



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA  
E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS (PPGCTA)



**Liziane Valgoi Spinelli**

**ABORDAGEM METABOLÔMICA NO ESTUDO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DE  
GENÓTIPOS DE GUABIJU (*Myrcianthes pungens* (O. Berg) D. Legrand)**

**PORTO ALEGRE**

**2022**

**Liziane Valgoi Spinelli**

**ABORDAGEM METABOLÔMICA NO ESTUDO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DE  
GENÓTIPOS DE GUABIJU (*Myrcianthes pungens* (O. Berg) D. Legrand)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos como um dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Eliseu Rodrigues

PORTO ALEGRE

2022

## CIP - Catalogação na Publicação

Spinelli, Liziane Valgoi  
ABORDAGEM METABOLÔMICA NO ESTUDO DE COMPOSTOS  
FENÓLICOS DE GENÓTIPOS DE GUABIJU (*Myrcianthes pungens*  
(O. Berg) D. Legrand) / Liziane Valgoi Spinelli. --  
2022.  
86 f.  
Orientador: Eliseu Rodrigues.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia  
de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e  
Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, BR-RS, 2022.

1. Compostos fenólicos. 2. Frutas nativas. 3.  
Metabolômica. 4. Guabiju. I. Rodrigues, Eliseu,  
orient. II. Título.

Liziane Valgoi Spinelli

**DISSERTAÇÃO**

ABORDAGEM METABOLÔMICA NO ESTUDO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DE GENÓTIPOS DE  
GUABIJU (*Myrcianthes pungens* (O. Berg) D. Legrand)

Submetida como parte dos requisitos para obtenção do grau de

**MESTRE EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA)

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, RS, Brasil.

Aprovada em: ..../..../....

Homologada em: ..../..../....

Pela Comissão Examinadora:

Por:

.....  
Prof. Dr. Eliseu Rodrigues  
Orientador – PPGCTA/UFRGS

.....  
Prof. Dr. Eliseu Rodrigues  
Coordenador – PPGCTA/UFRGS

.....  
Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Juliane Welke  
PPGCTA/UFRGS

.....  
Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Simone Hickmann Flôres  
Diretora - ICTA/UFRGS

.....  
Prof. Dr. Renan Chisté  
UFPA

.....  
Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Sabrina Somacal  
UFSM

## RESUMO

As frutas nativas do Rio Grande do Sul, com destaque para as Mirtáceas, vêm sendo estudadas devido ao seu potencial na agricultura e para a saúde dos consumidores. Dentre estas frutas, o guabiju se destaca pela alta concentração de compostos fenólicos (CF), os quais possivelmente contribuem para as propriedades funcionais, sensoriais e de defesa da planta. Neste trabalho, os CF de sete genótipos de guabiju foram analisados e uma abordagem metabolômica direcionada foi aplicada para explorar as suas similaridades e diferenças em relação a esses metabólitos. Sessenta e sete compostos fenólicos foram encontrados em todos os genótipos, os quais estão classificados em seis classes: ácidos fenólicos, taninos hidrolisáveis, flavan-3-óis, flavonóis, antocianinas e taninos condensados. Cerca de 80% desses compostos foram encontrados pela primeira vez no guabiju, com destaque para os ácidos galoilquínicos, encontrados na forma mono-, di- e trigaloilquínico. Além desses, elagitanos (taninos hidrolisáveis), derivados do hexahidroxi-difenil-glicose (HHDP) foram encontrados pela primeira vez no guabiju. Um total de vinte e quatro CF foram quantificados, dos quais os ácidos di-O-galoilquínico (701 a 1324  $\mu\text{g g}^{-1}$  em massa seca), tri-O-galoilquínico (572 a 973  $\mu\text{g g}^{-1}$ ), malvidina 3-O-glicosídeo (696 a 1448  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) e cianidina 3-O-glicosídeo (799 a 1319  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) são os majoritários. A análise dos CF quantificados através de agrupamento hierárquico e análise de componentes principais (ACP) permitiu agrupar os genótipos em sete grupos de acordo com a sua composição fenólica. Através da análise do coeficiente de *Silhouette* foi possível inferir onze compostos fenólicos como os mais importantes nos agrupamentos e na diferenciação dos genótipos, dos quais nós destacamos seis (em ordem decrescente de importância): epicatequina, catequina, galato de (epi)galocatequina II, ácido di-O-galoilquínico, ácido tri-O-galoilquínico e delphinidina 3-O-glicosídeo. Por fim, nossos achados foram relacionados com os resultados obtidos por outro grupo de pesquisadores analisando a resistência dos mesmos genótipos de guabiju afetados pela ferrugem causada pelo fungo *Austropuccinia psidii*. Foi possível hipotetizar que as diferentes sensibilidades dos genótipos à doença estão relacionadas à combinação única desses CF destacados em cada genótipo. Por exemplo, o genótipo G05, muito bem separado dos demais genótipos em relação à sua composição fenólica, foi o menos afetado pela infestação fúngica, enquanto que os genótipos G03 e G09 foram os mais afetados.

**Palavras-chave:** compostos bioativos, ácidos fenólicos, frutas, espectrometria de massas

## ABSTRACT

The native fruits from Rio Grande do Sul state, emphasizing the Myrtaceae family, have been studied due to their potential in agriculture and public health. Guabiju is one of them and stands out because of the high concentration of phenolic compounds (PC), which possibly contribute to the functional, sensory, and self-defense properties of the plant. In this study, guabiju seven genotypes PC were analyzed and a targeted metabolomics approach was applied to explore similarities and differences in these metabolites. Sixty-seven phenolic compounds were found in all genotypes, which are classified into six classes: phenolic acids, hydrolysable tannins, flavan-3-ols, flavonols, anthocyanins, and condensed tannins. About 80% of these compounds were found for the first time in guabiju, highlighting galloylquinic acids found as mono-, di-, and trigalloylquinic. Ellagitannins (hydrolyzable tannins), derived from hexahydroxydiphenoyl-D-glucose (HHDP), were identified for the first time in guabiju as well. Twenty-four PC quantified as the majority are di-O-galloylquinic acid (701 to 1324  $\mu\text{g g}^{-1}$  in dry weight), tri-O-galloylquinic acid (572 to 973  $\mu\text{g g}^{-1}$ ), malvidin 3-O-glucoside (696 to 1448  $\mu\text{g g}^{-1}$ ), and cyanidin 3-O-glucoside (799 to 1319  $\mu\text{g g}^{-1}$ ). The analysis of PC quantified through hierarchical clustering and principal component analysis (PCA) allowed to group the genotypes into seven clusters according to their phenolic composition. Based on the Silhouette Index, it was possible to select eleven phenolic compounds as the most important in the clustering and differentiation of genotypes, of which we highlight six (in decreasing order of importance): epicatechin, catechin, (epi)gallocatechin gallate II, di-O-galloylquinic acid, tri-O-galloylquinic acid, and delphinidin 3-O-glucoside. Finally, our findings were related to the results obtained by another group of researchers analyzing the resistance of the same guabiju genotypes affected by rust caused by *Austropuccinia psidii*. We hypothesize that the different genotypes' sensitivities to the disease are related to the unique combination of these FC highlighted in each genotype. For example, the G05, very well separated from the other genotypes in terms of its phenolic composition, was the least affected by fungal infestation, while the G03 and G09 genotypes were the most affected.

**Keywords:** bioactive compounds, phenolic acid, fruit, mass spectrometry

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	9
2. OBJETIVOS .....	11
2.1 Objetivo Geral .....	11
2.2 Objetivos Específicos .....	11
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	12
3.1 Compostos fenólicos (CF) .....	12
3.1.1 Flavonoides .....	13
3.1.2 Não flavonoides .....	15
3.2 Importância dos compostos fenólicos para as plantas .....	17
3.3 Influência do genótipo na composição fenólica das plantas .....	18
3.4 Compostos fenólicos e seus benefícios à saúde .....	19
3.5 Metabolômica .....	22
3.6 Guabiju ( <i>Myrcianthes pungens</i> (O. Berg) D. Legrand) .....	25
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	30
4.1 Reagentes e padrões analíticos .....	30
4.2 Amostragem .....	30
4.3 Metabolômica direcionada ( <i>targeted</i> ) .....	32
4.3.1 Preparo das amostras .....	33
4.3.2 Extração dos CF .....	35
4.3.3 Análise dos compostos fenólicos por HPLC-DAD-ESI-qTOF-MS/MS .....	35
4.3.4 Identificação .....	36
4.3.5 Quantificação .....	36
4.3.6. Análise Multivariada .....	38
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	41
5.1. LC-MS/MS based targeted metabolomic shows phenolic composition variation among seven Guabiju genotypes .....	41
6. DISCUSSÃO GERAL .....	74
7. CONCLUSÃO GERAL .....	76
REFERÊNCIAS .....	77

## 1. INTRODUÇÃO

O Rio Grande do Sul (RS) possui mais de 213 tipos de árvores frutíferas nativas, dentre as quais destacam-se as da família Myrtaceae. As características e o potencial dessas frutas foram relatados em uma revisão recente, a qual deixou claro que a maioria dessas frutas é pouco conhecida e explorada, apesar de muitas delas possuírem potencial para o uso sustentável e com agregação de valor à agroindústria local (BRACK et al., 2020a). Algumas mirtáceas já possuem registros de venda *in natura* em mercados e feiras de agricultores, como pitanga (*Eugenia uniflora*), araçá (*Psidium cattleianum*), guabiroba (*Campomanesia xanthocarpa*), goiabeira-serrana (*Acca sellowiana*) e jabuticaba (*Plinia peruviana*) (KÖHLER, 2014).

O guabiju (*Myrcianthes pungens* (O. Berg) D. Legrand) é uma fruta pequena (1,5 a 1,8 cm de diâmetro), com coloração violeta escura quando madura, contendo polpa açucarada, aromática e casca um pouco adstringente. Possui 90% de água em sua composição, baixa concentração de proteína e lipídios (ambos <1%), alta quantidade de fibras (~7%) e concentração de ácido ascórbico semelhante à laranja. Sua ocorrência no Brasil vai desde o estado de São Paulo até o Rio Grande do Sul e atinge parte de outros países como Paraguai, Uruguai e Argentina (BRACK et al., 2020b; SCHULZ et al., 2020). Recentemente, uma revisão de FARIAS et al. (2020) enfatizou o alto valor nutricional, diversidade de compostos bioativos e os benefícios à saúde atribuídos às mirtáceas.

Na literatura há trabalhos relatando a composição fenólica e também a capacidade antioxidante *in vitro* do Guabiju. A cor característica da casca é resultado da mistura das antocianinas delphinidina, cianidina, petunidina, peonidina e malvidina em suas formas glicosiladas. Além disso, diversos compostos fenólicos não antociânicos já foram relatados, entre eles: ácido gálico, catequina, epigalocatequina, isoquercitrina e kaempferol (ANDRADE et al., 2011; BETTA et al., 2018; DALLA NORA et al., 2014a; DETONI et al., 2021; SERAGLIO et al., 2017). A capacidade antioxidante *in vitro* já foi reportada frente aos radicais ABTS e DPPH assim como a atividade antiquimiotática do extrato metanólico do guabiju (ANDRADE et al., 2011). Além disso, um estudo *in vivo* mostrou que o guabiju pode reverter os efeitos da hipercolesterolemia induzida por cisplatina em ratos Wistar machos (DALLA NORA et al., 2014b). Provavelmente, os compostos fenólicos do guabiju contribuem para os efeitos benéficos atribuídos ao seu consumo.



O teor e o perfil qualitativo dos compostos fenólicos em uma planta são dependentes de diversos fatores, tanto intrínsecos (origem genética) como extrínsecos (solo, clima, método de cultivo e estocagem) (ESEBERRI et al., 2022). Alguns trabalhos demonstraram que damasco, sorgo e trigo da mesma espécie e de diferentes genótipos, possuem composições fenólicas únicas tanto quantitativas como qualitativas (SOCHOR et al., 2010; WANG et al., 2020; XIONG et al., 2020). Uma maior produção de compostos fenólicos ou de tipos específicos possui, pelo menos, dois aspectos relevantes: (1º) aumento da proteção da planta frente a agentes agressores, tais como fungos e (2º) aumento das propriedades funcionais da fruta, com importância para a saúde dos consumidores (PÉREZ-BURILLO et al., 2018; TALHAOUI et al., 2015).

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi aplicar uma abordagem metabolômica direcionada (*targeted*) para explorar diferenças e similaridades entre sete genótipos de guabiju. Por fim, destacamos que os mesmos genótipos estão sendo estudados paralelamente em relação à sua sensibilidade à ferrugem causada pelo fungo *Austropuccinia psidii*. Assim, em alguns momentos no texto, esses resultados serão referidos.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho é aplicar uma abordagem metabolômica direcionada (*targeted*) para explorar diferenças e similaridades entre sete genótipos de guabiju.

### 2.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos deste trabalho são:

- Identificar e quantificar os compostos fenólicos por HPLC-DAD-ESI-qTOF-MS/MS;
- Aplicar uma abordagem metabolômica *targeted* para diferenciar os genótipos de guabiju em relação à sua composição fenólica.

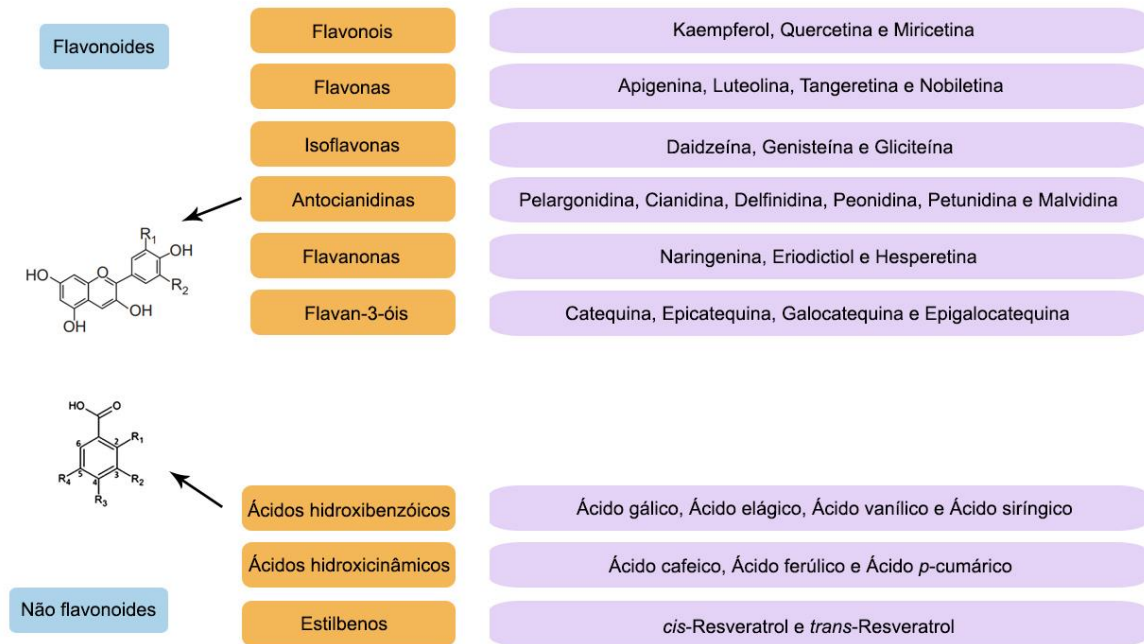
### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Compostos fenólicos (CF)

Os compostos fenólicos possuem ao menos um anel aromático com, pelo menos, um grupo hidroxila ligado na sua estrutura. Quando há mais de um anel aromático, eles podem ser chamados de polifenóis. Essas moléculas são ubíquas em plantas, onde atuam principalmente no sistema de defesa da planta. As plantas respondem a várias condições de estresse através da acumulação de compostos fenólicos. A especificidade destes compostos fenólicos depende do tipo de estressor e também da espécie de planta. Por exemplo, o estresse induzido por luz leva a biossíntese de ácidos fenólicos e flavonoides (CROZIER; JAGANATH; CLIFFORD, 2009).

Na literatura foram relatados mais de dez mil compostos fenólicos, os quais variam desde moléculas simples, como o ácido hidroxibenzoico, até moléculas de elevada massa molecular, como os taninos. Considerando as suas características estruturais, os compostos fenólicos podem ser classificados em dois grandes grupos: flavonoides e não flavonoides (NOLLET; GUTIÉRREZ-URIBE, 2018).

O grupo dos flavonoides é o mais numeroso, sendo encontrado principalmente na epiderme das folhas e nas cascas de frutas. Em relação aos não flavonoides, os ácidos fenólicos são mais significantes e podem ser produzidos pelas plantas como resposta a patógenos, doenças ou estresse climático (CROZIER; JAGANATH; CLIFFORD, 2009). As classes de compostos fenólicos e os principais exemplos de subclasses podem ser vistos na **Figura 1** e são aprofundados a seguir.

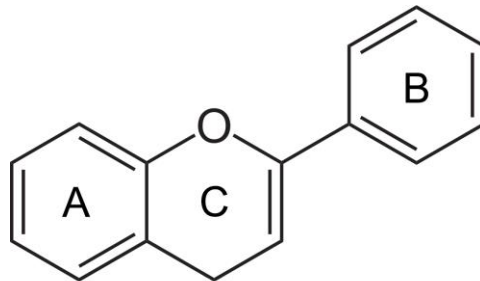


**Figura 1.** Classes e principais subclasses de compostos fenólicos

Fonte: Autora

### 3.1.1 Flavonoides

Contendo 15 carbonos, a estrutura básica dos flavonoides é composta de dois anéis aromáticos (A e B) e um anel com 3 carbonos (C central) como visto na **Figura 2**. Substituições no anel C geram 6 classes de flavonoides: flavonóis, flavonas, isoflavonas, antocianidinas, flavanonas e flavan-3-óis. Ainda, diferentes radicais nestas estruturas geram novas subclasses como visto anteriormente na **Figura 1** (DE LA ROSA et al., 2019).



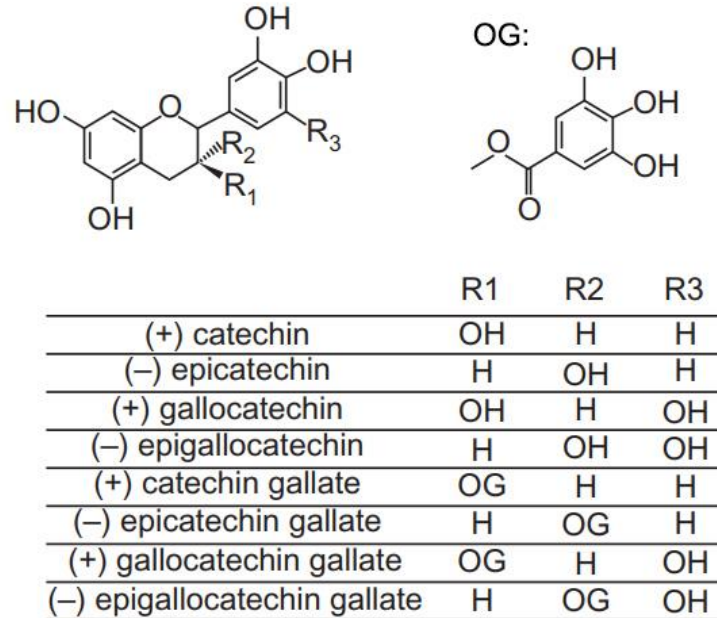
**Figura 2.** Estrutura básica dos flavonoides

A classe dos flavonóis é a mais abundante dos flavonoides estando presente em todo o reino vegetal com exceção às algas. São encontrados na natureza principalmente na forma glicosilada (CROZIER; JAGANATH; CLIFFORD, 2009). Um exemplo é a quercetina, encontrada principalmente em cebolas, maçãs e frutas tipo *berry*. O kaempferol é outro flavonol amplamente encontrado em plantas e está presente em alimentos como brócolis, morango e uva. Dentre as flavonas, destacam-se luteolina e apigenina por serem as mais encontradas em alimentos como grãos de trigo e azeite de oliva, principalmente glicosiladas (DURAZZO et al., 2019). Desempenhando um papel importante na proteção contra microrganismos nocivos às plantas, as isoflavonas estão presentes quase que exclusivamente em leguminosas e seus teores ficam elevados quando expostas ao stress climático. Genisteína e daidzeína são as isoflavonas mais encontradas e a principal fonte é a soja (KŘÍŽOVÁ et al., 2019).

As antocianidinas são encontradas na natureza principalmente em sua forma glicosilada, quando são chamadas de antocianinas. Elas são pigmentos naturais que proporcionam uma coloração que varia do vermelho ao roxo e estão presentes principalmente nas cascas de frutas como uva, morango e maçã. São encontradas também em pétalas de flores, onde são responsáveis pela pigmentação. Um papel importante das antocianinas nas plantas é a proteção contra radiação UV, visto que possuem forte absorção nessa região do espectro eletromagnético. Também tornam as plantas mais atrativas aos polinizadores e aos animais dispersores de sementes, auxiliando assim na propagação das espécies (MATTIOLI et al., 2020).

Encontradas principalmente em frutas cítricas, as flavanonas mais encontradas são as formas glicosiladas de hesperetina e naringeninas. Conjugações destes compostos com neohesperidosídeos causam amargor em algumas variedades de laranjas (CROZIER; JAGANATH; CLIFFORD, 2009; LI et al., 2022). Diferente de outros flavonoides, a classe dos flavan-3-óis é encontrada em sua maioria na forma aglicona e é representada principalmente pelos monômeros catequina e epicatequina bem como seus derivados representados na **Figura 3**. O chá verde é um exemplo de bebida com quantidade significativa de flavan-3-óis, majoritariamente galato de epigalocatequina, o que faz esta bebida ter alta capacidade antioxidante (BRAICU et al., 2013). Os polímeros de flavan-3-óis são chamados de proantocianidinas (taninos condensados) pois quando submetidos à hidrólise, como a ácida, liberam

antocianidinas livres. São encontrados em diversos alimentos como chocolate, vinho e ameixa (DE LA ROSA et al., 2019).



**Figura 3.** Exemplo de estrutura dos flavan-3-óis e radicais que originam os derivados de catequina e epicatequina

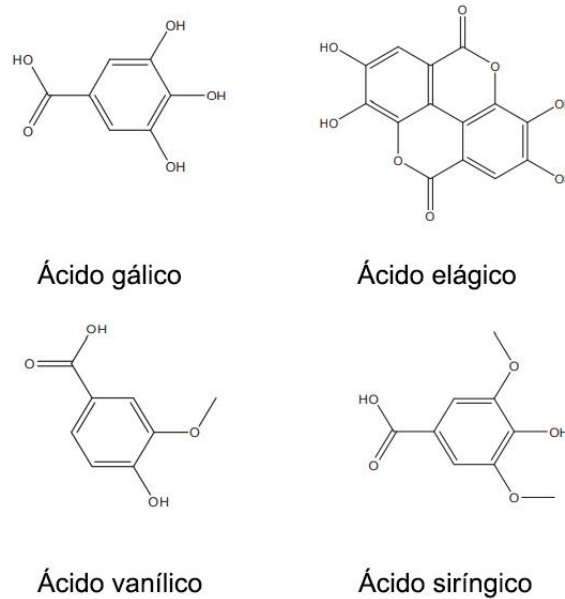
Fonte: Adaptado de DE LA ROSA et al. (2019)

### 3.1.2 Não flavonoides

O grupo dos ácidos fenólicos é o mais abundante dos não flavonoides e compreende os ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinâmicos. Os ácidos hidroxibenzoicos são derivados do ácido benzóico e os compostos principais desta classe incluem os ácidos gálico, elágico, siríngico e vanílico sendo que suas diferenças estruturais são principalmente em seus anéis aromáticos. A **Figura 4** mostra algumas destas estruturas químicas (RASHMI; NEGI, 2020). O ácido gálico é o mais comum dentre os ácidos fenólicos e está presente em alimentos como uvas, mangas e nos chás verde e preto (CROZIER; JAGANATH; CLIFFORD, 2009). Estruturas complexas formadas a partir de ácido gálico (galotaninos) ou ácido elágico (elagitaninos) esterificados com as hidroxilas de um açúcar central, são chamadas de taninos hidrolisáveis. Estes compostos são encontrados em frutas como romã e framboesa além de cereais como cevada e aveia. (MIN et al., 2003; NOLLET; GUTIÉRREZ-URIBE, 2018).

Os ácidos hidroxicinâmicos são abundantes no reino vegetal e são caracterizados por um grupo fenilpropanóide (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>) com uma ligação dupla na cadeia lateral onde pode incluir os ácidos cafeico, ferúlico, sinápico e cumárico. A esterificação destes compostos com outros ácidos como o quínico, dão origem aos ácidos clorogênicos assim como seus derivados. O café é a principal fonte deste grupo de compostos no consumo humano (LEONARD et al., 2021).

Os estilbenos, também pertencentes ao grupo dos não flavonoides, são representados pelo resveratrol em suas isomerias *trans* e *cis* presentes principalmente nos vinhos e cascas de uvas e em menor quantidade em amendoim e pistache. O teor de estilbenos nas plantas tende a aumentar com alta exposição de luz UV (DE LA ROSA et al., 2019).



**Figura 4.** Diferenças estruturais dos ácidos hidroxibenzoicos

Fonte: Adaptado de RASHMI (2020)

### 3.2 Importância dos compostos fenólicos para as plantas

Os compostos fenólicos atuam nas plantas principalmente as protegendo de danos externos como mudanças climáticas, pragas e doenças. A exposição à luz UV, principalmente, a alta exposição à luz UV-B, pode causar danos no DNA das plantas e em suas estruturas proteicas além da geração de espécies reativas de oxigênio (EROS). Diversos compostos fenólicos, principalmente flavonoides, possuem capacidade de absorver esta radiação prevenindo o dano oxidativo. Como consequência, plantas com maior exposição a estas condições sintetizam maiores quantidades de compostos fenólicos por meio de enzimas específicas, nomeadamente a *flavonol synthase* (FLS) e a *flavonoid glycosyltransferases* (FGT) (SHARMA et al., 2019). Em especial, algumas antocianinas também podem absorver a luz visível, principalmente quando aciladas com ácidos fenólicos. Antocianinas aciladas são encontradas principalmente em folhas. Além disso, as antocianinas protegem as plantas em situações de carência de nutrientes. Na deficiência de nitrogênio e fosfato inorgânico, importantes para a fotossíntese, ocorre o acúmulo de antocianinas prevenindo a senescência das folhas (LANDI; TATTINI; GOULD, 2015).



Os taninos são compostos importantes na defesa de plantas contra o ataque de pragas por atuarem como agentes antidigestivos, o qual está relacionado com a sua capacidade de ligação com proteínas. Isto afeta diretamente o desenvolvimento larval podendo reduzir infestações de insetos em plantações. Além disso, ácidos tânicos possuem agentes tóxicos que podem evitar o ataque de pragas como o gafanhoto (BARBEHENN; PETER CONSTABEL, 2011). A reprodução e o desenvolvimento de lagartas também são negativamente afetados quando se alimentam de plantas com altos níveis de glicosídeos fenólicos (BOECKLER; GERSHENZON; UNSICKER, 2011).

Alguns compostos fenólicos possuem a capacidade de proteger as plantas contra doenças causadas por microrganismos. Monoterpenos fenólicos como carvacrol e timol podem danificar as membranas fúngicas impedindo a ação patogênica (WANG et al., 2019). As doenças causadas por bactérias patogênicas como a podridão mole, por exemplo, é um grande problema para o cultivo de frutas e vegetais. Compostos fenólicos como os ácidos cumárico e salicílico são capazes de diminuir a expressão dos genes que causam a virulência nas bactérias do gênero *Pectobacterium*, causadoras destas doenças (JOSHI et al., 2016).

A polinização e a dispersão de sementes são fatores importantes para a perpetuação de espécies vegetais. Flavonóis como o kaempferol e a quercetina auxiliam no desenvolvimento do pólen funcional de plantas (SHARMA et al., 2019). Ao menos 30% das plantas secretam néctar com compostos fenólicos. Além disso, as características sensoriais de flores e frutas (cor, aroma e sabor), influenciadas pela concentração de compostos fenólicos, são indispensáveis para a atração de insetos polinizadores como abelhas e vespas e animais dispersores de sementes (DE LA ROSA et al., 2019; ZHANG; YANG; ZHANG, 2016).

### 3.3 Influência do genótipo na composição fenólica das plantas

O genótipo de uma planta consiste na sua base genética enquanto que o fenótipo se refere às características tanto do genótipo quanto das interações com o meio ambiente. Ao contrário da variabilidade genética, a variabilidade ambiental que a planta sofre não é hereditária e os fatores que a influenciam incluem as características do solo, temperatura, umidade, radiação solar e outros fatores externos

à planta. No melhoramento de plantas, genes com resistências específicas podem ser selecionados. Cultivares de uma mesma espécie diferem entre si devido a seleções feitas para garantir as características desejadas nas plantações (SINGH; SINGH; SINGH, 2021b). Por definição, germoplasma é qualquer subamostra com capacidade de manter geração após geração as características genéticas de uma população. O termo acesso, por sua vez, designa as amostras de germoplasma que representam a variação genética de uma população e foram registradas em um banco de germoplasma (SILVA, 2008). O termo subamostra vêm substituindo o termo acesso pela orientação técnica nº 2 de 30 de outubro de 2003 do Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN, 2003).

Há na literatura estudos que investigaram as particularidades nas composições químicas de amostras de mesma espécie com diferentes genótipos, acessos ou cultivares. O perfil dos compostos fenólicos é uma variável que tem se mostrado única para cada tipo de genótipo. Por exemplo, em 21 diferentes genótipos de damasco, SOCHOR et al. (2010) encontraram uma variação de mais de 300% na concentração de compostos fenólicos. Em outro estudo, analisando 31 cultivares de uvas, estes parâmetros variaram mais de 600% (XIA et al., 2019). Em raízes de sálvia vermelha, ZHAO et al.(2016) identificaram que tanto o mesmo genótipo produzido em diferentes locais como distintos genótipos em uma mesma plantação possuem diferenças em seus metabólitos.

Se tratando do guabiju, ANDRADE et al. (2011) analisaram dois genótipos e uma amostra selvagem da fruta, ambos no mesmo local de produção. O teor de compostos fenólicos foi diferente entre as amostras. O teor antocianinas totais, por exemplo, variou em cerca de 50% entre as três amostras apesar de todas terem a cianidina 3-glucosídeo como majoritária.

### 3.4 Compostos fenólicos e seus benefícios à saúde

Diversos componentes alimentares vêm sendo estudados ao longo dos anos por possuírem efeitos benéficos à saúde. Nos anos 80, o termo “alimento funcional” foi designado no Japão para fontes alimentares ricas em compostos que auxiliam na manutenção da saúde e prevenção de doenças. Estes alimentos, hoje mais de 300, são conhecidos no Japão como FOSHU, o que significa “alimentos para uso em

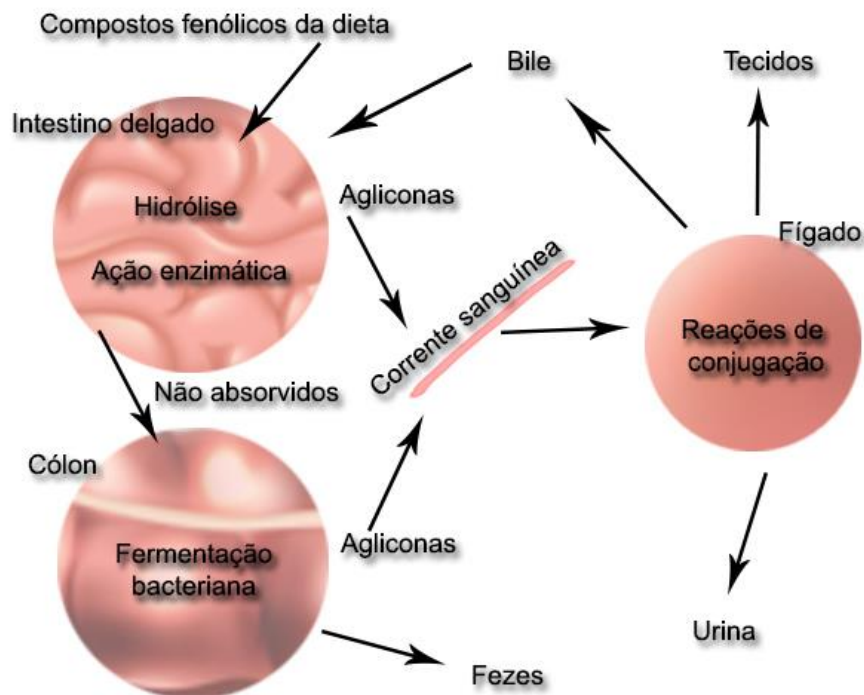
saúde” (AHMAD et al. 2020) . O avanço dos estudos envolvendo compostos fenólicos e seu potencial na saúde humana acompanha o avanço da tecnologia analítica e é frequentemente relacionado com a redução do risco de várias doenças crônicas não-transmissíveis (NOLLET et al. 2018).

Por hipótese, existe uma relação entre o consumo de alimentos ricos em compostos fenólicos e a melhora da saúde em humanos. Diversas frutas tipo *berries* já foram objeto de estudo na última década relacionando seus compostos fenólicos aos possíveis benefícios à saúde humana. Por exemplo, o extrato de amora rico em antocianinas utilizado em um estudo de DAI et al. (2007), foi capaz de inibir o crescimento de células cancerígenas provenientes do cólon humano (HT-29). Já as proantocianidinas presentes no *cranberry*, junto com a frutose da fruta, foram capazes de reduzir a adesão da bactéria *Escherichia coli* de células do tecido epitelial da uretra (T24) em um estudo de ERMEL et al. (2012), sugerindo possível proteção em quadros de infecção urinária. Um estudo mais recente, NTEMIRI et al. (2020) analisou *in vitro* um modelo de cólon humano com fermentação simulada juntamente a suplementação de polifenóis extraídos do mirtilo. A fermentação suplementada com antocianinas, flavonóis e proantocianidinas resultou em uma diversidade microbiana muito semelhante aquela onde foi utilizada uma mistura prebiótica com fibras e açúcares.

Com relação aos estudos *in vivo* utilizando humanos, apesar de escassos, existem alguns trabalhos relacionando o consumo de compostos fenólicos com alguns benefícios à saúde. Por exemplo, ao administrar 66 mg de isoflavonas de soja diariamente por 6 meses em 120 mulheres em início de menopausa, SATHYAPALAN et al.(2018) encontraram uma redução principalmente nos níveis séricos de insulina e glicemia em jejum e da pressão arterial sistólica quando comparado ao grupo que recebeu placebo. Em um estudo de LEYVA-SOTO et al. (2018) com 84 adultos, o grupo que consumiu diariamente 2 g de chocolate 70% cacau rico em flavonoides, por 6 meses, teve redução significativa dos níveis séricos de triglicerídeos e colesterol total. O mesmo não aconteceu com o grupo que consumiu chocolate ao leite, com menor concentração de flavonoides. Em um ensaio randomizado controlado mais recente de FRANCK et al. (2020), um grupo de 59 adultos foi submetido a uma intervenção nutricional onde consumiram 280 g de framboesa congelada diariamente por 8 semanas. O perfil da expressão gênica foi conduzido e 43 genes se diferenciaram no grupo da intervenção em relação ao controle. Destes genes, vários

foram relacionados com a sinalização de rotas metabólicas envolvidas no sistema imune humano.

Os benefícios atribuídos aos compostos fenólicos são diretamente relacionados à biodisponibilidade após sua ingestão. No intestino delgado, a absorção destes compostos pode variar de 5% a 10% do total consumido. Moléculas glicosiladas ou sensíveis a enzimas digestivas são transformadas em agliconas e logo absorvidas nesta primeira parte intestinal onde passam para a corrente sanguínea. Fatores como baixa solubilidade e a resistência ao ácido gástrico diminuem a permeabilidade intestinal fazendo com que cheguem ao cólon não totalmente digeridos. A fração não digerida no intestino delgado, em sua maioria os compostos fenólicos ligados à matriz, ainda possui benefícios à microbiota intestinal pois age como um “prebiótico” a ser metabolizado pelas bactérias. O produto do metabolismo destas bactérias gera novos compostos como os ácidos graxos de cadeia curta, o que torna o ambiente antioxidante. Este pode ser o mecanismo mais provável que explica os demais benefícios atribuídos até então aos compostos fenólicos. Esta rota bioquímica da absorção dos compostos fenólicos no corpo humano pode ser vista na **Figura 5**. (DE SOUZA et al. 2019; SAURA-CALIXTO, 2018; MARÍN et al. 2015).



**Figura 5.** Rota bioquímica da absorção dos compostos fenólicos no corpo humano

Fonte: Adaptado de MARÍN et al. (2015)

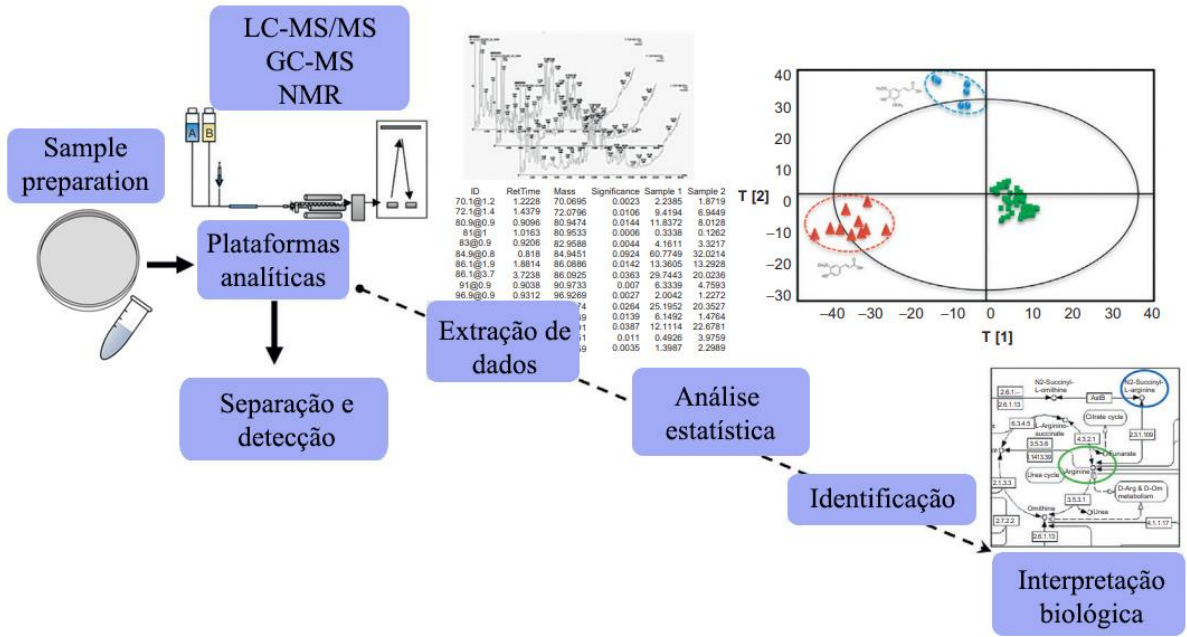
### 3.5 Metabolômica

Os produtos do metabolismo de uma amostra biológica são chamados de metabólitos e o conjunto destes, de metaboloma cuja massa molecular é inferior a 1500 Da. A análise abrangente e quantitativa do metaboloma de um sistema biológico é chamada de metabolômica que pode ser dividida entre as abordagens *untargeted* (global) e *targeted* (alvo). A abordagem *untargeted* se trata de uma análise exploratória onde se objetiva a extração de dados que podem ser utilizados como biomarcadores. Na abordagem *targeted*, se utilizam metabólitos de interesse a fim de serem identificados em diferentes amostras (BARNES et al. 2016).

Recentemente, algumas revisões exploraram as várias aplicações da metabolômica na área de alimentos. A segurança de alimentos foi abordada em um estudo de LI et al. (2021), que enfatizou este tipo de análise para detectar diversos contaminantes como patógenos, toxinas e resíduos químicos em diversas matrizes como frutas, carnes e bebidas. Além disso, como descrito por UTPOTT et al. (2022), a metabolômica é uma abordagem muito utilizada atualmente para definir as mudanças que ocorrem nos metabólitos durante o processamento dos alimentos como aquecimento, tratamento enzimático e fermentação. A diferenciação de genótipos e cultivares de plantas também é possível através deste tipo de análise. Isto é possível pela identificação e quantificação dos metabólitos de cada amostra associada com a análise multivariada dos resultados obtidos. Por exemplo, em um estudo de WANG et al. (2020), 5 cultivares de trigo foram divididos em 4 grupos tendo como critério a composição de flavonoides de cada amostra. A diferença na expressão dos genes que estão envolvidos na biossíntese de flavonoides foi o principal diferencial em cada variedade e suas diferentes pigmentações. De forma semelhante, esta abordagem também pode ser aplicada para determinar a origem geográfica de alimentos devido a seus biomarcadores fenólicos. Em um estudo de GHISONI et al. (2020), foi investigado o possível efeito de diferentes condições climáticas em mesmos cultivares de avelãs cultivados em diferentes países. Antocianinas e flavan-3-óis foram os principais marcadores para distinguir amostras provenientes da Geórgia, Chile ou Itália devido a abundância ou exclusividade de metabólitos.

Para uma análise qualitativa e quantitativa dos milhares de compostos de um metaboloma, a técnica mais poderosa é a espectrometria de massas (MS) acoplada a métodos cromatográficos onde é possível fazer a separação dos componentes da amostra bem como caracterizar individualmente os metabólitos. As características da amostra e os metabólitos de interesse definirão a plataforma a ser trabalhada. Em matrizes vegetais, por exemplo, é comum o uso da cromatografia líquida (LC) para analisar extratos, os quais são centrifugados previamente com o objetivo de remover as partículas sólidas da amostra (CUBERO-LEON et al. 2013). A análise por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (HPLC-MS) possui alta especificidade em estudos de metabolômica identificando biomarcadores de interesse (MEDINA et al. 2019).

O fluxo de trabalho na análise metabolômica pode ser visto na **Figura 6**. Previamente, é realizado o preparo adequado para a natureza da amostra que pode incluir a extração dos metabólitos com uso de solvente adequado. As plataformas analíticas consistem na cromatografia (líquida ou gasosa) acoplada à espectrometria de massas realizando a separação e detecção dos compostos, respectivamente. A ressonância magnética nuclear (NMR) também é muito utilizada. Com a extração destes dados, a análise estatística multivariada dos dados é feita com auxílio de *software*. Por fim, a identificação e interpretação dos metabólitos encontrados é possível através da consulta bibliográfica, biblioteca de banco de dados e *software* (SUSSULINI, 2017) .



**Figura 6.** Fluxo de trabalho na análise metabolômica

Fonte: Adaptado de JEAN-LOUIS SEBADIO (2014)

### 3.6 Guabiju (*Myrcianthes pungens* (O. Berg) D. Legrand)

Guabiju (*Myrcianthes pungens* (O. Berg) D. Legrand) também conhecida pelos nomes populares guabiroba-açu, guavira-guaçu, guabira-guaçu, guajará-da-várzea e seu nome indígena wa'bi (comestível) yu (amarelo), é uma fruta nativa brasileira pertencente à família Myrtaceae. O guabijuzeiro não possui expressão econômica no país, porém, é amplamente cultivado em pomares domésticos, assim como outras árvores da mesma família como pitangueira, jaboticabeira e araçazeiro. Ocorre desde o estado de São Paulo até o Rio Grande do Sul, alcançando parte do Uruguai, Argentina, Paraguai e Bolívia. Pode ser consumida *in natura* ou ser utilizada para preparações como sucos e geleias (LORENZI, 2008; RASEIRA et al. 2004). Além disso, a aplicação do guabiju na indústria vêm sendo estudada como em formulações de sorvetes (DETONI, 2020).

O guabijuzeiro é caracterizado por ter um tronco tortuoso com cerca de 60 centímetros de diâmetro e pode chegar até 20 metros de altura. Suas folhas são simples com até 7 centímetros de comprimento e uma ponta espinhosa. O florescimento ocorre entre outubro e novembro embora podem haver alternâncias na produção das flores que são muito atrativas aos insetos polinizadores como abelhas e mamangavas. Os frutos, parte comestível da planta, possuem sabor agradável e são caracterizados por bagas pubescentes com aspecto aveludado e de forma oblata. No estágio de maturação plena, seu exterior é violeta e o interior, alaranjado (**Figura 7**). A época de colheita pode variar de acordo com o clima porém é mais comum que ocorra em janeiro e fevereiro (LORENZI, 2008; RASEIRA et al. 2004).

Do ponto de vista nutricional, é uma fruta rica em potássio que é o elemento majoritário. Em menores concentrações possui magnésio, cálcio, cobre, ferro, manganês e zinco (DETONI et al. 2021). A **Tabela 1** mostra estes e outros componentes nutricionais dos frutos de guabiju encontrados na literatura. Por ser rica em açúcares e sólidos solúveis e ter baixa acidez, é considerada uma fruta doce (DALLA NORA et al. 2014a) .





**Figura 7.** Guabiju em estágio pleno de maturação

Fonte: Gustavo Giacon

**Tabela 1.** Composição nutricional dos frutos de guabiju

<b>Nutriente</b>	<b>Concentração (g 100 g<sup>-1</sup>)</b>
Proteínas	0.56-0.93
Lipídios	0.05-0.41
Carboidratos	12,4
Frutose	7,61
Glucose	6,04
Fibras	6,22-6,72
Potássio	1614*
Cálcio	52,1*
Magnésio	78,2*
Sódio	52,1*
Vitamina C	69,4*

\* Micronutrientes expressos em mg 100 g<sup>-1</sup>

Fonte: SCHULZ et al. (2020)

A **Tabela 2** mostra a relação dos principais estudos exploratórios encontrados sobre o guabiju e seus compostos bioativos. Os compostos fenólicos totais já foram analisados por alguns autores que encontraram valores semelhantes a outras frutas brasileiras como pitanga, acerola e jabuticaba. No estágio total de maturação, estes valores tendem a ser maiores podendo variar conforme influência de fatores ambientais (ANDRADE et al., 2011; BETTA et al., 2018; DETONI et al., 2021). Em um estudo de BETTA et al., (2018), foi encontrado o ácido gálico como o composto fenólico mais abundante seguido de isoquercitrina. No estudo de SERAGLIO et al., (2017), o guabiju apresentou maiores valores de compostos fenólicos se comparado com as frutas jabuticaba e jambolão dando destaque aos compostos quercetina, ácido gálico e isoquercitrina em ordem decrescente. Ainda neste estudo, os frutos com estágio intermediário de maturação apresentaram uma maior concentração de compostos fenólicos.

Quanto às antocianinas, em um estudo de DALLA NORA et al. (2014), o guabiju apresentou majoritariamente malvidina 3-glicosídeo seguida de delphinidina 3-glicosídeo e cianidina 3-glicosídeo. O valor total de antocianinas foi maior quando comparado com a fruta araçá vermelho. Após hidrólise ácida, ANDRADE et al. (2011) encontraram 5 antocianidinas sendo elas delphinidina, cianidina, petunidina, peonidina e malvidina. Dentre elas, a majoritária foi a cianidina. Neste mesmo estudo, o valor de antocianinas em três diferentes amostras de guabiju variou de 33 a 53 mg 100 g<sup>-1</sup>.

Em relação aos carotenoides, o majoritário encontrado no guabiju foi o  $\beta$ -caroteno seguido de  $\beta$ -criptoxantina. A abundância destes carotenoides na fruta foi relatada como tendo influência sobre a sua capacidade antioxidante (DALLA NORA et al., 2014a).

Alguns estudos avaliaram a capacidade antioxidante *in vitro* dos frutos de guabiju pelos métodos DPPH, ABTS, FRAP e inibição da produção de radical hidroxila. O alto conteúdo de compostos bioativos foi relacionado com a alta capacidade antioxidante desta fruta. Ainda, o estágio intermediário de maturação resultou em maior capacidade antioxidante (ANDRADE et al., 2011; BETTA et al., 2018; DALLA NORA et al., 2014b; SERAGLIO et al., 2017). Em um estudo *in vivo*, NORA et al., (2014) analisaram os efeitos do consumo de guabiju e araçá vermelho na hipercolesterolemia em ratos. A alimentação com guabiju resultou em menores

níveis séricos de colesterol total e LDL oxidado devido principalmente a quantidade de fibras e a capacidade antioxidante respectivamente. Além disso, o consumo de guabiju resultou em proteção contra estresse oxidativo causado por cisplatina.

Os óleos essenciais do guabiju são caracterizados pela riqueza em  $\beta$ -cariofileno, germacreno D e biciclogermacreno (MARIN et al., 2008). No óleo proveniente das folhas frescas de guabiju, foram encontrados 36 constituintes. O majoritário foi o mesmo encontrado na fruta fresca ( $\beta$ -cariofileno) seguido do composto  $\beta$ -elemeno (APEL; SOBRAL; HENRIQUES, 2006).

**Tabela 2.** Estudos que relataram os compostos bioativos do guabiju

<b>Título</b>	<b>Técnica de Análise</b>	<b>Metabólitos encontrados</b>	<b>Referência</b>
Phenolic Compounds Determined by LC-MS/MS and In Vitro Antioxidant Capacity of Brazilian Fruits in Two Edible Ripening Stages	LC-MS/MS (LC: Agilent 1290, ESI, QTRAP: AB Sciex)	Flavonoides: Catequina, Galato de epigallocatequina, Isoquercitrina, Kaempferol, Naringenina, Pinobanksin, Quercetina. Ácidos fenólicos: p-cumárico, 3,4-dihidroxibenzóico, Gálico, Siríngico	(BETTA et al., 2018)
Nutritional and bioactive potential of Myrtaceae fruits during ripening	LC-MS/MS (LC: Agilent 1290, ESI, QTRAP: AB Sciex)	Flavonoides: Catequina, Galato de epigallocatequina, Epicatequina, Isoquercitrina, Isoramnetina, Kaempferol, Naringenina, Quercetina, Pinobanksin, Pinocebrina. Ácidos fenólicos: Cafeico, Clorogênico, p-cumárico, 3,4-dihidroxibenzóico, Ferúlico, Gálico, Salicílico, Sináptico, Siríngico	(SERAGLIO et al., 2017)
The characterisation and profile of the bioactive compounds in red guava ( <i>Psidium cattleianum</i> Sabine) and guabiju ( <i>Myrcianthes pungens</i> (O. Berg) D. Legrand)	HPLC (HPLC: Agilent 1100)	Carotenoides: $\beta$ -caroteno, All-trans-luteína, Zeaxantina, $\beta$ -Criptoxantina, $\alpha$ -caroteno Antocianinas: Glicosídeos de Delfinidina, Cianidina e Malvidina; Cloretos de Cianidina, Peonidina e Malvidina.	(DALLA NORA et al., 2014a)
Phenolic Composition in Different Genotypes of Guabiju Fruits ( <i>Myrcianthes pungens</i> ) and Their Potential as Antioxidant and Antichemotactic Agents	HPLC (HPLC: Waters 2695)	Antocianidinas: Delfinidina, Cianidina, Petunidina, Peonidina e Malvidina Flavonoides: Isoquercitrina, Quercitrina e Hiperosídeo	(ANDRADE et al., 2011)

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Reagentes e padrões analíticos

Os seguintes reagentes e solventes foram utilizados: água ultrapura, acetonitrila grau HPLC (J.T. Baker), metanol grau HPLC (J.T. Baker), ácido fórmico P.A. (Neon), carbonato de sódio (Neon) e reagente *Folin-Ciocalteu* (Synth). A água ultrapura foi obtida usando o sistema de purificação Milli-Q da Millipore Co. (Massachusetts, USA). As fases móveis foram filtradas em sistema de filtração com filtros de acetato de celulose e politetrafluoretileno (PTFE) para fase aquosa e orgânica, respectivamente.

Um total de 17 padrões analíticos de compostos fenólicos foram utilizados, nomeadamente: ácido cafeico, ácido 5-cafeoilquínico, ácido elágico, ácido ferúlico, ácido gálico, ácido hidroxibenzóico, ácido *p*-cumárico, ácido vanílico, apigenina, catequina, daidzeína, epicatequina, naringenina, quercetina, rutina, punicalagina e cianidina 3-O-glucosídeo (pureza  $\geq 90\%$ , Sigma-Aldrich).

### 4.2 Amostragem

Os sete genótipos de guabiju foram doados pela Estação Experimental Agronômica (EEA) da UFRGS. Eles fazem parte de um projeto cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) com o código AE7A83F. Os genótipos são originados de sementes coletadas de plantas matrizes de três municípios do Rio Grande do Sul. Com estas sementes foram feitas as mudas que foram cultivadas na Estação Experimental Agronômica (EEA) da UFRGS, no município de Eldorado do Sul – RS (30°06'59" de latitude Sul e 51°40'02" de longitude Oeste com altitude média de 60 metros acima do nível do mar). Na **Tabela 3** são apresentados os sete genótipos utilizados nesse estudo com os seus respectivos números de registro no herbário da UFRGS no Instituto de Ciências Naturais (ICN), locais de coleta das sementes e georreferências.

A região de Eldorado do Sul possui o solo do tipo Argissolo Vermelho Distrófico Típico, apresentando relevos planos a ondulados (STRECK, E.V.; KÄMPF, N.; DALMOLIN, R.S.D.; KLAMT, E.; NASCIMENTO, P.C. DO; SCHNEIDER, P.;

GIASSON, E.; PINTO, 2008). O clima desta região é subtropical úmido, classificado como Cfa no sistema de classificação climática de Köppen. A temperatura varia entre 8,5 e 30,2 °C com a média anual de 18,8 °C. A umidade relativa do ar anual é de 77% e a precipitação média anual é de 1.455 mm (BERGAMASCHI; et al., 2013).

Na EEA, a alocação das mudas foi feita em 2013 com um espaçamento de 7,0 x 6,0 m e a cada duas plantas de guabijueiro, foi plantada uma muda de bracatinga (*Mimosa scabrella*). O local não possui sistema de irrigação e a fertilização foi feita apenas no momento do plantio. Aplicações de fungicidas e herbicidas foram feitas nos anos de 2019 e 2020, fora da safra de colheita das amostras. Entretanto, os pomares de guabijueiro estão próximos a plantações de frutas cítricas e maracujá onde aplicações destes tratamentos são feitas.

A coleta dos frutos foi realizada entre janeiro e março de 2021 sob o critério de maturação plena (código 89 da Escala BBCH) avaliado pela coloração violeta da casca. Quase todos os frutos de cada planta foram colhidos, descartando aqueles com sinais de ruptura na casca. Após a colheita, os frutos foram separados em caixas plásticas a fim de evitar injúrias e transportados imediatamente em caixas de isopor com gelo para a UFRGS, onde foram armazenados em freezer (-18°C).

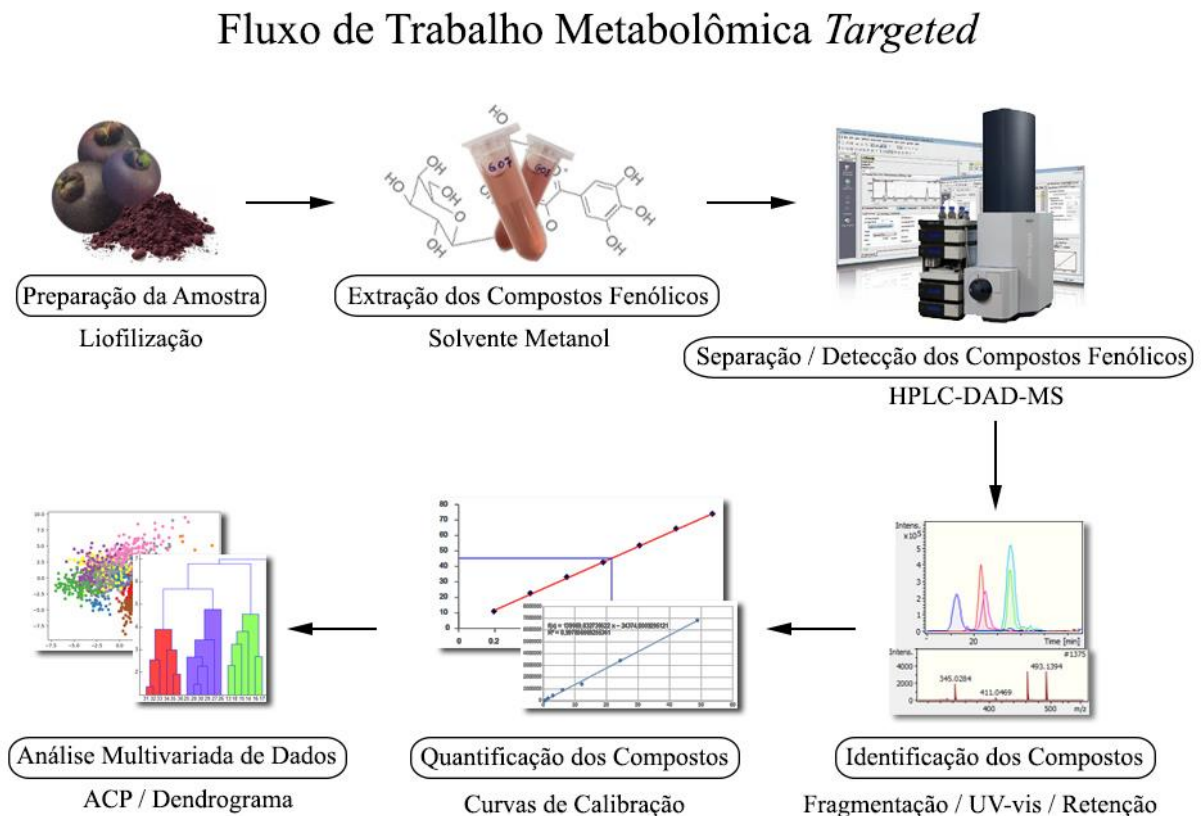
**Tabela 3.** Informações sobre os sete genótipos utilizados no trabalho

Genótipos	ICN	Local de coleta das sementes	Georreferencias
G03	175148	Guabiju	28°S 32' 47,3" 51°W 42' 11,8"
G04	175153	Guabiju	28°S 32' 31,5" 51°W 41' 22,6"
G05	NC*	Porto Alegre	30°S 00' 04,3" 51°W 09' 38,9"
G06	175157	Bento Gonçalves	29°S 09' 47,9" 51°W 31' 07,0"
G07	175152	Guabiju	28°S 32' 31,6" 51°W 41' 27,7"
G08	175151	Guabiju	28°S 32' 24,6" 51°W 41' 24,5"
G09	175156	Bento Gonçalves	29°S 09' 47,9" 51°W 31' 07,0"

\* NC: Não catalogado até o momento

### 4.3 Metabolômica direcionada (*targeted*)

No esquema da **Figura 8** é representado o fluxo de trabalho aplicado na análise de metabolômica direcionada dos compostos fenólicos (CF) do guabiju.



**Figura 8.** Fluxo de trabalho aplicado na análise de metabolômica direcionada (*targeted*)

Fonte: Autora

#### 4.3.1 Preparo das amostras

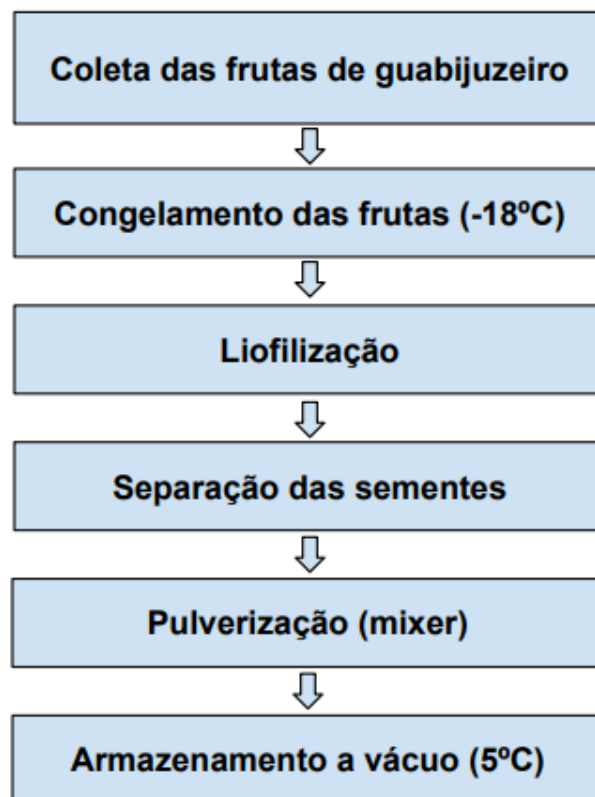
As amostras de guabiju foram congeladas por 2 h à  $-80^{\circ}\text{C}$  em ultrafreezer e depois foram liofilizadas. A liofilização (E-C Modulyo, Thermo, EUA) ocorreu por 5 dias à  $-60^{\circ}\text{C}$  e  $300\ \mu\text{mmHg}$ . Após serem liofilizadas, as frutas foram separadas manualmente das sementes e pulverizadas em processador doméstico (DG-01, Mondial, Brasil), resultando em uma amostra de fruta em pó (**Figura 9**). Posteriormente, a fruta em pó foi embalada a vácuo (SVC 200, Sulpack, Brasil) em pacotes de polietileno e armazenadas sob refrigeração ( $5^{\circ}\text{C}$ ) em caixa fechada com sílica até o momento das análises. O fluxograma da amostragem pode ser visto na **Figura 10**.





**Figura 9.** Exemplo de amostra de guabiju liofilizada e pulverizada

Fonte: Autora



**Figura 10.** Fluxograma da amostragem dos genótipos de guabiju

Fonte: Autora

#### 4.3.2 Extração dos CF

A extração dos CF teve como referência o método descrito previamente por RODRIGUES; MARIUTTI e MERCADANTE (2013). A extração foi realizada a partir de 0,5 g de fruta em pó adicionando 5 mL de uma mistura de metanol (MeOH) e água (H<sub>2</sub>O) (MeOH:H<sub>2</sub>O 8:2, v/v) acidificada com 0,35 % de ácido fórmico. Essa mistura foi agitada em vortex (Phoenix Luferco, 3800 rpm) por 3 minutos e centrifugada (Centrífuga HITACHI) a 25.000 g por 5 minutos (4 °C). Foram feitas três extrações unificando os sobrenadantes para cada amostra. Os extratos produzidos foram filtrados em filtros para seringa PTFE (hidrofílico) de 0,22 µm antes das análises. O procedimento foi feito em hexaplicata.

#### 4.3.3 Análise dos compostos fenólicos por HPLC-DAD-ESI-qTOF-MS/MS

Os compostos fenólicos foram analisados através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) utilizando HPLC da Shimadzu (Quioto, Japão), contendo um detector de arranjo de diodos SPD-M20A (DAD) e acoplado a um espectrômetro de massas (MS) da Bruker Daltonics (micrOTOF-Q III, Bremen, Alemanha) com fonte de ionização electrospray (ESI) e analisador de massas quadrupolo-tempo de voo (q-TOF).

As condições de separação cromatográfica foram descritas previamente por RODRIGUES; MARIUTTI e MERCADANTE (2013). Os compostos fenólicos foram separados em uma coluna Phenomenex C18 de 4 µm (250 x 4,6 mm), fluxo de 0,7 mL min<sup>-1</sup> a 35 °C, com fase móvel consistindo em água ultrapura (acidificada com 0,1% de ácido fórmico) (fase móvel A) e acetonitrila (acidificada com 0,1% de ácido fórmico) (fase móvel B) em gradiente linear. Foram realizadas pequenas modificações em relação ao método referenciado, no fluxo da fase móvel (0,9 para 0,7 mL min<sup>-1</sup>), temperatura (29 para 35 °C) e concentração de ácido fórmico (0,5 para 0,1%).

A fonte ESI foi operada nas seguintes condições: modos negativo e positivo de ionização, voltagem do capilar de 4000 V, faixa de varredura (*scan range*) de *m/z* 50 a 1000, temperatura e fluxo do gás (N<sub>2</sub>) secante de 310 °C e 8 L min<sup>-1</sup>, pressão do gás nebulizador de 4 bar. A fragmentação dos compostos fenólicos foi realizada no modo

automático com *threshold* de 1500 *counts* e com a definição de três íons precursoros. A calibração do equipamento foi realizada semanalmente com formiato de sódio como calibrante. Além disso, para cada corrida uma calibração interna foi realizada com esse mesmo calibrante.

#### 4.3.4 Identificação

A identificação foi realizada utilizando duas abordagens. A primeira foi uma análise manual onde os seguintes parâmetros foram considerados: massa acurada, padrão de fragmentação e ordem de eluição em coluna C18. Essas informações foram comparadas com os resultados dos padrões utilizados, dados encontrados na literatura e a biblioteca MassBank of North America (MoNA). O software utilizado para o processamento dos dados brutos foi a DataAnalysis (Bruker Daltonics). Na segunda abordagem, utilizou-se o software Sirius 4 para auxiliar na identificação dos compostos fenólicos. Esse software identifica moléculas com base no padrão isotópico e no padrão de fragmentação. As duas abordagens permitiram identificar os compostos com diferentes níveis de confiança (SCHYMANSKI et al., 2014), nomeadamente L1 a L5.

#### 4.3.5 Quantificação

Os CF foram quantificados por padronização externa, utilizando as informações originadas da análise por HPLC-DAD. As 17 curvas analíticas foram construídas na faixa de concentração de 0,35 até 105 mg L<sup>-1</sup> com 5 a 8 pontos. A única exceção foi a cianidina 3-O-glicosídeo, representante das antocianinas, onde a curva foi construída com concentrações entre 0,15 a 25 mg L<sup>-1</sup> por ser um padrão de uso único. Resumidamente, os padrões foram pesados (0,010 g) diretamente em balão volumétrico de 10 mL e dissolvidos em metanol grau HPLC, o que deu origem às soluções estoque. As concentrações das curvas foram preparadas através da diluição da solução estoque com uma solução 1:1 (v/v) da fase móvel A (água acidificada com 0,1 % de ácido fórmico) e B (acetonitrila acidificada com 0,1% de ácido fórmico). Para o preparo de cianidina 3-O-glicosídeo foram pesados aproximadamente 5 mg de padrão, o qual foi dissolvido em metanol acidificado (0,1 % de ácido clorídrico). A

determinação da concentração de cianidina 3-O-glicosídeo foi realizada pela leitura da absorbância a 529 nm e utilizando o coeficiente de absorvidade molar ( $\epsilon$ ) 34300 (GIUSTI; WROLSTAD, 2001).

Na **Tabela 4** há um resumo dos principais parâmetros das curvas analíticas construídas para os 17 padrões de compostos fenólicos. Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram determinados de acordo com a metodologia da *European Medicines Agency* (EMA) (ICH - EMA, 1995) e foram considerados os valores já com o erro padrão a fim de aumentar a confiabilidade da quantificação. Este método calcula os limites com os resultados obtidos das curvas analíticas através da relação entre o erro padrão e a inclinação da curva, de acordo com as equações 1 e 2 abaixo:

$$LD = 3,3 \times \frac{s}{b} \quad (1)$$

$$LQ = 10 \times \frac{s}{b} \quad (2)$$

Onde  $s$  é o erro-padrão da curva analítica e  $b$  a inclinação da curva analítica

**Tabela 4.** Parâmetros das curvas analíticas de padrões de compostos fenólicos obtidos por HPLC-DAD. Valores já com o erro calculado.

Padrão	Faixa de concentração (mg L <sup>-1</sup> )	Inclinação	Intercepto	<sup>a</sup> R <sup>2</sup>	<sup>b</sup> LD	<sup>c</sup> LQ
Ácido gálico	0,36 - 96	34164	3479	0,99	1,35	4,08
Ácido cafeico	0,40 - 102	77468	10736	0,99	0,24	0,74
Ácido 5-cafeoilquínico	0,36 - 47	279559	33783	0,99	0,15	0,44
Ácido elágico	0,35 - 6.0	366473	181226	0,99	0,40	1,20
Ácido hidroxibenzóico	0,41 - 105	61288	5222	0,99	0,17	0,52
Ácido ferúlico	0,38 - 49	250491	47728	0,99	0,24	0,72
Ácido <i>p</i> -cumárico	0,42 - 55	261056	40050	0,99	0,07	0,20
Ácido vanílico	0,37 - 47	23565	4539	0,99	0,23	0,69
Apigenina	0,35 - 90	82066	115253	0,99	1,90	5,76
Daidzeína	0,37 - 48	119529	6157	0,99	0,81	2,47
Punicalagina	0,33 - 43	149995	178624	0,99	0,05	0,14
Naringenina	0,38 - 97	139969	24374	0,99	0,24	0,72
Rutina	0,41 - 53	67915	27940	0,99	0,03	0,08
Epicatequina	0,41 - 53	82570	6190	0,99	0,05	0,14
Catequina	0,38 - 49	29160	11375	0,99	0,19	0,57
Quercetina	0,42 - 54	172129	94836	0,99	0,25	0,74
Cianidina 3-glicosídeo	0,15 - 25	117148	21745	0,99	0,09	0,28

<sup>a</sup>R<sup>2</sup>: Coeficiente de determinação. <sup>b</sup>LD: Limite de detecção (mg L<sup>-1</sup>). <sup>c</sup>LQ: Limite de quantificação (mg L<sup>-1</sup>).

#### 4.3.6. Análise Multivariada

As análises propostas têm o objetivo de selecionar um grupo reduzido de compostos fenólicos que gere grupos representativos de genótipos de acordo com as suas similaridades. Elas são baseadas em três etapas: (1<sup>o</sup>) pré-processamento dos

dados de acordo com dados ausentes e problemas de magnitude, (2º) aplicação da análise de componentes principais (ACP) aos dados e geração de um índice de ranqueamento dos compostos fenólicos de acordo com a sua importância, (3º) agrupamento iterativo dos genótipos utilizando o algoritmo de clusterização *k-means* e remoção dos dados menos informativos (RENCHER, 2012; JOLLIFFE, 2002).

Na primeira etapa os dados foram normalizados para evitar efeitos de escala na clusterização baseada em distância euclidiana. Isso porque há diferença de magnitude nos compostos fenólicos avaliados. Para os casos de dados ausentes que representaram ~2,6% do total, foi aplicado o método de imputação vizinho mais próximo (*nearest neighbor imputation*), que identifica as observações mais próximas e preenche os dados ausentes com base em tais observações (KAUFMAN; ROUSSEEUW, 1990).

Na segunda etapa, ACP foi aplicada aos dados pré-processados organizados em uma matriz consistindo de  $N$  genótipos (linhas) e  $P$  compostos fenólicos (colunas). Resultados de interesse da PCA incluem o peso de cada variável original sobre cada componente,  $w_{pr}$ , e a porcentagem de variância explicada por cada componente  $r$  ( $r = 1, \dots, R$ ),  $\lambda_r$ . Um importante índice é gerado para guiar a remoção de compostos fenólicos menos informativos baseado em  $w_{pr}$  and  $\lambda_r$ , conforme mostrado na equação 3. Compostos fenólicos com um alto  $v_p$  são considerados mais relevantes para o agrupamento dos genótipos baseado nas suas similaridades, visto que esses compostos fenólicos possuem alto  $w_{pr}$  derivado de componentes principais que explicam a maior parte da variância dos dados (DUDA et al., 2001).

$$v_p = \sum_{r=1}^R \lambda_r |w_{pr}| \quad p = 1, \dots, P \quad (3)$$

Na terceira etapa, um procedimento iterativo foi conduzido através do agrupamento dos genótipos e remoção dos compostos fenólicos menos relevantes. O procedimento iniciou pelo agrupamento dos genótipos aplicando clusterização *k-means* para os 24 compostos fenólicos quantificados (P). Na sequência, avaliamos a qualidade da clusterização através da métrica *Silhouette Index* (SI). O SI mede o grau de similaridade entre uma observação e outras do mesmo *cluster* comparada às

observações do *cluster* vizinho mais próximo. Os valores de SI variam de [-1, 1], sendo que valores próximos a +1 indicam a correção alocação da observação ao *cluster*. Na sequência, os compostos fenólicos com o menor  $v_p$  são removidos, uma nova clusterização é realizada com P-1 compostos fenólicos, e o  $SI_n$  é recalculado. Esse procedimento é repetido até restar único composto fenólico. Finalmente, escolhemos o subgrupo de compostos fenólicos com o maior SI (ANZANELLO et al., 2014; KAUFMAN; ROUSSEEUW, 1990; ROUSSEEUW, 1987). O *software* MATLAB (Versão 6.5) foi utilizado para estes cálculos e para ANOVA e teste de Tukey, SAS Studio.

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Nesta seção, estão apresentados os resultados obtidos no estudo dos compostos fenólicos de genótipos de guabiju. O conteúdo será apresentado na forma de artigo. O artigo será posteriormente submetido a um periódico internacional indexado.

5.1. LC-MS/MS based targeted metabolomic shows phenolic composition variation among seven Guabiju genotypes



## 6. DISCUSSÃO GERAL

Um número interessante de compostos fenólicos (CF) foi encontrado no guabiju. Foram 67 CF sendo que o perfil qualitativo foi o mesmo para todos os genótipos. Destes, 55 CF foram encontrados pela primeira vez nesta fruta. Além disso, estes compostos foram divididos entre 6 classes: ácidos fenólicos (30%), taninos hidrolisáveis (24%), flavan-3-óis (18%), flavonols (9%), antocianinas (8%) e taninos condensados (5%). Dos compostos encontrados pela primeira vez no guabiju, destacamos os ácidos galoilquínicos e os taninos.

Embora o perfil qualitativo tenha sido o mesmo, o perfil quantitativo foi completamente diferente entre os 7 genótipos. Os CF majoritários, por exemplo, foram os seguintes em cada amostra: malvidina 3-O-glicosídeo com concentração de 1400  $\mu\text{g g}^{-1}$  para G03 e 1448  $\mu\text{g g}^{-1}$  para G04, ácido tri-galoilquínico (883  $\mu\text{g g}^{-1}$  para G05), cianidina 3-O-glicosídeo (1319  $\mu\text{g g}^{-1}$  para G06 e 1072  $\mu\text{g g}^{-1}$  para G07) e ácido digaloilquínico (926  $\mu\text{g g}^{-1}$  para G08 e 1324  $\mu\text{g g}^{-1}$  para G09). Dos 67 CF encontrados, 24 estavam acima do limite de quantificação e foram quantificados.

Os resultados da análise multivariada de dados mostraram através de um dendrograma, que cada genótipo formou seu próprio grupo considerando as concentrações de cada um dos 24 CF. Através da seleção hierárquica de 11 CF principais selecionados através da métrica *Silhouette Index*, uma análise dos componentes principais (ACP) foi aplicada onde houve separações de alguns grupos. Os grupos que mais se separaram dos demais foram os referentes aos genótipos G05, G03 e G09.

Fazendo a união dos nossos resultados com o trabalho de outro grupo onde paralelamente analisou uma infestação fúngica nos mesmos genótipos, foi possível fazer uma relação da composição fenólica e a forma que cada planta se defendeu frente a doença. Por exemplo, o genótipo G03 foi a amostra com maior concentração de CF totais (6840  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) assim como antocianinas totais (3027  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) além de ter sido o genótipo mais afetado pela doença identificada como ferrugem causada pelo fungo *Austropuccinia psidii*. De modo contrário, o genótipo G05 foi o menos afetado pela ferrugem e os nossos resultados mostraram que foi a amostra com maior

concentração de flavonóis totais ( $232 \mu\text{g g}^{-1}$ ). Possivelmente esta amostra possui a melhor mistura quantitativa para a defesa frente a ferrugem.

## 7. CONCLUSÃO GERAL

Neste trabalho, através de uma abordagem de metabolômica direcionada aos compostos fenólicos de sete genótipos de guabiju, mostramos que, apesar dos mesmos compostos fenólicos serem encontrados nos genótipos, as suas concentrações são genótipo-dependentes. Através da análise multivariada exploratória, os sete genótipos foram agrupados exatamente em sete grupos de acordo com a sua composição fenólica, o que permite hipotermizarmos que esses genótipos possuirão propriedades fenólico-relacionadas diferentes, tais como defesa, sensoriais e funcionais.

Em relação à sua capacidade de defesa, um estudo paralelo com os mesmos genótipos de guabiju vem sendo conduzido por outro grupo de pesquisa, onde o objetivo foi avaliar a sensibilidade dos sete genótipos frente a doença ferrugem, causada pelo fungo *Austropuccinia psidii*. Os resultados mostraram que os genótipos possuem diferentes sensibilidades, as quais estão de acordo com as diferentes composições fenólicas encontradas em nosso trabalho. Assim, a combinação desse achado com o nosso, indica que a hipótese da relação entre a composição fenólica única para cada genótipo e as suas diferentes capacidades de defesa, pode ser verdadeira.

Finalmente, dando continuidade a esta pesquisa, os mesmos genótipos utilizados neste trabalho serão avaliados em modelos *in vivo* de doenças cardiovasculares, visando compreender se os compostos fenólicos dos genótipos de guabiju são capazes de diminuir o risco de doenças cardiovasculares e se o mecanismo envolve uma ação direta ou indireta como antioxidantes ou é mediada pela modulação da microbiota intestinal.

## REFERÊNCIAS

- AHMAD, F.; ZAIDI, S.; AHMAD, S. Role of By-products of Fruits and Vegetables in Functional Foods. In: **Functional Food Products and Sustainable Health**. Singapore: Springer Singapore, 2020. p. 199–218.
- ALVIN C. RENCHER, W. F. C. **Methods of Multivariate Analysis**. 3. ed. Hoboken, NJ: Wiley Series in Probability and Statistics, 2012.
- ANDRADE, J. M. M. et al. Phenolic Composition in Different Genotypes of Guabiju Fruits (*Myrcianthes pungens*) and Their Potential as Antioxidant and Antichemotactic Agents. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 8, p. C1181–C1187, out. 2011.
- ANZANELLO, M. J. et al. Selecting relevant Fourier transform infrared spectroscopy wavenumbers for clustering authentic and counterfeit drug samples. **Science & Justice**, v. 54, n. 5, p. 363–368, set. 2014.
- APEL, M. A.; SOBRAL, M.; HENRIQUES, A. T. Composição química do óleo volátil de *Myrcianthes* nativas da região sul do Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 3, p. 402–407, set. 2006.
- BARBEHENN, R. V.; PETER CONSTABEL, C. Tannins in plant–herbivore interactions. **Phytochemistry**, v. 72, n. 13, p. 1551–1565, set. 2011.
- BARNES, S. et al. Training in metabolomics research. I. Designing the experiment, collecting and extracting samples and generating metabolomics data. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 51, n. 7, p. 461–475, jul. 2016.
- BERGAMASCHI, H. et al. **Boletins agrometeorológicos da estação experimental agrônômica da UFRGS: série histórica 1970-2012**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2013.
- BETTA, F. DELLA et al. Phenolic Compounds Determined by LC-MS/MS and In Vitro Antioxidant Capacity of Brazilian Fruits in Two Edible Ripening Stages. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 73, n. 4, p. 302–307, 14 dez. 2018.
- BOECKLER, G. A.; GERSHENZON, J.; UNSICKER, S. B. Phenolic glycosides of the Salicaceae and their role as anti-herbivore defenses. **Phytochemistry**, v. 72, n. 13, p. 1497–1509, set. 2011.
- BRACK, P. et al. Frutas nativas do Rio Grande do Sul, Brasil: riqueza e potencial alimentício. **Rodriguésia**, v. 71, p. 1–20, 2020a.
- BRACK, P. et al. Frutas nativas do Rio Grande do Sul, Brasil: riqueza e potencial alimentício. **Rodriguésia**, v. 71, 2020b.
- BRAICU, C. et al. The relationship between the structure and biological actions of green tea catechins. **Food Chemistry**, v. 141, n. 3, p. 3282–3289, dez. 2013.

CGEN. **Orientação Técnica nº 2, de 30 de outubro de 2003**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br>>.

CROZIER, A.; JAGANATH, I. B.; CLIFFORD, M. N. Dietary phenolics: Chemistry, bioavailability and effects on health. **Natural Product Reports**, v. 26, n. 8, p. 1001–1043, 2009.

CUBERO-LEON, E.; PEÑALVER, R.; MAQUET, A. Review on metabolomics for food authentication. **Food Research International**, v. 60, p. 95–107, jun. 2013.

DAI, J.; PATEL, J. D.; MUMPER, R. J. Characterization of Blackberry Extract and Its Antiproliferative and Anti-Inflammatory Properties. **Journal of Medicinal Food**, v. 10, n. 2, p. 258–265, jun. 2007.

DALLA NORA, C. et al. The characterisation and profile of the bioactive compounds in red guava ( *Psidium cattleianum* Sabine) and guabiju ( *Myrcianthes pungens* (O. Berg) D. Legrand). **International Journal of Food Science & Technology**, v. 49, n. 8, p. 1842–1849, ago. 2014a.

DALLA NORA, C. et al. Protective effect of guabiju (*Myrcianthes pungens* (O. Berg) D. Legrand) and red guava (*Psidium cattleianum* Sabine) against cisplatin-induced hypercholesterolemia in rats. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 50, n. 3, p. 483–491, set. 2014b.

DE LA ROSA, L. A. et al. Phenolic Compounds. In: **Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables**. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 253–271.

DE PAULO FARIAS, D. et al. A critical review of some fruit trees from the Myrtaceae family as promising sources for food applications with functional claims. **Food Chemistry**, v. 306, p. 125630, fev. 2020.

DE SOUZA, E. L. et al. Potential interactions among phenolic compounds and probiotics for mutual boosting of their health-promoting properties and food functionalities – A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 59, n. 10, p. 1645–1659, 31 maio 2019.

DETONI, E. **SORVETE PRÓBIOTICO DE GUABIJÚ (*Myrcianthes pungens*): DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO, AVALIAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS E VIABILIDADE DE *Lactobacillus paracasei***. [s.l.] Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2020.

DETONI, E. et al. Guabijú (*Myrcianthes pungens*): Characterization of in natura and lyophilized Brazilian berry. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 3, p. e37810313337, 19 mar. 2021.

DURAZZO, A. et al. Polyphenols: A concise overview on the chemistry, occurrence, and human health. **Phytotherapy Research**, v. 33, n. 9, p. 2221–2243, 29 set. 2019.

ERMEL, G. et al. Inhibition of Adhesion of Uropathogenic Escherichia coli Bacteria to Uroepithelial Cells by Extracts from Cranberry. **Journal of Medicinal Food**, v. 15, n. 2, p. 126–134, fev. 2012.

ESEBERRI, I. et al. Variability in the Beneficial Effects of Phenolic Compounds: A Review. **Nutrients**, v. 14, n. 9, p. 1925, 4 maio 2022.

FRANCK, M. et al. Effects of Daily Raspberry Consumption on Immune-Metabolic Health in Subjects at Risk of Metabolic Syndrome: A Randomized Controlled Trial. **Nutrients**, v. 12, n. 12, p. 3858, 17 dez. 2020.

FULGENCIO SAURA-CALIXTO, J. P.-J. **Non-extractable Polyphenols and Carotenoids**. 1. ed. London: The Royal Society of Chemistry, 2018.

GHISONI, S. et al. Untargeted metabolomics with multivariate analysis to discriminate hazelnut (Corylus avellana L.) cultivars and their geographical origin. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 100, n. 2, p. 500–508, 30 jan. 2020.

GIACON, G. **Gustavo Giacon**. Disponível em: <<https://br.pinterest.com/gustavogiacon/>>. Acesso em: 26 set. 2022.

GIUSTI, M. M.; WROLSTAD, R. E. Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**, v. 00, n. 1, abr. 2001.

ICH (EMA). **ICH Q2(R2) Validation of analytical procedures**. Disponível em: <<https://www.ema.europa.eu/en/ich-q2r2-validation-analytical-procedures>>. Acesso em: 26 out. 2022.

JEAN-LOUIS SEBEDIO, L. B. **Metabolomics as a Tool in Nutrition Research**. 1. ed. Oxford, UK: Elsevier, 2014.

JOLLIFFE, I. T. **Principal Component Analysis**. 2. ed. New York, NY: Springer, 2002.

JOSHI, J. R. et al. Plant phenolic acids affect the virulence of *P. ectobacterium aroidearum* and *P. carotovorum* ssp. *brasiliense* via quorum sensing regulation. **Molecular Plant Pathology**, v. 17, n. 4, p. 487–500, maio 2016.

KAUFMAN, L.; ROUSSEUW, P. J. (EDS.). **Finding Groups in Data**. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc., 1990.

KÖHLER, M. **Diagnóstico preliminar da cadeia das frutas nativas no estado do Rio Grande do Sul**. [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2014.

KŘÍŽOVÁ, L. et al. Isoflavones. **Molecules**, v. 24, n. 6, p. 1076, 19 mar. 2019.

LANDI, M.; TATTINI, M.; GOULD, K. S. Multiple functional roles of anthocyanins in plant-environment interactions. **Environmental and Experimental Botany**, v. 119, p. 4–17, nov. 2015.

LEONARD, W. et al. Hydroxycinnamic acids on gut microbiota and health. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 20, n. 1, p. 710–737, 30 jan. 2021.

LEYVA-SOTO, A. et al. Daily Consumption of Chocolate Rich in Flavonoids Decreases Cellular Genotoxicity and Improves Biochemical Parameters of Lipid and Glucose Metabolism. **Molecules**, v. 23, n. 9, p. 2220, 1 set. 2018.

LI, S. et al. Recent advances in the application of metabolomics for food safety control and food quality analyses. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 61, n. 9, p. 1448–1469, 15 maio 2021.

LI, W. et al. Illustration of the variation in the content of flavanone rutinosides in various citrus germplasms from genetic and enzymatic perspectives. **Horticulture Research**, v. 9, 5 jan. 2022.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras - Volume 1**. 5. ed. Nova Odessa, SP: Plantarum, 2008.

MARIA DO CARMO BASSOLS RASEIRA, LUIS EDUARDO CORRÊA ANTUNES, RENATO TREVISAN, E. D. G. **Espécies frutíferas nativas do Sul do Brasil**. Pelotas, RS: Embrapa Clima Temperado, 2004.

MARÍN, L. et al. Bioavailability of Dietary Polyphenols and Gut Microbiota Metabolism: Antimicrobial Properties. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–18, 2015.

MARIN, R. et al. Volatile Components and Antioxidant Activity from some Myrtaceous Fruits cultivated in Southern Brazil. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, n. 2, p. 172–177, 2008.

MATTIOLI, R. et al. Anthocyanins: A Comprehensive Review of Their Chemical Properties and Health Effects on Cardiovascular and Neurodegenerative Diseases. **Molecules**, v. 25, n. 17, p. 3809, 21 ago. 2020.

MEDINA, S. et al. Food fingerprints – A valuable tool to monitor food authenticity and safety. **Food Chemistry**, v. 278, p. 144–162, abr. 2019.

MIN, B. . et al. The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages: a review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 106, n. 1–4, p. 3–19, abr. 2003.

NOLLET, L. M. L.; GUTIÉRREZ-URIBE, J. A. **Phenolic Compounds in Food: Characterization and Analysis**. 1. ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 2018.

NORA, C. D. et al. Protective effect of guabiju (*Myrcianthes pungens* (O. Berg) D. Legrand) and red guava (*Psidium cattleianum* Sabine) against cisplatin-induced

hypercholesterolemia in rats. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 50, n. 3, p. 483–491, set. 2014.

NTEMIRI, A. et al. Whole Blueberry and Isolated Polyphenol-Rich Fractions Modulate Specific Gut Microbes in an In Vitro Colon Model and in a Pilot Study in Human Consumers. **Nutrients**, v. 12, n. 9, p. 2800, 12 set. 2020.

PÉREZ-BURILLO, S. et al. Relationship between composition and bioactivity of persimmon and kiwifruit. **Food Research International**, v. 105, p. 461–472, mar. 2018.

RASHMI, H. B.; NEGI, P. S. Phenolic acids from vegetables: A review on processing stability and health benefits. **Food Research International**, v. 136, p. 109298, out. 2020.

RICHARD O. DUDA, PETER E. HART, D. G. S. **Pattern classification**. 2. ed. New York, NY: Wiley, 2001.

RODRIGUES, E.; MARIUTTI, L. R. B.; MERCADANTE, A. Z. Carotenoids and Phenolic Compounds from *Solanum sessiliflorum*, an Unexploited Amazonian Fruit, and Their Scavenging Capacities against Reactive Oxygen and Nitrogen Species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 12, p. 3022–3029, 27 mar. 2013.

ROUSSEUW, P. J. Silhouettes: A graphical aid to the interpretation and validation of cluster analysis. **Journal of Computational and Applied Mathematics**, v. 20, p. 53–65, nov. 1987.

SATHYAPALAN, T. et al. Soy isoflavones improve cardiovascular disease risk markers in women during the early menopause. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 28, n. 7, p. 691–697, jul. 2018.

SCHULZ, M. et al. Composition and potential health effects of dark-colored underutilized Brazilian fruits – A review. **Food Research International**, v. 137, p. 109744, nov. 2020.

SCHYMANSKI, E. L. et al. Identifying Small Molecules via High Resolution Mass Spectrometry: Communicating Confidence. **Environmental Science & Technology**, v. 48, n. 4, p. 2097–2098, 18 fev. 2014.

SERAGLIO, S. K. T. et al. Nutritional and bioactive potential of Myrtaceae fruits during ripening. **Food Chemistry**, v. 239, p. 649–656, jan. 2017.

SHARMA, A. et al. Response of Phenylpropanoid Pathway and the Role of Polyphenols in Plants under Abiotic Stress. **Molecules**, v. 24, n. 13, p. 2452, 4 jul. 2019.



SILVA, D. J. H. DA. **SEMINÁRIO DE TEMA LIVRE - CONSERVAÇÃO DE RECURSOS GENÉTICOS EX SITU.** Disponível em: <[http://arquivo.ufv.br/dbg/resumos2008b/Resumo André.htm#:~:text=Acesso são amostras de germoplasma,subamostra%2C em vez de acesso%2C](http://arquivo.ufv.br/dbg/resumos2008b/Resumo_André.htm#:~:text=Acesso são amostras de germoplasma,subamostra%2C em vez de acesso%2C)>.

SINGH, D. P.; SINGH, A. K.; SINGH, A. Plant breeding: past, present, and future perspectives. In: **Plant Breeding and Cultivar Development.** [s.l.] Elsevier, 2021. p. 1–24.

SOCHOR, J. et al. Content of Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity in Fruits of Apricot Genotypes. **Molecules**, v. 15, n. 9, p. 6285–6305, 7 set. 2010.

STRECK, E.V.; KÄMPF, N.; DALMOLIN, R.S.D.; KLAMT, E.; NASCIMENTO, P.C. DO; SCHNEIDER, P.; GIASSON, E.; PINTO, L. F. S. **Solos do Rio Grande do Sul.** 2. ed. Porto Alegre: Emater-RS / Ascar, 2008.

SUSSULINI, A. **Metabolomics: From Fundamentals to Clinical Applications.** Cham: Springer International Publishing, 2017. v. 965

TALHAOUI, N. et al. Phenolic compounds in olive leaves: Analytical determination, biotic and abiotic influence, and health benefits. **Food Research International**, v. 77, p. 92–108, nov. 2015.

UTPOTT, M. et al. Metabolomics: An analytical technique for food processing evaluation. **Food Chemistry**, v. 366, p. 130685, jan. 2022.

WANG, K. et al. Antifungal activity of phenolic monoterpenes and structure-related compounds against plant pathogenic fungi. **Natural Product Research**, v. 33, n. 10, p. 1423–1430, 19 maio 2019.

WANG, X. et al. Metabolomics and gene expression analysis reveal the accumulation patterns of phenylpropanoids and flavonoids in different colored-grain wheats (*Triticum aestivum* L.). **Food Research International**, v. 138, p. 109711, dez. 2020.

XIA, L. et al. Evaluation of phenolic compounds, antioxidant and antiproliferative activities of 31 grape cultivars with different genotypes. **Journal of Food Biochemistry**, v. 43, n. 6, p. e12626, jun. 2019.

XIONG, Y. et al. Comprehensive profiling of phenolic compounds by HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS/MS to reveal their location and form of presence in different sorghum grain genotypes. **Food Research International**, v. 137, p. 109671, nov. 2020.

ZHANG, F.-P.; YANG, Q.-Y.; ZHANG, S.-B. Dual Effect of Phenolic Nectar on Three Floral Visitors of *Elsholtzia rugulosa* (Lamiaceae) in SW China. **PLOS ONE**, v. 11, n. 4, p. e0154381, 22 abr. 2016.

ZHAO, Q. et al. Effect of Genotype and Environment on *Salvia miltiorrhiza* Roots Using LC/MS-Based Metabolomics. **Molecules**, v. 21, n. 4, p. 414, 26 mar. 2016.

**Supplementary Table 1.** Parameters of PC standards and analytical curves standards obtained by HPLC-DAD. The values are taking into account the calculated standard error.

Standard	Concentration range (mg L <sup>-1</sup> )	Slope	Intercept	<sup>a</sup> R <sup>2</sup>	<sup>b</sup> DL	<sup>c</sup> QL
Gallic acid	0,36 - 96	34164	3479	0,99	1,35	4,08
Caffeic acid	0,40 - 102	77468	10736	0,99	0,24	0,74
5-caffeoylquinic acid	0,36 - 47	279559	33783	0,99	0,15	0,44
Ellagic acid	0,35 – 6.0	366473	181226	0,99	0,40	1,20
Hydroxybenzoic acid	0,41 - 105	61288	5222	0,99	0,17	0,52
Ferulic acid	0,38 - 49	250491	47728	0,99	0,24	0,72
<i>p</i> -coumaric acid	0,42 - 55	261056	40050	0,99	0,07	0,20
Vanillic acid	0,37 - 47	23565	4539	0,99	0,23	0,69
Apigenin	0,35 - 90	82066	115253	0,99	1,90	5,76
Daidzein	0,37 - 48	119529	6157	0,99	0,81	2,47
Punicalagin	0,33 - 43	149995	178624	0,99	0,05	0,14
Naringenin	0,38 - 97	139969	24374	0,99	0,24	0,72
Rutin	0,41 - 53	67915	27940	0,99	0,03	0,08
Epicatechin	0,41 - 53	82570	6190	0,99	0,05	0,14
Catechin	0,38 - 49	29160	11375	0,99	0,19	0,57
Quercetin	0,42 - 54	172129	94836	0,99	0,25	0,74
Cyanidin 3-glucoside	0,15 - 25	117148	21745	0,99	0,09	0,28

<sup>a</sup>R<sup>2</sup>: Determination coefficient. <sup>b</sup>DL: Detection limit (mg L<sup>-1</sup>). <sup>c</sup>QL: Quantification limit (mg L<sup>-1</sup>).

**Supplementary Table 2.** Exploratory studies on Guabiju bioactive compounds.

Title	Analytical Method	Identified metabolites	Source
Phenolic Compounds Determined by LC-MS/MS and In Vitro Antioxidant Capacity of Brazilian Fruits in Two Edible Ripening Stages	LC-MS/MS (LC: Agilent 1290, ESI, QTRAP: AB Sciex)	Flavonoids: Catechin, Epigallocatechin gallate, Isoquercitrin, Kaempferol, Naringenin, Pinobanksin and Quercetin  Phenolic acids: <i>p</i> -coumaric, 3,4-dihydroxybenzoic, gallic and syringic	(BETTA et al., 2018)
Nutritional and bioactive potential of Myrtaceae fruits during ripening	LC-MS/MS (LC: Agilent 1290, ESI, QTRAP: AB Sciex)	Flavonoids: Catechin, Epigallocatechin gallate, Epicatechin, Isoquercitrin, Isoramnetin, Kaempferol, Naringenin, Quercetin, Pinobanksin and Pinocembrine  Phenolic acids: Caffeic, Chlorogenic, <i>p</i> -coumaric, 3,4-dihydroxybenzoic, Ferulic, Gallic, Salicylic, Syngaptic and Syringic	(SERAGLIO et al., 2017)
The characterisation and profile of the bioactive compounds in red guava ( <i>Psidium cattleianum</i> Sabine) and guabiju ( <i>Myrcianthes pungens</i> (O. Berg) D. Legrand)	HPLC (HPLC: Agilent 1100)	Carotenoids: $\beta$ -carotene, All-trans-lutein, Zeaxanthin, $\beta$ -Cryptoxanthin and $\alpha$ -carotene  Anthocyanins: Delphinidine, Cyanidin and Malvidin Glycosides; Cyanidin, Peonidin and Malvidin chlorides	(DALLA NORA et al., 2014a)
Phenolic Composition in Different Genotypes of Guabiju Fruits ( <i>Myrcianthes pungens</i> ) and Their Potential as Antioxidant and Antichemotactic Agents	HPLC (HPLC: Waters 2695)	Anthocyanidins: Delphinidin, Cyanidin, Petunidin, Peonidin and Malvidin  Flavonoids: Isoquercitrin, Quercitrin and Hyperoside	(ANDRADE et al., 2011)