



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

Antony Nadal Milezzi

Perfis de metabólitos produzidos por folhas, pericarpos, sementes e culturas *in vitro* de calos dos nós cotiledonares de *Passiflora setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado (PASSIFLORACEAE)

Florianópolis
2024

Antony Nadal Milezzi

Perfis de metabólitos produzidos por folhas, pericarpos, sementes e culturas *in vitro* de calos dos nós cotiledonares 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 Bacharel em Ciências Biológicas

Orientadora: Prof^ª Dra. Ana Maria Viana

Coorientadora: Ma. Ana Caroline da Silva

Florianópolis
2024

Nadal Milezzi, Antony

Perfis de metabólitos produzidos por folhas, pericarpos, sementes e culturas in vitro de calos de nós cotiledonares de *Passiflora setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado (PASSIFLORACEAE). / Antony Nadal Milezzi ; orientador, Ana Maria Viana, coorientador, Ana Caroline da Silva, 2024.

95 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. Extração Metabólitos Secundários. 3. Biotecnologia Vegetal. 4. Análise multivariada. 5. Calogênese. I. Viana, Ana Maria. II. Silva, Ana Caroline da. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Ciências Biológicas. IV. Título.

Antony Nadal Milezzi

Perfis de metabólitos produzidos por folhas, pericarpos, sementes e culturas *in vitro* de calos dos nós cotiledonares de *Passiflora setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado (PASSIFLORACEAE)

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

Florianópolis, 06 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 Antony e Flaviane.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Universidade Federal de Santa Catarina por ser uma universidade pública de qualidade, que me propiciou a estudar em um dos melhores cursos de Ciências Biológicas do país com professores do mais alto nível.

Agradeço a Dra. Ana Maria Costa (Embrapa Cerrados/Centro de Pesquisa Agropecuária dos Cerrados, Planaltina, DF), por disponibilizar todo o material vegetal utilizado nessa pesquisa e aos Departamentos de Química (Laboratório de Química de Produtos Naturais/QMC/CFM/UFSC) e de Botânica (Laboratório de Fisiologia Vegetal/Biotecnologia Vegetal/BOT/CCB/UFSC), que disponibilizaram a estrutura necessária para realizar este trabalho.

Sou extremamente grato à professora Dra. Ana Maria Viana por me aceitar como orientado, sem hesitar, mesmo me conhecendo apenas em uma aula de sua disciplina de Fisiologia Vegetal, me dando toda a atenção e suporte que precisava nessa caminhada.

Gratifico o professor Dr. Louis P. Sandjo do Departamento de Química (LQPN/QMC/UFSC), por todo apoio, desde a elaboração do projeto de pesquisa e durante todo o desenvolvimento do trabalho. Agradeço também a Dra. Geovanna de Oliveira Costa e a doutoranda Ana Caroline da Silva, orientadas do Prof. Louis P. Sandjo, ambas do Programa de Pós Graduação em Química (QMC/UFSC), que atuaram com muita dedicação e eficiência nas fases das análises químicas, identificação dos compostos, análises estatísticas e interpretação dos resultados.

Ao meu supervisor de estágio e amigo Sérgio Stähelin por ter me acolhido como seu pupilo e ter me ensinado tantas coisas em 7 meses, indo muito além do mundo acadêmico, que não aprenderia nem em quantidade quanto em excelência nos 7 anos de graduação.

A minha companheira de TCC, Victória, que me ajudou muito na construção do trabalho e se tornou um porto seguro no qual pudemos compartilhar nossas dificuldades, deixando todo o processo do trabalho muito mais leve e suportável.

Aos meus tios Alceu, Janete e Regiane e ao Wellington que sempre foram como um segundo pai ou mãe quando eu mais precisava e as minhas irmãs Angélica, Hayssa e Paula que têm a capacidade de me fazer rir e me deixar de alto astral mesmo nos piores momentos. Aos meus primos Arthur, Giulia, José e Victor, é impossível imaginar minha vida sem a presença de vocês, meus companheiros de alegria e tristeza, diversão e desabafo.

Aos meus incríveis e extraordinários amigos Brendo, Larissa e Nataly, que acompanharam cada passo que dei durante essa jornada da graduação, me levantando sempre

que tropeçava. Nunca esquecerei dos momentos de café entre aulas, das fofocas e piadas nos corredores, dos banhos de sol e cochilo nas gramas do campus, dos momentos de tensão antes das provas e do alívio depois delas. Com toda certeza a minha passagem na UFSC não teria valor algum se não tivesse cruzado caminho com vocês.

Agradeço eternamente aos meus pais por toda a confiança e suporte que me deram durante toda a vida, não há palavras suficientes que meçam o quão importante vocês são para mim.

RESUMO

Passiflora setacea D.C. (Passifloraceae) é uma espécie endêmica do Brasil, mais especificamente nos biomas do Cerrado e Caatinga. É conhecida como maracujá-do-sono por ter diversas propriedades terapêuticas, principalmente como calmante e antioxidante. O cultivar BRS Pérola do Cerrado foi lançado pela Embrapa em 2013, é o primeiro cultivar proveniente de uma espécie selvagem de *Passiflora* registrado e protegido. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do tempo de cultivo no incremento em biomassa e nos perfis de metabólitos secundários de calos de nós cotiledonares cultivados *in vitro* 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. A avaliação dos calos ocorreu após 30, 60 e 90 dias de cultivo. Os perfis fitoquímicos dos calos foram comparados com os de folhas, cascas de frutos e sementes. Todos os tipos de materiais vegetais foram secos ao ar livre, em temperatura de $23 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade relativa de 70%, até a estabilização da massa seca. O material seco de cada amostra foi macerado e mantido em solução hidroalcoólica de etanol 70% (v/v) para extração, filtrado e posteriormente processado usando cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada com espectrometria de massas (CLUE-ESI-EM). Os dados cromatográficos e espectrométricos resultantes foram analisados usando os softwares MS-DIAL e MS-FINDER para identificação dos metabólitos, criando um perfil metabolômico para as amostras analisadas. O perfil metabolômico foi obtido a partir do software MetaboAnalyst, incluindo análise de componentes principais (PCA), K-means clustering e importância da variável na projeção (VIP) baseada na análise discriminante de mínimos quadrados parciais (PLS-DA). Os resultados revelaram que o tempo de cultivo de 30 dias foi o mais eficiente em termos de incremento de massa seca e na diversidade de compostos. Apesar dos tempos de cultivo de 60 e 90 dias serem menos eficientes, houve associação com diferentes tipos de metabólitos baseado nos VIP scores, indicando a influência do tempo de cultivo tanto no crescimento dos calos quanto no perfil metabólico. De modo geral, o perfil metabólico dos calos foi mais similar ao das cascas de frutos, mas as folhas apresentaram maior diversidade de metabólitos. Ácidos orgânicos de interesse farmacêutico, como os ácidos aspártico, treônico, D- ribônico e succínico foram amplamente detectados nos calos. Ácidos orgânicos, flavonoides, terpenos, lipídios e fosfolipídios foram também encontrados em amostras dos outros materiais vegetais. Análises dos metabólitos via VIP revelou o alto potencial das culturas *in vitro* de nós cotiledonares como fontes de metabólitos relevantes, com atividade biológica como ácido cítrico (VIP score 1,6) e o flavonoide sabian (VIP score 1,4), além do flavonoide O-metil-epicatequina (VIP score 1,2) e dos terpenos cicloartano glicosídeos e astragalosídeo II (VIP scores próximos de 1,0). Esses resultados destacam o potencial dos calos de nó cotiledonar de *P. setacea* para produzir metabólitos secundários de interesse comercial e enfatizam a necessidade de pesquisas adicionais sobre vários aspectos dos bioprocessos envolvidos, em particular o tempo de cultivo e os métodos de extração.

Palavras-chave: Sabian, cultura de calos, maracujá-do-sono, CLUE-ESI-EM, análise multivariada, metabólitos

ABSTRACT

Passiflora setacea D.C. (Passifloraceae) is an endemic species of Brazil, specifically found in the Cerrado and Caatinga biomes. It is known as “maracujá-do-sono” (sleep passionfruit) due to its various therapeutic properties, mainly as a calming and antioxidant agent. The cultivar BRS Pérola do Cerrado was released by Embrapa in 2013, being the first cultivar derived from a wild species of *Passiflora* to be registered and protected. The aim of this study was to evaluate the effect of cultivation time on biomass increment and the profiles of secondary metabolites of calluses from cotyledonary nodes cultured *in vitro* in Murashige & Skoog (MS) medium, supplemented with 88.5 mM sucrose; 2.5 μ M 2,4-D and 0.2% Phytigel. The evaluation of the calluses occurred after 30, 60, and 90 days of cultivation. The phytochemical profiles of the calluses were compared with those of leaves, fruit peels, and seeds. All types of plant materials were air-dried at a temperature of $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ and relative humidity of 70% until dry mass stabilization. The dried material of each sample was macerated and kept in a hydroalcoholic solution of 70% ethanol (v/v) for extraction, filtered, and subsequently processed using ultra performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry (UPLC-ESI-MS). The resulting chromatographic and spectrometric data were analyzed using MS-DIAL and MS-FINDER software for metabolite identification, creating a metabolomic profile for the analyzed samples. The metabolomic profile was obtained using MetaboAnalyst software, including principal component analysis (PCA), K-means clustering, and variable importance in projection (VIP) based on partial least squares discriminant analysis (PLS-DA). The results revealed that the 30-day cultivation period was the most efficient in terms of dry mass increment and compound diversity. Although the 60 and 90-day cultivation periods were less efficient, they were associated with different types of metabolites based on VIP scores, indicating the influence of cultivation time on both callus growth and metabolic profile. Overall, the metabolic profile of the calluses was more similar to that of fruit peels, but the leaves showed greater metabolite diversity. Organic acids of pharmaceutical interest, such as aspartic, threonic, D-ribonic, and succinic acids, were widely detected in the calluses. Organic acids, flavonoids, terpenes, lipids, and phospholipids were also found in samples of other plant materials. Analysis of metabolites via VIP revealed the high potential of *in vitro* cultures of cotyledonary nodes as sources of relevant metabolites with biological activity, such as citric acid (VIP score 1.6) and the flavonoid sabian (VIP score 1.4), as well as the flavonoid O-methyl-epicatechin (VIP score 1.2) and the terpenes cycloartane glycosides and astragaloside II (VIP scores close to 1.0). These results highlight the potential of cotyledonary node calluses of *P. setacea* to produce secondary metabolites of commercial interest and emphasize the need for further research on various aspects of the involved bioprocesses, particularly cultivation time and extraction methods.

Keywords: Sabian, calluses culture, sleep passionfruit, UPLC-ESI-MS, multivariate analysis, metabolites

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Aspecto das cascas de frutos (a), sementes (b) e folhas (c) secas ao ar livre de *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado.....24
- Figura 2. Culturas de calos de nó cotiledonar de *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado cultivadas em meio de cultura Murashige & Skoog (MS), suplementado com 88,5 mM de sacarose, 2,5 µM de 2,4-D e 0,2 % de Phytigel em tubos de ensaio de 20 mm x 150 mm.....25
- Figura 3. Calos de *Passiflora setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado frescos e secos originados de segmentos de nó cotiledonar 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, após 30, 60 e 90 dias de cultivo.....26
- Figura 4. Calos de nó cotiledonar de *Passiflora setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado secos de 60 dias(a) e de 30, 60 e 90 dias(b) imersos em solução aquosa de etanol 70% para extração.....28
- Figura 5: Evaporador rotatório da IBBL utilizado para a remoção do solvente dos extratos de cascas, sementes folhas e calos de nó cotiledonar de *Passiflora setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado.....28
- Figura 6. Detalhes morfológicos dos calos originados de segmentos de nó cotiledonar 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 aos 30 (a), 60 (b) e 90 (c) dias de cultivo.....33
- Figura 7. Variações na massa fresca (A), massa seca (B), razão massa seca/massa fresca (C) e teor de água (D) dos calos de *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado originados a partir de segmentos de nó cotiledonar após 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. Valores são médias ± desvio padrão de 23-86 repetições por tratamento. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas entre os tempos de cultivo pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).....39
- Figura 8. Análise de regressão linear entre massa fresca e massa seca de calos de *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado originados a partir de segmentos de nó cotiledonar após 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.....40
- Figura 9. Cromatogramas obtidos em modo de ionização negativo 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.....42
- Figura 10. Cromatogramas obtidos em modo de ionização negativo de extratos brutos de nós cotiledonares de *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado cultivados por 30 (NC30, A), 60 (NC60), B) e 90 (NC90) 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 11. 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 nó cotiledonar de *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado cultivados *in vitro* por 30 (NC30), 60 (NC60) e 90 (NC) dias em meio Murashige & Skoog suplementado com 88,5 mM de sacarose, 2,5 mM de 2,4-D e 0,2% de Phytigel.....63

Figura 12. 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 nó cotiledonar de *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado cultivados *in vitro* por 30 (NC30), 60 (NC60) e 90 (NC) dias em meio Murashige & Skoog suplementado com 88,5 mM de sacarose, 2,5 mM de 2,4-D e 0,2% de Phytigel.....65

Figura 13. Importância da Variável na Projeção (VIP) scores de metabólitos detectados em extratos de folhas (fo), cascas (ca), sementes (se) e calos de nó cotiledonar de *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado nos tempos de cultivo de 30 (NC30), 60 (NC60) e 90 (NC90) dias em meio 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.....67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Efeito do tempo de cultivo no aspecto dos calos de <i>P. setacea</i> cv. BRS Pérola do Cerrado originados a partir de segmentos de nó cotiledonar após 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.	34
Tabela 2. Efeito do tempo de cultivo no crescimento dos calos de <i>P. setacea</i> cv, BRS Pérola do Cerrado originados a partir de segmentos de nó cotiledonar após 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	36
Tabela 3 – Valores de massas utilizadas na extração e obtidos para os extratos brutos de folhas, cascas, sementes e de calos de nó cotiledonar de 30, 60 e 90 dias de cultivo de <i>Passiflora setacea</i> cv. BRS Pérola do Cerrado.....	41
Tabela 4. Metabólitos identificados por CLUE-ESI-MS nos extratos hidroalcoólicos brutos de folhas (Fo), cascas de frutos (Ca), sementes (Se) e calos de <i>P. setacea</i> cv. BRS Pérola do Cerrado originados a partir de segmentos de nó cotiledonar após 30 (NC30), 60 (NC60) e 90 (NC90) 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.....	45
Tabela 5. Compostos detectados por CLUE-ESI-MS em extratos de folhas, cascas, sementes e calos de nó cotiledonar de <i>P. setacea</i> cv. BRS Pérola do Cerrado após cultivo em meio Murashige & Skoog suplementado com 88,5 mM de sacarose, 2,5 mM de 2,4-D e 0,2% de Phytigel.....	47
Tabela 6. Classes químicas majoritárias detectadas por CLUE-ESI-MS nos extratos brutos de cascas de frutos, folhas e sementes de <i>P. setacea</i> cv. BRS Pérola do Cerrado.....	48
Tabela 7. Compostos detectados por CLUE-ESI-MS em extratos de calos de nó cotiledonar de <i>P. setacea</i> cv. BRS Pérola do Cerrado após 30 (NC30), 60(NC60) e 90 (NC90) dias cultivo em meio Murashige & Skoog suplementado com 88,5 mM de sacarose, 2,5 mM de 2,4-D e 0,2% de Phytigel.	59
Tabela 8. Metabólitos de cascas, folhas, sementes e calos de nós cotiledonares de <i>P. setacea</i> cv. BRS Pérola do Cerrado cultivados por 30, 60 e 90 dias em meio Murashige & Skoog suplementado com 88,5 mM de sacarose, 2,5 mM de 2,4-D e 0,2% de Phytigel classificados de acordo com os intervalos crescentes de valores VIP obtidos pela análise PLS-DA.....	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2,4-D - Ácido 2,4-diclorofenoxiacético	MS - Meio de cultura Murashige & Skoog
ANA - Ácido α -naftalenoacético	m/z - Razão massa por carga
ANOVA - Análise de variância	N - Molar por litro
BAP - Benzilaminopurina	NC30 - Nó cotiledonar cultivo de 30 dias
BRS - Sigla de cultivares lançadas pela Embrapa, que são protegidas junto ao SNPC, ligado ao MAPA	NC60 - Nó cotiledonar cultivo de 60 dias
Ca - Cascas	NC90 - Nó cotiledonar cultivo de 90 dias
CLUE-ESI-EM - Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada à Espectrometria de Massa	PCA - Análise de Componentes Principais
Da - Daltons	PLS-DA - Análise Parcial de Mínimos Quadrados Discriminantes
Fo - Folhas	ppm - Partícula por milhão
g/L - Grama por litro	pH - Índice de acidez ou basicidade
Kgf/cm ³ - Quilogramas-força por centímetro cúbico	Se - Sementes
kV - Quilovolt	SNPC - Serviço Nacional de Proteção de Cultivares
LED - Diodo Emissor de Luz (Light-Emitting Diode)	TDZ - Thidiazuron
Lh ⁻¹ - Litros por hora elevado na -1	t _R - Tempo de retenção
M - Molar	VIP - Variável de importância para a projeção
MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento	V - Volts
mg - Miligrama	μ L - Microlitros
min - Minutos	μ M - Micromolar
mL - Mililitros	°C - Graus Celsius
mM - Milimolar	% m/V - Proporção de massa por volume
mm - Milímetros	

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
1.1	Família e espécie.....	15
1.2	Estudos fitoquímicos e atividades biológicas de <i>Passiflora L.</i>	15
1.3	Estratégias biotecnológicas para a produção de metabólitos secundários.....	17
1.4	Estudos biotecnológicos sobre <i>P. setacea.</i>	19
1.5	Justificativa e Objetivos.....	21
1.5.1	Justificativa.....	21
1.5.2	Objetivo Geral.....	22
1.5.3	Objetivos Específicos.....	23
2.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
2.1	Materiais.....	24
2.2	Métodos.....	24
2.2.1	Cultivo <i>in vitro</i> dos calos.....	24
2.2.1.1	Indução e manutenção das culturas <i>in vitro</i> de calos.....	24
2.2.1.2	Preparação do meio de cultura e condições de crescimento das culturas.....	25
2.2.2	Determinação das biomassas fresca, seca e do teor de água dos calos.....	25
2.2.3	Análises estatísticas dos experimentos de cultivo <i>in vitro</i> dos calos.....	26
2.3	Análise por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas (CLUE-ESI-EM).....	27
2.3.1	Extração do material vegetal.....	27
2.3.2	Análise por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada à Espectrometria de Massa (CLUE-ESI-EM).....	29
2.3.3	Processamento dos dados cromatográficos e espectrométricos para a identificação de metabólitos.....	30
2.3.4	Análise estatística de dados metabolômicos.....	31
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
3.1	Crescimento das culturas <i>in vitro</i>	33
3.1.1	Efeito do tempo de cultivo nas características morfológicas dos calos de <i>P. setacea</i> originados a partir de segmentos de nó cotiledonar.....	33
3.1.2	Efeito do tempo de cultivo no crescimento dos calos de <i>P. setacea</i> originados a partir de segmentos de nó cotiledonar.....	35
3.2.	Análise por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas (CLUE-ESI-EM).....	41

3.2.1	Rendimento da massa extraída obtida para análise CLUE-ESI-EM.....	41
3.2.2	Cromatogramas e perfis químicos obtidos por análise CLUSE-ESI-EM dos extratos de folhas, cascas, sementes e calos de nós cotiledonares de <i>P. setacea</i>	41
3.2.3	Análise do perfil químico de extratos brutos de folhas de <i>P. setacea</i> cv. BRS Pérola do Cerrado.....	48
3.2.4	Análise do perfil químico do extrato bruto de cascas de fruto de <i>P. setacea</i> cv. BRS Pérola do Cerrado.....	52
3.2.5	Análise do perfil químico do extrato bruto de sementes de <i>P. setacea</i> cv. BRS Pérola do Cerrado.....	55
3.2.6	Análise do perfil químico do extratos brutos dos calos de nós cotiledonares de <i>P. setacea</i> cv. BRS Pérola do Cerrado em vários tempos de cultivo.....	58
3.3.7	Análise estatística multivariada não supervisionada da análise de componentes principais (PCA) considerando todos tipos de materiais vegetais de <i>P. setacea</i> cv. BRS Pérola do Cerrado.....	62
3.3.8	Identificação de grupos de amostras através do algoritmo “K-means”.....	64
3.3.9	Análise estatística multivariada supervisionada pelo método PLS-DA.....	65
4	CONCLUSÃO.....	71
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVA FUTURA.....	74
	REFERÊNCIAS.....	75
	APÊNDICES.....	92

1 INTRODUÇÃO

1.1 Família e espécie

Passifloraceae é uma família botânica com ampla prevalência em regiões tropicais e subtropicais, possuindo aproximadamente 700 espécies divididas em 20 gêneros (NUNES; QUEIROZ, 2006). No Brasil existem 4 gêneros, sendo *Passiflora* L. de maior expressão, com mais de 140 espécies das quase 560 existentes do gênero (MÄDER *et al.*, 2009). De modo geral, as espécies de *Passiflora* são chamadas de maracujás e muitas possuem grande importância econômica, enquanto que as silvestres ainda são pouco introduzidas no mercado nacional (TERHAAG, 2019). A comercialização é voltada no consumo do fruto *in natura*, principalmente àquelas que tenham acesso aos cultivares geneticamente melhorados, para ornamento e pelas propriedades fitoterápicas, pois contém substâncias bioativas diversas com interesse farmacológico (DHAWAN; DHAWAN; SHARMA, 2004; OLIVEIRA; FALEIRO; JUNQUEIRA, 2017).

A espécie *Passiflora setacea* DC., mais conhecida como maracujá-sururuca ou maracujá-silvestre, é uma das quase 200 espécies silvestres de maracujá no Brasil (COSTA; MORAIS; SANTOS, 2014), conhecida pelos seus efeitos contra a insônia e ansiedade, por isso o nome popular sururuca (CARVALHO; OLIVEIRA; COSTA, 2018). É natural de capoeiras e restingas presentes nos biomas Cerrado e Caatinga, sendo encontrada nos estados da Bahia, Rio de Janeiro, Goiás, Minas Gerais, Espírito Santo, Mato Grosso e Alagoas (RUGGIERO; OLIVEIRA, 2005; LORENZI *et al.*, 2006). O cultivar BRS Pérola do Cerrado foi lançado pela Embrapa em 2013 e é o primeiro cultivar registrado e protegido de uma espécie selvagem de *Passiflora*. Com o intuito de explorar a variabilidade genética e inserir *P. setacea* no mercado comercial, esse cultivar foi criado pelo programa de melhoramento genético da Embrapa Cerrados, sendo então o primeiro cultivar de maracujazeiro silvestre registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (COSTA *et al.*, 2015).

1.2 Estudos fitoquímicos e atividades biológicas de *Passiflora* L.

Muitas pesquisas têm sido conduzidas com o intuito de aprofundar as análises fitoquímicas e sobre as atividades biológicas das espécies de *Passiflora* L., como efeitos ansiolíticos, antioxidante, anti-inflamatório e antibacteriano (CARVALHO; OLIVEIRA; COSTA, 2018; RAMAIYA *et al.*, 2021). Esses trabalhos deixam claro que essas atividades se

devem à presença de diferentes metabólitos, principalmente os compostos fenólicos, flavonóides, saponinas, alcoóis, ésteres e aldeídos (SANTOS-TIERNO *et al.*, 2021). Porém, outras classes de compostos, como os carotenoides, que são metabólitos relevantes para a medicina, têm sido pouco estudados em passifloras. Os carotenoides desempenham importante função nutricional e para a saúde, por serem antioxidantes, além de fontes de retinol (Vitamina A¹), que é o principal pigmento presente no globo ocular, e do ácido retinóico, que é uma forma oxidada da vitamina A (QUIAN-ULLOA; STANGE, 2021). Essas moléculas são importantes para vários processos fisiológicos nos seres humanos como a ativação do sistema imunológico, sistema óptico e desenvolvimento embrionário. Além desses carotenoides, que são convertidos em vitamina A, outros carotenoides são também necessários para várias funções fisiológicas no corpo humano que atuam contra doenças degenerativas, como a luteína, a qual exerce atividade anticancerígena e contra degeneração da retina (ÁLVAREZ *et al.*, 2015; KRINSKY, 1994).

Os estudos fitoquímicos sobre a polpa de frutos de *P.setacea* conduzidos até o momento demonstraram a presença de vários metabólitos secundários como as poliaminas bioativas (espermidina, putrescina e agmatina), que atuam na saúde humana como antioxidantes e a triptamina, que é precursor do neurotransmissor serotonina (BOMTEMPO *et al.*, 2016); fenólicos totais, flavonóides, aminas bioativas e atividade antioxidante (SANCHEZ *et al.*, 2020); flavonóides orientina, isorientina, vitexina, isovitexina e hesperitina, com atividade antioxidante (CARVALHO; OLIVEIRA; COSTA, 2018; OLIVEIRA *et al.*, 2022). Os estudos de Sánchez *et al* (2020), por exemplo, enfatizaram o efeito da pasteurização da polpa de frutos sobre os níveis de flavonóides, vitamina C, fenólicos totais e aminas bioativas e nas qualidades físicas e sensoriais desses compostos.

Em folhas de *P. setacea* foram detectados os flavonoides homorientina, vitexina, isovitexina e orientina (GADIOLI *et al.*, 2017; GOMES *et al.*, 2017; WOSCH *et al.*, 2017); isovitexina e isovitexina-2-O-xilosídeo como discriminante do grupo *P. setacea* var. BRS Pérola do Cerrado entre várias espécies de Passifloras (DUTRA *et al.*, 2023). Em sementes de *P. setacea* foram detectados óleos que estimularam a proletração de ceratinócitos e melhorou o processo de cicatrização através de uso tópico, com potencial terapêutico e cosmético (SOUZA *et al.*, 2022).

Essas pesquisas previamente relatadas indicam o potencial medicinal de *P. setacea*, uma vez que a revisão publicada por He *et al.* (2016) sobre atividades biológicas da vitexina e isovitexina ressaltam inúmeras ações dessas moléculas como neuroprotetor, anti-neoplásico, protetor do sistema cardiovascular, protetor contra os efeitos da diabetes atuando como

inibidores da alfa-glucosidase presente nos intestinos, enzima chave para degradar os carboidratos. Além dessas atividades notadamente comprovadas, essas moléculas atuam também como agentes anti-microbiano, anti-viral, anti-depressivo, anti-convulsão, antiepilético, anti-Alzheimer, antinociceptiva, anti-injúria por hipoxia e esquemia.

1.3 Estratégias biotecnológicas para a produção de metabólitos secundários

Muitas vezes, quando se tem interesse em explorar algum gênero ou espécie, pode ocorrer o problema de disponibilidade de material para extração e preservação da espécie, principalmente aquelas que estão em estado silvestre e sofreram seleção artificial e/ou aperfeiçoamentos genéticos (PIRES, 2022), como é o caso da *P. setacea*, que possui reprodução por germinação escassa (SANTOS *et al.*, 2010) e dificuldades na reprodução vegetativa (PÁDUA *et al.*, 2011). Uma forma de contornar esses tipos de problemas é fazendo o uso das ferramentas que a biotecnologia nos oferece.

A micropropagação é uma técnica que emprega o cultivo *in vitro* de tecidos vegetais com o intuito de multiplicar assexuadamente as células ou os organismos de interesse, livre de patógenos e conservando o genótipo do indivíduo original, sendo uma forma de manter sempre disponível o material para aplicação de outras técnicas (TORRES *et al.*, 2000). É realizada a partir de explantes, que são segmentos de tecidos ou órgãos, que podem regenerar *in vitro*, órgãos inteiros, como ramos e raízes (organogênese), embriões (embriogênese) ou os calos, através da desdiferenciação e proliferação das células (calogênese)(ANDRADE, 2002). O trabalho de Shekhawat *et al.* (2015) é um bom exemplo do uso da micropropagação, onde induziu a formação *in vitro* de raízes e, conseqüentemente, a produção em massa de plantas inteiras a partir de segmentos nodais de ramos em *Passiflora foetida*, uma espécie com múltiplas funções medicinais de grande interesse para as indústrias farmacêuticas. Os sistemas de micropropagação, quando otimizados, também podem ser utilizados para a produção de metabólitos secundários de interesse biotecnológico.

Para a obtenção de metabólitos secundários um dos processos mais vantajosos é o da calogênese, onde os calos, que são agrupamentos de células, normalmente pouco diferenciadas, podem ser utilizados tanto para produzir os metabólitos secundários como para se diferenciar em órgãos como ramos e raízes (organogênese indireta), que também podem produzir esses metabólitos (JAFARI; DANESHVAR, 2024). Em seu trabalho, Jafari e Daneshvar (2024), utilizando calos de *Passiflora caerulea*, demonstraram que os principais fatores que influenciam o processo de calogênese são o tipo de explante escolhido, o meio de

cultura e os reguladores de crescimento, enfatizando a necessidade de desenvolver protocolos adequados para aplicação eficiente da técnica.

Os sistemas de cultura *in vitro* de calos são muito relevantes e amplamente difundidos, como método para desenvolver a produção de metabólitos secundários, pois os calos podem ser manipulados com diferentes tipos de elicitores bióticos e abióticos, para otimizar as vias de biossíntese dos metabólitos de interesse, sendo uma ferramenta relatada em vários estudos que avaliam o potencial biológico e biotecnológico de várias espécies vegetais (PÉREZ-ALONSO; JIMÉNEZ, 2011). Inúmeros são os relatos na literatura de espécies em que a utilização da estratégia de cultivos *in vitro* de calos e de suspensões celulares são viabilizados para a produção de biomassa vegetal em biorreatores, para o escalonamento do processo de produção e extração de metabólitos secundários em condições controladas, que garantem a estabilidade da produção em condições controladas de luminosidade e temperatura.

Trabalhos com outros gêneros constataram que mais fatores, como temperatura e luz, também influenciaram na calogênese, além de fitohormônios, como o ácido salicílico, que promove a produção de carotenoides *in vitro* por plantas micropropagadas de *Nasturtium officinale* (KLIMEK-SZCZYKUTOWICZ *et al.*, 2022). Há também estudos com foco em fatores incomuns como fontes de luz de LED azul em sacos embrionários de *Citrus* (MA *et al.*, 2021) e herbicidas aplicados em calos e suspensões de *Solanun lycopersicum* (ENGELMANN *et al.*, 2010).

Revisões recentes mostram que as tecnologias de cultura de calos, de suspensões celulares e de raízes *in vitro* tem sido amplamente utilizadas em várias espécies, viabilizando alternativas promissoras para a produção de diversos metabólitos secundários com atividade biológicas (CHANDRAN *et al.*, 2020; ABDULHAFIZ *et al.*, 2022). Esses autores citam alguns exemplos de espécies e de metabólitos secundários de interesse, produzidos por culturas *in vitro* e com aplicações farmacológicas, como compostos fenólicos, flavonoides, ginsenosídeos, vimblastina, vincristine, atropina, taxol e quinino. Ressaltam que a utilização da engenharia metabólica das vias de biossíntese e da utilização de elicitores bióticos (fragmentos de parede celular de pectina e celulose, polissacarídeos quitina, quitosana e hormônios como ácido salicílico, metil-jasmonato) e não bióticos (radiação UV, estresse nutricional e por metais pesados) têm sido eficiente em estimular e otimizar os processos de produção por células cultivadas *in vitro*.

1.4 Estudos biotecnológicos sobre *P. setacea*

Nos últimos anos têm aumentado o número de estudos científicos sobre a *P. setacea* em culturas *in vitro* e estudos sobre metabólitos secundários produzidos pelas folhas, sementes e polpa de frutos. Santos *et al* (2010), por exemplo, procurou estabelecer protocolos para micropropagação a partir de sementes de *P. setacea* e germinação *in vitro*. Vieira *et al.* (2014), por sua vez, buscou determinar o protocolo ideal para a organogênese combinando diferentes tipos de reguladores de crescimento e regimes de luz em explantes de folha, hipocótilo e raízes. Já Araújo *et al* (2022) estudou a morfogênese com o uso de dois elicitores, benziladenina (BAP) e thidiazuron (TDZ), usando hipocótilo, segmentos de nós e de raízes como explantes, e seus resultados exibiram tendência maior de formação de calos e plântulas em segmentos de nós tratados com BAP.

As pesquisas sobre *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado realizadas no Laboratório de Fisiologia Vegetal/Biotecnologia (BOT/CCB/UFSC) têm sido direcionadas para avaliar e otimizar o potencial do desenvolvimento de sistemas de cultura *in vitro* de calos para a produção de metabólitos secundários, em especial de compostos fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante, sempre em condições controladas (SOZO *et al.*, 2016).

O primeiro estudo desenvolvido por Sozo (2014) sobre a produção de metabólitos de *P. setacea* por culturas *in vitro* de calos demonstrou a influência do explante de origem dos calos e do período de cultivo na produção de compostos fenólicos, carotenoides e atividade antioxidante. Neste trabalho foram comparados, quanto à produção de luteína, calos originários de vários tipos de explantes, com diferentes períodos de cultivo e foi demonstrada a diferença entre os calos originados de segmentos de hipocótilo, nó foliar, raiz, nó cotiledonar e cotilédone, indicando a maior produção nos calos de nó foliar cultivados em 65 dias, seguido dos calos de hipocótilo com 45 dias e dos calos de nó foliar e de cotilédone de 45 dias cultivados em 88,5 milimolar (mM) de sacarose e 2,5 micromolar (μ M) de ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D).

Terhaag (2019) demonstrou o aumento significativo da biossíntese de carotenóides totais em calos de nó cotiledonar e de cotilédone cultivados em 88,5 mM de sacarose e 2,5 μ M de 2,4-D em comparação com o ácido α -naftalenoacético (ANA), indicando, para ambos os tipos de calos, a maior eficiência do 2,4-D como regulador de crescimento.

Montagner (2018), realizando um estudo mais completo sobre *P. setacea* confirmou a influência de diferentes tipos de explantes utilizados para iniciar as culturas de diferentes tipos de calos, fontes de carbono e da elicitação com ácido salicílico nos níveis de compostos

fenólicos totais, flavonoides, carotenoides, compostos voláteis, terpenos e atividade antioxidante dos vários tipos de calos. O estudo ainda mostrou um aumento significativo na concentração de luteína nos calos oriundos de segmentos de nó cotiledonar e cotilédone elicitados com ácido salicílico em comparação com os calos não elicitados, otimizando assim a produção de luteína pelos calos originados de nó cotiledonar e cotilédone. Detectou também vários perfis de compostos voláteis entre as culturas de calos originados a partir de diferentes tipos de explantes, além de demonstrar a influência promotora do ácido salicílico, aumentando os níveis de fenólicos totais e atividade antioxidante.

No estudo conduzido por Montagner (2018) foram utilizadas técnicas de análise de compostos dos extratos hidroalcoólicos por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CL-ESI-EM), que permitiu estabelecer os perfis dos compostos polifenólicos detectados em extratos de pericarpo, sementes, folhas e calos de nó cotiledonar e de cotilédone de *P. setacea*. Em folhas, pericarpos e sementes foram encontrados 11 ácidos fenólicos, 1 aldeído fenólico e 5 flavonoides. Os calos de nó cotiledonar e cotilédone em sacarose produziram 8 ácidos fenólicos, mas apenas os calos de nó cotiledonar em frutose produziram os flavonoides vitexina e isoorientina. Os calos de cotilédone produziram vitexina e isoorientina apenas após a elicitação com ácido salicílico.

Fonseca (2019), selecionou os dois tipos de calos mais promissores (calos de nó cotiledonar e cotilédone) em termos da biossíntese de metabólitos secundários para demonstrar o efeito promotor de certos tipos de meio de cultura, de fontes de carbono utilizadas isoladamente, incluindo a trealose ou em combinação de fontes de luz nos níveis de compostos fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante. Terhaag (2019) constatou, nesses calos, o efeito promotor de diferentes tipos de reguladores de crescimento nos níveis de fenólicos totais, flavonoides, clorofilas e carotenoides. Em todas essas pesquisas previamente mencionadas, os métodos de análises foram as técnicas de extração hidroalcoólica em álcool etílico 96% (v/v) de compostos fenólicos totais e flavonoides e de dosagens quantitativas com métodos colorimétricos.

Santos-Tierno *et al* (2021) analisaram o efeito da qualidade da luz (escuro, fluorescente e LED branco, azul vermelho e azul-vermelho) na produção de metabólitos de calos derivados de segmentos internodais do caule de *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado por HPLC-UV e HPLC-UV-ESI-MS/TOF (cromatografia líquida de alta performance acoplada ao detector de UV e espectrômetro de tempo de voo), que revelou a presença de 14 compostos, principalmente flavonoides e ácidos graxos, com o maior número de compostos detectados nos calos sob efeito do LED azul. Os maiores potenciais antioxidantes foram

obtidos nos calos intermodais mantidos sob luz fluorescente, LEDs azul e vermelho. As atividades das enzimas antioxidantes foram maiores sob LED vermelho. Esses pesquisadores avaliaram pela primeira vez os efeitos de vários tipos de luz sobre a formação de calos, produção de metabólitos secundários e atividade antioxidante, obtendo dados valiosos, como aumento da biomassa dos calos estimulado por LED vermelho e maior produção de substâncias bioativas por LED azul, gerando novas perspectivas de estudo na conjuntura da biotecnologia vegetal. Foram detectados 14 compostos principalmente ácidos graxos e alguns compostos fenólicos tirosol (apenas em LED azul) e derivados C-glicosil (em todos tipos de luz) e luteolina (flavonoide, apenas em LED azul).

Santos-Tierno et al. (2022) também analisaram, através da HPLC-UV-ESI-MS/TOF, o conteúdo de flavonoides e o potencial antioxidante de extratos hidroalcoólicos de folhas de plantas do cv. BRS Pérola do Cerrado liofilizadas crescidas *in vivo* e folhas de plantas micropropagadas *in vitro*. Os dois constituintes majoritários em ambos os extratos foram vicentina-2 e chaftosídeo; outros derivados de apigenina-C-glucosil (flavonoides) foram detectados em menores quantidades e um tipo específico de apigenina apareceu apenas nas folhas de plantas micropropagadas, mas não na folha planta crescida *in vivo*. O estudo demonstrou o potencial positivo das plantas crescidas *in vitro* para a produção alternativa de flavonoides, apesar de ambos extratos terem mostrado baixo potencial antioxidante e nenhuma diferença nas atividades das enzimas antioxidantes, apenas a atividade da enzima antioxidante APX (ascorbato peroxidase) foi maior em extratos de folhas de plantas micropropagadas.

1.5 Justificativas e objetivos

1.5.1 Justificativas

Os estudos preliminares conduzidos até o momento demonstraram que as culturas de calos de nó cotiledonar de *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado apresentaram o potencial para a produção de compostos fenólicos flavonoides, terpenos, clorofilas, carotenoides e atividade antioxidante *in vitro* e permitiram a seleção de alguns fatores que otimizaram a biossíntese dos compostos, como tipo de explante utilizado para iniciar as culturas de calos, meios de cultura e fontes de carbono, elicitores e tipo e concentração do regulador de crescimento. Esses resultados tornaram evidente, a necessidade de aprofundar vários estudos, como por exemplo, avaliar a dinâmica do crescimento e os perfis de metabólitos produzidos

pelos calos de nó cotiledonar, em diferentes períodos de cultivo, além de comparar os perfis dos calos com os perfis metabólitos de extratos de folhas, cascas e sementes.

Os métodos de análise dos calos de *P. setacea* utilizados nos estudos anteriores foram a CL-ESI-EM para identificação de compostos, como fenólicos e flavonóides, HS-SPME/CG-MS, para quantificação de terpenos e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), para detecção de carotenoides. A análise por CLUE-ESI-EM tem sido atualmente a mais utilizada na análise metabolômica de várias espécies de plantas e é considerada um método com alta eficácia e maior sensibilidade, utilizado para identificar e quantificar os compostos bioativos presentes nos materiais vegetais.

A cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE), devido à alta resolução, utiliza colunas de cromatografia de menor diâmetro, que contém partículas menores fazendo com que as separações entre os compostos ocorra com maior eficiência e mais rapidez. Já a espectrometria de massas com ionização por electrospray (ESI-EM) detecta os compostos que foram separados pela CLUE, fornecendo informações mais detalhadas sobre a estrutura molecular e identificação dos compostos. Nesse contexto, o método combinado de análise com CLUE-ESI-EM foi utilizado pela primeira vez no presente estudo, para gerar os perfis metabólicos de extratos de calos de nó cotiledonar, em diferentes tempos de cultivo e de extratos de folhas, cascas de frutos e sementes de *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado.

O estudo comparativo dos perfis gerados pelos calos em diferentes tempos de cultivo permite detectar o período de cultivo em que ocorre a maior produção de compostos de interesse para extração. A comparação entre os perfis dos calos, folhas, cascas e sementes permitirá avaliar o potencial de produção dos calos produzidos *in vitro* em relação às folhas, cascas de frutos e sementes. Tais experimentos fornecem dados mais consistentes sobre a dinâmica, em função do tempo, do crescimento e do metabolismo dos calos *in vitro*, possibilitando a otimização do momento mais adequado do tempo de cultivo para a extração dos compostos. Esses estudos contribuem para a melhor compreensão das vias de biossíntese em função do tempo de cultivo dos calos, além de entendermos sobre a viabilização da produção em larga escala de compostos bioativos.

1.5.2 Objetivo Geral

Esse trabalho teve como objetivos determinar o efeito do tempo de cultivo no crescimento e no perfil de metabólitos secundários de calos de nós cotiledonares de *P. setacea* e proceder à análise comparativa com os perfis metabólicos de folhas, cascas e sementes,

otimizar os protocolos para a produção de biomassa e de metabólitos secundários dos calos e gerar informações sobre o potencial de produção dos calos em relação aos demais materiais vegetais analisados.

1.5.3 Objetivos Específicos

- Verificar o efeito dos períodos de 30, 60 e 90 dias de cultivo no incremento em massa fresca e seca dos calos de nó cotiledonar de *P. setacea* e comparar os resultados;
- Verificar o efeito dos períodos de 30, 60 e 90 dias de cultivo nos perfis de metabólitos secundários dos calos;
- Determinar os perfis de metabólitos secundários de extratos de folhas, cascas e sementes de *P. setacea*;
- Fazer a análise comparativa dos perfis de metabólitos secundários dos calos e de nós cotiledonares cultivados *in vitro* com os materiais produzidos *in vivo* de folhas, cascas e sementes.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Materiais

Foram utilizadas neste trabalho folhas, cascas de frutos, sementes e calos de nó cotiledonar cultivados *in vitro* a partir de *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado. As folhas, frutos e sementes frescas foram cedidas pela Embrapa Cerrados, Planaltina, DF, Brasil. As culturas de calos de nó cotiledonar foram estabelecidas de acordo com a metodologia descrita no item 2.2. Aspectos dos diferentes tipos de materiais vegetais utilizados são mostrados nas Figuras 1 e 2.

Figura 1. Aspecto das cascas de frutos (A), sementes (B) e folhas (C) secas ao ar livre de *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado.



Fonte: Elaborado pelo autor.

2.2 Métodos

2.2.1 Cultivo *in vitro* dos calos

2.2.1.1 Indução e manutenção das culturas *in vitro* de calos

As culturas de calos de nó cotiledonar utilizadas foram obtidas segundo a metodologia descrita por Sozo *et al.* (2016), a partir do cultivo de segmentos nodais cotiledonares, removidos de plântulas axênicas originadas através da germinação *in vitro* de sementes de *P. setacea* variedade BRS Pérola do Cerrado. Os segmentos nodais cotiledonares de 1 cm de comprimento consistiam de caule da plântula e das duas gemas axilares presentes no ponto de inserção dos cotilédones. Os calos 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 e repicados em períodos de 30 dias, para gerar a biomassa necessária para conduzir os experimentos de cultivo dos calos por períodos de 30, 60 e 90 dias (Figura 2).

Figura 2. Culturas de calos de nó cotiledonar de *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado cultivadas 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 em tubos de ensaio de 20 mm x 150 mm.



Fonte: Elaborado pelo autor.

2.2.1.2 Preparação do meio de cultura e condições de crescimento das culturas

O meio de cultura (MS), uma mistura em pó preparada 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 solução de hidróxido de sódio 0,1 M ou de ácido clorídrico 0,1N. Após a dissolução em placa aquecedora foi distribuído em tubos de ensaio de 20 mm x 150 mm (8 mL de meio por tubo). Todos os tubos foram fechados com tampas de polipropileno e autoclavados por 20 minutos a 1,1 Kg/cm³ e 121°C.

Em condição asséptica, no fluxo laminar, em cada tubo de ensaio foram inoculadas 300 mg de biomassa fresca de calos por tubo e foram inoculados 120 tubos de ensaio por período de cultivo. Os tubos foram fechados com filme de polipropileno transparentes, presos com elástico e as culturas transferidas para a sala de crescimento com temperatura controlada de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, sob fotoperíodo de 16 horas, provido por lâmpadas fluorescentes Philips TDL ($22.3 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Após 30, 60 e 90 dias de cultivo os calos foram coletados para as análises de crescimento e fitoquímicas.

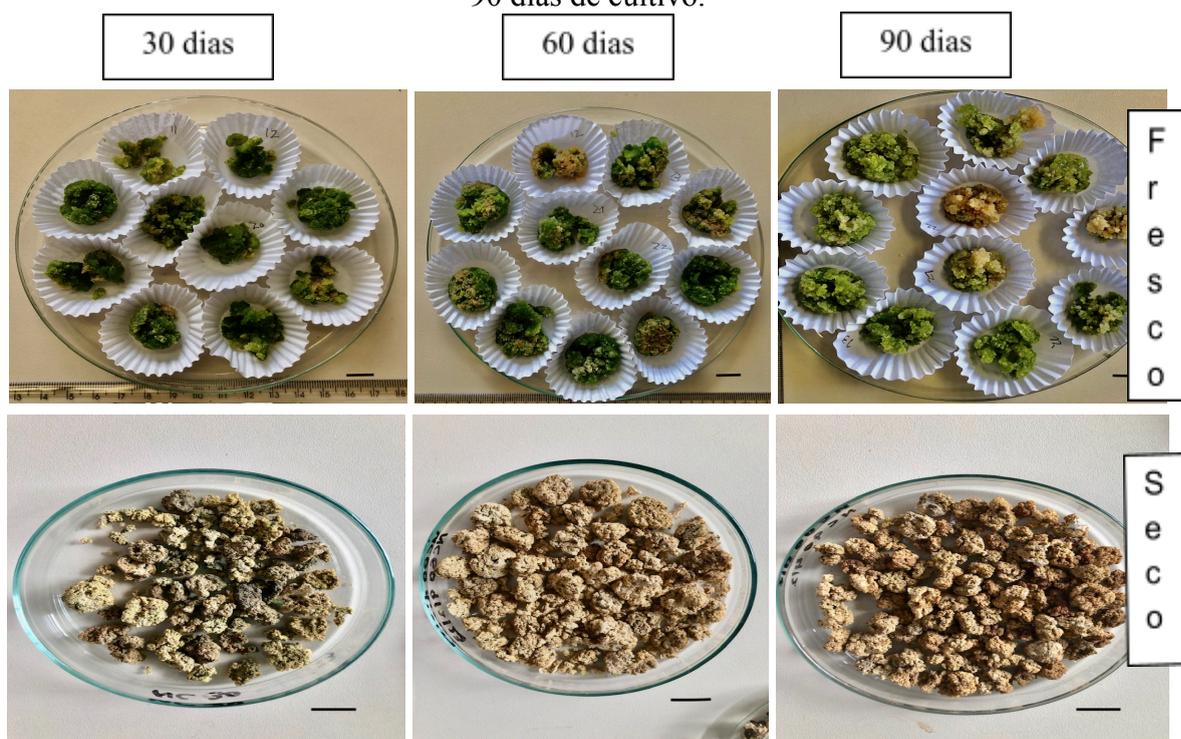
2.2.2 Determinação das biomassas fresca, seca e do teor de água dos calos

Os calos de nó cotiledonar foram retirados dos tubos de ensaio depois de 30, 60 e 90 dias de cultivo, pesados em balança analítica para determinação da biomassa fresca e em

seguida foram colocados, separadamente, em formas de papel de 2,5 cm de diâmetro, sobre placas de Petri de 16 cm de diâmetro (Figura 3).

As placas de Petri foram mantidas abertas, sobre prateleiras, em ambiente refrigerado para secagem ao ar livre em temperatura de $23 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade relativa do ar de 70%, até a estabilização da biomassa seca, o que ocorreu após o período de 4 dias, quando foi realizada a pesagem final dos calos, para determinação da biomassa seca e coleta para a extração (Figura 3). Os dados das biomassas fresca e seca de cada período de cultivo foram então utilizados para a determinação do teor de água, elaboração das curvas de crescimento dos calos e cálculo do rendimento dos extratos.

Figura 3. Calos de *Passiflora setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado frescos e secos originados de segmentos de nó cotiledonar 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, após 30, 60 e 90 dias de cultivo.



Fonte: Elaborado pelo autor
Barra = 1 cm

2.2.3. Análises estatísticas dos experimentos de cultivo *in vitro* dos calos

Todos os experimentos foram montados de acordo com o delineamento estatístico completamente casualizado. Os resultados foram analisados através da análise de variância (ANOVA), para avaliar o efeito dos períodos de cultivo sobre o crescimento dos calos. A separação de médias foi realizada pelo teste de Tukey, ao nível de probabilidade de 95%.

Também foram realizadas as análises de regressão linear e de correlação linear simples, entre os dados de massa fresca e massa seca dos calos, em cada período de cultivo, para a determinação das equações das retas, dos valores de coeficientes de correlação linear (r) e dos coeficientes de determinação [$R^2 = (100) \cdot (r^2)$] (GOMEZ & GOMEZ, 1984). As análises estatísticas foram feitas com base em softwares de estatística – EXCEL (Microsoft) e do software livre PAST 4 (Paleontological Statistics Software), versão 4 (HAMMER; HARPER; RYAN, 2001).

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

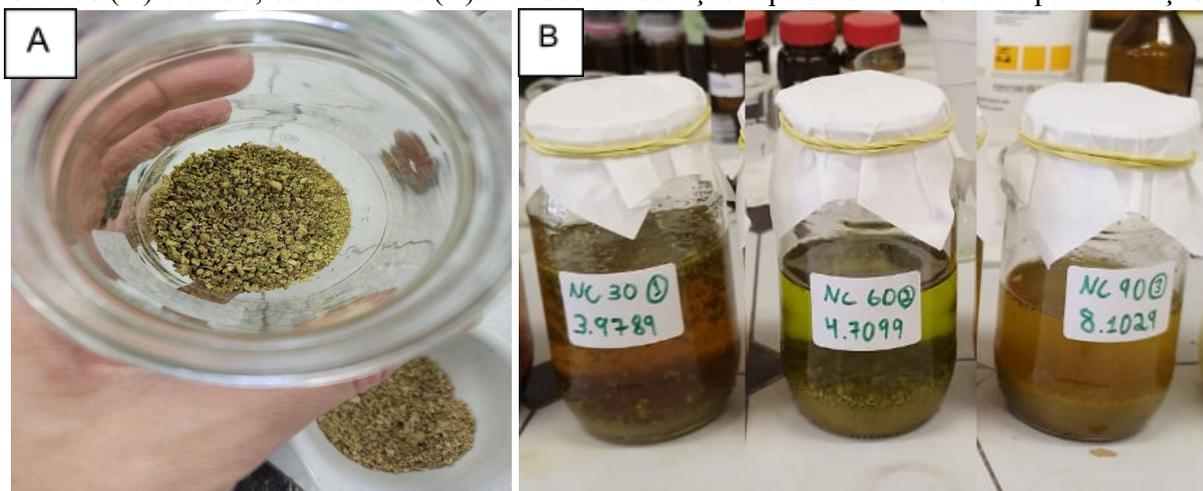
2.3.1 Extração do material vegetal

As massas secas iniciais utilizadas na extração de cada tipo de material vegetal, para obter o respectivo extrato bruto são mostradas na Tabela 2 (calos) e na Tabela 4 (Fo, Ca e Se). Para a obtenção dos extratos brutos foram utilizadas as biomassas secas de folhas (Fo), cascas de frutos (Ca), sementes (Se) e de calos de nó cotiledonar de 30 (NC30), 60 (NC60) e 90 (NC90) dias de cultivo, secas ao ar livre, em ambiente refrigerado a $23 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade relativa do ar de 70%, até os valores das massas secas de cada tipo de material ficarem constantes.

As biomassas de folhas e calos de nós cotiledonares de 30, 60 e 90 dias de cultivo passaram por maceração física e depois por maceração exaustiva mantidos imersos em solução hidroalcoólica na proporção 70% etanol e 30% água destilada por 3 semanas em recipiente fechado (Cechinel Filho e Yunes, 1998). Com o intuito de extrair o maior teor possível de cada grupo de calos, foi coletada a solução a cada 1 semana de imersão e o resíduo era novamente colocado para extrair por mais uma semana em nova solução hidroalcoólica.

Após 3 semanas todos os extratos foram filtrados e o solvente removido, sob pressão reduzida em um evaporador rotatório, obtendo-se extratos brutos. A Figura 4 mostra os calos de nó cotiledonar secos de 60 dias macerados (A) e de calos NC30, NC60 e NC90 imersos em solução hidroalcoólica (B) durante o processo de extração e a Figura 5 mostra o tipo de evaporador rotatório utilizado. Após a remoção do solvente em evaporador rotatório os extratos foram pesados em balança analítica, para se obter o rendimento final de cada material vegetal.

Figura 4. Calos de nó cotiledonar de *Passiflora setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado secos de 60 dias (A) e de 30, 60 e 90 dias (B) imersos em solução aquosa de etanol 70% para extração.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 5: Evaporador rotatório da IBBL utilizado para a remoção do solvente dos extratos de cascas, sementes, folhas e calos de nó cotiledonar de *Passiflora setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Após a remoção do solvente em evaporador rotatório os extratos foram pesados em balança analítica, para se obter o rendimento final de cada material vegetal mostrado na Tabela 3 do item 3.2. O rendimento foi calculado através da seguinte fórmula: $(\text{massa seca do extrato bruto} / \text{massa seca inicial}) \times 100$.

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

O método utilizado para a análise por CLUE-ESI-EM descrito abaixo, foi o mesmo utilizado por Oliveira (2024) em sua análise de extratos hidroalcoólicos de calos obtidos a partir de cotilédones de *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado.

Foram submetidos à análise de CLUE-ESI-EM todos os extratos hidroalcoólicos de *P. setacea*, incluindo os obtidos de partes da planta como folhas (Fo), cascas (Ca), sementes (Se) e dos calos de nó cotiledonar cultivados *in vitro* por 30 (NC30), 60 (NC60) e 90 (NC90) dias de cultivo. As amostras foram preparadas fazendo-se uma massa de extrato bruto de 1,6 mg, a qual foi diluída em 2 mL de uma mistura metanol:acetonitrila grau MS (1:1). Com o objetivo de impedir a passagem de partículas e ter uma solução final mais pura, as amostras foram filtradas em vial utilizando filtrilos de 0,22 µm de tamanho de poro.

Para fracionar as amostras foi utilizado um sistema CLUE (Waters, Milford, MA, EUA), equipado com um gerenciador de solvente quaternário, gerenciador de amostras e um detector de fotodiodos (PDA), bem como com uma coluna de fase reversa (BEH, C18 de 5x1 cm e 1,7µm de partículas). A coluna de amostra foi mantida em 40°C enquanto a bandeja de amostra estava em 20°C. Um volume de amostra de 2 µL foi submetido a uma condição de gradiente da fase móvel contendo água com 0.1% de ácido fórmico (A) e acetonitrila (B), a uma taxa de fluxo constante de 0.3 mL.min⁻¹: 0-1 min, 80% de A; 1-12 min, 10% de A; 12-14 min, 10% de A; 14-15 min 80% de A; 15-20 min, 80% de A (PRADI et al., 2023).

Foi vinculado ao sistema CLUE para identificar os componentes químicos de cada fração, um espectrômetro de massas do tipo quadrupolo ortogonal de tempo de voo (Xevo G2-S Qtof, Waters), com uma sonda de ionização por eletrospray (ESI) operando nos modos de ionização negativo.

Os parâmetros de aquisição de massas foram ajustados em modo centróide e monitorados em scan com tempo de 1 segundo, em uma faixa de massa de 100-1500 Da. A energia de colisão foi 6 eV em 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*). Foi incluída uma razão massa carga (m/z) referente ao MS¹ acima de um *threshold* de 30000 para todo ciclo de aquisição de dados, sendo estes os picos selecionados como precursores para posterior fragmentação, enquanto o *threshold* se manteve acima de 20000 os espectros MS/MS foram registrados. Durante a aquisição foi utilizada uma correção por infusão de um padrão de referência externo (LockSpray™), em infusão constante de uma solução de

leucina-encefalina (1 ng mL^{-1} , a $20 \text{ }\mu\text{L min}^{-1}$) (GAO et al., 2020), o que ajudou a garantir a precisão da massa.

Foram utilizados nos modos de ionização negativo e positivo voltagem do capilar de 3 kV, 40 V no cone amostral, voltagem offset de 80 V, 300°C em temperatura de dessolvatação, temperatura da fonte de 90°C , fluxo de gás de dessolvatação de 150 Lh^{-1} e 10 Lh^{-1} de fluxo de gás no cone.

2.3.3 Processamento dos dados cromatográficos e espectrométricos para a identificação de metabólitos

O método utilizado para o processamento dos dados cromatográficos e espectrométricos para a identificação de metabólitos descrito abaixo foi o mesmo utilizado por Oliveira (2024) em sua análise de extratos hidroalcoólicos de calos obtidos a partir de cotilédones de *P. setacea*.

Para facilitar na identificação dos metabólitos foi usado um arranjo dos softwares MS-DIAL (ver. 4.92) e MS-FINDER (ver. 3.52). Foram importados todos os dados brutos das análises de FastDDA, convertidos para o formato correspondente (mzML), para o MS-DIAL, onde, em conformidade com as análises realizadas por CLUE-EM, foram selecionadas informações e o alinhamento dos dados. Assim os parâmetros para o processamento e alinhamento dos dados foram escolhidos.

A tolerância usada para a coleta de dados foi de 0,02 Da e 0,06 Da para MS1 e MS2, respectivamente. Referente à detecção do pico, para a largura do corte de massa foi empregado amplitude de 0.1 Da e para a altura mínima foi com a amplitude de 10000 Da. Já nos parâmetros de desconvolução, para os valores da janela sigma foi usado 0,5 Da e ponto de corte de abundância MS/MS de 30 amplitudes. Para o alinhamento foi utilizado o arquivo do branco do solvente como referência. A tolerância no tempo de retenção do MS1 foi definida em 0,015 min e 0,02 Da. Foi aplicada a remoção de recursos com base em dados do branco do solvente, conseguindo-se então obter somente anotações referentes às amostras.

A partir de um arquivo de extensão MSP da MS-DIAL foi introduzida uma biblioteca espectral contendo compostos únicos ESI (+ e -) - MS/MS (padrões+bio+in silico, 16.995 compostos únicos em ESI+ e 15.245 compostos únicos em ESI-). A aplicação da biblioteca espectral ocorreu no decorrer dos processos de desconvolução e normalização de dados (TSUGAWA et al., 2015).

Ao finalizar o processamento dos dados, picos de íons precursores foram observados por meio de dois eixos de dados contínuos, tempo de retenção (t_R) e m/z , onde cada ponto representa um pico detectado. Com o processamento dos dados foi possível extrair uma gama de informações importantes, como um gráfico de barra indicando nas amostras analisadas a abundância de cada íon e uma tabela contendo valores de t_R , m/z , valores estatísticos e tipo de aduto (TSUGAWA et al., 2015).

Os dados obtidos de espectros de fragmentação no MS-DIAL foram exportados para MS-FINDER, o qual identificou os metabólitos por meio da comparação de espectros de fragmentação MS/MS, com vários bancos de dados (COCONUT, PubChem, UNPD, ChEBI, NNPDB, KNApSACk, NPA). A seleção de estrutura mais provável entre os candidatos ocorreu considerando o valor do score igual a 5 ou maior, os fragmentos obtidos e o conhecimento prévio das possíveis classes de compostos que o tipo de amostra é capaz de produzir (WANG et al., 2022).

2.3.4 Análise estatística de dados metabolômicos

O método utilizado para a análise estatística de dados metabolômicos foi o mesmo utilizado por Oliveira (2024) em sua análise de extratos hidroalcoólicos de calos obtidos a partir de cotilédones de *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado, compartilhando os dados de origem das partes das plantas Ca, Fo e Se.

A análise estatística de dados metabolômicos foi desenvolvida em um único experimento com os dados dos calos de nó cotiledonar (NC) e das diferentes partes da planta (Ca, Fo e Se), comparando os perfis metabolômicos dos calos de 30 (NC30), 60 (NC60) e 90 (NC90) dias de cultivo, com os perfis de folhas, cascas de frutos e sementes de *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado.

Foi exportado como um arquivo de texto contendo uma matriz de dados brutos (áreas de pico de cada característica, tempo de retenção, nome do composto ou ID) dos resultados de alinhamento do tratamento de dados MS-DIAL dos calos de NC correlacionados com os dados de casca (Ca), folhas (Fo) e sementes (Se,) já filtrados pela abundância de íons de amostras em branco. Com isso, foi montado um arquivo integrando os dados de metabólitos com as intensidades de pico de calos NC alinhados com os dados obtidos para as diferentes partes analisadas da planta, onde cada linha especificou um metabólito e cada coluna sua intensidade em uma determinada amostra. O arquivo foi convertido corretamente para CSV (valores separados por vírgula).

Para discriminar os metabólitos significativos dos calos NC30, NC60 e NC90 em relação aos diferentes tipos de materiais da planta (Ca, Fo e Se) foi aplicada a análise estatística univariada e multivariada realizada pelo MetaboAnalyst (v 5.0). Logo em seguida foi feita uma normalização de todos os dados antes das análises seguintes por meio da transformação de raiz quadrada e a escala de Pareto.

Com os dados normalizados, primeiramente, foi realizada a análise de componentes principais (PCA) para encontrar os recursos de distribuição do conjunto de dados (*score*, *loading plots* e *Kmeans*). Com isso, foi possível usar a análise parcial de mínimos quadrados discriminantes (PLS-DA) o que determinou 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).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Crescimento das culturas *in vitro*

3.1.1 Efeito do tempo de cultivo nas características morfológicas dos calos de *P. setacea* originados a partir de segmentos de nó cotiledonar

Na Tabela 1 e Figura 6 (A,B e C) são mostrados os detalhes da morfologia e coloração dos calos de nó cotiledonar cultivados por 30 (NC30), 60 (NC60) e 90 dias (NC90). Observa-se que, dos calos NC30 para NC90, há uma graduação da coloração, do verde intenso e brilhante para um fosco verde-amarelado, enquanto nos calos NC60 a coloração se manteve mais parecida com calos NC30, com poucas alterações, raros pontos amarelados. Sobre a textura, todas as amostras, de modo geral, se demonstraram friáveis, muito suscetíveis a desagregação.

As vantagens de se ter calos friáveis, menos compactos, é que a separação das células após a divisão é facilitada, formando menos agregados celulares, o que facilita a iniciação e a manutenção de suspensões celulares, estratégia eficiente de cultivo *in vitro*, que otimiza o crescimento celular, por manter as células rodeadas por nutrientes, facilitando a absorção maior do que em calos compactos (ROSAL, 2004).

Figura 6. Detalhes morfológicos dos calos originados de segmentos de nó cotiledonar de *Passiflora setacea* cv. 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 (A), 60 (B) e 90 (C) dias de cultivo.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 1. Efeito do tempo de cultivo no aspecto dos calos de *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado originados a partir de segmentos de nó cotiledonar após 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.

Tempo de cultivo (dias)	Coloração	Textura
30	Verde intenso	Friável
60	Verde intenso (Raros pontos amarelados)	Friável
90	Verde fosco ou amarelado	Friável

Fonte: Elaborado pelo autor.

Para efeitos de comparação, Oliveira (2024) utilizando explantes de cotilédone de *P. setacea* e utilizando os mesmos métodos de cultivo dos calos descritos neste trabalho, obteve calos de 30, 60 e 90 dias com textura compacta e rígida. A coloração dos calos de cotilédones divergiu dos calos de nós cotiledonares, apresentando um verde mais claro em 30 e 60 dias e bege nos calos de 90 dias, o que deve estar associado ao processo de senescência mais rapidamente encontrado do que os calos de nós cotiledonares.

Os resultados obtidos no presente trabalho para nós cotiledonares estão de acordo com os relatados por Terhaag (2019), que analisou o efeito de 2,4-D, na mesma concentração utilizada no presente trabalho e observou que, de modo geral, os calos de nós cotiledonares eram mais friáveis do que os calos de cotilédone e também tenderam a ser verdes mais escuro que calos de cotilédone, apresentando teores de clorofila total e carotenoides significativamente maiores do que os calos de cotilédone.

A coloração dos calos pode ser um indicador visual de informações importantes como a etapa do ciclo de crescimento, metabolismo e viabilidade do calo, fatores que impactam na produtividade celular. A coloração amarronzada ou preta podem ser sinais de estresse oxidativo, senescência celular ou até mesmo de contaminações na cultura.

Terhaag (2019) comprovou que a coloração verde mais escura dos calos de nó cotiledonar se deve à presença de maior teor de clorofilas e carotenoides. O amarelamento dos calos, observada nos calos NC60 e mais intensa nos calos NC90 possivelmente é consequência da alteração metabólica induzida pela senescência, de degradação de clorofila a e b, deixando em evidência os carotenoides, responsáveis pela coloração mais amarelada dos calos. Segundo Taiz *et al.* (2017) a senescência das folhas, por exemplo, pode ocorrer por ação de fatores internos (regulação de hormônios, açúcares ou mudança de fases) e externos (temperatura, falta de nutrientes ou água), e, após uma cascata de sinais, inicia-se a senescência, com degradação gradual e programada dos componentes celulares, inclusive a

clorofila. Nas culturas *in vitro* pode estar relacionado com a diminuição dos carboidratos e da disponibilidade de nutrientes durante o ciclo de cultivo.

No que tange ao nível de agregação celular dos calos, de acordo com a literatura (BRUNETTA *et al.*, 2006) é possível induzir calos a se tornarem mais friáveis, úmidos e células maiores por meio do uso de mais auxinas e menos citocininas no meio de cultura. O oposto, maior teor de citocininas e menor de auxinas no meio de cultura, resultaria em calos mais compactos, com menor teor de água e de células menores. Um dos reguladores mais utilizados em culturas *in vitro*, o 2,4-D dentro do organismo da planta funciona como um mimetizador de auxinas, sendo considerado uma auxina sintética (REIS; LAMEIRA; CORDEIRO, 2007). Um caso de uso do 2,4-D que resultou em calos mais friáveis foi relatado por Silva *et al* (2019), que, manuseando calos nodais de *Caesalpinia ferrea*, desenvolveu calos friáveis em culturas elicidadas com 2,4-D, porém em culturas em que não continham 2,4-D e sim BAP ou TDZ (ambos citocininas) os calos apresentaram-se compactos.

O mesmo padrão de maior friabilidade dos calos de nó cotiledonar de *P. setacea* também foram constatados em trabalhos realizados anteriormente. Esse padrão também foi constatado por Fonseca (2019), que produziu calos friáveis de nó cotiledonar de *P. setacea* em culturas com 2,5 μM de 2,4-D, entretanto os calos de cotilédone sobre essas mesmas condições se formaram compactos. Os resultados obtidos no presente trabalho estão de acordo com o descrito por Brunetta *et al.* (2006) e fatores como a manipulação de reguladores de crescimento no meio de cultura podem ser importantes para alterar as características de agregação das células nos calos.

3.1.2 Efeito do tempo de cultivo no crescimento dos calos de *P. setacea* originados a partir de segmentos de nó cotiledonar

Uma forma eficiente de monitorar as etapas do ciclo de crescimento dos calos é analisando o crescimento através de avaliações das massas fresca e seca.

A Tabela 2 mostra os dados de massa fresca, massa seca, razão massa seca/massa fresca, teor de água e coeficiente de correlação entre massa fresca e massa seca dos calos NC30, NC60 e N90. O teste de Tukey indicou diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos, para todos os parâmetros analisados, indicando que o tempo de cultivo influenciou diretamente no crescimento e no teor de água dos calos.

Tabela 2. Efeito do tempo de cultivo no crescimento dos calos de *P. setacea* cv, BRS Pérola do Cerrado originados a partir de segmentos de nó cotiledonar após 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

Tempo de cultivo (dias)	Massa fresca (mg)*	Massa seca (mg)*	Razão massa seca/massa fresca*	Teor de água (%)*	Coefficiente de Pearson (r)
30	1812,4 \pm 463,8c	99,7 \pm 14,1ab	0,056 \pm 0,010a	94,3 \pm 1,0b	0,774
60	2589,9 \pm 491,0a	107,1 \pm 17,2a	0,041 \pm 0,003b	95,9 \pm 0,3a	0,953
90	2199,8 \pm 466,6b	91,1 \pm 16,9b	0,042 \pm 0,007b	95,8 \pm 0,7a	0,755

Fonte: Elaborado pelo autor.

*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).

No início do experimento foram inoculados aproximadamente 300 mg de inóculo/tubo correspondente a 15,7 mg de massa seca/tubo, razão massa seca/massa fresca de 0,052 e 94,2% de teor de água. Entre o período do início do cultivo até 30 dias os calos NC30 apresentaram incrementos de 6 vezes na massa fresca e 6,5 vezes na massa seca; no período de cultivo entre 30 e 60 dias os incrementos foram de 1,4 e 1,1 vezes, respectivamente, e entre 60 e 90 dias de cultivo as massas fresca e seca diminuíram em relação ao tempo de 60 dias. Esses dados indicam que o incremento maior nas massas fresca e seca foi nos primeiros 30 dias de cultivo.

Os calos NC60 apresentaram valor significativamente maior de massa fresca (2589,9 mg/calor); valor maior de massa seca (107,1 mg/calor), mas que não diferiu significativamente dos calos NC30; maior teor de água (95,9%), que diferiu significativamente dos calos NC30; maior coeficiente de correlação entre as massas fresca e seca (0,953). Apenas quanto à razão massa seca/massa fresca o valor foi significativamente menor (0,041 mg de massa seca/mg de massa fresca) que os calos NC30, que não diferiu significativamente dos calos NC90.

Santos Tierno *et al* (2021), também cultivando calos de *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado, mas originados de segmentos nodais, segmentos internodais e segmentos de folhas, obtiveram, após 60 dias de cultivo, valores de massa seca respectivamente de 850 mg (sob luz lâmpadas fluorescentes, 4,14 μ M picloram), 730 mg (sob LED branco, 20,7 μ M picloram) e 930 mg (sob LED vermelho, 4,14 μ M picloram), valores muito inferiores aos conseguidos no presente trabalho para os calos de nó cotiledonar, que produziram 107,1 mg de massa seca/calor aos 60 dias de cultivo. Santos Tierno *et al* (2021) utilizaram o meio de cultura MSM, suplementado com 3% de sacarose, concentrações de picloram entre e 0,7% de ágar,

além de cultivarem os calos a 28°C, sob fluxo de fótons entre 42 e 45 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ para os LEDs branco e vermelho, respectivamente. Essas diferenças indicam a influência dos diferentes protocolos utilizados nessas pesquisas no crescimento dos calos e quantos fatores podem ser manipulados no meio de cultura e nas condições de cultivo em cada caso.

A Figura 7 (A, B, C, D) mostra a representação gráfica dos resultados da Tabela 2 para mostrar as variações ocorridas durante o tempo de cultivo.

Os calos NC30, após 30 dias de cultivo apresentaram as menores massas fresca e massa seca entre os tratamentos, mas apresentaram a maior relação massa seca/massa fresca, indicando que nos primeiros 30 dias de crescimento dos calos apresentaram 0,056 mg de massa seca/mg de massa fresca, valor significativamente maior que os demais tempos de cultivo indicando o maior incremento de massa seca por mg de massa fresca (Tabela 2, Figuras 7 (A, B, C). Terhaag (2019) e Fonseca (2019), que cultivaram *in vitro* calos de nó cotiledonar por 30 dias, através do mesmo método, conseguiram em ambos os trabalhos calos com cerca de 95% de teor de água e coeficiente de correlação linear próximo de 0,72, se aproximando dos valores obtidos no presente trabalho de 94,3% em teor de água e 0,77 de correlação linear para os calos NC30, que apresentaram o menor teor de água entre todos os tempos de cultivo (Tabela 2, Figura 7D).

Os calos NC60 alcançaram os maiores valores de massas fresca e seca, apesar de não diferirem significativamente da massa seca dos calos NC30, entretanto apresentaram valor de razão massa seca/massa fresca menor, mas com teor de água significativamente maior, chegando perto de 96%. Isto indica que durante o período de 30 a 60 dias de cultivo os calos começaram a acumular mais água nas células (Tabela 2, Figura 7 A,B,C,D).

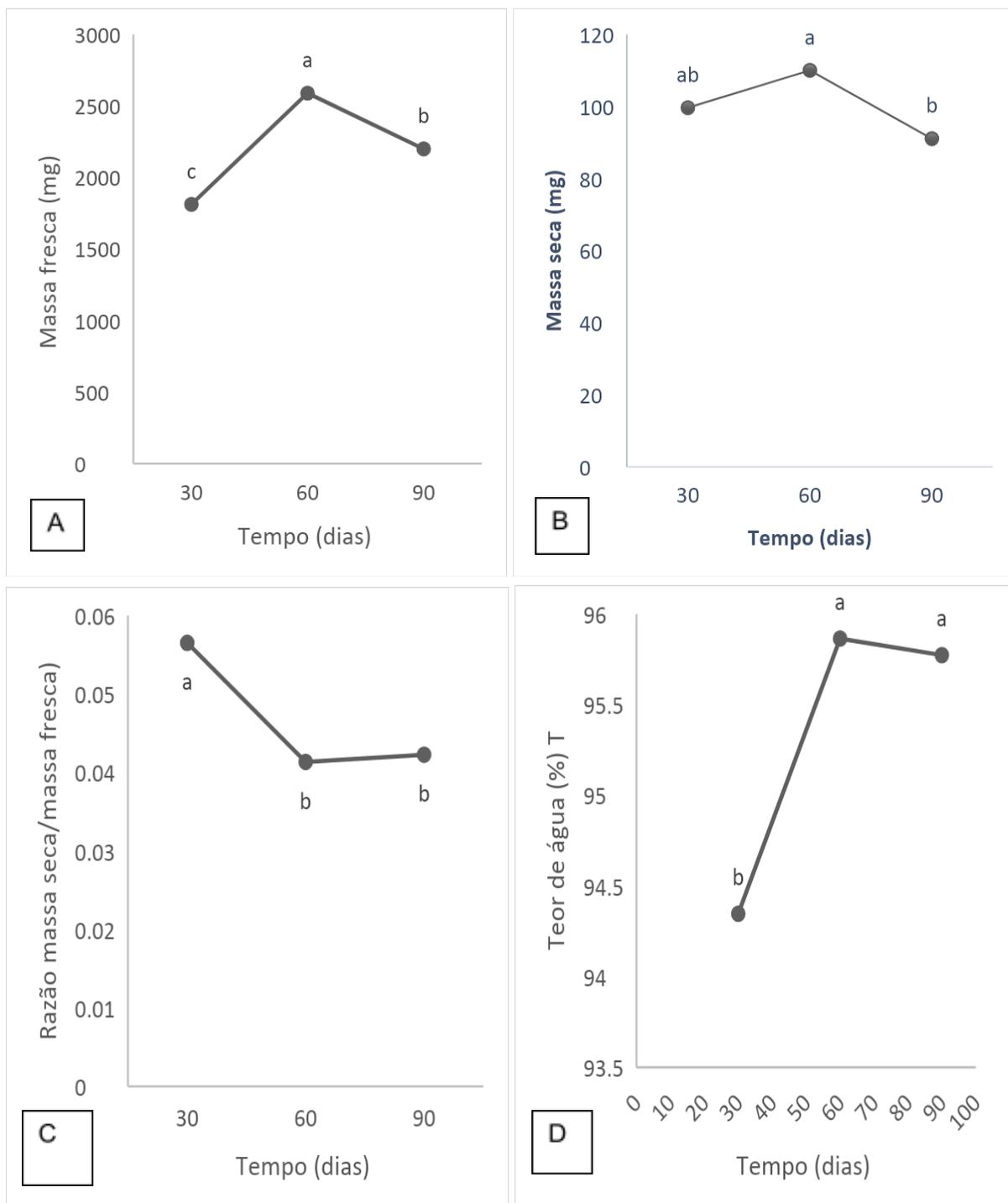
Levando em consideração o coeficiente de correlação de Pearson, o qual mede a intensidade e a direção da relação linear entre as duas variáveis quantitativas (neste caso massa fresca e massa seca), os calos NC60 apresentaram a maior correlação positiva de 0,953 (Tabela 2), próxima do perfeito (1,0), indicando que o crescimento dos calos com o incremento em massa seca esteve fortemente ligado ao incremento no teor de água, ganhando proporcionalmente, quase a mesma quantidade de massa fresca com o aumento da massa seca. O acúmulo de água tem diversas funções nas células vegetais, como a hidratação das enzimas e outras moléculas que participam das reações químicas tais como a fotossíntese, transporte de moléculas, divisão celular e desenvolver a pressão de turgor, essencial na expansão celular e manutenção de outros processos fisiológicos, que dependem do metabolismo primário e secundário das células (TAIZ *et al.*, 2017).

Os calos NC90 apresentaram teor de água próximo ao exibido pelos calos NC60, significativamente menor que os calos NC30; massa fresca total significativamente menor, entre todos os tempos de cultivo e massa seca similar estatisticamente aos calos NC30 (91,1 mg/calor), em média 15% menor; razão massa seca/massa fresca (0,042 mg de massa seca/mg de massa fresca). significativamente menor que NC30 e similar estatisticamente a NC60 (Tabela 2, Figura 7 (A, B, C,D)). Já o coeficiente de Pearson foi o mais baixo, indicando que, apesar de seu teor de água ser similar ao de NC60, houve diminuição da correlação entre massa fresca e massa seca, sugerindo que houve a perda de parte da massa seca pelos calos. A massa seca representa os componentes das células, como paredes, membranas, solutos como proteínas, lipídios, carboidratos, compostos fenólicos e outras classes de metabólitos secundários, pigmentos diversos e todos os metabólitos que as células acumularam durante o ciclo de crescimento. A diminuição no valor da massa seca pode estar ligada à degradação de metabólitos, o que é um forte sinal de senescência celular (TAIZ *et al*, 2017). Da mesma forma, Oliveira (2024) observou processos similares ocorrendo nos calos de cotilédone com 90 dias de cultivo, também sugerindo a possibilidade de início da senescência celular.

A Figura 8 (A, B, C) mostra os gráficos resultantes da análise de regressão linear, que reforça o que foi descrito anteriormente, mostrando o quanto o aumento em massa fresca dos calos esteve ligado ao aumento em massa seca em calos de cada tempo de cultivo. Os valores de R^2 que aparecem nos gráficos correspondem aos valores dos coeficientes de Pearson correspondentes encontrados na Tabela 2 elevados ao quadrado. Quando os valores de R^2 são multiplicados por 100 expressam a porcentagem dos dados em que a variação na massa fresca pode ser explicada pela função linear da massa seca (GOMEZ & GOMEZ, 1984).

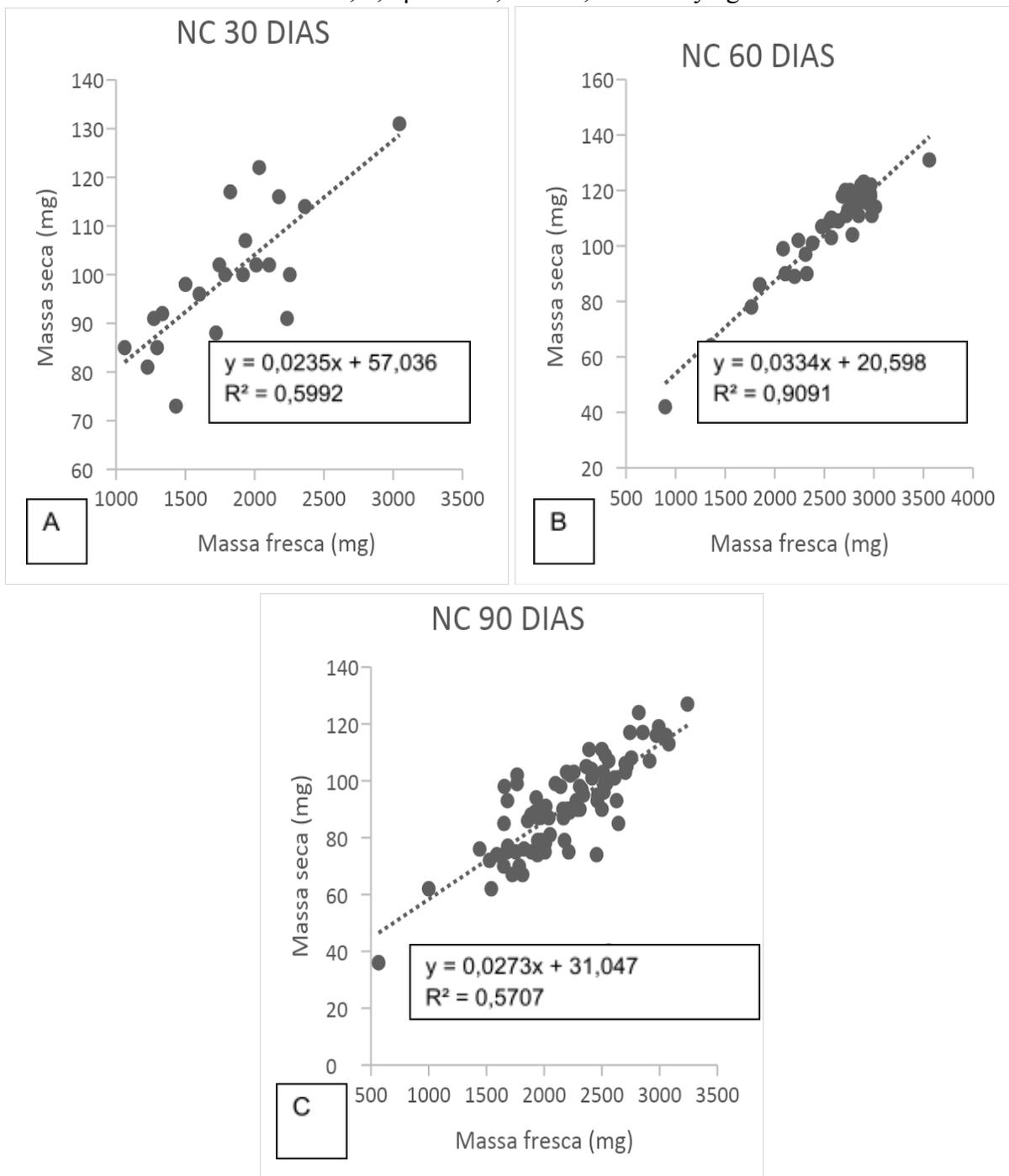
Para NC30 e NC90 os valores de R^2 foram próximos (0,559 e 0,507 respectivamente) o que indica que em NC30 55,9% da variação na massa fresca pode ser explicada pela função linear da massa seca. Nos calos NC60 90,9% da variação na massa fresca por ser explicada pela função linear da massa seca, devido à alta correlação entre as duas variáveis, ou seja, possuem à associação linear quase perfeita entre massa fresca e massa seca, indicando o quanto as duas massas aumentam na mesma proporção. Observa-se na Figura 8B que a maioria dos pontos agruparam-se bem próximo à reta, enquanto que na Figura 8A e Figura 8C parte dos pontos estão mais dispersos e distantes da reta, indicando menor correlação entre as massas fresca e seca nesses períodos de cultivo.

Figura 7. Variações na massa fresca (A), massa seca (B), razão massa seca/massa fresca (C) e teor de água (D) dos calos de *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado originados a partir de segmentos de nó cotiledonar após 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 pelo autor.

Figura 8. Análise de regressão linear entre massa fresca e massa seca de calos de *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado originados a partir de segmentos de nó cotiledonar após 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.



Fonte: Elaborado pelo autor.

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

3.2.1 Rendimento da massa extraída obtida para análise CLUE-ESI-EM

Após a remoção do solvente em evaporador rotatório os extratos foram pesados em balança analítica, para obtenção do rendimento final de cada material vegetal (Tabela 3). Os valores de rendimentos dos calos de nó cotiledonar variaram entre 66% e 68%, superiores aos valores obtidos para cascas e sementes (53% e 42%, respectivamente) e similares ao rendimento de 65% das folhas. Os resultados mostram que o rendimento entre os calos aumentou com o tempo de cultivo, variando de 65,58%, em NC30 a 68%, em NC90. Em geral, os extratos brutos dos calos renderam proporcionalmente mais do que folhas (Fo), cascas (Ca) e sementes (Se). Um dos fatores que mais interferem no rendimento dos extratos são as partes duras, na qual a maceração não é suficiente para solubilizar essas partes e por isso ficam retidas na filtragem.

Tabela 3 – Valores de massas utilizadas na extração e obtidos para os extratos brutos de folhas, cascas, sementes e de calos de nó cotiledonar de 30, 60 e 90 dias de cultivo de *Passiflora setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado.

Parâmetros	Folhas	Cascas	Sementes	Calos		
				NC30	NC60	NC90
Massa seca inicial (g)	187.89	58.14	18.16	3.98	4.71	8.10
Massa do extrato bruto(g)	121.17	30.76	7.64	2.61	3.12	5.51
Rendimento (%)	64.48	52.91	42.07	65.58	66.24	68.02

Fonte: Elaborado pelo autor.

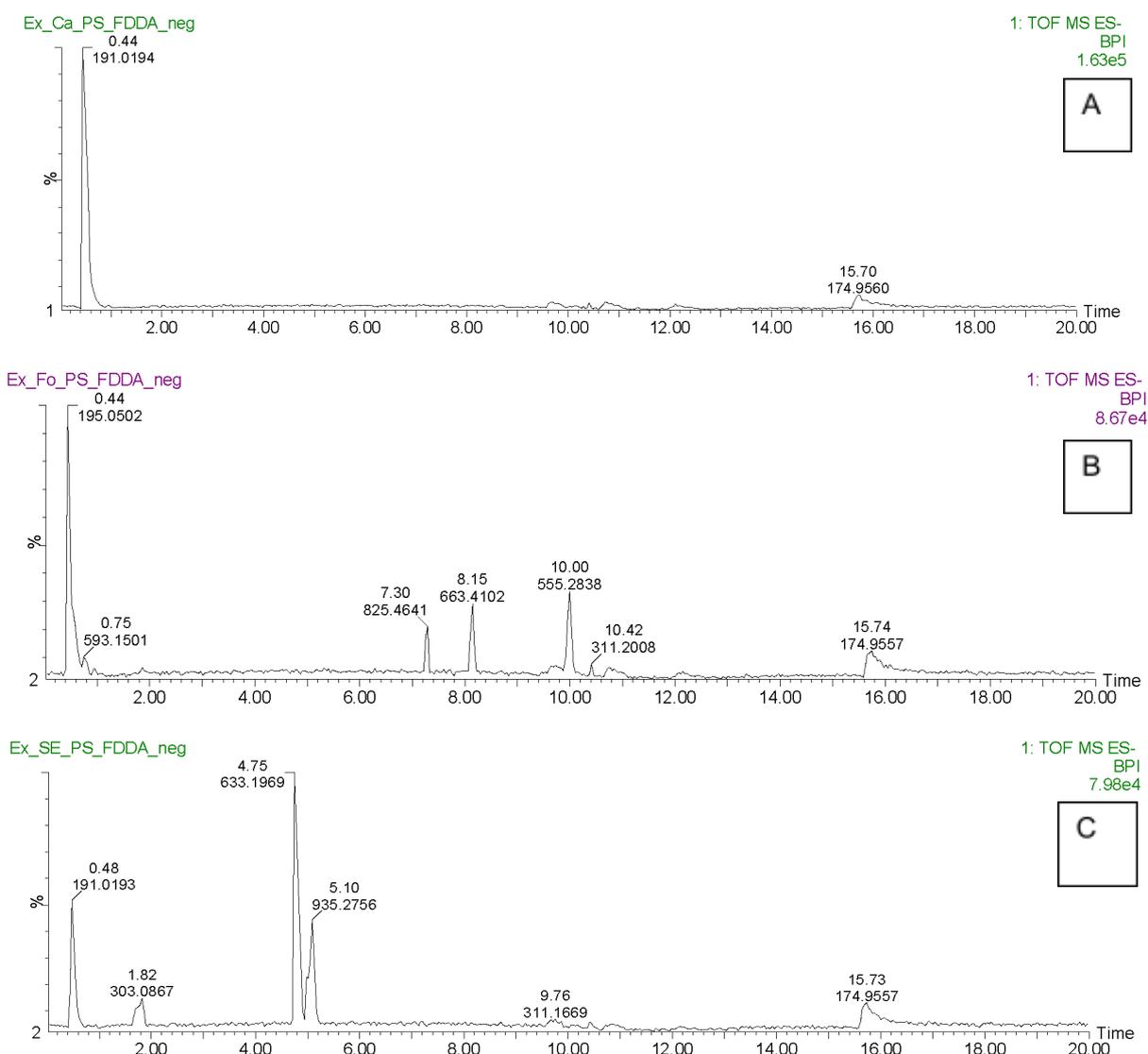
3.2.2 Cromatogramas e perfis químicos obtidos por análise CLUE-ESI-EM dos extratos de folhas, cascas, sementes e calos de nós cotiledonares de *P. setacea*

Os extratos hidroalcoólicos de folhas (Fo), cascas (Ca), sementes (Se) de *P. setacea*, assim como os extratos de calos de nós cotiledonares cultivados por períodos de 30, 60 e 90 dias (NC30, NC60 e NC90) foram submetidos à análise de CLUE-ESI-MS. A análise consiste na separação cromatográfica dos componentes da amostra e na detecção dos metabólitos ionizados no modo negativo e positivo, através da espectrometria de massas

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 no modo negativo.

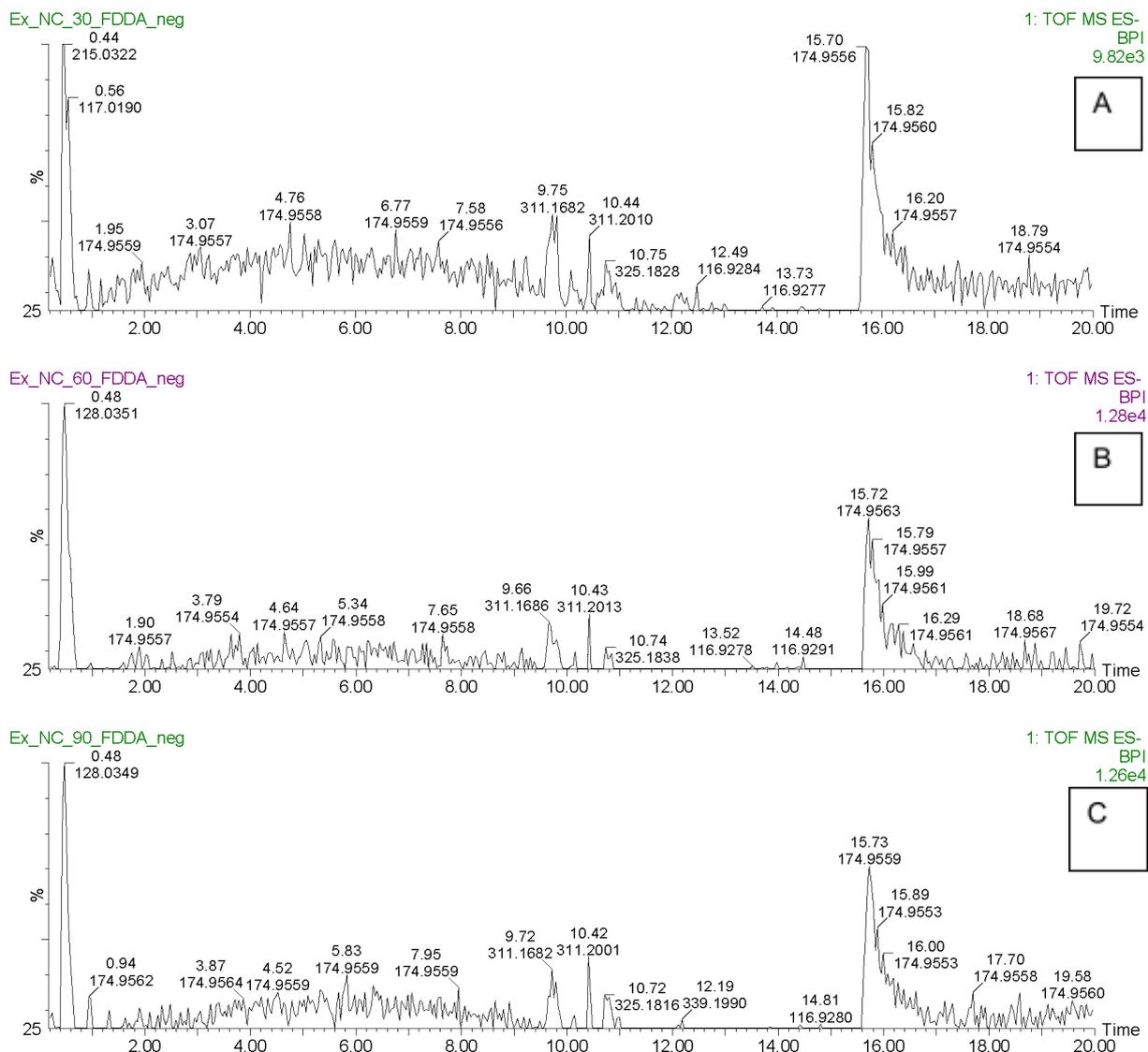
A Figura 9 (A, B, C) mostra os cromatogramas obtidos para os extratos brutos de cascas de frutos, folhas e sementes de *P. setacea*. Em todos os extratos, as classes químicas majoritárias presentes foram os ácidos orgânicos de cadeia curta, lipídios e açúcares (Tabela 6). O extrato bruto de folhas apresentou a maior diversidade em classes químicas comparado com os extratos de cascas e sementes, pois foram detectados também flavonoides, terpenos e fosfolipídios, além dos ácidos orgânicos, lipídios e açúcares (Figura 9 B). O extrato bruto de sementes também apresentou flavonoides, mas foi menos representativo do que os extratos de folhas e cascas em termos de classes químicas (Figura 9C, Tabela 6).

Figura 9. Cromatogramas obtidos em modo de ionização negativo 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 pelo autor.

Figura 10. Cromatogramas obtidos em modo de ionização negativo de extratos brutos de nós cotiledonares de *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado cultivados por 30 (NC30, A), 60 (NC60), B) e 90 (NC90) 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.



A Figura 10 (A, B, C) expõe os cromatogramas, também obtidos em modo negativo, referente aos extratos de calos de nós cotiledonares de *P. setacea* originados, em diferentes tempos de cultivo, ou seja, de 30 (NC30, A), 60 (NC60, B) e 90 dias (NC90, C). Os calos não apresentaram ampla diversidade de classes de metabólitos, apenas ácidos orgânicos e açúcares (Tabela 6).

Na Figura 10 (B, C) podem ser observados sinais muito próximos ao ruído instrumental e este resultado está associado com a baixa concentração de metabólitos na amostra, aspecto importante a ser considerado, que influencia a separação, ionização e, conseqüentemente, a detecção. O ajuste do tempo de cultivo, assim como o aumento da

quantidade de biomassa seca final na amostra utilizada para a extração hidroalcoólica são estratégias que devem ser adotadas em trabalhos futuros, para otimizar a geração de dados de melhor qualidade a partir da metodologia utilizada (SUMNER et al., 2007).

A Tabela 4 mostra os perfis químicos dos metabólitos identificados nos extratos de folhas (Fo), cascas (Ca), sementes (Se) e de calos de nós cotiledonares de *P. setacea* de 30 dias (NC30), 60 dias (NC60) e 90 (NC90) dias de cultivo. Os metabólitos estão dispostos na ordem de tempo de retenção (min), onde o erro de massa (ppm) é calculado com base na proporção de isótopos conhecidos de cada molécula.

A partir dos dados da Tabela 4 foi elaborada a Tabela 5, a qual exibe a lista dos metabólitos detectados, também em ordem crescente de tempo de retenção, e a ocorrência nos tipos de materiais vegetais analisados. Para os calos foram sinalizados todos os metabólitos detectados nos três períodos de cultivo. Foram detectados 15 compostos em folhas, 9 em cascas, 7 em sementes e 7 em calos, considerando-se todos os tempos de cultivo. A hexose foi a única molécula detectada em todos os materiais.

Metabólitos marcadores característicos de cada tipo de material vegetal analisado foram detectados. Ácido galactônico ou glucônico, composto não identificado NI (1), isosfictosídeo, astragalosídeo II, cicloartano e derivado de fosfocolina foram detectados apenas em folhas, citrato monoglicerídeo, ácido homoisocítrico/metilisocítrico somente em cascas, enquanto que nas sementes foram detectados O-metil-epicatequina, sabian, compostos são identificados NI (2) e NI (3); e em calos apenas o ácido aspártico (Tabela 6).

Na Tabela 6 são apresentadas as classes químicas dos metabólitos em cada uma das amostras. Podemos afirmar que os metabólitos identificados nos quatro tipos de materiais vegetais analisados pertencem às classes químicas majoritárias dos ácidos orgânicos, açúcares e lipídios, presentes em todos os tipos de materiais vegetais. As folhas e sementes apresentaram flavonoides e apenas nas folhas foram encontrados também terpenos e glicolipídios.

Tabela 4. Metabólitos identificados por CLUE-ESI-MS nos extratos hidroalcoólicos brutos de folhas (Fo), cascas de frutos (Ca), sementes (Se) e calos de *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado originados a partir de segmentos de nó cotiledonar após 30 (NC30), 60 (NC60) e 90 (NC90) 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.

(continua)

Tempo de retenção (min)	m/z	Erro de massa (ppm)	Precursor	Identidade do metabólito	MS/MS	Fórmula molecular	Amostras	MS DIAL score	Referência	Bases de dados de massas
0.44	132.0296	-0.85	[M-H]-	Ácido aspártico	-	C ₄ H ₇ NO ₄	NC30, NC60, NC90	100	-	-
0.44	135.0291	-1.84	[M-H]-	Ácido treônico	-	C ₄ H ₈ O ₅	Fo, NC30	100	-	-
0.44	165.0396	-1.9	[M-H]-	Ácido D-ribônico	-	C ₅ H ₁₀ O ₆	Fo, NC30, NC60	-	Kang <i>et al.</i> , 2019	-
0.44	179.0553	-1.75	[M-H]-	Hexose	-	C ₆ H ₁₂ O ₆	Ca, Fo, Se, NC30	100	Adomèniènè <i>et al.</i> , 2022	-
0.44	265.0559	-0.4	[M-H]-	Monoglicerídeo citrato derivado	-	C ₉ H ₁₄ O ₉	Ca	95.2	Silva <i>et al.</i> , 2023	-
0.46	193.0347	-0.66	[2M-H]-	Ácido glucurônico	-	C ₁₂ H ₂₄ O ₉	Ca, Se, NC30, NC90	100	-	-
0.46	195.0502	-1.42	[M-H]-	Ácido galactônico ou ácido glucônico	-	C ₆ H ₁₂ O ₇	Fo	100	-	-
0.48	290.0873	-0.25	[M-H]-	N-frutosil piroglutamato	128.03456	C ₁₁ H ₁₇ NO ₈	Fo, NC30, NC60	100	Adomèniènè <i>et al.</i> , 2022; El-Akad <i>et al.</i> , 2023	-
0.494	191.0194	-1	[M-H]-	Ácido cítrico	-	C ₆ H ₈ O ₇	Ca, Fo, Se	84.5	-	-
0.517	129.0193	4	[M-H]-	Ácido citracônico	-	C ₅ H ₆ O ₄	Ca, Fo	100	-	NP-MRD
0.555	205.0352	7.8	[M-H]-	Ácido homoisocítrico / Ácido metilisocítrico	111.0087	C ₇ H ₁₀ O ₇	Ca	-	-	KEGG
0.556	117.0186	-1.57	[M-H]-	Ácido succínico	-	C ₄ H ₆ O ₄	Ca, Fo, NC30, NC60, NC90	100	Liu <i>et al.</i> , 2023	-
0.594	173.0812	-0.83	[M-H]-	Ácido subérico	-	C ₈ H ₁₄ O ₄	Ca, Fo	100	-	-
0.594	189.0765	1.01	[M-H]-	Ácido hidroxisubérico	-	C ₈ H ₁₄ O ₅	Ca, Fo	100	Iwanami, 1980	-
0.787	593.1508	-	[M-H]-	NI (1)	-	-	Fo	100	-	-

(conclusão)

Tempo de retenção (min)	m/z	Erro de massa (ppm)	Precursor	Identidade do metabólito	MS/MS	Fórmula molecular	Amostras	MS DIAL score	Referência	Bases de dados de massas
0.825	563.14	-0.23	[M-H]-	Isoschaftosídeo	353.0719	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	Fo	100	Pinto, 2018	-
1.786	303.0872	-0.7	[M-H]-	O-Metil-epicatequina	-	C ₁₆ H ₁₆ O ₆	Se	100	Vivas, 2020	-
4.75	633.1968	-0.57	[M-H]-	Sabian	1267.39844 [2M-H]	C ₃₄ H ₃₄ O ₁₂	Se	85.2	Deng <i>et al.</i> , 2005	-
4.75	701.1837	-	[M-H]-	NI (2)	-	-	Se	null	-	-
5.058	935.275	-	[M-H]-	NI (3)	1003.25641	-	Se	null	-	-
7.298	825.4641	0.56	[M-H]-	Astragalosídeo II	-	C ₄₃ H ₇₀ O ₁₅	Fo	100	Ma <i>et al.</i> , 2002	-
8.146	663.4102	-0.9	[M-H]-	Glicosídeo cicloartano	-	C ₃₇ H ₆₀ O ₁₀	Fo	99.6	Perera <i>et al.</i> , 2021	-
9.997	555.2838	3.73	[M-H]-	Fosfocolina derivado	-	C ₂₇ H ₄₄ N ₂ O ₈ P	Fo	-	Pedro <i>et al.</i> , 2021	-

Fonte: Elaborado pelo autor.

*NI = Não identificado

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

Metabólitos	Folhas	Cascas	Sementes	Calos
Ácido aspártico				X
Ácido treônico	X			X
Ácido D-ribônico	X			X
Hexose	X	X	X	X
Citrato monoglicerídeo		X		
Ácido glucurônico		X	X	X
Ácido galactônico ou ácido glucônico	X			
N-frutossil piroglutamato	X			X
Ácido cítrico	X	X	X	
Ácido citracônico	X	X		
Ácido homoisocítrico/metilisocítrico		X		
Ácido succínico	X	X		X
Ácido subérico	X	X		
Ácido hidroxisubérico	X	X		
NI (1)	X			
Isoschaftosídeo	X			
O-metil-epicatequina			X	
Sabian			X	
NI (2)			X	
NI (3)			X	
Astragalosídeo II	X			
Cicloartano glicosídeos	X			
Fosfocolina derivado	X			
TOTAL	15	9	7	7

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 6. Classes químicas majoritárias detectadas por CLUE-ESI-MS nos extratos brutos de cascas de frutos, folhas e sementes de *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado.

Cascas	Folhas	Sementes	Calos
Ácidos orgânicos de cadeia curta			
Açúcares	Açúcares	Açúcares	Açúcares
Lipídios	Lipídios	Lipídios	-
-	Flavonoides	Flavonoides	-
-	Terpenos	-	-
-	Fosfolipídios	-	-

Fonte: Elaborado pelo autor.

3.2.3 Análise do perfil químico de extratos brutos de folhas de *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado

Nos extratos de folhas foram detectados vários ácidos orgânicos (Figura 9B, Tabelas 4, 5 e 6) como os ácidos treônico e D-ribônico, específicos de folhas, além dos ácidos cítrico, succínico, citracônico, subérico e hidroxisubérico, também detectados nas cascas. Além desses compostos foi detectado um ácido orgânico com fórmula molecular $C_6H_{12}O_7$ sugerindo ser o ácido galactônico ou glucônico, pois não foi possível confirmar a estrutura devido à isomeria (BAKAR *et al.*, 2023; SENTHIL, 2015).

Acredita-se que o ácido ribônico possui atividades terapêuticas. Estudos conduzidos por Thandivel *et al.* (2024) analisando extratos de frutos secos de *Catunaregam spinosa* (Rubiaceae), tradicionalmente utilizada na medicina da Índia, indicaram os inibidores de acetilcolinesterase (AChE) como uma opção de tratamento para a doença de Alzheimer, aumentando a neurotransmissão colinérgica e amenizando o declínio cognitivo. Entre os quatro constituintes fitoquímicos sugeridos, o ácido D-(+)-ribônico.gamma-lactona demonstrou ótima afinidade contra a acetilcolinesterase, sendo assim indicado como potencial inibidor da AChE para possível tratamento do Alzheimer.

Os ácidos galactônico e glucônico são precursores do ácido ascórbico nas plantas, um dos compostos que contribui para a acidez das frutas e podem ser utilizados como agentes acidificantes ou estabilizantes na indústria alimentícia. Podem ser biossintetizado, tanto através da D-galactose, que origina em sequência o D-galacturonato (ácido galacturônico), o ácido L-galactônico e depois o L-galactonolactona, ou através da oxidação da D-glucose em ácido D-glucurônico, que é convertido em ácido L-gulônico e depois L-gulonolactona,

precursor direto do ácido ascórbico. O ácido glucônico pode ser convertido em ácido gulônico e depois em ácido ascórbico (LOEWUS, 1999).

O ácido L-ascórbico, uma das moléculas mais abundantes nas plantas, que são as principais fontes de vitamina C para os seres humanos, ocorre em altas concentrações nos cloroplastos e no citosol. Os frutos de maracujá são considerados a melhor fonte de vitamina C, sendo que o suco fresco de maracujá amarelo contém 64,78 mg/100 g e as folhas do maracujá amarelo apresentaram acima de 292,5 mg/100 g de vitamina C (ZERAIK *et al.*, 2010; ZHANG *et al.* 2023). Além de ser o precursor de vários ácidos orgânicos atua também como antioxidante majoritário das plantas e como cofator de várias enzimas regulando o crescimento e desenvolvimento das plantas, além de outros processos como tolerância ao estresse e a transdução de sinal (YOSHIMURA; ISHIKAWA, 2017).

O ácido ascórbico atua removendo as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e estimulando a capacidade antioxidante das células através da transdução de sinais e da reciclagem de outras moléculas antioxidantes, como a Vitamina E, pois possui ação como cofator de várias enzimas que regulam a fotossíntese, respiração, o crescimento celular (divisão e alongamento) e a biossíntese de hormônios importantes (ácido abscísico, ácido salicílico e ácido indol acético). Além disso, participa na regulação das vias de transdução de sinais das plantas funcionando como composto redox e regulando o crescimento e desenvolvimento das plantas. (ORTIZ-ESPIN *et al.*, 2017).

Nos extratos de folhas de *P. setacea* também foram identificados o flavonoide isoschaftosídeo, um flavonoide-C-glicosil, com tempo de retenção 0,825 min e íon precursor m/z 563,14; os terpenos do tipo cicloartano em t_R 8,146 min e íon precursor de m/z 663,41 e o astragalosídeo II com t_R 7,298 min e íon precursor de m/z 825,464, composto por uma molécula de ácido glucurônico ligada ao triterpenóide astragalosídeo I e derivados da fosfocolina. A fosfocolina é um precursor da fosfatidilcolina, um dos principais constituintes das membranas celulares, formador de lipoproteínas de alta densidade, sendo comercializada como um fármaco para absorção de gordura e problemas hepáticos (MERTINS, 2004). Ko *et al.* (2016) descobriram que o tratamento profilático de neurônios com fosfatidilcolina pode prevenir a senescência induzida pela proteína β-amiloide (Aβ), envolvida na doença de Alzheimer, com efeito neuroprotetor dose-dependente

O flavonoide isoschaftosídeo é uma flavona-C-glicosídeo, metabólitos que são incomuns de serem encontrados em plantas (HOOPER *et al.*, 2010), mas em passiflora o isoschaftosídeo já foi identificado em folhas de *P. incarnata* (ABOURASHED; VANDERPLANK; KHAN, 2002) e em *P. alata* (CARVALHO, 2016; PINTO, 2018). Gadioli

et al. (2017) relataram a detecção desses metabólitos em outras espécies de passifloras como *P. tenuifila*, *P. foetida*, *P. nítida*, *P. palmeri*, *P. coriacea*, *P. loefgrenii*, *P. edulis*, *P. alata*, *P. ambigua* e *P. pithieri*, em caule de *P. cincinnata* (LEAL *et al.* 2020) e em folhas de *P. mucronata* e *P. incarnata* (TREMMELE; KIERMAIER; HEILMANN, 2021).

As flavonas-C-glicosídeo apresentam boas propriedades terapêuticas, principalmente devido à sua alta estabilidade e reatividade, sendo sugerida como um metabólito promissor no tratamento da hipertensão, como exemplificado em um trabalho que isolou isoschaftosídeo em extratos de *Syngonium podophyllum* (GOMES *et al.*, 2014). Além disso, é relatado em diversos artigos científicos que possui propriedade anti-hiperglicêmica (CHUA *et al.*, 2020). Li *et al.* (2022), encontrou o isoschaftosídeo em extratos da pimenta vermelha (*Capsicum frutescens*) após a fermentação, o qual teve interação com uma enzima (DPP-IV) que degrada peptídeos de glucagon e peptídeos gástricos, estimulantes de insulina, demonstrando então potencial para terapias de regulação glicêmica.

A ação anti-inflamatória do isoschaftosídeo foi demonstrada por Chen *et al.* (2024), que analisando as frações solúveis aquosas de extratos de *Artemisia argyi*, identificaram quatro metabólitos, entre eles o isoschaftosídeo, que foi capaz de inibir significativamente o conteúdo de óxido nítrico e a super expressão de vários fatores inflamatórios induzidos por lipopolissacarídeos em culturas de células de macrófagos de rato.

A maioria dos estudos sobre passifloras indica que 52,7% dos compostos fenólicos (ácidos fenólicos, fenóis, flavonoides e derivados) são encontrados nas folhas, 12,2% nas cascas, 8,5% nas sementes e 6,1% na polpa (GADIOLI *et al.*, 2017). Os flavonoides são encontrados principalmente nas folhas e atuam nos sistemas de defesa antioxidantes das plantas contra estresse biótico, como ataque de patógenos e estresse abiótico, contra a radiação ultravioleta. Os flavonoides têm efeitos antioxidantes, antibacteriano, antitumoral e anticonvulsão notadamente comprovados (HOLANDA *et al.*, 2020).

Zhang *et al.* (2023) afirma que os principais flavonoides encontrados em plantas de passifloras são a apigenina, luteolina, vitexina (apigenina-8-C-glicosídeo), isovitexina (apigenina-6-C-glicosídeo), crisoeriol e quercetina e os principais flavonoides que aparecem especificamente nas folhas de passifloras são a orientina, isoorientina, apigenina e quercetina (ARAUJO *et al.*, 2017; SANTOS *et al.*, 2021; SILVA, 2021). Zhang *et al.* (2023) também relatam várias atividades biológicas e mecanismo de ação de metabólitos e de extratos de diferentes espécies de passifloras, entre elas os efeitos anti-inflamatórios. Os derivados da apigenina-C-glicosil e luteolina apresentaram redução em aproximadamente 70% na inflamação através da expressão da citocina IL-8 (CARMO *et al.*, 2020). Os

flavonoides-C-glicosil de cascas de *P. edulis* reduziram a inflamação intestinal no modelo dextrana sulfato de sódio de colite em ratos, através da redução da expressão pró-inflamatória de citocinas TNF-alfa, IL-17, IL-1beta, IL-6, IL-12 e IL-17 a reduziram a expressão de MCP-1 e ICAM-1 (CAZARIN *et al.*, 2016).

Carvalho, Oliveira e Costa (2018) estudaram extratos de polpa de frutos de *P. setacea* por HPLC e utilizando curvas de calibração de diferentes padrões de flavonoides identificaram e quantificaram os flavonoides orientina, isoorientina, vitexina, isovitexina e hesperidina. Gomes *et al.* (2017) analisaram extratos hidroalcoólicos de 6g de folhas secas de 17 espécies de Passifloras por HPLC-DAD e em *P. setacea* quantificaram isovitexina em maior concentração (8,46 mg/g extrato) seguida por vitexina (2,48 mg/g extrato) e orientina (1,24 mg/g extrato seco).

A vitexina e isovitexina pertencem à classe das flavonas e, assim como o isoschaftosídeo detectado no presente trabalho por CLUE-ESI-EM em folhas de *P. setacea*, também são derivadas da apigenina 8/6-C-glucosídeo. Estudos demonstram que a vitexina e a isovitexina apresentam propriedades químicas semelhantes e com atividade antioxidante, antidiabetes (inibidores de alfa-glucosidase e alfa-amilase), anticâncer, anti-inflamatória, anti-hiperalgésica e ação neuroprotetora contra doenças neurológicas e psiquiátricas (HE *et al.*, 2016).

Os terpenóides são constituintes característicos de plantas de passiflora e contribuem para o sabor e aroma das folhas, flores e frutos e dessas partes mais de 20 triterpenóides já foram isolados, inclusive das raízes (ZHANG *et al.*, 2023). Os cicloartano glicosídeos são triterpenos tetracíclicos, com quatro anéis, 30 átomos de carbono e com esqueleto semelhante ao dos esteróis, encontrado nas famílias Leguminosae, Passifloraceae (*Passiflora edulis*) e Ranunculaceae (*Cimicifuga racemosa*) pertence ao grupo dos triterpenos que apresentam atividade anti-inflamatória, antinociceptiva, antimicrobiana, anticâncer (SILVA *et al.*, 2020) Seis terpenóides já foram isolados e identificados em *P. edulis*, a passiflorina e os ciclopasiflosídeos II, III, VII, VIII, XI.

Similarmente, Xu *et al.* (2016) isolaram e identificaram pela primeira vez em extratos de caules e folhas de *P. edulis* quatro novos cicloartanos triterpenóides, o 1-alfa, 3-beta-dihidroxi-16-ceto-24(31)-en-cicloartano, ciclopasiflosídeos XIV e XV e ácido 31-metoxilpassifloico. Esses autores demonstraram que os triterpenos do tipo cicloartano desempenham um papel protetor significativo contra os danos de neurotoxicidade induzidos pelo glutamato nas células PC12 e podem ser utilizados no tratamento de doenças neurodegenerativas (XU *et al.*, 2016). Além disso, os terpenos estão envolvidos na defesa das

plantas contra micro-organismos, apresentando atividade antibacteriana (RIZWANA *et al.*, 2019).

Nos extratos de folhas de *P. setacea* analisados no presente trabalho foram encontrados astragalosídeo II, com t_R de 7,298 min e de íon precursor 825,464 (Tabela 4). Esse metabólito pertence ao grupo dos astroglicosídeos, que possuem quatro subtipos principais, AS-I, II, III e IV, comumente extraídos de plantas de *Astragalus membranaceus*. O astroglicosídeo IV é um dos mais estudados pelas propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes, antibacterianas e antivirais, sendo muito utilizado em vários modelos de enfermidades do sistema nervoso central, principalmente Alzheimer e Parkinson (FREIRE *et al.* 2022). Em estudos prévios realizados com plantas de *P. setacea* também foram identificados terpenos aos quais foram atribuídos o sabor dos frutos com notas florais (PAULA *et al.*, 2015).

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

No extrato de cascas de fruto foram detectados hexose, ácidos orgânicos de cadeia curta, como o ácido cítrico (detectado em folhas e sementes), ácido citracônico, subérico, hidroxisubérico e succínico (detectados em folhas) e o ácido homoisocítrico/metilisocítrico, encontrado apenas em cascas, e o citrato monoglicerídeo, também encontrado apenas no extrato de cascas (Figura 9A, Tabelas 4, 5 e 6).

Citrato monoglicerídeo, de t_R 0,517 e precursor de m/z 129,0193, é um ácido graxo de cadeia média, importante na emulsificação com propriedades de qualidade alimentar, além de aditivos (YOUNES *et al.*, 2020). Ácidos graxos são normalmente associados a funções estruturais nas células vegetais e na transdução de sinais (SANTOS; LIMA; CASTRO, 2021).

Nos extratos de cascas foram detectados os ácidos orgânicos cítrico e succínico, diretamente envolvidos no ciclo do ácido cítrico, também conhecido como ciclo dos ácidos tricarbônicos, o Ciclo de Krebs. O ciclo de Krebs é responsável pela produção de NADH e $FADH_2$, além de gerar diversos precursores para biossíntese de outros compostos importantes para o metabolismo vegetal (TAIZ *et al.*, 2017). O ácido succínico é um metabólito intermediário do Ciclo de Krebs, formado a partir do ácido alfa-cetoglutárico e succinil-CoA e precursor da biossíntese de $FADH_2$ e dos ácidos málico e oxaloacético, precursor da biossíntese do ácido aspártico, asparagina, alcaloides, ácidos nucleicos, e outros tipos de

aminoácidos e proteínas importantes para o metabolismo da célula vegetal (TAIZ *et al.*, 2017).

Entre os diferentes ácidos orgânicos como malato, citrato e ácido citracônico, o malato é o que predomina na maioria das plantas (YAN *et al.*, 2022). Esses autores constataram que as sementes de *Torreya grandis* (Taxaceae) nos estágios finais de desenvolvimento acumularam dez tipos de ácidos orgânicos, entre eles o ácido citracônico, em relação aos estágios iniciais. Além de influenciarem as características organolépticas dos frutos como aroma e sabor, apresentam atividades antimicrobiana e antioxidantes, protegendo contra várias doenças.

Em frutos de *P. foetida* os ácidos orgânicos cítrico e oxálico predominam, representando 79,17% do conteúdo total de ácidos e em frutos de maracujá amarelo e vermelho os principais ácidos orgânicos encontrados, seguindo a tendência de predomínio decrescente foram ácido cítrico, ácido L-málico, ácido láctico, ácido succínico, ácido L-ascórbico, ácido tartárico e ácido fumárico, sendo que o alto teor de ácido cítrico em frutos de maracujá faz com que seja usado como um aditivo em alimentos processados e em produtos químicos (ZHANG *et al.*, 2023).

O ácido homoisocítrico, encontrado com t_R 0,555 e precursor de m/z 205,0352, participa da via metabólica que produz a lisina, via do α -aminoadipato, a qual em eucariotos é exclusiva de fungos quitinados e dos protistas euglinados. Isso indica que pode ter ocorrido contaminação durante os processos da metodologia (SCHMITZ *et al.*, 1996).

O ácido D-glucurônico, também encontrado nas cascas de frutos de *P. setacea* com t_R 0,46 e precursor de m/z 193,0347, desempenha nas plantas função importante na formação da parede celular e é precursor do ácido L-ascórbico, antioxidante majoritário das plantas (LOEWUS, 1999). Também é um produto da degradação enzimática de açúcar e, assim como o ácido homoisocítrico, sua detecção pode indicar contaminação na amostra, pois sua produção pode estar associada à presença de micro-organismos (QIAN *et al.*, 2022).

O ácido D-glucurônico é precursor do ácido UDP-glucurônico, o qual é o precursor comum direto da xilose, arabinose, ácido galacturônico, apiose e resíduos do ácido galacturônico da parede celular (REBOUL *et al.*, 2011). As moléculas do ácido galacturônico formam a pectina, abundante na casca do maracujá amarelo, que é utilizada como espessante e geleificante na indústria de alimentos (CANTERI *et al.*, 2012). O ácido UDP-glucurônico é o precursor comum direto da xilose, arabinose, ácido galacturônico, apiose e resíduos do ácido galacturônico da parede celular (REBOUL *et al.*, 2011). As moléculas do ácido

galacturônico formam a pectina, abundante na casca do maracujá amarelo, que é utilizada como espessante e geleificante na indústria de alimentos (ZHANG et al., 2023).

A partir da UDP-xilose, metabólito originado de uma série oxidativa do UDP-glucurônico, são sintetizadas as xilanas, um dos principais polissacarídeos que perfazem de 20-30% da composição total da parede celular e que compõem a hemicelulose. A hemicelulose, celulose e lignina formam a parede celular, que atua como uma importante barreira física e que protege a célula de vários estresses ambientais, incluindo o estresse salino (VANHOLME *et al.*, 2012). A hemicelulose e a celulose compõem as fibras da casca do maracujá. As cascas do maracujá amarelo são importantes fontes de fibras e são aproveitadas pela indústria para o enriquecimento de vários tipos de alimentos processados (ZHANG et al., 2023).

Também foram detectados nas cascas os ácidos graxos de cadeia média hidroxisubérico e subérico, além de um monoglicerídeo citrato com tempo de retenção de 0,44 min e íon precursor m/z 265,056, encontrado apenas neste extrato (Tabelas 4,5). O ácido subérico é um ácido dicarboxílico detectado com t_R 0,594 e precursor de m/z 173,0812. A principal função do ácido subérico é na biossíntese da suberina, um biopoliéster lipofílico presente nas paredes celulares, importante molécula envolvida na impermeabilização dos tecidos externos dos órgãos vegetais, como cascas de troncos de plantas lenhosas, folhas e cascas de frutas, com a função de proteger contra a perda de água e de íons, ataques de patógenos e contra estresses abióticos, como salinidade do solo e seca prolongada (WEI *et al.*, 2024).

Kang *et al.* (2022) descobriram que o ácido subérico, classe de moléculas abundantes em várias plantas como *Vernonia galamensis* e *Hibiscus syriacus*, pode interagir com receptores olfativos em células de mamíferos e vários desses receptores olfativos já foram observados em fibroblastos da derme de seres humanos. Kang et al. (2022) incubaram linhagens celulares de fibroblastos dérmicos humanos Hs68 em cultura com 12.5-400 μ M de ácido subérico dissolvido em DMSO por 24h e observaram que esse tratamento levou à ativação dos receptores OR10A3 presentes nos fibroblastos, aumentando a produção de colágeno nas células expostas ao UVB e diminuindo o decréscimo de colágeno pelo UVB. A ativação dos receptores OR10A3 pelo ácido subérico estimulou a síntese de colágeno pelos fibroblastos.

Os metabólitos identificados nas cascas de frutos de *P. setacea*, em geral desempenham funções na respiração celular, funções estruturais, como moléculas que

participam da composição da parede celular, e na defesa protegendo contra os estresses bióticos e abióticos (HE *et al.*, 2016).

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

No extrato de sementes, além dos ácidos orgânicos glucurônico (detectado em casca) e cítrico (detectado em folhas e cascas), foram identificados os flavonoides O-metil-epicatequina e sabian, sendo metabólitos específicos desse extrato (Figura 9C, Tabelas 4, 5 e 6). Além desses metabólitos, outros dois picos intensos, encontrados apenas nos extratos de sementes, foram detectados com t_R 4,75 e 5,058 min e íon precursor m/z 701,184 e 935,275 respectivamente, se mostraram intensos no cromatograma (Figura 9C), não sendo possível definir as classes químicas desses metabólitos. O extrato de sementes foi o menos diverso em classes químicas quando comparado com os extratos de casca e folhas.

O ácido cítrico desempenha funções no Ciclo de Krebs, na produção de moléculas de NADH utilizadas na produção de ATP, na fosforilação oxidativa. Além disso pode atuar na planta como um agente quelante, afetando a toxicidade por metais através de vários mecanismos, como absorção, complexação, precipitação e acidificação, podendo funcionar contra o estresse oxidativo induzido por metais nas plantas hiperacumuladoras de metais, como a *Solanum nigrum* e *Brassica jucea* (GAO *et al.* 2010).

Khatun *et al.* (2019) demonstraram que a aplicação de 100 μ M de ácido cítrico às plantas de *Oryza sativa* sob estresse induzido pela toxicidade ao cromo aumentou a atividade das enzimas antioxidantes, glutatona e prolina, indicando que o ácido cítrico pode ter exercido a função de agente quelante de cromo, regulando o mecanismo de defesa antioxidante através da modulação das enzimas e metabólitos que protegem a planta dos danos causados pelo estresse oxidativo induzido por cromo. Os autores demonstraram que o ácido cítrico recuperou os parâmetros de crescimento, conteúdo de proteínas totais e a estabilidade das membranas, confirmando o papel do ácido cítrico na detoxificação das plantas.

O acúmulo de metais pesados pelas plantas pode causar efeitos tóxicos e inibir o crescimento e o desenvolvimento vegetal, sendo que as plantas apresentam vários mecanismos de detoxificação que fazem com que tolerem o estresse por metais pesados. Entre os mecanismos intracelulares que possibilitam a tolerância aos metais no nível celular estão os ácidos orgânicos, além dos aminoácidos, fitoquelatina e as metalotioninas, que desempenham

função vital na tolerância a diferentes tipos de metais pesados (KUMAR *et al.*, 2016). Vários ácidos orgânicos de baixo peso molecular como málico, malônico, oxálico, acético, succínico, açúcares, aminoácidos e fenólicos funcionam como fitoquelantes/fitosideróforos liberados pelas plantas acumuladoras naturais de metais, os quais agem na rizosfera da planta aumentando a biodisponibilidade de metais e ajudando no transporte dos mesmos para o interior das plantas (SHEORAN; SHEORAN; POONIA, 2009).

Nas plantas os flavonoides são a maior classe de fenólicos e desempenham funções importantes como os pigmentos carotenoides (compostos terpênicos) e as antocianinas, responsáveis pela cor das flores e frutos, com a função de atrair os polinizadores que atuam na dispersão das sementes (TAIZ *et al.*, 2017). Esses autores relatam que as flavonas e flavonóis existem nos caules, raízes, folhas e flores, absorvem luz em comprimentos de onda entre 280 e 320 nm (UV-B), protegendo as células das mutações de DNA e do estresse oxidativo gerado pela radiação UV-B, além de mediar a interação das plantas com as rizobactérias fixadoras de nitrogênio, quando liberados pelas raízes. A exposição das plantas aos estresses abióticos e bióticos pode resultar na maior síntese de flavonas e flavonoides pelas plantas e pode ser utilizada como estratégia para aumentar a produção desses compostos.

O flavonóide sabian, detectado apenas nas amostras de sementes, já foi identificado e isolado de caules e folhas de *Sabian yunnanensis* (Euphorbiaceae), planta originária da China e Vietnã, muito utilizada na medicina tradicional chinesa, com propriedades medicinais. Além disso, foi relatado a presença de compostos fenólicos, flavonoides e outros compostos fitoquímicos com efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios em *S. yunnanensis* (DENG *et al.*, 2005). A estrutura do sabian foi determinada após análise de ressonância magnética nuclear (RMN) isolada de extratos hidrometanólicos de partes aéreas de *S. yunnanensis* (SABIACEAE), pertence à classe dos flavonóis e faz parte de um pequeno grupo de flavonóis com grupos C-linked não usuais, sendo um derivado do flavonol (8-C-derivado flavonol) com uma estrutura química com base de carbono não descrita anteriormente (VEITCH; GRAYER, 2008). Esse flavonol foi detectado pela primeira vez no presente trabalho, em extratos de sementes de *P. setacea*, não sendo relatado na literatura em estudos anteriormente realizados com extratos dessa espécie e de outras espécies de passifloras.

Os taninos são polímeros fenólicos (polifenóis) produzidos por frutos imaturos e atuam contra a herbivoria por vários tipos de animais, inibindo a ingestão dos frutos imaturos e garantindo o completo desenvolvimento dos frutos e das sementes, que serão dispersas quando os frutos estiverem completamente maduros (TAIZ *et al.*, 2017). De acordo com esses autores, os taninos atuam também como defesa contra microrganismos e são acumulados no

cerne das árvores, para evitar a decomposição por fungos e bactérias. Nas sementes de *P. setacea* pode desempenhar o papel de defesa, em conjunto com os demais flavonoides, durante a germinação das sementes no solo e garantir a sobrevivência das plântulas.

O flavonoide O-metil-epicatequina pertence ao grupo das proantocianidinas (PA's) que são as flavanas-3-ols (polifenóis), sendo a mais conhecida da classe. As PAs conferem as propriedades sensoriais de frutos frescos e polpas e são responsáveis pelo sabor e mudanças na coloração do fruto e do suco da fruta. O teor de proantocianidinas em polpa de frutos de *P. setacea* foi descrito como maior que em maçãs vermelhas e outras espécies de passifloras estudadas (GADIOLI, 2017). Bendini *et al.* (2005) detectaram epicatequinas por HPLC-DAD-MS em extratos metanólicos de folhas, caules e cascas de *P. palmeri*, *P. nítida*, *P. tenuifila*, *P. coriacea* e *P. foetida*. Também foram identificadas por Morais *et al.* (2015), por UPLC-ESI-MS), epicatequinas em extrato etanólico de casca de frutos de *P. edulis*

As catequinas e epicatequinas presentes principalmente nas sementes de uvas em grandes quantidades, conferem a adstringência e sabor de vinhos e sucos de uva (ABE *et al.* 2007). A (-)-epicatequina é um dos polifenóis mais abundantes na dieta humana e pode melhorar a sensibilidade à insulina e regular o nível de glicose, além de diminuir o estresse oxidativo, protegendo danos ao fígado e aumentando a insulina no soro sanguíneo, sendo um suplemento nutricional com potencial promotor na prevenção e no tratamento da diabetes mellitus tipo 2 (ZENG *et al.* 2024). Esses autores relatam que as flavanas-3-ol modulam a microbiota intestinal, pois quando ingeridas, apesar de boa parte das moléculas serem degradadas no cólon pela microbiota, uma pequena parte é absorvida no intestino delgado e atua inibindo a proliferação de bactérias produtoras de lipopolissacarídeos, reduzindo o nível sanguíneo desses compostos.

Os taninos são polímeros fenólicos produzidos por frutos imaturos e atuam contra a herbivoria por vários tipos de animais, inibindo a ingestão dos frutos imaturos e garantindo o completo desenvolvimento dos frutos e das sementes, que serão dispersas quando o fruto estiver completamente maduro (TAIZ *et al.*, 2017). De acordo com esses autores os taninos atuam também como defesa contra microrganismos e são acumulados no cerne das árvores, para evitar a decomposição por fungos e bactérias. Nas sementes de *P. setacea* poderia desempenhar o papel de defesa, em conjunto com os demais flavonoides, durante a germinação das sementes no solo e garantir a sobrevivência das plântulas.

A hexose detectada no t_R 0,44 min e m/z 179,055 (Tabela 4) foi encontrada nos três extratos de partes da planta (Ca, Fo, Se), mas não nos extratos dos calos cultivados *in vitro* de NC, com exceção de NC30. De acordo com a literatura, açúcares hexose presentes nas

plantas, dentre suas funções, servem também para sintetizar o ácido ascórbico, um cofator enzimático com múltiplas funções no metabolismo e nas respostas das plantas a estresses abióticos e patógenos (ISHIKAWA; DOWDLE; SMIRNOFF, 2006).

As hexoses na forma de hexoses-6-fosfato são moléculas de açúcares precursoras de todas as reações da via glicolítica, iniciando pela biotransformação em piruvato e depois em acetil-CoA. Essa molécula é fundamental para iniciar o Ciclo de Krebs, reagindo com o ácido oxaloacético e produzindo o ácido cítrico. O Ciclo de Krebs leva à síntese do NADH, principal doador de prótons e elétrons, que são transportados até o oxigênio, através da cadeia de transporte de elétrons da fosforilação oxidativa, processo que gera a energia para a síntese do ATP.

Durante o processo do Ciclo de Krebs, diversos compostos intermediários são formados, os quais desempenham importante papel como precursores da biossíntese de vários metabólitos secundários como os polissacarídeos da parede celular, fosfolipídios, aminoácidos, compostos fenólicos (tirosina, fenilalanina, antocianinas, ligninas, triptofano, auxinas), ácidos graxos, isoprenóides (carotenoides, cadeia de fitol da clorofila, esteróis, giberelinas, terpenos), vários compostos aromáticos (flavonoides), pigmentos fotorreceptores como clorofila, citocromos e fitocromos (a partir do alfa-oxoglutarato) e de aminoácidos, ácidos nucleicos e alcalóides (a partir do ácido oxaloacetato).

3.2.6 Análise do perfil químico dos extratos brutos dos calos de nós cotiledonares de *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado em vários tempos de cultivo

A Figura 10 (A, B, C) mostra os cromatogramas obtidos em modo negativo de ionização para os extratos de calos de nós cotiledonares de *P. setacea* originados, em diferentes tempos de cultivo de 30 (NC30, A), 60 (NC60, B) e 90 dias (NC90, C). A análise indica que os calos não apresentaram alta diversidade de classes de metabólitos como as folhas, cascas e sementes. Como já mencionado anteriormente, foram observados sinais próximos ao ruído instrumental e isso está relacionado com o baixo teor de metabólitos na amostra, influenciando principalmente na detecção de metabólitos.

As estratégias para otimizar a metodologia utilizada são o ajuste do tempo de cultivo e o aumento da quantidade de biomassa seca final na amostra utilizada para a extração hidroalcoólica (SUMNER *et al.*, 2007). Outro aspecto a ser explorado é testar outros tipos de solventes que podem otimizar a extração dos metabólitos como demonstrado por Shakour *et al.* (2023) nos estudos realizados na determinação dos perfis metabolômicos de folhas de

Moringa oleifera, em que testaram a eficácia das polaridades de diferentes solventes como etanol-água (7:3), metanol, etil acetato, clorofórmio e butanol para extrair certos grupos de compostos e melhorar a sua detecção cromatográfica.

A Tabela 4 mostra os perfis fitoquímicos estabelecidos para os extratos de folhas (Fo), cascas (Ca), sementes (Se) e de nós cotiledonares de *P. setacea* de 30 dias (NC30), 60 dias (NC60) e 90 (NC90) dias de cultivo. Os calos de nós cotiledonares de *P. setacea* apresentaram compostos característicos dos extratos de calos e que não foram encontrados em extratos de folhas, cascas e sementes, como o ácido aspártico, além de compostos também presentes em folhas (ácido treônico, ácido ribônico, aminoácido N-frutosil piroglutamato), em casca (ácidos glucurônico e succínico) e em sementes (ácido glucurônico) (Tabela 5).

A Tabela 7 abaixo, elaborada a partir dos dados da Tabela 5 mostra a lista dos metabólitos detectados em ordem crescente do tempo de retenção, produzidos pelos calos de nós cotiledonares de *P. setacea*, após os tempos de cultivo de 30 (NC30), 60(NC60) e 90 (NC90) após os diferentes períodos de cultivo.

Tabela 7. Compostos detectados por CLUE-ESI-MS em extratos de calos de nó cotiledonar de *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado após 30 (NC30), 60(NC60) e 90 (NC90) dias cultivo em meio Murashige & Skoog suplementado com 88,5 mM de sacarose, 2,5 mM de 2,4-D e 0,2% de Phytigel.

Metabólitos	NC30	NC60	NC90
Ácido aspártico	X	X	X
Ácido treônico	X		
Ácido D-ribônico	X	X	
Hexose	X		
Ácido glucurônico	X		X
N-frutosil piroglutamato	X	X	
Ácido succínico	X	X	X
TOTAL	7	4	3

Fonte: Elaborado pelo autor.

Verifica-se que os tempos de cultivo influenciaram os perfis químicos de metabólitos produzidos pelos calos, sendo que foram identificados 7 compostos com 30 dias de cultivo, decrescendo para 4 e 3 metabólitos nos períodos de cultivo seguintes.

O maior número de metabólitos nos calos com 30 dias de cultivo coincidiu com o maior período de crescimento e maior acúmulo de massa fresca e com o aumento da razão

massa seca/massa fresca. O declínio em número de metabólitos nos períodos de 60 e 90 dias de cultivo coincidiu com a influência do processo de entrada dos calos em senescência, em que se observou a coincidente redução da razão massa seca/massa fresca e na diminuição das massas fresca e seca dos calos aos 90 dias de cultivo (Tabela 3, Figuras 6).

O ácido treônico e a hexose apareceram apenas no tempo de 30 dias de cultivo. O ácido ribônico e o aminoácido N-frutosil piroglutamato foram detectados com 30 e 60 dias de cultivo e não foram detectados em calos com 90 dias. Esses resultados indicam a relevância de estudos para otimização do tempo de cultivo ideal dos calos, tanto para a extração da maior diversidade possível de compostos como para focar num período de cultivo específico, em que é produzido o composto de interesse para o isolamento químico.

Os calos de nós cotiledonares com 30 dias de cultivo estavam em fase de crescimento rápido, com metabolismo intenso e divisão celular, como pode ser constatado pelo incremento nas biomassas fresca e seca (Figura 7). Em média foram inoculadas 300 mg de massa fresca/tubo (média de 16 mg de massa seca/tubo) no início do cultivo, mas ao redor de 30 dias de cultivo a média de massa fresca foi de 1812,4 g/calor e massa seca de 99,7 g/calor, aumento aproximado de 6 vezes nas massas fresca e seca no período de 30 dias.

O metabolismo intenso das células na fase de crescimento rápido dos calos demanda aportes de hexoses consideráveis para manter a via glicolítica e as principais vias produtoras de moléculas redutoras como NADH e FADH₂ (Ciclo de Krebs) e NADPH (glicólise e via das pentoses fosfato), doadores de prótons e elétrons na fosforilação oxidativa, para a formação de ATP que mantém o metabolismo energético das células (TAIZ *et al.*, 2017). Além disso essas vias metabólicas geram precursores para a síntese das várias moléculas importantes para a construção das estruturas celulares como paredes e membranas, pigmentos como clorofila e que atuam na ecologia e nos mecanismos de defesa das plantas contra vários tipos de estresse provocado por fatores bióticos e abióticos.

A presença de moléculas como hexoses, ácido succínico e ácido aspártico são comprovações de que as vias metabólicas mencionadas acima estão em pleno funcionamento nos calos, processo fundamental para a produção de várias classes de metabólitos secundários de interesse, como compostos fenólicos, terpenóides e alcalóides. O ácido succínico, presente em todos os tempos de cultivo, é importante intermediário para a manutenção do Ciclo de Krebs que é convertido em ácido málico, precursor do ácido oxaloacético (SAAVEDRA *et al.*, 2022). O ácido aspártico é um aminoácido formado a partir do ácido oxaloacético, no Ciclo de Krebs, importantíssimo para a síntese de outros aminoácidos, asparagina, proteínas,

pirimidinas, que vão formar os ácidos nucleicos e dos alcalóides, muitos deles com várias atividades biológicas comprovadas.

O ácido D-glucurônico, também encontrado nas cascas de frutos, é importante na formação da parede celular e é precursor do ácido L-ascórbico, antioxidante majoritário das plantas (LOEWUS, 1999). Além disso desempenha várias funções no metabolismo celular e nas respostas das plantas aos estresses abióticos e patógenos ((ISHIKAWA; DOWDLE; SMIRNOFF, 2006). O ácido ascórbico pode ser convertido no ácido L-treônico (TAVARES *et al.*, 2010).

Além dos ácidos ribônico e treônico já citados no perfil fitoquímico das folhas, o N-frutosil piroglutamato foi detectado em NC30, amino ácido com t_R 0,48 min e íon precursor de m/z 290,0873. Os ácidos ribônico e treônico atuam nos mecanismos antioxidantes de proteção das plantas em espécies de *Astragalus* expostas ao UV-B (LIU *et al.*, 2020). Thandivel *et al.* (2024) analisando extratos de frutos secos *Catunaregam spinosa* (Rubiaceae), demonstraram o potencial de inibição da acetilcolinesterase do ácido D-(+)-ribônico-gamma-lactona, que é indicado como potencial opção de tratamento da doença de Alzheimer, aumentando a neurotransmissão colinérgica e amenizando o declínio cognitivo.

No extrato de calos com 60 dias de cultivo foram encontrados os ácidos orgânicos D-ribônico e succínico, além do ácido aspártico e do N-frutosil piroglutamato, presente também em NC30. Os aminoácidos são muito importantes para o desenvolvimento das plantas e atuam em processos de sinalização e na defesa contra o estresse, na biossíntese de proteínas, como precursores de muitos metabólitos primários e secundários e importantes para a nutrição humana (HILDEBRANDT *et al.*, 2015; TROVATO *et al.*, 2021). Nos extratos de calos com 90 dias de cultivo foram encontrados apenas os ácidos glucurônico, succínico e aspártico.

Esses resultados indicam o importante potencial dos calos de nós cotiledonares de *P. setacea* como fontes de ácidos orgânicos como o glucurônico, ribônico e treônico, com importantes atividades biológicas e de outros tipos de ácidos orgânicos imprescindíveis para o funcionamento do Ciclo de Krebs, essencial para a produção de várias classes de metabólitos secundários de interesse comercial.

3.3.7 Análise estatística multivariada não supervisionada da análise de componentes principais (PCA) considerando todos os tipos de materiais vegetais de *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado

Para analisar e visualizar os conjuntos de dados obtidos pela análise CLUE-ESI-EM dos extratos de folhas, cascas, sementes e calos de *P. setacea* foi realizada uma análise estatística multivariada não supervisionada por componentes principais (PCA - *Principal Component Analysis*). A análise de componentes principais é utilizada para extrair as informações importantes de uma tabela de dados multivariados e expressar essas informações como um conjunto de dados de poucas variáveis, que são os componentes principais que correspondem a uma combinação linear das originais (GALLO, 2022).

A análise estatística por PCA considera as correlações entre os dados de intensidade de picos por metabólito de cada amostra e gera o agrupamento das amostras de acordo com componentes que explicam a variância dentro dos conjuntos de dados e justifiquem a classificação dos grupos (GALLO, 2022).

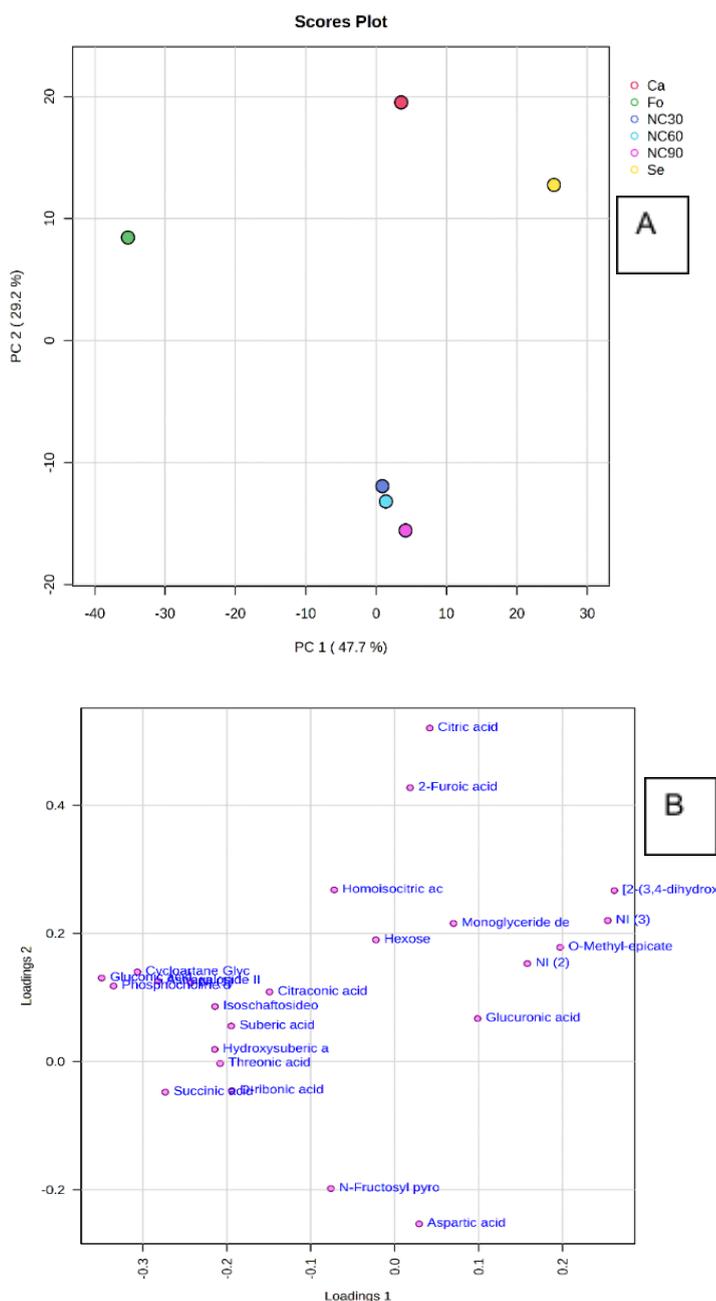
Os dados de intensidade de pico dos calos de nó cotiledonar em diferentes tempos de cultivo foram correlacionados com os dados de cascas, folhas e sementes. Os resultados da análise de classificação das amostras segundo este método não supervisionado indicaram a classificação de 76.9% dos dados em dois componentes principais (PCs). A Figura 11A mostra o gráfico de pontuação (Score) das 2 componentes principais nos eixos X e Y e as amostras. O eixo X representa o componente principal 1 (PC1), que explica 47,7% da variância dos dados de forma cumulativa e o eixo Y representa o componente principal 2 (PC2), que explica 29,2% da variância dos dados. Juntos os componentes justificam 76,9% da variância total do arranjo amostral.

Amostras de calos de nós cotiledonares nos três diferentes tempos de crescimento (NC30, NC60 e NC90) foram segregadas e se mantiveram agrupadas positivamente pela PC1, enquanto as amostras de partes da planta, representadas pelas folhas (Fo), cascas (Ca) e sementes (Se) mostraram menores similaridade e agrupamento com os calos (Figura 11A). As cascas (Ca) e sementes (Se) foram positivamente descritas pelas variáveis PC1 e PC2, sendo o extrato de sementes (Se) a amostra que apresentou maior correlação com a PC1. O perfil químico de folhas (Fo) foi positivamente correlacionado com a PC2 (Figura 11A).

O gráfico de cargas (*Loadings*) indica a direção da variância para a qual a amostra é projetada, e mostra cada metabólito de acordo com a sua contribuição com a variância. O gráfico de carga (*Loading*) da Figura 11B representa o quanto cada metabólito explica a

variação dos dados e mostra a relação entre os diferentes metabólitos. Variáveis com a mesma distância de 0 e a mesma direção são positivamente correlacionadas e em direção oposta são negativamente correlacionadas (GALLO, 2022). O gráfico de carga (Figura 11B) mostra os metabólitos identificados implicados na separação das amostras da Figura 11A.

Figura 11. 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 nó cotiledonar de *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado cultivados *in vitro* por 30 (NC30), 60 (NC60) e 90 (NC) dias em meio Murashige & Skoog suplementado com 88,5 mM de sacarose, 2,5 mM de 2,4-D e 0,2% de Phytigel.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Boa parte dos componentes encontrado nas folhas atingiram *Loadings* 1 negativo e alguns em *Loadings* 2 positivo, como os metabólitos terpenos cicloartano glicosídeos e astragalosídeo II, o flavonóide isoschaftosídeo, o derivado da fosfocolina, os ácidos orgânicos ribônico e treônico, variando entre -0,1 e -0,3. Nas sementes os flavonoides O-metil-epicatequina, sabian e os compostos não identificados NI (2) e NI (3), atingiram valores de *Loadings* 1 menor que 0,1. Já os ácidos orgânicos e outros compostos detectados nas cascas de frutos ficaram com *Loadings* 2 positivo e *Loadings* 1 próximo de 0, enquanto para os calos, nos diferentes tempos de cultivo, os valores de *Loadings* 1 variando de -0,1 a 0,1 e *Loadings* 2 negativos.

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

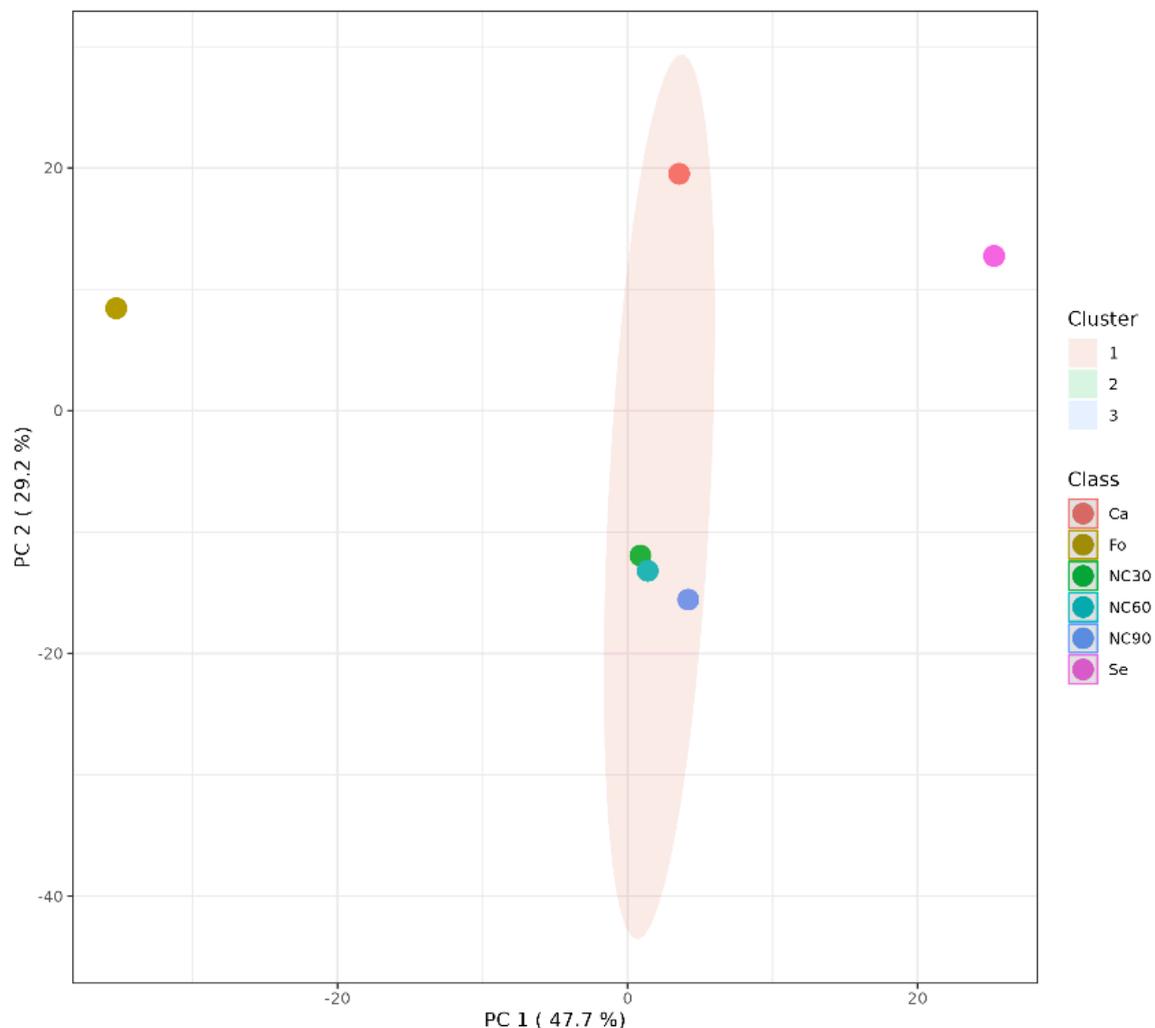
Uma forma de identificar grupos de amostras que apresentam uma medida ou característica principal em comum é através do algoritmo “K-means”. O método matemático tem como princípio o agrupamento de amostras a serem classificadas como similares, onde todas as intensidades de cada metabólito dentro do conjunto de amostras são utilizadas para calcular um valor referência.

A distância do valor de referência em relação aos valores encontrados em uma só amostra é utilizada para a construção dos *clusters*, ou agrupamentos. Amostras que possuem menor distância entre o valor referência e a natureza de metabólitos serão agrupadas dentro de um intervalo de confiança (IKOTUN *et al.*, 2023).

A Figura 12 apresenta o gráfico *K-means*, obtido pela análise de PCA das amostras de calos de nó cotiledonar 30 (NC30), 60 (NC60) e 90 (NC90) dias de cultivo analisadas em conjunto com as amostras de partes da planta folhas (Fo), cascas (Ca) e sementes (Se). A segregação do agrupamento se manteve para as amostras de calos nos diferentes tempos de cultivo (NC30, NC60 e NC90) e amostra de cascas (Ca), confirmando o resultado obtido para o conjunto de amostras descrito anteriormente.

A elipsoide colorida mostra que houve separação entre os grupos, indicando cascas e calos, em todos os tempos de cultivo em um grupo separado das folhas à esquerda e sementes à direita (GALLO, 2022).

Figura 12. 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 nó cotiledonar de *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado cultivados *in vitro* por 30 (NC30), 60 (NC60) e 90 (NC) dias em meio Murashige & Skoog suplementado com 88,5 mM de sacarose, 2,5 mM de 2,4-D e 0,2% de Phytigel.



Fonte: Elaborado pelo autor.

3.3.9 Análise estatística multivariada supervisionada pelo método PLS-DA

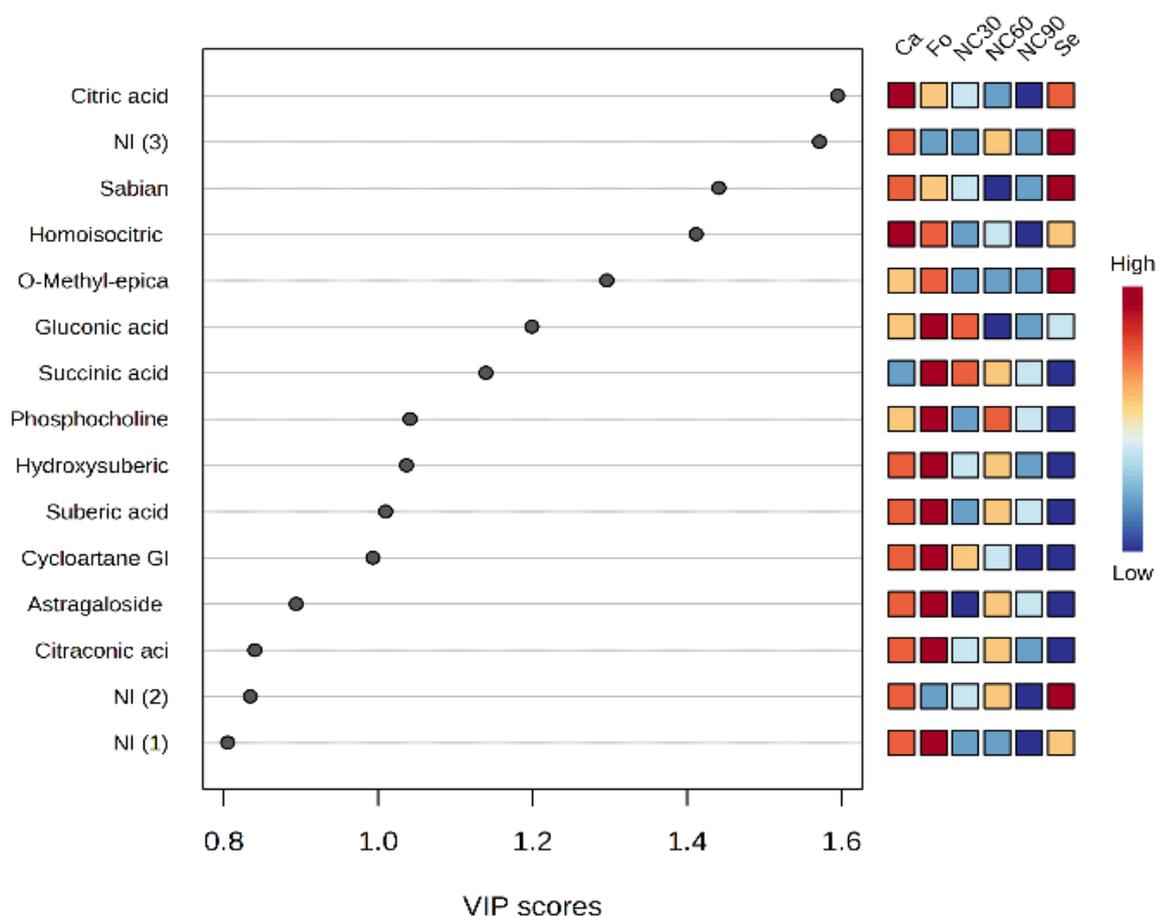
A análise discriminante por quadrados mínimos parciais (PLS-DA – *Partial Least Squares Discriminant Analysis*) é um método quimiométrico de classificação supervisionada de reconhecimento de padrões amplamente utilizado em química analítica (SANTANA *et al.* 2020). Nos métodos supervisionados as amostras com características conhecidas são utilizadas para construir modelos de classificação e esse modelo é utilizado para prever a classe de amostras desconhecidas.

A partir da análise PLS-DA das amostras de folhas, cascas, sementes e calos com perfis metabólitos conhecidos foi construído um modelo de classificação que permite prever o potencial de folhas, cascas, sementes e dos calos de nó cotiledonar em diferentes tempos de cultivo na produção dos vários tipos de metabólitos considerados relevantes pela análise que avaliou a importância da variável na projeção (VIP, Figura 13). Através do método PLS-DA foi possível, portanto, identificar metabólitos significativos, detectados através da correlação entre os materiais da planta, cascas de frutos, sementes e folhas com os calos de nó cotiledonares cultivados por 30, 60 e 90 dias (COCCHI; BIANCOLILLO; MARINI, 2018).

A Figura 13 mostra os metabólitos que foram significativos pela aplicação do modelo estatístico VIP (*variable importance in projection* ou variável de importância para a projeção) a partir da análise PLS-DA. O gráfico mostra no eixo Y os metabólitos e no eixo X representa os valores VIP dos metabólitos, que variou de 0,8 e 1,6, sendo considerados de maior importância os metabólitos com valor $VIP > 1,0$.

A escala de cores ao lado do gráfico da Figura 13 indica, para cada metabólito a concentração, a intensidade em cada material vegetal estudado, as cores da escala variam do azul escuro (baixa concentração) ao vermelho escuro (alta concentração). Os quadrados coloridos à direita do gráfico representam as concentrações relativas dos metabólitos nos diferentes materiais vegetais analisados em ordem decrescente de concentração estão as cores: vermelha > laranja > amarelo > azul claro > azul médio > azul escuro.

Figura 13. Importância da Variável na Projeção (VIP) scores de metabólitos detectados em extratos de folhas (fo), cascas (ca), sementes (se) e calos de nó cotiledonar de *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado nos tempos de cultivo de 30 (NC30), 60 (NC60) e 90 (NC90) dias em meio 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.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A partir dos resultados da Figura 13 foi possível elaborar a Tabela 8, que mostra os compostos classificados de acordo com a faixa de valores VIP. Os metabólitos selecionados como significativos e considerados de maior importância para a projeção foram os que apresentaram valores de $VIP > 1,0$ no eixo X.

O modelo de classificação construído a partir da análise PLS-DA das amostras de folhas, cascas, sementes e calos de nó cotiledonar de *P. setacea*, com características conhecidas, permitiu prever o potencial positivo dos calos de nó cotiledonar para produzir vários tipos de metabólitos com atividades biológicas importantes, considerados relevantes, pela análise que avaliou a IVP.

Tabela 8. Metabólitos de cascas, folhas, sementes e calos de nós cotiledonares de *P. setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado cultivados por 30, 60 e 90 dias em meio Murashige & Skoog suplementado com 88,5 mM de sacarose, 2,5 mM de 2,4-D e 0,2% de Phytigel classificados de acordo com os intervalos crescentes de valores VIP obtidos pela análise PLS-DA.

VIP scores	Metabólitos
Entre 0,8 e 1,0	NI (1), NI (2), ácido citracônico, astragalosídeo II (VIP 0.9)
Entre 1,0 e 1,2	Cicloartano glicosídeos, ácido subérico, ácido hidroxisubérico, fosfocolina, ácido succínico
Entre 1,2 e 1,4	Ácido glucurônico, O-metil-epicatequina
Entre 1,4 e 1,6	Ácido homoisocítrico, sabian, NI (3), ácido cítrico

Fonte: Elaborado pelo autor.

Na escala de VIP < 1,0 estão dois compostos não identificados. Entre todos os compostos detectados nessa faixa destaca-se o triterpeno astragalosídeo II, que apresentou valor VIP de 0,9 e que apresenta função estimulante do sistema imunológico, além de possível ação antiproliferativa de células cancerígenas (WAN *et al.* 2013). A barra de cores indica que na projeção esse metabólito foi mais alto nas amostras de folhas e decresceu em amostras de cascas (laranja) e de calos de nó cotiledonar de 60 dias de cultivo (amarelo). Nessa lista não aparece o metabólito flavonoide isoschaftosídeo identificado nos extratos de folhas.

Na faixa de valores VIP entre 1,0 e 1,2 destacaram-se o cicloartano e a fosfocolina. Na projeção o cicloartano glicosídeos aparece mais alto nas folhas (vermelho), seguido das cascas (laranja) e dos calos de nó cotiledonar de 30 dias (amarelo). A fosfocolina apareceu com intensidade maior nas folhas (vermelho) e na ordem decrescente nos calos de 60 dias (laranja), seguidos das cascas (amarelo).

Os metabólitos NI (3) e ácido cítrico de máxima relevância mostram valores VIP's próximo a 1,6 e maior que 1,6, respectivamente. Abaixo deles aparecem o ácido homoisocítrico e o flavonoide sabian (valores VIP's entre 1,4 e 1,6), seguidos do flavonoide O-metil-epicatequina e ácido glucônico (valores VIP's entre 1,2 e 1,4) e do ácido succínico (VIP ao redor de 1,2).

A O-metil-epicatequina, pela escala de cores, apareceu em maior concentração nas sementes, seguidas das folhas e cascas, reduzindo os níveis nos calos de nós cotiledonares em todos os períodos de cultivo. O flavonoide sabian, com propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (DENG *et al.*, 2005) apareceu na escala de cores em maior concentração nas sementes (vermelho) seguidas das cascas e folhas.

A análise da escala de cores da Figura 13 gerada pela análise IVP indica que as cascas contêm concentrações mais altas (vermelho) dos ácidos cítrico e homoisocítrico, as folhas contêm altas concentrações dos ácidos glucônico, succínico, fosfocolina, ácidos hidroxisubérico e subérico, cicloartano glicosídeos, ácido citracônico e NI (1) e as sementes apresentam altas concentrações de NI (3), sabian, O-metil-epicatequina e NI (2).

Entre os calos analisados, aqueles no tempo de cultivo de 30 dias (NC30) mostraram as concentrações mais altas de ácidos glucônico e succínico (laranja) e de cicloartano glicosídeos (amarelo); NC60 as maiores concentrações de NI (3), ácidos succínico, hidroxisubérico e subérico (amarelo), astragalosídeo II, ácido citracônico, NI (2) (amarelo) e fosfocolina (laranja); NC90 maiores concentrações de succínico, fosfocolina, subérico, astragalosídeo II (azul claro).

Considerando o tempo de cultivo dos calos houve uma maior concentração de ácido cítrico, em NC30 (azul claro); NI (3), em NC60 (amarelo); sabian, em NC30 (azul claro); ácido homoisocítrico, em NC60 (azul claro); O-metil-catequina, em NC30, NC60 e NC90 (azul médio); ácido glucônico, em NC30 (laranja); ácido succínico, em NC30 (laranja) e em NC60 (amarelo); fosfocolina; em NC60 (laranja); ácidos hidroxisubérico e subérico, em NC60 (amarelo); cicloartano glicosídeos, em NC30 (amarelo); astragalosídeo, II, ácido citracônico e NI (2), em NC60 (amarelo); NI (1), em NC30, NC60 (azul médio).

Através do modelo construído foi possível prever que a maioria dos compostos de maior relevância é produzida em períodos específicos do tempo de cultivo. Os calos de nó cotiledonar com 30 dias de cultivo foram superiores aos demais na produção de 5 tipos de compostos considerados relevantes pela análise VIP: o ácido cítrico, sabian, ácidos glucônico e succínico, cicloartano glicosídeos. Os calos com 60 dias de cultivo foram superiores aos demais na produção de 9 metabólitos relevantes: o NI (3), ácido homoisocítrico, O-metil-catequina, fosfocolina, ácidos hidroxisubérico e subérico, astragalosídeo II, ácido citracônico e NI (2). Os calos de 90 dias foram inferiores aos calos de 30 e 60 dias na produção de todos os compostos, mas ainda assim produziram, em níveis mais baixos, o ácido succínico, fosfocolina, ácido subérico e astragalosídeo II.

Esta previsão indica o tempo de cultivo de 30 dias como o melhor para a produção de sabian e do cicloartano glicosídeos. O cultivo de 60 dias é o tempo ideal para a produção de fosfocolina e astragalosídeo II. A O-metil-catequina é produzida no mesmo nível pelos calos de nó cotiledonar nos três tempos de cultivo.

Os metabólitos considerados de máxima relevância em calos de nó cotiledonar de *P. setacea* foram o ácido cítrico, com VIP de 1,6 e o flavonóide sabian, com VIP de 1,8. Por esse

modelo, diversos metabólitos não identificados nos perfis fitoquímicos foram categorizados como importantes pelos scores VIP, obtidos através da análise PLS-DA. Isso indica ser necessário viabilizar, em futuros experimentos, a obtenção de dados com maior qualidade espectral, através da preparação de novas amostras, com maiores quantidades de biomassa para a máxima extração de compostos de interesse.

4 CONCLUSÃO

O tempo de cultivo *in vitro* dos calos de nó cotiledonar de *Passiflora setacea* cv. BRS Pérola do Cerrado influenciou o crescimento dos calos e os perfis de metabólitos produzidos. A análise comparativa dos perfis dos calos, folhas, cascas e sementes indicou o potencial positivo dos calos cultivados *in vitro* para a produção de metabólitos bioativos. A análise PCA indicou o agrupamento por similaridade de perfis, de cascas e calos nos diferentes tempos de cultivo. A análise de projeção VIP (PLS-DA) possibilitou a previsão de produção pelos calos, de vários compostos de interesse, com atividade biológica, que não foram identificados na análise CLUE-ESI-EM, mas que foram detectados em folhas, cascas e sementes, indicando a necessidade de melhorar a qualidade espectral das amostras, através da utilização de maior quantidade de biomassa seca nos extratos e da otimização dos métodos de cultivo e de extração.

1-Em relação ao crescimento do cultivo *in vitro* dos calos de nó cotiledonar:

- O tempo de cultivo influenciou o crescimento dos calos.
- No tempo de cultivo de 30 dias foi obtida a maior massa seca, que não diferiu da massa seca de 60 dias, maior razão massa seca/massa fresca e menor teor água.
- O cultivo de 60 dias, apesar de apresentar menor razão massa fresca/massa seca do que o tempo de cultivo de 30 dias, apresentou incremento de massa seca em relação ao tempo de 90 dias.
- O cultivo de 90 dias apresentou massa seca muito baixa e sinais de senescência celular, diminuição da massa seca e aumento do teor de água.

2-Em relação aos perfis químicos de extratos de calos cultivados por 30, 60 e 90 dias:

- O tempo de cultivo influenciou os perfis de metabólitos dos calos, tanto o número total de metabólitos produzidos pelos calos, que decresceu com o decorrer do tempo de cultivo, como a diversidade dos compostos produzidos.

- Em NC30 ocorreu a maior diversidade de compostos detectados (7), principalmente ácidos orgânicos, alguns com ações terapêuticas, antioxidantes ou precursores de metabólitos de interesse das indústrias farmacêuticas;
- Em NC60 foram detectados 4 compostos, todos ácidos orgânicos e presentes em NC30, e também demonstram potencial na produção de metabólitos importantes de interesse de mercado;
- Em NC90 apenas 3 compostos foram detectados, todos presentes em NC30, mas um deles não está presente em NC60, inferindo que o cultivo *in vitro* em maior tempo pode gerar compostos diferentes;

3- Em relação aos perfis químicos de extratos de folhas, cascas e sementes:

- O perfil de metabólitos do extrato de folhas apresentou maior diversidade de compostos em relação aos perfis de cascas e de sementes.
- Vários dos compostos produzidos por esses materiais vegetais apresentam atividades biológicas com ações terapêuticas comprovadas, principalmente flavonoides e os triterpenos.

4- Em relação à comparação entre os perfis metabólicos de extratos de calos, folhas, cascas e sementes:

- A comparação entre os perfis de metabólitos dos calos de nó cotiledonar cultivados *in vitro* com os materiais produzidos *in vivo* de folhas, cascas e sementes indicou potencial positivo dos calos para a produção de metabólitos detectados nos materiais vegetais produzidos *in vivo*.
- A análise estatística multivariada não supervisionada de componentes principais (PCA) indicou o agrupamento do calos dos três tempos de cultivo e cascas em um único grupo de similaridade.
- Algoritmo K-means confirmou o agrupamento por similaridade observado pela análise PCA dos calos nos três tempos de cultivo com as cascas.

5- Em relação à análise de Importância da Variável na Projeção (IVP):

- A análise discriminante por quadrados mínimos parciais (PLS-DA) indicou pela aplicação do modelo variável de importância na projeção (VIP) a detecção de metabólitos significativos contendo atividades biológicas, com ações terapêuticas comprovadas, em calos de nó cotiledonar como ácido cítrico (VIP de 1,6) e o flavonoide sabian (VIP de 1,5). Outros metabólitos, indicados como significativos com $VIP > 1,0$ ou próximos de 1,0 e com atividades biológicas foram o flavonoide O-metil-epicatequina, e os triterpenos cicloartano glicosídeos e o astragalosídeo II.
- A partir da análise VIP foi possível prever para NC30 a produção consistente de ácido glucônico, ácido succínico e cicloartano glicosídeos;
- NC60 teve projeção consistente para a formação de NI (3), fosfocolina, ácido succínico, ácidos hidroxissubérico e subérico, astragalosídeo II, ácido citracônico e NI(2).
- NC90 teve projeção sutil para ácido succínico, fosfocolina, , ácido hidroxissubérico e astragalosídeo II.
- Casca mostrou a máxima intensidade na projeção para a produção dos ácidos cítrico e homoisocítrico
- Folhas apresentou máxima intensidade na projeção para ácidos glucônico e ácido succínico, fosfocolina, ácidos hidroxissubérico e subérico, cicloartano glicosídeos, astragalosídeo II e ácido citracônico e NI (1).
- Sementes mostraram a máxima intensidade para NI (3), sabian, ácido glucônico e NI (2).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVA FUTURA

O potencial desses calos para a produção de metabólitos secundário, que são produzidos também por folhas, cascas e sementes, ficou evidente, tanto através das análises dos compostos que foram identificados nos perfis químicos, como pela análise de projeção VIP que podem ser delineados para experimentos futuros, desde que a qualidade espectral das amostras seja melhorada ou otimizada.

Com base no presente estudo, foi possível a contribuição para a otimização da metodologia de análise fitoquímica para projetos futuros. Aumentar a quantidade amostral da massa seca e a concentração dos extratos que são utilizados na análise por CLUE-ESI-EM certamente facilitará a identificação de um número maior de compostos por amostra, assim como a concentração de cada um desses compostos, possibilitando identificar muitos dos compostos que aparecem na análise de projeção com VIP significativos, mas que constam como não identificados (NI) nos perfis fitoquímicos. Análises metabolômicos dos calos em tempos de cultivo intermediários, como 15 e 45 dias, podem também fornecer informações relevantes e complementares sobre a dinâmica do metabolismo de biossíntese de compostos químicos proveniente dos calos.

Outra estratégia importante a ser adotada é otimizar a metodologia de extração dos compostos, através da maceração mais eficiente e da utilização de diferentes solventes no processo de extração, como metanol ou etil acetato. A utilização de elicitores bióticos e abióticos nas culturas de calos de nó cotiledonar pode ser outra estratégia a ser testada para ativar as vias de biossíntese dos compostos de interesse além da utilização de outros reguladores de crescimento no meio de cultura.

REFERÊNCIAS

- ABE, Lucile Tiemi *et al.* Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca* L. e *Vitis vinifera* L. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, [S.L.], v. 27, n. 2, p. 394-400, jun. 2007. FapUNIFESP (SciELO).
<http://dx.doi.org/10.1590/s0101-20612007000200032>.
 Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cta/a/Mw4SJmqGKCSfD6dJDbhDst/?lang=pt>.
 Acesso em: 12 jul. 2024.
- ABDULHAFIZ, Ferid *et al.* Plant cell culture technologies: a promising alternatives to produce high-value secondary metabolites. **Arabian Journal Of Chemistry**, [S.L.], v. 15, n. 11, p. 104161, nov. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2022.104161>.
 Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878535222004774>.
 Acesso em: 25 jul. 2024.
- ABOURASHED, Ehab A.; VANDERPLANK, John R.; KHAN, Ikhlas A.. High-Speed Extraction and HPLC Fingerprinting of Medicinal Plants – I. Application to Passiflora Flavonoids. **Pharmaceutical Biology**, [S.L.], v. 40, n. 2, p. 81-91, jan. 2002. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1076/phbi.40.2.81.5844>. Disponível em:
<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1076/phbi.40.2.81.5844>. Acesso em: 07 jul. 2024.
- ADOMËNIENË, Aušra *et al.* Health Beneficial Phytochemicals in Dioscorea caucasica Lipsky Leaves and Tubers and Their Inhibitory Effects on Physiologically Important Enzymes. **Plants**, [S.L.], v. 11, n. 10, p. 1341, 18 maio 2022. MDPI AG.
<http://dx.doi.org/10.3390/plants11101341>. Disponível em:
<https://www.mdpi.com/2223-7747/11/10/1341>. Acesso em: 2 fev. 2024.
- ÁLVAREZ, María Victoria *et al.* Exploring feasible sources for lutein production: food by-products and supercritical fluid extraction, a reasonable combination. **Phytochemistry Reviews**, [S.L.], v. 14, n. 6, p. 891-897, 29 ago. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <https://dx.doi.org/10.1007/s11101-015-9434-0>. Disponível em:
<https://link.springer.com/article/10.1007/s11101-015-9434-0>. Acesso em: 10 out. 2023.
- ANDRADE, Solange Rocha Monteiro de. Princípios da Cultura de Tecidos Vegetais. **Embrapa Documentos**, Planaltina, v. 58, n. 0, p. 1-16, dez. 2002.
 Disponível em:
[https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CPAC-2009/24719/1/doc_58.pdf#page=13&z](https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CPAC-2009/24719/1/doc_58.pdf#page=13&zoom=100,0,0)
[oom=100,0,0](https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CPAC-2009/24719/1/doc_58.pdf#page=13&zoom=100,0,0). Acesso em: 27 fev. 2024.
- ARAUJO, Leticia da Silva *et al.* BA and TDZ in the Morphogenesis *in vitro* of Passiflora Setacea. **Research Square**, [S.L.], 4 jan. 2022. Research Square Platform LLC.
<http://dx.doi.org/10.21203/rs.3.rs-747944/v1>. Disponível em:
<https://www.researchsquare.com/article/rs-747944/v1>. Acesso em: 27 mar. 2024.
- ARAUJO, Marlon H. de *et al.* Biological activities and phytochemical profile of Passiflora mucronata from the Brazilian restinga. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [S.L.], v. 27, n. 6, p. 702-710, nov. 2017. Springer Science and Business Media LLC.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bjp.2017.07.005>.
 Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbfar/a/T6Cc3mh6RJCRHkhXNwXbv7L/?lang=en#>.
 Acesso em: 10 jul. 2024.

BAKAR, Rula Bany *et al.* The intestine as an endocrine organ and the role of gut hormones in metabolic regulation. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, Cambridge, v. 20, n. 12, p. 784-796, 25 ago. 2023. Springer Science and Business Media LLC.

<http://dx.doi.org/10.1038/s41575-023-00830-y>. Disponível em:

<https://www.nature.com/articles/s41575-023-00830-y#citeas>. Acesso em: 10 jul. 2024.

BENDINI, Alessandra *et al.* Phenol content related to antioxidant and antimicrobial activities of Passiflora spp. extracts. **European Food Research And Technology**, [S.L.], v. 223, n. 1, p. 102-109, 30 dez. 2005. Springer Science and Business Media LLC.

<http://dx.doi.org/10.1007/s00217-005-0150-7>.

Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00217-005-0150-7>.

Acesso em: 8 jul. 2024.

BOMTEMPO, Larissa L. *et al.* Bioactive amines in Passiflora are affected by species and fruit development. **Food Research International**, [S.L.], v. 89, p. 733-738, nov. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2016.09.028>. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996916304197>.

Acesso em: 25 jul. 2024.

BRUNETTA, Margarido Fonseca Couto *et al.* Calogênese *in vitro* em segmentos de epicótilo de mogno (*Swietenia macrophylla* King) com o uso de 6-benzilaminopurina e ácido α -naftalenoacético. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 71, p. 19-24, 2006. Disponível em:

<https://www.ipef.br/publicacoes/scientia/nr71/cap02.pdf>. Acesso em: 25 mai 2024

CANTERI, Maria H. G. *et al.* Pectina: da matéria-prima ao produto final. **Polímeros**, [S.L.], v. 22, n. 2, p. 149-157, 10 abr. 2012. FapUNIFESP (SciELO).

<http://dx.doi.org/10.1590/s0104-14282012005000024>. Disponível em:

<https://www.scielo.br/j/po/a/xFQbJ6HR3QrCpL6dT9PbVrz/#>. Acesso em: 5 jul. 2024.

CARMO, Mônica Cristina Lopes do *et al.* Passion fruit (*Passiflora edulis*) leaf aqueous extract ameliorates intestinal epithelial barrier dysfunction and reverts inflammatory parameters in Caco-2 cells monolayer. **Food Research International**, [S.L.], v. 133, p. 109162, jul. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109162>.

Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996920301873>.

Acesso em: 12 jul. 2024.

CARVALHO, Mariana Veras Oliveira de; OLIVEIRA, Lívia de Lacerda de; COSTA, Ana Maria. Effect of training system and climate conditions on phytochemicals of *Passiflora setacea*, a wild *Passiflora* from Brazilian savannah. **Food Chemistry**, [S.L.], v. 266, p. 350-358, nov. 2018. Elsevier BV. <https://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.05.097>.

Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814618309105?via%3Dihub>.

Acesso em: 28 ago. 2023.

CARVALHO, Paula Pinheiro de. **Organogênese *in vitro* de Passiflora alata Curtis e Passiflora miniata Master - Passifloraceae**. 2016. 102 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, Universidade do Estado de Mato Grosso, Tangará da Serra, 2016.

Disponível em: http://portal.unemat.br/media/files/Dissertacao_Paula%20Pinheiro.pdf.

Acesso em: 11 jul. 2024.

CAZARIN, Cinthia Baú Betim *et al.* Intestinal anti-inflammatory effects of *Passiflora edulis* peel in the dextran sodium sulphate model of mouse colitis. **Journal Of Functional Foods**, [S.L.], v. 26, p. 565-576, out. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2016.08.020>.

Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1756464616302328>.

Acesso em: 12 jul. 2024.

CECHINEL FILHO, Valdir; YUNES, Rosendo A.. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, [S.L.], v. 21, n. 1, p. 99-105, fev. 1998. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40421998000100015>.

Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/gTt6RMzGksWHZ83mxPDXxCs/>.

Acesso em: 10 ago. 2023.

CHANDRAN, Hema; MEENA, Mukesh; BARUPAL, Tansukh; SHARMA, Kanika. Plant tissue culture as a perpetual source for production of industrially important bioactive compounds. **Biotechnology Reports**, [S.L.], v. 26, p. 00450, jun. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00450>.

Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2215017X20300060>.

Acesso em: 25 jul. 2024.

CHEN, Le *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**, [S.L.], v. 319, p. 117364, jan. 2024. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2023.117364>.

Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378874123012345>.

Acesso em: 7 jul. 2024.

CHUA, Lee Suan *et al.* Potential of natural bioactive C-glycosyl flavones for antidiabetic properties. **Bioactive Natural Products**, [S.L.], v. 64, n. 0, p. 241-261, 2020. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-817903-1.00008-5>.

Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780128179031000085>.

Acesso em: 9 jul. 2024.

COCCHI, Marina; BIANCOLILLO, Alessandra; MARINI, Federico. Chemometric Methods for Classification and Feature Selection. **Comprehensive Analytical Chemistry**, [S.L.], v. 82, p. 265-299, 2018. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/bs.coac.2018.08.006>.

Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0166526X18300771>.

Acesso em: 7 jul. 2024.

COSTA, Ana Maria; MORAIS, Kelvin Luiz de; SANTOS, Fabrício Espíndola dos. Influência do tipo de condução na produção e características físico-química do maracujá silvestre brs pérola do cerrado (*Passiflora setacea*). In: Congresso brasileiro de fruticultura, 13., 2014, Cuiabá. **Anais [...]**. Sp: **Embrapa Cerrados**, 2014. p. 1-4. Disponível em: <https://www.bdpa.cnptia.embrapa.br/consulta/busca?b=pc&id=1013894&biblioteca=vazio&busca=1013894&qFacets=1013894&sort=&paginacao=t&paginaAtual=1>. Acesso em: 12 out. 2023.

COSTA, Ana Maria *et al.* Produção de Mudas de Maracujazeiro Silvestre (*Passiflora setacea*). **Embrapa Cerrados**, Planaltina, v. 176, n. 0, p. 1-6, jun. 2015. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1033191/producao-de-mudas-de-maracujazeiro-silvestre-passiflora-setacea>. Acesso em: 11 out. 2023.

DENG, Yun *et al.* Sabian, a novel flavonoid from *Sabia yunnanensis*. **Journal Of Asian Natural Products Research**, [S.L.], v. 7, n. 5, p. 741-745, 1 out. 2005. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/1028602042000325573>. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/1028602042000325573>. Acesso em: 7 jul. 2024.

DHAWAN, Kamaldeep; DHAWAN, Sanju; SHARMA, Anupam. *Passiflora*: a review update. **Journal Of Ethnopharmacology**, [S.L.], v. 94, n. 1, p. 1-23, set. 2004. Elsevier BV. <https://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2004.02.023>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378874104000856?via%3Dihub>. Acesso em: 10 out. 2023.

DUTRA, Livia Macedo *et al.* ¹H NMR-based metabolic profile and chemometric analysis for the discrimination of *Passiflora* species genotypic variations. **Food Research International**, [S.L.], v. 164, p. 112441, fev. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2022.112441>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0963996922014995>. Acesso em: 24 jul. 2024.

EL-AKAD, Radwa *et al.* How Does *Lagenaria siceraria* (Bottle Gourd) Metabolome Compare to *Cucumis sativus* (Cucumber) F. Cucurbitaceae? A Multiplex Approach of HR-UPLC/MS/MS and GC/MS Using Molecular Networking and Chemometrics. **Foods**, [S.L.], v. 12, n. 4, p. 771, 10 fev. 2023. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/foods12040771>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2304-8158/12/4/771>. Acesso em: 3 fev. 2024.

ENGELMANN, Nancy J. *et al.* Screening and Selection of High Carotenoid Producing *in vitro* Tomato Cell Culture Lines for [¹³C]-Carotenoid Production. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [S.L.], v. 58, n. 18, p. 9979-9987, 23 ago. 2010. American Chemical Society (ACS). <https://dx.doi.org/10.1021/jf101942x>. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf101942x>. Acesso em: 12 out. 2023

FREIRE, Marco Aurelio M. *et al.* Papéis do terpenóide Astragalosídeo IV em estados alterados do sistema nervoso: uma revisão atualizada. **Research, Society And Development**, [S.L.], v. 11, n. 6, p. 1-15, 22 abr. 2022. Research, Society and Development. <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i6.28861>. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/28861>. Acesso em: 12 jul. 2024.

FONSECA, Letícia Clara Formolo. **Efeitos de diferentes elicitores na produção de compostos fenólicos e atividade antioxidante em culturas celulares de Passiflora setacea (PASSIFLORACEAE)**. 2019. 188 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Biológicas, Departamento de Botânica, Ufsc, Florianópolis, 2019. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/215058>. Acesso em: 20 ago. 2023.

GADIOLI, Izabel Lucena *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**, [S.L.], v. 58, n. 5, p. 785-807, 28 jun. 2017. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2016.1224805>. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408398.2016.1224805>. Acesso em: 10 jul. 2024.

GADIOLI, Izabel Lucena. **Obtenção, caracterização química, propriedades antioxidantes e antimicrobianas de extratos de polpas, sementes e folhas de passifloras silvestres para formulação de nanoemulsões**. (Dissertação de doutorado) Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana, UnB, Brasília, DF. p.136. 2017. Disponível em: <http://repositorio.unb.br> Acesso em: 10 jul. 2024.

GALLO, Margareth B C. Metaboanalyst step-by-step. **Unpublished**, [S.L.], v. 1, n. 1, p. 1-109, 2022. Unpublished. <http://dx.doi.org/10.13140/RG.2.2.20578.81609>. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/362469660_Metaboanalyst_step-by-step. Acesso em: 5 jul. 2024.

GAO, Yang *et al.* Antioxidative defense system differences among four plants under combined Pb and Cd stress. **Chinese Journal Of Eco-Agriculture**, [S.L.], v. 18, n. 4, p. 836-842, 20 jul. 2010. China Science Publishing & Media Ltd.. <http://dx.doi.org/10.3724/sp.j.1011.2010.00836>. Disponível em: <http://www.ecoagri.ac.cn/en/article/doi/10.3724/SP.J.1011.2010.00836>. Acesso em: 12 jul. 2024.

GAO, Yi-Ling *et al.* Molecular networking as a dereplication strategy for monitoring metabolites of natural product treated cancer cells. **Rapid Communications In Mass Spectrometry**, [S.L.], v. 34, n. 1, abril. 2020. [Http://dx.doi.org/10.1002/rcm.8549](http://dx.doi.org/10.1002/rcm.8549). Disponível em: <https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/rcm.8549>. Acesso em: 03 maio 2024.

GOMES, Anne Caroline Candido *et al.* *In vitro* effect of isoschaftoside isolated from *Syngonium podophyllum* on pig kidney Na⁺, K⁺-ATPASE. **Química Nova**, [S.L.], v. 37, n. 10, p. 1606-1609, set. 2014. GN1 Sistemas e Publicacoes Ltd.. <http://dx.doi.org/10.5935/0100-4042.20140257>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/MfmdNpBWTPQQsMQgW4q4sfJ/?lang=en#>. Acesso em: 08 jul. 2024.

GOMES, Silvana V.F. *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**, [S.L.], v. 132, p. 28-35, maio 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2016.12.021>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0026265X16304441>. Acesso em: 12 jul. 2024.

GOMEZ, Kwanchai A.; GOMEZ, Arturo A.. **Statistical procedures for agricultural research**. 2. ed. Nova York: John Wiley And Sons, 1984. 680 p. Disponível em:

https://pdf.usaid.gov/pdf_docs/pnaar208.pdf. Acesso em: 05 out. 2023.

HAMMER, Øyvind; HARPER, David A.T.; RYAN, Paul D.. PAST: PALEONTOLOGICAL STATISTICS SOFTWARE PACKAGE FOR EDUCATION AND DATA ANALYSIS.

Palaeontologia Electronica, [s. l], v. 4, n. 1, p. 1-9, maio 2001. Disponível em:

https://palaeo-electronica.org/2001_1/past/past.pdf. Acesso em: 25 ago. 2023.

HE, Miao *et al.* A review on the pharmacological effects of vitexin and isovitexin.

Fitoterapia, [S.L.], v. 115, p. 74-85, dez. 2016. Elsevier BV.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2016.09.011>.

Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0367326X16304488>.

Acesso em: 12 jul. 2024.

HILDEBRANDT, Tatjana M. *et al.* Amino Acid Catabolism in Plants. **Molecular Plant**,

[S.L.], v. 8, n. 11, p. 1563-1579, nov. 2015. Elsevier BV.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.molp.2015.09.005>.

Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26384576/>.

Acesso em: 10 jul. 2024.

HOLANDA, Dayse Karine Rodrigues *et al.* Garlic passion fruit (*Passiflora tenuifila* Killip):

assessment of eventual acute toxicity, anxiolytic, sedative, and anticonvulsant effects using in

vivo assays. **Food Research International**, [S.L.], v. 128, p. 108813, fev. 2020. Elsevier BV.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108813>.

Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0963996919306994>.

Acesso em: 5 jul. 2024.

HOOPER, Antony M. *et al.* Isoschaftoside, a C-glycosylflavonoid from *Desmodium uncinatum* root exudate, is an allelochemical against the development of *Striga*.

Phytochemistry, [S.L.], v. 71, n. 8-9, p. 904-908, jun. 2010. Elsevier BV.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2010.02.015>.

Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0031942210000592>.

Acesso em: 10 jul. 2024.

IKOTUN, Abiodun M. *et al.* K-means clustering algorithms: a comprehensive review, variants analysis, and advances in the era of big data. **Information Sciences**, [S.L.], v. 622, p.

178-210, abr. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ins.2022.11.139>. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0020025522014633>. Acesso em: 7 jul.

2024.

ISHIKAWA, Takahiro; DOWDLE, John; SMIRNOFF, Nicholas. Progress in manipulating ascorbic acid biosynthesis and accumulation in plants. **Physiologia Plantarum**, [S.L.], v. 126,

n. 3, p. 343-355, 24 fev. 2006. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-3054.2006.00640.x>.

Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1399-3054.2006.00640.x>.

Acesso em: 12 jul. 2024.

IWANAMI, Y. Stimulation of pollen tube growth *in vitro* by dicarboxylic acids. **Protoplasma**, [S.L.], v. 102, n. 1-2, p. 111-115, mar. 1980. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/bf01276951>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF01276951>. Acesso em: 3 fev. 2024.

JAFARI, Marziyeh; DANESHVAR, Mohammad Hosein. Machine learning-mediated *Passiflora caerulea* callogenesis optimization. **Plos One**, [S.L.], v. 19, n. 1, 24 jan. 2024. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0292359>. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0292359>. Acesso em: 27 mar. 2024.

KANG, Wesuk *et al.* Activation of OR10A3 by Suberic Acid Promotes Collagen Synthesis in UVB-Irradiated Dermal Fibroblasts via the cAMP-Akt Pathway. **Cells**, [S.L.], v. 11, n. 24, p. 3961, 7 dez. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/cells11243961>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4409/11/24/3961>. Acesso em: 7 jul. 2024.

KANG, Zhiyu *et al.* Comparative metabolomic profiling in the roots and leaves in contrasting genotypes reveals complex mechanisms involved in post-anthesis drought tolerance in wheat. **Plos One**, [S.L.], v. 14, n. 3, p. 1-25, 11 mar. 2019. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0213502>. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0213502>. Acesso em: 2 fev. 2024.

KHATUN, Mosammad Rima *et al.* Insight into citric acid-induced chromium detoxification in rice (*Oryza sativa*. L). **International Journal Of Phytoremediation**, [S.L.], v. 21, n. 12, p. 1234-1240, 31 maio 2019. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/15226514.2019.1619162>. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/15226514.2019.1619162>. Acesso em: 7 jul. 2024.

KLIMEK-SZCZYKUTOWICZ, Marta *et al.* Impacts of elicitors on metabolite production and on antioxidant potential and tyrosinase inhibition in watercress microshoot cultures. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [S.L.], v. 106, n. 2, p. 619-633, jan. 2022. Springer Science and Business Media LLC. <https://dx.doi.org/10.1007/s00253-021-11743-8>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-021-11743-8>. Acesso em: 10 out. 2023.

KO, Mihee *et al.* Phosphatidylcholine protects neurons from toxic effects of amyloid β -protein in culture. **Brain Research**, [S.L.], v. 1642, p. 376-383, jul. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2016.04.035>. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0006899316302517?utm_source=blog&utm_medium=link&utm_campaign=externo&utm_term=estudo&utm_content=fosfatidilcolina. Acesso em: 7 jul. 2024.

KRINSKY, N. I. The biological properties of carotenoids. **Pure And Applied Chemistry**, [S.L.], v. 66, n. 5, p. 1003-1010, 1 jan. 1994. Walter de Gruyter GmbH. <https://dx.doi.org/10.1351/pac199466051003>. Disponível em: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1351/pac199466051003/html>. Acesso em: 29 ago. 2023.

KUMAR, Rajesh *et al.* Detoxification and Tolerance of Heavy Metals in Plants. **Plant Metal Interaction**, [S.L.], p. 335-359, 2016. Elsevier.
<http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-803158-2.00013-8>.
Disponível em: [sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780128031582000138](https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780128031582000138).
Acesso em: 12 jul. 2024.

LEAL, Ana Ediléia Barbosa Pereira *et al.* Determination of phenolic compounds, *in vitro* antioxidant activity and characterization of secondary metabolites in different parts of *Passiflora cincinnata* by HPLC-DAD-MS/MS analysis. **Natural Product Research**, [S.L.], v. 34, n. 7, p. 995-1001, 25 dez. 2018. Informa UK Limited.
<http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2018.1548445>.
Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/14786419.2018.1548445>.
Acesso em: 10 jul. 2024.

LI, Meiqi *et al.* Exploring the phytochemicals and inhibitory effects against α -glucosidase and dipeptidyl peptidase-IV in Chinese pickled chili pepper: insights into mechanisms by molecular docking analysis. **Lwt**, [S.L.], v. 162, n. 0, p. 113467-113477, jun. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113467>.
Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643822004029>.
Acesso em: 8 jul. 2024.

LIU, Caiyue *et al.* Untargeted UHPLC-MS Metabolomics Reveals the Metabolic Perturbations of *Helicoverpa armigera* under the Stress of Novel Insect Growth Regulator ZQ-8. **Agronomy**, [S.L.], v. 13, n. 5, p. 1315, 8 maio 2023. MDPI AG.
<http://dx.doi.org/10.3390/agronomy13051315>.
Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4395/13/5/1315>. Acesso em: 2 fev. 2024.

LOEWUS, F. Biosynthesis and metabolism of ascorbic acid in plants and of analogs of ascorbic acid in fungi. **Phytochemistry**, [S.L.], v. 52, n. 2, p. 193-210, set. 1999. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0031942299001454>. Acesso em: 08 jul. 2024.

LORENZI, Harri *et al.* **Frutas Brasileiras e Exóticas Cultivadas (de consumo in natura)**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2006. 640 p., Disponível em: Acervo Pessoal

MA, Gang *et al.* Blue LED light induces greening in the flavedo of Valencia orange *in vitro*. **Food Chemistry**, [S.L.], v. 335, p. 127621, jan. 2021. Elsevier BV.
<https://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127621>. Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814620314837?via%3Dihub>.
Acesso em: 12 out. 2023.

MA, Xia Q. *et al.* Chemical Analysis of Radix Astragali (Huangqi) in China: a comparison with its adulterants and seasonal variations. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [S.L.], v. 50, n. 17, p. 4861-4866, 16 jul. 2002. American Chemical Society (ACS).
<http://dx.doi.org/10.1021/jf0202279>. Disponível em:
<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf0202279>. Acesso em: 2 fev. 2024.

MÄDER, Geraldo *et al.* Novas ocorrências e distribuição do gênero *Passiflora* L. no Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 7, n. 4, p. 364-367, 15 out. 2009. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/1192>. Acesso em: 15 jul. 2024.

MERTINS, Omar. **Desenvolvimento e caracterização de nanovesículas lipossômicas compósitas de fosfatidilcolina da lecitina de soja e quitosana**. 2004. 77 f. Dissertação (Doutorado) - Curso de Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004. Disponível em: <https://lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/5100/000420653.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 15 jul. 2024.

MONTAGNER, Daiane Fiuza. **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)**. 2018. 256 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Biológicas, Centro de Ciências Biológicas, Ufsc, Florianópolis, 2018. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/205901>. Acesso em: 05 out. 2023.

MORAIS, Damila R. *et al.* Antioxidant activity, phenolics and UPLC–ESI(–)–MS of extracts from different tropical fruits parts and processed peels. **Food Research International**, [S.L.], v. 77, p. 392-399, nov. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2015.08.036>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0963996915301708>. Acesso em: 8 jul. 2024.

NUNES, Teonildes Sacramento; QUEIROZ, Luciano Paganucci de. Flora da Bahia: passifloraceae. **Sitientibus Série Ciências Biológicas**, [S.L.], v. 6, n. 3, p. 194-226, 1 out. 2006. Universidade Estadual de Feira de Santana. <https://dx.doi.org/10.13102/scb8177>. Disponível em: <https://periodicos.uefs.br/index.php/sitientibusBiologia/article/view/8177>. Acesso em: 22 out. 2023.

OLIVEIRA, Jamile da Silva; FALEIRO, Fabio Gelape; JUNQUEIRA, Nilton Tadeu Vilela. Importância dos maracujás (*Passiflora* L. spp.) e seu uso comercial. **Revista Rg News**, Brasília, v. 3, n. 3, p. 72-81, out. 2017. Disponível em: <https://www.recurso geneticos.org/revista/revista-rg-news>. Acesso em: 05 nov. 2023.

OLIVEIRA, Livia de Lacerda de *et al.* Shelf life and retention of bioactive compounds in storage of pasteurized *Passiflora setacea* pulp, an exotic fruit from Brazilian savannah. **Lwt**, [S.L.], v. 159, p. 113202, abr. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113202>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643822001372?via%3Dihub>. Acesso em: 24 jul. 2024.

OLIVEIRA, Victória Ellen de. **Perfis de metabólitos de extratos de folhas, pericarpos, sementes e culturas *in vitro* de calos de cotilédones de passiflora setacea var. brs pérola do cerrado (PASSIFLORACEAE)**. 2024. 78 f. TCC (Graduação) - Curso de Ciências Biológicas, Ufsc, Florianópolis, 2024. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/7433>.

ORTIZ-ESPÍN, Ana *et al.* The Role of Ascorbate in Plant Growth and Development. **Ascorbic Acid In Plant Growth, Development And Stress Tolerance**, [S.L.], p. 25-45, 2017. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-74057-7_2. Acesso em: 08 jul. 2024.

PÁDUA, Juliano Gomes *et al.* Germinação de sementes de Passiflora setacea e dormência induzida pelo armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, [S.L.], v. 33, n. 1, p. 80-85, 2011. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0101-31222011000100009>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbs/a/3XdGS4kByf7QdXjQW5W99st/abstract/?lang=pt#>. Acesso em: 01 abr. 2024.

PANG, Zhiqiang *et al.* MetaboAnalyst 5.0: narrowing the gap between raw spectra and functional insights. **Nucleic Acids Research**, [S.L.], v. 49, n. 1, p. 388-396, 21 maio 2021. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkab382>. Disponível em: <https://academic.oup.com/nar/article/49/W1/W388/6279832>. Acesso em: 03 maio 2024.

PAULA, Regina Cassia Mattos de *et al.* Volatile compounds in passion fruit seed oil (passiflora setacea brs perola do cerrado and passiflora alata brs doce mel). **Chemical Engineering Transactions**, [S.L.], v. 44, p. 103-108, 2015. AIDIC: Italian Association of Chemical Engineering. <http://dx.doi.org/10.3303/CET1544018>. Disponível em: aidic.it/cet/15/44/018.pdf. Acesso em: 10 jul. 2024.

PEDRO, Bernardo *et al.* Undaria pinnatifida (U. pinnatifida) bioactivity: antioxidant, gastro-intestinal motility, cholesterol biosynthesis and liver cell lines proteome. **Journal Of Functional Foods**, [S.L.], v. 83, p. 104567, ago. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2021.104567>. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2021.104567>. Acesso em: 4 fev. 2024.

PERERA, Wilmer H. *et al.* Anti-Inflammatory, Antidiabetic Properties and In Silico Modeling of Cucurbitane-Type Triterpene Glycosides from Fruits of an Indian Cultivar of Momordica charantia L. **Molecules**, [S.L.], v. 26, n. 4, p. 1038, 16 fev. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules26041038>. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules26041038>. Acesso em: 4 fev. 2024.

PÉREZ-ALONSO, Naivy; JIMÉNEZ, Elio. Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo *in vitro*. **Reseña Científica**, Santa Clara, v. 11, n. 4, p. 195-211, dez. 2011. Disponível em: <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/255/837>. Acesso em: 24 ago. 2023.

PINTO, Paloma Lira. **Extração e separação de flavonóides do extrato da casca do maracujá**. 2018. 58 f. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2018. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/1103422>. Acesso em: 12 jul. 2024.

PIRES, Gabriela Tavares. **Germinação e crescimento *in vitro* e aclimatização de famílias de maracujazeiro oriundas da seleção recorrente para resistência ao cowpea aphid-borne mosaic virus**. 2022. 77 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Genética e Melhoramento de Plantas, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Uenf, Campos dos Goytacazes, 2022. Disponível em: <https://pgmp.uenf.br/wp-content/uploads/2022/06/Tese-MS-Gabriela-Tavares-Pires-assinada.pdf>. Acesso em: 01 abr. 2024.

PRADI, Lucas *et al.* The Antinociceptive Effect of a Hydroalcoholic Extract of *Polygala altomontana* and Its Chemical Profile Using UPLC-ESI-QTOF-HR-MS. **Chemistry & Biodiversity**, [S.L.], v. 20, n. 1, jan. 2023. <https://doi.org/10.1002/cbdv.202200715> Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cbdv.202200715>. Acesso em: 03 maio 2024.

QIAN, Lisheng *et al.* A Glucuronic Acid-Producing Endophyte *Pseudomonas* sp. MCS15 Reduces Cadmium Uptake in Rice by Inhibition of Ethylene Biosynthesis. **Frontiers In Plant Science**, [S.L.], v. 13, p. 1-13, 14 abr. 2022. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2022.876545>. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/plant-science/articles/10.3389/fpls.2022.876545/full>. Acesso em: 5 fev. 2024.

QUIAN-ULLOA, Rocio; STANGE, Claudia. Carotenoid Biosynthesis and Plastid Development in Plants: the role of light. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 22, n. 3, p. 1184, 26 jan. 2021. MDPI AG. <https://dx.doi.org/10.3390/ijms22031184>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33530294/>. Acesso em: 20 out. 2023.

RAMAIYA, Shiamala Devi *et al.* Organic cultivation practices enhanced antioxidant activities and secondary metabolites in giant granadilla (*Passiflora quadrangularis* L.). **Plos One**, [S.L.], v. 16, n. 7, p. 1-17, 26 jul. 2021. Public Library of Science (PLoS). <https://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0255059>. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0255059>. Acesso em: 11 nov. 2023.

REBOUL, Rebecca *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**, [S.L.], v. 286, n. 46, p. 39982-39992, nov. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m111.255695>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3220558/>. Acesso em: 5 jul. 2024.

REIS, Iulla Naiff Rabelo de Souza; LAMEIRA, Osmar Alves; CORDEIRO, Iracema Maria Castro Coimbra. Efeito do 2,4-D na Indução de Calos *in vitro* de Paricá (*Schizolobium parahyba* var. *amazonicum* (Huber ex Ducke) Barneby). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 2, n. 5, p. 498-500, jul. 2007. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/82612/1/452-2301-1-PB.pdf>. Acesso em: 4 jun. 2024.

RIZWANA, Humaira *et al.* Evaluation of Chemical Composition, Antibacterial, Antifungal, and Cytotoxic Activity of *Laurus nobilis* L Grown in Saudi Arabia. **Journal Of Pure And Applied Microbiology**, [S.L.], v. 13, n. 4, p. 2073-2085, 30 dez. 2019. Journal of Pure and Applied Microbiology. <http://dx.doi.org/10.22207/jpam.13.4.19>. Disponível em: <https://microbiologyjournal.org/evaluation-of-chemical-composition-antibacterial-antifungal-and-cytotoxic-activity-of-laurus-nobilis-l-grown-in-saudi-arabia/>. Acesso em: 11 jul. 2024.

ROSAL, Louise Ferreira. **Germinação, indução de calos, micropropagação e anatomia foliar da Candeia (*Eremanthus erythropappus* DC.) Mac Leish**. 2004. 117 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós Graduação em Agronomia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004. Disponível em: <http://repositorio.ufla.br/bitstream/1/4022/1/> Acesso em: 7 maio 2024.

RUGGIERO, Carlos; OLIVEIRA, João Carlos de. Espécies de maracujá com potencial agrônomo. In: FALEIRO, Fábio Gelape; JUNQUEIRA, Nilton Tadeu Vilela; BRAGA, Marcelo Fideles (ed.). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina-Df: Embrapa Cerrados, 2005. Cap. 6. p. 142-158. Disponível em: http://ivrtpm.cpac.embrapa.br/homepage/capitulos/cap_6.pdf. Acesso em: 31 out. 2023.

SAAVEDRA, Teresa *et al.* Effects of foliar application of organic acids on strawberry plants. **Plant Physiology And Biochemistry**, [S.L.], v. 188, p. 12-20, out. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2022.08.004>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0981942822003527>. Acesso em: 11 jul. 2024.

SANCHEZ, Beatriz Alejandra Ortega *et al.* Pasteurization of passion fruit *Passiflora setacea* pulp to optimize bioactive compounds retention. **Food Chemistry: X**, [S.L.], v. 6, p. 100084, jun. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fochx.2020.100084>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2590157520300080>. Acesso em: 27 mar. 2024.

SANTANA, Felipe *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**, [S.L.], v. 43, n. 3, p. 371-381, fev. 2020. Sociedade Brasileira de Química (SBQ). <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170480>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/Bq7xdFNQ8dsKrxhPCbsHYPc/>. Acesso em: 7 jul. 2024.

SANTOS, Flávia Carvalho *et al.* Micropropagação do maracujazeiro-do-sono. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 57, n. 1, p. 112-117, fev. 2010. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0034-737x2010000100018>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rceres/a/RPJpkKFH3tz7VKPk5DHPc5j/?lang=pt>. Acesso em: 01 abr. 2024.

SANTOS, Luana Cristina Diniz; LIMA, Luciana Alves Rodrigues dos Santos; CASTRO, Ana Hortência Fonseca. Ácidos graxos vegetais: composição química, atividade biológica e potencial biotecnológico. **Trabalhos nas Áreas de Fronteira da Química 2**, [S.L.], p. 34-42, 17 fev. 2021. Atena Editora. <http://dx.doi.org/10.22533/at.ed.2292112024>. Disponível em: <https://atenaeditora.com.br/catalogo/ebook/trabalhos-nas-areas-de-fronteira-da-quimica-2>. Acesso em: 6 jul. 2024.

SANTOS, T. Barbosa *et al.* Phytochemical Compounds and Antioxidant Activity of the Pulp of Two Brazilian Passion Fruit Species: *passiflora cincinnatamast.* and *passiflora edulissims.* **International Journal Of Fruit Science**, [S.L.], v. 21, n. 1, p. 255-269, 1 jan. 2021. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/15538362.2021.1872050>. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/15538362.2021.1872050>. Acesso em: 11 jul. 2024.

SANTOS-TIERNO, Raphaela *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**, [S.L.], v. 16, n. 2, p. 26-34, 2022. Disponível em : <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/1152283>. Acesso em: 25 mar. 2024.

SANTOS-TIERNO, Raphaela *et al.* Light quality and explant type modulate growth, antioxidant properties and bioactive compounds production of calluses of *Passiflora setacea* cv BRS Pérola do Cerrado. **Plant Cell, Tissue And Organ Culture (Pctoc)**, [S.L.], v. 147, n. 3, p. 635-646, 30 out. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <https://dx.doi.org/10.1007/s11240-021-02188-y>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11240-021-02188-y>. Acesso em: 01 nov. 2023.

SCHMITZ, Carole *et al.* Síntesis de (-)-Lactona del ácido isocítrico y (-)-ácido homoisocítrico. Un nuevo método de conversión de alquínilsilanos en elAlquínil tioéter y ácidos carboxílicos correspondientes. **J. Org. Química**, El Salvador, v. 61, n. 5, p. 1817-1821, jun. 1996. Disponível em: <https://www.studocu.com/latam/document/universidad-de-el-salvador/quimica-organica-i/acid-o-isocitrico/65121365>. Acesso em: 5 jul. 2024.

SENTHIL, Kalaiselvi *et al.* Comparative chemometric profiles between leaf tissues of *withania somnifera* cultured in vitro and field. **International Journal Of Pharmacy And Pharmaceutical Sciences**, [S.L.], v. 7, n. 11, p. 66-71, 10 set. 2015. Disponível em: <https://journals.innovareacademics.in/index.php/ijpps/article/view/8089/5985>. Acesso em: 09 jul. 2024.

SHAKOUR, Zeinab T. Abdel *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**, [S.L.], v. 399, p. 133948, jan. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133948>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814622019100?via%3Dihub>. Acesso em: 12 jul. 2024.

SHEKHAWAT, Mahipal S. *et al.* *In vitro* regeneration of shoots and ex vitro rooting of an important medicinal plant *Passiflora foetida* L. through nodal segment cultures. **Journal Of Genetic Engineering And Biotechnology**, [S.L.], v. 13, n. 2, p. 209-214, dez. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jgeb.2015.08.002>.

Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1687157X15000335>.

Acesso em: 28 mar. 2024.

SHEORAN, V.; SHEORAN, A.s.; POONIA, P. Phytomining: a review. **Minerals Engineering**, [S.L.], v. 22, n. 12, p. 1007-1019, out. 2009. Elsevier BV.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.mineng.2009.04.001>.

Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S089268750900106X>.

Acesso em: 12 jul. 2024.

SILVA, Daniel da *et al.* Indução de calos friáveis em explantes foliares e segmentos nodais de pau-ferro (*Caesalpinia ferrea*). **Revista de Ciências Agrárias**, [S.L.], v. 41, n. 4, 20 jan. 2019.

<Http://dx.doi.org/10.19084/RCA17311>. Disponível em:

<https://revistas.rcaap.pt/index.php/rca/article/view/16779>. Acesso em: 15 jun. 2024.

SILVA, João Vitor Vicente da *et al.* Extração, caracterização e avaliação do potencial antioxidante do óleo fixo de semente de maracujá amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*).

Research, Society And Development, [S.L.], v. 12, n. 3, e17812340606, 7 mar. 2023.

Research, Society and Development. <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v12i3.40606>. Disponível em:

<https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/40606>. Acesso em: 2 fev. 2024.

SILVA, Tielen Viana da. **Caracterização fitoquímica e avaliação da atividade antioxidante de materiais obtidos in vivo e produzidos in vitro de *Passiflora alata* Curtis**. 2021. 99 f.

Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal,

Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2021. Disponível em:

<https://www.bdt.d.uerj.br:8443/handle/1/19881?mode=full>. Acesso em: 11 jul. 2024.

SOUZA, Myla Lôbo de *et al.* Wild *Passiflora* (*Passiflora* spp.) seed oils and their nanoemulsions induce proliferation in HaCaT keratinocytes cells. **Journal Of Drug Delivery Science And Technology**, [S.L.], v. 67, p. 102803, jan. 2022. Elsevier BV.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jddst.2021.102803>. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1773224721004834>.

Acesso em: 24 jul. 2024.

SOZO, Jenny Sumara. **Perfis de metabólitos secundários e atividade antioxidante de frutos, sementes e calos cultivados in vitro de *Passiflora setacea* e *Passiflora tenuifila* (Passifloraceae)**. 2014. 124 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciencia Biológicas, Centro de Ciências Biológicas, Ufsc, Florianópolis, 2014.

Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/129443>.

Acesso em: 08 out. 2023.

SOZO, Jenny Sumara *et al.*, *In Vitro* Culture and Phytochemical Analysis of *Passiflora tenuifila* Killip and *Passiflora setacea* DC (Passifloraceae). **Methods In Molecular Biology**, [S.L.], p. 13-30, 2016. Springer New York. https://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-3332-7_2.

Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27108307/>. Acesso em: 10 ago. 2023.

SUMNER, Lloyd W. *et al.* Proposed minimum reporting standards for chemical analysis. **Metabolomics**, [S.L.], v. 3, n. 3, p. 211-221, 12 set. 2007. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11306-007-0082-2>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24039616/>. Acesso em: 10 jul. 2024.

TAIZ, Lincoln *et al.* **Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 887 p. Disponível em: Acervo pessoal.

TAVARES, José Torquato de Queiroz *et al.* Interferência do ácido ascórbico na determinação de açúcares redutores pelo método de Lane e Eynon. **Química Nova**, [S.L.], v. 33, n. 4, p. 805-809, 2010. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422010000400008>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/dNKDBb4SSZyrscyvcmWtJpJ/>. Acesso em: 8 jul. 2024.

TERHAAG, Kathleen. **EFEITO DE TIPOS DE EXPLANTES E DE AUXINAS NO CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM CULTURAS CELULARES DE *Passiflora setacea* BRS Pérola do Cerrado (PASSIFLORACEAE)**. 2019. 132 f. TCC (Graduação) - Curso de Biologia, Centro de Ciências Biológicas, UFSC, Florianópolis, 2019. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/204047>. Acesso em: 20 ago. 2023

THANDIVEL, Sathish *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**, [S.L.], v. 10, n. 7, p. 1-19, abr. 2024. Disponível em: [https://www.cell.com/heliyon/fulltext/S2405-8440\(24\)03911-2](https://www.cell.com/heliyon/fulltext/S2405-8440(24)03911-2). Acesso em: 08 jul. 2024.

TORRES, Antonio Carlos *et al.* **Glossário de Biotecnologia vegetal**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2000. 128 p. Disponível em: <https://www.bdpa.cnptia.embrapa.br/consulta/busca?b=pc&id=769141&biblioteca=vazio&busca=769141&qFacets=769141&sort=&paginaacao=t&paginaAtual=1>. Acesso em: 30 mar. 2024.

TREMMEL, Martina; KIERMAIER, Josef; HEILMANN, Jörg. *In Vitro* Metabolism of Six C-Glycosidic Flavonoids from *Passiflora incarnata* L. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 22, n. 12, p. 6566, 18 jun. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms22126566>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/12/6566>. Acesso em: 11 jul. 2024.

TROVATO, Maurizio *et al.* Editorial: amino acids in plants. **Frontiers In Plant Science**, [S.L.], v. 12, p. 1-5, 18 out. 2021. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2021.772810>. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/plant-science/articles/10.3389/fpls.2021.772810/full>. Acesso em: 8 jul. 2024.

TSUGAWA, Hiroshi *et al.* MS-DIAL: data-independent ms/ms deconvolution for comprehensive metabolome analysis. **Nature Methods**, [S.L.], v. 12, n. 6, p. 523-526, 4 maio 2015. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nmeth.3393>. Acesso em: 03 maio 2024.

VANHOLME, Ruben *et al.* Metabolic engineering of novel lignin in biomass crops. **New Phytologist**, [S.L.], v. 196, n. 4, p. 978-1000, 4 out. 2012. Wiley.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-8137.2012.04337.x>. Disponível em:
<https://nph.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1469-8137.2012.04337.x>. Acesso em: 6 jul. 2024.

VEITCH, Nigel C.; GRAYER, Renée J.. Flavonoids and their glycosides, including anthocyanins. **Natural Product Reports**, [S.L.], v. 25, n. 3, p. 555, 2008. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/b718040n>.
 Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2008/np/b718040n/unauth>.
 Acesso em: 10 jul. 2024.

VIEIRA, Lorena Melo *et al.* *In vitro* plant regeneration of *Passiflora setacea* D.C. (Passifloraceae): the influence of explant type, growth regulators, and incubation conditions. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, [S.L.], v. 50, n. 6, p. 738-745, 6 nov. 2014. Springer Science and Business Media LLC.
<http://dx.doi.org/10.1007/s11627-014-9650-0>.
 Disponível em: <https://www.locus.ufv.br/handle/123456789/22315>. Acesso em: 27 mar. 2024

VIVAS, Diego Ballesteros. **Estudio del potencial antiproliferativo de extractos obtenidos de residuos frutícolas desde las perspectivas de la química verde y la alimentómica**. 2020. 301 f. Tese (Doutorado) - Curso de Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, 2020.
 Disponível em: <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/78010>. Acesso em: 2 fev. 2024.

WAN, Chun-Ping *et al.* Astragaloside II triggers T cell activation through regulation of CD45 protein tyrosine phosphatase activity. **Acta Pharmacologica Sinica**, [S.L.], v. 34, n. 4, p. 522-530, 25 mar. 2013. Springer Science and Business Media LLC.
<http://dx.doi.org/10.1038/aps.2012.208>.
 Disponível em: <https://www.nature.com/articles/aps2012208>. Acesso em: 7 jul. 2024.

WANG, Xuan *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**, [S.L.], v. 70, n. 23, p. 7085-7094, 30 maio 2022.
<Http://dx.doi.org/10.1021/acs.jafc.2c01595>. Disponível em:
<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.2c01595>. Acesso em: 03 maio 2024.

WEI, Xiaopeng *et al.* Exogenously applied abscisic acid accelerates wound healing of Chinese yam tubers (*Dioscorea opposita*) through promoting suberin polyphenolics biosynthesis. **Scientia Horticulturae**, [S.L.], v. 325, p. 112703, fev. 2024. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2023.112703>. Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304423823008713>.
 Acesso em: 5 jul. 2024.

WERNER, Elias Terra *et al.* Controle da calogênese do pau-brasil *in vitro*. **Revista Árvore**, Vitória (ES), v. 33, n. 6, p. 987-996, dez. 2009. FapUNIFESP (SciELO).
<http://dx.doi.org/10.1590/s0100-67622009000600001>. Disponível em:
<https://www.scielo.br/j/rarv/a/9CXrYtKb6nxBNKV5QvyQ47w/?lang=pt#>. Acesso em: 24 jun. 2024.

WOSCH, Luma; SANTOS, Kely Cristina dos; IMIG, Daniela Cristina; SANTOS, Cid Aimbiré M.. Comparative study of Passiflora taxa leaves: ii. a chromatographic profile. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [S.L.], v. 27, n. 1, p. 40-49, jan. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjp.2016.06.007>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1016/j.bjp.2016.06.007>. Acesso em: 25 jul. 2024.

XU, Feng-Qing *et al.* Protective effects of cycloartane triterpenoides from Passiflora edulis Sims against glutamate-induced neurotoxicity in PC12 cell. **Fitoterapia**, [S.L.], v. 115, p. 122-127, dez. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2016.09.013>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27693740/>. Acesso em: 12 jul. 2024.

YAN, Jingwei *et al.* Unraveling the malate biosynthesis during development of Torreya grandis nuts. **Current Research In Food Science**, [S.L.], v. 5, p. 2309-2315, 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.crfs.2022.11.017>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2665927122002209>. Acesso em: 5 jul. 2024.

YOSHIMURA, Kazuya; ISHIKAWA, Takahiro. Chemistry and Metabolism of Ascorbic Acid in Plants. **Ascorbic Acid In Plant Growth, Development And Stress Tolerance**, [S.L.], p. 1-23, dez. 2017. Springer International Publishing. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-74057-7_1. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-74057-7_1. Acesso em: 08 jul. 2024.

YOUNES, Maged *et al.* Re-evaluation of acetic acid, lactic acid, citric acid, tartaric acid, mono- and diacetyltartaric acid, mixed acetic and tartaric acid esters of mono- and diglycerides of fatty acids (E 472a-f) as food additives. **Efsa Journal**, [S.L.], v. 18, n. 3, p. 1-66, mar. 2020. [Http://dx.doi.org/10.2903/j.efsa.2020.6032](http://dx.doi.org/10.2903/j.efsa.2020.6032). Disponível em: <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.2903/j.efsa.2020.6032>. Acesso em: 7 jul. 2024.

ZENG, Hongzhe *et al.* (-)-Epicatechin ameliorates type 2 diabetes mellitus by reshaping the gut microbiota and Gut-Liver axis in GK rats. **Food Chemistry**, [S.L.], v. 447, p. 138916, jul. 2024. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.138916>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S030881462400565X>. Acesso em: 13 jul. 2024.

ZERAIK, Maria Luiza *et al.* Maracujá: um alimento funcional?. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [S.L.], v. 20, n. 3, p. 459-471, jul. 2010. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-695x2010000300026>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbfar/a/yRZvjcVJPFvVwV8GnbjRWss>. Acesso em: 9 jul. 2024.

ZHANG, Juan *et al.* Phytochemistry, nutritional composition, health benefits and future prospects of Passiflora: a review. **Food Chemistry**, [S.L.], v. 428, p. 136825, dez. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.136825>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814623014437>. Acesso em: 20 maio 2024.

APÊNDICE B - Análise estatística da massa fresca e massa seca de NC30, NC60 e NC90

Anova: factor único

SUMÁRIO					
Grupos	Contagem	Soma	Média	Variancia	
30	22	39872	1812,363636	215143,7662	c
60	40	103596	2589,9	241111,6308	a
90	85	186985	2199,823529	217750,6471	b

ANOVA						
Fonte de variacão	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	9048245,895	2	4524122,947	20,2242974	0,0000000181	3,058928001
Dentro de gru	32212427,04	144	223697,41			
Total	41260672,94	146				

Test for equal means						
	Sum of sqrs	df	Mean square	F	p (same)	
Between grou	9,05E+06	2	4,52E+06	20,22	1,82E-08	
Within groups	3,22E+07	144	2,24E+05		Permutation p (n=99999)	
Total:	4,13E+07	146	1,00E-05			

Components of variance (only for random effects):			
Var(group):	102791	Var(error):	223697
ICC:		ICC:	0,314837

omega2: 0,2073

Levene's test 1 p (same): 0,9889
 Levene's test, p (same): 0,8494

Welch F test in the case of unequal variances: F=19,57, df=53,01, p=4,308E-07

Bayes factor: 5,13E05 (decisive evidence for unequal means)

Anova: factor único

SUMÁRIO					
Grupos	Contagem	Soma	Média	Variancia	
30	22	2193	99,68181818	198,7987013	ab
60	40	4281	107,025	295,3583333	a
90	85	7742	91,08235294	284,1717087	b

ANOVA						
Fonte de variaco	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	7142,250512	2	3571,125256	12,99766987	0,0000064659	3,058928001
Dentro de gru	39564,17126	144	274,7511893			
Total	46706,42177	146				

Test for equal means						
	Sum of sqrs	df	Mean square	F	p (same)	
Between grou	7142,25	2	3571,13	13	6,47E-06	
Within groups	39564,2	144	274,751		Permutation p (n=99999)	
Total:	46706,4	146	1,00E-05			

Components of variance (only for random effects):			
Var(group):	78,7914	Var(error):	274,751
ICC:		ICC:	0,222862

omega2: 0,1403

Levene's test 1 p (same): 0,6422
 Levene's test, p (same): 0,577

Welch F test in the case of unequal variances: F=12,28, df=56,55, p=3,715E-05

Bayes factor: 2564 (decisive evidence for unequal means)

APÊNDICE C - Análise estatística da razão massa fresca/massa seca e teor de água% de NC30, NC60 e NC90

Anova: factor único

SUMÁRIO				
Grupos	Contagem	Soma	Média	Variância
30	23	1,3001787	0,056529508€	0,000100904€ a
60	40	1,667866192	0,041696654€	0,000007408€ b
90	85	3,592741625	0,042267548€	0,000045032€ b

ANOVA						
Fonte de variac	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	0,0040619895	2	0,0020309947	46,8077265	0	3,058486124
Dentro de gru	0,0062915733	145	0,0000433901			
Total	0,0103535628	147				

Test for equal means									
	Sum of sqrs	df	Mean square	F	p (same)	A	B	C	
Between grou	0,00406199	2	0,00203099	46,81	2,07E-16	A		0	0
Within groups	0,00629157	145	4,34E-05	Permutation p (n=99999)		B	12,17		0,8936
Total:	0,0103536	147	1,00E-05			C	13,03	0,6392	

Components of variance (only for random effects):
 Var(group): 4,69E-05 Var(error): 4,34E-05 ICC: 0,519324
 omega2: 0,3823

Levene's test f p (same): 1,86E-06
 Levene's test, p (same): 1,10E-05

Welch F test in the case of unequal variances: F=23,75, df=51,83, p=4,764E-08

Bayes factor: 2,339E13 (decisive evidence for unequal means)

Anova: factor único

SUMÁRIO				
Grupos	Contagem	Soma	Média	Variância
30	23	2169,98213	94,34704913	1,009048387 b
60	40	3833,213381	95,83033452	0,0740839254 a
90	85	8140,725837	95,77324515	0,450326136€ a

ANOVA						
Fonte de variac	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	40,61989554	2	20,30994777	46,8077265	0	3,058486124
Dentro de gru	62,91573308	145	0,4339016075			
Total	103,5356286	147				

Test for equal means									
	Sum of sqrs	df	Mean square	F	p (same)	A	B	C	
Between grou	40,6199	2	20,3099	46,81	2,07E-16	A		0	0
Within groups	62,9157	145	0,433902	Permutation p (n=99999)		B	12,17		0,8936
Total:	103,536	147	1,00E-05			C	13,03	0,6392	

Components of variance (only for random effects):
 Var(group): 0,46879 Var(error): 0,433902 ICC: 0,519324
 omega2: 0,3823

Levene's test f p (same): 1,86E-06
 Levene's test, p (same): 1,10E-05

Welch F test in the case of unequal variances: F=23,75, df=51,83, p=4,764E-08

Bayes factor: 2,339E13 (decisive evidence for unequal means)