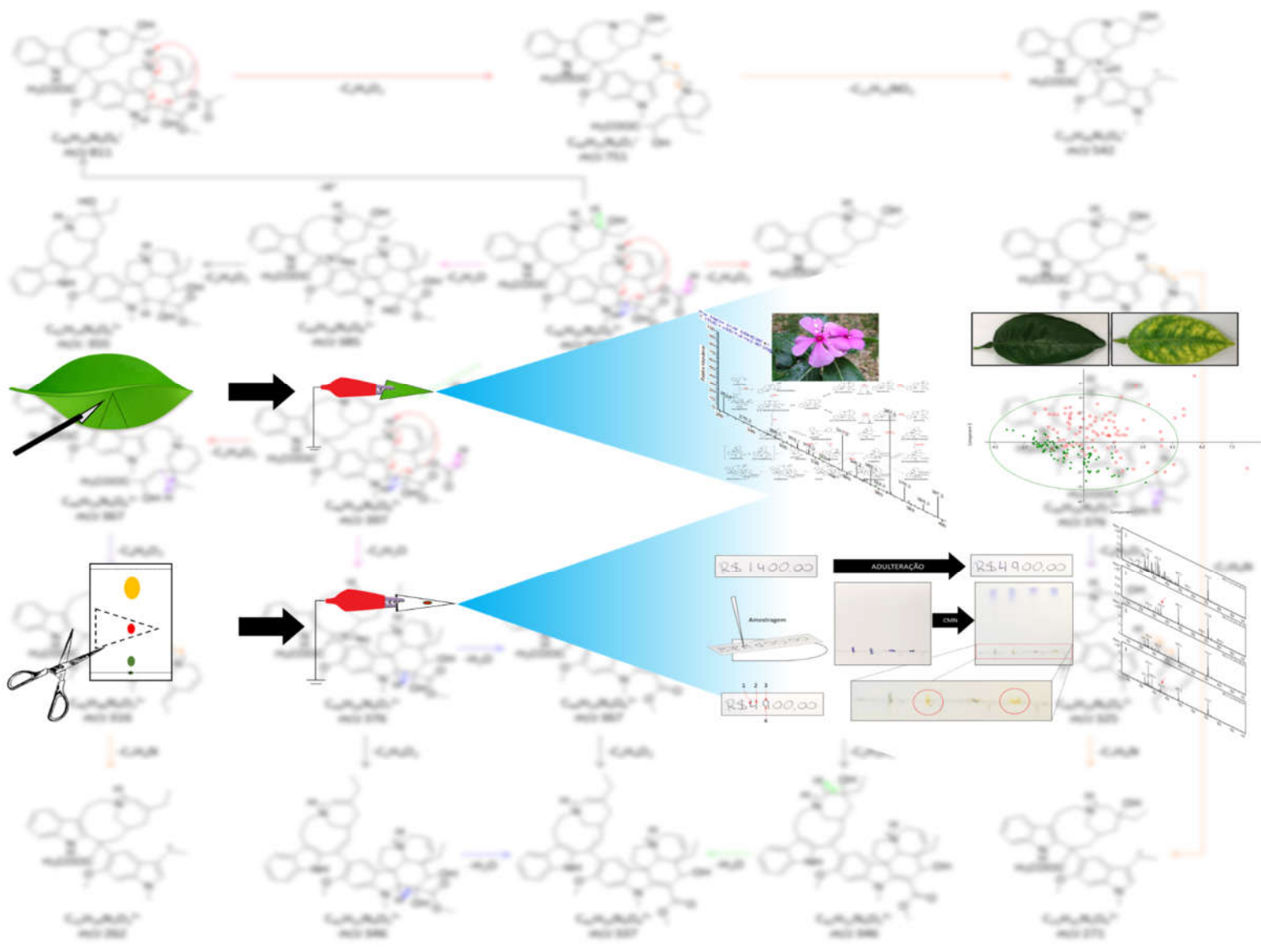


RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 04/08/2022.

TÉCNICAS DE ANÁLISE DIRETA EM ESPECTROMETRIA DE MASSAS: SOLUÇÕES SIMPLES PARA COMPLEXAS QUESTÕES DA QUÍMICA DE PRODUTOS NATURAIS À ANÁLISE FORENSE.



JOÃO LUIZ BRONZEL JUNIOR

2020

JOÃO LUIZ BRONZEL JUNIOR

**Técnicas de análise direta em espectrometria de massas:
soluções simples para complexas questões da química de
produtos naturais à análise forense.**

Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como
parte dos requisitos para obtenção do título
de Doutor em Química (Área: Química
Orgânica)

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maysa Furlan

Araraquara
2020

FICHA CATALOGRÁFICA

B869t Bronzel Junior, João Luiz
Técnicas de análise direta em espectrometria de massas:
soluções simples para complexas questões da química de
produtos naturais à análise forense / João Luiz Bronzel
Junior. – Araraquara : [s.n.], 2020
166 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química
Orientador: Maysa Furlan

1. Espectrometria de massa. 2. Produtos naturais.
3. Biossíntese. 4. Fitopatologia. 5. Química legal. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: "Técnicas de análise direta em espectrometria de massas: soluções simples para complexas questões da química de produtos naturais à análise forense"


AUTOR: JOAO LUIZ BRONZEL JÚNIOR

ORIENTADORA: MAYSA FURLAN

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em QUÍMICA, pela Comissão Examinadora:


Prof.^a Dr.^a MAYSA FURLAN
Departamento de Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara


Prof. Dr. ALBERTO JOSÉ CAVALHEIRO
Departamento de Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara


Prof. Dr. DANIEL RINALDO
Departamento de Química / Faculdade de Ciências - UNESP - Bauru


Prof.^a Dr.^a ROSANA MARIA DEBONSI
Departamento de Física e Química / Faculdade de Ciências Farmacêutica - USP - Ribeirão Preto


Prof. Dr. LUIS OCTÁVIO REGASINI
Departamento de Química e Ciências Ambientais / Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - UNESP - São José do Rio Preto

Araraquara, 04 de agosto de 2020

DADOS CURRICULARES

IDENTIFICAÇÃO

Nome: João Luiz Bronzel Junior.

Nome em citações bibliográficas: Bronzel, J. L. Jr.; João L. Bronzel; João L. Bronzel Junior; BRONZEL, J. L.; BRONZEL, J. L. Jr.; BRONZEL JR., JOÃO L.; BRONZEL, JOAO L.; BRONZEL, JOÃO L.; BRONZEL, J.

Nacionalidade: Brasileiro.

Naturalidade: Descalvado – SP.

Estado Civil: casado.

Filiação:

Nome do pai: João Luiz Bronzel.

Nome da mãe: Márcia Zanetti Martins Bronzel.

Nascimento: 24 de Março de 1987.

Endereço Profissional: Departamento de Bioquímica e Química Orgânica, Instituto de Química de Araraquara, R. Prof. Francisco Degni, 55, Araraquara-SP. CEP: 14800-060.

FORMAÇÃO ACADÊMICA

Graduação: Bacharelado em Química com atribuições tecnológicas.

Ano de conclusão: 2011.

Instituição: Universidade de São Paulo - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto.

Mestrado: Química.

Ano de conclusão: 2015.

Área de concentração: Química Orgânica.

Instituição: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Instituto de Química de Araraquara.

Formação Complementar:

2016 - Fundamentos de GC-MS. (Carga horária: 16h). Agilent Technologies Brasil, AGILENT, Brasil.

2014 - Treinamento Operacional e de Aplicação do Instrumento MaXis Impact. (Carga horária: 30h). Bruker do Brasil Comércio e Representação de Produtos Científicos, BRUKER, Brasil.

2014 - Treinamento Operacional do Espectrômetro de Massas Modelo LCQ-Fleet. (Carga horária: 16h). Nova Analítica Importação e Exportação Ltda, Analítica, Brasil.

2013 - Treinamento Básico Operacional no Equipamento Lambda 1050. (Carga horária: 7h). PerkinElmer do Brasil, PERKINELMER, Brasil.

2011 - Cromatografia Líquida: Fundamentos, Instrumentação e Aplicações. (Carga horária: 24h). Instituto Internacional de Cromatografia, IIC, Brasil.

Revisor de Periódico:

2018 - Atual: Journal of Mass Spectrometry.

2018 - Atual: Brazillian Journal of Pharmacognosy.

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA**Artigos completos publicados em periódicos:**

GORNI, P. H.; SANTOS, A. C. P.; MORO, A. L.; SILVA, J. F. A.; MORELI, R. R.; MIRANDA, G. R.; PELEGRINI, J. M.; SPERA, K. D.; BRONZEL JUNIOR, J. L.; SILVA, R. M. G. Salicylic acid foliar application increases biomass, nutrient assimilation, primary metabolites and essential oil content in *Achillea millefolium* L. **Scientia Horticulturae**, v. 270, p. 109436, 2020.

SANDONATO, BEATRIZ B.; SANTOS, VANESSA G.; LUIZETE, MILENA F.; BRONZEL JR., JOÃO L.; EBERLIN, MARCOS N.; MILAGRE, HUMBERTO M. S. MALDI Imaging mass spectrometry of fresh water cyanobacteria: spatial distribution of toxins and other metabolites. **Journal Of The Brazilian Chemical Society**, v. 28, p. 521-528, 2017.

BRONZEL, JOÃO L.; MILAGRE, CINTIA D.F. ; MILAGRE, HUMBERTO M.S. Analysis of low-molecular-weight compounds using MALDI- and LDI-TOF-MS: direct detection of active pharmaceutical ingredients in different formulations. **Journal Of Mass Spectrometry**, v. 52, p. 752-758, 2017.

DABDOUB, MIGUEL J.; BRONZEL, J. L.; RAMPIN, MÁRCIA A. Biodiesel: visão crítica do status atual e perspectivas na academia e na indústria. **Química Nova (Online)**, v. 32, p. 776-792, 2009.

Artigo aceito para publicação:

SILVA, L. P.; DEBIAGE, R. R.; BRONZEL JR., JOÃO L.; SILVA, R. M. G. *In vitro* anthelmintic activity of *Psidium guajava* hydroalcoholic extract against gastro-intestinal sheep nematodes. **Anais Da Academia Brasileira De Ciências (Online)**, 2020.

Resumos publicados em anais de congressos:

BRONZEL, J. L. JR.; MILAGRE, C. D. F. ; MILAGRE, H. M. S. New methodology for the analysis of pharmaceutical drugs by MALDI-MS. In: 39ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2016, Goiânia.

BRONZEL, J. L. JR.; MILAGRE, H. M. S. Ionic matrices: improving the microcystin quantitative analysis by MALDI-TOF-MS. In: 39ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2016, Goiânia.

BRONZEL, J. L. JR.; LUIZETE, M. F. ; MILAGRE, H. MALDI-TOF-MS for the differentiation of strains of cyanobacteria by their secondary metabolites profile. In:

63rd ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, 2015, St. Louis MO. Proceedings of the 63rd ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, 2015.

LUIZETE, M. F. ; BRONZEL, J. L. JR. ; MILAGRE, H. Peptides quantification: improved performance by the binary matrices system for MALDI-TOF-MS. In: 63rd ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, 2015, St. Louis, MO. Proceedings of the 63rd ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, 2015.

CODO, A. C. ; BRONZEL, J. L. JR. ; LUIZETE, M. F. ; MILAGRE, H. . Metabolomic profiling of cyanobacteria by mass spectrometry. In: 38^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2015, Águas de Lindóia - SP.

SILVA, A. A. ; CAVALHEIRO, A. J. ; SOUZA, S. A. C. D. ; TURATTI, I. C. C. ; BRONZEL, J. L. JR. . Identification of chemical composition of epicuticular wax from leaves of sugarcane varieties. In: 4th Brazilian Conference on Natural Products, 2013, Natal - RN.

Apresentações de trabalho:

CUNHA, G.; OLIVEIRA, Y.; CONSOLARO, H.; BRONZEL, J.; FURLAN, M.; JESUS, P.; GONCALVES, L. A.; SEVERINO, V. G. P. Leaf spray mass spectrometry guided by histochemistry in *Eugenia pitanga* (O.Berg) Nied and *Eugenia dysenterica* DC. leaves. In: 7th Brazilian Conference on Natural Products / XXXI RESEM, 2019, Rio de Janeiro - RJ.

FIGUEIREDO, C. C. M.; MARTINS, G. R.; BRONZEL, J. L. Jr.; SILVA, L. P.; SILVA, R. M. G. Potencial antioxidante de geléias de frutos de *Chrysophillum cainito* L. (Abiu roxo), *Hancorina speciosa* gomes (mangaba) e *Plinia glomerata* berg (jabuticaba amarela). In: 6^o Simpósio de Segurança Alimentar, 2018, Gramado-RS.

SILVA, L. P.; DEBIAGE, R. R.; JOÃO L. BRONZEL.; SILVA, R. M. G. Polyphenolic compounds of *Psidium Guajava* Linn. extract with anthelmintic activity. In: XXIXth International Conference on Polyphenols. In: XXIXth International Conference on Polyphenols / 9th Tannin Conference, 2018, Madison-WI (EUA).

GOMES, A. C.; FUGUEIREDO, C. C. M.; XIMENES, V. F.; BRONZEL JR., JOÃO L.; SILVA, R. M. G. Anti-glycation activity evaluation and flavonoids content screening of *Passiflora cincinnata* mast. 2018. In: 7th Brazilian Biotechnology Congress / 2nd Biotechnology Ibero-American Congress, 2018, Brasília – DF.

VARGAS, A.; BRONZEL, J. L. JR.; FURLAN, M. Identification of *Piper tuberculatum* piperamides by tissue spray ionization mass spectrometry (TSI-MS). In: 6th Brazilian Conference on Natural Products/XXXII RESEM, 2017, Vitória - ES.

GRANERO, F. ; MARTINS, G. ; BRONZEL, J. L. JR. ; MECINA, G. ; SILVA, R. . Unconventional wild edible fruits with antioxidant and antiglycation potential. In: 6th Brazilian Conference on Natural Products/XXXII RESEM, 2017, Vitória - ES.

BRONZEL, J. L. JR.; FURLAN, M. . Tissue spray - mass spectrometry: an attempt to map *Catharanthus roseus* terpenoid indole alkaloids biosynthesis. In: 6th Brazilian Conference on Natural Products/XXXII RESEM, 2017, Vitória - ES.

VIEL, A. M. ; BRONZEL, J. L. JR. ; SILVA, R. ; MELLO, E. C.T. . Physiological response, in vitro, of gastrointestinal helminths of sheep, exposed to *Psidium guajava* extract. In: 6th Brazilian Conference on Natural Products/XXXII RESEM, 2017, Vitória - ES.

SPERA, K. D. ; SILVA, R. M. G. ; BRONZEL, J. L. JR. ; SANTOS, P. . Determination of sugars present in *A. crassiflora* and *A. cacans*. In: 6th Brazilian Conference on Natural Products/XXXII RESEM, 2017, Vitória - ES.

BRONZEL, J. L. JR.; MILAGRE, C. D. F.; MILAGRE, H. M. S. . New methodology for the analysis of pharmaceutical drugs by MALDI-MS. In: 39ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2016, Goiânia - GO.

BRONZEL JR., JOÃO L.; MILAGRE, H. M. S. . Ionic matrices: improving the microcystin quantitative analysis by MALDI-TOF-MS. In: 39ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2016, Goiânia - GO.

BRONZEL, J. L. JR.; LUIZETE, M. F. ; MILAGRE, H. . MALDI-TOF-MS for the Differentiation of strains of cyanobacteria by their secondary metabolites profile. In: 63rd ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, 2015, St. Louis MO.

CODO, A. C. ; BRONZEL, J. L. JR. ; LUIZETE, M. F. ; MILAGRE, H. . Metabolomic profiling of cyanobacteria by mass spectrometry. In: 38ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2015, Águas de Lindóia - SP.

LUIZETE, M. F. ; BRONZEL, J. L. Jr. ; MILAGRE, H. . Peptides quantification: Improved Performance by the Binary Matrices System for MALDI-TOF-MS. In: 63rd ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, 2015, St. Louis MO.

SILVA, A. A. ; CAVALHEIRO, A. J. ; SOUZA, S. A. C. D. ; TURATTI, I. C. C. ; Bronzel, J. L. Jr. Identification of chemical composition of epicuticular wax from leaves of sugarcane varieties. In: 4th Brazilian Conference on Natural Products, 2013, Natal - RN.

Experiência Profissional:

(1) Estágio na Companhia Müller de Bebidas na área de controle de qualidade no período entre 04/10/2010 a 30/06/2011.

(2) Atuação como químico no Departamento de Bioquímica e Química Orgânica do Instituto de Química de Araraquara desde Fevereiro de 2012.

***Dedico este trabalho à minha filha Laura, a forma mais pura de vida que pude
conhecer.***

AGRADECIMENTOS

A Deus por todas as experiências que a vida me proporcionou até aqui.

À minha amada esposa Cristiane, pela compreensão em momentos nos quais estive ausente; por suas palavras de motivação, em momentos de tristeza, e de resiliência, em momentos de ansiedade; pelo amor, carinho e disposição em ajudar-me sempre e principalmente, por me permitir a experiência mais gratificante de minha vida: a paternidade.

A meus pais, pelo amor, apoio incondicional, carinho e cujos esforços permitiram meu acesso ao encantador mundo da ciência.

A meus avós Antônio Martins (*in memoriam*), Dirce Antonia Zanetti Martins (*in memoriam*), João Bronzel (*in memoriam*) e Therezinha de Moraes Bronzel, fontes de inspiração pela força, perseverança e por nunca se deixaram abater perante os sacrifícios que enfrentaram ao longo da vida.

À Prof.^a Maysa Furlan pela paciência, amizade, pelos ensinamentos e discussões sobre ciência que enriqueceram sobremaneira minha experiência profissional e a quem tenho como exemplo para o futuro de minha carreira.

A meus amigos Wellington Lima, Alexander Alves, Juliana Rodrigues, Marcos Peliçon, Juliano Passaretti Filho, Amauri Alves, sempre solidários e com quem sempre pude contar, tanto em momentos de alegria quanto de tristeza.

A Gabriel Pivoto, Mariana Pivoto, Maria Luiza Gioster, pela amizade e por momentos de descontração que tornaram a vida muito mais leve e proporcionaram muitas alegrias ao longo de nossa convivência.

A todos os colegas do NuBBE, com os quais dividi muitos aprendizados e momentos de alegria.

Ao Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus), particularmente aos pesquisadores Dr. Nelson Arno Wulff e Dr. Rodrigo Facchini Magnani pelas amostras cedidas e pelas proveitosas discussões sobre o *greening* de *Citrus*.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química e ao Instituto de Química de Araraquara pelo apoio e infraestrutura.

À FAPESP e CNPq, por fomentarem direta ou indiretamente as pesquisas apresentadas neste trabalho.

À CAPES pela manutenção do Portal de Periódicos.

(...)Lutemos por um mundo de razão, um mundo em que a ciência e o progresso conduzam à ventura de todos nós.(...)

Discurso de "O Grande Ditador".

Charles Chaplin, 1940

RESUMO

Atualmente, a espectrometria de massas é uma das técnicas analíticas de maior destaque em diversos campos de aplicação. As modernas técnicas de ionização apresentam grande versatilidade, permitindo a análise direta de várias matrizes complexas. Dentre elas, destacam-se as técnicas de ionização por *paper spray* (*Paper Spray Ionization* - PSI), e a ionização por *tissue spray* (*Tissue Spray Ionization* - TSI), as quais apresentam como principais vantagens a simplicidade no preparo de amostras, a rapidez da análise e o baixo consumo de solventes, conceitos que apresentam-se alinhados a alguns dos princípios da química analítica verde. Nesse trabalho a técnica de análise direta TSI-MS foi utilizada para mapear a via biossintética dos alcaloides indólicos terpenoídicos (AITs) em folhas e flores de *Catharanthus roseus*. Esse estudo resultou na detecção de vários produtos finais dessa via, com destaque para serpentina, alstonina, vindolinina e seu epímero 19-S-vindolinina, 3,4-anidrovinblastina e vimblastina. Além disso, foi possível identificar o alcaloide bisindólico serpentinina, o que resultou no primeiro relato dessa substância em flores de *Catharanthus roseus*. Essa mesma técnica também foi utilizada no estudo das variações metabólicas em *Citrus sinensis* var. Valência causadas pela infecção por *Candidatus Liberibacter asiaticus*, bactéria causadora da enfermidade denominada HLB, comumente conhecida como *greening* de *Citrus*, que afeta diretamente a produção de laranja. Nessa investigação foi possível detectar um maior teor do aminoácido arginina nas folhas de indivíduos infectados. Sob o ponto de vista biossintético, foi possível estabelecer a correlação entre o aumento da produção desse aminoácido a algumas respostas metabólicas atribuídas à defesa da planta. Ainda no âmbito desse trabalho, membranas de poliamida 66 foram utilizadas como fase estacionária em cromatografia planar acoplada à espectrometria de massas pela técnica de PSI, no desenvolvimento de uma metodologia simples, rápida e sustentável para identificação de corantes utilizados na composição de tintas de canetas esferográficas. O método desenvolvido foi aplicado com êxito na detecção de adulterações em documentos, sem prejudicar a interpretação da escrita após a realização das análises.

Palavras-chave: espectrometria de massas, *paper spray*, *tissue spray*, *membrane spray*, *Catharanthus roseus*, *huanglongbing*, análise forense, *Candidatus Liberibacter*.

ABSTRACT

Nowadays, mass spectrometry is one of the most prominent analytical techniques in several application fields. Modern ionization techniques have great versatility, allowing direct analysis of several complex matrices. Among them, paper spray ionization (PSI) and tissue spray ionization (TSI) stand out, because of their main advantages like sample preparation simplicity, the rapidity of analysis and low solvent consumption, concepts which are aligned with some principles of green analytical chemistry. In this work, TSI-MS direct analysis technique was used to map the biosynthetic pathway of terpenoid indolic alkaloids (TIAs) in leaves and flowers of *Catharanthus roseus*. This study resulted in the detection of several final products of this route, with emphasis on serpentine, alstonine, vindolinine and its epimer 19-S-vindolinine, 3,4-anhydrovinblastine and vinblastine. In addition, it was possible to identify the bisindolic alkaloid serpentinine, which resulted in the first report of this substance in *Catharanthus roseus* flowers. TSI-MS was also used to study metabolic variations in *Citrus sinensis* var. Valencia, caused by infection with *Candidatus Liberibacter asiaticus*, a bacterium that causes the disease called HLB, commonly known as *Citrus* greening, which directly affects orange production. In this investigation it was possible to detect a higher concentration of the amino acid arginine in leaves of infected plants. From biosynthetic point of view, it was possible to establish a correlation between the increase in the production of this amino acid and some metabolic responses attributed to plant defense. Still within the scope of this work, polyamide 66 membranes were used as a stationary phase in planar chromatography coupled to mass spectrometry by the PSI-MS technique in the development of a simple, fast and sustainable methodology for identifying dyes used in the composition of ballpoint pen inks. The developed method was successfully used to detect adulteration in documents, without impairing the interpretation of the writing after analysis.

Keywords: mass spectrometry, paper spray, tissue spray, membrane spray, *Catharanthus roseus*, *huanglongbing*, forensic analysis, *Candidatus Liberibacter*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 Esquema geral de um espectrômetro de massas.	27
Figura 1.2 Representação esquemática da fonte de ionização por elétrons (EI).	29
Figura 1.3 Representação esquemática da fonte de ionização química (CI).	30
Figura 1.4 Espectros da efedrina obtidos por EI-MS (A) e CI-MS (B).	30
Figura 1.5 Representação esquemática da fonte de ionização química a pressão atmosférica (APCI).	31
Figura 1.6 Representação esquemática da fonte de ionização por eletrospray (ESI).	32
Figura 1.7 Esquema do procedimento de análise pela técnica de PSI-MS.	34
Figura 1.8 Esquema do procedimento de análise pela técnica de TSI-MS.	35
Figura 2.1 Estruturas químicas de alcaloides indólicos terpenoídicos representativos de <i>Catharanthus roseus</i>	44
Figura 2.2 Biossíntese dos AITs em <i>Catharanthus roseus</i>	45
Figura 2.3 Preparo de amostras para o experimento de TSI-MS/MS.	49
Figura 2.4 Espectros de (+)-TSI-MS obtidos de folha (A) e flor (B) de <i>Catharanthus roseus</i>	53
Figura 2.5 Mecanismo de fragmentação dos íons $[M+H]^+$ gerados a partir da strictosidina.	55
Figura 2.6 Mecanismo de fragmentação dos íons $[M+H]^+$ gerados a partir da ajmalicina.	58
Figura 2.7 Mecanismo de fragmentação dos íons $[M+H]^+$ gerados a partir da 16-hidroxitabersonina.	59
Figura 2.8 Mecanismo de fragmentação dos íons $[M+H]^+$ gerados a partir da 19-hidroxitabersonina.	60
Figura 2.9 Cromatogramas EIC (m/z 353), obtidos por HPLC-MS/MS a partir da análise dos extratos metanólicos de folhas (A) e flores (B) acompanhados dos espectros de MS/MS de cada banda cromatográfica.	61
Figura 2.10 Mecanismo de fragmentação dos íons $[M]^+$ correspondentes ao par de epímeros serpentina/alstonina.	62

Figura 2.11 Cromatogramas EIC (m/z 349), obtidos por HPLC-MS/MS a partir da análise dos extratos metanólicos de folhas (A) e flores (B) acompanhados dos espectros de MS/MS de cada banda cromatográfica.....	63
Figura 2.12 Mecanismo de fragmentação dos íons $[M+H]^+$ gerados a partir da vindolinina (A) e da catarantina (B).	64
Figura 2.13 Cromatogramas EIC (m/z 337), obtidos por HPLC-MS/MS a partir da análise dos extratos metanólicos das folhas (A) e flores (B) acompanhados dos espectros de MS/MS de cada banda cromatográfica.....	65
Figura 2.14 Mecanismo de fragmentação dos íons $[M+H]^+$ gerados a partir da 16-metoxitabersonina.....	67
Figura 2.15 Mecanismo de fragmentação dos íons $[M+H]^+$ gerados a partir dos metabólitos vindolina e desmetoxivindolina.....	68
Figura 2.16 Mecanismo de fragmentação dos íons $[M+2H]^{2+}$ gerados a partir da 3,4-anidrovinblastina.....	70
Figura 2.17 Espectro de dissociação do íon com m/z 397 obtido por (+)-ESI-QqTOF-MS/MS.	71
Figura 2.18 Mecanismo de fragmentação dos íons $[M+H]^+$ gerados a partir da 3,4-anidrovinblastina.....	72
Figura 2.19 Mecanismo de fragmentação dos íons $[M+2H]^{2+}$ gerados a partir da vinblastina.....	73
Figura 2.20 Espectro de dissociação do íon com m/z 406 obtido por (+)-ESI-QqTOF-MS/MS.	74
Figura 2.21 Mecanismo de fragmentação dos íons $[M]^+$ correspondentes à serpentinina.	75
Figura 2.22 Resumo dos AITs detectados em folhas e flores de <i>Catharanthus roseus</i> por TSI-MS/MS.....	76
Figura 2.23 Mecanismo de fragmentação dos íons $[M]^+$ correspondentes a hirsutidina 3-O-[6-O-(α -ramnopiranosil)- β -galactopiranosídeo.	77
Figura 2.24 Mecanismo de fragmentação dos íons $[M+H]^+$ gerados a partir da feofitina-a.	78
Figura 3.1 Colônia de bactérias <i>Candidatus Liberibacter americanus</i> habitando vasos de floema de vinca (<i>Catharanthus roseus</i>).....	85

Figura 3.2 Sintomas apresentados por plantas infectadas por <i>Candidatus Liberibacter</i> . A e B mostram frutos assimétricos devido à má formação, C e D apresentam frutos oriundos de plantas saudáveis. E, F e G mostram folhas que apresentam mosqueamento e H, a ocorrência de ponteiros secos.	86
Figura 3.3 Psílideo de <i>Citrus</i> , <i>Diaphorina Citri</i> , vetor da bactéria <i>Candidatus Liberibacter</i> e ninfas dessa espécie alimentando-se do floema.	87
Figura 3.4 Acoplamento do corte da folha à fonte de ionização do espectrômetro de massas.....	92
Figura 3.5 Padronização da granulometria do material vegetal realizado previamente à extração.	96
Figura 3.6 Espectro de (+)-TSI-MS de folhas de <i>Citrus sinensis</i> , var. Valência não infectadas.....	99
Figura 3.7 Espectro de (+)-TSI-MS de folhas de <i>Citrus sinensis</i> , var. Valência não infectadas após <i>clean up</i>	101
Figura 3.8 Espectro de (-)-TSI-MS de folhas de <i>Citrus sinensis</i> , var. Valência não infectadas após <i>clean up</i>	102
Figura 3.9 Comparação entre os espectros de (+)-TSI-MS de folhas de <i>Citrus sinensis</i> , var. Valência saudáveis (A) e infectadas (B).....	102
Figura 3.10 Comparação entre as análises preliminares de TSI-MS em triplicatas das folhas dos indivíduos NI (A) e IS (B).....	103
Figura 3.11 Comparação entre os espectros de DI-(+)-ESI-QqTOF-MS dos extratos metanólicos de folhas de <i>Citrus sinensis</i> , var. Valência saudáveis (A) e infectadas (B).	104
Figura 3.12 Espectro de DI-(+)-ESI-QqTOF-MS/MS do íon de m/z 175,1177.	105
Figura 3.13 Proposta de mecanismo de fragmentação da arginina em sua forma protonada $[M+H]^+$ e as razões m/z teóricas de cada íon produto gerado.	106
Figura 3.14 Espectro de DI-(+)-ESI-QqTOF-MS/MS dos íons com m/z 144,1014.	106
Figura 3.15 Proposta de mecanismo de fragmentação iônica da prolina betaína $[M]^+$ e as razões m/z teóricas de cada íon produto gerado.....	107
Figura 3.16 Espectro de DI-(+)-ESI-QqTOF-MS/MS dos íons com m/z 116,0703.	107

Figura 3.17 Proposta de mecanismo de fragmentação iônica do aminoácido prolina em sua forma protonada $[M+H]^+$ e as razões m/z teóricas de cada íon produto gerado.	108
Figura 3.18 Espectro de DI-(+)-ESI-QqTOF-MS/MS dos íons com m/z 265,1537.	108
Figura 3.19 Proposta de mecanismo de fragmentação iônica da feruloilputrescina em sua forma protonada $[M+H]^+$ e as razões m/z teóricas de cada íon produto gerado. (A) e (B) representam as vias de fragmentação que se diferenciam com base no sítio de protonação.	109
Figura 3.20 Espectro de DI-(+)-ESI-QqTOF-MS/MS dos íons com m/z 160,0965.	110
Figura 3.21 Proposta de mecanismo de fragmentação dos íons $[M]^+$ da 4-hidroxi prolina betaína e as razões m/z teóricas de cada íon produto gerado.	110
Figura 3.22 Espectro de dissociação dos íons com m/z 318,2, adquirido por (+)-TSI-MS/MS.	111
Figura 3.23 Proposta de formação dos íons produto com m/z 175 e 144 a partir do íon precursor com m/z 318.	111
Figura 3.24 Gráficos de <i>loadings</i> das componentes 01, 02 e 03.	113
Figura 3.25 Gráfico de PCA do conjunto de dados obtidos pelas análises de TSI-MS.	114
Figura 3.26 Gráfico de PCA <i>bi-plot</i> do conjunto de dados obtidos pelas análises de TSI-MS.	115
Figura 3.27 Cromatogramas de pico base (BPC) obtidos através do experimento de UPLC-QqTOF-MS ^E para os extratos NI e IS.	115
Figura 3.28 Cromatogramas EIC para m/z 318,214; 144,102 e 175,119.	116
Figura 3.29 Gráficos de <i>loadings</i> para as componentes 01 (A) e 02 (B).	117
Figura 3.30 Gráfico de PCA do conjunto de dados obtidos através das análises de UPLC-QqTOF-MS ^E	118
Figura 3.31 Gráfico de PCA <i>bi-plot</i> do conjunto de dados obtidos através das análises de UPLC-QqTOF-MS ^E	119
Figura 3.32 Cromatogramas BPC (A) e EIC (B, C e D) representativos de indivíduos IS. (B) representa o cromatograma obtido pela extração da razão m/z 175, enquanto C e D representam as razões m/z 265 e 353 respectivamente.	120

Figura 3.33 Gráfico de barras construído com a média dos valores de A_{175}/API e A_{265}/API para cada triplicata de amostra.	121
Figura 3.34 Biossíntese da arginina a partir da ornitina.	122
Figura 3.35 Metabolismo da arginina demonstrando a formação de óxido nítrico e das poliaminas.	122
Figura 4.1 Esquema representativo da análise por cromatografia planar acoplada à espectrometria de massas.	132
Figura 4.2 Preparação da membrana para realização dos experimentos de cromatografia planar.	134
Figura 4.3 Esquema da metodologia utilizada na aplicação da amostra de tinta de caneta esferográfica na membrana de poliamida.	135
Figura 4.4 Simulação de adulteração de valores (A) e metodologia de amostragem da tinta contida na escrita (B).	135
Figura 4.5 Esquema do procedimento de eluição das amostras de tintas de caneta esferográfica.	136
Figura 4.6 Cálculo do fator de retenção das bandas cromatográficas após desenvolvimento da cromatografia planar.	137
Figura 4.7 Espectro de (+)-MeSI-MS da membrana de poliamida 66.	138
Figura 4.8 Estrutura química do dímero (A) e do trímero (B) de poliamida 66 descritos na literatura.	139
Figura 4.9 Espectros de (+)-MeSI-MS/MS gerados pela fragmentação dos íons de m/z 453,4 e 679,5.	139
Figura 4.10 Espectros de (+)-ESI-MS/MS de oligômeros contendo duas (a) e três unidades (b) do monômero de poliamida.	140
Figura 4.11 Cromatograma de tinta da caneta esferográfica Bic Crystal® preta.	140
Figura 4.12 Espectros de (+)-MeSI-MS da banda de coloração violeta (A) e (-)-MeSI-MS da banda de coloração amarela (B) da tinta da caneta Bic Crystal® preta.	141
Figura 4.13 Cromatograma comparativo entre tintas de canetas esferográficas pretas. (1) Bic Crystal®; (2) Papermate Kilometrica®; (3) Compactor top 2000®; (4) Jocar Office®.	142
Figura 4.14 Cromatograma comparativo entre tintas de canetas esferográficas Bic Crystal® azul (1), Bic Crystal® roxa (2), Bic Crystal® vermelha (3). A imagem do	

cromatograma (A) foi obtida sob luz ambiente, enquanto a imagem do cromatograma (B) foi obtida sob luz UV com comprimento de onda de 254 nm.	142
Figura 4.15 Espectro de (+)MeSI-MS das bandas violeta (A) e azul (B) da caneta Bic Crystal® azul.	143
Figura 4.16 Espectros de (-)-MeSI-MS da banda amarela (A) e (+)-MeSI-MS da banda rosa separadas a partir da tinta da caneta Bic Crystal® vermelha.	144
Figura 4.17 Estruturas químicas dos corantes rodamina B e 6G utilizados como componentes de tintas vermelhas.	144
Figura 4.18 Espectro de (+)-MeSI-MS/MS da banda rosa que compõe a tinta da caneta Bic Crystal® de coloração vermelha.....	145
Figura 4.19 Espectro de (+)-MeSI-MS da banda rosa que compõe a tinta da caneta Bic Crystal® de coloração roxa.	146
Figura 4.20 Cromatogramas das tintas de caneta Bic Crystal® azul, roxa e vermelha, obtidos utilizando-se como eluente uma solução 0,5% de NH ₄ OH em EtOH.	146
Figura 4.21 Cromatogramas das tintas de caneta Bic Crystal® azul, roxa e vermelha, obtidos utilizando-se como eluente uma solução 0,5% de ácido acético glacial em EtOH.	147
Figura 4.22 Esquema ilustrativo da simulação de adulteração e do processo de análise dos pontos de amostragem da tinta de caneta nas regiões de interesse.	148
Figura 4.23 Espectros de (-)-MeSI-MS das regiões da membrana correspondentes ao <i>R_f</i> do corante amarelo de metanila. A presença do sinal correspondente a esse corante é apontada com uma seta vermelha.	149
Figura 4.24 Imagem da escrita após extração da tinta (A) e seu verso (B).....	149

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 Íons produto obtidos por (+)-TSI-MS/MS em folhas de <i>Catharanthus roseus</i>	53
Tabela 2.2 Íons produto obtidos por (+)-TSI-MS/MS em flores de <i>Catharanthus roseus</i>	54
Tabela 2.3 Valores de <i>m/z</i> calculados e experimentais, obtidos pela análise de DI-ESI-QqTOF-MS do extrato de folhas (L) e flores (F).	56
Tabela 3.1 Autovalores e % da variância para cada componente principal após realização da análise de componentes principais.	112

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

A: fase móvel de menor força de eluição.

ACN: acetonitrila.

ACS: *American Chemical Society* – Sociedade Americana de Química.

AIT: alcaloide indólico terpenoídico.

APCI: *atmospheric pressure chemical ionization* – ionização química a pressão atmosférica.

B: fase móvel de maior força de eluição.

CI: *chemical ionization* – ionização química.

CID: *collision induced dissociation* – dissociação induzida por colisão.

CR: catenamina redutase.

DAD: detector de arranjo de diodos.

DI: *direct infusion* – infusão direta

DPAS: desidroprecondilocarpina sintase.

EI: *electron ionization* - ionização por elétrons.

EIC: *extracted ion chromatogram* – cromatograma de íon extraído.

ESI: *electrospray ionization* – ionização por eletrospray.

EtOH: etanol.

GS: geissoschizina sintase.

HCCA: *hydroxycinnamic acid amides* – amidas de ácidos hidroxicinâmicos.

HPLC: *high performance liquid chromatography* – cromatografia líquida de alta eficiência.

IS: indivíduos infectados sintomáticos.

IT: analisador do tipo *ion trap*.

***m/z*:** valor adimensional que se refere à relação entre a massa iônica, calculada pela soma das massas atômicas dos elementos que compõem um determinado íon e seu número de cargas elementares.

MALDI: *matrix assisted laser/desorption ionization* – ionização/dessorção a laser assistida por matriz.

MeOH: metanol.

MeSI: *membrane spray ionization* – ionização por membrane spray.

MS: *mass spectrometry* – espectrometria de massas.

MS/MS: espectrometria de massas sequencial de duplo estágio.

NI: indivíduos não infectados.

NOS: óxido nítrico sintase.

OMT: O-metiltransferase.

P.A.: para análise.

PAL: *phenylalanine ammonia lyase* - fenilalanina amônia liase.

PCA: *principal component analysis* - análise de componentes principais.

PMC: *polyamide membrane chromatography* - cromatografia em membrana de poliamida.

POD: peroxidase.

ppm: partes por milhão (usado para expressar o erro relativo da medida de *m/z* em relação à *m/z* calculada).

PSI: *paper spray ionization* - ionização por *paper spray*.

Q: analisador do tipo quadrupolo.

q: célula de colisão.

Rf: *retention factor* - fator de retenção.

SGD: secologanina desglicosidase.

SPE: *solid phase extraction* – extração em fase sólida.

STR: estrictosidina sintase.

T16H: tabersonina 16-hidroxilase.

THAS: tetraidroalstonina sintase.

TS: tabersonina sintase.

TSI: *tissue spray ionization* – ionização por *tissue spray*.

UPLC: *ultra-performance liquid chromatography* – cromatografia líquida de ultra-eficiência.

UV: ultravioleta.

SUMÁRIO

Capítulo 01	26
1.1 INTRODUÇÃO	26
1.2 CONCEITOS E DEFINIÇÕES EM ESPECTROMETRIA DE MASSAS	26
1.3 PERSPECTIVA HISTÓRICA DO DESENVOLVIMENTO DA TÉCNICA DE ESI	27
1.4 TÉCNICAS DE ANÁLISE DIRETA POR <i>PAPER SPRAY-MS</i> E <i>TISSUE SPRAY-MS</i>	33
1.5 OBJETIVO	36
1.6 REFERÊNCIAS	36
Capítulo 02	44
2.1 INTRODUÇÃO	44
2.2 OBJETIVOS	47
2.3 MATERIAIS E MÉTODOS	47
2.3.1 Experimentos de TSI-MS/MS	48
2.3.1.1 Preparo de amostras	48
2.3.1.2 Análise por TSI-MS/MS	48
2.3.2 Experimento de DI-ESI-QqTOF-MS	49
2.3.2.1 Preparo de amostras	49
2.3.2.2 Análise por DI-ESI-QqTOF-MS	50
2.3.3 Experimento de HPLC-ESI-IT-MS/MS	50
2.3.3.1 Preparo de amostras	50
2.3.3.2 Análise por HPLC-ESI-IT-MS/MS	51
2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
2.5 CONCLUSÃO	79
2.6 REFERÊNCIAS	79
Capítulo 03	85

3.1	INTRODUÇÃO	85
3.2	OBJETIVOS	89
3.3	MATERIAIS E MÉTODOS	89
3.3.1	Experimentos de TSI-MS	91
3.3.1.1	Amostragem.....	91
3.3.1.2	Preparo de amostras.....	91
3.3.1.3	Análise por TSI-MS.....	91
3.3.1.4	Análise de componentes principais dos dados de TSI-MS.....	92
3.3.2	Experimento de DI-ESI-QqTOF-MS/MS	93
3.3.2.1	Amostragem.....	93
3.3.2.2	Preparo de amostras.....	93
3.3.2.3	Análise por DI-ESI-QqTOF-MS	94
3.3.3	Experimento de UPLC-ESI-QqTOF-MS^E.....	95
3.3.3.1	Amostragem.....	95
3.3.3.2	Extração dos metabólitos do material vegetal	95
3.3.3.3	Preparo de amostras.....	96
3.3.3.4	Análise por UPLC-ESI-QqTOF-MS^E	97
3.3.3.5	Análise de componentes principais dos dados de UPLC- QqTOF-MS^E.....	98
3.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	99
3.4.1	Desenvolvimento de método e análises preliminares	99
3.4.2	Análise de componentes principais (PCA) dos dados obtidos por TSI-MS.....	112
3.4.3	Avaliação dos possíveis biomarcadores por UPLC-ESI-QqTOF-MS^E	115
3.5	CONCLUSÃO.....	124
3.6	REFERÊNCIAS	124
Capítulo 04.....		131

4.1	INTRODUÇÃO	131
4.2	OBJETIVOS	133
4.3	MATERIAIS E MÉTODOS	133
4.3.1	Análise por PMC.....	134
4.3.1.1	Preparo de amostras para a identificação dos corantes de tinta de caneta esferográfica por PMC-MeSI-MS	134
4.3.1.2	Preparo de amostra para a detecção de adulterações de escrita por PMC-MeSI-MS	135
4.3.1.3	Eluição das amostras	136
4.3.2	Análise das bandas cromatográficas por MeSI-MS e MeSI-MS/MS	137
4.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	138
4.4.1	Aplicação da PMC-MeSI-MS na análise qualitativa de tintas de canetas esferográficas.....	138
4.4.2	Aplicação da PMC-MeSI-MS na detecção de adulterações de documentos	147
4.5	CONCLUSÃO.....	150
4.6	REFERÊNCIAS	150
	Considerações Finais.....	154
	APÊNDICES	155

Capítulo 01

Espectrometria de Massas: Introdução às Técnicas de Análise Direta por *Paper Spray-MS* e *Tissue Spray-MS*.

1.1 INTRODUÇÃO

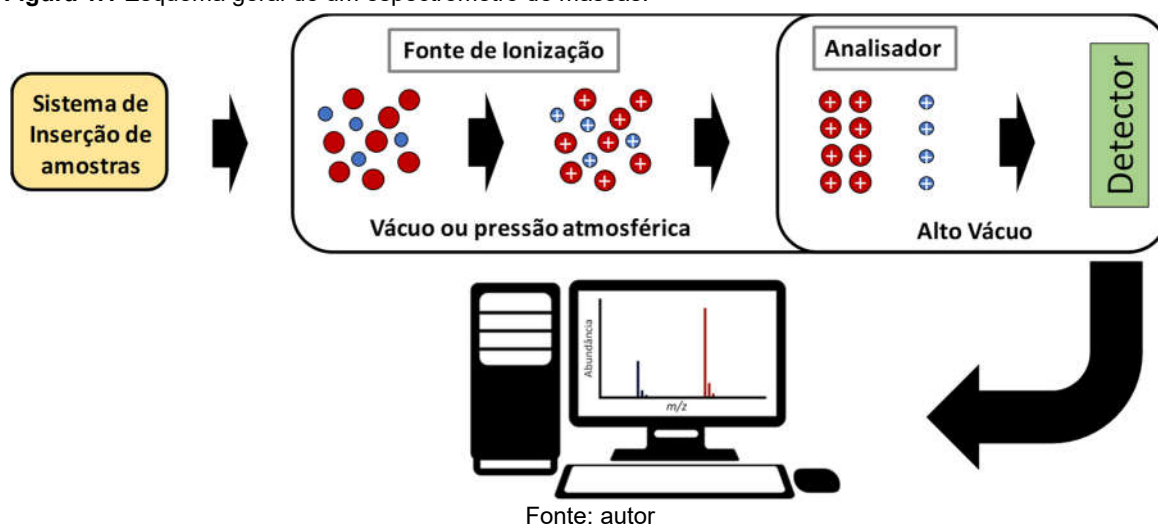
Nas últimas décadas a espectrometria de massas tem se destacado como ferramenta analítica nas mais diversas aplicações, tanto em análises de substâncias voláteis e de baixa massa molecular^{1; 2} como de macromoléculas biológicas³⁻⁶ e polímeros sintéticos.^{7; 8} Essa técnica tem desempenhado um papel determinante na investigação de processos metabólicos em organismos vivos, aplicação que varia desde a simples detecção ou quantificação de metabólitos em extratos⁹⁻¹¹ até o imageamento de biomarcadores em tecidos.¹² O seu grande sucesso se deve principalmente a características como elevada detectabilidade,¹³ seletividade,¹⁴ possibilidade de acoplamento com técnicas de separação¹⁵ e versatilidade, garantida, em grande parte, pelos variados tipos de fontes de ionização disponíveis para aplicações em diversas áreas.¹⁶

1.2 CONCEITOS E DEFINIÇÕES EM ESPECTROMETRIA DE MASSAS

A espectrometria de massas é uma técnica analítica capaz de determinar a razão massa/carga (m/z) de íons.¹⁷ O espectrômetro de massas é constituído por uma fonte de ionização, responsável por gerar íons (cátions ou ânions) a partir de moléculas neutras; um analisador de massas, responsável por separar os íons de acordo com suas razões m/z ; e um detector, que produz uma corrente elétrica quando atingido pelos íons provenientes do analisador (Figura 1.1, p. 27).¹⁸ A medida dessa corrente é utilizada por um sistema de aquisição de dados para gerar o espectro de massas, o qual consiste em um gráfico cujo eixo x exibe a razão m/z dos íons detectados e o eixo y, sua intensidade relativa ou absoluta.¹⁷ Os analisadores e os

detectores ficam situados em uma câmara mantida sob alto vácuo.¹⁹ Já as fontes de ionização podem ser divididas em dois grupos: fontes restritas a operação em alto vácuo, como a ionização por elétrons (*electron ionization* - EI), e fontes que operam a pressão ambiente, como a fonte de ionização por eletrospray (*electrospray ionization* - ESI).²⁰ Além dessa classificação, pode-se agrupar as fontes de ionização de acordo com o estado físico da amostra analisada em fontes de ionização em estado sólido (e.g.: dessorção/ionização a laser assistida por matriz – *matrix assisted laser desorption/ionization* - MALDI), em estado líquido (e.g.: ESI) e em fase gasosa (e.g.: EI).²¹

Figura 1.1 Esquema geral de um espectrômetro de massas.



A introdução das amostras no espectrômetro de massas é realizada por um sistema de inserção adequado à fonte de ionização utilizada. Para amostras analisadas em equipamentos com fonte ESI, comumente emprega-se seringas para a realização de infusões diretas²² ou sistemas de cromatografia líquida, acoplados ao espectrômetro, que promovem a separação dos compostos presentes na amostra antes de sua introdução na fonte de ionização.²³

1.3 PERSPECTIVA HISTÓRICA DO DESENVOLVIMENTO DA TÉCNICA DE ESI

O desenvolvimento de novas técnicas de ionização foi essencial para tornar a espectrometria de massas uma das técnicas analíticas mais difundidas em todo mundo. Seu marco inicial ocorreu na segunda década do século XIX com os trabalhos

de Joseph John Thomsom (1856-1940) que estudou as propriedades dos raios catódicos gerados pela passagem de uma corrente elétrica através de um tubo de vidro contendo gases rarefeitos.²⁴

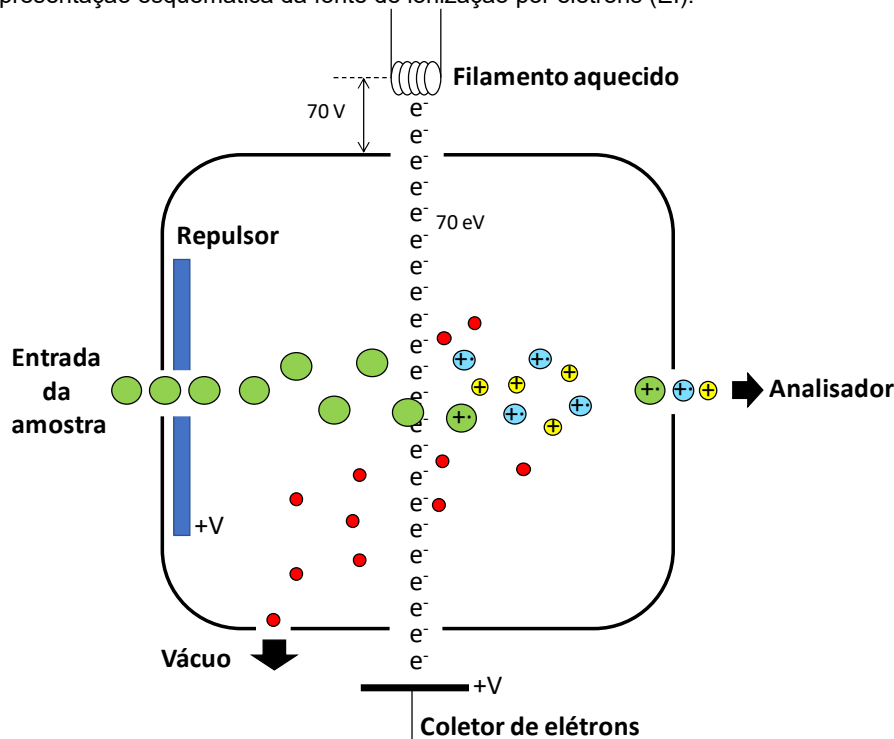
Em 1918, Arthur J. Dempster (1886-1950) utilizou um feixe de elétrons para promover a ionização de sólidos.²⁵ Essa técnica é atualmente denominada ionização por elétrons (*electron ionization* – EI).²⁶ Utilizando a EI, além de outras descobertas, Dempster revelou a existência de uma série de isótopos, dentre eles três isótopos do elemento Magnésio.²⁷

Baseando-se na fonte de ionização criada por Dempster, Walker Bleakney (EUA, 1911-1992) desenvolveu em 1929 a fonte de ionização por elétrons em fase gasosa,²⁸ o que posteriormente possibilitaria a análise de substâncias orgânicas, permitindo o estudo da estrutura química de inúmeras substâncias provenientes do petróleo²⁹ e de outras fontes naturais, como plantas^{30; 31} e microrganismos.³² O conceito fundamental da EI baseia-se na interação de substâncias em fase gasosa com um feixe de elétrons, produzidos por um filamento aquecido de tungstênio ou rênio e acelerados por um potencial de 70 V.³³ Nessa interação, as moléculas sofrem uma transição para um estado de alta energia, perdendo um elétron e gerando o íon molecular, M^+ . A dissipação da energia interna adquirida pela espécie iônica ocorre por excitação dos estados vibracionais, o que, por sua vez, ocasiona a ruptura de ligações químicas, em um processo comumente denominado fragmentação ou dissociação iônica.³⁴ Nesse processo representado pela figura 1.2 (p. 29), a partir do íon molecular precursor, podem ser gerados íons produto com número ímpar de elétrons (M^+), representados em azul, com número par de elétrons (M^+), representados em amarelo, ou moléculas neutras, representadas em vermelho. As espécies iônicas são aceleradas em direção ao analisador por um eletrodo repulsor mantido, no exemplo em questão, a um potencial positivo, enquanto as moléculas neutras são expulsas da câmara de ionização por ação do sistema de vácuo do espectrômetro de massas.³⁵

A interação entre o feixe de elétrons e as moléculas do analito também podem gerar espécies aniônicas pelo processo de captura de elétrons. Essas espécies são aceleradas em direção ao analisador, utilizando-se uma voltagem negativa no eletrodo repulsor. Nesse contexto pode-se classificar os modos de análise em positivo, quando

cátions são enviados ao analisador e negativo, quando ânions são analisados por esse componente.³³

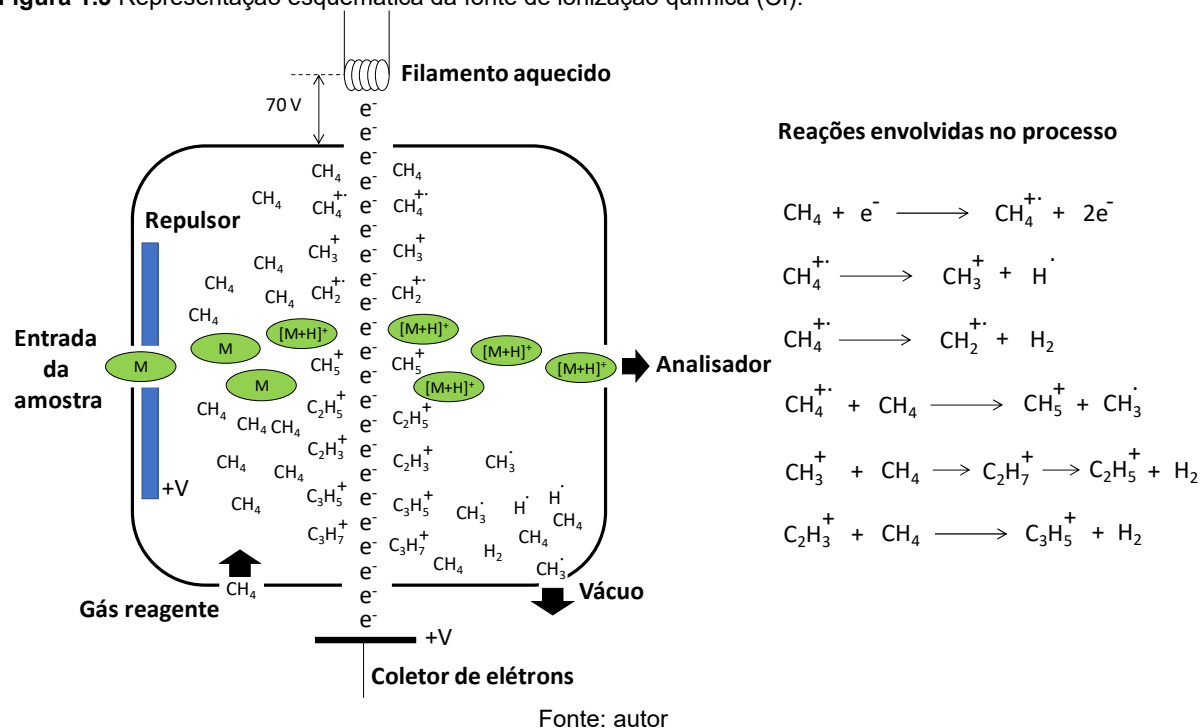
Figura 1.2 Representação esquemática da fonte de ionização por elétrons (EI).



Fonte: autor

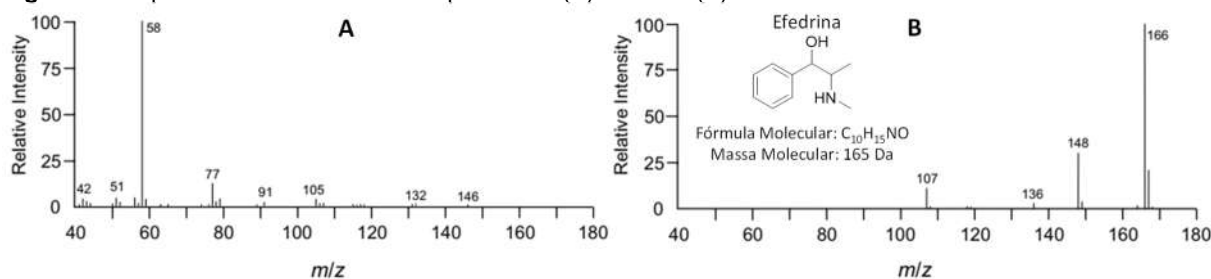
Embora a técnica de EI represente uma importante contribuição para a espectrometria de massas, possibilitando a análise de inúmeras substâncias orgânicas, sua aplicação é restrita a moléculas voláteis e termoestáveis.^{36; 37} Além disso, a alta energia proveniente dos elétrons (70 eV) pode causar excessiva fragmentação iônica, fazendo com que o sinal do íon molecular não seja observado no espectro de massas o que traz grandes desafios ao processo de elucidação estrutural.³⁸ Com a finalidade de contornar essa desvantagem, em 1966 Burnaby Munson e Frank H. Field promoveram modificações na fonte de ionização por elétrons que resultaram no surgimento da técnica denominada ionização química (*chemical ionization* – CI).³⁹ Nessa técnica um gás reagente é introduzido juntamente com a amostra na câmara de ionização. A figura 1.3 (p. 30) representa uma análise por CI-MS realizada no modo positivo utilizando-se metano como gás reagente. Durante essa análise, os elétrons gerados pelo filamento aquecido interagem primariamente com as moléculas de metano, gerando espécies protonadas que transferem seus prótons para as moléculas do analito.⁴⁰

Figura 1.3 Representação esquemática da fonte de ionização química (CI).



Na figura 1.4, são apresentados os espectros da efedrina, adquiridos por EI-MS (A) e por CI-MS (B). A diferença entre essas técnicas de ionização é notável, visto que no espectro de EI-MS, o sinal do íon molecular em m/z 165 não é observado ao passo que no espectro adquirido por CI-MS, o sinal correspondente à efedrina protonada é o mais intenso.³⁸ A CI é classificada como uma técnica de ionização branda, já que a energia transferida para as moléculas durante o processo de ionização é considerada pequena e por isso causa pouca ou, em alguns casos, nenhuma reação de fragmentação.⁴¹

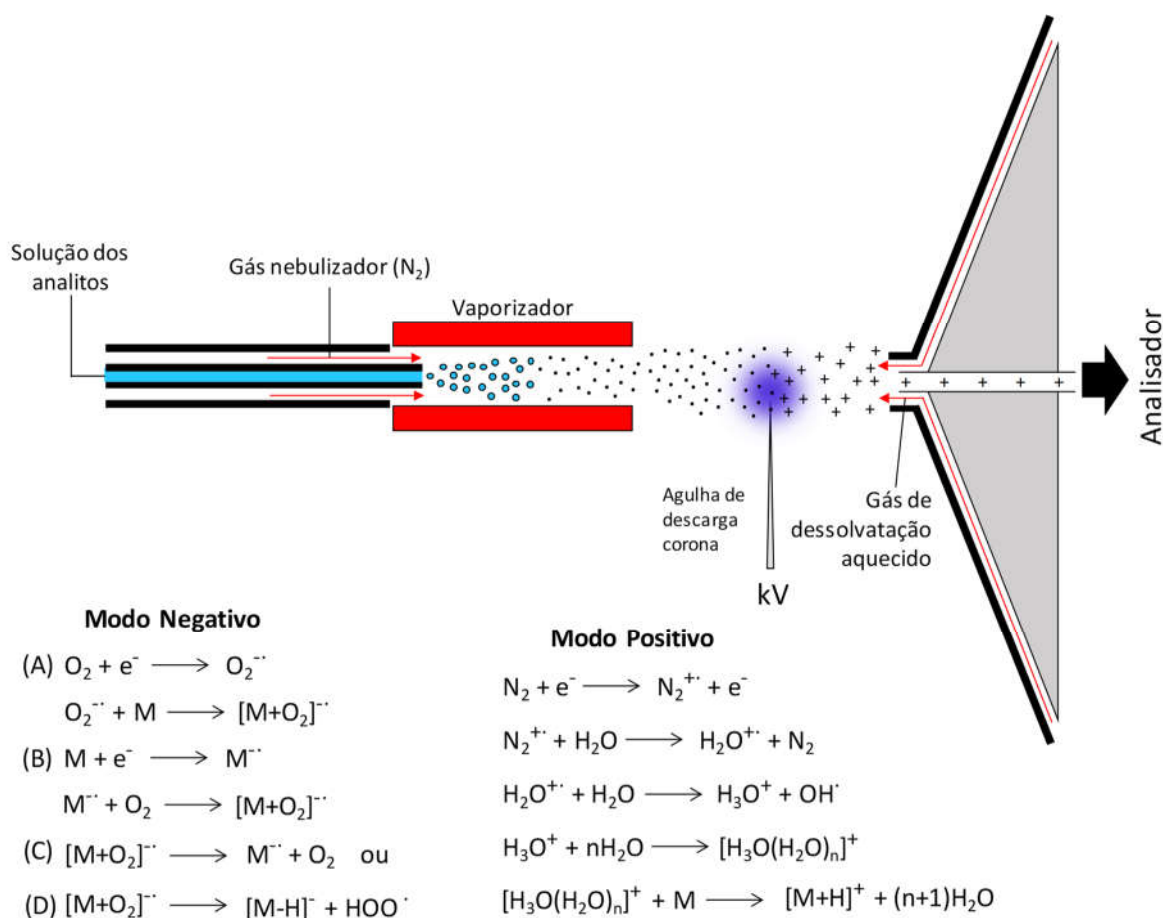
Figura 1.4 Espectros da efedrina obtidos por EI-MS (A) e CI-MS (B).



Ainda que a CI representasse um avanço no campo da espectrometria de massas, permitindo a determinação da massa molecular de substâncias lábeis, sua

aplicação continuava restrita à análise de voláteis.⁴² No entanto, em 1973, Evan C. Horning (1916-1993) desenvolveu uma nova técnica, denominada ionização a pressão atmosférica (*atmospheric pressure ionization* – API) que proporcionou a ionização de substâncias a partir de uma solução, antes de sua introdução na região de alto vácuo do espectrômetro de massas.⁴³ Em 1975, aperfeiçoamentos realizados na técnica de API resultaram na fonte de ionização química a pressão atmosférica (*atmospheric pressure chemical ionization* - APCI), ilustrada na figura 1.5.⁴⁴

Figura 1.5 Representação esquemática da fonte de ionização química a pressão atmosférica (APCI).



Fonte: autor

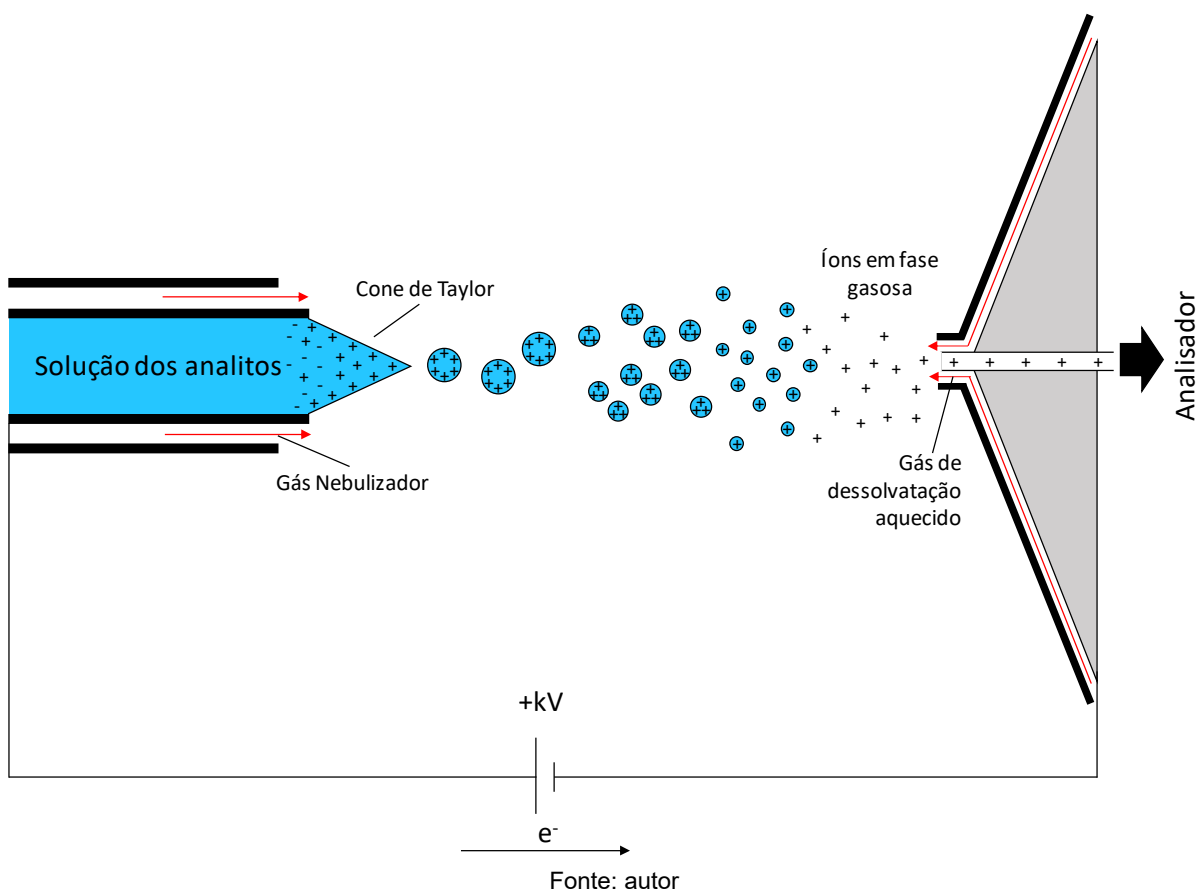
Nessa técnica a amostra em solução é nebulizada com o auxílio de um gás (N_2), denominado nebulizador, e vaporizada a altas temperaturas ($500\text{ }^\circ\text{C}$). Nesse processo, as moléculas do solvente e da amostra são transferidas para a fase gasosa e direcionadas para uma agulha de descarga corona, mantida a um elevado potencial elétrico ($4,0 - 6,0\text{ kV}$). Nas proximidades dessa agulha é gerado um plasma no qual reações em cadeia envolvendo o gás nebulizador ou oxigênio atmosférico e moléculas

de água provenientes do solvente resultam em espécies iônicas responsáveis pelos processos de protonação ou desprotonação das moléculas do analito.³³

As características de ionização da técnica de APCI permitiram a aplicação da espectrometria de massas à análise de compostos de média a baixa polaridade, como por exemplo triacilgliceróis,⁴⁵ carotenoides,⁴⁶ triterpenóides e sesquiterpenóides,⁴⁷ pesticidas⁴⁸, além de diversas outras aplicações.

O desenvolvimento de novas técnicas de ionização ocorridos na década de 1980, revolucionou a espectrometria de massas, tornando possível a análise de macromoléculas biológicas.⁴⁹ Em 1989, John Bennett Fenn e colaboradores descreveram pela primeira vez a análise de oligonucleotídeos e proteínas por espectrometria de massas utilizando uma fonte de ESI, mostrada na figura 1.6.⁵⁰

Figura 1.6 Representação esquemática da fonte de ionização por eletrospray (ESI).



No processo de ionização por eletrospray, uma solução contendo a amostra passa através de um capilar no qual se aplica um alto potencial elétrico, positivo ou negativo, a depender do modo de ionização utilizado na aquisição do espectro.⁵¹ Esse potencial causa uma distorção da superfície do líquido na extremidade do capilar,

gerando uma superfície cônica denominada cone de Taylor, a partir do qual microgotas com superfície eletricamente carregada são dispersas na direção do cone de amostragem do espectrômetro. Com a evaporação do solvente, estas microgotas sofrem diminuição de seu diâmetro, o que resulta em um aumento na densidade de cargas em sua superfície. Quando a repulsão entre as cargas superficiais supera a tensão superficial do líquido, a gota eclode em um processo denominado explosão coulombica. Esse processo se repete até que íons do analito sejam liberados em fase gasosa sob pressão atmosférica.⁵²

O fenômeno de formação de spray por ação de campos eletrostáticos pode ocorrer a partir de vários tipos de substrato.⁵³ Essa característica estimulou o surgimento de diferentes tipos de técnicas de ionização que simplificaram as análises por espectrometria de massas possibilitando a aquisição de espectros a partir diversos substratos incluindo papel,⁵⁴ órgãos vegetais⁵⁵ e até mesmo tecidos coletados por biópsia.⁵⁶

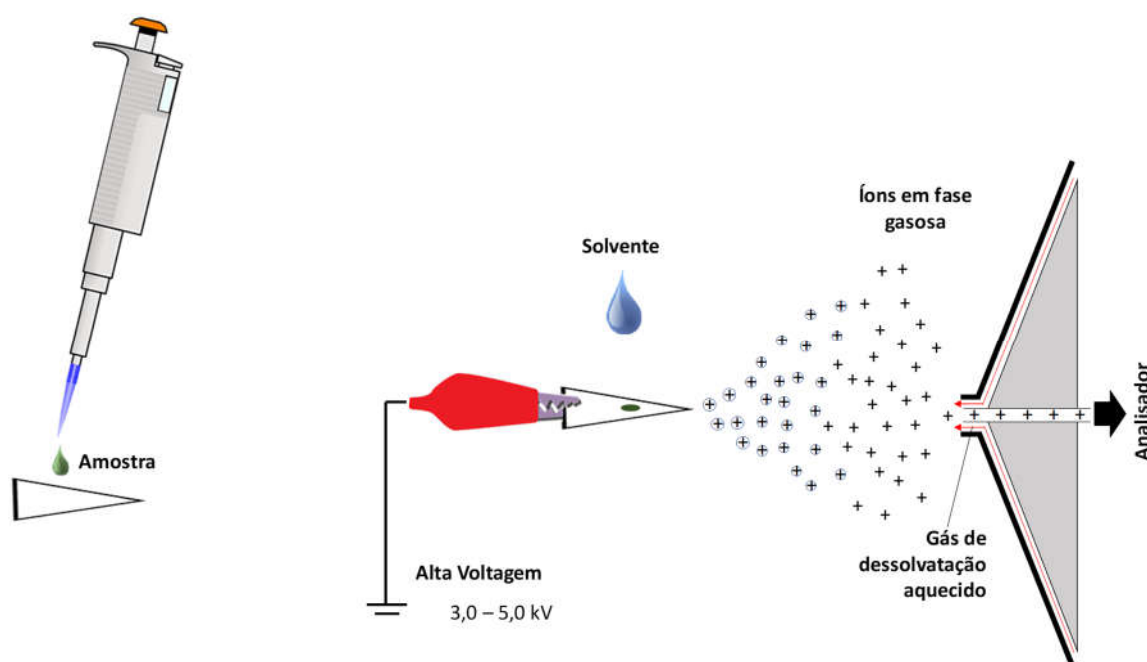
1.4 TÉCNICAS DE ANÁLISE DIRETA POR PAPER SPRAY-MS E TISSUE SPRAY-MS

A partir do século XXI, os avanços da espectrometria de massas foram direcionados com base na busca pela simplicidade dos métodos de preparo de amostra. Três principais preceitos foram utilizados no desenvolvimento dessas novas técnicas: a ionização dos analitos diretamente a partir do substrato e sob pressão atmosférica; a minimização do processo de preparo de amostra; e a utilização de métodos que possibilitassem a microextração dos analitos.⁵⁷

Com base nesses princípios, Liu e colaboradores desenvolveram em 2010 a técnica denominada ionização por *paper spray* (*paper spray ionization* – PSI),⁵⁸ tomando como ponto de partida as informações contidas em uma patente depositada por John Bennet Fenn em 2001.⁵⁹ Nessa técnica, ilustrada pela figura 1.7 (p. 34), a amostra em solução é depositada sobre um pedaço triangular de papel, utilizado como substrato, o qual é conectado à fonte de alta voltagem do espectrômetro de massas e posicionado nas proximidades do cone de amostragem.⁶⁰ A aplicação de um solvente adequado sobre a amostra, resulta na extração de seus componentes que são

posteriormente ionizados por ação do potencial elétrico aplicado no substrato, segundo os mesmos princípios que regem a ionização por ESI.

Figura 1.7 Esquema do procedimento de análise pela técnica de PSI-MS.



Fonte: autor

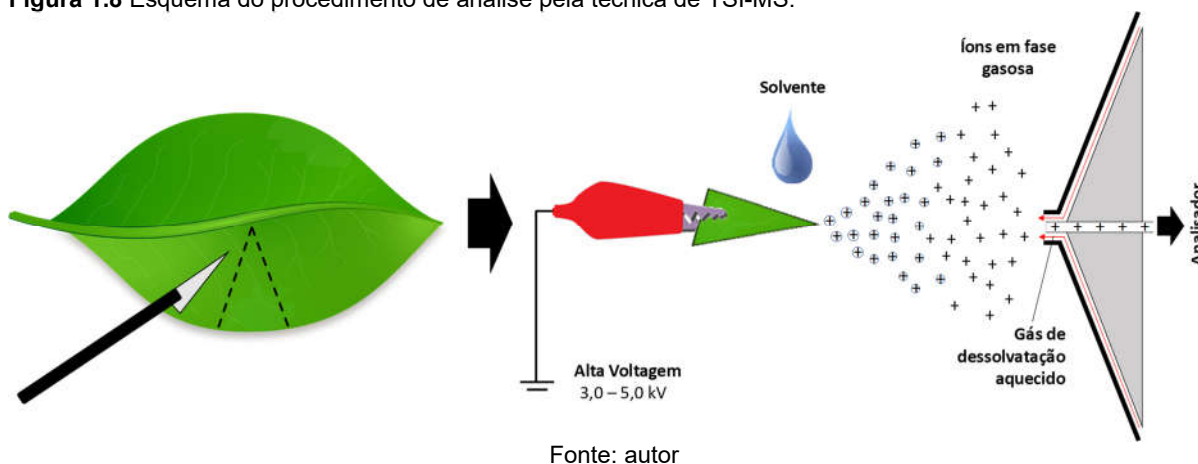
A PSI-MS contribuiu para o desenvolvimento de numerosas metodologias de análise no campo das ciências forenses,⁶¹ da medicina,⁶² da química de produtos naturais,⁶³ entre outros.

Em 2011, Liu e colaboradores utilizaram os conceitos da PSI-MS para desenvolver uma nova técnica de ionização na qual o substrato é constituído por tecidos provenientes de órgão vegetais, denominando-a ionização por *leaf spray* (*leaf spray ionization* – LSI-MS).⁶⁴ No mesmo ano, Chan e colaboradores aplicaram essa técnica no estudo dos metabólitos produzidos por *Panax quinquefolium* L., renomeando-a com o termo ionização por *tissue spray* (*tissue spray ionization*, TSI-MS),⁶⁵ que se mostrou mais adequado para aplicações envolvendo tecidos provenientes de órgãos diversos. O conceito fundamental da TSI-MS baseia-se na análise direta e *in vivo* de tecidos de um organismo para detecção dos seus metabólitos, dispensando etapas de extração e preparo de amostras, comumente associadas às análises espectroscópicas.^{66; 67}

A figura 1.8 (p. 35) exemplifica a aplicação da técnica de TSI-MS para a análise dos metabólitos produzidos por um organismo vegetal. Nesse caso, uma porção

triangular da folha do vegetal é acoplada à fonte de alta tensão do espectrômetro de massas, permitindo que uma alta voltagem seja aplicada diretamente no tecido, o que gera uma diferença de potencial entre o corte da folha e o cone de amostragem do espectrômetro de massas.⁶⁸ A adição de solvente apropriado sobre a superfície da amostra aliada à aplicação do potencial elétrico, gera um spray em cujas gotas estão solubilizados os metabólitos produzidos pela espécie investigada. Esses metabólitos são, então, ionizados de maneira análoga ao que ocorre na ionização por PSI.⁶⁹

Figura 1.8 Esquema do procedimento de análise pela técnica de TSI-MS.



A TSI-MS proporcionou metodologias simples para a detecção de uma variedade de substâncias provenientes do metabolismo de vegetais.^{70; 71} Além disso, dentre outras aplicações, essa técnica também foi utilizada no controle de qualidade de medicamentos fitoterápicos,⁷²⁻⁷⁴ na certificação da segurança alimentar de produtos vegetais,^{75; 76} no estudo das consequências metabólicas causadas por herbivoria,⁷⁷ na diferenciação de espécies baseada em estudos metabolômicos,⁷⁸ e na caracterização de substâncias.⁷⁹

Diante do exposto, torna-se evidente que a concepção atual das técnicas de análise direta por espectrometria de massas, baseadas na ionização por eletrospray, fornece subsídios para o desenvolvimento de metodologias de análise acessíveis, simples e rápidas. Além disso, a eliminação de etapas de preparo de amostra e o baixo consumo de solvente estão alinhados com alguns dos princípios da química analítica verde.¹⁶ Sendo assim, nesse trabalho as técnicas de análise direta por TSI-MS e PSI-MS foram utilizadas no desenvolvimento de métodos analíticos para aplicações no campo da química de produtos naturais e da análise forense.

Considerações Finais

O desenvolvimento desse trabalho resultou na aplicação das técnicas de análise direta por TSI-MS e MeSI-MS em matrizes diversas, nos campos da química de produtos naturais e da análise forense. As análises de TSI-MS/MS das folhas e flores de *Catharanthus roseus* permitiram a detecção dos principais produtos finais da via biossintética dos alcaloides indólicos terpenoídicos e resultaram no primeiro relato da serpentinina, comumente encontrada em raízes de *Rauwolfia serpentina*, nas flores dessa espécie. O estudo do metabolismo de *Citrus sinensis* var. Valência, infectadas pela bactéria *Candidatus Liberibacter asiaticus*, por TSI-MS, forneceu subsídios para relacionar o metabolismo da arginina à resposta da planta frente a infecção, já que esse aminoácido apareceu em maior teor nas folhas de indivíduos infectados. A técnica de MeSI-MS, criada a partir da aplicação dos conceitos da PSI-MS na análise de amostras separadas por cromatografia planar em membrana de poliamida, foi utilizada no desenvolvimento de uma metodologia para identificação de corantes constituintes das tintas de canetas esferográficas. Essa metodologia proporcionou, com êxito, a detecção de adulterações em documentos, sem causar prejuízo à interpretação da escrita, a qual se manteve praticamente inalterada após o procedimento de extração.

Diante desses resultados, pôde-se considerar que as técnicas de análise direta por espectrometria de massas possuem características extremamente vantajosas como a rapidez da análise, a simplicidade do preparo de amostras e a facilidade de acoplamento com técnicas de cromatografia planar. Além disso, a utilização de pequenas quantidades de solvente, sem a necessidade de promover a extração dos analitos atende aos princípios da química analítica verde, proporcionando o desenvolvimento de metodologias sustentáveis. A versatilidade dessas técnicas abre a possibilidade de uma grande variedade de aplicações em diversos campos de estudo, o que garante um futuro promissor para as análises diretas por espectrometria de massas.

Referências Bibliográficas

Capítulo 01

Espectrometria de Massas: Introdução às Técnicas de Análise

Direta por Paper Spray-MS e Tissue Spray-MS.

1 ZHOU, Y. et al. Identification of volatile components in tea infusions by headspace-programmed temperature vaporization-gas chromatography-mass spectrometry (HS-PTV-GC-MS) with chemometrics. **Analytical Letters**, v. 53, p. 1-17, 2020.

2 LI, M. et al. Optimization of headspace for GC-MS analysis of fragrance allergens in wooden children's products using response surface methodology. **Separation Science Plus**, v. 2, n. 1, p. 26-37, 2019.

3 RYAN, D.; SPRAGGINS, J.; CAPRIOLI, R. Protein identification strategies in MALDI imaging mass spectrometry: a brief review. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 48, p. 64-72, 2019.

4 DONNELLY, D. et al. Best practices and benchmarks for intact protein analysis for top-down mass spectrometry. **Nature Methods**, v. 16, n. 7, p. 587-594, 2019.

- 5 WETZEL, C.; LIMBACH, P. Mass spectrometry of modified RNAs: recent developments. **Analyst**, v. 141, n. 1, p. 16-23, 2016.
- 6 HUANG, W. et al. Determination of dna and RNA methylation in circulating tumor cells by mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 88, n. 2, p. 1378-1384, 2016.
- 7 JOVIC, K. et al. Hyphenation of size-exclusion chromatography to mass spectrometry for precision polymer analysis - a tutorial review. **Polymer Chemistry**, v. 10, n. 24, p. 3241-3256, 2019.
- 8 WU, T. et al. Solvent effect in polymer analysis by MALDI-TOF mass spectrometry. **International Journal of Polymer Analysis and Characterization**, v. 22, n. 2, p. 160-168, 2017.
- 9 LI, C. et al. A novel strategy for rapidly and accurately screening biomarkers based on ultraperformance liquid chromatography-mass spectrometry metabolomics data. **Analytica Chimica Acta**, v. 1063, p. 47-56, 2019.
- 10 OLESTI, E. et al. Quantification of endogenous neurotransmitters and related compounds by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 192, p. 93-102, 2019.
- 11 PAN, N. et al. Quantification of drug molecules in live single cells using the single-probe mass spectrometry technique. **Analytical Chemistry**, v. 91, n. 14, p. 9018-9024, 2019.
- 12 PEREZ, C. et al. Review and perspectives on the applications of mass spectrometry imaging under ambient conditions. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 33, p. 27-53, 2019.
- 13 HIRD, S. et al. Liquid chromatography-mass spectrometry for the determination of chemical contaminants in food. **Trac-Trends in Analytical Chemistry**, v. 59, p. 59-72, 2014.
- 14 CUYCKENS, F. Mass spectrometry in drug metabolism and pharmacokinetics: Current trends and future perspectives. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 33, p. 90-95, 2019.
- 15 MEYER, M.; MAURER, H. Review: LC coupled to low- and high-resolution mass spectrometry for new psychoactive substance screening in biological matrices - Where do we stand today? **Analytica Chimica Acta**, v. 927, p. 13-20, 2016.

- 16 MOLINA-DIAZ, A. et al. Ambient mass spectrometry from the point of view of green analytical chemistry. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 19, p. 50-60, 2019.
- 17 MURRAY, K. et al. Definitions of terms relating to mass spectrometry (IUPAC Recommendations 2013). **Pure and Applied Chemistry**, v. 85, n. 7, p. 1515-1609, 2013.
- 18 WRIGHT, P. Metabolite identification by mass spectrometry: forty years of evolution. **Xenobiotica**, v. 41, n. 8, p. 670-686, 2011.
- 19 ALLWOOD, J.; GOODACRE, R. An introduction to liquid chromatography-mass spectrometry instrumentation applied in plant metabolomic analyses. **Phytochemical Analysis**, v. 21, n. 1, p. 33-47, 2010.
- 20 ALBERICI, R. M. et al. Ambient mass spectrometry: bringing MS into the "real world". **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 398, n. 1, p. 265-94, 2010.
- 21 DASS, C. **Fundamentals of contemporary mass spectrometry**. 1^a Ed. Hoboken, NJ: Wiley, 2007. 585 p.
- 22 ANAND, S. et al. Detection and confirmation of serum lipid biomarkers for preeclampsia using direct infusion mass spectrometry. **Journal of Lipid Research**, v. 57, n. 4, p. 687-696, 2016.
- 23 LOPEZ-RUIZ, R.; ROMERO-GONZALEZ, R.; FRENICH, A. Ultrahigh-pressure liquid chromatography-mass spectrometry: An overview of the last decade. **Trac-Trends in Analytical Chemistry**, v. 118, p. 170-181, 2019.
- 24 GRIFFITHS, J. A brief history of mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 80, n. 15, p. 5678-5683, 2008.
- 25 DEMPSTER, A. A new method of positive ray analysis. **Physical Review**, v. 11, n. 4, p. 316-325, 1918.
- 26 WEI, J. et al. Rapid prediction of electron-ionization mass spectrometry using neural networks. **Acs Central Science**, v. 5, n. 4, p. 700-708, 2019.
- 27 DEMPSTER, A. Positive ray analysis of magnesium. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 7, p. 45-47, 1921.

28 BLEAKNEY, W. A new method of positive ray analysis and its application to the measurement of ionization potentials in mercury vapor. **Physical Review**, v. 34, n. 1, p. 157-160, 1929.

29 BORISOV, R.; KULIKOVA, L.; ZAIKIN, V. Mass spectrometry in petroleum chemistry (Petroleomics) (Review). **Petroleum Chemistry**, v. 59, n. 10, p. 1055-1076, 2019.

30 HU, B. et al. Development and validation of a GC-MS method for soybean organ-specific metabolomics. **Plant Production Science**, v. 21, n. 3, p. 215-224, 2018.

31 LV, M. et al. Comparative analysis of volatile oils in the stems and roots of *Ephedra sinica* via GC-MS-based plant metabolomics. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 14, n. 2, p. 133-140, 2016.

32 LAWAL, O. et al. Headspace volatile organic compounds from bacteria implicated in ventilator-associated pneumonia analysed by TD-GC/MS. **Journal of Breath Research**, v. 12, n. 2, 2018.

33 GROSS, J. H. **MASS SPECTROMETRY : a textbook**. 3^a Ed. Cham, ZG: SPRINGER INTERNATIONAL, 2017. 968 p.

34 NIESSEN, W. M. A.; CORREA C, R. A. **Interpretation of MS-MS mass spectra of drugs and pesticides**. 1^a Ed. Hoboken, NJ.: Wiley, 2017. 393 p.

35 MCLAFFERTY, F. W.; TURECEK, F. **Interpretation of mass spectra**. 4^a Ed. Sausalito, CA: University Science Books, 1993. 319 p.

36 KANANI, H.; CHRYSANTHOPOULOS, P.; KLAPA, M. Standardizing GC-MS metabolomics. **Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 871, n. 2, p. 191-201, 2008.

37 BEALE, D. et al. Review of recent developments in GC-MS approaches to metabolomics-based research. **Metabolomics**, v. 14, n. 11, 2018.

38 SMITH, R. M. **Understanding mass spectra : a basic approach**. 2^a Ed. Hoboken, NJ: Wiley Interscience, 2005. 372 p.

39 MUNSON, M.; FIELD, F. Chemical ionization mass spectrometry .i. General introduction. **Journal of the American Chemical Society**, v. 88, n. 12, p. 2621, 1966.

40 WATSON, J. T.; SPARKMAN, O. D. **Introduction to Mass Spectrometry Instrumentation, Applications, and Strategies for Data Interpretation**. 4^a Ed. New York, NY: Wiley, 2013. 819 p.

41 DE HOFFMANN, E.; STROOBANT, V. **Mass Spectrometry Principles and Applications**. 3^a Ed. New York, NY: Wiley, 2013. 489 p.

42 CARTER, G. T. NP/MS since 1970: from the basement to the bench top. **Natural Product Reports**, v. 31, n. 6, p. 711-7, 2014.

43 HORNING, E. C. et al. New picogram detection system based on a mass spectrometer with an external ionization source at atmospheric pressure. **Analytical Chemistry**, v. 45, n. 6, p. 936-943, 1973.

44 CARROLL, D. I. et al. Atmospheric pressure ionization mass spectrometry. Corona discharge ion source for use in a liquid chromatograph-mass spectrometer-computer analytical system. **Analytical Chemistry**, v. 47, n. 14, p. 2369-2373, 1975.

45 WANG, X. et al. Detection of edible plant oil adulteration by triacylglycerol profiles using an atmospheric pressure chemical ionization source and ms³ ion trap mass spectrometry. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 121, n. 12, p. 1900029, 2019.

46 STEINGASS, C. B. et al. HPLC-DAD-APCI-MSⁿ analysis of the genuine carotenoid pattern of pineapple (*Ananas comosus* [L.] Merr.) infructescence. **Food Research International**, v. 127, p. 108709, 2020.

47 TAI, Y. et al. Quantitative analysis of eight triterpenoids and two sesquiterpenoids in *Rhizoma Alismatis* by using UPLC-ESI/APCI-MS/MS and its application to optimisation of best harvest time and crude processing temperature. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, v. 2019, 2019.

48 SILVA, R. et al. Efficiency of ESI and APCI ionization sources in LC-MS/MS systems for analysis of 22 pesticide residues in food matrix. **Food Chemistry**, v. 297, 2019.

49 YATES, J. A century of mass spectrometry: from atoms to proteomes. **Nature Methods**, v. 8, n. 8, p. 633-637, 2011.

50 FENN, J. B. et al. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. **Science**, v. 246, n. 4926, p. 64-71, 1989.

51 KEBARLE, P.; VERKERK, U. H. Electrospray: from ions in solution to ions in the gas phase, what we know now. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 28, n. 6, p. 898-917, 2009.

52 POZNIAK, B. P.; COLE, R. B. Perspective on electrospray ionization and its relation to electrochemistry. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 26, n. 3, p. 369-385, 2015.

53 KLAMPFL, C. W.; HIMMELSBACH, M. Direct ionization methods in mass spectrometry: An overview. **Analytica Chimica Acta**, v. 890, p. 44-59, 2015.

54 DOWLING, S. et al. Direct soil analysis by paper spray mass spectrometry: Detection of drugs and chemical warfare agent hydrolysis products. **Forensic Chemistry**, v. 17, p. 100206, 2020.

55 HU, B. et al. In vivo and real-time monitoring of secondary metabolites of living organisms by mass spectrometry. **Scientific Reports**, v. 3, p. 2104, 2013.

56 WEI, Y. et al. Tissue spray ionization mass spectrometry for rapid recognition of human lung squamous cell carcinoma. **Scientific Reports**, v. 5, p. 10077, 2015.

57 BADU-TAWIAH, A. et al. Chemical aspects of the extractive methods of ambient ionization mass spectrometry. **Annual Review of Physical Chemistry**, Vol 64, v. 64, p. 481-505, 2013.

58 LIU, J. et al. Development, characterization, and application of paper spray ionization. **Analytical Chemistry**, v. 82, n. 6, p. 2463-2471, 2010.

59 FENN, J. B. **Improved method and apparatus for electrospray ionization.** FENN, J. B. Patente EP 1 010 468 A1. Depositada em 14/12/1998. Concedida em 21/07/ 2000. 16 pp. p. 2000.

60 OLIVEIRA, F. M. D. et al. Supramolecular microextraction combined with paper spray ionization mass spectrometry for sensitive determination of tricyclic antidepressants in urine. **Analytica Chimica Acta**, 2020. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267020301306>.

61 DOMINGOS, E. et al. Paper spray ionization mass spectrometry applied to forensic chemistry - drugs of abuse, inks and questioned documents. **Analytical Methods**, v. 9, n. 30, p. 4400-4409, 2017.

62 SHI, R. et al. Rapid measurement of cyclosporine and sirolimus in whole blood by paper spray-tandem mass spectrometry. **Clinical Chemistry**, v. 62, n. 1, p. 295-297, 2016.

- 63 SILVA, M. et al. Antioxidant activity and metabolomic analysis of cagaitas (*Eugenia dysenterica*) using paper spray mass spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 30, n. 5, p. 1034-1044, 2019.
- 64 LIU, J. et al. Leaf spray: direct chemical analysis of plant material and living plants by mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 83, n. 20, p. 7608-7613, 2011.
- 65 CHAN, S. L. et al. Tissue-spray ionization mass spectrometry for raw herb analysis. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 25, n. 19, p. 2837-43, 2011.
- 66 PULLIAM, C. J. et al. Mass spectrometry in the home and garden. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 26, n. 2, p. 224-230, 2015.
- 67 MIGGIELS, P. et al. Novel technologies for metabolomics: More for less. **Trac-Trends in Analytical Chemistry**, v. 120, 2019.
- 68 ZHANG, J. I. et al. Direct analysis of steviol glycosides from *Stevia* leaves by ambient ionization mass spectrometry performed on whole leaves. **Analyst**, v. 137, n. 13, p. 3091-3098, 2012.
- 69 SNYDER, D. T. et al. Profiling phenolic glycosides in *Populus deltoides* and *Populus grandidentata* by leaf spray ionization tandem mass spectrometry. **Analytical Methods**, v. 7, n. 3, p. 870-876, 2015.
- 70 ZHANG, N. et al. Rapid detection of polyhydroxylated alkaloids in mulberry using leaf spray mass spectrometry. **Analytical Methods**, v. 5, n. 10, p. 2455-2460, 2013.
- 71 FREUND, D. et al. Direct detection of surface localized specialized metabolites from *Glycyrrhiza lepidota* (American licorice) by leaf spray mass spectrometry. **Planta**, v. 247, n. 1, p. 267-275, 2018.
- 72 SARKAR, D.; SRIMANY, A.; PRADEEP, T. Rapid identification of molecular changes in tulsi (*Ocimum sanctum* Linn) upon ageing using leaf spray ionization mass spectrometry. **Analyst**, v. 137, n. 19, p. 4559-4563, 2012.
- 73 WONG, H. et al. Rapid authentication of *Gastrodiae rhizoma* by direct ionization mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 938, p. 90-97, 2016.
- 74 XIN, G. et al. A direct ionization mass spectrometry-based approach for differentiation of medicinal *Ephedra* species. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 117, p. 492-498, 2016.

75 PEREIRA, I. et al. Differentiation of Toxic and Non-Toxic Leaves of *Jatropha curcas* L. Genotypes by Leaf Spray Mass Spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 8, p. 1461-1466, 2017.

76 SCHRAGE, M. et al. Rapid and simple neurotoxin-based distinction of Chinese and Japanese star anise by direct plant spray mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1317, p. 246-253, 2013.

77 FALCONE, C.; COOKS, R. Molecular recognition of emerald ash borer infestation using leaf spray mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 30, n. 11, p. 1304-1312, 2016.

78 WONG, H.-Y. et al. Rapid differentiation of Ganoderma species by direct ionization mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 999, p. 99-106, 2018.

79 DE LIMA, B. et al. Integrative approach based on leaf spray mass spectrometry, HPLC-DAD-MS/MS, and NMR for comprehensive characterization of isoquinoline-derived alkaloids in leaves of *Onychopetalum amazonicum* R. E. Fr. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 31, n. 1, p. 79-89, 2020.

Referências Bibliográficas

Capítulo 02

Aplicação da TSI-MS/MS no Mapeamento da Via Biossintética dos Alcaloides Indólicos Terpenoídicos em *Catharanthus roseus*.

1 ZHU, X. et al. Biosynthetic pathway of terpenoid indole alkaloids in *Catharanthus roseus*. **Frontiers in Medicine**, v. 8, n. 3, p. 285-293, 2014.

2 PAN, Q. et al. Monoterpenoid indole alkaloids biosynthesis and its regulation in *Catharanthus roseus*: a literature review from genes to metabolites. **Phytochemistry Reviews**, v. 15, n. 2, p. 221-250, 2016.

3 VERMA, P. et al. Transgenic studies for modulating terpenoid indole alkaloids pathway in *Catharanthus roseus*: present status and future options. **Phytochemistry Reviews**, v. 16, n. 1, p. 19-54, 2017.

4 TIONG, S. H. et al. Antidiabetic and antioxidant properties of alkaloids from *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. **Molecules**, v. 18, n. 8, p. 9770-9784, 2013.

5 ALMAGRO, L.; FERNÁNDEZ-PÉREZ, F.; PEDREÑO, M. A. Indole alkaloids from *Catharanthus roseus*: bioproduction and their effect on human health. **Molecules**, v. 20, n. 2, p. 2973-3000, 2015.

6 IWASE, A. et al. Development of a novel system for producing ajmalicine and serpentine using direct culture of leaves in *Catharanthus roseus* intact plant. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 99, n. 3, p. 208-215, 2005.

7 VAN DER HEIJDEN, R. et al. The *Catharanthus alkaloids*: pharmacognosy and biotechnology. **Current Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 5, p. 607-628, 2004.

8 HUANG, Y. et al. The biosynthesis and genetic engineering of bioactive indole alkaloids in plants. **Journal of Plant Biology**, v. 59, n. 3, p. 203-214, 2016.

9 SHARMA, A. et al. Overexpression of tryptophan decarboxylase and strictosidine synthase enhanced terpenoid indole alkaloid pathway activity and antineoplastic vinblastine biosynthesis in *Catharanthus roseus*. **Protoplasma**, v. 255, n. 5, p. 1281-1294, 2018.

10 STAVRINIDES, A. et al. Structural investigation of heteroyohimbine alkaloid synthesis reveals active site elements that control stereoselectivity. **Nature Communications**, v. 7, p. 12116, 2016.

11 LIU, J. et al. Transcriptional regulation and transport of terpenoid indole alkaloid in *Catharanthus roseus*: exploration of new research directions. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 1, p. 53 - 73, 2017.

12 TATSIS, E. et al. A three enzyme system to generate the *Strychnos* alkaloid scaffold from a central biosynthetic intermediate. **Nature Communications**, v. 8, p. 316, 2017.

13 FARROW, S. et al. Biosynthesis of an anti-addiction agent from the iboga plant. **Journal of the American Chemical Society**, v. 141, n. 33, p. 12979-12983, 2019.

14 EL-SAYED, M.; VERPOORTE, R. *Catharanthus* terpenoid indole alkaloids: biosynthesis and regulation. **Phytochemistry Reviews**, v. 6, n. 2, p. 277-305, 2007.

15 CAPUTI, L. et al. Missing enzymes in the biosynthesis of the anticancer drug vinblastine in Madagascar periwinkle. **Science**, v. 360, n. 6394, p. 1235-1238, 2018.

16 SUN, J. et al. Expression of tabersonine 16-hydroxylase and 16-hydroxytabersonine-O-methyltransferase in *Catharanthus roseus* hairy roots. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 115, n. 3, p. 673-683, 2018.

17 YAMAMOTO, K. et al. Cell-specific localization of alkaloids in *Catharanthus roseus* stem tissue measured with Imaging MS and Single-cell MS. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 14, p. 3891-3896, 2016.

18 O'CONNOR, S.; MARESH, J. Chemistry and biology of monoterpene indole alkaloid biosynthesis. **Natural Product Reports**, v. 23, n. 4, p. 532-547, 2006.

19 PAN, Q. et al. CrERF5, an AP2/ERF transcription factor, positively regulates the biosynthesis of bisindole alkaloids and their precursors in *Catharanthus roseus*. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 931, 2019.

20 KUMAR, S.; SHILPASHREE, H.; NAGEGOWDA, D. Terpene moiety enhancement by overexpression of geranyl(geranyl) diphosphate synthase and geraniol synthase elevates monomeric and dimeric monoterpene indole alkaloids in transgenic *Catharanthus roseus*. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 942, 2018.

21 HU, B. et al. In vivo and real-time monitoring of secondary metabolites of living organisms by mass spectrometry. **Scientific Reports**, v. 3, p. 2104, 2013.

22 FERRERES, F. et al. Simple and reproducible HPLC-DAD-ESI-MS/MS analysis of alkaloids in *Catharanthus roseus* roots. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 51, n. 1, p. 65-69, 2010.

23 LIU, J. et al. Leaf spray: direct chemical analysis of plant material and living plants by mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 83, n. 20, p. 7608-7613, 2011.

24 COURDAVAULT, V. et al. A look inside an alkaloid multisite plant: the *Catharanthus* logistics. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 19, p. 43-50, 2014.

25 ROEPKE, J. et al. Vinca drug components accumulate exclusively in leaf exudates of Madagascar periwinkle. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 34, p. 15287-15292, 2010.

26 ZHOU, H. et al. Rapid identification of vinca alkaloids by direct-injection electrospray ionisation tandem mass spectrometry and confirmation by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. **Phytochemical Analysis**, v. 16, n. 5, p. 328-333, 2005.

27 HE, L. et al. Simultaneous quantification of four indole alkaloids in *Catharanthus roseus* cell line C20hi by UPLC-MS. **Analytical Sciences**, v. 27, n. 4, p. 433-438, 2011.

28 VERMA, A. et al. A simplified procedure for indole alkaloid extraction from *Catharanthus roseus* combined with a semi-synthetic production process for vinblastine. **Molecules**, v. 12, n. 7, p. 1307-1315, 2007.

29 HE, L. et al. Enhancement of vindoline production in suspension culture of the *Catharanthus roseus* cell line C20hi by light and methyl jasmonate elicitation. **Analytical Sciences**, v. 27, n. 12, p. 1243-1248, 2011.

- 30 CHEN, Q. et al. Identification and quantification of active alkaloids in *Catharanthus roseus* by liquid chromatography-ion trap mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 139, n. 1-4, p. 845-852, 2013.
- 31 HEMALATHA, R. G.; PRADEEP, T. Understanding the molecular signatures in leaves and flowers by desorption electrospray ionization mass spectrometry (DESI MS) imaging. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 31, p. 7477-7487, 2013.
- 32 JEONG, W. T.; LIM, H. B. A UPLC-ESI-Q-TOF method for rapid and reliable identification and quantification of major indole alkaloids in *Catharanthus roseus*. **Journal of Chromatogr B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1080, p. 27-36, 2018.
- 33 ZHANG, L. et al. Simultaneous quantitative determination of five alkaloids in *Catharanthus roseus* by HPLC-ESI-MS/MS. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 12, n. 10, p. 786-793, 2014.
- 34 KIDD, T. et al. Inter-organ transport of secologanin allows assembly of monoterpenoid indole alkaloids in a *Catharanthus roseus* mutant. **Phytochemistry**, v. 159, p. 119-126, 2019.
- 35 KUMAR, S. et al. Identification, characterization and distribution of terpene indole alkaloids in ethanolic extracts of *Catharanthus roseus* using high-performance liquid chromatography/electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry and the study of their geographical variation. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 32, n. 4, p. 319-332, 2018.
- 36 SAGI, S. et al. Quantification and characterization of alkaloids from roots of *Rauwolfia serpentina* using ultra-high performance liquid chromatography-photo diode array-mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 408, n. 1, p. 177-190, 2016.
- 37 KUMAR, S. et al. Structural characterization of monoterpene indole alkaloids in ethanolic extracts of *Rauwolfia* species by liquid chromatography with quadrupole time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 6, n. 6, p. 363-373, 2016.
- 38 KUMAR, S. et al. Simultaneous determination of bioactive monoterpene indole alkaloids in ethanolic extract of seven *Rauwolfia* species using UHPLC with hybrid triple quadrupole linear ion trap mass spectrometry. **Phytochemical Analysis**, v. 27, n. 5, p. 296-303, 2016.
- 39 AKHGARI, A. et al. Analysis of indole alkaloids from *Rhazya stricta* hairy roots by ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry. **Molecules**, v. 20, n. 12, p. 22621-22634, 2015.

- 40 SCHRODER, G. et al. Light-induced cytochrome P450-dependent enzyme in indole alkaloid biosynthesis: tabersonine 16-hydroxylase. **Febs Letters**, v. 458, n. 2, p. 97-102, 1999.
- 41 KUMAR, S. et al. Simultaneous quantitative determination of bioactive terpene indole alkaloids in ethanolic extracts of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 151, p. 32-41, 2018.
- 42 GAO, S. et al. Rapid and Sensitive Liquid Chromatography Coupled With Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry Method for the Analysis of Paclitaxel, Docetaxel, Vinblastine, and Vinorelbine in Human Plasma. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 36, n. 3, p. 394-400, 2014.
- 43 YANG, F. et al. Determination of free and total vincristine in human plasma after intravenous administration of vincristine sulfate liposome injection using ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography a**, v. 1275, p. 61-69, 2013.
- 44 KOSJEK, T. et al. Determination of vinblastine in tumour tissue with liquid chromatography-high resolution mass spectrometry. **Talanta**, v. 116, p. 887-893, 2013.
- 45 YANG, F. et al. Validation of an UPLC-MS-MS method for quantitative analysis of vincristine in human urine after intravenous administration of vincristine sulfate liposome injection. **Journal of Chromatographic Science**, v. 53, n. 6, p. 974-978, 2015.
- 46 BROWN, S. et al. De novo production of the plant-derived alkaloid strictosidine in yeast. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 11, p. 3205-3210, 2015.
- 47 COSTA, R. A. et al. Structural, vibrational, and electronic properties of the glucoalkaloid strictosidine: a combined experimental and theoretical study. **Journal of Chemistry**, v. 2016, p. 16, 2016.
- 48 TOKI, K. et al. 7-O-methylated anthocyanidin glycosides from the reddish purple flowers of *Catharanthus roseus* 'equator lavender'. **Heterocycles**, v. 83, n. 12, p. 2803, 2011.

Referências Bibliográficas

Capítulo 03

Aplicação da TSI-MS no Estudo das Variações Metabólicas em *Citrus sinensis* Var. Valência Infectadas com *Candidatus Liberibacter asiaticus*.

1 DA GRAÇA, J. V. et al. Huanglongbing: an overview of a complex pathosystem ravaging the world's citrus. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 58, n. 4, p. 373-87, 2016.

2 MUNIR, S. et al. Huanglongbing control: perhaps the end of the beginning. **Microbial Ecology**, v. 76, n. 1, p. 192-204, 2018.

3 COLETTA, H. et al. Temporal progression of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' infection in *Citrus* and acquisition efficiency by *Diaphorina citri*. **Phytopathology**, v. 104, n. 4, p. 416-421, 2014.

4 BOVÉ, J. M. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. **Journal of Plant Pathology**, v. 88, n. 1, p. 31, 2006.

5 PUTTAMUK, T. et al. Effect of chemical treatments on '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' infected pomelo (*Citrus maxima*). **Crop Protection**, v. 65, p. 114-121, 2014.

6 MERFA, M. V. et al. Progress and obstacles in culturing '*Candidatus Liberibacter asiaticus*', the bacterium associated with Huanglongbing. **Phytopathology**, v. 109, n. 7, p. 1092-1101, 2019.

7 TANAKA, F. A. O. et al. Detection of the "*Candidatus Liberibacter americanus*" in⁴⁹ phloem vessels of experimentally infected *Cataranthus roseus* by scanning electron microscopy. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, n. 6, p.518, 2007.

- 8 KOH, E. et al. Callose deposition in the phloem plasmodesmata and inhibition of phloem transport in *Citrus* leaves infected with "*Candidatus Liberibacter asiaticus*". **Protoplasma**, v. 249, n. 3, p. 687-697, 2012.
- 9 MOTA, A. et al. Portable fluorescence spectroscopy platform for Huanglongbing (HLB) *Citrus* disease in situ detection. **Light-Emitting Diodes: Materials, Devices, and Applications For Solid State Lighting Xviii**, v. 9003, 2014.
- 10 DAS, A. et al. Current distribution of Huanglongbing (*Citrus* greening disease) in India as diagnosed by real-time PCR. **Journal of Phytopathology**, v. 162, n. 6, p. 402-406, 2014.
- 11 LI, J. et al. Developing *Citrus* Huanglongbing (HLB) management strategies based on the severity of symptoms in HLB-endemic citrus-producing regions. **Phytopathology**, v. 109, n. 4, p. 582-592, 2019.
- 12 POURREZA, A. et al. An optimum method for real-time in-field detection of Huanglongbing disease using a vision sensor. **Computers and Electronics in Agriculture**, v. 110, p. 221-232, 2015.
- 13 ZHANG, M. et al. Effective antibiotics against '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' in HLB-affected *Citrus* plants identified via the graft-based evaluation. **Plos One**, v. 9, n. 11, p. e11032, 2014.
- 14 WANG, N.; TRIVEDI, P. *Citrus* Huanglongbing: a newly relevant disease presents unprecedented challenges. **Phytopathology**, v. 103, n. 7, p. 652-665, 2013.
- 15 RAO, M. et al. Metabolic mechanisms of host species against *Citrus* Huanglongbing (greening disease). **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 37, n. 6, p. 496-511, 2018.
- 16 STELINSKI, L. Ecological aspects of the vector-borne bacterial disease, *Citrus* greening (Huanglongbing): dispersal and host use by asian *Citrus* psyllid, *Diaphorina Citri* Kuwajama. **Insects**, v. 10, n. 7, p. 208, 2019.
- 17 BOSTOCK, R. M. et al. Excluding pests and pathogens: plant health: how diagnostic networks and interagency partnerships protect plant systems from pests and pathogens. **California Agriculture**, v. 68, n. 4, p. 117-124, 2014.

- 18 HALL DAVID, G. et al. Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, vector of citrus huanglongbing disease. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 146, n. 2, p. 207-223, 2012.
- 19 BONANI, J. P. et al. Characterization of electrical penetration graphs of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, in sweet orange seedlings. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 134, n. 1, p. 35-49, 2010.
- 20 MANN, R. S. et al. Induced release of a plant-defense volatile 'deceptively' attracts insect vectors to plants infected with a bacterial pathogen. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 3, p. e1002610, 2012.
- 21 REINKING, O. A. Diseases of economic plants in southern China. **Philippine Agriculturist**, v. 8, n. 4, p. 109-134, 1919.
- 22 DALA-PAULA, B. et al. Effect of Huanglongbing or greening disease on orange juice quality, a Review. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 1976, 2019.
- 23 ALVAREZ, S. et al. *Citrus* greening disease (Huanglongbing) in Florida: economic impact, management and the potential for biological control. **Agricultural Research**, v. 5, n. 2, p. 109-118, 2016.
- 24 CITRUS world markets and trades. United States Department of Agriculture - Foreign agricultural service, 2020. Disponível em: <https://www.fas.usda.gov/data/citrus-world-markets-and-trade>. Acesso em: 23/01/2020.
- 25 ESTIMATIVA da safra de laranja parque citrícola de São Paulo e triângulo/sudoeste mineiro, 2020. Disponível em <https://www.fundecitrus.com.br/pes/estimativa>. Acesso em: 23/01/2020.
- 26 INCIDÊNCIA do greening no cinturão citrícola, 2020. Disponível em: <https://www.fundecitrus.com.br/levantamentos/greening>. Acesso em: 23/02/2020.
- 27 FREITAS, D. et al. NMR-Based metabolomic analysis of huanglongbing-asymptomatic and -symptomatic *Citrus* trees. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 34, p. 7582-7588, 2015.

- 28 PONTES, J. et al. Metabolomics by NMR spectroscopy in plant disease diagnostic: Huanglongbing as a case study. **Chemistryselect**, v. 1, n. 6, p. 1176-1178, 2016.
- 29 ALBRECHT, U.; FIEHN, O.; BOWMAN, K. Metabolic variations in different *Citrus* rootstock cultivars associated with different responses to Huanglongbing. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 107, p. 33-44, 2016.
- 30 ASAI, T.; MATSUKAWA, T.; KAJIYAMA, S. Metabolomic analysis of primary metabolites in *Citrus* leaf during defense responses. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 123, n. 3, p. 376-381, 2017.
- 31 MANTHEY, J. Differences in secondary metabolites in leaves from orange (*Citrus sinensis* L.) trees affected with greening disease (Huanglongbing) (HLB). **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, v. 121, p. 285-288, 2008.
- 32 HIJAZ, F. M. et al. An HPLC-MS characterization of the changes in sweet orange leaf metabolite profile following infection by the bacterial pathogen *Candidatus Liberibacter asiaticus*. **PLoS One**, v. 8, n. 11, p. e79485, 2013.
- 33 LI, W. et al. Detection and seasonal variations of Huanglongbing disease in navel orange trees using direct ionization mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 67, n. 8, p. 2265-2271, 2019.
- 34 KOULMAN, A. et al. High-throughput direct-infusion ion trap mass spectrometry: a new method for metabolomics. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 21, n. 3, p. 421-428, 2007.
- 35 HAMMER, Ø. H., D. A.T., RYAN. P. D. Past: Paleontological Statistics Software Package For Education And Data Analysis. **Palaeontologia Electronica**, v. 4, n. 1, p. 9-17, 2001
- 36 KILLINY, N. Metabolomic comparative analysis of the phloem sap of curry leaf tree (*Bergera koenigii*), orange jasmine (*Murraya paniculata*), and Valencia sweet orange (*Citrus sinensis*) supports their differential responses to Huanglongbing. **Plant Signaling & Behavior**, v. 11, n. 11, p. e1249080, 2016.
- 37 RIBEIRO, A. et al. Chemical characterization of *Citrus sinensis* grafted on *C. limonia* and the effect of some isolated compounds on the growth of *Xylella fastidiosa*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 17, p. 7815-7822, 2008.

38 THURMAN, E. et al. Identification of polypropylene glycols and polyethylene glycol carboxylates in flowback and produced water from hydraulic fracturing. **Journal of Hazardous Materials**, v. 323, p. 11-17, 2017.

39 KROGH, K. et al. Environmental properties and effects of nonionic surfactant adjuvants in pesticides: a review. **Chemosphere**, v. 50, n. 7, p. 871-901, 2003.

40 KNOWLES, A. Recent developments of safer formulations of agrochemicals. **The Environmentalist**, v. 28, n. 1, p. 35-44, 2008.

41 KILLINY, N. Metabolite signature of the phloem sap of fourteen *Citrus* varieties with different degrees of tolerance to *Candidatus Liberibacter asiaticus*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 97, p. 20-29, 2017.

42 CSONKA, I.; PAIZS, B.; SUHAI, S. Modeling of the gas-phase ion chemistry of protonated arginine. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 39, n. 9, p. 1025-1035, 2004.

43 WINTER, G. et al. Physiological implications of arginine metabolism in plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 534, 2015.

44 JOSHI, V. et al. Systematized biosynthesis and catabolism regulate citrulline accumulation in watermelon. **Phytochemistry**, v. 162, p. 129-140, 2019.

45 SLOCUM, R. Genes, enzymes and regulation of arginine biosynthesis in plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 43, n. 8, p. 729-745, 2005.

46 ASTIER, J.; GROSS, I.; DURNER, J. Nitric oxide production in plants: an update. **Journal of Experimental Botany**, v. 69, n. 14, p. 3401-3411, 2018.

47 FRESCHI, L. Nitric oxide and phytohormone interactions: current status and perspectives. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, p. 398, 2013.

48 WENDEHENNE, D. et al. Nitric oxide: comparative synthesis and signaling in animal and plant cells. **Trends in Plant Science**, v. 6, n. 4, p. 177-183, 2001.

49 DENG, Y.; LU, S. Biosynthesis and regulation of phenylpropanoids in plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 36, n. 4, p. 257-290, 2017.

50 NOVO, M. et al. Deciphering the role of the phenylpropanoid metabolism in the tolerance of *Capsicum annuum* L. to *Verticillium dahliae* Kleb. **Plant Science**, v. 258, p. 12-20, 2017.

51 DAGLIA, M. Polyphenols as antimicrobial agents. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, n. 2, p. 174-181, 2012.

52 JOSHI, J. et al. Effects of plant antimicrobial phenolic compounds on virulence of the genus *Pectobacterium*. **Research in Microbiology**, v. 166, n. 6, p. 535-545, 2015.

53 TIBURCIO, A. et al. The roles of polyamines during the lifespan of plants: from development to stress. **Planta**, v. 240, n. 1, p. 1-18, 2014.

54 CHEN, D. et al. Polyamine function in plants: metabolism, regulation on development, and roles in abiotic stress responses. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 1945, 2019.

55 DOCIMO, T. et al. The first step in the biosynthesis of cocaine in *Erythroxylum coca*: the characterization of arginine and ornithine decarboxylases. **Plant Molecular Biology**, v. 78, n. 6, p. 599-615, 2012.

56 VUOSKU, J. et al. Scots pine aminopropyltransferases shed new light on evolution of the polyamine biosynthesis pathway in seed plants. **Annals of Botany**, v. 121, n. 6, p. 1243-1256, 2018.

57 PETERSEN, M. Hydroxycinnamoyltransferases in plant metabolism. **Phytochemistry Reviews**, v. 15, n. 5, p. 699-727, 2016.

58 MUROI, A. et al. Accumulation of hydroxycinnamic acid amides induced by pathogen infection and identification of agmatine coumaroyltransferase in *Arabidopsis thaliana*. **Planta**, v. 230, n. 3, p. 517-527, 2009.

Referências Bibliográficas

Capítulo 04

Investigação Forense da Composição de Tintas de Canetas Esferográficas por Cromatografia Planar em Membrana de Poliamida

66 Acoplada à Espectrometria de Massas e sua Aplicação na Detecção de Adulteração em Documentos.

1 GORZIZA, R. P. et al. Blue and black ballpoint pen inks: a systematic review for ink characterization and dating analysis. **Brazilian Journal of Forensic Sciences, Medical Law and Bioethics**, v. 8, n. 3, p. 113-138, 2019.

2 AGIUS, A. et al. The use of handwriting examinations beyond the traditional court purpose. **Science & Justice**, v. 57, n. 5, p. 394-400, 2017.

3 ALMEIDA, C. et al. Study of chemical profile and of lines crossing using blue and black ink pens by LDI (+) MS and LDI (+) imaging. **Microchemical Journal**, v. 148, p. 220-229, 2019.

4 NEUMANN, C.; RAMOTOWSKI, R.; GENESSAY, T. Forensic examination of ink by high-performance thin layer chromatography-The United States Secret Service Digital Ink Library. **Journal of Chromatography a**, v. 1218, n. 19, p. 2793-2811, 2011.

5 BRITO, L. et al. Critical review and trends in forensic investigations of crossing ink lines. **Trac-Trends in Analytical Chemistry**, v. 94, p. 54-69, 2017.

6 ROMAO, W. et al. Forensic chemistry: perspective of new analytical methods applied to documentoscopy, ballistic and drugs of abuse. **Quimica Nova**, v. 34, n. 10, p. 1717, 2011.

- 7 SHERMA, J. Advances in the thin-layer chromatographic forensic analysis of inks. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 39, n. 12, p. 549-557, 2016.
- 8 SUN, Q. et al. Detection and identification of dyes in blue writing inks by LC-DAD-orbitrap MS. **Forensic Science International**, v. 261, p. 71-81, 2016.
- 9 AKHMEROVA, D. et al. Forensic identification of dyes in ballpoint pen inks using LC-ESI-MS. **Chromatographia**, v. 80, n. 11, p. 1701-1709, 2017.
- 10 COSKUN, O. Separation techniques: chromatography. **Northern Clinics of Istanbul**, v. 3, n. 2, p. 156-160, 2016.
- 11 MORLOCK, G.; SCHWACK, W. Coupling of planar chromatography to mass spectrometry. **Trac-Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 10, p. 1157-1171, 2010.
- 12 SHERMA, J. Biennial review of planar chromatography: 2015-2017. **Journal of Aoac International**, v. 101, n. 4, p. 905-913, 2018.
- 13 WANG, K. et al. Separation of catechins and O-methylated (-)-epigallocatechin gallate using polyamide thin-layer chromatography. **Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1017, p. 221-225, 2016.
- 14 TANG, T. et al. A rapid and green limit test method for five synthetic colorants in foods using polyamide thin-layer chromatography. **Food Analytical Methods**, v. 8, n. 2, p. 459-466, 2015.
- 15 ORR, V. et al. Recent advances in bioprocessing application of membrane chromatography. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 4, p. 450-65, 2013.
- 16 KLAMPFL, C. W.; HIMMELSBACH, M. Direct ionization methods in mass spectrometry: An overview. **Analytica Chimica Acta**, v. 890, p. 44-59, 2015.
- 17 KRUGER, S.; BURMANN, L.; MORLOCK, G. Comparison and characterization of soybean and sunflower lecithins used for chocolate production by high-performance thin-layer chromatography with fluorescence detection and electro spray mass

spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 11, p. 2893-2901, 2015.

18 YOUSEFI-TAEMEH, M.; IFA, D. Analysis of tetrahydrocannabinol derivative from cannabis-infused chocolate by QuEChERS-thin layer chromatography-desorption electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 54, n. 10, p. 834-842, 2019.

19 HU, B. et al. Thin layer chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry for direct analysis of raw samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1415, p. 155-160, 2015.

20 PULLIAM, C. J. et al. Mass spectrometry in the home and garden. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 26, n. 2, p. 224-30, 2015.

21 MONGE, M. E. et al. Mass spectrometry: recent advances in direct open air surface sampling/ionization. **Chemical Reviews**, v. 113, n. 4, p. 2269-308, 2013.

22 CHENG, S. et al. Simple interface for scanning chemical compounds on developed thin layer chromatography plates using electrospray ionization mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 1049, p. 1-9, 2019.

23 LIU, J. et al. Development, characterization, and application of paper spray ionization. **Analytical Chemistry**, v. 82, n. 6, p. 2463-2471, 2010.

24 LIN, C. H. et al. Paper spray-MS for bioanalysis. **Bioanalysis**, v. 6, n. 2, p. 199-208, 2014.

25 AMADOR, V. et al. Paper spray mass spectrometry for the forensic analysis of black ballpoint pen inks. **Journal of the American Society For Mass Spectrometry**, v. 28, n. 9, p. 1965-1976, 2017.

26 EVARD, H. et al. Paper spray ionization mass spectrometry: study of a method for fast-screening analysis of pesticides in fruits and vegetables. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 41, p. 221-225, 2015.

27 TRAN, J.; DOUCETTE, A. Cyclic polyamide oligomers extracted from nylon 66 membrane filter disks as a source of contamination in liquid chromatography/mass

spectrometry. **Journal of the American Society For Mass Spectrometry**, v. 17, n. 5, p. 652-656, 2006.

28 WILLIAMS, M. et al. Analysis of black writing ink by electrospray ionization mass spectrometry. **Forensic Science International**, v. 191, n. 1-3, p. 97-103, 2009.

29 FERREIRA, P. et al. Forensic analysis of ballpoint pen inks using paper spray mass spectrometry. **Analyst**, v. 140, n. 3, p. 811-819, 2015.

30 LOONG, C. et al. Feasibility of high performance thin layer chromatography for the forensic analysis of red ballpoint pen inks. **Problems of Forensic sciences**, v. 97, p. 14-22, 2014.

31 FERREIRA, B. et al. Fragmentation reactions of rhodamine B and 6G as revealed by high accuracy orbitrap tandem mass spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 1, p. 136-142, 2017.