

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE QUÍMICA

ISABEL DUARTE COUTINHO

Dinâmica do metabolismo micromolecular da cana-de-açúcar
em resposta à infecção com o fungo *Puccinia kuehnii*
(ferrugem alaranjada)

Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte dos
requisitos para obtenção do título de Doutor em
Química.

Orientador: Alberto José Cavalheiro

Co-orientador: Renato Lajarim (UFSCar, São Carlos, Brasil)

Co-orientador: Michael Beale (Rothamsted Research, Harpenden, Inglaterra)

ARARAQUARA – SP

2014

FICHA CATALOGRÁFICA

C871d Coutinho, Isabel Duarte
Dinâmica do metabolismo micromolecular da cana-de-açúcar em resposta à infecção com o fungo *Puccinia kuehnii* (ferrugem alaranjada) / Isabel Duarte Coutinho. – Araraquara : [s.n], 2014
177 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química

Orientador: Alberto José Cavalheiro

Coorientador: Renato Lajarim Carneiro

Figura 1.1 Cana-de-açúcar. 2. Metabolômica. 3. Favonóides.
4. Cromatografia líquida de alta eficiência. I. Título.

Elaboração: Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química de Araraquara
Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

ISABEL DUARTE COUTINHO


Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte dos
requisitos para obtenção do título de Doutora em
Química.

Araraquara, 25 de abril de 2014.

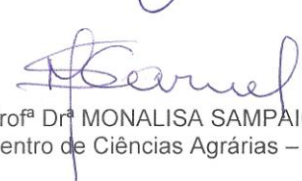
BANCA EXAMINADORA




Prof. Dr. ALBERTO JOSÉ CAVALHEIRO (Orientador)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara.



Prof. Dr. IAN CASTRO-GAMBOA
Instituto de Química – UNESP, Araraquara.



Prof.ª Dr.ª MONALISA SAMPAIO CARNEIRO
Centro de Ciências Agrárias – UFSCAR, Araras.



Prof. Dr. RAFAEL VICTÓRIO CARVALHO GUIDO
Instituto de Física – USP, São Carlos.



Prof. Dr. JAIRO KENUPP BASTOS
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP, Ribeirão Preto.

Dados curriculares

Formação

Doutorado– 03/2010-04/2014

Química, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, UNESP

Título: Dinâmica do metabolismo micromolecular da cana-de-açúcar em resposta à infecção com o fungo *Puccinia kuehnii* (ferrugem alaranjada).

Orientador: Alberto José Cavalheiro

Co-orientador: Renato Lajarim

Doutorado sanduíche: 07/2013-10/2013

Rothamsted Research, Harpenden, Inglaterra

Título: Metabolômica de *Miscanthus* e Cana-de-açúcar empregando LC-DAD-MS e ¹H NMR.

Orientador: Michael Beale

Mestrado – 2006-2008

Química Orgânica, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, UFMS, Campo Grande-MS.

Dissertação: Estudo químico e atividades biológicas de *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg (Myrtaceae).

Orientadora: Cláudia Andréa Lima Cardoso

Graduação - 2001-2005

Química, Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul, UEMS, Dourados-MS.

Artigo submetido para publicação

LEME, G. M.; COUTINHO, I. D.; CRESTE, S.; HOJO, O.; CARNEIRO, R. L.; BOLZANI, V.; CAVALHEIRO, A. HPLC-DAD method to metabolome fingerprinting to the phenotyping of sugarcane genotypes. **Industrial Crops and Products**. Artigo submetido

Publicações

CAVALHEIRO, A. J.; COUTINHO, I. D.; LEME, G. M.; SILVA, A. A.; SILVA, A. P. D. Metabolômica de cana-de-açúcar e sua relação com a produção de biomassa vegetal para bioenergia. In: STRADIOTTO, N. R.; LEMOS, E. G. (Ed.). **Bioenergia**: pesquisa, desenvolvimento e inovação – Parte I: biomassa para bioenergia. São Paulo: Cultura Acadêmica, 2012. Cap. 1, p. 13-34.

PAVAN, F. R. ; LEITE, C. Q. F. ; COELHO, R. G. ; COUTINHO, I. D. ; HONDA, N. K. ; VILEGAS, W. ; LEITE, S. R. A. ; SATO, D. N. . Evaluation of anti-Mycobacterium tuberculosis activity of *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae). **Química Nova**, v. 32, p. 1222-1226, 2009.

COUTINHO, I. D. ; KATAOKA, V. M. F. ; HONDA, N. K. ; COELHO, R. G. ; VIEIRA, M. C. ; CARDOSO, C. A. L. Influência da variação sazonal nos teores de flavonoides e atividade

antioxidante das folhas de *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg, Myrtaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, p. 322-327, 2010.

COUTINHO, I. D. ; CARDOSO, C. A. L. ; RE POPPI, N. ; MELO, A. M. DE ; VIEIRA, M. C. ; HONDA, N. K. ; COELHO, R. G. Gas Chromatography-Mass Spectrometry (CG-MS) and evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg (Guavira). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 45, p. 767-776, 2009.

COUTINHO, I. D. ; CARDOSO, C. A. L. ; RE POPPI, N. Identification of the volatile compounds of leaves and flowers in Guavira (*Campomanesia adamantium* O. Berg). **The Journal of Essential Oil Research**, v. 20, p. 405-407, 2008.

COUTINHO, I. D. ; COELHO, R. G. ; KATAOKA, V. M. F. ; HONDA, N. K. ; SILVA, J. R. M. ; VILEGAS, W. ; CARDOSO, C. A. L. Determination of phenolic compounds and evaluation of antioxidant capacity of *Campomanesia adamantium* leaves. **Eclética Química**, v. 33, p. 53-60, 2008.

Congresso internacional

COUTINHO, I. D.; THOMAZ, L.; LEME, G.; CAVALHEIRO, J. A. **Metabolite profile in sugarcane varieties, hybrids and species with HPLC-DAD combined with multivariate analysis**. In: 9th Annual International Conference of the Metabolomics Society, 2013, Glasgow, Escócia, Reino Unido.

COUTINHO, I. D. ; THOMAZ, L. ; LEME, G. M. ; SILVA, A. ; ALVES, P. ; NEPOMUCENO, M. ; CRESTE, S. ; CARNEIRO, R. L. ; CAVALHEIRO, J. A. **Chromatographic profile of sugarcane genotypes resistant and susceptible to orange rust (*Puccinia kuehni*)**. In: 3rd Brazilian Conference on Natural Products, XXIX RESEM and VII SFL, 2011, Ouro Preto, Brazil.

SANTOS, A.C.C. ; COUTINHO, I. D. ; MELO, A. M. DE ; CARDOSO, C. A. L. . **Evaluation of chromatography profile, antioxidant activity and phenolic contents of medicinal plants marketed in pharmacies of manipulation in the city of Dourados-MS**. In: 7^o International Congress of Pharmaceutical Sciences, 2009, Ribeirão Preto.

Congresso nacional

COUTINHO, I. D. ; CARDOSO, C. A. L. ; COELHO, R. G. ; HONDA, N. K. **Influência da variação sazonal nos teores de fenóis e atividade antioxidante das folhas de *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae)**. In: 32^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2009, Fortaleza.

COUTINHO, I. D.; CARDOSO, C. A. L.; COELHO, R. G.; MELO, A. M. de. **Flavonoides e atividade antioxidante e antimicrobiana das folhas de *Campomanesia adamantium* berg. (Myrtaceae)**. In: 31^a Reunião Anual da SBQ, 2008, Águas de Lindóia.

COELHO, R. G.; COUTINHO, I. D.; HONDA, N. K.; BRUM, R. L. **Flavonóis glicosilados e atividade antioxidante de *Bromelia balansae* (Bromeliaceae)**. In: 31ª Reunião Anual da SBQ, 2008, Águas de Lindóia.

COUTINHO, I. D.; CARDOSO, C. A. L.; RE POPPI, N. **Identificação das substâncias presentes no óleo essencial das folhas de *Campomanesia adamantium* utilizando CG/EM**. In: XIX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 2006, Salvador.

CARDOSO, C. A. L. ; COUTINHO, I. D. ; CHIMENEZ, T. ; COELHO, R. G. ; HONDA, N. K. **Atividade antioxidante e teor de flavonoides totais em extratos etanólicos dos frutos secos e in natura de *Campomanesia adamantium***. In: XIX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 2006, Salvador.

COELHO, R. G., COUTINHO, I. D., CARDOSO, C. A. L., HONDA, N. K. **Flavanonas isoladas das folhas de *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae)**. In: XIX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 2006, Salvador.

COUTINHO, I. D.; CARDOSO, C. A. L.; VIEIRA, M. C.; RAMOS, M. B. M. **Análise da presença de beta-ecdisona e do perfil cromatográfico das raízes, flores e galhos de *Pfaffia glomerata* cultivada por 18 meses**. In: 57ª Reunião Anual da SBPC, 2005, Fortaleza.

COUTINHO, I. D.; CARDOSO, C. A. L.; VIEIRA, M. C.; RAMOS, M. B. M. **Estudo do perfil cromatográfico e monitoramento de beta-ecdisona em diferentes amostras de ginseng-brasileiro**. In: 56ª Reunião Anual da SBPC, 2004, Cuiabá.

“Quanto mais me torno capaz de me afirmar como *sujeito* que pode conhecer tanto melhor desempenho minha aptidão para fazê-lo”

Paulo Freire, Pedagogia da autonomia, p. 124.

Dedicatória

Ao meu pai Frande da Silva Coutinho por me encorajar a nunca desistir dos meus sonhos e desafios.

Ao Luiz Dutra e as minhas filhas Carina e Clarice pelo amor incondicional.

Agradecimentos

A minha família pelo carinho e incentivo em todos os momentos..

Ao Alberto José Cavalheiro pela orientação, confiança e amizade.

A minha segunda família: minha sogra Cleusa, meu sogro Valdecir e cunhado Maurício pelo apoio em todos os momentos. Sou eternamente grata a vocês!

A Isabella pela grande amizade, apoio e carinho. Meu muito obrigado pelos momentos de descontração que você ofereceu a Carina e a Clarice durante minha ausência.

A Sayo e Rafa pela amizade, discussão e companheirismo.

As minhas amigas da cidade de Dourados: Fabiana, Sandra, Elisa e Renata pelos momentos de descontração desde a graduação até o início do doutorado, assim como nas discussões nas mais diversas áreas do conhecimento.

Ao meu grande amigo e compadre Gabriel Mazzi Leme pela amizade e disponibilidade em sempre ajudar.

As meninas Rute, Teresinha e Daniela pela ajuda nos momentos difíceis e de alegria.

Aos colegas do “grupo do Alberto”: Paulo, Fernando, Paula, Cristhian, Cristiano, Alexander e Vinicius pelas nossas discussões durante as reuniões.

A Livia Thomaz pelo auxílio nas coletas, análises por HPLC-DAD e discussão durante a interpretação dos resultados. E também pela amizade.

Aos técnicos Juliana e João pela pelo suporte durante a execução do trabalho.

Ao professor Norberto Pepporini e José Carlos Tomaz na obtenção das análises por LC-DAD-MS e ESI-MS.

A Bianca Ferreira pelas análises via ESI-MS.

Ao Nivaldo na obtenção das análises de ¹H NMR e nos momentos de descontração.

Ao professor Pedro Alves pela disponibilidade da Câmara de Crescimento para a execução do primeiro experimento de cultivo.

Ao professor Nelson Massola e Sérgio Gómez no auxílio dos experimentos de inoculação, além das discussões sobre fungos patogênicos.

*A Silvana Creste do IAC pela disponibilidade em fornecer as gemas de cana-de-açúcar para a execução de todos os experimentos de cultivo realizado. Assim como, a sugestão em trabalhar com o fungo *Puccinia kuehnii*.*

Ao professor Michael Beale pelo aceite durante o estágio de doutorado sanduíche. Assim como, nas discussões e dúvida durante a realização do estágio. Ao grupo Met-Ro: Claudia, Delia, John, Nathaniel e Jane pela ajuda e discussão durante a execução do trabalho no Rothamsted Research.

A amizade da Mike, Polyanna e Natália na cidade de Harpenden/Inglaterra durante o doutorado sanduíche.

A família NuBBE pela amizade e infra-estrutura concedida durante a execução de todo o trabalho.

Ao Instituto de Química e programa de pós-graduação em Química pela oportunidade de realização do doutorado.

Aos demais técnicos e funcionários do Instituto de Química meu muito obrigado!

À CAPES pelo auxílio financeiro na bolsa de doutorado no Brasil e doutorado sanduíche através do Programa Ciências sem Fronteira.

RESUMO

A cana-de-açúcar é a principal cultura agrícola em importância econômica das regiões tropicais, sendo que o Brasil possui a maior área cultivada e em expansão do mundo. As variedades modernas são oriundas principalmente do cruzamento entre *Saccharum officinarum* e *Saccharum spontaneum*. Com o desenvolvimento tecnológico dos programas de melhoramento genético, muitas doenças antigas da cana-de-açúcar foram superadas através do desenvolvimento de genótipos resistentes. Entretanto, no ano de 2009 o aparecimento da ferrugem alaranjada no estado de São Paulo causou grande prejuízo econômico, porque variedades com características de alta produtividade e resistência à ferrugem marrom, mostraram-se suscetíveis à ferrugem alaranjada. Diante disso, este trabalho teve por objetivo a caracterização micromolecular de genótipos de cana-de-açúcar resistentes e suscetíveis à ferrugem alaranjada, visando à identificação de marcadores moleculares de resistência a esse patógeno. Para isso, empregaram-se LC-DAD-MS e ¹H NMR para obtenção de dados analíticos e métodos quimiométricos para análise multivariada. Para a etapa de caracterização, o extrato hidro-alcoólico preparado a partir de 500 mg das folhas de cana-de-açúcar foi fracionado em HPLC-DAD, fornecendo 60 frações que foram analisadas por LC-DAD-MS e ¹H NMR. Esta etapa permitiu a identificação de 52 metabólitos, entre aminoácidos, açúcares, derivados do ácido benzoico, ácido hidroxicinâmico e flavonas *C* e *O* glicosiladas. Na segunda etapa foram avaliados os *fingerprintings* metabólicos dos genótipos resistentes (IAC95 5000) e suscetíveis (SP89 1115) empregando LC-DAD e submetidos a PCA. No primeiro planejamento experimental as mudas de ambos os genótipos com 30 dias foram transferidas para câmara de crescimento e mantidas a 25 °C durante 30 dias. A PCA deste experimento mostrou que o genótipo resistente possui maior correlação com derivados de luteolina. No segundo planejamento experimental, os genótipos IAC95 5000 e SP89 1115 foram inoculados com o fungo *P. kuehni*. O genótipo SP89 1115 mostrou sinais da infecção fúngica, enquanto o genótipo resistente não apresentou sintomas da doença. A PCA desse conjunto de amostras mostrou que o genótipo resistente possui maior correlação principalmente com ácido clorogênico, derivados de luteolina e tricina do que o genótipo suscetível.

Palavras-chave: Cana-de-açúcar. *Puccinia kuehni*. *Fingerprinting* metabolite. HPLC-DAD. HPLC-DAD-MS. ¹H NMR.

ABSTRACT

Sugarcane is the main agricultural crop in economic importance of tropical regions and Brazil has the largest cultivation acreage in the world. The modern varieties are arising mainly from the crossing of *Saccharum officinarum* X *Saccharum spontaneum*. With the technological development of breeding programs, many old diseases affecting sugarcane were overcome through the development of resistant genotypes. However, in 2009 the first appearance of orange rust in São Paulo State led to huge economic loss, because varieties with characteristics of high yield and resistance to brown rust were susceptible to orange rust. Therefore, this study aimed the micromolecular characterization of the sugarcane genotypes resistant and susceptible to orange rust by employing LC-DAD-MS and ¹H NMR as well as analysis of both genotype extracts by HPLC-DAD and multivariate analysis. For the characterization step, the extract prepared from 500 mg of sugarcane leaves employing H₂O/MeOH (8:2) was fractionated in 60 fractions and analyzed by LC-DAD-MS and ¹H NMR. This step allowed the identification of 52 metabolites, including amino acids, sugars, organic acids, such as benzoic and phenolic, and flavones, out of which 33 are described for the first time in sugarcane. On the second step, the genotypes IAC95 5000 (resistant) and SP89 1115 (susceptible) growing under control conditions and inoculated with *Puccinia kuehnii* were analyzed by HPLC-DAD and submitted to multivariate analysis by PCA. In the first experimental design, the seedlings of IAC95 5000 and SP89 1115 genotypes with 30 days were maintained in growth room at 25 °C. The harvest was carried out on 30, 35, 40, 45 and 60 day old seedlings at 6 am and 8 pm. The PCA of this experiment showed that the resistant genotype has the highest correlation of with luteolin derivatives. In the second experimental design, 25 plants were inoculated and 25 were considered as control for each genotype. The seedlings were maintained in BOD and the harvests were made before and after 3, 5, 10 e 15 days of inoculation. The PCA of these data set showed that the IAC95 5000 genotype has higher correlation mainly with chlorogenic acid, luteolin and tricetin derivatives.

Keywords: Sugarcane. *Puccinia kuehnii*. Metabolite fingerprinting. HPLC-DAD. HPLC-DAD-MS. ¹H NMR. ESI-MS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Imagem de microscopia de varredura da formação do apressório de <i>P. Kuenni</i> no estômato da folha de cana-de-açúcar.....	24
Figura 2 - Compartimentalização da absorção e fixação de CO ₂ em plantas C4.....	29
Figura 3 - Biossíntese do ácido chiquímico, quínico, gálico, protocatecuico	31
Figura 4 - Via do ácido chiquímico para formação do ácido cinâmico	28
Figura 5 - Proposta de vias biossintéticas para obtenção do ácido clorogênico em plantas.....	33
Figura 6 Biossíntese dos flavonoides.	34
Figura 7 - Espectro MS/MS modo negativo dos íons <i>m/z</i> 315 referente aos isômeros do ácido dihidroxibenzoico.....	43
Figura 8 - Hipótese para o padrão de fragmentação do ácido gentísico 5- <i>O</i> -β-glicosídeo (13).	44
Figura 9 - Hipótese para o padrão de fragmentação do ácido gentísico 2- <i>O</i> -β-glicosídeo (14).	45
Figura 10 Hipótese para o padrão de fragmentação do ácido protocatecuíco glicosídeo (15). 45	
Figura 11 Espectro MS/MS modo negativo do íon com <i>m/z</i> 299 referente ao ácido hidroxibenzoico-glicosídeo (16).....	46
Figura 12 Espectro MS/MS modo negativo dos íons com <i>m/z</i> 353 referentes os ácidos <i>trans</i> -3-cafeoilquínico (18) e <i>trans</i> -5-cafeoilquínico (19).	47
Figura 13 - Estrutura química dos isômeros do ácido <i>trans</i> -cafeoilquínico identificados nas frações 15, 21 e 23.....	48
Figura 14 Espectro MS/MS modo negativo do íon com <i>m/z</i> 367 referente ácido <i>trans</i> -3-feruloilquínico (21).....	48
Figura 15 - Estrutura química do ácido <i>trans</i> -3-feruloilquínico (21).....	49
Figura 16 - Cromatograma do íon extraído referente aos isômeros do ácido dicafeoilquínico <i>m/z</i> 515.....	49
Figura 17- Espectro MS/MS do íon com <i>m/z</i> 515 referente ácido dicafeoilquínico (22).....	49
Figura 18 - Espectros MS/MS do íon de <i>m/z</i> 355 referente aos isômeros do ácido <i>p</i> -cumaroilaldárico (23 e 24).....	50
Figura 19 - Proposta de fragmentação dos isômeros do ácido <i>p</i> -cumaroilaldárico (23 e 24) ..	51
Figura 20 - Espectro MS/MS modo negativo do íon de <i>m/z</i> 371 referente ao ácido.....	51
Figura 21 - Espectro MS/MS modo negativo do íon de <i>m/z</i> 313 referente ao ácido benzoilaldárico (26).....	52
Figura 22 - Espectro MS/MS modo negativo do ácido siringil-cumaroilaldárico (27).....	52
Figura 23 - Proposta de fragmentação para os isômeros do ácido siringil-cumaroilaldárico (27).	53
Figura 24 - Agliconas flavonoidicas identificados em cana-de-açúcar.....	54
Figura 25 - Substituintes ligados as agliconas flavonoidicas em cana-de-açúcar.	54
Figura 26 - Mecanismo de reação para a formação dos íons fragmentos ^{1,3} A ⁻ e ^{1,3} B ⁻ para luteolina e via de fragmentação para flavonoides pelo rompimento de ligações no anel C.....	55

Figura 27 - Nomenclatura de íons fragmentos para flavonoides glicosilados. naringenina-7- <i>O</i> -raminosil-(1→4)-glicosídeo(A) e naringenina-7- <i>O</i> -glicosídeo(B).	56
Figura 28 - Espectros MS/MS modo negativo referentes aos isômeros luteolina-6- <i>C</i> -arabinosil-8- <i>C</i> -glicosídeo (29) e luteolina-6- <i>C</i> -glicosil-8- <i>C</i> -arabinosídeo (30).....	56
Figura 29 - Padrão de fragmentação para luteolina 6- <i>C</i> -arabinosil-8- <i>C</i> -glicosídeo (30).	58
Figura 30 - Espectros MS/MS modo negativo referentes aos isômeros luteolina-6- <i>C</i> -glicosil (31) e luteolina-8- <i>C</i> -glicosil (32).....	59
Figura 31 - Espectro MS/MS referente aos isômeros apigenina-6- <i>C</i> -arabinosil-8- <i>C</i> -glicosídeo (33), apigenina-8- <i>C</i> -arabinosil-6- <i>C</i> -glicosídeo (34) e apigenina- <i>C</i> -glicosil-arabinosídeo (35).	60
Figura 32 - Proposta de fragmentação para os íons fragmentos <i>m/z</i> 413 e 293 da apigenina <i>C</i> -glicosil-arabinosídeo(35).	61
Figura 33 - Espectro MS/MS modo negativo referente apigenina 6,8-di- <i>C</i> -glicosídeo(36). ...	62
Figura 34 - Espectro MS/MS modo negativo referente apigenina 6,8-di- <i>C</i> -arabinosídeo (37).	62
Figura 35 - Espectro MS/MS modo negativo referente a luteolina-6,8-di- <i>C</i> -arabinosídeo (38).	63
Figura 36 - Espectro MS/MS modo negativo referente à diosmetina-6- <i>C</i> -glicosídeo (39).....	63
Figura 37 - Espectro MS/MS modo negativo referente à apigenina-6- <i>C</i> -glicosídeo(40).....	64
Figura 38 - Espectro MS/MS modo negativo referente à luteolina-6- <i>C</i> -arabinosídeo (41). ...	64
Figura 39 - Espectro MS/MS modo negativo referente à luteolina-8- <i>C</i> -arabinosil-7- <i>O</i> -raminosídeo (42).	65
Figura 40 - Espectros MS/MS no modo negativo referentes aos isômeros de tricina- <i>O</i> -glicosil-raminosídeo <i>m/z</i> 637 (43,44,45).	65
Figura 41 - Espectro MS/MS no modo negativo referente à tricina-7- <i>O</i> -glicosídeo (48).....	66
Figura 42 - Espectro MS/MS no modo negativo referente à tricina-7- <i>O</i> -acetil-glicosídeo (49).	67
Figura 43 - Proposta de fragmentação para os íons fragmentos <i>m/z</i> 373 e 329 da tricina-7- <i>O</i> -acetil-glicosídeo (49).	67
Figura 44 - Espectro MS/MS no modo negativo referente à tricina-7- <i>O</i> -raminosil-glicuronídeo (50).	67
Figura 45 - Proposta de fragmentação para os íons fragmentos <i>m/z</i> 329, 314,299 e 321 da tricina-7- <i>O</i> -raminosil-glicuronídeo (50).	68
Figura 46 - Espectro MS/MS no modo negativo referente à tricina-4'-(<i>O</i> -eritro/treo guaiacilgliceril)éter (51).	68
Figura 47 - Espectro MS/MS no modo negativo referente à tricina-7- <i>O</i> -glicuronídeo-bissulfato (52).	69
Figura 48 - Proposta de fragmentação para tricina-7- <i>O</i> -glicuronídeo-sulfato (52).....	69
Figura 49 - Cromatograma de íons totais do extrato não fracionado das folhas de cana-de-açúcar.....	74
Figura 50 - Genótipos de cana-de-açúcar cultivados em fotoperíodo: IAC 95-5000 e.....	82

Figura 51 - Inoculação das folhas de cana-de-açúcar com esporos de <i>P. kuehnii</i> empregando-se borrifador manual.....	83
Figura 53 - Cromatogramas amostras IAC 95-5000 coletada às 20 hs (iacn)	90
Figura 54 - Cromatogramas amostras IAC 95-5000 coletada às 6 hs (iacd).....	90
Figura 55 - Cromatogramas da variedade SP 89-1115 coletada as 20 hs (spn).....	91
Figura 56 - Cromatogramas da variedade SP 89-1115 coletada as 6 hs (spd).....	91
Figura 57 - Perfil cromatográfico da matriz original (A). Perfil cromatográfico da matriz reduzida (18 a 60 minutos – 60x4001)	92
Figura 58 - Gráfico de scores referente aos genótipos IAC 95-5000 e SP 89-1115 após o transplântio. (A) PC1 X PC2. (B) PC2 X PC3.....	93
Figura 59 - Gráfico de <i>loadings</i> PC2 X PC3 referente aos genótipos IAC 95-5000 e SP 89-1115 após o transplântio.....	94
Figura 60 - Cromatogramas das variedades IAC 95-5000 e SP 89-1115 cultivadas no Instituto de Química com 1 ano de idade.	96
Figura 61 - Perfil cromatográfico dos genótipos SP89 1115 controle durante 0 (SC1), 2 (SC2), 5 (SC3), 10 (SC4) e 15 (SC5) dias.	98
Figura 62 - Perfil cromatográfico dos genótipos SP89 1115 após 2 (SI2), 5 (SI3), 10 (SI4) e 15 (SI5) dias da inoculação com <i>P. kuehnii</i>	98
Figura 63 - Perfil cromatográfico dos genótipos IAC95 5000 controle durante 0 (RC1), 2 (RC2) , 5 (RC3), 10 (RC4) e 15 (RC5) dias.	98
Figura 64 - Perfil cromatográfico dos genótipos IAC95 5000 após 2 (RI3), 5 (RI4), 10 (RI5) e 15 (RI5) dias da inoculação com <i>P. kuehnii</i>	99
Figura 65 - Cromatograma da matriz de dados $X_{36 \times 6731}$ sem pré-processamento.....	100
Figura 66 - Cromatograma da matriz de dados $X_{36 \times 6731}$ normalizados.....	101
Figura 67 - Cromatograma da matriz de dados $X_{36 \times 6731}$ normalizados e centrado na média.	101
Figura 68 - Gráfico de scores PC1XPC2 dos dados sem pré-processamento (A), scores PC1XPC2 dos dados sem pré-processamento (B), gráfico de <i>loadings</i> PC2XPC4 dos dados sem pré-processamento (C).	102
Figura 69 - Gráfico de scores PC1XPC2 dos dados normalizado (A), Gráfico de scores PC2XPC4 dos dados normalizado(B), Gráfico de <i>loadings</i> PC1XPC2 dos dados normalizados (C), Gráfico de <i>loadings</i> PC2XPC4 dos dados normalizados (D).	103
Figura 70 - Gráfico de scores dos dados normalizado e centrado na média. (A) PC1XPC2, (B) PC1XPC5.	104
Figura 71 - Gráfico de <i>loadings</i> da PC1 obtido a partir dos dados normalizados e centrado na média.	104
Figura 72 - Cromatograma representativo das amostras submetida à PCA. Na figura superior a análise de 0-60 minutos e na figura inferior a faixa de 3-50 minutos que representa as 6731 variáveis empregadas na análise por PCA. Para identificação dos metabólitos ver a Tabela 6.	106
Figura 74 - Expansão dos cromatogramas obtidos para as amostras SP89 1115 (figura superior) e IAC95 5000 (figura inferior) destacando as regiões referentes aos picos 5,6,7 e 8.	110

Figura 75 - Expansão dos cromatogramas obtidos para as amostras SP89 1115 (figura inferior) e IAC95 5000 (figura superior) destacando as regiões referentes aos picos 14, 15, 16 e 17.	111
Figura 76 - Expansão dos cromatogramas obtidos para as amostras SP89 1115 (figura inferior) e IAC95 5000 (figura superior) destacando as regiões referentes aos picos 19 e 20.	112
Figura 77 - Gráfico de caixas referente aos metabólitos 3-16 para as amostras IAC95 5000 controle e inoculadas (RC e RI) e SP89 1115 controle e inoculada (SC e SI).	112
Figura 79 - Classificação das amostras IAC95 5000 inoculadas e da amostra de validação (●).	115
Figura 80 - Classificação das amostras SP89 1115 inoculada e da amostra de validação (●).	115
Figura 81 - Classificação das amostras SP89 1115 controle e da amostra de validação (●)..	115

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Compostos identificados nas folhas de cana-de-açúcar empregando LC-DAD-MS e ¹ H NMR.....	39
Tabela 2 - Tentativa de identificação dos metabólitos por LC-DAD-MS no cromatograma de íons totais do extrato não fracionado das folhas de cana-de-açúcar.....	71
Tabela 3 - Principais metabólitos responsável pela discriminação entre os genótipos IAC95 5000 e SP89 1115.....	94
Tabela 4 - Teor de luteolina-8-C-glicosídeo nos genótipos IAC95 5000(IACN) e SP89 1115 (SPN) coletado as 20:00 hs.....	96
Tabela 5 - Tipos de pré-processamento e números de componentes principais selecionadas para análise por componentes principais.	99
Tabela 6 - Variáveis selecionadas através do gráfico de <i>loadings</i> PC1XPC2 e PC1XPC5, tempo de retenção e identificação dos metabólitos.	106

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

[M+H]⁺ - molécula protonada

[M-H]⁻ - molécula desprotonada

¹H NMR – Hidrogen Nuclear Magnetic Ressonance

ACG - ácido clorogênico

AS: ácido salicílico

BOD – Biochemistry Oxygen Demand

C3'H – p-coumarato 3'-hidroxilase

CHI – chalcona isomerase

CHS – chalcona sintase

COW – Correlation Optimized Warning

DAHP – 3-deoxi-D-arabinose-heptulosonato-7-fosfato

EFS – Extração em Fase Sólida

ESI-MS – Electrospray Ionization Mass Spectrometry

FNSI – flavona sintase I

FNSII – flavona sintase II

HCT – hidroxicinamoil-CoA transferase

HPLC-DAD – High Performance Liquid Chromatography with Diode-array Detection

HQT – hidroxicinamoil-CoA chiquimato/quintato hidroxicinamoil transferase

HR-P – Highly Porous Polystyrene-divinylbenzene copolymer

LC-DAD-MS – Liquid Cromatography coupled to arranje diode dectector and mass spectrometry

LC-NMR-MS – Liquid Cromatography coupled to Nuclear Magnetic Ressonance and Mass Spectrometry

MEOH – metanol

NADP – nicotinamida difosfato

NADP-ME – nicotinamida difosfato-dependente

OAA - oxaloacetato

PABA - ácido *p*-aminobenzoico

PC – Principal Component

PCA – Principal Component Analysis

PEP - fosfoenolpiruvato

PLS-DA – Partial Least Square Discriminant Analysis

pb – pico base

RDA – Retro Diels Alder

SEI – Selective Inverse

TMS – Tetramethylsilane

TSP-d₄ – 3-(Trimethylsilyl)propionic-2,2,3,3-d₄ acid sodium salt

UPLC-DAD-MS – Ultra Performance Liquid Chromatography coupled to Diode-Array Detection and Mass Spectrometry

UV - Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	23
1.1 Cana-de-açúcar e o fungo <i>Puccinia kuehnii</i>	23
2 OBJETIVOS.....	27
2.1 Geral.....	27
2.2 Específicos	27
2.3 Estratégia experimental.....	27
3 IDENTIFICAÇÃO E ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DOS METABÓLITOS PRESENTES NAS FOLHAS DE CANA-DE-AÇÚCAR EMPREGANDO LC-DAD-MS E ¹ H NMR.....	28
3.1 Classificação botânica e caracterização fisiológica de cana-de-açúcar	28
3.1.1 Composição química de cana-de-açúcar.....	29
3.1.2 Biossíntese de fenilpropanóides.....	31
3.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	35
3.2.1 Preparo da amostra e extrato	35
3.2.2 Fracionamento do extrato IACSP	35
3.2.3 Cromatografia líquida com detector arranjo de diodos acoplada a espectrometria de massas (LC-DAD-MS).....	36
3.2.4 Ressonância magnética nuclear (NMR – Nuclear Magnetic Resonance)	36
3.2.5 Estratégia para a identificação dos metabólitos	37
3.3 RESULTADOS	38
3.3.1 Aminoácidos e açúcares	43
3.3.2 Ácidos fenólicos.....	43
3.3.2.1 Derivados do ácido benzoico	43
3.3.2.2. Derivados do ácido cinâmico	46
3.3.2.3 Derivados do ácido aldárico	50
3.3.3 Flavonas	54
3.4 DISCUSSÃO	75
4 <i>FINGERPRINTING</i> METABÓLICO DE GENÓTIPOS DE CANA-DE-AÇÚCAR COM DIFERENTES SUSCEPTIBILIDADES AO FUNGO FERRUGEM ALARANJADA EMPREGANDO HPLC-DAD.	77
4.1 Abordagem metabolômica.....	77
4.1.2 Cromatografia líquida de alta eficiência.....	78

4.1.3	Quimiometria e análise de dados multivariados em metabolômica	79
4.2	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	81
4.2.1	Cultivo dos genótipos IAC 95-5000 e SP 89-1115 sem inoculação	81
4.2.2	Cultivo dos genótipos IAC 95-5000 e SP 89-1115 e inoculação com <i>Puccinia kuehnii</i>	82
4.2.2.1	Avaliações	84
4.2.2.1.2	Pré-infecção	84
4.2.2.1.3	Períodos de incubação e latência	84
4.2.2.1.4	Severidade	84
4.2.2.1.5	Esporulação e viabilidade dos esporos	85
4.2.3	Preparo das amostras para as análises por cromatografia líquida	86
4.2.4	Preparo do extrato	86
4.2.5	Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-DAD)	87
4.2.6	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (LC- DAD-MS)	88
4.2.7	Determinação do teor de luteolina-8- <i>C</i> -glicosídeo nos genótipos IAC 95-5000 e SP 89-1115	88
4.2.8	Análise de dados	88
4.2.8.1	Pré- tratamento dos dados	89
4.2.8.2	Alinhamento cromatográfico	89
4.2.8.3	Análise de componente principal (PCA) e Análise Discriminante com método dos Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA)	89
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	90
4.3.1	Experimento de cultivo sem inoculação	90
4.3.2	Determinação do teor de luteolina-8- <i>C</i> -glicosídeo	95
4.3.3	Experimento de cultivo com inoculação	97
4.3.3.1	Avaliações da infecção com o fungo <i>Puccinia kuehnii</i>	97
4.3.3.2	Análises dos extratos dos genótipos SP89 1115 e IAC95 5000 inoculados com <i>P.</i> <i>kuehnii</i> e controle empregando LC-DAD e análise multivariada.	97
4.3.4	PLS-DA para previsão de amostras desconhecidas	114
5	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	117
	REFERÊNCIAS	119
	ANEXOS	127

Anexo 1 - Cromatograma de íons totais e UV/Vis e espectro de ¹HNMR das frações isoladas do extrato das folhas de cana-de-açúcar 127

1 INTRODUÇÃO

1.1 Cana-de-açúcar e o fungo *Puccinia kuehnii*

A cultura da cana-de-açúcar têm sido relevante para a economia brasileira desde o início do século 16 e atualmente o Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar com oito milhões de hectares cultivados, com previsão total de 588,92 milhões de toneladas de cana-de-açúcar a ser moída. Na safra já fechada 2012/2013 a produção de açúcar chegou a 38,34 milhões e de etanol a 23,65 bilhões de litros (CONAB 2013). As expectativas para o ano de 2014 incluem a renovação do canavial em algumas regiões e a continuidade da expansão da área cultivada, principalmente nas regiões Centro-Sul.

O aparecimento de doenças da cana-de-açúcar, tais como, mosaico, carvão, ferrugem marrom, escaldadura têm sido parcialmente controlada devido ao desenvolvimento tecnológico de variedades resistentes. Entretanto, em 2009 a infestação da ferrugem alaranjada causou enorme prejuízo nas lavouras, inicialmente na cidade de Araraquara-SP. Segundo o Ministério da Agricultura estima-se que o prejuízo causado pela ferrugem alaranjada no setor sucroalcooleiro chegou a R\$ 1 bilhão, afetando cerca de 20% da produtividade naquele ano.

A ferrugem alaranjada é causada pelo fungo *Puccinia kuehnii*, que pertence à divisão Basidiomycota, da Classe Pucciniomycetes, Ordem Puccinales e Família Pucciniaceae. *P. kuehnii* é considerado um fungo biotrófico, ou seja, desenvolve-se em tecido vegetal, sendo que a infecção ocorre pelo urediniósporo (esporo) e o principal agente de disseminação é o vento (KLOSOWSKI, 2012).

Os primeiros sintomas da infecção fúngica são pequenas pontuações amareladas e alongadas nas folhas, que evoluem gradativamente para pústulas salientes com coloração alaranjada para castanho-alaranjada. Em condições severas ocorre coalescência das pústulas e necrose das folhas. As pústulas tendem a ocorrer agrupadas e próximas ao ponto de inserção da folha ao colmo. Progressivamente as pústulas se abrem, liberando os urenidiósporos, que são unicelulares, ovoides, piriformes ou elipsoides, equinulados, com até cinco pontos equatoriais, espessura de parede de 1 a 2,3 μm , apresentando espessamento no seu ápice (CHAPOLA, 2013).

O desenvolvimento da doença não está associado ao estado fenológico da cana-de-açúcar, mas dependente das condições climáticas locais (ARAÚJO, 2013). As condições favoráveis

para germinação, penetração e colonização do hospedeiro pelo fungo são umidade relativa alta (acima de 70%), temperaturas amenas a não muito alta (17 a 30°C) e tempo nublado (SANTOS, 2009).

A resistência da cultivar foi inicialmente avaliado no Brasil através da escala diagramática para diagnóstico da ferrugem marrom. A avaliação é realizada na folha +3 e são consideradas como resistentes as plantas com notas de 1 a 3, intermediária 4 a 6 e suscetível de 7 a 9 (AMORIM *et al*, 1987). KLOSOWSKI, 2012 desenvolveu uma nova escala diagramática para ferrugem alaranjada devido à diferença entre o padrão dos sintomas das duas doenças.

Diferente de *Puccinia graminis*, que ocorre em trigo e apresenta ciclo longo e complexo, com até cinco estruturas diferentes, em *P. kuehni* somente o estado anamorfo é conhecido.

GÓMEZ, 2013 iniciou no Brasil os primeiros estudos sobre as características de *P. kuehni* durante o seu ciclo biológico empregando microscopia de varredura. Neste trabalho foi possível observar os uredinósporos (esporos) com tubo germinativo e apressório desenvolvido (Figura 1), assim como pústulas abertas com uredinósporos maduros e uredinósporos equinulados com a epiderme foliar rompida (figuras não apresentada).

Figura 1 - Imagem de microscopia de varredura da formação do apressório de *P. Kuenni* no estômato da folha de cana-de-açúcar.

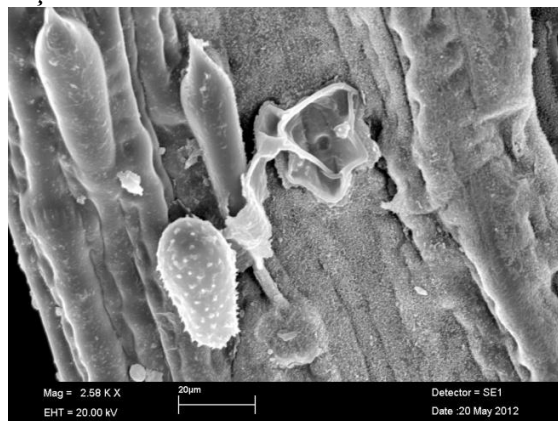


Imagem retirada da dissertação de mestrado de Sérgio Gómez, 2013.

Os danos causados pelo fungo *Puccinia* podem ser diretos, causando perdas na produção e afetando diretamente o produtor, ou indiretos, atingindo os programas de melhoramento genético, causando a morte de genótipos suscetíveis que apresentavam outras características agrônomicas desejáveis (TOKESHI, 1997). Por exemplo, na Guatemala estudos de genótipos inoculados com *P. kuehni* e tratados com fungicida mostraram redução de 18,09 toneladas de

cana-de-açúcar por hectare e 12,25% da concentração de açúcar em cinco das seis variedades estudadas (SÁENZ *et al*, 2010).

Estudos com a folha destacada de variedades comerciais americanas de cana-de-açúcar mostraram redução significativa no índice SPAD (Soil Plant Analysis Development), condutância estomática, taxa de transpiração e fotossintética líquida, após a inoculação com *P. kuehni*. A porção infectada das folhas inoculadas também tiveram redução na taxa de concentração de CO₂ intercelular e respiração (ZHAO *et al*, 2011).

Recentemente, extratos aquosos de cultivares resistente diminuíram a germinação dos urediniospóros, quando comparado com os extratos de variedade suscetível e o branco com água (TIBOLLA *et al*, 2013). Esses resultados são indicativos da presença de metabólitos em variedades resistentes com potencial para inibição dos esporos.

KLOSOWSKI, 2013, demonstrou que o cruzamento entre genótipos suscetíveis de cana-de-açúcar frente à ferrugem alaranjada pode gerar indivíduos resistentes, assim como no cruzamento entre genótipos resistentes foram obtidos genótipos resistentes e suscetíveis. Segundo KLOSOWSKI a resistência da cana-de-açúcar frente à ferrugem alaranjada pode ser controlada por efeitos de gene maior e vários outros genes minoritários atuando quantitativamente.

A cana-de-açúcar possui alto nível de ploidia, aneuploidia e genoma extremamente grande, o que tem dificultado a compreensão de sua arquitetura genética. Clones de *S. officinarum* usualmente tem $2n=80$ cromossomos. Em *S. spontaneum* vários citotipos tem sido descritos com o complemento $2n$ variando de 40 para 128. Já as variedades modernas possuem entre $2n=100$ e $2n=130$ cromossomos (GRIVET; ARRUDA, 2002).

Devido à complexidade genética da cana-de-açúcar, os programas de melhoramento genético encontram dificuldades na seleção de genótipos com características de resistência e alta produtividade. Programas, como o genoma da cana-de-açúcar (SUCEST) têm auxiliado no sequenciamento de fragmentos de genes denominados de ESTs (etiquetas de sequências expressas). O projeto SUCEST gerou aproximadamente 30 milhões de pares de bases. Os resultados obtidos neste projeto serviram de base para a proposição do programa BIOEN/FAPESP, e partir para as sequências completas através do projeto Sucest-fun. Estudos preliminares têm levado para o sequenciamento de 335 milhões de pares de base.

Apesar da importância do sequenciamento do código genético da cana-de-açúcar, muitos pesquisadores têm recorrido a ferramentas da genômica funcional para o entendimento da

função dos genes já sequenciado. Entre essas abordagens encontram-se a transcriptômica, a proteômica e a metabolômica.

A abordagem metabolômica em genótipos de cana-de-açúcar com diferente suscetibilidade à ferrugem alaranjada é uma alternativa na caracterização de fenótipos químicos para posterior correlação com o genótipo. A correlação entre fenótipos químicos e desenvolvimento genético permitirá o avanço no desenvolvimento rápido de genótipos resistentes e/ou mesmo com outras características agronômicas desejáveis, tais como, alta produtividade de biomassa.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

- Estudar a resposta micromolecular (metaboloma) de genótipos de cana-de-açúcar com diferentes suscetibilidades ao fungo *Puccinia kuehnii*, visando identificar marcadores moleculares de resistência à infecção fúngica ou sinalizadores de estabelecimento da infecção.

2.2 Específicos

- ✓ Identificar a maior quantidade possível de metabólitos presentes nas folhas de cana-de-açúcar para a construção de base de dados.
- ✓ Estabelecer protocolos de análise instrumental e quimiométrica para subsequentes abordagens metabolômica em cana-de-açúcar.

2.3 Estratégia experimental

1ª etapa:

- ✓ Preparar extratos em pequena escala para o isolamento dos constituintes presentes nas folhas dos genótipos IAC 95-5000 e SP 89-1115;
- ✓ Isolar os metabólitos empregando HPLC preparativo;
- ✓ Submeter as frações isoladas para a análise por LC-DAD-MS e ¹H NMR;
- ✓ Filtrar os dados obtidos a partir dos espectros de massas, ultravioleta e ressonância magnética nuclear de hidrogênio empregando as seguintes base de dados: Met-Ro (Rothamsted Research), Met-Cana base de dados “in house” e Reaxys (base de dados online).
- ✓ Analisar todos os metabólitos identificados no sistema HPLC-DAD e construir biblioteca de espectros no UV e tempo de retenção.

2ª etapa:

- ✓ Cultivar os genótipos IAC 95-5000 e SP 89-1115 sob condição controlada e inocular com o fungo *P. kuenii*.
- ✓ Preparar extratos dos genótipos inoculados e controle;
- ✓ Analisar os extratos empregando HPLC-DAD e submeter os dados obtidos para a PCA.
- ✓ Identificar os possíveis marcadores moleculares ou sinalizadores da infecção fúngica.

3 IDENTIFICAÇÃO E ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DOS METABÓLITOS PRESENTES NAS FOLHAS DE CANA-DE-AÇÚCAR EMPREGANDO LC-DAD-MS E ^1H NMR

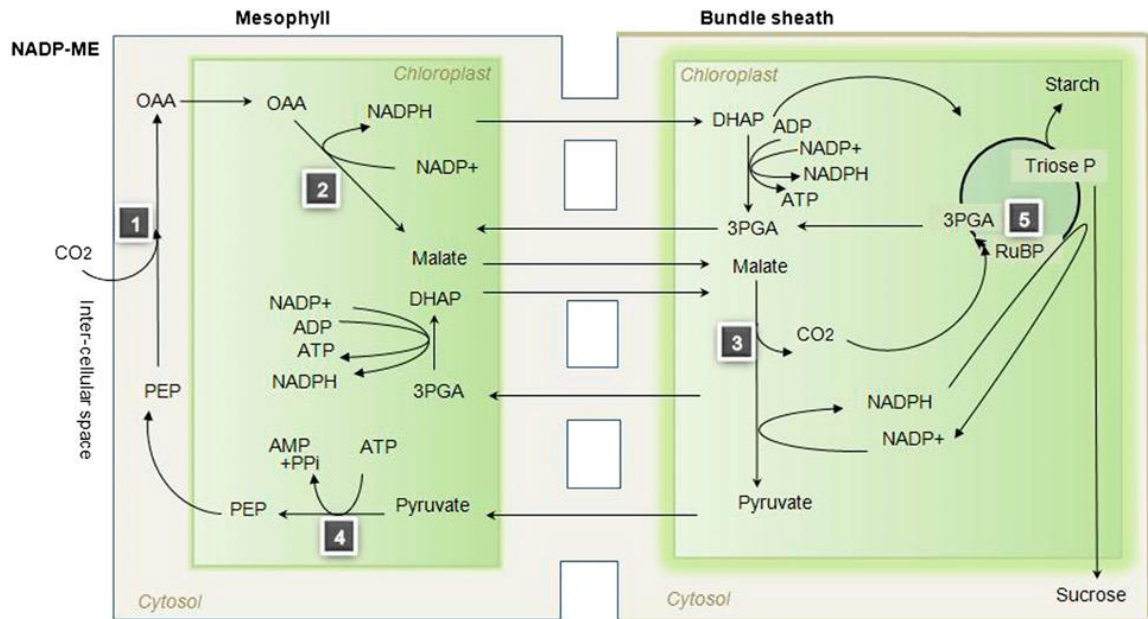
3.1 Classificação botânica e caracterização fisiológica de cana-de-açúcar

Atualmente as plantas cultivadas de cana-de-açúcar são híbridos, gerados principalmente a partir do cruzamento entre as espécies *S. officinarum* L. e *S. spontaneum* L. (CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al, 2011). As hibridações surgiram devido aos prejuízos causados por doenças e à necessidade de obtenção de plantas mais resistentes (FIGUEIREDO, 2009).

A cana-de-açúcar pertence à família Poaceae, e esta possuem as espécies mais ricas e economicamente importantes, sendo que a cana-de-açúcar, milho, arroz e trigo são considerados as quatro principais culturas agrícolas do mundo. Esforços foram necessários para o sequenciamento de todo o genoma em algumas espécies de Poaceae, tais como, *Oryza sativa* (arroz), *Sorghum bicolor* (sorgo), *Zea mays* (milho), *Brachypodium distachyon* (braquipódio) e *Setaria italica* (painço) (DEVOS, 2010).

Em relação ao metabolismo, assim como milho e sorgo, a cana-de-açúcar utiliza o ciclo C_4 para fixação de CO_2 . Plantas do metabolismo C_4 , diferentemente de plantas C_3 onde a fixação fotossintética do CO_2 ocorre em uma única célula (mesófilo), em C_4 este processo é distribuído entre as células do mesófilo e da bainha (DAL'MOLIN, 2010).

No metabolismo C_4 o CO_2 é fixado através do fosfoenolpiruvato (PEP), nas células do mesófilo, produzindo oxaloacetato (OAA) (Figura 2, etapa 1), o qual é reduzido a malato, que migra para a bainha vascular, onde é descarboxilado a piruvato, o qual retorna novamente para as células do mesófilo. Plantas C_4 exibem variantes de como completam a fixação de CO_2 , resultando em três diferentes modos de descarboxilação e múltiplos padrões de modificações anatômicas. No caso da cana-de-açúcar, milho e sorgo estas adaptações estão associadas às enzimas málicas NADP-dependente (NADP-ME), encontradas nos cloroplastos (TAIZ & ZEIGER, 1991).

Figura 2 - Compartimentalização da absorção e fixação de CO₂ em plantas C₄.

retirado de DAL'MOLIN, 2010

Nas espécies NADP-ME, oxaloacetato (etapa 2) é rapidamente reduzido para malato nos cloroplastos do mesófilo por NADPH. Malato entra nos cloroplastos da célula da bainha vascular e sofre descarboxilação (etapa 3). O CO₂ liberado pela descarboxilação do malato entra no ciclo de Calvin (etapa 5), levando para o mesmo ciclo fotossintético que ocorre em plantas C₃. O piruvato regenerado retorna para o cloroplasto do mesófilo, sendo convertido para fosfoenolpiruvato (etapa 4), finalizando assim um ciclo.

A assimilação de CO₂ em plantas C₄ foi descoberta por Hugo Kortschack e colegas no Havaí, através de estudos envolvendo CO₂ marcado em cana-de-açúcar. Quando as folhas foram expostas a CO₂ marcado na presença de luz, 70-80% do C marcado foi encontrado na forma de malato e aspartato. Diante dessas informações Hal Hatch e Roger Slack, na Austrália, elucidaram o que nós conhecemos hoje como ciclo fotossintético de assimilação de carbono C₄ (TAIZ & ZEIGER, 1991).

3.1.2 Composição química da cana-de-açúcar

Os primeiros compostos a serem descritos, obtidos das folhas de *Saccharum* sp, foram ligninas (BINKLEY; WOLFROM, 1953), ácido ferúlico, taninos (STEVENS, 1959) e na garapa antocianinas (BURR *et al*, 1957) e ácido siringico (ROBERTS & MARTIN, 1957).

Arundoina e sawamilletina foram os primeiros triterpenos a serem relatados nas folhas de *S. officinarum* L. (BRYCE *et al*, 1967). Posteriormente, foram caracterizados β-sitosterol,

estigmasterol e os compostos minoritários taraxerol, β -amirina, betulina, isosawamilletina, fernenol, cilindrina, 24-metil-lofenol, 24-etil-lofenol, estigmasten-5-en-3 β , ikshusterol, estigmasten-5-en-3 β , epi-ikshusterol e estigmastan-3 β , 5 α , 6 β -triol (Deshmane & Dev, 1971).

Além dos triterpenos e esteróides β -sitosterol e stigmasterol, foram isolados da torta de filtro 24-metilcolesta-3,6-diona; 24-etilcolesta-3,6-diona; 24-etilcolest-22-en-3,6-diona; 6-hidroxi-campest-4-en-3-ona; 6-hidroxiestigmast-4,22-dien-3-ona; colesta-4-en-3-ona, 24-metilcolest-4-en-3-ona; 24-metilcolesta-4,22-dien-3-ona; 24-etilcolest-4-en-3-ona; 24-etilcolesta-4,22-dien-3-ona (GEORGES *et al*, 2006).

Os primeiros flavonoides relatados em *S. officinarum*, *S. edule*, *S. robustum*, *S. sinense* e *S. spontaneum* foram tricina-7-neohesperidosídeo, tricina-7-di-glicosídeo, tricina-7-glicosídeo-sulfato, tricina-5-glicosídeo, iso-orientina, iso-orientina-O-raminosil-glicosídeo, iso-orientina-7-O-glicosídeo e iso-vitexina (WILLIAMS, HARBONE, SMITH, 1974). Neste trabalho as flavonas foram isoladas e caracterizadas a partir de estudos em cromatografia em camada delgada bidimensional e preparativa, utilizadas no processo de separação e isolamento, enquanto para caracterização estrutural foram empregados reagentes de deslocamento.

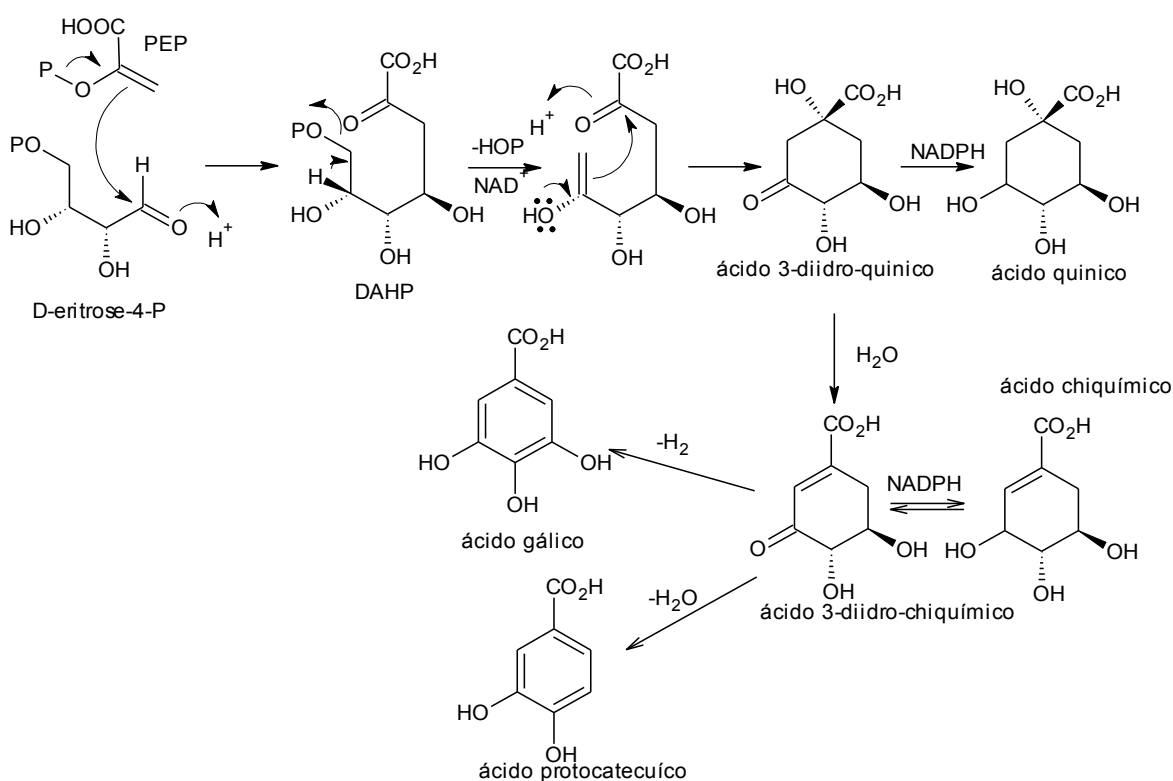
A partir do ano 2000 surgiram novos trabalhos de identificação destes compostos nas folhas de plantas híbridas, transgênicas e em garapa, a partir de cultivares brasileiro, porém empregando técnicas mais refinadas, como HPLC-DAD-MS. As moléculas descritas foram diosmetina-8-C-glicosídeo-arabinosídeo, diosmetina-8-C-glicosídeo, tricina-7-O-raminosilglicuronídeo, tricina-4'-O-(eritro ou treo-guaiacilgliceril) éter e tricina-4'-O-(eritro ou treo-guaiacilgliceril) éter-7-O-glicopiranosídeo, tricina-7-O-raminosil-galactoronídeo, tricina-7-O-neohesperosídeo, tricina-7-O-neoesperosídeo-4'-O-raminosídeo, tricina-7-O-metilglucuronídeo, tricina-7-O-neoesperosídeo-4'-O-raminosídeo, orientina, vitexina, luteolia-8-C-raminosil-glicosídeo, 4',5'-dimetil-luteolina-8-C-glicosídeo, luteolina-8-C-glucosil-7-O-glicuronídeo, diosmetina-8-C-glicosídeo-arabinosídeo, diosmetina-8-C-glicosídeo, schaftosídeo, isoschaftosídeo e 7-O-metilapigenina-6-C-glicosídeo (COLOMBO *et al*, 2005; COLOMBO *et al*, 2006; COLOMBO; YARIWAKE; MCCULLAGHB, 2008; COLOMBO *et al*, 2009).

Flavonoides luteolina-8-C-raminosilglicosídeo, tricina-7-O-raminosilgalacturonídeo, diosmina e as antocianinas petunidina-3-O-(6''-succinil)-raminosídeo e cianidina-3-O-glicosídeo foram quantificadas nas folhas, colmo e raízes de *S. sinensis* Roxb (LI *et al*, 2010).

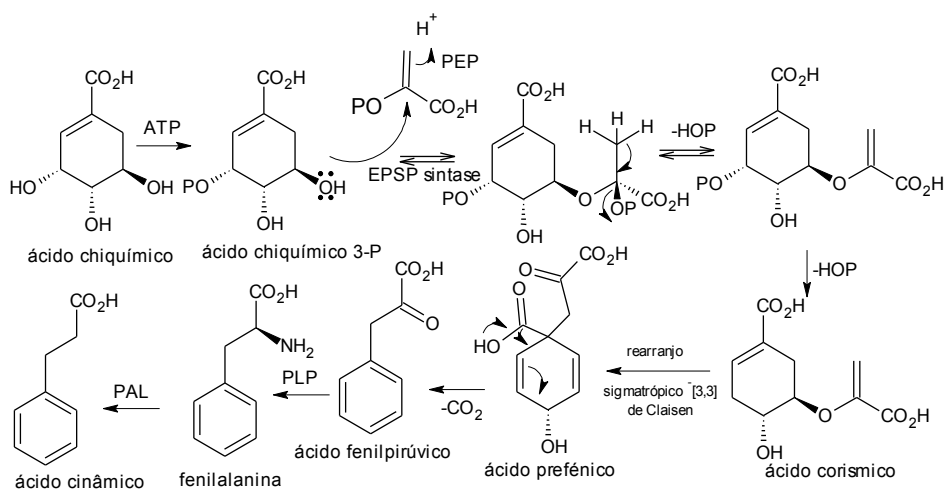
3.1.3 Biossíntese de fenilpropanóides

O ácido chiquímico é derivado da condensação aldólica de *D*-eritrose-4-fosfato com fosfoenolpiruvato (PEP). O intermediário formado é um derivado ácido com sete carbonos (Figura 3), 3-deoxi-*D*-arabinose-heptulose-7-fosfato (DAHP). A eliminação do ácido fosfórico a partir de DAHP e uma reação aldólica intramolecular leva a formação do primeiro intermediário carboxílico, o ácido 3-diidro-quinico (DEWICK, 2005). A redução do ácido 3-diidro-quinico leva a formação do ácido quinico. Outros ácidos também são formados, como o ácido chiquímico, ácido gálico e ácido protocatecuico.

Figura 3 - Biossíntese do ácido chiquímico, quinico, gálico, protocatecuico

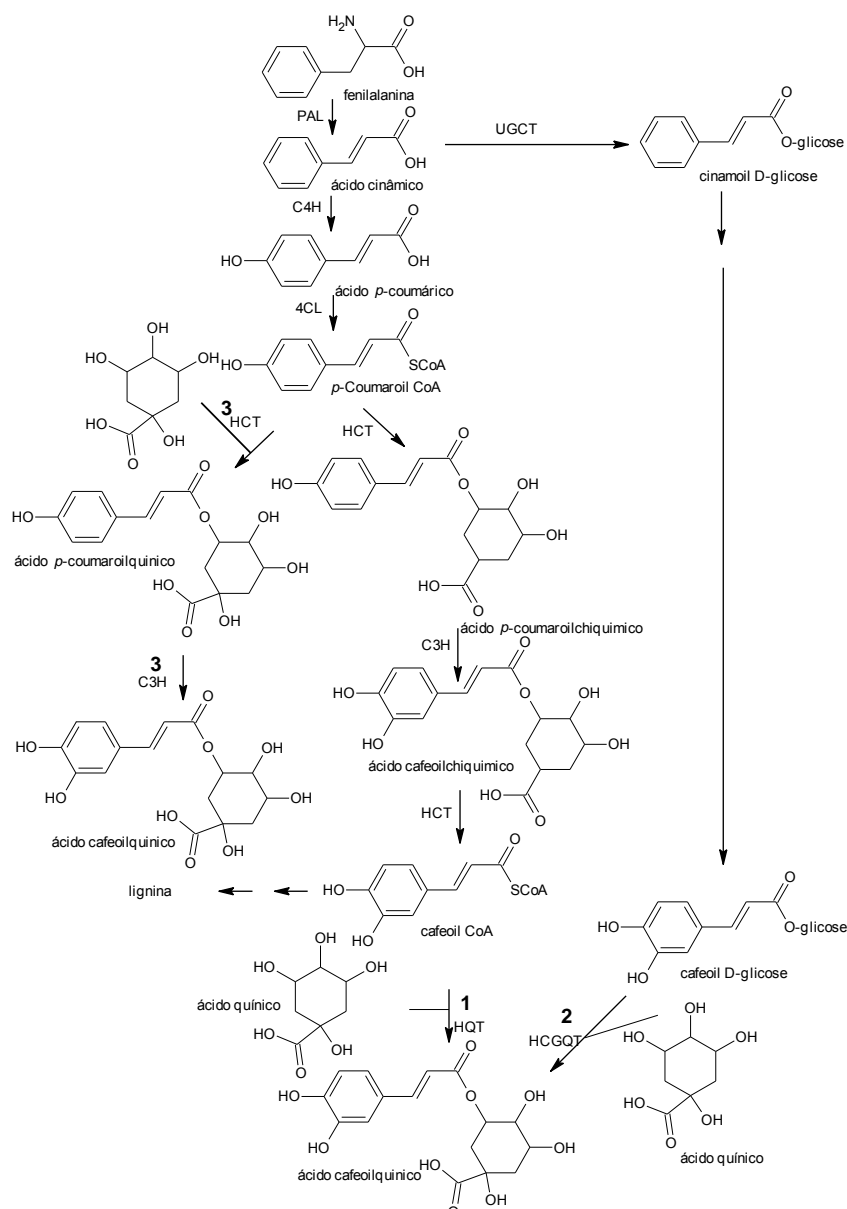


A via do chiquimato é importante para a biossíntese do ácido corísmico. Nesta via o ácido chiquímico combina-se com PEP (fosfoenolpiruvato) através de uma reação de adição-eliminação dando 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato (EPSP-5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate), que é transformado em ácido corísmico (Figura 4). O ácido corísmico é precursor dos aminoácidos fenilalanina e tirosina. Além de outros ácidos, como o ácido salicílico (AS), ácido *p*-aminobenzoico (PABA) e ácido antranílico (DEWICK, 2005).

Figura 4 - Via do ácido chiquímico para formação do ácido cinâmico.

Fenilalanina e tirosina são precursores de vários metabólitos secundários. No caso da fenilalanina, a eliminação da amônia da cadeia lateral gera o ácido *trans*-cinâmico, enquanto que se o precursor for tirosina é formado o ácido cumárico. Outros ácidos cinâmicos são obtidos por reações de hidroxilação e metilação, formando um padrão característico da via do chiquimato (oxigenação em orto). Estes ácidos (ácido cafeico, ácido ferúlico e sinápico) são geralmente encontrados esterificados com ácido quínico e/ou chiquímico e são conhecidos como ácidos clorogênicos.

A via biossintética para geração dos ácidos clorogênicos (ACG) ainda possui de controvérsia. Em tomate, tabaco e batata, a enzima hidroxicinamoil-CoA chiquimato/quinato hidroxicinamoil transferase HQT vai catalizar a formação de ACG a partir de cafeoil CoA e ácido quínico (Figura 5, rota 1). Em outras espécies, cafeoil glicosídeo têm sido proposto como o intermediário ativado (rota 2). A terceira possível rota envolve a síntese de *p*-cumaroil quinato por uma acil transferase e subsequente hidroxilação pela *p*-coumarato 3'-hidroxilase (C3'H) para formar ACG (rota 3). Recente caracterização de duas enzimas da biossíntese de monolignóis, C3'H e hidroxicinamoil-CoA transferase (HCT), têm sugerido que ACG é sintetizado pela terceira rota (NIGGEWEG et al, 2004).

Figura 5 - Proposta de vias biossintéticas para obtenção do ácido clorogênico em plantas.

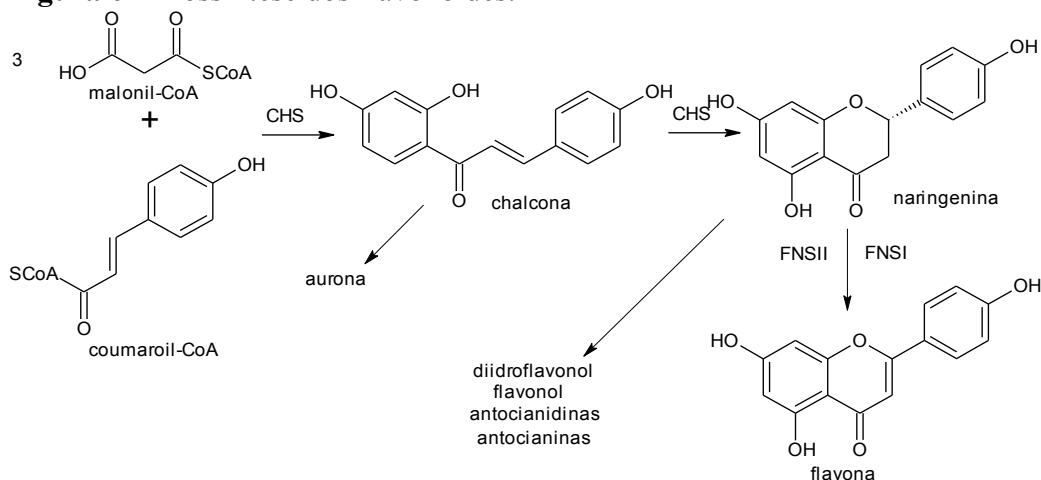
PAL: fenilalanina amônia liase; **C4H:** cinamato 4-hidroxilase; **4CL:** 4 hidroxicinamoi CoA; **C3H:** p-coumarato 3-hidroxilase; **HCGQT:** hidroxicinamoi D-glicose: quinato hidroxicinamoi transferase; **HQT:** hidroxicinamoi-CoA chiquimato/quinato hidroxicinamoi transferase; **HCT:** hidroxicinamoi-CoA transferase; **UGCT:** UDP glicose:cinamato glicosil transferase;

O acoplamento oxidativo entre monômeros do álcool hidroxicinâmico (álcool cumárico, álcool coníferico e álcool sinápico) catalizado pelas enzimas peroxidase leva a formação de lignina.

Ácido cumárico e seus ésteres da coenzima A podem ter a cadeia estendida por três moléculas de malonil-CoA para biossíntese de chalcona (Figura 6). Depois da captura da unidade *p*-cumaroil, cada etapa de condensação subsequente inicia com a descarboxilação de malonil-CoA no sítio ativo da enzima chalcona sintase-CHS (FERRER, 1999).

A chalcona isomerase (CHI) cataliza uma ciclização intramolecular específica de chalcona para (2S)-flavanona. A ação da flavona sintase I (FNSI) ou II (FNSII) promove a oxidação de flavanonas com adição de uma dupla ligação no C-2/C-3. A flavona sintase I tem sido descrita somente na família Apiaceae, enquanto a flavona sintase II é amplamente presente em diversas famílias de plantas (MARTENS, PREUB, MATERN, 2010).

Figura 6 - Biossíntese dos flavonoides.



A atividade da enzima flavonoide-glicosiltransferase permite a incorporação de unidades de açúcar na aglicona flavonoidica (DAVIES & SCHWINN, 2005).

Os flavonoides são metabólitos com esqueleto do tipo cromano, com substituinte fenil na posição C-2 ou C-3 e frequentemente hidroxilados na posição 3,5,7,3',4' e/ou 5'. Frequentemente, um ou mais destes grupos hidroxilas estão metilados, acetilados, prenilados ou sulfatados (RIJKE, et al, 2006). Apresentam banda de absorção no ultravioleta (UV) na faixa de 269-270 nm, referente a unidade benzoil e de 340-355 nm referente a unidade cinamoil (HARBONE et al, 1996).

Os flavonoides são classificados em chalcona, flavanona, flavanolol, flavona, flavonol, antocianinas, antocianidinas e são frequentes como *O*- ou *C*- glicosídeos. Os *O*-glicosídeos possuem unidade de açúcar ligados no grupo hidroxílico da aglicona, enquanto nos *C*-glicosídeos as unidades de açúcar estão ligadas no carbono C-6 e/ou C-8 da aglicona. A diferença no padrão de substituição torna-os facilmente distinguíveis através de espectros de massas característicos de cada classe.

O principal objetivo deste capítulo consiste no isolamento, identificação e caracterização estrutural dos metabólitos micromoleculares presentes nas folhas de genótipos de cana-de-açúcar com diferentes susceptibilidades ao fungo *P. kuehni*. Assim como, a construção de

uma base de dados espectroscópicos (espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (^1H NMR), massas (MS) e no ultravioleta (UV)) dos metabólitos identificados.

3.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.2.1 Preparo da amostra e extrato

Para a análise qualitativa dos metabólitos das folhas de cana-de-açúcar, 250 mg das folhas dos genótipos IAC 95-5000 e SP 89-1115, previamente secas e moídas, foram reunidas, obtendo-se a amostra IACSP (500 mg). Esses 500 mg foram divididos em cinco alíquotas de 100 mg, que foram transferidas para tubos de eppendorf para o preparo do extrato. A metodologia empregada foi realizada de acordo com o método desenvolvido por WARD et al, 2003; 2011. Em cada tubo foi adicionado 1,0 mL de água/metanol 8:2 (v/v). A seguir os tubos foram agitados através de vortex por 30 segundos e então aquecido a 50 °C em banho maria por 10 minutos. A seguir as amostras foram centrifugadas por 5 minutos. O sobrenadante foi removido e aquecido em banho Maria a 90 °C. Posteriormente, os tubos foram estocados em freezer por 30 minutos e a seguir concentrados em evaporador centrífugo à vácuo (Speed Vac, Geneva, concentrador miVac Quattro modelo QUC 23050-A00, equipado com sistema de refrigeração miVac modelo MST-23050-A00 e bomba de vácuo RV5, Edwards) até o volume final de 200 μL e combinados.

3.2.2 Fracionamento do extrato IACSP

O isolamento foi realizado em um sistema Agilent 1100 HPLC equipado com uma bomba quaternária G1311A, detector de arranjo de diodos G1315B, amostrador automático G1313A, forno de coluna G13161A, coletor de frações ISCO (modelo FOXY JR) e software Agilent Chemstation (RevA08). O gradiente linear de eluição consistiu em água com 0,1% ácido fórmico (solvente A) e acetronila com 0,1% de ácido fórmico (solvente B) nas seguintes condições: 0 min, 5% B; 60min, 29% B; 63 min, 100% B; 66 min, 100% B; 69 min, 5% B; 80 min, 5% B; vazão de 1,0 mL/min, volume de injeção de 100 μL . O cromatograma foi registrado até 66 minutos, onde 60 frações foram coletadas. O procedimento foi repetido 8 vezes. Cada fração obtida foi seca em evaporador centrífugo à vácuo. Todas as frações foram solubilizadas em 650 μL de $\text{D}_2\text{O}:\text{CD}_3\text{OD}$ 80:20 (v/v) contendo 0,01% TSP- d_4 (m/v) (sal de sódio do ácido trimetilsililpropionico), sendo que 50 μL foram separados e diluídos em 150

μL $\text{H}_2\text{O}/\text{MEOH}$ 80:20 (v/v) para análise por LC-DAD-MS e os 600 μL restantes foram analisados por ^1H NMR.

3.2.3 - Cromatografia líquida com detector arranjo de diodos acoplada a espectrometria de massas (LC-DAD-MS)

Todas as frações coletadas a partir do HPLC foram analisadas empregando o sistema LC-DAD-MS composto de um cromatografo Dionex ULTIMATE 3000 UHPLC acoplado ao espectrômetro de massas Thermo LTQ-Orbitrap Elite, usando como interface uma fonte aquecida ESI (Thermo Scientific, Hemel Hempstead). Os espectros de massas foram adquiridos separadamente no modo negativo e positivo com ajuste de resolução de 120000 com m/z 50-1500. Os parâmetros de operação foram: voltagem da fonte, 2.5 kV, gás de bainha, 35(unidade arbitrária); gás auxiliar, 10 (unidades arbitrárias); gás de arraste, 0,0 (unidade arbitrária); e temperatura do capilar 350 °C. Valores padrões foram usados em muitos outros parâmetros de aquisição. MS/MS automático foi realizado para os 3 íons mais abundantes de cada varredura, com resolução do Orbitrap de 15000 à m/z 50+. Uma largura de isolamento de 2 m/z foi utilizada e os íons precursores foram fragmentados por alta energia de dissociação C-trap (HCD) com energia de colisão normalizada de 65, e tempo de ativação de 0,1 ms. O tempo máximo de injeção para FT foi de 200 ms para o modo MS e MSⁿ. As análises dos dados foram realizadas empregando software XCalibur. As aquisições foram realizadas a partir de 1,35 minutos.

O sistema de cromatografia líquida foi um Dionex Ultimate 3000 equipado com uma bomba quaternária LPG-3400RS, detector de arranjo de diodos DAD-3000, amostrador automático termostatizado WPS3000TRS e compartimento de coluna TCC-3000 RS. As análises foram realizadas empregando a coluna Hypersil gold column (1,9 μm , 30 x 2,1 mm i.d., Thermo, Hemel Hempstead), a qual foi mantida a 25°C e o sistema solvente de água/0,1% de ácido acético (A) e acetonitrila/0,1% de ácido acético (B) (Fisher Scientific). Separação foi realizada em 24.5 minutos sobre as seguintes condições: 0 min, 5% B; 22 min, 31,6% B; 23 min, 100% B, 24,6 min, 100%. Vazão de 0,3 mL/min e volume de injeção de 10 μL .

3.2.4 - Ressonância magnética nuclear (NMR – Nuclear Magnetic Resonance)

Os espectros de ^1H -NMR foram adquiridos sob automação à temperatura de 300 K no espectrômetro Avance[®] 600 (Bruker Biospin, Coventry, UK) operando à 600,0528 MHz e

usando uma probe SEI (Selective inverse probe) de 5 mm. O sinal residual de água foi suprimido por pré-saturação durante tempo de espera de relaxação de 5 s. Cada espectro consistiu de 128 para 512 scans com 65 K pontos de dados na faixa espectral de 12 ppm. FIDs sofreram transformada de Fourier após a aplicação da função de apodização com aplicação de linha de 0,5 Hz. Correção da linha de base e fase foram realizadas com o software TopSpin (Bruker Biospin, Coventry, UK). Deslocamento químico ^1H NMR foram referenciados para os sinais $(\text{CH}_3)_3$ do TSP- d_4 à $\delta 0.00$.

3.2.5 Estratégia para a identificação dos metabólitos

Os dados de ^1H NMR e LC-DAD-MS obtidos das frações 1-60 (item 3.2.3) foram submetidos a uma série de filtros para a etapa de identificação dos metabólitos.

Os seguintes filtros foram sequencialmente aplicados:

1. Base de dados de NMR mantida pelo grupo Met-RO (Rothamsted Research) empregando o software AMIX (Bruker, Coventry, UK).
2. Banco de dados Met-Cana. Este banco de dados foi construído através dos dados de massa e fórmulas moleculares dos compostos já identificados em cana-de-açúcar (CAVALHEIRO et al, 2012) e em algumas espécies de Poaceae.
3. Base de dados Reaxys (disponível em www.reaxys.com).

Para o filtro 2 e 3 foram utilizadas as fórmulas moleculares gerada pelo software XCalibur para o íon detectado com erro aceitável de 10 ppm.

Os possíveis compostos identificados nos filtros 2 e 3 foram confirmados através dos íons fragmentos obtidos dos espectros de MS/MS e deslocamentos químicos no espectro de ^1H NMR. Os metabólitos que não foram identificados empregando os três filtros acima foram tentativamente identificados através da combinação dos dados de ^1H NMR, espectros de massas (MS e MS/MS) e espectros no UV.

3.3 RESULTADOS

Foram detectados 144 íons nas análises das sessenta frações por LC-DAD-MS. Nas análises por ^1H NMR somente oito frações mostram espectros com “mínima” impureza, enquanto 35 espectros apresentaram sinais das substâncias em mistura e 17 espectros não apresentaram sinais referentes a metabólitos. No total foram identificados 52 metabólitos, dos quais quatro são derivados de ácidos benzóicos, seis dos ácidos hidroxicinâmicos, seis dos ácidos aldáricos, 24 flavonas, nove aminoácidos, dois ácidos orgânicos e sacarose (tabela 1). Os aminoácidos, sacarose e ácido *trans*-3-cafeoilquínico foram identificados através da comparação dos espectros da base de dados Met-Ro. O restante dos metabólitos tiveram os sinais atribuídos de acordo com dados da literatura e por LC-DAD-MS. O espectro de ^1H NMR e o cromatograma de íons totais e UV de cada fração analisada encontra-se em anexo (Anexo 1).

Tabela 1 Compostos identificados nas folhas de cana-de-açúcar empregando LC-DAD-MS e ^1H NMR.

Classe	No.	Metabólito	LC-DAD-MS		^1H NMR
			[M-H] ⁻	UV	
<i>Açúcar</i>	1	sacarose	-	-	5,39d (3,4), 4,18d (8,8), 3,20-3,75 m (3-4)
<i>Ácidos orgânicos</i>	2	ácido <i>trans</i> aconítico	173,00941	-	6,98 s, 2,65 s (6)
	3	ácido <i>cis</i> aconítico	173,00943	-	6,35 s, 2,70 s (6)
<i>Aminoácidos</i>	4	fenilalanina	166,08597 ^P	258	3,09dd (8,6, 8,1), 3,95dd (4,7,5,0), 7,3 m (8-9)
	5	glutamina	-	-	2,10m, 2,53 m (6)
	6	guanosina	-	-	8,12s, 5,90d (5,0), 4,56q(?), 4,37t(?), 4,20m (6)
	7	isoleucina	-	-	3,64m, 1,7m, 1,45m, 1,19d (5,3), 1,15t (8,5, 5,8 ?) (6)
	8	leucina	-	-	1,15q (?), 3,68m (6)
	9	tirosina	-	-	3,07q (8,0, 8,3), 3,2m, 7,17d (8,5), 8,18d (6,8) (4)
	10	treonina	-	-	1,31d(5,8) (4)
	11	triptofano	188,07018 ^P	279	4,02dd (4,4, 3,5), 7,17 td (1,1, 1,1, 1,1), 7,25td (1,1, 1,1, 1,1), 7,50 d (7,9), 7,72 d (8,2) (14)
	12	valina	-	-	0,99d (6,7), 1,02d (5,8), 2,54m (4)
<i>Ácidos fenólicos</i>	13	ácido gentísico 5-O- β -glicosídeo	315,0722, 317,12018 ^P	298	4,94 (7,6), 6,68d (8,7), 7,21dd (8,7, 3,30), 7,54d (3,30) (11)
	14	ácido gentísico 2-O- β -glicosídeo	315,0722	-	-

15	ácido protocatecuíco 4-β-glicosídeo	315,0723	-	-
16	ácido hidroxibenzoico-4-β-glicosídeo	299,07721	-	7,24d (7,4), 7,07d (8,3), 5,08 (9,0), 3,25-3,75m (12)
17	ácido <i>cis p</i> -cumaroilquínico	337,11395	-	8,07 d (7,06); 7,59 d (7,98); 5,50 m (17)
18	ácido <i>trans</i> -3-cafeoilquínico	353,0876	324	2,01m, 2,10 d (3,1), 2,15m, 4,21 dd (3,6, 4,3), 5,10d (7,9), 5,32m , 6,39d (16,2), 6,92d (8,1), 7,11 dd (2,4, 3,2), 7,19d (2,0), 7,65 (16,3) (21)
19	ácido <i>trans</i> 5-cafeoilquínico	353,08777; 355,10266 ^P	326	5,36m, 6,44 d (15,9), 6,93d (8,9), 7,13 dd (1,8, 2,5), 7,20d (2,6), 7,64 (16,0) (15)
20	ácido <i>trans</i> 4-cafeoilquínico	353,08762	-	-
21	ácido <i>trans</i> -3-feruloilquínico	367,10345	324	3,7s, 5,3m, 6,49d (15,9), 6,93d (8,3), 7,20dd (2,0, 2,0), 7,3d (1,8), 7,70d (15,9), (22-23)
22	ácido dicafeoilquínico	515,13013	-	-
23	isômero do ácido <i>p</i> -cumaroil-aldarico	355,06696	308	-
24	isômero do ácido <i>p</i> -cumaroil-aldarico	355,06738	-	-
25	ácido cafeoilaldárico	371,06204	281	-
26	ácido benzoilaldárico	313,05637	311	-
27	ácido siringil-cumaroilaldárico	535,10706; 581,14465 ^P	296	7,30d (8,3), 7,22d (16), 7,18s, 6,84d (8,5), 6,09dd (1,6, 8,0), 6,01d (16), 5,74dd (2,6,7,3), 4,44d (1,8), 4,37 (2,7) (36)
28	ácido siringilcumaroilaldárico	535,11359; 581,14345 ^P	291	-

<i>Flavonas</i>	29	luteolina-6- <i>C</i> -arabinosil-8- <i>C</i> -glicosídeo	579,1353	271/347	7,4 (s), 5,06 d (7,2) (30)
	30	luteolina-6- <i>C</i> -glicosil-8- <i>C</i> -arabinosídeo	579,1351	271/347	-
	31	luteolina-6- <i>C</i> -glicosídeo	447,0939	270/347	-
	32	luteolina-8- <i>C</i> -glicosídeo	447,0936	270/347	-
	33	apigenina-6- <i>C</i> -arabinosil-8- <i>C</i> -glicosídeo	563,14050; 565,15289 ^P	271/336	6,82s, 8,02 d (8,1), 7,52d (8,5) (33)
	34	apigenina-6- <i>C</i> -glicosil-8- <i>C</i> -arabinosídeo	563,14868	271/335	6,8 s, 7,17d (8,7), 7,52d (8,5) (33)
	35	apigenina-6- <i>C</i> -glicosil-arabinosídeo	563,1390	271/334	-
	36	apigenina-6,8-di- <i>C</i> -glicosídeo	593,15140	269/338	-
	37	Apigenina-6,8-di- <i>C</i> -arabinosídeo	533,12988	269/342	-
	38	luteolina-6,8-di- <i>C</i> -arabinosídeo	549,1223	279/345	-
	39	diosmetina-6- <i>C</i> -glicosídeo	461,1088; 463,12329 ^P	271/346	-
	40	apigenina-6- <i>C</i> -glicosídeo	431,09875	269/334	-
	41	luteolina-6- <i>C</i> -arabinosídeo	417,08258	-	-
	42	luteolina 8- <i>C</i> -arabinosil-7- <i>O</i> -raminosídeo	563,14050	-	-
	43	apigenina-6- <i>C</i> -glicosil-raminosídeo	577,15601	271/339	-
	44	apigenina-8- <i>C</i> -glicosil-raminosídeo	577,15594	271/337	-
45	isômero da tricina- <i>O</i> -neohesperosídeo	637,2499	-	-	

46	isômero da tricina- <i>O</i> -neohesperosídeo	637,1793	269/348	-
47	isômero da tricina- <i>O</i> -neohesperosídeo	637,1741; 639,19128 ^p	266/347	-
48	tricina-7- <i>O</i> -glicosídeo	491,1921	-	-
49	tricina-5-carboxil-7- <i>O</i> -glicosídeo	535,18182	-	-
50	tricina-7- <i>O</i> - α -L-raminosil-glicuronídeo	651,1533; 653,17041 ^p	269/351	7,3 (s), 6,9d (2,4), 6,8 (s),6,5d (2,4), 5,42d (7,3), 5,2d (1,9), 4,0dd (1,7;3,4), 3-4m, 1,3d (7,0) (47)
51	tricina-4'-(<i>O</i> -eritro/treo guaiacilgliceril)éter	687,1921	-	-
52	tricina-7- <i>O</i> -glicuronídeo-sulfato	585,06360	269/351	6,60 d (J=2,4), 6,97 d (J=3,12), 6,81 s, 5,41 d (7,3), 4,20 d (9,07) (53)

p: detectado no modo positivo; (): fração na qual foi identificado; -: não detectado e/ou não observado

3.3.1 Aminoácidos e açúcares

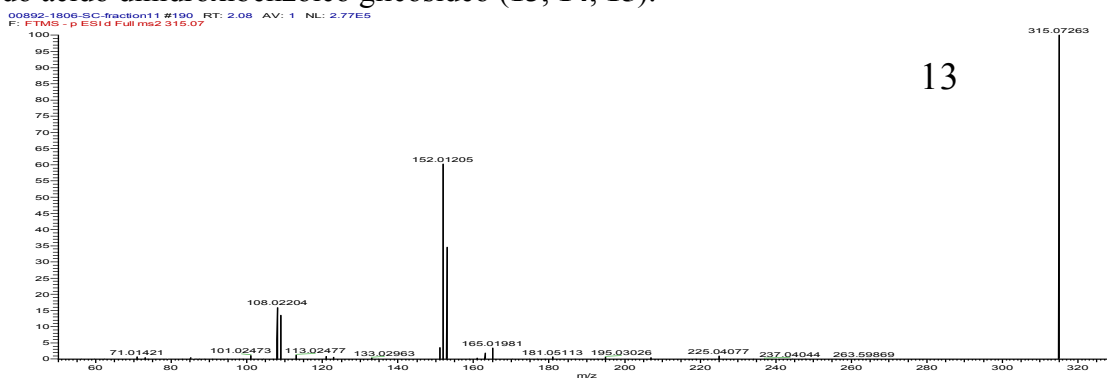
Os aminoácidos e açúcares (**1-12**) foram identificados no primeiro filtro, através da comparação dos espectros de ^1H NMR das amostras com os espectros da base de dados Met-RO. Todos os aminoácidos foram identificados somente por ^1H NMR, com exceção da fenilalanina e triptofano, que foram detectados também empregando LC-DAD-MS(+). Os outros aminoácidos não foram detectados porque eluíram antes do tempo de aquisição. A tabela 1 mostra o deslocamento químico e a constante de acoplamento para todos os aminoácidos identificados. Uma discussão detalhada sobre a elucidação estrutural dos aminoácidos torna-se desnecessária, tendo em vista, que estes compostos são comuns em plantas, e foram identificados simplesmente por comparação.

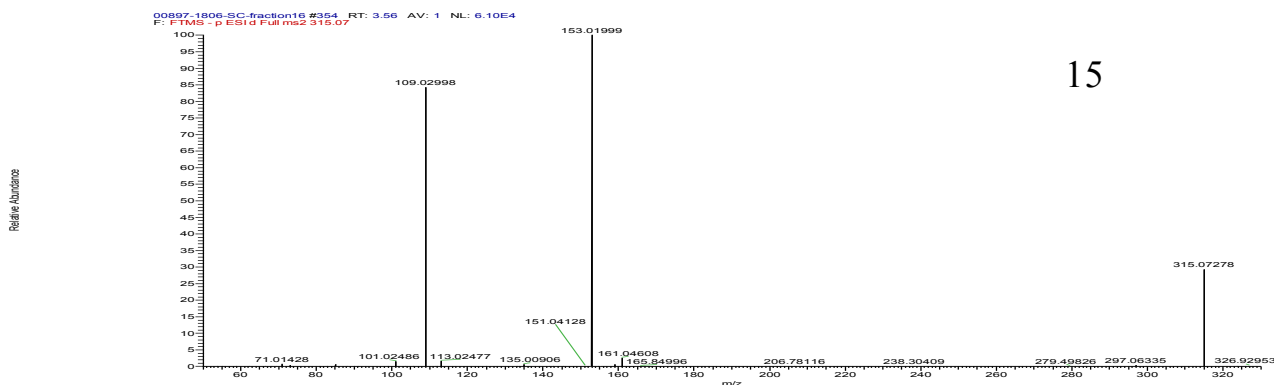
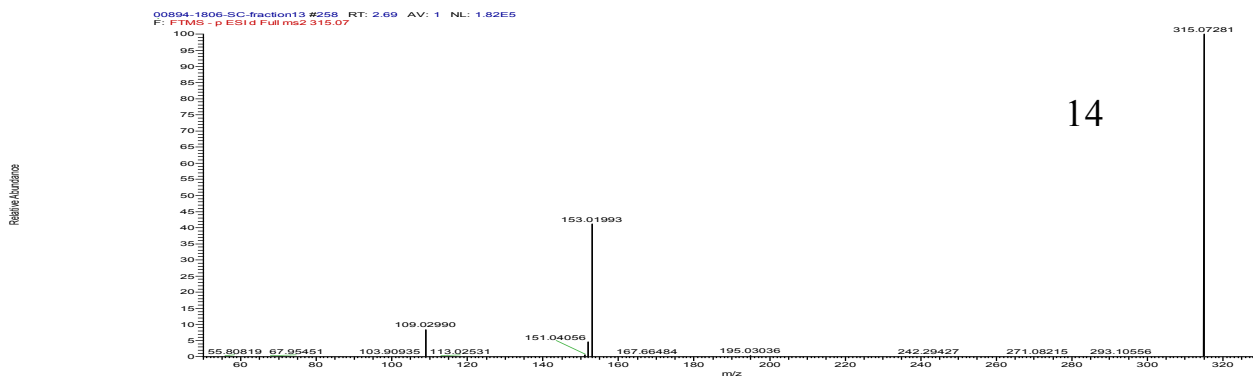
3.3.2 Ácidos fenólicos

3.3.2.1 Derivados do ácido benzoico

Os ácidos fenólicos estão espalhados como metabólitos secundários em plantas, derivados a partir do ácido benzoico e cinâmico. Isômeros do ácido dihidroxibenzoico glicosilado (**13,14** e **15**) foram identificados nas frações 11, 13 e 16 com tempos de retenção em 2,10; 2,68 e 3,59 minutos, respectivamente. Os três compostos apresentaram m/z 315 referente ao ácido dihidroxibenzoico ligado a unidade de glicose, mas íons fragmentos m/z 108, 109, 152 e 153 com abundância diferente nos espectros MS/MS (Figura 7).

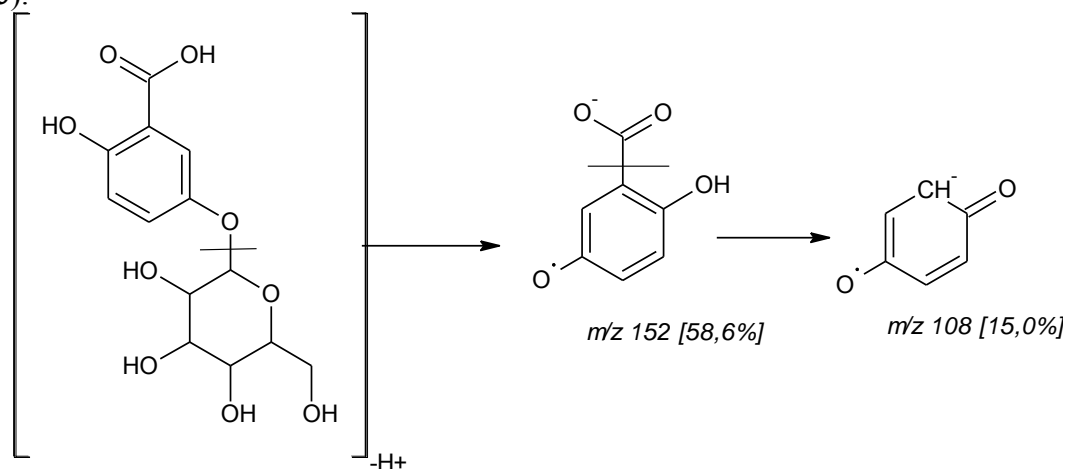
Figura 7 - Espectro MS/MS no modo negativo dos íons m/z 315 referente aos isômeros do ácido dihidroxibenzoico glicosídeo (**13**, **14**, **15**).





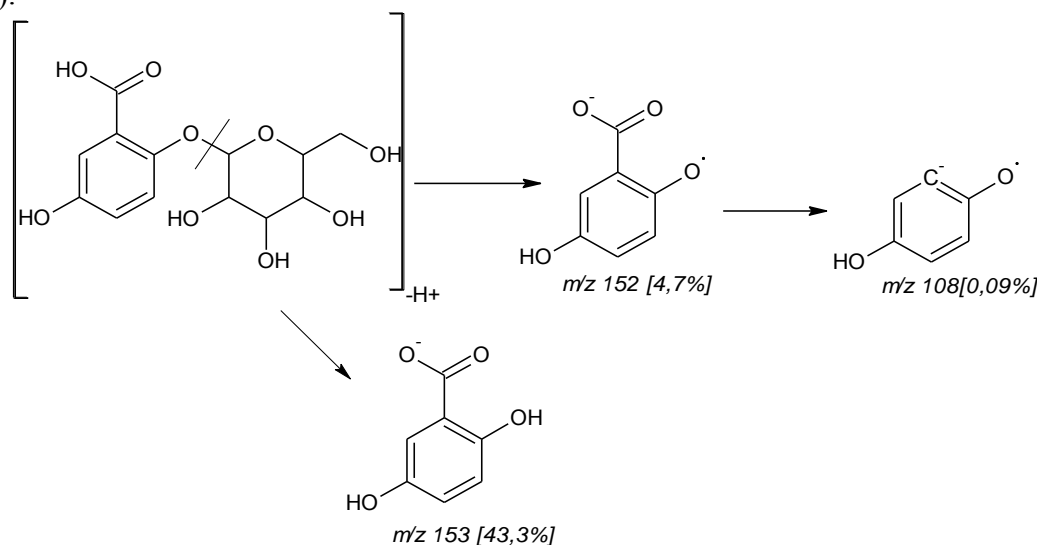
O metabólito **13** foi identificado como ácido gentísico 5-*O*- β -glicosilado. O espectro do íon produto mostrou fragmento m/z 315 (pb), seguido pelos íons fragmentos m/z 152 e 108 (Figura 8), os quais estão de acordo com FAYOS et al, 2006. No espectro de ^1H NMR foram observados sinais em δ 4,94d (7,60) referente ao hidrogênio anomérico da unidade de açúcar, dubleto em δ 6,68 (8,70) H-3, duplo dubleto em δ 7,21 (8,70;3,30) H-4, dubleto em δ 7,54 (3,30) H-6.

Figura 8 - Hipótese para o padrão de fragmentação do ácido gentísico 5-*O*- β -glicosídeo (**13**).



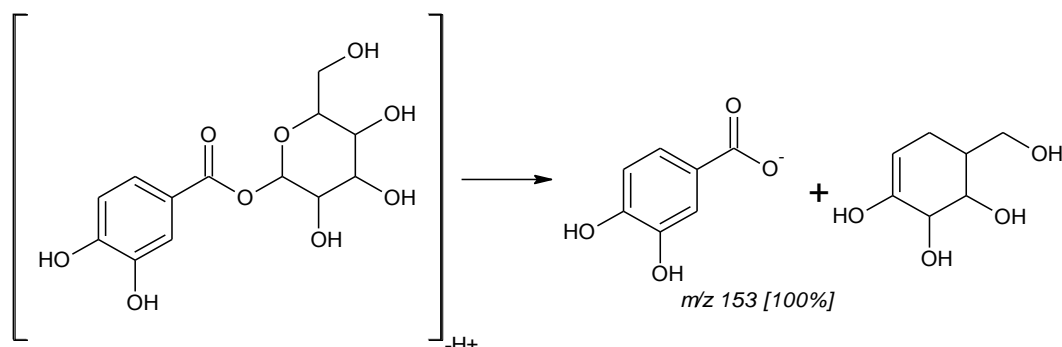
O mesmo padrão de íons fragmentos obtidos para o ácido gentísico 5-*O*-β-glicosídeo foram observados para o pico em 2,68 minutos (Figura 9). Entretanto com a abundância relativa menor para o íon produto *m/z* 152 e 108, sugere-se que este metabólito possui a ligação glicosídica no oxigênio ligado ao C-2, portanto este metabólito foi identificado como ácido gentísico 2-*O*-β-glicosídeo (14).

Figura 9 - Hipótese para o padrão de fragmentação do ácido gentísico 2-*O*-β-glicosídeo (14).



O pico em 3,59 minutos foi identificado como ácido protocatecuíco glicosídeo (15) com a unidade de açúcar esterificada na hidroxila do ácido carboxílico (Figura 10). O pico base *m/z* 153 é referente a perda da unidade de açúcar.

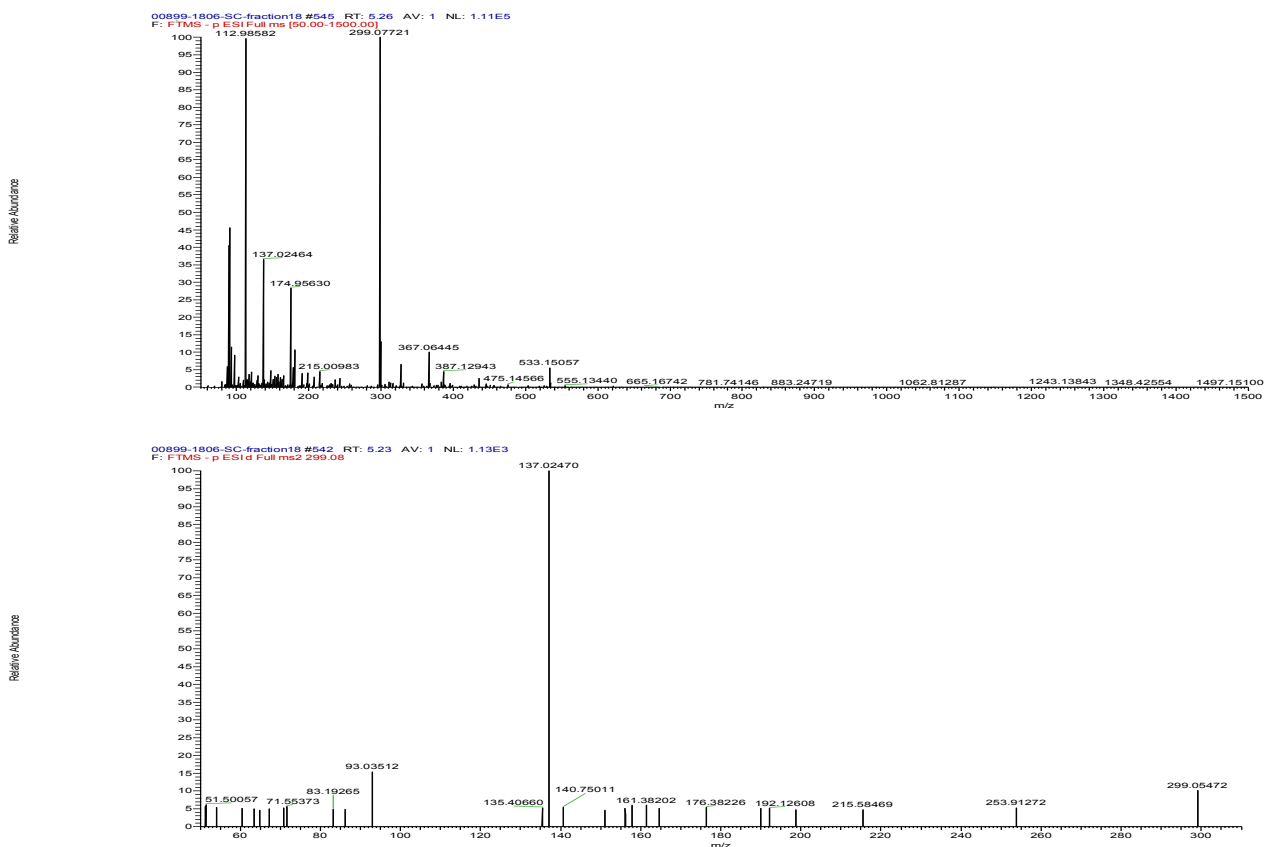
Figura 10 - Hipótese para o padrão de fragmentação do ácido protocatecuíco glicosídeo (15).



A tentativa de identificação da série de isômeros com *m/z* 315 pode estar de acordo com a ordem de eluição desses compostos em C-18, onde metabólitos com carboxila livre (11-12) seriam mais polares do que compostos com carboxila esterificada (13).

A fração 18 mostrou cinco picos, dos quais o pico em 5,26 minutos gerou o espectro com m/z 299 $[M-H]^-$ ($C_{13}H_{15}O_8$) referente ao ácido hidroxibenzoico glicosídeo (**16**). O espectro MS/MS do íon produto mostrou pico base m/z 137, referente a molécula desprotonada do ácido hidroxibenzoico após a perda da unidade de glicose (Figura 11).

Figura 11 - Espectro MS/MS no modo negativo do íon com m/z 299 referente ao ácido hidroxibenzoico-glicosídeo (**16**).

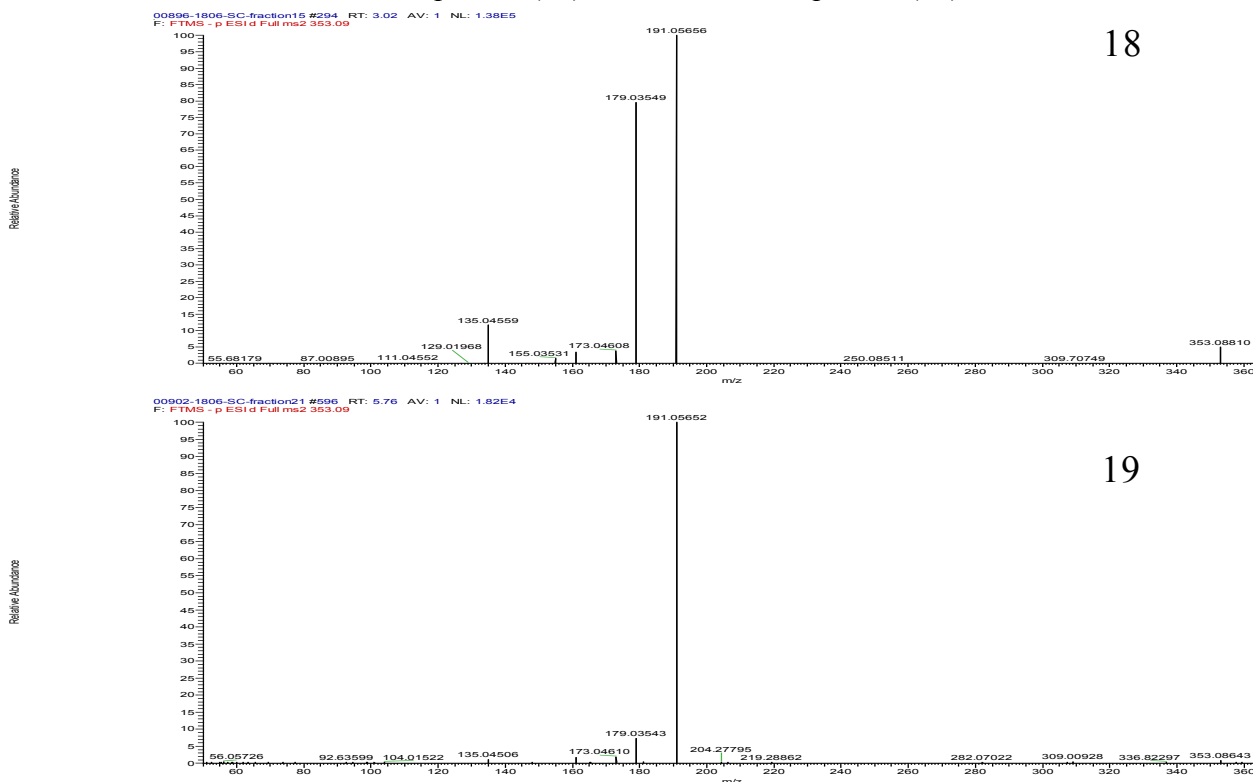


3.3.2.2. Derivados do ácido cinâmico

Os ácidos clorogênicos foram identificados pelo padrão de fragmentação publicado por CLIFFORD et al, 2003 e com os trabalhos de PARVEEN et al (2011, 2013) sobre identificação de ácidos clorogênicos em *Miscanthus*, ambos empregando espectrometria de massas. Os ácidos clorogênicos são constituídos por uma unidade quinica esterificada com ácido caféico, o qual apresenta bandas no UV ~ 300 e ~ 325 nm. Os derivados do ácido cafeoilquínico apresentam m/z 353 $[M-H]^-$ ($C_{16}H_{18}O_9$) como íon precursor no modo de ionização negativo, mostrando padrão de fragmentação específico para cada composto. Nas frações 15, 21 e 23 foram identificados os ácidos *trans*-5-cafeoilquínico (**19**), *trans*-3-cafeoilquínico (**18**) e *trans*-4-cafeoilquínico (**20**) com

tempos de retenção em 3,04, 5,84 e 6,64 minutos, respectivamente (Figura 12). Os espectros MS/MS dos isômeros **18** e **19** apresentaram íon produto m/z 191, correspondente ao íon [quinato-H]⁻, enquanto o isômero **20** teve como pico base o íon m/z 173 [quinato-H₂O-H]⁻, formado pela perda de água da unidade quínica.

Figura 12 - Espectro MS/MS no modo negativo dos íons com m/z 353 referentes aos ácidos *trans*-3-cafeoilquínico (**18**) e *trans*-5-cafeoilquínico (**19**).

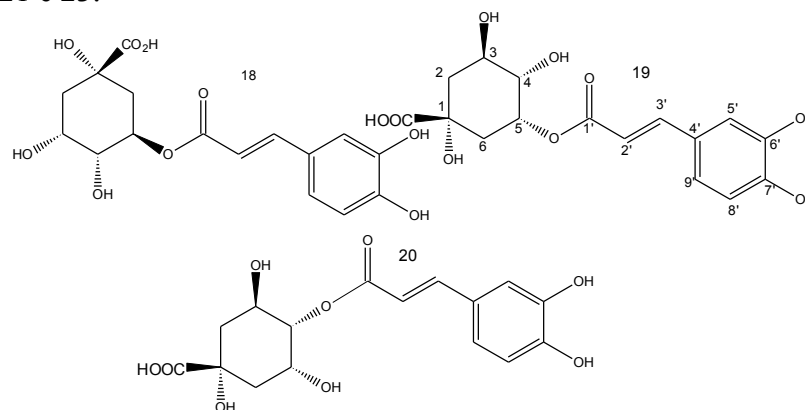


O espectro de ¹H NMR mostrou sinais em δ 6,44d (J=16,0) e 7,64 d(J=16,0) correspondentes aos hidrogênios olefínicos 2' e 3' da unidade cumaroil, além dos sinais em δ 6,93 d(J=8,9), δ 7,13 dd (J= 1,8; 2,6) e 7,20 d (2,6) referentes aos hidrogenios 8', 9' e 5' do anel aromático da unidade cumaroil, respectivamente. Foi possível ainda observar o multiplete em 5,36 ppm referente ao hidrogênio 5 da unidade quínica. Portanto, esses dados corroboram com os íons fragmentos do espectro MS/MS para estabelecimento da estrutura do ácido *trans*-5-cafeoilquínico (Figura 13).

Também foi possível observar os sinais referentes ao ácido *trans*-5-cafeoilquínico na fração 21, com sinais em δ 6,39 d (16,2) e 7,65 (16,2) dos hidrogênios olefínicos 2' e 3' da unidade cumaroil, e os sinais 6,92 d (8,1), 7,11 dd (2,4; 3,2) e 7,19 d (2,0) referentes aos hidrogenios 8', 9' e 5' do anel aromático da unidade cumaroil, respectivamente. Os sinais da unidade quínica foram observados em δ 5,32 m referente

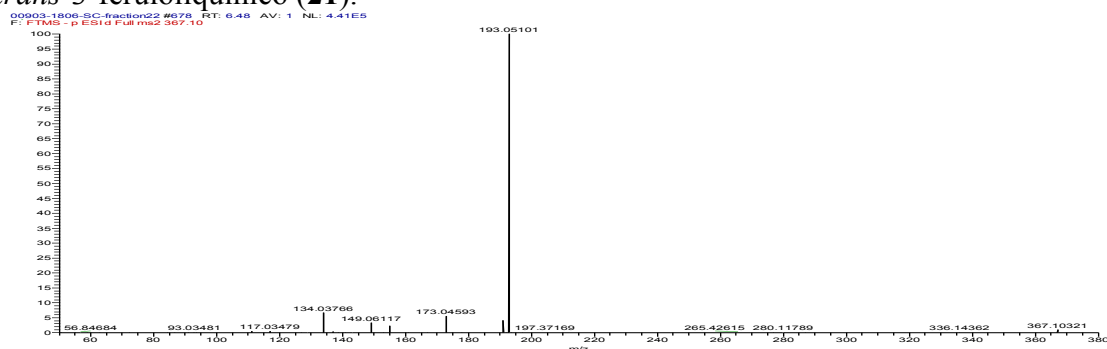
ao hidrogênio 3, δ 5,10 d (7,9) H-5, δ 4,21 d (3,6; 4,3) H-4 e os multipletos em 2,01 e 2,15 ppm referente aos hidrogênios 2 e 6 (Figura 13).

Figura 13 - Estrutura química dos isômeros do ácido *trans*-cafeoilquínico identificados nas frações 15, 21 e 23.

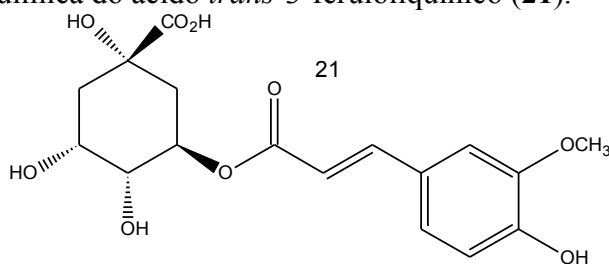


A fração 22 mostrou pico com tempo de retenção em 6,50 minutos e íon precursor com m/z 367 $[M-H]^-$ ($C_{17}H_{19}O_9$), o qual foi identificado como ácido *trans*-3-feruloilquínico (**21**). O espectro MS/MS do íon produto mostrou m/z 193 referente ao íon ferulato (Figura 14).

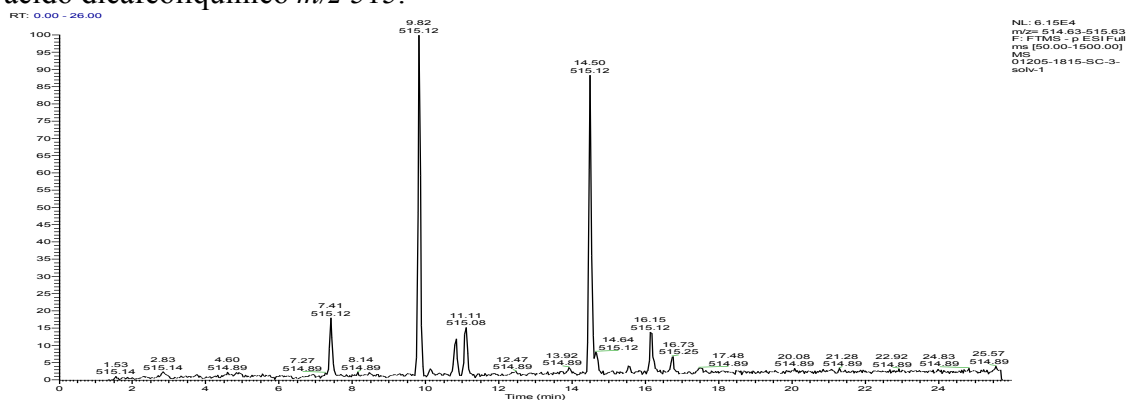
Figura 14 - Espectro MS/MS no modo negativo do íon com m/z 367 referente ácido *trans*-3-feruloilquínico (**21**).



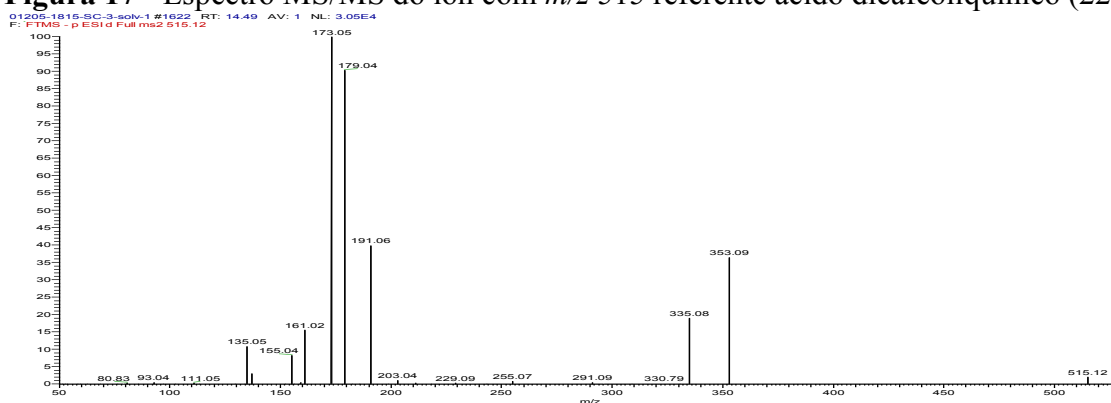
Através do espectro de 1H NMR das frações 22 e 23 foi possível observar os sinais em δ 7,70 d (15,9) e δ 6,49 d (15,9) referentes aos hidrogênios olefínicos 2' e 3' da unidade feruloil, além dos sinais em δ 6,93 d (8,3), δ 7,20 dd (2,0; 2,0) e δ 7,3 d (1,8), referente aos hidrogênios 9', 8' e 9' e δ 3,91 referente ao grupo metoxi ligada no carbono 6' da unidade feruloil. A presença da unidade quínica foi confirmada com o multipletos em 5,3 ppm (Figura 15).

Figura 15 - Estrutura química do ácido *trans*-3-feruloilquínico (21).

A fração 35 apresentou pico em 9,84 minutos referente ao íon precursor m/z 515. Entretanto, o espectro MS/MS (Figura 16) deste íon mostrou baixa aquisição de íons. Através do cromatograma de íons extraídos do extrato preparado como descrito no ítem 2.3 foi possível averiguar a presença do íon m/z 515.

Figura 16 - Cromatograma do íon extraído no modo negativo referente aos isômeros do ácido dicafeoilquínico m/z 515.

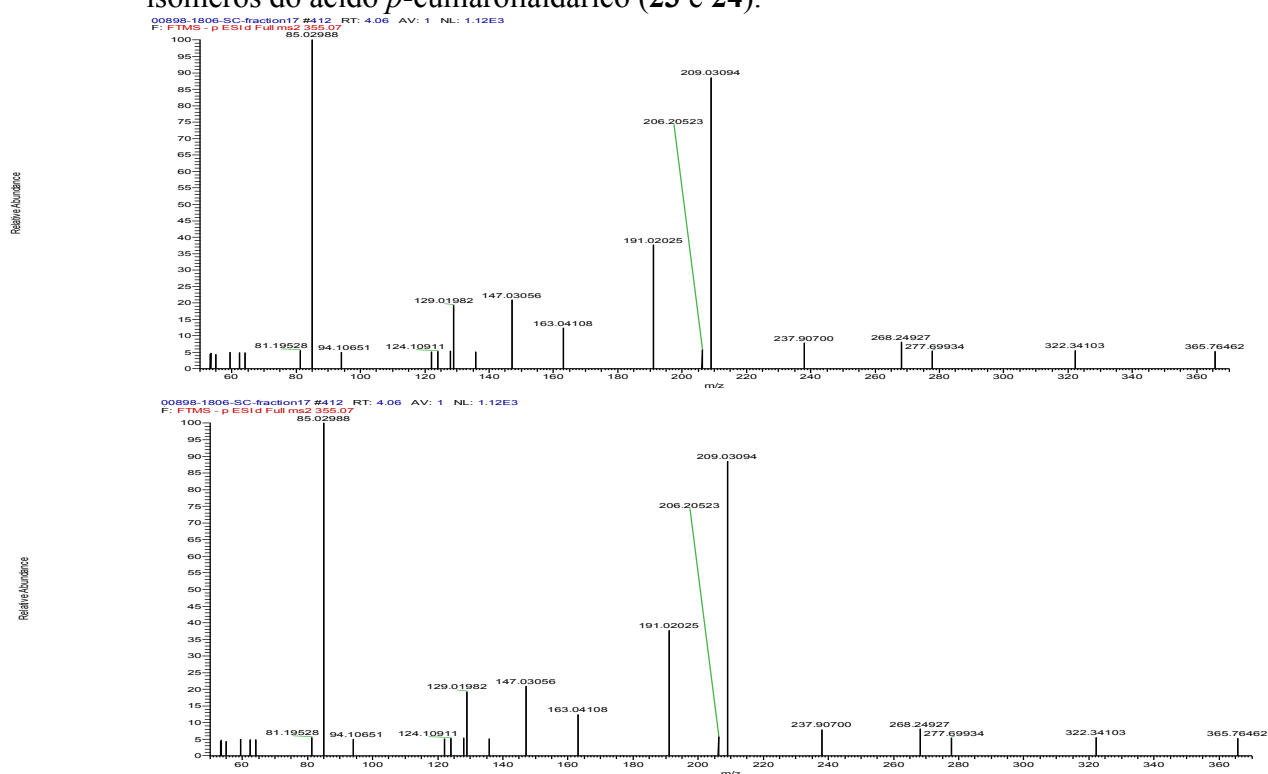
Assim como para a fração, o espectro MS/MS do íon precursor m/z 515 (9,82 minutos) mostrou baixa aquisição de íons. Enquanto o espectro MS/MS do pico em 14,50 minutos (Figura 17) apresentou padrão de fragmentação característico da perda da unidade quinica m/z 191, cafeoil m/z 179 e pico base m/z 173 referente [quinato- H_2O -H]. Este metabólito foi identificado como ácido dicafeoilquínico (22).

Figura 17 - Espectro MS/MS do íon com m/z 515 referente ácido dicafeoilquínico (22).

3.2.2.3 Derivados do ácido aldárico

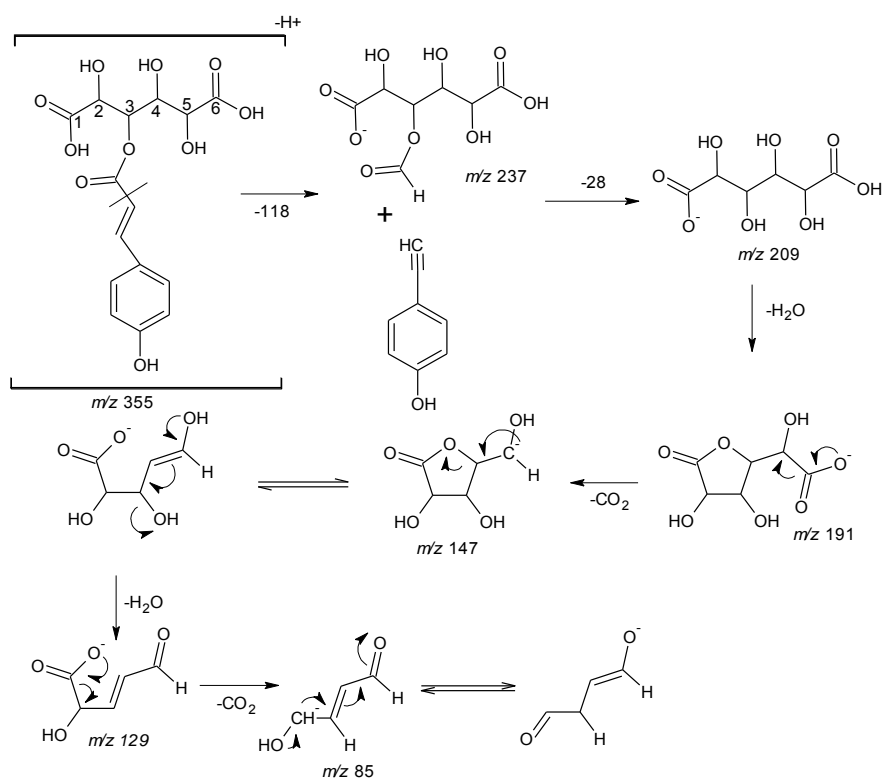
O ácido aldárico é um ácido dicarboxílico, derivado das aldoses, sendo mais comum na forma de ácido glicárico e manárico (MORRISON; BOYD, 1996). Os picos em 4,12 e 4,39 minutos presentes nas frações 17 e 18, respectivamente, foram atribuídos aos isômeros do ácido *p*-cumaroilaldárico (**23** e **24**). O espectro do íon precursor mostrou m/z 355 $[M-H]^-$ ($C_{15}H_{15}O_{10}$). O espectro MS/MS do íon produto mostrou picos com m/z 209, 147 e pico base em 85 (Figura 18).

Figura 18 - Espectros MS/MS no modo negativo do íon de m/z 355 referente aos isômeros do ácido *p*-cumaroilaldárico (**23** e **24**).

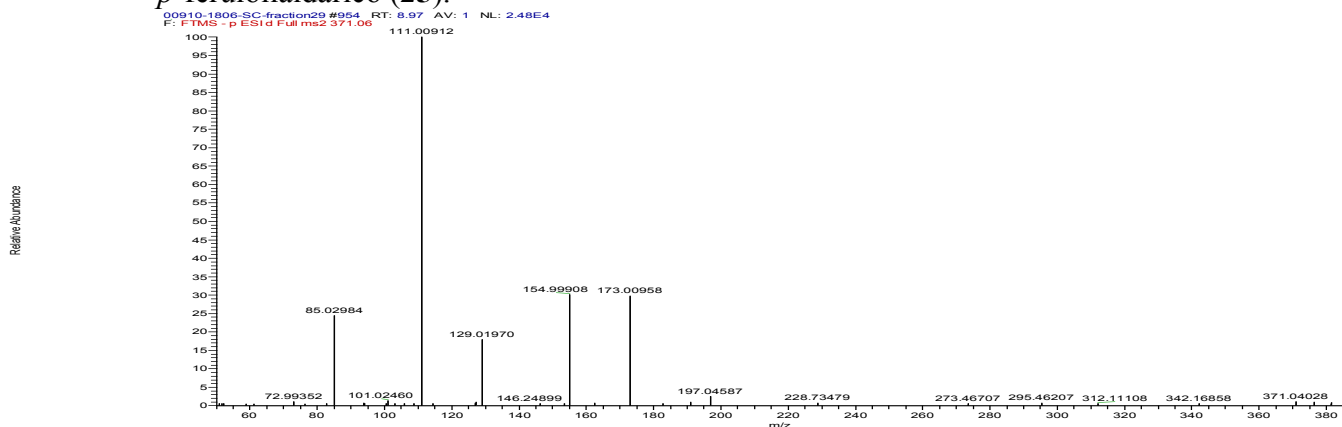


O fragmento de m/z 209 corresponde ao íon do ácido aldárico e m/z 85 refere-se a perda de massa da unidade aldárica. A proposta de fragmentação para este metabólito foi estabelecida (Figura 19), tendo em vista que os trabalhos na literatura foram realizados na faixa de aquisição do espectrômetro de massas a partir de m/z 100 e 200 (RUIZ et al, 2013; DUEÑAS et al, 2005), ao qual atribuíram como pico base o íon m/z 209.

Não foi possível determinar a posição exata para o substituinte, sendo que este pode estar ligado no C-2, C-3 ou C-4 da unidade aldárica. Somente a título de exemplo, a proposta de fragmentação foi realizada com o ácido 3-*p*-cumaroilaldárico.

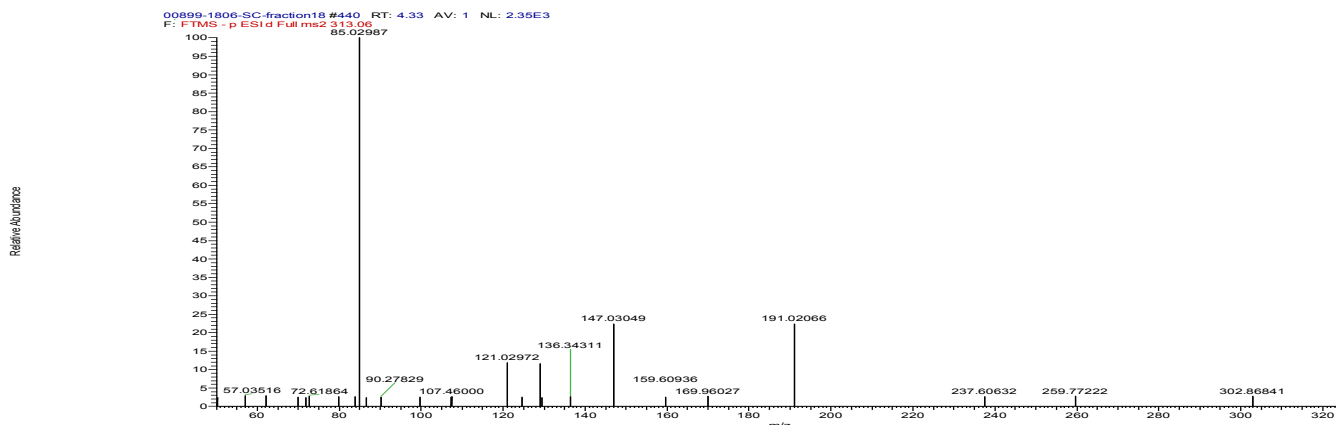
Figura 19 - Proposta de fragmentação dos isômeros do ácido *p*-cumaroilaldarico (**23** e **24**)

O pico em 8,95 minutos presente na fração 29 foi atribuído ao ácido *p*-cafeoilaldarico (**25**). O espectro do íon precursor mostrou m/z 371 $[M-H]^-$ ($C_{15}H_{15}O_{10}$). O espectro MS/MS do íon produto mostrou picos com m/z 111 (pb), 129 e 85 (Figura 20).

Figura 20 - Espectro MS/MS no modo negativo do íon de m/z 371 referente ao ácido *p*-feruloilaldárico (**25**).

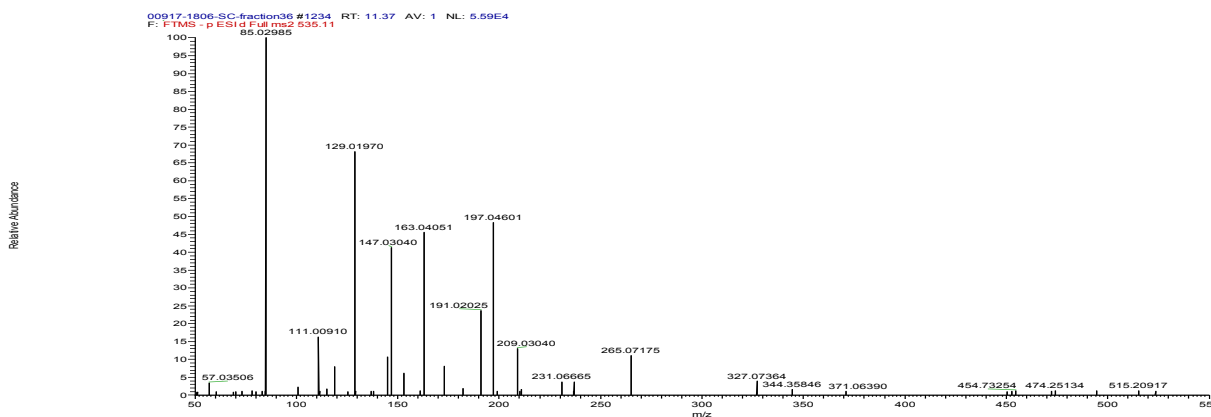
O pico em 4,39 minutos presente na fração 18 foi atribuído ao ácido benzoilaldárico (26). O espectro do íon precursor mostrou m/z 313 $[M-H]^-$ ($C_{13}H_{14}O_9$). O espectro MS/MS do íon produto mostrou picos com m/z 85 (pb), 121, 147 e 192 (Figura 21).

Figura 21 - Espectro MS/MS no modo negativo do íon de m/z 313 referente ao ácido benzoilaldárico (26)



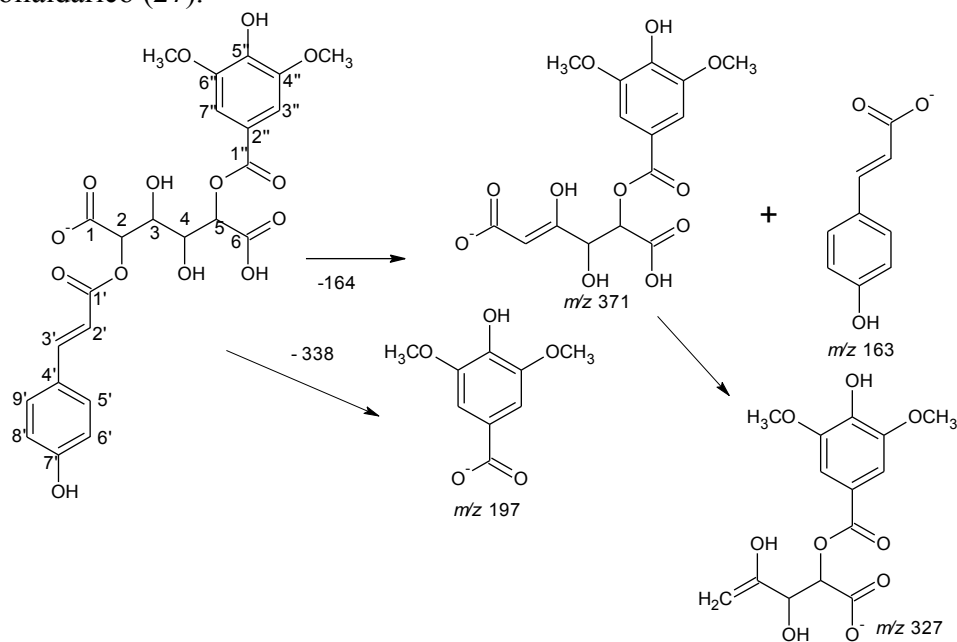
O isômero do ácido siríngil-cumaroilaldárico (27) foi identificado na fração 36 com tempo de retenção em 11,36 minutos. O espectro no UV mostrou banda intensa em 296 nm e espectro de massas m/z 535 $[M-H]^-$. O espectro MS/MS (Figura 22) gerou íons fragmentos m/z 57 (3,48), 85 (100,0), 129 (70,83), 163(46,61), 197 (55,46), 209 (11,06), 265 (12,15) e 327 (3,28). O íon produto m/z 209 corresponde a molécula do ácido aldárico, enquanto o íon produto m/z 163 é referente a unidade cumaroil e 197 a unidade siríngil (Figura 23). O íon fragmento m/z 85 é referente a perda de massa da unidade aldárica. Estes resultados foram suportados por dados de 1H NMR, sendo que os deslocamentos químicos e as constantes de acoplamento estão descritas na tabela 1.

Figura 22 - Espectro MS/MS modo negativo do ácido siríngil-coumaroilaldárico (27).



O espectro de ^1H NMR mostrou sinais característicos da unidade cumaroil, devido aos sinais em δ 6,01 d (16,0) e 7,22 d (16,0) referentes aos hidrogênios olefínicos 2' e 3', além dos hidrogênios 6' e 8' com δ 7,30 d (8,3) e dos hidrogênios 5' e 9' com δ 6,84 d (8,5). A outra porção da molécula identificada foi a unidade siringil devido ao singlete em 7,18 ppm referente aos hidrogênios 3'' e 7'' e em 3,71 ppm referente aos grupos metoxila ligado no carbono 4'' e 6''. A unidade aldárica foi identificada através dos sinais em δ 6,10 dd (1,6; 1,8), 5,75 dd (2,6; 2,4), 4,44 d (1,8) e 4,37 d (2,6). Não foi possível atribuir corretamente os sinais da unidade aldárica, talvez com experimentos 2D NMR. Além desses sinais, também foi possível observar sinais na região de δ 3,85-3,95 sugerindo que há equilíbrio da unidade aldárica tanto na forma cíclica com acíclica. Não há relatos sobre o ácido siringil-cumaroilaldárico, sendo descrito pela primeira vez.

Figura 23 - Proposta de fragmentação para os isômeros do ácido siringil-cumaroilaldárico (**27**).



Também foi detectado o isômero do ácido siringil-cumaroilaldárico (**28**) na fração 33 com tempo de retenção em 10,19 minutos e m/z 535,14345. O padrão de fragmentação foi o mesmo para o metabólito acima, portanto, os dados de fragmentação não serão discutidos.

3.3.3 Flavonas

Flavonas do tipo apigenina, luteolina, diosmetina e tricina foram identificadas ligada a glicose, arabinose, ácido glicurônico, ácido hidroxicinâmico, dissacarídeos, como por exemplo, neohesperosídeo (glicose 1→ raminose) e rutinosídeo (1→ 2) (Figuras 24 e 25).

Figura 24 - Agliconas flavonoidicas identificados em cana-de-açúcar.

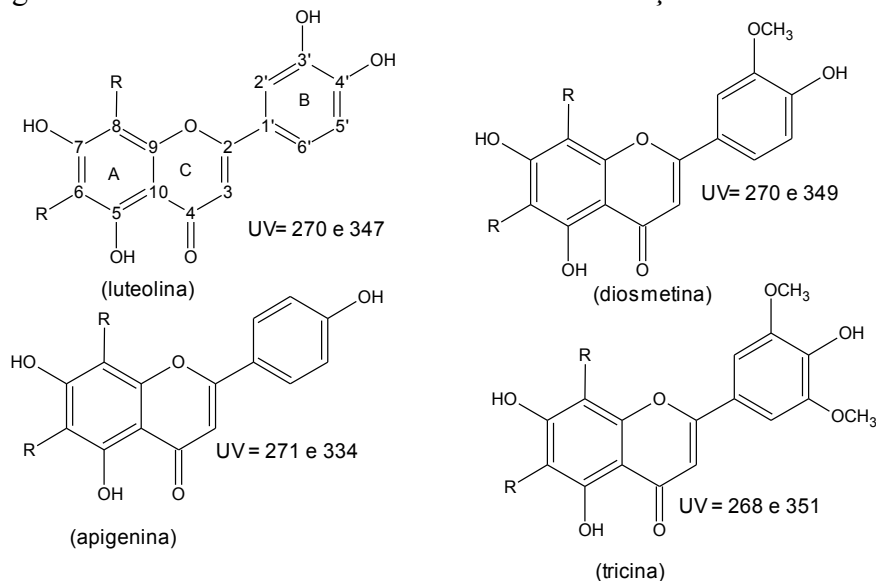
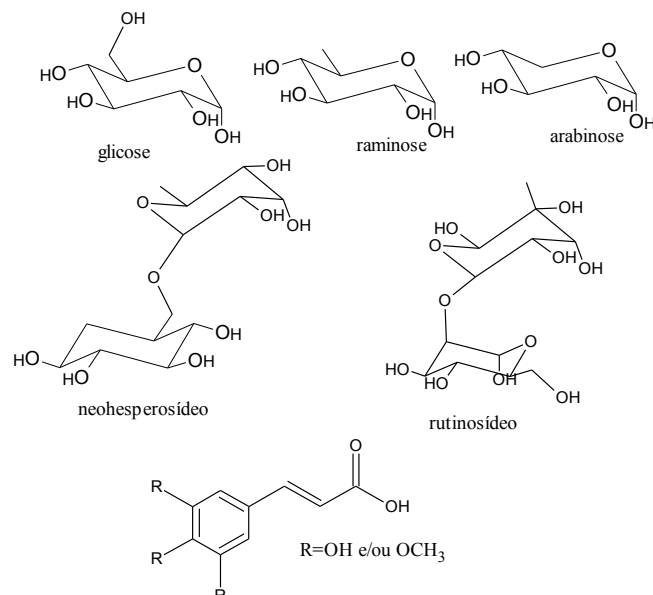


Figura 25 - Substituintes ligados as agliconas flavonoidicas em cana-de-açúcar.

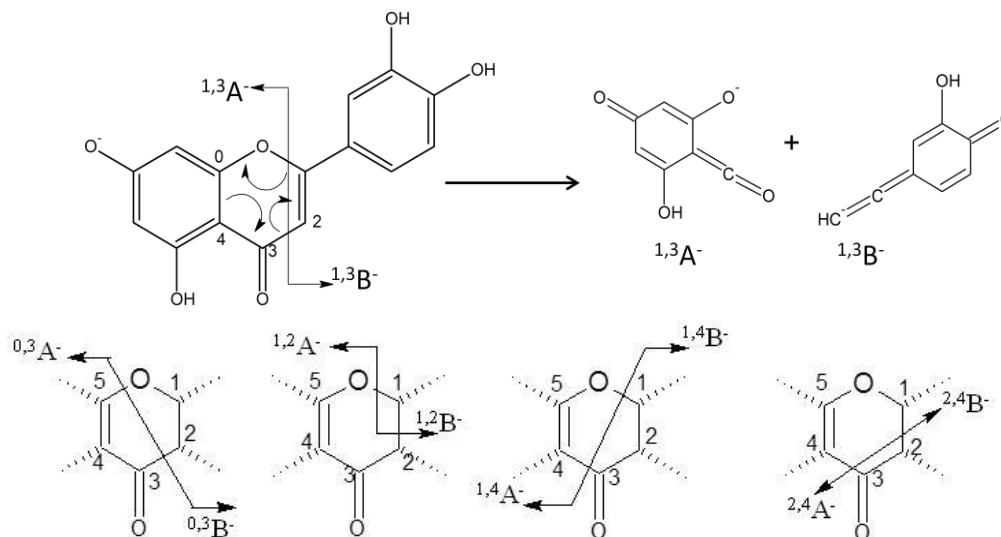


Os flavonoides *O*-glicosilados apresentam espectros de massas com pico base referente ao íon produto da aglicona, enquanto os flavonoides *C*-glicosilados

apresentam perda de massa de 60, 90, 120 e 150 referente fragmentação da porção glicosídica.

A descrição dos fragmentos de flavonoides em espectrometria de massas possui a seguinte nomenclatura: no modo negativo os íons são denotados $^{ij}A^-$ e $^{ij}B^-$, com o íon A contendo o anel A e o íon B contendo o anel B (RIJKE et al, 2006). Os índices i e j representam as ligações no anel C rompidas. Os íons derivados a partir de íons fragmentos pela perda de um fragmento X são denotados $[^{ij}A^- - X]$ e $[^{ij}B^- - X]$. Uma importante reação de fragmentação que pode ocorrer é a Retro Diels Alder (RDA). RDA ocorre em anel de seis membros contendo uma ligação dupla e envolve a relocação de três pares de elétrons no anel, de acordo com o mecanismo da Figura 26.

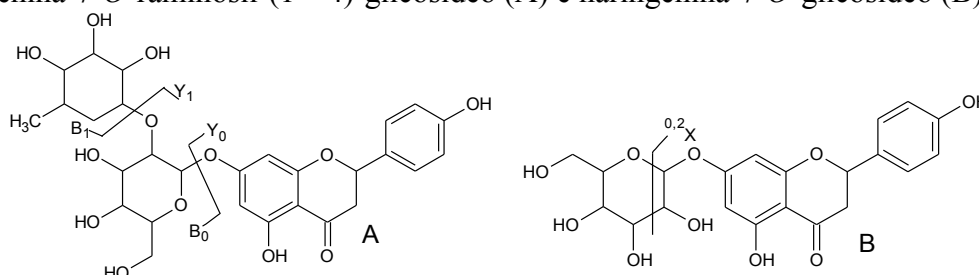
Figura 26 - Mecanismo de reação para a formação dos íons fragmentos $^{1,3}A^-$ e $^{1,3}B^-$ para luteolina e via de fragmentação para flavonoides pelo rompimento de ligações no anel C.



Enquanto a nomenclatura do padrão de fragmentação de flavonoides glicosilados foi adotada de acordo com MABRY, 1975, DOMON; COSTELO, 1988, WARIDEL, 2001 de acordo com os exemplos de RIJKE et al, 2006 (Figura 27). Y representa o diglicosídeo com os fragmentos que contém parte da aglicona sendo descrito por Y_1 (perda de glicose) e Y_0 (perda de duas unidades de glicose). Os íons formados devido a clivagem no anel da glicose e que contém parte da aglicona são descritos como $^{k,l}X_j$, onde j é o número da ligação interglicosídica clivada, contando a partir da aglicona. O subscrito k e l indica a ligação interglicosídica, com a ligação glicosídica ligando parte da aglicona sendo numerada como zero.

Os flavonoides *C*-glicosilados são denotados da mesma forma que os *O*-glicosilados. Na discussão sobre a elucidação dos isômeros de luteolina-di-*C*-glicosil-arabinosídeo está ilustrado os possíveis íons fragmentos correspondente a clivagem nas unidades de açúcar.

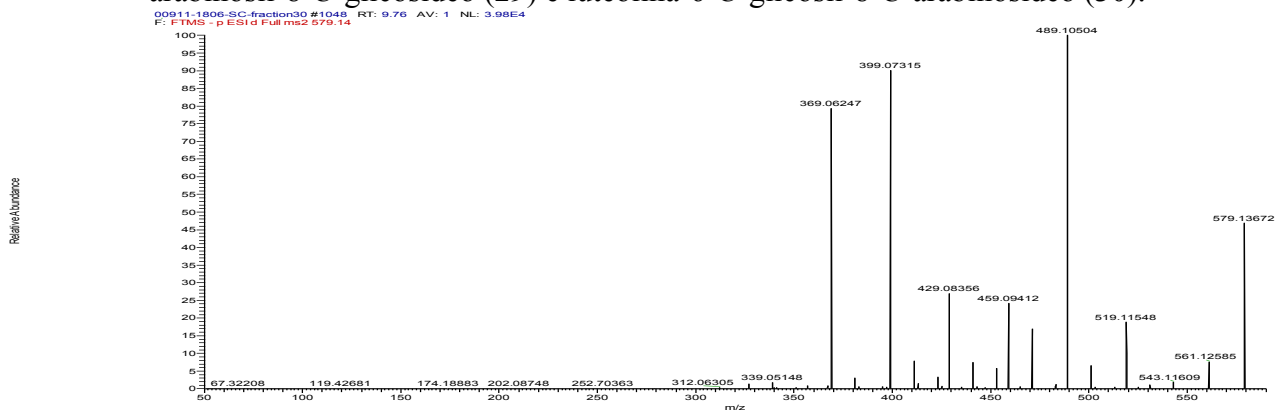
Figura 27 - Nomenclatura de íons fragmentos para flavonoides glicosilados. naringenina-7-*O*-raminosil-(1→4)-glicosídeo (A) e naringenina-7-*O*-glicosídeo (B).

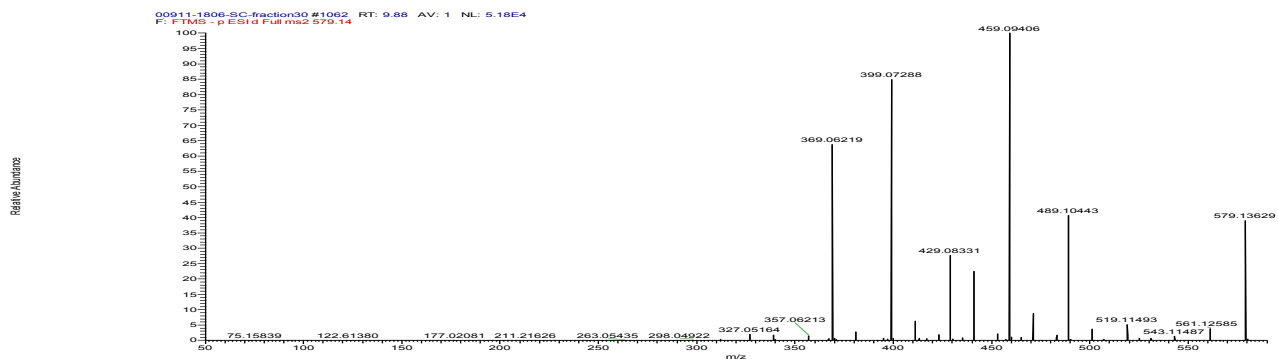


Os flavonoides **29-52** foram caracterizados através dos espectros de massas e UV, com excessão dos flavonoides **33**, **36**, **47** e **53** que foram adicionalmente caracterizados por dados de ^1H NMR.

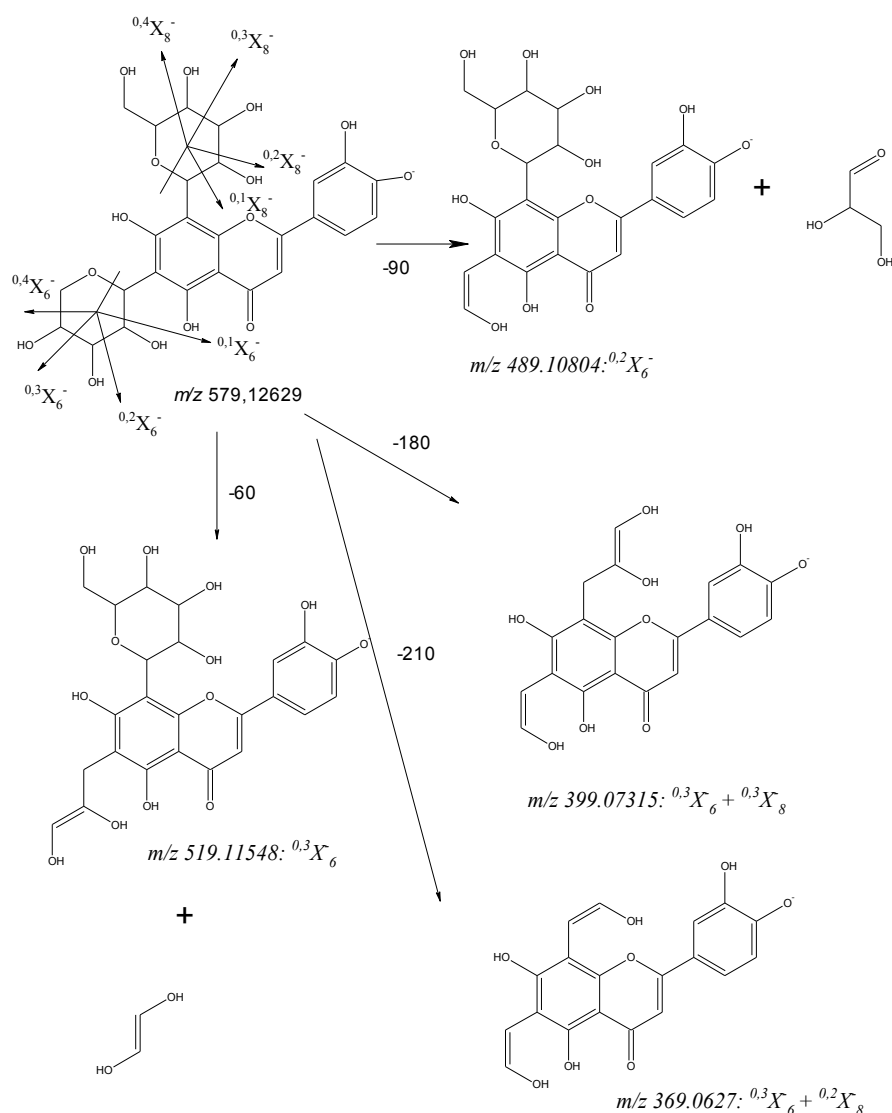
Os isômeros luteolina-6-*C*-arabinosil-8-*C*-glicosídeo (**29**) e luteolina-6-*C*-glicosil-8-*C*-arabinosídeo (**30**) foram identificados na fração 30 com tempo de retenção em 9,80 e 9,87 minutos, e espectros de massas com m/z 579 $[\text{M}-\text{H}]^-$ ($\text{C}_{26}\text{H}_{27}\text{O}_{15}$). O espectro MS/MS (Figura 28) de ambos os picos apresentaram os mesmos íons fragmentos, mas com intensidades ligeiramente diferentes, principalmente para o íon produto m/z 489 (pb) e 459 (pb) para os picos em 9,80 e 9,87 minutos, respectivamente.

Figura 28 - Espectros MS/MS no modo negativo referentes aos isômeros luteolina-6-*C*-arabinosil-8-*C*-glicosídeo (**29**) e luteolina-6-*C*-glicosil-8-*C*-arabinosídeo (**30**).





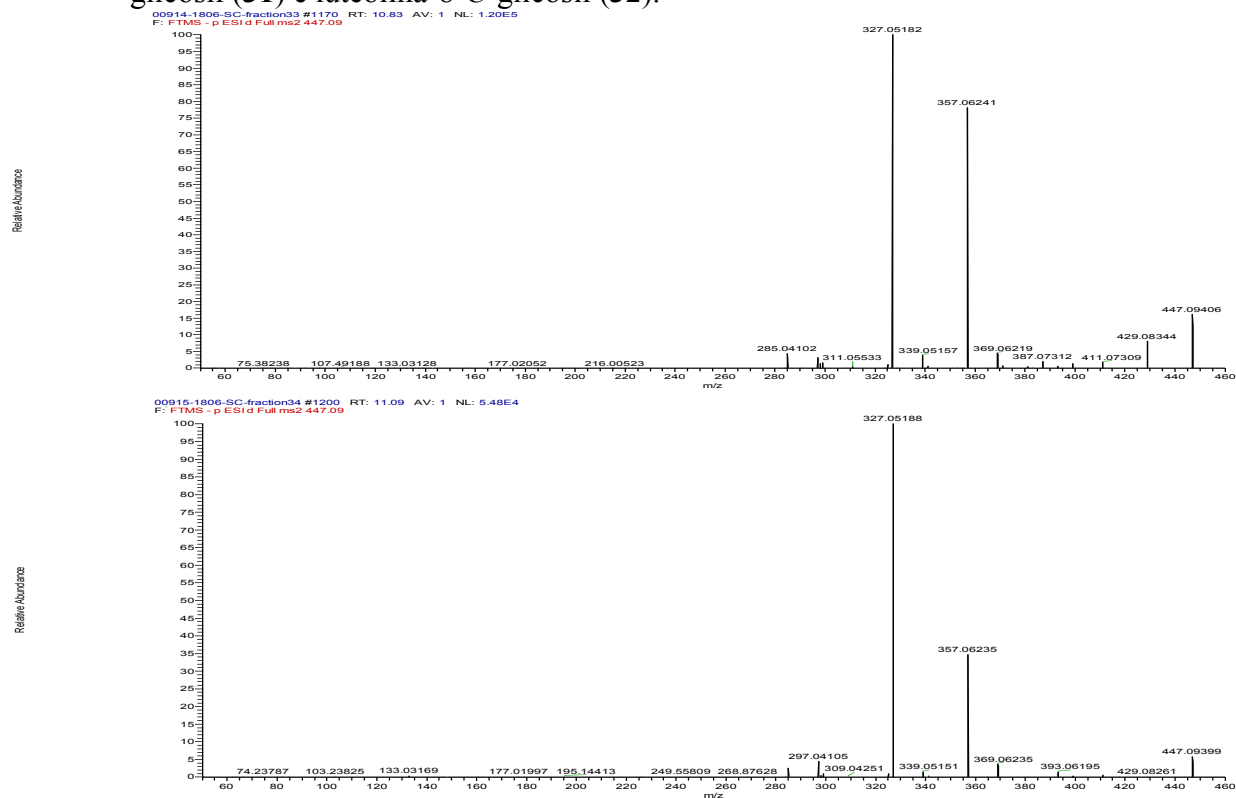
O íon fragmento $^{0,3}X^{-}[M-H-90]^{-}$ m/z 489 foi atribuído a perda de massa da unidade arabinosil ligada no C-6 (luteolina-6-C-arabinosil-8-C-glicosídeo (**30**), enquanto o íon $^{0,2}X^{-}[M-H-120]^{-}$ correspondente a m/z 459 foi atribuído a perda de massa da unidade glicosil ligada no C-6 luteolina-8-C-arabinosil-6-C-glicosídeo, considerando a intensidade dos íons fragmentos $^{0,3}X^{-}[M-H-90]^{-}$ e $^{0,2}X^{-}[M-H-120]^{-}$ como íons diagnóstico para a unidade glicosídica no C-6 ou C-8 (Figura 29). Além da intensidade destes íons também foi possível observar íons fragmentos intensos referentes $[M-H-H_2O]^{-}$ e $[M-H-2H_2O]^{-}$ para os dois isômeros, evidenciando que a formação do pico base em cada caso foi oriunda da clivagem das unidades de açúcar no C-6. Outra via de fragmentação importante observada, mas pouco intensa, foi a RDA referente ao íons fragmentos $^{1,3}A^{-}$ m/z 327 e 357, sendo a primeira detectada nos espectros de ambos os isômeros, e a segunda presente somente no espectro da luteolina-6-C-glicosil-8-C-arabinosídeo.

Figura 29 - Padrão de fragmentação para luteolina 6-*C*-arabinosil-8-*C*-glicosídeo (**30**).

Os isômeros luteolina 6-*C*-glicosídeo (**31**) e luteolina 8-*C*-glicosídeo (**32**) foram identificados na fração 34 em 10,82 e 11,06 minutos, respectivamente. Ambos os espectros MS/MS (Figura 30) resultaram na formação de m/z 327 $^{0.2}X^-$ [M-H-120] referente à clivagem da unidade glicosídica. Entretanto no espectro referente a luteolina 6-*C*-glicosídeo foi observado perda abundante de água (E_1^-), assim como o íon $^{0.3}X^-$ [M-H-90] foi mais abundante, quando comparado com o espectro da luteolina 8-*C*-glicosídeo. Estes resultados estão de acordo com os trabalhos de WARIDEL et al 2001 ao avaliar a diferenciação no espectro de massas de flavonoides 6 e 8-*C* glicosilados, observou que os isômeros 6-*C*-glicosídeo demonstraram facilidade de perda de água devido a eliminação de uma molécula de água entre o grupo 2''-hidroxil da unidade de

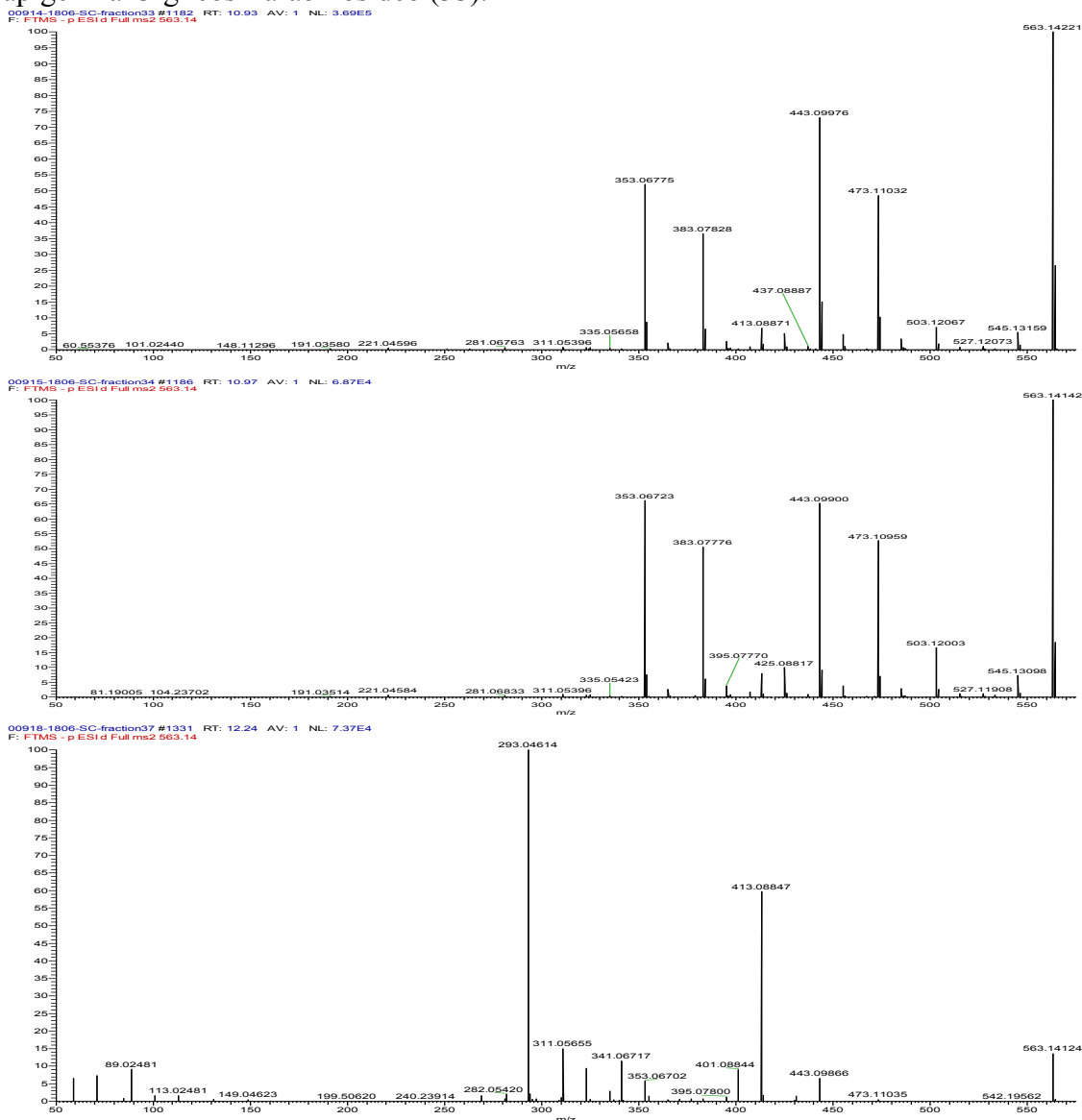
açúcar e o grupo 5 ou 7-hidroxil da aglicona. Em ambos os espectros foram observados íons fragmentos m/z 133 referente à RDA $^{1,3}B^-$, confirmando que aglicona é a luteolina.

Figura 30 - Espectros MS/MS no modo negativo referentes aos isômeros luteolina-6-*C*-glicosil (**31**) e luteolina-8-*C*-glicosil (**32**).



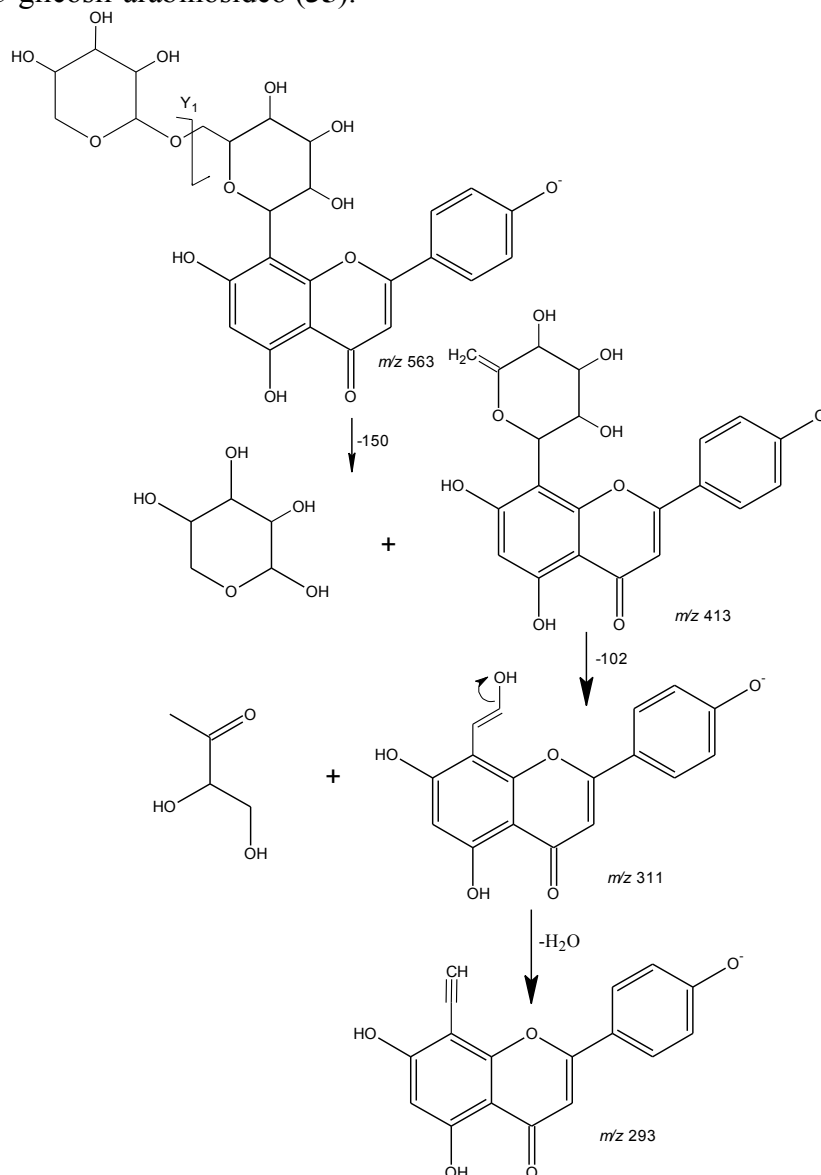
Os isômeros apigenina-6-*C*-arabinosil-8-*C*-glicosídeo (**33**), apigenina-8-*C*-arabinosil-6-*C*-glicosídeo (**34**) e apigenina-6-glicosil-arabinosídeo (**35**) foram identificados nas frações 33, 34 e 37, com tempos de retenção em 10,95, 10,92, 12,29 minutos, respectivamente. Os espectros de cada pico apresentaram m/z 563 $[M-H]^-$ ($C_{26}H_{27}O_{14}$). O espectro MS/MS (Figura 31) do pico em 10,95 mostrou os mesmos íons fragmentos do pico em 10,92 minutos, entretanto os íons fragmento $^{0,3}X^- [M-H-90]^-$ e $^{0,2}X^- [M-H-120]^-$ apresentaram intensidade superior ao espectro do íon produto do pico em 10,92 minutos. Esses resultados sugerem que a unidade arabinosil está ligada no *C*-6 da apigenina no pico em 10,95 minutos, enquanto que no pico em 10,92 a unidade arabinosil está ligada no *C*-8. Estes dados estão de acordo com os trabalhos de COLOMBO et al, 2006-2010.

Figura 31 - Espectros MS/MS no modo negativo referentes aos isômeros apigenina-6-C-arabinosil-8-C-glicosídeo (**33**), apigenina-8-C-arabinosil-6-C-glicosídeo (**34**) e apigenina-C-glicosil-arabinosídeo (**35**).



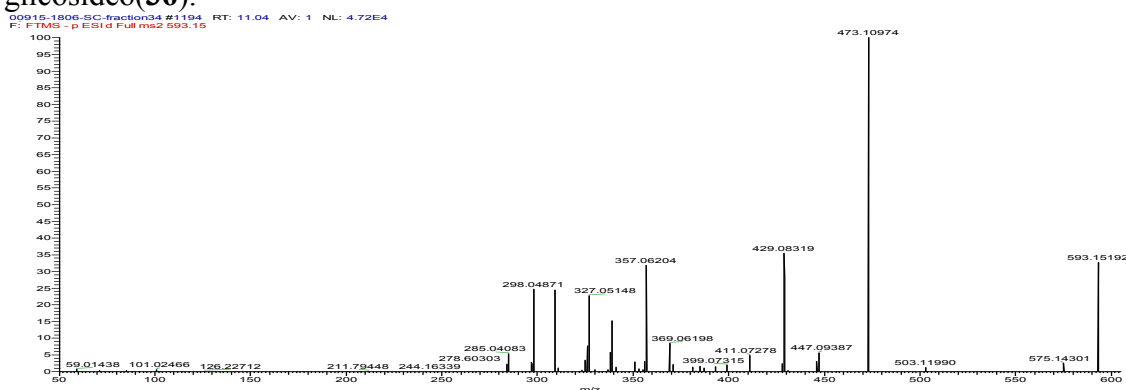
O espectro de massas do pico em 12,29 minutos mostrou padrão de fragmentação diferente dos espectros de massas dos isômeros que eluíram em 10,95 e 10,92 minutos. O espectro do íon precursor mostrou íons fragmentos m/z 413 e 293 (pb). Não foi possível atribuir a posição da ligação da unidade de açúcar. A figura 32 mostra a proposta de fragmentação para formação dos íons fragmentos.

Figura 32 - Proposta de fragmentação para os íons fragmentos m/z 413 e 293 da apigenina C-glicosil-arabinosídeo (**35**).

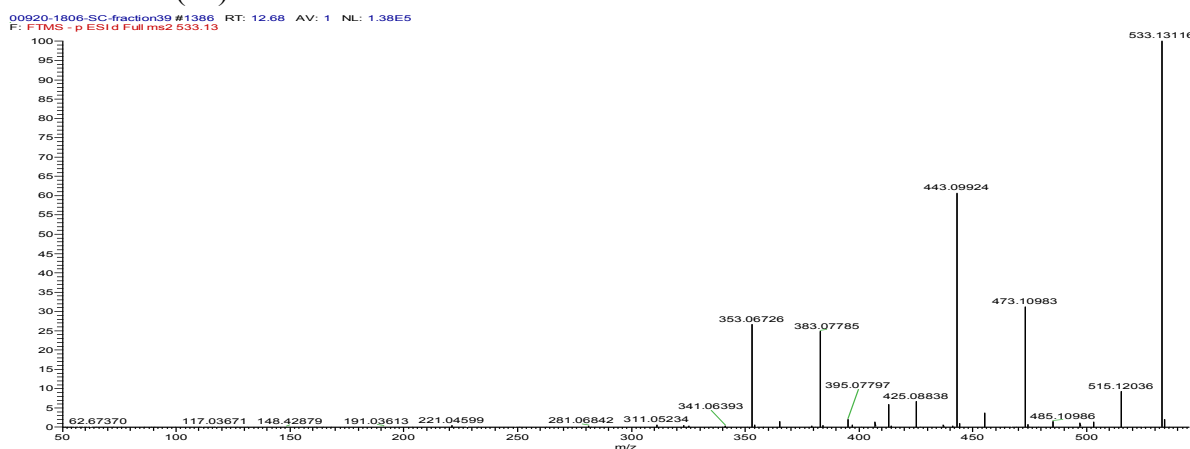


O íon fragmento m/z 413 corresponde a clivagem da ligação arabinosil-glicosídeo, o qual leva a perda de 150 unidades de massa. Este mesmo íon fragmenta novamente para gerar o íon produto m/z 311 $^{0,2}X^+ [M-H-120]^-$ o qual elimina uma molécula de água para gerar o pico base m/z 293.

Apigenina 6,8-di-C-glicosídeo (**36**) foi identificada na fração 34 com tempo de retenção em 11,06 minutos. O espectro do íon precursor apresentou m/z 593 $[M-H]^-$ ($C_{27}H_{29}O_{15}$). O espectro MS/MS (Figura 33) resultou na formação dos íons produto $^{0,2}X^+ [M-H-120]^-$ como pico base, referente à perda de massa de uma das unidades glicosídica.

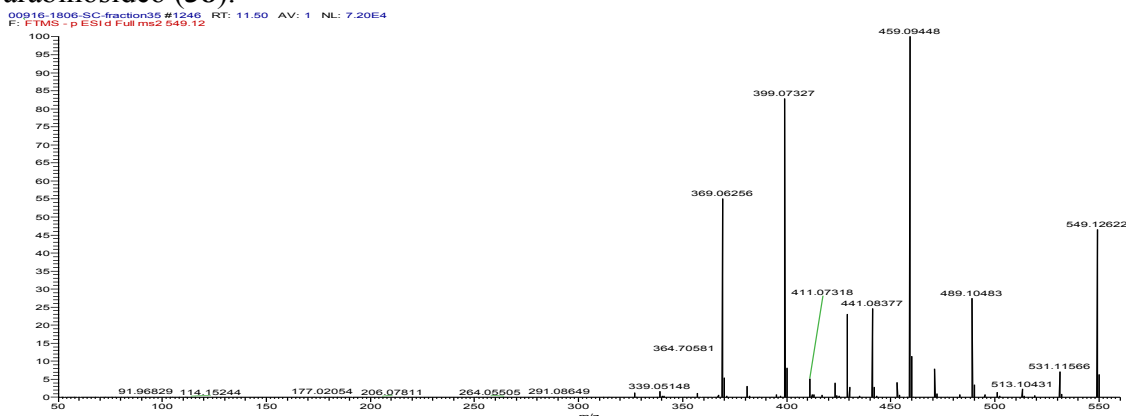
Figura 33 - Espectro MS/MS no modo negativo referente apigenina 6,8-di-C-glicosídeo(36).

Apigenina-6,8-di-C-arabinosídeo (37) foi identificada na fração 39 em 12,67 minutos no cromatograma de íons totais, com espectro do íon precursor m/z 533 [M-H]⁻. O espectro MS/MS (Figura 34) mostrou íons fragmentos m/z 515 referente a perda de água, m/z 443 correspondente a clivagem da arabinose em $^{0,2}X[M-H-90]^{-}$. Além da clivagem da segunda unidade de arabinose, devido ao íon fragmento m/z 353, o qual perde 90 unidades de massa em relação ao íon m/z 443.

Figura 34 - Espectro MS/MS no modo negativo referente apigenina 6,8-di-C-arabinosídeo (37).

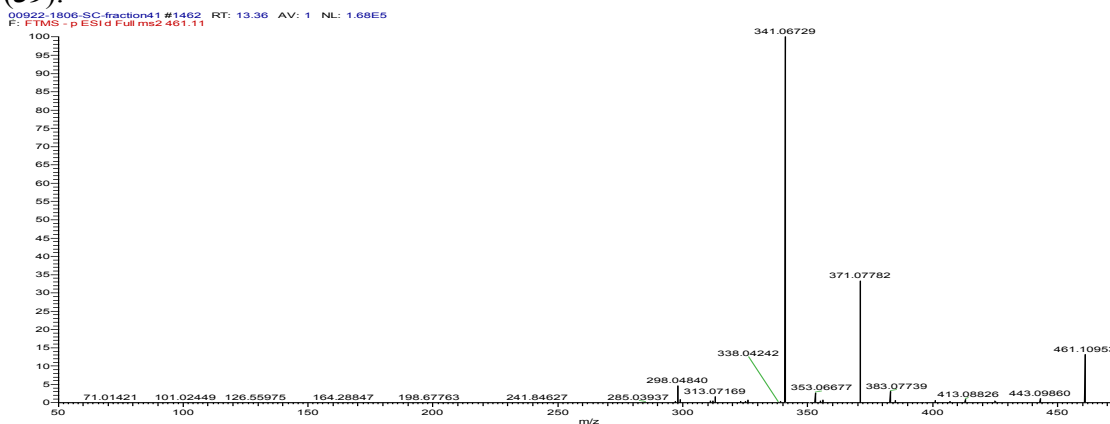
Luteolina-6,8-di-C-arabinosídeo (38) foi identificada na fração 35 com tempo de retenção em 11,52 minutos. O espectro do íon precursor mostrou m/z 549 [M-H]⁻ (C₂₅H₂₅O₁₄). O espectro MS/MS (Figura 35) mostrou a formação de íons fragmentos m/z 459 $^{0,3}X[M-H-90]^{-}$ como pico base, referente à perda de massa da unidade arabinosil no C-6.

Figura 35 - Espectro MS/MS no modo negativo referente a luteolina-6,8-di-*C*-arabinosídeo (**38**).



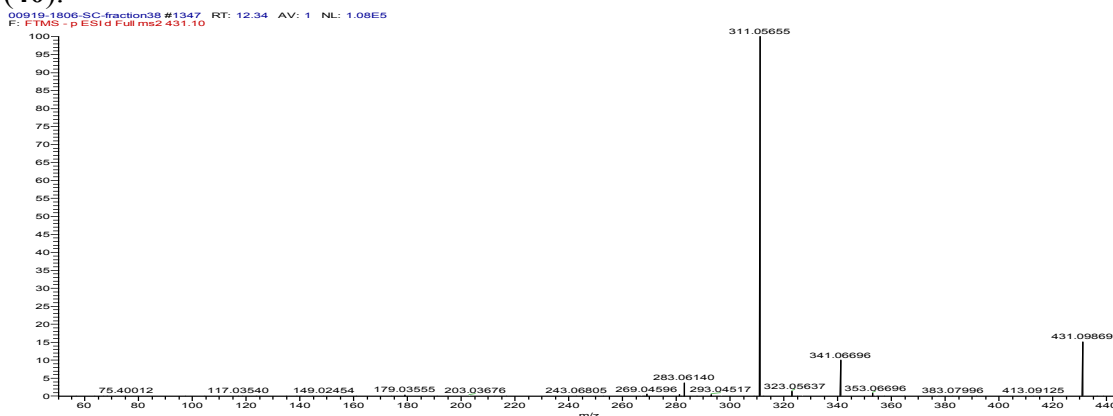
Diosmetina-6-*C*-glicosídeo (**39**) foi identificada na fração 41 com tempo de retenção em 13,38 minutos. O espectro no UV mostrou duas bandas em 346 e 327 nm e espectro de massas com m/z 461[M-H]⁻(C₂₂H₂₁O₁₁). O espectro MS/MS (Figura 36) apresentou íons fragmentos m/z 341^{0,2}X[M-H-120]⁻ referente a perda de massa da unidade glicosídica.

Figura 36 - Espectro MS/MS no modo negativo referente à diosmetina-6-*C*-glicosídeo (**39**).



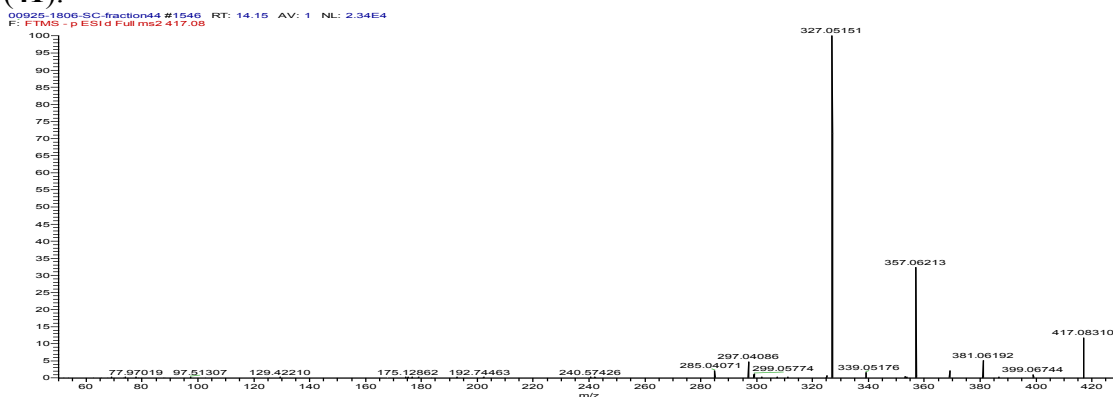
Apigenina-6-*C*-glicosídeo (**40**) foi identificada na fração 38 com tempo de retenção em 12,39 minutos. O espectro no UV mostrou banda em 336/269 nm e espectro de massas m/z 431[M-H]⁻(C₂₁H₁₉O₁₀). O espectro MS/MS (Figura 37) mostrou íon fragmentos m/z 311^{0,3}X[M-H-120]⁻, o qual é íon diagnóstico para perda de massa da unidade glicosídica ligada no C-6.

Figura 37 - Espectro MS/MS no modo negativo referente à apigenina-6-C-glicosídeo (40).



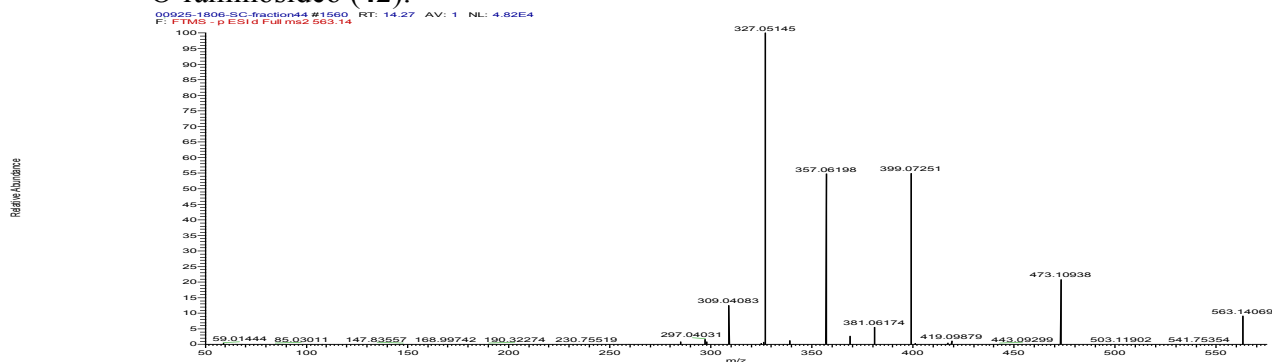
Luteolina-6-C-arabinosídeo (41) foi identificada na fração 44 em 14,15 minutos no cromatograma de íons totais, o qual apresentou espectro do íon precursor m/z 417 [M-H]⁻. O espectro MS/MS (Figura 38) mostrou íons fragmentos m/z 327(pb), referente a clivagem da arabinose em $^{0,2}X^-$ [M-H-90]⁻.

Figura 38 - Espectro MS/MS no modo negativo referente à luteolina-6-C-arabinosídeo (41).



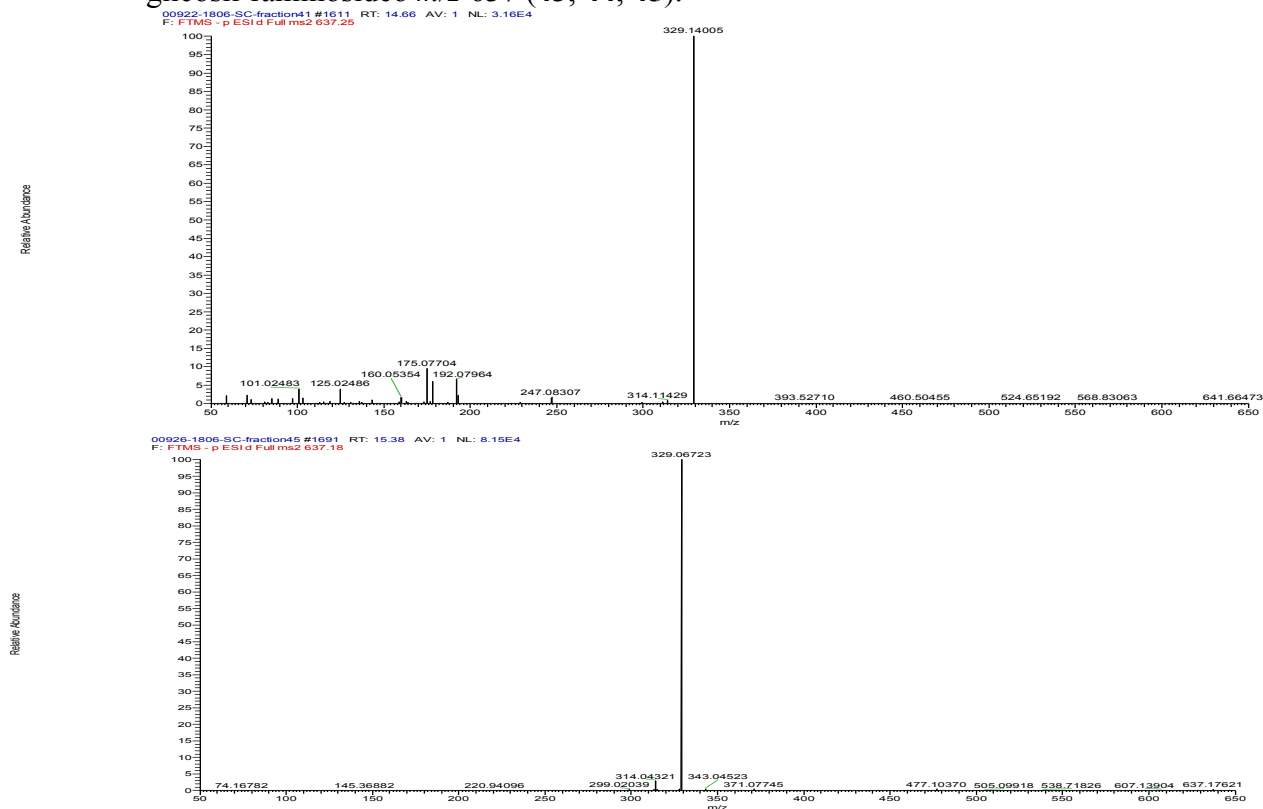
Luteolina-8-C-arabinosil-7-O-raminosídeo (42) foi identificada no cromatograma de íons totais da fração 44 em 14,31 minutos com espectro de massas m/z 563 [M-H]⁻. O espectro MS/MS (Figura 39) mostrou íons fragmentos m/z 473, referentes a clivagem da arabinose em $^{0,2}X^-$ [M-H-90]⁻ e 327 (pb).

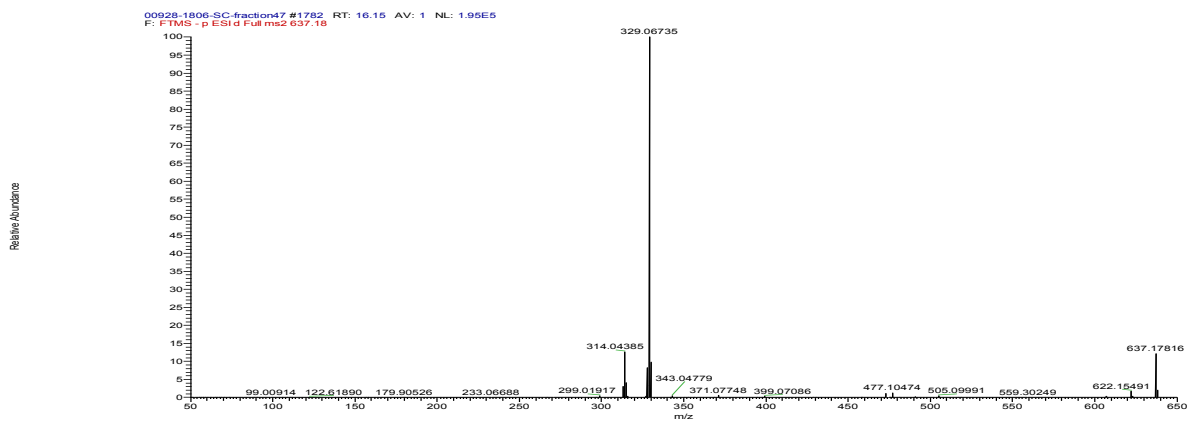
Figura 39 - Espectro MS/MS no modo negativo referente à luteolina-8-*C*-arabinosil-7-*O*-raminosídeo (42).



Isômeros de tricina *O*-glicosil-raminosídeo (45, 46 e 47) foram identificados nas frações 41, 45 e 47, com tempo de retenção em 14,65, 15,04 e 16,14 minutos, respectivamente. Os espectros de massas apresentaram m/z 637 $[M-H]^-$ ($C_{21}H_{19}O_{10}$). O íon m/z 329 (Figura 40) corresponde a aglicona tricina após a perda das unidades de açúcar. Não foi possível determinar a posição da unidade glicosídica devido a similaridade dos espectros MS/MS.

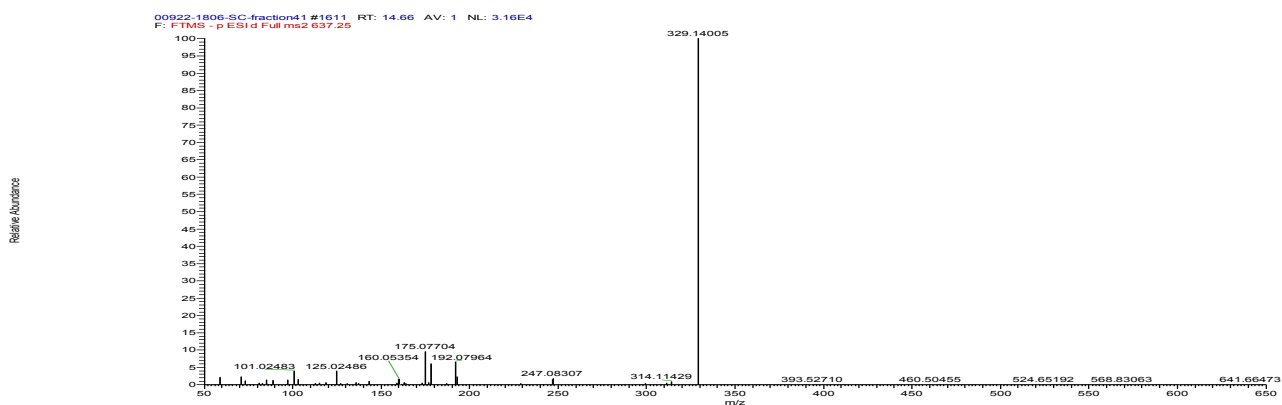
Figura 40 - Espectros MS/MS no modo negativo referentes aos isômeros de tricina-*O*-glicosil-raminosídeo m/z 637 (43, 44, 45).





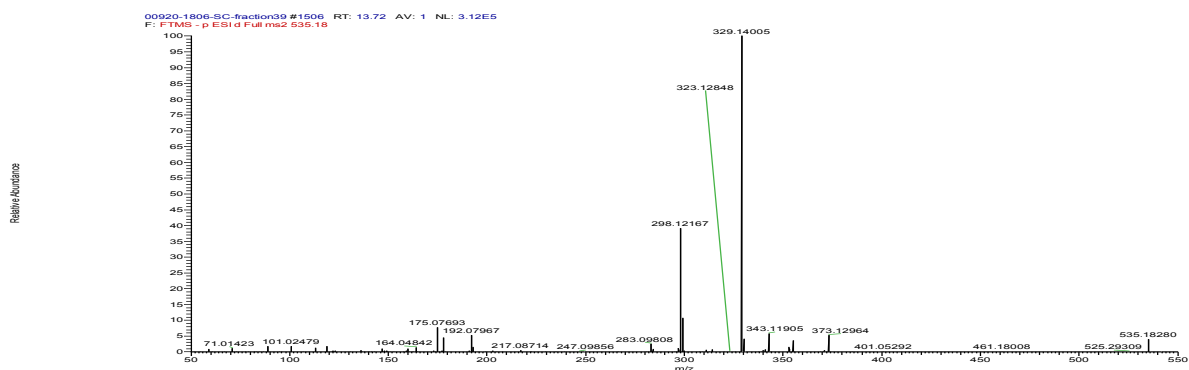
Tricina-7-*O*-glicosídeo (**48**) foi identificado na fração 43 em 14,85 minutos no cromatograma de íons totais. O espectro MS apresentou m/z 491[M-H]⁻(C₂₅H₃₁O₁₀). O espectro MS/MS (Figura 41) apresentou m/z 329, referente à aglicona tricina após a perda da glicose.

Figura 41 - Espectro MS/MS no modo negativo referente à tricina-7-*O*-glicosídeo (**48**).



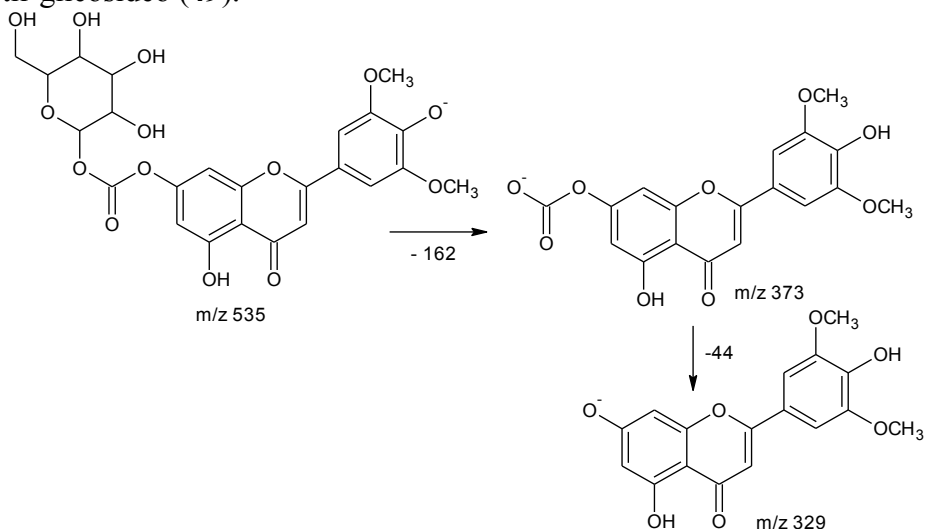
Tricina-7-*O*-acetil-glicosídeo (**49**) foi identificada na fração 39 com tempo de retenção em 13,74 minutos no cromatograma de íons totais, o qual apresentou espectro do íon precursor m/z 535[M-H]⁻. O espectro MS/MS (Figura 42) mostrou íons fragmentos m/z 329 (pb) referente a aglicona tricina.

Figura 42 - Espectro MS/MS no modo negativo referente à tricina-7-*O*-acetil-glicosídeo (**49**).



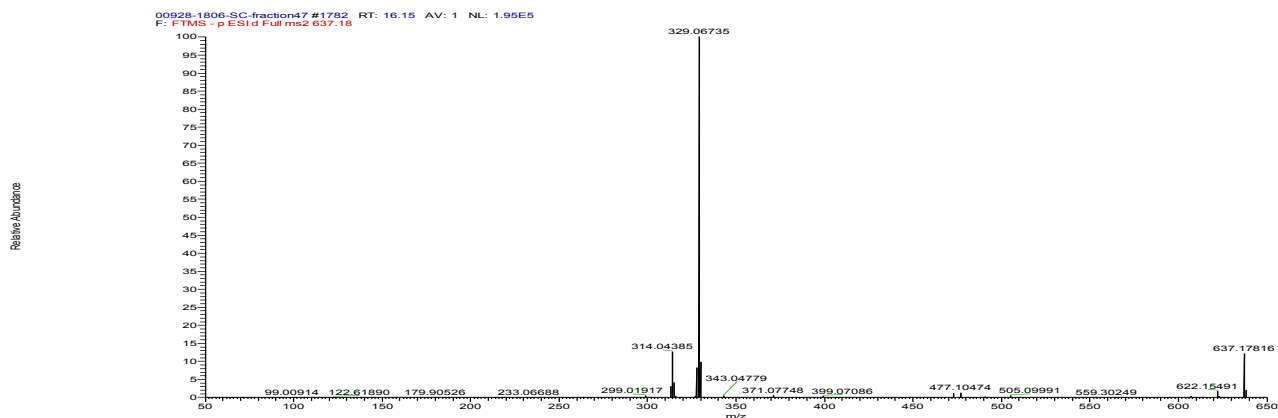
O íon fragmento m/z 373, refere-se a perda de uma unidade de glicose, seguida pela perda de 44 unidades de massa, a perda deste último fragmento sugere que a glicose está ligada ao CO_2 . Os íons fragmentos com menor intensidade m/z 164, 178 e 192 foram atribuídos às vias de fragmentação $^{1,2}\text{B}^-$, $^{1,3}\text{B}^-$ e $^{1,2}\text{A}^-$ causada pela clivagem do anel C (Figura 43).

Figura 43 - Proposta de fragmentação para os íons fragmentos m/z 373 e 329 da tricina-7-*O*-acetil-glicosídeo (**49**).



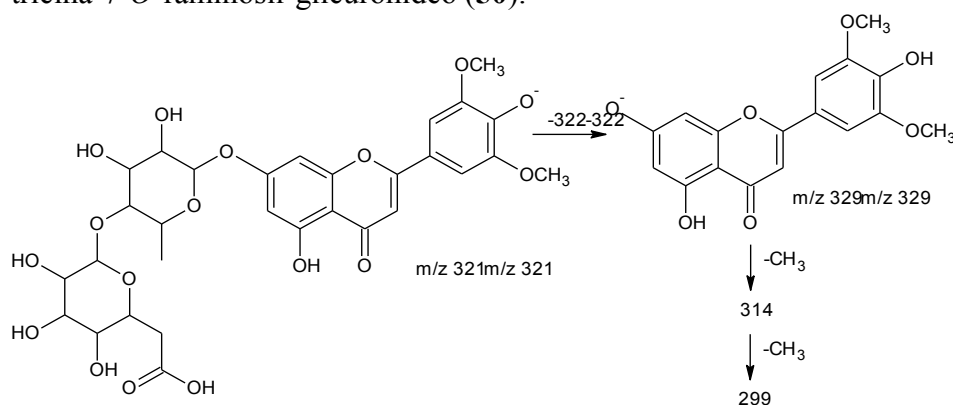
Tricina-7-*O*-raminosil-glicuronídeo (**50**) foi identificada no cromatograma de íons totais da fração 47, com tempo de retenção em 15,77 minutos e espectro de massas m/z 651 $[\text{M}-\text{H}]^-$ ($\text{C}_{36}\text{H}_{27}\text{O}_{12}$). O espectro MS/MS (Figura 44) mostrou íons fragmentos m/z 329 (pb), devido a perda da unidade raminosil-glicuronídeo.

Figura 44 - Espectro MS/MS no modo negativo referente à tricina-7-*O*-raminosil-glicuronídeo (**50**).



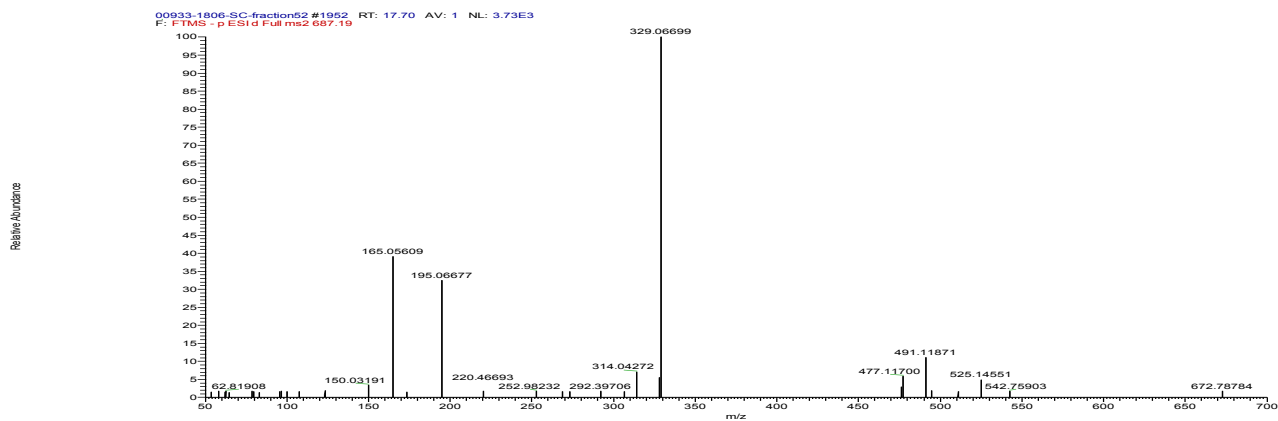
A proposta de fragmentação está ilustrada na figura 45, onde podemos observar íons fragmentos secundários m/z 321 referente à unidade do ácido glicurónico ligado a raminose, m/z 175 referente ao ácido glicurónico livre, além dos íons fragmentos m/z 314 e 299 referente à perda de metoxila da unidade de tricina. Estes resultados estão de acordo com as atribuições no espectro de ^1H NMR.

Figura 45 Proposta de fragmentação para os íons fragmentos m/z 329, 314, 299 e 321 da tricina-7-*O*-raminosil-glicuronídeo (**50**).



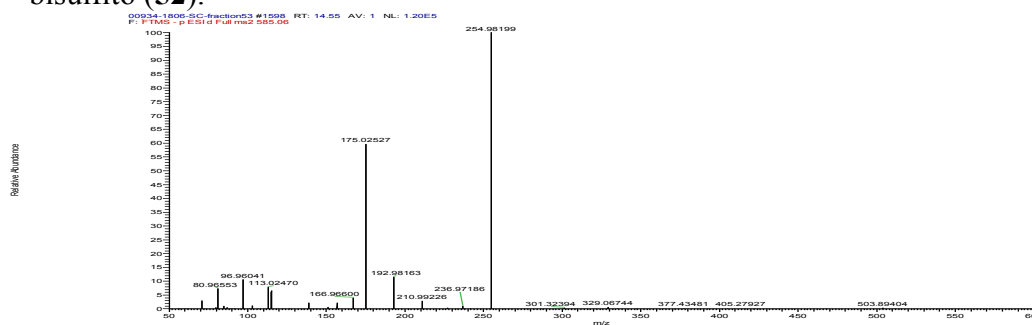
Tricina-4'-(*O*-eritro/treo guaiacilgliceril) éter (**51**) foi identificada no cromatograma de íons totais da fração 52 com 17,70 minutos e mostrou espectro do íon precursor m/z 687 $[\text{M}-\text{H}]^-$ ($\text{C}_{33}\text{H}_{35}\text{O}_{16}$). O espectro MS/MS (Figura 46) mostrou íons fragmentos m/z 329 (pb), devido a perda da unidade guaiacilgliceril-éter.

Figura 46 - Espectro MS/MS no modo negativo referente à tricina-4'-(*O*-eritro/treo guaiacilgliceril) éter (**51**).



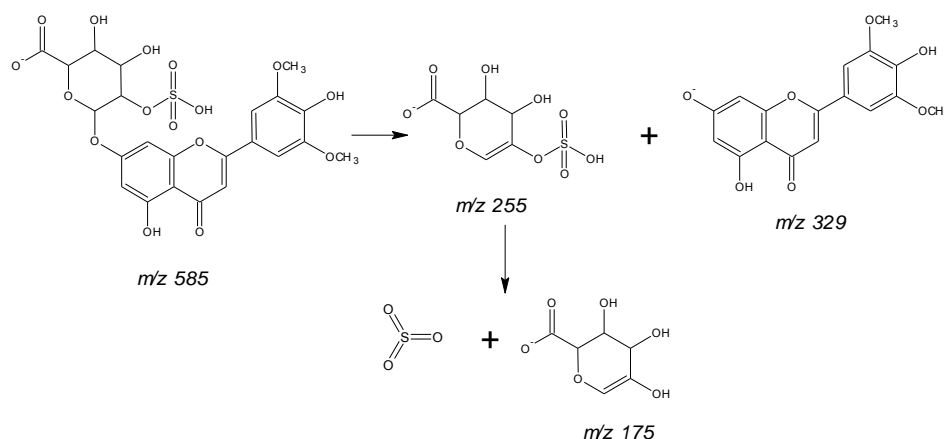
Tricina-7-*O*-glicuronídeo-sulfato (**52**) foi identificado no cromatograma de íons totais em 14,54 minutos e espectro de ^1H NMR da fração 53. O espectro de massas mostrou íon produto m/z 585 [M-H] ($\text{C}_{23}\text{H}_{21}\text{O}_{16}\text{S}$). O espectro MS/MS (Figura 47) mostrou íons fragmentos m/z 255 referente a unidade glicuronídeo-sulfato e m/z 175 referente ao ácido glicuronídeo após a perda neutra do sulfato (Figura 48).

Figura 47 - Espectro MS/MS no modo negativo referente à tricinia-7-*O*-glicuronídeo-bisulfato (**52**).



Foram observados sinais no espectro de ^1H NMR referentes aos hidrogênios 6 e 8 da tricina em δ 6,60 d ($J=2,4$) e 6,97 d ($J=3,12$), respectivamente, além dos singletos em 6,81 referente ao H-3 e 7,37 referente aos hidrogênios 2' e 6'. O hidrogênio anomérico da unidade glicuronídeo foi observado como um dubleto em 5,41 (7,3) ppm.

Figura 48 - Proposta de fragmentação para tricinia-7-*O*-glicuronídeo-sulfato (**52**).



A presença de tricina ligada a grupo sulfato em cana-de-açúcar já tinha sido relatada por WILLIAMS, HARBONE, SMITH, 1974, mas neste caso a unidade de açúcar foi identificada como glicose, e não como ácido glicurônico, como neste trabalho.

Todos os compostos identificados através das análises via LC-DAD-MS apresentado acima estão ilustrados na figura 41 no cromatograma total de íons e resumidos na tabela 2. O cromatograma total de íons foi obtido através da análise do extrato não fracionado. As frações analisadas no LC-DAD-Orbitrap (Rothamsted, Harpenden, Inglaterra) foram também analisadas no LC-DAD (IQ UNESP, Araraquara, Brasil). Os compostos identificados e detectados no LC-DAD foram utilizados para a construção e manutenção do banco de dados Met-Cana. Os resultados armazenados no banco de dados foram correlacionados com os resultados obtidos através das análises multivariadas, as quais serão abordadas nos próximos capítulos.

Tabela 2 Tentativa de identificação dos metabólitos por LC-DAD-MS no cromatograma de íons totais do extrato não fracionado das folhas de cana-de-açúcar.

No.	TR	UV	[M-H]-	MS/MS (% relativa)	Fórmula molecular [M-H]-	Erro	Tentativa de identificação
1	2,06	-	329,08755	167,035 (100)	C ₁₄ H ₁₇ O ₉	-0,776	ácido vanílico glicosídeo
2	2,1	298	315,0722	108,022 (15,04) 109,03 (12,62) 152,012 (58,61) 153,02 (33,3) 315,073 (15,04)	C ₁₃ H ₁₅ O ₉	0,142	ácido gentísico 5-O-β-glicosídeo
3	2,68	-	315,0722	108,022(0,09), 109,03(8,43) 108,022(0,09), 109,03(8,43), 315,073(100)	C ₁₃ H ₁₅ O ₉	0,555	ácido gentísico 2-O-β-glicosídeo
4	3,04	324	353,0878	135,046(11,76) 161,025(3,59) 173,046(3,89) 179,035(80,06) 191,057(100)	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	-0,100	ácido <i>trans</i> -5-cafeoilquínico
5	3,59	-	315,0723	109,03(84,21) 153,02(100) 315,073(29,98)	C ₁₃ H ₁₅ O ₉	-0,048	ácido protocatecuico 4-O-glicosídeo
6	4,12	313	355,067	85,0298(100) 147,03(22,25) 163,04(9,81) 173,01(3,66) 191,02(30,26) 209,031(61,91)	C ₁₅ H ₁₅ O ₁₀	-0,309	ácido <i>p</i> -cumaroil-galactarico
7	4,39	281	313,05637	85,0299(100) 111,009(4,28) 121,029(8,6) 129,019(14,6) 147,029(26,4)191,029(15,9)	C ₁₃ H ₁₃ O ₉	0,143	isômero do ácido benzoilaldárico
8	4,78	-	337,114	87,0455(88,12) 113,025(36,6) 337,114(100)	C ₁₃ H ₂₁ O ₉	-0,208	ácido 5- <i>p</i> -cumaroilquínico
9	4,87	311	313,05655	85,029(100) 111,009(5,3) 121,029(8,7) 129,019(15,3) 147,029(26,5) 191,019(21,9)	C ₁₃ H ₁₃ O ₉	0,143	isômero do ácido benzoilaldárico
10	5,26	274	299,0772	93,0351(15,12) 135,407(5,15) 137,025(100) 299,055(10,12)	C ₁₃ H ₁₅ O ₈	-0,102	ácido hidroxibenzoico glicosídeo
11	5,84	324	353,0876	161,025(2,2) 173,046(0,74) 179,035(6,47) 191,057(100) 353,087(0,58)	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	-0,723	ácido <i>trans</i> -3-cafeoilquínico
12	6,5	324	367,1035	173,046(5,29) 191,057(3,99) 193,051(100) 367,103(0,88)	C ₁₇ H ₁₉ O ₉	-0,015	ácido <i>trans</i> -3-feruloilquínico
13	6,52	283	325,09274	163,041 (100)	C ₁₅ H ₁₇ O ₈	-0,341	ácido <i>p</i> -cumaroil glicosídeo
14	6,64	324	353,0876	161,025(2,48) 173,046(100) 179,035(81,08) 191,056(43,44) 353,088(3,76)	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	-0,525	ácido <i>trans</i> -4-cafeoilquínico
15	8,95	-	371,06204	111,0090(100) 173,0100(30,36) 85,0298(24,01)	C ₁₅ H ₁₅ O ₁₁	-0,512	isômero do ácido cafeoilaldárico
16	9,80	271/347	579,1353	369,062(84,25) 399,073(100) 411,073(8,38) 429,083(28,84) 459,094(33,94) 489,105(99,96) 579,136(49,14)	C ₂₆ H ₂₇ O ₁₅	-0,403	luteolina-8-C-glicosil-6-C-arabinosídeo
17	9,84	-	515,1301	515,124(100)	C ₃₆ H ₁₉ O ₄	2,422	ácido dicafeoilquínico
18	9,87	271/347	579,1351	369,062(65,02) 399,073(84,68) 429,083(27,79) 441,083(23,22) 459,094(100) 489,104(41,38) 579,136(38,98)	C ₂₆ H ₂₇ O ₁₅	-0,713	luteolina-6-C-glicosil-8-C-arabinosídeo
19	10,02	278	371,0985	85,0299(6,53) 103,004(1,32) 113,025(25,66)	C ₁₆ H ₁₉ O ₁₀	0,458	ácido benzoilaldárico

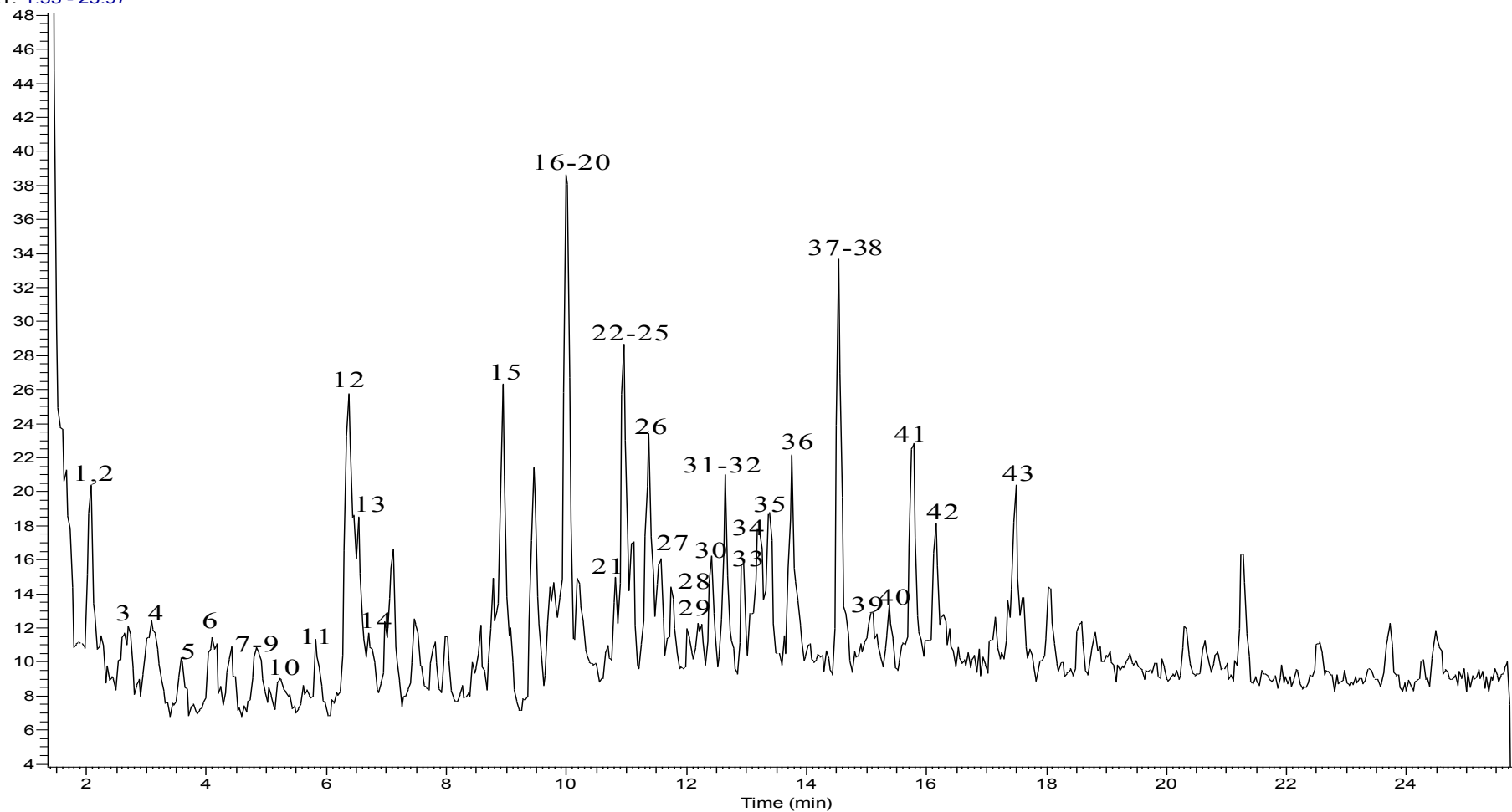
				121,03(100) 175,025(3,74) 231,051(9,32) 189,041(1,63) 371,099(26,81)			
20	10,19	-	535,1071	85,0298 (100) 129,027 (71,5) 147,03 (45,3) 191,02 (28,6), 209 (10,86), 163,04 (45,7)	C ₂₄ H ₂₅ O ₁₄	-1,172	ácido siringil-cumaroilaldárico
21	10,82	270/347	447,0939	327,052(100) 357,063(77,35) 429,084(8,12) 447,095(17,03)	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁	1,309	luteolina-6-C-glicosídeo
22	10,92	272/329	563,139	353,067(38,07) 383,078(25,97) 443,099(62,32) 473,11(42,96) 563,141(100)	C ₂₆ H ₂₇ O ₁₄	-2,928	apigenina 8-C-arabinosil-6-C-glicosídeo
23	10,95	271/337	563,1405	353,068(50,55) 383,078(35,84) 443,1(71,65) 473,11(47,7) 545,132(5,44) 563,142(100)	C ₂₆ H ₂₇ O ₁₄	-0,228	apigenina-6-C-arabinosil-8-C-glicosídeo
24	11,06	270/347	447,0936	327,052(100) 357,062(34,78) 447,094(5,79)	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁	0,706	luteolina 8-C-glicosídeo
25	11,06	269/338	593,1514	298,049(24,91) 309,041(24,69) 327,051(22,44) 339,051(15,58) 357,062(31,5) 429,083(35,01) 473,11(100) 575,143(100) 593,152(32,37)	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₅	0,298	apigenina 6,8-di-C-glicosídeo
26	11,36	296	535,1071	85,0299(100) 129,02(70,83) 147,03(46,5) 163,041(46,61) 191,02(27,62) 197,046(55,46) 209,031(11,06)	C ₂₄ H ₂₅ O ₁₄	-1,172	ácido siringil-cumaroilaldárico
27	11,52	279/345	549,1223	369,063(55,19) 399,073(81,49) 429,084(23,37) 441,084(24,28) 459,094(100) 460,098(11,31) 471,094(8,01) 489,105(27,65) 549,126(45,62)	C ₂₅ H ₂₅ O ₁₄	-4,969	luteolina-6,8-di-C-arabinosídeo
28	12,29	271/334	563,1406	293,046(100) 311,057(14,78) 341,067(11,29) 413,088(61,08) 563,141(13,78)	C ₂₆ H ₂₇ O ₁₄	0,002	apigenina 6-C-glicosil-arabinosídeo
29	12,39	269/336	431,098	311,056(100) 341,067(10,18) 431,099(15,52)	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₀	-0,951	apigenina 8-C-glicosídeo
30	12,46	270/343	593,1508	297,042(1,53) 327,051(100) 341,067(20,24) 357,062(23,33) 431,099(89,97) 593,152(75,84)	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅		luteolina 6-C-glicosil-4'-O-raminosídeo
L	12,63	270/340	577,156	293,046(100) 311,057(14,74) 323,057(16,69) 341,067(16,69) 413,089(61,21) 577,157(17,8)	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₄		apigenina-6-C-glicosil-4'-O-raminosídeo
32	12,64	271/337	431,0983	311,057(100) 341,067(39,56) 395,078(0,65) 413,088(2,1) 431,099(16,42)	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₀	-0,093	apigenina 6-C-glicosídeo
33	13,05	279	681,2397	329,14(100)	C ₃₄ H ₃₃ O ₁₅	-	tricina-7-O-β-(6''-5''',6'''-dimetoxicinamato)
34	13,14	272/337	577,15710	487,124(26,1) 457,115(58,2) 383,077(20,3) 353,067(30,8)	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₄	0,758	apigenina-6-C-glicosil-raminosídeo
35	13,38	271/346	461,1088	341,067(100) 371,078(33,33) 425,088(0,48) 443,099(1,14) 461,11(13,32)	C ₂₂ H ₂₁ O ₁₁	-1,159	diosmetina 6-C-glicosídeo
36	13,74	269/351	535,18182	373 (10) 329 (100)	C ₂₆ H ₃₁ O ₁₂	-1,195	tricina-7-O-acetil-glicosídeo
37	14,54	269/351	585,06360	254,982 (100) 175,025 (60)	C ₂₃ H ₂₁ O ₁₆ S		tricina-7-O-glicuronídeo-sulfato
38	14,65	-	637,25	329,14(100)	C ₂₉ H ₃₃ O ₁₆	-0,281	tricina 7-O-neohesperosídeo
39	14,85	-	491,1921	329,14(100)	C ₂₅ H ₃₁ O ₁₀	-0,326	tricina 7-O-glicosídeo
40	15,4	269/348	637,1793	329,067(100)	C ₂₉ H ₃₃ O ₁₆	2,907	tricina ?-O-neohesperosídeo
41	15,77	351	651,1533	329,068(100)	C ₃₆ H ₂₇ O ₁₂	-	tricina 7-O-raminosil-glicuronídeo

42	16,14	266/347	637,1741	299,019(0,46) 329,067(100)	$C_{29}H_{33}O_{16}$	2,913	tricina ?- <i>O</i> -neohesperosídeo
43	17,7	-	687,1921	165,056(38,26) 328,06(5,51) 329,067(100) 477,117(6,02) 491,119(11,03)	$C_{33}H_{35}O_{16}$	-0,538	tricina-4'-(<i>O</i> -eritro/treo guaiacilgliceril) éter-glicosídeo

Figura 49 Cromatograma de íons totais do extrato não fracionado das folhas de cana-de-açúcar.

RT: 1.35 - 25.97

NL: 1.34E7
 TIC F: FTMS - p
 ESI Full ms
 [50.00-1500.00]
 MS
 00881-1806-SC-
 unfractionated



3.4 DISCUSSÃO

Devido a grande quantidade de compostos fenólicos identificados nas folhas de cana-de-açúcar, podemos inferir a ocorrência de altos níveis de transcritos da via dos fenilpropanóides nas variedades de cana-de-açúcar em estudo.

Dentre os derivados do ácido chiquímico, identificamos a presença do ácido quínico esterificado com unidades de ácido cinâmico, e o ácido protocatecuíco glicosilado, além dos aminoácidos fenilalanina e tirosina, os quais têm como precursor o ácido corísmico. Estes mesmos aminoácidos são responsáveis pela síntese do ácido cumárico, o qual através de reações de hidroxilação e metilação leva a biossíntese dos ácidos cafeico e ferúlico. Estes ácidos foram encontrados esterificados com ácido quínico e na forma mais rara com ácido aldárico. A enzima denominada de ácido clorogênico:ácido glicárico *O*-cafeoiltransferase foi identificada em *Lycopersicon esculentum* por catalizar a transferência do ácido caféico a partir do ácido 5-*O*-cafeoilquínico para ácidos aldárico (glicárico e galactárico) (STRACK & GROSS, 1990). Isômeros dos ácidos cafeoilaldárico têm sido identificados em *Smallanthus sonchifolius* (TAKENAKA et al, 2003), *Berberis microphylla* (RUIZ et al, 2013) e *Vigna sinensis* (DUEÑAS et al, 2005).

O ácido salicílico (AS) e ácido hidroxibenzoico podem ser biossintetizados a partir dos ácidos cinâmico ou corísmico. Os derivados do ácido cinâmico podem também ser clivados na ligação dupla e perder dois carbonos da cadeia lateral. Foi possível identificar neste trabalho tanto o ácido hidroxibenzoico como o dihidroxibenzoico ligado a unidades de açúcar, dentre eles, ácido gentísico 5-*O*- β -glicosídeo.

O AS é um regulador endógeno que desempenha papel importante na defesa de plantas frente à patógenos (LE et al, 1995). Além deste, o ácido gentísico, metabólito homólogo ao AS, têm sido considerado também como molécula sinalizadora de defesa na resposta de plantas a patógenos (CAMPOS et al, 2014). Acúmulo de altos níveis de ácido gentísico foi descrito após infecções sistêmicas. Em tomate, o ácido gentísico atua como sinalizador de patógeno da mesma forma que o ácido salicílico ativando genes de defesa (FAYOS et al, 2006).

Os flavonoides identificados neste trabalho pertencem a classe das flavonas, sendo que intermediários desta via metabólica, tais como chalconas e flavanonas não foram detectadas. Dentre as flavonas, foram identificados derivados *C*-glicosilados de

apigenina, luteolina e diosmetina e *O*-glicosilados de tricina. Este perfil de flavonas é característico das espécies de gramíneas (HARBONE; HALL, 1964).

Diferentes funções têm sido atribuídas aos flavonoides *C*-glicosilados, em muitos casos estas funções requer alta concentração local e muitos destes compostos são prejudiciais para a planta. Portanto, a presença e a síntese requerem restrita compartimentalização dos sítios de produção e armazenamento. Para alguns metabólitos, tem sido demonstrado que são armazenados no vacúolo. Conseqüentemente, mecanismos de transporte para vacúolo de compostos glicosilados são importantes (WILLIAMS, 2006).

4 FINGERPRINTING METABÓLICO DE GENÓTIPOS DE CANA-DE-AÇÚCAR COM DIFERENTE SUSCEPTIBILIDADE AO FUNGO FERRUGEM ALARANJADA EMPREGANDO HPLC-DAD.

4.1 Abordagem metabolômica

Desde Gregor Mendel, que em 1865 relatou sua descoberta da transmissão hereditária de características fenotípicas em *Pisum sativum*, até a clássica publicação em 1953 da proposta da estrutura molecular do DNA feita por James Watson e Francis Crick, e desde então até os dias atuais, ocorreram avanços no nosso conhecimento sobre os processos bioquímicos, genéticos e fisiológicos relacionados ao funcionamento dos sistemas vivos.

Em 2000 o sequenciamento completo do genoma de *Arabidopsis thaliana* foi publicado, seguido pelo sequenciamento completo do genoma humano em 2001. No entanto, apesar do conhecimento da sequência completa do DNA de *Arabidopsis*, somente uma pequena fração foi caracterizada como funcional. Consequentemente, nesta era pós-sequenciamento surgiu uma nova área em ciências biológicas, conhecida como genômica funcional, cujo principal objetivo é associar o gene a uma função (DIXON et al, 2006).

A elucidação funcional de um gene pode ser obtida através de uma perturbação sistemática na expressão gênica seguida por análises quantitativas e qualitativas dos produtos dessa expressão, tais como mRNA, proteínas e micromoléculas. Estas abordagens são referidas comumente como transcriptômica, proteômica e metabolômica (SUMNER, MENDES & DIXON, 2003).

O transcriptoma determina o nível de todos os genes transcritos, enquanto o proteoma determina as proteínas traduzidas e o metaboloma estuda o conjunto de metabólitos produzidos e/ou modificados por um organismo. O metaboloma consiste em um grande número de diferentes compostos com diversas propriedades químicas e físicas, tais como, massa molecular, polaridade, volatilidade, solubilidade, estabilidade e pKa, além de ocorrerem em concentrações muito distintas em um determinado organismo (BECKLES & ROESSNER, 2012).

Há duas principais abordagens em estudos metabolômicos, denominada de alvo e sem alvo. Na abordagem alvo é necessária a seleção e quantificação absoluta de um determinado subconjunto de metabólitos. Já na abordagem sem alvo, duas estratégias analíticas são empregadas:

- Perfil metabólito: refere-se para a análise de classe de metabólitos (metabólitos quimicamente relatados ou associados com uma via metabólica particular); e
- *Fingerprinting* metabólico: refere-se à análise de um conjunto total de metabólitos, para rápida classificação de amostras, evitando-se a propensão de focar em classes específicas de compostos. Não sendo necessária a identificação individual dos metabólitos.

Até o momento, não existe ferramenta analítica com potencial para analisar todos os metabólitos ao mesmo tempo. O que se busca é a análise da maior quantidade possível, utilizando diversas ferramentas analíticas, tais como HPLC-DAD; LC-DAD-MS; ESI-MS, NMR e LC-NMR-MS, para obter-se o *fingerprinting* metabólico o mais amplo possível de um determinado organismo, órgão, tecido ou célula animal ou vegetal.

4.1.2 Cromatografia líquida de alta eficiência

A cromatografia líquida de alta eficiência é uma técnica analítica popular para análise de produtos naturais (TISTAERT et al, 2011). Apesar de algumas limitações quando comparadas com outras técnicas sofisticadas, mas de alto custo, HPLD-DAD apresenta muitas vantagens para monitoramento na quantidade de uma ampla faixa de metabólitos com cromofóros distintos. Dependendo do cromofóro, a detecção no UV pode ser mais sensível e precisa do que métodos de espectrometria de massas (ISHIHARA et al, 2007).

A performance do *fingerprinting* cromatográfico é altamente dependente do grau de separação cromatográfica e a distribuição de concentração dos componentes químicos na planta. Portanto, é necessário desenvolver e otimizar uma metodologia para criar *fingerprintings*. Os *fingerprintings* resultantes devem mostrar boa seletividade, reprodutibilidade e viabilidade (JI et al, 2005).

Um fator importante no desenvolvimento de *fingerprint* é a escolha da fase estacionária. As colunas comumente utilizadas em *fingerprinting* de plantas são empactadas com fase estacionária do tipo C-18. A eficiência destas colunas é altamente dependente do diâmetro das partículas (3-5 μm). Partículas menores aumentam drasticamente a pressão. Os equipamentos HPLC podem resistir à pressão de até 400 bar, sendo que, alta eficiência e pequeno tempo de separação pelo decréscimo do diâmetro das partículas e aumento na vazão são limitados.

Recentemente, a cromatografia líquida de ultra-performance (UHPLC – Ultra-high performance liquid chromatography) surgiu como uma técnica viável para a análise de

extratos vegetais. UHPLC tornou possível a realização de separações com resolução superior as análises por HPLC empregando partículas de fase estacionária com diâmetro menor que 2 μ m. O uso de colunas com menor tamanho de partícula levou para o aumento na eficiência da separação, colunas pequenas podem ser empregadas em curto tempo de análise com pequeno consumo de solvente.

Apesar do desenvolvimento de técnicas analíticas de alto desempenho, a HPLC-DAD ainda tem se mostrado uma técnica fácil para operar, completamente automatizada, alta resolução, seletividade e sensibilidade, barata e robusta.

4.1.3 Quimiometria e análise de dados multivariados em metabolômica

Os dados obtidos a partir das plataformas analíticas geram muita informação, as quais requerem tratamento e análise criteriosa para permitir uma interpretação química e biológica. Considerando que um simples experimento gera uma enorme quantidade de dados, os quais consistem de certo número de objetos (amostras), descritos por um número de variáveis, a metabolômica utiliza ferramentas da quimiometria para análise, interpretação e visualização dos dados gerados.

Há várias etapas envolvidas desde a extração, visualização e interpretação dos dados. Dentre estas etapas, praticamente dois estágios são aplicados no processamento dos dados. O primeiro denominado de pré-tratamento dos dados, tem por objetivo é remover matematicamente fontes de variação indesejáveis que não serão removidas naturalmente durante a análise dos dados e que podem influenciar os resultados finais. No segundo estágio realiza-se análise estatística através de metodologias multivariadas.

O pré-tratamento dos dados pode ser dividido em dois tipos: transformação, aplicados às amostras, e pré-processamento, aplicados às variáveis. Na etapa de transformação pode ser utilizado o alisamento, correção da linha de base, logaritmo, alinhamento e normalização. Nas etapas de pré-processamento, os métodos empregados são de centragem dos dados na média, escalamento e autoescalamento (FERREIRA, 2005).

Os métodos de análise de dados multivariados são classificados em métodos de exploração, discriminação e classificação, correlação e regressão, e de resolução. Também podem ser classificados de acordo com o tipo de dados: os baseados em dados originais e os de variáveis latentes. Os métodos de exploração permitem a visualização da informação, similaridade e agrupamento entre amostras, correlação entre as

variáveis, detecção outlier, medidas de seleção das variáveis relevantes através da análise de componentes (MASSART, 1990).

Os métodos de classificação e discriminação são utilizados para a separação de amostras em grupos definidos ou classes, atribuição de novas amostras para classes pré-definida e para detecção de amostras anômalas não pertencentes a nenhum grupo. Para estes casos são empregados os métodos PCA (Principal component analysis), SIMCA (Soft Independent Modeling of Class Analogy), PLS-DA (Partial Least Squares Discriminant Analysis), LDA (Linear Discriminant Analysis) e SVM (Suport Vector Machines).

Os métodos de correlação e regressão permitem encontrar relações entre dois blocos de variáveis, modelagem das propriedades de trocas entre um grupo de variáveis e predição de uma propriedade a partir de uma medida indireta a partir de um grupo de variáveis correlacionadas com esta (FERREIRA et al, 1999). Para interpretação desses dados são empregados os métodos de regressão MLR (Multilinear Regression), PCR (Principal components regresion), PLS (Partial least squares regression).

A análise de componentes principais (PCA) foi introduzida na Química em 1960 por Malinowski com o nome de “Principal factor analysis” (WOLD, GELADI & ESBENSEN, 1987). Este método permite a transformação e a visualização de um conjunto de dados complexos em novo conjunto, onde as informações mais relevantes tornam-se facilmente perceptíveis.

A PCA assume um modelo bilinear para explicar a variância dos dados observados usando um número reduzido de componentes (PERÉ-TREPAT et al, 2006). Esta decomposição bilinear pode ser escrita pela seguinte equação:

$$d_{ij} = \sum_{n=1}^N \mu_{in} v_{jn} + e_{ij}$$

Onde d_{ij} é a matriz de entrada dos dados experimentais, em que i th são as linhas (amostras) e j th as colunas (variáveis), μ_{in} é o elemento score para a amostra i , v_{jn} é o elemento *loading* para a variável j e e_{ij} é o resíduo não modelado pela soma das N componentes ou contribuições.

Esta mesma equação pode ser escrita na forma de uma matriz (TAULER, 2011):

$$\begin{array}{ccc}
 \begin{array}{c} t_1 \quad t_2 \\ \boxed{\begin{array}{c} t_{j1} \quad t_{j2} \end{array}} \\ \mathbf{T} \\ (n,2) \end{array} & = & \begin{array}{ccc} x_1 \quad x_2 \quad x_3 \\ \boxed{\begin{array}{ccc} x_{j1} & x_{j2} & x_{j3} \end{array}} \\ \mathbf{X} \\ (n,3) \end{array} \quad \begin{array}{c} p_1 \quad p_2 \\ \boxed{\begin{array}{c} p_{11} \\ p_{21} \\ p_{31} \end{array}} \\ \mathbf{P} \\ (3,2) \end{array} \\
 \\
 t_{j1} = x_{j1} p_{11} + x_{j2} p_{21} + x_{j3} p_{31} \\
 \mathbf{T} = \mathbf{X}\mathbf{P}
 \end{array}$$

A matriz T é referente aos scores e descreve as amostras no espaço das componentes principais, enquanto a matriz P é a matriz dos “loadings” (pesos), os quais descrevem as variáveis no espaço das componentes principais.

A análise de componentes principais é o método mais utilizado nos estudos metabolômicos de plantas. A análise conjunta do gráfico de scores com o de *loadings* na abordagem metabolômica pode ser utilizada, principalmente, para fornecer subsídios para responder a seguinte questão: há um metabólito ou conjunto de metabólitos responsáveis pelo agrupamento e/ou discriminação de um “sistema complexo” submetido a uma perturbação (estresse biótico ou abiótico)?

Este tipo de abordagem tem sido muito utilizado na caracterização e fenotipagem de culturas agrícolas (BECKLES & ROESSNER, 2012). Além do que, informações metabolômicas associadas a análises genômicas e proteômicas integrada a plataformas de bioinformática podem auxiliar na identificação de fenótipos metabólitos responsáveis por uma determinada característica da planta (genótipo, cultivar), com o objetivo de acelerar os programas de melhoramento genético de plantas, reduzindo de 10 para 5 anos o lançamento de um novo genótipo de planta no mercado (FERNIE; SCHAUER, 2008).

O objetivo principal desta etapa foi a análise de *fingerprinting* metabólico das folhas de genótipos de cana-de-açúcar com diferentes suscetibilidades ao fungo *P. kuenni*.

4.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

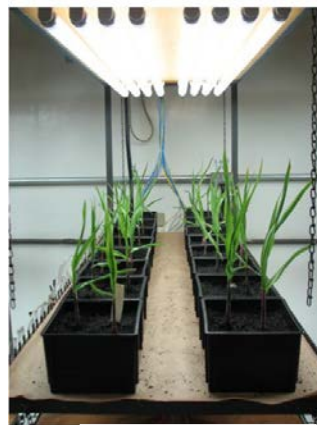
4.2.1 Cultivo dos genótipos IAC 95-5000 e SP 89-1115 sem inoculação

Toletes das variedades IAC 95-5000 e SP 89-1115 foram fornecidos pelo Instituto Agrônomo (IAC) – Centro de Cana, localizado em Ribeirão Preto-SP, em

13/09/2010. Duzentas gemas de cada genótipo foram germinadas em frascos de 180 mL em meio nutritivo Bioplant durante 30 dias. Posteriormente, 74 mudas de cada variedade foram selecionadas aleatoriamente e transferidas para vasos de 3 litros contendo Bioplant (duas mudas por vaso).

As plantas permaneceram em câmara de crescimento à 26°C com fotoperíodo de 10 horas para o período noturno e 14 horas para o período diurno (Figura 50). Os experimentos foram realizados no Campus da UNESP de Jaboticabal, Departamento de Biologia, Laboratório de Matologia, sob supervisão do Prof. Dr. Pedro Alves. As coletas foram realizadas aos 30, 35, 40, 45, 60, 75 dias após a germinação das plântulas para os vasos maiores, a partir do sorteio aleatório de cinco vasos, e com intervalo de tempo de 10 horas entre uma coleta e outra para cada dia de coleta.

Figura 50 - Genótipos de cana-de-açúcar cultivados em fotoperíodo: IAC 95-5000 e SP 89-1115.



IAC 95-5000



SP 89-1115

4.2.2 Cultivo dos genótipos IAC 95-5000 e SP 89-1115 e inoculação com *Puccinia kuehnii*

Toletes das variedades IAC 95-5000 e SP 89-1115 foram fornecidos pelo Instituto Agrônomo (IAC) – Centro de Cana, localizado em Ribeirão Preto-SP, em 13/09/2012. Cem gemas de cada genótipo foram germinadas em frascos de 180 mL em meio nutritivo. As mudas foram mantidas em estufa durante 40 dias e irrigadas todos os dias. Dez dias antes da inoculação foram adubadas com solução de sulfato de amônio (30 g/L). Os experimentos de cultivo e inoculação com *P. kuehnii* foram realizados no Departamento de Fitopatologia e Nematologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, na cidade de Piracicaba, estado de São Paulo, entre os meses de Setembro de 2012 e outubro de 2012 sob supervisão do Prof. Dr. Nelson Massola. O delineamento

experimental no experimento de inoculação foi inteiramente casualizado, com cinco repetições. Cada repetição foi representada por uma planta. O total de 50 plantas das variedades altamente suscetível (SP 89-1115) e resistente (IAC 95-5000) a *P. kuehni* foram separadas para o experimento de inoculação, sendo que 25 plantas de cada variedade referem-se às testemunhas.

O inóculo foi obtido de plantas jovens com pústulas abertas, previamente inoculadas e mantidas em câmara incubador tipo BOD, garantindo inóculo mais homogêneo e em qualquer período do ano. Com o auxílio de uma bomba de vácuo (Prismatec Mod. 131) foram coletados os esporos das pústulas abertas, preferindo-se as do lado abaxial da folha. Após a coleta, preparou-se uma suspensão de esporos em água que foi homogeneizada em agitador magnético (Marconi, Mod. MA 085) por 30 minutos. A suspensão foi quantificada sob microscópio de luz (Olimpus mod. CX 21) em câmara de Neubauer (Boeco) (SOOD; COMSTOCK; GLYNN, 2009). Obteram-se 500 mL de suspensão com uma concentração de 10^4 esporos por mL. Pulverizou-se aproximadamente 4 mL dessa suspensão em cada planta, por meio de borrifador manual de distribuição regular de gotas pequenas (Figura 51). Priorizou-se atingir a face abaxial das folhas.

Figura 51 - Inoculação das folhas de cana-de-açúcar com esporos de *P. kuehni* empregando-se borrifador manual.



Imediatamente após a inoculação as plantas foram colocadas em câmara de orvalho. Durante as primeiras 24 horas as plantas inoculadas permaneceram em temperatura

media de 22 °C e com umidificador de ar (Waterclear Max) que mantinha-se ligado durante 15 minutos a cada 2 horas, garantindo condições de umidade próxima a saturação.

A viabilidade média dos esporos utilizados como inóculo foi testada em placas com meio Ágar-Água a 2%, mantidas no escuro em câmara incubadora com temperatura média de 25°C. A avaliação foi realizada sob microscópio de luz em observações diretamente nas placas, 12 horas após a semeadura. Consideraram-se germinados os esporos que tinham o tubo germinativo com comprimento maior que seu diâmetro. Obteve-se viabilidade média de 54%.

Após período de 24 horas na câmara de orvalho, as plantas foram transferidas para câmaras de crescimento (BOD) até o encerramento dos experimentos. As plantas foram mantidas a 25 °C. As condições de luminosidade nas câmaras de crescimento foram ajustadas para manter um fotoperíodo de 12 horas de luz branca fluorescente e 12 horas de escuro. As coletas foram realizadas após 0, 2, 5, 10 e 15 dias após a inoculação.

4.2.2.1 Avaliações

4.2.2.1.2 Pré-infecção

Para as avaliações foram consideradas as variáveis período de incubação e latência, severidade, esporulação e viabilidade dos esporos produzidos.

4.2.2.1.3 Períodos de incubação e latência

Diariamente as plantas foram observadas para determinar o período de incubação, compreendidas entre os dias desde a inoculação até o aparecimento dos primeiros sintomas visíveis a olho nu em mais de 50 % das plantas. Avaliou-se também o período de latência, considerado o tempo transcorrido entre a inoculação e a esporulação em mais de 50% das pústulas.

4.2.2.1.4 Severidade

A severidade da ferrugem foi quantificada por meio da porcentagem da área foliar atacada após a determinação do período de latência: 11 a 18 dias após a inoculação, com o auxílio do integrador LI 3000A (LI-COR, USA) ou medidor de área foliar fixo. As pústulas de cada folha foram desenhadas em folhas de plástico transparente, as quais foram submetidas ao integrador para estimativa da área foliar doente. Em seguida, as

folhas inteiras também foram submetidas ao mesmo equipamento, para cálculo da área total de cada folha. Desse modo, calculou-se a porcentagem de área atacada em relação à área total de cada folha. Cada leitura foi realizada em duplicada e considerou-se a média das mesmas para os cálculos. Os dados de porcentagem de área foliar doente foram transformados para $\sqrt{(x+1)}$ e comparadas pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade usando o SOFTWARE ASSISTAT.

4.2.2.1.5 Esporulação e viabilidade dos esporos

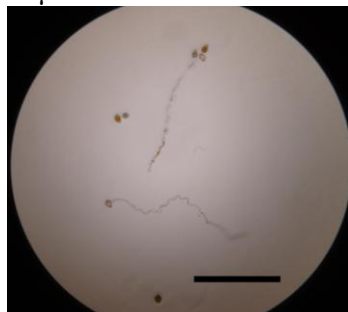
A esporulação e a viabilidade dos esporos produzidos foram avaliadas oito dias após o término do período de latência. Segmentos de folhas com aproximadamente 20 pústulas foram cortados e retirados cuidadosamente de cada uma das repetições. Tais segmentos foram acondicionados em microtubos de 2 mL, aos quais adicionou-se 0,8 mL de água destilada e agitou-se em agitador de tubos (IKA Mod. Lab dancer) por um minuto. Em seguida, retiraram-se os segmentos de folhas e centrifugou-se a fase líquida em centrífuga orbital (Eppendorf Mod. 5415 D) a 10000 RPM por 5 minutos. Descartou-se 0,6 mL do sobrenadante e ressuspenderam-se os urediniósporos no volume restante. A quantificação foi realizada por meio de contagem dos urediniósporos em 5 alíquotas de 4 μ L sob microscópio composto com aumento de 50X. Para essa avaliação foram utilizadas as mesmas pústulas para as quais foram determinados seus tamanhos. Assim, os resultados de esporulação foram calculados em número de esporos/mm² de pústula.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco repetições para cada tratamento. As médias das leituras foram comparadas pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade usando o SOFTWARE ASSISTAT. Para efetuar a análise estatística os dados foram transformados em log dos valores.

A viabilidade dos esporos foi avaliada mediante testes de germinação em Agar. Alíquotas de 100 μ L da mesma suspensão usada para quantificação da esporulação foram espalhadas na superfície de meio Ágar-Água a 2%, com auxílio de alça de Drigalsky. As placas foram mantidas em câmara de crescimento a 25 °C e no escuro. A germinação dos urediniósporos foi avaliada após 12 horas de incubação, por meio da observação de 100 esporos aleatoriamente em cada placa de Petri, para estimar a porcentagem de urediniósporos germinados. Considerou-se germinado o urediniósporo que apresentou tubo germinativo mais comprido que seu diâmetro (Figura 52). Os dados

de porcentagem de germinação foram comparados pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade usando o SOFTWARE ASSISTAT.

Figura 52 - Uredíniosporos germinados e não germinados em placa de Petri contendo meio sólido Agar-água. Barra: 200 μm .



A metodologia e os resultados obtidos do ítem 2.2.1.4 à 2.2.1.5 foram realizadas em colaboração com Sérgio Gómez, 2013 e também estão descritos na sua dissertação.

4.2.3 Preparo das amostras para as análises por cromatografia líquida.

Imediatamente após as coletas das folhas, a atividade enzimática foi inibida por congelamento com nitrogênio líquido e o material vegetal armazenado em freezer - 80°C. As plantas foram secas por liofilização. O material vegetal seco foi triturado em moinho criogênico durante 10 minutos. A primeira etapa do procedimento de moagem consistiu de congelamento da amostra seguida por 1 ciclo com dois estágios de pulverização e resfriamento, respectivamente, para obter partículas < 60 μm .

4.2.4 Preparo do extrato

A etapa de preparo dos extratos e análise por HPLC foi realizada de acordo com a metodologia desenvolvida por nosso grupo (LEME 2011).

Os extratos foram preparados a partir de 200 mg de material vegetal seco, no qual adicionaram-se 2 mL da mistura de água/etanol/isopropanol (35:45:25 v/v/v), com sonicação durante 15 minutos em banho de ultra-som (ELMA®, modelo TANSSONIC 700, de frequência de 35 kHz). O sobrenadante foi separado e ao resíduo foram adicionados mais 2 mL para segunda extração. Após a segunda extração, o material vegetal restante no frasco foi lavado com 2 mL da mistura de solvente e adicionado mais 2 mL para terceira extração em ultra-som. O volume final de 8 mL foi seco em evaporador rotativo a vácuo (Speedvac - Thermo).

Depois de seco o extrato foi solubilizado em 2 mL da mistura água/metanol (1:1 v/v), aplicado em cartucho de extração em fase sólida (EFS) C18 (10 x 3 mL, com 500 mg de adsorvente, Agilent Technologies) e eluído com 4 mL de metanol. O volume final de 4 mL foi filtrado e seco em evaporador rotativo a vácuo. O extrato seco foi reconstituído em 100 µL de MeOH/H₂O (1:1 v/v) para análise.

Na etapa de extração em fase sólida para as amostras do experimento de inoculação, metanol foi substituído por etanol.

4.2.5 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-DAD)

Os extratos obtidos das amostras sem inoculação (item 2.1) foram analisados empregando um cromatógrafo líquido de alta eficiência, marca Shimadzu[®], equipado com duas bombas modelo LC-20AT, detector de arranjo de diodos (DAD) modelo SPD-M20A, amostrador automático modelo 20A e software LC Solution versão 1.23 SP1. A coluna utilizada para as análises foi Kinetex[®] C-18 (150 x 4,6 mm x 2,6 µm) da Phenomenex. A eluição foi realizada com solventes de grau cromatográfico em sistema gradiente, nas seguintes condições cromatográficas: iniciou-se com 10% de metanol e 90% de água indo até 45 minutos para atingir 50% de metanol e 50% de água, depois mais 10 minutos para atingir 100% de metanol e permaneceu durante 5 minutos 100% de metanol, 5 minutos para voltar à condição inicial e então mais 15 minutos em 10% de metanol para condicionamento da coluna. Tempo de análise foi de 80 minutos. Vazão da bomba de 1 mL/min e volume de amostra injetado de 20 µL. Os cromatogramas foram registrados em 350 nm e os espectros no UV-Vis adquiridos na faixa de 200 a 800 nm.

Os extratos das amostras do item 2.2 foram analisados empregando o cromatógrafo líquido de ultra-alta eficiência (UHPLC) *Ultimate3000*, marca Dionex[®] equipado com duas bombas modelo DGP-3600RS, detector de arranjo de diodos (DAD) modelo DAD3000(RS), amostrador automático modelo WPS3000RS e *software* Chromeleon versão 6.80. A frequência de aquisição de dados foi de 5,0 Hz. As condições cromatográficas utilizadas foram as mesmas descritas para o sistema da Shimadzu, com exceção da fase móvel onde se utilizou 1% de ácido acético na fase móvel ao invés de 0,1%.

Mistura de padrões contendo ácido cumárico, ácido clorogênico, ácido cafeico, luteolina-6-*C*-glicosídeo, luteolina-8-*C*-glicosídeo e vitexina foram usados para comparar o tempo de retenção e perfil espectral UV/Vis das flavonas e ácidos fenólicos.

4.2.6 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (LC-DAD-MS)

Um sistema HPLC-DAD com as mesma configurações e condições cromatográficas do item 2.2.3 foi conectado para espectrômetro de massas micrOTOF II-ESI-TOF (Bruker Daltonics, Billerica, MA, EUA). As análises foram realizadas no modo negativo, temperatura de desolvatação de 180°C, fluxo de gás no cone de 50 µL/min, voltagem do capilar de 4,5 kV, voltagem do cone 120 V. O sistema foi previamente calibrado com uma solução de Na-TFA a 100 mg/mL.

4.2.7 Determinação do teor de luteolina-8-*C*-glicosídeo nos genótipos IAC 95-5000 e SP 89-1115

Utilizou-se como padrão externo a luteolina-8-*C*-glicosídeo, da qual foi construída uma curva analítica a partir de valores experimentais obtidos para as concentrações de 1 mg/mL, 0,48 mg/mL, 0,24 mg/mL, 0,12 mg/mL e 0,06 mg/mL. Para cada solução foi obtido um cromatograma, obtendo-se a área do pico do padrão medida em 348 nm, construindo-se a curva analítica de área *versus* concentração do analito. Através da análise de regressão linear foi possível estabelecer o coeficiente de correlação, assim como o coeficiente angular e linear para a determinação da concentração de luteolina-8-*C*-glicosídeo nos genótipos IAC 95-5000 e SP 89-1115 em diferentes estágios de desenvolvimento sem inoculação.

4.2.8 Análise de dados

Os dados cromatográficos obtidos foram organizados na forma de matrizes $X_{I \times J}$, onde I são as linhas (amostras) e J colunas (variáveis). As variáveis foram as intensidades (em mV) de absorbância, medidas a 350 nm, a cada 640 ms de corrida cromatográfica. O processamento dos dados foi realizado empregando o software Matlab 7.10.0 (The MathWorks, Co., Natick, MA, USA) e o pacote computacional PLS-Toolbox (Eigenvector Research, Inc.). PCA foi utilizada como método exploratório (FERREIRA et al, 1999).

4.2.8.1 Pré- tratamento dos dados

Os dados obtidos foram submetidos à etapa de pré-tratamento. Os métodos de pré-tratamento utilizados foram alinhamento, normalização, centragem na média e autoescalonamento.

4.2.8.2 Alinhamento cromatográfico

Os dados cromatográficos foram submetidos às etapas de pré-tratamento e processamento. A etapa de pré-tratamento consistiu no alinhamento dos cromatogramas empregando o algoritmo COW – Correlation optimized warning (Nielsen, Cartensen & Smedsgaard, 1998; Tomasi, Berg & Andersson, 2004) disponível na página <http://www.models.kvl.dk/users/rasmus/>. O algoritmo COW alinha cromatogramas desalinhados (xd) a partir de um cromatograma de referência (xr). O cromatograma de referência selecionado foi aquele que mostrou os picos mais resolvidos. O alinhamento torna-se necessário para corrigir os deslocamentos dos picos, devido principalmente às variações de temperatura, composição, vazão da fase móvel e idade da coluna, inerentes ao sistema cromatográfico.

4.2.8.3 Análise de componente principal (PCA) e Análise Discriminante com método dos Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA)

PCA é um modelo bilinear para explicar a variância dos dados observados usando um número reduzido de dimensões ortogonais. A determinação da complexidade do modelo em PCA foi baseada na seleção de componentes principais que correspondessem ao número de PCs em que a curva "porcentagem de variância explicada por n° da PC" começa a decrescer assintoticamente para zero e considerando todas as componentes principais que descrevessem cerca de 95% da informação original dos dados. O PLS-DA foi usado com as amostras dos experimentos de inoculação, sendo que a classificação foi baseada nos resultados obtidos do experimento de cultivo e PCA.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Experimento de cultivo sem inoculação

São apresentados os métodos de tratamento de dados e análise de dados cromatográficos aplicados as 63 amostras do genótipo SP 89-1115 e IAC 95-5000 coletadas após 30, 35, 40, 45, 60 e 75 dias da germinação, às 20:00 horas (noite) e 6:00 horas (manhã) de acordo com o item 4.2.1. As amostras foram analisadas empregando-se LC-DAD (figuras 53, 54, 55 e 56). Os genótipos SP 89-1115 coletado às 6:00 horas (spd) e às 20:00 horas (spn) com 30, 35, 40, 45, 60 e 75 dias de germinação foram codificados como: *spd30*, *spd35*, *spd40*, *spd45*, *spd60*, *spd75* e *spn30*, *spn35*, *spn40*, *spn45*, *spn60*, *spn75*; Os genótipos IAC 95-5000 coletado às 6:00 horas (iacd) e às 20:00 horas(iacn) com 35, 45, 60 e 75 dias de germinação foram codificados como: *iacd35*, *iacd45*, *iacd60*, *iacd75* e *iacn35*, *iacn45*, *iacn60*, *spn75*.

Figura 53 - Cromatogramas amostras IAC 95-5000 coletada às 20 hs (iacn)

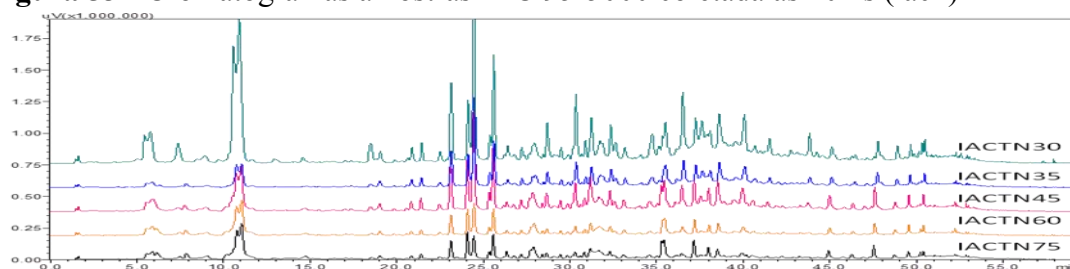


Figura 54 - Cromatogramas amostras IAC 95-5000 coletada às 6 hs (iacd)

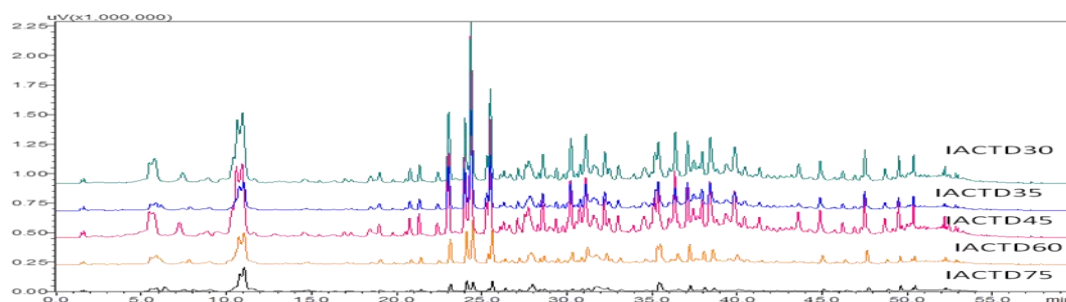
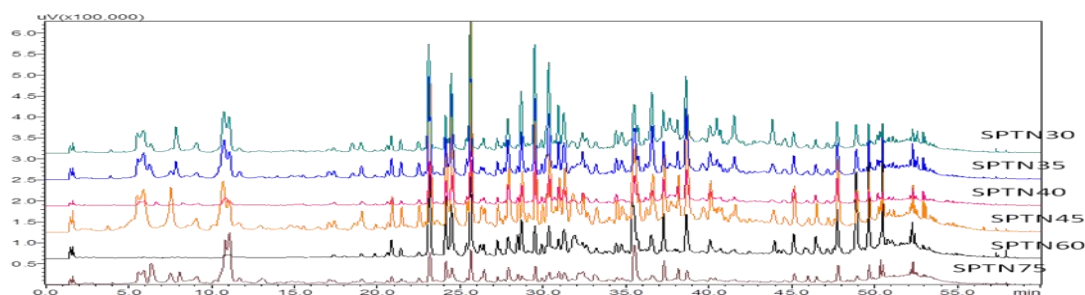
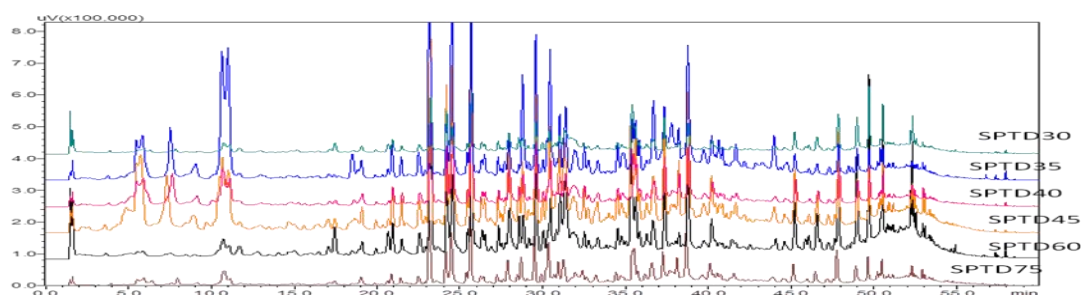
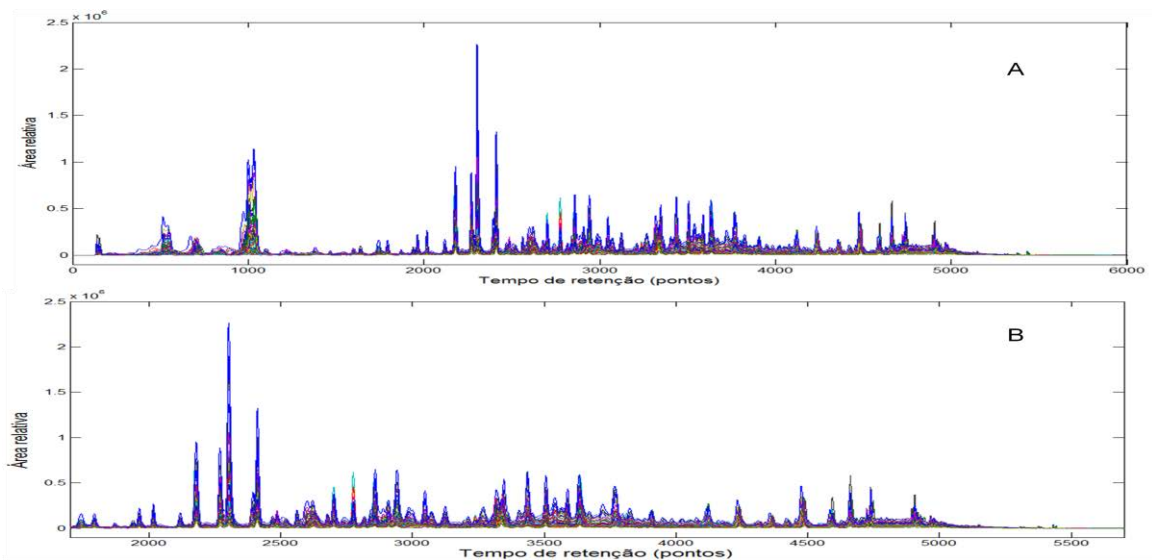


Figura 55 - Cromatogramas da variedade SP 89-1115 coletada as 20 hs (spn).**Figura 56** - Cromatogramas da variedade SP 89-1115 coletada as 6 hs (spd).

O alinhamento cromatográfico foi obtido a partir do ajuste dos parâmetros m (comprimento do segmento) e s (*slack* - parâmetro de distorção). O parâmetro m está relacionado com o número de seções no qual o cromatograma é dividido, definindo a posição dos nós. Já o parâmetro *slack* (s) define as possíveis deformações (encurtamento ou alongamento). Empregando a decomposição dos valores singulares (SVD), os melhores valores obtidos para os parâmetros m e s foram 120 e 2, respectivamente.

A região entre 1-16 minutos foi excluída porque a resolução e retenção dos picos observados nessa região (principalmente entre 5 à 11 minutos) não foram consistentes entre as várias replicatas, provavelmente devido à dificuldade de recondicionamento reprodutível de colunas de fase reversa C-18 com fases móveis com alta proporção de água. Portanto, a matriz original de dimensões 60x7503 foi reduzida para 60x4001, ou seja, 60 amostras por 4001 variáveis (Figura 57).

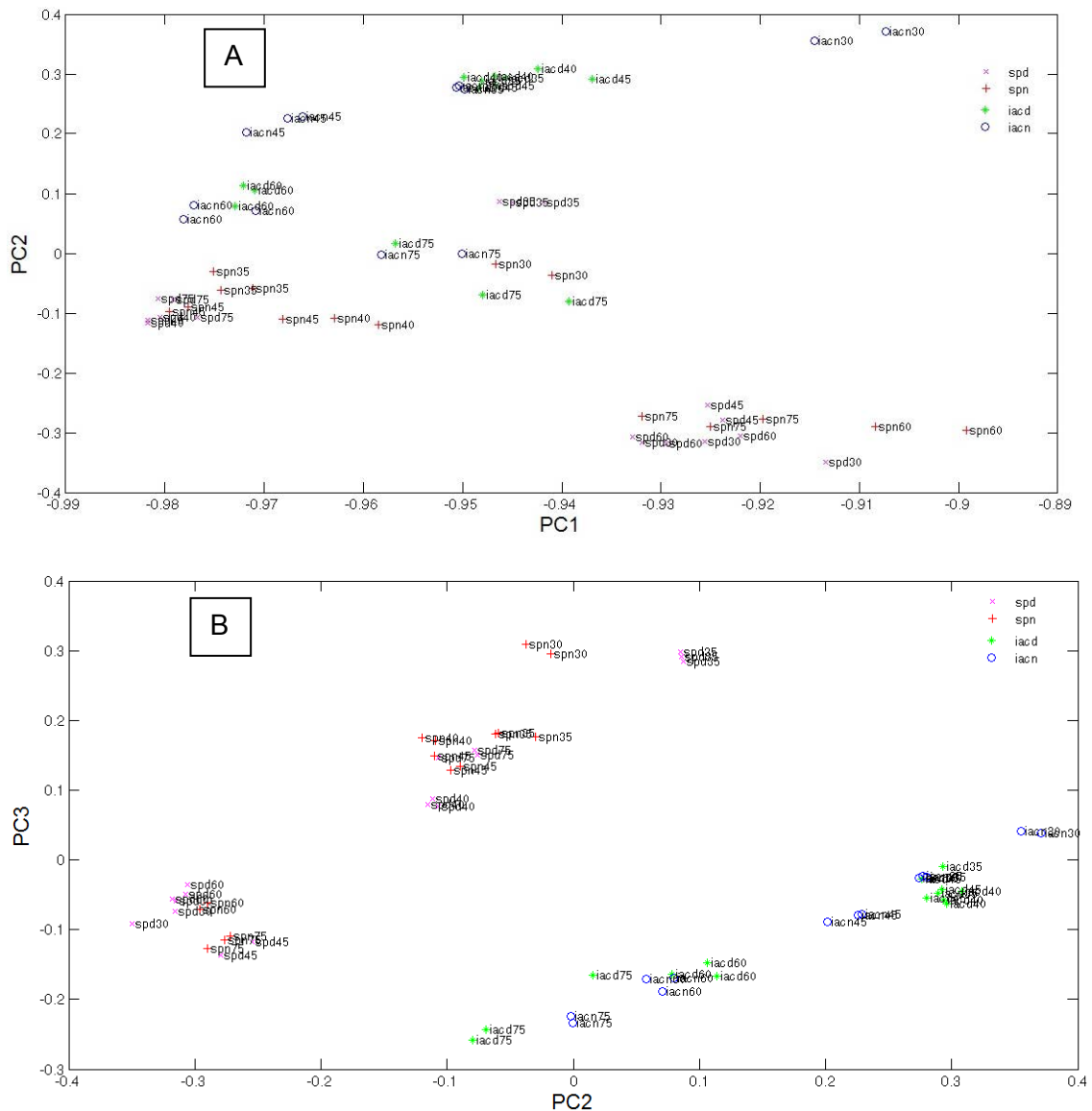
Figura 57 - Perfil cromatográfico da matriz original (A). Perfil cromatográfico da matriz reduzida (18 a 60 minutos – 60x4001) com a etapa de alinhamento.



A seguir PCA foi aplicada para classificar as amostras e reduzir a dimensionalidade dos dados. O número de componentes principais foi selecionado através do gráfico "número de componentes *versus* autovalores". Os autovalores representam a quantidade de variância original descrita por cada componente. Quatro componentes principais explicaram 97,23% da variância explicada.

No gráfico de scores PC1 versus PC2 (Figura 58) não foi possível observar evidente separação entre os genótipos. No gráfico de scores PC1 X PC2 não foi possível observar evidente discriminação entre o genótipo SP 89-1115 (suscetível a ferrugem alaranjada), enquanto do IAC 95-5000 (resistente). No entanto, usando PC2 e PC3 os dois genótipos de cana-de-açúcar foram discriminados de forma mais evidente, observando-se também alinhamento das amostras de acordo com a idade planta, principalmente para a variedade IAC 95-5000. A partir de valores positivos da PC3 para valores negativos de PC3 e PC2, indicando que os genótipos com 30 dias apresentam perfil cromatográfico diferente, mas à medida que “envelhecem” o perfil cromatográfico tende a se tornar semelhante. Essa constatação pode ser importante para distinguir indivíduos ainda muito jovens quanto à resistência ao patógeno. Esta separação não foi tão evidente para as amostras spd, devido a não homogeneidade entre os clones durante a coleta e/ou mesmo a ocorrência de erros aleatórios durante a etapa de preparo.

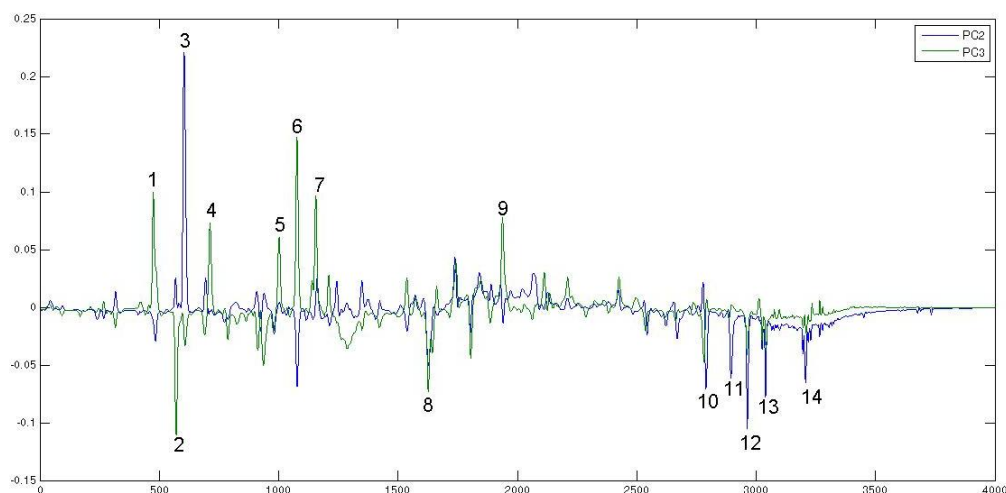
Figura 58 - Gráfico de scores referente aos genótipos IAC 95-5000 e SP 89-1115 após o transplante. (A) PC1 X PC2. (B) PC2 X PC3.



SP 89-1115 coletada às 6:00 horas (spd) e às 20:00 horas (spn) com 30, 35, 40, 45, 60 e 75 dias de germinação: *spd30, spd35, spd40, spd45, spd60, spd75 e spn30, spn35, spn40, spn45, spn60, spn75*; IAC 95-5000 coletada às 6:00 horas (iacd) e às 20:00 horas (iacn) com 35, 45, 60 e 75 dias de germinação: *iacd35, iacd45, iacd60, iacd75 e iacn35, iacn45, iacn60, spn75*.

O gráfico de *loadings* (Figura 59) permitiram atribuir as principais variáveis (picos) responsáveis pela discriminação das amostras. Sendo que a segunda componente (PC2) teve a variância explicada, principalmente, em relação ao pico 3 em 24,6 minutos. Enquanto que a PC3 teve a variância explicada devido aos picos 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8 e 9, referente aos picos com 23,1; 24,2; 25,8; 28,9; 29,6; 30,5; 35,5; e 38,7 minutos.

Figura 59 - Gráfico de *loadings* PC2 X PC3 referente aos genótipos IAC 95-5000 e SP 89-1115 após o transplântio..



A identificação dos picos 1-14 foi realizada através da comparação dos dados de retenção e espectros no UV obtido por LC-DAD com os compostos identificados no capítulo 1 (Tabela 3).

Tabela 3 Principais metabólitos responsável pela discriminação entre os genótipos IAC95 5000 e SP89 1115.

Loadings	Tempo de retenção (min)	UV	Substância proposta
1	21,7	346/267	luteolina-6-C-glicosídeo*
2	22,7	334/270	apigenina-6-C-arabinosil-8-glicosídeo
3	23,2	347/268	luteolina-8-C-glicosídeo*
4	24,1	345/268	diosmetina-8-C-glicosídeo
5	27,3	334/268	apigenina-8-C-glicosídeo
6	27,9	338/269	-
7	28,7	347/269	-
8	34,2	349/266	tricina 7-O-raminosil-galacturonideo
9	35,9	348/267	tricina-7-O-neohesperosídeo
10	44,8	337/270	-
11	47,0	345/268	tricina
12	47,9	336/270	tricina-4'-O-(eritro ou treo-guaiacilgliceril)-éter

13	48,8	-	-
14	50,9	314	-

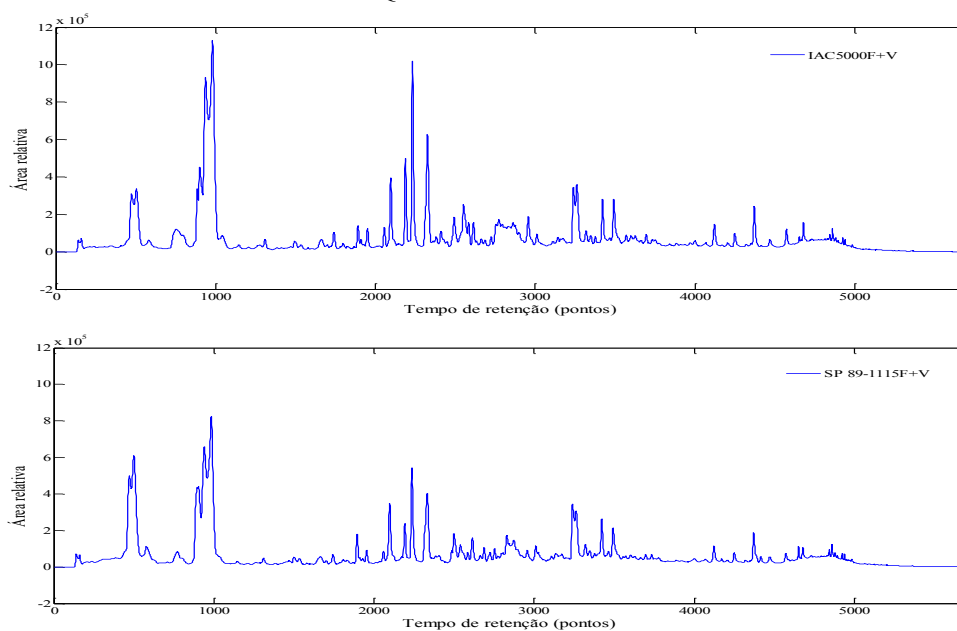
*: confirmado com o padrão;

O gráfico de *loadings* e scores (PC2XPC3) pode-se verificar a formação de três grupos, devido a diferente correlação destas amostras com os metabólitos 1-14. As amostras IAC 95-5000 situada na parte positiva da PC2 foram agrupadas e separadas das demais, devido a maior correlação com luteolina-8-*C*-glicosídeo. As amostras do genótipo SP 89-1115 (30-40 dias) situado na parte positiva da PC3 mostraram maior correlação com luteolina-6-*C*-glicosídeo, diosmetina 8-*C*-glicosídeo, apigenina-8-*C*-glicosídeo e tricina-7-*O*-neohesperosídeo, enquanto as amostras coletadas com 45-75 dias (com exceção da spd30) situadas na parte negativa da PC2 e PC3 foram agrupadas devido a presença de apigenina-6-*C*-arabinosil-8-glicosídeo, tricina, tricina 7-raminosil-galacturonídeo, tricina-4'-*O*-(eritro ou treo-guaiacilgliceril)-éter e os picos 10,13 e 14 (não identificados). Podemos observar também que com 30 dias as variedades IAC apresentam maior quantidade de isoorientina, do que a SP89-1115, a medida que “envelhecem” a diferença na quantidade de isoorientina diminui, e estas duas variedades ocupam praticamente o mesmo quadrante com 75 dias (PC2 e PC3 negativa).

4.3.2 Determinação do teor de luteolina-8-*C*-glicosídeo

Considerando a abordagem metabolômica com alvo, após identificar o principal metabólito responsável pela separação entre as duas variedades, foi calculado o teor de luteolina-8-*C*-glicosídeo nas amostras estudadas e nas duas variedades com 1 ano de idade cultivada no Instituto de Química (Figura 60).

Figura 60 - Cromatogramas das variedades IAC 95-5000 e SP 89-1115 cultivadas no Instituto de Química com 1 ano de idade.



A Tabela 4 mostra o teor de luteolina-8-*C*-glicosídeo das amostras coletadas as 20:00 hs. O teor foi calculado a partir dos dados de regressão linear da curva analítica $y=1.10^6x-1.10^6$ com coeficiente de correlação igual a 0,997.

Tabela 4 - Teor de luteolina-8-*C*-glicosídeo nos genótipos IAC95 5000(IACN) e SP89 1115 (SPN) coletado as 20:00 hs.

Amostra	luteolina-8- <i>C</i> -glicosídeo (µg/mL)	Desvio padrão
SPN30	2,40	0,02
SPN35	2,57	0,01
SPN40	1,36	0,01
SPN45	2,72	0,03
SPN60	1,57	0,01
SPN75	1,20	0,01
IACN30	9,65	0,20
IACN35	4,76	0,04
IACN45	5,76	0,01
IACN60	2,66	0,01
IACN75	2,24	0,01
SP1ANO	4,18	0,02
IAC1ANO	5,18	0,10

A tabela 4, apenas confirma os resultados obtidos através do gráfico de *loadings*, e além do que, podemos observar que as quantidades de luteolina-8-*C*-glicosídeo nas plantas com 1 ano são muito próximas. A partir desses resultados podemos inferir que a possível resistência da variedade IAC95-5000, em relação à ferrugem alaranjada e

possivelmente a outras doenças, pode estar relacionada, principalmente a maior quantidade de flavonoides, principalmente luteolina-8-C-glicosídeo.

4.3.3 Experimento de cultivo com inoculação.

4.3.3.1 Avaliações da infecção com o fungo *Puccinia kuehni*

Somente o genótipo SP89 1115, depois de inoculado apresentou sinais da doença, enquanto as amostras controle, IAC95 5000 controle e inoculada não apresentaram esses sinais. Portanto, os resultados apresentados sobre a avaliação de infecção referem-se exclusivamente a SP89 1115. Os sintomas visíveis da doença ocorreram após 9 dias da inoculação e a esporulação das pústulas após 11 dias. A média de pústulas foi de 5,6 pústulas/cm². Em relação a severidade da doença, a área foliar atacada foi em torno de 6%. A viabilidade média dos esporos utilizados como inóculo foi de 54%. A alta viabilidade dos esporos refletiu na porcentagem de 45% de formação de apressórios após 24 horas de inoculação.

4.3.3.2 Análises dos extratos dos genótipos SP89 1115 e IAC95 5000 inoculados com *P. kuehni* e controle empregando LC-DAD e análise multivariada.

Os cromatogramas dos genótipos IAC95 5000 e SP89 1115 inoculados e controles estão ilustrados nas figuras 61, 62, 63 e 64. As amostras referentes ao genótipo SP89 1115 estão codificadas como **S**, sendo que a **SC** representa as amostras suscetíveis sem inoculação (controle) e **SI** suscetíveis inoculadas. O genótipo IAC95 5000 foi codificado como **R**, sendo que, **RC** representa as amostras resistentes sem inoculação (controle) e **RI** as amostras inoculadas. Os números 1, 2, 3, 4 e 5 referem-se ao tempo de coleta das amostras. T igual a 1 refere-se as amostras coletadas antes da inoculação, 3, 4, 5 e 6 referente as amostras coletada após 2, 5, 10 e 15 dias de inoculação, respectivamente. Todas as análises foram realizadas em duplicata, mas por questão de melhor visualização, somente um cromatograma de cada amostra está ilustrado.

Através da inspeção visual dos cromatogramas, pode se observar alta similaridade do perfil qualitativo de ambos os genótipos, tanto inoculado como controle. Os picos observados na região 2-12 minutos são referentes aos ácidos fenólicos e flavonas C-e O glicosilados entre 17-40 minutos

Figura 61 - Perfil cromatográfico dos genótipos SP89 1115 controle durante 0 (SC1), 2 (SC2), 5 (SC3), 10 (SC4) e 15 (SC5) dias.

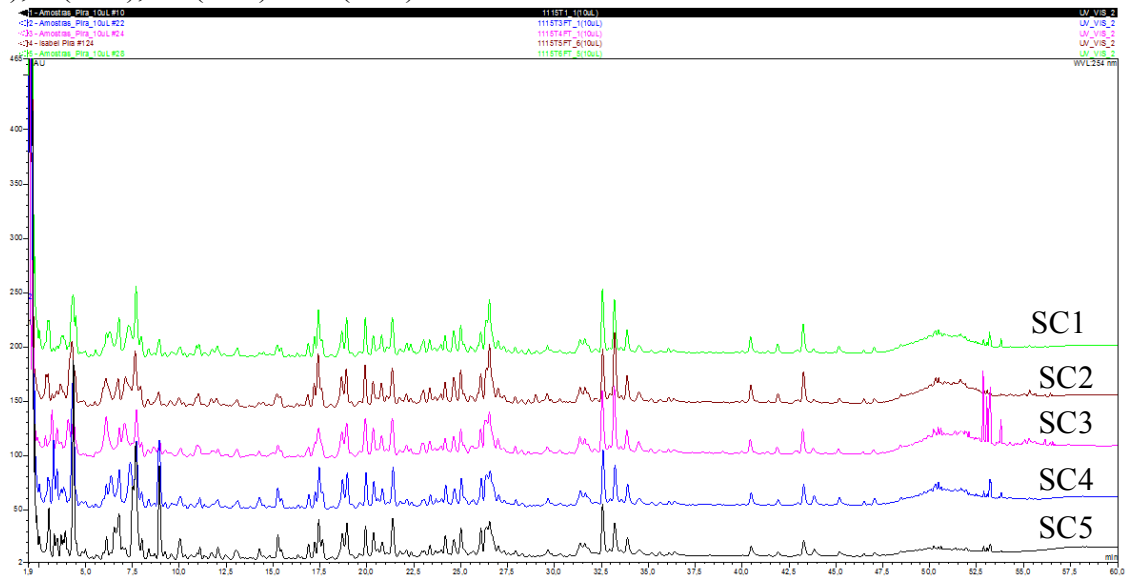


Figura 62 - Perfil cromatográfico dos genótipos SP89 1115 após 2 (SI2), 5 (SI3), 10 (SI4) e 15 (SI5) dias da inoculação com *P. kuehni*.

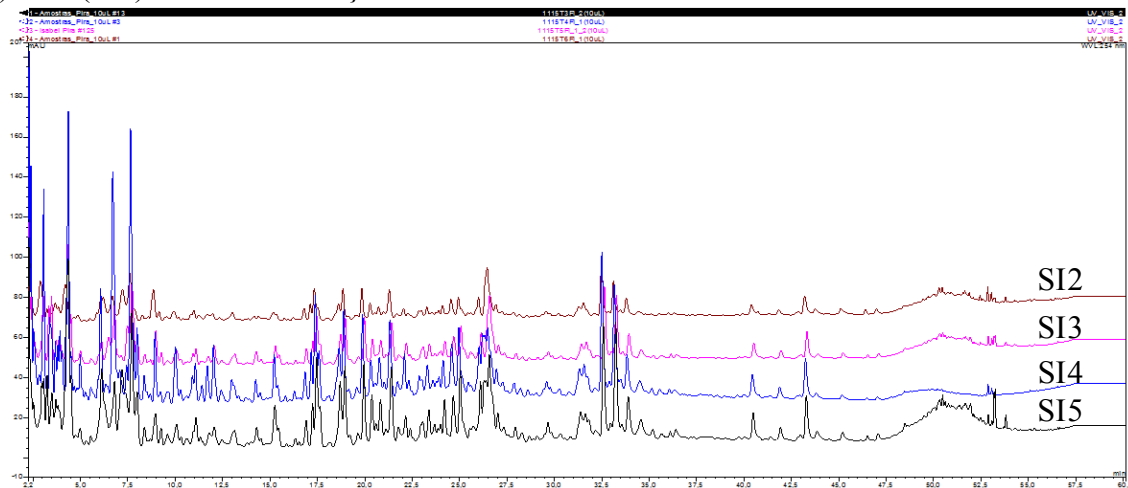


Figura 63 - Perfil cromatográfico dos genótipos IAC95 5000 controle durante 0 (RC1), 2 (RC2), 5 (RC3), 10 (RC4) e 15 (RC5) dias.

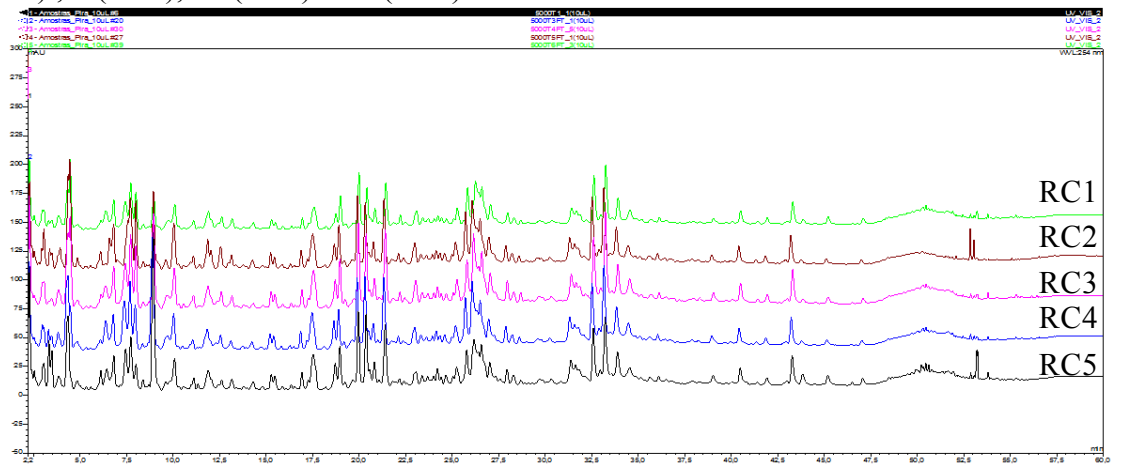
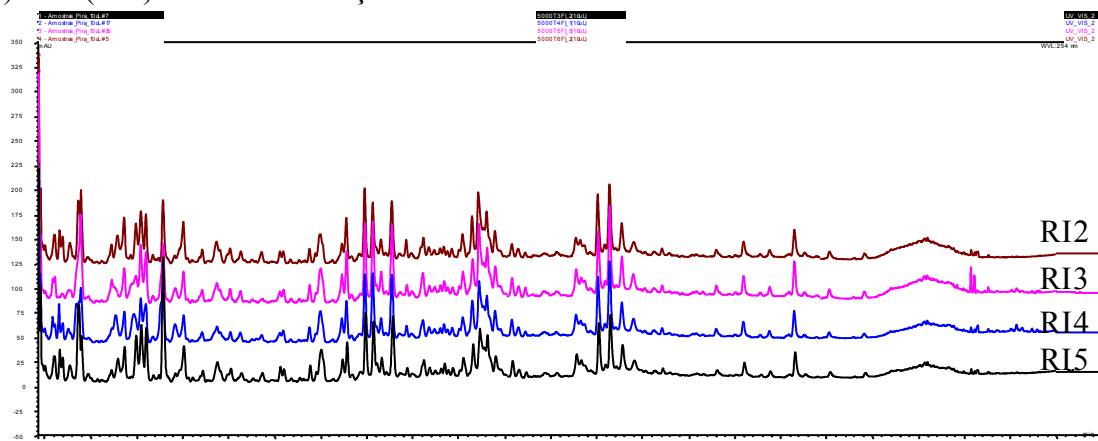


Figura 64 - Perfil cromatográfico dos genótipos IAC95 5000 após 2 (RI3), 5 (RI4), 10 (RI5) e 15 (RI5) dias da inoculação com *P. kuehnii*.



Os dados cromatográficos (tempo de retenção e área) foram transformados em dados numéricos e organizados em uma matriz, a qual consistiu de 37 linhas e 9602 colunas, sendo que 36 linhas referem-se as amostras e 1 linha refere-se ao branco da análise. Para o alinhamento os melhores valores obtidos para os parâmetros m e s foram 40 e 2, respectivamente. A região entre 1-2,2 e 60-80 minutos foram excluídas após o alinhamento. Portanto, a matriz original de dimensões 36×9602 foi reduzida para 36×6731 ($X_{36 \times 6731}$).

Após o alinhamento foram avaliados 3 diferentes tipos de pré-processamento, tendo em vista que o sucesso no tratamento multivariado depende desta etapa. O número de componentes principais (CP) selecionadas em cada modelo está apresentado na tabela 5. Os cromatogramas dos dados sem pré-processamento, normalização e normalização+centrado na média estão apresentados nas figuras 65, 66 e 67.

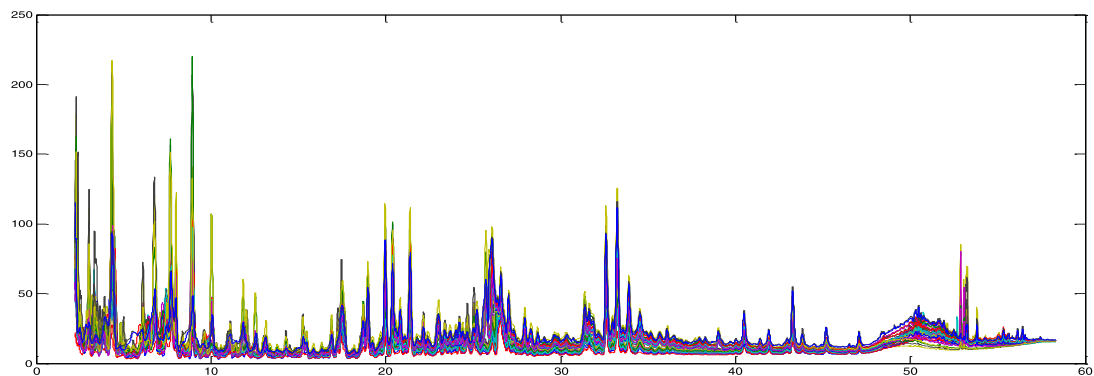
Tabela 5 - Tipos de pré-processamento e números de componentes principais selecionadas para análise por componentes principais.

Processamento	Componentes principais (%)	Número de componentes selecionadas
Sem pré-processamento	92,79	4
	2,41	
	2,32	
	0,88	
Normalizado	93,04	4

	2,51	
	1,93	
	0,84	
Normalizado + centrado na média	37,30	5
	25,84	
	11,55	
	4,48	
	4,14	

Na etapa sem pré-processamento 4 componentes principais explicaram 98,40% da variância explicada. Sendo que a PC1 mostrou a maior variância nos dados (Figura 65).

Figura 65 - Cromatograma da matriz de dados $X_{36 \times 6731}$ sem pré-processamento



A normalização nas amostras foi realizado por comprimento do vetor unitário, onde cada valor original foi dividido pela soma dos quadrados de todos os valores das variáveis da mesma linha, de acordo com a equação abaixo:

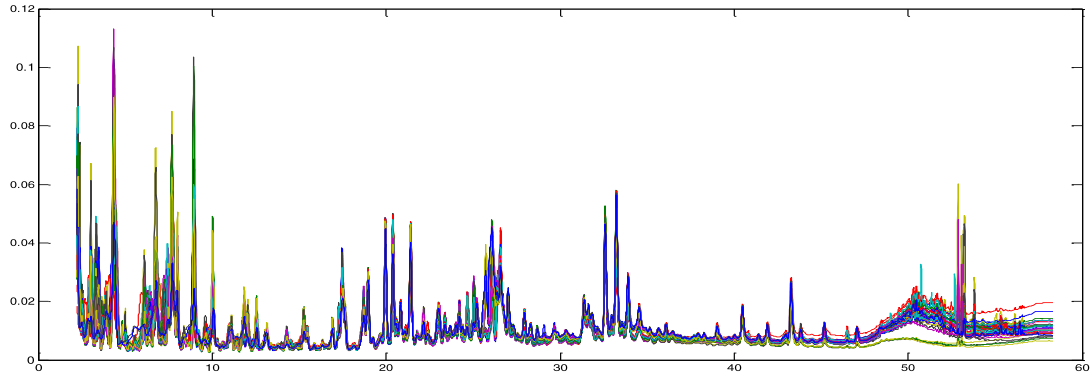
$$w_i = \frac{\sum_{j=1}^n x_{i,j}^2}{\sum_{j=1}^n x_{i,j}^2}$$

sendo, n=número total de variáveis, xi=vetor de valores observados para uma dada amostra, j= número de variáveis.

Ao realizar este procedimento podemos observar no cromatograma da Figura 66 que a escala das intensidades foi modificada, mas as características originais e a proporção dos picos cromatográficos foram mantidas. Ao ser construído PCA quatro componentes principais explicaram 98,32% da variância explicada. Através dos dados

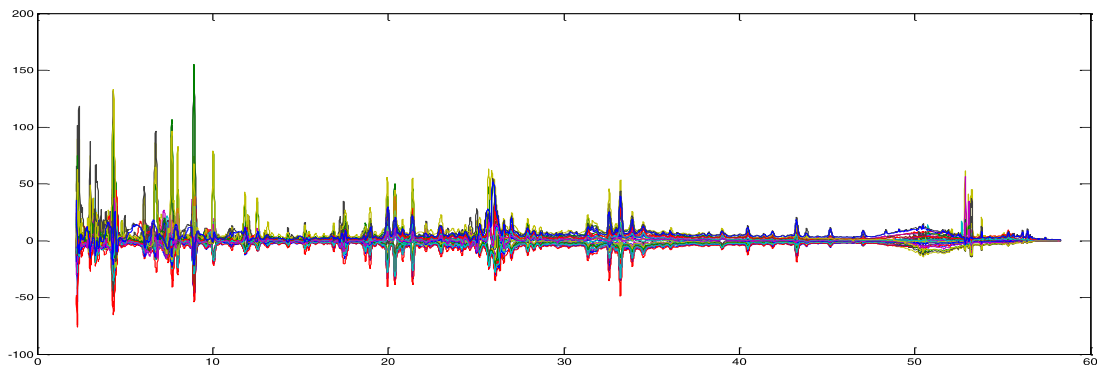
normalizados foi possível observar mais claramente a diferença entre as replicatas de cada amostra no gráfico de scores da PCA.

Figura 66 - Cromatograma da matriz de dados $X_{36 \times 6731}$ normalizados.



O terceiro tipo de pré-processamento consistiu na normalização e centragem na média. Nesta etapa, a variação sistemática foi removida através da normalização. Na centragem na média os dados são transladados até a origem da coordenada. Cada variável é centrada na média e subtraído da média de todos os valores da coluna. Quando os dados são centrados nas médias diferenças entre as variáveis devido à área são eliminadas, permitindo avaliar quais variáveis discriminariam melhor as amostras. Cinco componentes principais apresentaram 83,51% da variância explicada.

Figura 67 - Cromatograma da matriz de dados $X_{36 \times 6731}$ normalizados e centrado na média.



A análise do gráfico de scores para PC1XPC2 dos dados sem pré-processamento e normalizado mostraram dois grupos, os quais foram separados pela PC2 (Figura 68 e 69), sendo que o cluster na parte negativa da PC2 é referente ao genótipo IAC95 5000 controle e inoculado, enquanto na parte positiva da PC2 é referente ao genótipo SP89 1115 controle e inoculado. Ao plotar PC2XPC4 observa-se que além da discriminação das amostras através da PC2, a PC4 mostra a separação das amostras dependente do

tempo de coleta, com as amostras SC tendendo da parte positiva da PC2 para negativa da PC4, enquanto as amostras RC e RI da parte negativa da PC2 para negativa da PC4. As amostras SI não mostraram mesma tendência.

A discriminação dos genótipos, além da tendência de separação por idade, já fora observado no experimento de cultivo sem inoculação (item 4.3.1), reforçando, portanto, este tipo de discriminação entre as amostras controle.

Na PCA dos dados sem processamento e normalizado não foi possível observar diferença entre as amostras controle das inoculadas, indicando que este pré-processamento não é adequado.

Figura 68 - Gráfico de scores PC1XPC2 dos dados sem pré-processamento (A), scores PC1XPC2 dos dados sem pré-processamento (B), gráfico de *loadings* PC2XPC4 dos dados sem pré-processamento (C).

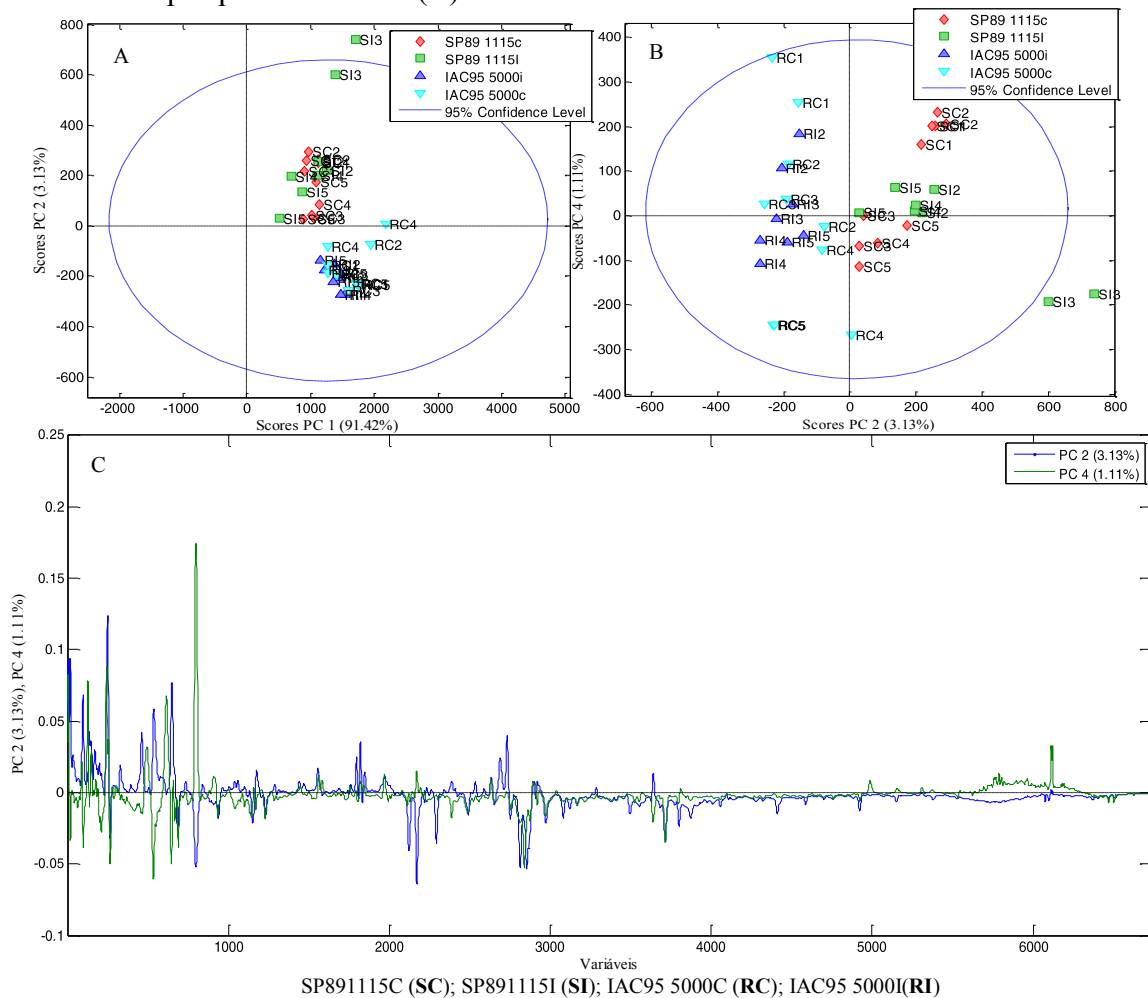
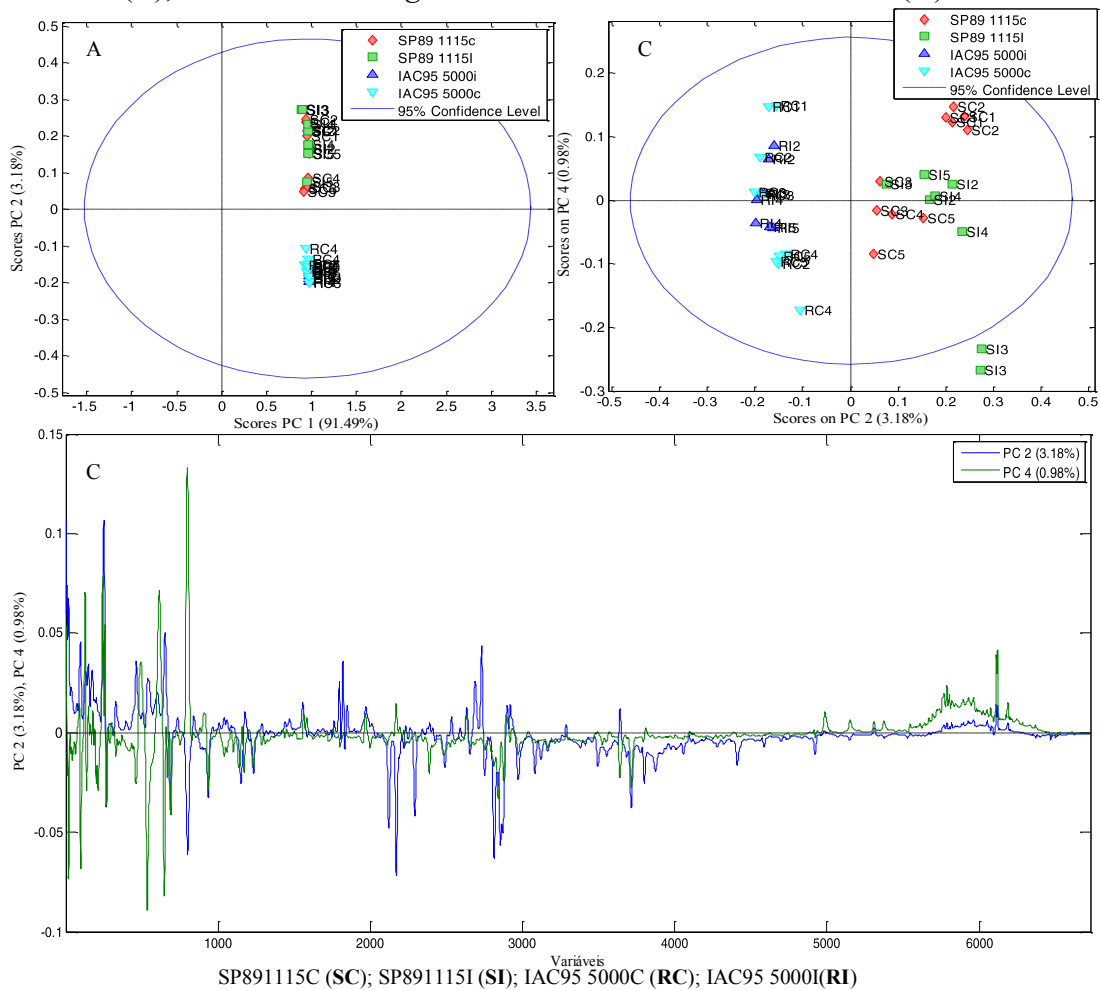


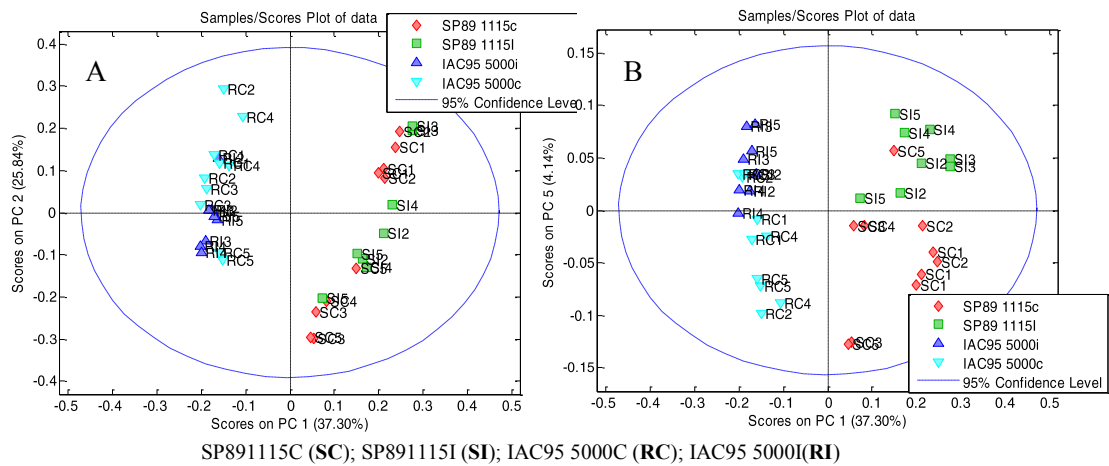
Figura 69 - Gráfico de scores PC1XPC2 dos dados normalizado (A), Gráfico de scores PC2XPC4 dos dados normalizado(B), Gráfico de *loadings* PC1XPC2 dos dados normalizados (C), Gráfico de *loadings* PC2XPC4 dos dados normalizados (D).



Diferentemente dos gráficos de scores PC1XPC2 dos dados sem pré-processamento e normalizados, PCA dos dados normalizados e centrados na média permitiu a discriminação entre os genótipos IAC95 5000 e SP89 1115 pela PC1 (Figura 70). A PC2 mostrou discriminação entre os genótipos em função do tempo de coleta, a partir de valores positivos da PC2. Essa diferença foi mais nítida para as amostra controle, sendo que as amostras inoculadas mostraram tendência em agrupar-se somente na parte negativa da PC2 e PC1.

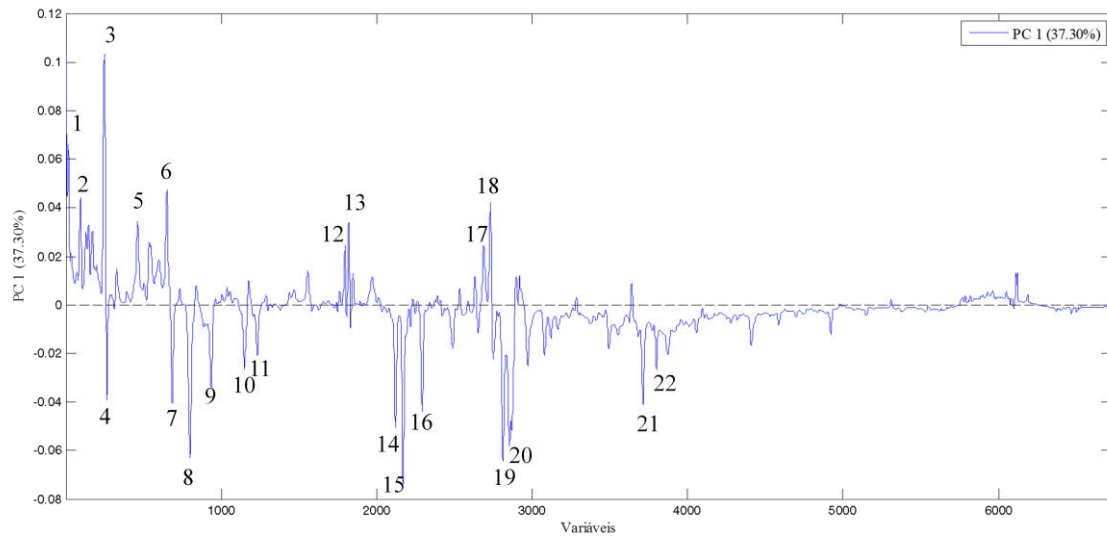
O gráfico de scores PC1XPC5 a PC5 mostrou a discriminação entre os genótipos inoculados e controle, com excessão da amostra SC5 para o genótipo SP89 1115 e RI3 para o genótipo IAC95 5000. As amostras controles foram agrupadas na parte negativa da PC5, enquanto as inoculadas foram agrupadas na parte positiva.

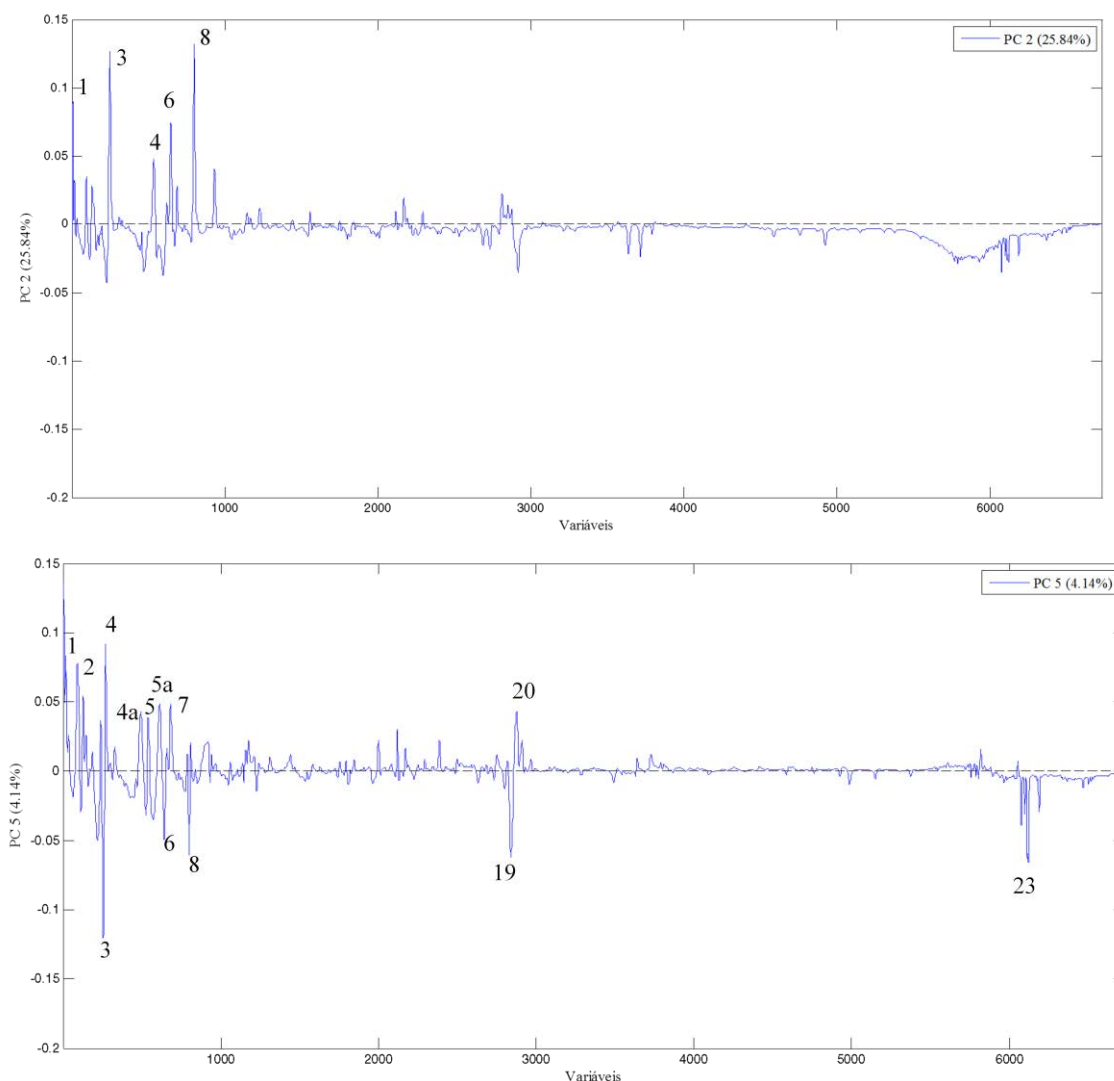
Figura 70 - Gráfico de scores dos dados normalizado e centrado na média. (A) PC1XPC2, (B) PC1XPC5.



Através do gráfico de *loadings* (Figura 71) foi possível detectar as principais variáveis responsáveis pela discriminação entre os grupos. As variáveis que apresentaram maior valor de *loadings* para PC1 e PC4 foram selecionadas para identificação.

Figura 71 - Gráfico de *loadings* da PC1 obtido a partir dos dados normalizados e centrado na média.





Para a identificação das variáveis seus valores foram transformados em tempos de retenção de acordo com a seguinte equação:

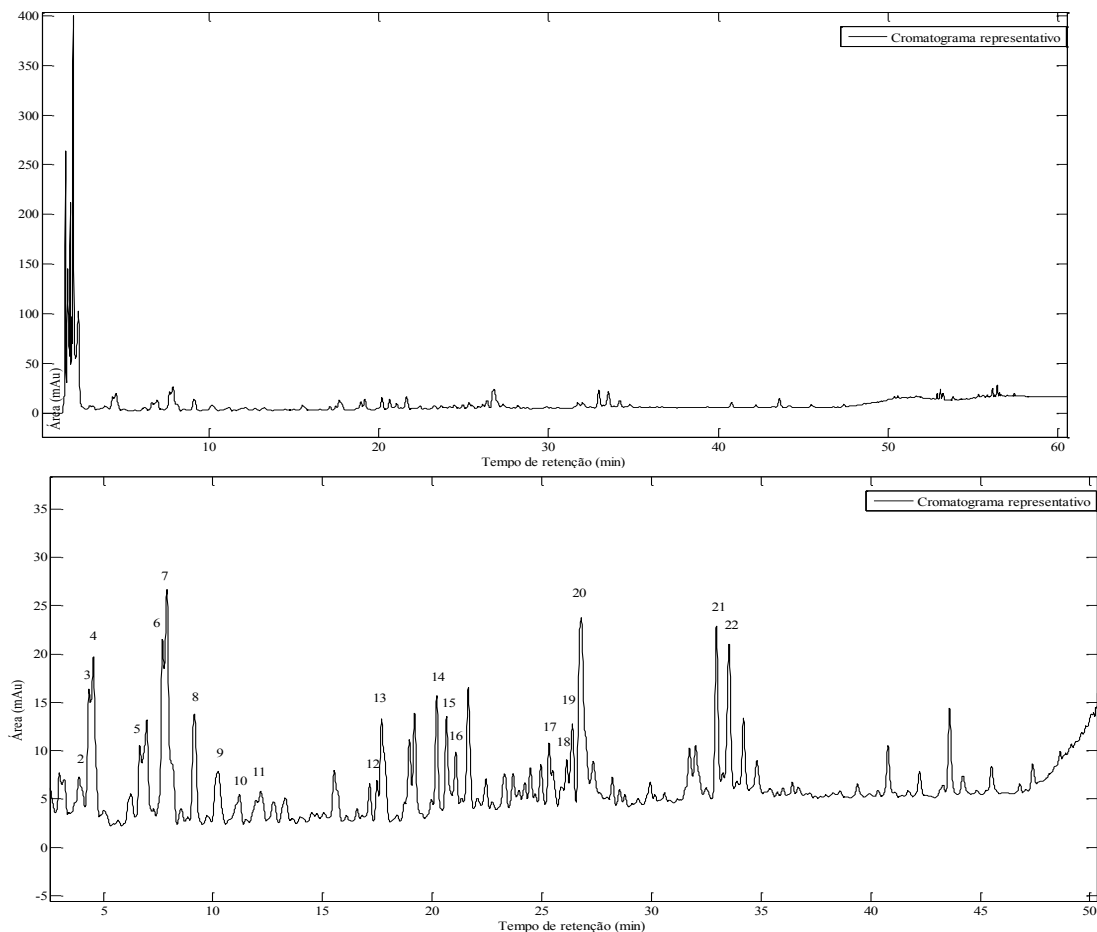
$$tr = (270 + \text{variável}) * \frac{trf}{tv}$$

Onde, trf corresponde ao tempo de retenção final ($trf=80$ minutos) e tv significa totais de variáveis, neste caso $tv=9602$.

Após as informações obtidas pelo modelo de PCA, a segunda etapa consistiu na interpretação das informações obtidas com base no conhecimento químico e papel biológico dos metabólitos identificados. A identificação dos metabólitos foi realizada a partir da comparação dos tempos de retenção e espectro no UV das variáveis selecionadas nestes experimentos com os respectivos dados das substâncias identificadas na análise qualitativa (item 3.3) e analisadas na mesma condição e equipamento do presente conjunto de dados. Esses dados foram comparados com o

cromatograma representativo de todas as amostras (Figura 72), que foi obtido através do mesmo “pool” de amostra descrito no ítem 3.2.1.

Figura 72 - Cromatograma representativo das amostras submetida à PCA. Na figura superior a análise de 0-60 minutos e na figura inferior a faixa de 3-50 minutos que representa as 6731 variáveis empregadas na análise por PCA. Para identificação dos metabólitos ver a Tabela 6.



A tabela 6 lista as variáveis selecionadas no gráfico de *loadings*, tempos de retenção e os respectivos metabólitos identificados.

Tabela 6 - Variáveis selecionadas através do gráfico de *loadings* PC1XPC2 e PC1XPC5, tempo de retenção e identificação dos metabólitos.

Variáveis	Tempo de retenção	Metabólitos
17(1)	2,3	ácido <i>trans</i> -aconítico
222(2)	4,03	ácido dihidroxibenzoico glicosídeo
250(3)	4,30	ácido <i>trans</i> -5-

		cafeoilquínico
256(4)	4,40	ácido <i>p</i> -cumaroil aldárico
494(4a)	6,20	-
542(5)	6,65	UV=328
613(5a)	7,24	<i>m/z</i> 379 Ácido <i>p</i> -cumaroil quínico *
653(6)	7,50	<i>m/z</i> 397, UV 324
689(7)	7,86	ácido <i>trans</i> -4-cafeoilquínico
799(8)	8,76	ácido <i>trans</i> -3-cafeoilquínico
938(9)	9,86	<i>m/z</i> 351
1148(10)	11,63	ácido cafeoilaldárico
1232(11)	12,32	<i>m/z</i> 413,1243; 367,1010 e 447,2408 *
1797(12)	16,90	luteolina 8- <i>C</i> -glicosil-6- <i>C</i> -arabinosídeo
1820(13)	17,15	ácido cafeoilaldárico
2121(14)	19,00	apigenina 6,8-di- <i>C</i> -glicosídeo, apigenina 6- <i>C</i> -arabinosil-8-glicosídeo, luteolina 6- <i>C</i> -glicosídeo
2179(15)	20,00	luteolina 8- <i>C</i> -glicosídeo
2291(16)	21,04	diosmetina 8- <i>C</i> -glicosídeo
2688(17)	24,20	apigenina 6- <i>C</i> -glicosídeo
2734(18)	24,60	apigenina 8- <i>C</i> -glicosídeo
2815(19)	25,27	tricina 7- <i>O</i> -glicosídeo
2842(20)	25,60	tricina 7- <i>O</i> -glicuronídeo-sulfato e + co-eluentes
3714(21)	32,66	tricina 7- <i>O</i> -raminosil-galacturonídeo
3802(22)	33,39	isômero tricina O-

neohesperosídeo

6120(23)

52,40

m/z 293

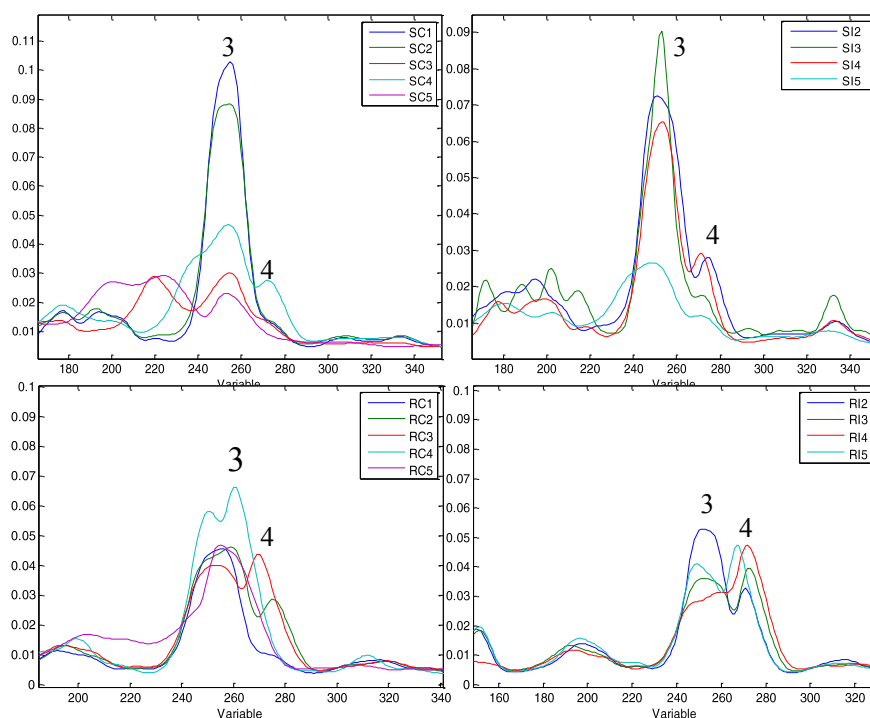
(-): não identificado.

Através desses resultados (Figura 71) podemos inferir que os principais metabólitos responsáveis pelo agrupamento do genótipo SP89 1115 foram: ácido *trans*-aconítico (1), ácido dihidroxibenzoico glicosídeo (2), ácido *trans*-5-cafeoilquínico (3), luteolina 8-*C*-glicosil-6-*C*-arabinosídeo (12), ácido cafeoilaldárico (13), apigenina 6-*C*-glicosídeo (17), apigenina 8-*C*-glicosídeo (18) e os metabólitos 5 e 6 não identificados, mas com espectro no UV sugestivos de derivados do ácido hidroxicinâmico. Para o agrupamento das amostras do genótipo IAC95 5000 foram importantes: ácido *p*-cumaroilaldárico (4), ácido *trans*-4-cafeoilquínico (7), ácido *trans*-3-cafeoilquínico (8), metabólito 14 (apigenina 6,8-di-*C*-glicosídeo, apigenina 6-*C*-arabinosil-8-glicosídeo e luteolina 6-*C*-glicosídeo), luteolina 8-*C*-glicosídeo (15), diosmetina 8-*C*-glicosídeo (16), tricina-7-*O*-glicuronídeo-sulfato (20), tricina 7-*O*-raminosil-galacturonídeo (21) e isômero tricina *O*-neohesperosídeo (22), além dos metabólitos 9, 11 e 19 não identificados.

Através do gráfico de *loadings* da PC5 (Figura 67) foi possível identificar que os genótipos inoculados apresentaram maior correlação com os metabólitos 4 e 20, enquanto as amostras controle apresentaram maior correlação com 3, 6, 8, 19 e 23.

Maior informação sobre o comportamento dos metabólitos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 14, 15, 16, 19 e 20, que apresentaram maior peso no gráfico de *loadings*, foi obtida ao comparar a intensidade dos respectivos picos cromatográficos (Figuras 73, 74 e 75).

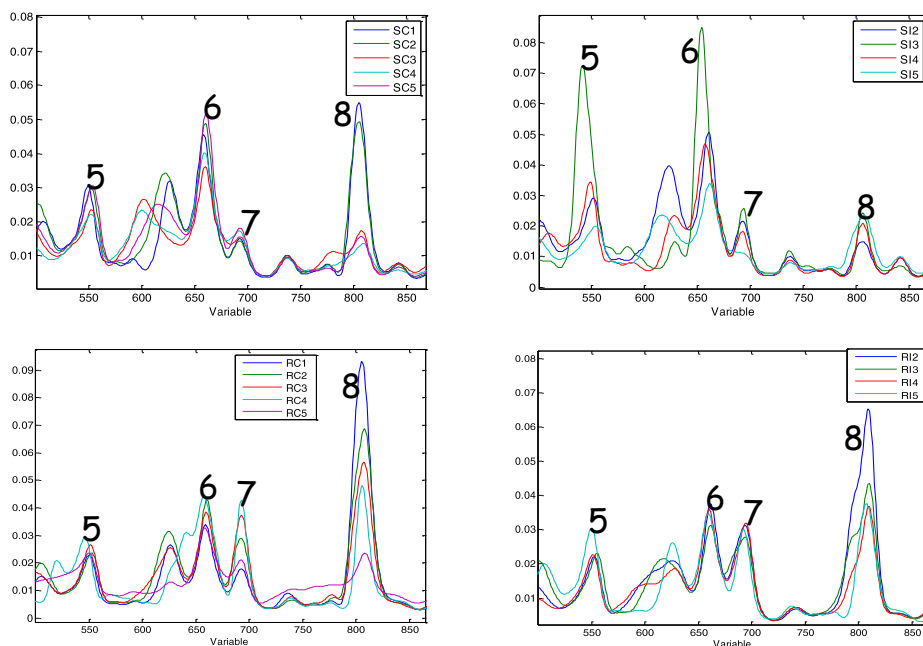
Figura 73 – Expansão dos cromatogramas obtidos para as amostras SP89 1115 (figura superior) e IAC95 5000 (figura inferior) destacando as regiões referentes aos picos 3 e 4.



Através dos cromatogramas acima, pode se observar a oscilação dos ácidos *trans* 5-cafeoilquínico (3) e ácido *p*-cumaroil aldárico (4), principalmente durante o período de incubação e latência nas amostras SI. Outro aspecto importante, é que a quantidade relativa de ácido *p*-cumaroil aldárico é maior em RI e aumenta com a idade de desenvolvimento da planta.

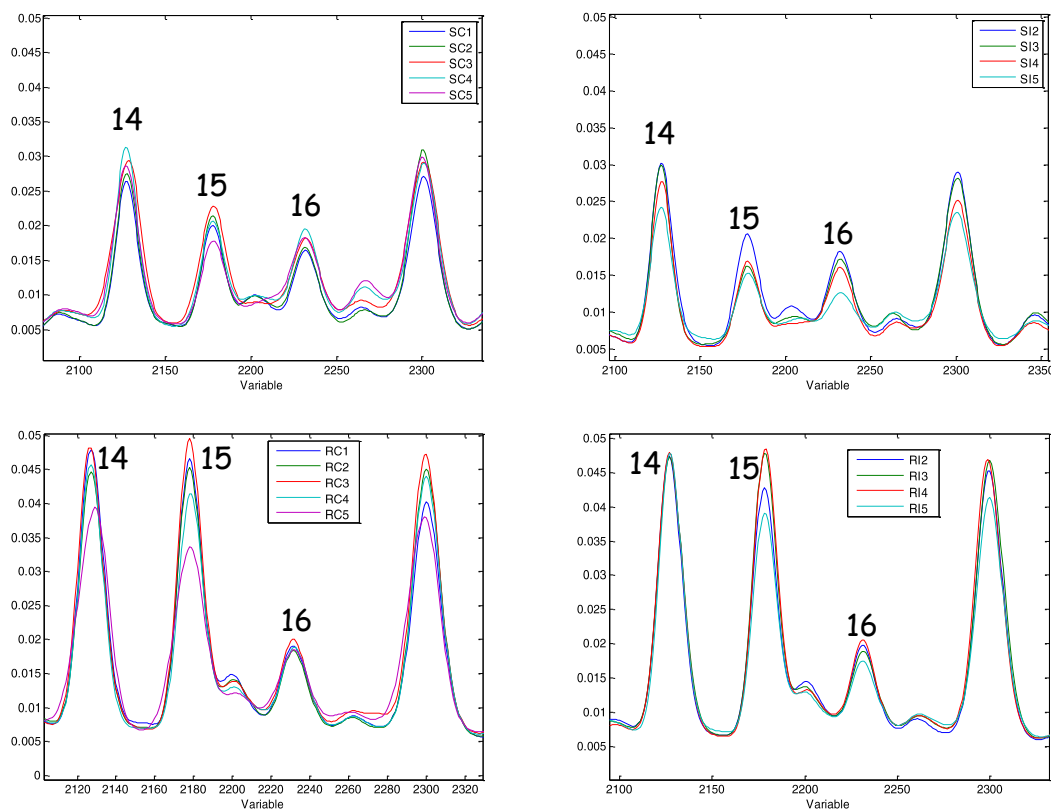
Em relação aos metabólitos 5 e 6 (Figura 74), pode observar-se o aumento significativo no nível destes nas amostras SI com 5 dias de inoculação, assim como o decréscimo com 15 dias. O ácido *trans* 4-cafeoilquínico (7) mostrou decréscimo significativo na amostra SI5 durante o período de severidade da doença, enquanto o mesmo não foi observado para o controle suscetível. O ácido *trans* 3-cafeoilquínico (8) ocorre em maior quantidade relativa nas amostras resistentes do que nas suscetíveis, assim como diminui rapidamente com o desenvolvimento da planta, principalmente nos genótipos SP89 1115.

Figura 74 - Expansão dos cromatogramas obtidos para as amostras SP89 1115 (figura superior) e IAC95 5000 (figura inferior) destacando as regiões referentes aos picos 5,6,7 e 8.



A figura 75 mostra o perfil dos metabólitos 14, 15 e 16 nas amostras suscetível e controle. Como podemos observar, as amostras resistente apresentaram maior intensidade relativa dos flavonoides, principalmente luteolina-8-*C*-glicosídeo (15), enquanto o genótipo suscetível maior quantidade relativa do pico 14 referente aos flavonóides apigenina 6,8-di-*C*-glicosídeo, apigenina 6-*C*-arabinosil-8-glicosídeo e luteolina 6-*C*-glicosídeo.

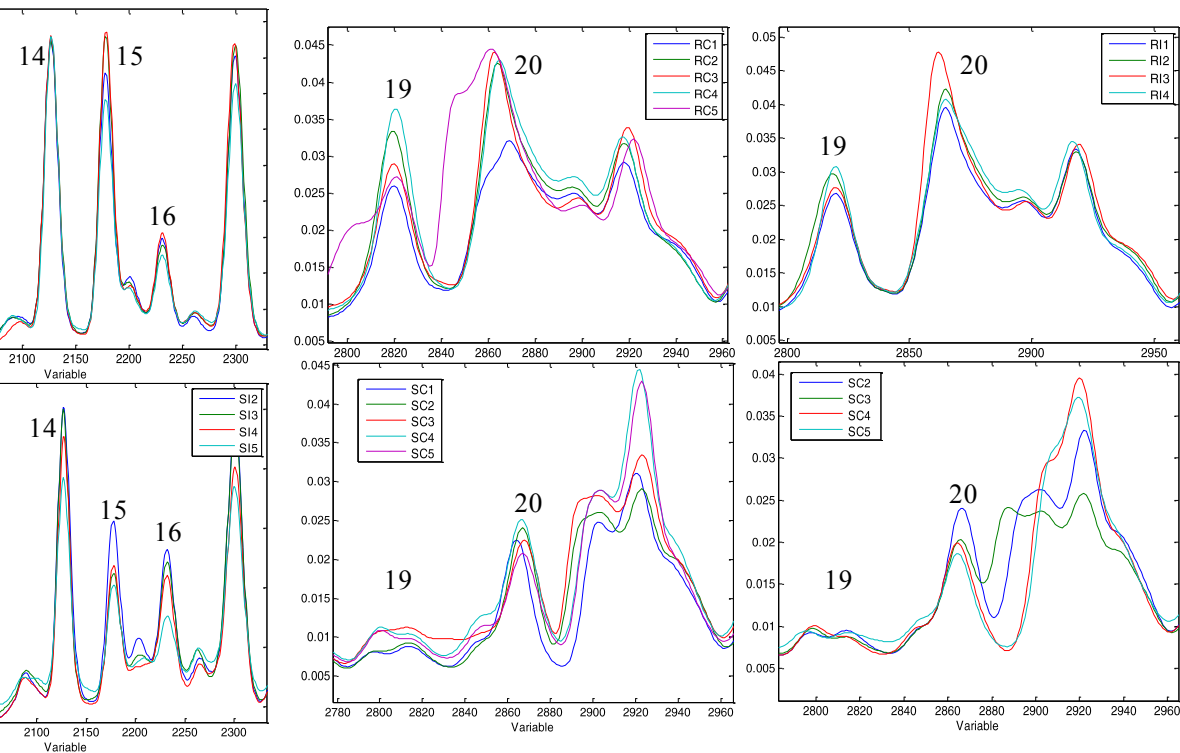
Figura 75 - Expansão dos cromatogramas obtidos para as amostras SP89 1115 (figura inferior) e IAC95 5000 (figura superior) destacando as regiões referentes aos picos 14, 15, 16 e 17.



Maior teor de luteolina-8-*C*-glicosídeo no genótipo resistente já fora observado nas amostras cultivadas sob condição controlada do ítem 4.2.1, assim como a tendência no decréscimo da quantidade de luteolina-8-*C*-glicosídeo com o desenvolvimento dos genótipos foi a responsável pela principal discriminação entre os genótipos.

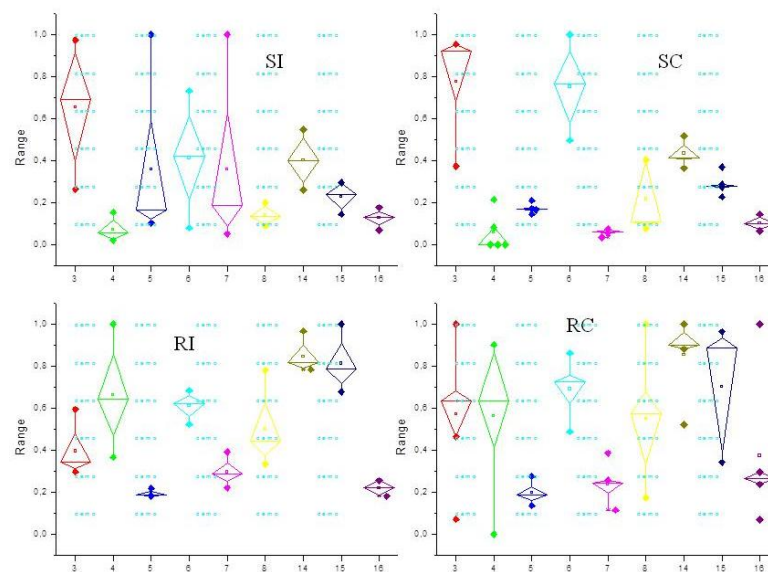
Em relação aos metabólitos 19 e 20 (Figura 76), luteolina 6-*C*-glicosil-raminosídeo (19) praticamente não foi detectado no genótipo SP89 1115 e o 20 (tricina 7-*O*-glicuronídeo-sulfato + co-eluentes) mostrou maior teor nas amostras resistente do que na suscetível.

Figura 76 - Expansão dos cromatogramas obtidos para as amostras SP89 1115 (figura inferior) e IAC95 5000 (figura superior) destacando as regiões referentes aos picos 19 e 20.



A partir da área normalizada dos picos 3-16 nas amostras controle e inoculada dos genótipos resistentes e suscetíveis foi construído o gráfico de caixas (Figura 77).

Figura 77 - Gráfico de caixas referente aos metabólitos 3-16 para as amostras IAC95 5000 controle e inoculadas (RC e RI) e SP89 1115 controle e inoculada (SC e SI).



O gráfico de caixas corrobora com a discussão acima, onde podemos observar que as amostras suscetíveis apresentam maior tendência no aumento da quantidade relativa de ácido *trans*-5-cafeoilquínico (3), enquanto as amostras resistentes possuem maior quantidade de ácido *trans*-3-cafeoilquínico (8), além do que o ácido *trans*-4-cafeoilquínico possui a tendência em diminuir na amostra suscetível inoculada. Outro aspecto importante, é que ocorre “pool” do metabólito 5 nas amostras suscetível inoculada, conforme já observado no perfil cromatográfico. Além disso, podemos observar que os metabólitos 14, 15 e 16 estão presentes em maior quantidade nas amostras resistentes, enquanto nas amostras suscetível estes estão em menor quantidade, assim como a tendência de luteolina-8-*C*-glicosídeo (15) diminuir nas amostras RC e ser pouco alterado nas amostras RI.

Isômeros do ácido cafeoilquínico são denominados de ácidos clorogênicos. O ácido clorogênico tem sido apontado como um composto importante na resistência pré-formada de plantas a fitopatógenos. O ácido *trans* 3-cafeoilquínico pode ser oxidado por enzimas do tipo polifenoloxidase, usando O₂ como aceptor de elétrons, dando origem a quinonas altamente tóxicas aos microorganismos. As quinonas atuam em processos enzimáticos vitais de fungos e bactérias, inibindo, por exemplo, a ação de fosforilases, desidrogenases, carboxilases e coenzimas. Além disso, o ácido clorogênico pode também funcionar nas plantas como um intermediário metabólico na formação de compostos fenólicos insolúveis (lignina e polímeros) associados com a resistência também. O conteúdo de ácido clorogênico nas raízes de plantas de batata está diretamente relacionado com a resistência à murcha de *Verticillium* (PASCHOLATI et al, 2011).

As flavonas estão associadas à resistência natural de algumas culturas agrícolas, como em *Zea mays* (milho) frente a *Helicoverpa zea*. Em *Cucumis sativus* (pepino) a resistência induzida frente a *Podosphaera xanthii* deve-se ao aumento na quantidade de apigenina 6-*C*-glicosídeo e apigenina 8-*C*-glicosídeo (MCNAIL et al, 2003) e luteolina em *Sorghum* (AHUJA; KISSEN; BONES; 2012). *Oryza sativa* mostrou resistência contra *Nilaparvata lugens* devido ao aumento na taxa de mortalidade de ninfa com o acréscimo da concentração de tricinas (BING et al, 2007).

A presença de substituinte *O*-dihidroxi no anel B das *C*-glicosilflavonas (maisina) mostrou-se importante para atividade antibiose em *Zea mays* frente a *Helicoverpa zea*, enquanto a natureza do açúcar não mostrou-se importante (MCNAIL et al, 2003).

Diante dos resultados acima, podemos inferir que os fatores químicos de resistência do genótipo IAC95 5000 são pré-formados, devido a maior abundância de flavonas com substituinte *O*-dihidroxi no anel B, melhor representado por luteolina-8-*C*-glicosídeo e luteolina-6-*C*-glicosídeo-raminosídeo, além de tricinas *O*-glicosiladas e principalmente o ácido *trans*-3-cafeoilquinico e ácido *p*-cumaroilaldárico. Além do que, o nível destes metabólitos praticamente não é alterado quando inoculados, mas varia de forma muito sutil com o desenvolvimento dos genótipos. Já nas amostras SP89 1115 os níveis dos metabólitos diminuem mais rapidamente com o desenvolvimento do genótipo, principalmente o ácido *trans*-3-cafeoilquinico.

4.3.4 PLS-DA para previsão de amostras desconhecidas

Através dos resultados de classificação obtidos por PCA na figura 67, e considerando que o genótipo IAC95 5000 quando inoculado não apresentou sinais da ferrugem alaranjada, enquanto o genótipo SP89 1115 permaneceu “sadio” após a inoculação, resolveu-se testar o método supervisionado PLS-DA para a previsão de amostras desconhecida. As amostras utilizadas para construção do modelo foi as mesmas empregadas para o modelo de PCA da figura 67, enquanto para validação foi empregado cultivares comercial CTC e SP sadios e resistente a ferrugem alaranjada coletado na região de Araraquara, São Paulo.

O modelo PLS-DA com quatro variáveis latentes, e como pré-processamento a normalização e centragem na média. A classe 1 representa as amostras SP891115 controle, a classe 2 as amostras SP89 1115 inoculada, a classe 3 IAC95 5000 inoculada e a classe 4 IAC95 5000 controle. Os resultados obtidos para as quatro classes estão representados nas figuras 78-81.

Figura 78 - Classificação das amostras IAC95 5000 controle e da amostra de validação (●).

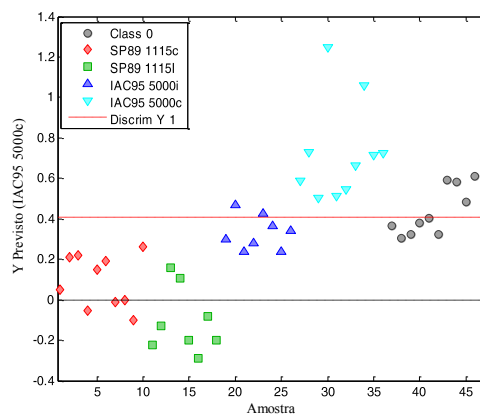


Figura 79 - Classificação das amostras IAC95 5000 inoculadas e da amostra de validação (●).

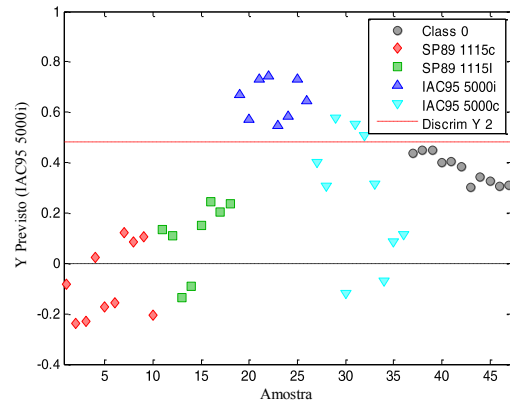


Figura 80 - Classificação das amostras SP89 1115 inoculada e da amostra de validação (●).

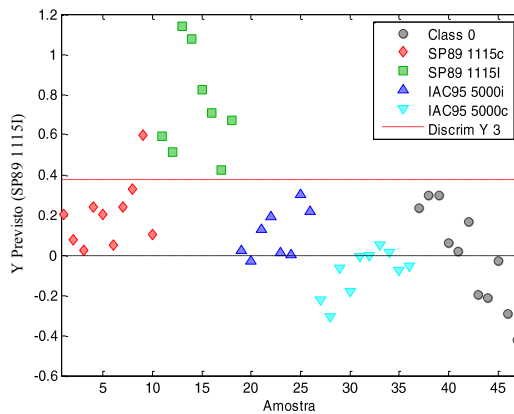
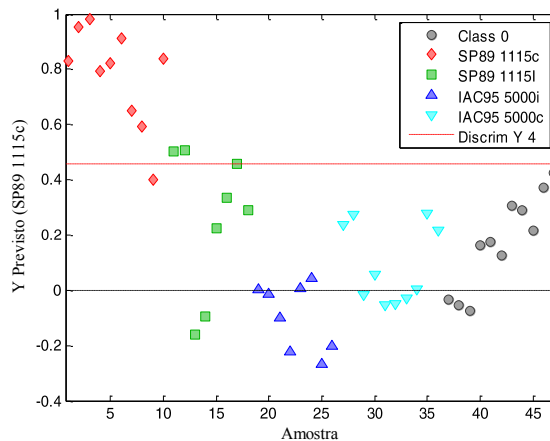


Figura 81 - Classificação das amostras SP89 1115 controle e da amostra de validação (●).



Os gráficos apresentados nas figuras 78-81 indicam as amostras pertencentes a cada uma das classes classificadas pelo PLS-DA. As amostras são classificadas como pertencente a uma determinada classe se estão acima da linha limite, representada pela linha tracejada após a linha zero. Na classe IAC95 5000c todas as amostras foram classificadas corretamente. Na classe IAC95 5000i todas as amostras foram

classificadas de forma correta, excepto três pertencentes a primeira classe. Uma amostra de calibração SP89 1115i foi classificada como pertencente a classe SP89 1115c e duas amostras SP89 1115i foram classificadas em SP89 1115c.

O erro de classificação do modelo foi baixo, com erro da validação cruzada de 0,9%, 0,19%, 0,09% e 0,11% para as classes IAC95 5000c, IAC95 5000i, SP89 1115c e SP89 1115i, respectivamente.

Como podemos observar, o modelo classificou corretamente as amostras no grupo dos genótipos IAC95 5000, como pertencente à classe das resistentes. Portanto, o modelo mostrou-se útil para previsão de amostras desconhecidas, ou mesmo, na análise de genótipos em fase de melhoramento genético.

5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos nas análises empregando LC-DAD-MS e ^1H NMR permitiu a identificação de 52 metabólitos, além de 92 íons detectados que até o presente não foram identificados. Dos 52 metabólitos identificados: 1-12 pertencem ao metabolismo primário, e são comumente encontrados em plantas; 13-28 foram ácidos benzoicos e fenólicos, todos descritos pela primeira vez em cana-de-açúcar com excessão do ácido *trans* 3-cafeoilquínico. Entre os ácidos fenólicos o ácido *p*-cumaroilaldárico tem sido descrito pela primeira vez em cana-de-açúcar e na família Poaceae, além do que o ácido aldárico di-substituído com o grupo *p*-cumaroil e siringil inédito. Dos 24 flavonóides, somente 7 já foram relatados em cana-de-açúcar, além do que, os flavonóides tricina-7-*O*-acetil-glicosídeo (51) e tricina-7-*O*-glicuronídeo-sulfato (52) são considerados inédito também.

Apesar da necessidade de análises por ^{13}C NMR e 2D NMR mais refinada para a caracterização absoluta dos derivados do ácido aldárico e os flavonóides tricina-7-*O*-acetil-glicosídeo (51) e tricina-7-*O*-glicuronídeo-sulfato, as técnicas de alto desempenho empregadas permitiram pelo menos a possibilidade de sugerir e atribuir alguns sinais com propriedade para a identificação de novas substâncias.

Diante da grande variabilidade de compostos identificados, a cana-de-açúcar, cultivada e estudada durante séculos, mostra-se um organismo promissor como fonte de substâncias com propriedades antioxidantes e outras atividades biológicas importantes já relatadas para os ácidos fenólicos e flavonóides. Além do entendimento da função e papel dessas substâncias frente a fatores de estresse biótico e abiótico e importância da quimiotaxinomia nos programas de melhoramento genético para a seleção de parental. Outro fator importante, é que devido, a grande quantidade de compostos fenólicos e o não aproveitamento destes pelas usinas de açúcar e álcool, a cana-de-açúcar mostra-se também um planta promissora para uso em biorefinarias.

No que se refere aos resultados obtidos no item 4 através das análises de *fingerprinting* metabólico empregando LC-DAD e análise multivariada foi possível observar que os ácidos clorogênicos, ácido *p*-cumaroil-aldárico e os flavonóides derivados de tricina e luteolina são os principais metabólitos presentes no genótipo IAC95 5000 resistente a ferrugem alaranjada. Portanto, esses resultados são forte indicativo de que esses metabólitos podem ser considerados antecipinas, pelo fato de já estarem presente em quantidade suficiente para inibir a infecção pelo patógeno. Esses resultados corroboram com relatos na literatura de que extratos aquosos das folhas de

cana-de-açúcar de variedade resistente levou a menor germinação dos uredinósporos de *P. kuehni*.

Entre as substâncias identificadas, os ácidos gentísico glicosídeo, podem ser fortes candidatos como moléculas sinalizadoras, apesar dessa resposta não ser evidente nas análises por PCA. Esse tipo de constatação também permitiu refletir, que ao coletar a folha inteira, poderíamos estar diluindo a resposta sistêmica, muitas vezes, a qual poderia ser obtida através de uma análise mais cautelosa da coleta do tecido vegetal na camada de abscisão, onde ocorre a separação de parte do tecido vegetal sadio do tecido doente. Outros metabólitos não monitorados, tais como, os primários, também poderiam permitir a discriminação entre as amostras controle e inoculadas. Assim como substâncias presente na cera das folhas, trabalho o qual vem sendo desenvolvido por outro aluno de doutorado através das análises de lipofílicos empregando cromatografia gasosa.

Portanto, o presente trabalho, permitiu o estudo exploratório e desafiador de *fingerprinting* metabólico de genótipos de cana-de-açúcar infectado com fungo biotrófico, tendo em vista que, este é o primeiro relato do uso da abordagem metabolômica no estudo de interações da cana-de-açúcar frente à ferrugem. Através deste trabalho foi possível identificar substâncias provavelmente relacionadas à resistência pré-formada de genótipos resistentes frente a *P. kuehni*. Que os resultados aqui destacadas possa ser futuramente correlacionado com dados de transcriptoma/proteoma durante a etapa de desenvolvimento de novos genótipos de cana-de-açúcar nos programas de melhoramento genético.

REFERÊNCIAS

- AHUJA, I.; KISSEN, R.; BONES, A. M. Phytoalexins in defense against pathogens. **Trends in Plant Science**, v. 17, p. 73-80, 2012.
- AKUZAWA, K.; YAMADA, R.; LI, Z.; LI, Y.; SADANARI, H.; MATSUBARA, K.; WATANABE, K.; KOKETSU, M.; TUCHIDA, Y.; MURAYAMA, T. Inhibitory effects of tricin derivative from *Sasa albo-marginata* on replication of human cytomegalovirus. **Antiviral Research**, v. 91, p. 296-303, 2011.
- AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; SANGUINO, A.; CARDOSO, C. O. N.; MORAES, V. A.; FERNANDES, C. R. Metodologia de avaliação de ferrugem da cana-de-açúcar (*Puccinia melanocephala*). **Boletim Técnico Copersucar**, v. 39, p. 13-16, 1987.
- ARAÚJO, K. L.; CANTERI, M. G.; GILIO, T. A. S.; NEUBAUER, R. A.; SANCHES, P. B.; SUMIDA, C. H.; GIGLIOTI, E. D. Resistência genotípica e monitoramento da favorabilidade para ocorrência da ferrugem alaranjada da cana-de-açúcar. **Summa Phytopathologica**, v. 39, p. 271-274, 2013.
- BECKLES, D. M.; ROESSNER, U. Plant metabolomics: applications and opportunities for agricultural biotechnology. In: ALTMAN, A.; HASEGAWA, P. (Ed.). **Plant biotechnology and agriculture: prospects for the 21st century**. Oxford: Elsevier, 2012. p. 67-81.
- BING, L.; HONGXIA, D.; MAOXIN, Z.; DI, X.; JINGSHU, W. Potential resistance of tricin in rice against brown planthopper *Nilaparvata lugens* (Stal). **Acta Ecologica Sinica**, v. 27, p. 1300-1307, 2007.
- BINKLEY, W. W.; WOLFROM, M. L. Composition of cane juice and cane final molasses. **Advances Carbohydrate Chemical**, v. 8, p. 291-300, 1953.
- BOWNE, J.; BACIC, A.; TESTER, M.; ROESSNER, U. Abiotic stress and metabolomics. In: HALL, R. (Ed.). **Biology of plant metabolomics**. West Sussex: Wiley-Blackwell, 2011. Cap. 3, p. 61-85.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Conselho Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira, 2013**. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_08_08_09_39_29_boletim_cana_portugues_-_abril_2013_1o_lev.pdf>. Acesso em: 16 mar. 2013.
- BRINKER, A. M.; SEIGLER, D. S. Isolation and identification of piceatannol as a phytoalexin from sugarcane. **Phytochemistry**, v. 30, p. 3229-3232, 1991.
- BRYCE, T. A.; MARTIN-SMITH, M.; OSSKE, G.; SCHREIBER, K.; SUBRAMANIAN, G. Isolation of arundoin and sawamilletin from Cuban sugar cane wax. **Phytochemistry**, v. 23, p. 1283-1296, 1967.

BURR, G. O.; HARTT, C. E.; BRODIE, H. W.; TANIMOTO, T.; KORTSHAK, H. P.; TAKAHASHI, D.; ASHTON, F. M.; COLEMAN, R. E. The sugar cane plant. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 8, p. 275-308, 1957.

CAMPOS, L.; GRANELL, P.; TÁRRAGA, S.; LÓPEZ-GRESA, P.; CONEJERO, V.; BELLÉS, J. M.; RODRIGO, I.; LISÓN, P. Salicylic acid and gentisic acid induce RNA silencing-related genes and plant resistance to RNA pathogens. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 77, p. 35-43, 2014.

CAVALHEIRO, A. J.; COUTINHO, I. D.; LEME, G. M.; SILVA, A. A.; SILVA, A. P. D. Metabolômica de cana-de-açúcar e sua relação com a produção de biomassa vegetal para bioenergia. In: STRADIOTTO, N. R.; LEMOS, E. G. (Ed.). **Bioenergia: pesquisa, desenvolvimento e inovação – Parte I: biomassa para bioenergia**. São Paulo: Cultura Acadêmica, 2012. Cap. 1, p. 13-34.

CHAPOLA, R. G. **Reação de variedades de cana-de-açúcar à ferrugem alaranjada (*Puccinia kuehni*)**. 2013. 77 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

CHEAVEGATTI-GIANOTTO, A. Sugarcane (*Saccharum X officinarum*): a reference study for the regulation of genetically modified cultivars in Brazil. **Tropical Plant Biology**, v. 4, p. 62-89, 2011

COLOMBO, R.; YARIWAKE, J. H.; McCULLAGHB, M. Study of C- and O-glycosylflavones in sugarcane extracts using liquid chromatography-exact mass measurement mass spectrometry. **Journal Brazilian Chemical Society**, v.19, p. 483-490, 2008.

COLOMBO, R.; YARIWAKE, J. H.; QUEIROZ, E. F.; NDJOKO, K.; HOSTETTMANN, K. On-line identification of further flavone C- and O-glycosides from sugarcane (*Saccharum officinarum* L., Gramineae) by CLAE-UV-MS. **Phytochemical Analysis**, v. 17, p. 337-343, 2006.

COLOMBO, R.; YARIWAKE, J. H.; QUEIROZ, E. F.; NDJOKO, K.; HOSTETTMANN. On-line identification of minor flavones from sugarcane juice by LC/UV/MS and post-column derivatization. **Journal Brazilian Chemical Society**, v. 20, p. 1574-1579, 2009.

COLOMBO, R.; YARIWAKE, J. H.; QUEIROZ, E. F.; NDJOKO, K.; HOSTETTMANN, K. On-line identification of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). **Journal of Chromatography A**, v. 1082, p. 51-59, 2005.

DAL’MOLIN, C. G. O.; QUEK, L-E.; PALFREYMAN, S. M. B.; NIELSEN, L. K. C4GEM, a genome-scale metabolic model to study C4 plant metabolism. **Plant Physiology**, v. 154, p. 1871-1885, 2010.

DEVOS, K. M. Grass genome organization and evolution. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 13, p. 139-145, 2010.

- DIXON, R. A.; GANG, D. R. ; CHARLTON, A. J.; FIEHN, O.; KUIPER, H. A.; REYNOLDS, T. L.; TJEERDEMA, R. S.; JEFFERY, E. H.; GERMAN, B.; RIDLEY, W. P.; SEIBER, J. N. Application of metabolomics in agriculture. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 8984-8994, 2006
- DEWICK, P. M. **Medicinal natural products**: a biosynthetic approach. 2nd ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2005. 300 p.
- DOMON, B.; COSTELLO, C. A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates. **Glycoconjugate Journal**, v. 5, p. 397-409, 1988.
- DUARTE-ALMEIDA, J. M.; NEGRI, G.; SALATINO, A.; CARVALHO, J. E.; LAJOLO, F. M. Antiproliferative and antioxidant activities of a tricin acylated glycoside from sugarcane (*Saccharum officinarum*) juice. **Phytochemistry**, v. 68, p. 1165-1171, 2007.
- DUARTE-ALMEIDA, J. M.; NOVOA, A. V.; LINARES, A. F.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Antioxidant activity of phenolic compounds from sugar cane (*Saccharum officinarum* L.) juice. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 61, p. 187-192, 2006.
- DUENÑAS, M.; FERNÁNDEZ, D.; HERNÁNDEZ, T.; ESTRELLA, I.; MUÑOZ, R. Bioactive phenolic compounds of cowpeas (*Vigna sinensis* L.) modifications by fermentation with natural microflora and with *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917. **Journal of Science of Food and Agriculture**, v. 85, p. 297-304, 2005.
- FERNIE, A. R.; SCHAUER, N. Metabolomics-assisted breeding: a viable option for crop improvement? **Trends in Genetics**, v. 25, p. 39-48, 2008.
- FERREIRA, M. M. C. **Análise multivariada de dados químicos**: quimiometria. Campinas: Ed. UNICAMP, 2005. 180 p.
- FERREIRA, M. M. C.; ANTUNES, A. M.; MELGO, M. S.; VOLPE, P. L. O. Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. **Química Nova**, v. 22, p. 724-731, 1999.
- FERRER, J. L.; JEZ, J. M.; BOWMAN, M. E.; DIXON, R. A.; NOEL, J. P. Structure of chalcone synthase and the molecular basis of plant polyketide biosynthesis. **Nature Structural Biology**, v. 6, p. 775-784, 1999.
- FIGUEIREDO, P. Um pouco de história. In: DINARDO-MIRANDA, L. L.; VASCONCELOS, A. M.; LANDELL, M. G. A. (Ed.). **Cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Agrônômico. 2008. p. 35.
- FRANÇA, S. C.; ROBERTO, P. G.; MARINS, M. A.; PUGA, R. D.; RODRIGUES, A.; PEREIRA, J. O. Biosynthesis of secondary metabolites in sugarcane. **Genetics and Molecular Biology**, v. 24, p. 243-250, 2001.

FUNARI, C.; CARNEIRO, R.; ANDRADE, A.; HILDER, E.; CAVALHEIRO, A. J. Green chromatographic fingerprinting: a friendly approach for the development of separation methods for fingerprinting complex matrices. **Journal of Separation Science**, v. 37, p. 37-44, 2014.

GEORGES, P.; SYLVESTRE, M.; RUEGGER, H.; BOURGEOIS, P. Ketosteroids and hydroxyketosteroids, minor metabolites of sugarcane wax. **Steroids**, v. 71, p. 647-652, 2006.

GÓMEZ, S. G. P. **Quantificação de parâmetros monocíclicos da ferrugem alaranjada**. 2013. 53 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade São Paulo, Piracicaba, 2013.

GRIVET, L.; ARRUDA, P. Sugarcane genomics: depicting the complex genome of an important tropical crop. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 5, p. 122-127, 2002.

HARBONE, J. B.; HALL, E. Plant polyphenols II: the occurrence of triclin and of glycoflavones in grasses. **Phytochemistry**, v. 3, p. 421-428, 1964.

HARBONE, J. B.; MABRY, T. J. **The flavonoids**. New York: Academic Press, 1975. 500 p.

IBÁÑEZ, C.; GARCÍA-CAÑAS, V.; VALDÉS, A.; SIMÓ, C. Novel MS-based approaches and applications in food metabolomics. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 52, p. 100-111, 2013.

JI, Y-B.; XU, Q-S.; HU, Y-Z.; HEYDEN, Y. V. Development, optimization and validation of a fingerprint of Ginkgo biloba extracts by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1066, p. 97-104, 2005.

KEBARLE, P.; VERKERK, U. H. On the mechanism of electrospray ionization mass spectrometry (ESIMS). In: COLE, R. B. (Ed.). **Electrospray and MALDI mass spectrometry**. Hoboken: John Wiley & Sons, 2010. Cap. 1, p. 8.

KLOSOWSKI, A. C. **Escala diagramática, segregação da resistência em progênies de cana-de-açúcar e reação de cultivares à ferrugem alaranjada**. 2012. 72 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

KLOSOWSKI, A. C.; BESPALHOK FILHO, J. C.; RUARO, L.; MAY DE MIO, L. L. Inheritance of resistance to orange rust (*Puccinia kuehnii*) in sugarcane families from crosses between parents with different orange rust reactions. **Sugar Technology**, v. 15, p. 379-383, 2013.

KRISHNAN, P.; KRUGER, N. J.; RATCLIFFE, R. G. Metabolite fingerprinting and profiling in plants using NMR. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, p. 255-265, 2005.

LEE, H-I.; LEON, J.; RASKIN, I. Biosynthesis and metabolism of salicylic acid. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 92, p. 4076-4079, 1995.

- LEME, G. M. **Desenvolvimento de método analítico para estudo metabolômico de cana-de-açúcar**. 2011. 123 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2011.
- LI, X.; YAO, S.; TU, B.; LI, X.; JIA, C.; SONG, H. Determination and comparison of flavonoids and anthocyanins in chinese sugarcane tips, stems, roots and leaves. **Journal of Separation Science**, v. 33, p. 1216-1223, 2010.
- LOBO, A. M.; LOURENÇO, A. M. **Biossíntese de produtos naturais**. Lisboa: IST Press, 2007. 276 p.
- LOURENÇO, R. V. **A utilização da química computacional em processos químicos relacionados à ionização por *electrospray***. 2009. 272 f. Tese (Doutorado em Química) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.
- MARTENS, S.; PREUß, A.; MATERN, U. Multifunctional flavonoid dioxygenases: flavonol and anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* L. **Phytochemistry**, v. 71, p. 1040-1049, 2010.
- MASSART, D. L. **Chemometrics: a textbook**. Amsterdam: Elsevier, 1990. 500 p.
- McNALLY, D. J.; WURMS, K. V.; LABBE, C.; BELANGER, R. R. Synthesis of C-glycosyl flavonoids phytoalexins as a site-specific response to fungal penetration in cucumber. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 63, p. 293-303, 2003.
- MOHEB, A.; AGHARBAOUIC, Z.; KANAPATHY, F.; IBRAHIM, R.; ROY, R.; SARHAN, F. Tricin biosynthesis during growth of wheat under different abiotic stresses. **Plant Science**, v. 201/202, p. 115-120, 2013.
- MORRISON, R.; BOYD, R. **Química orgânica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1996. 1200 p.
- MULAGABAL, V.; LANG, G. A.; DeWITT, D. L.; DALAVOY, S. S.; NAIR, M. G. Anthocyanin content, lipid peroxidation and cyclooxygenase enzyme inhibitory activities of sweet and sour cherries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 1239-1246, 2009.
- NICHOLSON, J. K.; BUCKINGHAM, M. J.; SADLER, P. J. High resolution ¹H NMR studies of vertebrate blood and plasma. **The Biochemical Journal**, v. 211, p. 605-615, 1983.
- NIGGEWEG, R.; MICHAEL, A. J.; MARTIN, C. Engineering plants with increased levels of the antioxidant chlorogenic acid. **Nature Biotechnology**, v. 22, p. 746-754, 2004.
- OTTO, M. **Chemometrics: statistics and computer application in analytical chemistry**. Weinheim: Wiley-VCH, 2007. 300 p.

PARVEEN, I.; THREADGILL, M.; HAUCK, B.; DONNISON, I.; WINTERS, A. Isolation, identification and quantitation of hydroxycinnamic acid conjugates, potential platform chemical, in the leaves and stems of *Miscanthus x giganteus* using LC-ESI-MSⁿ. **Phytochemistry**, v. 72, p. 2376-2384, 2011.

PARVEEN, I.; WILSON, T.; DONNISON, I. S.; COOKSON, A. R.; HAUCK, B. THREADGILL, M. D. Potential sources of high value chemicals from leaves, stems and flowers of *Miscanthus sinensis* 'Goliath' and *Miscanthus sacchariflorus*. **Phytochemistry**, v. 92, p. 160-167, 2013.

PASCHOLATI, S. Fisiologia do parasitismo: como as plantas se defendem dos patógenos. In: AMORIN, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de fitopatologia**. 4. ed. Piracicaba: Agronômica Ceres, 2011. Cap. 35, p. 604-605.

PERÉ-TREPAT, E.; OLIVELLA, L.; GINEBREDÀ, A.; CAIXACH, J.; TAULER, R. Chemometrics modelling of organic contaminants in fish and sediment river samples. **Science of the Total Environment**, v. 371, p. 223-237, 2006.

PUSHPA, S.; SHRIVASTAVA, A. K.; SUMAN, A.; ARYA, N.; TIWARI, P.; RAI, R. K.; SINGH, J.; SINGH, A. K. Allelopathic effects of hidroxamic acids from sugarcane leaves on germination and growth of crops. **Allelopathy Journal**, v. 23, p. 203-212, 2009.

RIJKE, E.; OUT, P.; NIESSEN, W. M. A.; ARIESE, F.; GOOIJER, C.; BRINKMAN, U. A. T. H. Analytical separation and detection methods for flavonoids. **Journal of Chromatography**, v. 1112, p. 31-63, 2006.

RISCH, B.; HERRMANN, K.; WRAY, V.; GROTHJAHN, L. 2'-(E)-O-p-coumaroylgalactaric acid and 2'-(E)-O-feruloylgalactaric acid in citrus. **Phytochemistry**, v. 26, p. 509-510, 1987.

ROLIN, D.; DEBORDE, C.; MAUCORT, M.; CABASSON, C.; FAUVELLE, F.; JACOB, D.; CANLET, C.; MOING, A. High-resolution ¹H-NMR spectroscopy and beyond to explore plant metabolome. **Advances in Botanical Search**, v. 67, p. 1-66, 2013.

RUIZ, A.; MARDONES, C.; VERGARA, C.; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I.; VON.; BAER, D.; HINRICHSEN, P.; RODRIGUES, R.; ARRIBILLAGA, D.; DOMINGUEZ, E. Analysis of hydroxycinnamic acids derivatives in calafate (*Berberis microphylla* G. Forst) berries by liquid chromatography with photodiode array and mass spectrometry detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1281, p. 38-45, 2013.

SÁENZ, W. O.; OROZCO, H.; FONG, E.; GARCÍA, S. The effect of orange rust (*Puccinia kuehnii*) on sugar yield in six sugarcane varieties in Guatemala. **Proceedings International Society of Sugar Cane Technology**, v. 27, p. 1-9, 2010.

SANTOS, A. S. S. Doença causada por fungos. In: DINARDO-MIRANDA, L. L.; VASCONCELOS, A. M.; LANDELL, M. G. A. (Ed.). **Cana-de-açúcar**. Campinas: IAC, 2008. Cap. 19, p.423-424.

SHALINI, V.; BHASKAR, S.; KUMAR, K. S.; MOHANLAL, S.; JAYALEKSHMY, A.; HELEN, A. Molecular mechanisms of anti-inflammatory action of the flavonoid, tricicin from Njavara rice (*Oryza sativa* L.) in human peripheral blood mononuclear cells: possible role in the inflammatory signaling. **International Immunopharmacology**, v. 14, p. 32-38, 2012.

SILVA, A. P. D. **Caracterização de metabólitos não-voláteis da cana-de-açúcar**. 2012. 131 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Paulista, Araraquara, 2012.

SING, P.; SUMAN, A.; SHRIVASTAVA, A. K. Isolation and identification of allelochemicals from sugarcane leaves. **Allelopathy Journal**, v. 12, p. 71-79, 2003.

SOOD, S. G.; COMSTOCK, J. C.; GLYNN, N. Leaf whorl inoculation method for screening sugarcane rust resistance. **Plant Disease**, v. 93, p. 1335-1340, 2009.

STEVENS, R. Phenolic constituents of sugar cane. **International Sugar Journal**, v. 61, p. 199, 1959.

STRACK, D.; GROSS, W. Properties and activity changes of chlorogenic acid:glucaric acid caffeoyltransferase from tomato (*Lycopersicon esculentum*). **Plant Physiology**, v. 92, p. 41-47, 1990.

SUMNER, L. W.; MENDES, P.; DIXON, R. A. Plant metabolomics: large-scale phytochemistry in the functional genomics era. **Phytochemistry**, v. 62, p. 817-836, 2003.

TAIZ, L. Photosynthesis: carbon metabolism. In: TAIZ, L.; ZAIGER, E. (Ed.). **Plant physiology**. Redwood City: The Benjamin Cummings, 1991. Cap. 8, p. 219-248.

TAKENAKA, M.; YAN, X.; ONO, H.; YOSHIDA, M.; NAGATA, T.; NAKANISHI, T. Caffeic acid derivatives in the roots of yacon (*Smallanthus sonchifolius*). **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 793-796, 2003.

TIBOLLA, F.; SUMIDA, C. H.; PEITL, D. C.; CANTERI, M. G.; CASTRO, A. M. C. Viabilidade de urediniósporos de *Puccinia kuehnii* e sua germinação influenciada por extratos aquosos de folhas de cana-de-açúcar. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, p. 2239-2246, 2013.

TISTAERT, C.; DEJAEGHER, B.; HEYDEN, Y. V. Chromatographic separation techniques and data handling methods for herbal fingerprintings: a review. **Analytical Chemical Acta** 690, v. 690, p. 148-161, 2011.

TOKESHI, H. Cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*)-controle de doenças. In: VALE, F. X. R.; ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Controle de doenças de plantas: grandes culturas**. Viçosa: Suprema, 1997. Cap. 3, p. 658-751.

TOMASI, G.; BERG, F. V. D.; ANDERSSON, C. Correlation optimized warping and dynamic time warping as preprocessing methods for chromatographic data. **Journal of Chemometrics**, v. 18, p. 231-241, 2004.

WARD, J. L.; HARRIS, C.; LEWIS, J.; BEALE, M. Assessment of ¹H NMR spectroscopy and multivariate analysis as a technique for metabolite fingerprinting of *Arabidopsis thaliana*. **Phytochemistry**, v. 62, p. 949-957, 2003.

WARD, J. L.; BAKER, J. M.; LLEWELLYN, A. M.; HAWKINS, N. D.; BEALE, M. H. Metabolomics analysis of *Arabidopsis* reveals hemiterpenoid glycosides as products of a nitrate ion-regulated, carbon flux overflow. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 108, p. 10762-10767, 2011.

WARIDEL, P.; WOLFENDER, J.-L.; NDJOKO, K.; HOBBY, K. R.; MAJOR, H. J.; HOSTETTSMANN, K. Evaluation of quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry and ion-trap multiple-stage mass spectrometry for the differentiation of C-glycosidic flavonoid isomers. **Journal of Chromatography A**, v. 926, p. 29-41, 2001.

WILLIAMS, C. Flavone and flavonol O-glycosides. In: ANDERSEN, O.; MARKHAM, K. (Ed.). **Flavonoids: chemistry, biochemistry, and applications**. Boca Raton: CRC Press, 2006. Cap. 7, p. 897-950.

WILLIAMS, C.; HARBORNE, J.; SMITH, P. The taxonomic significance of leaf flavonoids in *Saccharum* and related genera. **Phytochemistry**, v. 13, p. 1141-1149, 1974.

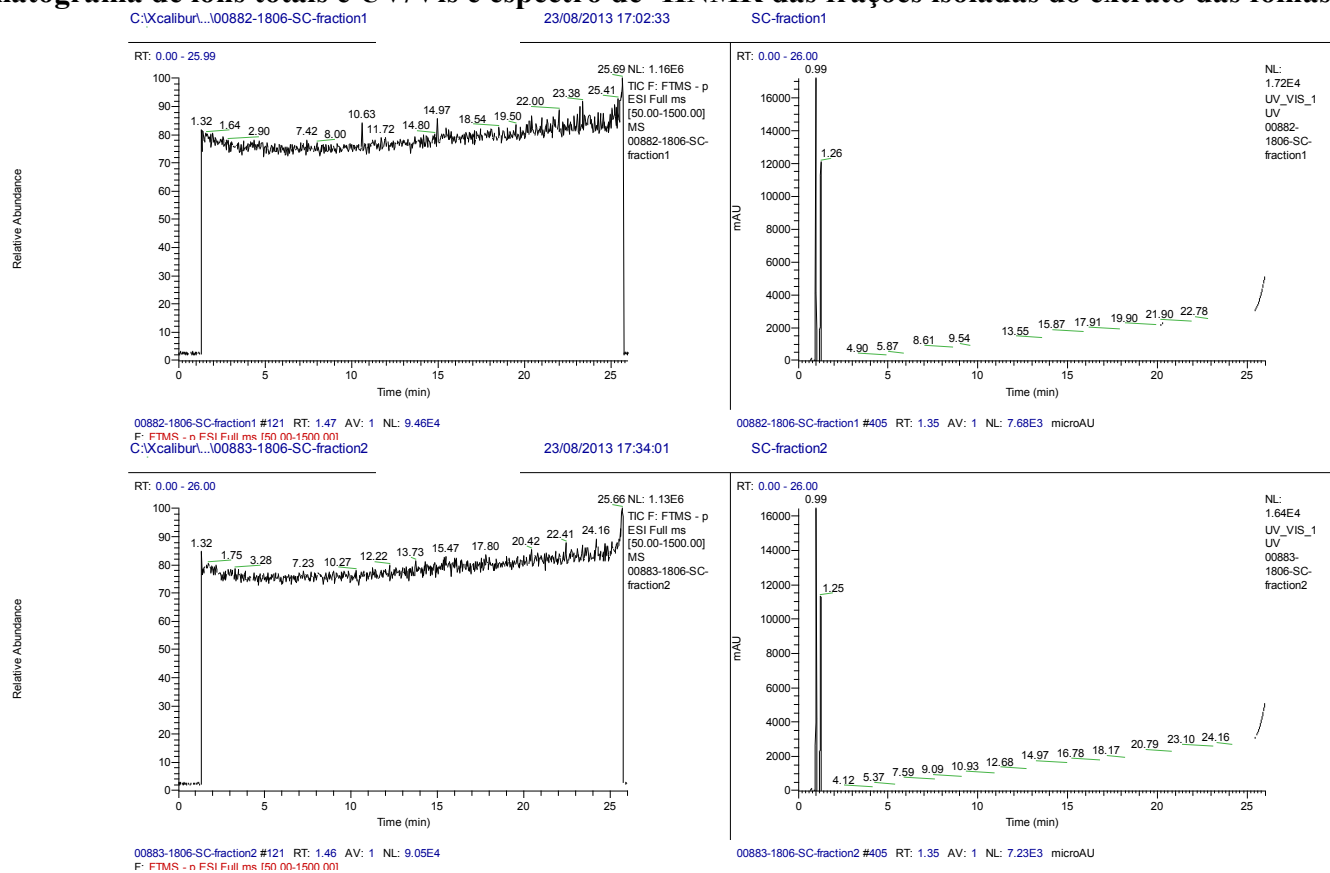
WOLD, S.; GELADI, P.; ESBENSEN, K. Principal component analysis. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 2, p. 37-52, 1987.

YAZAWA, K.; TSUCHIDA, Y.; YAMADA, R.; SADANARI, H.; MURAYAMA, T. Anti-influenza virus activity by tricetin, isolated from *Sasa albomarginata* in Japan. **Antiviral Research**, v. 86, p. A1-A78, 2010.

ZHAO, D.; GLYNN, N. C.; GLAZ, B.; COMSTOCK, J. C.; SOOD, S. Physiological responses of sugarcane to orange rust infection. **Journal American Society of Sugar Cane Technologist**, v. 31, p. 67-70, 2011.

ANEXOS

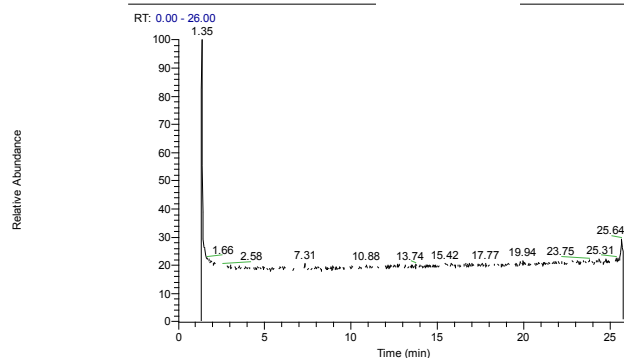
Anexo 1 - Cromatograma de íons totais e UV/Vis e espectro de ¹HNMR das frações isoladas do extrato das folhas de cana-de-açúcar



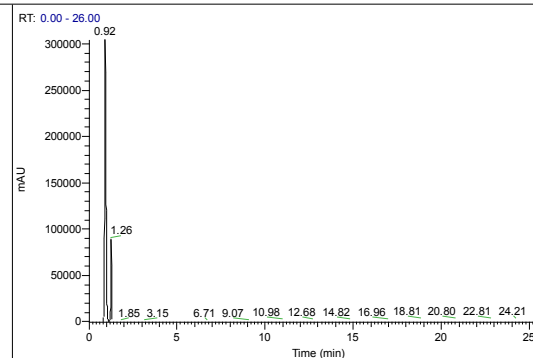
C:\Xcalibur...00884-1806-SC-fraction3

23/08/2013 18:05:30

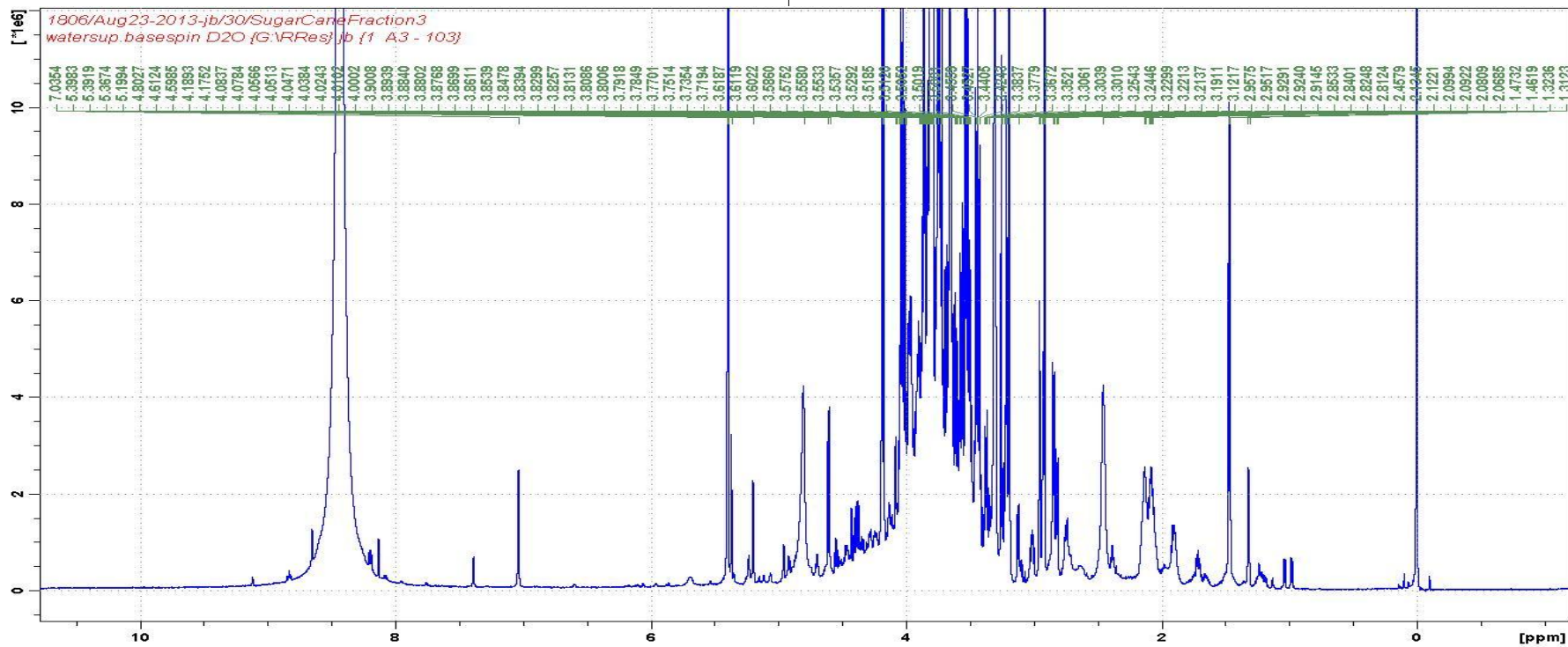
SC-fraction3



NL: 4.39E6
TIC F: FTMS - p
ESI Full ms
[50.00-1500.00]
MS
00884-1806-SC-
fraction3



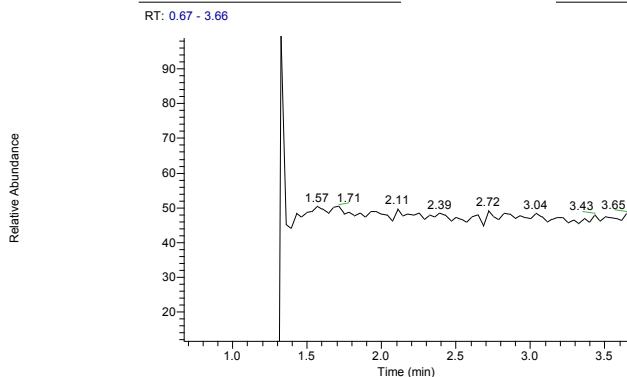
NL:
3.04E5
UV_VIS_1
UV
00884-
1806-SC-
fraction3



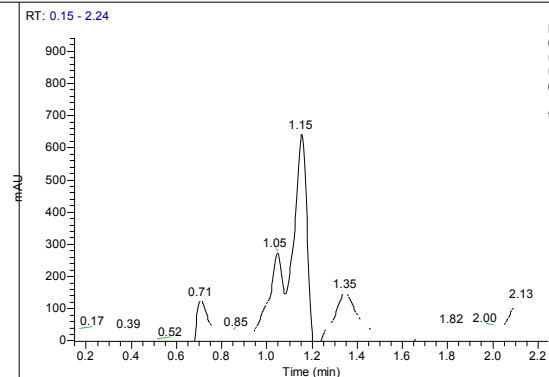
C:\Xcalibur...00885-1806-SC-fraction4

23/08/2013 18:37:00

SC-fraction4



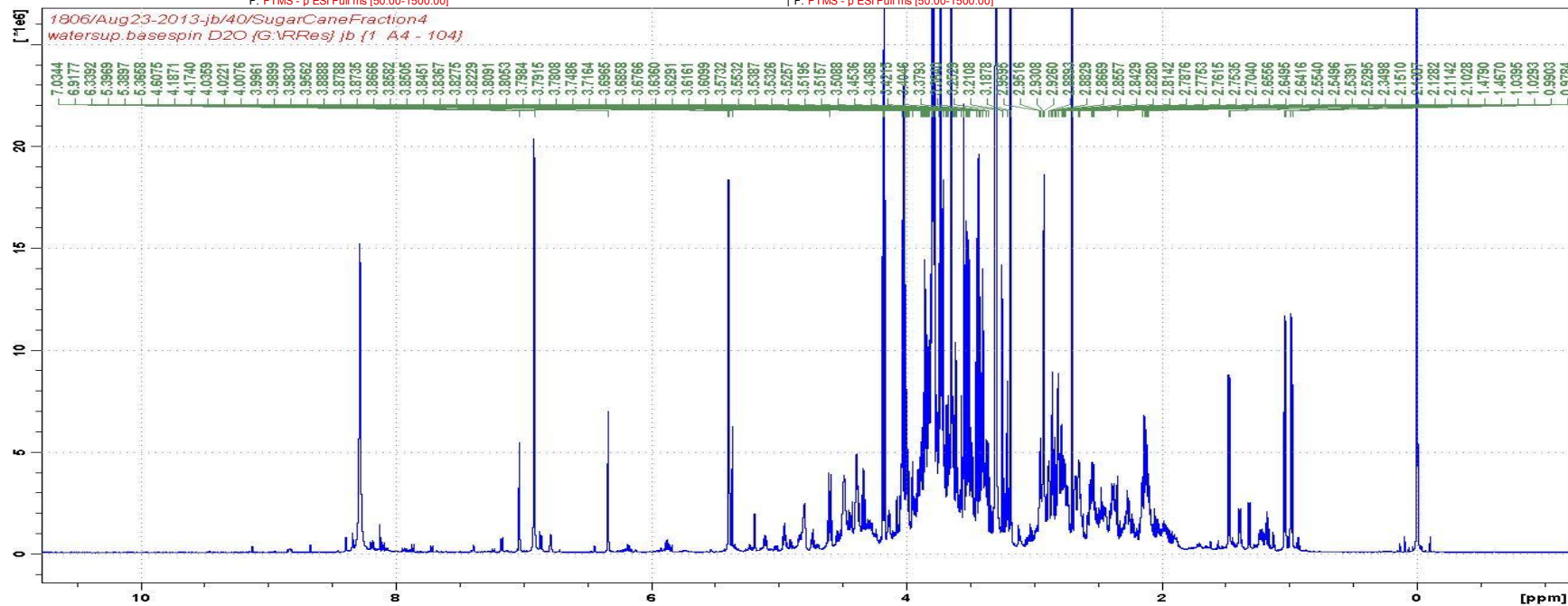
NL: 1.76E6
TIC F: FTMS - p
ESI Full ms
[50.00-1500.00]
MS
00885-1806-SC-
fraction4



NL:
6.45E2
UV_VIS_1
UV
00885-
1806-SC-
fraction4

00885-1806-SC-fraction4 #105 RT: 1.32 AV: 1 NL: 2.14E5
F: FTMS - p ESI Full ms [50.00-1500.00]

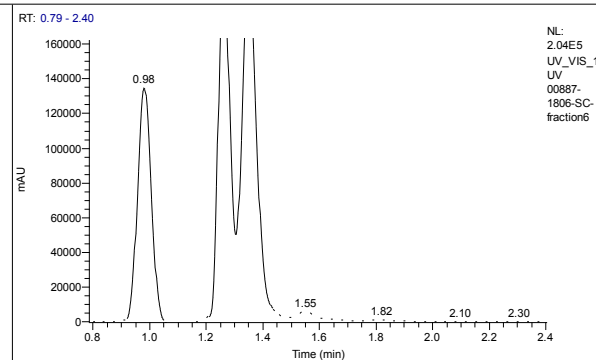
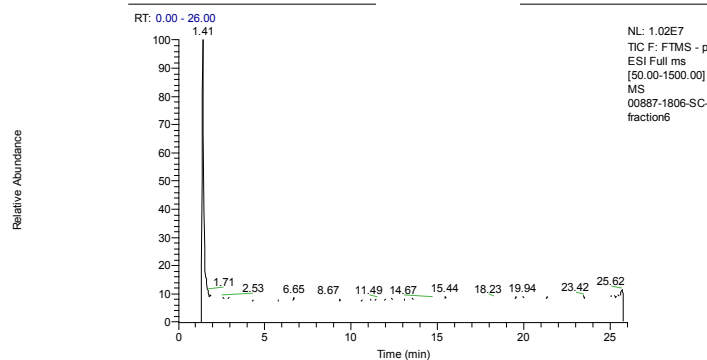
00885-1806-SC-fraction4 #405 RT: 1.35 AV: 1 NL: 7.33E3 microAU
F: FTMS - p ESI Full ms [50.00-1500.00]



C:\Xcalibur...00887-1806-SC-fraction6

23/08/2013 19:39:59

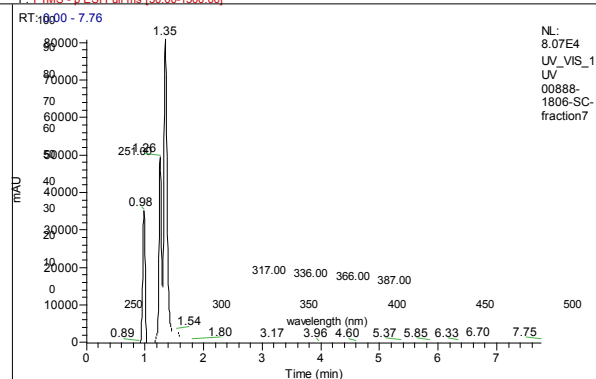
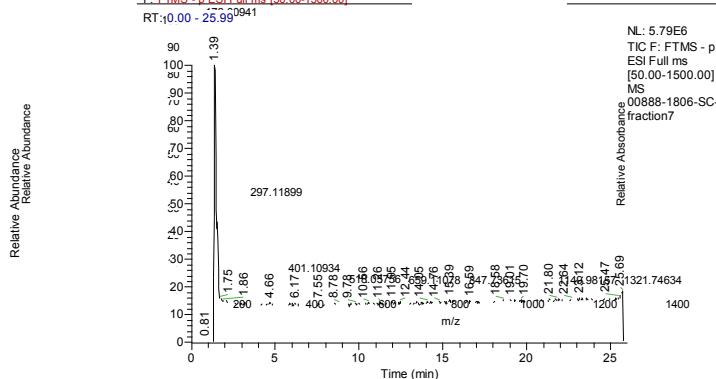
SC-fraction6



C:\Xcalibur...00888-1806-SC-fraction7

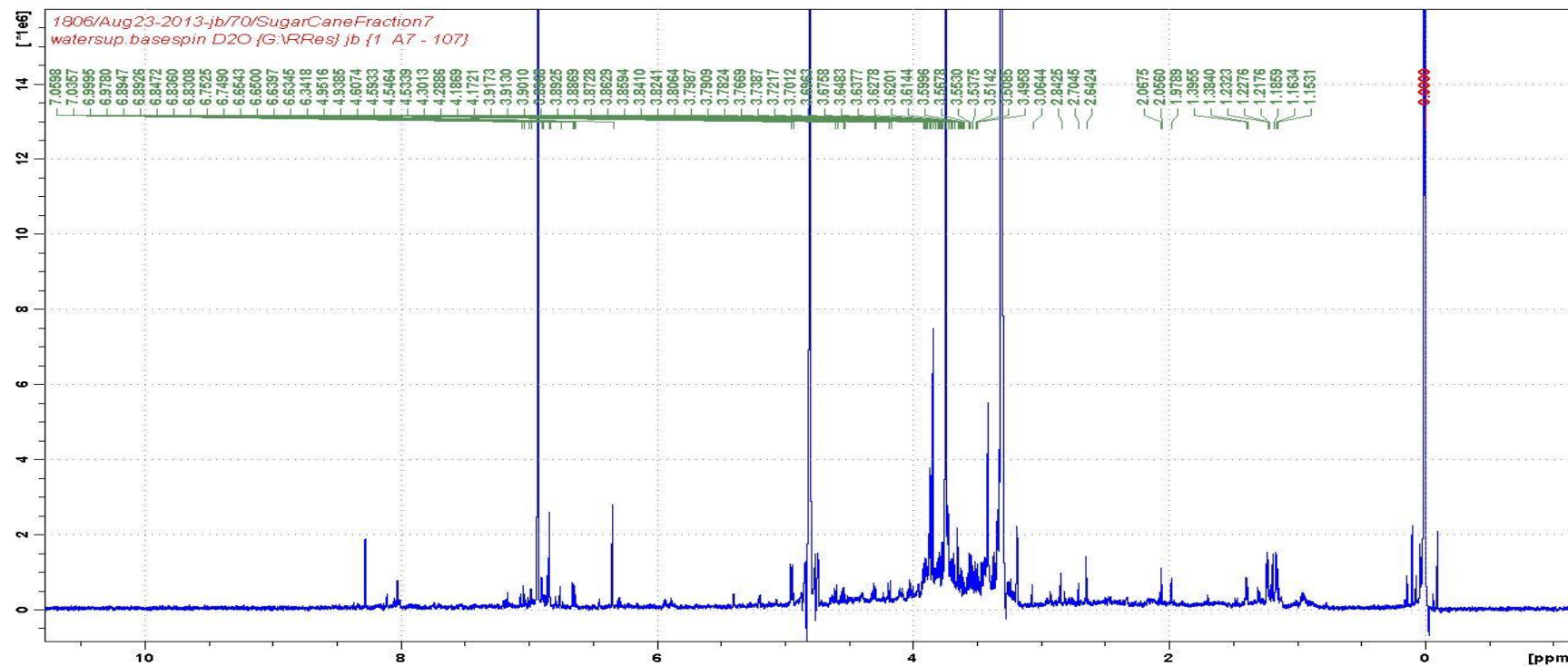
23/08/2013 20:11:29

SC-fraction7



00888-1806-SC-fraction7 #121 RT: 1.45 AV: 1 NL: 1.29E6
F: FTMS - p ESI Full ms [50.00-1500.00]

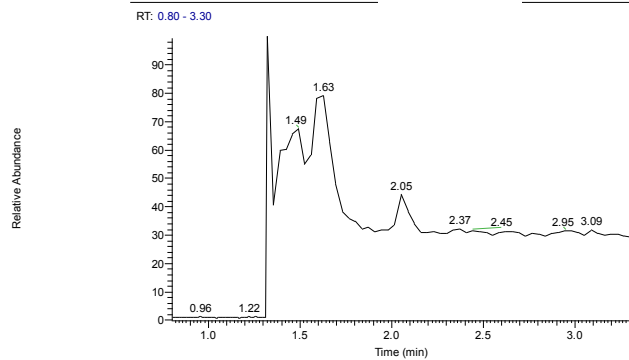
00888-1806-SC-fraction7 #367-425 RT: 1.22-1.42 AV: 59 NL: 2.98E5 microAU
F: FTMS - p ESI Full ms [50.00-1500.00]



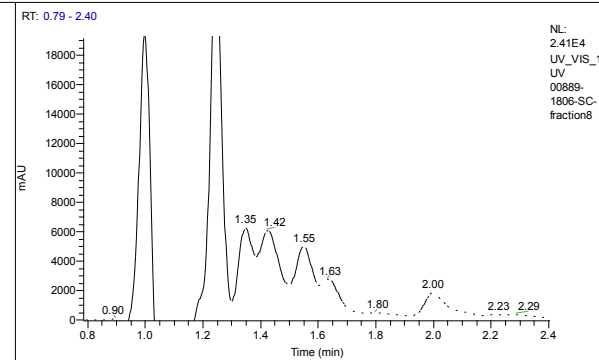
C:\Xcalibur...00889-1806-SC-fraction8

23/08/2013 20:42:59

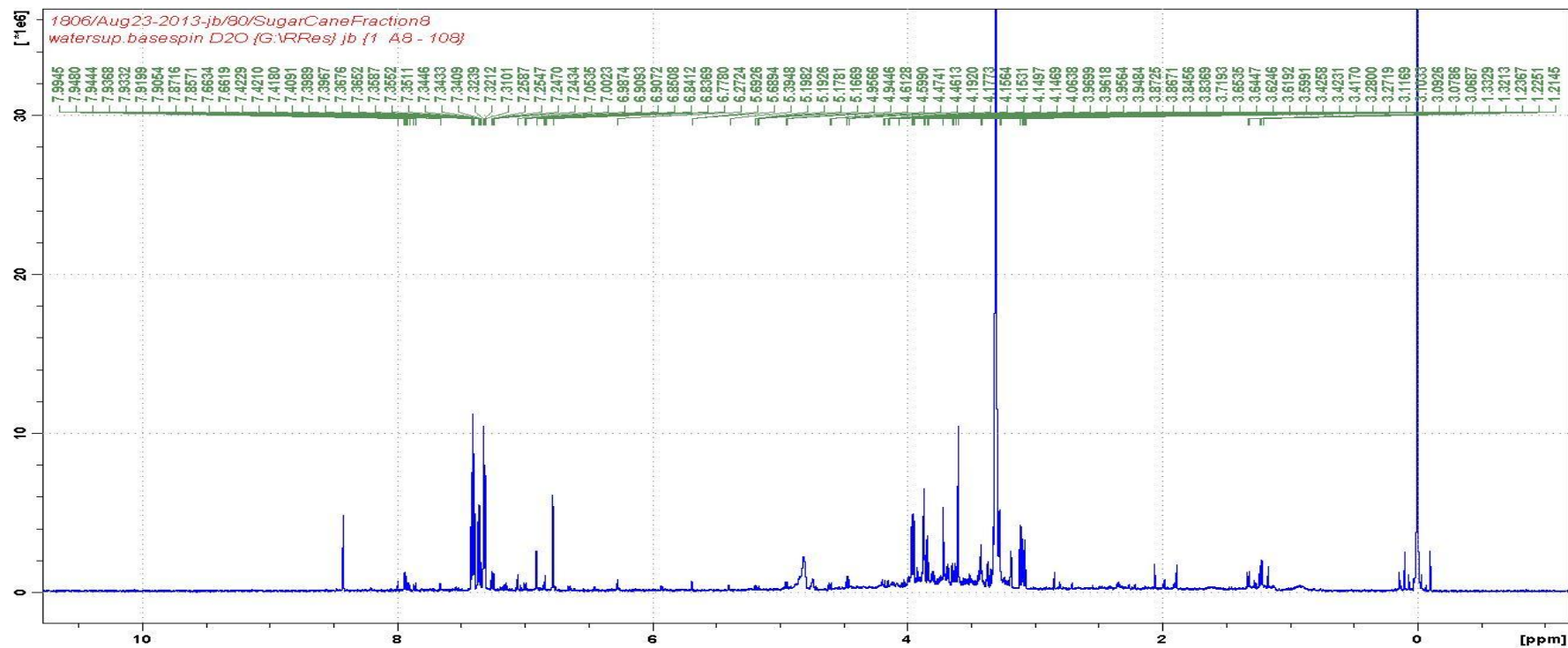
SC-fraction8



NL: 2.61E6
TIC F: FTMS - p
ESI Full ms
[50.00-1500.00]
MS
00889-1806-SC-
fraction8



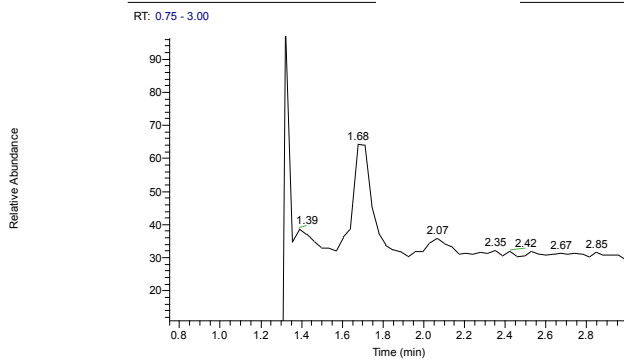
NL:
2.41E4
UV_VIS_1
UV
00889-
1806-SC-
fraction8



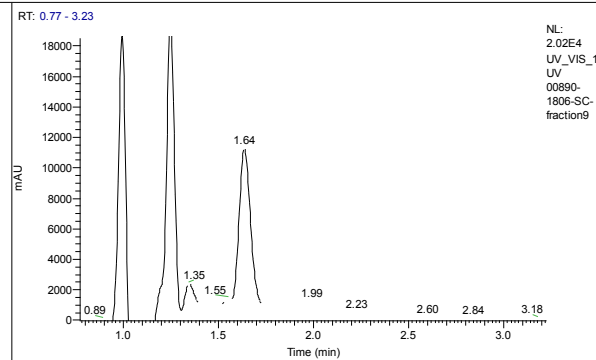
C:\Xcalibur...00890-1806-SC-fraction9

23/08/2013 21:14:28

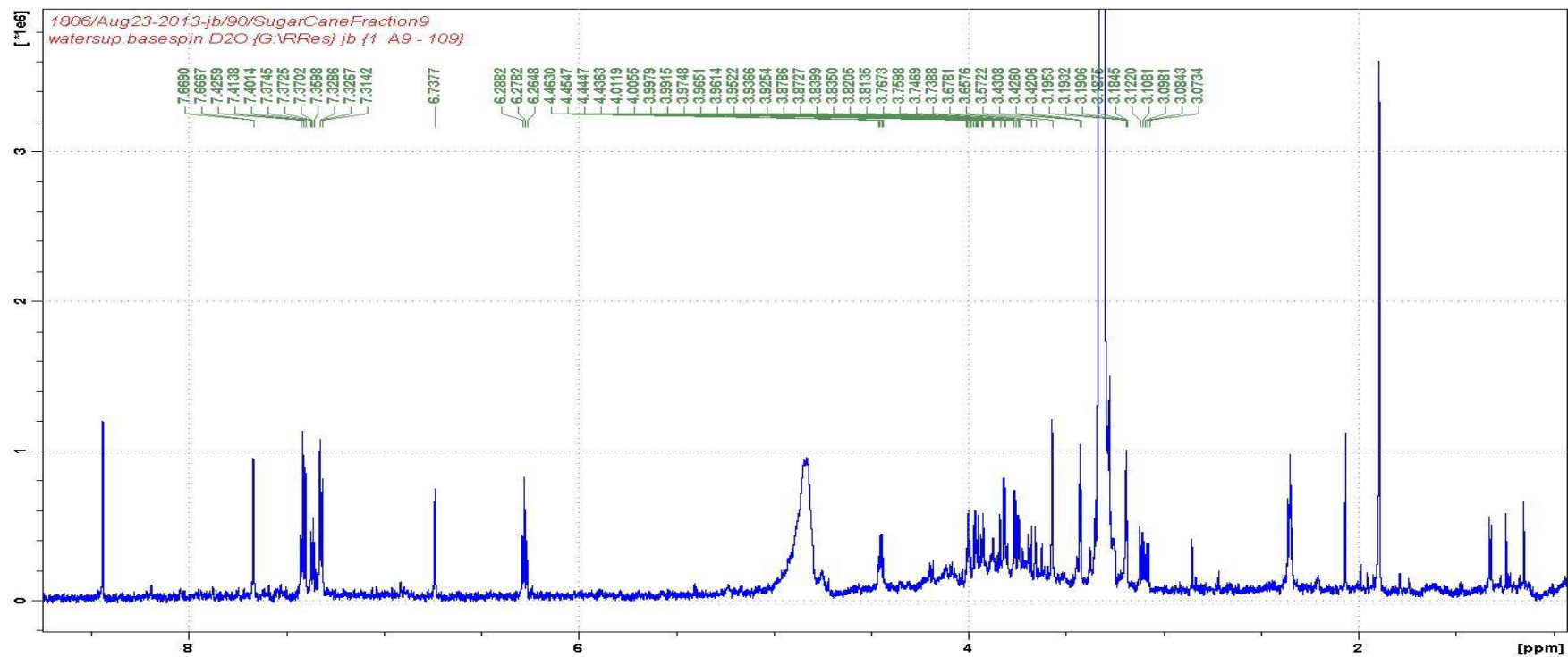
SC-fraction9



NL: 2.59E6
TIC F: FTMS - p
ESI Full ms
[50.00-1500.00]
MS
00890-1806-SC-
fraction9



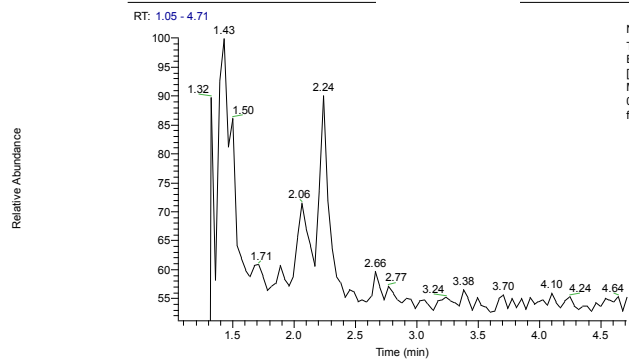
NL:
2.02E4
UV_VIS_1
UV
00890-
1806-SC-
fraction9



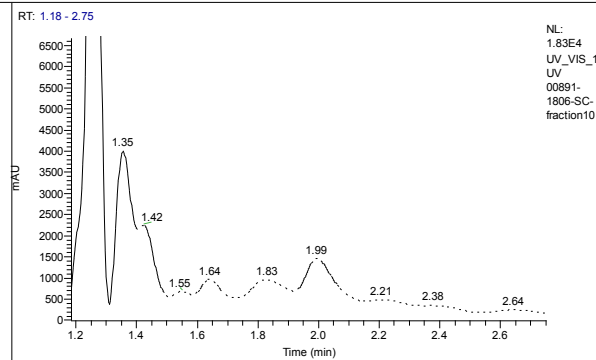
C:\Xcalibur...00891-1806-SC-fraction10

23/08/2013 21:45:58

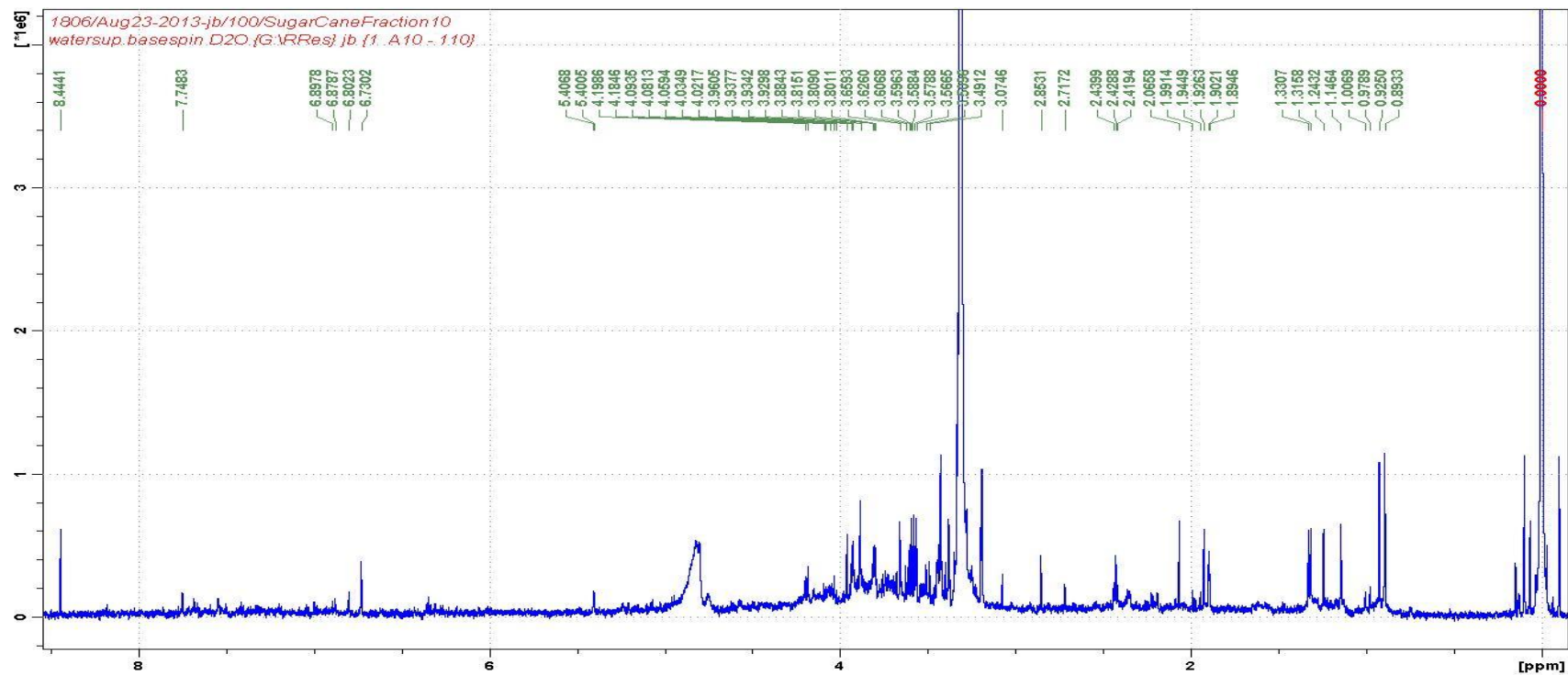
SC-fraction10



NL: 1.45E6
TIC F: FTMS - p
ESI Full ms
[50.00-1500.00]
MS
00891-1806-SC-
fraction10



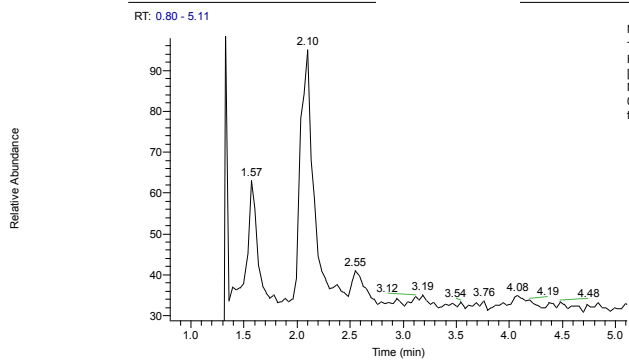
NL: 1.83E4
UV_VIS_1
UV
00891-
1806-SC-
fraction10



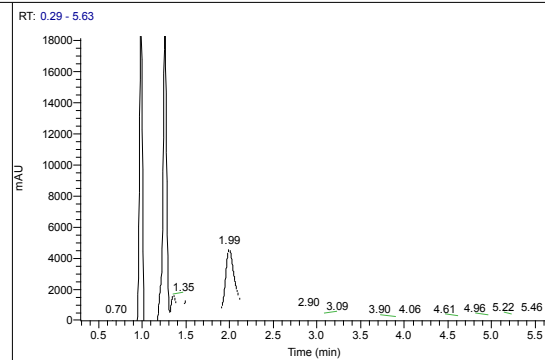
C:\Xcalibur...00892-1806-SC-fraction11

23/08/2013 22:17:28

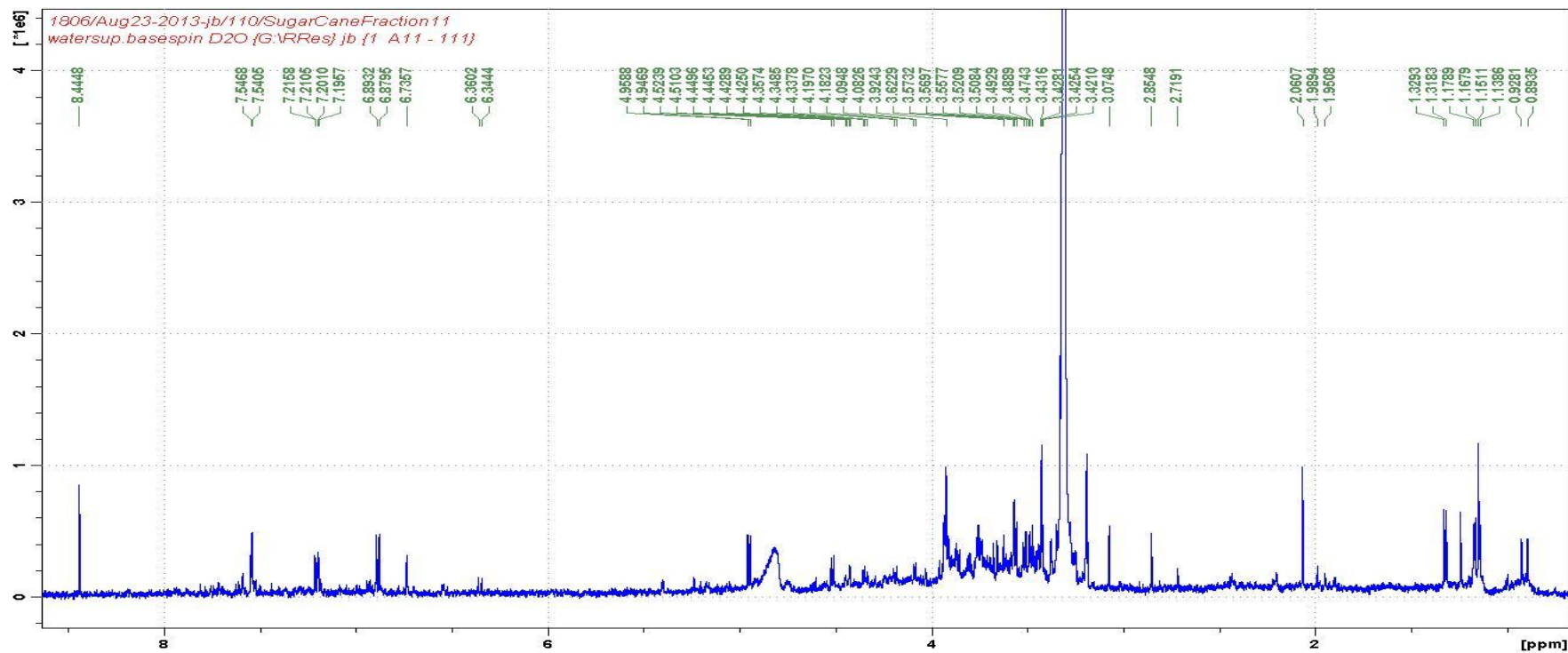
SC-fraction11



NL: 2.41E6
TIC F: FTMS - p
ESI Full ms
[50.00-1500.00]
MS
00892-1806-SC-
fraction11



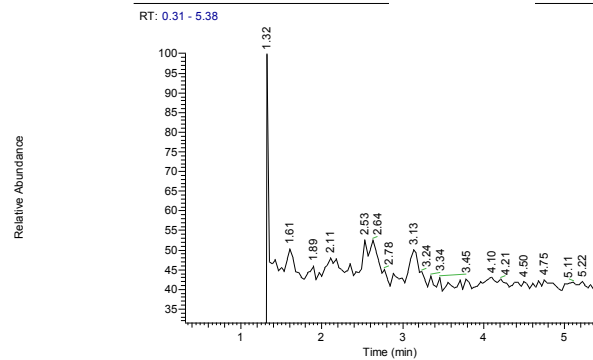
NL:
1.93E4
UV_VIS_1
UV
00892-
1806-SC-
fraction11



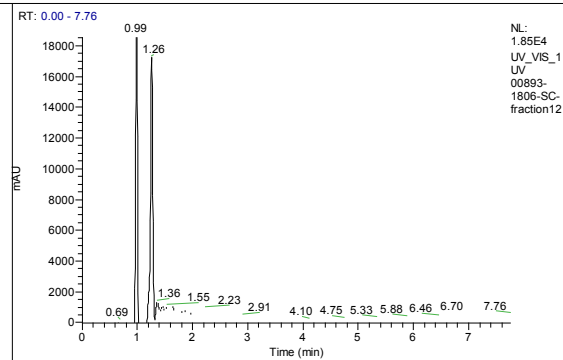
C:\Xcalibur\...00893-1806-SC-fraction12

03/09/2013 22:48:57

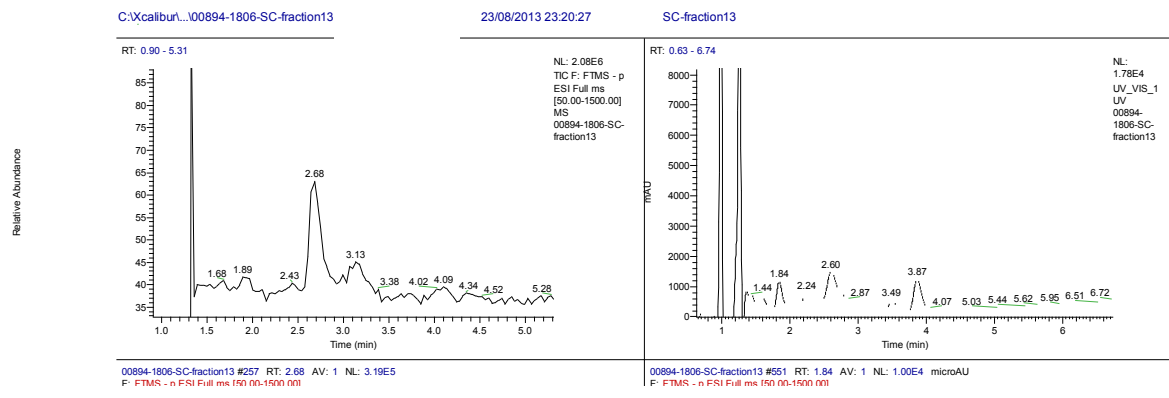
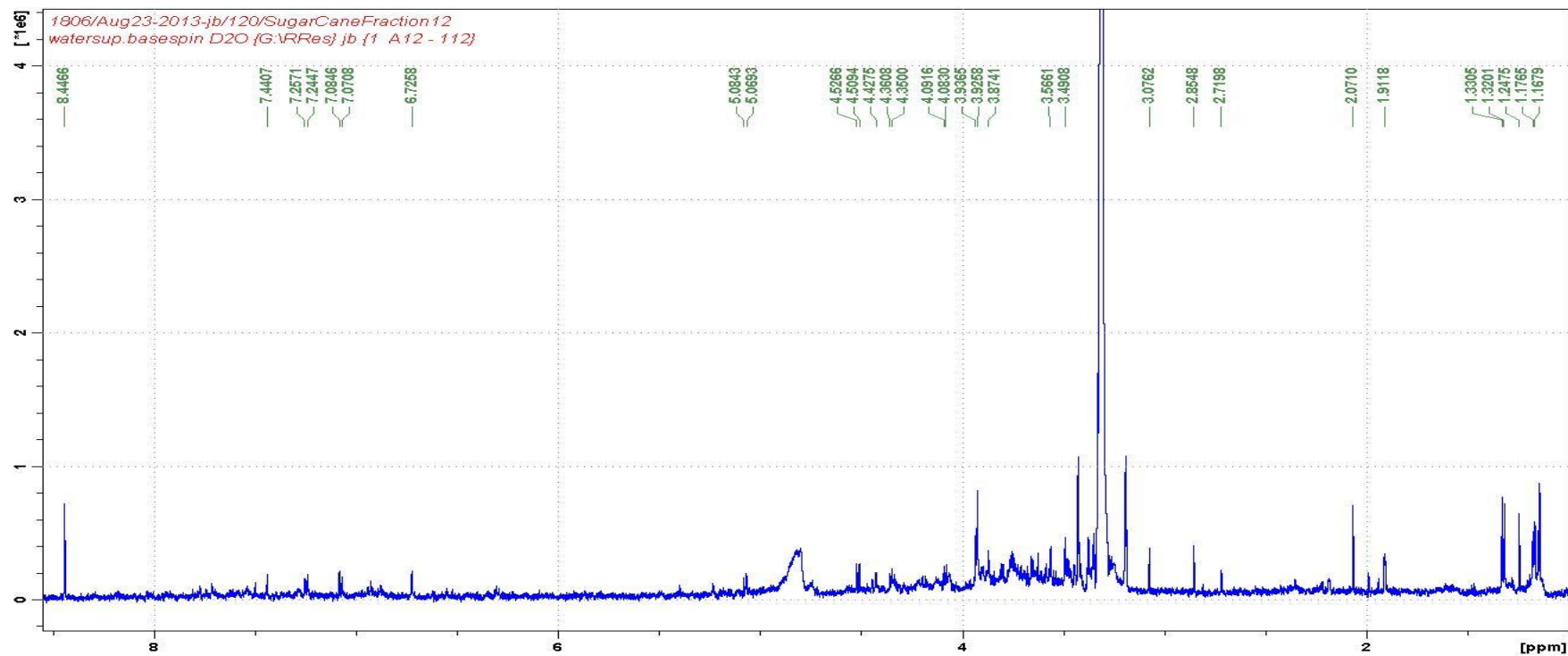
SC-fraction12

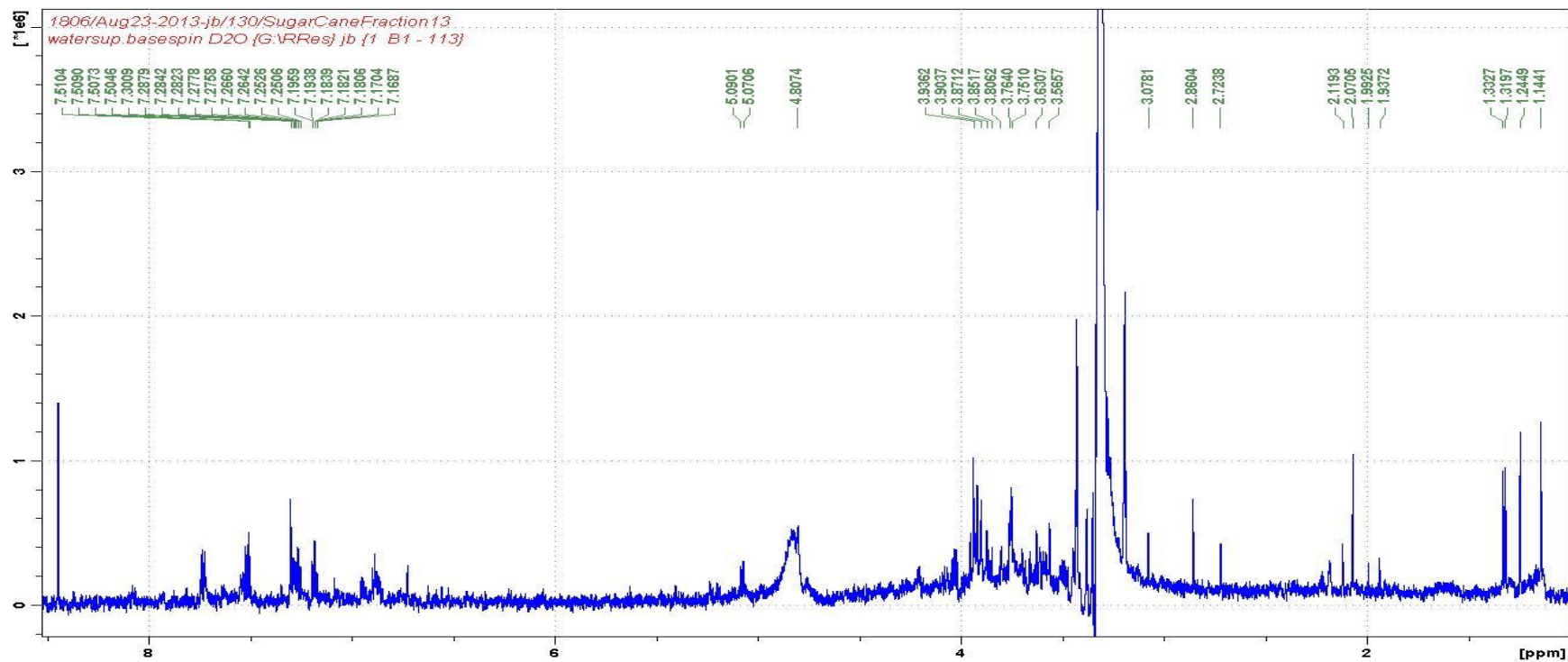


00893-1806-SC-fraction12 #341 DT: 2.52 AV: 4 AL: 1.07EE



00893-1806-SC-fraction12 #36742E DT: 1.22442 AV: 50 AL: 1.00EE microAU



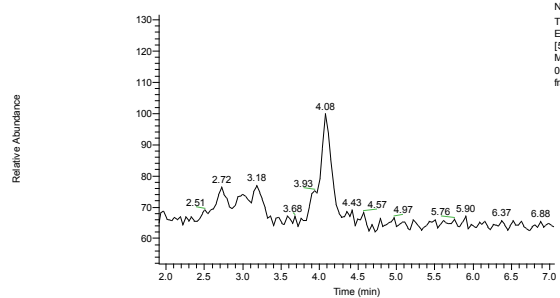


C:\xcalibur\...00895-1806-SC-fraction14

23/08/2013 23:51:57

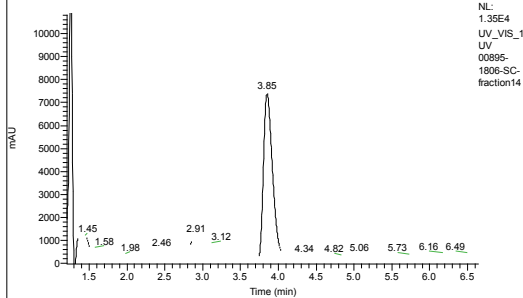
SC-fraction14

RT: 1.90 - 7.06



00895-1806-SC-fraction14 #113 RT: 4.08 AV: 1 NL: 3.37E5
C:\F14 - F14.F - 150.00.1500.00

RT: 1.20 - 6.65

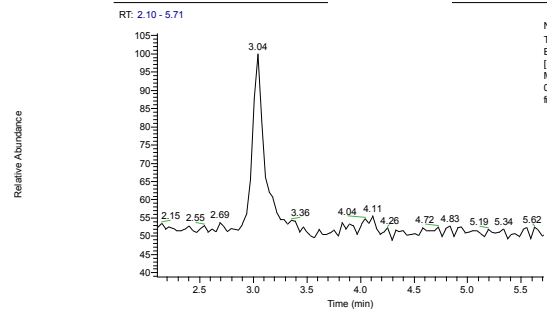


00895-1806-SC-fraction14 #116 RT: 3.85 AV: 1 NL: 9.20E4 microAU
C:\F14 - F14.F - 150.00.1500.00

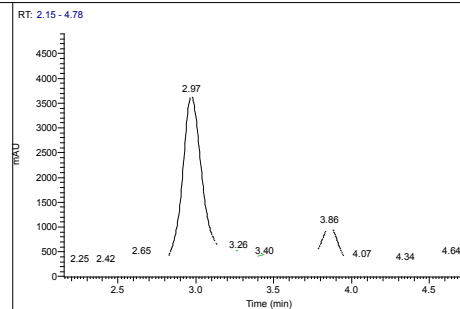
C:\Xcalibur\...00896-1806-SC-fraction15

24/08/2013 00:23:26

SC-fraction15



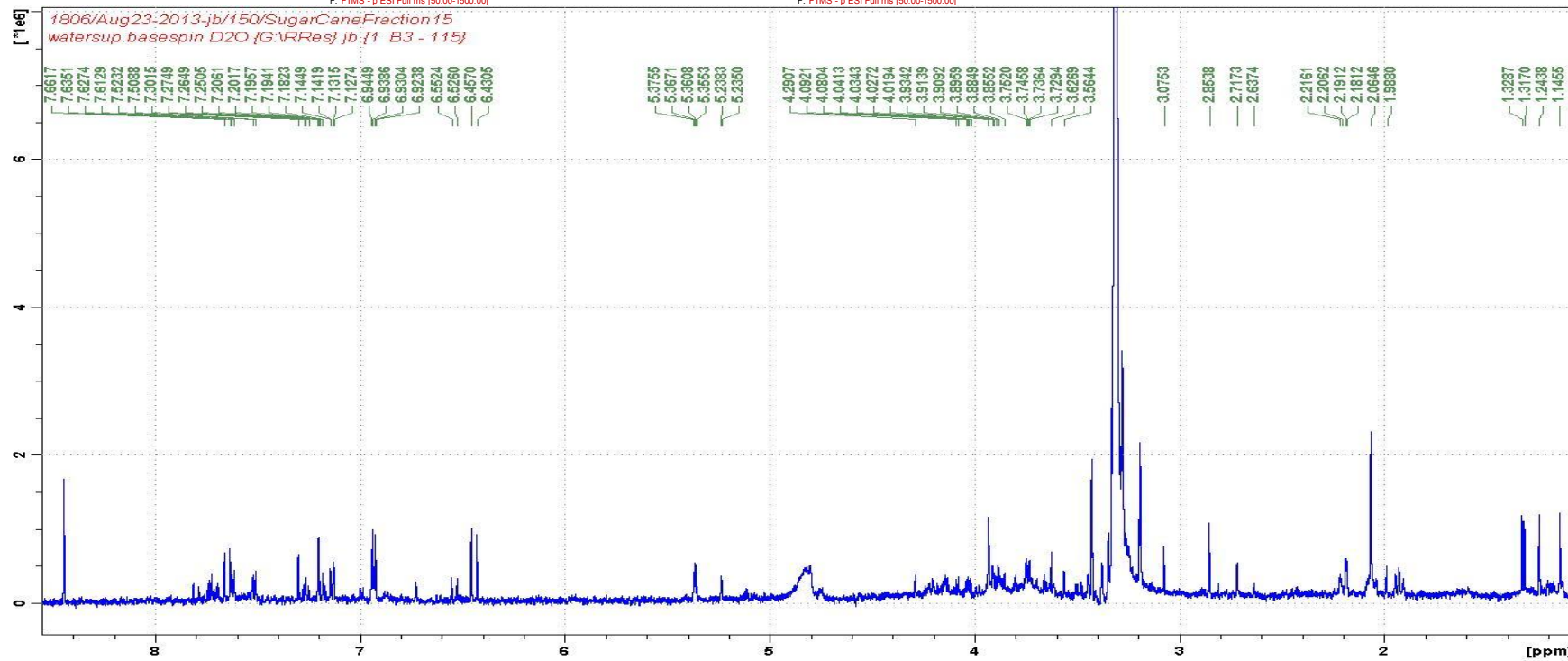
NL: 1.49E6
TIC F: FTMS - p
ESI Full ms
[50.00-1500.00]
MS
00896-1806-SC-
fraction15



NL: 3.64E3
UV_VIS_1
UV
00896-
1806-SC-
fraction15

00896-1806-SC-fraction15 #289 RT: 2.97 AV: 1 NL: 1.16E5
F: FTMS - p ESI Full ms [50.00-1500.00]

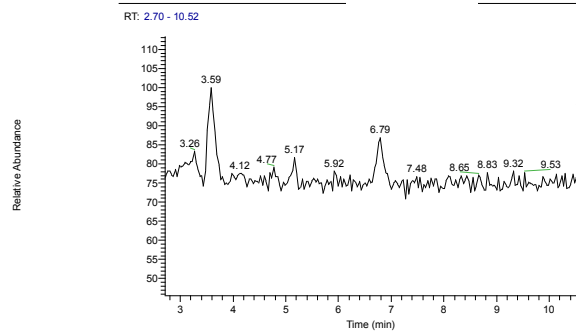
00896-1806-SC-fraction15 #889 RT: 2.96 AV: 1 NL: 1.60E4 microAU
F: FTMS - p ESI Full ms [50.00-1500.00]



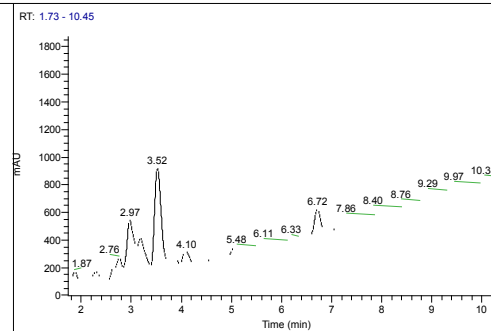
C:\Xcalibur...00897-1806-SC-fraction16

24/08/2013 00:54:56

SC-fraction16



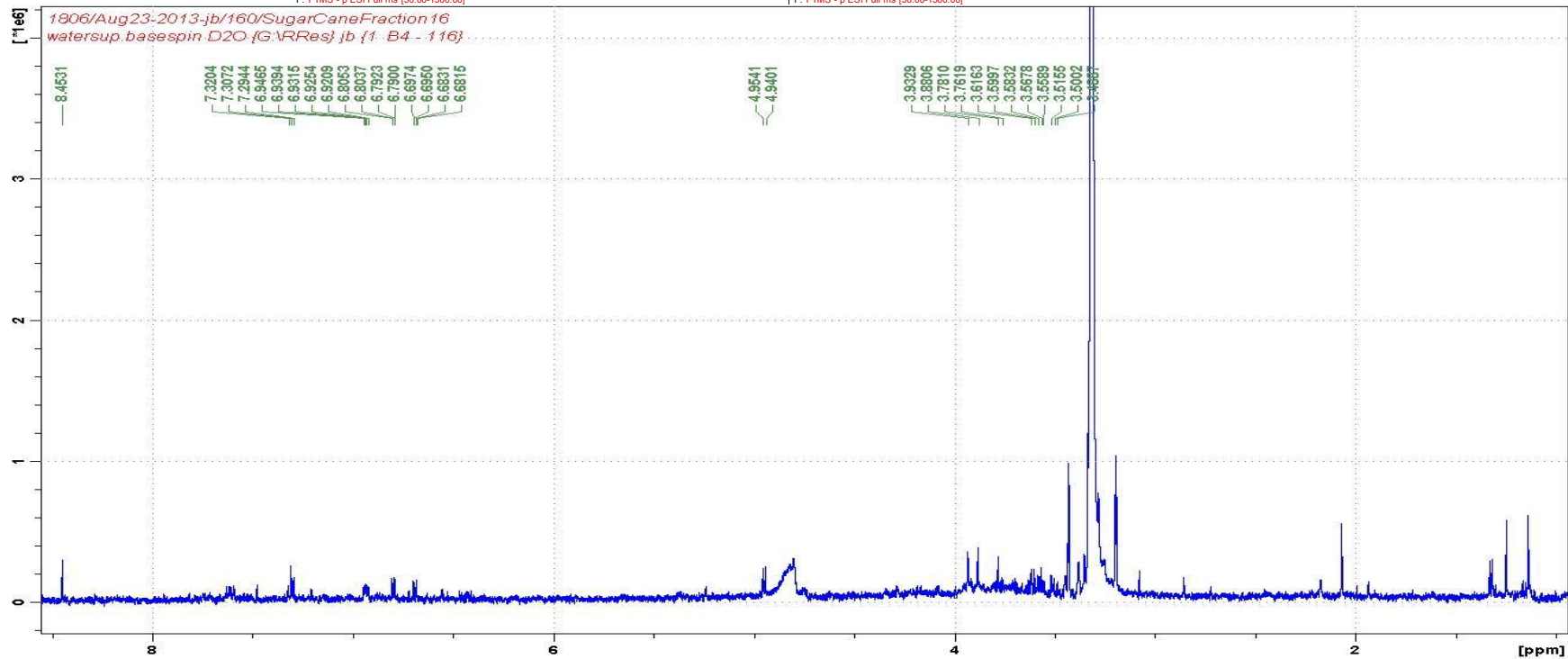
NL: 1.02E6
TIC F: FTMS - p
ESI Full ms
[50.00-1500.00]
MS
00897-1806-SC-
fraction16



NL:
9.18E2
UV_VIS_1
UV
00897-
1806-SC-
fraction16

00897-1806-SC-fraction16 #321 RT: 3.26 AV: 1 NL: 1.10E5
F: FTMS - p ESI Full ms [50.00-1500.00]

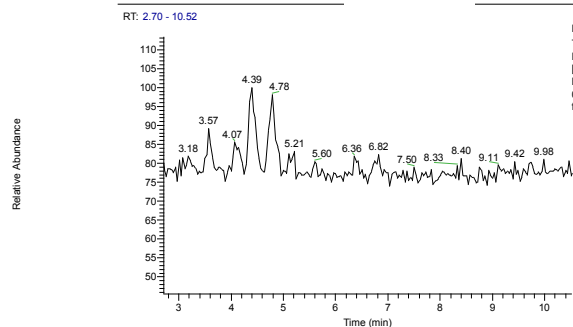
00897-1806-SC-fraction16 #953 RT: 3.18 AV: 1 NL: 1.06E4 microAU
F: FTMS - p ESI Full ms [50.00-1500.00]



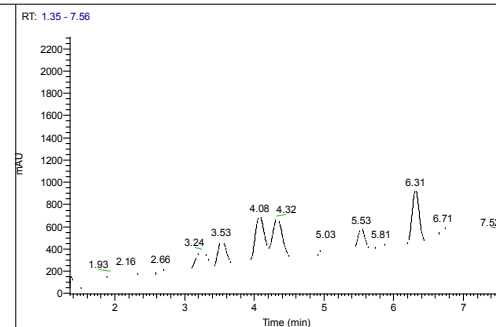
C:\xcalibur...00898-1806-SC-fraction17

24/08/2013 01:26:26

SC-fraction17



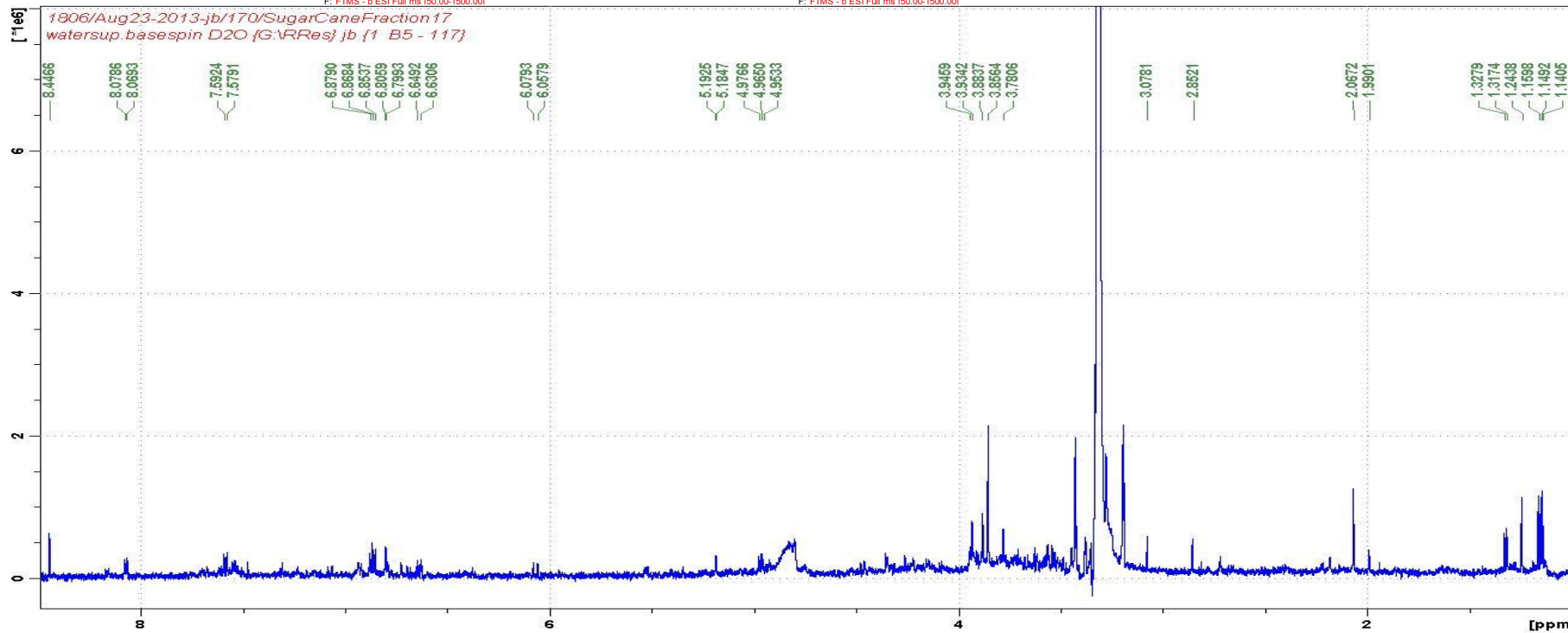
NL: 9.85E5
TIC F: FTMS - p
ESI Full ms
[50.00-1500.00]
MS
00898-1806-SC-
fraction17



NL:
9.31E2
UV_VIS_1
UV
00898-
1806-SC-
fraction17

00898-1806-SC-fraction17 #413 RT: 4.07 AV: 1 NL: 1.04E5
F: FTMS - p ESI Full ms [50.00-1500.00]

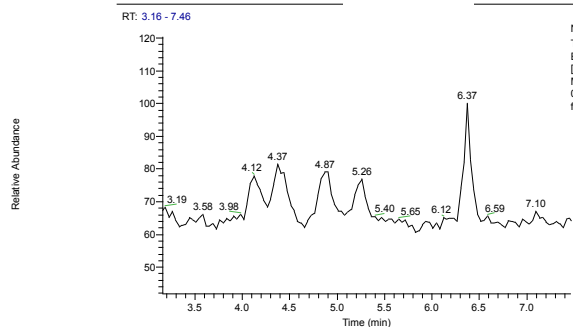
00898-1806-SC-fraction17 #953 RT: 3.18 AV: 1 NL: 1.04E4 microAU
F: FTMS - p ESI Full ms [50.00-1500.00]



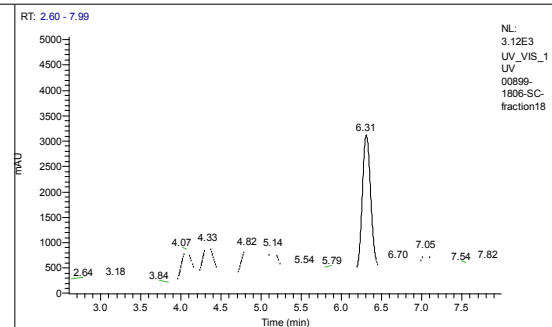
C:\Xcalibur...00899-1806-SC-fraction18

24/08/2013 01:57:55

SC-fraction18



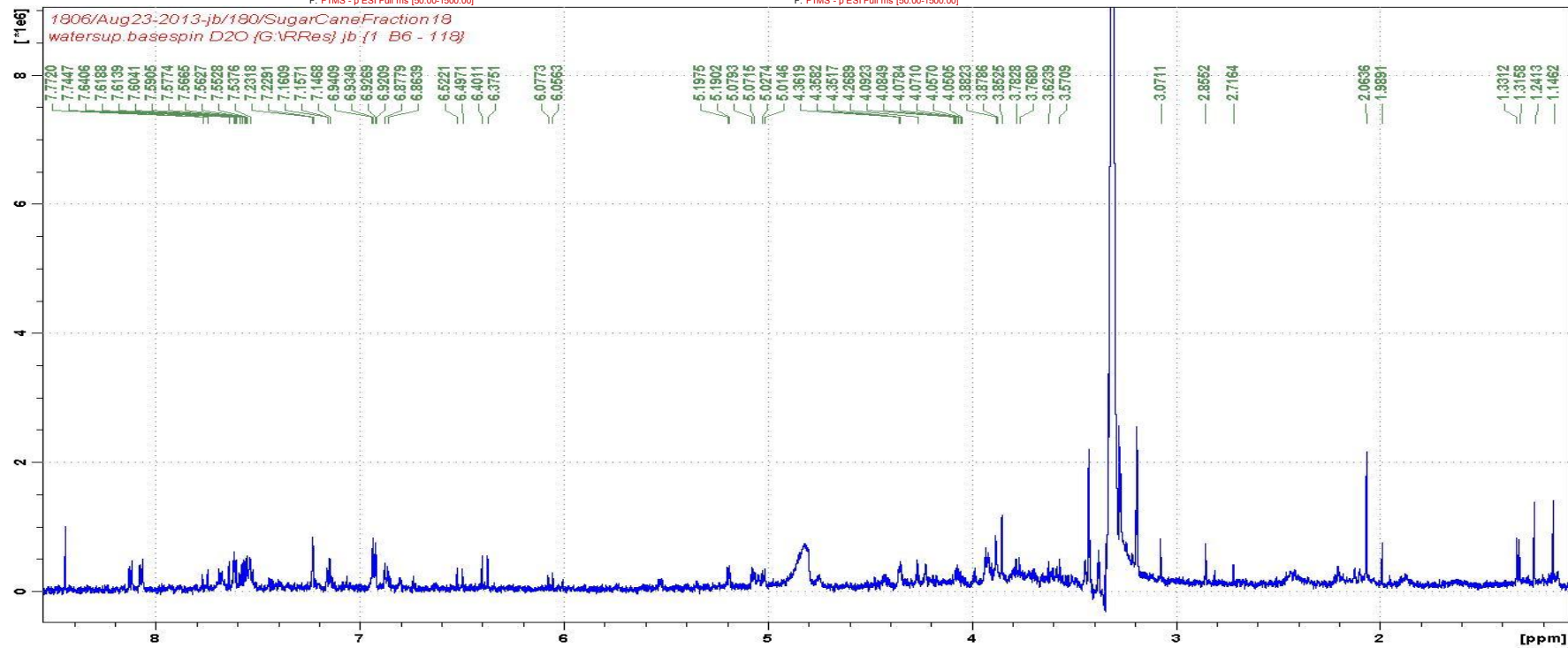
NL: 1.19E6
TIC F: FTMS - p
ESI Full ms
[50.00-1500.00]
MS
00899-1806-SC-
fraction18



NL:
3.12E3
UV_VIS_1
UV
00899-
1806-SC-
fraction18

00899-1806-SC-fraction18 #669 RT: 6.37 AV: 1 NL: 2.57E5
F: FTMS - p ESI Full ms [50.00-1500.00]

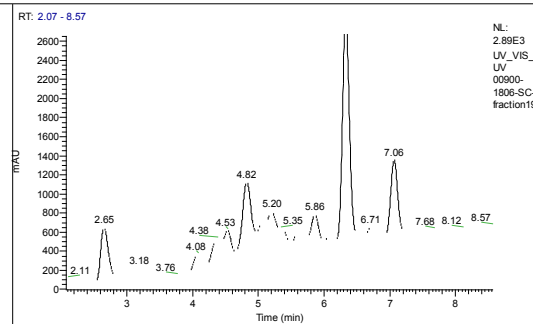
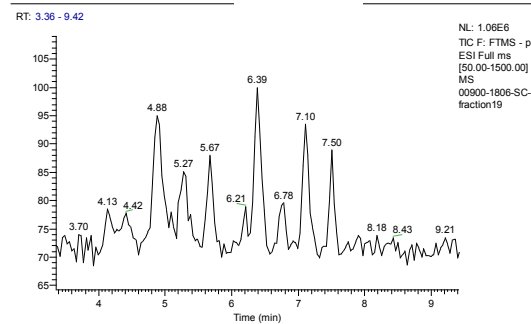
00899-1806-SC-fraction18 #1892 RT: 6.31 AV: 1 NL: 2.39E4 microAU
F: FTMS - p ESI Full ms [50.00-1500.00]



C:\Xcalibur\...00900-1806-SC-fraction19

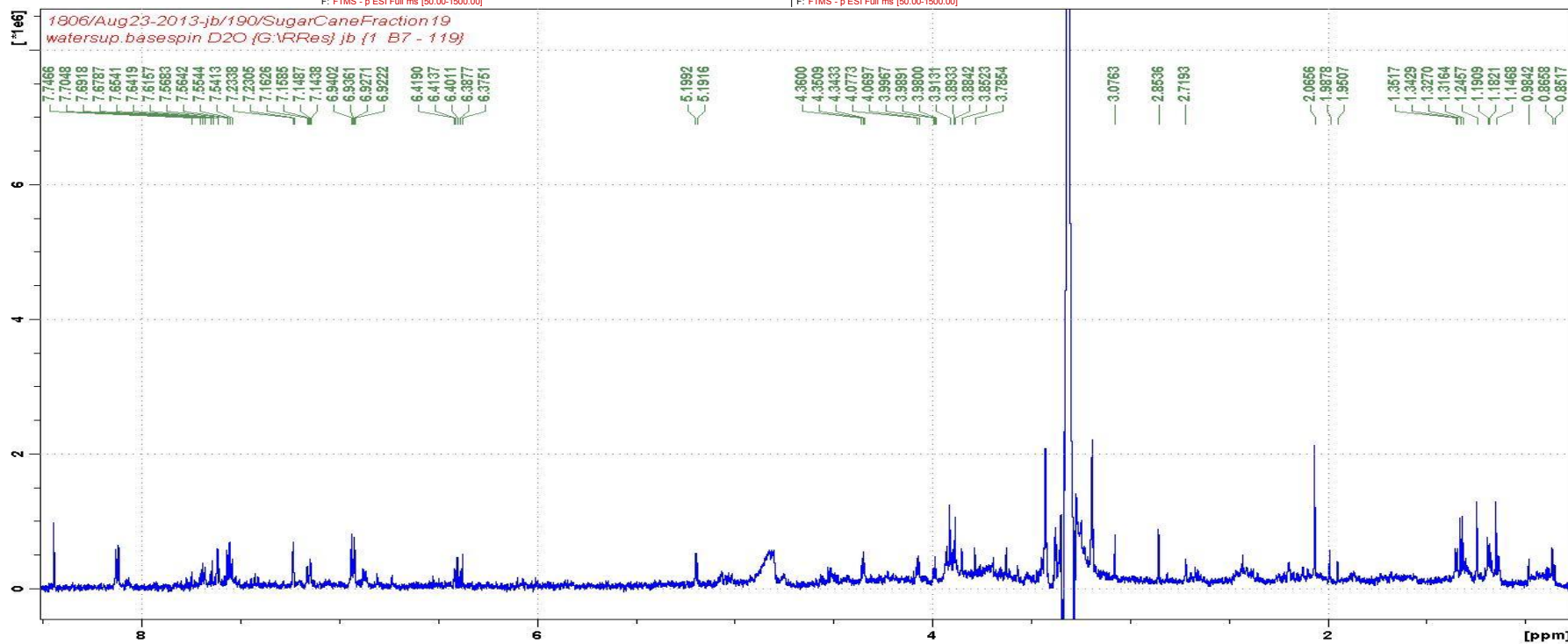
24/08/2013 02:29:25

SC-fraction19



00900-1806-SC-fraction19 #549 RT: 5.31 AV: 1 NL: 1.07E5
F: FTMS - p ESI Full ms [50.00-1500.00]

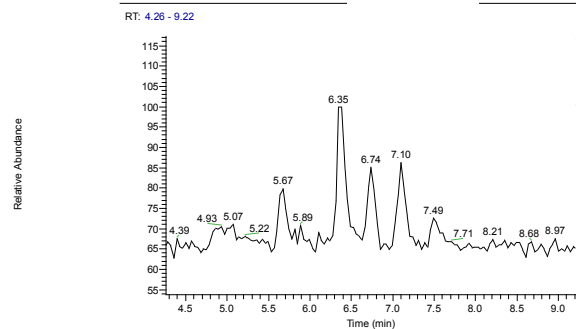
00900-1806-SC-fraction19 #1557 RT: 5.19 AV: 1 NL: 1.93E4 microAU
F: FTMS - p ESI Full ms [50.00-1500.00]



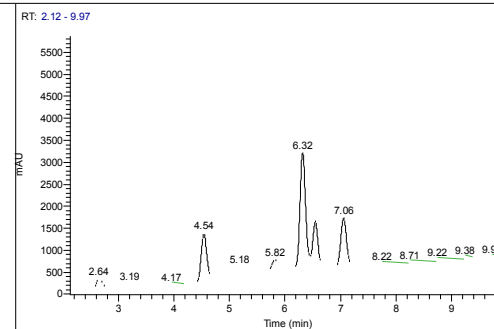
C:\Xcalibur\...00901-1806-SC-fraction20

24/08/2013 03:00:55

SC-fraction20



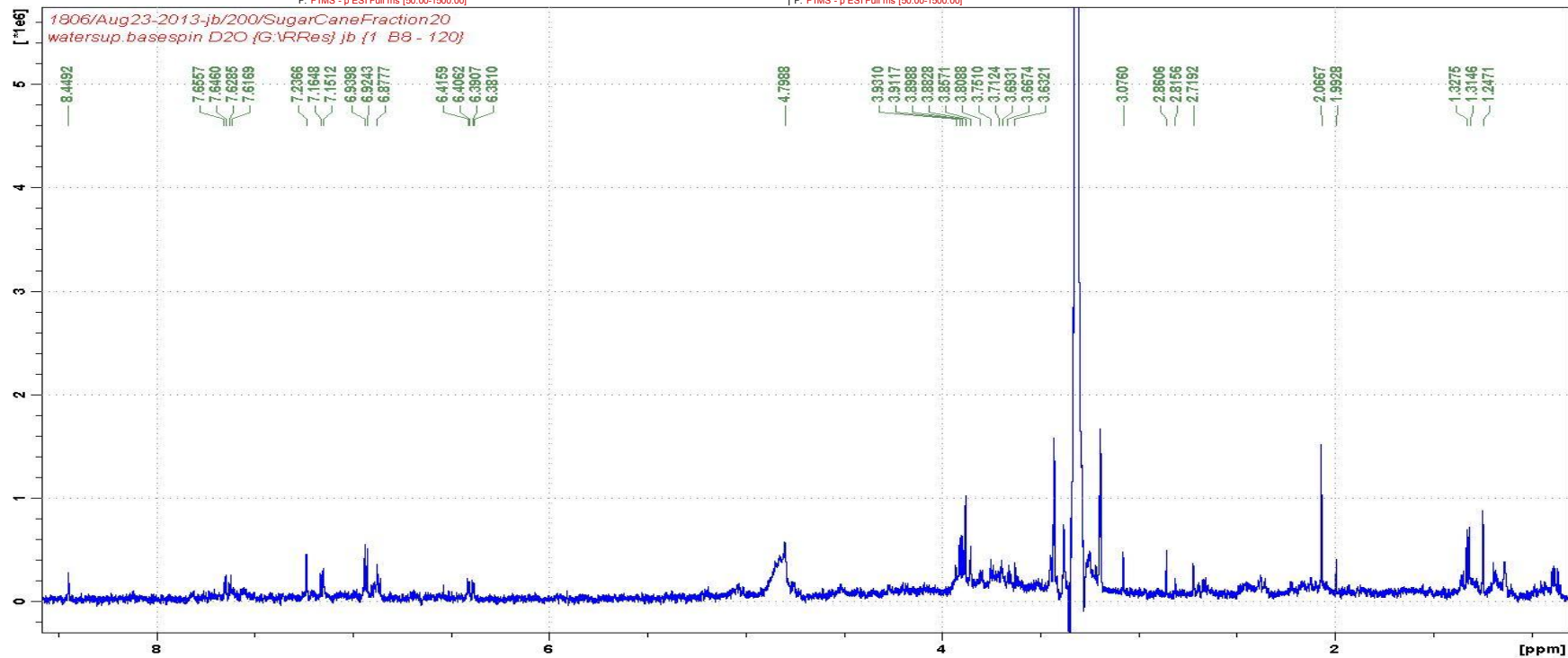
NL: 1.15E6
TIC F: FTMS - p
ESI Full ms
[50.00-1500.00]
MS
00901-1806-SC-
fraction20



NL: 3.22E3
UV_VIS_1
UV
00901-
1806-SC-
fraction20

00901-1806-SC-fraction20 #753 RT: 7.14 AV: 1 NL: 1.09E5
F: FTMS - p ESI Full ms [50.00-1500.00]

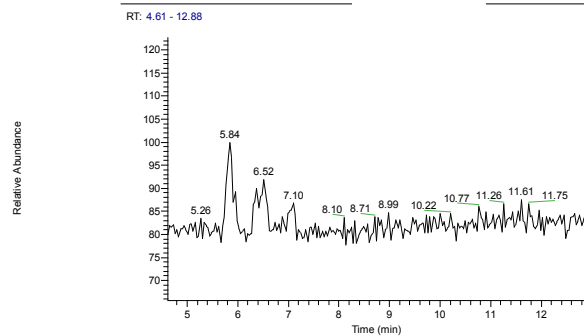
00901-1806-SC-fraction20 #2117 RT: 7.06 AV: 1 NL: 2.33E4 microAU
F: FTMS - p ESI Full ms [50.00-1500.00]



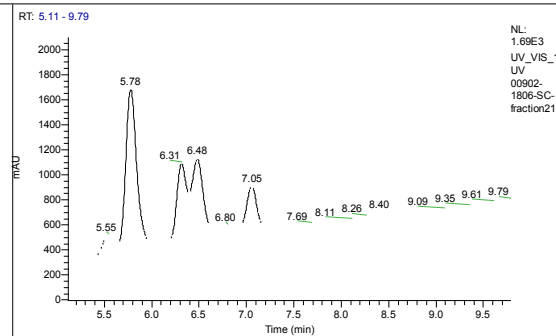
C:\xcalibur...100902-1806-SC-fraction21

24/08/2013 03:32:22

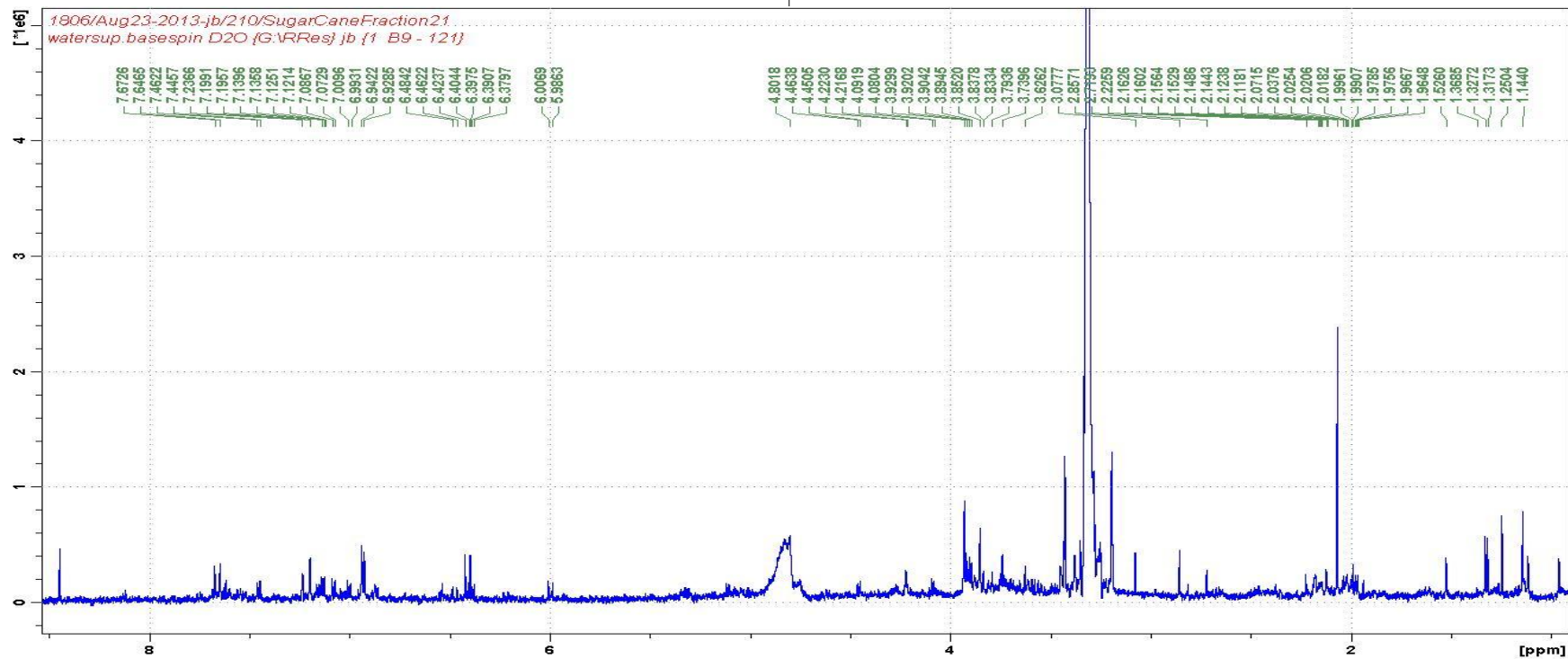
SC-fraction21

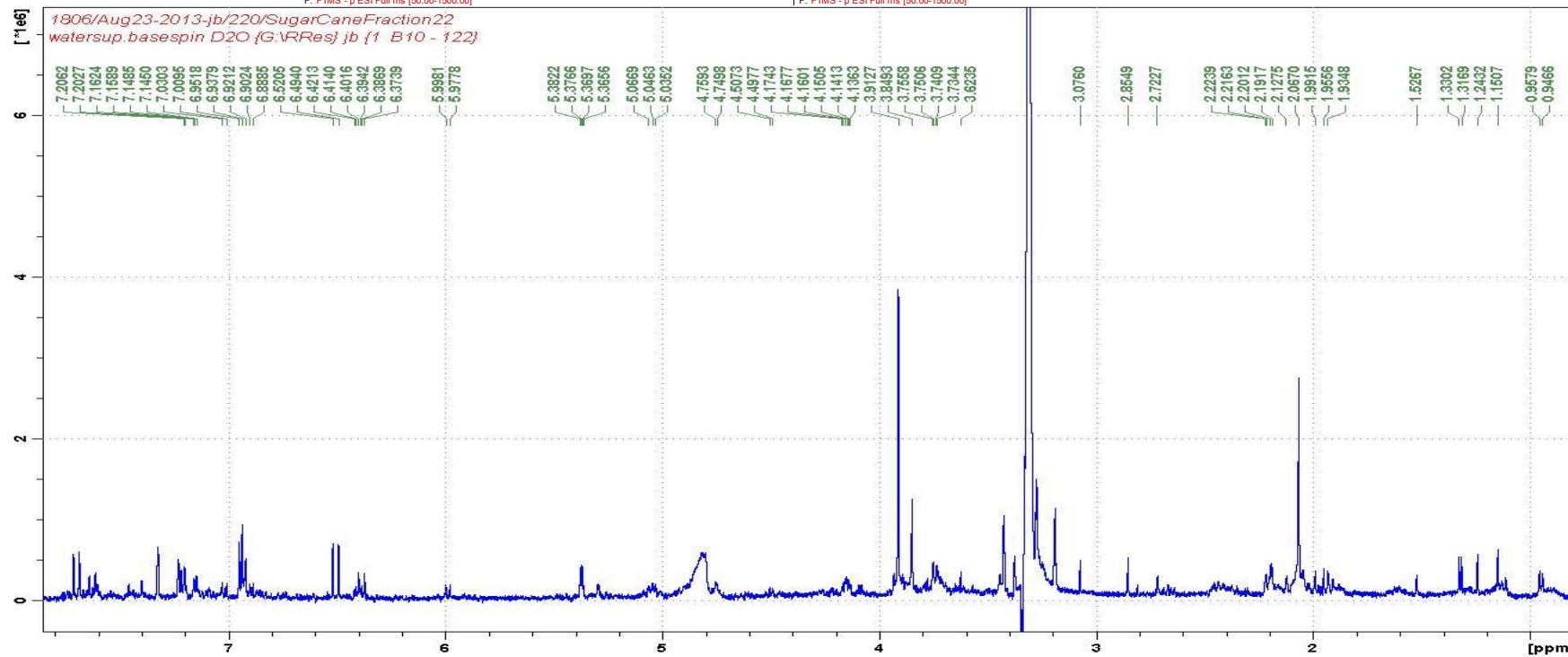
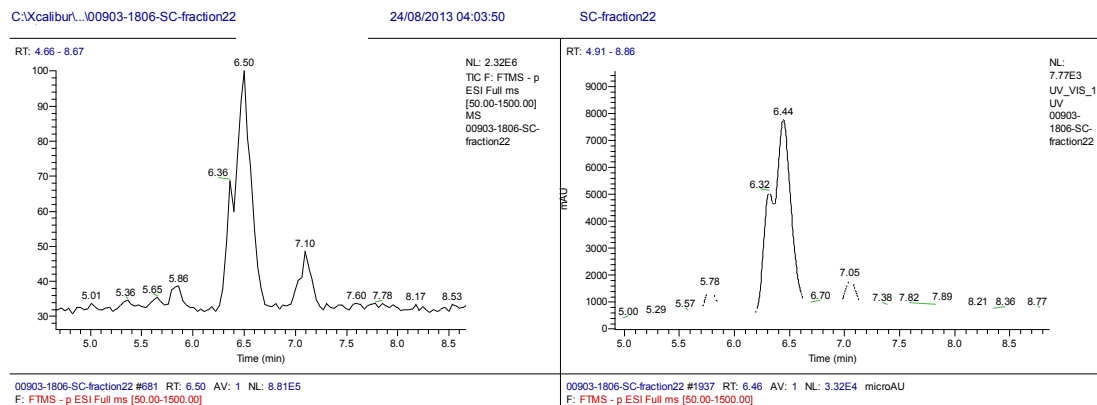


NL: 9.31E5
TIC F: FTMS - p
ESI Full ms
[50.00-1500.00]
MS
00902-1806-SC-
fraction21



NL:
1.69E3
UV_VIS_1
UV
00902-
1806-SC-
fraction21

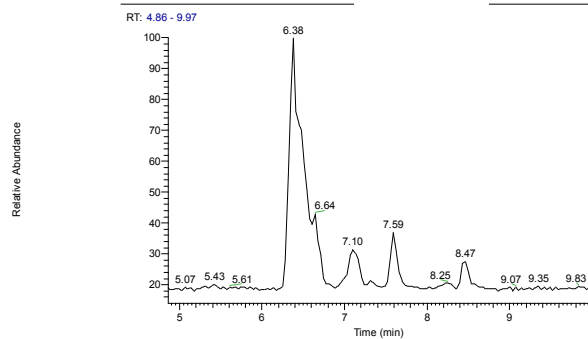




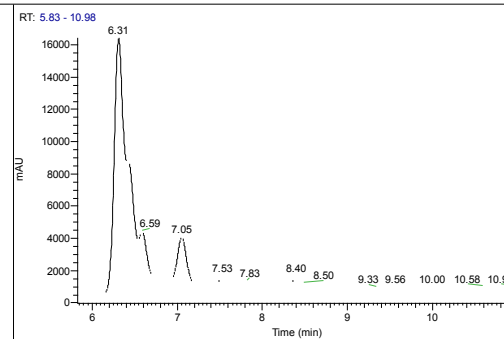
C:\Xcalibur...00904-1806-SC-fraction23

24/08/2013 04:35:20

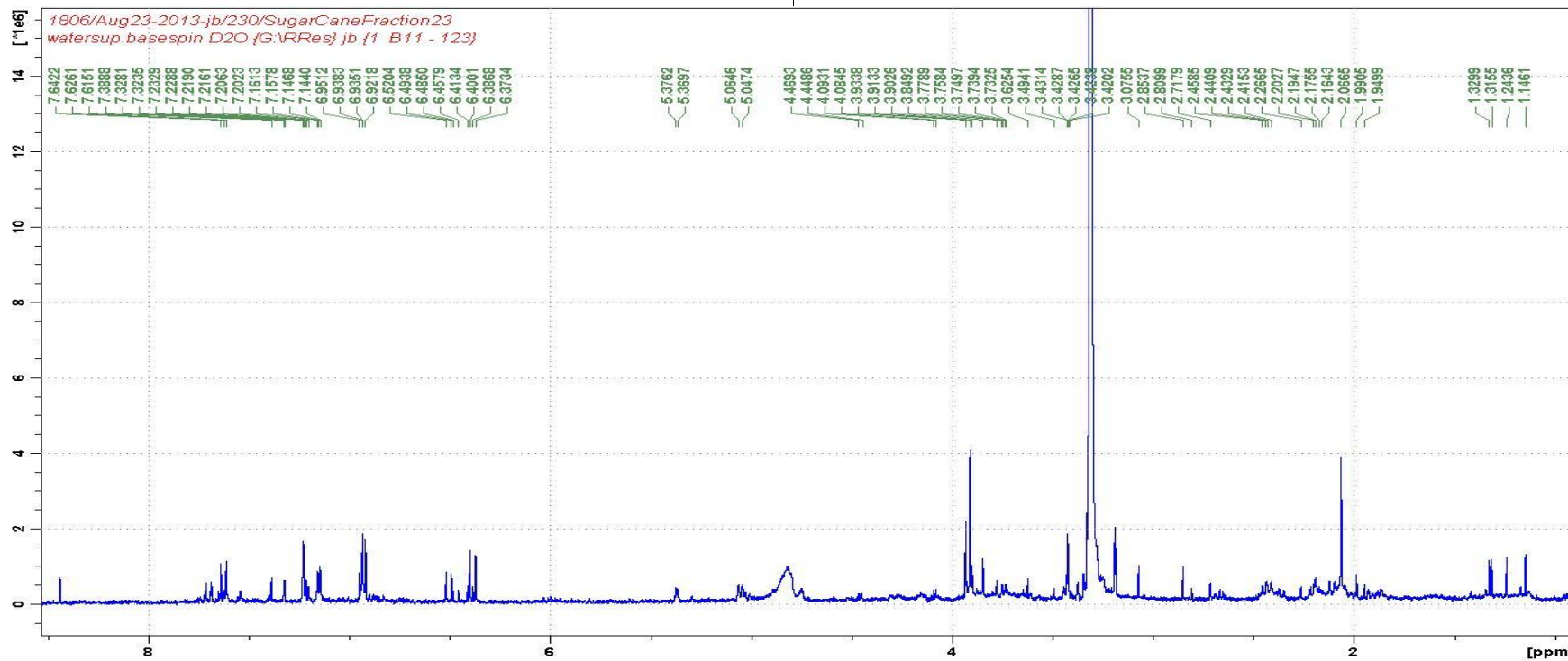
SC-fraction23



NL: 4.00E6
TIC F: FTMS - p
ESI Full ms
[50.00-1500.00]
MS
00904-1806-SC-
fraction23



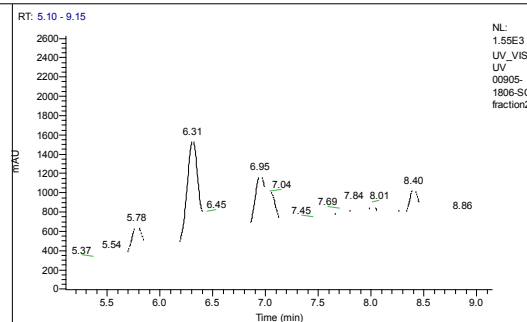
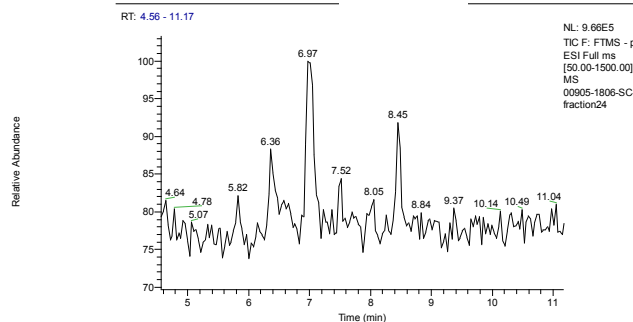
NL:
1.64E4
UV_VIS_1
UV
00904-
1806-SC-
fraction23



C:\Xcalibur\...00905-1806-SC-fraction24

24/08/2013 05:06:47

SC-fraction24



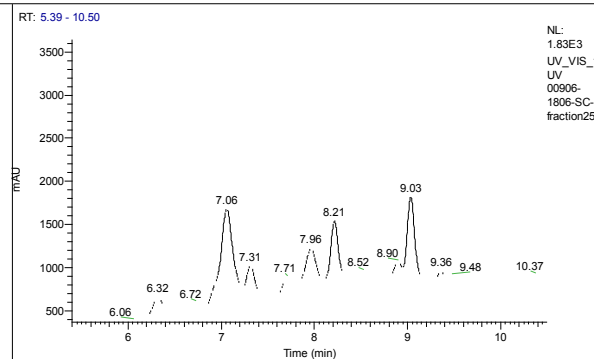
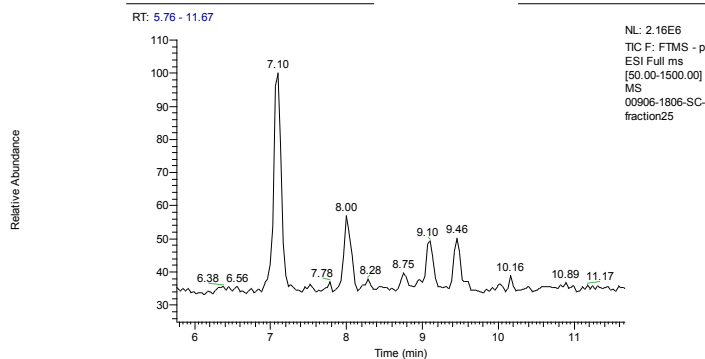
00905-1806-SC-fraction24 #733 RT: 6.97 AV: 1 NL: 1.97E5
F: FTMS - p ESI Full ms [50.00-1500.00]

00905-1806-SC-fraction24 #2085 RT: 6.95 AV: 1 NL: 2.31E4 microAU
F: FTMS - p ESI Full ms [50.00-1500.00]

C:\Xcalibur\...00906-1806-SC-fraction25

24/08/2013 05:38:15

SC-fraction25



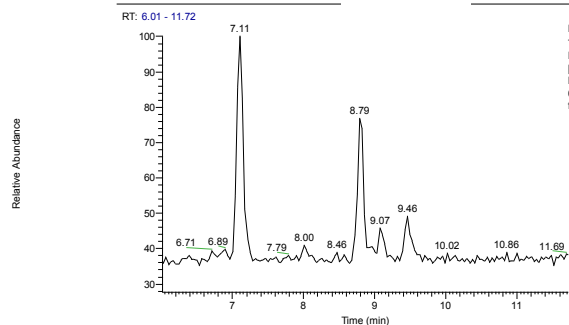
00906-1806-SC-fraction25 #745 RT: 7.10 AV: 1 NL: 5.75E5
F: FTMS - p ESI Full ms [50.00-1500.00]

00906-1806-SC-fraction25 #2515 RT: 8.38 AV: 1 NL: 2.39E4 microAU
F: FTMS - p ESI Full ms [50.00-1500.00]

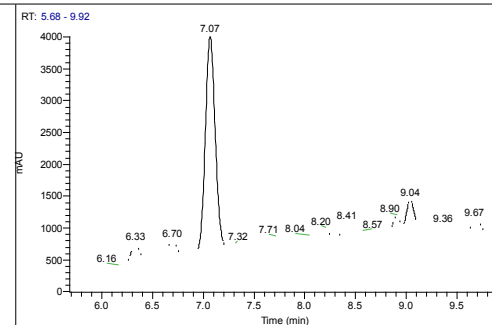
C:\Xcalibur\...00907-1806-SC-fraction26

24/08/2013 06:09:43

SC-fraction26



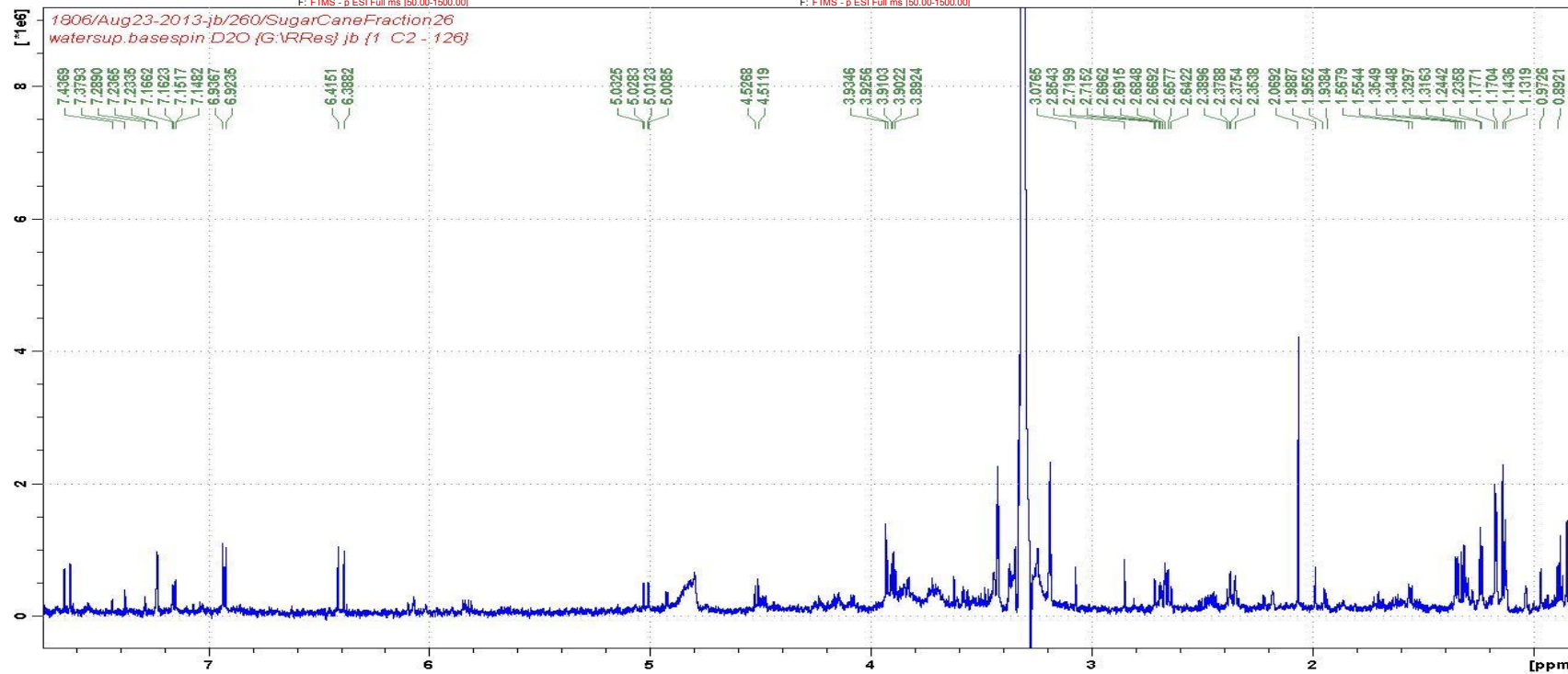
NL: 2.04E6
TIC F: FTMS - p
ESI Full ms
[50.00-1500.00]
MS
00907-1806-SC-
fraction26



NL:
4.01E3
UV_VIS_1
UV
00907-
1806-SC-
fraction26

00907-1806-SC-fraction26 #937 RT: 8.79 AV: 1 NL: 5.55E5
F: FTMS - p ESI Full ms [50.00-1500.00]

00907-1806-SC-fraction26 #2670 RT: 8.90 AV: 1 NL: 2.57E4 microAU
F: FTMS - p ESI Full ms [50.00-1500.00]

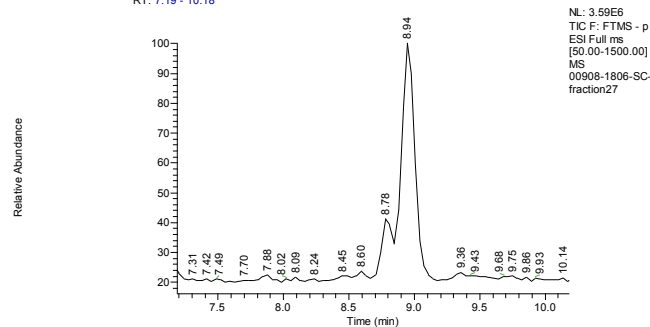


C:\xcalibur...00908-1806-SC-fraction27

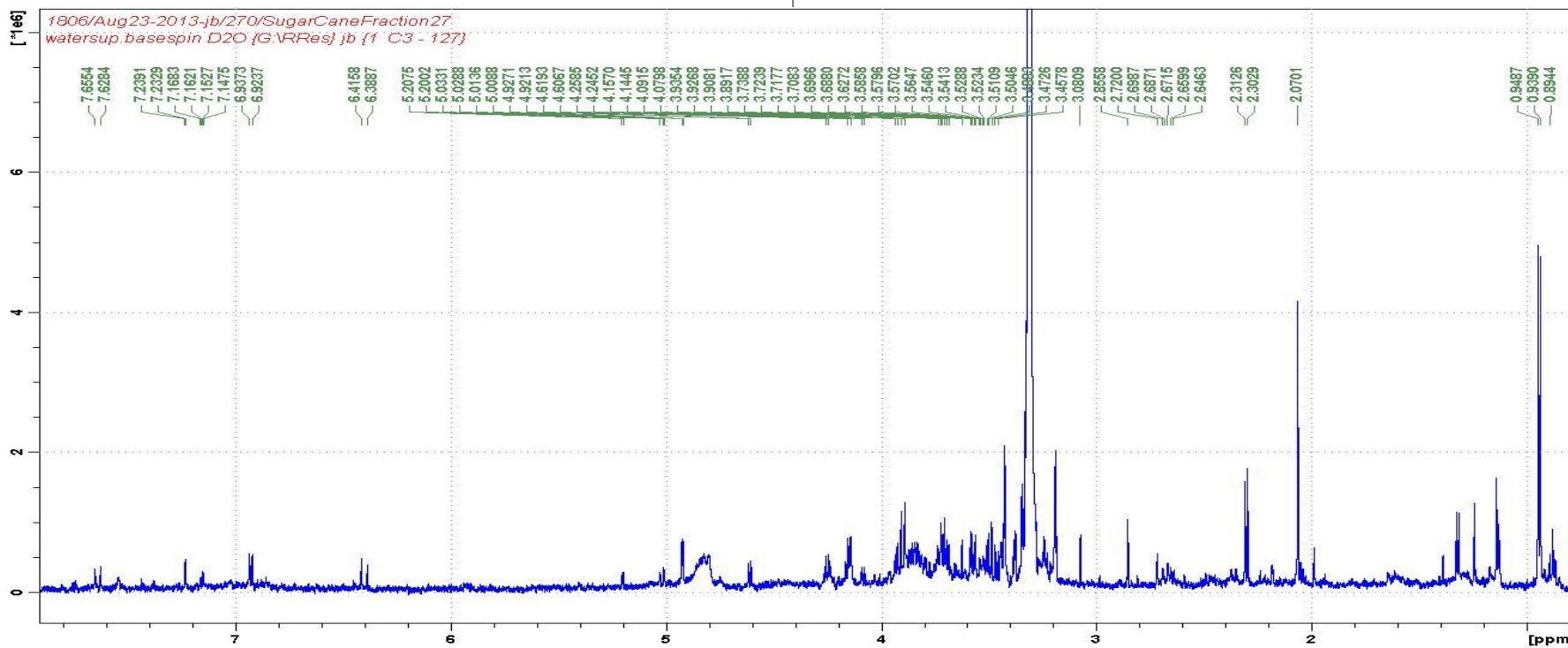
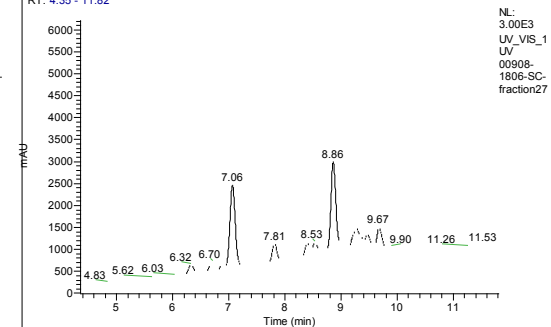
07/08/2013 06:41:10

SC-fraction27

RT: 7.19 - 10.18



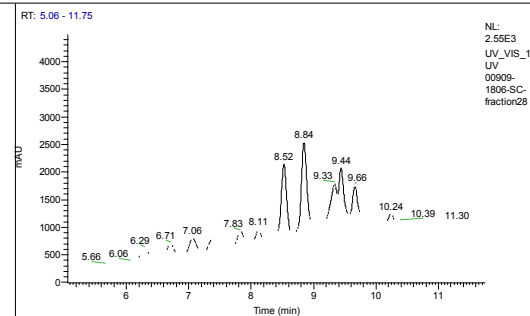
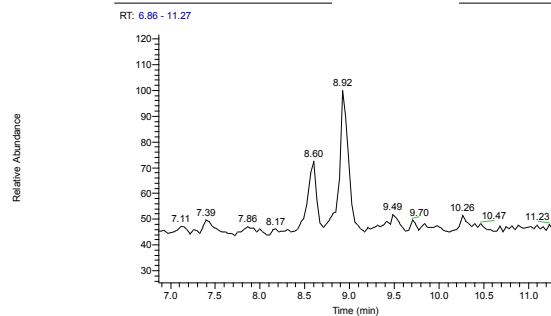
RT: 4.35 - 11.82



C:\xcalibur\...00909-1806-SC-fraction28

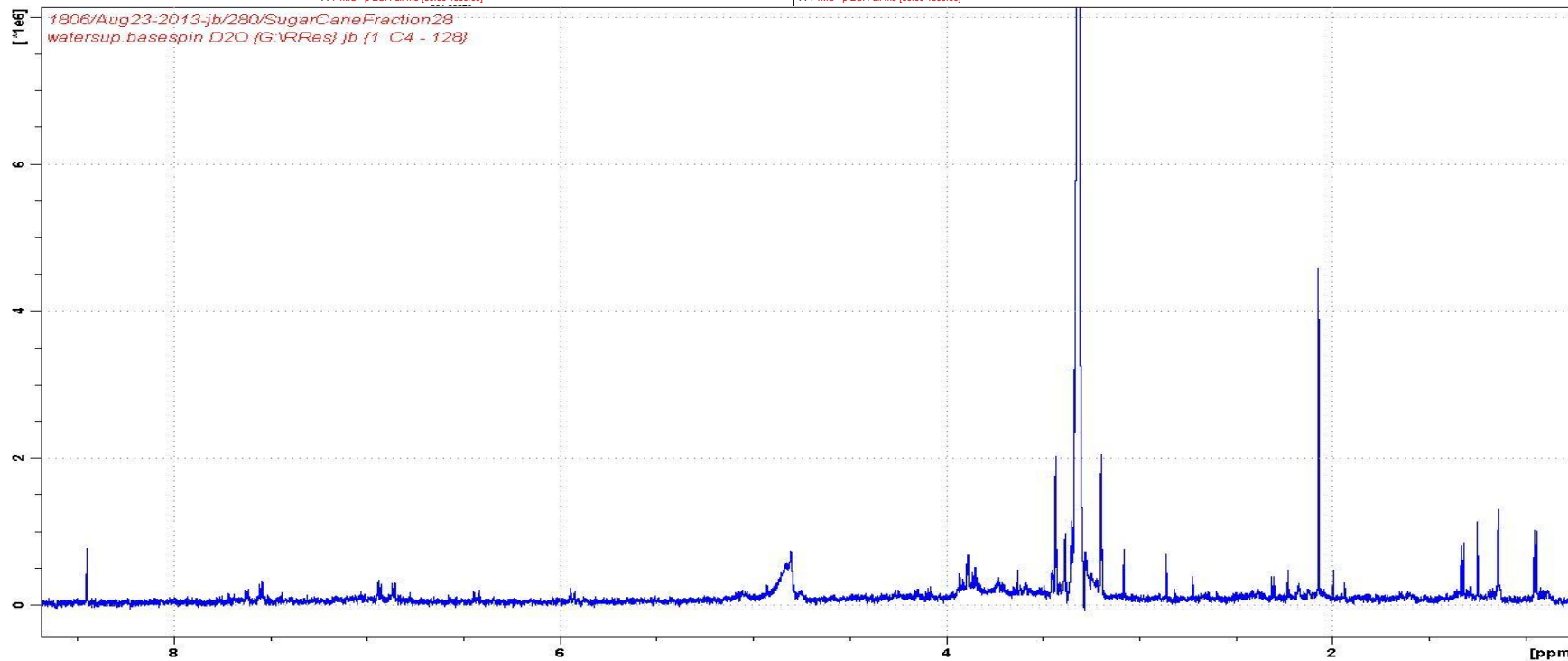
24/08/2013 07:12:40

SC-fraction28



00909-1806-SC-fraction28 #905 RT: 8.53 AV: 1 NL: 1.28E5
F: FTMS - p ESI Full ms [50.00-1500.00]

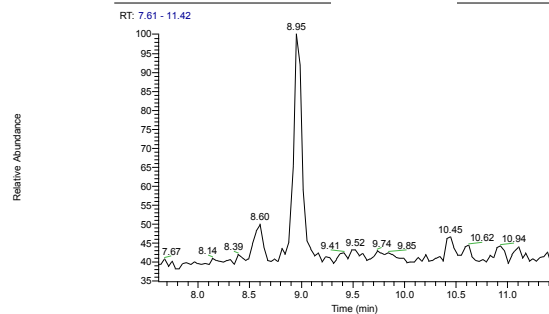
00909-1806-SC-fraction28 #2557 RT: 8.52 AV: 1 SB: 2 8.41, 8.67 NL: 1.27E4 microAU
F: FTMS - p ESI Full ms [50.00-1500.00]



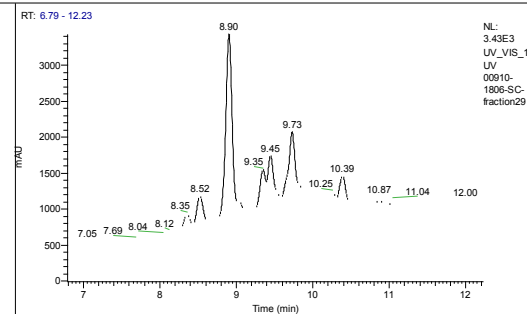
C:\xcalibur...00910-1806-SC-fraction29

24/08/2013 07:44:09

SC-fraction29



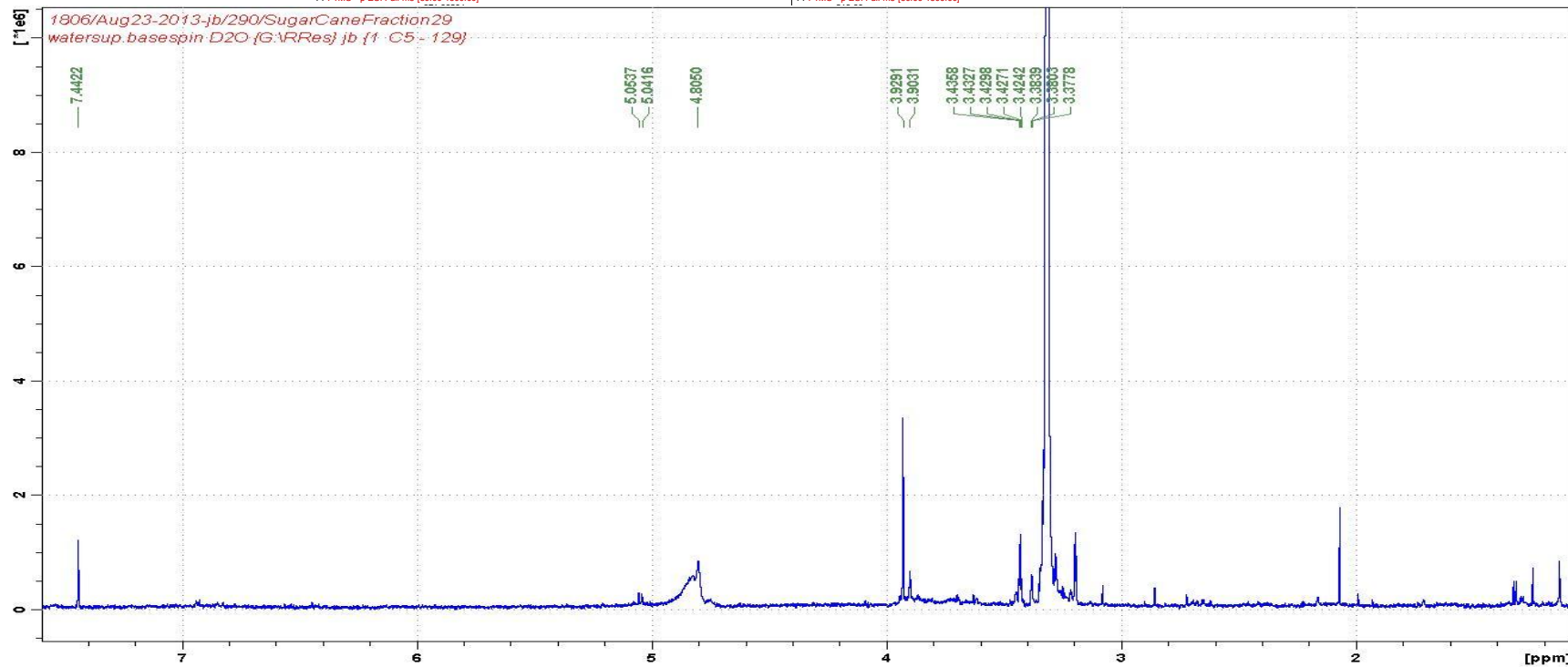
NL: 1.85E6
TIC F: FTMS - p
ESI Full ms
[50.00-1500.00]
MS
00910-1806-SC-
fraction29

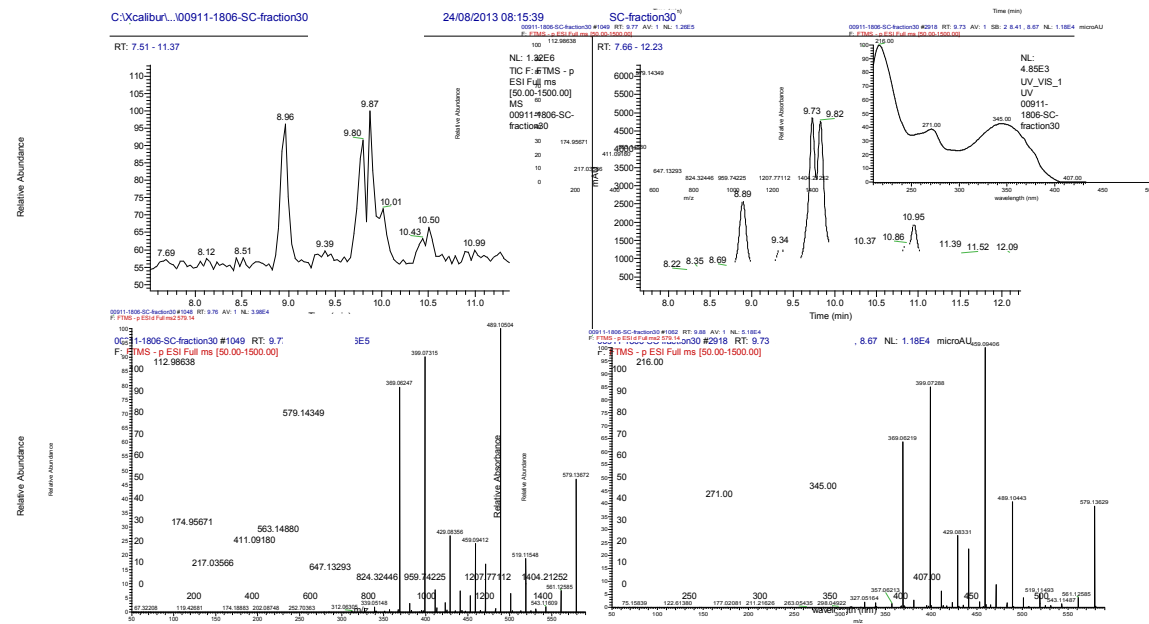


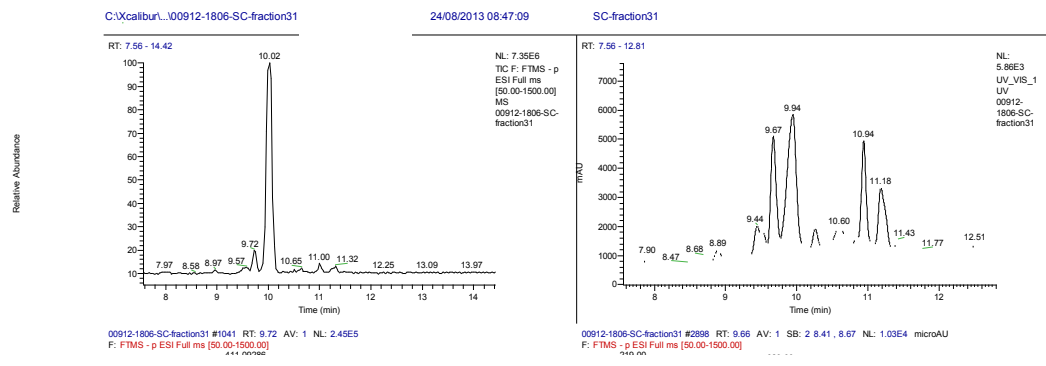
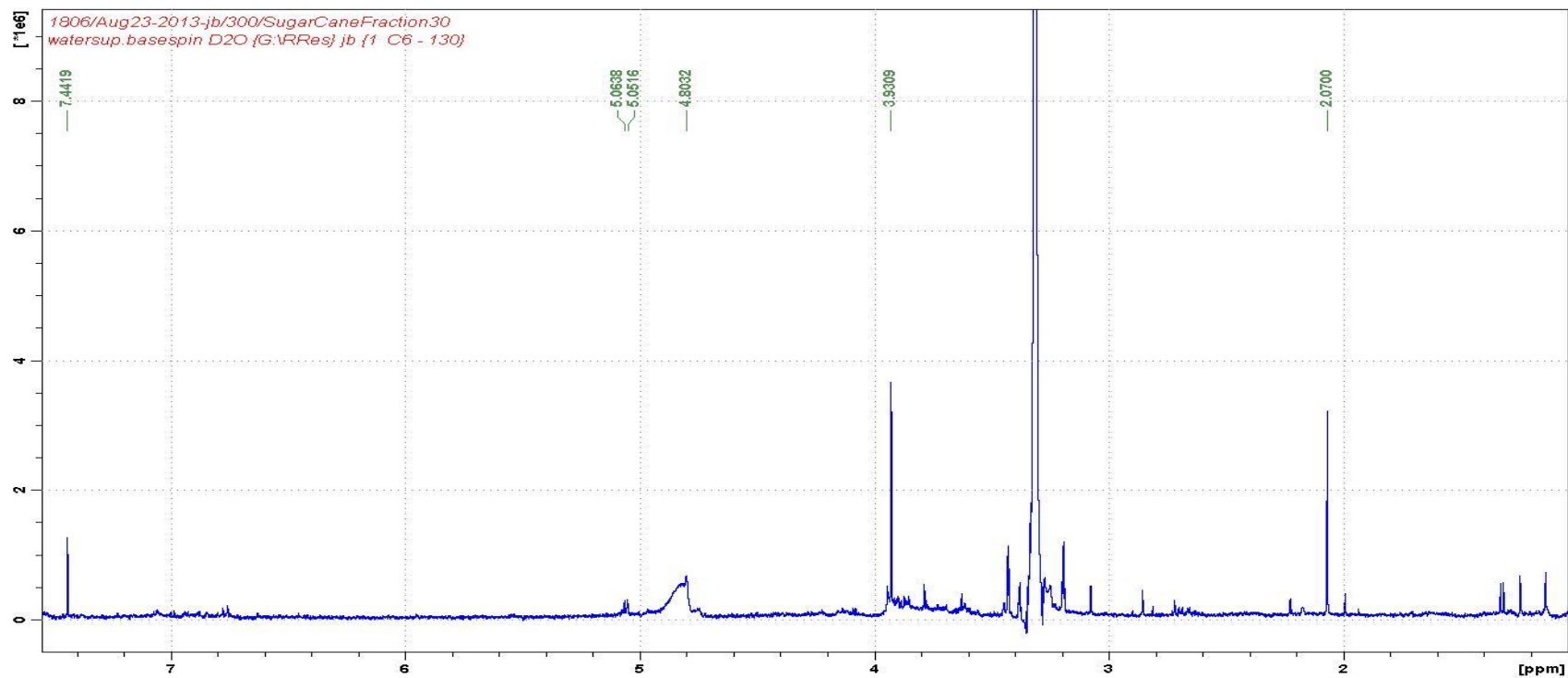
NL:
3.43E3
UV_VIS_1
UV
00910-
1806-SC-
fraction29

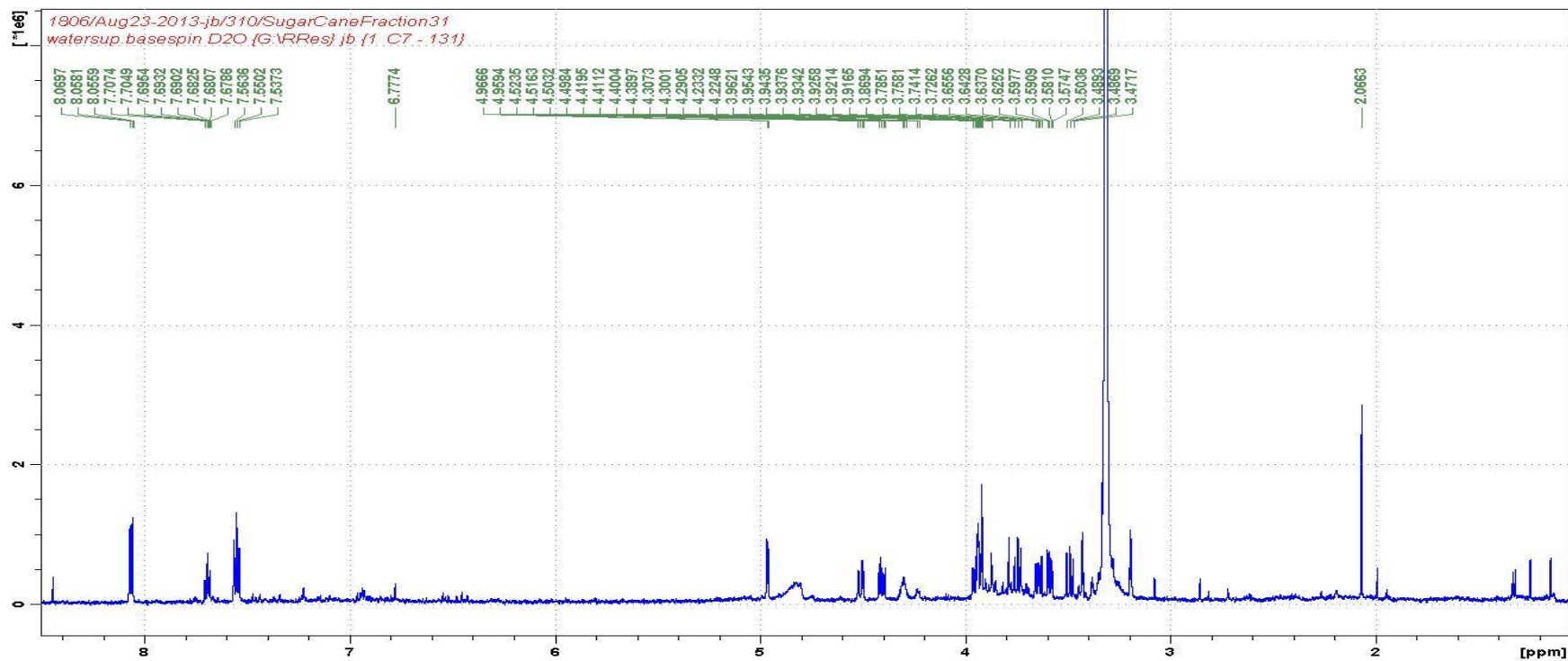
00910-1806-SC-fraction29 #957 RT: 8.99 AV: 1 NL: 5.58E5
F: FTMS - p ESI Full ms [50.00-1500.00]

00910-1806-SC-fraction29 #2672 RT: 8.91 AV: 1 SB: 2 8.41, 8.67 NL: 1.75E4 microAU
F: FTMS - p ESI Full ms [50.00-1500.00]





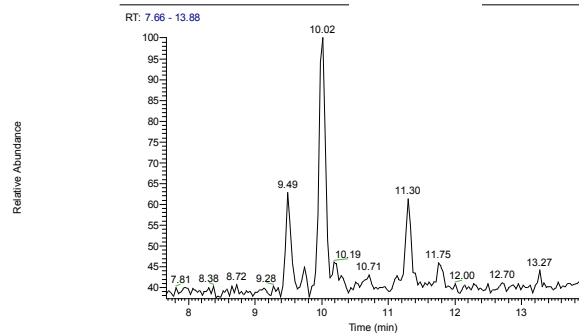




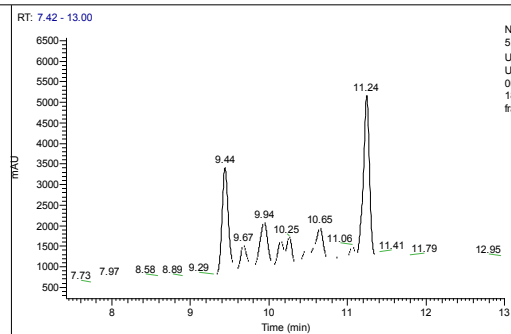
C:\Xcalibur\...00913-1806-SC-fraction32

24/08/2013 09:18:38

SC-fraction32



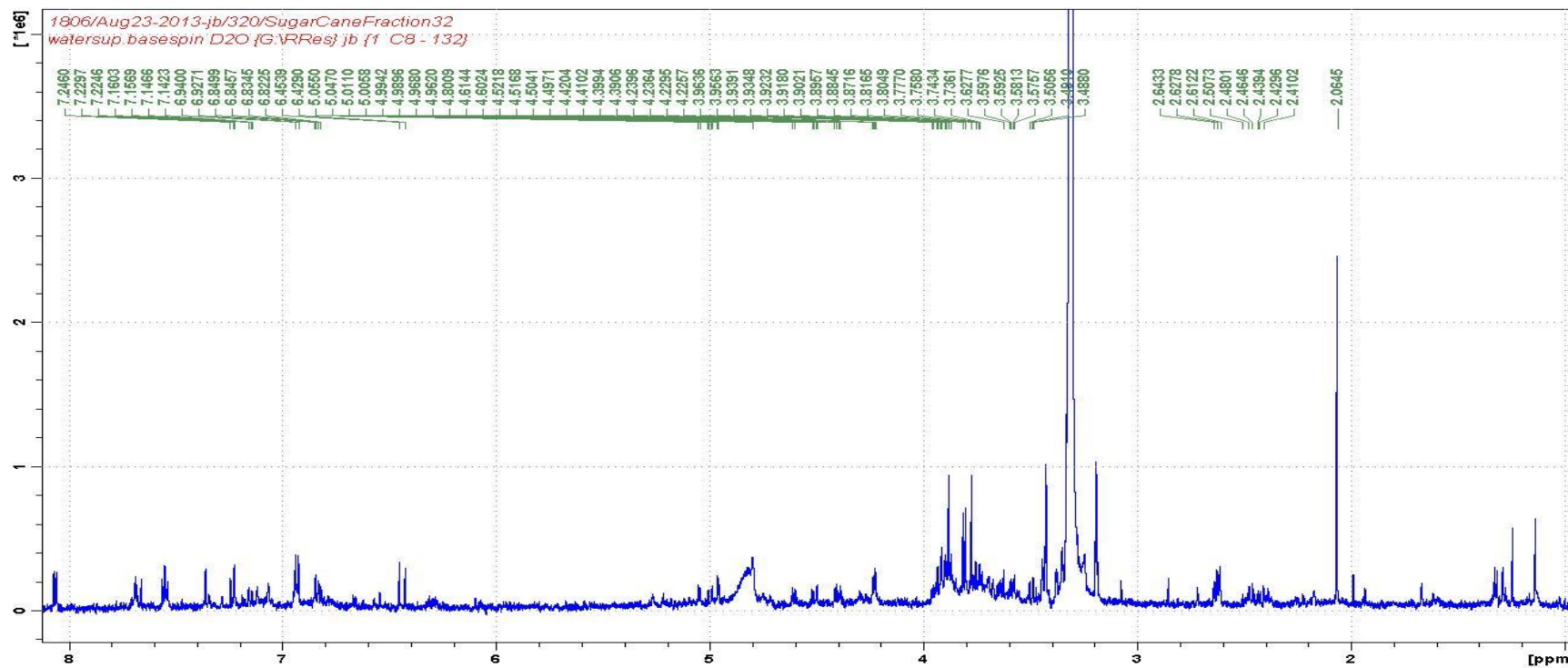
NL: 1.89E6
TIC F: FTMS - p
ESI Full ms
[50.00-1500.00]
MS
00913-1806-SC-
fraction32



NL:
5.18E3
UV_VIS_1
UV
00913-
1806-SC-
fraction32

00913-1806-SC-fraction32 #1017 RT: 9.49 AV: 1 NL: 1.82E5
F: FTMS - p ESI Full ms [50.00-1500.00]

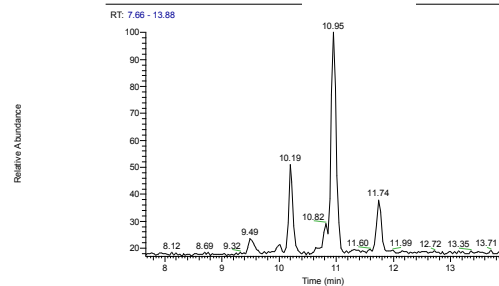
00913-1806-SC-fraction32 #2631 RT: 9.44 AV: 1 SB: 2 8.41, 8.67 NL: 7.33E3 microAU
F: FTMS - p ESI Full ms [50.00-1500.00]



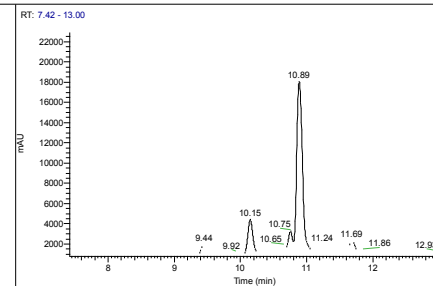
C:\xcalibur\...00914-1806-SC-fraction33

24/08/2013 09:50:08

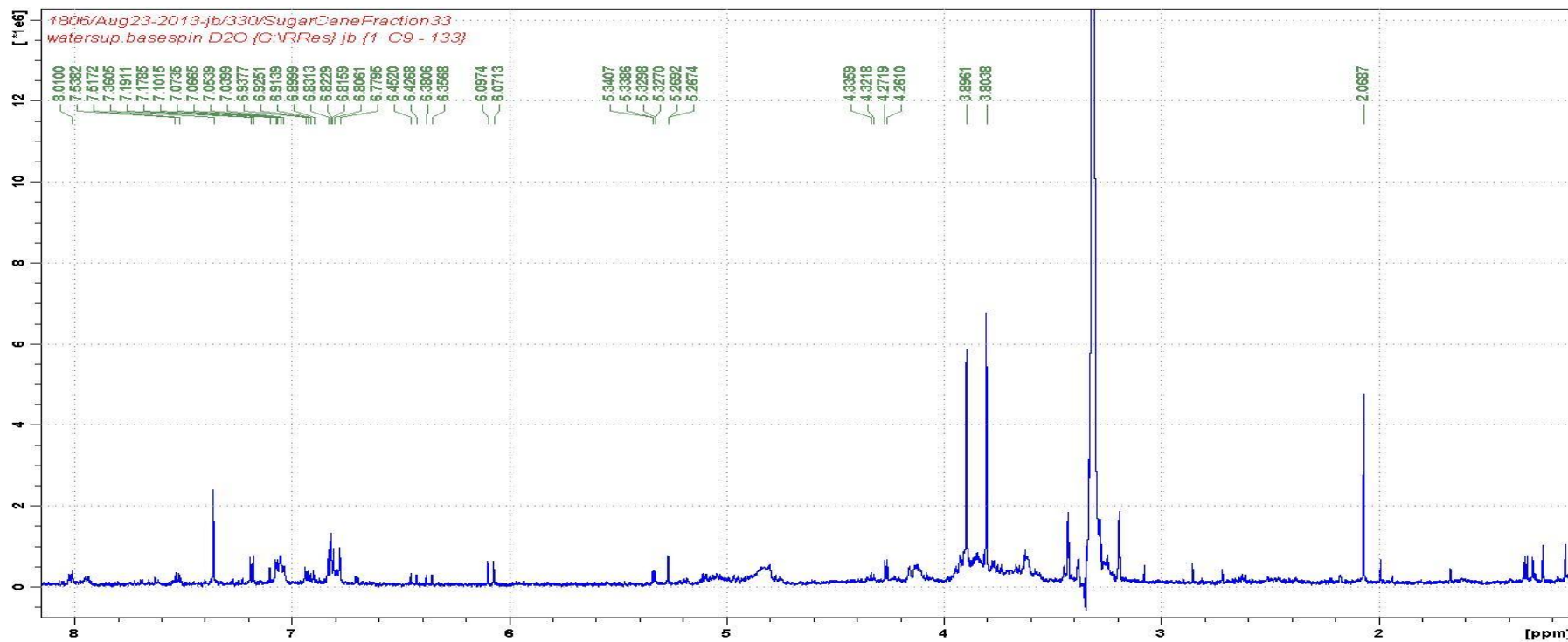
SC-fraction33



00914-1806-SC-fraction33 #1169 RT: 10.82 AV: 1 NL: 3.50E5
F: FTMS - p ESI Full ms [50.00-1500.00]



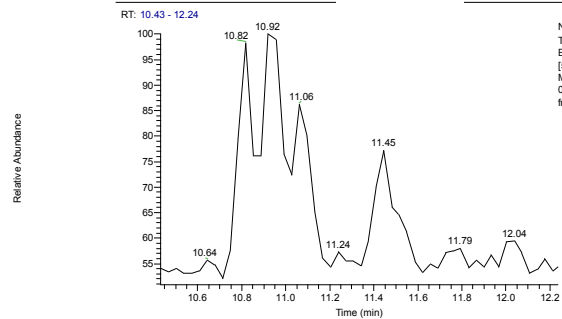
00914-1806-SC-fraction33 #3227 RT: 10.76 AV: 1 SB: 2 8.41, 8.67 NL: 1.05E4 microAU
F: FTMS - p ESI Full ms [50.00-1500.00]



C:\Xcalibur\...00915-1806-SC-fraction34

24/08/2013 10:21:38

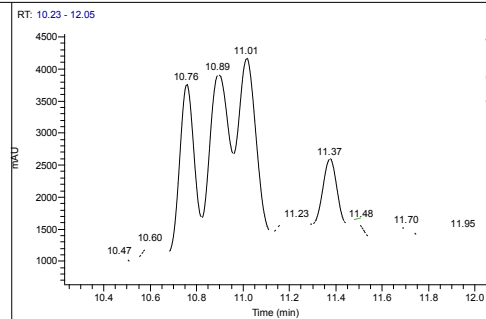
SC-fraction34



00915-1806-SC-fraction34 #1169 RT: 10.82 AV: 1 NL: 4.89E5

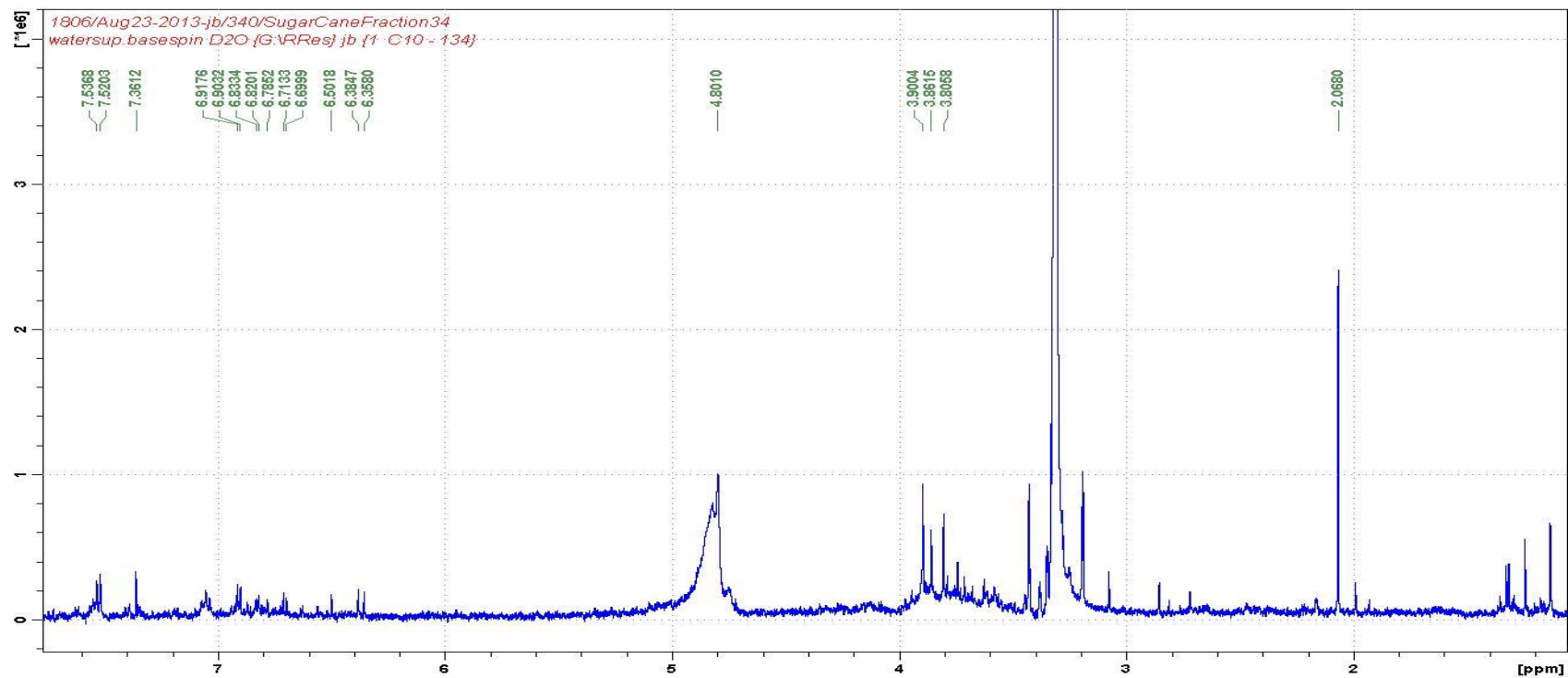
NL: 1.40E6
TIC F: FTMS - p
ESI Full ms
[50.00-1500.00]
MS

00915-1806-SC-fraction34



00915-1806-SC-fraction34 #3225 RT: 10.75 AV: 1 SB: 2.8.41, 8.67 NL: 1.11E4 microAU

NL: 4.16E3
UV_VIS_1
UV
00915-1806-SC-fraction34

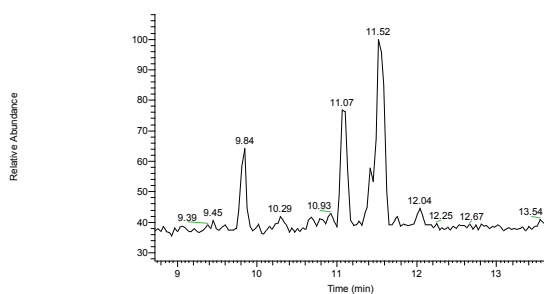


C:\xcalibur...\00916-1806-SC-fraction35

24/08/2013 10:53:07

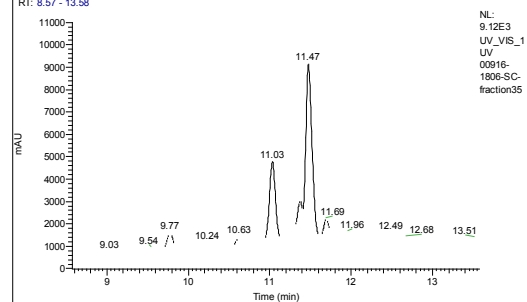
SC-fraction35

RT: 8.72 - 13.63



00916-1806-SC-fraction35 #1049 RT: 9.77 AV: 1 NL: 1.32E5
F: FTMS - o ESI Full ms 150.00-1500.001

RT: 8.57 - 13.58

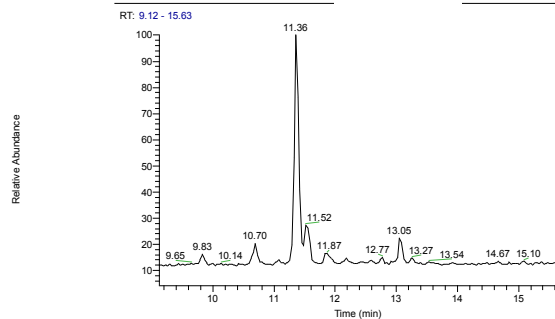


00916-1806-SC-fraction35 #2933 RT: 9.78 AV: 1 SB: 2.841, 8.67 NL: 1.20E4 microAU
F: FTMS - o ESI Full ms 150.00-1500.001

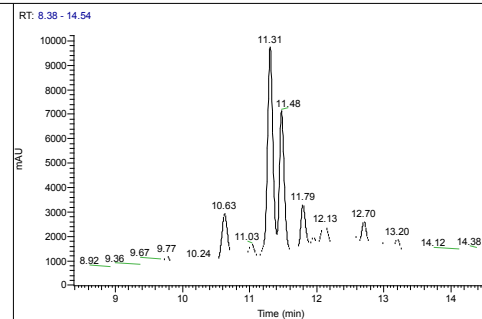
C:\Xcalibur\...00917-1806-SC-fraction36

24/08/2013 11:24:37

SC-fraction36



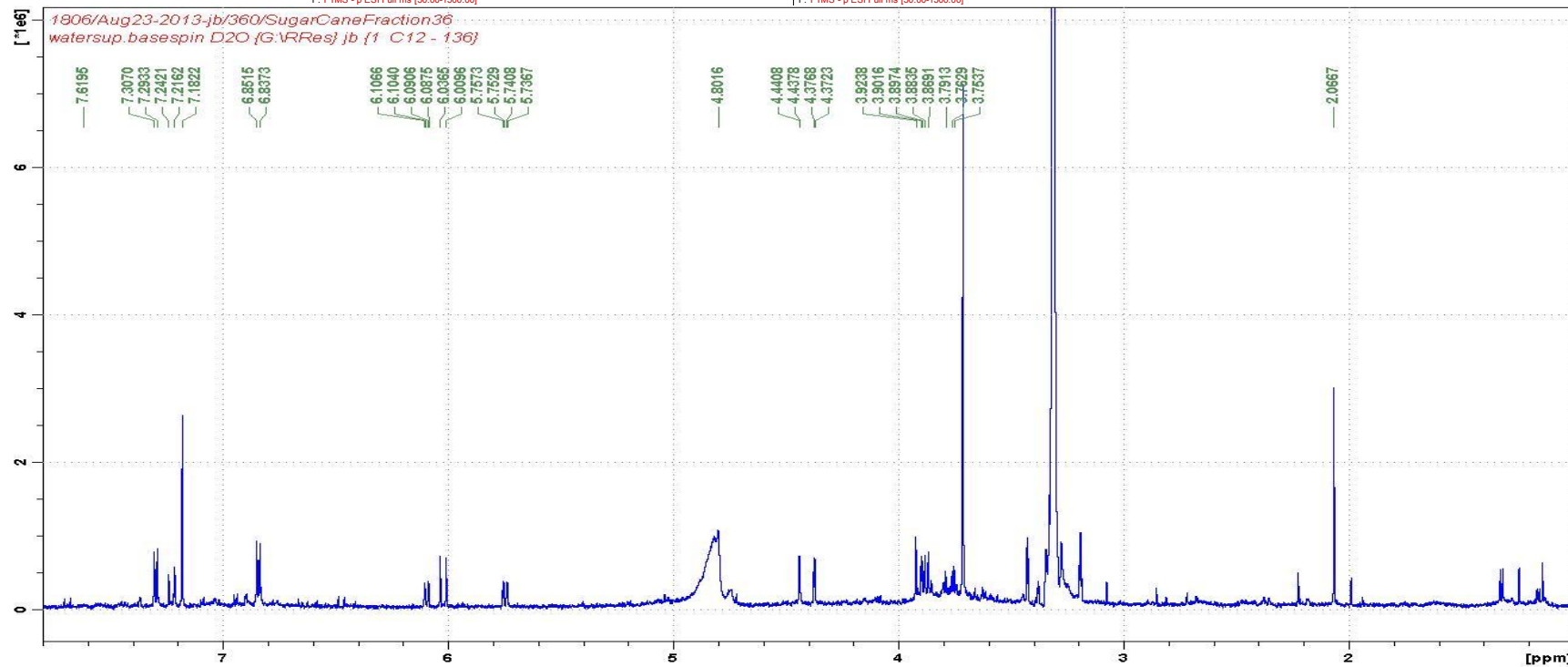
NL: 6.07E6
TIC F: FTMS - p
ESI Full ms
[50.00-1500.00]
MS
00917-1806-SC-
fraction36



NL:
9.76E3
UV_VIS_1
UV
00917-
1806-SC-
fraction36

00917-1806-SC-fraction36 #1233 RT: 11.36 AV: 1 NL: 2.49E6
F: FTMS - p ESI Full ms [50.00-1500.00]

00917-1806-SC-fraction36 #3394 RT: 11.31 AV: 1 SB: 2 8.41, 8.67 NL: 5.55E4 microAU
F: FTMS - p ESI Full ms [50.00-1500.00]

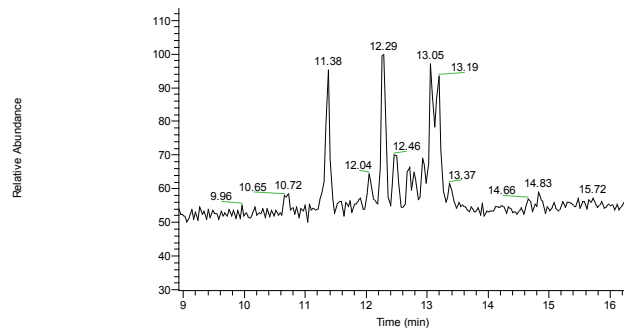


C:\Xcalibur...00918-1806-SC-fraction37

24/08/2013 11:56:07

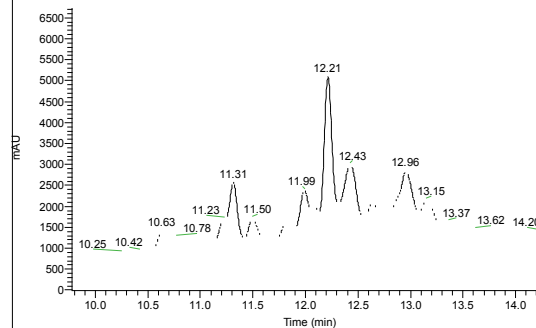
SC-fraction37

RT: 8.92 - 16.28

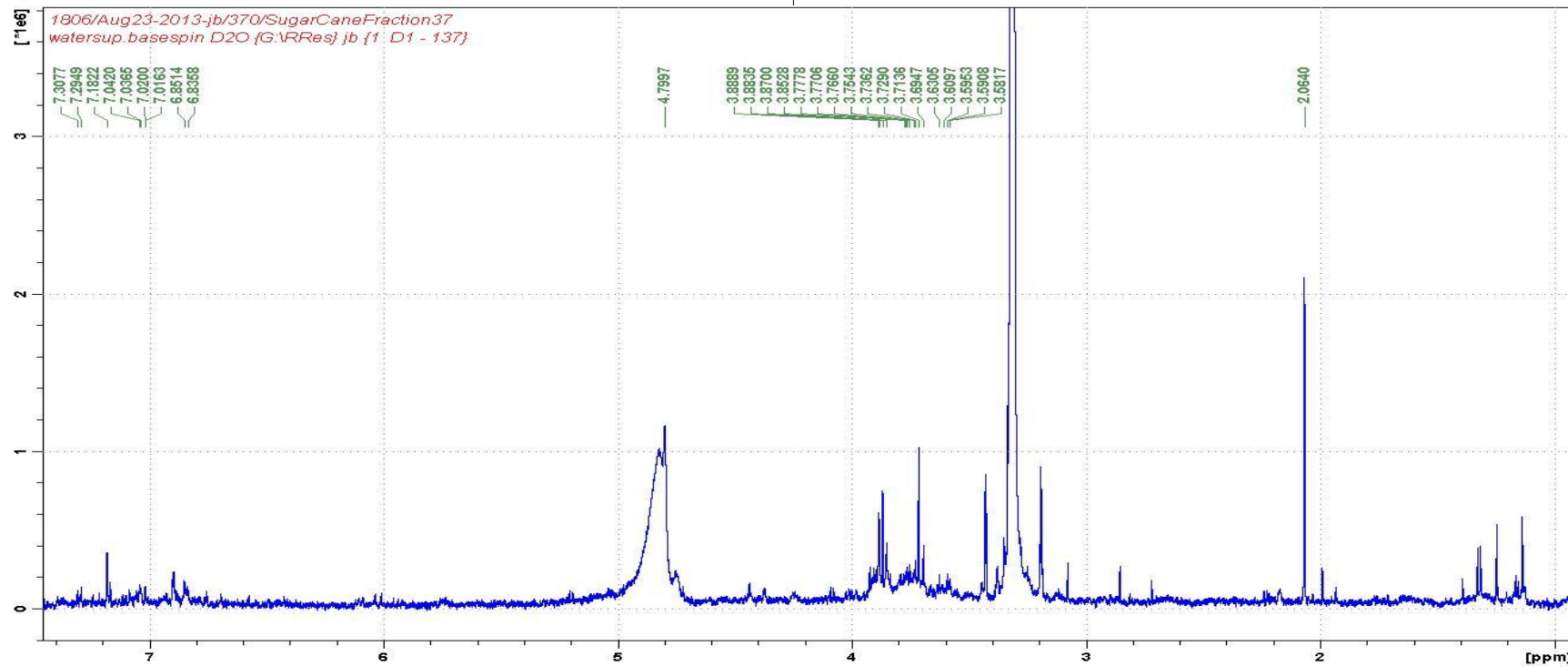


NL: 1.41E6
TIC F: FTMS - p
ESI Full.ms
[50.00-1500.00]
MS
00918-1806-SC-
fraction37

RT: 9.77 - 14.30



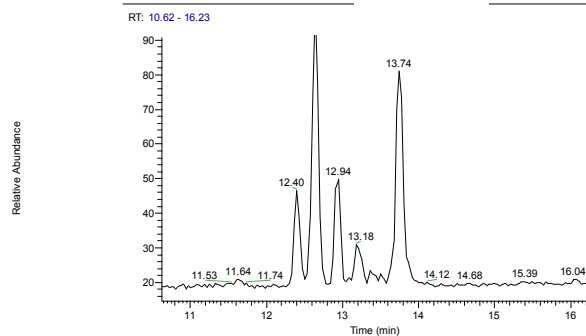
NL:
5.08E3
UV_VIS_1
UV
00918-
1806-SC-
fraction37



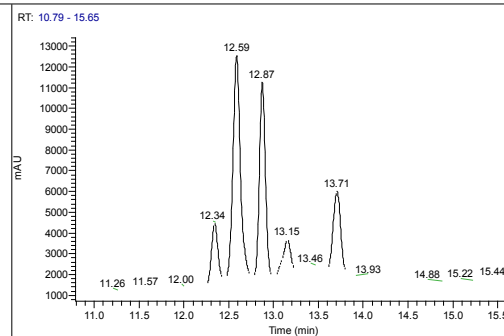
C:\Xcalibur\...00920-1806-SC-fraction39

24/08/2013 12:59:06

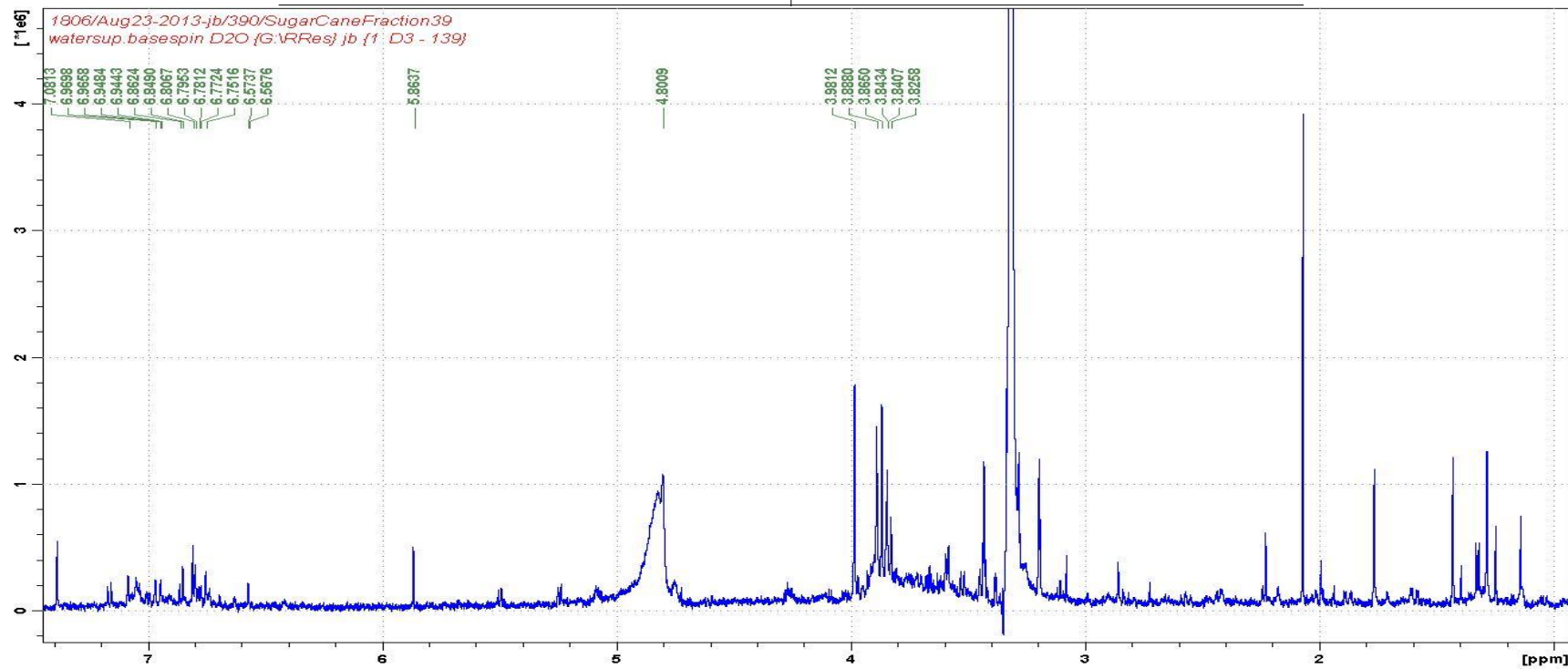
SC-fraction39



NL: 3.96E6
TIC F: FTMS - p
ESI Full ms
[50.00-1500.00]
MS
00920-1806-SC-
fraction39



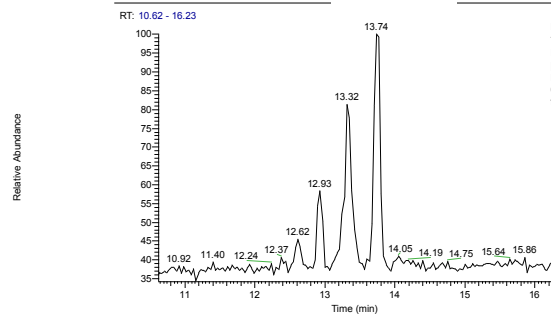
NL:
1.25E4
UV_VIS_1
UV
00920-
1806-SC-
fraction39



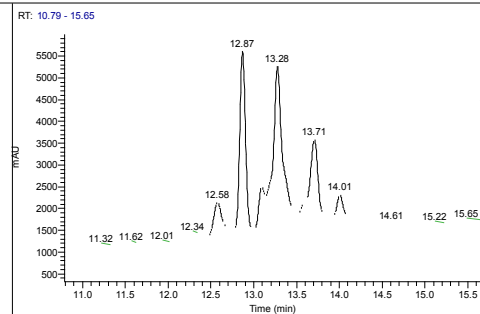
C:\Xcalibur\...00921-1806-SC-fraction40

24/08/2013 13:30:36

SC-fraction40



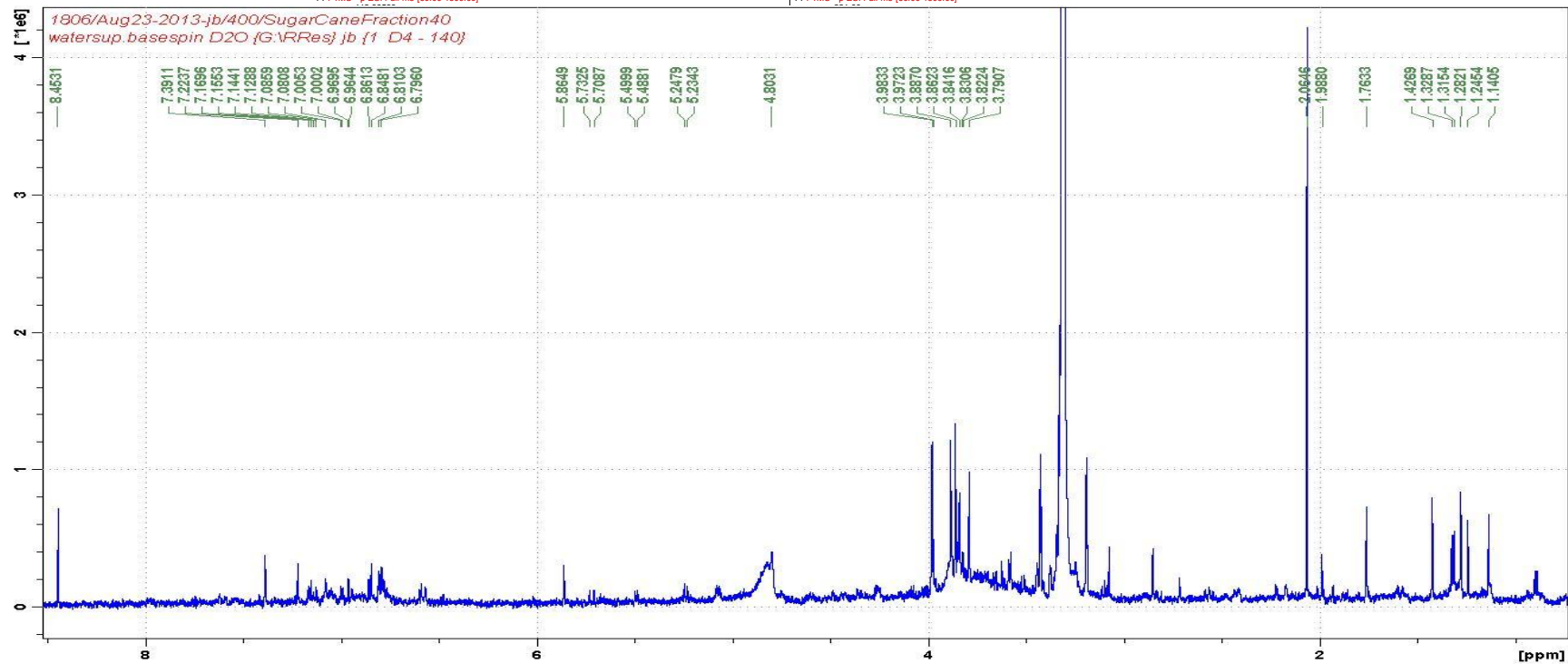
NL: 2.01E6
TIC F: FTMS - p
ESI Full ms
[50.00-1500.00]
MS
00921-1806-SC-
fraction40



NL:
5.60E3
UV_VIS_1
UV
00921-
1806-SC-
fraction40

00921-1806-SC-fraction40 #1437 RT: 13.14 AV: 1 NL: 1.55E5
F: FTMS - p ESI Full ms [50.00-1500.00]

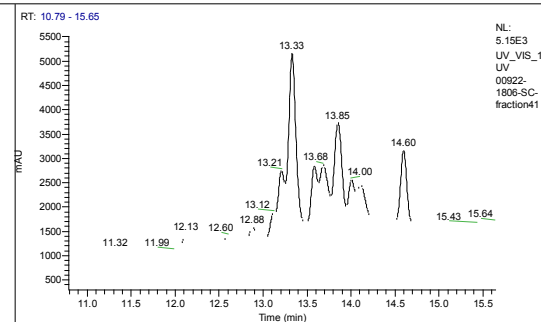
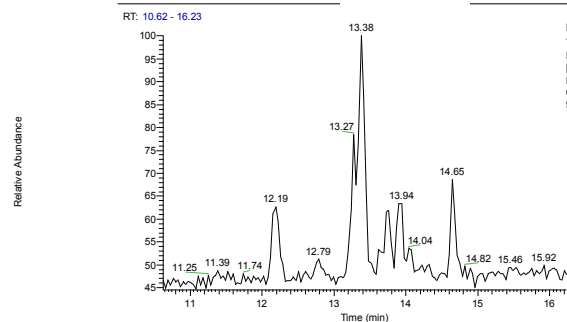
00921-1806-SC-fraction40 #3928 RT: 13.09 AV: 1 SB: 2 8.41, 8.67 NL: 1.71E4 microAU
F: FTMS - p ESI Full ms [50.00-1500.00]



C:\xcalibur...00922-1806-SC-fraction41

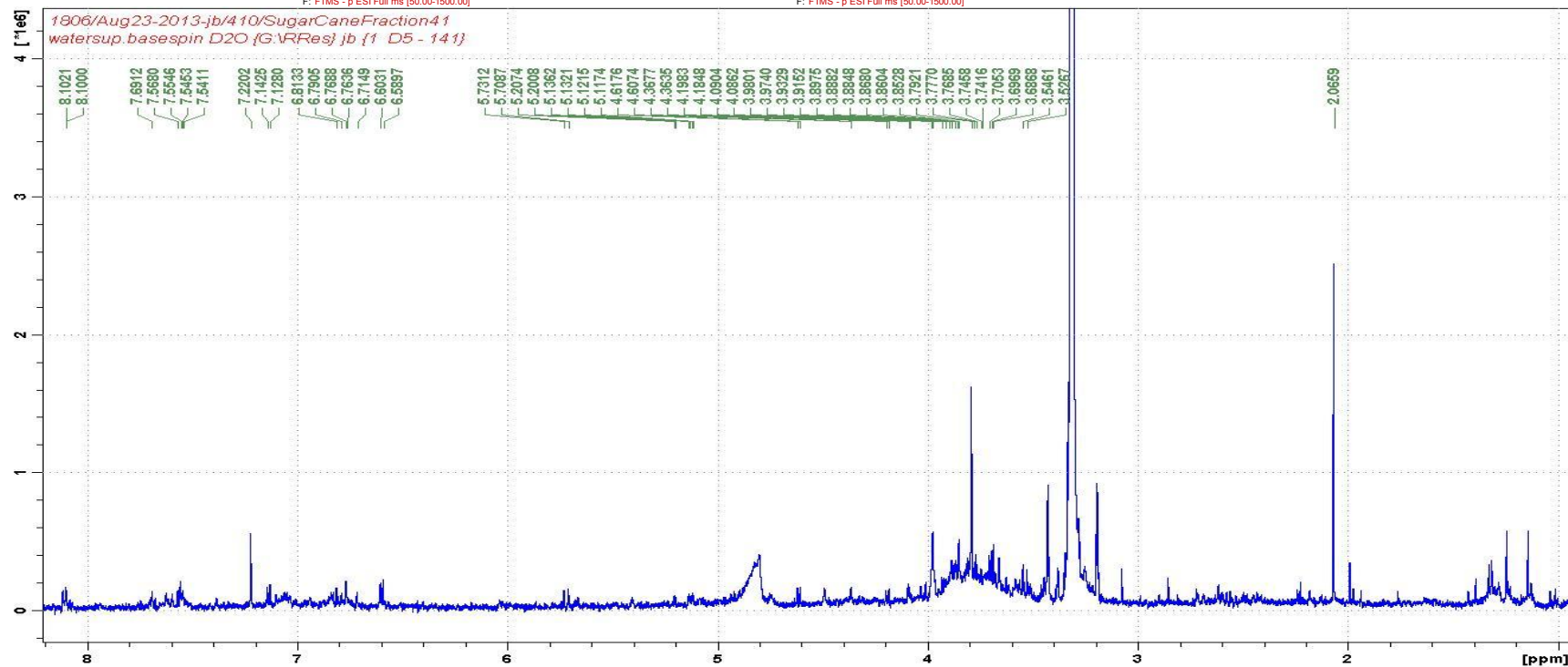
24/08/2013 14:02:06

SC-fraction41



00922-1806-SC-fraction41 #1321 RT: 12.12 AV: 1 NL: 1.52E5
F: FTMS - p ESI Full ms [50.00-1500.00]

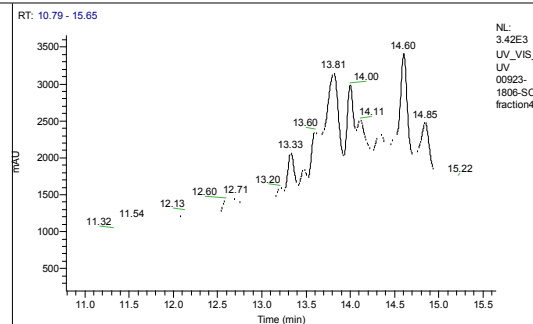
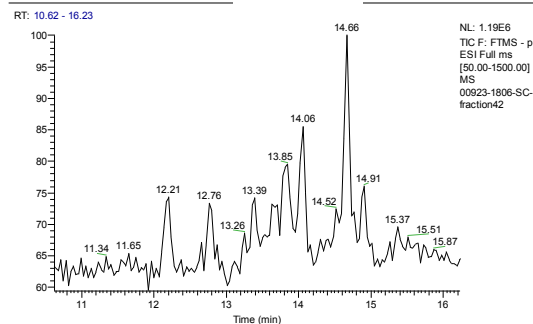
00922-1806-SC-fraction41 #3639 RT: 12.13 AV: 1 SB: 2 8.41, 8.67 NL: 1.27E4 microAU
F: FTMS - p ESI Full ms [50.00-1500.00]



C:\Xcalibur\...00923-1806-SC-fraction42

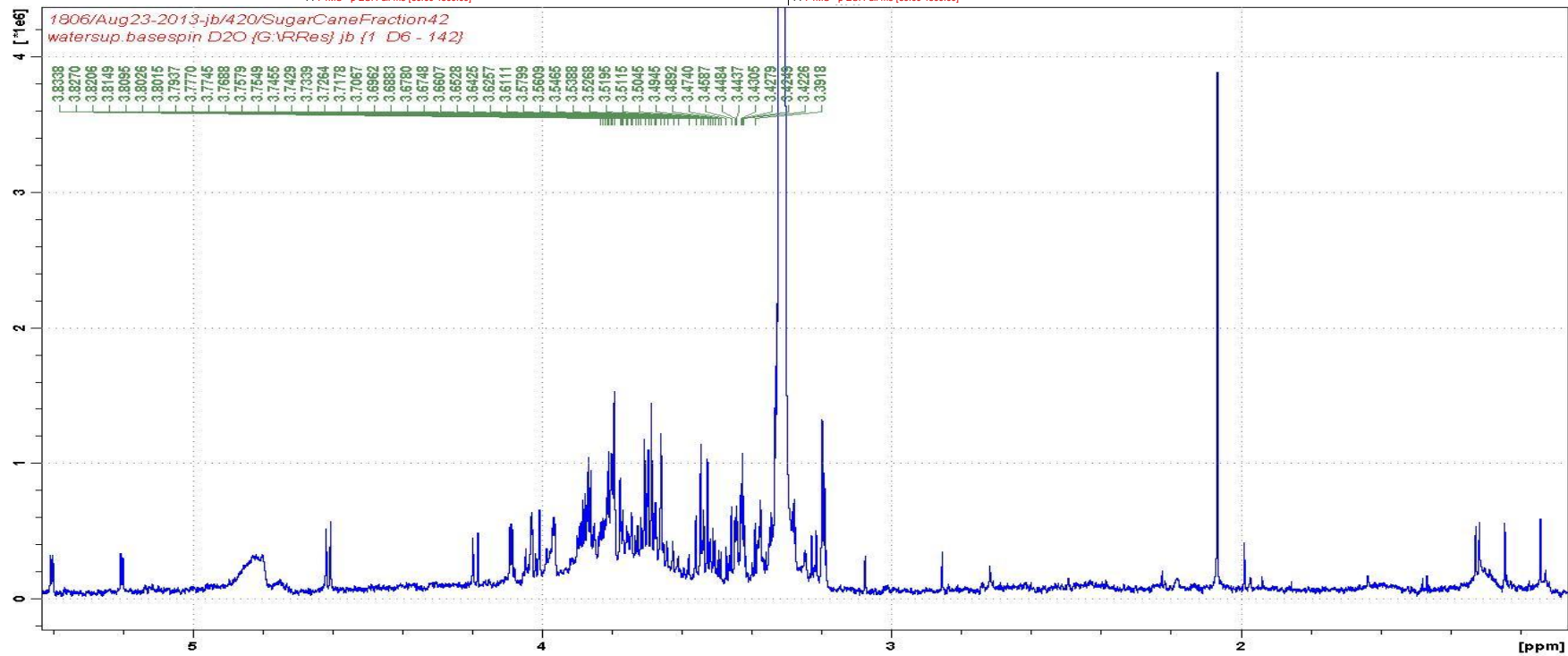
24/08/2013 14:33:35

SC-fraction42



00923-1806-SC-fraction42 #1397 RT: 12.80 AV: 1 NL: 1.50E5
F: FTMS - p ESI Full ms [50.00-1500.00]

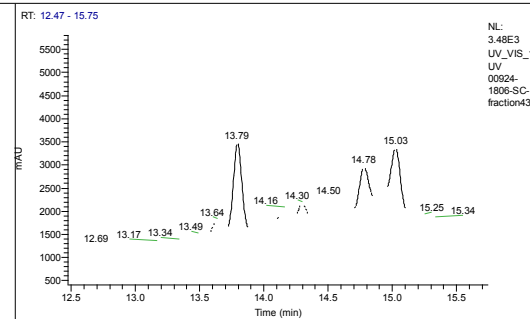
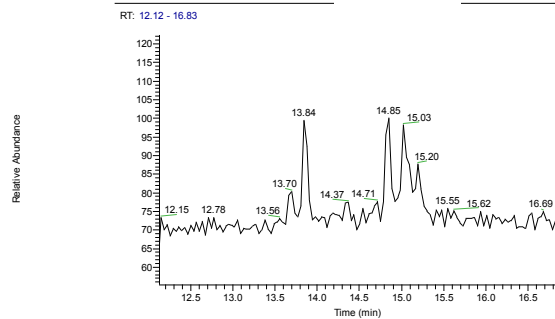
00923-1806-SC-fraction42 #3814 RT: 12.71 AV: 1 SB: 2 8.41, 8.67 NL: 1.46E4 microAU
F: FTMS - p ESI Full ms [50.00-1500.00]



C:\Xcalibur\...00924-1806-SC-fraction43

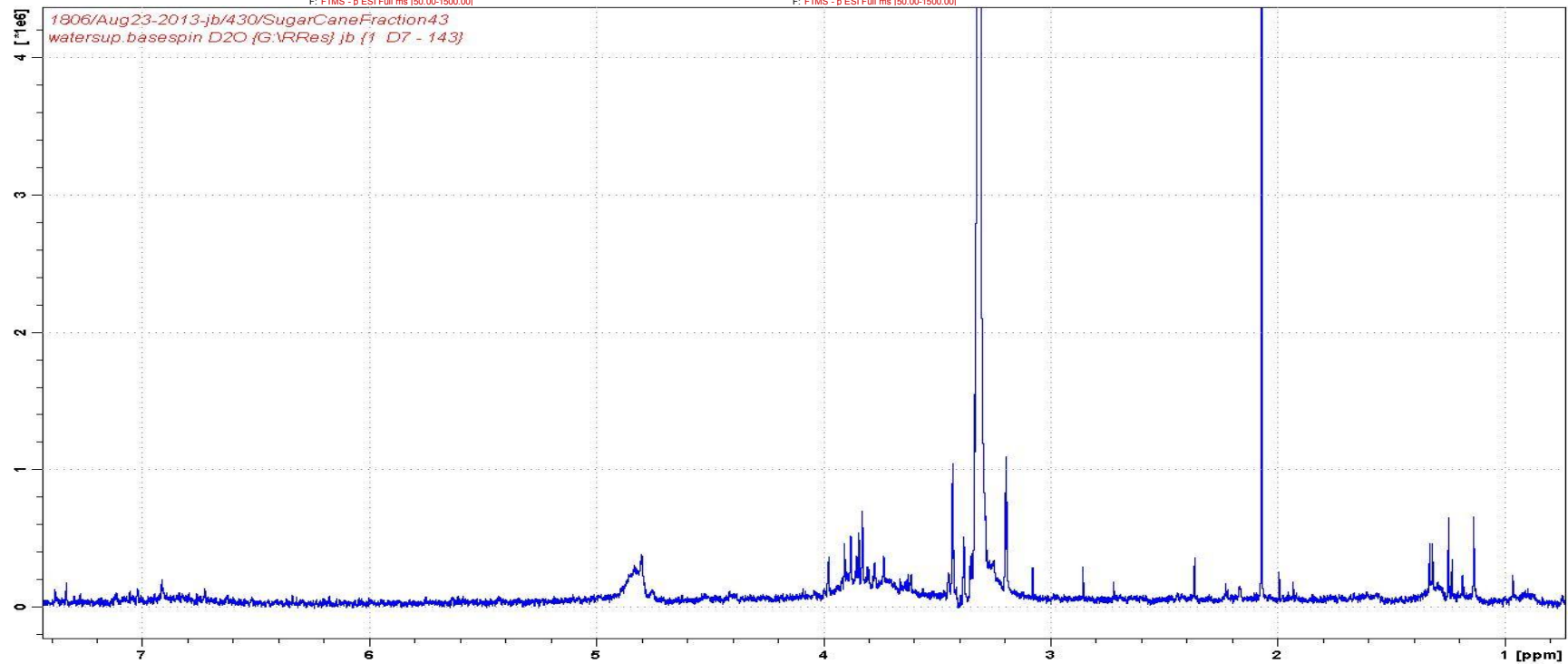
24/08/2013 15:05:05

SC-fraction43



00924-1806-SC-fraction43 #1517 RT: 13.84 AV: 1 NL: 1.74E5
F: FTMS - p ESI Full ms [50.00-1500.00]

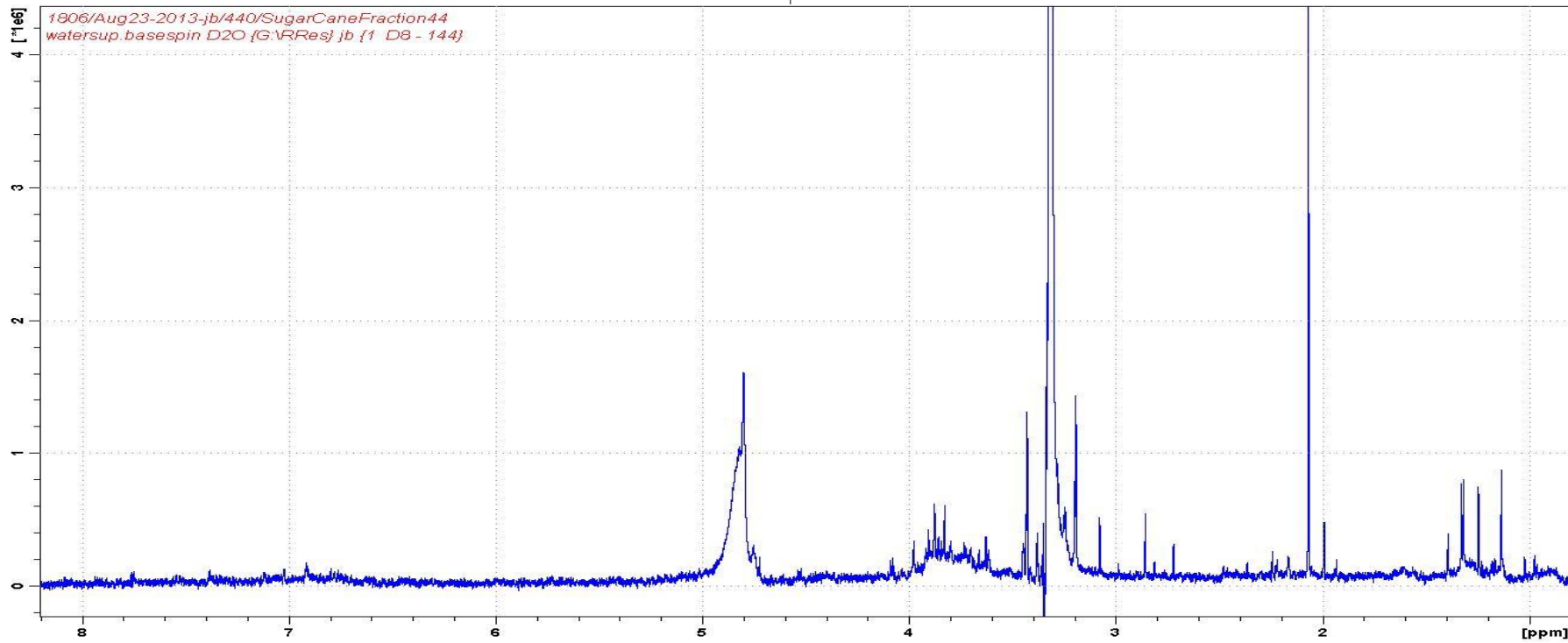
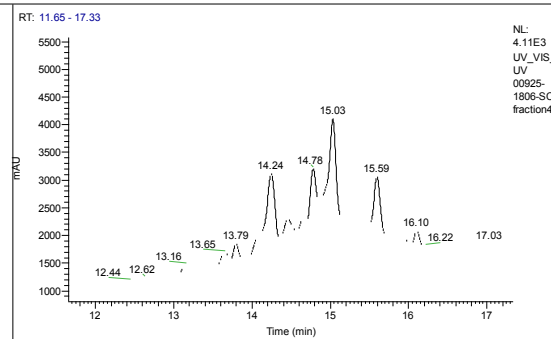
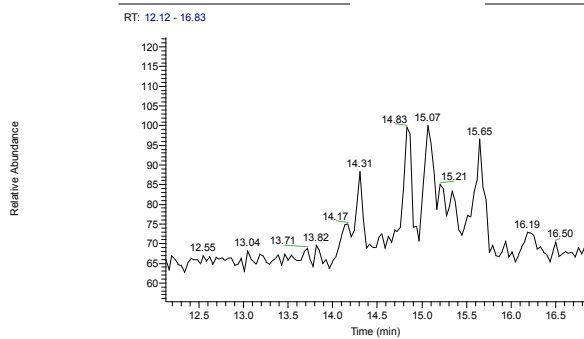
00924-1806-SC-fraction43 #1138 RT: 13.79 AV: 1 SB: 2 8.41, 8.67 NL: 2.02E4 microAU
F: FTMS - p ESI Full ms [50.00-1500.00]



C:\xcalibur\...00925-1806-SC-fraction44

24/08/2013 15:36:34

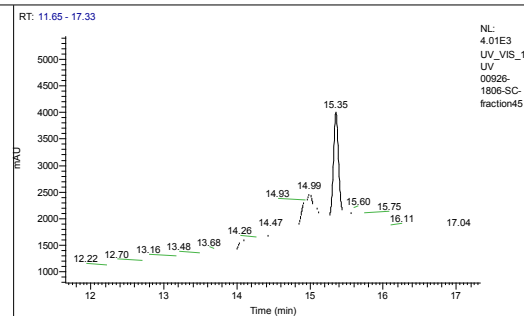
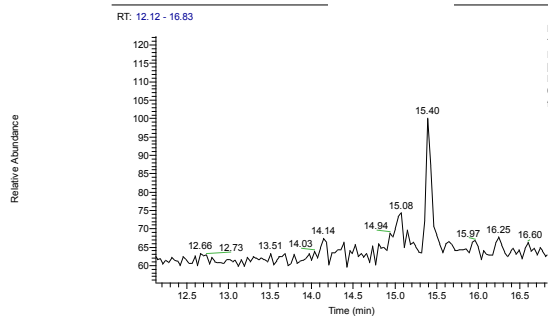
SC-fraction44



C:\Xcalibur...00926-1806-SC-fraction45

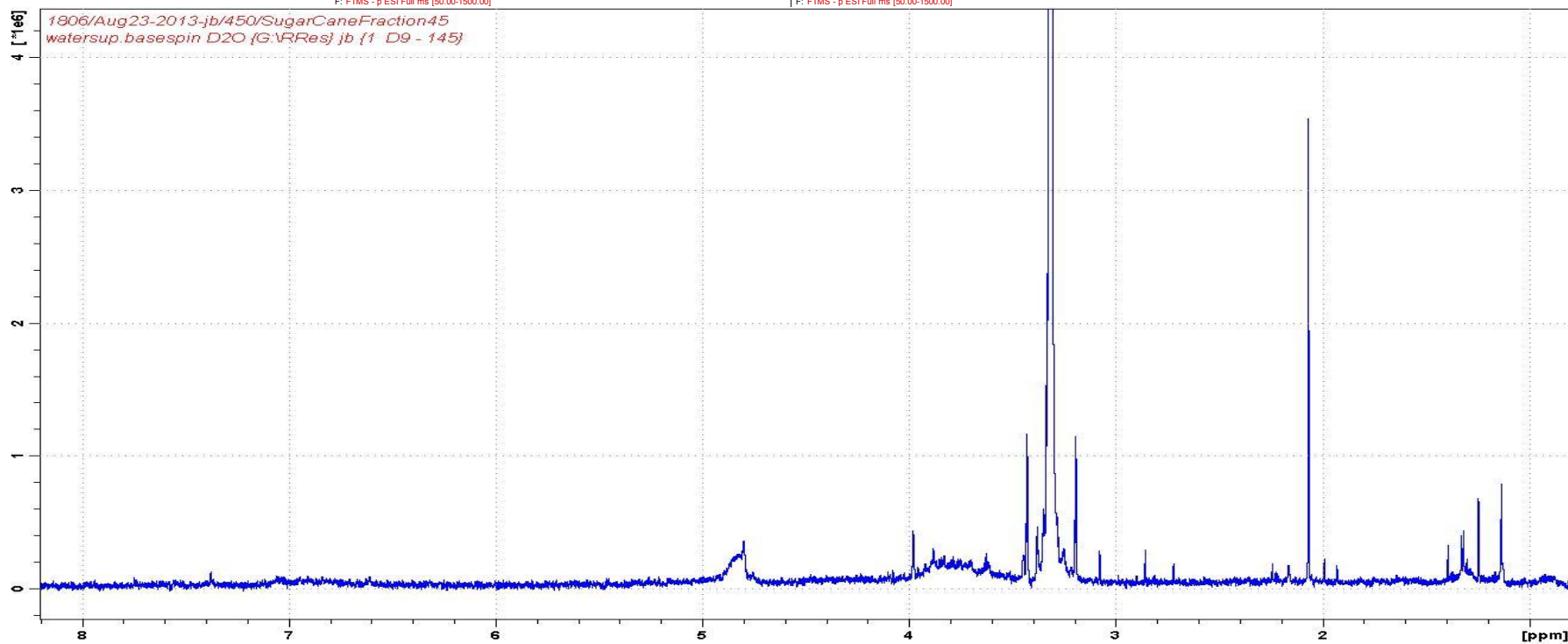
24/08/2013 16:08:04

SC-fraction45



00926-1806-SC-fraction45 #1693 RT: 15.40 AV: 1 NL: 1.74E5
F: FTMS - p ESI Full ms [50.00-1500.00]

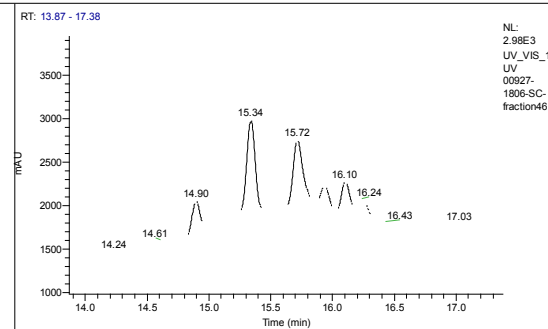
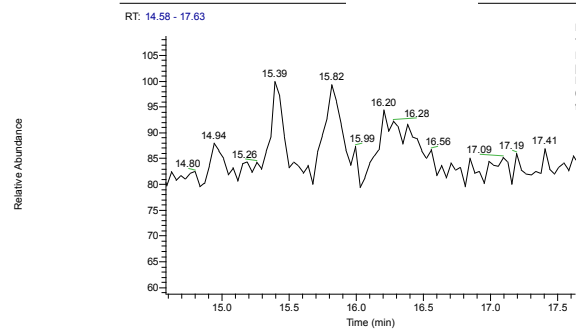
00926-1806-SC-fraction45 #4611 RT: 15.37 AV: 1 SB: 2 8.41, 8.67 NL: 2.57E4 microAU
F: FTMS - p ESI Full ms [50.00-1500.00]



C:\Xcalibur\...00927-1806-SC-fraction46

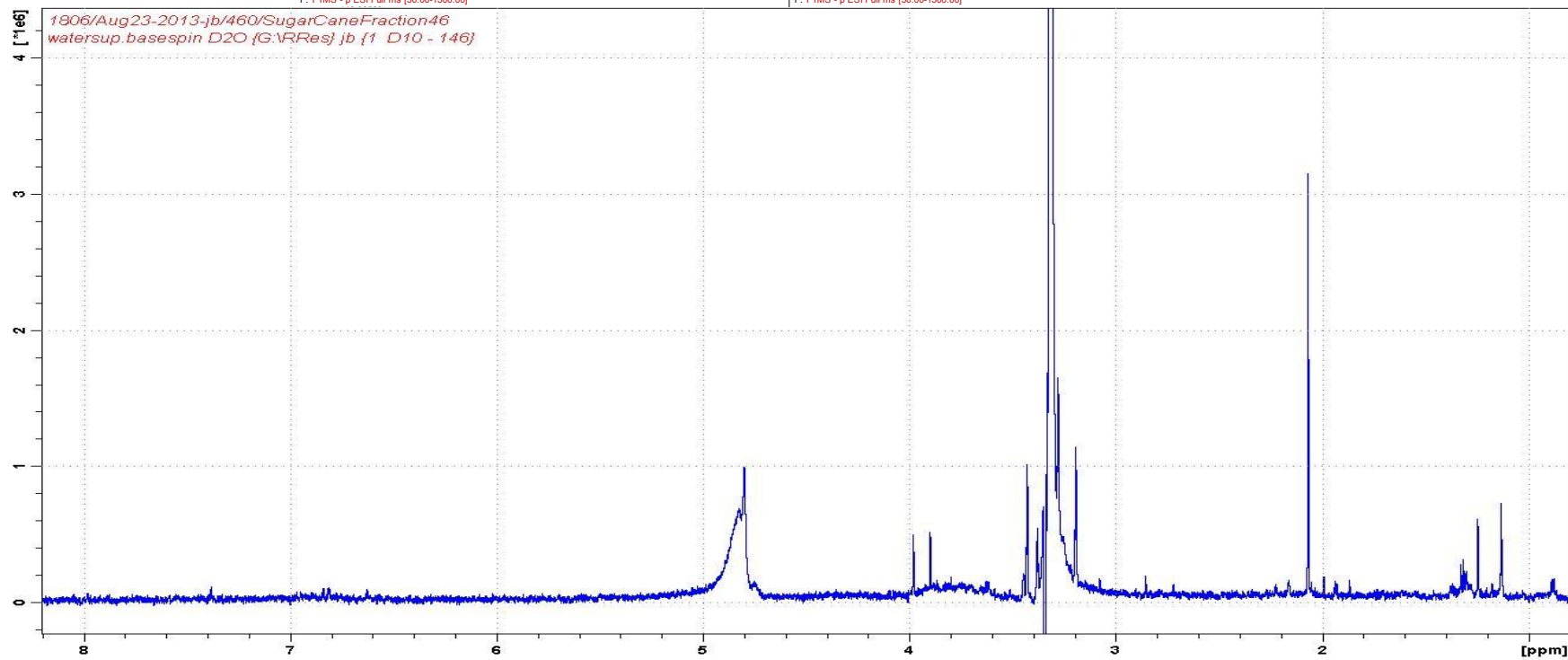
24/08/2013 16:39:34

SC-fraction46



00927-1806-SC-fraction46 #1841 RT: 14.94 AV: 1 NL: 1.70E5
F: FTMS - p ESI Full ms [50.00-1500.00]

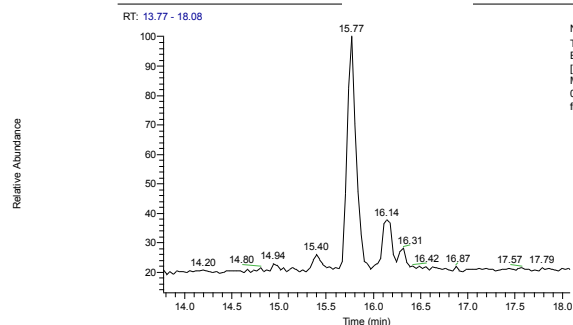
00927-1806-SC-fraction46 #4471 RT: 14.90 AV: 1 SB: 2 8.41, 8.67 NL: 2.13E4 microAU
F: FTMS - p ESI Full ms [50.00-1500.00]



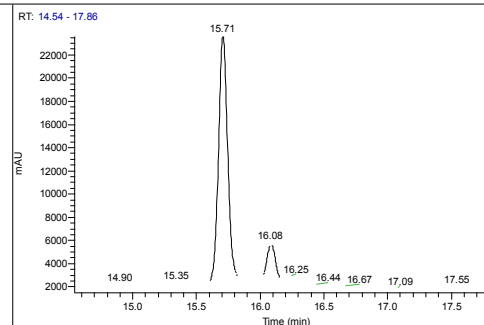
C:\Xcalibur\...00928-1806-SC-fraction47

24/08/2013 17:11:03

SC-fraction47



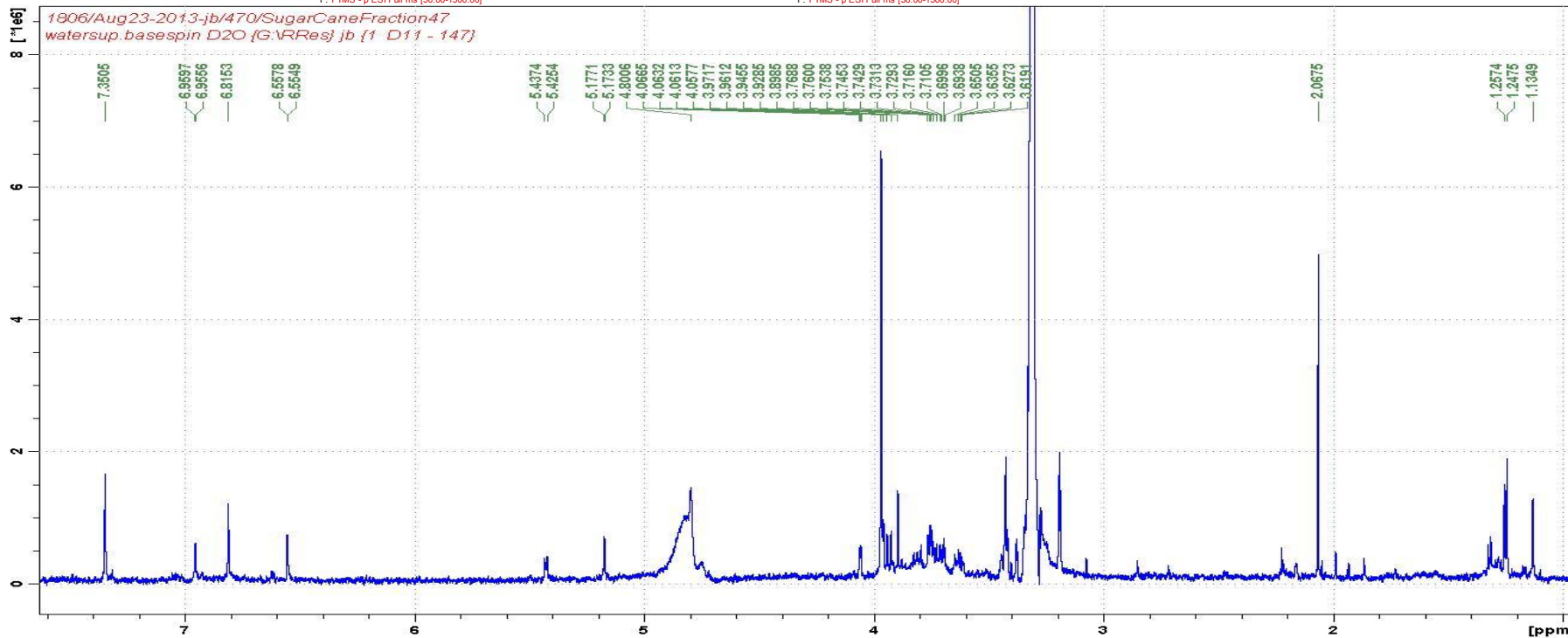
NL: 3.71E6
TIC F: FTMS - p
ESI Full ms
[50.00-1500.00]
MS
00928-1806-SC-
fraction47



NL: 2.38E4
UV_VIS_1
UV
00928-
1806-SC-
fraction47

00928-1806-SC-fraction47 #1733 RT: 15.74 AV: 1 NL: 1.07E6
F: FTMS - p ESI Full ms [50.00-1500.00]

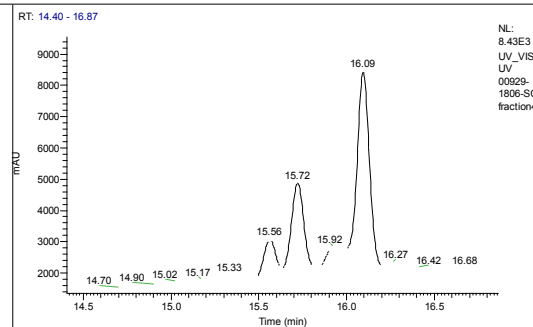
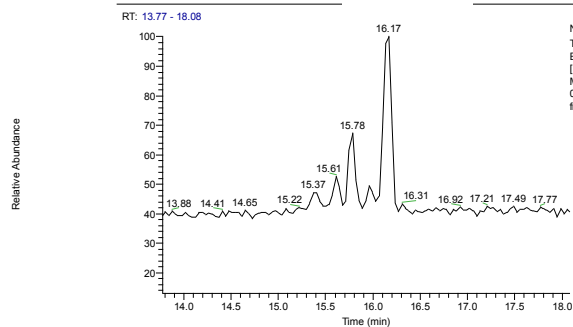
00928-1806-SC-fraction47 #4711 RT: 15.70 AV: 1 SB: 2 8.41, 8.67 NL: 6.30E4 microAU
F: FTMS - p ESI Full ms [50.00-1500.00]



C:\xcalibur\...00929-1806-SC-fraction48

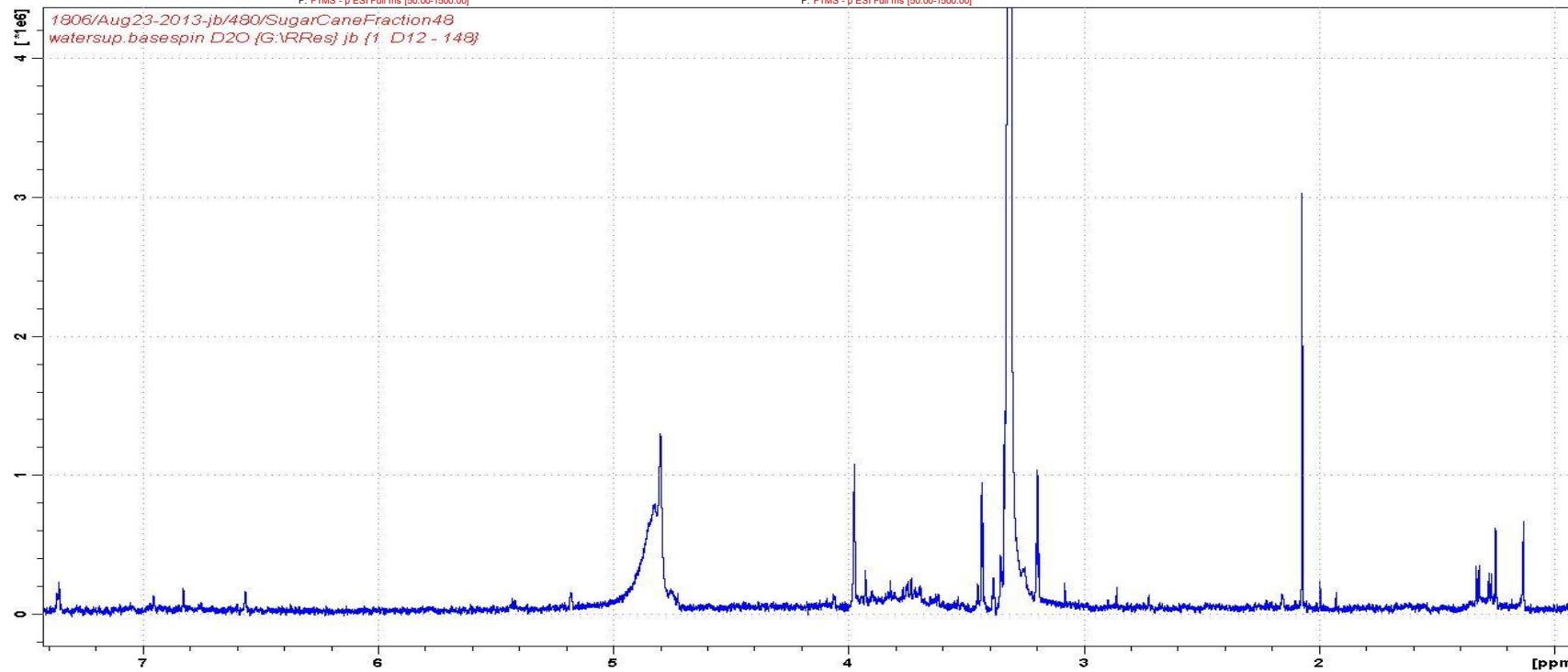
24/08/2013 17:42:33

SC-fraction48



00929-1806-SC-fraction48 #1717 RT: 15.61 AV: 1 NL: 1.72E5
F: FTMS - p ESI Full ms [50.00-1500.00]

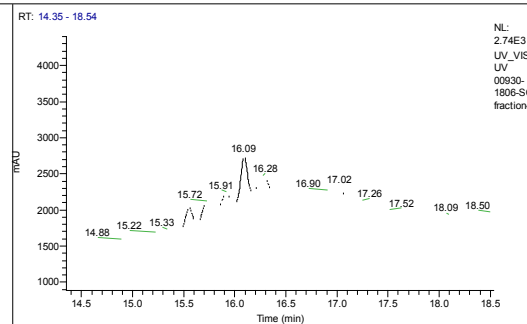
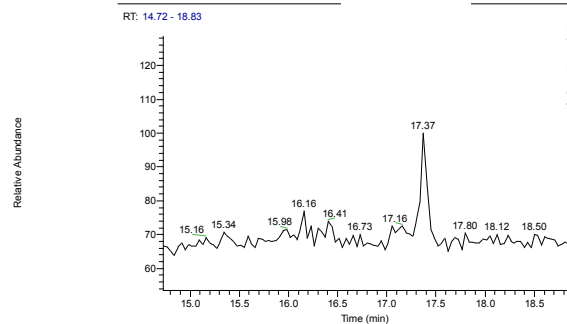
00929-1806-SC-fraction48 #4664 RT: 15.55 AV: 1 SB: 2 8.41, 8.67 NL: 2.45E4 microAU
F: FTMS - p ESI Full ms [50.00-1500.00]



C:\Xcalibur\...00930-1806-SC-fraction49

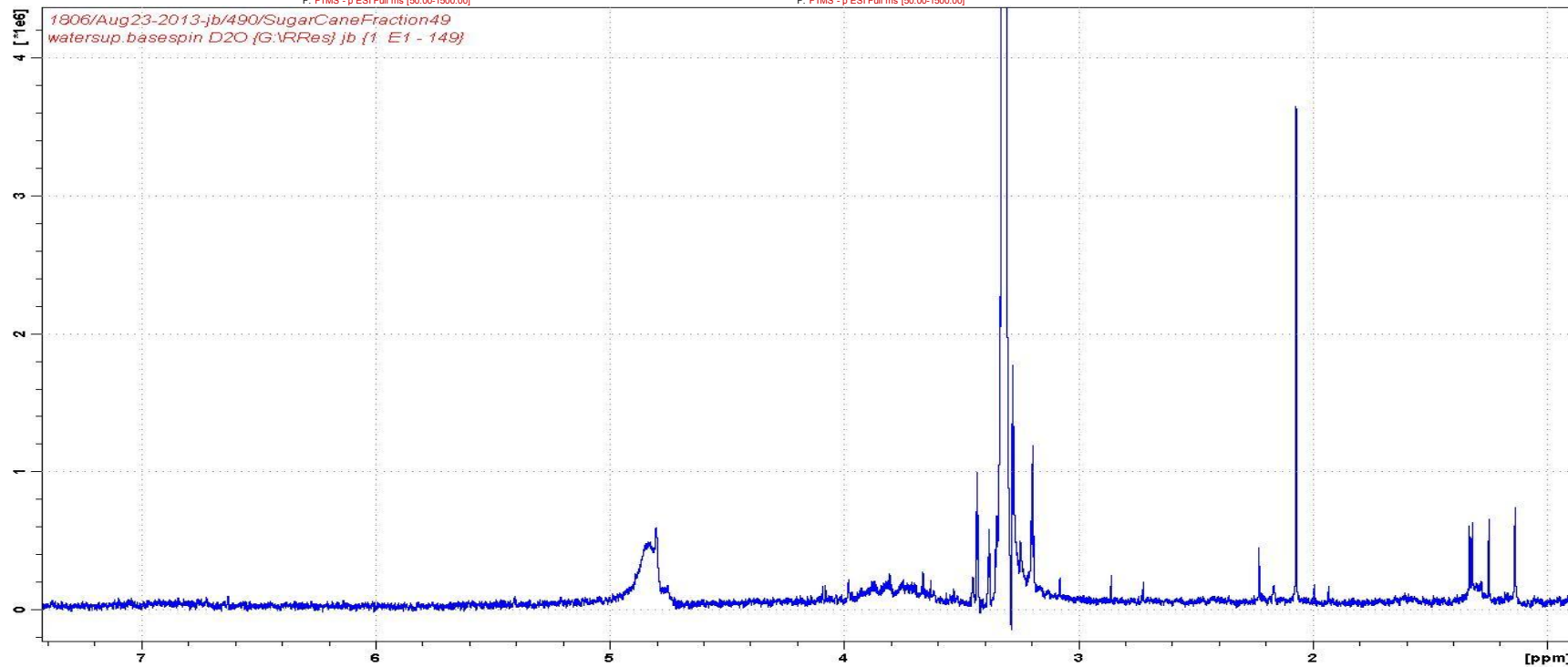
24/08/2013 18:14:03

SC-fraction49



00930-1806-SC-fraction49 #1913 RT: 17.37 AV: 1 NL: 1.91E5
F: FTMS - p ESI Full ms [50.00-1500.00]

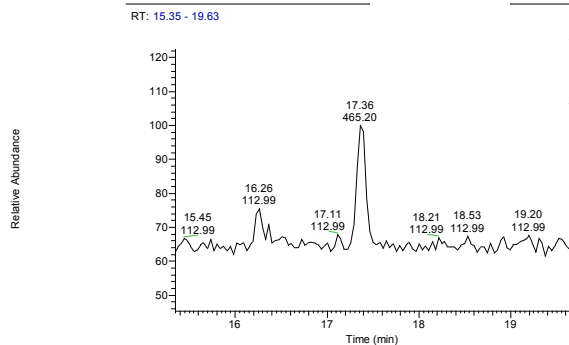
00930-1806-SC-fraction49 #4664 RT: 15.55 AV: 1 SB: 2 8.41, 8.67 NL: 2.30E4 microAU
F: FTMS - p ESI Full ms [50.00-1500.00]



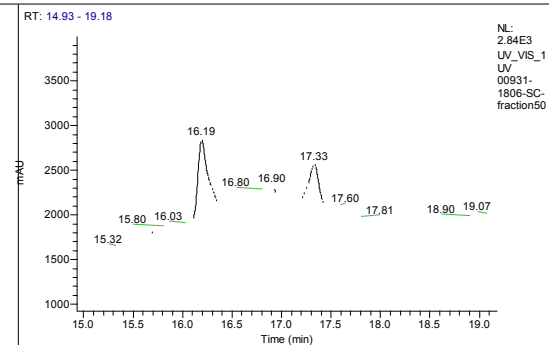
C:\Xcalibur\...00931-1806-SC-fraction50

04/08/2013 18:45:30

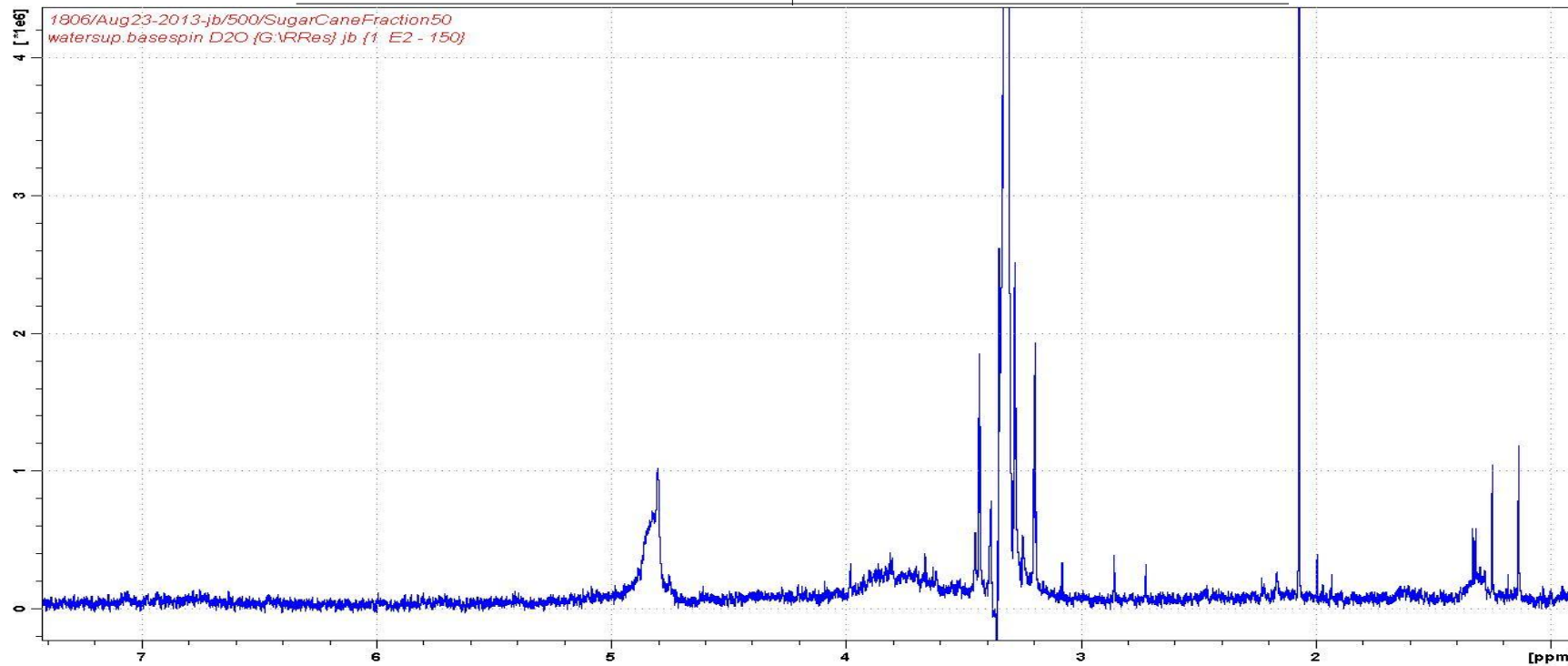
SC-fraction50



NL: 1.21E6
TIC F: FTMS - p
ESI Full ms
[50.00-1500.00]
MS
00931-1806-SC-
fraction50



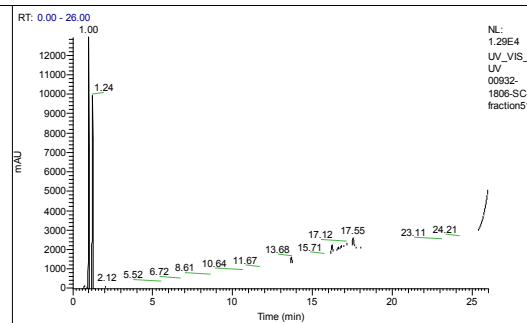
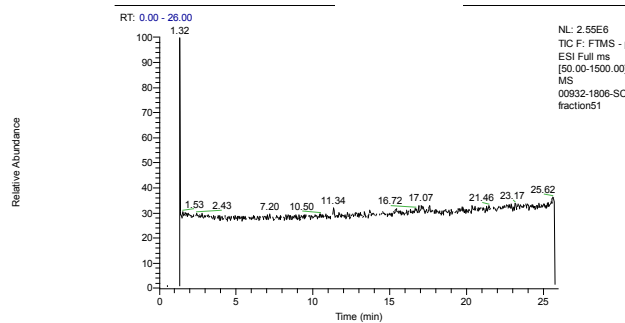
NL: 2.84E3
UV_VIS_1
UV
00931-
1806-SC-
fraction50



C:\Xcalibur...00932-1806-SC-fraction51

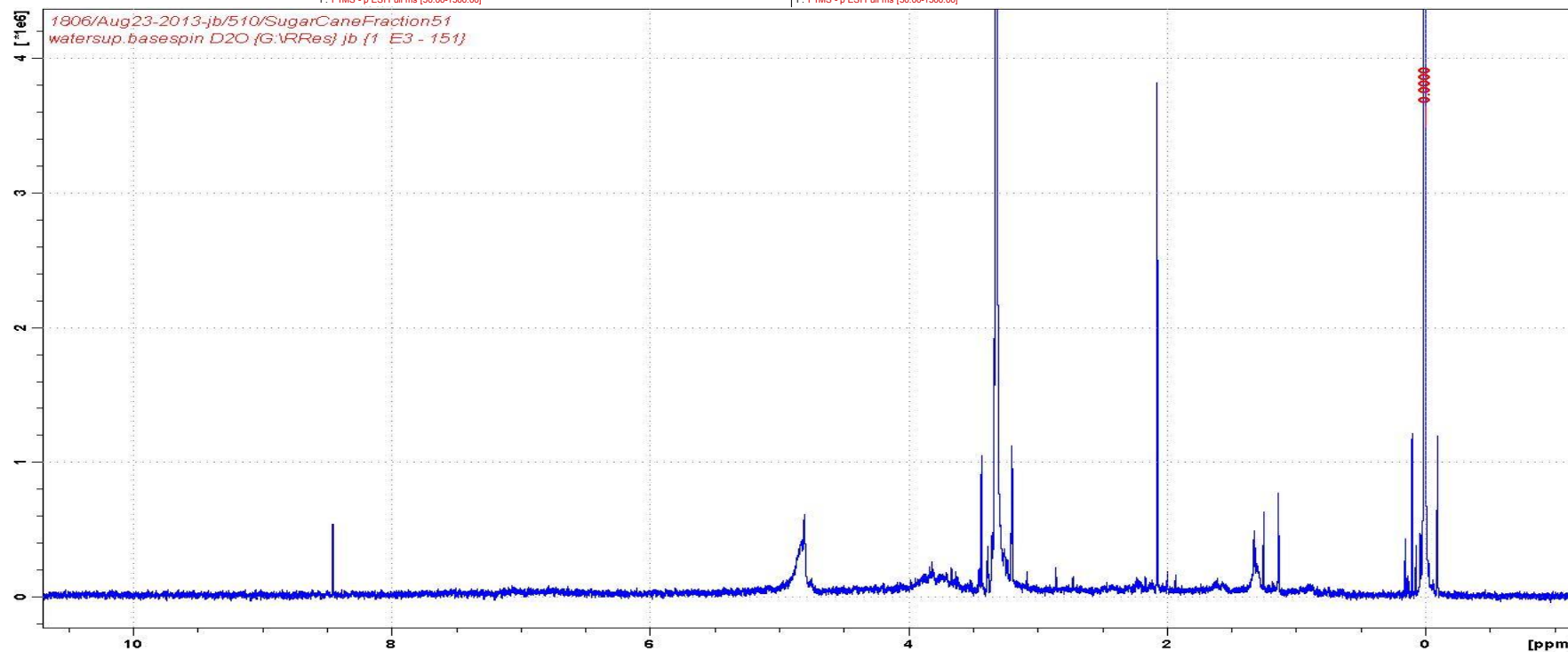
24/08/2013 19:16:58

SC-fraction51



00932-1806-SC-fraction51 #969 RT: 9.07 AV: 1 NL: 1.38E5
 F: FTMS - p ESI Full ms [50.00-1500.00]

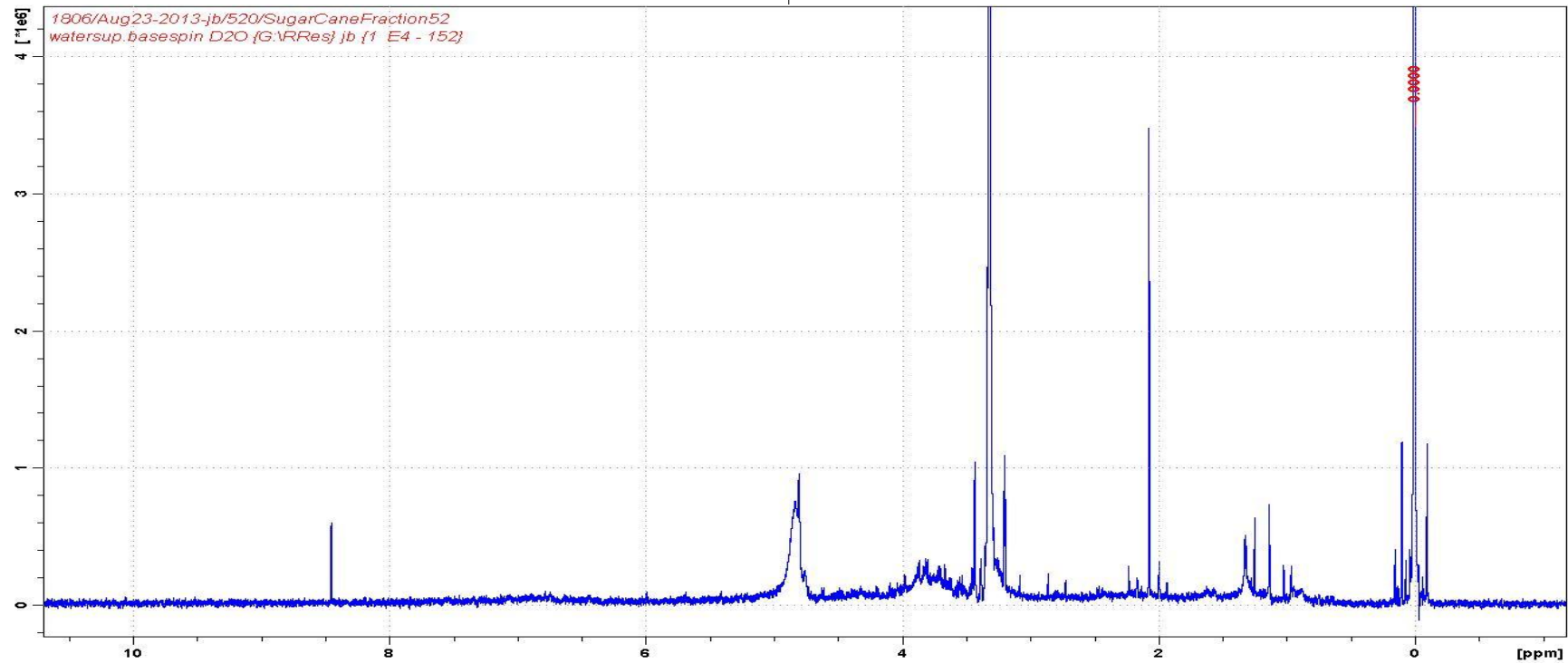
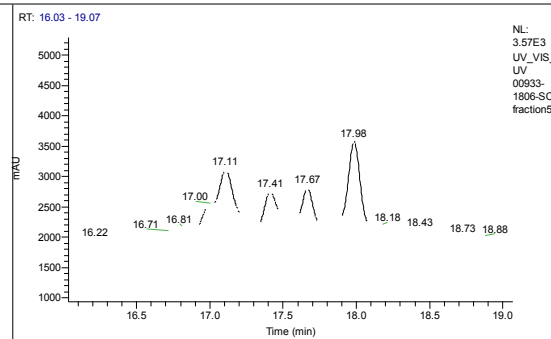
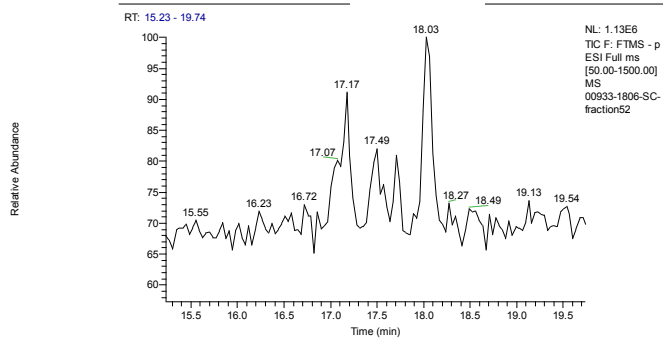
00932-1806-SC-fraction51 #1430 RT: 4.77 AV: 1 SB: 2 8.41, 8.67 NL: 0 microAU
 F: FTMS - p ESI Full ms [50.00-1500.00]



C:\xcalibur\...00933-1806-SC-fraction52

24/08/2013 19:48:28

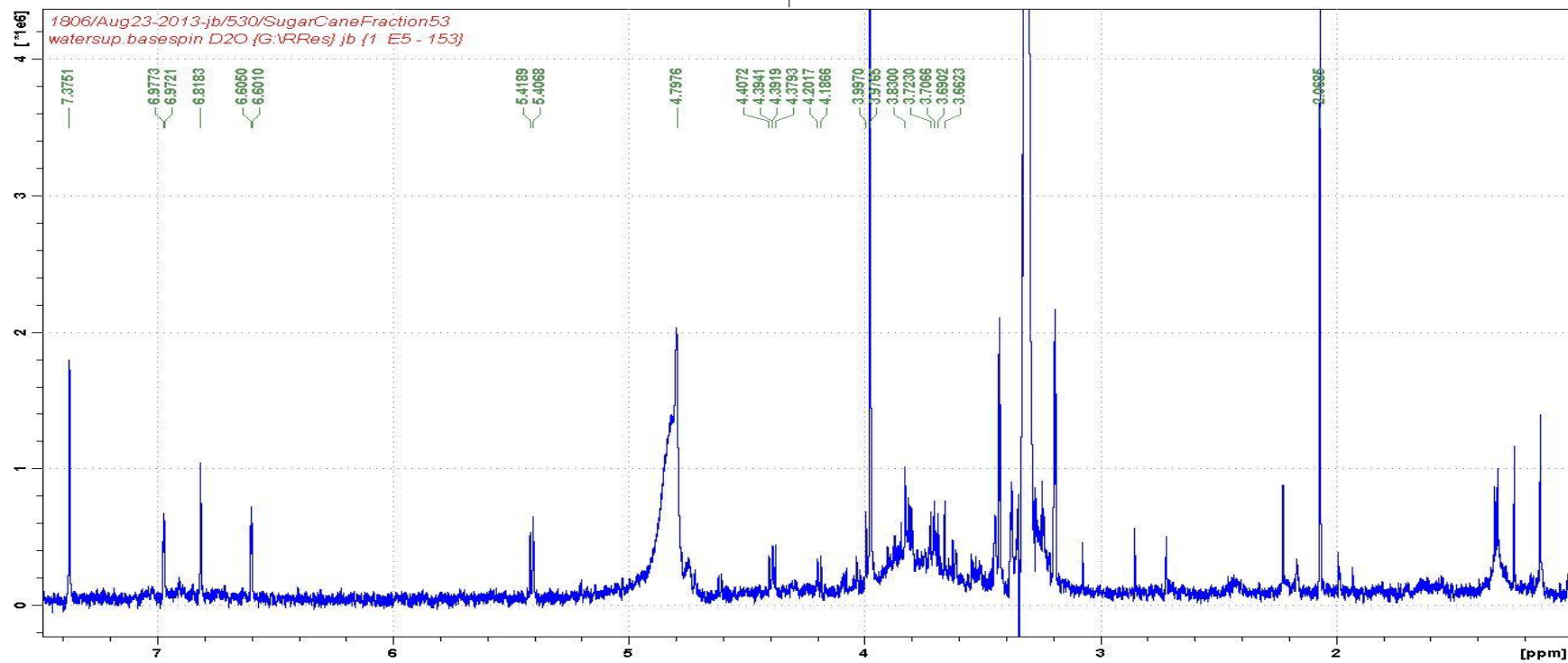
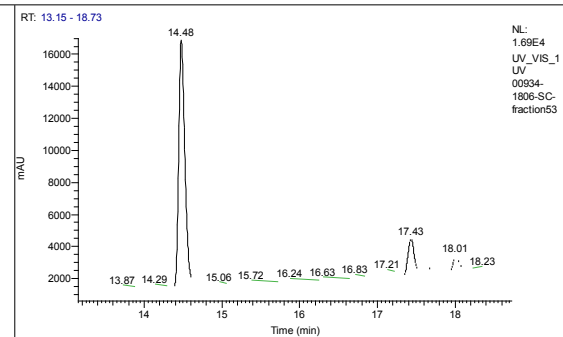
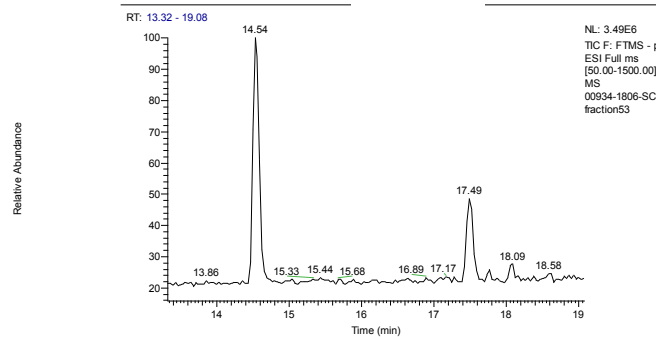
SC-fraction52



C:\xcalibur...100934-1806-SC-fraction53

24/08/2013 20:19:57

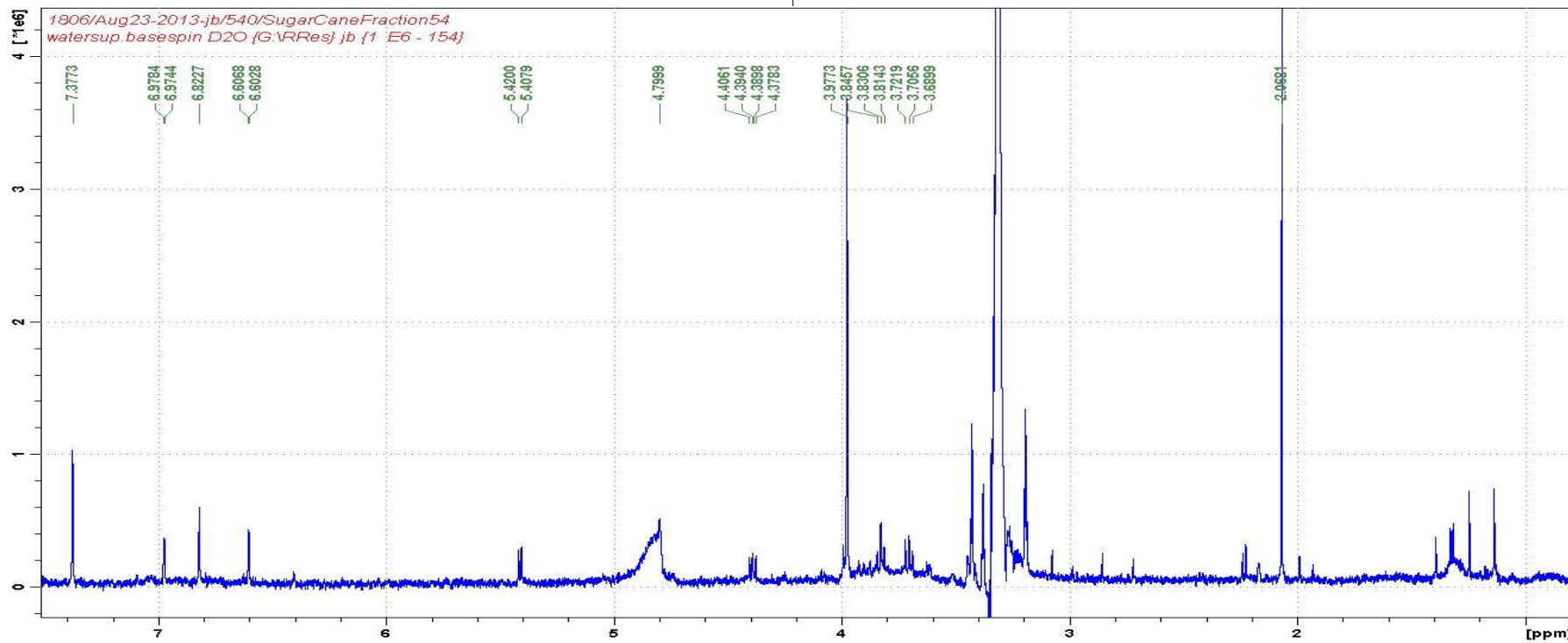
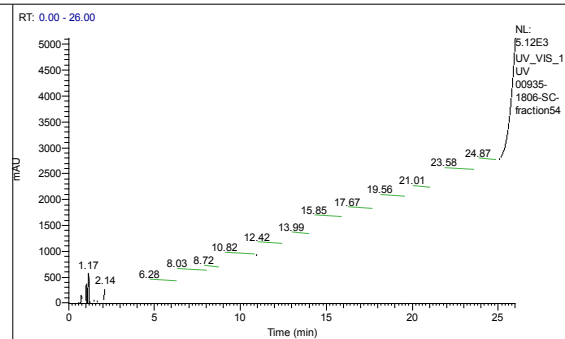
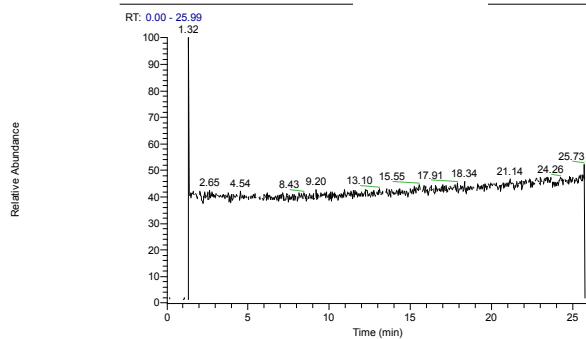
SC-fraction53



C:\Xcalibur...00935-1806-SC-fraction54

24/08/2013 20:51:27

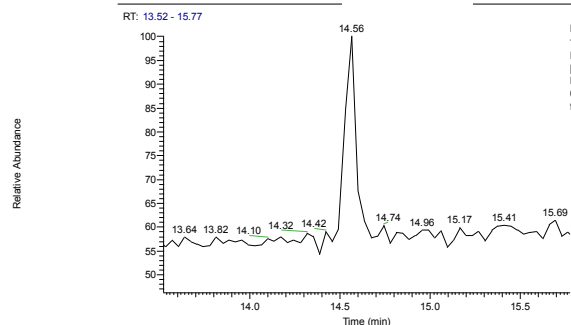
SC-fraction54



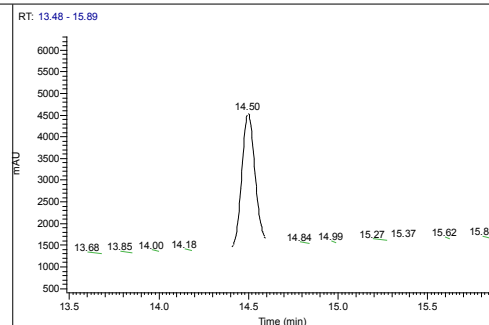
C:\Xcalibur\...00936-1806-SC-fraction55

24/08/2013 21:22:57

SC-fraction55



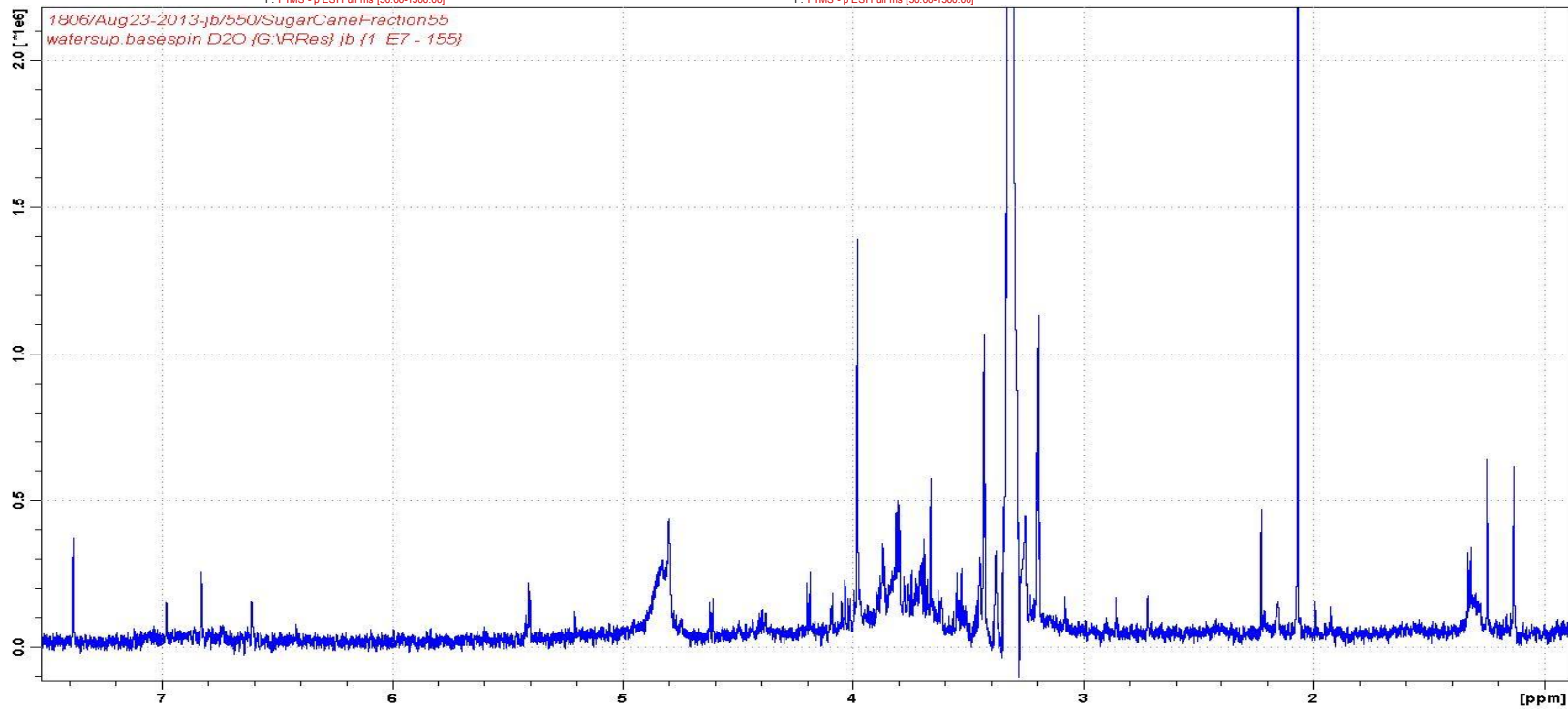
NL: 1.31E6
TIC F: FTMS - p
ESI Full ms
[50.00-1500.00]
MS
00936-1806-SC-
fraction55



NL:
4.53E3
UV_VIS_1
UV
00936-
1806-SC-
fraction55

00936-1806-SC-fraction55 #1597 RT: 14.56 AV: 1 NL: 2.77E5
F: FTMS - p ESI Full ms [50.00-1500.00]

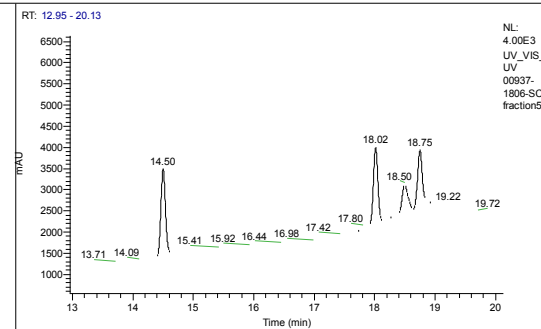
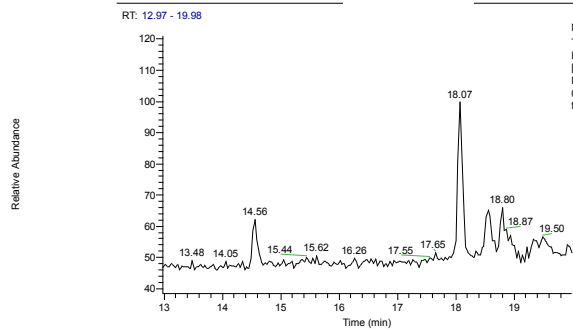
00936-1806-SC-fraction55 #4347 RT: 14.49 AV: 1 SB: 2 8.41, 8.67 NL: 2.37E4 microAU
F: FTMS - p ESI Full ms [50.00-1500.00]



C:\Xcalibur\...00937-1806-SC-fraction56

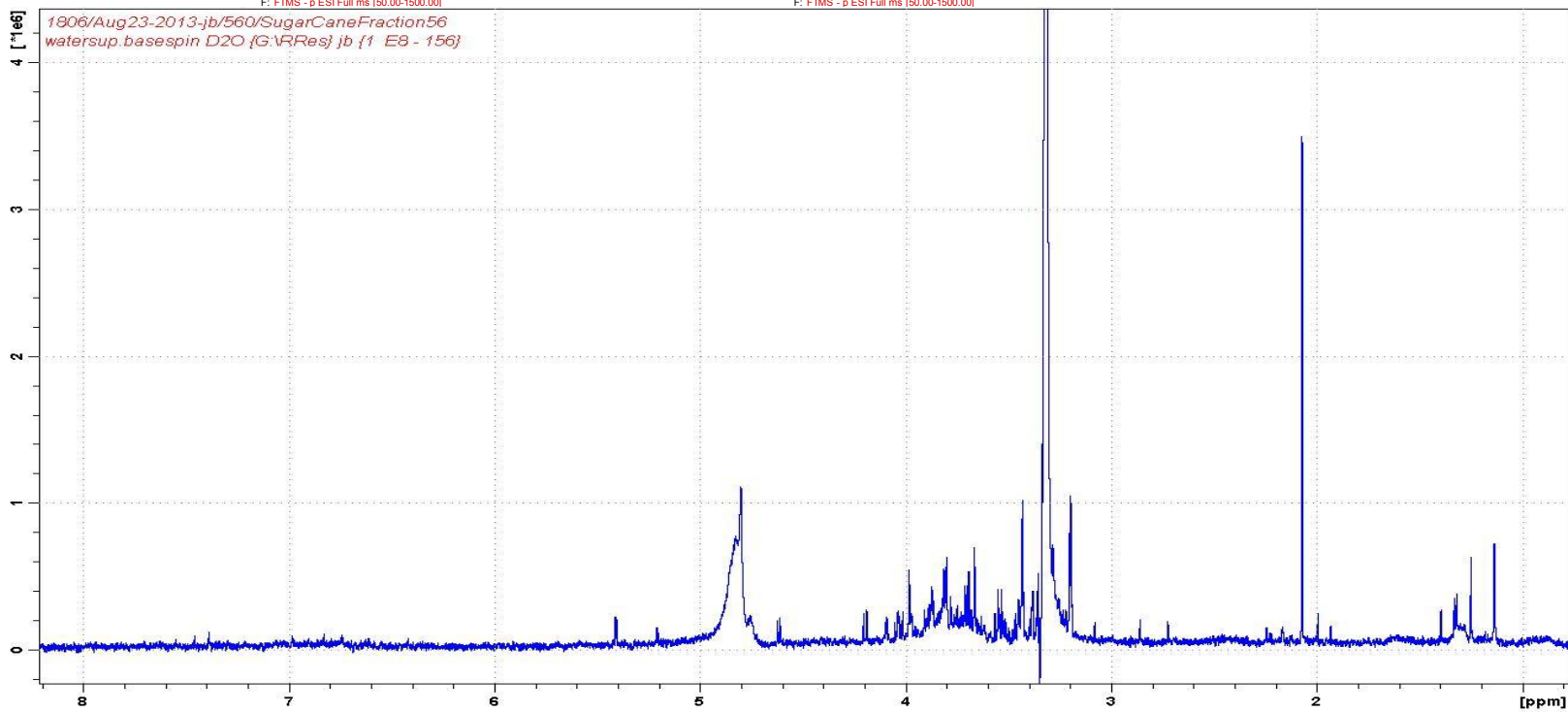
24/08/2013 21:54:27

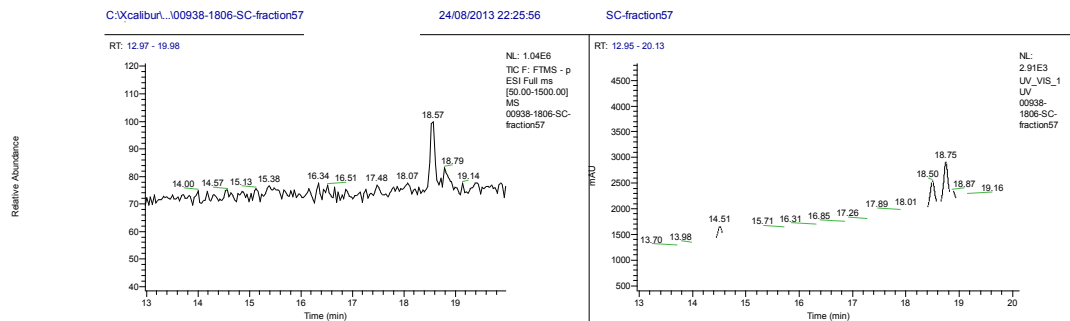
SC-fraction56



00937-1806-SC-fraction56 #1989 RT: 18.07 AV: 1 NL: 4.97E5
F: FTMS - p ESI Full ms [50.00-1500.00]

00937-1806-SC-fraction56 #5401 RT: 18.00 AV: 1 SB: 2 8.41, 8.67 NL: 3.39E4 microAU
F: FTMS - p ESI Full ms [50.00-1500.00]

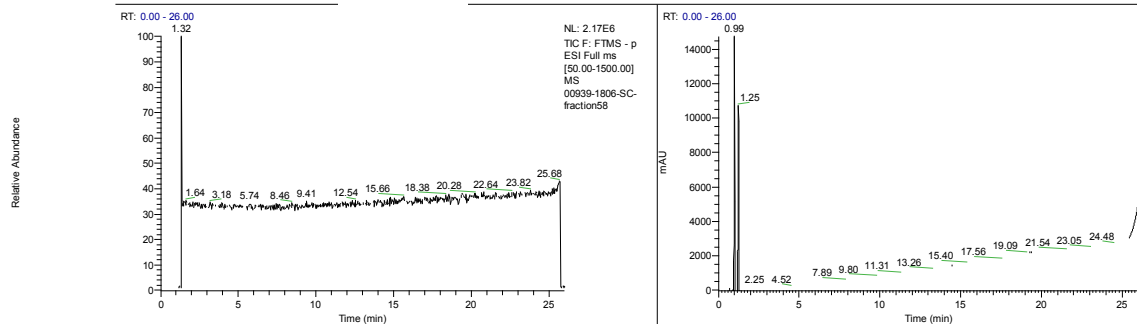




00938-1806-SC-fraction57 #2045 RT: 18.54 AV: 1 NL: 1.92E5
F: FTMS - p ESI Full ms [50.00-1500.00]
172 areas

00938-1806-SC-fraction57 #5553 RT: 18.51 AV: 1 SB: 2.841, 8.67 NL: 3.34E4 microAU
F: FTMS - p ESI Full ms [50.00-1500.00]

C:\Xcalibur\...00939-1806-SC-fraction58
24/08/2013 22:57:25
SC-fraction58



00939-1806-SC-fraction58 #1029 RT: 9.58 AV: 1 NL: 1.40E5
F: FTMS - p ESI Full ms [50.00-1500.00]

00939-1806-SC-fraction58 #4348 RT: 14.49 AV: 1 SB: 2.841, 8.67 NL: 1.91E4 microAU
F: FTMS - p ESI Full ms [50.00-1500.00]

C:\Xcalibur\...00941-1806-SC-fraction60
25/08/2013 00:00:25
SC-fraction60

