UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Estudos metabolômicos de *Spondias mombin* e de *S. tuberosa*
(Anacardiaceae)**

Marina Dantas Corradin

**Ribeirão Preto
2020**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Estudos metabolômicos de *Spondias mombin* e de *S. tuberosa*
(Anacardiaceae)**

Marina Dantas Corradin

Ribeirão Preto
2020

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Marina Dantas Corradin

**Estudos metabolômicos de *Spondias mombin* e de *S. Tuberosa*
(Anacardiaceae)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas da Faculdade de Ciências
Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP
para obtenção do Título de Mestre em
Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais
e Sintéticos

Orientador: Prof. Dr. Fernando Batista da
Costa

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em 27/08/2020. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2020

FICHA CATALOGRÁFICA

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dantas Corradin, Marina

Estudos metabolômicos de *Spondias mombin* e de *S. Tuberosa* (Anacardiaceae). Ribeirão Preto, 2020.

92 p.; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos

Orientador: Prof. Dr. Fernando Batista da Costa

1. Metabolômica. 2. *Spondias*. 3. Quimiometria.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Marina Dantas Corradin

Título: Estudos metabolômicos de *Spondias mombin* e de *S. tuberosa*
(Anacardiaceae)

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas da Faculdade de Ciências
Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP
para obtenção do Título de Mestre em
Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais
e Sintéticos

Orientador: Prof. Dr. Fernando Batista da
Costa

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer principalmente ao meu orientador, Prof. Dr. Fernando Batista da Costa, pela oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa desde 2017. Sou muito grata por todo o apoio, incentivo e confiança que recebi nesses últimos anos.

Em especial gostaria de agradecer ao Álvaro e ao Jolindo, que fizeram parte da minha trajetória desde o início da minha jornada no grupo de pesquisa, por toda a troca de conhecimento, confiança e companheirismo. Também quero agradecer ao Gari e ao Federico por toda a confiança e incentivo que recebi nessa trajetória.

Os meus mais sinceros agradecimentos ao Dr. Guilherme Zocolo, que foi um dos mentores desse trabalho, pelo apoio, confiança e por me dar a oportunidade de conhecer o laboratório LMQPN na Embrapa Agroindústria Tropical e todos os seus excelentes profissionais. Também quero agradecer a Dr. Cristiane Ramires e a Dr. Maria Auxiliadora de Lima, que foram pessoas essenciais para o desenvolvimento do meu trabalho.

Agradeço aos meus amigos e também atuais e ex-colegas de laboratório, Danielle, Jonas, Rosana, Felipe, Tsvetelina, Amanda, Débora, Marília, Lucas, Amanda, Anny, por toda amizade, apoio e ótimos momentos. E aos técnicos Waltinho, Mário, Angélica e Luizão por todo o apoio e convivência.

Quero agradecer sobretudo aos meus pais, Gianfranco e Denise, que sempre me incentivaram a estudar e me apoiaram incondicionalmente em toda a minha vida. E também a Julia, minha irmã e que foi a minha melhor amiga e companheira e amiga de vida, a minha família, a Julia, minha confidente, incentivadora e amiga, e ao Juan, que sempre me deu forças.

Finalmente, gostaria de agradecer a Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, a Embrapa e as agências de fomento CNPq, CAPES e FAPESP pelo apoio financeiro. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

Dantas Corradin, M. **Estudos metabolômicos de *Spondias mombin* e de *S. Tuberosa* (Anacardiaceae)**. 2020. 92 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

As espécies *Spondias mombin* e *S. tuberosa* (Anacardiaceae) são plantas frutíferas e suas frutas cajá e umbu, respectivamente, são comercializadas como frutas exóticas. A maior inserção dessas espécies no mercado é dificultada pela sua grande variabilidade genética, falta de conhecimento de técnicas para a reprodução, colheita e conservação. Portanto, foram criados pela Embrapa os Bancos Ativos de Germoplasma (BAG) com a finalidade de conservação dos recursos genéticos e de otimizar o uso das espécies, e uma das abordagens para a seleção dos acessos são os estudos metabolômicos. Neste trabalho, a realização do estudo metabolômico correlacionou, por análises quimiométricas, o perfil metabolômico de cascas, galhos e folhas das espécies *S. mombin* e *S. tuberosa* e fatores abióticos aos quais as amostras estavam expostas. Além disso, as substâncias que mais influenciaram os grupamentos observados foram identificadas e indicadas como marcadores. A fim de auxiliar na desreplicação de substâncias observadas nos perfis metabólicos, foi construída uma biblioteca de estruturas químicas da família Anacardiaceae, a qual possibilitou a identificação de 40 substâncias. Os resultados deste trabalho evidenciam que os galhos e as cascas das duas espécies apresentam como marcadores ambos o ácido gálico e ácido cítrico e, apesar de serem de espécies diferentes, os perfis são semelhantes. Já as folhas de *S. mombin* tem como marcadores o ácido anacárdico C17:3 e derivados de quercetina, enquanto as folhas da *S. tuberosa* apresentam os ácidos anacárdicos C17:1, C17:2, C13 como os seus marcadores. Além disso, foi verificado que os fatores abióticos tiveram mais influência no perfil metabólico das folhas do que a sua variabilidade genética. No caso das folhas de *S. mombin*, os flavonoides estão inversamente correlacionados com a nebulosidade e diretamente correlacionados com a temperatura do local da coleta.

Palavras-chave: **Metabolômica, *Spondias*, Quimiometria**

ABSTRACT

Dantas Corradin, M. **Metabolomics studies of *Spondias mombin* and *S. tuberosa* (Anacardiaceae)**. 2020. 92 f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

The species *S. mombin* and *S. tuberosa* (Anacardiaceae) are fruit plants, their fruits are known as cajá and umbu, respectively, and they are marketed as exotic fruits. The better insertion of these species in the market is hampered by their genetic variability, lack of knowledge of techniques for reproduction, harvest and conservation. Therefore, Active Germplasm Banks (BAG) were created by Embrapa, with the purpose of conserving genetic resources and optimizing the use of species. One of the approaches to the selection of species is metabolomics studies. In this work, the performance of the metabolomics study correlated, by chemometric analysis, the metabolomics profile of bark, branches and leaves of the species *S. mombin* and *S. tuberosa* with abiotic factors that the samples were exposed to. Thus, the substances that most influenced the observed groups were identified and indicated as markers. In order to perform the desreplication of the metabolomic profile, a library of chemical structures of the Anacardiaceae family was built, which enabled the identification of 40 substances. The results in this work show that the branches and barks have gallic acid and citric acid as markers and their profile are similar despite being of different species. In the case of the leaves of the *S. mombin* species, the anacardic acid C17: 3 and quercetin derivatives are marked, while the leaves of the *S. tuberosa* has the anacardic acids C17: 1, C17: 2, C13 as their markers. In addition, it was found that meteorological factors had more influence on the metabolic profile of the leaves than their genetic variability. In the case of *S. mombin* leaves, flavonoids are inversely correlated with cloudiness and directly correlated with the temperature of the collect site.

Keywords: Metabolomic, *Spondias*, chemometrics

1. INTRODUÇÃO

A família Anacardiaceae é constituída por cerca de 80 gêneros e 800 espécies, distribuídas principalmente nas regiões tropicais e subtropicais, mas também podem ser encontradas nas zonas temperadas (CORREIA; DAVID; DAVID, 2006; WANNAN, 2006). Em 1896 seus gêneros foram subdivididos por Engler em cinco tribos: Anacardieae, Dobineae, Rhoeae, Semecarpeae e Spondiadeae. O gênero *Spondias* está presente na tribo Spondiadeae e detém as espécies *Spondias mombin* L. e *S. tuberosa* Arruda Cam..

A espécie *S. mombin* (Figura 1), popularmente conhecida como cajazeira, é nativa das florestas úmidas localizadas na porção norte da América do Sul e também é encontrada dispersa em regiões tropicais da África, Ásia e América (MITCHELL e DALY 2015). Essa espécie é a mais alta do gênero, podendo alcançar até 30 m, é uma planta caducifólia, ou seja, perde suas folhas no outono, tem o início da senescência foliar em setembro e a sua produção de frutas de janeiro a julho no Nordeste Brasileiro (SACRAMENTO e SOUZA, 2000). Mesmo o cajá sendo muito utilizado na agroindústria para a produção de suco, néctar e geleia, a sua produção é baixa devido a exploração extrativista que ocorre pela falta de conhecimento técnico na sua domesticação e a dificuldade da colheita de frutos pela altura da planta (SANTOS e ALMEIDA, 2019).

Figura 1. Árvore (esquerda) e fruta (direita) da *S. mombin*. Fonte: Secom-PB.

Além do uso comercial do cajá, outras partes da planta, como as folhas, galhos e cascas, dessa espécie também são utilizadas na medicina popular. Alguns

estudos comprovaram a ação farmacológica dessa espécie, como sua atividade na inibição da enzima colinesterase (ELUFIOYE *et al.* 2017), antimicrobiana (OSUTOKUN e CRISTINA, 2019) e antiviral, em específico para o vírus herpes tipo 1 (SIQUEIRA *et al.*, 2020). Apesar de que alguns estudos fitoquímicos já tenham sido realizados (NEIENS *et al.*, 2017; DE VASCONCELOS *et al.*, 2016), há ainda a necessidade de que sejam aprofundados.

A cajazeira, como já foi citado, possui grande valor econômico, porém sua produção não atende à demanda de mercado e os principais entraves ao seu cultivo racional são a inexistência de clones selecionados e o porte alto da planta. A solução para esse problema está na identificação, clonagem e a seleção de clones de porte baixo para a busca de boa produtividade e melhoria da qualidade de produtos.

Já a *S. tuberosa* (Figura 2), popularmente conhecida como umbuzeiro, é nativa e endêmica da região semiárida brasileira, podendo chegar a 7 m de altura, sua safra ocorre de janeiro a março e, após esse período, a planta perde suas folhas (DE LIMA *et al.*, 2018). Assim, a sua fruta, o umbu, é pouco comercializada por ser uma planta que é nativa no Norte e Nordeste Brasileiro e é dificilmente encontrada em outras regiões no mundo. Portanto, o consumo do umbu é em sua maioria local, porém vários produtos derivados são comercializados em outras partes do Brasil e na Europa (DE LIMA *et al.*, 2018). Apesar da dificuldade de se encontrar o umbuzeiro, algumas ações farmacológicas foram comprovadas, como antifúngica contra *Candida* (CORDEIRO *et al.* 2018) e *Cryptococcus* (CORDEIRO *et al.*, 2020). Alguns estudos fitoquímicos também já foram realizados (GUIMARÃES *et al.*, 2018; SIQUEIRA *et al.*, 2016), contudo, ainda precisam ser mais aprofundados.

Figura 2. Árvore (esquerda) e fruta (direita) da *S. tuberosa*. Fonte: Marcelino Ribeiro.

Além da produção extrativista, outros fatores dificultam a maior inserção no mercado dessa espécie, como seu período restrito de coleta, sua grande variabilidade genética, a falta de conhecimento de técnicas para a produção e a conservação das frutas pós-colheita. Portanto, assim como a *S. mombin*, a *S. tuberosa* também precisa ter sua produtividade melhorada a partir de técnicas de identificação e clonagem.

Atualmente, os comércios de frutas exóticas, como o de cajá e o umbu, têm grande destaque, e isso faz com que se torne interessante economicamente investir na produção e comercialização dessas espécies. Nesse contexto, a Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), com a finalidade de evitar o risco da erosão genética e otimizar o uso das espécies *S. mombin* e *S. tuberosa*, observa a necessidade do estabelecimento de estratégias efetivas de conservação *ex situ*, buscando resgatar a variabilidade existente e tornando-a disponível para a utilização em programas de melhoramento genético (MACHADO *et al.*, 2015).

A Embrapa é uma instituição de pesquisa vinculada ao Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) do Brasil. Foi criada em 26 de abril de 1973, com o objetivo de desenvolver tecnologias, conhecimentos e informações voltadas para a agricultura e pecuária brasileira. A empresa compõe o Sistema Nacional de Pesquisa Agropecuária-SNPA, também constituído pelas Organizações de Pesquisa Agropecuária-Oepas, por universidades e institutos de pesquisa de âmbito federal ou estadual, entre outras organizações públicas e privadas, direta ou indiretamente vinculadas à atividade de pesquisa agropecuária (www.embrapa.br/agroindustria-tropical/apresentacao). Possui 42 centros de

pesquisa em todo o Brasil, com atuação em diversas áreas, sendo uma delas a Embrapa Agroindústria Tropical, tendo o seu principal foco na agroindustrialização, com a atuação na agroindústria, fabricantes de insumos para indústrias e a valorização da biodiversidade brasileira (www.embrapa.br/snpa).

Os recursos genéticos presentes nas espécies de plantas, animais e microrganismos são transmitidos de uma geração para outra por meio de seu material genético, e esse material está nas células germinativas chamadas de germoplasma. Então, os germoplasmas podem ser conservados em locais denominados Bancos de Germoplasma. Esses bancos são muito importantes para se realizar trabalhos de pesquisa que utilizam reservatórios de genes com a finalidade de conservação desses recursos genéticos e na domesticação de plantas alimentícias. Assim, o uso desses bancos é fundamental para o melhoramento das espécies, uma vez que se torna viável realizar a diferenciação morfológica e reprodutiva com base na seleção de genes. Neste sentido, foram implementados os Bancos Ativos de Germoplasma (BAG) de *S. mombin* e de *S. tuberosa*, tendo como objetivo a conservação dos recursos genéticos das espécies e a caracterização, a avaliação, o intercâmbio e a documentação desses germoplasmas (MACHADO *et al.*, 2015).

Em 1996, foram instalados dois Bancos Ativos de Germoplasma na Estação Experimental de Mangabeira da Emepa (Empresa Estadual de Pesquisa Agropecuária da Paraíba), situada na Mesorregião da Zona da Mata paraibana, no município de João Pessoa, PB. Foram introduzidos o BAG-01 de cajá, resultante de propagação sexuada (progênes), composto de 23 acessos, e o BAG-02, de propagação assexuada (clones), composto de 11 acessos. As progênes são oriundas de sementes e os clones são oriundos de estaquia, ambos de diversos municípios do estado. Para a estaquia, foram coletadas estacas lenhosas de plantas adultas com boa sanidade de diversos municípios, e, então elas foram colocadas em local arejado e sombreado, e ao formar os calos, elas foram plantadas no local definitivo.

O Banco Ativo de Germoplasma de Umbu (BGU) foi implantado em 1994, na Embrapa Semiárido, em Petrolina, PE, com material identificado e coletado em diferentes estados. As plantas foram enxertadas e plantadas, e a enxertia foi de

garfagem no topo em fenda cheia. O BGU já contém 79 acessos com um total de 316 clones no campo.

Visando o melhoramento das espécies, uma possível abordagem para a seleção dos acessos nos BAGs são os estudos metabolômicos. A metabolômica visa o estudo do metabolismo do organismo, e assim, tem o objetivo de determinar o maior número possível de metabólitos presentes em uma dada amostra biológica. O metabolismo secundário da planta é composto de pequenas moléculas, as quais são componentes-chave na reprodução proteção, interação e adaptação com os fatores bióticos e abióticos (YANG *et al.*, 2018). Além disso, os metabólitos secundários são comercialmente interessantes por serem de grande utilidade para as indústrias farmacêuticas, alimentícias, de cosméticos e agrícolas.

Atualmente, a abordagem metabolômica tem sido uma das ferramentas de escolha na tentativa de realizar estudos holísticos sobre metabólitos de plantas, com o objetivo de detectar, simultaneamente, o máximo de substâncias possíveis e comparar padrões de comportamento ou tendências. Os estudos metabolômicos podem ser realizados de forma não direcionada (*untargeted*) e direcionada (*targeted*), sendo o objetivo da primeira a análise do maior número de metabólitos possível, podendo pertencer a diversas classes químicas, já o da segunda é a análise de metabólitos pré-selecionados de determinada classe química ou que estejam associados a rotas metabólicas específicas (VERPOORTE *et al.* 2005).

Então, os estudos metabolômicos são realizados através da metabolômica, do perfil metabólico e da impressão digital metabólica. Sendo a metabolômica a identificação e a quantificação de todos os metabolitos de um organismo, já o perfil metabólico proporciona a identificação e uma quantificação aproximada de um grupo de metabolitos, e a impressão digital metabólica é uma abordagem utilizada para a detecção da composição do organismo, sem necessariamente a identificação de cada metabólito (BEISKEN *et al.* 2015).

As metodologias metabolômicas englobam técnicas eficazes para a descoberta de novas substâncias, como o uso da ressonância magnética nuclear (RMN), que é uma poderosa técnica de elucidação da estrutural e tem a vantagem de ser não destrutiva, embora menos sensível, e das técnicas de separação cromatográficas, gasosa ou líquida, acopladas a espectrometria de massas (LC-MS), as quais conferem a sensibilidade necessária para uma análise simultânea

forneendo uma visão mais abrangente do metaboloma (BLAŽENOVIC´ *et al.* 2018). Por meio destas técnicas, são gerados enormes conjuntos de dados oriundos dos espectros e cromatogramas, os quais precisam ser processados com auxílio de técnicas computacionais, por exemplo para a eliminação de ruídos, alinhamento e escalonamento dos picos com vistas a análises multivariadas, com o objetivo de se identificar, por exemplo as tendências de grupos. Os dados são analisados através de análises multivariadas, como PCA (*Principal Component Analysis*) e PLS (*Partial Least Squares*).

Apesar da abordagem metabolômica ser amplamente utilizada, ainda não é possível realizar o mapeamento completo da constituição metabólica de uma dada espécie. No entanto, essa abordagem já permite a correlação dos metabólitos aos diferentes estados fisiológicos e respostas a fatores bióticos e abióticos. Além disso, a aplicação de técnicas e conceitos da metabolômica aumentou consideravelmente nos últimos dez anos devido ao rápido desenvolvimento de diferentes plataformas e bancos de dados (BLAŽENOVIC´ *et al.* 2018; PINU e VILLAS-BOAS, 2017). Assim, a identificação um produto natural em um extrato é possível sem necessariamente realizar o processo de isolamento e identificação estrutural (MOHIANI *et al.* 2018), utilizando técnicas analíticas como LC com detectores de UV e MS em conjunto com banco de dados de produtos naturais. Portanto, a perspectiva é que a abordagem metabolômica seja cada vez mais aperfeiçoada, e assim, se torne uma técnica cada vez mais eficiente para um mapeamento metabólico mais completo.

O grupo de pesquisa AsterBioChem possui experiência em metabolômica e já organizou um banco de dados de cerca de 4.000 substâncias descritas previamente na literatura, principalmente da família Asteraceae, que compreende principalmente classes como terpenos, flavonoides e lactonas sesquiterpênicas. Organizou ainda uma extratoteca e uma biblioteca de substâncias puras oriundas de espécies vegetais. O presente trabalho tem como foco a família Anacardiaceae, marcando uma nova etapa em nosso grupo de pesquisas, que recentemente tem incluído diferentes famílias, como Vochysiaceae e Cannabaceae, enriquecendo o conhecimento do grupo e aumentando o número de constituintes do banco de dados AsterDB (www.asterbiochem.org/asterdb), o qual contém diversas estruturas químicas úteis no processo de desreplicação.

Esse trabalho é resultado da parceria entre o AsterBioChem e a Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, a qual forneceu material vegetal da cajazeira e do umbuzeiro, proveniente dos Bancos Ativos de Germoplasma, além do apoio técnico e financeiro. A empresa é responsável pelos processos de coleta, secagem e envio das amostras, as quais são recebidas em nosso laboratório na FCFRP-USP.

Neste trabalho, o estudo metabolômico da cajazeira e do umbuzeiro foi realizado com as amostras provenientes de indivíduos presentes nos BAGs anteriormente citados, com a finalidade de correlacionar o metabolismo das folhas, galhos e cascas dessas espécies com os fatores abióticos da coleta. As amostras de *S. mombin* são caules e folhas coletados em 2017 e 2018 na Emepa, PB, no período que as plantas estavam com folhas verdes. A coleta nesses períodos é interessante, uma vez que pode-se estudar o metabolismo da planta em relação a seu período de frutificação e aos fatores abióticos. Já a *S. tuberosa* foi coletada também por dois anos na Embrapa do Semiárido, PE.

Além do estudo metabolômico das espécies *S. mombin* e *S. tuberosa*, o presente trabalho também tem como objetivo elaborar uma biblioteca das estruturas químicas dos metabólitos da família Anacardiaceae, realizando a identificação e a catalogação de substâncias. Desta forma, como resultado, deve-se incrementar e diversificar o banco de dados AsterDB e a aplicação do BAG, permitindo, no futuro, realizar avanços em diversas áreas, por exemplo, as respostas químicas das plantas a pragas e ao ambiente.

O presente projeto de mestrado é parte do projeto de pesquisa coordenado pelo Dr. Guilherme Julião Zocolo, intitulado “Caracterização química, avaliação da atividade anticâncer e estudos de variabilidade intraespecífica de metabólitos secundários dos extratos de cascas e folhas do Bancos Ativos de Germoplasma de abacaxizeiro, cajazeira e umbuzeiro”, o qual está sendo desenvolvido pela Embrapa Agroindústria Tropical em colaboração com a Universidade Estadual Paulista (UNESP), Universidade Federal do Ceará, Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz-CE) e Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FCFRP-USP), com o objetivo de identificar quimicamente o metabolismo de espécimes das famílias Anacardiaceae (caju, cajá e umbu) e Bromeliaceae (abacaxi), a fim de entender como elas se comportam no metabolismo vegetal e

ainda verificar se possuem potencial antitumoral. O presente projeto ainda está inserido em um subprojeto intitulado “Biblioteca de substâncias e de extratos de Anacardiaceae empregando ferramentas “in silico” e de metabolômica para o enriquecimento de Bancos Ativos de Germoplasma da Embrapa”, sob responsabilidade do Prof. Fernando B. da Costa (FCFRP-USP) e financiamento da CAPES.

5. CONCLUSÕES

A biblioteca de estruturas químicas da família Anacardiaceae (AnacardDB) construída neste trabalho permitiu a desreplicação de 40 substâncias nas espécies *S. mombin* e *S. tuberosa*. Dessa substâncias, 30 foram identificadas com nível de confiança 2 utilizando a AnacardDB com dados de tR e massa monoisotópica em alta resolução, 10 foram identificadas com nível 1 utilizando também padrões de referência. Além disso, os dados da biblioteca mostram a necessidade de estudos fitoquímicos e metabolômicos do gênero *Spondias* por outras técnicas, além de GC-MS.

Com as condições de extração otimizadas e padronizadas, foram obtidas as impressões digitais metabólicas dos extratos por UHPLC-ESI-HRMS. As impressões digitais permitiram a identificação dos marcadores metabólicos nos extratos de folhas, cascas e galhos das espécies *S. mombin* e *S. tuberosa*. Os marcadores dos galhos e cascas são o ácido gálico e o ácido cítrico. Já as folhas de *S. mombin* apresentam como marcadores o ácido anacárdico C17:3, ácido elágico e derivados da quercetina, enquanto as folhas de *S. tuberosa* apresentam a rutina, os ácidos anacárdicos C17:1, C17:2, C13 e canferol-3-O-rutinosídeo.

No caso de *S. mombin*, os fatores meteorológicos apresentaram uma influência mais significativa nos perfis metabólicos das folhas do que o local de procedência do seu material genético. Nesse caso, os flavonoides estão inversamente correlacionados com a nebulosidade e diretamente relacionados com a temperatura no momento da coleta das folhas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAEK, S.H.; KO, J.; LEE, J.H.; KIM, C.; LEE, H.; NAM, D.; LEE, J.; LEE, S.; YANG, W.M.; UM, J.; SETHI, G.; AHN, K.S. Ginkgolic acid inhibits invasion and migration and tgf-b-induced emt of lung cancer cells through PI3K/Akt/mTOR inactivation. **Journal of Cellular Physiology**, p. 346-354, 2017a.

BAEK, S.H.; LEE, J.H.; KIM, C.; KO, J.; RYU, S.; LEE, S.; YANG, W.M.; UM, J.; CHINNATHAMBI, A.; ALHARBI, S.A.; SETHI, G.; AHN, A.S. Ginkgolic acid C 17:1, derived from *Ginkgo biloba* leaves, suppresses constitutive and inducible STAT3 activation through induction of PTEN and SHP-1 tyrosine phosphatase. **Molecules**, v. 22, p. 276-288, 2017b.

BEISKEN, S.; EIDEN, M.; SALEK, R.M. Getting the right answers: understanding metabolomics challenges. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 15, n. 1, p. 97–109, 2015.

BLAŽENOVIC, I.; KIND, T.; JI, J.; FIEHN, O. Software tools and approaches for compound identification of LC-MS/MS data in metabolomics. **Metabolites**, v. 8, p. 31-54, 2018

BRERETON, R.G. **Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant**. Chichester, England: John Wiley & Sons Ltd., 2003

CHATTERJEE, S.; DHANURDHAR; ROKHUM, L. Extraction of a cardanol based liquid bio-fuel from waste natural resource and decarboxylation using a silver-based catalyst. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 72, p. 560–56, 2017.

CHIBLI, L.A.; ROSA, A.L.; NONATO, M.C.; DA COSTA, F.B. Untargeted LC-MS metabolomic studies of Asteraceae species to discover inhibitors of Leishmania major dihydroorotate dehydrogenase. **Metabolomics**, v. 15, p. 59-81, 2019.

CORDEIRO, B.M.P.C.; CARVALHO JUNIOR, A.R.; SANTOS, J.R.A., ARAÚJO, A.D.; SILVA, A.G.; CORREIA, M.T.S.; SILVA, M.V.; NAPOLEÃO, T.H.; SILVA, L.C.N.; SANTOS, N.D.L.; PAIVA, P.M.G. Anticryptococcal activity of hexane extract

from *Spondias tuberosa* Arruda and associated cellular events. **Journal de Mycologie Médicale**, v.30, n. 2, 2020.

CORDEIRO, B.M.P.C.; SANTOS, N.D.L.; FERREIRA, M.R.A.; ARAÚJO, L.C.C.; CRVALHO JUNIOR, A.R.; SANTOS, A.D.C.; OLIVEIRA, P.; SILVA, A.G.; FALCÃO, E.P.S.; CORREIRA, M.T.S.; ALMEIDA, J.R.G.S.; SILVA, L.C.N.; SOARES, L.A.L.; NAPOLEÃO, T.H.; SILVA, M.V.; PAIVA, P.M.G. Hexane extract from *Spondias tuberosa* (Anacardiaceae) leaves has antioxidant activity and is an anti-*Candida* agent by causing mitochondrial and lysosomal damages **BMC Complementary and Alternative Medicine**, n. 18, p. 284-294, 2018.

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

DE LIMA, M.A.C.; SILVA, S.M.; OLIVEIRA, V.R. **Exotic Fruits Reference Guide**, 1st edition. Academic Press, p. 427-433, 2018.

DE VASCONCELOS, A.L.; DE VASCONCELOS, A.L.; RANDAUL, K.P. Pharmacognostic Characterization of *Spondias mombin* L. (Anacardiaceae). **Pharmacognosy Journal**, v. 8, n. 6, p. 513–519, 2016.

DEWICK, P.M. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach**, 3rd edition. The Atrium, Southern Gate, West Sussex, United Kingdom: John Wiley & Sons, Inc, 2009.

DUDZIK, D.; BARBAS-BERNARDOS, C.; GARCÍA, A. Quality assurance procedures for mass spectrometry untargeted metabolomics. a review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 147, n. 5, p. 149-173, 2018.

ELUFIOYE, T.O.; OBUOTOR, E.M.; AGBEDAHUNSI, J.M.; ADESANYA, S.A. Anticholinesterase constituents from the leaves of *Spondias mombin* L. (Anacardiaceae). **Biologics: Targets and Therapy**, v. 11, p. 107-114, 2017.

FRASER, D.P., SHARMA, A., FLETCHER, T. ET AL. UV-B antagonises shade avoidance and increases levels of the flavonoid quercetin in coriander (*Coriandrum sativum*). **Scientific Reports**, v. 7, p. 17758-17769, 2017.

GUIMARÃES, A.L.; OLIVEIRA, A.P.; SILVA, G.S.F.S.; BEZERRA, G.S.; SOUZA, I.; ALMEIDA, J.R.G.S.; RODRIGUES, J.D.S.; ALENCAR FILHO, J.M.T.; ARAÚJO, E.C.C. Gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS) analysis of the constituents of the fixed oils obtained from the barks, leaves and stems of *Spondias tuberosa* Arruda (Anacardiaceae). **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 12, n. 8, p. 89-95, 2018.

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

HAMAD, F.B. & MUBOFU, E.B. Potential biological applications of bio-based anacardic acids and their derivatives. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, p. 8569-8590, 2015.

HAMDOUN, S & EFFERTH, T. Ginkgolic acids inhibit migration in breast cancer cells by inhibition of NEMO sumoylation and NF- κ B activity. **Oncotarget**, v. 8, n. 21, p. 35103-35115, 2017.

HERMS, D.A. & MATTSON, W.J. The dilemma of plants: to grow or defend. **Quarterly Review of Biology**, v. 67, p. 283-335, 1992.

HWANG, D.; KANG, M.J.; KANG, C.W.; KIM, G.D. Kaempferol-3-O- β -rutinoside suppresses the inflammatory responses in lipopolysaccharide stimulated RAW264.7 cells via the NF κ B and MAPK pathways. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 44, n. 6, p. 2321-2328, 2019.

JUNFENG YANG, WENJUN SHI, BINBIN LI, YONGCHAO BAI, ZHIXIA HOU. Preharvest and postharvest UV radiation affected flavonoid metabolism and antioxidant capacity differently in developing blueberries (*Vaccinium corymbosum* L. **Food Chemistry**, V. 301, p. 125248-125259, 2019

KESSNER, C.; CHAMBERS, M.; BERKE, R.; AGUS, D.; MALLICK, P. ProteoWizard: open source software for rapid proteomics tools development. **Bioinformatics**, v. 24, n. 21, p. 2534-2536, 2008.

LEE, J.; KIM, Y.; RYU, S.H.; CHO, M.H.; LEE, J. Ginkgolic acids and *Ginkgo biloba* extract inhibit *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* biofilm formation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 174, p. 47-55, 2014.

LI, D.; HEILING, S.; BALDWIN, I.T.; GAQUEREL, E. Illuminating a plant's tissue-specific metabolic diversity using computational metabolomics and information theory. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 7, p. 610-618, 2016.

LI, X.; DENG, F.; SHAN, X.; PAN, J.; YU, P.; MAO, Z. Effects of the molluscicidal agent GA-C13:0, a natural occurring ginkgolic acid, on snail mitochondria. **Pesticide Biochemistry and Physiology** v. 103, p. 115-120, 2012.

LIN, C.; WU, F.; ZHENG, T.; WANG, X.; CHEN, Y.; WU, X. Kaempferol attenuates retinal ganglion cell death by suppressing NLRP1/NLRP3 inflammasomes and caspase-8 via JNK and NF- κ B pathways in acute glaucoma. **Eye**, v. 33, p. 777–784, 2019.

LIU, R.; CHOU, J. HOU, S.; LIU, X.; YU, J.; ZHAO, X.; LI, Y.; LIU, L.; SUN, C. Evaluation of two-step liquid-liquid extraction protocol for untargeted metabolic profiling of serum samples to achieve broader metabolome coverage by UPLC-Q-TOF-MS. **Analytica Chimica Acta**, v. 1035, n. 4, p. 96-107, 2018.

LOBO, A.M.; LOURENÇO, A.M. **Biossíntese de Produtos Naturais**, 1st edition, Lisboa, Portugal: IST Press, 2007.

LU, J.; YAN, S.; JAMALUDDIN, S.; WEAKLEY, S.M.; LIANG, Z.; SIWAK, E.; YAO, Q.; CHEN, A.C. Ginkgolic acid inhibits HIV protease activity and HIV infection in vitro. **Medical Science Monitor**, v. 18, n. 8, p. 293-298, 2012.

MACHADO, C.F.; OLIVEIRA, V.R.; MAIA, M.C.C.; ALVES, R.M.; RITZINGER, R.; SOARES FILHO, W.S.; FONSECA, N. Banco ativo de germoplasma de Spondias da Embrapa. **Sistema de Gestão do Acervo Documental e Digital da Embrapa**, 2015.

MCKEY, C. Adaptive patterns in alkaloid physiology. **American Naturalist**, v. 108, p. 305-320, 1974.

MITCHELL, J.D.; DALY, C.D. A revision of *Spondias* L. (Anacardiaceae) in the Neotropics. **PhytoKeys**, v. 55, p. 1-92, 2015

MOHIMANI, H., GUREVICH, A., SHLEMOV, A. ET AL. Dereplication of microbial metabolites through database search of mass spectra. *Nature Communications* v. 9, p. 4035-4047, 2018.

NEIENS, S.D.; GEIBLITZ, S.M.; STEINHAUS, M. Aroma-active compounds in *Spondias mombin* L. fruit pulp. **European Food Research Technology**, v. 243, p. 1073–1081, 2017.

OH, J.; HWANG, I.H.; HONG, C.; LYU, S.; NA, M. Inhibition of fatty acid synthase by ginkgolic acids from the leaves of *Ginkgo biloba* and their cytotoxic activity. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, 2013; 28(3): 565–568

OHNMEISS, T.E.; & BALDWIN, I.T. Optimal Defense Theory Predicts the Ontogeny of an Induced Nicotine Defense. **Ecology**, v. 81, n. 7, p. 1765-1783, 2000.

OSUNTOKUN, O.T.; CRISTINA, G.M. Bio-guided isolation, chemical purification, identification, antimicrobial and synergistic efficacy of extracted essential oils from stem bark extract of *Spondias mombin* (Linn). **International Journal of Molecular Biology** Open Access, v. 4, n. 4, p. 135–143, 2019.

PADILLA-GONZALEZ, G.F.; FREY, M.; GÓMEZ-ZELEDÓN, J.; DA COSTA, F.B.; SRING, O. Metabolomic and gene expression approaches reveal the developmental and environmental regulation of the secondary metabolism of yacón (*Smallanthus sonchifolius*, Asteraceae). **Scientific Reports**, v. 9, p. 13178, 2019.

PELL, S.K., MITCHELL, J.D., LOWRY, P.P., RANDRIANASOLO, A., URBATSCH, L.E. Phylogenetic split of malagasy and african taxa of *Protorhus* and *Rhus* (Anacardiaceae) based on cpDNA trnL–trnF and nrDNA ETS and ITS. **Sequence Data Systematic Botany**, v. 33, n. 2, p. 375–383, 2008.

PEREIRA, F.M.V. & PEREIRA-FILHO, E.R. Aplicação de programa computacional livre em planejamento de experimentos: um tutorial. **Química Nova**, v. 41, n. 9, p. 1061-1071, 2018.

PINU, F.R. & VILLAS-BOAS, S.G. Extracellular microbial metabolomics: the state of the art. **Metabolites**, v.7, p. 43-61, 2017.

PURANIK, N.V.; SRIVASTAVA, P.; BHATT, G.; MARY, D.J.S.J.; LIMAYE, A.M.; SIVARAMAN, J. Determination and analysis of agonist and antagonist potential of naturally occurring flavonoids for estrogen receptor ($\text{eR}\alpha$) by various parameters and molecular modelling approach. **Scientific Reports**, v. 9, p. 7450-7461, 2019.

RHOADES, D.F.; **Evolution of plant chemical defense against herbivores. Herbivores: their interaction with secondary plant metabolites**. Academic Press, Orlando, Fla, p. 4-55, 1979.

RIABI-CHEBBI, I.; SOUID, S.; OTHMAN, H.; HAOUES, M.; KAROUI, H.; MOREL, A.; SRAIRI-ABID, N.; ESSAFI, M.; ESSAFI-BENKHADIR, K. The Phenolic compound Kaempferol overcomes 5-fluorouracil resistance in human resistant LS174 colon cancer cells. **Scientific Reports**, v. 9, p. 195-215, 2019.

RYCKEWAERT, L.; SACCONNAY, L.; CARRUPT, P.; NURISSO, A.; SIMÕES-PIRES, C. Non-specific SIRT inhibition as a mechanism for the cytotoxicity of ginkgolic acids and urushiols. **Toxicology Letters**, v. 229, p. 374–380, 2014.

SACRAMENTO, C.K. do; SOUZA, F.X. **Cajá (*Spondias mombin* L.)**. Jaboticabal: Funep, 2000.

SANTOS, V.; ALMEIDA, C. The complete chloroplast genome sequences of three *Spondias* species reveal close relationship among the species. **Genetics and Molecular Biology**, v. 42, n. 1, p. 132-138, 2019.

SANTOS, VANESSA & ALMEIDA, CÍCERO. The complete chloroplast genome sequences of three *Spondias* species reveal close relationship among the species. **Genetics and Molecular Biology**, v. 42, n. 1, p. 132-138, 2019.

SEVERIANO A.; CARRIÇO, J.A.; ROBINSON, D.A; RAMIREZ, M.; PINTO, F.R. Evaluation of jackknife and bootstrap for defining confidence intervals for pairwise agreement measures. **PloS one**, v. 6, n. 5, p. e19538, 2011.

SHAMLOO, M., BABAWALE, E. A., FURTADO, A., HENRY, R. J., ECK, P. K., & JONES, P. Effects of genotype and temperature on accumulation of plant secondary metabolites in Canadian and Australian wheat grown under controlled environments. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 9133-9146, 2017.

SILVEIRA, C.; OLIVEIRA, F.; SANTOS, M.L.; FREITAS, T.; IMPARATO, J.C.; MAGALHÃES, A.C. Anacardic acid from brazilian cashew nut trees reduces dentine erosion. **Caries Research**, n. 48, p. 549–556, 2014.

SIQUEIRA, E.M.S.; FELIX-SILVA, J.; ARAÚJO, L.M.L.; FERNANDES, J.M.; CABRAL, B.; GOMES, J.A.S.; ROQUE, A.A.; TOMAZ, J.C.; LOPES, N.P.; FERNANDES-PEDROSA, M.F.; GIORDANI, R.B.; ZUCOLOTTI, S.M. *Spondias tuberosa* (Anacardiaceae) leaves: profiling phenolic compounds by HPLC-DAD and LC–MS/MS and in vivo anti-inflammatory activity. **Biomedical Chromatography**, v.30, p. 1656–1665, 2016.

SIQUEIRA, E.M.S; LIMA, T.L.C; BOFF, L.; LIMA, S.G.M.; LOURENÇO, E.M.G.; FERREIRA, E.G.; BARBOSA, E.G.; MACHADO, P.R.L.; FARIAS, K.J.S.; FERREIRA, L.S.; ROCHA, H.A.O.; SIMÕES, C.M.O. Antiviral potential of *Spondias mombin* L. leaves extract against herpes simplex virus type-1 replication using in vitro and in silico approaches. **Planta Medica**, v.86, n. 7, p. 505-515, 2020.

SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J.J.; DOLAN, J.W. **Introduction to Modern Liquid Chromatography. 3rd edition**. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc. p. 523-525, 2010.

VAN DEN BERG, R.A; HOEFSLOOT, H.C.; WESTERHUIS, J.A.; SMILDE, A.K.; VAN DER WERF, M.J. Centering scaling, and tranformations: improving the biological information content of metabolomics data. **BMC Genomics**, n. 7, p. 142, 2006.

VERPOORTE, R.; CHOI, Y.H.; KIM, H.K. Ethnopharmacology and systems biology: a perfect holistic match. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 53-56, 2005.

VILLALBA, J.M. & ALCAÍN, F.J. Sirtuin activators and inhibitors. **Biofactors**, v. 38, n. 5, p. 349-359, 2012.

WANNAN, B. S. Analysis of generic relationships in Anacardiaceae. **Blumea - Biodiversity, Evolution and Biogeography of Plants**, v. 51, n. 1, p. 165–195, 2006.

WILSON, B.A.P.; THORNBURG, C.C.; HENRICH, C.J.; GRKOVIC, T.; O'KEEFE, B.R. Creating and screening natural products libraries. **Natural Product Reports**, v. 37, p. 893-918, 2020.

WOLINSKA, K.W. & BERENS, M.L. Optimal defense theory 2.0: tissue-specific stress defense prioritization as an extra layer of complexity. **Communicative & Integrative Biology**, v. 12, n. 1, p. 91–95, 2019.

YAN, Y.; STODDARD, F.F.; NEUGART, S.; SADRAS, V.O.; LINDFORS, A.; MORALES, O.L.; APHALO, P.J. Responses of flavonoid profile and associated gene expression to solar blue and UV radiation in two accessions of *Vicia faba* L. from contrasting UV environments. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 18, p. 434-447, 2019.

YANG, L.; WEN, K.S.; RUAN, X.; ZHAO, Y.X.; WEI, F.; WANG, Q. Response of Plant Secondary Metabolites to Environmental Factors. **Molecules** v. 23, p. 762-788, 2018.

YANG, X.; WANG, Y.; LI, Y.; MA, H. Thermal stability of ginkgolic acids from Ginkgo biloba and the effects of ginkgol C17:1 on the apoptosis and migration of SMMC7721 cells. **Fitoterapia**, v. 98, p. 66–76, 2014.

YONEKAWA, M.; SHIMIZU, M.; KANEKO, A.; MATSUMURA, J.; TAKAHASH, H. Suppression of R5-type of HIV-1 in CD4+ NKT cells by V δ 1+ t cells activated by flavonoid glycosides, hesperidin and linarin. **Scientific Reports**, v. 9, p. 7506-7518, 2019.

YOU, W.; ZHENG, W.; WEISS, S.; CHUA, K.F.; STEEGBORN, C. Structural basis for the activation and inhibition of Sirtuin 6 by quercetin and its derivatives. **Scientific Reports**, v. 9, p. 19176-19187, 2019.

ZWICKER, J.I.; SCHLECHTER, B.L.; STOPA, J.C.; LIEBMAN, H.A.; AGGARWAL, A.; PULIGANDLA, M.; CAUGHEY, T.; BAUER, K.A.; KUEMMERLE, N.; WONG, E.L.; WUN, T.; MCLAUGHLIN, M.; HIDALGO, M.; NEUBERG, D.; FURIE, B.; FLAUMENHAFT, R. Targeting protein disulfide isomerase with the flavonoid isoquercetin to improve hypercoagulability in advanced cancer. **JCI Insight**, v. 4, p. 4-16, 2019.