinidade, havendo a interação direta com os AGE's. A presença do receptor AGE permite um sistema de reconhecimento, removendo especificamente, apenas as proteínas com produtos de glicação avançada (VLASSARA; BROWNLEE; CERAMI, 1988; VLASSARA; BROWNLEE; CERAMI, 1985)

Como mencionado na seção anterior, o envelhecimento da pele é causado por diversos fatores, dentre eles a exposição à radiação ultravioleta, que pode gerar alterações químicas em moléculas através dos radicais livres. Reconhecidos como excelentes agentes antioxidantes, os compostos fenólicos têm ganhado grande importância nos últimos anos, uma vez que inibem a peroxidação lipídica e a lipooxigenase *in vitro*. Os compostos fenólicos possuem uma estrutura ideal para o sequestro de radicais livres, tanto pela doação de elétrons como pela estabilização do radical flavonoil formado, além de capacidade de quelar metais de transição, reatividade maior frente a outros antioxidantes, solubilidade e interação com membranas (SHAHIDI; JANITHA; WANASUNDARA, 1992).

Visto que o estresse oxidativo induz a formação de AGEs, do mesmo modo que proteínas glicadas também podem causar o estresse oxidativo (BAYNES; THORPE, 1999), sendo assim, elementos que possuem atividade antioxidante também podem apresentar atividade antiglicante. Logo, a incorporação de ativos antioxidantes nos produtos cosméticos é uma das estratégias escolhidas para prevenir a formação de AGEs e radicais livres, podendo então, prevenir o envelhecimento cutâneo.

## 4 METODOLOGIA

Os experimentos necessários para o desenvolvimento do presente trabalho foram realizados no Laboratório Multiusuário de Química de Produtos Naturais (LMQPN) localizado na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), no Laboratório de Polímeros e Inovação de Materiais (LabPIM) localizado no Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará (UFC) e no Laboratório de Fitoquímica e Biomoléculas (LabFitoBio) localizado na Universidade Estadual de Londrina (UEL).

### 4.1 Instrumentação

- Balança analítica;
- Banho ultrassom de potência fixa de 135 W;
- Centrífuga;
- Coluna cromatográfica *Waters Acquity* UPLC BEH (150 x 2,1 mm, 1,7  $\mu\text{m}$ );
- Concentrador plus;
- Espectrofotômetro;
- Incubadora refrigerada com agitação
- Leitor de microplacas de luminescência VICTOR Nivo™;
- Sistema cromatográfico *Acquity* UPLC (*Waters*), acoplado a um sistema de Quadrupolo/Tempo de voo (QTOF, *Waters*);
- Ultrafreezer;
- Vortex para agitação de tubos de ensaio;

### 4.2 Reagentes, solventes e materiais utilizados

- Acetonitrila;
- Ácido fórmico;
- Água ultrapura, purificada em sistema Milli-Q® Integral Purification System da Merck Millipore (resistividade de 18,2  $\text{M}\Omega\text{ cm}$ );
- Albumina Sérica Bovina
- Cloridrato de Aminoguanidina
- Espátulas;
- Estante para tubos de ensaio;
- Etanol 96%;
- Filtros de PTFE de tamanho de poro 0,22  $\mu\text{m}$ ;
- Frascos de penicilina

- Hexano 95%
- Micropipetadores automáticos de capacidade variável;
- Microtubo tipo EPPENDORF;
- Pipetas de Pasteur de vidro;
- Solução de Metilglioxal
- Tampão Fosfato
- Tubos de ensaio de 15 mL com tampa;
- Vials para UPLC-MS;
- Vidrarias auxiliares: proveta, becker, erlenmeyer e balão volumétrico.
- 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH)

### 4.3 Coleta de amostras

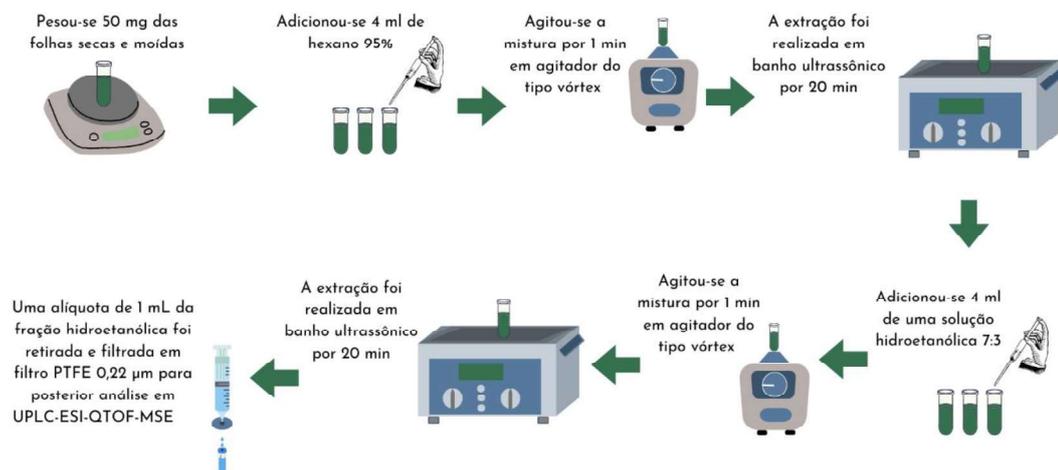
As folhas de *Spondias tuberosa* foram coletadas no Banco Ativo de Germoplasma de Umbu em Petrolina, PE, Brasil, com as seguintes coordenadas geográficas 09°03'42,6''S e 40°18'49,3''W. Foram escolhidos 30 acessos da espécie e coletadas as folhas. As coletas foram realizadas em diferentes datas referentes aos estádios fenológicos da planta. A coleta referente às folhas jovens foram realizadas nos dias 20, 21 e 26 de novembro de 2018 e 04 de dezembro. A coleta referente às folhas em plena produção foram realizadas nos dias 19, 21 e 25 de março de 2019 e 09 de abril de 2019. A coleta referente às folhas em senescência foram realizadas no dia 06 de junho de 2019. Foi realizado *quenching* metabólico das folhas em N<sub>2</sub> líquido, para interromper a atividade enzimática e manter as propriedades do momento da coleta. Em seguida, as folhas foram liofilizadas, moídas em moinho de facas e peneiradas em peneira de 80 Mesh para a padronização da granulometria.

### 4.4 Preparo de extrato para análise em UPLC

Após serem coletadas, secas e moídas, as folhas passaram por um processo de extração. Foram pesadas 50 mg de cada amostra em tubos de centrifuga devidamente identificados. Após a pesagem, foram adicionados 4 mL de hexano 95% com o objetivo de desengordurar a amostra, por meio da extração dos componentes apolares presentes no tecido vegetal que pudessem comprometer a qualidade da análise química. Em seguida, realizou-se a homogeneização por 1 min em um agitador do tipo vórtex e após esse tempo, as amostras foram colocadas em um banho ultrassônico por 20 min. Posteriormente, foram adicionados 4 mL de uma solução etanol/água (7:3), submetendo as amostras novamente à agitação via vórtex por 1 min seguida de 20 min em banho ultrassônico.

Após o procedimento de extração, as amostras foram centrifugadas por 10 min a uma rotação de 3000 rpm para a separação efetiva das fases do extrato. A fase polar do extrato foi transferida para um frasco de penicilina, onde 900  $\mu$ L do extrato hidroetanólico foram transferidos para uma seringa de vidro acoplada a um filtro PTFE 0,22  $\mu$ m, sendo o filtrado recolhido em *vials* de 1,5 mL, previamente identificados. Após a filtração, foram adicionados 100  $\mu$ L de padrão interno ácido antraceno-9-carboxílico (pureza 99%, 100 ppm), resultando ao final do processo uma concentração de 10 ppm. Por fim, os frascos foram armazenados em ultrafreezer (-80°C) para conservação até a análise. O esquema simplificado dos processos de extração é mostrado na Figura 8. De maneira sequencial ao preparo das amostras, as amostras controle de qualidade (QC, do inglês *quality control*), que são a mistura de volumes iguais (10  $\mu$ L) de todas as amostras envolvidas na análise, foram preparadas. Os QCs têm como objetivo avaliar o desempenho e a estabilidade instrumental durante toda a aquisição de dados, tendo em vista que uma amostra QC é avaliada em intervalos pré-estabelecidos, sendo sua leitura intercalada à das amostras, durante toda a sequência analítica (THEODORIDIS *et al.*, 2012). No total foram obtidos 90 extratos referentes aos 30 acessos em 3 estádios fenológicos.

**Figura 8** – Esquema simplificado do procedimento operacional de microextrações sólido-líquido para UPLC-ESI-QTOF-MS<sup>E</sup>.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2023.

#### 4.5 Preparo de extrato para atividades biológicas

O preparo de extrato para a utilização em análises biológicas é semelhante ao preparo para análises em UPLC. Foi pesado 1 g de cada amostra em tubos de centrifuga devidamente identificados. Após a pesagem, foram adicionados 8 mL de uma solução etanol/água (7:3) para a extração dos compostos moderadamente polares. A mistura foi levada

ao agitador do tipo vórtex por 1 min para homogeneização, e após esse tempo, as amostras foram submetidas a extração em banho ultrassônico por 20 min. A próxima etapa consistiu em adicionar 4 mL de hexano com o objetivo de desengordurar a amostra, por meio da extração dos componentes apolares presentes no tecido vegetal da amostra. Após isso, a mistura foi levada mais uma vez ao agitador vórtex por 1 min e em seguida, submetida a extração em banho ultrassônico por 20 min.

Após o processo de extração, a fração etanol/água (7:3) foi recolhida e filtrada em filtro PTFE 0,22  $\mu\text{m}$ , com o auxílio de uma seringa de vidro, sendo o filtrado transferido para frascos de penicilina devidamente identificados e tarados. Posteriormente, os extratos foram submetidos a secagem à vácuo com aquecimento a 45°C em um concentrador Eppendorf Concentrador Plus no modo dessecador. Após secas, as amostras foram armazenadas em ultrafreezer a -80°C.

#### 4.6 Condições de análise aplicadas ao sistema UPLC-ESI-QTOF-MS<sup>E</sup>

A análise foi realizada em um sistema Acquity UPLC (Waters), acoplado a um espectrômetro de massas do tipo Quadrupolo/ToF (Waters) pertencente a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa. As corridas cromatográficas foram realizadas em uma coluna Waters Acquity UPLC BEH (150 mm x 2,1 mm, 1,7  $\mu\text{m}$ ) com temperatura fixa de 40°C. O sistema de eluição de gradiente binário consistiu em água com 0,1% de ácido fórmico (A) e acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico (B), com gradiente variando 0-22 min (2-95%) de B; 22,50-26,00 min (98%) de B; 26,50-29,50 min (2%) de B, vazão de 0,3 mL min<sup>-1</sup> e volume de injeção da amostra de 5  $\mu\text{L}$ .

O modo negativo (ESI<sup>-</sup>) foi adquirido na faixa de  $m/z$  110-1100, temperatura da fonte fixa de 120°C, temperatura de dessolvatação 350 °C. O fluxo de gás dessolvatação foi de 500 L h<sup>-1</sup>. A voltagem do capilar foi de 2,6 kV. Leucina encefalina foi utilizada como *lock mass*. O modo positivo (ESI<sup>+</sup>) foi adquirido na faixa de  $m/z$  120-1180, temperatura da fonte fixa de 120°C, temperatura de dessolvatação 350 °C. O fluxo de gás dessolvatação foi de 500 L h<sup>-1</sup>. A voltagem do capilar foi de 3,2 kV. Leucina encefalina foi utilizada como *lock mass*. O espectrômetro foi operado com modo de aquisição MS<sup>E</sup> centroide utilizando uma rampa de tensão de 20 a 40 V. O instrumento foi controlado pelo software MassLynx 4.1 (Waters Corporation).

#### 4.7 Processamento de dados e análise estatística

Para analisar os perfis químicos de uma espécie em diferentes estádios fenológicos usando UPLC-QTOF-MS<sup>E</sup>, os dados obtidos foram processados com o software estatístico MarkerLynx. O pré-processamento, uma etapa crucial que ocorre entre a aquisição dos dados por dispositivos analíticos e sua análise estatística subsequente, visa principalmente aprimorar a qualidade dos sinais e reduzir as interferências de ruídos. Estas medidas são essenciais para garantir que os dados sejam comparáveis e confiáveis, conforme discutido por Pilon *et al.* (2020).

Essa etapa é essencial para otimizar os resultados analíticos, facilitando a detecção e quantificação precisas dos picos. O processo envolve transformar os dados em uma matriz consolidada que permite eliminar variações potenciais causadas por diferenças na amostra ou no equipamento, como variações de concentração de sais, temperatura e pH (PILON *et al.*, 2020). Certas operações de pré-processamento de técnicas analíticas particulares, como em sinais cromatográficos de LC-MS são aplicáveis a qualquer tipo de dados e incluem a filtragem de ruídos, correção de linha de base, alinhamento de sinais, deconvolução, seleção de picos e normalização. Estas técnicas são implementadas para melhorar a integridade e a utilidade dos dados coletados (CUBERO-LEON; PENÁLVER; MAQUET, 2014; PILON *et al.*, 2020).

Posteriormente, a análise multivariada foi realizada, onde a PCA (Análise de componentes principais) e a OPLS-DA (Análise discriminante por mínimos quadrados parciais ortogonais) foram utilizados. A análise multivariada foi realizada nas seguintes condições: janela de tempo de retenção de 0,90 a 26,00 minutos, faixa de massa de 110 a 1200 Da e tolerância de massa de 0,02 Da.

Para a análise dos dados, uma lista de intensidade detectada de picos usando o par tempo de retenção ( $t_R$ ) e massa ( $m/z$ ) foi utilizada como identificador de cada pico. Uma identificação foi atribuída a cada um dos pares  $t_R$ - $m/z$  com base em suas ordens de eluição. As intensidades dos íons de cada pico detectado foram normalizadas em relação a soma das intensidades de pico dentro dessa amostra utilizando o MarkerLynx. Os compostos eram considerados os mesmos quando os valores de  $t_R$  e  $m/z$  coincidiam (SOUSA *et al.*, 2017).

O conjunto de dados foi centrado na média e o método da escala de Pareto foi usado para gerar o PCA. Os dados que compõe o número do pico (par  $t_R$ - $m/z$ ), nome da amostra e intensidade do íon foram analisadas por Análise de Componentes Principais (PCA) e Análise Discriminante de Mínimos Quadrados Parciais Ortogonais utilizando o software MarkerLynx

(NI *et al.*, 2008; VAN DEN BERG *et al.*, 2006).

#### 4.8 Anotação dos metabólitos

Os dados gerados pela análise em UPLC-QToF-MS<sup>E</sup> foram processados utilizando o software MassLynx, versão 4.1. A análise dos picos no cromatograma e respectivos espectros de massas baseou-se em uma tolerância de  $\pm 0,05$  min para o tempo de retenção e  $\pm 0,05$  Da para a massa. Utilizando a ferramenta *Elemental Composition*, deduziram-se as possíveis fórmulas moleculares, levando em conta os elementos carbono, hidrogênio e oxigênio, com uma tolerância de erro de 10 ppm.

O perfil metabólico da espécie em estudo foi definido por meio dos espectros de MS e MS/MS, identificando-se compostos através da desreplicação, baseada em dados de quimiotaxonomia literários. Os dados metabolômicos dos extratos foram processados no software MS-DIAL 4.24 (TSUGAWA *et al.*, 2019, 2015) para desconvolução e alinhamento dos espectros MSE, e a identificação preliminar foi feita com o MS-FINDER 3.44 (TSUGAWA *et al.*, 2016). Considerando regras heurísticas (SUMNER *et al.*, 2007), a tolerância de massa ajustou-se para 0,02 Da. Este processo gerou um conjunto de dados contendo 421 espectros MS/MS.

Os metabólitos foram anotados conforme a iniciativa de padrões metabólicos (MSI) nível 2.1 (SCHRIMPE-RUTLEDGE *et al.*, 2016; SUMNER *et al.*, 2007; TSUGAWA *et al.*, 2019), com base em várias bases de dados reconhecidas, incluindo o Banco de Dados do Metabolome Humano (HMDB), PubChem, LipidMaps, MassBank, ChemSpider, a Enciclopédia de Genes e Genomas de Kyoto (KEGG), as Entidades Químicas de Interesse Biológico (ChEBI), FooDB, KnapSAcK e PlantCyc.

Os cromatogramas foram obtidos nos modos de ionização negativo e positivo, mas a identificação e anotação dos compostos foram realizadas apenas com dados do modo de ionização negativo. Esta decisão foi tomada porque os dados do modo de ionização positiva mostraram apenas algumas bandas, e algumas daquelas que foram identificadas também apareceram nos dados do modo de ionização negativa. Além disso, com base na pesquisa realizada para o enquadramento quimiotaxonômico, além dos bancos de dados e na literatura para o gênero e espécie, as classes de metabólitos que esperávamos encontrar eram mais facilmente ionizadas no modo de ionização negativa.

## 4.9 Ensaios biológicos *in vitro* realizados com os extratos etanólicos de *Spondias tuberosa*

### 4.9.1 Atividade Antiglicante

A atividade antiglicante foi determinada a partir do ensaio Albumina Sérica Bovina (BSA) / (MGO) Metilglioxal de acordo com o método descrito por (LUNCEFORD; GUGLIUCCI, 2005), com algumas modificações. Uma solução de BSA (1 mg.mL<sup>-1</sup>) foi preparada em tampão fosfato de sódio (10 mmol.L<sup>-1</sup>), pH 7,4, contendo cloreto de sódio (150 mmol.L<sup>-1</sup>). Uma solução de MGO (5mmol.L<sup>-1</sup>) e os extratos (300 µg mL<sup>-1</sup>) foram adicionados à solução de BSA e após isso, a mistura foi encubada a 37 °C por três dias. As amostras foram encubadas com a presença e ausência (controle negativo) de aminoguanidina (10 mmol.L<sup>-1</sup>).

Após encubação, a fluorescência das amostras foi medida no máximo de excitação de 370 nm e máximo de emissão de 440 nm, e a porcentagem de inibição da formação de AGEs foi calculada por  $[(FLCN \text{ FLbCN}) / (FLs \text{ FLbS})] / (FLCN \text{ FLbCN}) \times 100$ , onde FLCN e FLbCN são as intensidades de fluorescência da mistura do controle negativo e seu branco, respectivamente, e FLs e FLbS são as intensidades de fluorescência do extrato e seu branco, respectivamente (FRAIGE *et. al.*, 2017).

Para a análise estatística, realizou-se primeiramente a análise da normalidade dos conjuntos de dados, pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Após essa etapa, performou-se a Análise de Variância (ANOVA one-way). O intervalo de confiança adotado foi de 95%, ou seja, resultados com \*p < 0,05 foram considerados estatisticamente significativos. As análises estatísticas dos dados foram realizadas utilizando o *software GraphPad Prism* versão 10.0.3 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EUA).

### 4.9.2 Atividade Antioxidante

A atividade antioxidante foi avaliada pelo ensaio DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) descrito por (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995) com algumas modificações (CÂMARANETO *et al.*, 2022). As amostras foram solubilizadas inicialmente em etanol (70%), sendo preparadas posteriormente, diversas diluições para o ensaio (5.000 – 5 µg mL<sup>-1</sup>). O índice de varredura (IV%) foi calculado a partir da seguinte equação:

$$IV\% = \frac{[A_{DPPH} - (A_{AMOSTRAS} - A_{CONCENTRAÇÕES})]}{A_{DPPH}} \times 100$$

Onde, A<sub>DPPH</sub> é a absorbância detectada para a solução etanólica de DPPH, A<sub>AMOSTRAS</sub> são as absorbâncias obtidas para as misturas reacionais, e A<sub>CONCENTRAÇÕES</sub> são as

absorbâncias obtidas para cada diluição (apenas com etanol absoluto) no comprimento de onda de 515 nm. As concentrações eficientes ( $CE_{50}$ ) foram determinadas por regressão linear das novas concentrações pelos seus respectivos IV%, no comprimento de onda de 515 nm. Todos os ensaios foram feitos em sextuplicata para avaliação estatística e o ácido ascórbico foi utilizado como substância de referência para o experimento.

Para o conjunto de dados obtidos realizou-se inicialmente uma averiguação da presença de valores *outliers*, procedendo-se posteriormente com análise da normalidade dos mesmos, pelo teste de Shapiro-Wilk. Para realização das análises estatísticas, após essa etapa, foram utilizados os seguintes testes: Análise de variância (ANOVA one-way), seguida de pós-teste de comparações múltiplas de Tukey para valores médios normais e teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn's para dados não paramétricos. O intervalo de confiança adotado foi de 95%, ou seja, resultados com  $*p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos, sendo também considerado os demais níveis de significância ( $**p < 0,01$ ;  $***p < 0,001$  e  $****p < 0,0001$ ). As análises estatísticas dos dados foram realizadas utilizando o *software GradPad Prism*, versão 9.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EUA). Todos os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Análise do perfil químico das folhas de *Spondias tuberosa*

O perfil químico das folhas de *Spondias tuberosa* foi estabelecido a partir da análise dos cromatogramas no modo de ionização negativo (ESI<sup>-</sup>) (Figura 9), em conjunto com os espectros de massas. Para facilitar a interpretação dos dados, os picos mostrados no cromatograma foram enumerados de acordo com a ordem de eluição (Tabela 5). Na Tabela 5 é possível observar 40 compostos detectados, com 15 metabólitos anotados (Figura 10). Junto aos metabólitos estão seus íons desprotonados [M-H]<sup>-</sup> e seus fragmentos de íons, assim como o erro em partes por milhão (ppm) e sua possível fórmula molecular.

Os picos **1** ( $t_{R-m/z} = 1.24_{-189,0023}$ ), **2** ( $t_{R-m/z} = 4.39_{-369,0468}$ ), **6** ( $t_{R-m/z} = 5.52_{-799,162}$ ), **10** ( $t_{R-m/z} = 6.59_{-451,1655}$ ), **13** ( $t_{R-m/z} = 6.98_{-293,0882}$ ), **14** ( $t_{R-m/z} = 7.14_{-745,2008}$ ), **15** ( $t_{R-m/z} = 8.31_{-427,1867}$ ), **18** ( $t_{R-m/z} = 10.61_{-329,2333}$ ), **19** ( $t_{R-m/z} = 10.74_{-287,2243}$ ), **20** ( $t_{R-m/z} = 10.82_{-287,2221}$ ), **21** ( $t_{R-m/z} = 11.00_{-207,1385}$ ), **22** ( $t_{R-m/z} = 11.66_{-217,1233}$ ), **24** ( $t_{R-m/z} = 13.95_{-421,2630}$ ), **25** ( $t_{R-m/z} = 14.96_{-675,3482}$ ), **26** ( $t_{R-m/z} = 15.56_{-593,2737}$ ), **27** ( $t_{R-m/z} = 16.41_{-277,2161}$ ), **28** ( $t_{R-m/z} = 18.4_{-311,1688}$ ), **29** ( $t_{R-m/z} = 18.74_{-571,2872}$ ), **30** ( $t_{R-m/z} = 19.63_{-387,2526}$ ), **31** ( $t_{R-m/z} = 19.78_{-387,2501}$ ), **32** ( $t_{R-m/z} = 19.96_{-385,2372}$ ), **33** ( $t_{R-m/z} = 20.26_{-385,2371}$ ), **34** ( $t_{R-m/z} = 20.63_{-555,2850}$ ) e **36** ( $t_{R-m/z} = 22.73_{-343,2622}$ ) são as moléculas não anotadas, indicando a presença de possíveis compostos inéditos. Na Tabela 5, são apresentadas fórmulas moleculares dos metabólitos anotados, associadas às massas monoisotópicas observadas no espectro de massas de MS e MS/MS.

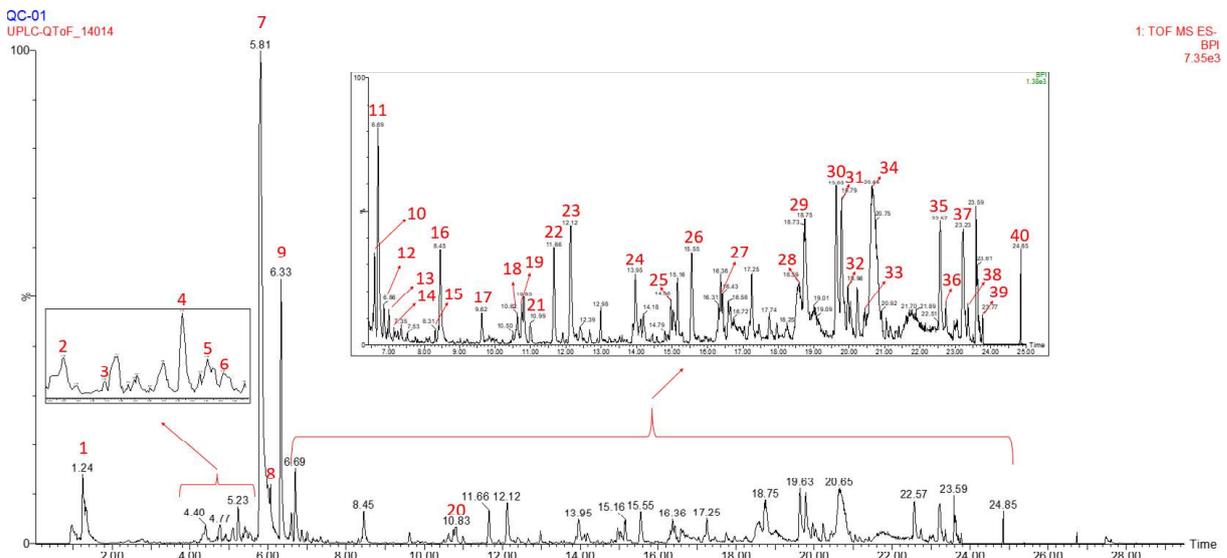
O pico **3** ( $t_R = 4,67$  min) apresentou em seu espectro de MS o íon desprotonado 633,0708 [M-H]<sup>-</sup>, e a presença dos íons fragmentos no espectro de MS/MS  $m/z$  275,0167, 300,9948, 463,0451 e 481,0250, caracterizando a molécula como corilagina. Os fragmentos  $m/z$  481,0250 [M-H-C<sub>7</sub>H<sub>4</sub>O<sub>4</sub>]<sup>-</sup> e 463,0451 [M-H-C<sub>7</sub>H<sub>4</sub>O<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O] são resultados da perda consecutiva de um grupo galoil e água, o íon fragmento  $m/z$  300,9948 corresponde ao ácido elágico (KUMAR *et al.*, 2015).

O pico **4** ( $t_R = 5,22$  min) apresentou em seu espectro de MS o íon desprotonado 625,1427 [M-H]<sup>-</sup>, e a presença dos íons fragmentos no espectro de MS/MS  $m/z$  316,0241 e 317,0344. O fragmento  $m/z$  317,0344 [M-H-146-162] corresponde a perda simultânea dos grupos ramosídeo e glicosídeo, gerando a miricetina aglicona, já o fragmento  $m/z$  316,0241 se apresenta como resultado da clivagem homolítica da ligação glicosídica, possibilitando a anotação do metabólito como miricetina-*O*-rutinosídeo (ABU-REIDAH *et al.*, 2015; REGAZZONI *et al.*, 2013).

No pico **5** ( $t_R = 5,40$  min) foi observado o íon desprotonado 953,0878  $[M-H]^-$ , com íons fragmentos  $m/z$  169,0150, 463,0796, 633,0554 e 935,1250. A presença do íon  $m/z$  935,1250 indica a perda de uma molécula de água  $[M-H-H_2O]^-$ . As sucessivas perdas dos grupos HHDP (hexahidroxidifenil-D-glicose) e ácido gálico, geraram os respectivamente os íons produtos  $m/z$  633,0554  $[M-H-HHDP]^-$  e  $m/z$  463,0796  $[M-H-HHDP-170]^-$ , sugerindo então a presença do composto galoil-bis-HHDP glicose (SILVA *et al.*, 2016b).

No espectro de MS referente ao pico **7** ( $t_R = 5,78$  min) foi observado o íon desprotonado 609,1484  $[M-H]^-$ , e a presença dos íons fragmentos no espectro de MS/MS,  $m/z$  151,0026, 271,0276, 300,0245 e 301,0305. A formação do fragmento  $m/z$  301,0305  $[M-H-146-162]^-$  após a perda sucessiva dos grupos ramnosídeo e glicosídeo, corresponde a quercetina, confirmada pela presença dos fragmentos  $m/z$  273,0372, 229,0131, 178,9999, 151,0022 e 121,0280. Com isso, o composto foi anotado como rutina (ENGELS *et al.*, 2012).

**Figura 9** – Cromatograma do QC 1 das folhas de *Spondias tuberosa* obtido no sistema UPLC-QToF-MS<sup>E</sup> no modo negativo ESI<sup>-</sup>.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2023.

O pico **8** ( $t_R = 6,05$  min) apresentou em seu espectro MS o íon desprotonado 463,0853  $[M-H]^-$ , e no espectro de MS/MS os íons fragmentos  $m/z$  151,0024, 179,0019, 255,0322, 271,0221, 300,0256 e 301,0320. O fragmento  $m/z$  301,0320  $[M-H-162]$  corresponde à perda do grupo hexosídeo. O fragmento  $m/z$  300,0256  $[M-H-162-H]$  indica a presença do ânion radical após a quebra homolítica da ligação glicosídica, apontando a presença do hexosídeo substituído na posição OH-3. Os fragmentos  $m/z$  271,0221  $[M-H-162-CO-H\bullet]$  e

255,0322 [M-H-162-CO-H•-O] corresponde as perdas sucessivas de CO e O. A presença dos fragmentos  $m/z$  179,0019 e 151,0024 correspondem respectivamente às retrociclizações  $^{1,2}A^-$  e  $^{1,2}A^- - CO$ , assim, sugerindo a anotação da molécula como quercetina 3-*O*-glicosídeo (ERŞAN *et al.*, 2016; REGAZZONI *et al.*, 2013).

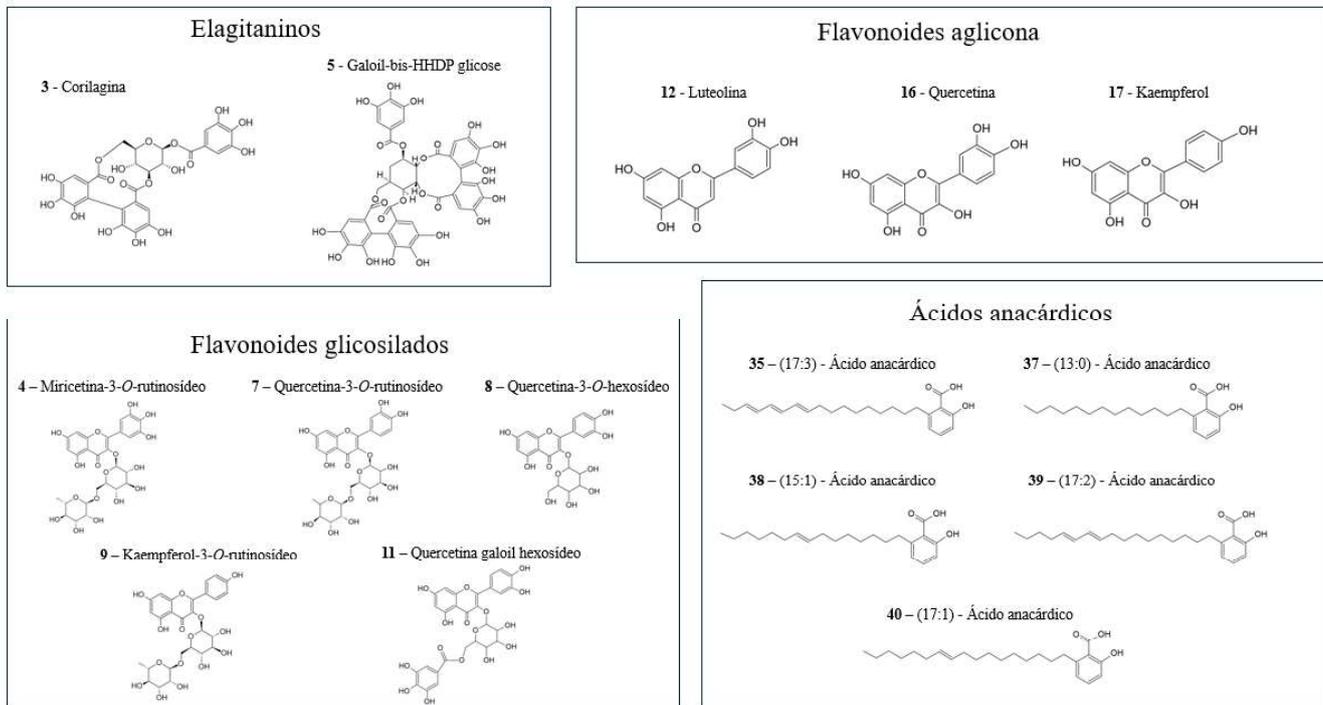
O pico **9** ( $t_R = 6,33$  min) apresentou em seu espectro de MS o íon desprotonado 593,1502 [M-H]<sup>-</sup>, e no espectro de MS/MS os íons fragmentos  $m/z$  255,0310, 284,0303 e 285,0363. O íon fragmento  $m/z$  284,0303 corresponde a clivagem homolítica da molécula glicosilada, e o íon  $m/z$  285,0363 corresponde a clivagem heterolítica. Com isso, o composto foi anotado como kaempferol 3-*O*-rutinosídeo (ENGELS *et al.*, 2012).

No pico **11** ( $t_R = 6,69$  min) foi observado o íon desprotonado 615,1019 [M-H]<sup>-</sup>, com íons produtos  $m/z$  301,0359 e 463,0867. O fragmento  $m/z$  463,0867 [M-H-152]<sup>-</sup> corresponde a perda do grupo galoil e o íon 301,035 [M-H-152-162] corresponde a perda sucessiva do grupo galoil e do grupo hexosídeo, indicando a anotação do composto como quercetina galoil hexosídeo (ERŞAN *et al.*, 2016).

No pico **12** ( $t_R = 6,84$  min) foi verificada a presença do íon desprotonado 285,0422 [M-H]<sup>-</sup>, com os respectivos íons produtos  $m/z$  133,0407, 151,0080, 175,0382, 199,0362 e 217,0973. O fragmento  $m/z$  217,0973 [M-H-C<sub>3</sub>O<sub>2</sub>]<sup>-</sup> corresponde à perda do grupo β-dihidroxil presente no anel A. O fragmento  $m/z$  199,0362 [M-H-C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O-CO<sub>2</sub>] diz respeito a clivagem do grupo C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O seguida da perda neutra de CO<sub>2</sub>. O fragmento  $m/z$  175,0382 [M-H- C<sub>3</sub>O<sub>2</sub>-C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O] é formado a partir da perda do grupo C<sub>3</sub>O<sub>2</sub> seguido da perda dos carbonos 3 e 4. O fragmento  $m/z$  151,0080 corresponde à retrociclização  $^{1,3}A^-$  e o fragmento  $m/z$  133,0407 corresponde à retrociclização  $^{1,3}B^-$ . Sendo assim, sugerindo a anotação do metabólito como luteolina (ABU-REIDAH *et al.*, 2015).

O pico **16** ( $t_R = 8,44$  min) apresentou o íon desprotonado 301,0327 [M-H]<sup>-</sup>, e os íons produtos  $m/z$  121,0284, 151,0001, 178,9965, 229, 0404 e 273,0378. O fragmento  $m/z$  273,0378 [M-H-CO]<sup>-</sup> corresponde à perda neutra do grupo CO, seguida da perda do grupo CO<sub>2</sub> gerando o fragmento 229,0404 [M-H-CO-CO<sub>2</sub>]. Os fragmentos  $m/z$  178,9965 e 151,0001 são correspondentes respectivamente a retrociclização  $^{1,2}A^-$  e  $^{1,2}A^- - CO$ . O fragmento  $m/z$  121,0284 corresponde a retrociclização  $^{1,2}B^-$ . A partir da correlação das massas, o composto foi anotado como quercetina (ABU-REIDAH *et al.*, 2015; FABRE *et al.*, 2001; GENG *et al.*, 2014).

Figura 10 – Representação estrutural dos metabólitos anotados das folhas de *Spondias tuberosa*.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2024.

O pico **17** ( $t_R = 9,60$  min) apresentou em seu espectro MS o íon desprotonado 285,0425 [M-H]<sup>-</sup>, e no espectro de MS/MS os íons produtos  $m/z$  151,0078, 229,0562, 255,0337 e 257,0514. O fragmento  $m/z$  257,0514 [M-H-CO]<sup>-</sup> corresponde a perda neutra de CO, seguida da perda sucessiva de outra molécula de CO gerando o fragmento  $m/z$  229,0562 [M-H-CO-CO]. O fragmento  $m/z$  151,0078 corresponde a retrociclização <sup>1,3</sup>A<sup>-</sup>, sugerindo a anotação do composto kaempferol (ABU-REIDAH *et al.*, 2015).

Os picos **35** ( $t_R = 22,55$  min), **39** ( $t_R = 23,77$  min) e **40** ( $t_R = 24,85$ ) apresentaram em seu espectro de MS os respectivos íons desprotonados 369,2404 [M-H]<sup>-</sup>, 371,2586 [M-H]<sup>-</sup> e 373,2691 [M-H]<sup>-</sup>. Essas massas também foram observadas por Erşan *et al.*, 2016 e anotadas como cadeias alquil C17 de ácidos anacárdicos, diferenciados pelo grau de insaturação da cadeia carbônica. Com isso, os picos **35**, **39** e **40** foram anotados respectivamente como ácido anacárdico (17:3), ácido anacárdico (17:2) e ácido anacárdico (17:1). Além disso, outros dois ácidos anacárdicos foram anotados nos picos **37** ( $t_R = 23,23$  min) e **38** ( $t_R = 23,35$  min). Sendo observados, respectivamente os íons desprotonados 319,2280 [M-H]<sup>-</sup> e 345,2426 [M-H]<sup>-</sup>. Essas massas correspondem aos ácidos anacárdicos, descritos por (ERŞAN *et al.*, 2016), os quais foram respectivamente anotados como ácido anacárdico (13:0) e ácido anacárdico (15:1).

Tabela 5 – Compostos anotados nas amostras de folhas de *Spondias tuberosa* (umbu).

Pico Nº	t <sub>R</sub> min	[M-H] <sup>+</sup> Observado	[M-H] <sup>+</sup> Calculado	Íons produto (MS/MS)	Fórmula Molecular	Erro (ppm)	Metabólitos anotados	Referências
1	1,24	189,0023	189,0035		C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>7</sub>	-6,3	NÃO IDENTIFICADO	
2	4,39	369,0468	369,0458		C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>11</sub>	2,7	NÃO IDENTIFICADO	
3	4,67	633,0708	633,0728	275,0167; 300,9948; 463,0451; 481,0250	C <sub>27</sub> H <sub>22</sub> O <sub>18</sub>	-3,2	Corilagina	Kumar et al., 2015
4	5,22	625,1427	625,1405	316,0241; 317,0344	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>17</sub>	3,5	Miricetina <i>O</i> -rutinosídeo	Abu-reidah et al., 2015
5	5,4	953,0878	953,0896	935,1250; 633,0554; 463,0796; 169,0150	C <sub>41</sub> H <sub>30</sub> O <sub>27</sub>	-1,9	Galoil-bis-HHDP glicose	SILVA et al., 2016b
6	5,52	799,162	799,1628	609,1447; 189,0005	C <sub>26</sub> H <sub>40</sub> O <sub>28</sub>	-1,0	NÃO IDENTIFICADO	
7	5,78	609,1484	609,1456	151,0026; 271,0276; 300,0245; 301,0305	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	4,9	Quercetina-3- <i>O</i> -rutinosídeo (Rutina)	Engels et al., 2012
8	6,05	463,0853	463,0877	151,0024; 179,0019; 255,0322; 271,0221; 300,0256	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	-5,2	Quercetina-3- <i>O</i> -hexosídeo	Erşan et al., 2016
9	6,33	593,1502	593,1506	255,0310; 284,0303; 285,0363	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	-0,7	Kaempferol 3- <i>O</i> -rutinosídeo	Engels et al., 2012
10	6,59	451,1655	451,1663		C <sub>15</sub> H <sub>32</sub> O <sub>15</sub>	-1,8	NÃO IDENTIFICADO	
11	6,69	615,1019	615,0986	301,0359; 463,0867	C <sub>28</sub> H <sub>24</sub> O <sub>16</sub>	5,4	Quercetina galoil hexosídeo	Erşan et al., 2016
12	6,84	285,0422	285,0399	133,0407; 151,0080; 175,0382; 199,0362; 217,0973	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	8,1	Luteolina	Abu-reidah et al., 2015
13	6,98	293,0882	293,0873		C <sub>11</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	3,1	NÃO IDENTIFICADO	
14	7,14	745,2008	745,198		C <sub>35</sub> H <sub>38</sub> O <sub>18</sub>	3,8	NÃO IDENTIFICADO	
15	8,31	427,1867	427,1909		C <sub>28</sub> H <sub>28</sub> O <sub>4</sub>	-9,8	NÃO IDENTIFICADO	
16	8,44	301,0327	301,0348	273,0378; 229,0404; 178,9965; 151,0001; 121,0284	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	-7,0	Quercetina	Abu-reidah et al., 2015
17	9,6	285,0425	285,0399	151,0078; 229,0562; 257,0514	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	9,1	Kaempferol	Abu-reidah et al., 2015
18	10,61	329,2333	329,2328		C <sub>18</sub> H <sub>35</sub> O <sub>5</sub>	1,5	NÃO IDENTIFICADO	
19	10,74	287,2243	287,2222		C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>4</sub>	7,3	NÃO IDENTIFICADO	

Tabela 5 – Compostos anotados nas amostras de folhas de *Spondias tuberosa* (Umbu). (Continuação)

Pico N°	t <sub>R</sub> (min)	[M-H]- Observado	[M-H]- Calculado	Íons produto (MS/MS)	Fórmula Molecular	Erro (ppm)	Metabólitos anotados	Referências
20	10,82	287,2221	287,2222		C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>4</sub>	-0,3	NÃO IDENTIFICADO	
21	11	207,1385	207,1385		C <sub>13</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	0,0	NÃO IDENTIFICADO	
22	11,66	217,1233	235,1229		C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>	6,0	NÃO IDENTIFICADO	
23	12,13	221,0597	221,0603	177,0686	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	-2,7	Ácido 9-antracencarboxílico	PUBCHEM
24	13,95	421,263	421,259		C <sub>24</sub> H <sub>38</sub> O <sub>6</sub>	9,5	NÃO IDENTIFICADO	
25	14,96	675,3482	675,3533		C <sub>49</sub> H <sub>52</sub> O <sub>9</sub>	-7,6	NÃO IDENTIFICADO	
26	15,56	593,2737	593,2751		C <sub>34</sub> H <sub>42</sub> O <sub>9</sub>	-2,4	NÃO IDENTIFICADO	
27	16,41	277,2161	277,2168		C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	-2,5	NÃO IDENTIFICADO	
28	18,54	311,1688	311,1706		C <sub>13</sub> H <sub>28</sub> O <sub>8</sub>	-5,8	NÃO IDENTIFICADO	
29	18,74	571,2872	571,2848		C <sub>13</sub> H <sub>28</sub> O <sub>8</sub>	-6,7	NÃO IDENTIFICADO	
30	19,63	387,2526	387,2535		C <sub>24</sub> H <sub>36</sub> O <sub>4</sub>	-2,3	NÃO IDENTIFICADO	
31	19,78	387,2501	387,2535		C <sub>24</sub> H <sub>36</sub> O <sub>4</sub>	-8,8	NÃO IDENTIFICADO	
32	19,96	385,2372	385,2379		C <sub>24</sub> H <sub>36</sub> O <sub>4</sub>	-7,5	NÃO IDENTIFICADO	
33	20,26	385,2371	385,2379		C <sub>24</sub> H <sub>34</sub> O <sub>4</sub>	-1,8	NÃO IDENTIFICADO	
34	20,63	555,285	555,2805		C <sub>28</sub> H <sub>44</sub> O <sub>11</sub>	8,1	NÃO IDENTIFICADO	
35	22,55	369,2404	369,243	183,0098; 325,2491	C <sub>24</sub> H <sub>34</sub> O <sub>3</sub>	-7,0	(17:3)- Ácido Anacárdico	Erşan et al., 2016
36	22,73	343,2622	343,2637		C <sub>23</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	-4,4	NÃO IDENTIFICADO	
37	23,23	319,228	319,2273	275,2367	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>	2,2	(13:0)- Ácido Anacárdico	Erşan et al., 2016
38	23,35	345,2426	345,243	301,2552	C <sub>22</sub> H <sub>34</sub> O <sub>3</sub>	-1,2	(15:1)- Ácido Anacárdico	Erşan et al., 2016
39	23,77	371,2586	371,2586	327,2678	C <sub>24</sub> H <sub>36</sub> O <sub>3</sub>	0,0	(17:2)- Ácido Anacárdico	Erşan et al., 2016
40	24,85	373,2691	373,2743	329,2859	C <sub>24</sub> H <sub>38</sub> O <sub>3</sub>	-13,9	(17:1)-Ácido Anacárdico	Erşan et al., 2016

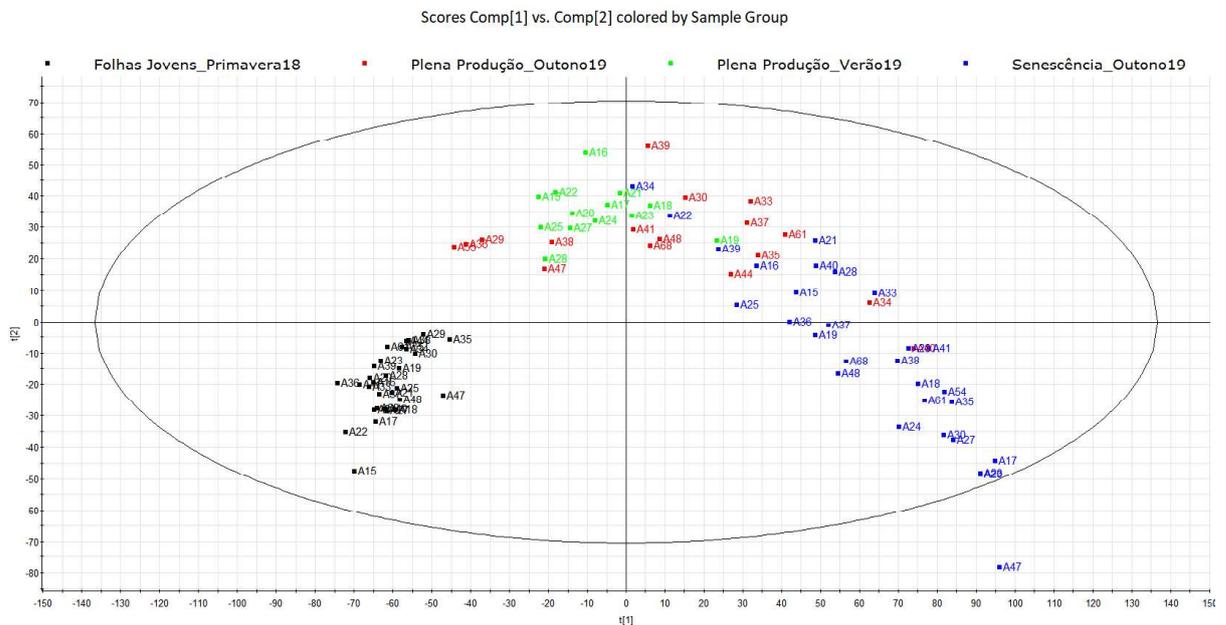
## 5.2 Análise multivariada

### 5.2.1 Análise de componentes principais (PCA)

A PCA foi utilizada inicialmente para reduzir a complexidade dos dados sem perder informações importantes. Os gráficos de *scores* e *loadings* foram utilizados para investigar a relação dos compostos anotados com as amostras analisadas, com o objetivo de verificar semelhanças e amostras entre as amostras, tendo como consequência a formação de possíveis agrupamentos de amostras (GUEDES *et al.*, 2020).

Apesar de apresentarem uma composição química semelhante, com a PCA foi possível explicar 48% da variância total, porém PC1 e PC2 foram utilizados por possibilitaram uma melhor visualização do comportamento das amostras no decorrer dos estádios fenológicos, acumulando 39,47% da variância ( $R^2X[1]= 0,3118$  e  $R^2X[2]= 0,0829$ ), possibilitando também corrigir e observar determinados agrupamentos das amostras, sendo a variação dos compostos ao longo dos estádios fenológicos das folhas de *S. tuberosa*, a responsável pela tendência mostrada na Figura 11.

**Figura 11** – Análise de Componentes Principais (PCA) em 2D dos extratos das folhas de *Spondias tuberosa*.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2023.

Ao analisar o gráfico de *scores*, foi possível observar a correlação dos grupos formados com os estádios fenológicos. O comportamento observado nos leva a inferir que a primeira componente principal (PC1) modela o comportamento das amostras em relação ao

período de coleta, devido a oposição exibida entre os estádio de folhas jovens e senescência, e a segunda componente principal (PC2) corresponde as semelhanças e diferenças da composição química das amostras dentro de um mesmo período de coleta, onde o estádio de folhas jovens foi o que obteve menor variação em PC1 e PC2 indicando alta correlação das amostras nesse estádio, sendo o estádio que mais se diferenciou dos demais, se localizando exclusivamente no 3º quadrante do gráfico, ou seja, no eixo negativo de PC1 e PC2.

De acordo com (GOBBO-NETO; LOPES, 2007) é possível observar que mesmo que os tecidos mais novos tenham taxas biossintéticas mais altas, nota-se um fenômeno interessante: durante períodos de crescimento tecidual rápido, há uma diminuição na produção de certos metabólitos especializados, notadamente derivados fenólicos. Isso sugere que quando a planta está no processo de crescimento rápido, a energia ou recursos podem ser desviados de algumas rotas metabólicas para corroborar com o crescimento, logo, a separação observada na Figura 11 pode estar relacionada as necessidades anteriormente mencionadas das folhas jovens.

Entretanto, ao analisar os demais estádios, verificou-se uma menor correlação entre as amostras e uma maior correlação entre os estádios, sendo possível visualizar uma transição menos acentuada entre o estádio de plena produção e senescência. De acordo com os estudos de (AIDAR *et al.* 2021) sobre a fenologia do umbuzeiro nas safras de 2012-2013, 2013-2014 e 2014-2015, foi possível observar que o processo de senescência foliar iniciou-se antes da finalização do período de amadurecimento de frutos, logo, a correlação encontrada entre a plena produção e senescência pode estar relacionada a esses processos ocorrendo de forma simultânea na planta.

Segundo (AIDAR *et al.*, 2021), com o aumento da intensidade de incidência luminosa e a transição do período chuvoso para o seco, o umbuzeiro entra em um período de mudança da fase de crescimento para a fase de repouso vegetativo. O déficit hídrico progressivo do solo, geralmente leva a planta ao estádio de senescência, período no qual diversos processos de foto-oxidação dos tecidos acontecem em uma intensidade na qual os sistemas antioxidantes de fotoproteção das folhas não são suficientes para que os danos causados por esses processos sejam impedidos, e alguns estudos relatam que a seca é um dos principais fatores que influencia na qualidade e rendimento das plantas, afetando particularmente, o acúmulo de compostos bioativos nas plantas, levando a mudanças significativas na composição de fenólicos presentes na composição química das plantas (ZANATTA; VILEGAS; EDRADA-EBEL, 2021).

A região na qual as folhas foram coletadas apresenta condições climáticas marcadas por temperaturas médias a elevada (entre 25° e 30°C) e baixa precipitação (entre 400 e 1220 mm anuais) (TABARELLI *et al.*, 2018), apresentando duas estações principais: o período seco

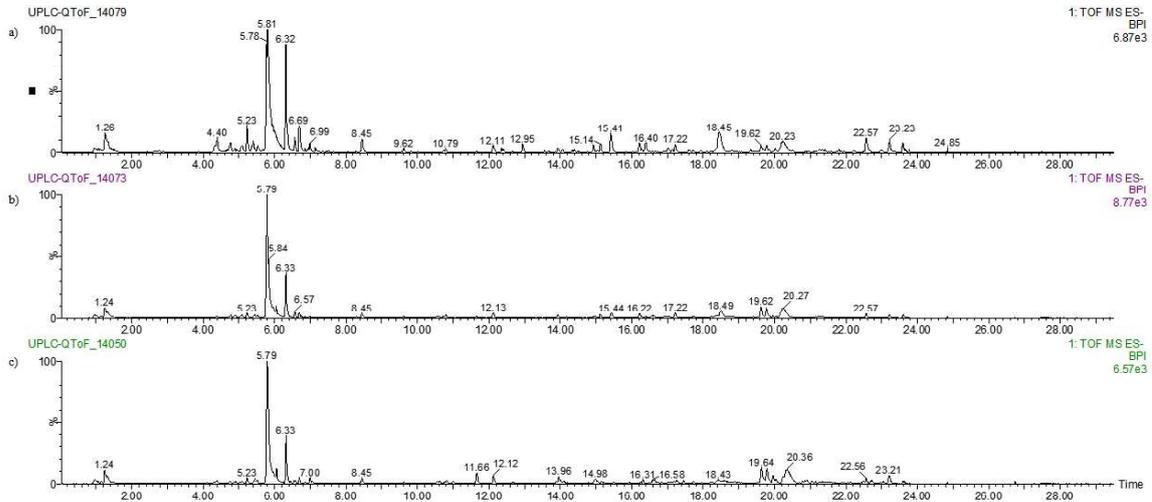
que ocorre na maior parte do ano entre junho (outono) e dezembro (primavera) e o período chuvoso que ocorre entre os meses de janeiro (verão) e maio (outono). As folhas jovens foram coletadas nos meses de novembro e dezembro de 2018 (primavera), que apresentaram um período seco e com altas temperaturas. As folhas de plena produção verão e outono foram coletadas em março e abril de 2019 (verão e outono), que apresentaram um período chuvoso e com altas temperaturas. As folhas de senescência foram coletadas em junho de 2019 (outono), que apresentou um período seco e com temperaturas médias (COSTA JÚNIOR *et al.*, 2019; GUEDES *et al.*, 2019; SANTOS *et al.*, 2019).

Apesar de ser possível identificar os agrupamentos das amostras e as correlações com os estádios fenológicos, observa-se uma variedade de distribuição dentro de um mesmo estágio, havendo a possibilidade de ser ocasionada pela ampla variedade genética dos espécimes que constituem o Banco Ativo de Germoplasma de Umbuzeiro (BGU), podendo ser constatada, por exemplo, pela presença de espécimes que produzem frutos de 4 g a 85 g, aproximadamente, e com sabores distintos. O BGU é formado por 80 acessos, representantes de todas as unidades de paisagem do Semiárido nordestino, coletados nos estados de Pernambuco, Bahia, Minas Gerais e Rio Grande do Norte (SANTOS *et al.*, 1999; SILVA JÚNIOR *et al.*, 2021).

Os resultados obtidos com PCA mostraram que a concentração de diferentes compostos foi diretamente afetada pelo período de coleta, podendo essa diferença estar relacionada as condições ambientais características de cada período como a temperatura, radiação solar, umidade relativa e chuva, além de fatores genéticos, levando em conta as diferentes origens dos acessos de umbuzeiro estudados.

Na figura 12 são mostrados os cromatogramas de um espécime (BGU 16) nos estádios fenológicos de Folhas Jovens (a), Plena Produção (b) e Senescência (c). É possível observar a variação da composição química desse espécime nos diferentes estádios fenológicos.

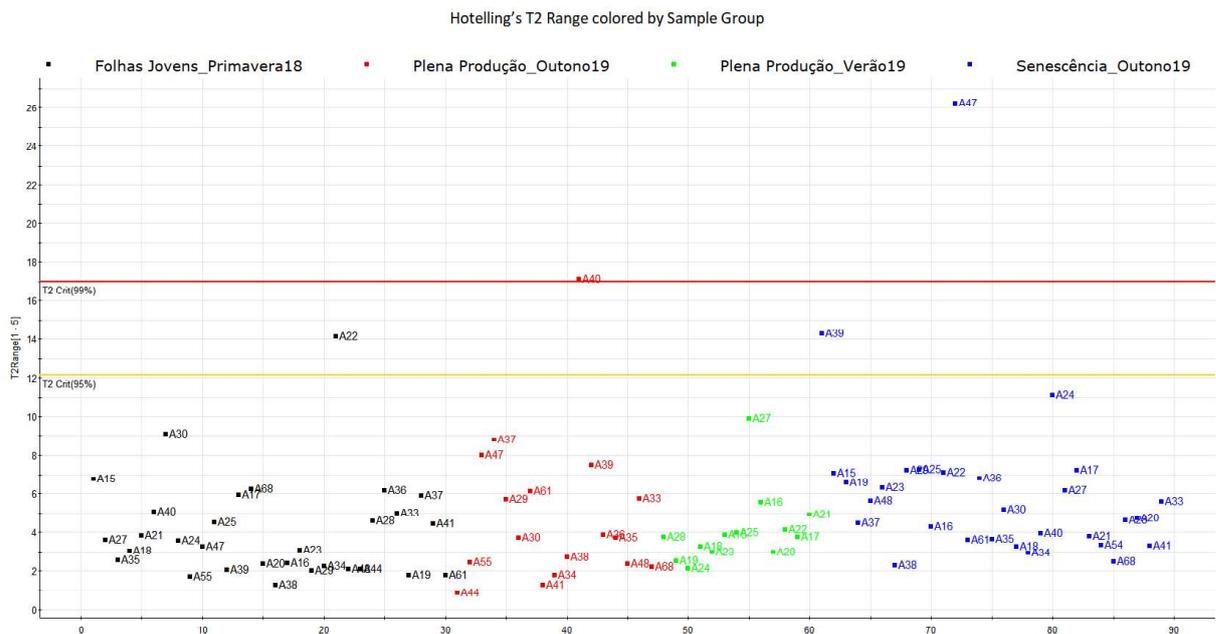
**Figura 12** – Cromatogramas do espécime (BGU 16) nos estádios fenológicos de Folhas Jovens (a), Plena Produção (b) e Senescência (c).



Fonte: Elaborada pelo autor, 2023.

A partir da análise de Hotelling’s  $T^2$ , que indica o quão longe cada observação está do centro de dados, ou seja, o quanto cada observação está distante quando comparado à observação média, foi possível determinar os possíveis *outliers* (Figura 13). Nesse trabalho foi utilizado um intervalo de confiança de 95%, ou seja, qualquer amostra fora desse intervalo, foi considerada um outlier.

**Figura 13** – Pontuações de Hotelling’s  $T^2$  para PCA de *Spondias tuberosa*.



Fonte: Autor, 2023.

### 5.2.2 OPLS-DA e Análise de S-Plot

Através da PCA foi possível separar e distinguir o perfil metabólico de *S. tuberosa* em quatro grupos distintos. Entretanto, visando determinar as variáveis responsáveis, marcadores químicos, pela separação e consequente diferenciação dos grupos de amostras, a OPLS-DA associada aos gráficos de dispersão S-Plot foram utilizados no conjunto de dados.

Nesse estudo, o modelo de OPLS-DA foi aplicado aos dados oriundos do UPLC-QTOF-MS<sup>E</sup> para comparar os grupos de amostra. Os valores de  $t_R$ - $m/z$  serviram como base para a anotação de potenciais marcadores químicos responsáveis pela separação das amostras.

Ao analisar o gráfico de scores de OPLS-DA (Figura 14 (a)) entre as amostras no estágio fenológico folhas jovens primavera de 2018 e senescência outono de 2019 de *Spondias tuberosa*, evidenciou uma separação explícita dos dois grupos de amostra. Para avaliar a precisão e confiabilidade do modelo de OPLS-DA, dois parâmetros foram utilizados: a variável  $R^2Y$ , chamada de variação explicada e a variável  $Q^2$ , chamada de variação predita. Em resumo,  $R^2Y$  fornece uma medida de ajuste do modelo para os dados originais, enquanto  $Q^2$  fornece uma medida interna de consistência entre os dados originais e preditivos da validação cruzada. Modelos com os parâmetros  $R^2Y$  e  $Q^2$  com valores próximos de 1 são considerados excelentes, embora valores próximos de 0,5 são aceitos quando os componentes das amostras apresentam alta complexibilidade (WOLD; SJOSTROM; ERIKSSON, 2001).

Deste modo, a OPLS-DA concebida nesse estudo apresentou  $R^2Y = 0,98$  e  $Q^2 = 0,97$ . Esse resultado sugere que o modelo explica 98% das variações de Y, com capacidade preditiva de 97%, indicando que o modelo está bem estabelecido e possui excelente predição. Para a identificação de possíveis marcadores químicos, foi utilizada a importância da variável na projeção (VIP) e S-Plot, os quais foram obtidos a partir do OPLS-DA entre as amostras no estágio fenológico folhas jovens primavera de 2018 e senescência outono de 2019 de *S. tuberosa*. VIP é uma forma de classificar a melhor faixa nas quais os metabólitos discriminatórios estão inseridos e é considerado estatisticamente significativo quando o valor é maior que 1,0 (NI *et al.*, 2008). Neste trabalho, foi utilizado  $VIP > 7$  e  $p < 0,05$ .

De acordo com o S-Plot (Figura 14 (b)), os íons no canto inferior esquerdo, representados por **4, 9, 16, 26 e 35** (Tabela 1), foram os pares ( $t_R$ - $m/z$ ) com maior contribuição para a caracterização das amostras no estágio fenológico folhas jovens primavera de 2018. Por outro lado, no canto superior direito do gráfico de S-Plot (Figura 14 (b)), os pares ( $t_R$ - $m/z$ ) que mais contribuíram para a caracterização das amostras no estágio fenológico senescência outono de 2019, foram anotadas como **7, 22, 30 e 32**. Portanto, o grupo de pares ( $t_R$ - $m/z$ ) representados por **4, 7, 9, 16, 22, 26, 30, 32 e 35** são os potenciais marcadores químicos responsáveis por

caracterizar e discriminar os dois grupos de amostras e conseqüentemente diferenciar as amostras no estágio fenológico folhas jovens primavera de 2018 das amostras no estágio fenológico senescência outono de 2019.

É importante salientar que cada ponto no gráfico de S-Plot corresponde a um par  $t_R$ - $m/z$ , os quais foram atribuídos aos compostos anotados. Deste modo, os metabólitos referentes aos pares mencionados foram anotados como: miricetina-*O*-rutinosídeo (**4**), rutina (**7**), kaempferol 3-*O*-rutinosídeo (**9**), quercetina (**16**), Não identificado (11.66\_217,1233) (**22**), Não identificado (15.56\_593,2737) (**26**), Não identificado (19.63\_387,2526) (**30**), Não identificado (19.96\_385,2372) (**32**) e ácido anacárdico (17:3) (**35**).

Ao analisar a OPLS-DA (Figura 14 (c)) entre as amostras no estágio fenológico folhas jovens primavera de 2018 e o grupo contendo as amostras no estágio fenológico plena produção verão de 2019 e plena produção outono de 2019, foi possível verificar uma clara separação dos dois grupos de amostra,  $R^2Y = 0,99$  e  $Q^2 = 0,96$ . Esse resultado sugere que o modelo explica 99 % das variações de Y, com capacidade preditiva de 96 %, indicando que o modelo está bem estabelecido e possui excelente predição.

Para a identificação de possíveis marcadores químicos, foi utilizada a importância da variável na projeção (VIP) e S-Plot, os quais foram obtidos a partir do OPLS-DA entre as amostras no estágio fenológico folhas jovens primavera de 2018 e o grupo contendo as amostras no estágio fenológico plena produção verão de 2019 e plena produção outono de 2019.

De acordo com o S-Plot (Figura 14 (d)), os pares ( $t_R$ - $m/z$ ) no canto inferior esquerdo, representados **4**, **5**, **9**, **16**, **26** e **27** (Tabela 1) apresentaram maior contribuição para a caracterização das amostras no estágio fenológico folhas jovens primavera de 2018. Por outro lado, no canto superior direito do gráfico de S-Plot (Figura 14 (b)), os pares ( $t_R$ - $m/z$ ) que mais contribuíram para a caracterização do grupo contendo as amostras nos estádios fenológicos plena produção verão de 2019 e plena produção outono de 2019, foram anotados como **7**, **30** e **34**. Portanto, o grupo de pares ( $t_R$ - $m/z$ ) representados por **4**, **5**, **7**, **9**, **16**, **26**, **27**, **30** e **34** são os potenciais marcadores químicos responsáveis por caracterizar e discriminar os dois grupos de amostras e conseqüentemente diferenciar as amostras no estágio fenológico folhas jovens primavera de 2018 e o grupo contendo as amostras no estágio fenológico plena produção verão de 2019 e plena produção outono de 2019. Sendo assim, os compostos foram anotados como: miricetina-*O*-rutinosídeo (**4**), galoil-bis-HHDP glicose (**5**), rutina (**7**), kaempferol 3-*O*-rutinosídeo (**9**), quercetina (**16**), Não identificado (15.56\_593,2737) (**26**), Não identificado (16.41\_277,2261) (**27**), Não identificado (19.63\_387,2526) (**30**) e Não identificado (20.63\_555,2850) (**34**).

Ao tentar utilizar amostras dos estádios fenológicos de plena produção (verão de 2019 e outono de 2019) ou senescência (outono de 2019) para comparações, percebeu-se que a qualidade do modelo OPLS-DA decaía significativamente. O parâmetro  $Q^2$ , uma métrica interna que avalia a consistência entre os dados originais e os dados preditivos durante a validação cruzada, apresentou valores substancialmente mais baixos:  $Q^2 = 0,56$  e  $Q^2 = 0,79$ . Esses valores são inferiores aos obtidos quando utilizamos as amostras no estágio fenológico de folhas jovens coletadas na primavera de 2018.

Portanto, optou-se por não utilizar os estádios de plena produção e senescência nas análises porque esses não forneceram uma precisão e confiabilidade comparáveis às obtidas com as amostras de folhas jovens. Isso sugere que o estágio de folhas jovens pode ser mais discriminativo ou sensível às variáveis que estamos tentando modelar ou entender.

Na Tabela 6 são mostrados os compostos anotados como discriminantes a partir da análise por OPLS-DA e S-Plot de folhas jovens vs senescência e folhas jovens vs plena produção, e seus respectivos valores de VIP.

**Tabela 6** – Discriminantes dos estádios fenológicos das folhas de *Spondias tuberosa*.

Nº Pico	t <sub>R</sub>	m/z	Compostos	Jovens v.s. Senescência	Senescência v.s. Jovens	Jovens v.s. Plena Produção	Plena Produção v.s. Jovens
				VIP	VIP	VIP	VIP
4	5,22	625,1427	Miricetina- <i>O</i> -rutinosídeo	8,43		10,3	
5	5,4	953,0878	Galoil-bis-HHDP glicose			7,76	
7	5,78	609,1484	Quercetina-3- <i>O</i> -rutinosídeo (Rutina)		12,22		8,31
9	6,33	593,1502	Kaempferol 3- <i>O</i> -rutinosídeo	14,75		9,34	
16	8,44	301,0327	Quercetina	7		8,31	
22	11,66	217,1233	Não identificado		9,11		
26	15,56	593,2737	Não identificado	8,65		8,26	
27	16,41	277,2261	Não identificado			7,3	
30	19,63	387,2526	Não identificado		8,01		10,08
32	19,96	385,2372	Não identificado		7,20		
34	20,63	555,2850	Não identificado				9,85
35	22,55	369,2404	(17:3)- Ácido Anacárdico	7			

Fonte: Autor, 2023.

Ao analisar os marcadores químicos correspondentes aos diferentes estádios fenológicos, foi possível observar que os compostos fenólicos foram as principais variáveis responsáveis pela separação dos grupos em estudo. Embora tenham sido classificados como discriminantes, os compostos fenólicos estiveram presentes em todos os estádios fenológicos, porém em diferentes proporções. (LIU *et al.*, 2023) constatou a variação de flavonoides, antocianinas e procianidinas durante o desenvolvimento das flores de *Zingiber mioga*, demonstrando que a produção desses constituintes pode estar restrita a algum estágio de desenvolvimento específico da planta. Este padrão sugere uma complexa interação entre o desenvolvimento fenológico e a biossíntese de compostos fenólicos, sublinhando a sofisticação adaptativa dessas plantas a condições ambientais variáveis e possivelmente desafios ecológicos específicos.

Os flavonoides desempenham funções importantes na planta, agindo como moduladores do transporte polar de auxinas e outros hormônios envolvidos no desenvolvimento e frutificação. Além disso, alguns metabólitos secundários são reciclados em produtos do metabolismo primário, energia ou CO<sub>2</sub>, e isso explica em parte a transitoriedade de metabólitos na planta (MING *et al.*, 2012) observada pela distribuição dos marcadores químicos nas folhas de umbuzeiro.

A presença de kaempferol 3-*O*-rutinosídeo apontada como marcador químico do estágio de folhas jovens pode estar relacionado ao potencial de proteção solar contra raios UV (SEKANDI *et al.*, 2023), considerando as altas temperaturas e incidência luminosa da região na época da coleta (COSTA JÚNIOR *et al.*, 2019). Associada à defesa contra herbívoros, a rutina se encontra em maior concentração, sendo classificada como marcador químico do estágio de folhas em plena produção.

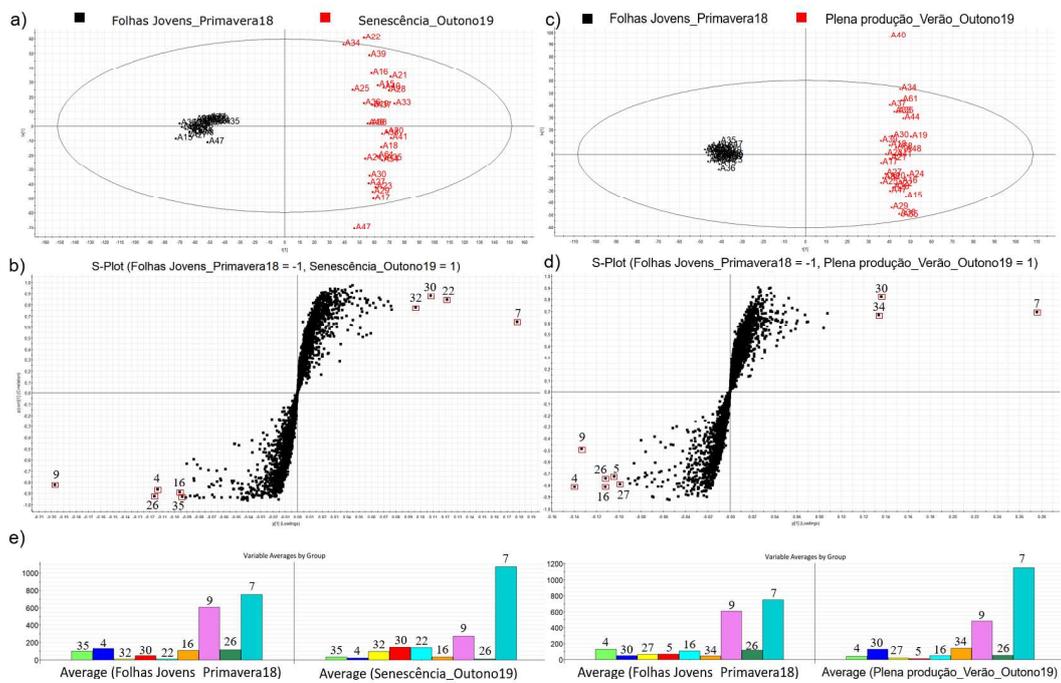
### **5.2.3 Avaliação da distribuição dos marcadores químicos nas folhas de *S. tuberosa***

A análise da variação fenotípica em *S. tuberosa*, conforme ilustrada na Figura 6(e), revela diferenças significativas na composição química das folhas em distintos estádios fenológicos, evidenciando a complexa interação entre metabolismo vegetal e condições ambientais sazonais. Durante a primavera de 2018, observa-se uma concentração elevada de flavonoides, como miricetina-*O*-rutinosídeo, Caempferol 3-*O*-rutinosídeo e quercetina. Esses compostos são conhecidos por suas propriedades antioxidantes, sugerindo uma resposta adaptativa da planta às condições de crescimento vigoroso na primavera, que exige proteção contra os radicais livres produzidos durante processos metabólicos intensos.

Em contraste, no outono de 2019, marcado pela senescência, nota-se uma redução desses compostos, possivelmente devido à degradação natural associada ao envelhecimento das folhas e à preparação para o estado de dormência no inverno. Este padrão sugere uma diminuição na atividade metabólica e na necessidade de defesas antioxidantes à medida que a planta se prepara para condições adversas.

Adicionalmente, nos períodos de plena produção no verão e outono de 2019, foram detectadas concentrações elevadas de rutina e outros compostos não anotados, indicativos de um perfil metabólico distinto que pode estar relacionado à maturação e à reprodução da planta. Estes compostos podem desempenhar papéis cruciais na proteção contra estresses térmicos e na atração de polinizadores, essenciais para a reprodução no pico da estação de crescimento.

**Figura 14** – Gráficos das análises das folhas de *Spondias tuberosa*: (a) OPLS-DA folhas jovens vs senescência Y; (b) S-Plot folhas jovens v.s. senescência; (c) OPLS-DA folhas jovens v.s. plena produção; (d) S-Plot folhas jovens v.s. plena produção; (e) Variação média dos marcadores químicos do extrato etanólico das folhas de *Spondias tuberosa*.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2023.

### 5.3 Atividade Antiglicante

Os extratos hidroetanólicos das folhas de *Spondias tuberosa* foram testados quanto a sua capacidade antiglicante. Inicialmente, foi realizado um *screening*, onde os extratos foram testados em uma concentração de 300  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e a atividade antiglicante foi determinada utilizando fluorimetria, como descrito na literatura, devido a fluorescência exibida pelos AGEs (FRAIGE *et. al.*, 2017).

Os extratos apresentaram capacidade antiglicante bastante diversificada, variando de 3,6-97,2% (Figura 15). Foi possível observar que essa variação ocorreu tanto entre os estádios fenológicos quanto dentro de um mesmo estágio. Das amostras testadas, 71,76% foram classificadas como ativas, apresentando inibição de glicação superior a 50%, enquanto 37,64% das amostras apresentaram inibição de glicação superior à da aminoguanidina (74,7%), utilizada como controle positivo por sua atividade antiglicante comprovada.

No estágio de folhas jovens, 73,33% foram classificadas como ativas, onde 36,67% das amostras foram superiores ao controle positivo (Figura 15 (a)). No estágio de plena Produção, 75% foram classificadas como ativas e 46,42% foram superiores ao controle positivo (Figura 15 (b)) e por fim no estágio de senescência, 70,37% foram classificadas como ativas e 44,44% foram superiores ao controle positivo (Figura 15 (c)).

Os espécimes A19, A21, A34, A36, A39 e A47 apresentaram elevada atividade antiglicante em todos os estádios fenológicos, superiores aos 74,7% da aminoguanidina, utilizada como controle positivo. Os espécimes A15, A16, A18, A22, A24, A28, A29, A38, A48 e A68 apresentaram desde valores intermediários de atividade antiglicante, ou seja, maiores que 50% até valores elevados, superiores a 74,7% em todos os estádios fenológicos. Os espécimes A17, A20, A23, A25, A27, A30, A35, A33, A37, A44 e A61 apresentaram desde baixos valores de atividade antiglicante, ou seja, menores de 50% até valores superiores a 74,7%, onde os espécimes A23, A27, A44, A61 apresentaram apenas valores abaixo de 50% de atividade antiglicante.

Ao calcular a atividade antiglicante média para os diferentes estádios fenológicos, encontrou-se o valor de 62,74% para as folhas jovens, 64,85 % para plena produção e 64,97% para o estágio de senescência.

**Figura 15** – Porcentagens de Inibição da AGE's (a) Folhas Jovens; (b) Plena Produção e (c) Senescência.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2023

Para analisar se existia uma diferença significativa entre as médias, foi realizada uma ANOVA. Ao realizar o teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov, os resultados mostraram ter uma distribuição normal, e com isso, foi possível realizar a análise de variância (ANOVA). Após a realização da ANOVA, o *software* gerou os seguintes valores contidos na Tabela 7.

**Tabela 7** – Tabela de ANOVA para a comparação da atividade antiglicante nos diferentes estágios fenológicos.

<b>Fonte da variação</b>	<b>SQ</b>	<b>gl</b>	<b>MQ</b>	<b>F</b>	<b>valor-P</b>	<b>F crítico</b>
Entre grupos	91.49757	2	45.74879	0.074482	0.928287	3.107891
Dentro dos grupos	50366.61	82	614.2269			
<b>Total</b>	<b>50458.11</b>	<b>84</b>				

Fonte: Elaborada pelo autor, 2023.

A ANOVA é um tipo de análise estatística utilizada para determinar se há diferença entre as médias de dois ou mais grupos. Para medir isso, é utilizado o valor de probabilidade (*p-value*) que é obtido através do resultado da análise. O valor de *p* serve para apoiar ou descartar a hipótese nula ( $H_0$ ), que afirma que não há diferença entre os grupos estudados. Para um nível de significância igual a 5%, ou seja, 0,05, valores de  $p > 0,05$ , indicam a  $H_0$  como verdadeira (STAHL E WOLD, 1989; WASSERSTEIN E LAZAR, 2016).

Ao obter o (*p-value*) = 0,928287, foi possível afirmar que não há diferença significativa entre as médias dos grupos analisados, ou seja, as folhas de *S. tuberosa* apresentaram estatisticamente a mesma atividade antiglicante em todos os estádios fenológicos estudados nesse trabalho.

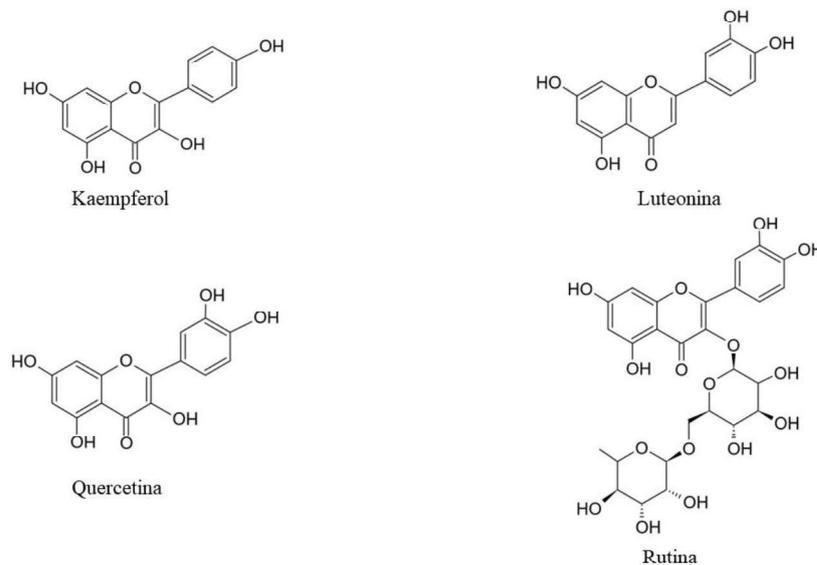
Apesar da composição química do umbuzeiro (*S. tuberosa*) ser pouco conhecida, sabe-se que várias das propriedades farmacológicas do gênero *Spondias* são atribuídas aos compostos fenólicos, como os taninos e flavonóides, presentes principalmente nas folhas (GUEDES *et al.*, 2020). O uso das folhas de *Spondias tuberosa* na medicina popular para o tratamento de diversas doenças, como por exemplo, a doença de diabetes (AGRA *et al.*, 2007), mostrou-se concordante com os resultados obtidos, visto que a formação dos produtos de glicação avançada (AGEs) é um dos principais mecanismos responsáveis pelos danos celulares e teciduais observados nessa doença (JAKUS; RIETBROCK, 2004).

Segundo (GALENO *et al.*, 2014), os compostos como o ácido gálico, miricetina 3-raminosídeo, quercetina-3-*O*-galactosídeo, quercetina-3-*O*-xilósídeo, quercetina-3-*O*-raminosídeo e kaempferol-3-*O*-ramnosídeo, apresentam um alto potencial antioxidante e tem sido associados a efeitos terapêuticos hipoglicêmicos, inibição enzimática ( $\alpha$ -amilase,  $\alpha$ -glucosidade e xantina oxidase), bem como potencial para reduzir os riscos de doenças cardíacas e diabetes *mellitus* tipo 2. E como aponta (WU; YEN, 2005), além de apresentarem potencial antioxidante, os flavonoides inibem a glicação e, conseqüentemente, a formação de AGEs. A presença de alguns desses compostos já reportados nas folhas de umbuzeiro por (GUEDES *et al.*, 2020), pode estar relacionada a atividade antiglicante apresentada pelas folhas de *S.*

*tuberosa*, ainda não relatada na literatura.

De acordo com (WU; YEN, 2005) os compostos fenólicos na seguinte ordem crescente kaempferol < quercetina < rutina < luteolina (Figura 16), uma elevada capacidade de inibição da formação de AGEs, onde a luteolina e o kaempferol ganharam destaque pela capacidade de quebra das ligações cruzadas entre AGEs e as proteínas.

**Figura 16** – Flavonoides que apresentam atividade antiglicante.

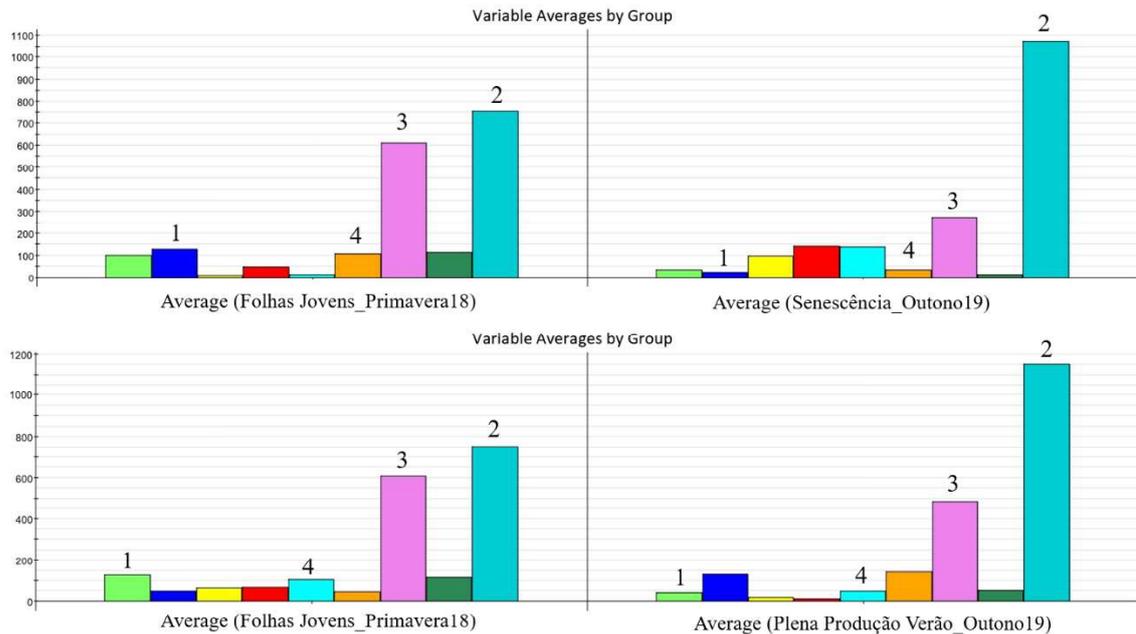


Fonte: Elaborada pelo autor, 2023.

Na Figura 15 é mostrada a variação da % de inibição de glicação, evidenciando os desafios que são encontrados em estudos metabômicos de plantas, como a dinâmica metabólica, diversidade química e os efeitos cíclicos, ambientais e ontogenéticos (PILON *et al.*, 2020). Os níveis de flavonoides são influenciados por fatores genéticos e condições ambientais, como radiação solar, raios UV, períodos de seca e chuva, nutrientes e estações do ano, além disso, fatores artificiais como a poluição podem interferir, levando a planta a produzir uma maior quantidade de metabólitos, dentre eles os flavonoides (LI *et al.*, 2020).

Como mencionado, a atividade antiglicante das folhas de umbuzeiro pode estar relacionada aos compostos fenólicos encontrados na planta. Dito isso, foi visto na seção anterior a variação média dos marcadores químicos distribuídos nas folhas de *Spondias tuberosa* nos diferentes estádios fenológicos, e dentre os marcadores químicos, nos deparamos com alguns flavonóides como a miricetina-*O*-ramnosilglicose, quercetina-3-*O*-rutinosideo (rutina), kaempferol 3-*O*-rutinosideo e quercetina (Figura 17).

**Figura 17** – Distribuição dos marcadores químicos das folhas de umbuzeiro onde (1) miricetina-*O*-ramnosilglicose; (2) quercetina-3-*O*-rutinosídeo (rutina); (3) kaempferol 3-*O*-rutinosídeo e (4) quercetina.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2023.

A variação encontrada da atividade antiglicante pode estar diretamente relacionada a variação da concentração desses flavonóides e suas diferentes formas de redução de formação de AGEs, que pode se dar por duas grandes vias: influenciando por meio de mecanismos antioxidante e/ou intervindo em uma ou mais etapas das vias bioquímicas envolvidas na reação de glicação nos estágios inicial, onde os produtos de Amadori são formados, intermediário, com a formação das espécies reativas de carbonilas e final com a formação de AGEs e estruturas *cross-linking* (WU; YEN, 2005).

Segundo (CHINCHANSURE *et al.*, 2015), no estágio inicial, a rutina é capaz de inibir a formação da base de Schiff, e em uma segunda etapa, a quercetina é capaz de inibir a formação dos produtos de Amadori, enquanto no estágio pós-Amadori, flavonóides como a luteolina e miricetina são capazes de capturar as espécies reativas de carbonilas que estão envolvidas no *cross-linking* das proteínas e na formação de AGE's.

Os extratos hidroetanólicos das folhas de *Spondias tuberosa* apresentaram atividade antiglicante, mostrando-se capazes de reduzir a interação do metilglioxal (MG) com a albumina sérica bovina (BSA), tornando-se promissores quanto ao seu uso como fontes naturais de componentes em formulações cosméticas ou farmacêuticas para tratamento de doenças degenerativas e no combate ao envelhecimento precoce, visto que há fortes evidências de que o processo de glicação das proteínas da pele, como por exemplo, o colágeno, está diretamente envolvido no processo de envelhecimento (KRUTMANN *et al.*, 2017).

#### 5.4 Atividade Antioxidante

Visto que os radicais livres, assim como outros oxidantes são responsáveis pelo envelhecimento e surgimento de diversas doenças degenerativas associadas ao envelhecimento (SOUSA *et al.*, 2007), ressalta-se a importância da avaliação de atividade antioxidante no estudo de plantas medicinais.

Para a determinação do potencial antioxidante das folhas de *Spondias tuberosa* mostrados na Tabela 8, as amostras foram selecionadas a partir dos resultados obtidos de atividade antiglicante e PCA. Observou-se a formação de três grupos de espécimes, onde no primeiro grupo, exibiu-se uma elevada atividade antiglicante, no segundo grupo obteve-se uma atividade antiglicante intermediária e no terceiro grupo, a atividade antiglicante exibida foi considerada baixa. Para realizar a correlação da atividade antiglicante com a atividade antioxidante, foram selecionados espécimes representativos de cada grupo, onde os espécimes A34 (primeiro grupo), A16 (segundo grupo) e A27 (terceiro grupo) foram escolhidos.

As amostras escolhidas por PCA tiveram o objetivo de medir a contribuição para a atividade antioxidante das substâncias que se apresentaram nas extremidades do gráfico de *loadings*. Algumas dessas substâncias foram anotadas como marcadores químicos como a miricetina-*O*-ramnosilglicose, a quercetina-3-*O*-rutinosídeo (rutina), o kaempferol 3-*O*-rutinosídeo e Não Identificada (11.66\_217.1233).

**Tabela 8** – Capacidade antioxidante sequestradora de radicais (DPPH) para os extratos das folhas de *S. tuberosa*.

\* folhas jovens; \*\* plena produção e \*\*\* senescência.

Amostra	IC <sub>50</sub>	Desvio padrão
<b>Ácido Ascórbico</b>	7.8024	0.0885
<b>A16 (20/11/18)*</b>	34.6800	1.1700
<b>A16 (19/03/19)**</b>	54.8413	2.4142
<b>A16 (06/06/19)***</b>	60.6534	1.4365
<b>A17 (06/06/19)***</b>	118.9237	0.8518
<b>A22 (20/11/18)*</b>	51.9838	0.8395
<b>A27 (20/11/18)*</b>	37.7482	2.1772
<b>A27 (19/03/19)**</b>	37.0000	1.1230
<b>A27 (06/06/19)***</b>	40.186	0.6067
<b>A33 (06/06/19)***</b>	61.7502	1.7162
<b>A34 (20/11/18)*</b>	34.5698	4.3669
<b>A34 (21/03/19)**</b>	47.5476	0.6677
<b>A34 (06/06/19)***</b>	63.1121	1.0152
<b>A55 (09/04/19)**</b>	49.2467	1.2001

Fonte: Elaborada pelo autor, 2023.

No ensaio de atividade antioxidante pelo método de DPPH, o DPPH é utilizado como radical livre para avaliar a capacidade antioxidante dos extratos, e o grau de descoloração é atribuída a capacidade de doação de átomos de hidrogênio das substâncias contidas nesses extratos (SILVA *et al.*, 2012).

O IC<sub>50</sub> foi utilizado para categorizar as atividades antioxidantes dos extratos e comparar com o padrão utilizado. Amostras com IC<sub>50</sub> < 50 µg mL<sup>-1</sup> são antioxidantes muito fortes, 50 µg mL<sup>-1</sup> - 100 µg mL<sup>-1</sup> são antioxidantes fortes, 101 µg mL<sup>-1</sup> - 150 µg mL<sup>-1</sup> são antioxidantes moderados e >150 µg mL<sup>-1</sup> são considerados antioxidantes fracos (FRIDIANNY *et al.*, 2014).

Conforme apresentado na Tabela 4, foi possível observar que extratos etanólicos de *Spondias tuberosa* (A16 – 20/11/2018; A22 – 20/11/18; A27 – 20/11/18; A27 – 19/13/19; A27 – 06/06/19; A34 – 20/11/18; A34 – 21/03/19 e A55 – 09/04/19) exibiram IC<sub>50</sub> < 50 µg mL<sup>-1</sup> foram anotadas pela classificação acima citada como antioxidantes muito fortes.

Os extratos (A16 – 19/03/19; A16 – 06/06/2019; A22 – 20/11/2018; A33 – 06/06/19 e A34 – 06/06/19) apresentaram IC<sub>50</sub> com valores de 50 µg mL<sup>-1</sup> - 100 µg mL<sup>-1</sup>, sendo classificados como antioxidantes fortes. O extrato (A17 – 06/06/19) foi o único que apresentou valores de IC<sub>50</sub> > 100 µg mL<sup>-1</sup>, sendo classificado como antioxidante moderado.

Para o método de DPPH (SILVA *et al.*, 2012) encontrou valores de IC<sub>50</sub> = 0,558 ± 0,008 mg mL<sup>-1</sup> para os extratos metanólicos das folhas de *Spondias tuberosa*. Foram obtidos valores de IC<sub>50</sub> = 234 µg mL<sup>-1</sup> para os extratos hexânicos de *Spondias tuberosa* (CORDEIRO *et al.*, 2018).

Ao comparar os resultados obtidos no ensaio de atividade antiglicante com os resultados de atividade antioxidante, foi possível observar que algumas amostras mostraram comportamentos totalmente diferentes frente as duas atividades testadas (Tabela 9).

O espécime A17 – (06/06/19) mostrou que não houve contribuição do constituinte **não identificado** (11.66\_217,1233) para a atividade antioxidante, apresentando o maior IC<sub>50</sub> dos espécimes analisados. O espécime A22 – (20/11/18) mostrou contribuição significativa do constituinte **miricetina-O-rutinosideo** para a atividade antioxidante. O espécime A33 – (06/06/19) mostrou uma boa contribuição do constituinte **quercetina-3-O-rutinosideo (rutina)** para a atividade antiglicante, classificando a amostra como antioxidante forte segundo a classificação de FRIDIANNY *et al.*, 2014. O espécime A55 – (09/04/19) mostrou forte contribuição do constituinte **kaempferol 3-O-rutinosideo** para a atividade antioxidante, apresentando IC<sub>50</sub> < 50 µg mL<sup>-1</sup>, classificando a amostra como antioxidante muito forte.

**Tabela 9** – Comparação de Atividade Antiglicante com Atividade Antioxidante.

<b>Amostra</b>	<b>IC<sub>50</sub></b>	<b>% Inibição de AGE's</b>
<b>A16 (20/11/18)</b>	34.6800 ± 1.1700	71 ± 1.67
<b>A16 (19/03/19)</b>	54.8413 ± 2.4142	74.8 ± 0.2
<b>A16 (06/06/19)</b>	60.6534 ± 1.4365	73.2 ± 0.32
<b>A17 (06/06/19)</b>	118.9237 ± 0.8518	38.2 ± 0
<b>A22 (20/11/18)</b>	51.9838 ± 0.8395	54.2 ± 11.17
<b>A27 (20/11/18)</b>	37.7482 ± 2.1772	7.8 ± 4.72
<b>A27 (19/03/19)</b>	37.0000 ± 1.1230	3.6 ± 1.8
<b>A27 (06/06/19)</b>	40.1860 ± 0.6067	19.8 ± 9.67
<b>A33 (06/06/19)</b>	61.7502 ± 1.7162	45.5 ± 9.29
<b>A34 (20/11/18)</b>	34.5698 ± 4.3669	92.9 ± 0
<b>A34 (21/03/19)</b>	47.5476 ± 0.6677	97.2 ± 0
<b>A34 (06/06/19)</b>	63.1121 ± 1.0152	86.9 ± 0.47
<b>A55 (09/04/19)</b>	49.2467 ± 1.2001	72.3 ± 0

Fonte: Elaborada pelo autor, 2023.

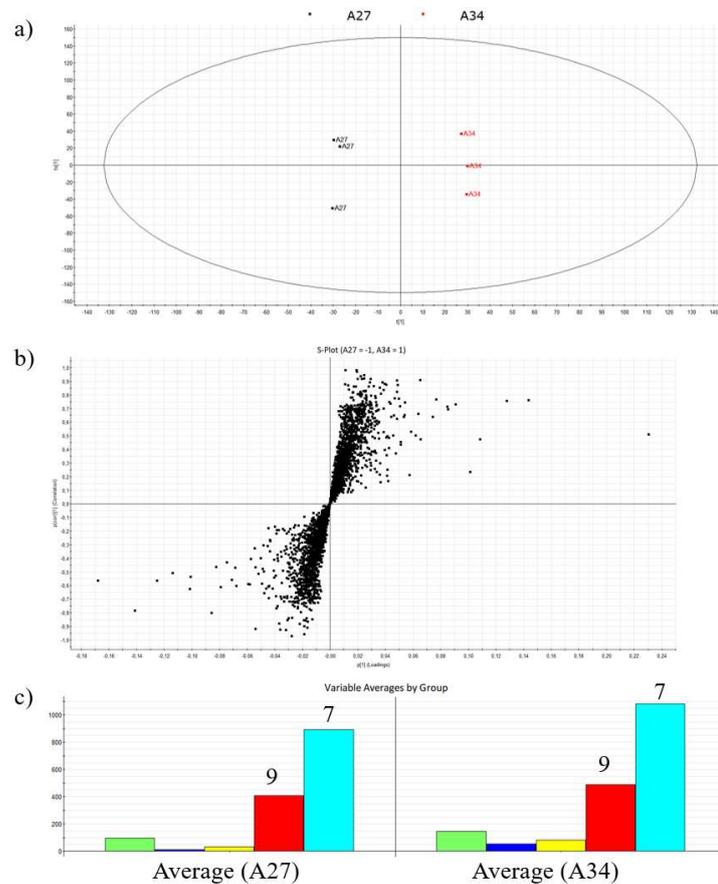
O espécime **A27** apresentou em todos os estádios fenológicos atividade antiglicante inferior a 50%, porcentagem inibitória mínima para ser considerada ativa. Em contrapartida, o mesmo espécime obteve elevada performance no ensaio de atividade antioxidante, fugindo do padrão observado para os outros espécimes. Por meio da variação média dos constituintes de cada espécime, a composição química do espécime **A27** foi comparada a composição química do espécime **A34**, que obteve elevada performance nas duas atividades estudadas nesse trabalho. (Figura 18).

Ao analisar a variação média dos constituintes dos espécimes **A27** e **A34**, obtida a partir de uma OPLS-DA, foi possível verificar que a composição apresentou semelhança, porém a concentração média dos componentes químicos mostrou-se diferentes, podendo essa variação estar relacionada a diferença de atividade observada.

A análise das atividades antioxidante (AO) e antiglicante (AG) apresentada na Tabela 5 revela um padrão notável: enquanto as amostras **A27** e **A34** exibem altos níveis de atividade AO, elas divergem significativamente em relação à atividade AG – a amostra **A27** mostra baixa atividade AG, ao contrário da amostra **A34**, que apresenta níveis elevados dessa atividade.

Para elucidar os compostos responsáveis por essa distinção na atividade AG, recorreu-se à técnica estatística avançada de análise discriminante de projeção ortogonal a mínimos quadrados (OPLS-DA) (Figura 16).

**Figura 18** – Gráficos das análises das folhas de *Spondias tuberosa*: (a) OPLS-DA A27 vs A34; (b) S-Plot A27 vs A34; (c) Variação média dos marcadores químicos do A34 em relação a A27; rutina (7) e kaempferol 3-*O*-rutinosídeo (9).



Fonte: Elaborada pelo autor, 2023.

A aplicação dessa ferramenta estatística multivariada permitiu detectar que a presença acentuada de flavonoides, especificamente **quercetina-3-*O*-rutinosídeo (rutina) (7)** e **kaempferol 3-*O*-rutinosídeo (9)**, na amostra **A34**, correlaciona-se com seu desempenho superior na AG. Este insight ressalta a contribuição potencial destes flavonoides para as propriedades bioativas da amostra estudada.

A capacidade de inibição da formação de AGE's de alguns flavonóides e a suas determinadas atividades antioxidantes estão diretamente relacionadas. Contudo, alguns conflitos já foram observados, como por exemplo, os flavonoides apigenina, wogonina e ramnetina, apresentaram atividade inibitória da formação de AGE's, mas exibiram baixa atividade antioxidante (MATSUDA *et al.*, 2003).

A ação antioxidante dos flavonoides pode ocorrer por diversos mecanismos, nos quais os flavonoides podem ter participação direta na varredura das ERO's ou desempenhar o papel de coadjuvante nos processos de controle oxidativo (SHEN *et al.*, 2022). Além dos

variados mecanismos, a atividade antioxidante *in vitro* dos flavonoides também pode variar de acordo com o arranjo dos grupos hidroxila (ZUO *et al.*, 2018). A existência de um grupo *orto-dihidroxi* no anel B de um flavonoide, permite a participação de radicais fenoxil na deslocalização de elétrons, levando a deslocalização de elétrons no anel B, exibindo assim, um caráter antioxidante (BIELA *et al.*, 2020).

A prevenção e atenuação do envelhecimento cutâneo é uma preocupação constante da Cosmetologia, exibida através da busca e do estudo de substâncias antioxidantes eficazes que são oferecidas em produtos cosméticos aos consumidores. A desorganização do mecanismo de defesa antioxidante é uma das maiores causas do envelhecimento cutâneo, sendo consequência de danos nas estruturas nela presentes como lipídios, proteínas e DNA (SCOTTI *et. al*, 2007).

A capacidade de sequestrar radicais livres exibida pelos extratos das folhas de *S. tuberosa* mostrou-se satisfatória, logo, o seu uso em formulações cosméticas para a prevenção de danos causados pelas espécies reativas de oxigênio (ERO) pode ser uma saída para contrabalançar o efeito deletério causado pelo estresse oxidativo (GUARATINI; MEDEIROS; COLEPICOLO, 2007).

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os métodos empregados para a obtenção de extratos para análises biológicas e em UPLC-ESI-QToF-MS<sup>E</sup> mostraram-se rápidos, fáceis de executar e eficientes. A análise dos extratos por meio do UPLC-ESI-QToF-MS<sup>E</sup> permitiu a identificação de 16 compostos nas folhas de umbu. Desse modo, foi possível estabelecer o perfil químico para a espécie de *Spondias tuberosa*.

A análise multivariada (PCA, OPLS-DA e *S-Plot*) mostrou-se imprescindível para a identificação das diferenças e semelhanças dos perfis metabólicos das folhas de *Spondias tuberosa* em diferentes estádios fenológicos, possibilitando a identificação dos marcadores químicos responsáveis por caracterizar e discriminar os estádios fenológicos das folhas de umbu.

O PCA proporcionou a separação das amostras e a visualização dos estados transitórios entre os estádios fenológicos. Por meio de OPLS-DA e *S-Plot*, foi possível identificar os compostos responsáveis pela distinção dos estádios fenológicos. Além disso, também foi possível determinar os marcadores químicos (Miricetina *O*-rutinosídeo, Galoil-bis-HHDP glicose, Rutina, Kaempferol 3-*O*-rutinosídeo, Quercetina, Não identificado ( $t_R$  11.66 e  $m/z$  217.1233) (**22**), Não identificado ( $t_R$  15.56 e  $m/z$  593.2737) (**26**), Não identificado ( $t_R$  16.41 e  $m/z$  277.2261) (**27**), Não identificado ( $t_R$  19.63 e  $m/z$  387.2526) (**30**), Não identificado ( $t_R$  19.96 e  $m/z$  385.2372) (**32**), Não identificado ( $t_R$  20.63 e  $m/z$  555,2850) (**34**) e Ácido Anacárdico (17:3) responsáveis por distinguir os estádios fenológicos das folhas de *Spondias tuberosa*.

As análises biológicas apresentaram resultados bastante satisfatórios. Os extratos das folhas de umbu mostraram-se como potenciais agentes antiglicante e antioxidantes, tornando-se candidatos a serem utilizados como princípio ativo para formulações cosméticas com ação Anti-Aging.

Portanto, estas observações são corroboradas pelo uso de técnicas avançadas de metabolômica, que permitem uma análise detalhada e quantitativa dos perfis metabólicos. A utilização de quimiometria nos estudos, incluindo análises de componentes principais e análises discriminantes, facilita a interpretação desses dados complexos, revelando não apenas variações bioquímicas significativas entre os diferentes estádios fenológicos, mas também fornecendo insights sobre as estratégias adaptativas da planta em resposta às mudanças sazonais no ambiente. Essa abordagem integrada é essencial para uma compreensão mais profunda das

relações causa-efeito no metabolismo vegetal, oferecendo perspectivas valiosas para a biologia de plantas e aplicações agronômicas.

## REFERÊNCIAS

- AGRA, M. DE F.; FREITAS, P. F. DE; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 114–140, mar. 2007
- AIDAR, S. T. *et al.* Fenologia, produção e características químicas dos frutos de acessos de umbuzeiro (*Spondias tuberosa* Arruda) em Petrolina, PE. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 145 / Embrapa Semiárido**, ISSN 1808-9968; 145, 2021.
- AHMED, N. Advanced glycation endproducts—role in pathology of diabetic complications. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 67, n. 1, p. 3–21, jan. 2005.
- ANTONGIOVANNI, M. *et al.* Chronic anthropogenic disturbance on Caatinga dry forest fragments. **Journal of Applied Ecology**, 2020.
- ARNOSO, B. J. DE M.; DA COSTA, G. F.; SCHMIDT, B. Biodisponibilidade e classificação de compostos fenólicos. **Nutrição Brasil**, v. 18, n. 1, p. 39, 4 ago. 2019.
- ARNOUS, A.H. *et al.* Plantas medicinais de uso caseiro – Conhecimento popular e interesse por cultivo comunitário. **Revista Espaço para a Saúde**, v. 6, n. 2, p. 1-6, 2005
- ARRUDA, J. *et al.* Comparative analyses of metabolic fingerprint integrated with cytotoxic activity and in silico approaches of the leaves extract of *Spondias mombin* L. and *Spondias tuberosa* Arr. Cam. from Northeast, Brazil. **Phytochemistry Letters**, v. 40, p. 26–36, 1 dez. 2020.
- BARBOSA, J. H. P.; OLIVEIRA, S. L. DE; SEARA, L. T. E. Produtos da glicação avançada dietéticos e as complicações crônicas do diabetes. **Revista de Nutrição**, v. 22, n. 1, p. 113–124, 1 fev. 2009.
- BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. DA S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 679–688, 2009.
- BAYNES, J. W.; THORPE, S. R. Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. **Diabetes**, v. 48, n. 1, p. 1–9, 1 jan. 1999.
- BELINATO, J. *et al.* METABOLÔMICA MICROBIANA: INOVAÇÕES E APLICAÇÕES. **Química Nova**, v. 42, n. 5, p. 546-559, 2019.
- BEZERRA, J. M. *et al.* Parâmetros biofísicos obtidos por sensoriamento remoto em região semiárida do estado do Rio Grande do Norte, Brasil. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 18, p. 73–84, 1 jan. 2014.
- BIELA, M. *et al.* Antioxidant action of deprotonated flavonoids: Thermodynamics of sequential proton-loss electron-transfer. **Phytochemistry**, v. 180, p. 112528, dez. 2020.
- BORGES, W. DE S. *et al.* A Química de Produtos Naturais do Brasil no Século XXI. **Química Nova**, 3 jul. 2017.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, jan. 1995.

BRAZ FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 229–239, 2010.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Dispõe sobre a definição, a classificação, os requisitos técnicos para rotulagem e embalagem, os parâmetros para controle microbiológico, bem como os requisitos técnicos e procedimentos para a regularização de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes. RDC n.752, 19 setembro 2019.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente (MMA). Cadastro Nacional de Unidades de Conservação (CNUC). Disponível em: <https://cnuc.mma.gov.br/powerbi>. Acesso em 19 set. 2023.

BRUDZYŃSKA, P. *et al.* Antioxidant Activity of Plant-Derived Colorants for Potential Cosmetic Application. **Cosmetics**, v. 9, n. 4, p. 81, 2 ago. 2022.

CALIXTO, J. B. BIODIVERSIDADE COMO FONTE DE MEDICAMENTOS. **Ciência e Cultura**, 2003.

CÂMARA NETO, J. F. *et al.* Gastroprotective effect of hydroalcoholic extract from *Agaricus blazei* Murill against ethanol-induced gastric ulcer in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 292, p. 115191, 28 jun. 2022.

CARDOSO, M. *et al.* **Caatinga : The Largest Tropical Dry Forest Region in South America**. Cham: Springer International Publishing, 2017.

CAVALCANTI, N. B; RESENDE, G. M; BRITO, L. T. L. PERÍODO DE OCORRÊNCIA DA FRUTIFICAÇÃO DO IMBUZEIRO NA REGIÃO SEMI-ÁRIDA DE PERNAMBUCO. **Revista Caatinga**, v. 18, n. 2, p. 129–135, 1 jan. 2005.

CAVALCANTE, A. G. DE M.; BRUIN, P. F. C. DE. O papel do estresse oxidativo na DPOC: conceitos atuais e perspectivas. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 35, n. 12, p. 1227–1237, dez. 2009.

CERAMI, C. *et al.* Tobacco smoke is a source of toxic reactive glycation products. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n. 25, p. 13915–13920, 9 dez. 1997.

COSTA JÚNIOR, V. G. *et al.* BOLETIM DO CLIMA: SÍNTESE CLIMÁTICA. **Agência Pernambucana de Águas e Clima (APAC)**, Recife, v. 6, n. 12, janeiro 2019.

DA COSTA CORDEIRO, B. M. P. *et al.* Hexane extract from *Spondias tuberosa* (Anacardiaceae) leaves has antioxidant activity and is an anti-*Candida* agent by causing mitochondrial and lysosomal damages. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 18, n. 1, 19 out. 2018.

DA SILVA, A. R. A. *et al.* Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of two Spondias species from Northeastern Brazil. **Pharmaceutical Biology**, v. 50, n. 6, p. 740–746, 10 abr. 2012.

DE BARROS SILVA, S. *et al.* Produtos naturais de *Momordica charantia* L. como moduladores da resistência de *Escherichia coli* a fármacos antimicrobianos. **AGROPECUÁRIA CIENTÍFICA NO SEMIÁRIDO**, v. 15, n. 3, p. 219, 15 out. 2019.

DEBORDE, C. *et al.* Plant metabolism as studied by NMR spectroscopy. **Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy**, v. 102–103, p. 61–97, 2017.

DOS SANTOS, Deborah Yara Alves Cursino. **Botânica aplicada: metabólicos secundários na interação planta-ambiente**. 2015. Tese (Livre Docência) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/livredocencia/41/tde-29092015-103721/>. Acesso em: 14 jul. 2024.

BARBOSA, H. M. *et al.* Spondias tuberosa inner bark extract exert antidiabetic effects in streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 227, p. 248–257, 5 dez. 2018.

CANUTO, G. A. B. *et al.* Metabolômica; Definições, Estado-da-arte e Aplicações Representativas. **Química Nova**, Vol. 41, No. 1, 75-91, 2018.

CHINCHANSURE, A. A. *et al.* Recent development of plant products with anti-glycation activity: a review. **RSC Advances**, v. 5, n. 39, p. 31113–31138, 2015.

COHEN, S. D.; KENNEDY, J. A. Plant metabolism and the environment: Implications for managing phenolics. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 50, n. 7, p. 620–643, 2010.

CORADIN, L.; CAMILLO, J.; PAREYN, F. G. C. **Espécies Nativas da Flora Brasileira de Valor Econômico Atual ou Potencial Planta para o Futuro: Região Nordeste**, 2018.

CORREIA, S. D. J.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M. Metabólitos secundários de espécies de Anacardiaceae. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1287–1300, 2006.

CUBERO-LEON, E.; PEÑALVER, R.; MAQUET, A. Review on metabolomics for food authentication. **FRIN**, v. 60, p. 95–107, 2014.

DRUMOND, M. A.; AIDAR, S. de T.; NASCIMENTO, C. E. de S.; OLIVEIRA, V. R. de. **Umbuzeiro: avanços e perspectivas**. 1ª Edição. Petrolina, PE: Embrapa Semiárido, 2016.

DUTRA, F. V. *et al.* Características físicas e químicas de acessos de umbuzeiros (*Spondias tuberosa* Arr. Cam). **Revista de Ciências Agrárias**, v. 40, n. 4, p. 814–822, dez. 2017.

ESKANDANI, M.; HAMISHEHKAR, H.; EZZATI NAZHAD DOLATABADI, J. Cytotoxicity and DNA damage properties of tert-butylhydroquinone (TBHQ) food additive. **Food Chemistry**, v. 153, p. 315–320, jun. 2014.

FABRE, N. *et al.* Determination of flavone, flavonol, and flavanone aglycones by negative ion liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 12, n. 6, p. 707–715, 1 jun. 2001.

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.

FERNANDES, M.F; QUEIROZ, L.P. Vegetação e flora da Caatinga. **Ciênc Cult**, v. 70, n. 4, p. 51-56, 2018.

FIDRIANNY, I.; RIZKIYA, A.; RUSLAN, K. Antioxidant activities of various fruit extracts from three solanum sp. using DPPH and ABTS method and correlation with phenolic, flavonoid and carotenoid content. Available online [www.jocpr.com](http://www.jocpr.com) **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 7, n. 5, p. 666–672, 2015.

FONSECA, C. R. *et al.* Oportunidades de conservação na Caatinga. **Ciência e Cultura**, 2018.

FONSECA, N. *et al.* Cajá e espécies afins. p. 29 p, 2018.

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, 1 mar. 2018.

FREITAS, K. H. G.; FATIBELLO-FILHO, O. Simultaneous determination of butylated hydroxyanisole (BHA) and butylated hydroxytoluene (BHT) in food samples using a carbon composite electrode modified with Cu<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> immobilized in polyester resin. **Talanta**, v. 81, n. 3, p. 1102–1108, 15 maio 2010.

FIDRIANNY I. ; RIZKI R K. ; INSANU M. IN VITRO ANTIOXIDANT ACTIVITIES FROM VARIOUS EXTRACTS OF BANANA PEELS USING ABTS, DPPH ASSAYS AND CORRELATION WITH PHENOLIC, FLAVONOID, CAROTENOID CONTENT. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 6, n. 8, p. 299–303, 1 set. 2014.

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.

GAENS, K. HJ.; STEHOUWER, C. DA.; SCHALKWIJK, C. G. Advanced glycation endproducts and its receptor for advanced glycation endproducts in obesity. **Current Opinion in Lipidology**, v. 24, n. 1, p. 4–11, fev. 2013.

GALENO, D. M. L. *et al.* Extract from *Eugenia punicifolia* is an Antioxidant and Inhibits Enzymes Related to Metabolic Syndrome. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, n. 1, p. 311–324, 28 set. 2013.

GALDEANO, D. M.; KLEINGESINDS, C. **Microrganismos x Planta: guerra ou parceria?** pp. 212, 2013.

GENG, C.-A. *et al.* Rapid characterization of chemical constituents in *Saniculiphyllum guangxiense* by ultra fast liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization tandem mass spectrometry. **International journal of mass spectrometry**, v. 361, p. 9–22, 1 mar. 2014.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374–381, abr. 2007.

GUARATINI, T.; MEDEIROS, M. H. G.; COLEPICOLO, P. Antioxidantes na manutenção do equilíbrio redox cutâneo: uso e avaliação de sua eficácia. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 206–213, fev. 2007.

GUEDES, J. A. C *et al.* Comparative analyses of metabolic fingerprint integrated with cytotoxic activity and in silico approaches of the leaves extract of *Spondias mombin* L. and *Spondias tuberosa* Arr. Cam. from Northeast, Brazil. **Phytochemistry Letters**, v. 40, p. 26–36, 1 dez. 2020.

GUEDES, J. A. C. **ESTUDO DO PERFIL METABOLÔMICO DE FOLHAS DE CAJAZEIRA, UMBUZEIRO E ABACAXIZEIRO E SUA CORRELAÇÃO COM POTENCIAL ATIVIDADE ANTICÂNCER POR MEIO DE ANÁLISE MULTIVARIADA.** Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, p. 34. 2018.

GUEDES, R. V. S. *et al.* BOLETIM DO CLIMA: SÍNTESE CLIMÁTICA. **Agência Pernambucana de Águas e Clima (APAC)**, Recife, v. 7, n. 4, abril de 2019.

HAUFF, S. N. Representatividade do Sistema Nacional de Unidades de Conservação na Caatinga. **Programa Das Nações Unidas Para O Desenvolvimento**, 2010.

HENLE, T.; MIYATA, T. Advanced glycation end products in uremia. **Advances in Renal Replacement Therapy**, v. 10, n. 4, p. 321–331, out. 2003.

HUEBSCHMANN, A. G. *et al.* Diabetes and Advanced Glycoxidation End Products. **Diabetes Care**, v. 29, n. 6, p. 1420–1432, 26 maio 2006.

HUSSEIN, R.A.; EL-ANSSARY, A. Plants Secondary Metabolites: The Key Drivers of the Pharmacological Actions of Medicinal Plants. **Herbal Medicine**, 2019.

- JAKUŠ, V.; RIETBROCK, N. Advanced glycation end-products and the progress of diabetic vascular complications. **Physiological Research**, p. 131–142, 2004.
- JEONG, S.-H. *et al.* Effects of butylated hydroxyanisole on the development and functions of reproductive system in rats. **Toxicology**, v. 208, n. 1, p. 49–62, mar. 2005.
- KABERA, J. Plant Secondary Metabolites: Biosynthesis, Classification, Function and Pharmacological Classification, Function and Pharmacological Properties Ethnobotanical survey of medicinal plants with pesticides properties and their potential use in Rwanda View pro. **Journal of Pharmacy and Pharmacology** 2, v. 2, p. 377–392, 2014.
- KRUTMANN, J. *et al.* The skin aging exposome. **Journal of Dermatological Science**, v. 85, n. 3, p. 152–161, 1 mar. 2017.
- LACCHIA, A. P. S. *et al.* Foliar colleters in Anacardiaceae: first report for the family. **Botany**, v. 94, n. 5, p. 337–346, maio 2016.
- LANGE, M. K.; HEBERLÉ, G.; MILÃO, D. Avaliação da estabilidade e atividade antioxidante de uma emulsão base não-iônica contendo resveratrol. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, p. 145–151, 1 mar. 2009.
- LANIGAN, R. S.; YAMARIK, T. A. Final report on the safety assessment of BHT(1). **International journal of toxicology**, v. 21 Suppl 2, p. 19–94, 2002.
- LEI, Z.; HUHMANN, D. V.; SUMNER, L. W. Mass Spectrometry Strategies in Metabolomics. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 29, p. 25435–25442, 1 jun. 2011.
- LI, Y. *et al.* The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 148, p. 80–89, mar. 2020.
- LIMA F. O.; BEZERRA A. S. Flavonoides e radicais livres. **Disciplinarum Scientia | Naturais e Tecnológicas**, v. 13, n. 1, p. 111–124, 1 jan. 2012.
- LIMA, S. S. *et al.* Caracterização geográfica e dinâmica de uso da terra da Ibiapaba e seu entorno, Domínio Fitogeográfico da Caatinga. **Revista Brasileira de Geografia Física**, v. 15, n. 5, p. 2500–2524, 29 ago. 2022.
- LIMA NETO, G. A. *et al.* Quantificação de metabólitos secundários e avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante de algumas plantas selecionadas do Cerrado de Mato Grosso. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 4 suppl 3, p. 1069–1077, 2015.
- LIU, H. *et al.* The dynamic variations of flavonoid metabolites in flower buds for *Zingiber mioga* at different developmental stages. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 123, p. 105537–105537, 1 out. 2023.
- MAIA, J. M. *et al.* Motivações socioeconômicas para a conservação e exploração sustentável do bioma Caatinga. **Desenvolvimento e Meio Ambiente**, v. 41, 30 ago. 2017.
- LUNCEFORD, N.; GUGLIUCCI, A. *Ilex paraguariensis* extracts inhibit AGE formation more efficiently than green tea. **Fitoterapia**, v. 76, n. 5, p. 419–427, jul. 2005.

MARCUCCI, M. C. *et al.* Accessible Methodologies for Quantification of Flavonoids and Total Phenols in Propolis. **Revista Virtual de Química**, v. 13, n. 1, p. 61–73, 2021.

MARIA *et al.* Biodiversidade, Uso Tradicional De Plantas Medicinais E Produção De Fitoterápicos Em Minas Gerais. 1 jan. 2010.

MACHADO, H. *et al.* Flavonóides e seu potencial terapêutico. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, Juiz de Fora, v. 27, n. 1/2, p. 33-39, 2008.

MATSUDA, H. *et al.* Structural requirements of flavonoids for inhibition of protein glycation and radical scavenging activities. v. 11, n. 24, p. 5317–5323, 1 dez. 2003.

MING, L. C. *et al.* Phytomass and flavonoid production in different organs and phenological stages of *Passiflora alata* Dryander. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 6, n. 45, p. 5695–5700, 2012.

MOREIRA, M. N. *et al.* Perfil fitoquímico e propriedade antioxidante de diferentes genótipos de frutos do umbuzeiro (*Spondias tuberosa* Arruda Câmara): uma revisão. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 16, p. e58101623116, 6 dez. 2021.

NARAIN, N. *et al.* Variation in physical and chemical composition during maturation of umbu (*Spondias tuberosa*) fruits. **Food Chemistry**, v. 44, n. 4, p. 255–259, 1992.

NASCIMENTO, D. C. A. DO *et al.* Atividades farmacológicas comprovadas para o gênero spondias: uma revisão de literatura. **E-Acadêmica**, v. 3, n. 2, p. e3832192, 12 jun. 2022.

NEDIĆ, O. *et al.* Molecular effects of advanced glycation end products on cell signalling pathways, ageing and pathophysiology. **Free Radical Research**, v. 47, n. sup1, p. 28–38, 21 maio 2013.

NI, Y. *et al.* Metabolic profiling reveals disorder of amino acid metabolism in four brain regions from a rat model of chronic unpredictable mild stress. **FEBS Letters**, v. 582, n. 17, p. 2627–2636, 27 jun. 2008.

OLIVEIRA, A. C. DE *et al.* Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 689–702, 2009.

OLIVEIRA, F. Q. *et al.* New evidences of antimalarial activity of *Bidens pilosa* roots extract correlated with polyacetylene and flavonoids. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 93, n. 1, p. 39–42, 1 jul. 2004.

OLIVEIRA e SILVA, E. B. *et al.* REVISÃO Produtos de glicação avançada e desenvolvimento da aterosclerose Advanced glycation end products and development of atherosclerosis **Nutrição Brasil**. v. 15, n. 4, p. 219-228, 2016.

OLIVEIRA, C. D. L.; SILVA, A. P. A.; MOURA, P. A. G. Distribution and Importance of Conservation Units in the Caatinga Domain. **Anuário do Instituto de Geociências - UFRJ**, v. 42, n. 1, p. 425–429, 13 maio 2019.

OLIVEIRA, F.C.S.; BARROS, R.F.M.; MOITA NETO, J.M. Plantas medicinais utilizadas em comunidades rurais de Oeiras, semiárido piauiense. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, Botucatu**, v.12, n.3, p.282-301, 2010b.

OLIVOTO, T. *et al.* Plant secondary metabolites and its dynamical systems of induction in response to environmental factors : A review. v. 12, n. 2, p. 71–84, 2017.

PELL, S. K. *et al.* Anacardiaceae. In: **Flowering Plants. Eudicots**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2010. p. 7–50.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes **J. Biotec. Biodivers.** v. 3, N.4: pp. 146-152, Nov. 2012.

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

PIMENTEL, V. *et al.* Biodiversidade brasileira como fonte da inovação farmacêutica: uma nova esperança? **Revista do BNDES 43**, p. 41–89, 2015.

QUEIROZ, M. A. DE. Recursos Genéticos Vegetais da Caatinga para o Desenvolvimento do Semiárido Brasileiro (Caatinga Plant Genetic Resources for the Development of the Brazilian Semiarid). **Revista Brasileira de Geografia Física**, v. 4, n. 6, p. 1135, 21 mar. 2012.

RAHBAR, S. *et al.* Evidence that pioglitazone, metformin and pentoxifylline are inhibitors of glycation. **Clinica Chimica Acta**, v. 301, n. 1-2, p. 65–77, 1 nov. 2000.

RANZATO FILARDI, F. L. *et al.* **Brazilian flora 2020: Innovation and collaboration to meet target 1 of the global strategy for plant conservation (GSPC)**. **Rodriguesia** Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, , 1 out. 2018.

RIBEIRO, E. M. S. *et al.* Chronic anthropogenic disturbance drives the biological impoverishment of the Brazilian Caatinga vegetation. **Journal of Applied Ecology**, 2015.

ROCHA, A. L. S. S. *et al.* Potencial antimicrobiano de seis plantas do semiárido paraibano contra bactérias relacionadas à infecção endodôntica. **Rev Ciênc Farm Básica Apl.**, v. 34, n. 3, p. 351-355, 1 jul. 2013.

ROESLER, R. *et al.* Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Food Science and Technology**, v. 27, p. 53–60, 1 mar. 2007.

SALVEMINI, D.; CUZZOCREA, S. Oxidative stress in septic shock and disseminated intravascular coagulation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 33, n. 9, p. 1173–1185, nov. 2002.

SAMEH, S. *et al.* Genus *Spondias*: A Phytochemical and Pharmacological Review. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2018, p. 1–13, 2018.

SANTOS, E. P. *et al.* BOLETIM DO CLIMA: SÍNTESE CLIMÁTICA. **Agência Pernambucana de Águas e Clima (APAC), a (APAC)**, Recife, v. 7, n. 6, junho de 2019.

SANTOS, D. S.; RODRIGUES, M. M. F. Atividades farmacológicas dos flavonoides: um estudo de revisão. **Estação Científica (UNIFAP)**, v. 7, n. 3, p. 29, 6 nov. 2017.

SANTOS, C. A. F. *et al.* Preservação da variabilidade genética e melhoramento do umbuzeiro. **Rev. Bras. Frutic ., Jaboticabal - SP**, v. 21, n. 2, p. 104-109, agosto 1999.

SÁ- FILHO, G. F. DE *et al.* Plantas medicinais utilizadas na caatinga brasileira e o potencial terapêutico dos metabólitos secundários: uma revisão. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 13, p. e140101321096, 9 out. 2021.

SCOTTI, L. *et al.* Modelagem molecular aplicada ao desenvolvimento de moléculas com atividade antioxidante visando ao uso cosmético. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 2, jun. 2007.

SEKANDI, P. *et al.* Antimicrobial, antioxidant, and sun protection potential of the isolated compounds from *Spermacoce princeae* (K. Schum). **BMC Complementary Medicine and Therapies**, v. 23, n. 1, 19 jun. 2023.

SELIM, K. *et al.* The Role of the MAPK Signaling, Topoisomerase and Dietary Bioactives in Controlling Cancer Incidence. **Diseases**, v. 5, n. 2, p. 13, 26 abr. 2017.

SILVA JUNIOR, J. F. da; SOUZA, F. V. D.; PADUA, J. G. (Ed.). A arca de Noé das frutas nativas brasileiras. Brasília, DF: Embrapa, 2021.

SHAHIDI, F.; JANITHA, P. K.; WANASUNDARA, P. D. Phenolic antioxidants. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 32, n. 1, p. 67–103, jan. 1992.

SCHRIMPE-RUTLEDGE, A. C. *et al.* Untargeted metabolomics strategies – Challenges and Emerging Directions. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 27, n. 12, p. 1897–1905, 1 dez. 2016.

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.

SILVA, F. A. M.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, v. 22, n. 1, p. 94–103, fev. 1999.

SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre: Artmed, 2017.

SINGH, S. *et al.* Formulation and evaluation of carrot seed oil-based cosmetic emulsions. **Journal of Cosmetic and Laser Therapy: Official Publication of the European Society for Laser Dermatology**, v. 21, n. 2, p. 99–107, 2019.

SOUSA, C. M. DE M. *et al.* Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, p. 351–355, 1 abr. 2007.

SOUSA, A. D. *et al.* UPLC-QTOF-MSE-based chemometric approach driving the choice of the best extraction process for *Phyllanthus niruri*. **Separation Science and Technology**, v. 52, n. 10, p. 1696–1706, 3 jul. 2017.

STAHLE, L.; WOLD, S. Analysis of variance (ANOVA). **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 6, n. 4, p. 259–272, nov. 1989.

SCOTTI, L. *et al.* Modelagem molecular aplicada ao desenvolvimento de moléculas com atividade antioxidante visando ao uso cosmético. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 2, jun. 2007.

SHEN, N. *et al.* Plant flavonoids: Classification, distribution, biosynthesis, and antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 383, p. 132531, jul. 2022.

SUMNER, L. W. *et al.* Proposed minimum reporting standards for chemical analysis. **Metabolomics**, v. 3, n. 3, p. 211–221, set. 2007.

TABARELLI, M. *et al.* Caatinga: legado, trajetória e desafios rumo à sustentabilidade. **Ciência e Cultura**, v. 70, n. 4, p. 25–29, 1 out. 2018.

TAN, K. C. B. *et al.* Association Between Acute-Phase Reactants and Advanced Glycation End Products in Type 2 Diabetes. **Diabetes Care**, v. 27, n. 1, p. 223–228, 23 dez. 2003.

THEODORIDIS, G. A. *et al.* Liquid chromatography–mass spectrometry based global metabolite profiling: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 711, p. 7–16, jan. 2012.

THORNALLEY, P. J.; LANGBORG, A.; MINHAS, H. S. Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose. **Biochemical Journal**, v. 344, n. 1, p. 109–116, 8 nov. 1999.

TORRES, M. P. DE O. N. *et al.* The Chemistry of Advanced Glycation End-products. **Revista Virtual de Química**, v. 10, n. 2, p. 375–392, 2018.

TSUGAWA, H. *et al.* MS-DIAL: data-independent MS/MS deconvolution for comprehensive metabolome analysis. **Nature Methods**, v. 12, n. 6, p. 523–526, jun. 2015.

TSUGAWA, H. *et al.* A cheminformatics approach to characterize metabolomes in stable-isotope-labeled organisms. **Nature Methods**, v. 16, n. 4, p. 295–298, abr. 2019.

ULRICH, P.; CERAMI, A. Protein Glycation, Diabetes, and Aging. **Recent Progress in Hormone Research**, v. 56, n. 1, p. 1–22, 1 jan. 2001.

VAN DEN BERG, R. A. *et al.* Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data. **BMC Genomics**, v. 7, p. 142, 8 jun. 2006.

- VIJAYKRISHNARAJ, M.; WANG, K. Dietary natural products as a potential inhibitor towards advanced glycation end products and hyperglycemic complications: A phytotherapy approaches. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 144, p. 112336, dez. 2021.
- VIZZOTTO M.; A. C. R. KROLOW; WEBER, B. Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância. 1 jan. 2010.
- VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. DA S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326–337, abr. 2006.
- VLISSARA, H.; BROWNLEE, M.; CERAMI, A. Specific Macrophage Receptor Activity for Advanced Glycosylation End Products Inversely Correlates With Insulin Levels In Vivo. **Diabetes**, v. 37, n. 4, p. 456–461, 1 abr. 1988.
- VLISSARA, H.; BROWNLEE, M.; CERAMI, A. High-affinity-receptor-mediated uptake and degradation of glucose-modified proteins: a potential mechanism for the removal of senescent macromolecules. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 82, n. 17, p. 5588–5592, 1 set. 1985.
- WANNAN, B. S. Analysis of Generic Relationships in Anacardiaceae. **Blumea - Biodiversity, Evolution and Biogeography of Plants**, v. 51, n. 1, p. 165–195, 10 maio 2006.
- WASSERSTEIN, R. L.; LAZAR, N. A. The ASA Statement on p-Values: Context, Process, and Purpose. **The American Statistician**, v. 70, n. 2, p. 129–133, 2 abr. 2016.
- WENG, J.-K. The evolutionary paths towards complexity: a metabolic perspective. **New Phytologist**, v. 201, n. 4, p. 1141–1149, 1 mar. 2014.
- WINK, M. Modes of Action of Herbal Medicines and Plant Secondary Metabolites. **Medicines**, v. 2, n. 3, p. 251–286, 8 set. 2015.
- WOLD, S.; SJÖSTRÖM, M.; ERIKSSON, L. PLS-regression: a basic tool of chemometrics. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 58, n. 2, p. 109–130, out. 2001.
- WU, C.-H.; YEN, G.-C. Inhibitory Effect of Naturally Occurring Flavonoids on the Formation of Advanced Glycation Endproducts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 8, p. 3167–3173, abr. 2005.
- XAVIER, V. L. *et al.* Nutritional and technological potential of Umbu (*Spondias tuberosa* Arr. Cam.) processing by-product flour. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 94, n. 1, 2022.
- YANG, X. *et al.* Developmental toxicity of synthetic phenolic antioxidants to the early life stage of zebrafish. **Science of The Total Environment**, v. 643, p. 559–568, dez. 2018.
- YUAN, H. *et al.* The Traditional Medicine and Modern Medicine from Natural Products. **Molecules**, v. 21, n. 5, p. 559, 29 abr. 2016.

ZANATTA, A. C.; VILEGAS W.; EDRADA-EBEL R. A. UHPLC-(ESI)-HRMS and NMR-Based Metabolomics Approach to Access the Seasonality of *Byrsonima intermedia* and *Serjania marginata* From Brazilian Cerrado Flora Diversity. **Frontiers in Chemistry**, v. 9, 6 jul. 2021.

ZUO, A.-R. *et al.* The antityrosinase and antioxidant activities of flavonoids dominated by the number and location of phenolic hydroxyl groups. **Chinese Medicine**, v. 13, p. 51, 2018.