



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA
CURSO DE LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Victória Ellen de Oliveira

**PERFIS DE METABÓLITOS DE EXTRATOS DE FOLHAS, PERICARPOS,
SEMENTES E CULTURAS *IN VITRO* DE CALOS DE COTILÉDONES DE
PASSIFLORA SETACEA CV. BRS PÉROLA DO CERRADO (PASSIFLORACEAE)**

Florianópolis

2024

Victória Ellen de Oliveira

**PERFIS DE METABÓLITOS DE EXTRATOS DE FOLHAS, PERICARPOS,
SEMENTES E CULTURAS *IN VITRO* DE CALOS DE COTILÉDONES DE
PASSIFLORA SETACEA CV. BRS PÉROLA DO CERRADO (PASSIFLORACEAE)**

Trabalho Conclusão do Curso de
Graduação em Ciências Biológicas do
Centro de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Santa Catarina
como requisito para a obtenção do título de
Licenciada em Ciências Biológicas

Orientador(a): Prof^a Dra. Ana Maria Viana
Coorientadora: Me. Ana Caroline da Silva

Florianópolis

2024

de Oliveira, Victória Ellen
PERFIS DE METABÓLITOS DE EXTRATOS DE FOLHAS,
PERICARPOS, SEMENTES E CULTURAS IN VITRO DE CALOS DE
COTILÉDONES DE PASSIFLORA SETACEA CV. BRS PÉROLA DO
CERRADO (PASSIFLORACEAE) / Victória Ellen de Oliveira ;
orientadora, Ana Maria Viana, coorientador, Ana Caroline
da Silva, 2024.
89 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências
Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas,
Florianópolis, 2024.

Inclui referências.

1. Ciências Biológicas. 2. Biotecnologia vegetal. 3.
Calos de cotilédones. 4. Cultivo in vitro. 5. CLUE-ESI-EM.
I. Viana, Ana Maria. II. da Silva, Ana Caroline. III.
Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em
Ciências Biológicas. IV. Título.

Victória Ellen de Oliveira

**PERFIS DE METABÓLITOS DE EXTRATOS DE FOLHAS, PERICARPOS,
SEMENTES E CULTURAS *IN VITRO* DE CALOS DE COTILÉDONES DE
PASSIFLORA SETACEA CV. BRS PÉROLA DO CERRADO (PASSIFLORACEAE)**

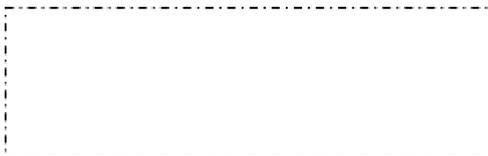
Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do título de
Licenciado e aprovado em sua forma final pelo Curso de Ciências Biológicas.

Florianópolis, 08 de agosto de 2024



Prof.ª Dra. Daniela Cristina de Toni
Coordenação do Curso

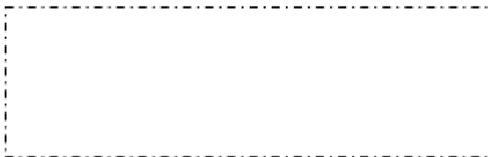
Banca examinadora



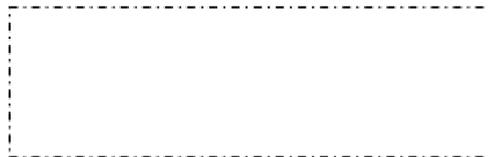
Prof.ª Dra. Ana Maria Viana
Orientadora



Ma. Ana Caroline da Silva
Co-orientadora



Prof.ª Dra. Daiane Martins Ramos
Universidade Federal de Santa Catarina



Prof. Dr. Ângelo Paggi Matos
Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 2024

Dedico este trabalho aos meus pais, Marloy e Fábio,
pela dedicação, princípios e amor que sempre me
deram. E aos meus irmãos, pelo apoio e inspiração.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal de Santa Catarina por proporcionar um ambiente que fomenta a difusão e o avanço do conhecimento, além de me oportunizar uma experiência repleta de encontros e aprendizados, os quais moldaram o que sou hoje.

Direciono um especial agradecimento à minha orientadora, professora Dra. Ana Maria Viana, por se dispor a me guiar no processo mais importante da graduação, compartilhando seus saberes e depositando sua confiança em mim para executar este trabalho.

Agradeço à Embrapa Cerrados por ceder o material vegetal necessário, além de todo o incentivo às pesquisas que exploram o potencial das espécies nativas do Cerrado, tendo em vista a valorização dessas plantas.

Faço meus agradecimentos à coorientadora Me. Ana Caroline da Silva, pelo suporte ao longo dessa trajetória, ao professor Dr. Louis P. Sandjo, do Departamento de Química, por disponibilizar o laboratório LQPN para a realização de etapas cruciais para o desenvolvimento da pesquisa, além da Dra. Geovanna de Oliveira Costa, que se dispôs a nos orientar diante dos desafios que a química apresentou.

Expresso minha gratidão ao meu colega de TCC, Nadal, com quem pude compartilhar dúvidas, respostas, sentimentos e a ansiedade de quem está passando por essa fase. Nos fortalecemos nas dificuldades e na alegria das conquistas.

Minha mais eterna gratidão é dedicada aos meus pais, que me ensinaram princípios valiosos que definem minha pessoa, por ensinarem o valor dos estudos e serem exemplos de responsabilidade, dedicação e perseverança. Minha mãe, Marloy, que me deu suporte, orientou e me encorajou a superar todos os obstáculos para estar aqui hoje. Ao meu pai, Fábio, que me inspirou a estudar na mesma universidade de sua formação, me apoiou nas minhas decisões e me deu o suporte necessário por todo esse percurso universitário.

Com muito carinho, dedico um agradecimento ao meu companheiro Gabriel, com quem escrevo minha história há mais de 10 anos. Quando me conheceu, virou disciplinado só pra fazer minhas tarefas, no final do ensino médio me acompanhava em todos os cursinhos extras, quando passei no vestibular da UFSC não hesitou em se mudar comigo para Florianópolis. Durante essa trajetória, foi meu aluno cobaia, ombro amigo, admirador, meu cozinheiro particular e, mais que tudo, meu grande amor.

Meu agradecimento também é destinado às minhas irmãs e meus irmãos, pessoas mais que especiais pra mim. Vinícius, Yasmin e Mariê, pelo exemplo e inspiração; Marina e Joana,

por me motivarem a buscar sempre minha melhor versão; e ao João, por todo o apoio e carinho.

Não poderia deixar de citar em meus agradecimentos os meus tantos amigos que conheci ao longo dessa jornada universitária, pessoas que chegam, marcam nossa história e, em algum momento, precisamos nos despedir. Compartilhamos uns com os outros as nossas experiências pessoais, compartilhamos conhecimentos, momentos de alegria e também de ansiedade que essa fase da vida provoca. Um agradecimento especial também vai para minhas irmãs de alma, Aryadnes, Cecília, Juliana e Kamila, que acompanharam todas as minhas dificuldades e conquistas, desde quando éramos ainda crianças, sempre me acolhendo e me reconectando com a minha essência.

Agradeço também aos meus gatinhos, Linda Rosa e Joca, que estão ao meu lado desde 2016, o ano em que comecei a graduação na UFSC. Os dois fazem parte de toda a história que vivi em Florianópolis, sempre me transmitindo paz, risadas e aconchego. São inúmeras as fotos em que estou estudando e eles me fazendo companhia.

Também dedico meu agradecimento ao professor Dr. Ângelo, que me apresentou à professora orientadora. Ele me apoiou e me ajudou significativamente durante o processo de desenvolvimento do TCC. Bem como agradeço às professoras e professores do curso de Licenciatura em Ciências Biológicas, responsáveis por todo o conhecimento que adquiri na área e que também participaram ativamente da elaboração do meu pensamento crítico.

Por fim e primordialmente, agradeço a Deus, essência de tudo e todos que citei anteriormente, e que me ilumina quando tudo parece impossível.

RESUMO

A *Passiflora setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado é um cultivar da espécie nativa, *Passiflora setacea*, desenvolvida pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA, Cerrado) através de melhoramento genético. É popularmente conhecida como “maracujá do sono”, devido às suas propriedades sedativas, e é a primeira passiflora silvestre registrada e protegida pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Este estudo teve por objetivo avaliar o efeito do tempo de cultivo no crescimento e nos perfis fitoquímicos dos calos de cotilédones cultivados *in vitro* por diferentes períodos de tempo. Os perfis fitoquímicos dos calos também foram comparados com os perfis fitoquímicos de extratos de folhas, cascas e sementes para avaliar o potencial dos calos na produção *in vitro* de compostos de interesse. Os calos de cotilédones foram mantidos em meio de cultura Murashige & Skoog (MS) suplementado com 88,5 mM de sacarose, 2,5 µM de 2,4-D e 0,2% Phytigel. Ao final de 30, 60 e 90 dias de cultivo os calos foram coletados para as avaliações do crescimento e para as análises fitoquímicas, todos os materiais vegetais foram secos ao ar livre sob temperatura média de $23 \pm 2^\circ\text{C}$ e 70% de umidade relativa, até a estabilização da massa seca. As análises fitoquímicas foram realizadas através de cromatografia líquida de ultra eficiência com ionização por eletrospray acoplada à espectrometria de massas (CLUE-ESI-EM). Os dados técnicos gerados foram avaliados por meio de métodos estatísticos, tais como análise de componentes principais (PCA), *k-means* e importância variável na projeção (VIP), com base na análise discriminante de mínimos quadrados parciais (PLS-DA). Os resultados da pesquisa indicaram que o tempo de cultivo influenciou significativamente o crescimento dos calos, bem como a produção de metabólitos. Ácidos orgânicos de interesse e com atividade biológica foram produzidos pelos calos como os ácidos cítrico, glucurônico, treônico e ribônico, sendo esses últimos envolvidos, respectivamente, no mecanismo antioxidante das plantas e indicado como potencial inibidor da acetilcolinesterase, para possível tratamento da Alzheimer. Ácidos orgânicos, flavonoides bioativos, como o isoschaftosídeo, O-metil-epicatequina, sabian, terpenos bioativos, como o astragalosídeo II e cicloartano glicosídeos, lipídios, em especial o sulfoquinovosil monoacilglicerol (SQMG), com várias atividades biológicas foram também detectados em extratos de folhas e sementes. Análises dos metabólitos via Importância das Variáveis na Projeção (*Variables of Importance in the Projection* -VIP) revelou o alto potencial das culturas *in vitro* de cotilédones como fontes de metabólitos relevantes, com atividade biológica como ácido cítrico (VIP score 1,4) e o flavonoide sabian (VIP > 1,8), além do N-frutosil piroglutamato (VIP > 1,4), ácido azelaico (VIP > 1,2) e ácido treônico (VIP > 1,0). A similaridade observada entre os perfis fitoquímicos das folhas e cascas com os calos sugere a viabilidade de otimização do cultivo *in vitro* para a produção de metabólitos. Este estudo contribuiu para o aperfeiçoamento de protocolos de cultivo *in vitro* de culturas de calos de cotilédone de *P. setacea* BRS-PC, demonstrando que o tempo de cultivo de 30 dias foi o mais efetivo em incrementar o crescimento e produção de uma maior diversidade de metabólitos em um tempo de cultivo mais curto.

Palavras-chave: Cultivo *in vitro*, ácido azelaico, sabian, CLUE-ESI-EM, Importância das Variáveis na Projeção (VIP).

ABSTRACT

Passiflora setacea cv. BRS Pérola do Cerrado is a cultivar of the native species *Passiflora setacea*, developed by the Brazilian Agricultural Research Corporation (Embrapa Cerrados) through genetic improvement. It is popularly known as "sleep passion fruit", due to its sedative properties, it is the first cultivar of a wild passion fruit registered and protected by the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply (MAPA). This study aimed to evaluate the effect of cultivation time on the growth and phytochemical profiles of cotyledon calluses grown *in vitro* for different periods of time. The phytochemical profiles of the calluses were also compared with the phytochemical profiles of leaf, peels and seed extracts to evaluate the potential of calluses in the *in vitro* production of compounds of interest. Cotyledon calluses were maintained on Murashige & Skoog (MS) culture medium supplemented with 88.5 mM sucrose, 2.5 μ M 2,4-D and 0.2% Phytigel. At the end of 30, 60 and 90 days of cultivation, calluses were collected for growth evaluations and phytochemical analyses. All plant materials were dried in the open air under an average temperature of $23 \pm 2^\circ\text{C}$ and 70% relative humidity, until the dry mass stabilized. Phytochemical analyses were performed using ultra-high performance liquid chromatography with electrospray ionization coupled to mass spectrometry (UPLC-ESI-EM). The technical data generated were evaluated through statistical methods, such as principal component analysis (PCA), K-means and Variable Importance in the Projection (VIP), based on partial least squares discriminant analysis (PLS-DA). The results indicated that the cultivation time significantly influenced callus growth, as well as the production of metabolites. Organic acids of interest and with biological activity were produced by calluses, such as citric, glucuronic, threonic and ribonic acids, the latter involved, respectively, in the antioxidant mechanism of plants and indicated as a potential inhibitor of acetylcholinesterase, for a possible treatment of Alzheimer's disease. Organic acids, bioactive flavonoids, such as isoschaftoside, O-methyl-epicatechin, sabian, bioactive terpenes, such as astragaloside II and cycloartane glycosides, lipids, especially the sulphoglycerolipid SQMG, with various biological activities were also detected in leaf and seed extracts. Analyses of the metabolites via Variables of Importance in the Projection (VIP) revealed the high potential of *in vitro* callus cultures of cotyledons as sources of relevant metabolites, with biological activity such as citric acid (VIP score 1.4) and the sabian flavonoid (VIP score 1.8), in addition to N-fructosyl pyroglutamate (VIP >1.4), azelaic acid (VIP >1.2), threonic acid (VIP > 1.0). The similarity observed between the phytochemical profiles of leaves, peels and with calluses suggests the feasibility of optimizing *in vitro* cultivation and production of metabolites. This study contributed to the improvement of *in vitro* protocols of cotyledon callus cultures of *P. setacea* BRS-PC, demonstrating that the cultivation time of 30 days was the most effective in increasing growth and generating the best phytochemical profile, with the production of a greater number of compounds.

Keywords: *Passiflora setacea*, cotyledon callus, *in vitro* culture, leaves, peels, seeds, secondary metabolites, metabolites, CLUE-ESI-EM.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Folhas (A), cascas (B), sementes (C) e calos de cotilédone (D) de *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado secas ao ar livre à $23 \pm 2^\circ\text{C}$ e 70% de umidade relativa.....**28**
- Figura 2. Calos de cotilédone de *Passiflora setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado cultivados em meio de cultura Murashige & Skoog suplementado com 88,5 mM de sacarose, 2,5 μM de 2,4-D e 0,2% de Phytigel por 30, 60 e 90 dias de cultivo, frescos e secos ao ar livre. Barra = 1 cm.....**30**
- Figura 3. Extração com solução aquosa de etanol 70% de folhas, cascas, sementes e calos de 30, 60 e 90 dias de cultivo de *P. setacea* cv. Pérola do Cerrado.....**32**
- Figura 4. A) Filtragem dos extratos e B) Solvente removido sob pressão reduzida em um evaporador rotatório, resultando em extratos brutos hidroalcoólicos (70% etanol) de calos de cotilédone de *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado.....**33**
- Figura 5. Aspectos morfológicos de calos derivados de cotilédones de *P. setacea* BRS Pérola do Cerrado cultivados em meio de cultura Murashige & Skoog suplementado com 88,5 mM de sacarose, 2,5 μM de 2,4-D e 0,2% de Phytigel aos 30, 60 e 90 dias de cultivo.....**39**
- Figura 6. Variações na massa fresca (A), massa seca (B), razão massa seca/massa fresca (C) e teor de água (D) dos calos derivados de segmentos de cotilédones da *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado aos 30, 60 e 90 dias de cultivo em meio de cultura Murashige & Skoog suplementado com 88,5 mM de sacarose, 2,5 μM de 2,4-D e 0,2% de Phytigel.....**42**
- Figura 7. Análise de regressão linear entre massa fresca e massa seca de calos de cotilédones de *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado cultivados por 30, 60 e 90 dias em meio de cultura Murashige & Skoog suplementado com 88,5 mM de sacarose, 2,5 μM de 2,4-D e 0,2% de Phytigel.....**43**
- Figura 8. Cromatogramas obtidos em modo de ionização negativa de extratos brutos de cascas dos frutos (A), folhas (B) e sementes (C) de *P. setacea* cv. Pérola do Cerrado mostrando a distribuição dos metabólitos majoritários.....**45**

Figura 9. Cromatogramas obtidos em modo de ionização negativa de extratos brutos de calos cultivados por 30 (A), 60 (B) e 90 (C) dias de *P. setacea* cv. Pérola do Cerrado mostrando a distribuição dos metabólitos majoritários.....**56**

Figura 10. Gráficos de *scores* (variância) (A) e *loadings* (resíduos de variância) (B) obtidos a partir da Análise de Componentes Principais (PCA) para o conjunto de dados de folhas (Fo), cascas (Ca), sementes (Se) e calos de cotilédones de *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado cultivados *in vitro* por 30 (C30), 60 (C60) e 90 (C90) dias em meio de cultura Murashige & Skoog suplementado com 88,5 mM de sacarose, 2,5 mM de 2,4-D e 0,2% de Phytigel.....**67**

Figura 11. Agrupamento de dados normalizados em Análise de Componentes Principais (PCA) por algoritmo *K-means* para o conjunto de dados de folhas (Fo), cascas (Ca), sementes (Se) e calos de cotilédone de *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado cultivados *in vitro* por 30 (C30), 60 (C60) e 90 (C90) dias em meio de cultura Murashige & Skoog suplementado com 88,5 mM de sacarose, 2,5 mM de 2,4-D e 0,2% de Phytigel.....**68**

Figura 12. Importância da Variável na Projeção (VIP) *scores* de metabólitos detectados em extratos de folhas (fo), cascas (ca), sementes (se) e calos de cotilédones de *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado nos tempos de cultivo de 30 (C30), 60 (C60) e 90 (C90) dias em meio de cultura Murashige & Skoog suplementado com 88,5 mM de sacarose, 2,5 mM de 2,4-D e 0,2% de Phytigel, obtidos a partir da Análise Discriminante de Quadrados Mínimos Parciais (PLS-DA).....**70**

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Efeito do tempo de cultivo no aspecto dos calos de cotilédone de *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado após 30, 60 e 90 dias em meio de cultura Murashige & Skoog suplementado com 88,5 mM de sacarose, 2,5 µM de 2,4-D e 0,2% de Phytigel.....**39**
- Tabela 2. Efeito do tempo de cultivo no crescimento dos calos de cotilédone de *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrados cultivados por 30, 60 e 90 dias em meio de cultura Murashige & Skoog suplementado com 88,5 mM de sacarose, 2,5 µM de 2,4-D e 0,2% de Phytigel.....**41**
- Tabela 3. Valores de massas utilizados na extração e obtidos para os extratos brutos de folhas, cascas, sementes e de calos de cotilédone de *Passiflora setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado cultivados por 30, 60 e 90 dias em meio de cultura Murashige & Skoog suplementado com 88,5 mM de sacarose, 2,5 µM de 2,4-D e 0,2% de Phytigel.....**44**
- Tabela 4. Metabólitos identificados por CLUE-ESI-MS nos extratos hidroalcoólicos brutos de folhas (Fo), cascas do fruto (Ca), sementes (Se) e calos de cotilédone de *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado cultivados por 30 (C30), 60 (C60) e 90 (C90) dias em meio de cultura Murashige & Skoog suplementado com 88,5 mM de sacarose, 2,5 µM de 2,4-D e 0,2% de Phytigel.....**47**
- Tabela 5. Compostos detectados por CLUE-ESI-EM em extratos de calos de cotilédone de *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado após 30 (C30), 60 (C60) e 90 (C90) dias de cultivo em meio de cultura Murashige & Skoog suplementado com 88,5 mM de sacarose, 2,5 mM de 2,4-D e 0,2% de Phytigel.....**58**
- Tabela 6. Compostos detectados por CLUE-ESI-EM em extratos de folhas, cascas, sementes e calos de cotilédone de *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado após cultivo em meio de cultura Murashige & Skoog suplementado com 88,5 mM de sacarose, 2,5 mM de 2,4-D e 0,2% de Phytigel.....**62**
- Tabela 7. Classes químicas majoritárias detectadas por CLUE-ESI-EM nos extratos brutos de cascas do fruto, folhas, sementes e calos de cotilédone de *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado.....**63**
- Tabela 8. Compostos não identificados por análise CLUE-ESI-MS nos extratos brutos de cascas do fruto, folhas, sementes e calos de cotilédone de *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado.....**65**
- Tabela 9. Metabólitos classificados de acordo com a faixa de valores VIP, obtidos a partir da Análise Discriminante de Quadrados Mínimos Parciais dos extratos de folhas, cascas, sementes e calos de cotilédone de *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado nos diferentes tempos de cultivo em meio Murashige & Skoog suplementado com 88,5 mM de sacarose, 2,5 mM de 2,4-D e 0,2% de Phytigel.....**71**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% m/V - Proporção de massa por volume	Da - Daltons
2,4-D - Ácido 2,4-diclorofenoxiacético	DDA - Aquisição dependente de dados
ACh - Neurotransmissor acetilcolina	Embrapa - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
AChE - Enzima acetilcolinesterase	ERN - Espécies reativas de nitrogênio
ANA - Ácido α -naftalenoacético	ERO - Espécies reativas de oxigênio
ANOVA - Análise de variância	ESI - Sonda de ionização por eletrospray
ATP - Adenosina Trifosfato	eV - Elétron-volts
BEH - Tecnologia de suporte de coluna desenvolvida pela Waters Corporation (<i>Bridge Ethylene Hybrid</i>)	FADH ₂ - Dinucleótido de flavina e adenina
BRS - Sigla de cultivares lançadas pela EMBRAPA	Fe - Ferro
C - Cotilédone	Fo - Folhas
C30 - Cotilédone em cultivo de 30 dias	g - Grama
C60 - Cotilédone em cultivo de 60 dias	g/L - Grama por litro
C90 - Cotilédone em cultivo de 90 dias	G1 - Fase inicial do ciclo celular
Ca - Cascas	ID - Identificador
CLUE-ESI-EM - Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas	Kgf/cm ³ - Quilogramas-força por centímetro cúbico
CSV - Formato de arquivo para armazenar dados tabulares	Lh ⁻¹ - Litros por hora elevado na -1
	M - Molar
	m/z - Razão massa por carga
	MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MCP - Morte celular programada

mg - Miligrama

min - Minutos

mL - Mililitros

mm - Milímetros

mM - Milimolar

MS - Meio de cultura Murashige & Skoog

MS-DIAL - Plataforma de software para a análise e interpretação de dados de espectrometria de massa

MS-FINDER - Software desenvolvido para a interpretação de dados de espectrometria de massa

MS/MS - Espectrometria de Massa em Tandem

MS1 - Primeira etapa de análise em um experimento de espectrometria de massa

MS2 - Segunda etapa de análise em um experimento de espectrometria de massa

MSP - extensão de arquivo (*Mass Spectrometry Precursor*)

mzML - Formato de arquivo

N - Molar por litro

NADH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo

NC - Nó cotiledonar

ng - Nanograma

NI - Metabólito desconhecido

OR10A3 - Tipo específico de receptor olfativo que pertence à família dos receptores acoplados à proteína G (GPCRs)

PC's - Componentes principais

PCA - Análise de componentes principais

PDA - *Photodiode array*

PGRs - *Plant growth regulators*

pH - Índice de acidez ou basicidade

PLS-DA - Análise discriminante por mínimos quadrados parciais

ppm - Partes por milhão

PWV - *Passion fruit woodiness virus*

r - Coeficiente de Pearson

r^2 - Coeficiente de correlação linear ao quadrado

R^2 - Coeficiente de determinação ao quadrado

S - É a fase em que a célula replica seu DNA (síntese)

Se - Sementes

SQMG - Sulfoquinovosil monoacilglicerol

T de Student - Teste estatístico que compara as médias de dois grupos

TAGs - Triglicerídeos

TDL - Designação para o tipo de lâmpada fluorescente produzida pela Philips

t_R - Tempo de retenção

UVB - Radiação ultravioleta B.

V - Volt

VIP - Importância da variável na projeção

Xevo G2-S Qtof - Espectrômetro de massas do tipo quadrupolo ortogonal de tempo de voo da marca Waters

μM - Micromolar

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1	Gênero <i>Passiflora</i> (PASSIFLORACEAE).....	19
2.2.	Importância nutricional, farmacológica, medicinal e econômica das passifloras.....	20
2.3	<i>Passiflora setacea</i> D.C.....	22
2.4	Estresse oxidativo, antioxidantes e metabólitos secundários.....	23
2.5	Estratégias biotecnológicas para a produção de metabólitos secundários.....	25
3	JUSTIFICATIVA.....	27
4	OBJETIVO.....	27
4.1	Objetivo geral.....	27
4.2	Objetivos específicos.....	27
5	MATERIAL E MÉTODOS.....	28
5.1	Materiais.....	28
5.2	Métodos.....	29
5.2.1	Condições de crescimento de cultivo, manutenção das culturas <i>in vitro</i> e obtenção dos calos de cotilédones.....	29
5.2.2	Preparação do meio de cultura e condições de autoclavagem.....	29
5.2.3	Determinação das massas fresca, seca e do teor de água dos calos de cotilédones.....	30
5.2.4	Análises estatísticas.....	31
5.2.5	Análise por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas (CLUE-ESI-EM).....	31
5.2.5.1	Obtenção dos extratos brutos de folhas, cascas, sementes e calos de cotilédones.....	31
5.2.5.2	Análise por cromatografia líquida de ultra eficiência com ionização por eletrospray acoplada à espectrometria de massa (CLUE-ESI-EM).....	33
5.2.5.3	Processamento dos dados cromatográficos e espectrométricos para identificação de metabólitos.....	34
5.2.5.4	Análise estatística para interpretação dos dados metabolômicos.....	35
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
6.1	Aspecto morfológico e crescimento das culturas <i>in vitro</i> de calos de cotilédones de <i>P.setacea</i> cv. BRS Pérola do Cerrado.....	37
6.1.1	Efeito do tempo de cultivo nas características morfológicas dos calos de cotilédones.....	37

6.1.2	Efeito do tempo de cultivo no crescimento dos calos de cotilédones.....	39
6.2	Análise por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas (CLUE-ESI-EM).....	43
6.2.1	Rendimento dos extratos brutos de <i>Passiflora setacea</i> BRS Pérola do Cerrado.....	43
6.2.2	Cromatogramas e perfis químicos obtidos por análise CLUE-ESI-EM dos extratos de folhas, cascas, sementes e calos de cotilédone de <i>P.setacea</i>	44
6.2.2.1	Análise do perfil químico de extrato bruto de cascas de <i>P. setacea</i> cv. BRS Pérola do Cerrado.....	50
6.2.2.2	Análise do perfil químico de extrato bruto de folhas de <i>P. setacea</i> cv. BRS Pérola do Cerrado.....	51
6.2.2.3	Análise do perfil químico de extrato bruto de sementes de <i>P. setacea</i> cv. BRS Pérola do Cerrado.....	55
6.2.2.4	Análise dos perfis fitoquímicos de extratos de calos de cotilédones de <i>P. setacea</i> cv. BRS Pérola do Cerrado em diferentes tempos de cultivo.....	56
6.2.2.5	Análise comparativa dos resultados obtidos por análise CLUE-ESI-EM dos extratos hidroalcoólicos de folhas, cascas, sementes e calos de cotilédone de <i>P.setacea</i> cv. BRS Pérola do Cerrado.....	61
6.2.2.6	Análise estatística multivariada não supervisionada de componentes principais (PCA) para as amostras vegetais de <i>P. setacea</i> cv. BRS Pérola do Cerrado.....	65
6.2.2.7	Identificação de grupos de amostras através do algoritmo “ <i>K-means</i> ”.....	68
6.2.2.8	Análise estatística multivariada supervisionada pelo método PLS-DA.....	69
7.	CONCLUSÃO, CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVA FUTURA.....	74
	REFERÊNCIAS.....	76

1. INTRODUÇÃO

Uma mudança de paradigma nutricional está sendo impulsionada pela crescente conscientização dos consumidores sobre o impacto dos hábitos alimentares. O aumento da demanda por alimentos que apresentam propriedades nutracêuticas, motivada pelo desejo de elevar a expectativa de vida, não é apenas uma tendência passageira, mas sim um reflexo das aspirações de uma sociedade que valoriza a saúde preventiva ao longo da vida (SIRÓ *et al.*, 2008; GRANATO *et al.*, 2020). Dentre esses alimentos funcionais, encontram-se as espécies da família Passifloraceae, a qual comporta cerca de 16 gêneros e aproximadamente 700 espécies. Dos quais, mais de 500 espécies pertencem ao gênero *Passiflora*, o grupo mais diversificado e importante economicamente (FEUILLET & MACDOUGAL, 2007; OZAROWSKI & THIEM, 2013; MILWARD-DE-AZEVEDO, 2018; PEREIRA *et al.*, 2019; NIKOLOVA *et al.*, 2024).

O gênero *Passiflora* é amplamente reconhecido por seus efeitos sedativos, ansiolíticos, analgésicos e anti-inflamatórios. O uso desta planta na medicina popular é bem documentado em diversas partes do mundo, despertando o interesse da comunidade científica para investigar suas propriedades terapêuticas (COSTA *et al.*, 2016; LUCAS-GONZÁLEZ *et al.*, 2022; SANTOS-TIERNO *et al.*, 2022). Esse interesse tem se refletido em um aumento significativo entre 2000 e 2022 no número de publicações científicas sobre as *Passifloras* (FONSECA *et al.*, 2022). As espécies de *Passifloras* são encontradas principalmente em regiões de clima tropical e subtropical, com maior incidência no Brasil e na Colômbia (REIS *et al.*, 2018; BERNACCI, 2003).

As *Passifloras* são valorizadas não só pelo seu uso medicinal, mas também pelo seu valor nutricional e econômico. Estudos têm demonstrado o potencial dos compostos fitoquímicos presentes nas *Passifloras*, como flavonoides e compostos fenólicos, que possuem atividades farmacológicas já comprovadas (KOBORI & JORGE, 2005; CÓRDOVA *et al.*, 2005; ZERAIK *et al.*, 2010; GOMES *et al.*, 2017 *et al.*, 2017).

Passiflora setacea D.C., conhecida como maracujá-sururuca ou maracujá-do-sono, é uma espécie nativa do Cerrado brasileiro. É uma alternativa promissora à *Passiflora edulis* devido à sua resistência a pragas e doenças, além de suas propriedades nutricionais e farmacológicas (SANTOS-TIERNO *et al.*, 2022). A variedade *P. setacea* BRS Pérola do Cerrado, desenvolvida pela EMBRAPA, destaca-se pela produtividade e resistência, tornando-se relevante tanto para a indústria alimentícia quanto farmacêutica (BRAGA *et al.*, 2016; OLIVEIRA *et al.*, 2022). No Brasil, o cultivo de maracujá tem como principal

finalidade a produção de suco concentrado, posicionando o país como líder global nesse segmento. No entanto, o processamento dos frutos gera resíduos que têm demonstrado potencial notável devido à alta concentração de compostos bioativos nas cascas e sementes (SOUZA *et al.*, 2022).

Com base no exposto, o presente trabalho tem por objetivo investigar os perfis fitoquímicos de extratos de culturas de calos de cotilédones de *Passiflora setacea* BRS Pérola do Cerrado durante o decorrer do tempo de cultivo de 30, 60 e 90 dias.

Estudos anteriores, conduzidos no Laboratório de Biotecnologia Vegetal (BOT/CCB/UFSC) incluindo teses de doutorado, dissertações de mestrado e trabalhos de conclusão de curso na Universidade Federal de Santa Catarina, já exploraram diversos aspectos de abordagens biotecnológicas para a produção *in vitro*, por culturas de células, de compostos de interesse dessa espécie, destacando a relevância fitoquímica e o potencial para aplicações práticas (MONTAGNER, 2018; SOZO, 2014, 2016; TERHAAG, 2019). A influência positiva de vários fatores na produção *in vitro* de compostos por culturas de calos de *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado foi constatada nesses estudos anteriores, incluindo o tipo de explante, fontes de carbono, fontes de reguladores de crescimento, tipos de meios de cultura e elicitação com ácido salicílico.

A condução do presente trabalho justifica-se pela necessidade de aprofundar os estudos sobre a influência do período de cultivo no crescimento e no perfil químico dos calos e proceder à avaliação comparativa com os perfis obtidos para folhas, cascas e sementes, no sentido de avaliar o potencial metabólico dos calos e otimizar protocolos de cultivo e produção *in vitro* da espécie e contribuir para a valorização de espécies nativas do Cerrado brasileiro.

O termo Cerrado é amplamente utilizado para designar o conjunto de ecossistemas que inclui savanas, matas, campos e matas de galeria, predominantes no Brasil Central (KLINK & MACHADO, 2005). Este conjunto ocupa uma extensa área do país, abrangendo os estados de Goiás, Distrito Federal, e partes de Minas Gerais, Rondônia, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Bahia, Tocantins, Maranhão, Piauí e Pará (SANTOS *et al.*, 2010).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Gênero *Passiflora* (PASSIFLORACEAE)

A história da família de angiospermas Passifloraceae remonta ao período anterior à exploração das Américas, quando os habitantes nativos já tinham conhecimento de suas flores (FONSECA *et al.*, 2022). A descrição e registro dessa família têm início durante a expansão europeia nos séculos XVI e XVII, quando a planta despertou interesse entre os colonizadores espanhóis (KILLIP, 1938). Influenciados pela fé católica, esses colonizadores associaram a morfologia da planta aos instrumentos da paixão de Cristo, conferindo-lhe o nome "flor da paixão" ou "*passion fruit*" (CERVI, 1997). O termo popular "maracujá", utilizado no Brasil, tem origem na palavra tupi "marahú", empregada pelos indígenas para descrever a planta como um 'alimento na cuia' (IMIG, 2013).

A família Passifloraceae compreende cerca de 16 gêneros e aproximadamente 700 espécies. Dentre estes, destaca-se o gênero *Passiflora*, o grupo mais diversificado e economicamente importante, o qual engloba mais de 500 espécies (FEUILLET & MACDOUGAL, 2007; OZAROWSKI & THIEM, 2013; MILWARD-DE-AZEVEDO, 2018; PEREIRA *et al.*, 2019; NIKOLOVA *et al.*, 2024). Conhecidas por seus efeitos sedativos, ansiolíticos, analgésicos e anti-inflamatórios, seu uso na medicina popular é registrado em várias partes do mundo, despertando interesse para muitos estudos científicos (COSTA *et al.*, 2016; LUCAS-GONZÁLEZ *et al.*, 2022; SANTOS-TIERNO *et al.*, 2022). Em uma pesquisa bibliográfica realizada no banco de dados *Web of Science*, entre o período de 2000 e 2021, notou-se um aumento de 6,9 vezes no número de publicações por ano (FONSECA *et al.*, 2022), destacando sua relevância na comunidade científica.

As *passifloras* estão presentes em uma ampla área geográfica, que compreende regiões de clima tropical e subtropical (REIS *et al.*, 2018), se estendendo do sul da Argentina ao sul dos Estados Unidos, através da América Central e México. Apesar da pouca incidência, outras espécies também ocorrem exclusivamente em regiões da Ásia, Austrália e Nova Zelândia (HANSEN *et al.*, 2006). Apesar do maior número de espécies nativas serem encontradas no Brasil e Colômbia, também há ocorrências em países como Índia e China (BERNACCI, 2003).

O gênero *Passiflora* engloba uma variedade considerável de plantas, que evidencia sua habilidade de assumir diferentes formas, de trepadeiras lenhosas ou herbáceas a cipós, de subarbustos a árvores pequenas. Hermafroditas, dióicas ou andromonóicas são as estratégias

reprodutivas que essas plantas podem assumir (DHAWAN *et al.*, 2004; BERNACCI, 2003; HASSEN *et al.*, 2006). De modo frequente, necessitam de suporte adequado para otimizar a distribuição dos seus ramos e, conseqüentemente, sua produtividade. Essas características botânicas distintivas, como a presença de gavinhas axilares e a capacidade de desenvolver caules herbáceos ou lenhosos, contribuem para a ampla distribuição e adaptação do gênero em diversos ambientes. (SULLADMATH *et al.*, 2012; CARVALHO *et al.*, 2018).

2.2 Importância nutricional, farmacológica, medicinal e econômica das passifloras

Nos últimos anos, os alimentos têm sido reconhecidos pela capacidade de induzir respostas fisiológicas específicas, além de promover a nutrição e satisfação sensorial. Esses alimentos, denominados funcionais, têm o potencial de prevenir, tratar ou auxiliar na recuperação de doenças (ZERAİK *et al.*, 2010). Essa inovadora concepção de alimentação saudável, introduzida pelo Japão na década de 1980 (SIRÓ *et al.*, 2008; GRANATO *et al.*, 2020), surgiu da observação da relação da baixa incidência de doenças associadas a dieta de certas populações (ANJO, 2004). Dentre esses alimentos funcionais, vários estudos apontam o potencial das *passifloras* (KOBORI & JORGE, 2005; CÓRDOVA *et al.*, 2005; ZERAİK *et al.*, 2010; GOMES *et al.*, 2017).

Datadas de milhares de anos, sementes de *passifloras* foram descobertas em sítios arqueológicos na América do Norte, evidenciando um longo histórico do consumo dessas plantas pelos humanos (DHAWAN *et al.*, 2004; STAFNE, 2022). Ao redor do mundo a diversidade de suas aplicações medicinais tornaram as *passifloras* alvo de diversas revisões sobre suas propriedades terapêuticas, destacando sua importância na medicina popular, devido ao seu valor nutricional, composição fitoquímica com atividades farmacológicas (CORRÊA *et al.*, 2016; DHAWAN *et al.*, 2004; GADIOLI *et al.*, 2018; LUCAS-GONZÁLEZ *et al.*, 2022). No Brasil, o maracujá tem sido empregado como ansiolítico, sedativo, diurético e analgésico (OGA *et al.*, 1984). Há registro de seu uso como agente antimicrobiano na Argentina (ANESINI & PEREZ, 1993). Em várias regiões, incluindo a América do Sul, México, Holanda e Índias Ocidentais, a raiz da planta é reconhecida por suas propriedades vermífugas. Na Itália, a *passiflora* é utilizada como antiespasmódico e sedativo (DHAWAN *et al.*, 2004). Na Índia, a infusão das folhas é utilizada para tratar disenteria e hipertensão (JAMIR *et al.*, 1999), enquanto na Nigéria, é conhecida pelos efeitos sedativos e no tratamento de transtornos de ansiedade (NWOSU, 1999).

O cultivo do maracujá tem como principal finalidade a produção de suco concentrado, colocando o Brasil como líder global nesse segmento. No entanto, o processamento dos frutos geram toneladas de resíduos, sendo aproximadamente 50% composto por cascas e 13% por sementes (SOUZA *et al.*, 2022). Esses resíduos que, descartados em quantidade considerada pela indústria, apresenta algumas notoriedades.

Como exemplo, as sementes de *passifloras*, que apresentam alta concentração de ácidos graxos insaturados (SANTANA *et al.*, 2015), totalizando em pelo menos 60% da sua composição (LOPES *et al.*, 2010), associados às propriedades regeneradoras e cicatrizantes. O ômega-6, por exemplo, é um ácido essencial para o organismo humano, porém não biossintetizado (MCCUSKER & GRANT-KELS, 2010). Em virtude da presença de ω -6 em óleos extraídos das sementes de *passifloras*, torna-se viável sua aplicação em uma ampla gama de produtos, incluindo fármacos, cosméticos e produtos nutracêuticos (SOUZA *et al.*, 2022).

Além do aproveitamento das sementes, a casca também pode apresentar valor nutricional, pois em sua composição existe uma quantidade de compostos fenólicos superiores à polpa (DE FAVERI *et al.*, 2020). As cascas de *passifloras* são ricas em vitaminas, minerais e fibras alimentares, que estão associadas ao controle do nível glicêmico e a prevenção de doenças cardiovasculares.

Uma alternativa para evitar o seu desperdício das cascas, é a utilização das mesmas em produtos de panificação (NASCIMENTO *et al.*, 2020; SHI *et al.*, 2021). Por meio da desidratação, as cascas de maracujá podem ser transformadas em pós de farinha. Este produto é comercializado no Brasil como tratamento auxiliar de diabetes devido ao seu efeito hipoglicemiante, relacionada ao tratamento da dislipidemia (MARQUES *et al.*, 2016; WENG *et al.*, 2021). Ademais, a pectina, extraída da casca do maracujá, é amplamente usada na indústria de alimentos, como agente estabilizante e gelificante em produtos alimentícios. Também é utilizada na área farmacêutica e biotecnológica, como excipiente de produtos cosméticos, cicatrizantes e medicamentos direcionados à prevenção do câncer de cólon (FILHO *et al.*, 2020; FREITAS *et al.*, 2020).

Além das partes que compõem os frutos, as folhas de *passifloras* também apresentam efeitos sedativos e ansiolíticos (LUCAS-GONZÁLEZ *et al.*, 2022). Desde 1867, preparações utilizando as folhas de diversas espécies de *passifloras* são empregadas para tratar insônia e ansiedade (DHAWAN *et al.*, 2004; ROMANINI *et al.*, 2006). Seus efeitos diuréticos, analgésicos, sedativos e ansiolíticos levam o emprego de suas folhas na produção de fitoterápicos (BERALDO & KATO, 2010; TREVISAN *et al.*, 2021). A ação farmacológica,

toxicológica e os constituintes químicos das folhas de várias espécies do gênero *Passiflora* foram descritas em uma vasta revisão realizada por DHAWAN *et al.* (2004). Flavonoides, como a vitexina e orientina, são os principais compostos encontrados nas folhas de espécies de *Passiflora* (MORAES, 1995). Essa classe de metabólitos secundários apresenta grande relevância para a indústria farmacêutica (TREVISAN *et al.*, 2021).

2.3 *Passiflora setacea* D.C.

No Brasil, a *Passiflora edulis* (maracujá amarelo ou azedo) domina mais de 90% dos pomares e é amplamente usada no mercado internacional devido à sua aceitação sensorial e alto rendimento industrial (FALEIRO *et al.*, 2019; OCAMPO *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2020; ATAÍDE *et al.*, 2023). No entanto, essa espécie é altamente suscetível a pragas e doenças que ameaçam sua produtividade (PEREIRA *et al.*, 2019). Entre as principais doenças, destaca-se a murcha vascular causada por fungos do gênero *Fusarium oxysporum* (SILVA *et al.*, 2010), que provoca grandes perdas econômicas e reduz a vida útil dos maracujazeiros (CARVALHO *et al.*, 2015; PEREIRA *et al.*, 2019).

Uma excelente alternativa ao mercado do maracujá é a espécie *Passiflora setacea* D.C., em razão de sua produtividade e resistência a pragas. Além disso, possui várias características químicas e propriedades farmacológicas, tornando-se uma opção às indústrias alimentícia, farmacêutica e decorativo-ornamental (SANTOS-TIERNNO *et al.*, 2022). São espécies mais resistentes à patógenos tais como *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Phytophthora* e ao vírus do endurecimento dos frutos do maracujazeiro (PWV) (BRAGA *et al.*, 2006; ATAÍDE *et al.*, 2012; PEREIRA *et al.*, 2019; SANTOS-TIERNNO *et al.*, 2022). Além disso, a colheita de seus frutos, no Distrito Federal, ocorre durante o período de entressafra do maracujá-azedo comercial, tornando-o relevante para o programa de melhoramento genético (GUIMARÃES *et al.*, 2013; BRAGA *et al.*, 2016).

Passiflora setacea D.C., é uma espécie silvestre nativa dos Cerrados brasileiros, também ocorre no bioma Caatinga e em áreas de transição, como o semiárido norte-mineiro do Brasil (RINALDI *et al.*, 2022). Conhecido popularmente como maracujá-sururuca, maracujá-de-boi e maracujá-do-sono, está distribuída nas regiões Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste (BRAGA *et al.*, 2016). Apresenta frutos comestíveis, ricos em sais minerais, além de compostos fenólicos e proantocianidinas, associados à atividade antioxidante (CARVALHO *et al.*, 2018; SANTOS-TIERNNO *et al.*, 2022). Apesar da espécie ser muito resistente à seca, pode não resistir a queimadas. Provavelmente, os principais agentes polinizadores são os

morcegos e as mariposas. Além disso, acredita-se que, por ser protéica e de boa digestibilidade, suas folhas são muito consumidas por bovinos (BRAGA *et al.*, 2016).

P. setacea BRS Pérola do Cerrado é uma espécie derivada do melhoramento genético a partir da manipulação de frutas silvestres, lançada pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Cerrados). Através de policruzamentos de plantas selecionadas, obteve-se uma variedade que apresentou aumento da produtividade celular e do tamanho dos frutos. Tal espécie foi a primeira passiflora silvestre a ser registrada e protegida no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), nomeada como Pérola do Cerrado (SOZO, 2014 *apud* EMBRAPA, 2013). O seu nome popular é “maracujá do sono”, pois é conhecido regionalmente por suas propriedades sedativas e, portanto, utilizada na medicina popular no tratamento de insônia (BRAGA *et al.*, 2016; CARVALHO *et al.*, 2018; OLIVEIRA *et al.*, 2022).

2.4 Estresse oxidativo, antioxidantes e metabólitos secundários

Os produtos do metabolismo primário das plantas, provenientes das vias fotossintéticas e respiratórias, como aminoácidos, ácidos nucleicos, carboidratos, proteínas e lipídeos, têm sido fonte nutricional da humanidade por séculos (CUNHA *et al.*, 2016). No entanto, uma quantidade significativa de carbono e energia é desviada para a produção de moléculas cuja função não está completamente esclarecida (DIAS *et al.*, 2016). Essas moléculas, chamados de metabólitos secundários, não são considerados essenciais para os processos vitais das plantas, mas desempenham um papel fundamental na interação delas com o ambiente (RAO & RAVISHANKAR, 2002; SMETANSKA, 2008; JAMWAL *et al.*, 2018).

Estímulos induzidos por estresses abióticos (luz UV, frio, calor, fungicidas, metais pesados etc.) e bióticos (patógenos, estresse oxidativo, ferimento etc.), atuam como elicitores que modulam a expressão gênica (FRTIZ *et al.*, 2010; EFFERTH, 2019), promovendo a produção de metabólitos secundários, essenciais para a adaptação das plantas (WANG *et al.*, 2018). Esses compostos desempenham principalmente uma função ecológica, seja atraindo insetos polinizadores ou atuando nos mecanismos de defesa contra predadores (SMETANSKA, 2008). Além disso, muitos metabólitos secundários não apenas revelam funções protetoras, mas também possuem valor medicinal para os seres humanos (EFFERTH, 2019). Sua aplicação se estende à produção de fármacos, agroquímicos, aromatizantes, fragrâncias, corantes, pesticidas e aditivos alimentares (RAO & RAVISHANKAR, 2002).

Substâncias bioativas derivadas do metabolismo secundário, apresentam elevado potencial antioxidante, conferindo às plantas propriedades medicinais, capazes de prevenir e inibir a ação dos radicais livres no organismo humano (CUNHA *et al.*, 2016; PEREIRA & CARDOSO, 2012). A produção dos radicais livres é natural do processo fisiológico, associada à produção de ATP, fagocitose, regulação do crescimento celular, entre outros (BARREIROS *et al.*, 2006; PEREIRA & CARDOSO, 2012). As espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN) são radicais livres altamente reativos devido a elétrons desemparelhados. Na busca de estabilizar-se, essas espécies reativas capturam elétrons de outras moléculas (SANTOS-SÁNCHEZ *et al.*, 2019; Mendes *et al.*, 2020), como proteínas, lipídeos, carboidratos e ácidos nucleicos, levando a alterações funcionais, promovendo danos nas estruturas celulares ou até mesmo apoptose (VELLOSA *et al.*, 2021).

Todavia, um sistema biológico na presença de excesso de EROs pode apresentar diversas patologias (SANTOS-SÁNCHEZ *et al.*, 2019). Evidências significativas indicam que os radicais livres e outros oxidantes desempenham papel chave nos processos de mutagênese e carcinogênese, além de influenciarem o envelhecimento, doenças autoimunes, infecciosas e/ou inflamatórias, e condições degenerativas tais como, diminuição da resposta imunológica e disfunções cerebrais (PEREIRA & CARDOSO, 2012). Em sistemas biológicos, o estresse oxidativo é caracterizado por um desequilíbrio entre a produção de radicais livres e a capacidade do organismo de neutralizá-los por meio de antioxidantes (SANTOS-SÁNCHEZ *et al.*, 2019; Mendes *et al.*, 2020).

A fim de evitar a sobrecarga de radicais livres no organismo, além do sistema antioxidante endógeno, a obtenção de antioxidantes provenientes de fontes externas, como alimentos, suplementos nutricionais ou produtos farmacêuticos, torna-se necessária (BARREIROS *et al.*, 2006; MENDES *et al.*, 2020). Entre os antioxidantes externos mais relevantes estão os compostos fenólicos, carotenóides e vitamina C (SANTOS-SÁNCHEZ *et al.*, 2019; MENDES *et al.*, 2020). Outro fator importante dos antioxidantes é a sua aplicação na indústria, para a proteção de cosméticos, fármacos e alimentos, prevenindo a decomposição oxidativa desses pela ação da luz, temperatura e umidade (BARREIROS *et al.*, 2006).

Explorar o potencial da atividade antioxidante dos frutos do Cerrado apresenta uma promissora oportunidade para a elaboração de novos medicamentos pela indústria farmacêutica (SIQUEIRA *et al.*, 2013). A alta atividade do metabolismo secundário e, conseqüentemente, a significativa concentração de compostos antioxidantes nas espécies adaptadas a esse bioma, são atribuídas às condições edafoclimáticas extremas do Cerrado

(OLIVEIRA *et al.*, 2022). A acidez do solo, exposição excessiva ao sol e queimadas durante a estação seca, comuns desse bioma, são fatores abióticos que selecionaram espécies com mecanismos de defesa capazes de lidar com o intenso estresse oxidativo imposto pelo ambiente, resultando em altos teores de compostos bioativos, como fenólicos e vitamina C. Portanto, os frutos cultivados no Cerrado são consistentemente associados a benefícios para a saúde (CARVALHO *et al.*, 2018), como por exemplo a espécie silvestre do Cerrado brasileiro *Passiflora setacea*, sendo a variedade BRS Pérola do Cerrado (CARVALHO *et al.*, 2018; OLIVEIRA *et al.*, 2022), o objeto de estudo do trabalho em questão.

Na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) foram desenvolvidas pesquisas utilizando a espécie *P. setacea*. Montagner (2018), teve como objetivo avaliar, em diferentes condições de cultivo, a produção de fenólicos totais, flavonoides, carotenoides, terpenos e atividades antioxidante e biológica de culturas *in vitro* de calos, comparando extratos de folhas, pericarpos e sementes. Sozo (2014) avaliou os perfis de metabólitos secundários e atividade antioxidante de frutos, sementes e calos cultivados *in vitro* das espécies *P. setacea* e *P. tenuifila*. Terhaag (2019) teve como objetivo analisar os efeitos gerados em diferentes tipos de explantes quanto ao crescimento, teores de compostos fenólicos totais, flavonóides, clorofilas, carotenóides e na atividade antioxidante de extratos de culturas de calos de *P. setacea* a partir da variação de concentrações de auxinas ácido α -naftalenoacético (ANA) e ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D). Estes trabalhos prévios evidenciaram sua importância do ponto de vista fitoquímico, expandindo nosso conhecimento sobre a planta *P. setacea*.

2.5 Estratégias biotecnológicas para a produção de metabólitos secundários

Com o objetivo de otimizar a produção dos compostos bioativos produzidos pelas plantas, combinando biotecnologia e bioquímica, novos estudos têm sido conduzidos para aprimorar os protocolos de cultivo *in vitro* de células, tecidos e órgãos vegetais. Baseada na totipotência das células vegetais, a primeira explicação teórica para o cultivo *in vitro* foi proposta em 1902 pelo botânico austríaco Gottlieb Haberlandt. Compreende-se essa técnica como um sistema de produção padronizado que permite maior uniformidade dos extratos, visando obter os compostos desejados e preservar as características genéticas dos clones de maior rendimento (SMETANSKA, 2008; DIAS *et al.*, 2016).

O cultivo *in vitro* baseia-se na capacidade das células vegetais, de qualquer tecido, regredirem ao seu estado indiferenciado. Sob condições controladas de luz, umidade e temperatura, as células multiplicam-se ou redefinem uma nova via metabólica, formando

novos tecidos celulares ou até mesmo uma nova planta. O cultivo *in vitro* é uma ferramenta eficaz para a produção de biomassa em larga escala e extração de metabólitos secundários de interesse comercial, sem a exploração de populações selvagens, garantindo alta qualidade fitossanitária e genética (SOUZA, RESCAROLLI, NUNES, 2018).

O crescimento e a síntese de metabólitos secundários desejados dependem de fatores físicos e químicos. O controle da intensidade luminosa, temperatura e pH é essencial para as culturas de tecidos vegetais. Além disso, a cultura ideal deve incluir constituintes como micronutrientes, macronutrientes, aminoácidos, vitaminas, fontes de carbono, suplementos de nitrogênio, agentes solidificantes e reguladores de crescimento (PGRs). Esses elementos, ao estimular a multiplicação celular, têm sido utilizados como elicitores eficientes para aumentar a produção de metabólitos secundários (HUSSAIN *et al.*, 2012; TRIVEDI *et al.*, 2015). Embora cada espécie tenha requisitos laboratoriais distintos, existem protocolos baseados em experimentações sistemáticas. Um exemplo disso é o meio de cultura Murashige e Skoog (meio MS), comumente utilizado em ensaios laboratoriais por conter os elementos básicos tais como vitaminas, carboidratos e sais inorgânicos (TRIVEDI *et al.*, 2015; EFFERTH, 2018).

Um dos elementos utilizados para manipular culturas *in vitro* são os reguladores de crescimento, substâncias sintéticas ou naturais (produzidas por fungos, por exemplo) que influenciam o crescimento e desenvolvimento das plantas. Essas substâncias são análogas aos hormônios sintetizados pelas próprias plantas, os fitormônios (BASRA, 2000). A resposta dos organismos aos reguladores de crescimento vegetal depende da espécie cultivada, estágio de desenvolvimento, estado fisiológico e nutricional, condições ambientais e equilíbrio hormonal endógeno (AFTAB *et al.*, 2010; NAEEM *et al.*, 2011; IDREES *et al.*, 2012). Portanto, diferentes substâncias reguladoras podem ser manipuladas em laboratório para alcançar êxito na produção de culturas *in vitro*. Um meio de cultura destinado a estimular o crescimento celular será diferente de um meio projetado para otimizar a produção de metabólitos secundários (EFFERTH, 2018).

A distribuição de metabólitos secundários é limitada nas plantas, sendo encontrados em partes por milhão na natureza (ppm). Logo, as culturas *in vitro* surgem como uma alternativa sustentável para a obtenção de compostos biossintetizados, uma vez que uma grande quantidade de plantas seria necessária para atender às demandas do mercado (JAMWAL *et al.*, 2018). Nesse contexto, estudos comparativos sobre a produção de metabólitos secundários em plantas naturais e calos cultivados *in vitro* têm sido realizados. Por exemplo, Costa *et al.* (2012) observaram que extratos hidroalcoólicos de calos de *Thymus lotocephalus* apresentaram maior concentração de antioxidantes do que as plantas coletadas

na natureza. Sankar e Matthew (2014) quantificaram metabólitos secundários em culturas *in vivo* e calos *in vitro* de *Ocimum*, concluindo que culturas *in vitro* com elicitores produziram maior quantidade de fenol, alcaloides e terpenoides.

3. JUSTIFICATIVA

Estudos conduzidos até o momento evidenciam que a espécie *P. setacea* BRS Pérola do Cerrado apresenta alta capacidade de produção *in vitro* de metabólitos secundários com propriedades antioxidantes, que podem ser aplicáveis nas indústrias de química fina e farmacêutica. Contudo, é necessário explorar mais estudos no sentido de avaliar o efeito do tempo de cultivo *in vitro* sobre o perfil fitoquímico. Além disso, também é necessário comparar com o perfil fitoquímico do extrato de folhas, cascas e sementes, a fim de verificar se novos compostos são produzidos no sistema de cultivo *in vitro*.

4. OBJETIVO

4.1 Objetivo geral

Avaliar o perfil fitoquímico de extratos de culturas de calos derivados de cotilédones de *P. setacea* BRS Pérola do Cerrado ao longo do período de cultivo *in vitro*, além de realizar um comparativo com os perfis fitoquímicos de extratos de folhas, cascas e sementes.

4.2 Objetivos específicos

- Verificar o efeito do tempo de cultivo por 30, 60 e 90 dias no crescimento *in vitro* dos calos de cotilédone de *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado;
- Verificar o efeito do tempo de cultivo por 30, 60 e 90 dias nos perfis de metabólitos dos calos de cotilédone de *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado;
- Determinar os perfis de metabólitos de extratos de folhas, cascas e sementes de *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado;
- Comparar os perfis fitoquímicos de calos originados a partir de segmentos de cotilédones cultivados *in vitro* por 30, 60 e 90 dias com o perfil fitoquímico observado em extratos de folhas, cascas e sementes de *P. setacea* BRS Pérola do Cerrado;

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Materiais

Os materiais biológicos utilizados neste trabalho foram folhas, cascas do fruto, sementes e calos derivados de segmentos de cotilédones, cultivados por 30, 60 e 90 dias de *P. setacea* variedade BRS Pérola do Cerrado. As folhas, cascas e sementes frescas foram cedidas pela Embrapa Cerrados, Planaltina, DF, Brasil. Os materiais empregados nas análises foram colocados em bandejas e submetidos à secagem ao ar livre, onde a temperatura foi mantida em $23 \pm 2^\circ\text{C}$ com 70% de umidade relativa, até que as massas secas de cada tipo de material atingissem valores constantes. A Figura 1 apresenta os aspectos das folhas, cascas, sementes e calos após o processo de secagem.

Figura 1. Folhas (A), cascas (B), sementes (C) e calos de cotilédone (D) de *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado secas ao ar livre à $23 \pm 2^\circ\text{C}$ e 70% de umidade relativa.



Fonte: Elaborado pela autora.

5.2 Métodos

5.2.1 Condições de crescimento de cultivo, manutenção das culturas *in vitro* e obtenção dos calos de cotilédones

As culturas *in vitro* de calos derivados de segmentos de cotilédones foram obtidas segundo a metodologia descrita por Sozo *et al.* (2016). Os segmentos de cotilédone foram removidos de plântulas axênicas, obtidas a partir da germinação *in vitro* de sementes de *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado. Os calos de cotilédone obtidos foram mantidos em meio de cultura Murashige & Skoog (MS), suplementado com 88,5 mM de sacarose, 2,5 μ M de 2,4-D e 0,2 % de Phytigel, através de repicagens realizadas a cada 30 dias, permitindo a produção de material biológico suficiente para a montagem dos experimentos.

5.2.2 Preparação do meio de cultura, condições de autoclavagem, inoculação das culturas e condições de cultivo

O meio de cultura MS, uma mistura em pó produzida pela Sigma Chemical Co., na concentração de 4,4 g/L foi suplementado com 88,5 mM de sacarose, 2,5 μ M de 2,4-D e 0,2% (m/V) de Phytigel. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8, antes da adição do Phytigel, utilizando-se uma solução de 0,1 M hidróxido de sódio ou de ácido clorídrico 0,1 N. Após a adição do Phytigel o meio foi dissolvido em placa aquecedora e distribuído 8 mL de meio por tubo de ensaio de 20 x 150 mm. Após serem fechados com tampas de polipropileno, os tubos foram autoclavados por 20 minutos a 1,1 Kg/cm³ e 121°C.

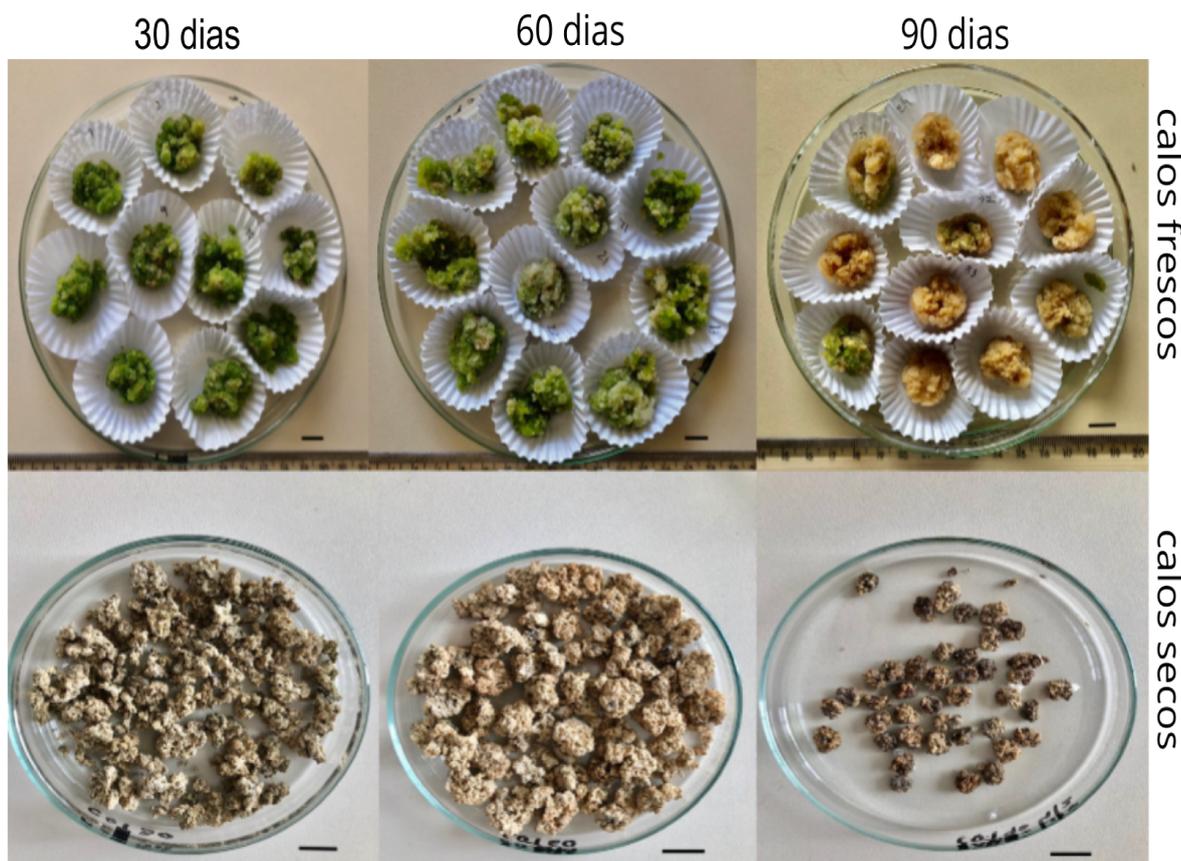
No fluxo laminar, sob condições assépticas, foram inoculados 300 mg de biomassa fresca de calos em cada tubo de ensaio, os quais foram fechados com filme de polipropileno transparente e selados com elástico, totalizando em 120 tubos por período de cultivo. As culturas foram transferidas para a sala de crescimento, mantidas a uma temperatura controlada de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, com fotoperíodo de 16 horas por lâmpadas fluorescentes Philips TDL (22.3 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Após o cultivo de 30, 60 e 90 dias, os calos foram coletados para a determinação das massas frescas e secas, seguidas pela análise de crescimento e fitoquímica.

5.2.3 Determinação das massas fresca, seca e do teor de água dos calos de cotilédone

Os calos de cotilédones, após 30, 60 e 90 dias de cultivo, foram retirados dos tubos de ensaio e pesados em uma balança analítica para determinar a massa fresca. Em seguida, foram individualmente dispostos em formas de papel com 2,5 cm de diâmetro, sobre placas de Petri de 16 cm de diâmetro (Figura 2). Para a secagem ao ar livre, as placas foram mantidas abertas sobre prateleiras, em ambiente refrigerado a uma temperatura de $23 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade relativa do ar de 70%. Após 4 dias, ao estabilizar os valores de massa seca, os calos secos produzidos em cada tubo de ensaio foram pesados para determinar a massa seca.

A determinação do teor de água dos calos e a elaboração das curvas de crescimento foram realizados utilizando-se dos dados das massas fresca e seca de cada período de cultivo.

Figura 2. Calos de cotilédone de *Passiflora setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado cultivados em meio de cultura Murashige & Skoog suplementado com 88,5 mM de sacarose, 2,5 μM de 2,4-D e 0,2% de Phytigel por 30, 60 e 90 dias de cultivo, frescos e secos ao ar livre. Barra = 1 cm.



Fonte: Elaborado pela autora.

5.2.4 Análises estatísticas

Os experimentos foram organizados seguindo um delineamento estatístico inteiramente casualizado ou seja, a alocação dos tratamentos (períodos de cultivo) às unidades experimentais (tubos de ensaio) foi realizada inteiramente ao acaso, garantindo que cada tubo de ensaio tivesse a mesma probabilidade de receber qualquer um dos tratamentos. Este delineamento é utilizado quando as condições do ambiente são uniformes (STOCHERO *et al.*, 2020).

Os parâmetros dados de massa fresca, massa seca, razão massa seca/massa fresca e teor de água obtidos nos diferentes tempos de cultivo foram submetidos à análise de variância (ANOVA), para avaliar a existência de diferenças relevantes em função do tempo de cultivo. A ANOVA é um procedimento estatístico utilizado para averiguar a existência de variação significativa entre as médias dos tratamentos (STOCHERO *et al.*, 2020), ou seja, no contexto do presente trabalho, essa aplicação é utilizada para avaliar se há diferenças significativas entre os tratamentos, mas não indica quais tratamentos são diferentes entre si, sendo necessário em seguida, realizar o teste de Tukey para separar as médias. Posteriormente, então foi realizada a separação entre si das médias por meio do teste de Tukey, com um nível de probabilidade de 95%.

Os dados da massa fresca e massa seca foram usados para realizar análises de correlação linear simples, determinando os valores dos coeficientes de correlação linear (r). Além disso, foi realizada a análise de regressão linear para a determinação das equações das retas e os coeficientes de determinação [$R^2 = (100) \cdot (r^2)$]. A análise de regressão descreve o efeito da variável independente (massa fresca) sobre a variável dependente (massa seca), expressando esta última em função da primeira (GOMEZ & GOMEZ, 1984). As análises estatísticas foram elaboradas com base em softwares de estatística – EXCEL (Microsoft) e do software livre PAST 4 (Paleontological Statistics Software, <https://www.nhm.uio.no/english/research/resources/past/>), versão 4 (HAMMER *et al.*, 2001).

5.2.5 Análise por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas (CLUE-ESI-EM)

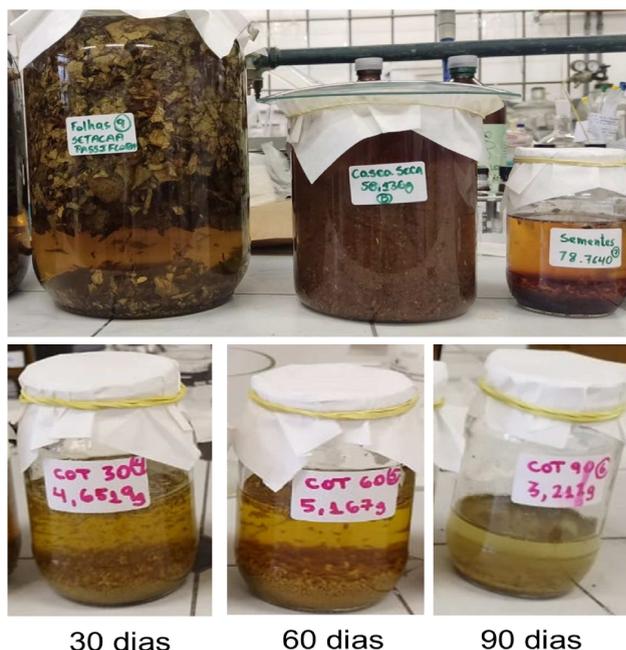
5.2.5.1. Obtenção dos extratos brutos de folhas, cascas, sementes e calos de cotilédones e cálculo do rendimento.

Os extratos brutos foram obtidos a partir de folhas (Fo), cascas do fruto (Ca), sementes (Se) e calos de cotilédone (C) cultivados *in vitro* por períodos de 30 dias (C30), 60 dias (C60) e 90 dias (C90). Os materiais vegetais foram secos ao ar livre em ambiente à temperatura $23 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade relativa do ar de 70%, até a massa seca atingir valores constantes (Figura 1). A Tabela 2 apresenta a quantidade inicial de massa seca, utilizada na extração de cada tipo de material vegetal, para obtenção dos extratos brutos.

O método aplicado para a extração foi o descrito por Cechinel Filho e Yunes (1998). As sementes e os calos secos foram macerados em um almofariz com o auxílio de um pistilo, as folhas foram trituradas manualmente e as cascas processadas em um liquidificador. O processo de extração foi realizado semanalmente durante o período de 21 dias (3 semanas). A cada semana, os volumes dos solventes dos extratos foram coletados, e os resíduos de cada material foram submetidos a uma nova extração com solução aquosa de etanol 70% (Figura 3).

Após a extração, os extratos foram filtrados (Figura 4A) e o solvente removido sob pressão reduzida em um evaporador rotatório (Figura 4B), resultando em extratos brutos hidroalcoólicos (70% etanol). Em seguida, os extratos foram pesados em uma balança analítica para calcular o rendimento final de cada material vegetal. O rendimento dos extratos foi calculado utilizando a seguinte fórmula: $(\text{massa do extrato bruto} / \text{massa seca inicial}) \times 100$.

Figura 3. Extração com solução aquosa de etanol 70% de folhas, cascas, sementes e calos de 30, 60 e 90 dias de cultivo de *P. setacea* cv. Pérola do Cerrado.



Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 4. A) Filtragem dos extratos e B) Solvente removido sob pressão reduzida em um evaporador rotatório, resultando em extratos brutos hidroalcoólicos (70% etanol) de calos de cotilédone de *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado.



Fonte: Elaborado pela autora.

5.2.5.2 Análise por cromatografia líquida de ultra eficiência com ionização por eletrospray acoplada à espectrometria de massa (CLUE-ESI-EM)

O preparo das amostras foi elaborado com uma massa de extrato bruto de 1,6 mg solubilizada em 2 mL de uma mistura de metanol:acetonitrila grau MS (1:1). As amostras foram filtradas em *vial* através de filtrilos com tamanho de poro de 0,22 μm , a fim de evitar a passagem de partículas para a solução final.

Para a separação dos compostos bioativos, foi utilizado o sistema CLUE (Waters, Milford, MA, EUA), equipado com um detector de fotodiodos (PDA), gerenciador de amostras, gerenciador de solvente quaternário e uma coluna de fase reversa (BEH, C18 de 5x1 cm e 1,7 μm de partículas). A temperatura da coluna foi mantida a 40°C, enquanto a bandeja de amostras foi mantida a 20°C. Um volume de amostra de 2 μL foi submetido a uma condição de gradiente da fase móvel, que consiste em uma mistura de água com 0,1% de ácido fórmico (A) e acetonitrila (B), bombeada a uma taxa constante de 0,3 mL min^{-1} . O gradiente foi aplicado da seguinte forma: 0-1 min, 80% A; 1-12 min, 10% A; 12-14 min, 10% A; 14-15 min, 80% A; 15-20 min, 80% A (PRADI *et al.*, 2023).

Para detectar os componentes químicos presentes em cada fração analisada foi utilizado um espectrômetro de massas do tipo quadrupolo ortogonal de tempo de voo (Xevo G2-S Qtof, Waters), equipado com uma sonda de ionização por eletrospray (ESI) no modo de ionização negativa, acoplado ao sistema CLUE.

Os parâmetros de aquisição de massas foram configurados para operar no modo centróide, com um tempo de varredura de 1 segundo e uma faixa de massa de 100-1500 Da. A energia de colisão foi de 6 eV na função 1, subindo de 20 para 35 eV na função 2, em modo de rápida aquisição dependente de dados (Fast DDA – *Fast Data Dependent Acquisition*). Cada ciclo de aquisição de dados incluiu uma m/z referente ao MS¹ acima de um *threshold* de 30000, sendo estes os picos selecionados como precursores para posterior fragmentação. Os espectros MS/MS foram registrados enquanto o *threshold* se manteve acima de 20000. A exatidão de massa foi assegurada durante a aquisição utilizando correção por infusão de um padrão de referência externo (*LockSpray™*), em infusão constante de uma solução de leucina-encefalina (1 ng mL⁻¹, a 20 µL min⁻¹) (GAO *et al.*, 2020).

Nos modos de ionização negativa e positiva utilizou-se uma voltagem de capilar de 3 kV, voltagem de cone amostral de 40 V, voltagem offset de 80 V, temperatura de dessolvatação de 300 °C, temperatura da fonte de 90 °C, fluxo de gás no cone 10 L h⁻¹ e fluxo de gás de dessolvatação de 150 L h⁻¹.

Os extratos hidroalcoólicos derivados das diferentes partes da planta (folhas, cascas e sementes) e dos calos de cotilédones de *P. setacea*, foram submetidos à análise CLUE-ESI-MS descrita acima, foi o mesmo método adotado por Milezzi (2024) na análise de extratos brutos de calos provenientes de nós cotiledonares.

5.2.5.3. Processamento dos dados cromatográficos e espectrométricos para identificação de metabólitos

Para contribuir na identificação dos metabólitos, utilizou-se uma combinação dos softwares MS-DIAL (versão 4.92) e MS-FINDER (versão 3.52). Os dados brutos das análises de FastDDA foram convertidos para o formato padrão de arquivo mzML e importados para o MS-DIAL. O software selecionou as informações conforme as análises realizadas por CLUE-MS e definiu os parâmetros para o processamento e alinhamento dos dados.

A coleta de dados foi obtida com tolerância de 0,02 Da para MS¹ e 0,06 Da para MS². A detecção de picos foi obtida utilizando uma amplitude mínima de 10.000 unidades de intensidade para a altura do pico e uma largura de corte de massa de 0,1 Da. Nos parâmetros de deconvolução, foram utilizados uma janela sigma de 0,5 e um ponto de corte de abundância MS/MS de 30 unidades de amplitude, para garantir a separação precisa dos picos sobrepostos e a identificação correta dos compostos individuais presentes na amostra. Para o processo de alinhamento, utilizou-se o arquivo do branco do solvente como referência. Foi

estabelecida uma tolerância de 0,015 min para o tempo de retenção e de 0,02 Da de tolerância para o MS1. Além disso, foi aplicada a opção de remover características com base nos dados do branco do solvente, garantindo assim que as anotações se referissem exclusivamente às amostras analisadas.

Uma biblioteca espectral disponibilizada pelo MS-DIAL foi integrada por meio de um arquivo de extensão MSP, que inclui compostos únicos ESI (+ e -) -MS/MS (padrões + bio + in silico, totalizando 16.995 compostos únicos em ESI+ e 15.245 compostos únicos em ESI-). Essa biblioteca espectral foi empregada durante o processo de desconvolução e normalização de dados (TSUGAWA *et al.*, 2015).

Após concluir o processamento, picos de íons precursores foram identificados utilizando dois parâmetros contínuos: tempo de retenção (t_R) e razão massa/carga (m/z), onde cada ponto representa um pico detectado. Além disso, diversas informações foram geradas, incluindo uma tabela com valores de m/z , tempo de retenção, tipo de aduto, dados estatísticos e um gráfico de barras que mostra a abundância de cada íon nas amostras analisadas (TSUGAWA *et al.*, 2015).

Os espectros de fragmentação gerados pelo MS-DIAL foram exportados para o MS-FINDER, onde os metabólitos foram identificados através da comparação dos espectros de fragmentação MS/MS com vários bancos de dados (COCONUT, PubChem, UNPD, ChEBI, NANPDB, KNApSAcK, NPA). Para determinar a estrutura mais provável entre os candidatos, foram considerados o valor do score (≥ 5), os fragmentos obtidos e o conhecimento das possíveis classes de compostos presentes na amostra (WANG *et al.*, 2022).

O método utilizado para o processamento dos dados cromatográficos e espectrométricos para a identificação de metabólitos de extratos hidroalcoólicos descrito acima foi o mesmo adotado por Milezzi (2024) na sua análise de calos derivados de nós cotiledonares de *P. setacea*.

5.2.5.4 Análise estatística para interpretação dos dados metabolômicos

Os resultados de alinhamento dos dados processados pelo MS-DIAL de cada grupo amostral (calos de nós cotiledonares e cotilédones) foram correlacionados com os dados de cascas (Ca), folhas (Fo) e sementes (Se). Após serem filtrados pela abundância de íons das amostras em branco, esses dados foram exportados como um arquivo de texto contendo uma matriz de dados brutos (áreas de pico de cada característica, tempo de retenção e nome do composto ou ID).

Foi construído um único arquivo contendo anotação de metabólitos com respectivas intensidades de pico de cotilédone (C) e alinhados com as partes da planta. Cada linha especificou o metabólito e cada coluna sua intensidade em uma determinada amostra. O arquivo foi convertido corretamente para CSV (valores separados por vírgula).

A análise estatística univariada e multivariada realizada pelo *MetaboAnalyst* (versão 5.0) foi utilizada para discriminar metabólitos significativos dos calos de cotilédone (C), em diferentes tempos de cultivo (C30, C60 e C90) em relação aos diferentes tipos de materiais da planta (casca, folhas e sementes). A transformação de raiz quadrada e a escala de Pareto foram aplicadas para a normalização de todos os dados antes de análises posteriores. A análise de componentes principais (PCA) foi aplicada para encontrar os recursos de distribuição do conjunto de dados (*score*, *loading plots* e *K-means*). A análise parcial de mínimos quadrados discriminantes (PLS-DA) foi utilizada para determinar a importância da variável na projeção (VIP) de cada composto. Apenas compostos com valor $p < 0,05$ (teste T de *Student*) e valor $VIP > 1,0$ foram considerados significativamente diferentes entre os grupos (PANG *et al.*, 2021).

Os resultados apresentados no presente trabalho referem-se apenas aos extratos de calos de cotilédones (C) em relação aos diferentes tipos de materiais da planta (casca, folhas e sementes), embora a análise estatística dos dados metabolômicos tenha sido desenvolvida agrupando-se os dados de ambos os calos de *P. setacea*.

Os dados provenientes das partes das plantas (Ca, Se e Fo) foram compartilhados com Millezi (2024) que, em sua pesquisa, utilizou-se do mesmo método para a análise estatística de dados metabolômicos na análise de extratos hidroalcoólicos de calos derivados de nós cotiledonares (NC).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Aspecto morfológico e crescimento das culturas *in vitro* de calos de cotilédones de *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado

6.1.1 Efeito do tempo de cultivo nas características morfológicas dos calos de cotilédones

Os aspectos morfológicos dos calos originados a partir de cotilédones cultivados *in vitro* por 30, 60 e 90 dias estão apresentados na Figura 5 e na Tabela 1. Observa-se que, além dos calos apresentarem estruturas globulares, com o aumento do tempo de cultivo perderam gradualmente a coloração verde-claro, apresentando, nas amostras de 60 dias (C60) seções esbranquiçadas e nas amostras de 90 dias (C90) coloração bege. Quanto à textura, os calos mantiveram-se compactos, exibindo uma consistência rígida e coesa, aspecto sólido e uniforme, e uma notável resistência à desagregação.

As mudanças significativas na coloração podem ser justificadas pelo processo de senescência descrito por Taiz *et al.* (2017). Aos 30 dias, a coloração verde intensa dos calos indica a presença ativa de cloroplastos e síntese de clorofila. No entanto, conforme o tempo de cultivo avança, especialmente aos 60 dias, observa-se o aparecimento de pequenas seções brancas, sugerindo o início da decomposição das clorofilas. Este processo envolve a degradação de componentes da clorofila por enzimas específicas, resultando na formação de produtos solúveis e incolores (TAIZ *et al.*, 2017). Aos 90 dias, a coloração predominantemente bege dos calos indica uma senescência mais avançada, onde a ausência de clorofila confere a cor bege aos calos, os metabólitos incolores resultantes da decomposição da clorofila são exportados para o vacúolo e armazenados permanentemente, enquanto as proteínas associadas são recicladas (TAIZ *et al.*, 2017). Esse processo de senescência é regulado geneticamente e pode ser induzido tanto por sinais de desenvolvimento quanto por estresses abióticos e bióticos, envolvendo mecanismos de autofagia que ajudam a manter a integridade celular até o ponto da morte celular programada (MCP) (TAIZ *et al.*, 2017). Assim, a mudança na coloração dos calos ao longo do tempo pode ser atribuída à degradação progressiva da clorofila e à ativação dos mecanismos de senescência e MCP em resposta à escassez de recursos no meio de cultivo.

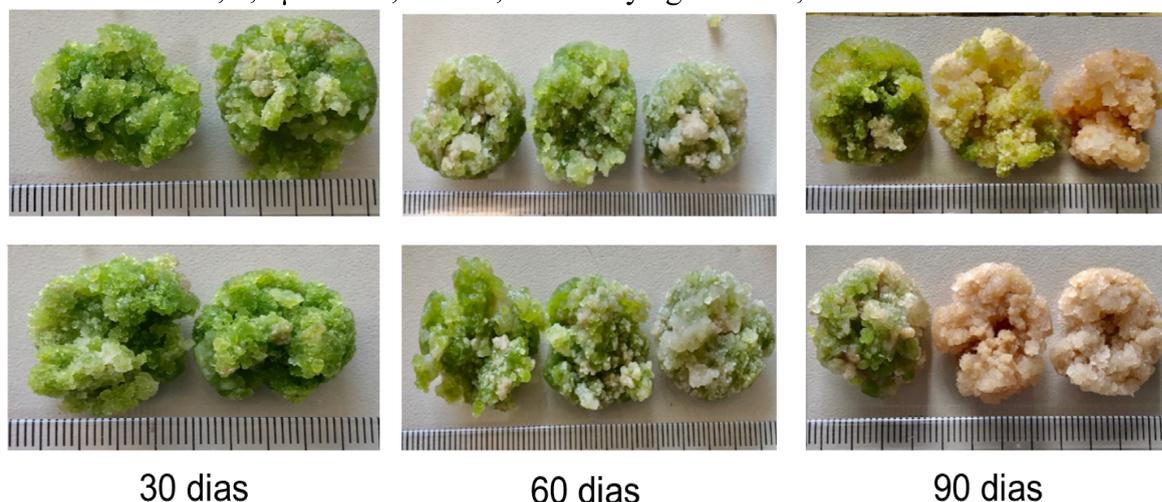
A coloração e a textura dos calos são afetadas diretamente pela concentração de 2,4-D no meio de cultivo. Esta auxina sintética é amplamente utilizada como regulador de crescimento para induzir a desdiferenciação e o desenvolvimento de calos. Werner (2009)

sugere que a coloração esverdeada de calos provenientes de tecidos meristemáticos pode ser um indicativo do início da organogênese. Ele atribui essa coloração à exposição constante à luz, que desencadeia a síntese de pigmentos de clorofila nas células de calos translúcidos.

Contradizendo essa observação, Efferth (2019) afirma que as células de calos embora semelhantes às células meristemáticas não diferenciadas, apresentam apenas pequenos vacúolos e não possuem cloroplastos necessários para a fotossíntese. No entanto, estudos realizados no Laboratório de Biotecnologia Vegetal (BOT/CCB/UFSC), incluindo pesquisas de Sozo (2016), Montagner (2018), Formolo (2019) e Terhaag. (2020) evidenciaram a presença e/ou quantificaram clorofilas e carotenos nos calos de cotilédone e de nós cotiledonares, partir da observação da coloração verde em calos derivados de diferentes explantes da cv. Pérola do Cerrado.

Adicionalmente, Terhaag (2019) cultivou calos de *P. setacea* variando a dosagem de 2,4-D ou ANA e observou que calos derivados de nó cotiledonar tendiam, de modo geral, a apresentar uma coloração verde-escuro e textura friável, enquanto calos de cotilédones apresentaram coloração verde-claro e textura compacta. Esses relatos entram em concordância com os resultados inferidos por Milezzi (2024) que, utilizando explantes de nó cotiledonar de *P. setacea* e os mesmos métodos de cultivo *in vitro* descritos neste trabalho, observou maior suscetibilidade a granulação e textura friável nos calos de 30, 60 e 90. O resultado gerados nessas últimas duas pesquisas citadas são compatíveis com as características morfológicas encontradas no presente trabalho, onde foi possível observar calos com coloração verde-claro e compacta. Devido a essa textura rígida, a maceração dos calos secos em um almofariz com o auxílio de um pistilo foi dificultada, principalmente nos calos de 90 dias. Este fator pode ter influenciado na concentração dos extratos brutos, visto que quão mais macerado o material biológico está, maior é a superfície de contato com o solvente. Dito isso, em futuras pesquisas, é aconselhável a trituração dos calos para maior eficiência da extração.

Figura 5. Aspectos morfológicos de calos derivados de cotilédones de *P. setacea* BRS Pérola do Cerrado cultivados em meio de cultura Murashige & Skoog suplementado com 88,5 mM de sacarose, 2,5 μ M de 2,4-D e 0,2% de Phytigel aos 30, 60 e 90 dias de cultivo.



Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 1. Efeito do tempo de cultivo no aspecto dos calos de cotilédone de *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado após 30, 60 e 90 dias em meio de cultura Murashige & Skoog suplementado com 88,5 mM de sacarose, 2,5 μ M de 2,4-D e 0,2% de Phytigel.

Tempo de cultivo (dias)	Coloração	Textura
30	Verde-claro	Compacto
60	Verde-claro	Compacto
90	Bege	Compacto

Fonte: Elaborado pela autora.

6.1.2 Efeito do tempo de cultivo no crescimento dos calos de cotilédones

Os resultados da Tabela 2, expressos graficamente na Figura 6, ilustram o efeito do tempo de cultivo no crescimento dos calos de *P. setacea* originados a partir de segmentos de cotilédone. De acordo com EFFERTH (2019), a literatura evidencia que as fases do ciclo de crescimento dos calos influenciam os processos de diferenciação celular e dos perfis dos metabólitos produzidos.

Os dados da Tabela 2 indicam que o tempo de cultivo afetou significativamente os parâmetros de crescimento dos calos de cotilédone. Os calos com 60 dias de cultivo apresentaram os maiores valores de massa fresca e massa seca (2919,8 mg/calor e 113 mg/calor, respectivamente enquanto os calos com 30 dias de cultivo mostraram o maior valor de razão massa seca/massa fresca (0,054 mg de massa seca/mg de massa fresca) e menor teor

de água (94,6%). Os valores de massas fresca e seca e a razão massa seca/massa fresca diminuíram significativamente nos calos com 90 dias de cultivo em relação aos demais tempos de cultivo, sendo que o teor de água foi significativamente maior (96,8%).

Considerando-se que inicialmente foram inoculadas 300 mg de massa fresca, correspondentes a 15,8 mg de massa é possível concluir que nos primeiros 30 dias de cultivo o aumento em massa fresca e em massa seca dos calos de cotilédone foi de 6,7 vezes, enquanto entre 30 e 60 dias esses valores aumentaram apenas 1,5 e 1,1 vezes. Esses dados indicam que os maiores incrementos em massa fresca e seca ocorreram nos primeiros 30 dias de cultivo, com os calos desacelerando muito o crescimento entre 30 e 60 dias de cultivo.

Os dados da Tabela 2 demonstram que a massa fresca aumentou inicialmente, atingindo o pico aos 60 dias, seguido de uma redução aos 90 dias. O aumento do crescimento entre o período inicial e os primeiros 30 dias de cultivo indica um período de crescimento ativo, enquanto a diminuição em C90 sugere um possível início de senescência ou limitações de recursos. Da mesma forma, o maior valor de massa seca foi observado aos 60 dias, indicando a fase de maior acúmulo de biomassa, mas com a desvantagem de que o aumento do teor de água nos calos reduziu significativamente a razão massa seca/massa fresca. A redução da massa seca de 60 para 90 dias de cultivo foi consideravelmente maior em comparação com os demais tempos de cultivo. A diminuição da massa seca está relacionada com a senescência e a degradação dos compostos acumulados pelas células na fase mais ativa do crescimento.

Como exposto na Tabela 2, a diminuição da razão massa seca/massa fresca ao longo do tempo indica que os calos diminuíram a massa seca e acumularam progressivamente mais água, especialmente após os 60 dias, em relação à produção de biomassa. Portanto, é possível observar que o teor de água foi maior conforme o aumento do tempo de cultivo.

O coeficiente de Pearson (r) mede a força e a direção da relação linear entre a massa fresca e a massa seca. Durante o período inicial (30 dias) e final (90 dias) de cultivo, observou-se uma correlação positiva e forte, indicando que a massa fresca e a massa seca aumentaram proporcionalmente. Aos 60 dias de cultivo, essa correlação foi menos acentuada em comparação com os períodos de 30 e 60 dias de cultivo, sugerindo uma maior retenção de água em relação à produção de biomassa nesse período.

A análise de regressão linear, apresentada na Figura 7 mostra as equações das retas e os valores de R^2 (coeficientes de determinação que corresponde ao valor do coeficiente de correlação de Pearson r^2) foram de 0,5046; 0,3318 e 0,5848, respectivamente para os calos de 30, 60 e 90 dias de cultivo. Quando os valores de R^2 são multiplicados por 100 expressam as

porcentagens de dados, em que a variação na massa fresca pode ser explicada pela função linear da massa seca (GOMEZ & GOMEZ, 1984).

Esses valores indicam que nos calos de 60 dias de cultivo apenas 33,18% da variação na variável massa fresca pode ser explicada pela função linear com a variável massa seca, o que significa que em apenas em 33,18% dos calos o incremento em massa fresca esteve ligado ao incremento linear correspondente em massa seca. Em 66,82% dos calos com 60 dias de cultivo a variação em massa fresca não correspondeu ao aumento linear em massa seca. Isso pode ser observado no gráfico da Figura 7 de 60 dias de cultivo, em que a maioria dos pontos estão mais dispersos ao redor da linha reta pontilhada, se afastando da reta, indicando que muitos calos aumentaram muito em massa fresca, mas pouco em massa seca e vice-versa, não apresentando correlação linear forte entre os dois parâmetros. Já no caso dos gráficos de 30 e 90 dias os pontos aparecem mais agrupados próximos à reta e nesses casos, entre todos os calos analisados em cada tempo de cultivo, 50,46% (30 dias) e 58,48% (90 dias) deles a variação em massa fresca pode ser explicada pela função linear com a massa seca. Considerando que a massa fresca é composta pela massa seca e água, é importante destacar que a correlação positiva não necessariamente reflete num aumento da massa seca, mas pode ocorrer devido ao aumento da absorção de água pelas células.

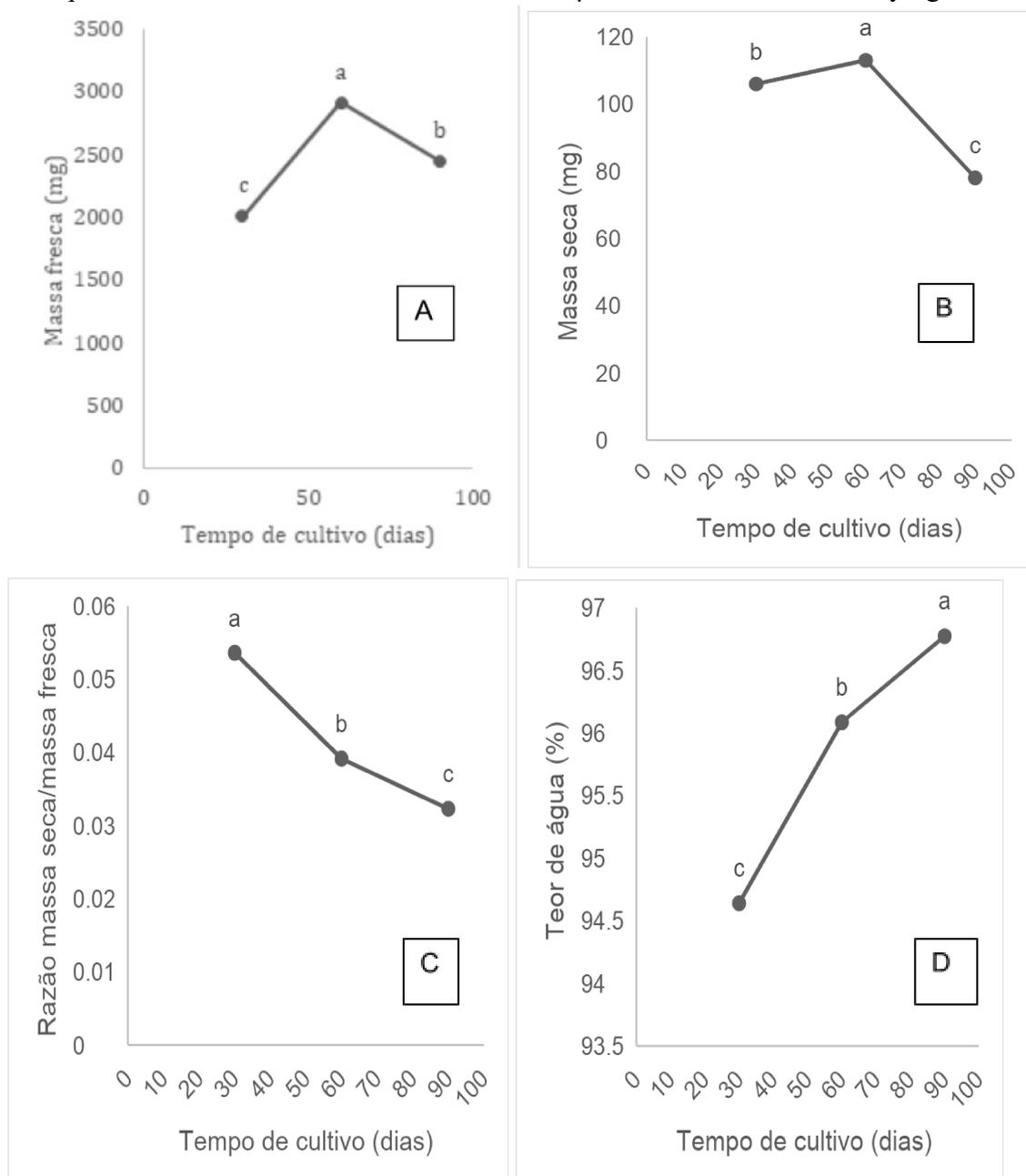
Tabela 2. Efeito do tempo de cultivo no crescimento dos calos de cotilédone de *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrados cultivados por 30, 60 e 90 dias em meio de cultura Murashige & Skoog suplementado com 88,5 mM de sacarose, 2,5 μ M de 2,4-D e 0,2% de Phytigel.

Tempo de cultivo (dias)	Massa fresca (mg)*	Massa seca (mg)*	Razão massa seca/massa fresca*	Teor de água (%)*	Coefficiente de Pearson (r)
30	2016.6 \pm 383.1c	106 \pm 3.5b	0.054 \pm 0.008a	94.6 \pm 0.8c	0.710
60	2919.8 \pm 446.3a	113 \pm 16.1a	0.039 \pm 0.006b	96.1 \pm 0.6b	0.576
90	2452.9 \pm 455.9b	78 \pm 0.2c	0.032 \pm 0.004c	96.8 \pm 0.4a	0.764

Fonte: Elaborado pela autora.

*Média \pm desvio padrão (n = 23-86 repetições por tratamento) seguidas por letras diferentes, na mesma coluna, diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

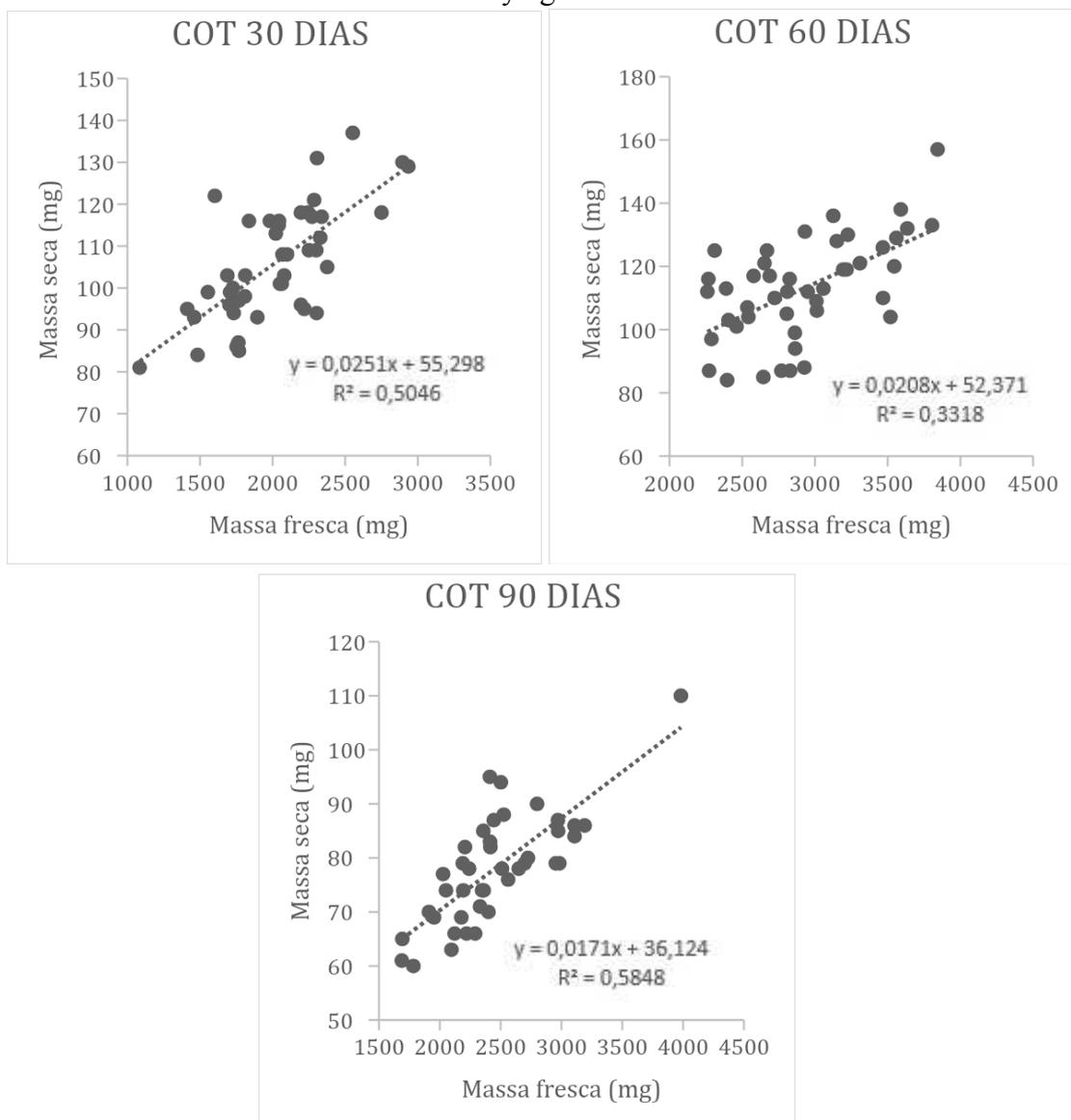
Figura 6. Variações na massa fresca (A), massa seca (B), razão massa seca/massa fresca (C) e teor de água (D) dos calos derivados de segmentos de cotilédones da *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado aos 30, 60 e 90 dias de cultivo em meio de cultura Murashige & Skoog suplementado com 88,5 mM de sacarose, 2,5 μ M de 2,4-D e 0,2% de Phytigel.



Valores são médias \pm desvio padrão de 23-86 repetições por tratamento. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas entre os tempos de cultivo pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 7. Análise de regressão linear entre massa fresca e massa seca de calos de cotilédones de *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado cultivados por 30, 60 e 90 dias em meio de cultura Murashige & Skoog suplementado com 88,5 mM de sacarose, 2,5 μ M de 2,4-D e 0,2% de Phytigel.



Fonte: Elaborado pela autora.

6.2 Análise por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas (CLUE-ESI-EM)

6.2.1 Rendimento dos extratos brutos de *Passiflora setacea* BRS Pérola do Cerrado

Os extratos hidroalcoólicos de folhas (Fo), cascas (Ca), sementes (Se) e calos de cotilédone de *P. setacea* aos 30 (C30), 60 (C60) e 90 (C90) dias de cultivo foram obtidos utilizando solução 70% etanol:água. O rendimento (%) de cada material foi calculado a partir

da razão massa do extrato bruto/massa seca inicial multiplicada por 100 (extrato bruto/massa seca inicial x100). É possível observar na Tabela 4 que, entre as partes da planta, as folhas apresentaram o maior rendimento (65%), seguidas pelas cascas (53%) e as sementes (42%). Em relação aos calos, a condição C90 resultou no maior rendimento (70%). As condições C30 e C60 apresentaram rendimentos próximos, de 34% e 37%, respectivamente. Os calos obtidos a partir de segmentos de cotilédones cultivados por 90 dias (C90) apresentaram o maior rendimento entre todos os materiais biológicos utilizados no presente trabalho, dentro das condições de cultivo e extração descritas.

Tabela 3. Valores de massas utilizados na extração e obtidos para os extratos brutos de folhas, cascas, sementes e de calos de cotilédone de *Passiflora setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado cultivados por 30, 60 e 90 dias em meio de cultura Murashige & Skoog suplementado com 88,5 mM de sacarose, 2,5 μ M de 2,4-D e 0,2% de Phytigel.

Parâmetros	Folhas	Cascas	Sementes	Calos		
				C30	C60	C90
Massa seca inicial (g)	187,89	58,14	18,16	4,65	5,17	3,20
Massa do extrato bruto (g)	121,17	30,76	7,64	1,57	1,87	2,24
Rendimento (%)	65	53	42	34	37	70

Fonte: Elaborado pelo autor.

6.2.2 Cromatogramas e perfis químicos obtidos por análise CLUE-ESI-EM dos extratos de folhas, cascas, sementes e calos de cotilédone de *P. setacea*

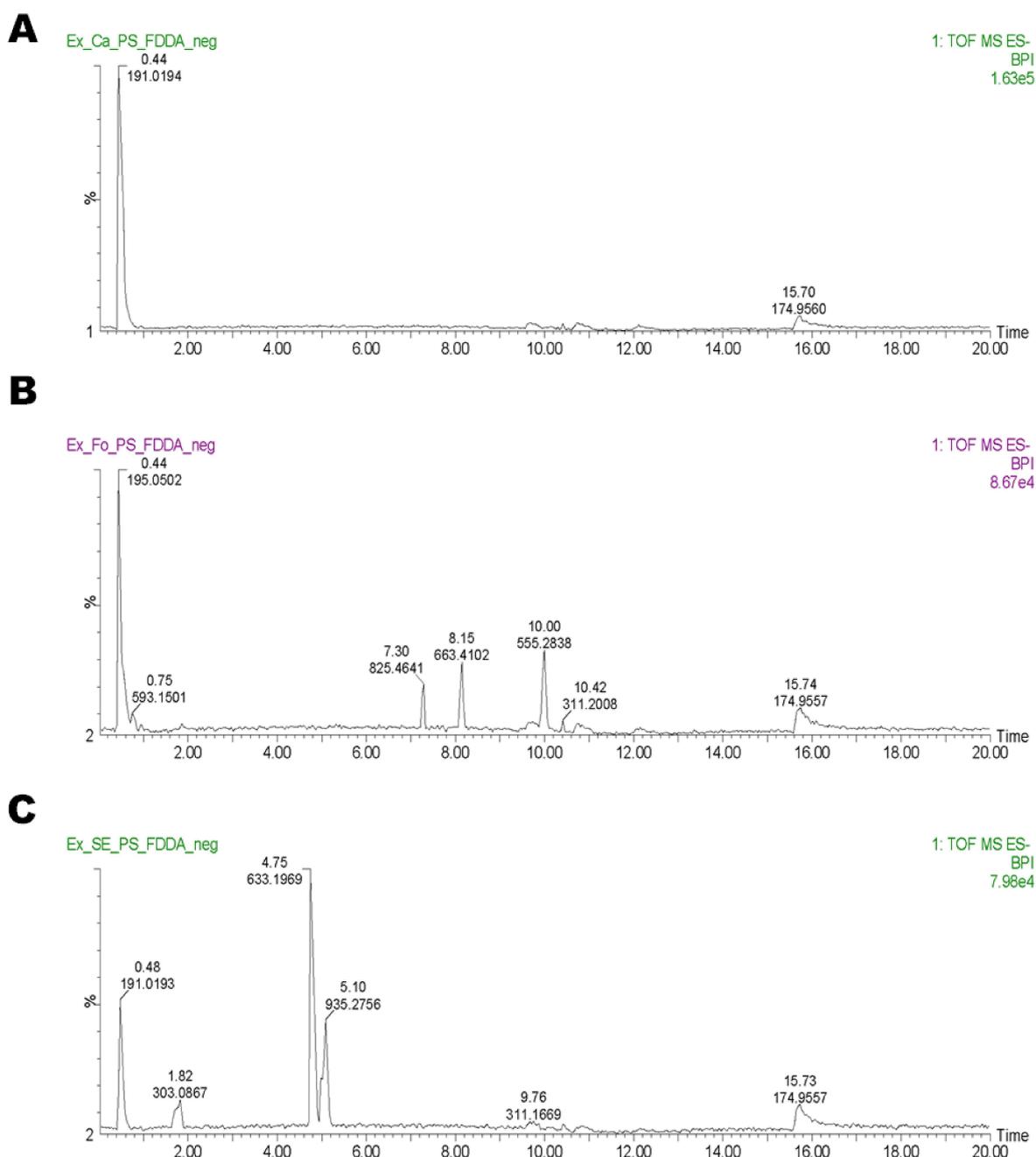
Os extratos hidroalcoólicos obtidos a partir das Folhas (Fo), cascas (Ca), sementes (Se) e dos calos de cotilédone de *P. setacea* cultivados *in vitro* no período de 30, 60 e 90 dias (C30, C60, C90) da espécie *P. setacea* BRS-PC foram submetidos à análise pelo método CLUE-ESI-MS, que gerou os cromatogramas e os perfis químicos dos compostos identificados nos extratos. O método consiste na separação cromatográfica dos componentes das amostras e, por espectrometria de massas, detecção dos metabólitos ionizados no modo negativo e positivo.

Devido à baixa concentração de metabólitos nos extratos hidroalcoólicos, o processo de ionização e aquisição de dados em modo positivo não gerou informação suficiente para a anotação de metabólitos. Os dados apresentados e discutidos a seguir correspondem ao refinamento de íons gerados e detectados em modo negativo.

Na Figura 8 (A, B, C), estão representados os cromatogramas dos extratos brutos das folhas (Fo), cascas (Ca) e sementes (Se) de *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrados. Os cromatogramas possibilitam a avaliação das classes químicas predominantes nos extratos,

onde foram detectados ácidos orgânicos de cadeia curta, lipídeos e açúcares. Além dessas classes, também foram identificados flavonoides, terpenos e glicolipídeos no extrato bruto de folhas (Figura 8B). Embora também apresente flavonoides, o extrato de sementes (Figura 8C) mostrou-se o menos representativo em termos de diversidade de classes químicas de metabólitos, enquanto o extrato de folhas apresentou-se mais representativo.

Figura 8. Cromatogramas obtidos em modo de ionização negativa de extratos brutos de cascas de frutos (A), folhas (B) e sementes (C) de *P. setacea* cv. Pérola do Cerrado mostrando a distribuição dos metabólitos majoritários.



Fonte: Elaborado pela autora.

A Tabela 4 mostra os perfis químicos dos metabólitos identificados nos extratos de folhas (Fo), cascas (Ca), sementes (Se) e de calos de cotilédone de *P. setacea* de 30 dias (C30), 60 dias (C60) e 90 (C90) dias de cultivo. Os metabólitos estão dispostos na ordem de tempo de retenção (min) e o erro de massa (ppm) é calculado com base na proporção de isótopos conhecidos de cada molécula. Os dados apresentados e discutidos a seguir referem-se ao refinamento dos íons gerados e identificados apenas no modo negativo. O processo de ionização e aquisição de dados em modo positivo não forneceu informações suficientes para descrição de metabólitos, devido à baixa concentração destes nos extratos hidroalcoólicos.

A Hexose detectada no t_R 0.44 min e m/z 179.055, foi encontrada nos três extratos de partes da planta (Ca, Fo, Se), mas não nos extratos dos calos derivados de cotilédones (C). De acordo com a literatura, os açúcares hexose presentes nas plantas desempenham diversas funções, incluindo a síntese de ácido ascórbico. O ácido ascórbico atua como um cofator enzimático essencial, contribuindo para o metabolismo das plantas e suas respostas a estresses abióticos e patógenos (ISHIKAWA *et al.*, 2006). Maiores detalhes sobre os perfis de metabólicos de cada material vegetal serão discutidos nos itens subsequentes de 6.2.2.1 a 6.2.2.4.

Os dados referentes aos extratos hidroalcoólicos provenientes de Fo, Ca e Se foram compartilhados com a pesquisa de Milezzi (2024), que utilizou esse conjunto de dados para comparar com os perfis dos extratos de calos de nó cotiledonar de *P. setacea*, cultivados pelos mesmos períodos que os calos de cotilédone. A relação entre as duas pesquisas foi importante, pois melhorou a compreensão da dinâmica do crescimento e metabolismo de ambos os tipos de calos e o potencial de cada um deles na produção de metabólitos produzidos pelas folhas, cascas e sementes.

Tabela 4. Metabólitos identificados por CLUE-ESI-MS nos extratos hidroalcoólicos brutos de folhas (Fo), cascas de frutos (Ca), sementes (Se) e calos de cotilédone de *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado cultivados por 30 (C30), 60 (C60) e 90 (C90) dias em meio de cultura Murashige & Skoog suplementado com 88,5 mM de sacarose, 2,5 µM de 2,4-D e 0,2% de Phytigel.

(continua)

Tempo de retenção (min)	m/z	Erro de massa (ppm)	Precursor	Identidade do metabólito	MS/MS	Fórmula molecular	Amostra	MS -DIAL score	MS -FINDER score	Referências	Bases de dados de massas
0.44	35.029	1.84	M-H]-	Trihydroxy-butanoic acid	-	C ₄ H ₈ O ₅	Fo, C30	100	-	El-Akad et al., 2023	
0.44	165.04	-1.9	[M-H]-	D-ribonic acid	-	C ₅ H ₁₀ O ₆	Fo, C30, C60	-	-	Kang et al., 2019	
0.44	179.055	-1.75	[M-H]-	Hexose	-	C ₆ H ₁₂ O ₆	Ca, Fo, Se	100	-	Adomèniènè et al., 2022	
0.44	193.035	0.74	[M-H]-	Glucuronic acid	-	C ₆ H ₁₀ O ₇	Ca, Se, C30, C60	100	-	Huang et al., 2018; Wittschier et al., 2009	
0.44	195.05	4.2146	[M-H]-	Galactonic acid ou Gluconic acid	-	C ₆ H ₁₂ O ₇	Fo	100	5.66	Bakar et al., 2023; Thirugnanasambantham et al., 2015	HMDB, KNApSAcK, ChEBI, DrugBank, YMDB, T3DB
0.44	265.056	-0.4	[M-H]-	Monoglyceride citrate	-	C ₉ H ₁₄ O ₉	Ca	95.2	-	Silva et al., 2023	
0.443	146.046	1.83	[M-H]-	Glutamic acid	-	C ₅ H ₉ NO ₄	C60	100	-	(Oladeji & Oyebamiji, 2020)	
0.478	191.019	0.4261	[M-H]-	Citric acid	111.009	C ₆ H ₈ O ₇	Se	84.1	7.63	Bakar et al., 2023; Olennikov et al., 2004	HMDB, KNApSAcK, ChEBI, DrugBank

(continuação)

Tempo de retenção (min)	m/z	Erro de massa (ppm)	Precursor	Identidade do metabólito	MS/MS	Fórmula molecular	Amostra	MS -DIAL score	MS -FINDER score	Referências	Bases de dados de massas
0.482	135.029	0.75	[M-H]-	L-threonic acid	-	C ₄ H ₈ O ₅	C30	100		Helsper & Loewus, 1982	
0.482	290.088	-0.25	[M-H]-	N-Fructosyl pyroglutamate	128.035	C ₁₁ H ₁₇ NO ₈	C30, C60	100	-	Adoménienè et al., 2022; El-Akad et al., 2023	
0.517	129.019	4	[M-H]-	Mesaconic acid	-	C ₅ H ₆ O ₄	Fo, C30	-	-	Buston, 1928	
0.555	205.035	1.82	[M-H]-	Homocitric acid	-	C ₇ H ₁₀ O ₇	Ca, Fo	100	-	El-Akad et al., 2023	
0.557	117.019	-2	[M-H]-	Succinic acid	-	C ₄ H ₆ O ₄	Ca, Fo, C30, C90	100	-	Liu et al., 2023; Lu et al., 2021	
0.597	189.076	1.01	[M-H]-	Hydroxysuberic acid	-	C ₈ H ₁₄ O ₅	Ca, Fo, C30	100	-	Iwanami, 1980	
0.599	173.082	1.25	[M-H]-	Suberic acid	-	C ₈ H ₁₄ O ₄	Ca, Fo, C30	100	-	Iwanami, 1980	
0.787	593.151		[M-H]-	NI (1)	-	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	Fo	100	-	-	
0.825	563.14	-0.23	[M-H]-	Isoschaftosídeo	353.072	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	Fo	100	-	Pinto, 2018	
1.786	303.087		[M-H]-	O-Methyl-epicatechin	-	C ₁₆ H ₁₆ O ₆	Se	-	-	Vivas, 2020	
2.15	187.097	0.78	[M-H]-	Azelaic acid	-	C ₉ H ₁₆ O ₄	C30, C60	100	-	El-Akad et al., 2023	
4.75	633.197	-0.57	[M-H]-	Flavonoid (Sabian)	1267.398 44 [2M-H]	C ₃₄ H ₃₄ O ₁₂	Se	85.2	5.02	Deng et al., 2005	No record
4.75	701.184		[M-H]-	NI (3)	-	null	Se	null	-	-	
4.941	283.145	0.17	[M-H]-	NI (4)	-	C ₁₇ H ₂₀ N ₂ O ₂	C30	100	-	-	
5.058	935.275		[M-H]-	NI (5)	1003.26	-	Se	null	-	-	
5.174	1237.35		[M-H]-	NI (6)	-	null	Se	null	-	-	

(conclusão)

Tempo de retenção (min)	m/z	Erro de massa (ppm)	Precursor	Identidade do metabólito	MS/MS	Fórmula molecular	Amostra	MS -DIAL score	MS -FINDER score	Referências	Bases de dados de massas
5.251	329.232	-0.97	[M-H]-	FA 18:1+3O	-	C ₁₈ H ₃₄ O ₅	C30, C60	100	-	Pinto, 2018	MassBank
7.298	825.464	0.56	[M-H]-	Astragaloside II	-	C ₄₃ H ₇₀ O ₁₅	Fo	100	-	Ma et al., 2002	
8.146	663.41	-0.9	[M-H]-	Cycloartane Glycosides	-	C ₃₇ H ₆₀ O ₁₀	Fo	99.6	-	Perera et al., 2021	
9.997	555.284	-0.2	[M-H]-	Sulfoquinovosy II monoacylglycerol (SQMG)	-	C ₂₅ H ₄₈ O ₁₁ S	Fo	99.9	-	Conde et al., 2021; da Costa et al., 2018	
11.71	271.227	-0.55	[M-H]-	Hydroxy hexadecenoic acid	-	C ₁₆ H ₃₂ O ₃	C60, C90	100	-	Adoménienè et al., 2022	

Fonte: Elaborado pela autora

6.2.2.1 Análise do perfil químico de extrato bruto de cascas de *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado

No extrato das cascas foi encontrado vários ácidos orgânicos diretamente envolvidos no ciclo de Krebs, como ácido homocítrico e succínico, (TAIZ *et al.*, 2017). O ácido homocítrico é um intermediário da via metabólica que leva à produção do ácido cítrico, um importante precursor no Ciclo de Krebs ou Ciclo do ácido cítrico.

Do ácido cítrico depende a produção de vários compostos intermediários do Ciclo de Krebs, como o alfa-cetoglutarato, que leva à produção de alfa-oxoglutarato e succinato (forma ionizada do ácido succínico), essenciais para a formação do malato e oxaloacetato. O alfa-cetoglutarato é precursor do ácido glutâmico e de vários compostos como clorofilas, glutamina e outros aminoácidos e o oxaloacetato é precursor de asparagina, ácidos nucleicos, aminoácidos e alcaloides (TAIZ *et al.*, 2017).

O ácido homocítrico que, em estudos anteriores, foi relatado em folhas e frutos de *Vanilla planifolia* (PALAMA *et al.*, 2010). Esse composto, entre outros ácidos orgânicos, é investigado como agente quelante natural para fitorremediação eficiente. O ácido homocítrico atua como um componente do cofator ferro-molibdênio de certas proteínas da nitrogenase, enzima presentes em microrganismos fixadores de nitrogênio da atmosfera (KAUSHIK, 2015). O ácido cítrico pode atuar como agente quelante de metais pesados, através da regulação do mecanismo de defesa antioxidante, modulando as enzimas e estimulando a produção de compostos que conferem proteção aos danos causados pelo estresse oxidativo induzido pelo acúmulo de metais pesados (KHATUN *et al.*, 2019).

Outro ácido orgânico detectado no extrato de cascas é o ácido succínico, um metabólito intermediário no ciclo do ácido cítrico, formado a partir do ácido alfa-cetoglutarico e do succinil-CoA, que atua como precursor na biossíntese do cofator FADH₂, crucial para a cadeia respiratória e a produção de energia (TAIZ *et al.*, 2017). Proposto como um marcador de deficiência de ferro (Fe), é facilmente convertido no ciclo de Krebs em ácido málico, que desempenha funções como regulação do pH e promoção do equilíbrio osmótico no vacúolo celular (SAAVEDRA *et al.*, 2022).

O ácido glucurônico, presente neste extrato, é sintetizado a partir do mio-inositol, desempenham um papel essencial na formação da parede celular (TOZZI, 2014). Além disso, é precursor do ácido L-ascórbico, que atua como um antioxidante predominante nas plantas (LOEWUS, 1999). O inositol dá origem ao ácido D-glucurônico, que posteriormente se transforma em ácido UDP-D-glucurônico, precursor do ácido galacturônico (REBOUL *et al.*,

2011), responsável pela formação da pectina, um composto utilizado como espessante e geleificante na indústria de alimentos e abundante na casca do maracujá amarelo (ZHANG *et al.*, 2023). Um estudo com *P. edulis* observou um aumento coordenado nos níveis de ácido glucurônico, assim como de açúcares e aminoácidos, durante as mudanças vegetativas das folhas, sugerindo uma função importante no desenvolvimento da planta (SILVA, 2017).

Também foram detectados ácidos graxos de cadeia média (hidroxissubérico e subérico), e o monoglicerídeo citrato encontrado apenas no extrato das cascas, com tempo de retenção de 0.44 min e íon precursor m/z 265.056. Em geral, considerando-se os metabólitos identificados à nível de classe, os ácidos graxos desempenham funções estruturais e regulatória na defesa a estresses abióticos e bióticos, bem como na reserva de carbono e energia em triacilgliceróis (TAGs) (HE *et al.*, 2020). As funções estruturais que desempenham estão relacionadas com a biossíntese de suberina, componente das paredes celulares para proteção de cascas e folhas contra ataques de patógenos e protegendo contra desidratação.

Um estudo com camundongos propôs que o ácido subérico é um agente promissor no tratamento do fotoenvelhecimento da pele, pois atenuou genes relacionados à produção de colágeno e ácido hialurônico (KANG *et al.*, 2019). Outra pesquisa testou o ácido subérico na ativação do receptor olfativo OR10A3, amenizando os efeitos do UVB sobre a produção de colágeno, reforçando sua relevância no tratamento anti-envelhecimento da pele (KANG *et al.*, 2022).

6.2.2.2 Análise do perfil químico de extrato bruto de folhas de *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado

No extrato de folhas (Figura 8B, Tabelas 4 e 6)) também foram identificados ácidos orgânicos, tais como ácidos trihidroxi-butanóico, D-ribônico, mesacônico, homocítrico, succínico, hidroxissubérico e subérico.

Além desses compostos, foi detectado, apenas neste extrato, um ácido orgânico com fórmula molecular $C_6H_{12}O_7$, possivelmente um ácido galactônico ou glucônico, porém, devido à isometria do composto não foi possível confirmar a estrutura exata (BAKAR *et al.*, 2023; THIRUGNANASAMBANTHAM *et al.*, 2015). A estes ácidos, pode-se conferir a propriedade ácida das frutas, portanto são utilizados na indústria alimentícia como um aditivo acidificante. Além de possuírem propriedades similares, podem ser precursores do ácido ascórbico (vitamina C), uma vez que estudos demonstram que a sua biossíntese ocorre através do ácido D-galacturônico (AGIUS *et al.*, 2003; STOCK, 2013). O ácido L-ascórbico está

presente nos cloroplastos e citosol de células vegetais, onde atua como um importante antioxidante e cofator enzimático. Ele regula vários processos fisiológicos, incluindo tolerância ao estresse, crescimento, desenvolvimento e transdução de sinais nas plantas (YOSHIMURA & ISHIKAWA, 2017).

Quanto ao ácido glucônico, a ausência de toxicidade aprova seu uso alimentar. Além disso, a estabilidade, resistência à esterilização e alta solubilidade dos sais de gluconato garantem uma alta concentração de íons desejados, tornando-os eficazes e seguros para uso medicinal e aplicação farmacêutica (MATTEY, 1992).

Quanto ao ácido ribônico, o composto também é relatado em extratos de *Pentas lanceolata* (Rubiaceae) (MURAVNIK *et al.*, 2014) e em soja (*Glycine max*), exposta a estresse hídrico (MESQUITA, 2013). THANDIVEL *et al.* (2024) investigaram o potencial de compostos presentes em *Catunaregam spinosa* como inibidores de acetilcolinesterase como alternativa ao tratamento de Alzheimer. O neurotransmissor acetilcolina (ACh), essencial para a memória e a função cognitiva, é hidrolisada pela enzima acetilcolinesterase (AChE), resultando em uma redução nos níveis de acetilcolina e encolhimento do cérebro. Portanto, visando aumentar a neurotransmissão colinérgica e aliviar o declínio cognitivo, o estudo identificou, entre fitoconstituintes que mais mostraram potencial como inibidores potentes de AChE, foi o ácido butanóico e ácido D-(+)-ribônico.gama-lactona. O ácido butanóico é conhecido no tratamento de doenças do cólon, além disso, dados preliminares sugerem possíveis aplicações em patologias hematológicas, metabólicas e neurológicas (SOSSAI, 2012). Por último, entre os ácido orgânicos detectados, o ácido mesacônico foi encontrado no extrato das folhas, também relatado em folhas de repolho em estudos antigos (BUSTON, 1928).

Além dos compostos da classe de ácidos orgânicos, pode-se identificar flavonoides, detectados apenas no extrato de folhas, como o isoschaftosídeo, terpenos como o astragalosídeo II e cicloartano glicosídeos e o glicolípido sulfoquinovosil monoacilglicerol (SQMG). Esses compostos foram detectados somente no extrato das folhas, o flavonóide com tempo de retenção 0.825 min e íon precursor m/z 563.14, o terpeno com t_R 7.298 min e íon precursor de m/z 825.464, e os glicosídeos em t_R 8.146 min e t_R 9.997 min com íon precursor de m/z 663.41 e m/z 555.284, respectivamente.

O isoschaftosídeo, um flavonóide C-glicosil conhecido por promover proteção hepática, foi também relatado em raízes de *Desmodium uncinatum* e *Abrus cantoniensis* (GUAN *et al.*, 2022). Estudos anteriores relataram que os flavonoides atuam na defesa contra raios ultravioletas e ataque de patógenos, no controle da ação de hormônios vegetais e na

atração de polinizadores. O flavonoide isoschaftosídeo já foi identificado na espécie de *Passiflora alata* e *Passiflora edulis f. flavicarpa* (DE CARVALHO, 2016; PINTO, 2018), bem como em folhas de *Passiflora incarnata* (ABOURASHED *et al.*, 2002). Para além dos relatos em passifloras, o flavonóide em questão, também foi encontrado nas raízes de *Desmodium uncinatum* e atua como inibidor alelopático do desenvolvimento do parasita *Striga hemonthica*, uma erva daninha parasita que pode devastar culturas de milho (HOOPER *et al.*, 2010). Adicionalmente, o isoschaftosídeo, isolado de extratos de *Syngonium podophyllum*, é proposto como um metabólito potencial para o tratamento da hipertensão. (GOMES *et al.*, 2014). Além disso, Chen *et al.* (2024) analisaram frações solúveis aquosas de extratos de *Artemisia argyi* e identificaram diversos metabólitos, incluindo o isoschaftosídeo, que inibiram significativamente a produção de óxido nítrico e a superexpressão de fatores inflamatórios em culturas de células de macrófagos de ratos.

Os terpenos são conhecidos pelas propriedades anti-inflamatórias, hepatoprotetora, sedativa, antioxidante, antialérgica, antiangiogênica e anticancerígena (SILVA *et al.*, 2020). Pesquisas anteriores identificaram o composto 'passiflorina', uma saponina glicosídica triterpênica derivada do núcleo cicloartano, inicialmente em folhas de *P. edulis* e, posteriormente, em folhas de *P. quadrangularis* e *P. mollissima* (COSTA, 2013). Estudos prévios de *P. setacea* também identificaram terpenos presentes na planta, e conferiram a esses compostos voláteis um sabor com notas florais (DE PAULA *et al.*, 2015). Além disso, é conferido aos terpenos a defesa das plantas contra micro-organismos, o que tem relação com sua atividade antibacteriana (RIZWANA *et al.*, 2019). Os terpenos, especialmente as saponinas triterpenóides, são compostos funcionais importantes na planta do maracujá. Alguns triterpenos e suas saponinas foram isolados das folhas e caules de *P. edulis*, com relatos de que alguns triterpenóides cicloartanos possuem efeitos semelhantes aos antidepressivos, sugerindo seu potencial uso no tratamento de doenças neurodegenerativas (XU *et al.*, 2016 ; XU YI *et al.*, 2023).

Um estudo identificou a presença de triterpenóides tipo cicloartano em própolis provenientes de Teresina, Piauí (PI), anteriormente apenas relatado em *Mangifera indica*, sugerindo a sua correlação com as abelhas. Essas substâncias presentes no própolis apresentam diversas atividades farmacológicas, tais como anti-inflamatória, antiviral e antitumoral (SILVA *et al.*, 2005).

O astragalosídeo II, já relatado em *Astragalus membranaceus*, tem demonstrado significativos benefícios para o sistema imunológico. Estudos recentes mostraram que o composto é associado à regulação de enzimas específicas que ativam a proliferação de células

T e estimulam a secreção de importantes citocinas. Além disso, estudos com animais demonstraram que a administração de astragalosídeo II restaurou a função imunológica em condições de imunossupressão (WAN *et al.*, 2013). Estudos anteriores destacaram que o astragalosídeo II possui a capacidade de reparar a barreira epitelial após lesões intestinais, indicando um potencial terapêutico promissor para o tratamento da doença do intestino irritável e para o alívio da colite (LEE *et al.*, 2017).

O glicosulfolípídeo sulfoquinovosil monoacilglicerol (SQMG), formado por uma molécula de açúcar sulfoquinovose ligada a uma molécula de ácido graxo, o monoacilglicerol, com t_R 9.997 min e íon precursor de m/z 555.284, respectivamente, foram detectados somente no extrato das folhas. Esse glicolípídeo sulfatado SQMG foi estudado como um supressor do crescimento de células cancerígenas e um agente antitumoral promissor (HANASHIMA *et al.*, 2000; MURAKAMI *et al.*, 2004). O SQMG apresenta capacidade de inibir as DNA polimerases replicativas, quando checkpoints são ativados no ciclo celular em respostas ao estresse genotóxico induzido pelo ambiente. Sua habilidade de bloquear a transição da fase G1 para S induz apoptose por uma via distinta dos agentes tradicionais, destacando seu potencial antitumoral (MURAKAMI *et al.*, 2003). Além disso, estudos anteriores investigaram o potencial do α -SQMG para melhorar a eficácia da radioterapia e remodelar o microambiente tumoral, porém ainda é necessário maior investigação antes da aplicação clínica (OHTA *et al.*, 2010).

Jala *et al.* (2022) relatam trabalhos em que o uso de SQMG sintéticos suprimiu significativamente o crescimento de tumores sólidos como as células A-549 do adenocarcinoma de pulmão humano e potente inibidor da DNA polimerase e potente agente antineoplásico contra linhagens celulares de câncer gástrico NUGC3 e foi demonstrado que o efeito antitumoral do SQMG pode ter sido devido a impactos anti-angiogênicos. Esses autores também reportam vários artigos em que o SQDG exibiu potente atividade antiviral contra o HIV, antitumoral e anti-inflamatória ressaltando que vários tipos de SQDGs identificados em cianobactéria exibiram atividade antiviral e a alga vermelha *Gigartina tenella* e a pteridófito *Athyrium niponicum* inibiram a DNA-polimerase e a HIV-transcriptase reversa enquanto que SQDG de *Spinacia oleracea* (espinafre) mostrou a inibição da DNA-polimerase e atividade anti-proliferativa de células NUGC3 de câncer gástrico humano.

6.2.2.3 Análise do perfil químico de extrato bruto de sementes de *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado

O extrato das sementes (Figura 8C, Tabela 4) se apresentou como a amostra menos representativa em termos de classes químicas. Foram identificados ácidos orgânicos, como glucurônico e, apenas nesse extrato, o ácido cítrico e flavonóides O-metil-epicatequina e sabian. Outros três picos se mostraram intensos no cromatograma, porém não foi possível concluir suas classes químicas. Os três picos foram detectados com t_R 4.75, 5.058, 5.174 min e íon precursor m/z 701.184, 935.275, 1237.35, respectivamente.

Além das funções já apontadas para os ácidos orgânicos, são descritos também como componentes dos mecanismos de tolerância às adversidades promovidas pelo ambiente e na desintoxicação de metais tóxicos (PANDA & CHOUDHURY, 2005). O ácido cítrico é usado em alimentos, confeitaria e bebidas, assim como em produtos farmacêuticos e indústrias. Seu uso depende de três propriedades principais: acidez, sabor e capacidade de formar sais (MATTEY, 1992). Estudos recentes comprovam que o ácido cítrico melhora o crescimento e rendimento das plantas sob estresse abiótico. Regula a desintoxicação por metais pesados, promovendo a precipitação, quelação e sequestro de íons metálicos. Além disso, induz sistemas de defesa antioxidantes e aumento de clorofila nas plantas (PANDA & CHOUDHURY, 2005; TAHJIB-UL-ARIF *et al.*, 2021).

Os flavonoides, localizados nos vacúolos celulares das plantas, atuam como moléculas sinalizadoras, antioxidantes, na defesa contra patógenos, como filtros UV, e na atração de polinizadores através da influência na cor e aroma das flores e frutos. A concentração de flavonoides aumenta diante condições adversas, como variações extremas de temperatura, privação de nutrientes, e toxicidade de metais, conferindo proteção contra estresses bióticos e abióticos (SAMANTA *et al.*, 2011; HERNÁNDEZ *et al.*, 2009).

A epicatequina, um flavonoide previamente identificado na espécie *Eugenia involucrata* DC (VIEIRA *et al.*, 2024), é conhecida por suas propriedades antitumorais e capacidade antioxidante (GIRARDELO *et al.*, 2020). Também foram identificadas epicatequinas em extrato etanólico de cascas de *Passiflora edulis* por UPLC-ESI-MS (MORAIS *et al.*, 2015).

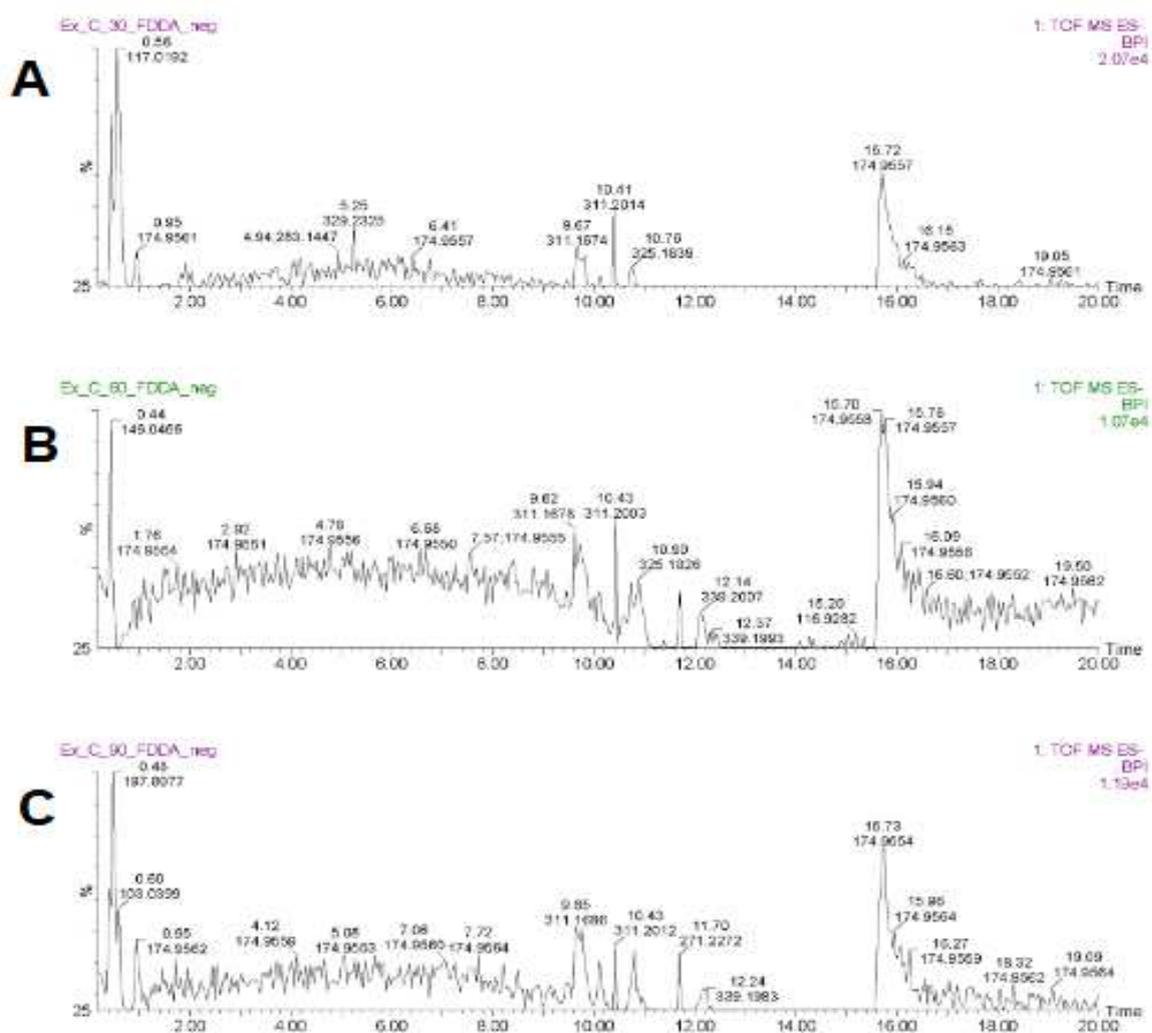
O flavonoide sabian, detectado exclusivamente no extrato de sementes, foi identificado pela primeira vez neste estudo em passifloras. Até o momento, não havia registros na literatura sobre a presença desse flavonoide em extratos de *P. setacea* ou em outras espécies de passifloras. Contudo, o flavonoide sabian já foi relatado em *Sabia*

yunnanensis, uma erva medicinal popular na China utilizada para o tratamento de doenças reumáticas e de tumefações (DENG *et al.*, 2005).

6.2.2.4. Análise dos perfis fitoquímicos de extratos de calos de cotilédones de *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado em diferentes tempos de cultivo

A Figura 9 (A, B, C) mostra os cromatogramas, obtidos em modo negativo, para os extratos de calos de cotilédones de *P. setacea*, no decorrer do tempo de cultivo (C30-A; C60-B; C90).

Figura 9. Cromatogramas obtidos em modo de ionização negativa de extratos brutos de calos cultivados por 30 (A), 60 (B) e 90 (C) dias de *P. setacea* cv. Pérola do Cerrado mostrando a distribuição dos metabólitos majoritários.



Fonte: Elaborado pela autora.

A análise cromatográfica dos extratos de cotilédones (C), demonstra que os resultados não apresentaram representatividade de metabólitos, apenas foi possível identificar ácidos orgânicos e açúcares (Tabela 3).

Pode-se observar na Figura 9 os sinais próximos ao ruído instrumental, devido a insuficiência de compostos em concentração significativa para a separação, ionização e detecção. Em vista de aperfeiçoar a aquisição de informações pela metodologia utilizada, sugere-se o ajuste do tempo de cultivo e o aumento da quantidade das amostras de calos secos utilizadas para a extração hidroalcoólica (SUMNER, *et al.*, 2007). Outra abordagem para a otimização da extração de metabólitos, foi demonstrada por Shakour *et al.* (2022) em seus estudos sobre os perfis metabolômicos das folhas de *Moringa oleifera*. Considerando que a polaridade dos solventes pode influenciar significativamente a extração e a detecção dos compostos, eles testaram a viabilidade de combinar diferentes solventes para melhorar a detecção e a extração de variados grupos de compostos.

Conforme observado nas Tabelas 4 e 5, os ácidos orgânicos e lipídios, como ácidos graxos, foram as classes de compostos majoritários encontrados nos extratos de calos derivados de cotilédones. Nas amostras de C30, foram detectados os ácidos orgânicos tri-hidroxi-butanóico, D-ribônico, glucurônico, L-treônico, mesacônico, succínico, hidroxisubérico, subérico, azelaico tri-hidroxi-octadecenóico e um composto exclusivamente nessa amostra, com um tempo de retenção (t_R) de 0.482 min e m/z 135.029 (Tabelas 4 e 5).

A Tabela 5 mostra que os perfis de metabólitos dos calos de cotilédone variaram com o tempo de cultivo de 30, 60 e 90 dias, decrescendo em número, tendo sido detectados 12, 7 e 2 compostos, respectivamente. Alguns compostos como o ácido tri-hidroxi-octadecenóico e os ácidos treônico, mesacônico, subérico e o composto não identificado NI (4) foram característicos de calos com 30 dias de cultivo. O ácido glutâmico foi característico dos calos com 60 dias e o ácido hidroxi-hexadecenóico foi detectado em calos com 60 e 90 dias de cultivo.

Tabela 5. Compostos detectados por CLUE-ESI-MS em extratos de calos de cotilédone de *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado após 30 (C30), 60 (C60) e 90 (C90) dias de cultivo em meio de cultura Murashige & Skoog suplementado com 88,5 mM de sacarose, 2,5 mM de 2,4-D e 0,2% de Phytigel.

Metabólitos	C30	C60	C90
Ácido tri-hidroxi-butanoico	X		
Ácido D-ribônico	X	X	
Ácido glucurônico	X	X	
Ácido glutâmico		X	
Ácido L-treônico	X		
N-frutossil piroglutamato	X	X	
Ácido mesacônico	X		
Ácido succínico	X		X
Ácido hidroxisubérico	X		
Ácido subérico	X		
Ácido azelaico	X	X	
NI (4)	X		
Ácido tri-hidroxi-octadecenóico	X	X	
Ácido hidroxi hexadecenóico		X	X
Total	12	7	2

Fonte: Elaborado pela autora.

Como relatado anteriormente, o ácido ascórbico pode ser sintetizado a partir de hexoses e de outros ácidos orgânicos presentes na planta, como o ácido D-glucurônico. A presença do ácido glucurônico nos extratos de calos de cotilédone de 30 e 60 dias pode estar associada a uma pressuposta biossíntese otimizada de ácido ascórbico e por conseguinte, à uma considerável capacidade redutora desses extratos. O ácido pode sofrer oxidação irreversível, com perda da atividade redutora, sendo convertido a ácido 2,3-dicetogulônico, precursor do ácido L-treônico, detectado nos calos de cotilédone com 30 dias de cultivo (TAVARES *et al.*, 2010).

O ácido L-treônico ocorreu também em folhas de *Pelargonium crispum* e *Rumex x acutus* L. (HELSPER & LOEWUS, 1982). Nos humanos, o ácido treônico, derivado de proteínas glicadas ou da degradação do ácido ascórbico, é um componente encontrado no humor aquoso dos olhos e no sangue (HARDING *et al.*, 1999).

Os ácidos graxos de cadeia média identificados foram os ácidos azelaico, subérico e hidroxisubérico. O primeiro, detectado exclusivamente nos extratos de calos de cotilédone com 30 dias de cultivo é conhecido por estimular o mecanismo de resistência ao estresse das plantas, ao ser transportado do tecido infectado para tecidos não infectados, facilitando a comunicação de defesa contra patógenos (JUNG *et al.*, 2009). Entre diversas aplicações nas indústrias cosmética e farmacêutica, o ácido azelaico já foi relatado como agente clareador da pele e no tratamento de acne (JOHNSON *et al.*, 2000; DINLER & CETINKAYA, 2024). Embora o ácido subérico seja quimicamente relacionado ao ácido azelaico, não apresenta a mesma capacidade de indução de resistência sistêmica adquirida (SAR) em plantas, o que se deve a uma variação estrutural mínima (BEST *et al.*, 2012).

Além destas classes, foi detectado um aminoácido conhecido como N-frutosil piroglutamato, presente apenas nos extratos de calos com 30 e 60 dias de cultivo (C30 e C60). De modo geral os aminoácidos, além de formar proteínas são cruciais para a fisiologia das plantas, atuando na sinalização e resposta a estresses ambientais, no desenvolvimento vegetal, e como precursores de diversos metabólitos, incluindo aminoácidos essenciais para a nutrição humana, visto que animais não são capazes de sintetizar todos os aminoácidos necessários (HILDEBRANDT *et al.*, 2015; TROVATO *et al.*, 2021). São moléculas de armazenamento de nitrogênio e são os principais transportadores de nitrogênio nos sistemas de transporte de longa distância das plantas (OKUMOTO *et al.*, 2016).

No t_R 5.251 min (m/z 329.232, composto FA18:1+3, Tabela 4), foi detectado, exclusivamente nos extratos de calos com 30 e 60 dias de cultivo (C30 e C60), um composto com a fórmula molecular $C_{18}H_{34}O_5$, podendo ser um ácido trihidroxi-octadecaenóico. MASUI *et al.* (1989) relataram o ácido 9,12,13-tri-hidroxi-(E)-10-octadecenóico como uma substância antifúngica isolada dos tubérculos de taro (*Colocasia antiquorum*) inoculados com o fungo da podridão negra (*Ceratocystis fimbriata*). Entretanto, não foi possível identificar sua estrutura, mas sabe-se que sua classe química é um ácido graxo de cadeia longa (PINTO, 2018). Ademais, no t_R 4.941 min com íon precursor de m/z 283.145 da Tabela 4, sugeriu-se a fórmula molecular $C_{17}H_{20}N_2O_2$, indicando o composto NI (4), característico de calos com 30 dias de cultivo, como um ácido indol-carboxílico, porém a sua estrutura química não foi possível determinar.

Além dos compostos extraídos de calos com 60 dias de cultivo (C60) já citados, também foi detectado nessa amostra ácidos orgânicos como D-ribônico e glucurônico. Como mencionado anteriormente, o ácido ribônico detectado em extratos de *Catunaregam spinosa* (Rubiaceae), foi indicado como potencial opção de tratamento da doença de Alzheimer

(THANDIVEL *et al.* (2024). Exclusivamente nesse extrato, foi identificado um aminoácido (glutâmico) no t_R 0.443 min e íon precursor de m/z 146.046.

O glutamato é conhecido como precursor da síntese de clorofila em folhas em desenvolvimento e está ligado ao metabolismo energético do ciclo de Krebs. Avaliado na perspectiva evolutiva, o composto atua tanto como molécula sinalizadora quanto na relação raiz e nitrogênio orgânico no solo. A sua capacidade de doar o grupo amino (NH_2), permite a sua redistribuição, a síntese e ajuste de diversos aminoácidos nas plantas (FORDE & LEA, 2007; OKUMOTO *et al.*, 2016).

Nas amostras C60 e C90 foi detectado, no t_R 11.71 min (m/z 271.227), um ácido de cadeia longa, conhecido como hidroxí-hexadecenóico. De acordo com a literatura, hidroxilases de ácidos graxos apresentam possíveis envoltimentos na defesa e desenvolvimento das plantas, que incluem o catabolismo dos ácidos graxos, a reprodução e a desintoxicação das plantas (KANDEL *et al.*, 2006).

No extrato de C90, foi detectado apenas os ácidos succínico e hidroxí-hexadecenóico também relatados em calos com 30 e 60 dias de cultivo, respectivamente. Como descrito anteriormente, os ácidos orgânicos desempenham funções vitais nas plantas, especialmente no ciclo de Krebs e no transporte de ferro (ABADÍA *et al.*, 2002; TAIZ *et al.*, 2017). O ácido succínico, por exemplo, é um precursor essencial na biossíntese de clorofila (SAAVEDRA *et al.*, 2022). Além dessas funções metabólicas, os ácidos orgânicos são importantes para a tolerância a adversidades ambientais e na desintoxicação de metais tóxicos (Panda & Choudhury, 2005). Os ácidos graxos, por sua vez, têm papéis estruturais e protetores nas plantas. Eles estão associados a respostas a estresses bióticos e abióticos, contribuindo para a proteção e adaptação das plantas em ambientes adversos (HE *et al.*, 2020; JOHNSON *et al.*, 2000; KANDEL, *et al.*, 2006).

O estudo metabolômico dos calos de cotilédone revelou que, em termos de moléculas identificadas, o tempo de cultivo mais representativo foi de 30 dias, seguido pelo extrato de 60 dias. O tempo de cultivo que apresentou a menor quantidade de compostos detectados foi de 90 dias.

6.2.2.5 Análise comparativa dos resultados obtidos por análise CLUE-ESI-EM dos extratos hidroalcoólicos de folhas, cascas, sementes e calos de cotilédone de *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado

A Tabela 6 foi elaborada a partir da Tabela 4 e apresenta os compostos organizados em ordem crescente do tempo de retenção, detectados por análise de CLUE-ESI-MS em extratos de folhas (Fo), cascas (Ca), sementes (Se) e calos de cotilédones (C), facilitando a comparação entre eles. Para os calos foram sinalizados todos os metabólitos detectados nos três períodos de cultivo. Foram detectados 14 compostos em folhas, 7 em cascas, 8 em sementes e 14 em calos de cotilédone, considerando-se todos os tempos de cultivo, indicando o potencial dos calos em relação ao das folhas, quando se considera o número dos metabólitos produzidos. A hexose foi a única molécula detectada em todos os materiais, exceto nos calos de cotilédone cultivados *in vitro* (Tabela 6).

A análise comparativa da Tabela 6 revela a detecção de metabólitos marcadores característicos para cada tipo de material vegetal analisado. Ácido galactônico ou glucônico, composto não identificado NI (1), isoschaftosídeo, astragalosídeo II, cicloartano glicosídeos e SQMG foram detectados apenas em folhas; citrato monoglicerídeo apenas em cascas; ácido cítrico, O-metil-epicatequina, sabian, compostos são identificados NI (3), NI (5) e NI (6) em sementes; ácidos glutâmico e L-treônico, N-frutosil piroglutamato, ácidos azelaico, tri-hidroxi-octadecenoico e hidroxi-hexadecenoico e um composto não identificado NI (4) nos calos.

Esses dados indicam que os calos de cotilédone produziram 7 compostos que, no presente trabalho não foram detectados em folhas, cascas e sementes, o que indica o potencial na produção de novos compostos *in vitro*. Os calos de cotilédone também apresentaram o potencial de produzir vários compostos característicos de folhas, cascas e sementes, com comprovadas atividades biológicas de interesse como relatado anteriormente.

Tabela 6. Compostos detectados por CLUE-ESI-MS em extratos de folhas, cascas, sementes e calos de cotilédone de *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado após cultivo em meio de cultura Murashige & Skoog suplementado com 88,5 mM de sacarose, 2,5 mM de 2,4-D e 0,2% de Phytigel.

Metabólitos	Folha	Casca	Semente	Calos
Ácido tri-hidroxi-butanóico	x			x
Ácido D-ribônico	x			x
Hexose	x	x	x	
Ácido glucurônico		x	x	x
Ácido galactônico ou ácido glucônico	x			
Monoglicerídeo citrato		x		
Ácido glutâmico				x
Ácido cítrico			x	
Ácido L-treônico				x
N-frutossil piroglutamato				x
Ácido mesacônico	x			x
Ácido homoisocítrico/metilisocítrico	x	x		
Ácido succínico	x	x		x
Ácido hidroxisubérico	x	x		x
Ácido subérico	x	x		x
NI (1)	x			
Isoschaftosídeo (flavonoide)	x			
O-metil-epicatequina (flavonoide)			x	
Ácido azelaico				x
Sabian (flavonóide)			x	
NI (3)			x	
NI (4)				x
NI (5)			x	
NI (6)			x	
FA 18: 1+3 Ácido tri-hidroxi-octadecenóico				x
Astragalosídeo II (terpeno)	x			
Cicloartano glicosídeos (terpeno)	x			
Sulfoquinovosyl monoacil glicerol (SQMG)	x			
Ácido hidroxí hexadecenóico				x
TOTAL	14	7	8	14

Fonte: Elaborado pela autora.

A Tabela 7 mostra as classes químicas majoritárias de cada tipo de material vegetal analisado e observa-se a diferença entre as diversidades de classes dos diferentes materiais vegetais analisados predominando as folhas, seguidas das cascas, sementes e calos de cotilédone.

Os ácidos orgânicos são cruciais no processo de respiração celular. Ao serem oxidados nas mitocôndrias, produzem NADH e FADH₂, coenzimas essenciais para a cadeia de transporte de elétrons, fornecendo energia para a síntese de ATP durante a fosforilação oxidativa (TAIZ *et al.*, 2017). Essa classe química foi a de ocorrência comum em todos os extratos, além de se apresentar como a mais representativa entre as classes. Os ácidos orgânicos detectados foram ácido 3-hidroxi-butanoico, ácido mesacônico, ácido D-ribônico, ácido glucurônico, ácido galactônico ou ácido glucônico, ácido glutâmico, ácido cítrico, ácido L-treônico, ácido homocítrico, ácido succínico, ácido hidroxi-subérico, ácido subérico, ácido azelaico, ácido tri-hidroxi-octadecaenóico, ácido hidroxi hexadecenóico e o citrato de monoglicerídeo.

Tabela 7. Classes químicas majoritárias detectadas por CLUE-ESI-EM nos extratos brutos de cascas do fruto, folhas, sementes e calos de cotilédone de *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado.

Classes Químicas	Folhas	Cascas	Sementes	Calos	Compostos
Ácidos orgânicos	X	X	X	X	Vários tipos de ácidos
Açúcares	X	X	X		Hexose
Flavonóides	X*		X		Isoschaftosídeo*, O-metil-epicatequina, Sabian*
Terpenos	X				Cicloartano glicosídeos, astragalosídeo II
Lipídeos	X*	X			Sulfoquinovosil monoacilglicerol (SQMG)*, Citrato de monoglicerídeo
Total	5	3	3	1	-

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os açúcares também foram encontrados em todas as amostras, as hexoses apenas em folhas, cascas e sementes, enquanto nos calos de cotilédone apenas foi encontrado N-frutossil piroglutamato, que é um derivado do aminoácido glutamato (MINISTRINI *et al.*, 2022).

Os flavonoides O-metil-epicatequina e sabian foram identificados nas sementes, enquanto o isoschaftosídeo em folhas. O primeiro é relatado pela capacidade antioxidante e como agente antitumoral (GIRARDELO *et al.*, 2020) e o sabian, já relatado em erva medicinal chinesa, usada no tratamento de doenças reumáticas e de tumefações (DENG *et al.*, 2005). O isoschaftosídeo é sugerido para o tratamento da hipertensão (GOMES *et al.*, 2014).

Apenas um terpeno foi identificado exclusivamente na amostra de folhas, o qual foi previamente descrito em *P. edulis* e demonstrou potencial para o tratamento de doenças neurodegenerativas (XU *et al.*, 2016; XU YI *et al.*, 2023). Outro composto também detectado apenas nas folhas foi o astragalosídeo II, que é conhecido por melhorar a função imunológica (WAN *et al.*, 2013), reparar a barreira epitelial intestinal e aliviar a colite (LEE *et al.*, 2017).

Quanto aos lipídios, identificou-se na amostra de cascas o citrato de monoglicérido e nas amostras de folhas, o glicosulfolípido sulfoquinovosil monoacilglicerol (SQMG), conhecido por inibir as DNA polimerases e bloquear a transição da fase G1 para a fase S, induzindo apoptose e destacando-se como um potencial antitumoral (MURAKAMI *et al.*, 2003).

Diante destes resultados, as classes químicas observadas na amostra de folhas foram ácidos orgânicos, açúcares, flavonoides, terpenos, saponinas e lipídios (14 metabólitos), apresentando-se assim como a amostra com maior variedade de classes químicas. Em relação às cascas (Ca), três classes foram possíveis de ser identificadas em 7 compostos, são elas os ácidos orgânicos, açúcares e lipídeos. As sementes (Se) apresentaram a mesma quantidade de classes em 8 metabólitos detectados. Por último, os calos foram as amostras menos representativas em termos de classe química, os 14 compostos identificados (na maioria em C30) pertencem à classe dos ácidos orgânicos e açúcares. Visando obter maior variedade de classes, em todas as amostras, é necessário que em estudos futuros haja o aumento da quantidade dos materiais biológicos utilizados para extração e, portanto, detecção em análise de CLUE-ESI-MS.

A Tabela 8 mostra os compostos que não foram detectados, mas não identificados pela análise CLUE-ESI-MS tendo ocorrido, do total de 6 compostos, a maioria deles em sementes.

Tabela 8. Compostos não identificados por análise CLUE-ESI-MS nos extratos brutos de cascas do fruto, folhas, sementes e calos de cotilédone de *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado.

Metabólitos	Folhas	Cascas	Sementes	Calos
NI (1)	X			
NI (2)*			X	
NI (3)			X	
NI (4)				X
NI (5)			X	
NI (6)			X	
Total	1	0	4	1

Fonte: Elaborado pelo autor.

6.2.2.6 Análise estatística multivariada não supervisionada de componentes principais (PCA) para as amostras vegetais de *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado

A técnica estatística multivariada não supervisionada de Análise de Componentes Principais (PCA) foi utilizada para interpretar a distribuição dos dados obtidos, através da análise CLUE-ESI-EM, dos extratos de folhas, cascas, sementes e calos de *P. setacea* BRS-PC. Essa técnica considera variáveis de intensidade por metabólito para identificar padrões e relações nos dados, facilitando a interpretação entre os grupos analisados (GALLO & DE SOUZA, 2022). Os dados de intensidade de pico obtidos a partir dos extratos de calos de cotilédone em diferentes tempos de cultivo de 30, 60 e 90 dias (C30, C60 e C90) foram correlacionados com os dados obtidos a partir dos extratos de cascas, folhas e sementes (Ca, Fo e Se).

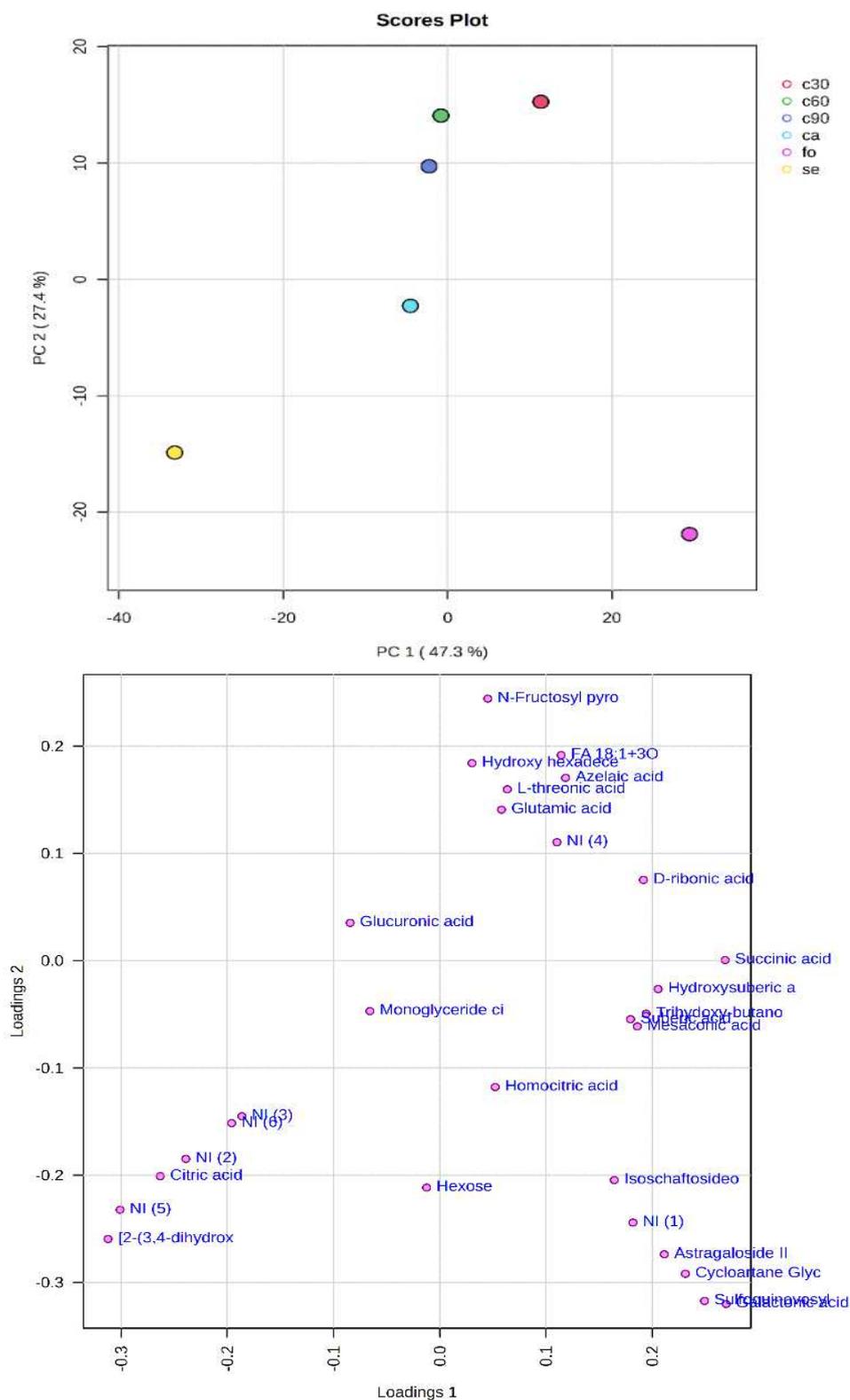
Os resultados da classificação das amostras, segundo o método não supervisionado, explicam 74.7% da variância total dos dados em duas componentes principais (PC's). Ou seja, as duas PC's capturam a maior parte da informação presente no conjunto total de dados, reduzindo a dimensionalidade ao considerar as variáveis mais relevantes. O gráfico "score" (Figura 10A) indica o agrupamento com base na similaridade dos perfis metabólicos dos extratos de calos de cotilédone nos diferentes tempos de cultivo, cascas, folhas e sementes (C30, C60, C90, Ca, Fo e Se). O gráfico "loading" (Figura 10B) ilustra a direção da variância projetada para cada amostra, destacando quais metabólitos contribuem mais significativamente para essa variação.

O gráfico de pontuação (*score*) é formado pela distribuição das amostras em duas componentes principais, o eixo X e Y (Figura 10A). O eixo X representa a componente principal 1 (PC1), que explica 47,3% da variância dos dados e o eixo Y representa o componente principal 2 (PC2), que explica 27,4% da variância dos dados. Somando ambas as componentes, é justificado 74.7% da variância. Neste gráfico pode-se observar o agrupamento positivo das amostras de calos de cotilédones nos três períodos de cultivo (C30, C60, C90) em relação às componentes 1 (PC1) e 2 (PC2). As amostras das partes das plantas, representadas pelas folhas (Fo), cascas (Ca) e sementes (Se) foram correlacionadas negativamente pelas componentes. A variância de Fo foi a amostra que apresentou maior correlação com PC1, enquanto a amostra Ca foi pouco explicada pelas componentes PC1 e PC2. Já a amostra de sementes (Se) não foi justificada pela variância de PC1 e PC2.

O gráfico de carga (*loadings*), demonstrado na Figura 10B, indica a direção da variância para a qual a amostra é projetada, ou seja, ilustra como os diferentes metabólitos se projetam ao longo das componentes principais identificadas na análise. Variáveis (ou metabólitos) que estão na mesma distância do ponto zero e compartilham a mesma direção no gráfico são positivamente correlacionadas. Por outro lado, metabólitos que estão na mesma distância do ponto zero, mas com direções opostas, são negativamente correlacionados. Isso sugere que quando um metabólito aumenta, o outro tende a diminuir e vice-versa (GALLO & DE SOUZA, 2022).

Valores de Loadings 1 positivo, específicos de folhas, variando entre 0,1 e 0,3: NI (1), flavonóide isoschaftosídeo, terpenos cicloartano glicosídeos e astragalosídeo II, glicosídeo sulfoquinovosil monoacilglicerol (SQMG) e ácido galacturônico ou glucônico. Valores positivos de Loadings 1 (variando entre 0,05 e 0,2) e 2 (maior que 0,1) específicos de calos de cotilédones (C30, C60, C90): ácido glutâmico, ácido L-treônico, N-frutosil piroglutamato, ácido azelaico, NI (4), Ácido tri-hidroxi-octadecaenóico (FA 18:1+30) e Ácido hidroxi hexadecenóico. Valores negativos de Loading 1 (menor que -0,1) e 2 (menor que -0,1), exclusivos de sementes: ácido cítrico e os compostos não identificados NI (2), NI (3), NI (5) e NI (6). Compostos presentes nos calos de cotilédones e nas folhas com valores positivos para Loading 1, maior que 0,1: ácido mesacônico, ácido D-ribônico, tri-hidroxi-butanóico, ácido succínico e ácido hidroxisubérico

Figura 10. Gráficos de *scores* (variância) (A) e *loadings* (resíduos de variância) (B) obtidos a partir da Análise de Componentes Principais (PCA) para o conjunto de dados de folhas (Fo), cascas (Ca), sementes (Se) e calos de cotilédones de *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado cultivados *in vitro* por 30 (C30), 60 (C60) e 90 (C90) dias em meio de cultura Murashige & Skoog suplementado com 88,5 mM de sacarose, 2,5 mM de 2,4-D e 0,2% de Phytigel.



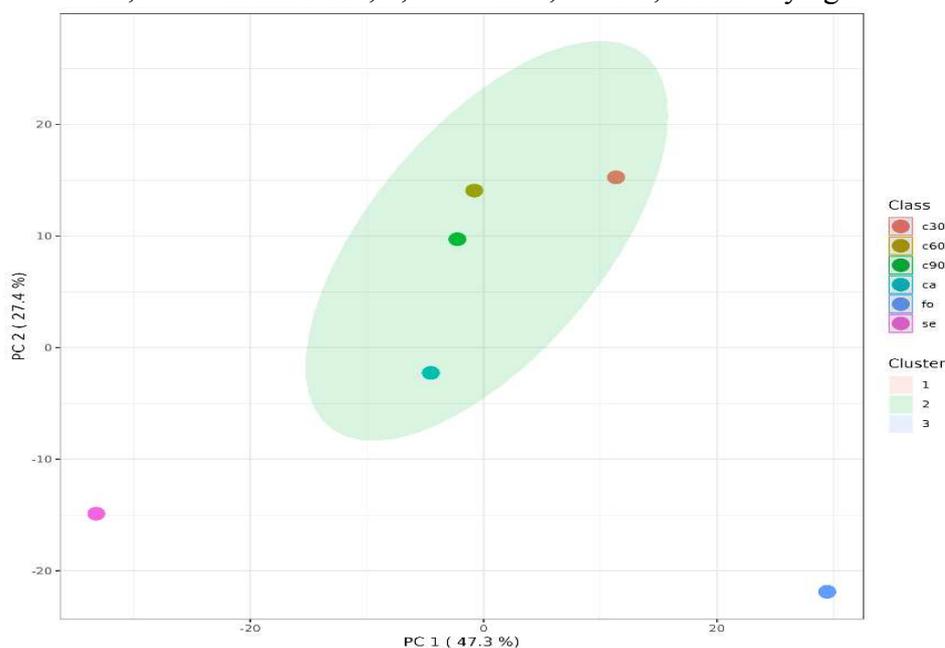
Fonte: Elaborado pela autora.

6.2.2.7 Identificação de grupos de amostras através do algoritmo “K-means”

“K-means” é um algoritmo que tem como objetivo de dividir um conjunto de dados em grupos de amostras que compartilham uma medida/característica principal em comum. O princípio do método matemático é o agrupamento de amostras, de acordo com as similaridades, e o cálculo de um valor referência a partir das intensidades de cada metabólito, dentro do conjunto de amostras.

Para construir os clusters (grupos), utiliza-se a distância entre os valores observados em cada amostra e um valor de referência. Esse valor de referência é calculado com base nas intensidades de cada metabólito em todo o conjunto de amostras. Amostras com valores de metabólitos mais próximos desse valor de referência serão agrupadas no mesmo cluster, dentro de um intervalo de confiança. Este método garante que as amostras que compartilham características metabólicas similares fiquem juntas, facilitando a identificação de padrões e tendências nos dados (Ikotun *et al.*, 2023). A separação entre os grupos é destacada pela elipsóide, na cor verde, demonstrada na Figura 11, indicando as cascas e os calos de cotilédone nos tempos de cultivo de 30, 60 e 90 dias (C30, C60 e C90) em um único grupo distinto das folhas, à direita, e as sementes, à esquerda (GALLO & DE SOUZA, 2022).

Figura 11. Agrupamento de dados normalizados em Análise de Componentes Principais (PCA) por algoritmo K-means para o conjunto de dados de folhas (Fo), cascas (Ca), sementes (Se) e calos de cotilédone de *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado cultivados *in vitro* por 30 (C30), 60 (C60) e 90 (C90) dias em meio de cultura Murashige & Skoog suplementado com 88,5 mM de sacarose, 2,5 mM de 2,4-D e 0,2% de Phytigel.



Fonte: Elaborado pela autora.

6.2.2.8 Análise estatística multivariada supervisionada pelo método PLS-DA

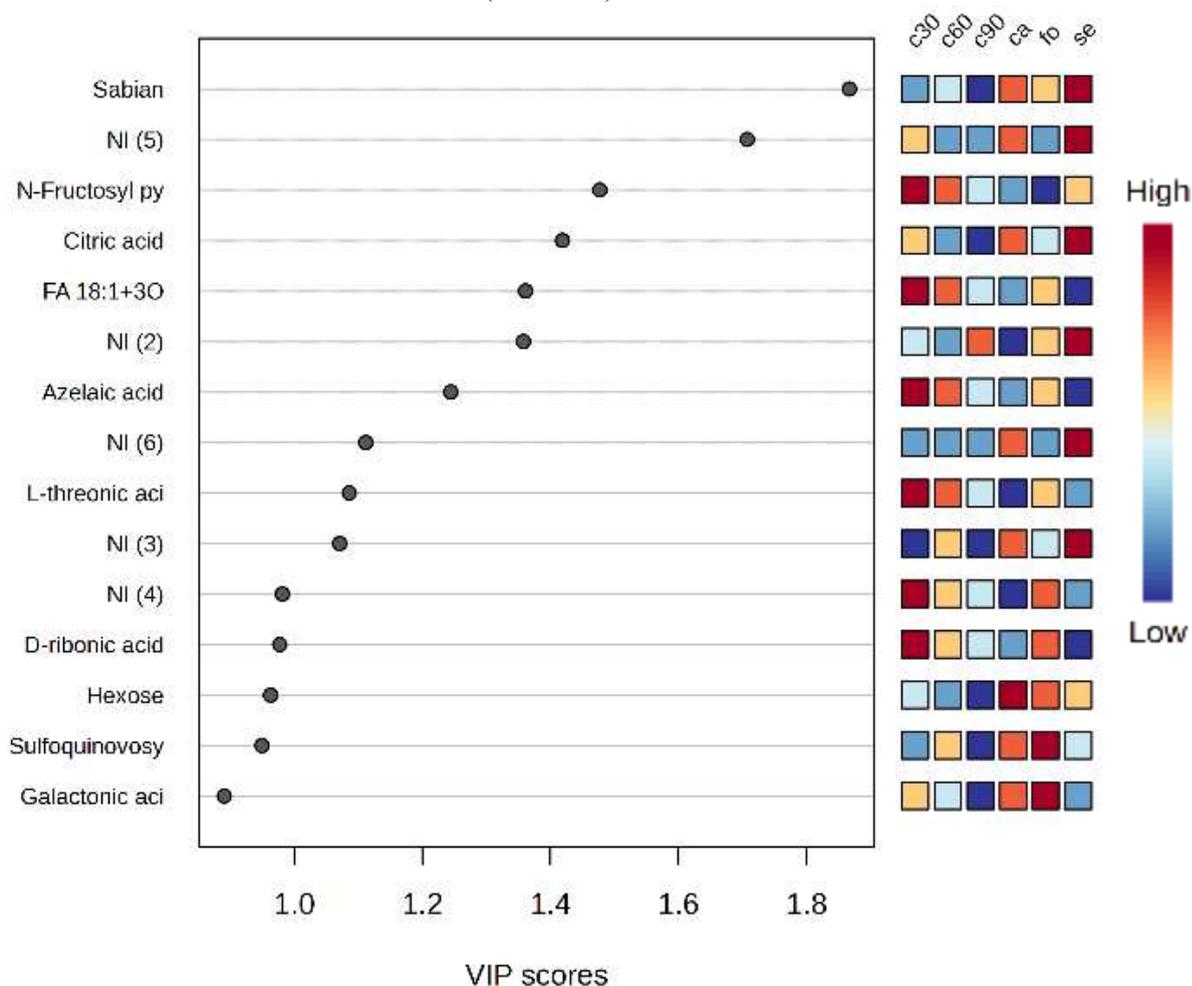
O método quimiométrico de classificação supervisionada mais utilizado para reconhecimento de padrões em química analítica é a Análise Discriminante por Quadrados Mínimos Parciais (PLS-DA – *Partial Least Squares Discriminant Analysis*) (SANTANA *et al.*, 2020). Nos métodos supervisionados, amostras com características previamente conhecidas são empregadas para construir modelos de classificação. Esses modelos são então aplicados para prever a classe de novas amostras desconhecidas, permitindo a identificação e categorização eficiente de padrões complexos nos dados.

A partir do método de análise PLS-DA foi possível a identificação dos metabólitos relevantes detectados através da correlação entre os calos derivados de segmentos de cotilédones cultivados *in vitro* ao longo dos períodos de cultivo (C30, C60, C90) com as partes das plantas, como as folhas (Fo), cascas do fruto (Ca) e sementes (Se) (Cocchi *et al.*, 2018). A análise PLS-DA das amostras com perfis metabólicos conhecidos foi utilizada para construir um modelo de classificação. Este modelo permite estimar o potencial das amostras na produção de diversos tipos de metabólitos considerados significativos pela análise que avaliou a Importância da Variável na Projeção (VIP) (Figura 12).

O gráfico na Figura 12 exibe no eixo X os valores VIP (Importância da Variável na Projeção) dos metabólitos, que variam de 0,8 a 1,6, sendo os valores maiores que 1 ($VIP > 1$) considerados os compostos de maior importância. No eixo Y, estão listados os diferentes metabólitos, classificados de acordo com sua relevância determinada pelo modelo estatístico VIP (Variable Importance in Projection ou Variável de Importância para a Projeção) a partir da análise PLS-DA.

Conforme é possível observar na Figura 12, os quadrados à direita representam as amostras na ordem C30, C60, C90, Ca, Fo e Se. As cores dos quadrados, localizados abaixo das amostras, expressam as concentrações relativas dos metabólitos nos diferentes materiais vegetais. O nível de intensidade de cada metabólito para cada amostra é indicado conforme a escala de cores, onde o vermelho escuro representa alta concentração do composto, enquanto azul escuro a baixa concentração do metabólito. A ordem decrescente de acordo com a intensidade é dada da seguinte forma: vermelho > laranja > amarelo > azul claro > azul médio > azul escuro.

Figura 12. Importância da Variável na Projeção (VIP) scores de metabólitos detectados em extratos de folhas (fo), cascas (ca), sementes (se) e calos de cotilédones de *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado nos tempos de cultivo de 30 (C30), 60 (C60) e 90 (C90) dias em meio de cultura Murashige & Skoog suplementado com 88,5 mM de sacarose, 2,5 mM de 2,4-D e 0,2% de Phytigel, obtidos a partir da Análise Discriminante de Quadrados Mínimos Parciais (PLS-DA).



Fonte: Elaborado pela autora.

A Tabela 8, gerada a partir dos resultados da Figura 12, demonstram os compostos classificados de acordo com a faixa de valores VIP do eixo Y. Os metabólitos selecionados como significativos e considerados de maior importância para a projeção foram os que apresentaram valores de VIP >1 no eixo X.

Tabela 9. Metabólitos classificados de acordo com a faixa de valores VIP, obtidos a partir da Análise Discriminante de Quadrados Mínimos Parciais dos extratos de folhas, cascas, sementes e calos de cotilédone de *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado nos diferentes tempos de cultivo em meio Murashige & Skoog suplementado com 88,5 mM de sacarose, 2,5 mM de 2,4-D e 0,2% de Phytigel.

VIP scores	Metabólitos
Entre 0,8 e 1,0	Ácidos galactônico, sulfoquinovosil monoacilglicerol (SQMG), hexose, ácido D-ribônico, NI (4)
Entre 1,0 e 1,2	NI (3), ácido L-treônico, NI (6)
Entre 1,2 e 1,4	Ácido azelaico, NI (2), FA18:1+30 (tri-hidroxi-octadecaenólico)
Entre 1,4 e 1,6	Ácido cítrico, N-frutosil piroglutamato
Entre 1,6 e 1,8	NI (5), sabian

Fonte: Elaborado pela autora.

Nos valores VIP que apresentaram maior importância para a projeção, entre 1,6 e 1,8, identificou-se o composto desconhecido NI (5) e sabian, detectado apenas na amostra de sementes, com maior intensidade marcada nas partes da planta (Se, Ca e Fo, respectivamente). O flavonoide sabian já foi relatado no tratamento de doenças reumáticas e de tumefações em uma erva medicinal popular na China (DENG *et al.*, 2006). Porém, não se tem conhecimento de relatos de sua presença em espécies de passifloras. A maioria dos compostos com maior intensidade em sementes (Se) são desconhecidos, exceto o ácido cítrico e o flavonoide sabian, sendo estes os metabólitos NI (2), NI (3), NI (5) e NI (6). O metabólito O-metil-epicatequina, encontrado apenas na amostra de semente, não foi considerado neste modelo de projeção, assim como o ácido glucurônico, identificadas também nas cascas e calos C30 e C60.

Nos valores VIP entre 1,4 e 1,6 identificou-se dois compostos, o ácido cítrico e o N-frutosil piroglutamato. O ácido cítrico, apenas encontrado na amostra de sementes, apresentou maior intensidade em Se (vermelho), seguido pelas Ca (laranja) e C30 (amarelo). Enquanto o N-frutosil piroglutamato, presente apenas nas amostras C30 e C60, apresentou intensidade C30 (vermelho), C60 (laranja) e Se (amarelo). Esse metabólito, é um derivado do glutamato que, submetido a reações de Maillard, entre açúcares e aminoácidos, resultam na formação de uma variedade de produtos, incluindo derivados como o N-fructosyl-piroglutamato (MINISTRINI *et al.*, 2022). Os aminoácidos, além de formar proteínas, são essenciais para a fisiologia das plantas, atuando na sinalização de estresses,

desenvolvimento vegetal e como precursores de metabólitos essenciais para a nutrição humana (HILDEBRANDT *et al.*, 2015; TROVATO *et al.*, 2021).

Na sequência, com valor VIP de 1,0 a 1,2, entre dois compostos não identificados, NI (3) e NI (6), é possível observar a presença do ácido L-treônico com alta intensidade em C30 (vermelho), C60 (laranja) e Fo (amarelo), sendo este composto identificado apenas na amostra de calos cultivados *in vitro* por 30 dias. VIP com valores entre 1,2 e 1,4 é marcada pela presença de dois compostos presentes apenas nas amostras de calos de cotilédone C30 e C60, sendo esses o ácido azelaico e FA18:1+30 (tri-hidroxi-octadecaenóico) com intensidade, para os dois compostos, maior em C30 (vermelho) C60 (laranja) e Fo (amarelo). Quanto ao ácido azelaico, conhecido por sua aplicação nas indústrias cosmética e farmacêutica, já foi relatado como agente clareador da pele e como agente terapêutico no tratamento de acne (DINLER & CETINKAYA, 2024). O ácido L-treônico, ácido azelaico e tri-hidroxi-octadecaenóico apresentam o mesmo padrão de comportamento, pois todos são identificados apenas em calos e seguem na projeção com maior intensidade, entre as partes das plantas, nas folhas. O que pode indicar que esses compostos são produzidos pelas folhas em algum determinado estágio de desenvolvimento. O ácido glutâmico (C60) e o ácido hidroxi-hexadecenóico (C60 e C90), encontrados apenas nos calos, não foram considerados na projeção VIP.

Muito próximo de VIP 1, destacam-se o metabólito desconhecido NI (4) e o ácido D-ribônico, sendo esse encontrado apenas nas amostras de folhas e calos C30 e C60. O ácido D-ribônico é investigado como uma alternativa promissora para o tratamento da doença de Alzheimer (THANDIVEL *et al.*, 2024). A maior intensidade desse metabólito se apresentou em C30 (vermelho), Fo (laranja) e C60 (amarelo). O NI (1), isoschaftosídeo, astragalosídeo II e o cicloartano glicosídeo, identificados apenas na amostra de folhas, não foram considerados na projeção VIP.

Entre os valores VIP até 1, dois compostos se apresentaram com maior intensidade em folhas (vermelho), seguido pelas cascas (laranja). Os metabólitos considerados nesse gráfico, são identificados apenas nas amostras de folhas, sendo estes o ácido galactônico e sulfoquinovosil monoacilglicerol (SQMG). Portanto, apesar desses compostos terem sido detectados apenas em folhas, o modelo prevê maior potencial destes metabólitos também serem encontrados em cascas. Para os dois compostos, a menor intensidade mostrou-se nos calos cultivados por 90 dias (azul escuro), ou seja, o modelo prevê que entre os calos, existe maior possibilidade de encontrá-los em C30 e C60. O primeiro, ácido L-galactônico, semelhante ao ácido D-glucônico, podem ser utilizados como materiais de partida na síntese

química do ácido ascórbico, além disso é usado em cosméticos, alimentos (como acidulante) e produtos de limpeza (agente quelante). O segundo, SQMG, é estudado como um agente antitumoral promissor (HANASHIMA *et al.*, 2000; MURAKAMI *et al.*, 2004; OHTA *et al.*, 2010).

Além dos compostos já apontados como ausentes na projeção VIP, os seguintes compostos também não foram considerados no modelo estatístico: O ácido 3-hidroxi-butanóico (Fo e C30), citrato de monoglicerídeo (Ca), ácido mesacônico (Fo e C30), ácido homocítrico (Fo e Ca), ácido succínico (Fo, Ca, C30 e C90), ácido hidroxi-subérico e subérico (Fo, Ca, C30).

7. CONCLUSÃO, CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVA FUTURA

O presente estudo forneceu uma análise comparativa dos perfis fitoquímicos entre calos derivados de segmentos de cotilédones de *Passiflora setacea* BRS Pérola do Cerrado, cultivados *in vitro* por 30, 60 e 90 dias, assim como comparações com os perfis fitoquímicos de folhas, cascas e sementes. A avaliação foi realizada utilizando o sistema de análise dos extratos por CLUE-ESI-EM e interpretada pelos métodos estatísticos PCA e PLS-DA.

Os resultados demonstraram que o tempo de cultivo teve impacto significativo tanto no crescimento dos calos de cotilédone quanto na produção de metabólitos de interesse comercial. Calos cultivados por 30 dias apresentaram maior incremento no crescimento em massa seca, que não diferiu dos calos com 60 dias de cultivo.

Os calos por 30 dias também apresentaram o maior número de 12 compostos químicos em relação aos demais tempos de cultivo. A análise revelou que, aos 60 dias, foram identificados dois compostos adicionais, sugerindo que a escassez de nutrientes pode estar relacionada com a síntese de novos metabólitos. Portanto, embora o cultivo por 60 dias permita a produção de compostos adicionais, os calos de 30 dias mostraram-se mais promissores em termos de diversidade de metabólitos e eficiência do tempo de cultivo, uma vez que produziram uma gama variada de compostos secundários em um período mais curto de tempo.

Considerando que aproximadamente metade dos compostos encontrados em calos de 60 dias foram detectados aos 30 dias, é sugerido que estudos futuros explorem um período intermediário de cultivo, como 45 dias, para potencial otimização da produção de metabólitos. Aos 90 dias, não foram encontrados compostos novos, apenas um metabólito em comum com C30 e um com C90, indicando que este intervalo não é ideal para a exploração de metabólitos, dentro das condições de cultivo estabelecidas nesse trabalho, ou para a otimização do tempo de cultivo. Porém, devido à rigidez dos calos neste período de cultivo e a resistência à desagregação na maceração, acredita-se que a eficácia da extração pode ter sido prejudicada. Por isso, em estudos futuros, sugere-se a trituração completa dos calos, visando aumentar a superfície de contato do material com o solvente, conseqüentemente melhorando a eficiência da extração.

Em termos de comparação com partes da planta, as folhas apresentaram o perfil metabólico mais semelhante aos calos, com seis metabólitos comuns, especialmente com os calos cultivados por 30 dias. Seguiram-se as cascas, com quatro metabólitos em comum, e por último, as sementes, que compartilham apenas o ácido glucurônico com calos de 30 e 60 dias.

A maior semelhança das folhas e cascas com os calos sugere que o cultivo *in vitro* pode ser otimizado para a produção de metabólitos desses metabólitos em comum (visto maior semelhança dessas partes em comparação com as sementes), cujo desenvolvimento *in vivo* leva mais de 30 dias.

Adicionalmente, a identificação do composto sabian nas sementes, um metabólito não previamente relatado para espécies de Passifloras, destaca uma linha promissora para pesquisas futuras. Sendo este composto já documentado no tratamento de doenças reumáticas, portanto, indicando seu potencial medicinal. O modelo estatístico VIP sugere este metabólito, entre os calos de cotilédone, em maior intensidade nos calos cultivados por 30 dias, ou seja, o ajuste no meio de cultivo, como a manipulação de elicitores, pode induzir a maior produção desse composto.

A pesquisa também identificou compostos exclusivos nos calos, como ácido glutâmico, ácido L-treônico, N-frutosil piroglutamato, ácido azelaico, NI (4) e ácido tri-hidroxi-octadecaenóico. Seis compostos detectados, não foram identificados, indicando a necessidade de aumentar a quantidade de massa seca utilizada em estudos futuros para obter resultados mais precisos e detalhados.

Em suma, os dados obtidos oferecem perspectivas valiosas para a exploração das propriedades químicas da *P. setacea* BRS-PC e destacam o potencial do cultivo *in vitro* na otimização da produção de metabólitos. Dado que os calos de 30 dias se mostraram particularmente eficazes na geração de uma variedade de compostos secundários em um período mais curto, eles representam uma estratégia promissora para futuras investigações. A relevância dos resultados está na contribuição para o desenvolvimento de protocolos de cultivo mais específicos e eficientes para esta espécie, proporcionando avanço na biotecnologia aplicada à produção de metabólitos.

REFERÊNCIAS

- ABADÍA, J.; LÓPEZ-MILLÁN, A. F.; ROMBOLÀ, A.; *et al.* Organic acids and Fe deficiency: a review. **Plant and Soil**, v. 241, p. 75-86, 2002.
- ABOURASHED, E.A.; VANDERPLANK, J.R.; KHAN, I.A. High-Speed Extraction and HPLC Fingerprinting of Medicinal Plants – I. Application to Passiflora Flavonoids. **Pharmaceutical Biology**, v. 40, n. 2, p. 81–91, 2002.
- AFTAB, T.; KHAN, M.M.; IDREES, M.; *et al.* Stimulation of crop productivity, photosynthesis and artemisinin production in *Artemisia annua* L. triacontanol and gibberellic acid application. **Journal of Plant Interactions**, v. 1, p. 273-281, 2010.
- AGIUS, F.; GONZÁLEZ-LAMOTHE, R.; CABALLERO, J.L.; *et al.* Engineering increased vitamin C levels in plants by overexpression of a D-galacturonic acid reductase. **Nature Biotechnology**, v. 21, n. 2, p. 177–181, 2003.
- ANESINI, C.; PEREZ, C. Screening of plants used in Argentine folk medicine for antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 39, n. 2, p. 119–128, 1993.
- ANJO, D.F.C. Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 2, p. 145-154, 2004.
- ATAÍDE, E.M.; DE OLIVEIRA, F.J.M.; FALEIRO, F.G.; *et al.* Desenvolvimento de cultivares de maracujazeiro doce BRS Mel do Cerrado, Silvestre BRS Pérola do Cerrado e azedo BRS Rubi do Cerrado no semiárido nordestino. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, v.6, n.2, p. 1889-1896, 2023.
- ATAÍDE, E.M.; OLIVEIRA, J.C.; RUGGIERO C. Florescimento e frutificação do maracujazeiro silvestre *Passiflora setacea* D.C. cultivado em Jaboticabal, SP. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 34, p. 377-381, 2012.
- BAKAR, K.; NILOFAR; MOHAMED, *et al.* Evaluating Phytochemical Profiles, Cytotoxicity, Antiviral Activity, Antioxidant Potential, and Enzyme Inhibition of Vepris boiviniana Extracts. **Molecules**, v. 28, n. 22, p. 7531, 2023.
- BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n.1, p. 113-123, 2006.
- BASRA, A. Plant Growth Regulators in Agriculture and Horticulture: Their Role and Commercial Uses. **CRC Press.**, 2000.
- BERALDO, J.; KATO, E.T.M. Morfoanatomia de folhas e caules de *Passiflora edulis* Sims, Passifloraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 2, p. 233-239, 2010.
- BERNACCI, L.C. (coord.). Passifloraceae. In: WANDERLEY, M.G.L.; SHEPHERD, G.J.; MELHEM, T.S.; GIULIETTI, A.M.; KIRIZAWA, M. (eds.). **Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo**. São Paulo: Instituto de Botânica, 2003. v. 3, p. 247-274.
- BEST, M.; GIFFORD, A.N.; KIM, S.W.; *et al.* Rapid radiosynthesis of [11C] and

[14C]azelaic, suberic, and sebacic acids for *in vivo* mechanistic studies of systemic acquired resistance in plants. **Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals**, v. 55, n. 1, p. 39–43, 2011.

BRAGA M.F.; SANTOS E.C.; JUNQUEIRA N.T.V.; *et al.* Enraizamento de estacas de três espécies silvestres de Passiflora. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 2, p. 284-288, 2006.

BRAGA, M.F.; JUNQUEIRA, N.T.V.; FALEIRO, F.G.; *et al.* *Passiflora* spp.: Maracujá-do-cerrado. Embrapa Cerrados, 2016.

BUSTON, Harold William. Note on the isolation of mesaconic acid from cabbage leaves. **Biochemical Journal**, v. 22, n. 6, p. 1523–1525, 1928.

CARVALHO, A.B.; COELHO, V.J.; ARAÚJO, K.L.; *et al.* Genetic variability of *Fusarium solani* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* isolates from Pantanal, Amazon and Cerrado biomes of Mato Grosso, Brazil. **African Journal of Agricultural Research**, v. 10, n.53, p. 4990-4997, 2015.

CARVALHO, M.V.O.; OLIVEIRA, L.L.; COSTA, A.M. Effect of training system and climate conditions on phytochemicals of *Passiflora setacea*, a wild *Passiflora* from Brazilian savannah. **Food Chemistry**, v. 266, p. 350-358, 2018.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n. 1, p. 99–105, 1998.

CERVI, A.C. Passifloraceae do Brasil. Estudo do gênero *Passiflora* L., subgênero *Passiflora*. **Fontqueria**, v. 45, p. 1-92, 1997.

CHEN, L.; ZHU, Y.; WANG, Y; *et al.* The water-soluble subfraction from *Artemisia argyi* alleviates LPS-induced inflammatory responses via multiple pathways and targets *in vitro* and *in vivo*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 319, p. 117364, 2024.

CÓRDOVA, K.R.V.; GAMA, T.T.B.; WINTER, C.M.G.; *et al.* Características físico-químicas da casca do maracujá amarelo (*Passiflora edulis flavicarpa* Degener) obtida por secagem. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v.23, n.2, p.221-230, 2005.

CORRÊA, R.C.G.; PERALTA, R.M.; HAMINIUK, C.W.I.; *et al.* The past decade findings related with nutritional composition, bioactive molecules and biotechnological applications of *Passiflora* spp. (passion fruit). **Trends in Food Science and Technology**, v. 58, p. 79-95, 2016.

COSTA, G.M. **ESTUDO QUÍMICO DE ESPÉCIES BRASILEIRAS E COLOMBIANAS DO GÊNERO *Passiflora***. Tese (Doutorado em Farmácia) Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

COSTA, G.M.; GAZOLA, A.C.; ZUCOLOTTI, S.M.; *et al.* Chemical profiles of traditional preparations of four South American *Passiflora* species by chromatographic and capillary electrophoretic techniques. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, p. 451-458, 2016.

COSTA, P.; GONÇALVES, S.; VALENTÃO, P.; *et al.* *Thymus lotocephalus* wild plants and *in vitro* cultures produce different profiles of phenolic compounds with antioxidant activity. **Food chemistry**, v. 135, n. 3, p. 1253-1260, 2012.

CUNHA, A.L.; MOURA, K.S.; BARBOSA, J.C.; *et al.* Os metabólitos secundários e sua importância para o organismo. **Diversitas Journal**, v.1, n.2, p.175-181, 2016.

DE CARVALHO, P.P. **Organogênese *in vitro* de *Passiflora alata* Curtis e *Passiflora miniata* Master - Passifloraceae**. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) Universidade do Estado de Mato Grosso, Tangará da Serra, 2016.

DE FAVERI, A.; DE FAVERI, R.; BROERING, M.F.; *et al.* Effects of passion fruit peel flour (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* O. Deg.) in cafeteria diet-induced metabolic disorders. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 250, 2020.

DE PAULA, R. C. M.; SOARES, A. G.; FREITAS, S. P. Volatile Compounds in Passion Fruit Seed Oil (*Passiflora setacea* BRS Pérola do Cerrado and *Passiflora alata* BRS Doce Mel). **Chemical Engineering Transactions**, v. 44, p. 103–108, 20 set. 2015.

DENG, Y.; ZHENG, Y.; CHEN, B.; *et al.* Sabian, a novel flavonoid from *Sabia yunnanensis*. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 7, n. 5, p. 741–745, 2005.

DHAWAN, K.; DHAWAN, S.; SHARMA, A. *Passiflora*: a review update. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, p. 1-23, 2004.

DIAS, M.I.; SOUSA, M.J.; ALVES, R.C.; *et al.* Exploring plant tissue culture to improve the production of phenolic compounds: A review. **Industrial Crops and Products**, v. 82, p. 9–22, 2016.

DINLER, B.S.; CETINKAYA, H.. An overview on Azelaic Acid: Biosynthesis, signalling and the action under stress conditions in plants. **Journal of Plant Stress Physiology**, v. 10, p. 8–12, 2024.

DOS REIS, L.C.R.; FACCO, E.M.P.; SALVADOR, M. *et al.* Antioxidant potential and physicochemical characterization of yellow, purple and orange passion fruit. **Journal of Food Science and Technology**, v. 55, p. 2679–2691, 2018.

EFFERTH, T. Biotechnology Applications of Plant Callus Cultures. **Engineering**, v. 5, n. 1, p. 50–59, 2019.

Embrapa Cerrados. Disponível em: <<https://www.cpac.embrapa.br/lancamentoperola/>>.

FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; JUNGHANS, T.G.; *et al.* Advances in passion fruit (*Passiflora* spp.) propagation. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 41, n. 2, 2019.

FEUILLET, C.; MACDOUGAL, J.M. Passifloraceae. *In: Flowering Plants · Eudicots*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, p. 270–281, 2007

FILHO, M.A.C.C.; CARDOSO, B.F.; FERREIRA, V.R. Study of the effect of temperature, concentration and pH on ATM pectin viscosity. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, p. 4848-4833, 2020.

FONSECA, A.M.A.; GERALDI, M.V.; JUNIOR, M.R.M.; *et al.* Purple passion fruit (*Passiflora edulis* f. *edulis*): A comprehensive review on the nutritional value, phytochemical profile and associated health effects. **Food Research International**, v. 160, n. 111665, 2022.

FORDE, B.G.; LEA, P.J. Glutamate in plants: metabolism, regulation, and signalling. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, n. 9, p. 2339–2358, 2007.

FREITAS, C.M.P.; COSTA, A.R.; RODRIGUES, F.A.; *et al.* Optimization of pectin extraction from passion fruit (*Passiflora edulis flavicarpa*) using the response surface method. **Brazilian Journal of Development**, v.6, n.5, 2020.

GADIOLI, I.L.; DA CUNHA, M.S.B.; DE CARVALHO, M.V.O.; *et al.* A systematic review on phenolic compounds in *Passiflora* plants: Exploring biodiversity for food, nutrition, and popular medicine. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 58, n. 5, p. 785–807, 2018.

GAO, Y. L.; WANG, Y. J.; CHUNG, H. H.; *et al.* Molecular networking as a dereplication strategy for monitoring metabolites of natural product treated cancer cells. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 34, n. S1, 2019.

GIRARDELO, J. R.; MUNARI, E. L.; DALLORSOLETA, J. C. S.; *et al.* Bioactive compounds, antioxidant capacity and antitumoral activity of ethanolic extracts from fruits and seeds of *Eugenia involucrata* DC. **Food Research International**, v. 137, p. 109615, 2020.

GOMES, A.C.C.; SAMPAIO, L.S.; DA SILVA, P.A.; *et al.* *In vitro* effect of isoschaftoside isolated from *Syngonium podophyllum* on pig kidney Na⁺, K⁺-ATPase. **Química Nova**, v. 37, p. 1606-1609, 2014.

GOMES, S.V.F.; PORTUGAL, L.A.; ANJOS, J.P.; *et al.* Accelerated solvent extraction of phenolic compounds exploiting a Box-Behnken design and quantification of five flavonoids by HPLC-DAD in *Passiflora* species. **Microchemical Journal**, v. 132, p. 28–35, 2017.

GOMEZ, K.A.; GOMEZ, A.A. **Statistical procedures for agricultural research**. 2. ed. Nova York: John Wiley And Sons, 1984.

GRANATO, D.; BARBA, F.J.; KOVAČEVIĆ, D. B.; *et al.* Functional Foods: Product Development, Technological Trends, Efficacy Testing, and Safety. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 11, n. 1, 2020.

GUAN, S.; SUN, L.; WANG, X.; *et al.* Isoschaftoside Inhibits Lipopolysaccharide-Induced Inflammation in Microglia through Regulation of HIF-1 α -Mediated Metabolic Reprogramming. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2022, p. 1–8, 2022.

GUIMARÃES, T.G.; DIANESE, A.C.; OLIVEIRA, C.M.; *et al.* Recomendações técnicas para o cultivo de *Passiflora setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado. **Embrapa Cerrados**, Planaltina (DF), 2013.

HAMMER, Ø.; HARPER, D.A.T.; RYAN, P.D. Past: paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**, v. 4, n. 1, 2001.

HANASHIMA, S.; MIZUSHINA, Y.; OHTA, K.; *et al.* Structure-Activity Relationship of a Novel Group of Mammalian DNA Polymerase Inhibitors, Synthetic Sulfoquinovosylacylglycerols. **Japanese Journal of Cancer Research**, v. 91, n. 10, p. 1073–1083, 2000.

HANSEN, A.K.; GILBERT, L.E.; SIMPSON, B.B.; *et al.* Phylogenetic Relationships and Chromosome Number Evolution in *Passiflora*. **Systematic Botany**, v. 31, n. 1, p. 138-150, 2006.

HARDING, J.J.; HASSETT, P.; RIXON, K.C.; *et al.* Sugars including erythronic and threonic acids in human aqueous humour. **Current Eye Research**, v. 19, n. 2, p. 131–136, 1999.

HE, M.; QIN, C.-X.; WANG, X.; *et al.* Plant Unsaturated Fatty Acids: Biosynthesis and Regulation. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, 2020.

HELSPER, J.P.; LOEWUS, F.A. Metabolism of l-Threonic Acid in *Rumex x acutus* L. and *Pelargonium crispum* (L.) L'Hér. **Plant Physiology**, v. 69, n. 6, p. 1365–1368, 1982.

HERNÁNDEZ, I.; ALEGRE, L.; VAN BREUSEGEM, F.; *et al.* How relevant are flavonoids as antioxidants in plants?. **Trends in Plant Science**, v. 14, n. 3, p. 125–132, 2009.

HILDEBRANDT, T.M.; NUNES NESI, A.; ARAÚJO, W.L.; *et al.* Amino Acid Catabolism in Plants. **Molecular Plant**, v. 8, n. 11, p. 1563–1579, 2015.

HOOPER, A.M.; TSANUO, M.K.; CHAMBERLAIN, K.; *et al.* Isoschaftoside, a C-glycosylflavonoid from *Desmodium uncinatum* root exudate, is an allelochemical against the development of *Striga*. **Phytochemistry**, v. 71, n. 8–9, p. 904–908, 2010.

HUSSAIN, A.; QARSHI, I.A.; NAZIR, H.; *et al.* Plant Tissue Culture: Current Status and Opportunities. **Recent Advances in Plant in vitro Culture**, 2012.

IDREES, M., NAEEM, M., KHAN, M.N., *et al.* Alleviation of salt stress in lemongrass by salicylic acid. **Protoplasma**, v. 249, n. 3, p. 709–720, 2012.

IMIG, D.C. **Estudo taxonômico da família Passifloraceae Juss. no Distrito Federal, Brasil**. Dissertação (mestrado em Ciências Biológicas) Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

ISHIKAWA, T.; DOWDLE, J.; SMIRNOFF, N. Progress in manipulating ascorbic acid biosynthesis and accumulation in plants. **Physiologia Plantarum**, v. 126, n. 3, p. 343–355, 2006.

- JALA, R.C.R.; VUDHGIRI, S.; KUMAR, C.G. A comprehensive review on natural occurrence, synthesis and biological activities of glycolipids. **Carbohydrate Research**, v. 516, 2022.
- JAMIR, T.T.; SHARMA, H.K.; DOLUI, A.K. Folklore medicinal plants of Nagaland, India. **Fitoterapia**, v. 70, p. 395–401, 1999.
- JAMWAL, K.; BHATTACHARYA, S.; PURI S. Plant growth regulator mediated consequences of secondary metabolites in medicinal plants. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, v. 9, p. 26-38, 2018.
- JOHNSON, R. W., POLLOCK, C. M., & CANTRELL, R. R. Dicarboxylic acids. **Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology**, 2000.
- JUNG, H.W.; TSCHAPLINSKI, T.J.; WANG, L.; *et al.* Priming in Systemic Plant Immunity. **Science**, v. 324, n. 5923, p. 89–91, 2009.
- KANDEL, S.; SAUVEPLANE, V.; OLRYS, A.; *et al.* Cytochrome P450-dependent fatty acid hydroxylases in plants. **Phytochemistry Reviews**, v. 5, n. 2–3, p. 359–372, 2006.
- KANG, W.; CHOI, D.; PARK, T. Dietary Suberic Acid Protects Against UVB-Induced Skin Photoaging in Hairless Mice. **Nutrients**, v. 11, n. 12, p. 2948, 2019.
- KANG, W.; CHOI, D.; SON, B.; *et al.* Activation of OR10A3 by Suberic Acid Promotes Collagen Synthesis in UVB-Irradiated Dermal Fibroblasts via the cAMP-Akt Pathway. **Cells**, v. 11, n. 24, p. 3961, 2022.
- KAUSHIK, P. Use of Natural Organic and Synthetic Chelating Agents for Efficient Phytoremediation. **Science Technology & Engineering**, v. 4, p. 99–101, 2015.
- KILLIP, E.P. **The american species of Passifloraceae**. Publication Field Museum of Natural History - Botanical Series 19 (1-2): p.1-613, 1938.
- KHATUN, M. R.; MUKTA, R. H.; ISLAM, M. A.; *et al.* Insight into citric acid-induced chromium detoxification in rice (*Oryza sativa* L). **International Journal of Phytoremediation**, v. 21, n. 12, p. 1234-1240, 2019.
- KLINK, C.A.; MACHADO, R.B. A conservação do Cerrado brasileiro. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 147-155, 2005.
- KOBORI, C.N.; JORGE, N. Caracterização dos óleos de algumas sementes de frutas como aproveitamento de resíduos industriais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos • Ciênc. agrotec.** v. 29, n. 5, p. 1008-1014, 2005.
- LEE, S.-Y.; TSAI, W.-C.; LIN, J.-C.; *et al.* Astragaloside II promotes intestinal epithelial repair by enhancing L-arginine uptake and activating the mTOR pathway. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 2017.
- LOEWUS, F. Biosynthesis and metabolism of ascorbic acid in plants and of analogs of ascorbic acid in fungi. **Phytochemistry**, v. 52, n. 2, p. 193–210, 1999.

LOPES, R.M.; SEVILHA, A.C.; FALEIRO, F.G.; *et al.* Estudo comparativo do perfil de ácidos graxos em semente de passifloras nativas do cerrado brasileiro. **Revista Brasileira de Fruticultura.**, v. 32, n. 2, p. 498–506, 2010.

LUCAS-GONZÁLEZ, R.; CAPANOGLU, E.; PATEIRO, M.; *et al.* Current trends in *Passiflora* genus research: Obesity and fermented foods systematic review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 127, p. 143-155, 2022.

MARQUES, S.S.F.; LIBONATI, R.M.F.; SABAA-SRUR, A.U.O.; LUO, R.; SHEJWALKAR, P.; HARA, K.; DOBBS, T.; SMITH, R.E. Evaluation of the effects of passion fruit peel flour (*Passiflora edulis* fo. *flavicarpa*) on metabolic changes in HIV patients with lipodystrophy syndrome secondary to antiretroviral therapy. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 26, n. 4, p. 420-426, 2016.

MASUI, H.; KONDO, T.; KOJIMA, M.. An antifungal compound, 9, 12, 13-trihydroxy-(E)-10-octadecenoic acid, from *Colocasia antiquorum* inoculated with *Ceratocystis fimbriata*. **Phytochemistry**, v. 28, n. 10, p. 2613-2615, 1989.

MATHEW, R.; SANKAR, P.D. Comparison of major secondary metabolites quantified in elicited cell cultures, non-elicited cell cultures, callus cultures and field grown plants of *Ocimum*. **Int J Pharm Pharm Sci**, v. 6, n. 2, p. 102-106, 2014.

MATTEY, Michael. The Production of Organic Acids. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 12, n. 1–2, p. 87–132, 1992.

MCCUSKER, M.M., & GRANT-KELS, J.M. Healing fats of the skin: the structural and immunologic roles of the omega-6 and omega-3 fatty acids. **Clinics in dermatology**, v. 28, p. 440-451, 2010.

MENDES, A.P.A.; PEREIRA, R. C.; ANGELIS-PEREIRA, M.C. Estresse Oxidativo e Sistemas Antioxidantes: Conceitos Fundamentais Sob os Aspectos da Nutrição e da Ciência dos Alimentos. **Tecnologia de Alimentos: Tópicos Físicos, Químicos e Biológicos**, v. 2, p.296-312, 2020.

MESQUITA, R.O. **DETERMINANTES FISIOLÓGICOS E MOLECULARES DA RESPOSTA DIFERENCIAL À SECA EM SOJA**. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2013.

MILWARD-DE-AZEVEDO, M.A. Histórico de *Passiflora* L. com enfoque no subgênero *Decaloba* (DC.) Rchb. (*Passifloraceae sensu stricto*). **Diversidade e Gestão**, v. 2, n. 1, p. 36-45, 2018.

MINISTRINI, M.; CHARTON, S.; IKEN, M.; *et al.* Identification of amadori products and oligosaccharide-glycated amino acids in brewer's spent grain extract. **Frontiers in Food Science and Technology**, v. 2, 2022.

MONTAGNER, D.F. **Perfis de metabólitos secundários, atividade antioxidante e atividade biológica de calos cultivados *in vitro*, folhas, pericarpos e sementes de *Passiflora tenuifila* Killip. e *Passiflora setacea* BRS pérola do cerrado (*Passifloraceae*).**

Tese (Doutorado em Biotecnologia e Biociências). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2018.

MORAES, M.L.L. **Extração e análise de flavonóides em espécies brasileiras de *Passiflora* L.** 1995. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, São Carlos, 1995.

MORAIS, D.R.; ROTTA, E.M.; SARGI, S.C.; *et al.* Antioxidant activity, phenolics and UPLC–ESI(–)–MS of extracts from different tropical fruits parts and processed peels. **Food Research International**, v. 77, p. 392–399, 2015.

MURAKAMI, C.; MIUZNO, T.; HANAOKA, F.; *et al.* Mechanism of cell cycle arrest by sulfoquinovosyl monoacylglycerol with a C18-saturated fatty acid (C18-SQMG). **Biochemical Pharmacology**, v. 67, n. 7, p. 1373–1380, 2004.

MURAKAMI, C.; TAKEMURA, M.; YOSHIDA, H.; *et al.* Analysis of cell cycle regulation by 1-mono-O-acyl-3-O-(α -D-sulfoquinovosyl)-glyceride (SQMG), an inhibitor of eukaryotic DNA polymerases. **Biochemical Pharmacology**, v. 66, n. 4, p. 541–550, 2003.

MURAVNIK, L.E.; KOSTINA, O.V.; SHAVARDA, A.L. Development, structure and secretion compounds of stipule colleters in *Pentas lanceolata* (Rubiaceae). **South African Journal of Botany**, v. 93, p. 27–36, 2014.

NAEEM, M., KHAN, M. M. A., IDREES, M., *et al.* Triacontanol-mediated regulation of growth yield, physiological activities and active constituents of *Mentha arvensis* L. **Plant Growth Regulation**, v. 65, p. 195–206, 2011.

NASCIMENTO, N.C.; DE MEDEIROS, H.I.R.; PEREIRA, I.C.; *et al.* Preparation of biscuit with the flour of maracujá skin (*Passiflora edulis*). **Research, Society and Development**, v. 9, n. 7, 2020.

NIKOLAVA, K.; VELIKOVA, M.; GENTSCHEVA, G.; *et al.* Chemical Compositions, Pharmacological Properties and Medicinal Effects of Genus *Passiflora* L.: A Review. **Plants**, v. 13, n. 2, p. 228, 2024.

NWOSU, M.O. Herbs for mental disorders. **Fitoterapia**, v. 70, p. 58–63, 1999.

OCAMPO, J.; ARIAS, J. C.; URREA, R. Interspecific hybridization between cultivated and wild species of genus *Passiflora* L. **Euphytica**, v. 209, n. 2, p. 395–408, 2016.

OGA, S.; DE FREITAS, P.C.D.; GOMES DA SILVA, A.C.; *et al.* Pharmacological trials of crude extracts of *Passiflora alata*. **Planta Medica**, v. 50, n. 4, p. 303–306, 1984.

OHTA, K.; MURATA, H.; MORI, Y.; *et al.* Remodeling of the Tumor Microenvironment by Combined Treatment with a Novel Radiosensitizer, α -Sulfoquinovosylmonoacylglycerol (α -SQMG) and X-irradiation. **International Institute of Anticancer Research**, v. 30, n. 11, p. 4397–4404, 2010.

OKUMOTO, S.; FUNCK, D.; TROVATO, M.; *et al.* Editorial: Amino Acids of the Glutamate Family: Functions beyond Primary Metabolism. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, 2016.

OLIVEIRA, L.L.; SANCHEZ, B.A.O.; CELESTINO I.C.; *et al.* Shelf life and retention of bioactive compounds in storage of pasteurized *Passiflora setacea* pulp, an exotic fruit from Brazilian savannah. **LWT**, v.159, 2022.

OZAROWSKI, M.; THIEM, B. Progress in micropropagation of *Passiflora* spp. to produce medicinal plants: A mini-review. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 23, n. 6, p. 937–947, 2013.

PALAMA, T.L.; FOCK, I.; CHOI, Y.H.; *et al.* Biological variation of *Vanilla planifolia* leaf metabolome. **Phytochemistry**, v. 71, n. 5–6, p. 567–573, 2010.

PANDA, S.K.; CHOUDHURY, S. Chromium stress in plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 17, n. 1, p. 95–102, 2005.

PANG, Z.; CHONG, J.; ZHOU, G.; *et al.* MetaboAnalyst 5.0: narrowing the gap between raw spectra and functional insights. **Nucleic Acids Research**, v. 49, n. W1, p. W388–W396, 2021.

PEREIRA, P.P.A.; LIMA, L.K.S.; SOARES, T.L.; *et al.* Initial vegetative growth and survival analysis for the assessment of *Fusarium* wilt resistance in *Passiflora* spp. **Crop Protection**, v. 121, p. 195-203, 2019.

PEREIRA, R.J.; CARDOSO, M.G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 3, n.4, p. 146-152, 2012.

PINTO, P.L. **EXTRAÇÃO E SEPARAÇÃO DE FLAVONOIDES DO EXTRATO DA CASCA DO MARACUJÁ**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2018.

PRADI, L.; ANDRADE, T. E. S.; LACERDA, J. W. F.; *et al.* The Antinociceptive Effect of a Hydroalcoholic Extract of *Polygala altomontana* and Its Chemical Profile Using UPLC-ESI-QTOF-HR-MS. **Chemistry & Biodiversity**, v. 20, n. 1, 2023.

RAO, S.R.; RAVISHANKAR, G.A. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. **Biotechnol Adv.**, v. 20, p. 101–153, 2002.

REBOUL, R.; GESERICK, C.; PABST, M.; *et al.* Down-regulation of UDP-glucuronic Acid Biosynthesis Leads to Swollen Plant Cell Walls and Severe Developmental Defects Associated with Changes in Pectic Polysaccharides. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 46, p. 39982–39992, 2011.

RINALDI, M.M.; COSTA, A.M.; DIANESE, A.C. Armazenamento de *Passiflora setacea* cv BRS Pérola do Cerrado em diferentes embalagens e temperaturas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos: pesquisa e práticas contemporâneas**, v. 3, 2022.

RIZWANA, H.; AL OTIBI, F.; AL-MALKI, N. Chemical composition, FTIR Studies and Antibacterial Activity of *Passiflora edulis* f. *edulis* (Fruit). **Journal of Pure and Applied Microbiology**, v. 13, n. 4, p. 2489–2498, 2019.

- ROMANINI, C.V.; MACHADO, M.W.; BIAVATTI, M.W.; *et al.* Avaliação da atividade ansiolítica e antidepressiva do extrato fluido e fração aquosa de folhas de *Passiflora alata* Curtis em camundongos. **Acta Scientiarum Health Science**, v. 28, n.2, 2006.
- SAAVEDRA, T.; GAMA, F.; RODRIGUES, M.A.; *et al.* Effects of foliar application of organic acids on strawberry plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 188, p. 12–20, 2022.
- SAMANTA, A.; DAS, G.; DAS, S.K.. ROLES OF FLAVONOIDS IN PLANTS. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 6, n. 1, p. 12–35, 2011.
- SANTANA, F.C.; SHINAGAWA, F.B.; ARAÚJO, E.S.; *et al.* Chemical composition and antioxidant capacity of Brazilian *Passiflora* seed oils, **Journal of Food Science**. v. 80, 2015.
- SANTANA, F. B. D.; SOUZA, A. M. D.; ALMEIDA, M. R.; *et al.* Experimento didático de quimiometria para classificação de óleos vegetais comestíveis por espectroscopia no infravermelho médio combinado com análise discriminante por mínimos quadrados parciais: Um tutorial, PARTE V. **Química Nova**, v. 43, n3, p. 371-381, 2020.
- SANTOS, M. A.; BARBIERI, A. F.; CARVALHO, J. A. M.; *et al.* **O cerrado brasileiro: notas para estudo**. Belo Horizonte: UFMG/Cedeplar, 2010.
- SANTOS-SÁNCHEZ, N.F.; SALAS-CORONADO, R.; VILLANUEVA-CAÑONGO, C.; *et al.* Antioxidant Compounds and Their Antioxidant Mechanism. **IntechOpen**, 2019.
- SANTOS-TIERNO, R.; GARCIA, R.; FONSECA, E.; *et al.* Flavonoid content and antioxidant potential of leaf extracts of *Passiflora setacea* cv BRS Pérola do Cerrado, a new wild passion fruit cultivar. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 16, n. 2, p. 26-34, 2022.
- SENTHIL, K.; THIRUGNANASAMBANTHAM, P.; OH, T.J.; *et al.* Free Radical Scavenging Activity and Comparative Metabolic Profiling of *In Vitro* Cultured and Field Grown *Withania somnifera* Roots. **PLOS ONE**, v. 10, n. 4, p. e0123360, 2015.
- SHAKOUR, Z. T. A.; RADWA, H.; ELSHAMY, A. I.; *et al.* Dissection of *Moringa oleifera* leaf metabolome in context of its different extracts, origin and in relationship to its biological effects as analysed using molecular networking and chemometrics. **Food Chemistry**, v. 399, p. 133948, 2023.
- SHI, M.; ALI, M.M.; HE, Y.; *et al.* Flavonoids Accumulation in Fruit Peel and Expression Profiling of Related Genes in Purple (*Passiflora edulis* f. *edulis*) and Yellow (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) Passion Fruits. **Plants**, v. 10, n.11, 2021.
- SILVA, A.S.; OLIVEIRA, E.J.; HOHENFELD, C.S.; *et al.* Variação genética em isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* com marcadores AFLP. **Embrapa Mandioca e Fruticultura**, 2010.
- SILVA, F.C.O.; FERREIRA, M.K.A.; SILVA, A.W.; *et al.* Bioactivities of plant-isolated Triterpenes: A brief review. **Revista Virtual de Química**, v. 12, n. 1, p. 234–247, 2020.

- SILVA, G.S.; BORGES, G.S.C.; CASTRO, C.D.P.C.; *et al.* Physicochemical quality, bioactive compounds and *in vitro* antioxidant activity of a new variety of passion fruit cv. BRS Sertão Forte (*Passiflora cincinnata* Mast.) from Brazilian Semiarid region. **Scientia Horticulturae**, v. 272, 2020.
- SILVA, M.S.S.; CITÓ, A.M.G.L.; CHAVES, M.H.; *et al.* Triterpenóides tipo cicloartano de própolis de Teresina - PI. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 801–804, 2005.
- SILVA, P.O. **Desenvolvimento foliar em *Passiflora edulis* Sims.: caracterização do perfil metabólico, da expressão gênica e do papel de açúcares na modulação das vias miR156 e miR172.** 2017. 71 f. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2017.
- SIRÓ, I.; KÁPOLNA, E.; KÁPOLNA, B.; *et al.* Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance - a review. **Appetite**, v. 51, n. 3, p. 456-467, 2008.
- SMETANSKA, I. Production of Secondary Metabolites Using Plant Cell Cultures. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, vol 111, p. 187–228, 2008.
- STAFNE, E. T. Controlled Pollination to Assess Intraspecific Compatibility Among *Passiflora incarnata* Genotypes from Different Provenances. **HortScience**, v. 57, n. 8, p. 919-924, 2022.
- SOSSAI, P. Butyric acid: what is the future for this old substance? **Swiss Medical Weekly**, 2012.
- SOUZA, J.C.; RESCAROLLI, C.L.S.; NUNEZ, C.V. Produção de metabólitos secundários por meio da cultura de tecidos vegetais. **Revista Fitos**. Rio de Janeiro; v. 12; n. 3: p. 269-280. 2018.
- SOUZA, M.L.; DOURADO, D.; LÔBO, I.P. *et al.* Wild *Passiflora* (*Passiflora* spp.) seed oils and their nanoemulsions induce proliferation in HaCaT keratinocytes cells. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 67, 2022.
- SOZO, J.S. **Perfis de metabólitos secundários e atividade antioxidante de frutos, sementes e calos cultivados *in vitro* de *Passiflora setacea* e *Passiflora tenuifila* (Passifloraceae).** Dissertação (mestrado em Biotecnologia e Biociências) Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.
- STOCHERO, E.L.M.; JACOBI, L.F.; LÚCIO, A.D.'C. Imputação de dados na análise de variância em experimentos no Delineamento Inteiramente Casualizado. **Ciência e Natura**, v. 42, p. e37, 2020.
- STOCK, D. **Conversão de pectina cítrica a ácido D-Galacturônico usando pectinases produzidas por fermentação no estado sólido.** Dissertação (Mestrado em Química) Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.
- SULLADMATH, V.V.; SRINIVAS, K.; LAXMAN, R.H. Yield and Quality of Passion Fruit in Relation to Training Systems. **Journal of Horticultural Sciences**, v. 7, n. 1, p. 46-50, 2012.
- SUMNER, L.W.; AMBERG, A.; BARRETT, D.; *et al.* Proposed minimum reporting

standards for chemical analysis. **Metabolomics**, v. 3, n. 3, p. 211–221, 2007.

TAHJIB-UL-ARIF, Md.; ZAHAN, M.I.; KARIM, M.M.; *et al.* Citric Acid-Mediated Abiotic Stress Tolerance in Plants. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 13, p. 7235, 2021.

TAIZ, L., ZEIGER, E., MØLLER, I. M.; *et al.* **Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal - 6ed.** Porto Alegre: Artmed, 2017. 887 p.

TAVARES, J.T.Q.; CARDOSO, R.L.; COSTA, J.A.; *et al.* Interferência do ácido ascórbico na determinação de açúcares redutores pelo método de Lane e Eynon. **Química Nova**, v. 33, n. 4, p. 805–809, 2010.

TERHAAG, K. **Efeitos de tipos de explantes e auxinas no crescimento e produção de metabólitos secundários em culturas celulares de *Passiflora setacea* BRS Pérola do Cerrado (Passifloraceae)**. TCC (graduação em Ciências Biológicas) Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2019.

THANDIVEL, S.; RAJAN, P.; GUNASEKAR, T.; *et al.* In silico molecular docking and dynamic simulation of anti-cholinesterase compounds from the extract of *Catunaregam spinosa* for possible treatment of Alzheimer's disease. **Heliyon**, v. 10, n. 7, p. e27880, 2024.

TOZZI, H.H. **A semente de *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* O. Deg. (Maracujá-Amarelo) durante a germinação e crescimento inicial da plântula: a dinâmica de lipídios, carboidratos e cloroplastos, e sua relevância nesse período**. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2014.

TREVISAN, N.P.; TEODORO, E.I.S.; LIMA, C. B.; *et al.* Controle de qualidade da droga vegetal e preparação do extrato de folhas de *Passiflora edulis*. **Conjecturas**, v.21, n.3, p. 813–825, 2021.

TRIVEDI, M.K.; BRANTON, A.; TRIVEDI, D.; *et al.* Physical, Thermal, and Spectroscopic Characterization of Biofield Energy Treated Murashige and Skoog Plant Cell Culture Media. **Cell Biology**, v. 3, n. 4, p. 50-57, 2015.

TROVATO, M.; FUNCK, D.; FORLANI, G.; *et al.* Editorial: Amino Acids in Plants: Regulation and Functions in Development and Stress Defense. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, 2021.

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

FRITZ, V.A.; JUSTEN, V.L.; BODE, A.M.; *et al.* Glucosinolate enhancement in cabbage induced by jasmonic acid application. **HortScience**, v.45, n.8, p. 1188-1191, 2010.

VELLOSA, J.R.; BIAVATTI, M.; FRANÇOIA, P.C.O.; *et al.* Estresse oxidativo: uma introdução ao estado da arte. **Brazilian Journal of Development**, v.7, n.1, p.10152-10168, 2021.

VIEIRA, F. M.S.; ABRAO, F. Y.; NETO, J. R.O.; *et al.* Otimização do Extrato Bruto Hidroetanólico das Folhas de *Eugenia dysenterica* DC. pelo Método Box-Behnken e Avaliação das suas Atividades Antioxidante e Antimicrobiana. **Revista Virtual de Química**, v. 16, n. 3, 2024.

WAN, C.-P.; GAO, L.-X.; HOU, L.-F.; *et al.* Astragaloside II triggers T cell activation through regulation of CD45 protein tyrosine phosphatase activity. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 34, n. 4, p. 522–530, 2013.

WANG, J.; LI, J.-L.; LI, J.; *et al.* Production of Active Compounds in Medicinal Plants: From Plant Tissue Culture to Biosynthesis. **Chinese Herbal Medicines**, v. 9, n 2, p. 115-125, 2017.

WANG, X.; LI, N.; CHEN, S.; *et al.* MS-FINDER assisted in understanding the profile of flavonoids in temporal dimension during the fermentation of Pu-erh tea. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 70, n. 23, p. 7085-7094, 2022.

WENG, M.; LI, Y.; WU, L.; *et al.* Effects of passion fruit peel flour as a dietary fibre resource on biscuit quality. **Food Science and Technology**, Campinas, v.4, n.1, p.65-73, 2021.

XU, F.-Q.; WANG, N.; FAN, W.-W.; *et al.* Protective effects of cycloartane triterpenoides from *Passiflora edulis* Sims against glutamate-induced neurotoxicity in PC12 cell. **Fitoterapia**, v. 115, p. 122–127, 2016.

XU, Y.; HUANG, D.-M.; MA, F.-N.; *et al.* Identification of key genes involved in flavonoid and terpenoid biosynthesis and the pathway of triterpenoid biosynthesis in *Passiflora edulis*. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 22, n. 5, p. 1412–1423, 2023.

YOSHIMURA, K.; ISHIKAWA, T.. Chemistry and Metabolism of Ascorbic Acid in Plants. *In: Ascorbic Acid in Plant Growth, Development and Stress Tolerance*. Cham: Springer International Publishing, p. 1–23, 2017.

ZERAIK, M.L.; PEREIRA, C.A.; ZUIN, V.G.; *et al.* Maracujá: um alimento funcional. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.20, n.3, p.459-471, 2010.

ZHANG, J.; TAO, S.; HOU, G.; *et al.* Phytochemistry, nutritional composition, health benefits and future prospects of *Passiflora*: A review. **Food Chemistry**, v. 428, 2023.