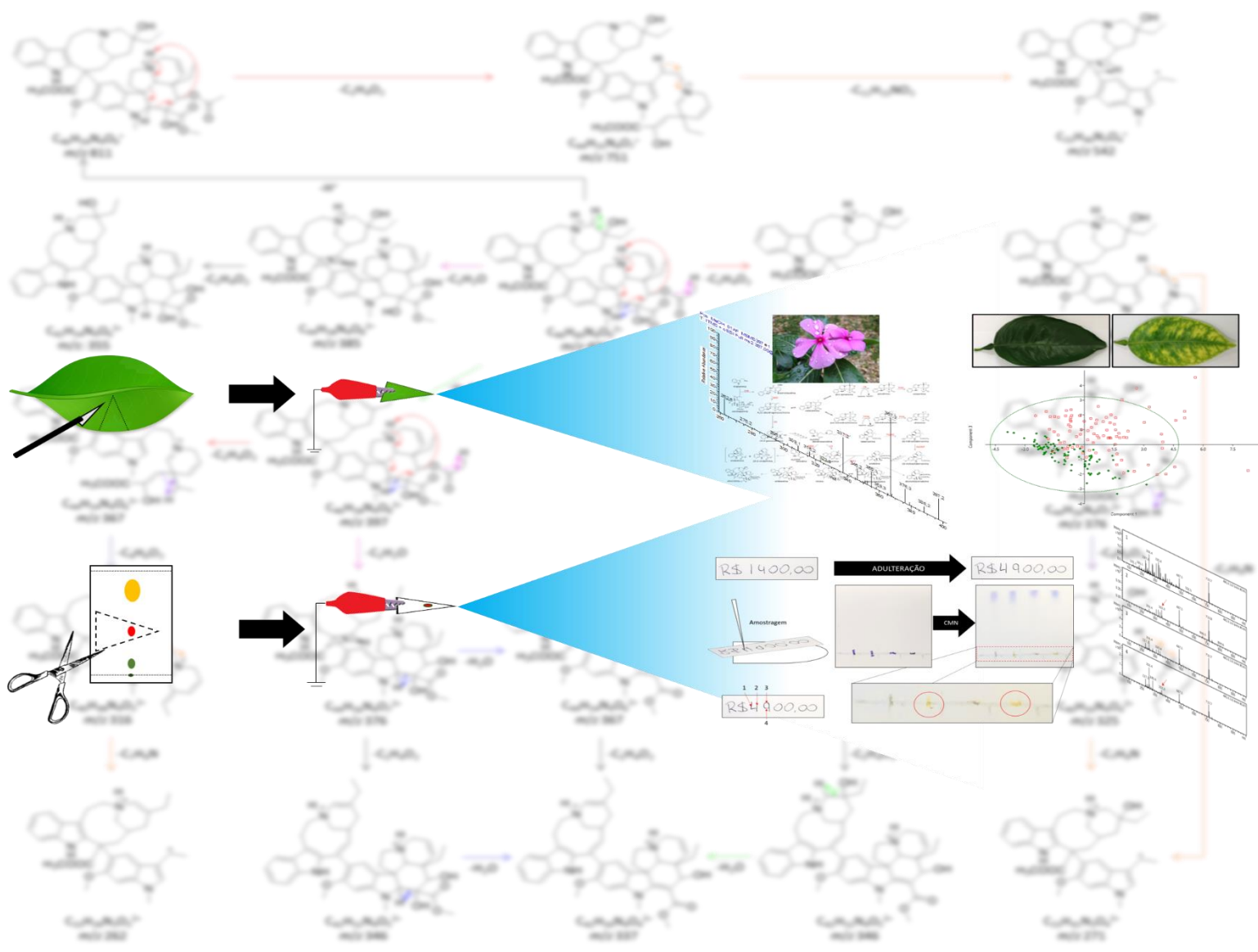


TÉCNICAS DE ANÁLISE DIRETA EM ESPECTROMETRIA DE MASSAS: SOLUÇÕES SIMPLES PARA COMPLEXAS QUESTÕES DA QUÍMICA DE PRODUTOS NATURAIS À ANÁLISE FORENSE.



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

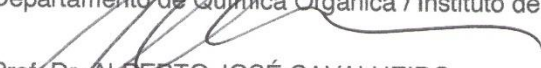
TÍTULO DA TESE: "Técnicas de análise direta em espectrometria de massas: soluções simples para complexas questões da química de produtos naturais à análise forense"

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: 38ª 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: 6º 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 mpectrometry: 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. cacasns*. 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 serpentinitina, 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 estrictosidina.	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 serpentina.	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-hidroxiprolina 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 m/z 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: desidrorecondilocarpina 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

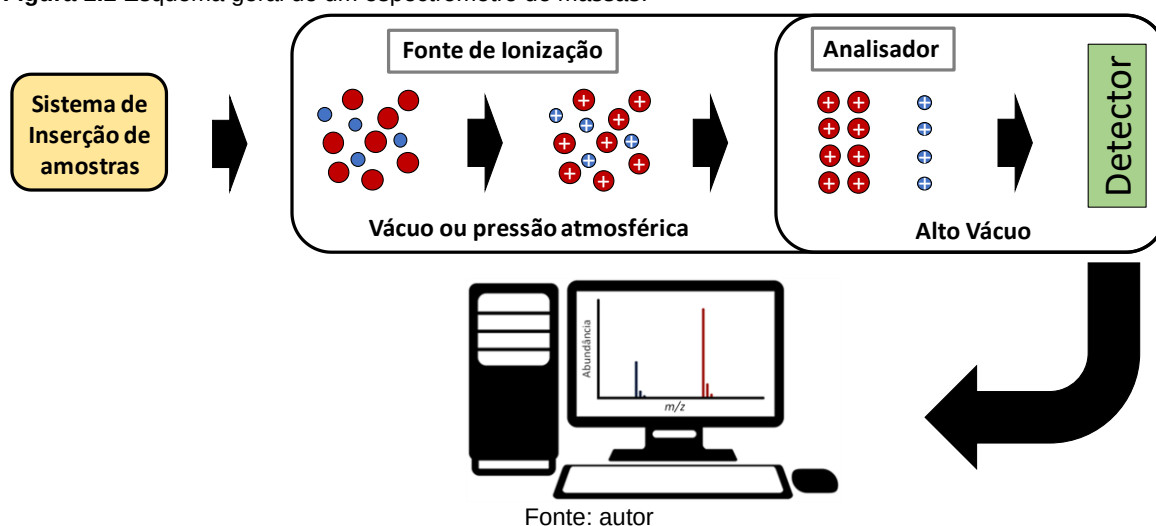
Nas últimas décadas a espectrometria de massas tem se destacado como ferramenta analítica nas mais diversas aplicações, tanto em análises de substâncias voláteis e de baixa massa molecular^{1; 2} como de macromoléculas biológicas³⁻⁶ e polímeros sintéticos.^{7; 8} Essa técnica tem desempenhado um papel 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

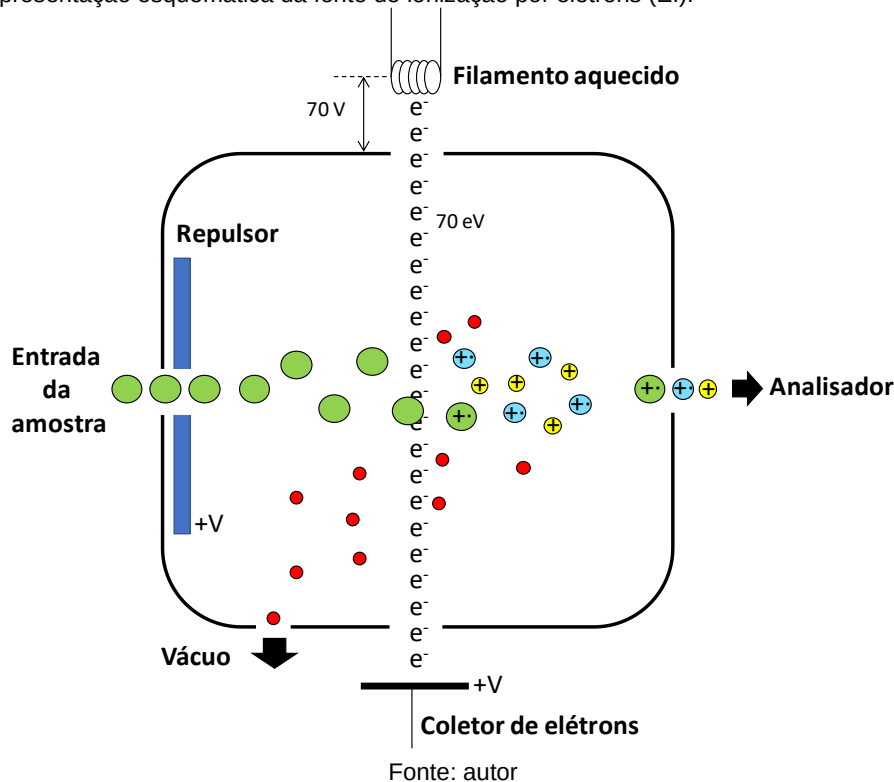
Em 1918, Arthur J. Dempster (1886-1950) utilizou um feixe de elétrons para promover a ionização de sólidos.²⁵ Essa técnica é atualmente denominada ionização por elétrons (*electron ionization* – EI).²⁶ Utilizando a EI, além de outras descobertas, Dempster revelou a existência de uma série de isótopos,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

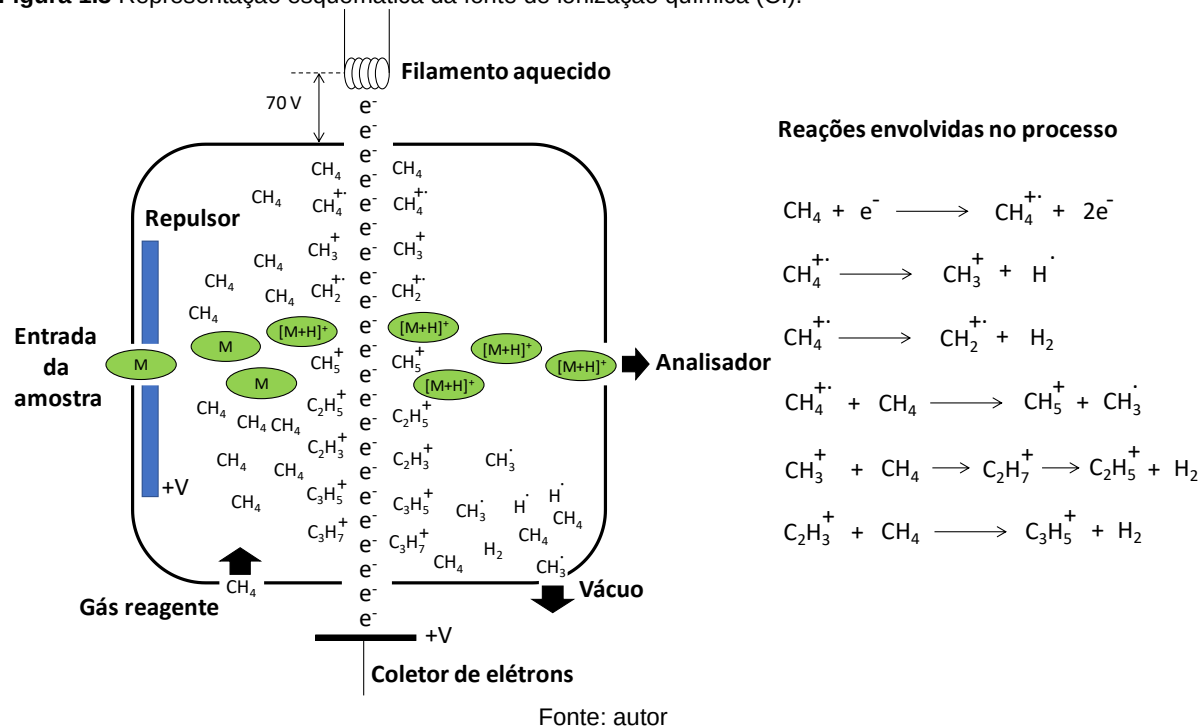
A interação entre o feixe de elétrons e as moléculas do analito também podem gerar espécies aniônicas pelo processo de captura de elétrons. Essas espécies são aceleradas em direção ao analisador, utilizando-se uma voltagem negativa no eletrodo repulsor. Nesse contexto pode-se classificar os modos de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

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

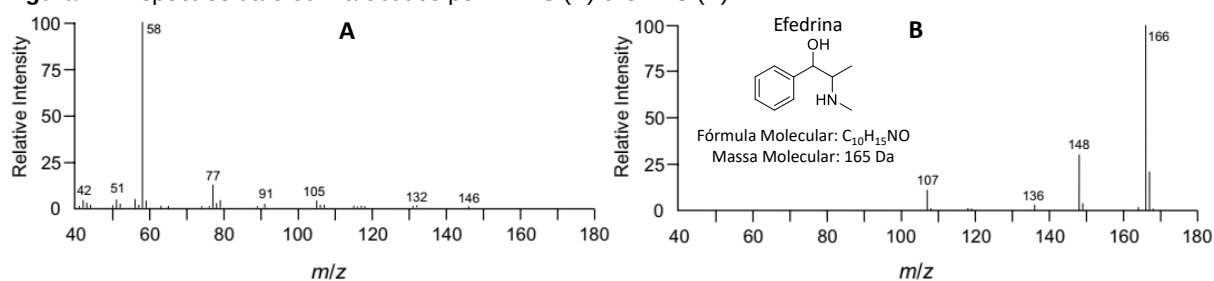
Figura 1.2 Representação esquemática da fonte de ionização por elétrons (EI).



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

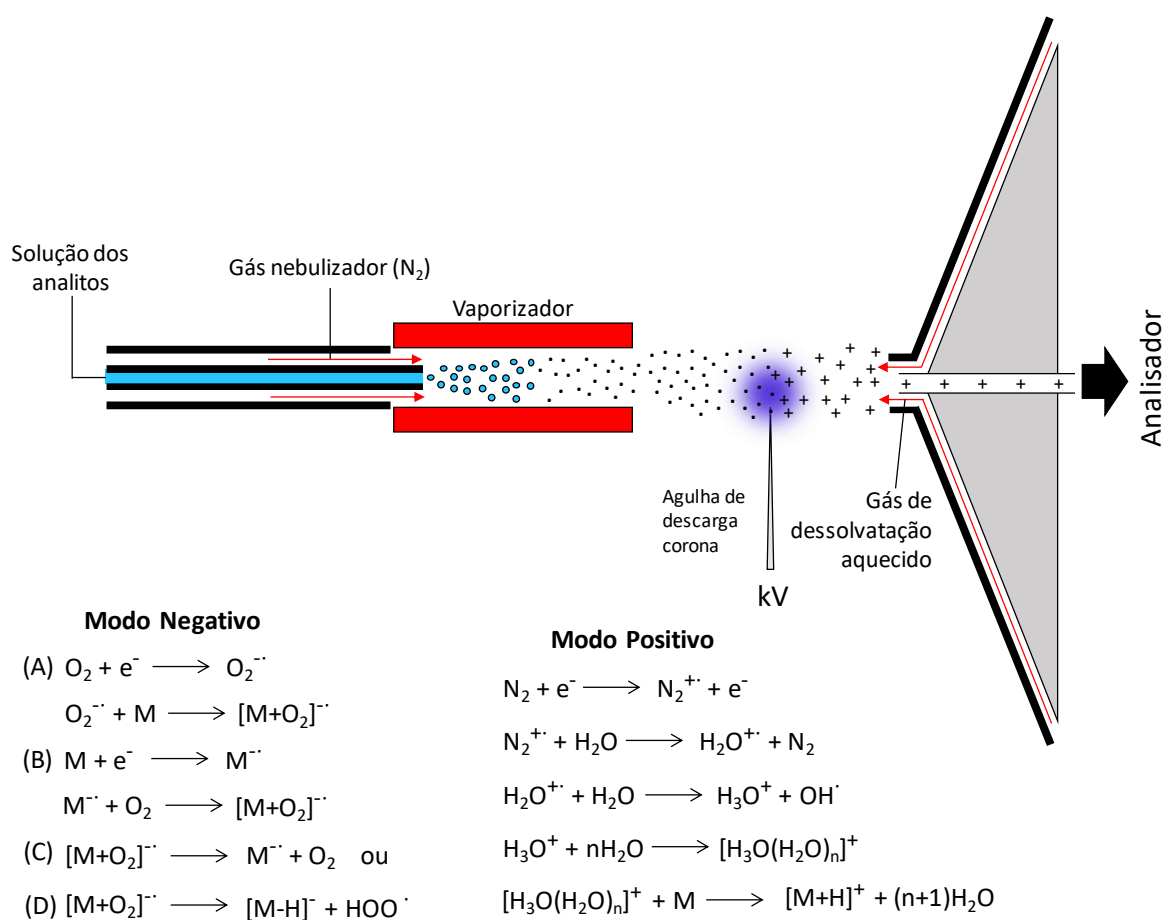
Figura 1.4 Espectros da efedrina obtidos por EI-MS (A) e CI-MS (B).

Fonte: adaptado da ref.[38]

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

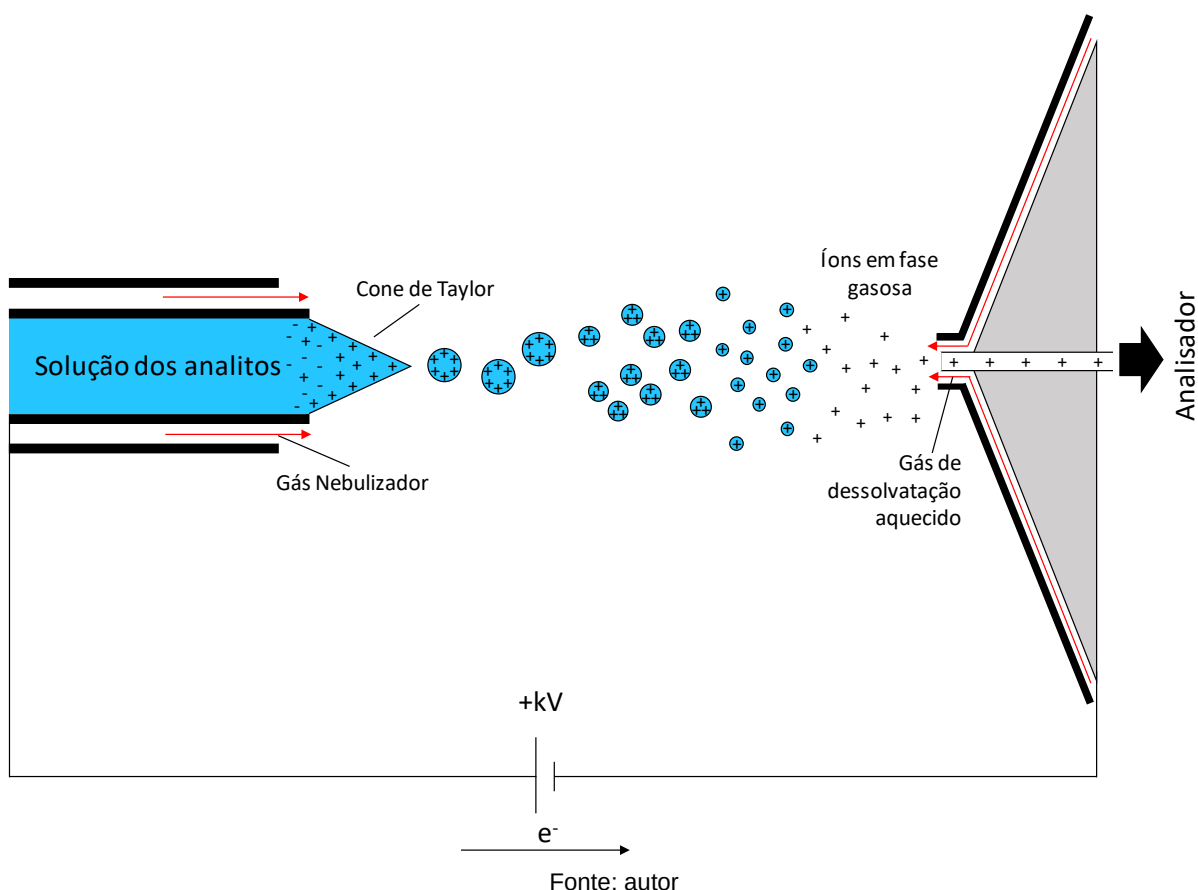
Nessa técnica a amostra em solução é nebulizada com o auxílio de um gás (N_2), denominado nebulizador, e vaporizada a altas temperaturas ($500\text{ }^{\circ}\text{C}$). Nesse processo, as moléculas do solvente e da amostra são transferidas para a fase gasosa e direcionadas para uma agulha de descarga 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

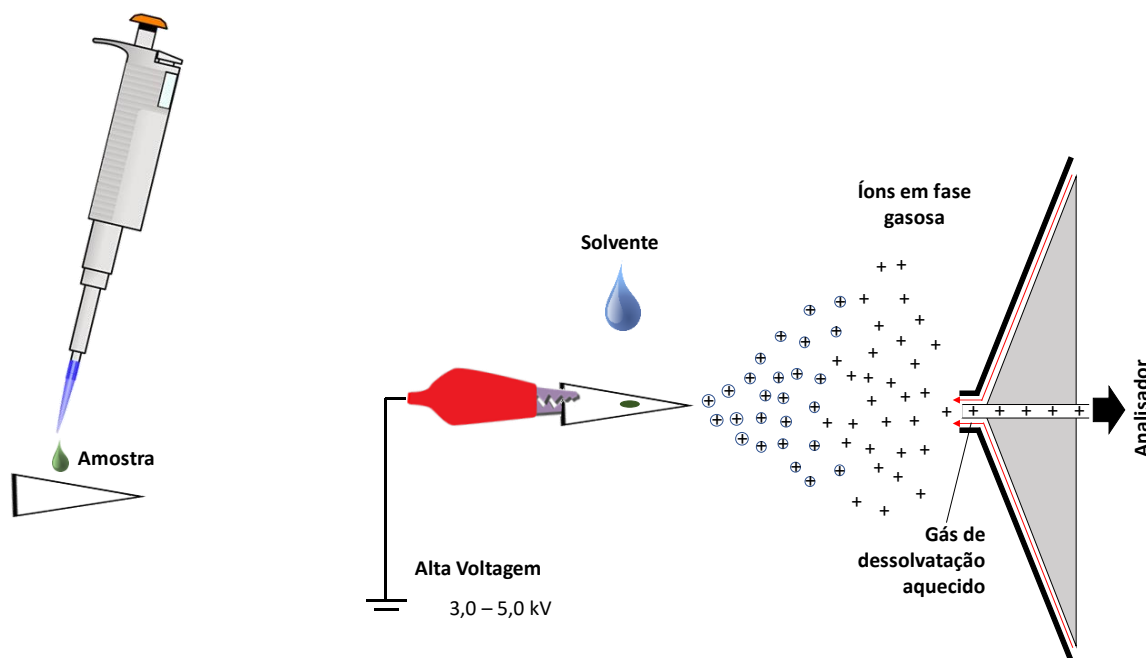
1.4 TÉCNICAS DE ANÁLISE DIRETA POR *PAPER SPRAY*-MS E *TISSUE SPRAY*-MS

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

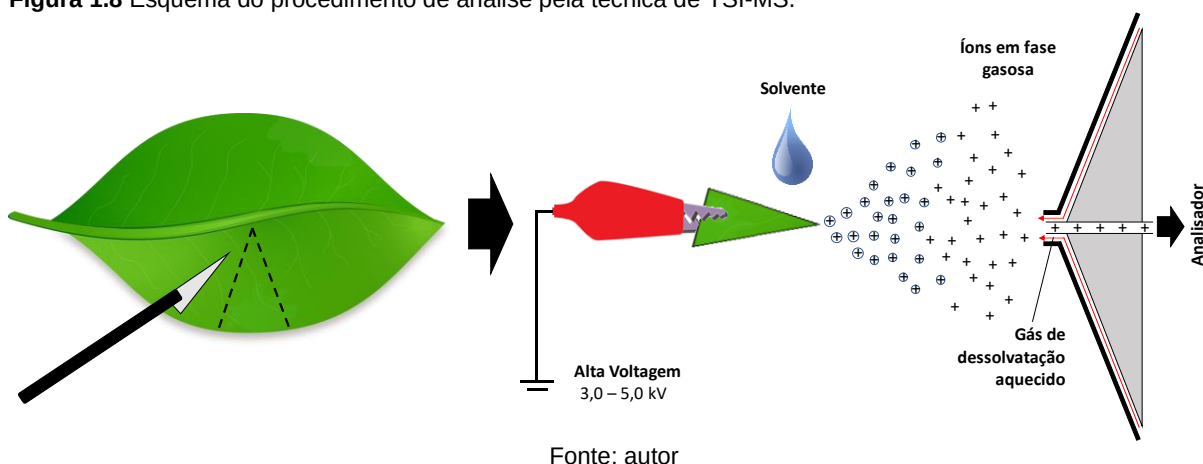
A PSI-MS contribuiu para o desenvolvimento de numerosas metodologias de análise no campo das ciências forenses,⁶¹ da medicina,⁶² da química de produtos naturais,⁶³ entre outros.

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.

1.5 OBJETIVO

O objetivo central deste trabalho foi avaliar a aplicabilidade das técnicas de TSI-MS e PSI-MS. Nesse contexto, três objetivos específicos foram planejados:

1. aplicar a TSI-MS/MS no mapeamento da via biossintética dos alcaloides indólicos terpenoídicos produzidos por *Catharanthus roseus*;
2. utilizar a TSI-MS na diferenciação de indivíduos da espécie *Citrus sinensis* var. Valência saudáveis e infectados por *Candidatus Liberibacter asiaticus*, avaliando as diferenças metabólicas sob o ponto de vista da biossíntese de produtos naturais;
3. desenvolver uma metodologia de identificação de corantes utilizados em tintas de canetas esferográficas para promover a detecção de adulterações em documentos, utilizando os conceitos das técnicas de PSI-MS e cromatografia planar.

1.6 REFERÊNCIAS

- 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.

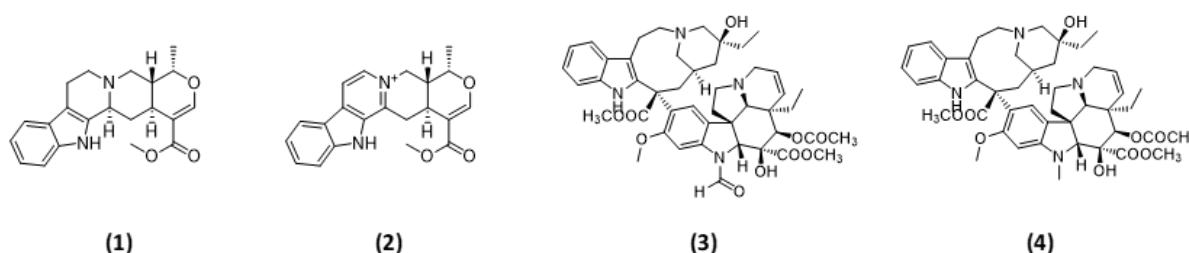
Capítulo 02

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

2.1 INTRODUÇÃO

Catharanthus roseus, popularmente denominada vinca, é uma espécie de planta medicinal, pertencente à família Apocynaceae, muito conhecida pela produção de uma ampla variedade de alcaloides indólicos terpenoídicos (AITs).¹ Mais de 130 tipos distintos de substâncias dessa classe foram isoladas de folhas, flores e raízes dessa espécie.² Essas substâncias são estruturalmente caracterizadas por apresentar um grupo indol ligado a um esqueleto terpenoídico³ e algumas delas exibem atividades biológicas importantes.⁴ Ajmalicina e serpentina (Figura 2.1, (1) e (2)), por exemplo, apresentam propriedades anti-hipertensiva e tranquilizante.^{5; 6} Outros exemplos incluem os alcaloides bisindólicos vinblastina e vincristina (Figura 2.1, (3) e (4)) que exibem atividade antineoplásica e tem sido utilizados como drogas quimioterápicas desde a década de 1960.⁷

Figura 2.1 Estruturas químicas de alcaloides indólicos terpenoídicos representativos de *Catharanthus roseus*.

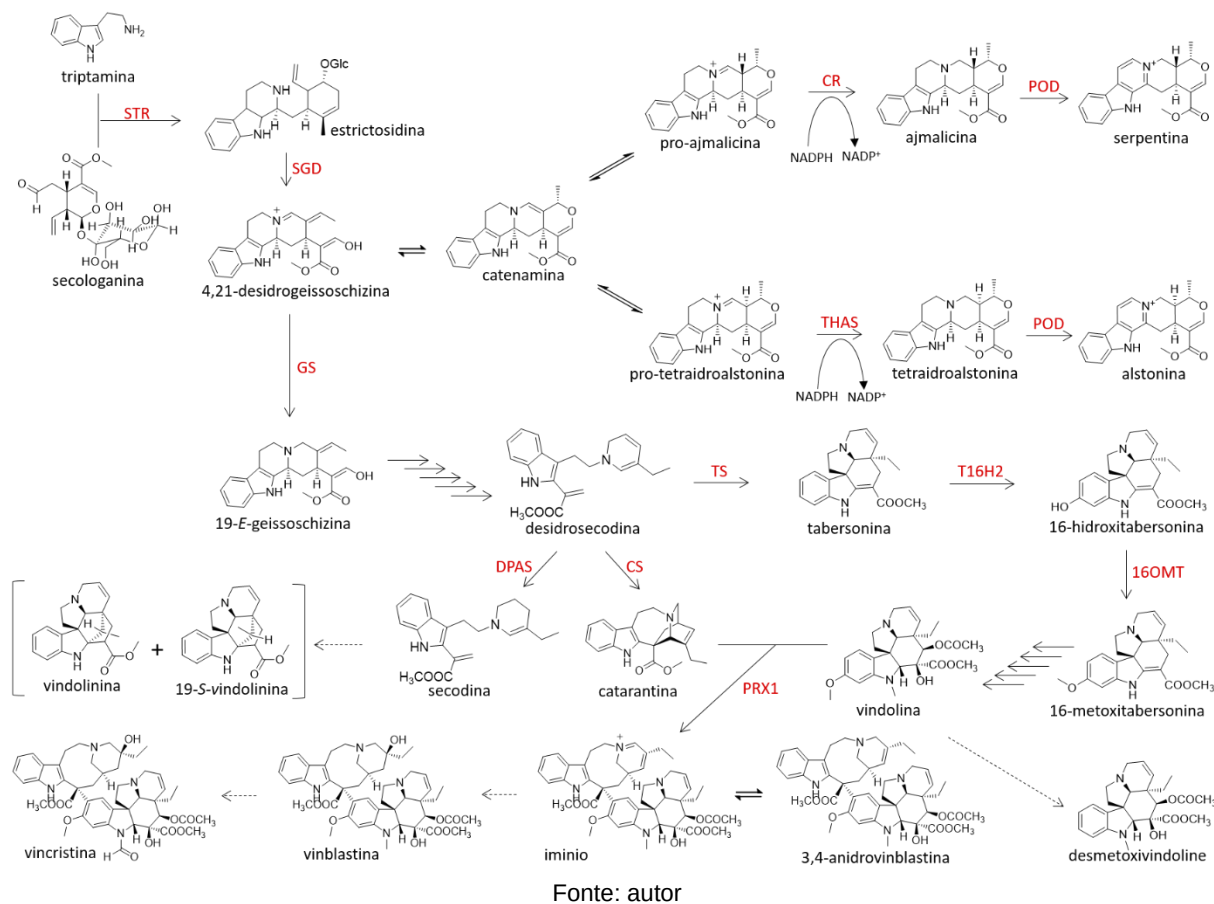


Fonte: autor

Os AITs constituem o maior grupo de substâncias da classe dos alcaloides produzidos no reino vegetal. A biossíntese dos metabólitos dessa classe em *Catharanthus roseus* encontra-se representada na figura 2.2 (p. 45). Tem como precursores a secologanina e a triptamina⁸, os quais constituem os blocos

construtores da estrictosidina, considerada o iniciador da rota dos AITs, produzida em uma reação catalisada pela enzima estrictosidina sintase (STR).⁹

Figura 2.2 Biossíntese dos AITs em *Catharanthus roseus*.



A estrictosidina perde a sua unidade de glicose por ação da enzima estrictosidina β -D-glicosidase (SGD), o que leva à formação de um intermediário imínio denominado 4,21-desidrogeissoschizina que se encontra em equilíbrio com a catenamina. Essa substância, por sua vez, pode assumir duas formas intermediárias carregadas: pró-ajmalicina e pró-tetraidroalstonina.¹⁰ Esses intermediários são reduzidos pela ação das enzimas catenamina redutase (CR) e tetraidroalstonina sintase (THAS) resultando respectivamente nos alcaloides ajmalicina e tetraidroalstonina, os quais sofrem oxidação por ação de uma enzima peroxidase (POD) dando origem ao par de epímeros serpentina e alstonina.¹¹

O intermediário 4,21-desidrogeissoschizina também é precursor do alcaloide corinanteano 19-E-geissoschizina, que é produzido por uma reação de redução catalisada pela enzima geissoschizina sintase (GS).¹² Esse metabolito sofre várias

etapas de transformação que o levam à desidrosecodina, a partir da qual três vias diferentes podem ser derivadas. Em uma delas, a desidrosecodina é reduzida a secodina em uma reação catalisada pela enzima desidroprecondilocarpina sintase (DPAS).¹³ Posteriormente, a secodina é convertida a vindolinina ou 19-S-vindolinina em um processo ainda não descrito na literatura.^{2; 14} A partir de duas reações do tipo Diels-Alder, que podem ser catalisadas pela catarantina sintase (CS) e tabersonina sintase (TS) a desidrosecodina é convertida em catarantina e tabersonina, respectivamente.¹⁵

A tabersonina é hidroxilada na posição 16 pela tabersonina 16-hidroxilase (T16H). Posteriormente uma O-metiltransferase converte esse grupo hidroxila em uma metoxila, levando à 16-metoxitabersonina que, por sua vez, sofre uma série de cinco reações enzimáticas que aumentam sua funcionalidade química e a conduzem para a formação da vindolina.¹⁶ Esse metabólito, por sua vez, sofre uma reação de desmetoxilação, que resulta na formação da desmetoxivindolina.¹⁷

Nas próximas etapas da via biossintética dos AITs ocorre uma reação de dimerização entre catarantina e vindolina, catalisada por uma enzima peroxidase denominada PRX1 que leva à formação de um intermediário imínio.^{14; 18; 19} Esse intermediário é precursor de uma série de alcaloides bisindólicos produzidos pela *Catharanthus roseus*. Entre esses metabólitos figuram a 3,4-anidrovinblastina e a vinblastina.²⁰ Nesse trabalho, essas substâncias serão consideradas os produtos finais da rota biossintética dos AITs, embora a maquinaria enzimática presente em *Catharanthus roseus* exibe uma capacidade impressionante de proporcionar grande variabilidade estrutural, de maneira que muitas outras substâncias dessa classe de compostos poderiam ser citadas.

A espécie *Catharanthus roseus* foi escolhida para o mapeamento metabólico por TSI-MS/MS pois a via biossintética dos AITs produzidos por essa espécie encontra-se consolidada na literatura. Embora técnicas de análise direta por espectrometria de massas já tenham sido utilizadas na detecção de alguns metabólitos desta classe em folhas de *Catharanthus roseus*,²¹ uma análise mais abrangente ainda não foi reportada. Além disso, não há relatos de aplicação da técnica de TSI-MS/MS no estudo de flores dessa espécie.

2.2 OBJETIVOS

O principal objetivo deste trabalho consiste em aplicar a técnica de TSI-MS/MS no mapeamento da via biossintética dos AITs produzidos pela espécie *Catharanthus roseus*. Com base nesse propósito, os seguintes objetivos específicos foram traçados:

1. desenvolver uma metodologia de análise de tecidos provenientes de folhas e flores de *Catharanthus roseus* por TSI-MS/MS;
2. atribuir os sinais dos espectros adquiridos por TSI-MS/MS com base nos dados relatados na literatura e propor os mecanismos de fragmentação iônica das substâncias detectadas;
3. confirmar as fórmulas dos íons detectados nos experimentos de TSI-MS por espectrometria de massas de alta resolução;
4. avaliar a presença ou ausência de diastereoisômeros dentre as substâncias detectadas mediante análises dos extratos metanólicos dos tecidos estudados por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas.

2.3 MATERIAIS E MÉTODOS

Metanol e acetonitrila (Merck LiChrosolv®, Darmstadt, Alemanha) grau de pureza HPLC-gradiente foram usados no preparo de amostras e nas análises por LC-MS/MS, TSI-MS/MS, DI-ESI-QqTOF-MS. Água ultrapura foi obtida de um sistema de purificação MilliQ Direct 8® (Merck-Millipore, Molsheim, França). Ácido fórmico ~98,0 % para espectrometria de massas (Fluka, St. Louis, USA) foi utilizado para acidificar os solventes empregados nos experimentos de TSI-MS/MS e DI-ESI-QqTOF-MS. Ácido acético glacial P.A. ACS (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) foi utilizado como modificador de fase móvel no experimento de HPLC-ESI-MS/MS. Uma mini centrífuga MiniSpin® (Eppendorf, Germany) foi utilizada na centrifugação dos extratos de folhas e flores de *Catharanthus roseus*.

Os experimentos de TSI-MS/MS foram realizados em um espectrômetro de massas LCQ-Fleet® (ThermoFisher Scientific, San Jose, USA) com configuração ESI-IT. A fonte de ionização desse equipamento foi modificada de modo a permitir a aplicação da técnica de TSI-MS/MS. Os experimentos de espectrometria de massas

de alta resolução por infusão direta (DI-ESI-QqTOF-MS) foram realizados em um espectrômetro Maxis Impact® (Bruker Daltonik, Bremen, Alemanha).

As análises de HPLC-ESI-MS/MS foram conduzidas em um sistema cromatográfico modular binário Prominence® (Shimadzu, Kyoto, Japan), equipado com duas bombas LC-20AD, um desgaseificador de fase móvel DGU-20A3R, um amostrador automático SIL-20A, um forno para colunas CTO-20A, um detector de arranjo de diodos SPD-M20A e um módulo controlador CBM-20A. O monitoramento das substâncias eluídas foi realizado em um espectrômetro Amazon® (Bruker Daltonik, Bremen, Alemanha), com configuração ESI-IT. A separação dos constituintes da amostra foi realizada em uma coluna Luna® C18 (Phenomenex Inc., Torrance, EUA), com dimensões 250 x 4.6 mm, contendo partículas de 5.0 µm de diâmetro médio e 100 Å de tamanho médio de poro.

Os dados de espectrometria de massas foram processados pela utilização dos softwares Xcalibur® versão 2.2 (ThermoFisher Scientific, San Jose, EUA) e DataAnalysis, versão 4.2 (Bruker Daltonik, Bremen, Alemanha).

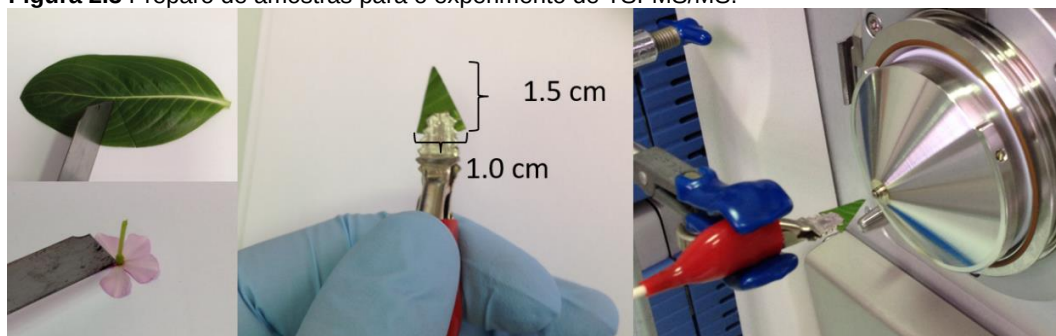
2.3.1 Experimentos de TSI-MS/MS

2.3.1.1 Preparo de amostras

Folhas e flores de um exemplar de *Catharanthus roseus* foram coletadas e enxaguadas com água ultrapura. Posteriormente, após secagem dos órgãos com um lenço de papel, partes triangulares medindo aproximadamente 1,0 cm de base e 1,5 cm de altura foram cortadas com um estilete.

2.3.1.2 Análise por TSI-MS/MS

Cada um dos cortes triangulares foi acoplado à fonte de alta tensão do espectrômetro e alinhados ao cone de amostragem do equipamento, mantendo-as a uma distância de 3,0 mm do orifício do capilar de transferência, como demonstrado na figura 2.3 (p. 49).

Figura 2.3 Preparo de amostras para o experimento de TSI-MS/MS.

Fonte: autor

A tensão aplicada na amostra foi ajustada a 3,0 kV. Os espectros foram adquiridos no modo positivo, logo após a aplicação de 10,0 μ L de MeOH contendo 0,1 % v/v de ácido fórmico sobre o tecido analisado. A faixa e a taxa de aquisição foram estabelecidas a m/z 50-2000 e 60,0 μ s/ m/z , respectivamente. Para as análises de TSI-MS/MS, as energias de colisão foram manualmente ajustadas com a finalidade de otimizar as intensidades dos sinais dos fragmentos. Nessas análises, alíquotas de 10,0 μ L de solvente foram continuamente adicionadas para manter constante a corrente iônica, permitindo completar os experimentos de MS/MS para um determinado íon. As energias de colisão encontram-se anotadas nos espectros apresentados nos apêndices A (p. 155) e B (p. 156).

2.3.2 Experimento de DI-ESI-QqTOF-MS

2.3.2.1 Preparo de amostras

Para as análises de ESI-QqTOF-MS, foi realizada uma extração dos metabólitos contidos em duas folhas e duas flores frescas, utilizando-se MeOH como solvente extrator. Nesse processo, as pétalas das flores foram inseridas em um almofariz e após a adição de 5,0 mL de MeOH, foram trituradas com um pistilo até que seu tecido se apresentasse finamente dividido. No caso das folhas, o mesmo processo foi empregado, porém utilizando-se um volume de 10,0 mL de MeOH. Após trituração, 1,0 mL de cada uma das soluções de extrato (folhas e flores) foi transferido, separadamente, para dois microtubos de 1,5 mL, que foram levados, posteriormente, a uma mini centrífuga, onde foram centrifugados por um período de 3,0 min a 10.000 rpm. Em seguida, o sobrenadante da solução do extrato das flores foi diluído por um

fator de 1:50 em solução de infusão (MeOH:H₂O 50% v/v, contendo 0,1% v/v de ácido fórmico) enquanto para o sobrenadante do extrato proveniente das folhas foi utilizado um fator de diluição de 1:100. Na sequência, as amostras foram prontamente analisadas.

2.3.2.2 Análise por DI-ESI-QqTOF-MS

As análises de ESI-QqTOF-MS foram realizadas por infusão direta das soluções diluídas de extratos de folhas e flores. A vazão utilizada para infusão na fonte de ESI foi de 180.0 µL/h. A voltagem de entrada do capilar de transferência foi mantida a -4.500 V e a pressão do gás nebulizador foi ajustada a 0,3 bar. A vazão e a temperatura do gás de dessolvatação foram estabelecidas a 4.0 L/min e 180 °C, respectivamente. Os espectros foram adquiridos na faixa de *m/z* 50-1500. Alguns dos íons detectados foram fragmentados em experimentos de dissociação induzida por colisão (CID), nos quais N₂ foi utilizado como gás de colisão e a energia de dissociação foi ajustada manualmente para otimização dos sinais dos fragmentos. A resolução da janela de isolamento foi estabelecida a 1,0 unidade de *m/z*. A energia de dissociação encontra-se especificada em cada espectro discutido ao longo do texto. Os erros das medidas foram calculados através do aplicativo SmartFormula do software DataAnalysis versão 4.2.

2.3.3 Experimento de HPLC-ESI-IT-MS/MS

A confirmação da presença de diastereoisômeros entre os metabólitos detectados foi realizada por HPLC-ESI-IT-MS/MS. Esses experimentos foram executados seguindo-se uma metodologia previamente descrita na literatura.²²

2.3.3.1 Preparo de amostras

As amostras analisadas por HPLC-ESI-IT-MS/MS foram preparadas segundo procedimento descrito na seção 2.3.2.1.

2.3.3.2 Análise por HPLC-ESI-IT-MS/MS

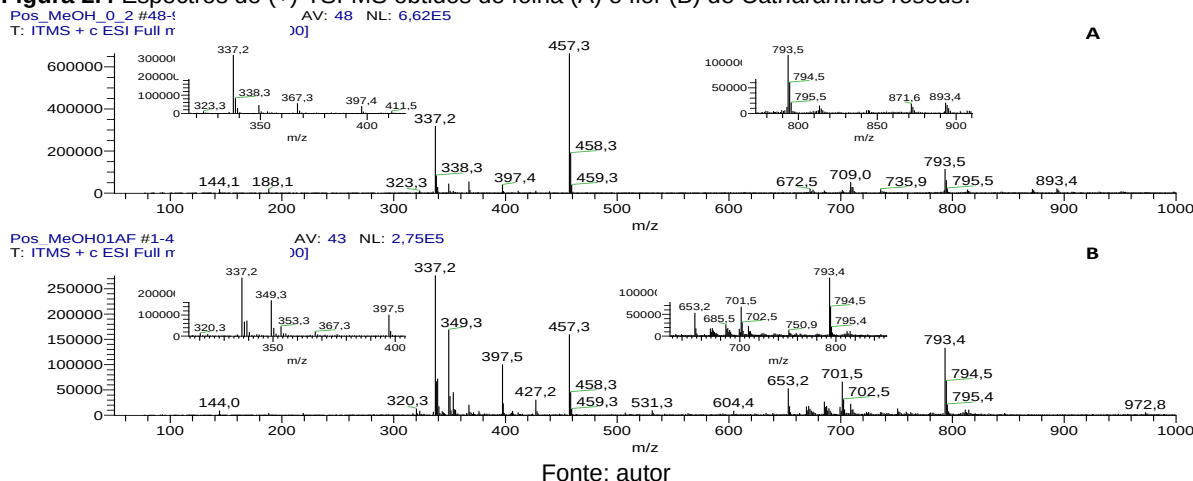
Os componentes A e B da fase móvel foram constituídos, respectivamente, por a uma solução de ácido acético a 0,5% v/v em água ultrapura e acetonitrila grau de pureza HPLC sem adição de modificadores. As amostras foram analisadas em modo gradiente, com programação segmentada na qual a proporção do componente B, expresso em (%B), iniciou-se em 12%, aumentando para 20% em 30,0 min. Posteriormente, a %B foi ampliada para 50% em 10,0 min, mantendo-se nessa proporção por um período de 5,0 min. Em seguida, a %B sofreu novo incremento para 100% em 5,0 min, sendo mantida nessa condição por 10,0 min para promover a limpeza da coluna. A etapa de recondicionamento foi realizada diminuindo-se a %B a 12,0% em 5,0 min, mantendo-se nessa proporção por 10,0 min para equilíbrio da coluna. A vazão de fase móvel foi estabelecida a 1,0 mLmin⁻¹ e o volume de injeção foi de 5,0 µL para ambas as amostras. A faixa de comprimento de onda e a frequência de aquisição do detector DAD foram ajustados a 190-800 nm e 4,1667 Hz respectivamente. O forno da coluna foi mantido a 40,0 °C ao longo de todas as análises. Uma conexão com divisão de fluxo foi utilizada no acoplamento do sistema cromatográfico com o espectrômetro de massas de maneira que apenas 25% da vazão total da coluna foi enviada à fonte de ESI.

Os dados de MS foram adquiridos no modo *enhanced resolution*, positivo, cobrindo a faixa de aquisição de m/z 50-1000. Na fonte de ionização, a voltagem de entrada do capilar de transferência foi mantida a -4.500V, a pressão do gás de nebulização (N₂) foi estabelecida a 50,0 psi e a vazão e temperatura do gás de dessolvatação (N₂) foram de 10,0 Lmin⁻¹ e 300,0 °C respectivamente. O *target mass* foi ajustado a m/z 500. Os experimentos de MS² foram realizados no modo *auto MS/MS* no qual apenas foram fragmentados íons com contagem superior a 5x10⁴. Utilizou-se uma faixa de exclusão de m/z 50-250 para evitar a fragmentação de contaminantes de baixa massa molecular, presentes na fase móvel. Hélio foi utilizado como gás de colisão durante os experimentos de CID. A janela de isolamento dos íons precursores foi estabelecida a ±1,0 unidades de m/z e a ativação dos íons foi realizada através de uma rampa de potencial de 0,4 a 4,0 V por ciclo de fragmentação.

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho, folhas e flores coletadas de um exemplar de *Catharanthus roseus* foram analisadas por TSI-MS/MS com o objetivo de promover o mapeamento da via biossintética dos AITs produzidos por essa espécie. Os experimentos foram realizados em modo positivo e metanol foi escolhido como solvente pois na literatura há relatos de que suas propriedades permitem a extração e, conseqüentemente a detecção de ampla variedade de classes de metabólitos.²³ Ácido fórmico foi adicionado a este solvente na concentração de 0,1% v/v a fim de favorecer a protonação dos AITs no processo de ionização.

Os espectros de varredura obtidos por TSI-MS da folha e da flor são apresentados na figura 2.4 (p. 53). Na comparação entre esses dois espectros foram observadas diferenças na abundância absoluta dos sinais compartilhados por cada um. No entanto não foi possível atribuir essas variações a diferenças de concentração dos metabólitos entre os tecidos, já que, por possuírem características distintas, observáveis principalmente pela diferença de textura e espessura, esses tecidos possuem seu próprio efeito de matriz no processo de ionização. Além disso, a compartimentalização e a logística de cada metabólito após sua biossíntese ocorre por diferentes maneiras.²⁴ A catarantina, por exemplo, é produzida dentro do citosol das células epiteliais e liberada para a superfície das folhas, onde é acumulada na cera da epiderme foliar. A vindolina, por outro lado é produzida por laticíferos e idioblastos, estruturas celulares responsáveis pela produção e acúmulo de látex.²⁵ Com base nessas informações, é razoável concluir que os metabólitos compartimentalizados dentro de organelas celulares ou do citosol das células de folhas ou flores são detectados como resultado de sua extração a partir da região que compreende a borda de corte dos tecidos.

Figura 2.4 Espectros de (+)-TSI-MS obtidos de folha (A) e flor (B) de *Catharanthus roseus*.

As tabelas 2.1 e 2.2 (p. 54) apresentam, respectivamente, os principais íons produto obtidos por CID através dos experimentos de TSI-MS/MS em folhas e flores de *Catharanthus roseus*. As intensidades dos sinais podem ser conferidas nos espectros apresentados nos apêndices A (p. 155) e B (p. 156).

Tabela 2.1 Íons produto obtidos por (+)-TSI-MS/MS em folhas de *Catharanthus roseus*.

<i>m/z</i> dos íons precursores	<i>m/z</i> dos principais íons produto obtidos experimentalmente	Possíveis atribuições	<i>m/z</i> dos principais íons produto obtidos na literatura	Referências
337	320, 308, 305, 173, 144	catarantina	173 , 144	15; 17; 21; 26; 27; 28; 29; 30; 31; 32; 33; 34; 35
		vindolinina	320 , 308	26; 29; 35
		19-S-vindolinina	320 , 308	26; 29; 35
349	317, 289, 263	serpentina	317, 289, 277, 263	17; 21; 27; 31; 32; 35; 36; 37; 38; 39
		alstonina	317, 289, 277, 263	17; 21; 27; 31; 32; 35; 36; 37; 38; 39
353	335, 321, 307, 303, 293, 251, 249, 246, 228, 226, 222, 210, 171, 170, 160, 144	16-hidroxitabersonina	321, 293 , 265, 244, 184, 136	16; 40
		19-hidroxitabersonina	335 , 321, 228	16
		ajmalicina	321, 222 , 210 , 144	17; 27; 29; 30; 32; 35; 36; 37; 38
367	335, 307, 279, 258	16-metoxitabersonina	335, 307, 279, 258, 226, 136	16; 40
397	524, 388, 376, 367, 355, 346, 337, 316, 262, 222, 190, 188, 173, 162	3,4-anidrovinblastina [M+2H] ²⁺	376, 367, 346, 355, 337, 271, 248, 210, 188	21
427	409, 367, 158	desmetoxivindolina	409, 367, 158, 143	17; 26
457	439, 397, 365, 188	vindolina	439, 397, 188	17; 21; 26; 27; 28; 29; 30; 31; 32; 33; 34; 35; 41; 42
793	775, 761, 760, 733, 715, 701, 648, 631, 563, 524, 522, 490, 464, 379, 352	3,4-anidrovinblastina [M+H] ⁺	793, 733, 524, 352, 337, 305, 224, 144	21; 31

Fonte: autor

Em ambas as tabelas, os sinais de íons produto diagnósticos são apresentados em negrito. Esses sinais foram coletados da literatura e são específicos de cada substância. Eles foram utilizados para estabelecer as atribuições dos sinais detectados pela comparação dos espectros de TSI-MS/MS adquiridos nesse trabalho com os espectros de MS/MS reportados na literatura para substâncias puras. Além disso, mecanismos de fragmentação foram propostos com o objetivo de validar a identificação de cada substância detectada.

Tabela 2.2 Íons produto obtidos por (+)-TSI-MS/MS em flores de *Catharanthus roseus*.

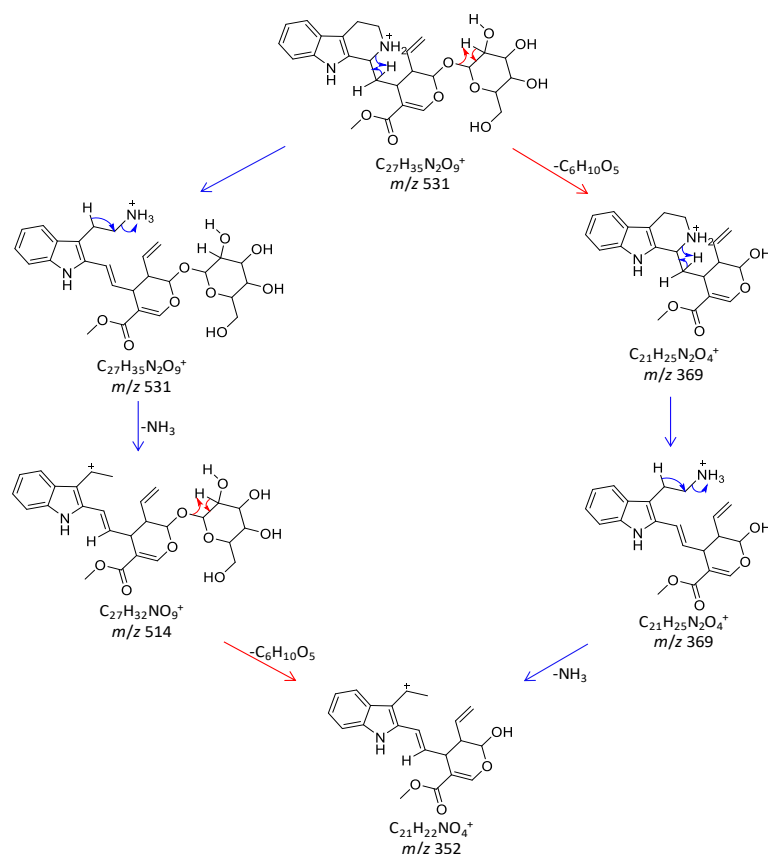
<i>m/z</i> dos íons precursores	<i>m/z</i> dos principais íons produto obtidos experimentalmente	Possíveis atribuições	<i>m/z</i> dos principais íons produto obtidos na literatura	Referências
337	320, 308, 305, 173, 144	catarantina	173 , 144	15; 17; 21; 26; 27; 28; 29; 30; 31; 32; 33; 34; 35
		vindolinina	320 , 308	26; 29; 35
		19-S-vindolinina	320 , 308	26; 29; 35
349	317, 289, 263	serpentina	317, 289, 277, 263	17; 21; 27; 31; 32; 35; 36; 37; 38; 39
		alstonina	317, 289, 277, 263	17; 21; 27; 31; 32; 35; 36; 37; 38; 39
353	336, 335, 324, 321, 310, 303, 293, 251, 228, 222, 210, 189, 178, 171, 160, 144	16-hidroxitabersonina	321, 293 , 265, 244, 184, 136	16; 40
		19-hidroxitabersonina	335 , 321, 228	16
		hidroxitabersonina (isômero)	336 , 321, 144	NR
		ajmalicina	321, 222 , 210 , 144	17; 27; 29; 30; 32; 35; 36; 37; 38
367	335, 307, 279, 258	16-metoxitabersonina	335, 307, 279, 258, 226, 136	16; 40
397	524, 388, 376, 367, 355, 346, 337, 316, 305, 262, 190, 188,	3,4-anidrovinblastina [M+2H] ²⁺	367, 346, 337, 272, 262, 248, 210, 188	21
406	542, 397, 385, 384, 376, 367, 355, 346, 345, 337, 332, 325, 271, 210	vimblastina [M+2H] ²⁺	376, 367, 346, 355, 337, 271, 248, 210, 188	43; 44; 45
427	409, 367, 158	desmetoxivindolina	409, 367, 158, 143	17; 26
457	439, 397, 365, 188	vindolina	439, 397, 188	17; 21; 26; 27; 28; 29; 30; 31; 32; 33; 34; 35; 41; 42
531	514, 369, 352	estrictosidina	514, 369, 352	17; 39; 46
685	653, 621, 435, 433, 403, 375, 349, 251	serpentinina	653, 435, 403, 375, 349, 251	36; 37
793	775, 733, 732, 701, 671, 648, 631, 563, 524, 522, 486, 379, 352	3,4-anidrovinblastina [M+H] ⁺	793, 733, 524, 352, 337, 305, 224, 144	21; 31

NR= não reportado

Fonte: autor

A via biossintética dos AITs é iniciada pela produção de strictosidina, catalisada pela strictosidina sintase (STR). Nos experimentos de TSI-MS/MS, esse alcaloide foi detectado apenas no tecido das flores, embora haja relatos na literatura de sua presença em extratos oriundos de folhas⁴⁷ e caules.¹⁷ Esse resultado indica que um possível efeito de matriz relacionado à estrutura e morfologia dos tecidos contribui para a detecção deste metabólito apenas em flores. A fragmentação dos íons $[M+H]^+$ com m/z 531 gerou íons produto em m/z 514, 369 e 352. Na proposta do mecanismo de fragmentação, apresentada na figura 2.5, o primeiro sinal é formado por um rearranjo de hidrogênio remoto, seguido de uma reação de deslocamento assistida por rearranjo de hidreto, como indicado pelas setas azuis, gerando amônia como perda neutra. O íon produto em m/z 369 é formado pela perda da glicose, representada pelas setas vermelhas, resultado de um rearranjo de hidrogênio remoto. O íon produto detectado em m/z 352 pode ser gerado tanto por perda da porção glicosídica, a partir do íon com m/z 514 (setas vermelhas), quanto pela perda de amônia a partir do íon com m/z 369 (setas azuis).

Figura 2.5 Mecanismo de fragmentação dos íons $[M+H]^+$ gerados a partir da strictosidina.



Fonte: autor

Na tabela 2.3 são apresentadas as razões m/z obtidas pelo experimento de ESI-QqTOF-MS (apêndice C, p. 157) realizado por infusão direta dos extratos metanólicos diluídos de folhas e flores. Nesse experimento, o íon $[M+H]^+$ da estrictosidina apresentou um valor de m/z de 531.2343, que, quando comparado com o valor calculado (m/z 531,2337) apresentou um erro de -1,12 ppm. Esse pequeno valor de erro confirma a detecção dessa substância pois manteve-se abaixo do limite de 5,0 ppm estabelecido como critério máximo de atribuição.

Tabela 2.3 Valores de m/z calculados e experimentais, obtidos pela análise de DI-ESI-QqTOF-MS do extrato de folhas (L) e flores (F).

m/z calculada	Tipo de íon detectado	m/z experimental	Erro (ppm)	Fórmula iônica	Atribuição
337,1910	$[M+H]^+$	337,1910 (L)	0,02	$C_{21}H_{25}N_2O_2$	catarantina, vindolinina/19-S-vindolinine
		337,1910 (F)	0,13		
349,1547	M^+	349,1543 (L)	0,95	$C_{21}H_{21}N_2O_3$	serpentina/alstonina
		349,1545 (F)	0,55		
353,1860	$[M+H]^+$	353,1853 (L)	1,79	$C_{21}H_{25}N_2O_3$	ajmalicina, hidroxitabersonina (isômeros)
		353,1855 (F)	1,32		
*397,2122	$[M+2H]^{2+}$	397,2126 (L)	-1,02	$C_{46}H_{58}N_4O_8$	3,4-anidrovinblastina
		397,2118 (F)	0,94		
*406,2175	$[M+2H]^{2+}$	406,2158 (L)	4,02	$C_{46}H_{60}N_4O_9$	vinblastina
		406,2163 (F)	2,81		
427,2227	$[M+H]^+$	427,2220 (L)	1,84	$C_{24}H_{31}N_2O_5$	desmetoxivindolina
		427,2216 (F)	2,64		
457,2333	$[M+H]^+$	457,2331 (L)	0,4	$C_{25}H_{33}N_2O_6$	vindolina
		457,2333 (F)	0,06		
531,2337	$[M+H]^+$	ND (L)	---	$C_{27}H_{35}N_2O_9$	estrictosidina
		531,2343 (F)	-1,12		
653,2076	M^+	ND (L)	---	$C_{30}H_{37}O_{16}$	Hirsutidina 3-O-[6-O-(α -ramnopiranosil)- β -galactopiranosídeo]
		653,2078 (F)	-0,36		
685,3384	M^+	ND (L)	---	$C_{42}H_{45}N_4O_5$	serpentinina
		685,3382 (F)	0,29		
793,4171	$[M+H]^+$	793,4173 (L)	-0,25	$C_{46}H_{57}N_4O_8$	3,4-anidrovinblastina
		793,4178 (F)	-0,85		
811,4277	$[M+H]^+$	ND (L)	---	$C_{46}H_{59}N_4O_9$	vinblastina
		811,4282 (F)	-0,59		
871,5732	$[M+H]^+$	871,5729 (L)	0,38	$C_{55}H_{75}N_4O_5$	feofitina-a
		ND (F)	---		

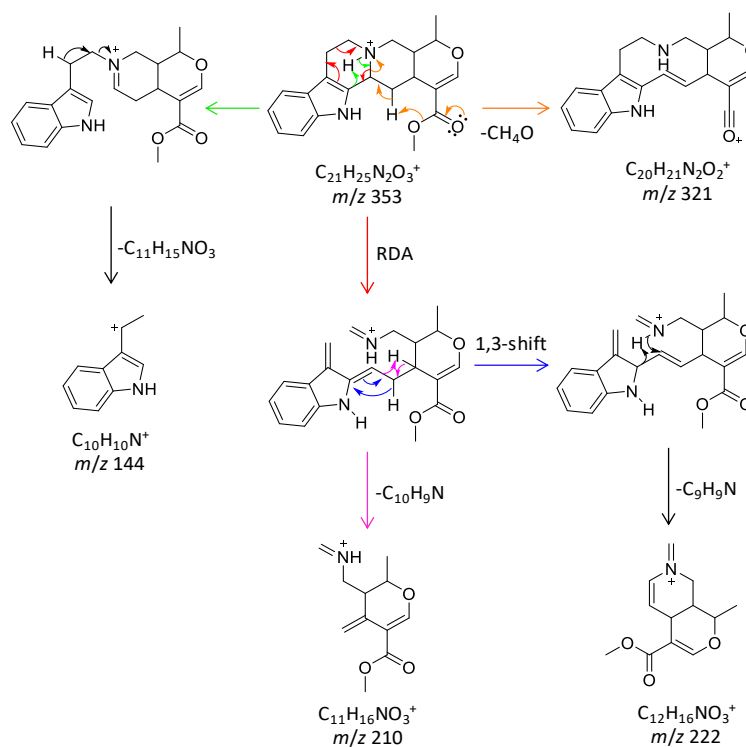
ND = não detectado

Fonte: autor

Seguindo a via biossintética dos AITs, os produtos intermediários 4,21-desidrogeissoschizina e catenamina não foram detectados em ambos os tecidos, possivelmente pelo fato de serem metabólitos transientes, sendo prontamente convertidos nos produtos subsequentes, ajmalicina e tetraidroalstonina, respectivamente. Por se tratarem de epímeros, os íons $[M+H]^+$ da ajmalicina e tetraidroalstonina apresentam a mesma razão m/z 353 e mesmo padrão de fragmentação no espectro de TSI-MS/MS. Os íons produto gerados pela fragmentação dos íons precursores com m/z 353 são mostrados nas tabelas 2.1 (p. 53) e 2.2 (p. 54). A avaliação desse resultado mostrou que, durante o experimento de CID, outros íons isômeros foram também isolados e fragmentados, já que sinais distintos daqueles relatados para a ajmalicina e tetraidroalstonina foram detectados.²² Embora esse fato tenha dificultado a interpretação dos espectros, foi possível extrair os sinais diagnósticos em m/z 210 e 222 que podem ter sua origem atribuída tanto à ajmalicina quanto à tetraidroalstonina. Os sinais remanescentes foram associados a íons gerados a partir de outros isômeros. Dentre eles, a 16-hidroxitabersonina, a 19-hidroxitabersonina e um isômero que não pôde ser atribuído baseado em dados da literatura, e por isso foi denominado, de forma genérica, de isômero de hidroxitabersonina. A fórmula iônica $C_{21}H_{25}N_2O_3^+$, correspondente a esses isômeros, foi confirmada pelo experimento de DI-ESI-QqTOF-MS que forneceu os valores de m/z 353.1853 (erro: 1,79 ppm) para o extrato de folhas e m/z 353.1855 (erro: 1,32 ppm) para o extrato de flores. O mecanismo de fragmentação do íon $[M+H]^+$ do par de epímeros ajmalicina e tetraidroalstonina (Figura 2.6, p. 58) compreende três vias reacionais, que envolvem a abertura do anel cicloexênico adjacente ao grupo indol. Em uma delas, indicada com setas laranjas, uma reação de remoção de hidrogênio β resulta no íon produto com m/z 321 e na perda neutra de CH_4O . A segunda via (setas vermelhas) consiste em uma reação de retro-Diels-Alder que pode ser seguida tanto por um rearranjo de hidrogênio remoto, dando origem ao íon com m/z 210 e à perda neutra de $C_{10}H_9N$ (setas magenta) quanto por um deslocamento 1,3 de hidrogênio responsável pela formação de uma espécie iônica intermediária. Na etapa seguinte, essa espécie sofre um rearranjo de hidrogênio remoto que dá origem ao íon produto com m/z 222 e à perda neutra de C_9H_9N . Na terceira via, indicada com setas verdes, ocorre a abertura do anel cicloexênico pelo rearranjo de hidrogênio remoto.

Posteriormente, uma reação de deslocamento assistida por rearranjo de hidreto leva à formação do íon produto com m/z 144 e de uma perda neutra de $C_{11}H_{15}NO_3$.

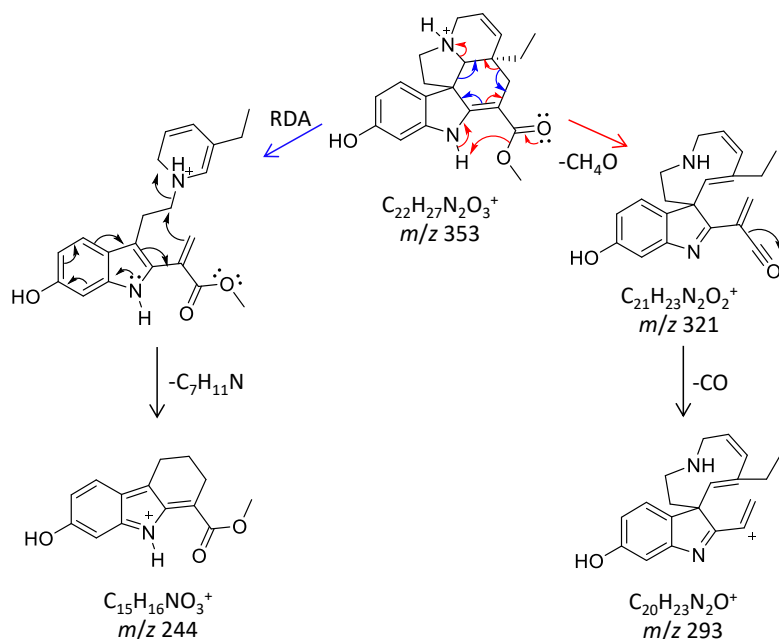
Figura 2.6 Mecanismo de fragmentação dos íons $[M+H]^+$ gerados a partir da ajmalicina.



Fonte: autor

O mecanismo de fragmentação dos íons $[M+H]^+$ gerados a partir da 16-hidroxitabersonina foi proposto com base nos íons produto reportados na literatura (Tabelas 2.1, p. 53 e 2.2, p. 54) e encontra-se ilustrado na figura 2.7 (p. 59). Duas vias de fragmentação podem ser derivadas a partir do íon precursor. Em uma delas, indicada com setas azuis, uma reação de retro-Diels-Alder é responsável pela abertura do anel cicloexênico central. Após essa etapa, ocorre uma reação de deslocamento com consequente formação da perda neutra de $C_7H_{11}N$, gerando o íon produto com m/z 244. Na outra via, descrita com setas vermelhas, uma reação de remoção de hidrogênio β gera o íon acílio com m/z 321. Posteriormente, uma clivagem indutiva é responsável por gerar a perda neutra de CO e o íon produto com m/z 293, considerado íon diagnóstico e detectado nos experimentos de TSI-MS/MS das folhas e das flores.

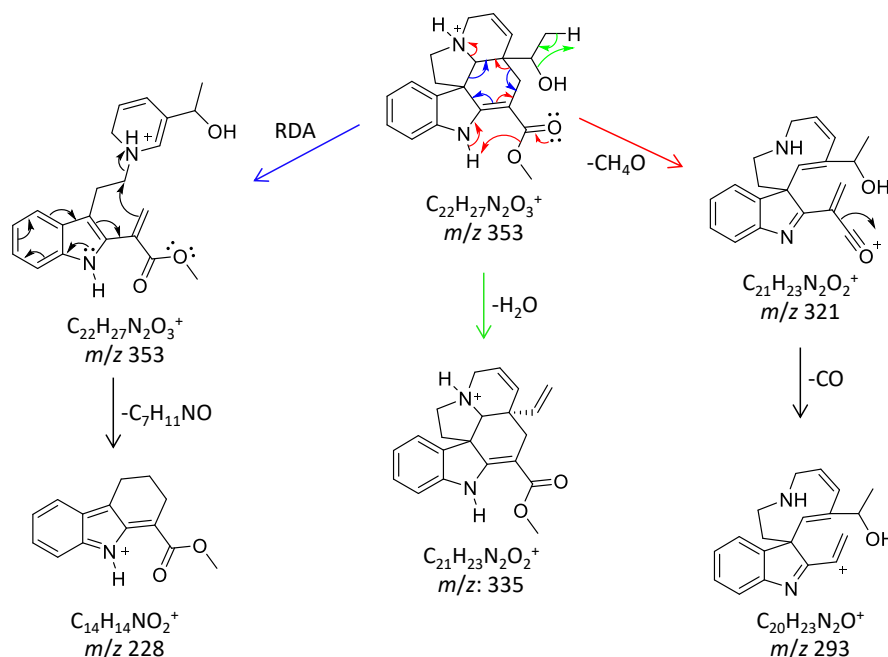
Figura 2.7 Mecanismo de fragmentação dos íons $[M+H]^+$ gerados a partir da 16-hidroxitabersonina.



Fonte: autor

Outra possível substância responsável pela formação dos íons $[M+H]^+$ com m/z 353 correspondeu à 19-hidroxitabersonina, dada a presença de seus sinais diagnósticos no espectro de TSI-MS/MS de folhas e flores. A proposta de mecanismo de fragmentação para os íons $[M+H]^+$ gerados a partir dessa substância está representada na figura 2.8 (p. 60). Por esse mecanismo, a molécula protonada pode seguir uma entre três vias de fragmentação. Em uma delas, uma reação de retro-Diels-Alder (setas azuis) é responsável por abrir o anel cicloexênico. Posteriormente, ocorre uma reação de deslocamento que resulta na formação do íon produto com m/z 244 acompanhada pela restauração do anel cicloexênico e pela formação da perda neutra de $C_7H_{11}NO$. A segunda via, indicada com setas verdes, consiste em um rearranjo de hidrogênio remoto, com perda neutra de água, gerando o íon produto com m/z 335. O terceiro caminho reacional, mostrado pelas setas vermelhas, começa com uma remoção de hidrogênio β que leva à formação do íon acílio com m/z 321 acompanhada da liberação da perda neutra de CH_4O . Posteriormente, uma clivagem indutiva resulta na formação do íon produto em m/z 293 e da perda neutra de CO .

Figura 2.8 Mecanismo de fragmentação dos íons $[M+H]^+$ gerados a partir da 19-hidroxitabersonina.

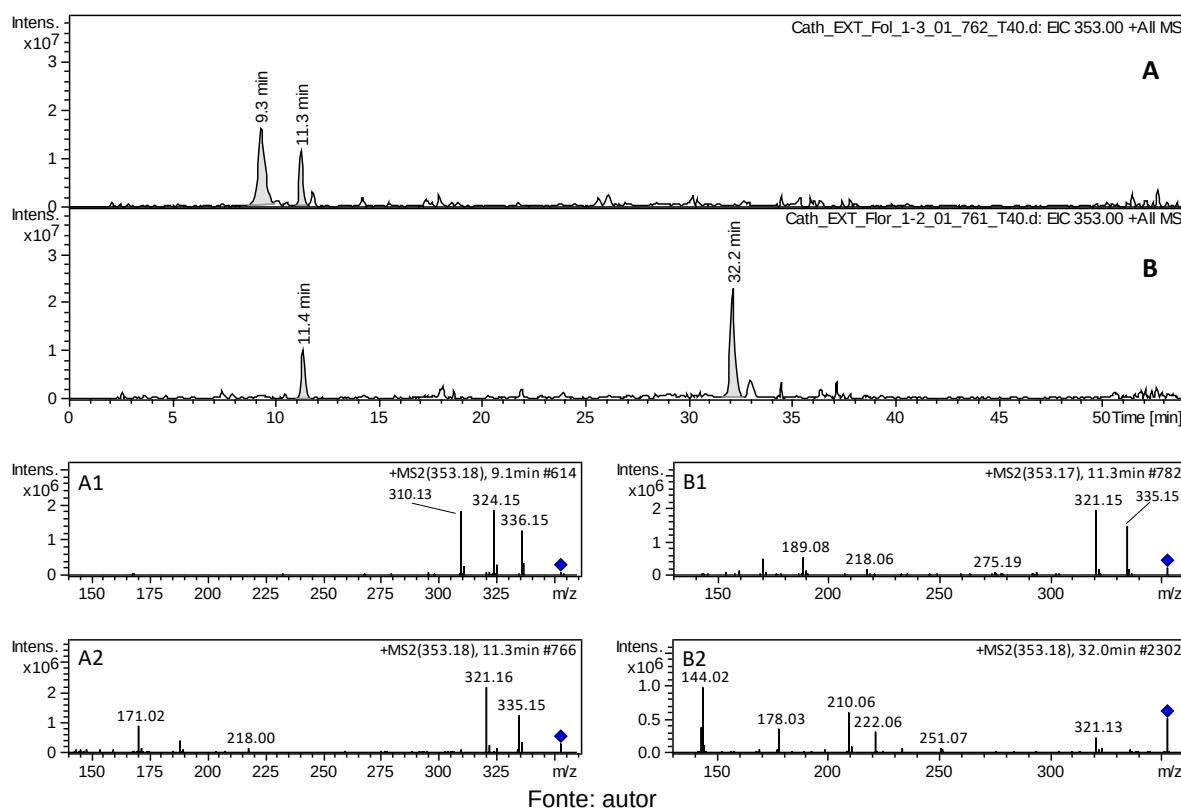


Fonte: autor

Com a finalidade de avaliar a detecção desses isômeros por TSI-MS/MS, os extratos de folhas e flores de *Catharanthus roseus* foram analisados por HPLC-ESI-IT-MS/MS. Os cromatogramas de íon extraído para m/z 353 encontram-se representados na figura 2.9 (p. 61). A partir desses resultados, foi possível atribuir a banda cromatográfica em 32,2 min, presente apenas no extrato das flores, à ajmalicina, já que seu tempo de retenção e padrão de fragmentação foram similares àqueles reportados na literatura.²² Da mesma maneira foi possível atribuir as bandas cromatográficas com tempo de retenção de 11,3 e 11,4 min à 19-hidroxitabersonina, dada a presença do sinal diagnóstico em m/z 335 nos espectros de MS/MS correspondentes. Nenhuma das bandas cromatográficas apresentaram em seus espectros o sinal diagnóstico da 16-hidroxitabersonina, indicando que o processo de extração e preparo de amostras apresentou baixa seletividade para esta substância. No cromatograma EIC do extrato de flores (Figura 2.9 (A), p. 61), foi observada uma banda com $t_R = 9,3$ min cujo espectro de massas apresentou sinais que não foram compatíveis com nenhuma substância relatada na literatura. Sua massa molecular par, indica a ausência de átomos de N ou a presença de número par de átomos desse elemento. A perda neutra de 17 Da, resultado da formação do íon em m/z 336, corresponde a uma molécula de amônia, o que confirma, portanto, a presença de pelo

menos dois átomos de N nessa substância. Mesmo com as demais informações contidas nesse espectro não foi possível realizar a elucidação estrutural dessa substância.

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.

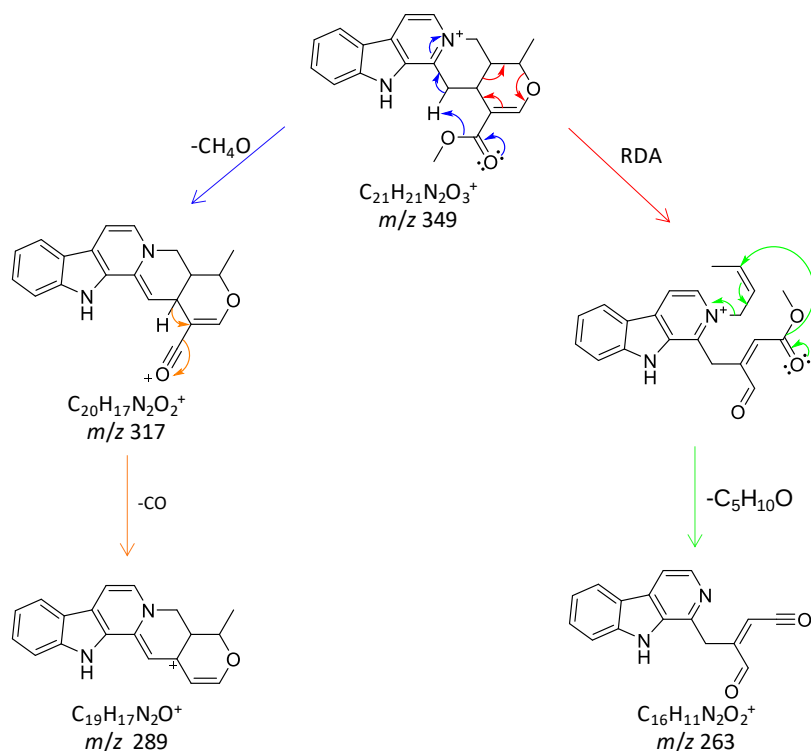


Após sua formação, ajmalicina e tetraidroalstonina são convertidas respectivamente a serpentina e alstonina que constituem outro par de epímeros acumulados em *Catharanthus roseus*. No caso dessas substâncias, os dados das tabelas 2.1 (p. 53) e 2.2 (p. 54) mostram uma completa correlação entre os padrões de fragmentação obtidos por TSI-MS/MS e os dados reportados na literatura, os quais descrevem a formação de íons produto em m/z 317, 289 e 263. Essas observações estão de acordo com o mecanismo de fragmentação proposto na figura 2.10 (p. 62), que pode seguir duas vias diferentes. Em uma delas (setas azuis), uma reação de remoção de hidrogênio β acompanhada da perda neutra de CH_4O resulta no íon produto de m/z 317. Essa reação é acompanhada por uma perda de CO que ocorre como consequência de uma reação de deslocamento assistida por rearranjo de hidreto, responsável por gerar o íon produto com m/z 289. A outra via de fragmentação

envolve uma reação de retro-Diels-Alder, indicada pelas setas vermelhas, responsável pela abertura do anel diidropirânico que na sequência forma um íon acílio com m/z 263 por um rearranjo seguido da perda neutra de $C_5H_{10}O$.

O cálculo da razão m/z do íon $[M]^+$ correspondente aos alcaloides serpentina e alstonina forneceu o valor de 349,1547 e o experimento de DI-ESI-QqTOF-MS resultou em m/z 349,1543 (erro: 0,95 ppm) e 349,1545 (erro: 0,55 ppm) para os extratos de folhas e flores, respectivamente. Esse resultado confirma, portanto, a fórmula iônica ($C_{21}H_{21}N_2O_3^+$) das substâncias em questão, já que foram obtidos erros inferiores a 5,0 ppm.

Figura 2.10 Mecanismo de fragmentação dos íons $[M]^+$ correspondentes ao par de epímeros serpentina/alstonina.

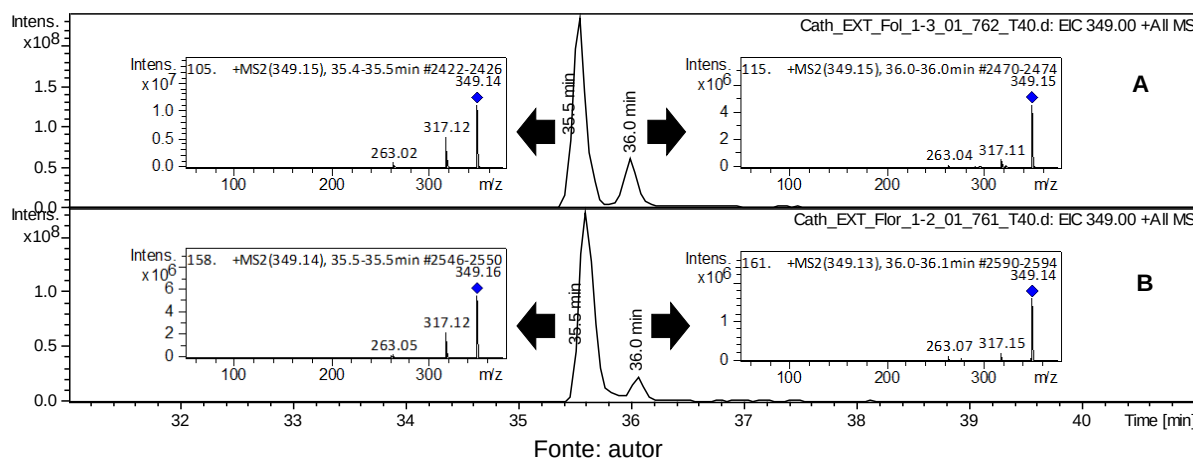


Fonte: autor

Não foi possível confirmar a presença de ambos os epímeros, serpentina e alstonina, em folhas e flores por TSI-MS/MS, particularmente devido à equivalência de seus espectros de MS^2 . Por esse motivo, os dados de LC-MS/MS dos extratos de folhas e flores foram explorados com a finalidade de realizar uma busca por esses metabólitos. A figura 2.11 (p. 63) mostra os cromatogramas EIC com m/z 349 e os espectros sequenciais de MS^2 correspondentes a cada banda cromatográfica. Os

tempos de retenção (t_R) de cada substância eluída foram 35,5 e 36,0 min. Comparando esses dados com a ordem de eluição reportada na literatura,²² foi possível atribuir a banda com $t_R = 35,5$ min à serpentina e a banda com $t_R = 36,0$ min à alstonina. Com base nesses resultados foi possível concluir que o sinal em m/z 349 detectado por TSI-MS/MS corresponde a ambos os epímeros.

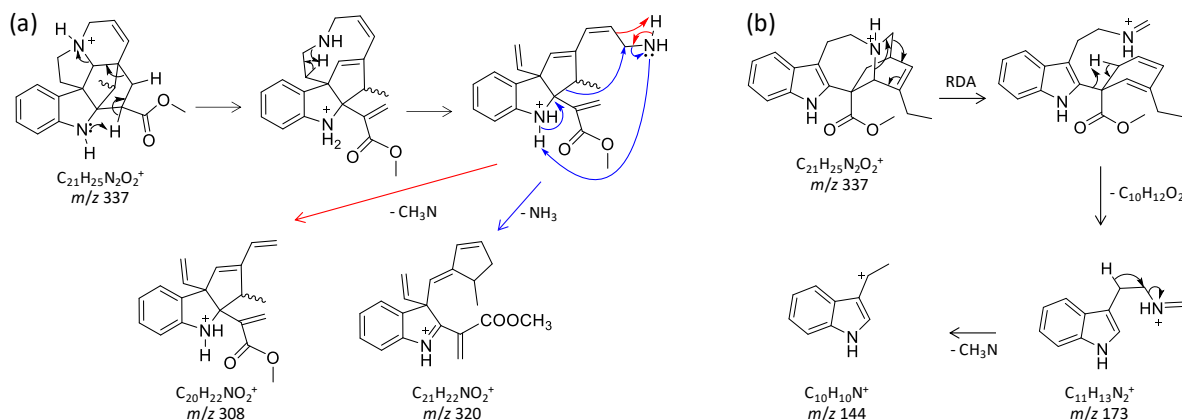
Figura 2.11 Cromatogramas EIC (m/z 349), obtidos por HPLC-MS/MS a partir da análise dos extratos metanólicos de folhas (A) e flores (B) acompanhados dos espectros de MS/MS de cada banda cromatográfica.



As próximas etapas na via biossintética dos AITs compreendem a produção dos alcaloides vindolinina e seu epímero 19-S-vindolinina, catarantina, desmetoxivindolina e vindolina a partir do precursor desidroseocodina. Três das substâncias envolvidas nessa via, a citar vindolinina, catarantina e tabersonina são isômeros constitucionais e, portanto, seus íons $[M+H]^+$ apresentam a mesma razão m/z , cujo valor é 337. No entanto, seus padrões de fragmentação são diferentes o que as torna distinguíveis em experimentos sequenciais de MS/MS. Nos experimentos de TSI-MS/MS o isolamento e fragmentação dos íons com m/z 337 resultaram nos sinais em m/z 320, 173 e 144. Na tabela 2.3 (p. 56), o experimento DI-ESI-QqTOF-MS forneceu m/z 337,19105 e 337,19101 para os extratos metanólicos de folhas e flores, respectivamente. Esses valores são compatíveis com a fórmula iônica correspondente a estes compostos, $C_{21}H_{25}N_2O_2^+$, apresentando erros de 0,02 ppm para a razão m/z obtida no extrato de folhas e 0,13 ppm, no extrato de flores. O padrão de fragmentação observado indica a presença do par de epímeros vindolinina/19-S-vindolinina, e da catarantina, que apresentam sinais diagnósticos em m/z 320 e 173, respectivamente. O sinal diagnóstico da tabersonina com m/z 305²² não foi encontrado e sua presença,

portanto, não pôde ser atestada. Os mecanismos de fragmentação propostos para os íons $[M+H]^+$ correspondentes a vindolinina /19-S-vindolinina e catarantina estão representados na figura 2.12.

Figura 2.12 Mecanismo de fragmentação dos íons $[M+H]^+$ gerados a partir da vindolinina (A) e da catarantina (B).



Fonte: autor

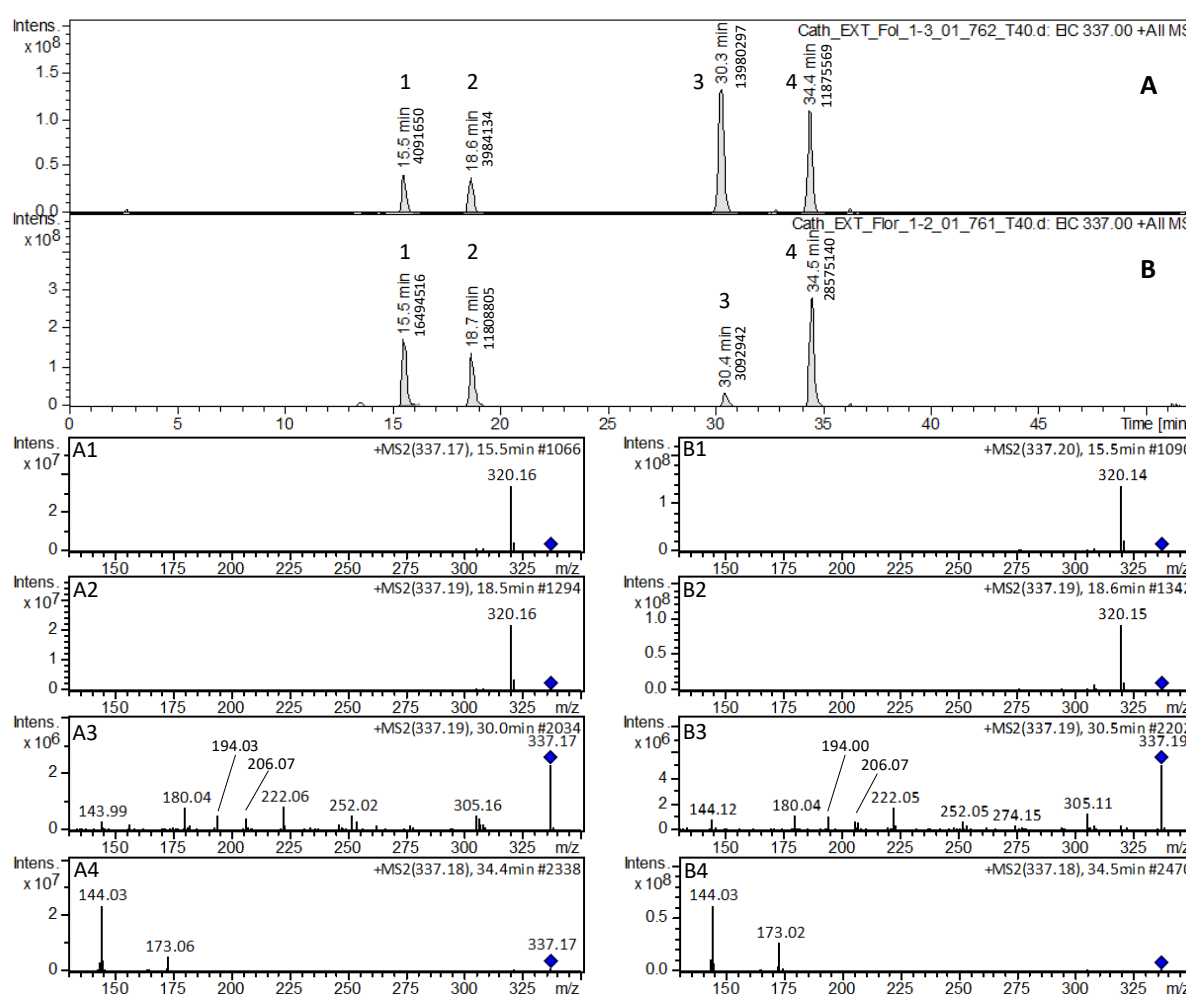
O mecanismo de fragmentação proposto para o par vindolinina/19-S-vindolinina, representado na figura 2.12 (a), envolve uma sequência de duas reações que são responsáveis pela diminuição da tensão do sistema biciclo [2,2,1] heptano. Na primeira reação, uma remoção de hidrogênio β pelo átomo de nitrogênio do grupo diidroindol causa a abertura de um dos anéis que compõe esse sistema. Posteriormente, um rearranjo de hidrogênio remoto resulta na formação de uma amina primária. A partir desse íon intermediário, duas vias de fragmentação podem ser derivadas. Em uma delas, representada pelas setas azuis, ocorre uma reação de ciclização que se inicia com a captura de um dos prótons ligados ao nitrogênio do grupo diidroindol pelo par de elétrons do nitrogênio da amina primária. Posteriormente, um rearranjo das ligações promove, nessa espécie iônica, uma reação de deslocamento que resulta em perda neutra de NH_3 com a consequente formação do íon produto em m/z 320. A outra via, indicada por setas vermelhas, consiste em um rearranjo de hidrogênio remoto que gera o íon produto em m/z 308, acompanhado de uma perda neutra de CH_3N .

No caso do mecanismo de fragmentação dos íons $[M+H]^+$ correspondentes à catarantina, representado na figura 12 (b), a etapa inicial corresponde a uma reação de retro-Diels-Alder, seguida por um rearranjo de hidrogênio remoto, resultando em uma perda neutra de $C_{10}H_{12}O_2$ e no íon produto com m/z 173. Na etapa seguinte

ocorre uma eliminação de CH_3N , auxiliada por um rearranjo de hidreto, que gera o íon produto em m/z 144.

Para confirmar a presença de ambos os epímeros da vindolinina, recorreu-se aos dados obtidos por HPLC-ESI-IT-MS/MS. Nos cromatogramas de íon extraído para m/z 337, foi possível observar quatro bandas cromatográficas principais em t_R 15,5, 18,7, 30,4 e 34,5 min, como demonstrado pela figura 2.13.

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.



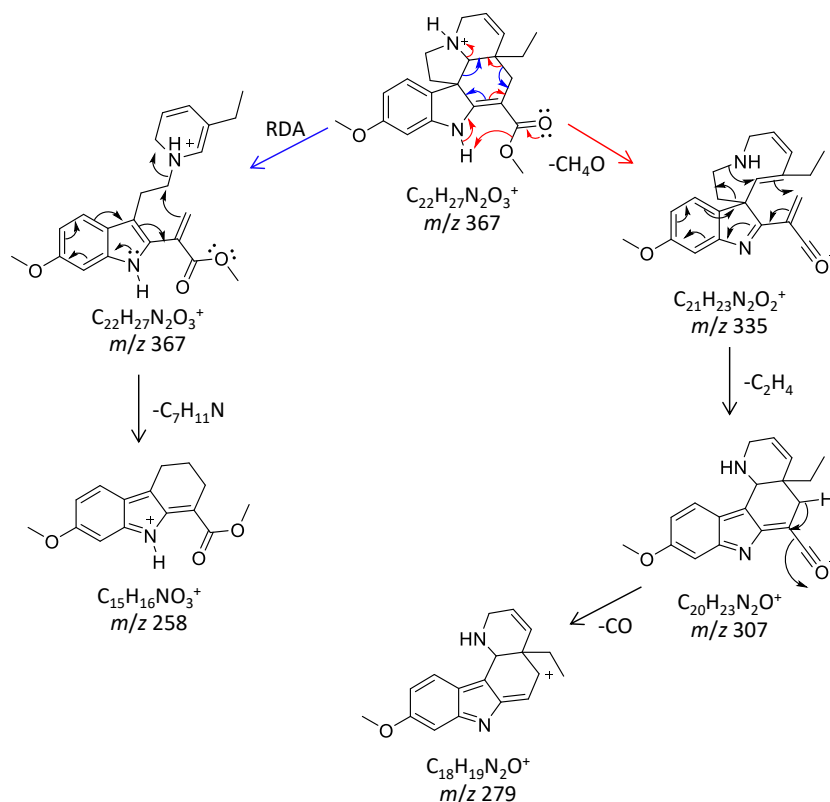
Fonte: autor

As substâncias eluídas em t_R 15,5 e 18,7 min exibiram espectros de MS/MS idênticos, que apresentaram pico base em m/z 320 e um sinal de baixa intensidade em m/z 308. Esse padrão de fragmentação foi compatível com os relatados para vindolinina e 19-S-vindolinina e estavam de acordo com o mecanismo de fragmentação proposto para essas substâncias. A ordem de eluição desse par de

epímeros em fase reversa (C18), relatada na literatura, indica que $t_{R(19-S-vindolinina)} > t_{R(vindolinina)}$.²² Portanto, foi possível concluir que ambas as substâncias foram detectadas no experimento TSI-MS/MS em folhas e flores. A banda cromatográfica eluída em $t_R = 30,4$ min (Figura 2.13, p. 65) exibiu íons produto em m/z 305, 252, 222, 206, 194, 180 e 144. Alguns desses sinais também estavam presentes no espectro de TSI-MS/MS das folhas, embora suas intensidades tenham sido extremamente baixas (apêndice A, p. 155). Infelizmente, esse padrão de fragmentação não correspondeu a nenhum outro relatado na literatura consultada, o que impossibilitou sua atribuição. No cromatograma das folhas, a banda correspondente a essa substância apresentou maior área em comparação com seus isômeros. Embora esse isômero também tenha sido detectado no extrato de flores, a área de sua banda cromatográfica foi notavelmente baixa em comparação com a área obtida na análise de HPLC-MS/MS do extrato de folhas. Esse fato explica a ocorrência dos íons produtos em m/z 252, 222, 194 e 180 apenas no espectro TSI-MS/MS das folhas. Ainda na figura 2.13, a substância eluída em $t_R = 34,5$ min exibiu íons produto em m/z 173 e 144 (Figura 2.13 - A4 e B4, p. 65), compatíveis com os sinais relatados para a catarantina.

Um dos produtos intermediários da conversão da tabersonina a vindolina é a 16-metoxitabersonina. Esse metabólito foi detectado nas folhas e flores de *Catharanthus roseus* e o mecanismo de fragmentação de seu íon $[M+H]^+$ está representado na figura 2.14 (p. 67). Nesse mecanismo, duas vias de fragmentação podem ser apontadas. Em uma delas, representada por setas azuis, ocorre uma reação de retro-Diels-Alder, seguida de um rearranjo de ligações que resulta no deslocamento de uma perda neutra de $C_7H_{11}N$ e no íon produto com m/z 258. A outra via, representada com setas vermelhas, consiste em uma reação de remoção de hidrogênio β que gera o íon acílio em m/z 335. Posteriormente, uma reação de ciclização resulta no íon produto com m/z 307 e na perda neutra de C_2H_4 . Finalmente, ocorre uma reação de deslocamento assistida por hidreto que é responsável pela formação da perda neutra de CO e do íon produto com m/z 279, que apresenta elevada estabilidade devido à deslocalização da carga. Embora não tenha sido possível confirmar a fórmula do íon $[M+H]^+$ correspondente à 16-metoxitabersonina pelo experimento de DI-ESI-QqTOF-MS, uma vez que não foi possível detectá-lo, o mecanismo de fragmentação foi suficiente para atribuir sua estrutura.

Figura 2.14 Mecanismo de fragmentação dos íons $[M+H]^+$ gerados a partir da 16-metoxitabersonina.

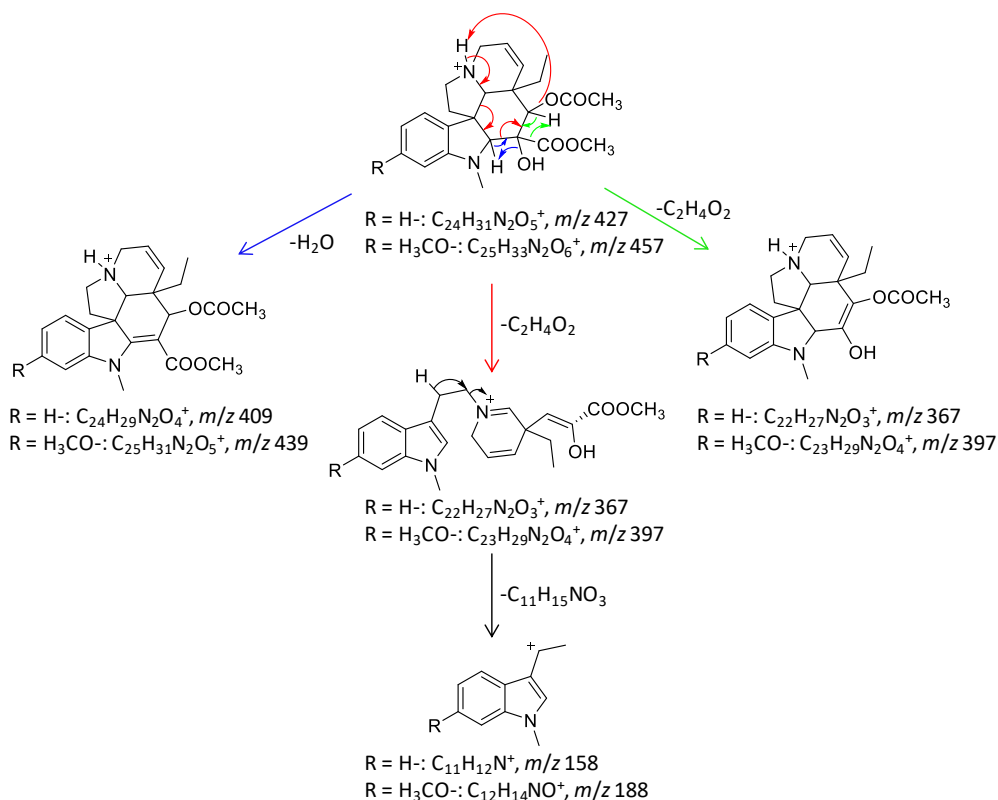


Fonte: autor

Os experimentos de TSI-MS/MS também proporcionaram a detecção da vindolina, m/z 457, e seu derivado desmetoxilado, a desmetoxivindolina, m/z 427. As razões m/z calculadas para o íon $[M+H]^+$ desses metabólitos foram respectivamente, 457,2333 e 427,2227. Nos experimentos de DI-ESI-QqTOF-MS, o íon $[M+H]^+$ correspondente à vindolina apresentou m/z 457,2331 (erro: 0,4 ppm) no extrato de folhas e 457,2333 (erro: 0,06 ppm) no extrato das flores. Ainda nesses experimentos, o íon $[M+H]^+$ proveniente da protonação da desmetoxivindolina foi detectado em m/z 427,2220 (erro: 1,84 ppm) no extrato de folhas e em 427,2216 (erro: 2,64 ppm) no extrato de flores. Esses resultados estão de acordo com as fórmulas dos íons $[M+H]^+$ propostas para vindolina, $C_{25}H_{33}N_2O_6^+$ e desmetoxivindolina, $C_{24}H_{31}N_2O_5^+$, já que apresentaram erro menor que 5,0 ppm. Para essas substâncias, os padrões de fragmentação obtidos no experimento TSI-MS/MS foram suficientes para garantir sua detecção, uma vez que houve uma completa similaridade dos espectros experimentais com aqueles relatados na literatura. Esses padrões de dissociação foram consistentes com o mecanismo de fragmentação proposto, representado na figura 2.15 (p. 68). As mesmas perdas neutras foram observadas nos espectros de

MS/MS de ambas as substâncias, o que já era esperado dada a semelhança estrutural entre elas. A fragmentação dos íons $[M+H]^+$, em ambos os casos, pode seguir uma de três possíveis vias. Uma delas, representada por setas azuis, envolve um rearranjo de hidrogênio remoto, que resulta em perda neutra de água, levando à formação de íons produto com m/z 409 para a desmetoxivindolina e m/z 439 para a vindolina. Na segunda via, indicada com setas vermelhas, ocorre um rearranjo de hidrogênio remoto, que gera a perda neutra de $C_2H_4O_2$, e os íons produto intermediários com m/z 397 para a vindolina, e m/z 367 para a desmetoxivindolina. Posteriormente, nessa mesma via, ocorre uma reação de deslocamento assistida por um rearranjo de hidreto, que dá origem a uma perda neutra de $C_{11}H_{15}NO_3$ e aos íons produto com m/z 158 para desmetoxivindolina e 188 para vindolina. A terceira via, representada por setas verdes, corresponde a um outro rearranjo de hidrogênio remoto, que resulta na formação da perda neutra de $C_2H_4O_2$ e dos íons com m/z 367 e 397 para a desmetoxivindolina e vindolina, respectivamente.

Figura 2.15 Mecanismo de fragmentação dos íons $[M+H]^+$ gerados a partir dos metabólitos vindolina e desmetoxivindolina.



Fonte: autor

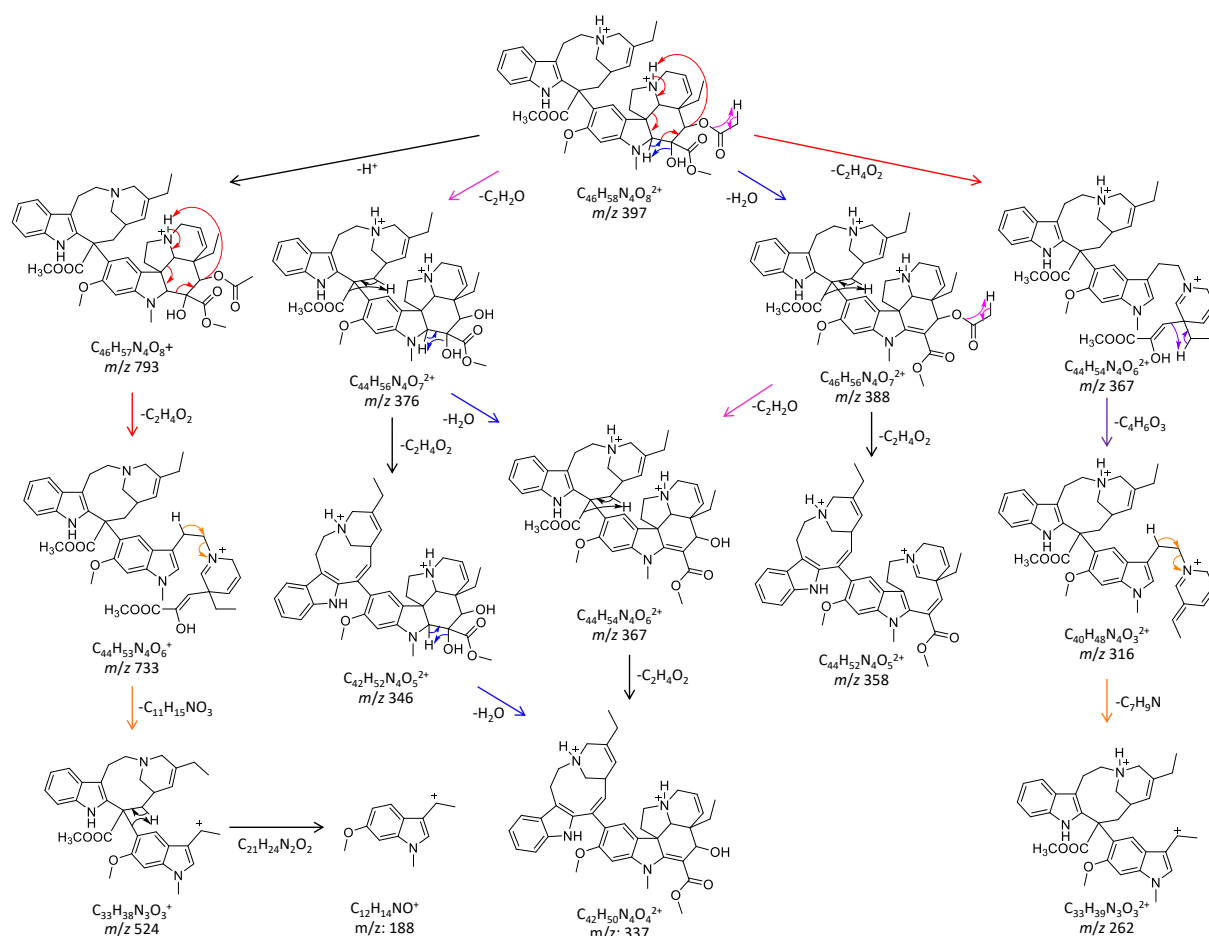
Com relação aos alcaloides bisindólicos produzidos por *Catharanthus roseus*, o experimento de TSI-MS/MS possibilitou a detecção da 3,4-anidrovinblastina e vinblastina. Nas flores, ambos os metabólitos foram detectados, enquanto nas folhas, detectou-se apenas o primeiro. Os sinais mais abundantes relacionados a esses metabólitos foram atribuídos à molécula duplamente protonada, $[M+2H]^{2+}$, que apresentou m/z 397 e 406 para 3,4-anidrovinblastina e vinblastina, respectivamente. Somente nas flores foi possível detectar o íon monocarregado $[M+H]^+$ da 3,4-anidrovinblastina. O mecanismo de fragmentação do íon $[M+2H]^{2+}$ correspondente à 3,4-anidrovinblastina encontra-se representado na figura 2.16 (p. 70). No espectro TSI-MS/MS, foi possível observar um sinal em m/z 524. A ocorrência desse sinal somente faz sentido se uma desprotonação do íon duplamente carregado $[M + 2H]^{2+}$ ocorrer durante o processo de CID. Partindo dessa premissa, a molécula protonada resultante, com m/z 793, passa por um rearranjo de hidrogênio remoto (setas vermelhas) que ocasiona a formação da perda neutra de $C_2H_4O_2$, e do íon produto em m/z 733. Posteriormente, uma reação de deslocamento assistida por hidreto gera o íon produto com m/z 524, citado acima, acompanhado de uma perda neutra de $C_{11}H_{15}NO_3$. A próxima etapa consiste em um rearranjo de hidrogênio remoto que resulta no íon produto com m/z 188 e na perda neutra de $C_{21}H_{24}N_2O_2$. Embora essas etapas do mecanismo corroborem a formação dos íons produto detectados em m/z 524 e 188, os íons intermediários com m/z 733 e 793 não foram encontrados no espectro TSI-MS/MS. Essa observação pode ser explicada pela baixa intensidade do sinal com m/z 524 o que indica que a desprotonação do íon $[M+2H]^{2+}$ durante o experimento de CID ocorre com um baixo rendimento e, consequentemente, a maior parte do conjunto dos íons precursores permanece na forma de íons duplamente carregados. Dessa maneira, a população de íons produto com m/z 733 e 793 tende a ser muito pequena, ou até mesmo, indetectável.

As próximas duas vias de fragmentação partem da espécie iônica $[M+2H]^{2+}$ e envolvem rearranjos de hidrogênios remotos acompanhados pela formação de perdas neutras de C_2H_2O (setas de cor magenta) e H_2O (setas azuis), que resultam em íons produtos com m/z 376 e 388, respectivamente. Essas dissociações ocorrem em uma sequência paralela e alternada dando origem a um íon produto em comum, com m/z 367, o qual sofre outro rearranjo de hidrogênio, gerando o íon produto com m/z 337 e a perda neutra de $C_2H_4O_2$. Essa mesma reação pode ocorrer diretamente a partir dos

íons produto intermediários com m/z 376 e 388, o que resulta nos íons observados em m/z 346 e 358. Uma outra perda neutra de H_2O , decorrente de um rearranjo hidrogênio remoto, pode explicar a conversão dos íons com m/z 346 em íons produto com m/z 337.

A última via de fragmentação do íon precursor (setas vermelhas) começa com um rearranjo de hidrogênio que gera o íon produto em m/z 367, acompanhado da liberação da perda neutra de $C_2H_4O_2$. Posteriormente, o íon produto gerado sofre outro rearranjo de hidrogênio (setas roxas), levando a uma perda neutra de $C_4H_6O_3$ e ao íon produto com m/z 316, no qual ocorre um deslocamento assistido por rearranjo de hidreto (setas laranjas), responsável pela formação do íon produto em m/z 262 com uma consequente perda neutra de C_7H_9N .

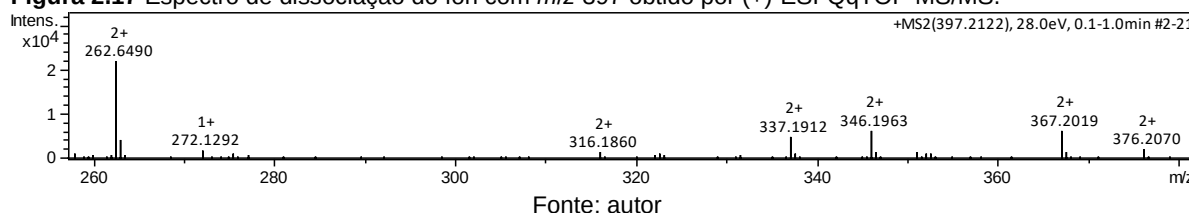
Figura 2.16 Mecanismo de fragmentação dos íons $[M+2H]^{2+}$ gerados a partir da 3,4-anidrovinblastina.



Fonte: autor

Para confirmar o estado de dupla carga dos íons produto apresentados no mecanismo de fragmentação proposto na figura 2.16 (p. 70), foi realizado um experimento de MS/MS em alta resolução no qual os íons com m/z 397 foram dissociados por CID. O espectro obtido encontra-se na figura 2.17 e corrobora o mecanismo proposto, uma vez que confirma o estado de carga dos sinais observados, obtido pelo processamento dos dados por deconvolução de cargas.

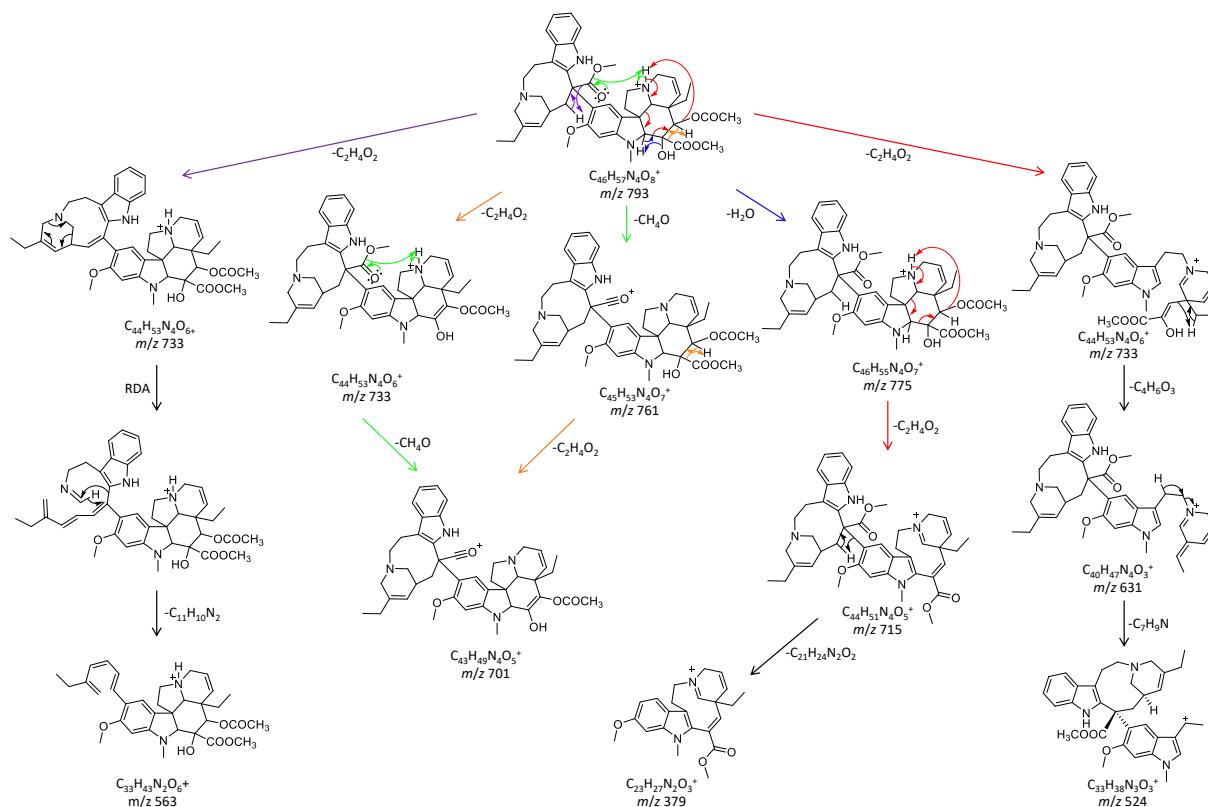
Figura 2.17 Espectro de dissociação do íon com m/z 397 obtido por (+)-ESI-QqTOF-MS/MS.



A 3,4-anidrovinblastina também foi detectada em sua forma monocarregada. Com o padrão de fragmentação obtido a partir da dissociação dos íons $[M+H]^+$, foi possível propor o mecanismo de fragmentação mostrado na figura 2.18 (p. 72). Nesse mecanismo, o íon precursor pode seguir uma das cinco vias representadas em cores diferentes.

A primeira via (setas roxas), corresponde a um rearranjo de hidrogênio remoto, que resulta no íon produto com m/z 733 e na perda neutra de $C_2H_4O_2$. Essa fragmentação é seguida por uma reação de retro-Diels-Alder, responsável pela abertura no anel diidropiperidínico pertencente à porção que corresponde à catarantina. Posteriormente, um rearranjo de hidrogênio seguido de uma reação de ciclização forma o íon produto com m/z 563 e uma perda neutra de $C_{11}H_{10}N_2$.

O íon produto com m/z 701 pode ser gerado por duas vias distintas que envolvem duas reações consecutivas. Uma delas corresponde a um rearranjo de hidrogênio remoto (setas laranja) que resulta na perda neutra de $C_2H_4O_2$. A segunda via (setas verdes), consiste em uma migração de hidrogênio a partir do nitrogênio que constitui o sítio de protonação, pertencente à porção que corresponde à vindolina, para a função éster pertencente à porção que corresponde a catarantina, acarretando em perda neutra de CH_4O . Essas duas reações podem ocorrer simultaneamente e de forma alternada a partir do íon precursor, o que explica a formação dos íons produto com m/z 733 e 761.

Figura 2.18 Mecanismo de fragmentação dos íons $[M+H]^+$ gerados a partir da 3,4-anidrovinblastina.

Fonte: autor

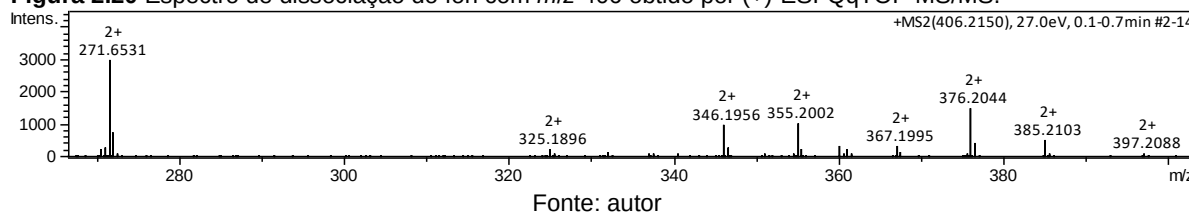
A próxima via engloba uma sequência de rearranjos de hidrogênio remoto, que se inicia com uma perda neutra de H_2O (setas azuis), resultando no íon produto em m/z 775, seguida de uma perda neutra de $C_2H_4O_2$ (setas vermelhas) que dá origem ao íon com m/z 715. Na sequência, ocorre formação do íon produto em m/z 379, com perda neutra de $C_{21}H_{24}N_2O_2$.

A última via de fragmentação começa com um rearranjo de hidrogênio remoto (setas vermelhas), que leva à formação do íon produto com m/z 733, acompanhada da liberação de uma perda neutra de $C_2H_4O_2$. Essa reação é seguida por outra perda neutra de $C_4H_6O_3$ formada por um rearranjo de hidrogênio remoto (setas pretas) que resulta no íon produto com m/z 631. Esse íon, por sua vez, sofre uma reação de deslocamento assistida por migração de hidreto, responsável pela formação do íon produto com m/z 524 e de uma perda neutra de C_7H_9N .

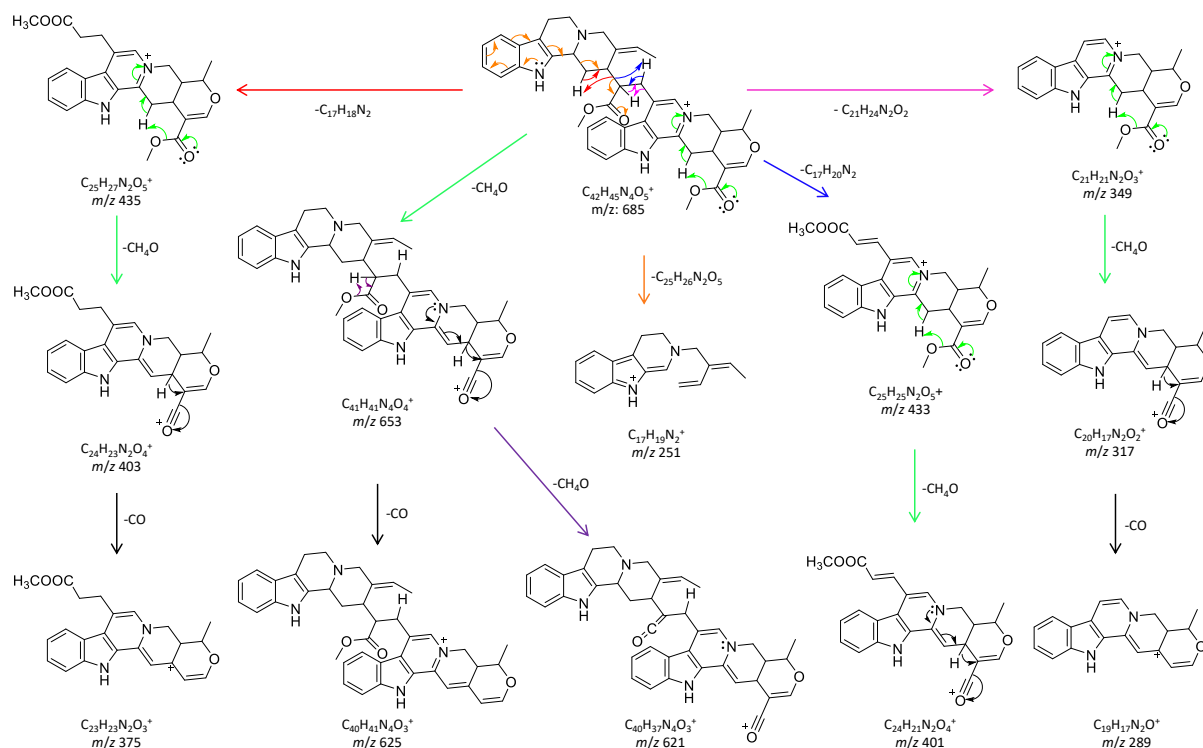
Considerando ainda a classe dos alcaloides bisindólicos, o experimento de TSI-MS/MS também proporcionou a detecção da vinblastina nas flores de *Catharanthus roseus*. No caso dessa substância, apenas íons duplamente carregados, $[M+2H]^{2+}$,

Novamente, a confirmação do estado de carga dos íons produto detectados no experimento de TSI-MS/MS foi realizada pelo experimento de DI-ESI-QqTOF-MS/MS do extrato das flores. No espectro adquirido (Figura 2.20), foi possível verificar os fragmentos duplamente carregados, obtidos pelo processamento de deconvolução de cargas.

Figura 2.20 Espectro de dissociação do íon com m/z 406 obtido por (+)-ESI-QqTOF-MS/MS.



Além das substâncias relacionadas acima, esse trabalho possibilitou ainda, a detecção da serpentinina nas flores de *Catharanthus roseus*. Esse metabólito pertence à classe dos alcaloides bisindólicos terpenoídicos e é comumente encontrado em raízes de plantas da espécie *Rauwolfia serpentina*.³⁶ Cabe ressaltar que não há relatos dessa substância em flores *Catharanthus roseus*, o que torna esse trabalho pioneiro nesse aspecto. No experimento de TSI-MS/MS, a molécula protonada foi encontrada em m/z 685, e o espectro de MS² gerou sinais de fragmentos em m/z 653, 621, 435, 433, 403, 375, 349 e 251, descritos na tabela 2.2 (p. 54). A massa exata calculada para o íon $[M+H]^+$ da serpentinina é 653,3384. Na análise do extrato metanólico das flores pelo experimento de DI-ESI-QqTOF-MS, foi observado um sinal em m/z 653.3382, que confirma a fórmula desse íon com um erro de 0,29 ppm. A partir dos sinais obtidos no experimento TSI-MS/MS, foi possível propor o mecanismo de fragmentação representado na figura 2.21 (p. 75). A partir do íon precursor, cinco vias de fragmentação podem ser derivadas. Em uma delas, um rearranjo de hidrogênio remoto, representado por setas vermelhas, resulta no íon produto com m/z 435 e em uma perda neutra correspondente a $C_{17}H_{18}N_2$. Essa fragmentação é seguida por uma reação de remoção de hidrogênio β (setas verdes), acompanhada pela formação de perda neutra de CH_4O , que resulta no íon produto com m/z 403. Posteriormente, ocorre uma reação de deslocamento assistido por rearranjo de hidreto (setas pretas), liberando a perda neutra de CO e gerando o íon produto com m/z 375.

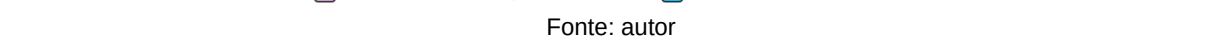
Figura 2.21 Mecanismo de fragmentação dos íons $[M]^+$ correspondentes à serpentinina.


Fonte: autor

A segunda via tem início com a reação de remoção de hidrogênio β (setas verdes) já discutida anteriormente, que resulta no íon produto em m/z 653. Esse íon passa por duas dissociações paralelas: uma reação de deslocamento assistida por rearranjo de hidreto (setas pretas), que leva à formação do íon produto com m/z 625 e perda neutra de CO, e um rearranjo de hidrogênio remoto (setas roxas) responsável por gerar o íon produto com m/z 621 e a perda neutra de CH_4O . A partir do íon precursor, a fragmentação representada pelas setas laranjas, é responsável por gerar o íon produto com m/z 251 e liberar uma espécie zwitteriônica com a fórmula molecular $C_{25}H_{26}N_2O_5$.

A via descrita pelas setas azuis corresponde a um rearranjo de hidrogênio remoto que resulta no íon produto com m/z 433 acompanhado pela formação de uma perda neutra de $C_{17}H_{20}N_2$. Em seguida, uma reação de remoção de hidrogênio β (setas verdes) gera o íon produto com m/z 401.

A última via tem início com um rearranjo de hidrogênio remoto (setas de cor magenta) que converte o íon precursor no íon produto com m/z 349 e libera a perda neutra de $C_{21}H_{24}N_2O_2$. Posteriormente, uma reação de remoção de hidrogênio β (setas verdes) é responsável por gerar o íon produto com m/z 317, que por sua vez

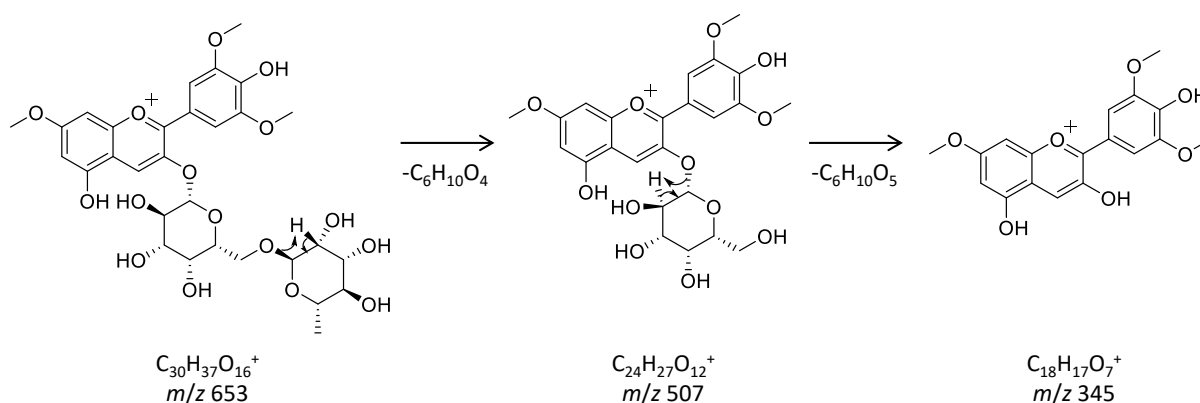


76

galactopiranosídeo, uma substância da classe das antocianinas, previamente relatada na variedade lavanda equatorial da espécie *Catharanthus roseus*.⁴⁸

O íon $[M]^+$ correspondente à hirsutidina 3-O-[6-O-(α -ramnopiranosil)- β -galactopiranosídeo] exibiu m/z 653, e sua fragmentação resultou nos sinais em m/z 507 e 345. A massa exata calculada para esse íon foi 653,2076, enquanto a análise do extrato de flores por DI-ESI-QqTOF-MS forneceu o valor de m/z 653.2078. Esse resultado confirmou a fórmula do íon $[M]^+$ dessa substância com base no baixo erro apresentado pela medida (0,36 ppm). O mecanismo de fragmentação desses íons encontra-se representado na figura 2.23 e consiste em uma sequência de dois rearranjos de hidrogênio remoto. Em um primeiro momento, a porção correspondente à ramnose é perdida, resultando no íon produto com m/z 507. A partir desse íon, ocorre uma perda da porção correspondente à galactose que resulta no íon produto correspondente à antocianidina em m/z 345.

Figura 2.23 Mecanismo de fragmentação dos íons $[M]^+$ correspondentes a hirsutidina 3-O-[6-O-(α -ramnopiranosil)- β -galactopiranosídeo].

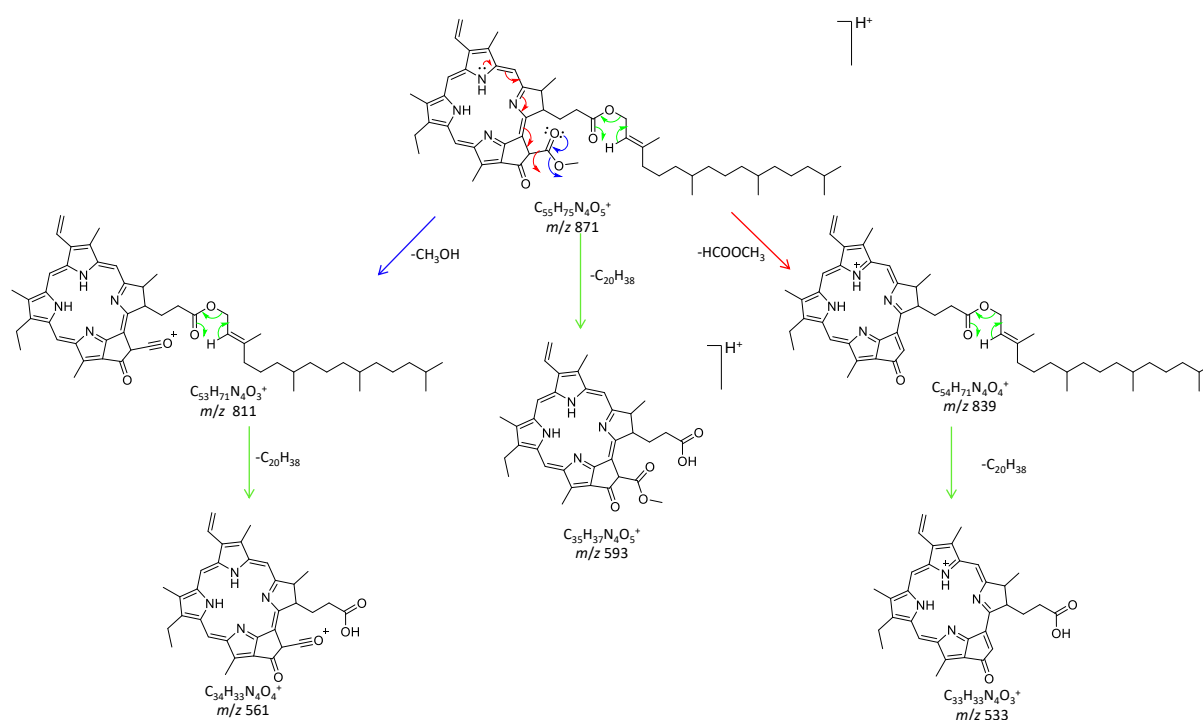


Fonte: autor

O íon $[M+H]^+$ da feofitina-a foi detectado em m/z 871 e sua fragmentação forneceu sinais em m/z 839, 811, 593, 561 e 533. Na análise do extrato de folhas por DI-ESI-QqTOF, um sinal em m/z 871.5732 foi observado. A massa exata calculada para a feofitina-a em seu estado protonado resultou no valor de m/z 871,5729. A comparação entre os valores experimental e calculado forneceu em um erro de 0,38 ppm, o que corrobora a detecção dessa substância. O mecanismo de fragmentação da feofitina-a encontra-se representado na figura 2.24 (p. 78). Três vias principais são responsáveis pela formação dos cinco íons produto detectados. Na primeira via, descrita com setas azuis, a perda de CH_4O ocorre por uma reação de remoção de

hidrogênio β resultando na formação do íon produto em m/z 811, a partir do qual um rearranjo de McLafferty (setas verdes) é responsável gerar a perda neutra de $C_{20}H_{38}$ e o íon produto com m/z 561. Na segunda via, o íon produto com m/z 593 é formado diretamente a partir do íon precursor pelo mesmo rearranjo de McLafferty discutido anteriormente. A terceira via engloba um rearranjo de hidrogênio (setas vermelhas) que dá origem ao íon produto com m/z 839 e à perda neutra de $C_2H_4O_2$. Posteriormente, ocorre um rearranjo de McLafferty, que resulta no sinal em m/z 533.

Figura 2.24 Mecanismo de fragmentação dos íons $[M+H]^+$ gerados a partir da feofitina-a.



Fonte: autor

A detecção de substâncias específicas em cada tecido, mostra a capacidade da técnica de TSI-MS/MS em proporcionar a diferenciação química de diferentes tecidos oriundos do mesmo organismo. Essa característica é de grande importância quando são consideradas aplicações nas quais o objetivo é promover uma comparação do metabolismo de um ser vivo em diferentes órgãos.

2.5 CONCLUSÃO

Neste trabalho, a técnica de TSI-MS/MS foi aplicada no mapeamento da via biossintética dos AITs em flores e folhas de *Catharanthus roseus*. Essa técnica possibilitou a detecção das principais substâncias produzidas por essa espécie, dentre as quais, strictosidina, ajmalicina, serpentina, alstonina, catarantina e vindolina. Além disso, os alcaloides bisindólicos 3,4-anidrovinblastina e vimblastina, produtos finais dessa via, também foram detectados. A serpentinina, comumente encontrada nas raízes das espécies *Raulwolfia serpentina*, foi surpreendentemente detectada pela primeira vez em flores de *Catharanthus roseus* através das análises desses órgãos por TSI-MS/MS. Substâncias pigmentares específicas de cada tecido, a citar feofitina-a e a Hirsutidina 3-O-[6-O-(α -ramnopiranosil)- β -galactopiranosídeo], também foram detectadas nas folhas e flores, respectivamente, o que possibilitou a diferenciação química de cada um. O baixo consumo de solvente, a simplicidade do preparo das amostras e a rapidez das análises mostraram que essa técnica é extremamente vantajosa para triagens e análises qualitativas quando comparada às técnicas espectroscópicas e cromatográficas convencionais. Além disso, os experimentos de TSI-MS/MS forneceram informações estruturais em poucos minutos, sem a introdução de interferentes em virtude do uso de extensos protocolos de extração e preparo de amostras.

2.6 REFERÊNCIAS

- 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.

Capítulo 03

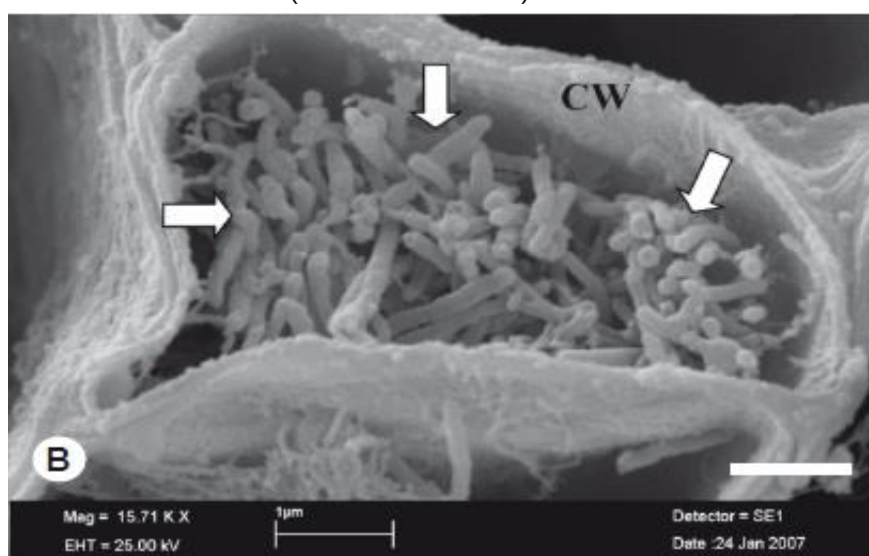
Aplicação da TSI-MS no Estudo das Variações Metabólicas em *Citrus sinensis* Var. Valência Infectadas com *Candidatus Liberibacter asiaticus*.

3.1 INTRODUÇÃO

O Huanglongbing (HLB), também conhecido como *greening*, é a mais devastadora doença que acomete plantas do gênero *Citrus*, sendo também considerada uma das mais complexas, já que envolve interações ecológicas entre hospedeiros, vetores e patógeno.^{1; 2} Essa enfermidade é causada por três espécies de (α)-proteobactérias gram-negativas pertencentes à ordem Rhizobiales, família Rhizobiaceae, gênero *Candidatus Liberibacter* (Figura 3.1): *Candidatus Liberibacter asiaticus*; *Candidatus Liberibacter africanus*; e *Candidatus Liberibacter americanus*.³⁻

5

Figura 3.1 Colônia de bactérias *Candidatus Liberibacter americanus* habitando vasos de floema de vinca (*Catharanthus roseus*).

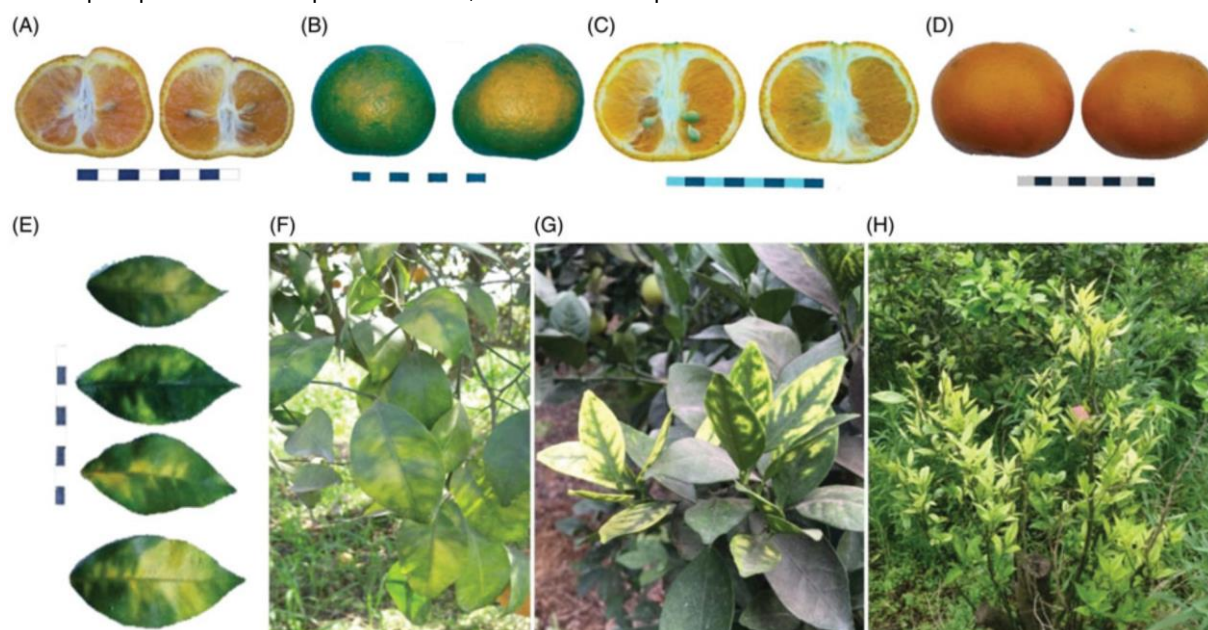


Fonte: ref [7]

As bactérias desse gênero alojam-se e se proliferam apenas no interior dos vasos condutores de floema, sendo restritas a esse meio, o que torna extremamente difícil sua cultura *in vitro*.^{6; 7} Como resposta à alta concentração de células de *Candidatus Liberibacter* ao longo dos tubos crivados, a planta promove a deposição de calose nesses vasos, o que ocasiona a restrição da circulação de seiva elaborada. Com isso, os nutrientes contidos no floema não conseguem atingir todas as regiões da planta, que acaba morrendo com o avanço da doença.^{1; 4; 8}

A figura 3.2 mostra os principais sintomas apresentados por plantas infectadas. Dentre eles pode-se citar o aparecimento de ramos com folhas amareladas (clorose), evoluindo para a seca e morte de ponteiros; o surgimento de manchas assimétricas, verde claras ou amareladas nas folhas, sem nítida divisão entre as regiões de cores distintas; o espessamento e o clareamento das nervuras das folhas que passam a apresentar uma aparência corticosa; a ocorrência de frutos que apresentam sementes abortadas, com menores dimensões e coloração escura; produção de frutos com mesocarpo mais espesso em comparação ao de frutos provenientes de plantas saudáveis; queda intensa e precoce dos frutos, que apresentam má formação e geralmente são assimétricos.^{1; 4; 9-14}

Figura 3.2 Sintomas apresentados por plantas infectadas por *Candidatus Liberibacter*. 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.



Fonte: ref. [15]

A transmissão do HLB ocorre principalmente por insetos denominados psílídeos que agem como vetores. Duas espécies, pertencentes à ordem Hemiptera e à família Psyllidae, são comprovadamente transmissoras da doença: o psílídeo asiático de *Citrus*, *Diaphorina citri* (Figura 3.3),^{16; 17} e o psílídeo africano, *Trioza erytrea*.¹⁸ Esses insetos possuem um dispositivo perfurante que os permite alcançar o floema das folhas e caules jovens, sua fonte de alimento.¹⁹ Assim, a transmissão da doença ocorre durante o ataque das plantas saudáveis por psílídeos durante sua alimentação. A alta eficiência de propagação do HLB através desses vetores se deve às características do mecanismo de atração vetor-hospedeiro. Por esse mecanismo, psílídeos adultos isentos da bactéria sentem maior atração por plantas infectadas, ao passo que quando a transportam, são atraídos mais fortemente por plantas não infectadas.²⁰

Figura 3.3 Psílídeo de *Citrus*, *Diaphorina Citri*, vetor da bactéria *Candidatus Liberibacter* e ninfas dessa espécie alimentando-se do floema.



Fonte: ref. [16]

O primeiro relato sobre o HLB se deu em 1919, em um estudo sobre doenças que acometem plantas de interesse econômico na região sudeste da China.²¹ Posteriormente, de 1941 a 1945, o mais extenso trabalho sobre o *greening* foi conduzido pelo pesquisador Dr. Lin Kung Hsiang (1910-1986), que em 1956, concluiu que essa enfermidade não se origina de uma desordem fisiológica, constatando que se trata de uma doença infecciosa transmissível.⁴ O impacto econômico decorrente da incidência de HLB é extremamente preocupante. Nos Estados Unidos da América

(EUA), o HLB causou um decréscimo de 72,2% em sua produção de laranja para processamento considerando-se o período compreendido entre as safras de 2007/2008 a 2017/2018.²² Na Flórida, principal estado produtor de laranja dos EUA, um levantamento realizado entre os anos de 2006 e 2011, aponta que a perda na produção durante este período tenha causado um prejuízo de US\$1,7 bilhão.²³

No Brasil, país que figura como maior produtor de laranja no mundo,²⁴ a principal região produtora, denominada cinturão citrícola, compreende o estado de São Paulo e o sul do estado de Minas Gerais. Nesta região, a safra de 2018/2019 resultou na produção de 285,98 milhões de caixas de 40,8 Kg, ou aproximadamente 11,7 milhões de toneladas do fruto.²⁵ Estima-se que na safra 2019/2020 a produção atinja aproximadamente 15,7 milhões de toneladas.²⁵ No entanto, dados levantados em 2019 apontam que 19% das árvores que compõem os pomares desta região apresentam sintomas da doença, o que pode causar inúmeros prejuízos aos produtores.²⁶

O estudo dessa enfermidade em folhas de plantas do gênero *Citrus* tem sido realizado através da extração dos metabólitos e posterior análise por técnicas convencionais como espectroscopia de ressonância magnética nuclear ou cromatografia gasosa e líquida acoplada à espectrometria de massas.²⁷⁻³² Embora a literatura relate a aplicação da técnica de TSI-MS no estudo de folhas de plantas da espécie *Citrus sinensis*, o foco principal desse trabalho foi a análise de metabólitos de massa molecular acima de 200, sendo relatados como marcadores uma substância da classe dos flavonoides glicosilados (m/z 649) e um dissacarídeo (m/z 381).³³

Neste trabalho, a TSI-MS foi aplicada no estudo metabolômico do *greening* de citrus em plantas da espécie *Citrus sinensis* var. valência, de modo a permitir a avaliação da variação metabólica abrangendo substâncias de baixa massa molecular. Folhas de plantas infectadas sintomáticas (IS) e não infectadas (NI) foram avaliadas em termos das intensidades dos metabólitos detectados nos experimentos. A análise de componentes principais (*principal component analysis* - PCA) mostrou a formação de dois agrupamentos formados pela diferença entre as intensidades das variáveis consideradas para os de indivíduos IS e NI. Estas observações foram validadas utilizando-se a técnica de UPLC-QqTOF-MS^E.

3.2 OBJETIVOS

Este trabalho teve como principal objetivo a aplicação da técnica de TSI-MS na investigação das diferenças metabólicas em folhas de indivíduos da espécie *Citrus sinensis* var. valência infectados sintomáticos (IS) e não infectados (NI) com *Candidatus Liberibacter asiaticus*, causadora do HLB e a utilização da metodologia desenvolvida no diagnóstico dessa doença. Dentro dessa proposta, foram traçados como objetivos específicos:

1. desenvolver um método de análise de folhas de *Citrus sinensis* por TSI-MS;
2. aplicar a metodologia desenvolvida no estudo comparativo de folhas de indivíduos NI e IS;
3. identificar as principais substâncias detectadas por TSI-MS pela análise de espectrometria de massas sequencial de alta resolução;
4. realizar uma análise de componentes principais com os dados obtidos a partir dos experimentos de TSI-MS com a finalidade de encontrar um possível marcador para o HLB;
5. realizar a confirmação dos resultados utilizando a técnica de cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas de alta resolução.

3.3 MATERIAIS E MÉTODOS

Todas as amostras analisadas neste estudo foram gentilmente cedidas pelo Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus), localizado em Araraquara-SP. As amostras de folha foram coletadas de indivíduos não infectados (NI) e infectados sintomáticos (IS) de plantas enxertadas em porta enxerto de citrumelo swingle, mantidas em estufa com condições controladas de irrigação e fertirrigação descritas no apêndice D (p. 158). Todos os indivíduos infectados foram diagnosticados no Laboratório de Pesquisa e Diagnóstico do Fundecitrus, utilizando-se a técnica de PCR quantitativo.

Um tamis com abertura de 250,0 µm e malha mesh 60 (Bronzinox, São Paulo, Brasil) foi utilizado para padronização da granulometria do material vegetal. Foram

utilizados metanol e acetonitrila grau HPLC gradiente (Merck LiChrosolv[®], Darmstadt, Alemanha) nas análises de TSI-MS e UPLC-QqTOF-MS^E respectivamente. Etanol grau de pureza HPLC (Panreac, Darmstadt, Alemanha) e lenços de papel não abrasivos (Kimwipes[®], Kimberly-Clark, EUA) foram utilizados no processo de *clean up* das amostras de folha. Água ultrapura foi obtida de um sistema de purificação MilliQ[®] Direct 8 (Merck-Millipore, Molsheim, France). A pulverização do material vegetal para posterior extração foi realizada em moinho analítico A11 (Ika, Staufen, Alemanha). Um liofilizador modelo Alpha1-2LD plus (Christ[®], Osterode am Harz, Alemanha) e um banho ultrassônico S60H (Elma[®], Singen, Alemanha) foram utilizados no preparo dos extratos de folhas infectadas e não infectadas. Para pesagem do material vegetal pulverizado utilizou-se uma balança analítica AG245 (Metler-Toledo, Bochum, Alemanha). Para centrifugação dos extratos utilizou-se uma mini centrífuga MiniSpin[®] (Eppendorf, Hamburg, Alemanha). Um evaporador de amostras a vácuo Speed Vac[®] (Thermo-Savant, Millford, EUA) foi utilizado para secagem das soluções de extrato antes e depois do preparo de amostras. O *clean up* dos extratos metanólicos das folhas provenientes de indivíduos NI e IS, para as análises de DI-ESI-QqTOF-MS/MS foi realizado em cartuchos de extração em fase sólida (SPE) Chromabond[®] C18 ec (Macherey-Nagel, Düren, Alemanha) contendo 500 mg de fase estacionária e 3,0 mL de volume. Já no preparo de amostras para análise de UPLC-MS^E, utilizou-se cartuchos de SPE Strata[®] C18 (Phenomenex, Torrance, EUA) contendo 100 mg de fase estacionária e volume de 3,0 mL.

As análises de TSI-MS foram realizadas em um espectrômetro de massas Amazon SL[®] (Bruker Daltonik, Bremen, Alemanha), equipado com um analisador do tipo *ion trap* e com uma fonte de ionização por eletrospray modificada de modo a permitir a aplicação desta técnica. Os experimentos de espectrometria de massas de alta resolução por infusão direta foram executados no equipamento Maxis Impact[®] (Bruker Daltonik, Bremen, Alemanha), com configuração ESI-QqTOF.

Os extratos das folhas de plantas infectadas e saudáveis também foram avaliados por UPLC-ESI-QqTOF-MS^E. Nesta etapa, utilizou-se um cromatógrafo líquido modular de ultra eficiência constituído de uma bomba quaternária Acquity[®] HClass, um amostrador automático Acquity[®] FTN, e um detector de arranjo de diodos Acquity[®] PDA eλ acoplado a um espectrômetro de massas XEVO[®] G2-XS QTOF (Waters, Millford, EUA).

3.3.1 Experimentos de TSI-MS

Para realização dos estudos de indivíduos NI e IS por TSI-MS, a metodologia empregada envolveu as etapas de amostragem, preparo de amostras e análise, sendo que as duas últimas foram desenvolvidas de modo a otimizar a qualidade dos espectros obtidos com base na intensidade dos sinais referentes aos metabólitos detectados. Os procedimentos realizados encontram-se descritos nas seções seguintes.

3.3.1.1 Amostragem

Para as análises preliminares por TSI-MS, realizadas para o desenvolvimento da metodologia, foram coletadas três folhas provenientes de dois indivíduos, cada qual em uma das situações NI e IS. Após desenvolvimento da metodologia, com a finalidade de se estabelecer correlações em um número maior de amostras, 20 indivíduos, sendo 10 NI e 10 IS tiveram suas folhas coletadas em triplicata. Cada uma destas folhas foi analisada também em triplicata (três cortes por folha).

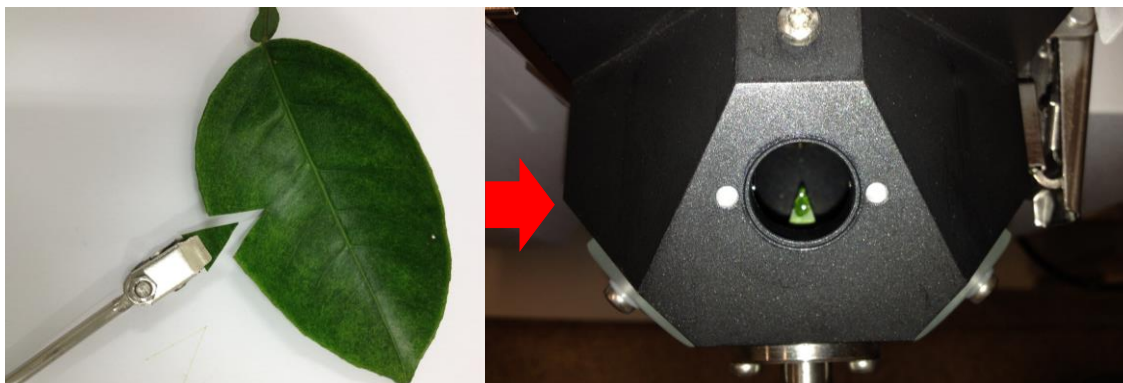
3.3.1.2 Preparo de amostras

Após coleta, as folhas foram limpas em água corrente, retirando-se todo o material particulado de sua superfície. Posteriormente realizou-se um enxague destas folhas com água ultrapura, para a retirada de sais remanescentes e por fim, promoveu-se a secagem com toalhas de papel. Em seguida, realizou-se um procedimento de *clean up* das folhas passando-se sobre sua superfície lenços de papel não abrasivos embebidos em EtOH com grau de pureza HPLC. Após evaporação do EtOH da superfície das folhas a temperatura e pressão ambientes, realizou-se prontamente as análises por TSI-MS.

3.3.1.3 Análise por TSI-MS

Para a execução das análises, cortou-se, utilizando-se um estilete, 3 porções triangulares de regiões aleatórias de cada folha, medindo aproximadamente 1,0 cm de base por 1,5 cm de altura.

Figura 3.4 Acoplamento do corte da folha à fonte de ionização do espectrômetro de massas.



Fonte: autor

Posicionou-se estas amostras a 8,0 mm de distância do cone de amostragem do espectrômetro de massas (Figura 3.4). Posteriormente, adicionou-se, sobre a superfície da amostra, 10,0 μL de MeOH grau de pureza HPLC, e em seguida, aplicou-se a tensão alternada de $+/- 4500\text{ V}$ na entrada do capilar de transferência de modo a permitir a aquisição simultânea de espectros no modo negativo, (-)-TSI-MS e positivo, (+)-TSI-MS. A faixa de aquisição utilizada compreendeu o intervalo de m/z 50-1500. Utilizou-se uma vazão de gás de dessolvatação de $3,0\text{ Lmin}^{-1}$ a uma temperatura de $250,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ para evitar contaminação excessiva da entrada do espectrômetro. O tempo máximo de acúmulo de íons no analisador foi ajustado a 50 ms. Os espectros de TSI-MS foram gerados de uma média de 5 espectros consecutivos.

Os dados obtidos foram tratados no software DataAnalysis, versão 4.2 (Bruker Daltonik, Bremen, Alemanha).

3.3.1.4 Análise de componentes principais dos dados de TSI-MS

Os dados adquiridos a partir dos experimentos de TSI-MS e UPLC-QqTOF-MS^E foram avaliados utilizando análise de componentes principais (*principal component analysis* - PCA). Para os experimentos de TSI-MS, as intensidades dos principais sinais presentes nos espectros, a citar m/z 104,1; 116,1; 144,1; 150,1; 175,1; 182,1; 265,2; 318,4; 325,3; 343,3; 373,3 e 381,2, foram extraídas para o software Microsoft Excel[®] e normalizadas dividindo seu valor pelo valor da corrente iônica total (TIC). Este procedimento teve a finalidade de contornar variações de intensidade causadas por acúmulo de contaminação na fonte de ionização.³⁴ De cada

valor normalizado foi subtraída a média das amostras por variável, dividindo-se o resultado pelo desvio padrão calculado. Estes valores foram utilizados no estudo da PCA, realizado através do software Past, versão 3.25.³⁵ Neste estudo, avaliou-se as variáveis mais representativas na investigação das folhas de indivíduos NI e IS.

3.3.2 Experimento de DI-ESI-QqTOF-MS/MS

Extratos metanólicos de folhas de indivíduos NI e IS foram analisados por DI-ESI-QqTOF-MS/MS com a finalidade de promover a atribuição dos sinais detectados nos experimentos de TSI-MS.

3.3.2.1 Amostragem

Nesta etapa, realizou-se uma amostragem de menor abrangência já que o objetivo desta análise era apenas identificar alguns dos sinais detectados nos experimentos de TSI-MS. No processo de coleta de material vegetal, duas folhas foram obtidas de cada um dos dois indivíduos, NI e IS.

3.3.2.2 Preparo de amostras

As folhas coletadas foram enxaguadas em água corrente e posteriormente em água ultrapura para a retirada de material particulado e sais remanescentes. Posteriormente as folhas foram secas em papel toalha e inseridas em almofariz onde, então, foram trituradas com um pistilo na presença de nitrogênio líquido. O material vegetal finamente dividido proveniente desta etapa, foi liofilizado por 12 h a uma pressão de 0,07 mbar e temperatura de -45,0 °C. Em seguida, aferiu-se a massa do material liofilizado, obtendo-se 0,7739 g para o indivíduo NI e 0,8396 g, para o IS. Este material foi inserido, separadamente, em dois frascos de amostragem de 40,0 mL onde realizou-se o processo de extração.

A extração de cada amostra foi realizada em três etapas com porções de 5,0 mL de MeOH grau HPLC. Cada ciclo de extração, auxiliada por ultrassom, teve duração de 5,0 min. O material sólido foi removido por filtração em papel de filtro e a solução de extrato foi seca previamente em capela de exaustão. Após esta etapa, cada frasco foi mergulhado em nitrogênio líquido por aproximadamente 1,0 min e

ambos foram levados ao liofilizador, onde permaneceram por 12 h, nas mesmas condições previamente mencionadas. Posteriormente os extratos foram pesados, obtendo-se 0,08943 g para a amostra do indivíduo NI e 0,06373 g para o IS.

Em seguida, pesou-se 31,3 mg de extrato proveniente do indivíduo (NI) e 30,2 mg do (IS) em dois microtubos de 1,5 mL. Na solubilização destes extratos foi adicionado MeOH 95% em H₂O em cada um dos dois microtubos, de modo a obter soluções a 30 mgmL⁻¹. Durante este processo verificou-se, nos dois casos, que uma parte de cada extrato não se dissolveu, formando um precipitado no fundo dos microtubos. As soluções foram então centrifugadas, separando-se o sobrenadante do precipitado. Ne sequência, estes sobrenadantes foram submetidos ao processo de *clean up* em cartucho de extração em fase sólida. Neste procedimento, inicialmente promoveu-se o condicionamento do cartucho com 6 volumes mortos (~ 5,0 mL) de MeOH grau de pureza HPLC. Em seguida, equilibrou-se o cartucho com 6 volumes mortos de solução MeOH:H₂O 95% e aplicou-se o volume total dos sobrenadantes obtidos na etapa anterior. A eluição foi realizada com 3,0 mL de MeOH:H₂O 95%. O extrato obtido nessa etapa foi seco em capela de exaustão por um período de 18 h. Obteve-se ao final, 19,0 mg de extrato do indivíduo (NI) e 21,7 mg de extrato proveniente do indivíduo (IS). Ao final, os extratos foram ressolubilizados em MeOH e diluídos em MeOH: H₂O 50% de modo a se obter uma solução a 1,0 mg/mL e diluídos em MeOH:H₂O 50% v/v contendo 0,1% de ácido fórmico na razão de 1:100. A solução resultante foi centrifugada em mini centrífuga a 10.000 rpm por um período de 3,0 min e prontamente analisada pela técnica de DI-ESI-QqTOF-MS.

3.3.2.3 Análise por DI-ESI-QqTOF-MS

Os extratos diluídos foram infundidos na fonte de ESI do espectrômetro a uma vazão de 180,0 µLh⁻¹. Na fonte de ionização, a voltagem de entrada do capilar de transferência foi mantida a -3.000 V, a pressão do gás nebulizador foi ajustada a 0,3 bar, a vazão e a temperatura do gás de dessolvatação foram estabelecidas a 4,0 Lh⁻¹ e 180,0 °C, respectivamente. Os espectros sequenciais foram obtidos por CID, utilizando-se N₂ como gás de colisão. Na aquisição destes espectros, a energia de colisão foi ajustada manualmente com a finalidade de otimizar a intensidade dos sinais pertencentes aos íons produto. As informações das energias empregadas nestes

experimentos encontram-se na descrição contida no cabeçalho de cada espectro discutido ao longo do texto.

Os dados experimentais foram tratados através do software DataAnalysis, versão 4.2 (Bruker Daltonik, Bremen, Alemanha). Os erros das medidas foram calculados através do aplicativo SmartFormula do software DataAnalysis, versão 4.2.

3.3.3 Experimento de UPLC-ESI-QqTOF-MS^E

Com a intenção de avaliar os resultados obtidos nos experimentos de TSI-MS, extratos de folhas obtidas de indivíduos infectados e saudáveis foram analisados por UPLC-QqTOF-MS^E.

3.3.3.1 Amostragem

Nesta etapa do trabalho, realizou-se uma amostragem composta para a obtenção dos extratos a serem analisados por UPLC-QqTOF-MS^E. Para tanto, três folhas foram coletadas de cada indivíduo de um conjunto de 15 indivíduos nas situações NI ou IS. Cada grupo de 3 indivíduos (9 folhas), compuseram uma amostra. Foram compostas 5 amostras de cada grupo de indivíduos em cada uma das situações, NI e IS. As amostras compostas foram extraídas e preparadas em triplicata.

3.3.3.2 Extração dos metabólitos do material vegetal

As folhas coletadas foram inicialmente enxaguadas em água corrente para a retirada de material particulado e posteriormente, em água ultrapura para a retirada de sais remanescentes em suas superfícies. Após secagem das folhas utilizando-se papel toalha, cada grupo de 9 folhas foi pulverizado em moinho analítico na presença de nitrogênio líquido. Após moagem, o material vegetal foi liofilizado por 24h à pressão de 0,07 mbar e temperatura de -45 °C. Posteriormente, realizou-se uma padronização da granulometria deste material, peneirando-o em tamis com dimensão de malha mesh 60, obtendo-se assim maior homogeneidade do tamanho das partículas que compunham a amostra (Figura 3.5, p 71).

Figura 3.5 Padronização da granulometria do material vegetal realizado previamente à extração.



Fonte: autor

Para promover a extração, foram pesados em microtubos de 1,5 mL, aproximadamente 30,0 mg de cada amostra em triplicata. A extração foi realizada em três etapas com porções de 300,0 μL de uma solução de griseofulvina (padrão interno) a $3,3 \mu\text{g mL}^{-1}$ em MeOH grau de pureza HPLC. A cada etapa de extração, a mistura material vegetal-solvente foi sonificada em banho de ultrassom por 5,0 min e centrifugada em mini centrífuga a 10000 rpm por 3,0 min. Posteriormente, os sobrenadantes foram transferidos para microtubos de 1,5 mL. A solução de extrato resultante foi parcialmente evaporada em capela de exaustão e levada a um evaporador a vácuo para completa secagem. Este processo teve duração de 2,0 horas utilizando-se uma pressão de 1,0 torr a uma temperatura de $35,0^\circ\text{C}$.

3.3.3.3 Preparo de amostras

Os extratos obtidos passaram por um processo de *clean up* utilizando-se cartuchos de extração em fase sólida (SPE) contendo sílica modificada com grupos octadecil (C18). Para tanto, solubilizou-se os extratos em 300,0 μL de MeOH:H₂O 95% v/v com auxílio de ultrassom e agitação.

Os cartuchos de SPE foram condicionados com 1,0 mL de MeOH grau de pureza HPLC. Após condicionamento, equilibrou-se o cartucho com 1,0 mL de solução MeOH:H₂O 95% e aplicou-se a solução da amostra. A eluição foi realizada com 1,0 mL de MeOH:H₂O 95% v/v, coletando-se o eluato em microtubos de 1,5 mL com massa previamente mensurada. As soluções de extrato foram parcialmente

evaporadas em capela de exaustão até o volume aproximado de 100 μL . As soluções resultantes foram secas em evaporador a vácuo por 5 horas a 1,0 Torr e 35,0 $^{\circ}\text{C}$. Os extratos obtidos foram solubilizados em $\text{MeOH:H}_2\text{O}$ 70% v/v de modo a obter soluções a 1,0 mg mL^{-1} . Estas soluções foram diluídas na razão de 1:10 para ajuste da concentração a 100 ppm. Posteriormente, as soluções resultantes foram centrifugadas em mini centrífuga a 10000 rpm por 3,0 min e prontamente analisadas.

3.3.3.4 Análise por UPLC-ESI-QqTOF-MS^E

Na análise por UPLC-ESI-QqTOF-MS^E, a separação foi realizada em coluna Acquity UPLC[®] HSST3, com dimensões de 100 x 2.1mm, contendo fase estacionária reversa (C18), constituída de partículas com 1.8 μm de diâmetro médio e 100 $\text{\AA}$ de diâmetro médio de poro. A eluição foi realizada em modo gradiente, utilizando-se água como componente A e acetonitrila como componente B, ambos contendo 0,1% v/v de ácido fórmico. Realizou-se um gradiente exploratório de 5,0 a 100,0% de B em 8,0 minutos, com uma etapa adicional de limpeza após o término do gradiente, na qual manteve-se 100,0% de B por 5,0 minutos. A vazão utilizada foi de 500,0 $\mu\text{L min}^{-1}$ e o forno da coluna foi mantido a 40,0 $^{\circ}\text{C}$. O detector de DAD foi operado na faixa de comprimento de onda de 210-800nm, com frequência de aquisição de 20,0 Hz.

No espectrômetro de massas a aquisição foi realizada no modo resolução - positivo na faixa de m/z 50-1000. Ajustou-se os parâmetros da fonte de ionização de modo que sua temperatura foi mantida a 100,0 $^{\circ}\text{C}$ e, no capilar de eletrospray, foi aplicado um potencial de 1.5 kV. A voltagem do cone de transferência foi estabelecida a um potencial de 40 V. A vazão do gás de dessolvatação (N_2) foi ajustada a 800 L h^{-1} e sua temperatura mantida a 650,0 $^{\circ}\text{C}$. O experimento de MS^E foi realizado em duas condições de energia aplicadas à célula de colisão, sendo que os espectros de baixa energia foram obtidos a 6,0 eV e para obtenção dos espectros de alta energia, utilizou-se uma rampa de potencial de 25,0 a 45,0 eV. Leucina-encefalina foi utilizada como referência de massa para promover a correção dos valores de m/z experimentais. Para tanto uma solução a 200,0 $\text{pg } \mu\text{L}^{-1}$ deste composto foi continuamente infundida através do capilar secundário de eletrospray do espectrômetro. A vazão de infusão foi ajustada a 10,0 $\mu\text{L min}^{-1}$ e o capilar secundário de ESI foi mantido a um potencial de 0,5 kV. O monitoramento da razão m/z deste calibrante foi realizado a uma energia de

colisão de 6,0 eV a cada 10 segundos de análise. Os dados de MS foram corrigidos durante a aquisição.

Os dados obtidos a partir dos experimentos de UPLC-QqTOF-MS^E foram tratados no software UNIFI[®] V 1.8 (Waters, Millford, USA) através do qual realizou-se uma análise de *screening* para anotação das substâncias detectadas. Nesta etapa, utilizou-se um banco de dados construído com metabólitos reportados para o gênero Citrus,^{27; 31; 32; 36; 37} apresentados na tabela do apêndice E (p. 159). A atribuição dos sinais foi realizada com base na comparação entre as razões *m/z* dos íons detectados e as razões *m/z* dos íons das substâncias que constituem o banco de dados, considerando-se a formação de íons [M+H]⁺, [M+Na]⁺ e [M+K]⁺. A tolerância máxima de erro foi estabelecida a 10 ppm. O valor mínimo de intensidade de pico para alta energia foi ajustado a uma contagem de 1000 íons, enquanto, para baixa energia, estabeleceu-se o valor de 2000 íons. Apenas considerou-se a anotação para sinais que se mostraram relevantes na diferenciação entre indivíduos NI e IS, sendo que as demais anotações não foram exploradas.

3.3.3.5 Análise de componentes principais dos dados de UPLC-QqTOF-MS^E

Para realização da análise de componentes principais dos dados previamente deconvoluídos foi utilizado o software EZ Info V 3.0.3.0 (Sartorius Stedim Biotech, Umeå, Suécia). Os marcadores foram gerados utilizando-se o modo automático de avaliação de tolerância de desvio de razão *m/z* e de tempo de retenção. A faixa de *m/z* considerada correspondeu à faixa de aquisição adotada nos experimentos e a faixa de intensidade absoluta foi estabelecida de 0 a 10⁶. Os sinais de contaminantes foram manualmente deletados da lista de marcadores considerando-se as análises do branco, constituído de uma solução MeOH:H₂O, 70% v/v.

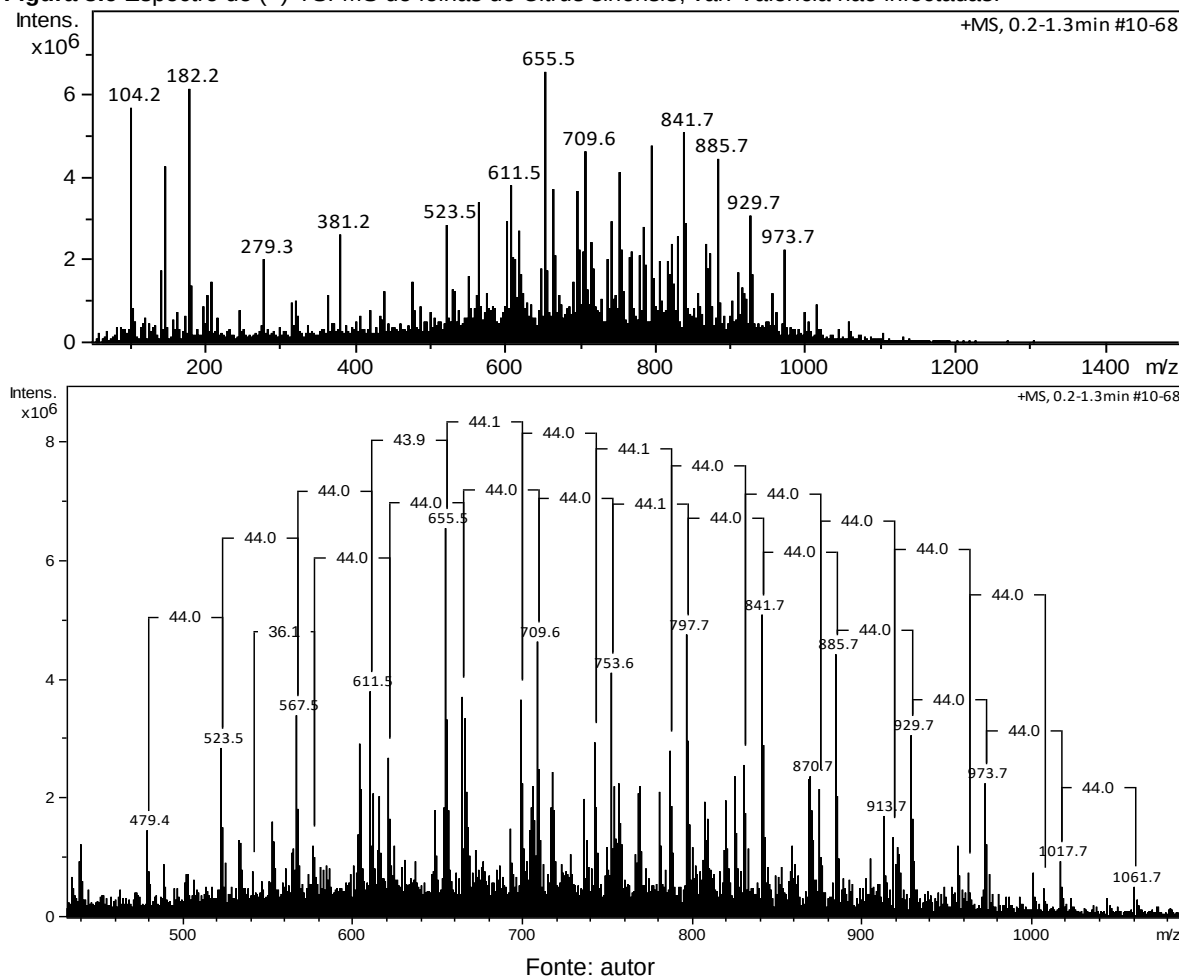
3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A proposta desse trabalho foi elaborar uma metodologia para o estudo de *Citrus sinensis* var. valência, com a finalidade de avaliar as diferenças metabólicas entre as folhas de indivíduos saudáveis e infectados por *Candidatus Liberibacter asiaticus* causadoras do HLB. Além disso, avaliou-se a possibilidade de aplicação da metodologia empregada para o diagnóstico dessa enfermidade utilizando as folhas de indivíduos infectados.

3.4.1 Desenvolvimento de método e análises preliminares

As análises iniciais tiveram como principal objetivo ajustar a metodologia empregada e buscar por um marcador específico para indivíduos infectados. O primeiro experimento resultou no espectro da figura 3.6, adquirido no modo positivo.

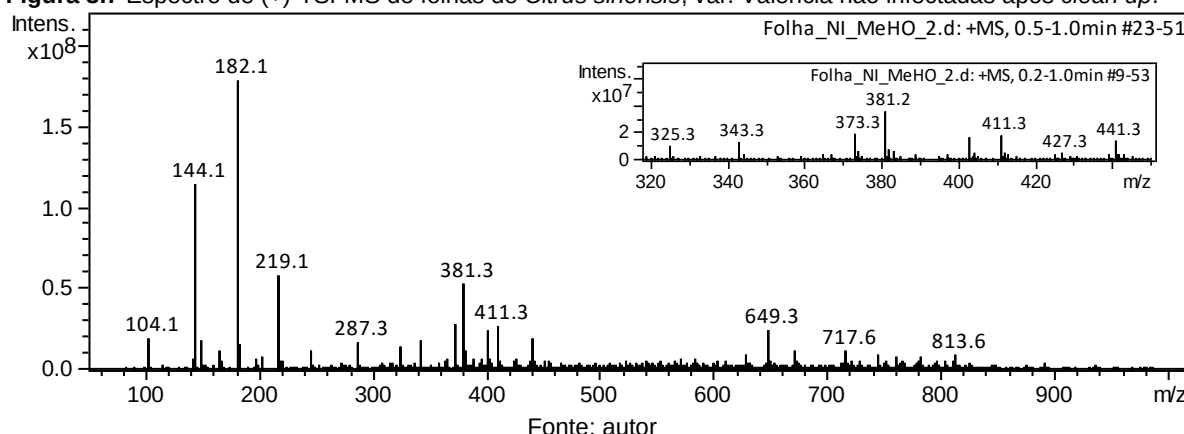
Figura 3.6 Espectro de (+)-TSI-MS de folhas de *Citrus sinensis*, var. Valência não infectadas.



Avaliando-se o espectro obtido, pôde-se observar a presença de duas séries de sinais na região de m/z 500-1000, caracterizados pela diferença de 44,0 unidades de razão m/z entre sinais adjacentes. Esta característica é indicativa da presença de polímeros derivados de etilenoglicol. Esses polímeros são geralmente compostos por um conjunto de macromoléculas que contém diferentes números de monômeros (etilenoglicol) ligados entre si. Duas cadeias poliméricas que divergem por uma unidade de monômero apresentarão uma diferença de 44,0 Da em suas massas moleculares.³⁸

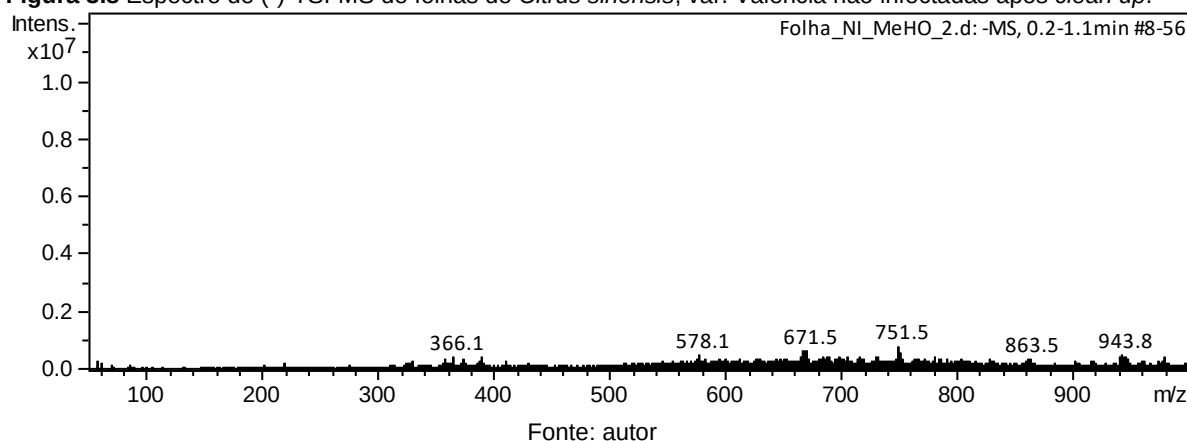
Polímeros a base de etilenoglicol são amplamente utilizados na formulação de defensivos agrícolas devido às suas propriedades emulsificante e adjuvante.^{39; 40} Considerando este fato, realizou-se um levantamento dos pesticidas aplicados nas plantas cujas folhas foram analisadas por TSI-MS. Dentre os defensivos agrícolas aplicados, estão os inseticidas Tiger[®] produzido pela Sumitomo Chemical do Brasil e Sabre[®] produzido pela Dow AgroSciences Industrial, além dos inseticidas e acaricidas Abamex[®] da Nufarm, Assist[®] e Pirate[®], ambos produzidos pela Basf S.A, e o fungicida e bactericida Kocide[®] da fabricante Mitsui&CO do Brasil. Verificando-se as bulas destes defensivos, não foi possível encontrar informações a respeito dos adjuvantes utilizados nas formulações, de modo que não se pôde realizar a correlação da presença dos polímeros com o uso de um defensivo em específico.

A presença destes polímeros na matriz da amostra causou uma baixa eficiência de ionização dos metabólitos da folha, o que se pôde constatar pela baixa intensidade absoluta dos sinais do espectro em questão, da ordem de 10^6 . Além desta observação, verificou-se que a linha de base apresentou ruído bastante pronunciado, também da ordem de 10^6 . Para solucionar este problema, incluiu-se na metodologia de análise uma etapa de *clean up* das folhas de *Citrus sinensis* antes da realização do experimento de TSI-MS. Neste procedimento, após o enxague das folhas com água ultrapura, promoveu-se a limpeza de sua superfície com lenços não abrasivos embebidos em EtOH grau de pureza HPLC. Após este processo realizou-se novamente o experimento de TSI-MS, que resultou no espectro da figura 3.7 (p. 101).

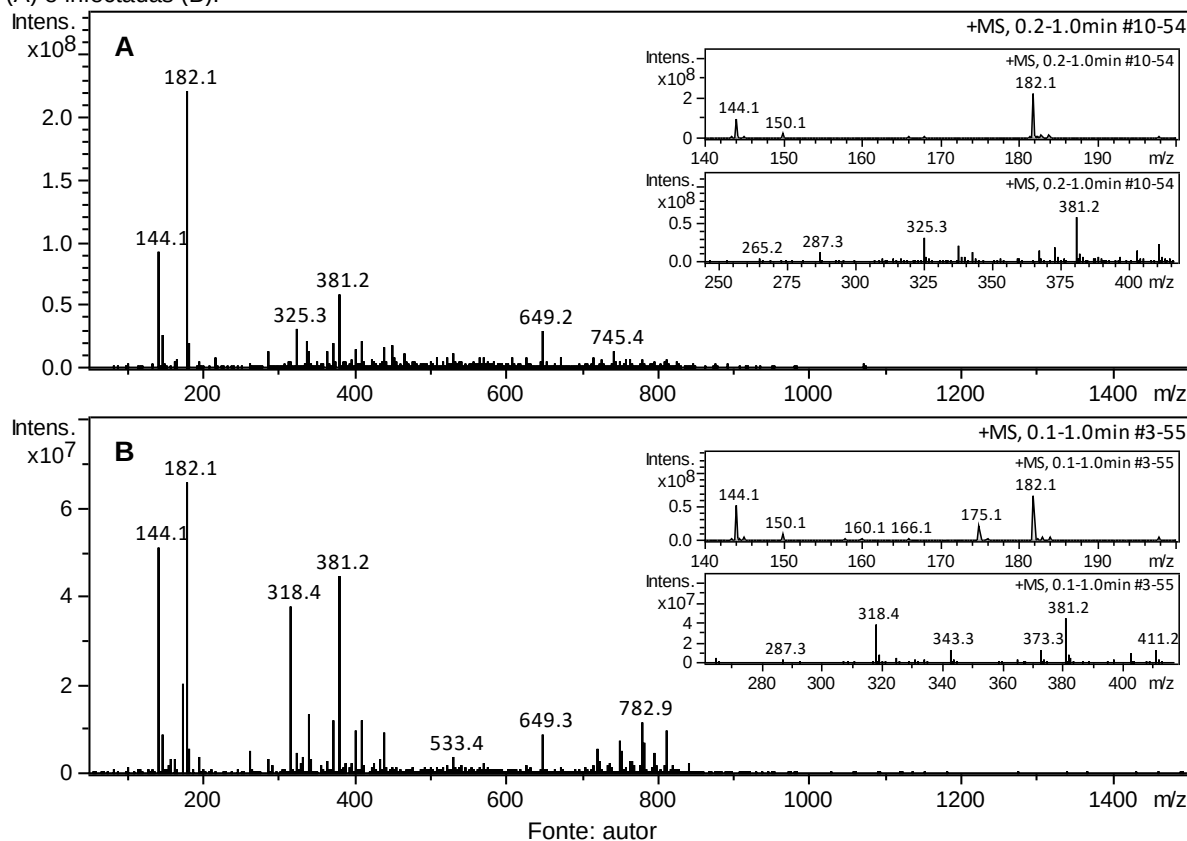
Figura 3.7 Espectro de (+)-TSI-MS de folhas de *Citrus sinensis*, var. Valência não infectadas após *clean up*.

A análise do espectro (Figura 3.7), permitiu constatar que o processo de *clean up* promoveu a completa remoção do contaminante polimérico, melhorando a qualidade do espectro com a diminuição da linha de base, o que possibilitou a detecção de íons em quase toda a faixa de m/z 500-1000. A intensidade, que antes era da ordem de 10^6 , agora apresentou valores maiores, da ordem de 10^8 , resultando em uma maior detectabilidade do método empregado.

Embora os experimentos de TSI-MS tenham sido realizados em modo alternado, os espectros obtidos no modo negativo não puderam ser aproveitados devido à ineficiência do processo de ionização, como demonstrado na figura 3.8 (p. 102). Esse fato demonstra que o modo negativo possui características específicas que o diferenciam das análises realizadas no modo positivo e que demandam uma otimização dos parâmetros que comandam este processo, como por exemplo os valores da tensão aplicados no cone de amostragem, na entrada e saída do capilar de transferência e a vazão e temperatura do gás de dessolvatação. Diante deste fato, optou-se por utilizar apenas os dados obtidos no modo positivo para a interpretação dos espectros.

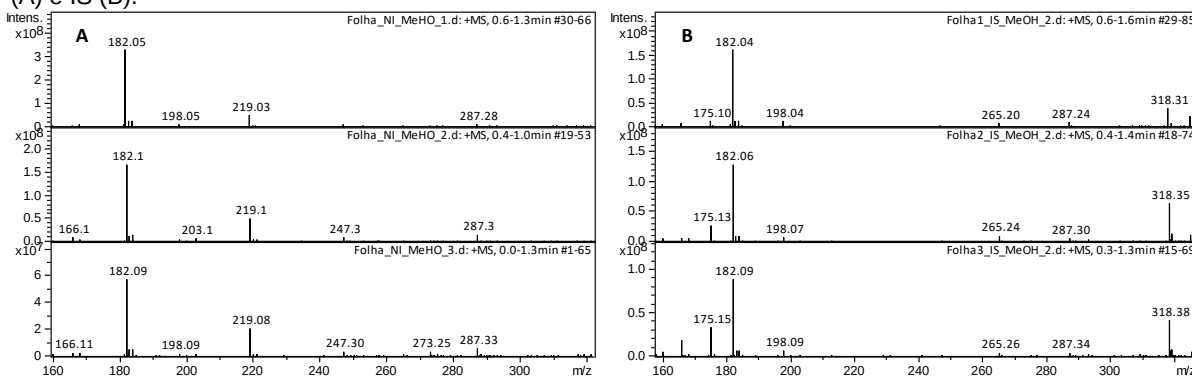
Figura 3.8 Espectro de (-)-TSI-MS de folhas de *Citrus sinensis*, var. Valência não infectadas após *clean up*.

Ajustado o método, uma análise preliminar em triplicata de folhas foi realizada. Comparando os espectros individuais obtidos de indivíduos NI e IS, pôde-se notar que uma das principais diferenças é decorrente da presença de dois sinais que tiveram maior intensidade apenas em folhas de indivíduos infectados, um em m/z 175,1, e outro em m/z 318 como demonstrado na figura 3.9.

Figura 3.9 Comparação entre os espectros de (+)-TSI-MS de folhas de *Citrus sinensis*, var. Valência saudáveis (A) e infectadas (B).

A figura 3.10 apresenta a comparação entre as análises em triplicata. A partir destes espectros, novamente observa-se a presença dos sinais em m/z 175 e 318 apenas nas folhas oriundas de indivíduos IS. Esta informação sugere que estes sinais sejam provenientes de potenciais biomarcadores para o HLB.

Figura 3.10 Comparação entre as análises preliminares de TSI-MS em triplicatas das folhas dos indivíduos NI (A) e IS (B).

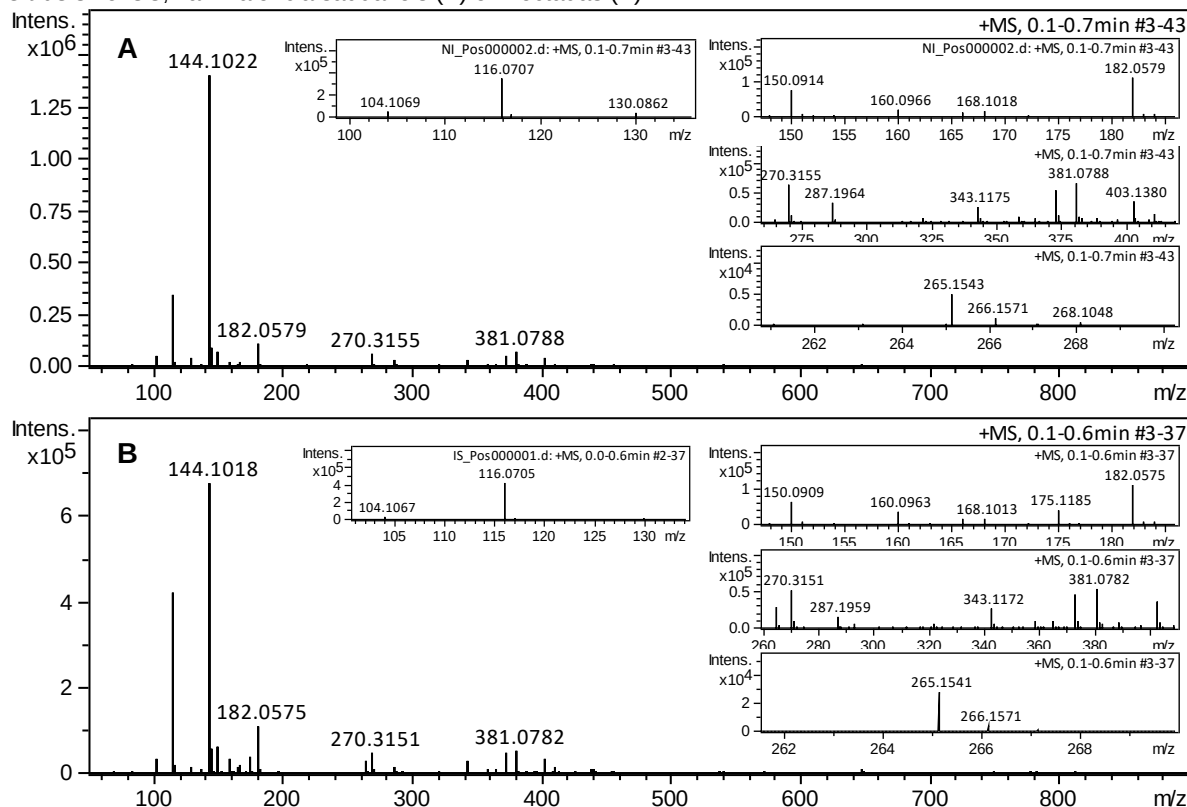


Fonte: autor

Com a finalidade de identificar estes possíveis marcadores além de outros compostos também detectados nos experimentos iniciais, os extratos de indivíduos NI e IS foram submetidos a análises de infusão direta em espectrômetro de massas de alta resolução (DI-ESI-QqTOF-MS/MS).

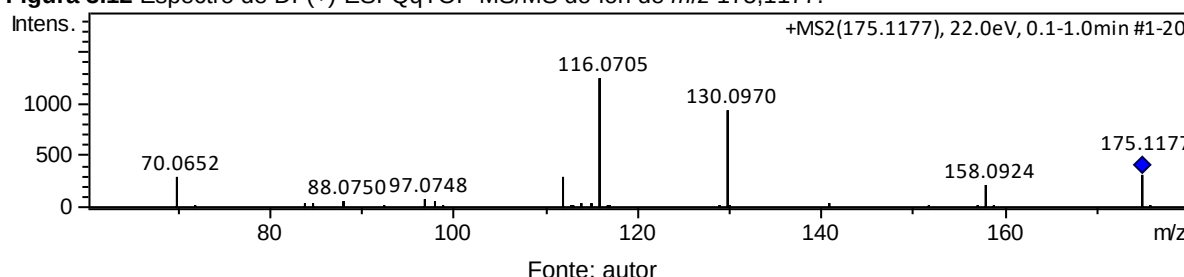
Nestas análises, de maneira semelhante ao que fora observado nos experimentos iniciais, também foi possível identificar a presença do sinal em m/z 175 apenas no extrato de folhas infectadas, como demonstrado na figura 3.11 (p. 104). No entanto, curiosamente, o sinal em m/z 318 não foi detectado nestas análises.

Figura 3.11 Comparação entre os espectros de DI-(+)-ESI-QqTOF-MS dos extratos metanólicos de folhas de *Citrus sinensis*, var. Valência saudáveis (A) e infectadas (B).



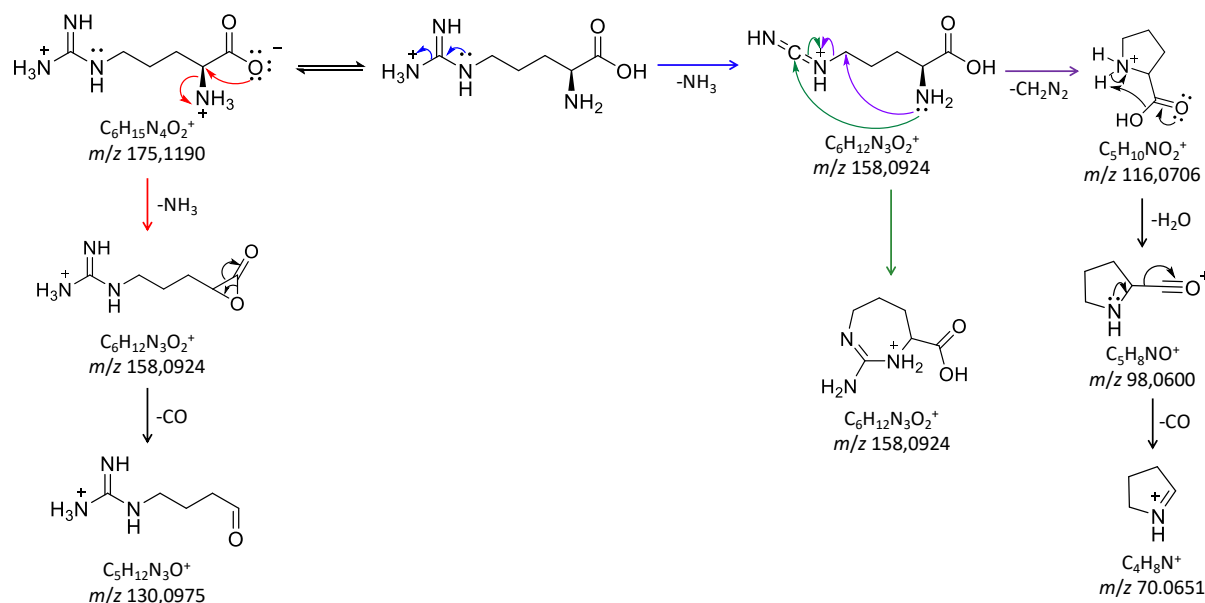
Fonte: autor

O valor de m/z 175,1185 obtido no experimento de ESI-QqTOF-MS foi utilizado no cálculo da fórmula molecular deste íon, utilizando-se o aplicativo *smart formula* do software DataAnalysis versão 4.2. Neste cálculo, foram considerados apenas íons gerados por protonação de moléculas neutras $[M+H]^+$, com tolerância de 5 ppm de erro em relação ao dado experimental. Como resultado, obteve-se apenas a fórmula iônica $C_6H_{15}N_4O_2$ sugerindo a presença do aminoácido arginina, que já fora reportado em floema de plantas do gênero *Citrus*.⁴¹ O valor experimental de m/z apresentou um erro de 2,7 ppm em relação ao valor teórico que é de 175,1190. Para comprovar a identidade deste íon, foi realizado um experimento sequencial, obtendo-se o espectro de ESI-QqTOF-MS/MS apresentado na figura 3.12 (p. 105).

Figura 3.12 Espectro de DI-(+)-ESI-QqTOF-MS/MS do íon de m/z 175,1177.

O padrão de fragmentação exibido pelo íon com m/z 175,1177 no experimento de MS/MS está de acordo com aquele descrito na literatura para o aminoácido arginina.⁴² No mecanismo de fragmentação proposto (figura 3.13, p. 106), a arginina protonada apresenta-se sob a forma de duas estruturas canônicas em equilíbrio que se diferenciam pelo estado de carga dos grupos ácido carboxílico e amina do aminoácido. Em uma dessas formas, ambos os grupos se apresentam neutros enquanto na outra, apresentam-se dotados de carga, sendo esta positiva para a amina e negativa para o ácido carboxílico, como resultado do caráter zwitteriônico dos aminoácidos. A partir da espécie zwitteriônica, uma reação de deslocamento (setas vermelhas) com perda neutra de amônia e consequente ciclização, dá origem ao íon produto em m/z 158,0924. Este, por sua vez, sofre uma eliminação de CO que leva à formação de um íon produto em m/z 130,0975. Na estrutura da arginina cuja carga encontra-se apenas no grupo guanidila, ocorre uma reação de deslocamento com consequente saída de uma molécula de amônia, ilustrada pelas setas azuis, resultando no íon produto de m/z 158,0924. Este íon pode sofrer duas reações: uma ciclização, ilustrada pelas setas verdes, e uma reação de deslocamento, representada com setas roxas, que dá origem ao íon produto de m/z 116,0706 com consequente perda neutra de CH_2N_2 . Na sequência, uma remoção de hidrogênio β causa a perda de água a partir do íon de m/z 116,0706, gerando o íon produto com m/z 98,0600, que por sua vez, sofre uma reação de deslocamento perdendo CO, o que resulta no íon produto com m/z 70,0651.

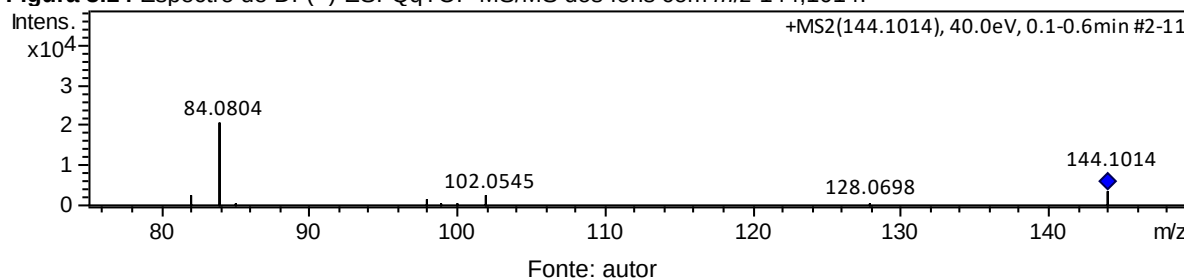
Figura 3.13 Proposta de mecanismo de fragmentação da arginina em sua forma protonada $[M+H]^+$ e as razões m/z teóricas de cada íon produto gerado.



Fonte: autor

Um dos sinais mais intensos presentes nos espectros de TSI-MS corresponde ao íon de m/z 144.1. Nos espectros de DI-ESI-QqTOF-MS, este sinal exibiu m/z 144,1022 para o extrato NI e 144,1018 para IS. Estes valores são compatíveis com a razão m/z de um derivado do aminoácido prolina relatado para espécies do gênero *Citrus*, a prolina betaína,²⁷ cuja massa exata teórica é 144,1019. Os dados experimentais apresentaram erros de 1,9 ppm para o valor obtido a partir do extrato NI e 0,7 ppm para IS. O espectro de MS/MS deste íon é mostrado na figura 3.14.

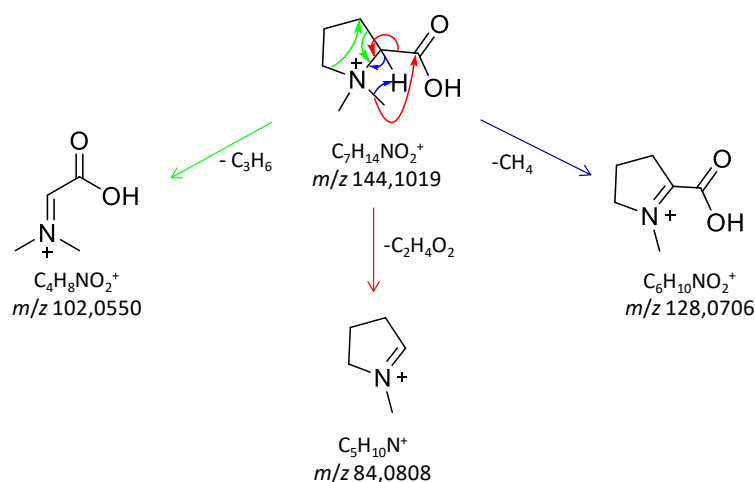
Figura 3.14 Espectro de DI-(+)-ESI-QqTOF-MS/MS dos íons com m/z 144,1014.



A proposta de mecanismo de fragmentação deste íon é retratada na figura 3.15 (p. 107). Nesta proposta, o íon precursor pode seguir qualquer um dos três caminhos reacionais descritos. No primeiro, ilustrado com setas verdes, uma eliminação de um ciclopropano leva à formação do íon produto de m/z 102,0550. Já no mecanismo

descrito com setas vermelhas, ocorre um rearranjo de um grupo metílico com a consequente saída de ácido acético, o que resulta na formação do íon produto com m/z 84,0804. Por fim, um rearranjo de hidrogênio, indicado pelas setas azuis, é responsável pela formação do íon produto em m/z 128,0698 e pela perda neutra de metano.

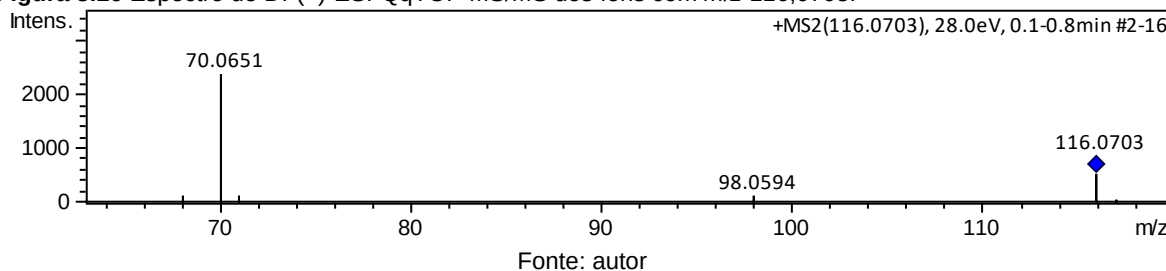
Figura 3.15 Proposta de mecanismo de fragmentação iônica da prolina betaína $[M]^+$ e as razões m/z teóricas de cada íon produto gerado.



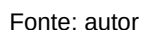
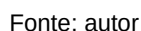
Fonte: autor

Nos experimentos de DI-ESI-QqTOF-MS/MS foi possível identificar o aminoácido prolina.²⁷ No espectro *full scan* o íon $[M+H]^+$ desta substância exibiu m/z 116,0707 para a análise do extrato NI e 116,0705 para o extrato IS. Ambos os erros calculados com relação ao valor teórico de 116,0706, foram de 0,5 ppm. O espectro de MS/MS é mostrado na figura 3.16.

Figura 3.16 Espectro de DI-(+)-ESI-QqTOF-MS/MS dos íons com m/z 116,0703.

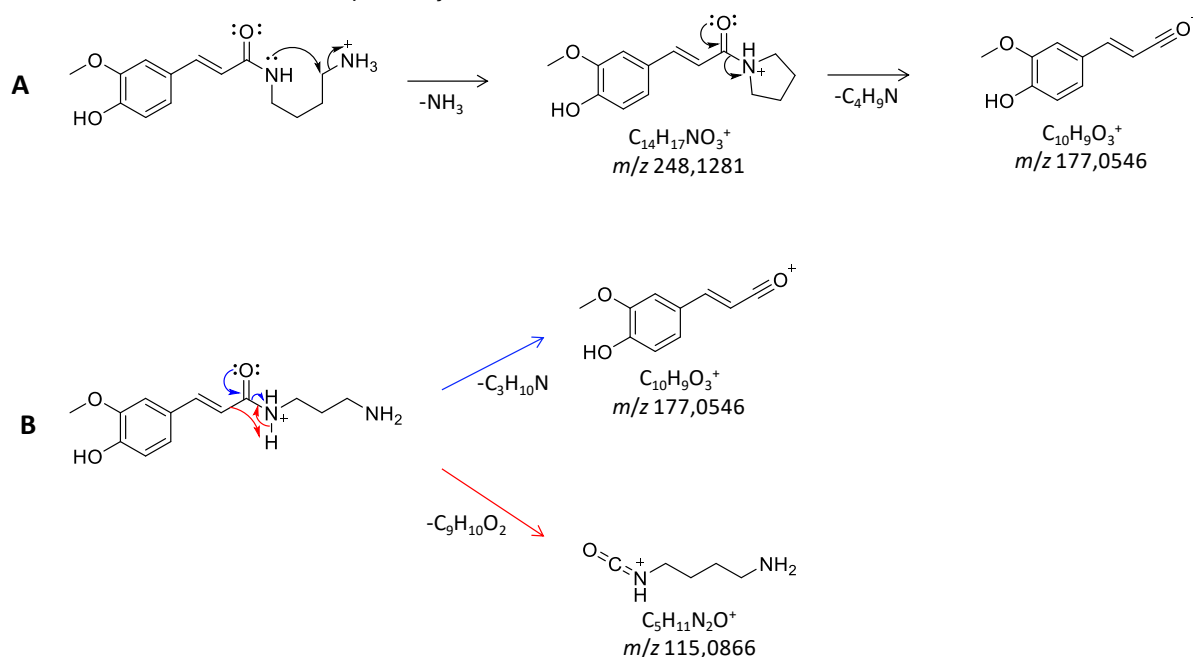


O padrão de fragmentação observado neste experimento pôde ser explicado pelo mecanismo de fragmentação retratado na figura 3.17 (p. 108). Este mecanismo



amida (Fig. 13.19-B). A partir do íon A, foi proposta a ocorrência de uma reação de deslocamento com eliminação de amônia e formação do íon produto de m/z 248,1281. Este íon, por sua vez, sofre uma clivagem indutiva assistida por heteroátomo, que dá origem à perda neutra de C_4H_9N e ao íon acílio em m/z 177,0545. Partindo-se do íon precursor representado pela estrutura B, duas reações podem ocorrer. Uma delas, representada por setas azuis, corresponde a uma clivagem indutiva assistida por heteroátomo que leva à formação do íon acílio, o qual apresenta m/z 177,0546 e de uma perda neutra de $C_3H_{10}N$. Já na segunda reação, demonstrada pelas setas vermelhas, ocorre um rearranjo de hidrogênio responsável por gerar o íon produto em m/z 115, 0869 com uma consequente perda neutra de $C_9H_{10}O_2$.

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.

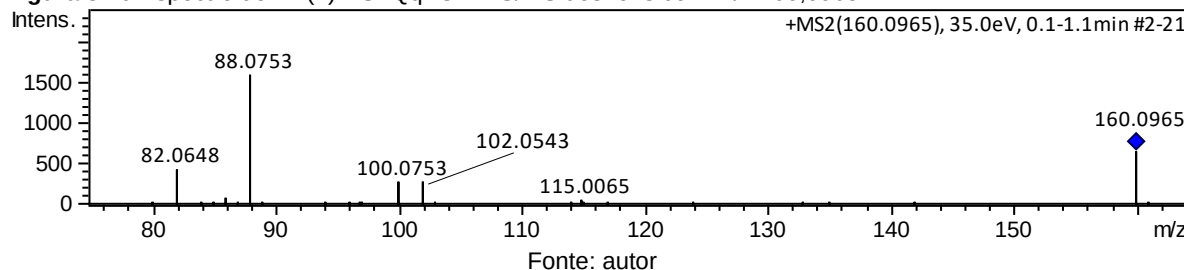


Fonte: autor

Em alguns espectros de TSI-MS foi detectado um íon de razão m/z 160,1. Nos experimentos de DI-ESI-QqTOF-MS, este sinal está presente em ambos os extratos (NI e IS) apresentando m/z 160,0966 para o extrato NI e m/z 160,0963 para o extrato IS. Com fórmula iônica calculada a partir destes dados foi possível atribuir este sinal à 4-hidroxiprolina betaína, cujo valor teórico de razão m/z é 160,0968. Os erros associados às medias foram de 1,2 ppm para o valor obtido a partir da análise do

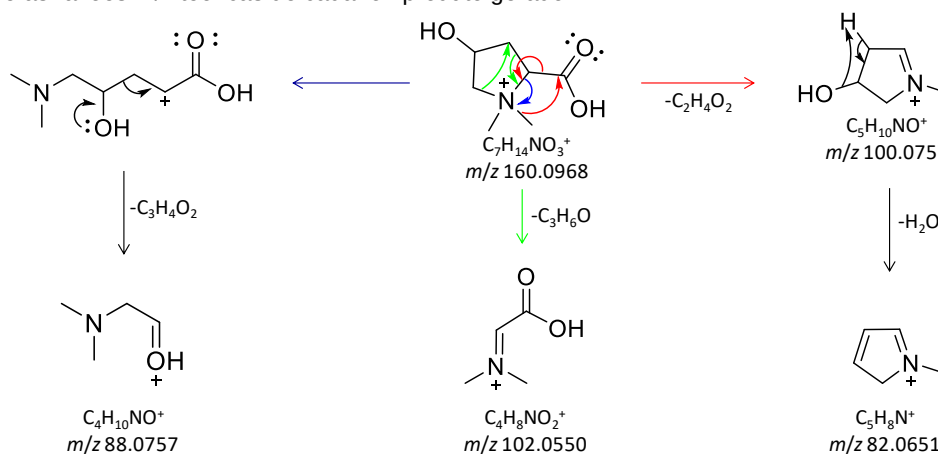
extrato NI e 3,1 ppm para o valor obtido na análise do extrato IS. O espectro de MS/MS deste íon encontra-se na figura 3.20.

Figura 3.20 Espectro de DI-(+)-ESI-QqTOF-MS/MS dos íons com m/z 160,0965.



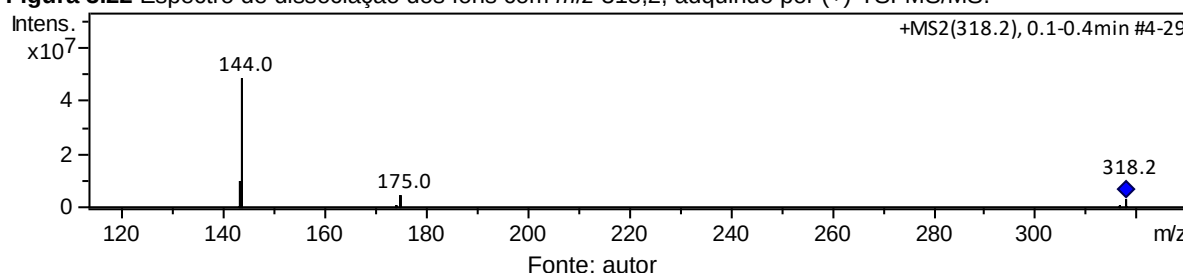
O mecanismo de fragmentação do íon $[M]^+$ correspondente à 4-hidroxiprolina betaína, mostrado na figura 3.21, envolve três caminhos reacionais, dentre os quais a abertura do anel de cinco membros através de uma clivagem indutiva simples, demonstrada pela seta azul. O íon produto desta reação sofre uma clivagem indutiva assistida por heteroátomo adjacente dando origem ao íon de m/z 88,0753 e à perda neutra de $C_3H_4O_2$. A segunda reação de fragmentação, descrita com setas verdes, consiste na eliminação de uma molécula de hidrox ciclopropano acompanhada da formação do íon produto de razão m/z 102,0543. Por fim, indicada pelas setas em vermelho, uma migração de grupo metila acompanhada pela perda de ácido acético é responsável pela formação do íon produto em m/z 100,0753, que por sua vez sofre um rearranjo de hidrogênio remoto com perda neutra de água, responsável por gerar o íon produto em m/z 82,0668.

Figura 3.21 Proposta de mecanismo de fragmentação dos íons $[M]^+$ da 4-hidroxiprolina betaína e as razões m/z teóricas de cada íon produto gerado.



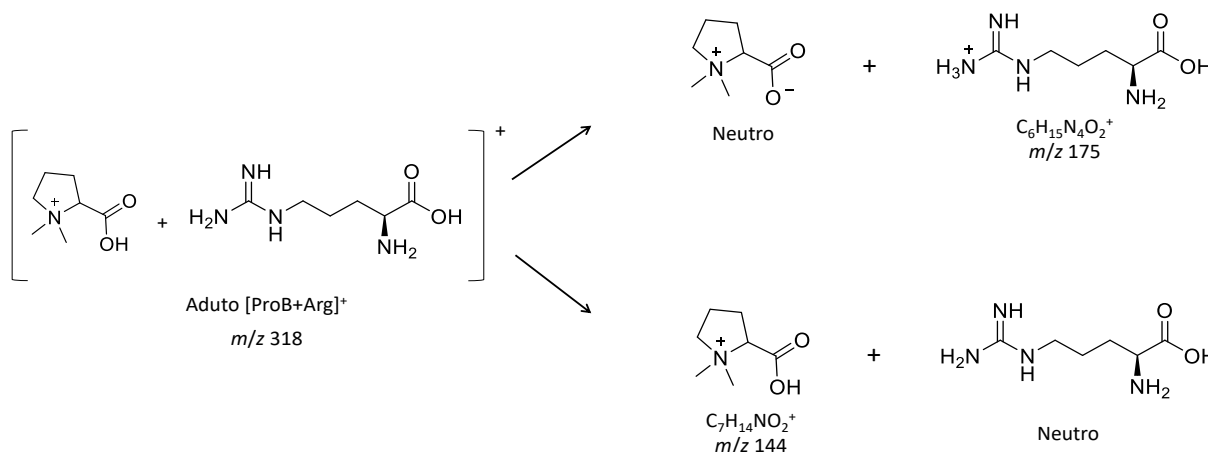
Curiosamente, o íon de razão m/z 318 não foi detectado nos experimentos de DI-ESI-QqTOF-MS. Por este motivo, realizou-se um experimento de TSI-MS/MS com a finalidade de estudar sua estrutura química. O espectro obtido encontra-se ilustrado na figura 3.22 na qual é possível observar íons produto em m/z 175 e 144.

Figura 3.22 Espectro de dissociação dos íons com m/z 318,2, adquirido por (+)-TSI-MS/MS.



Este resultado sugere que este íon seja constituído de um aduto formado pela interação eletrostática entre prolina betaína (MM = 144 Da) e arginina (MM = 174 Da), $[\text{ProB}+\text{Arg}]^+$. O rompimento desta interação pode ocorrer de modo que o próton permaneça ligado ao grupo ácido, dando origem ao íon em m/z 144, ou seja transferido ao nitrogênio do grupo guanidila da arginina, resultando no íon de m/z 175, como indicado na figura 3.23.

Figura 3.23 Proposta de formação dos íons produto com m/z 175 e 144 a partir do íon precursor com m/z 318.



As análises de DI-ESI-QqTOF-MS/MS, contribuíram para a identificação de alguns dos principais íons detectados no experimento de TSI-MS. O aminoácido arginina demonstrou potencial para ser considerado um marcador, já que a

intensidade de seu sinal foi maior em folhas de indivíduos IS. Com o objetivo de verificar se este comportamento segue a mesma tendência para um número maior de indivíduos, foram realizados novos experimentos de TSI-MS partindo-se de uma amostragem mais extensa. Estes dados foram posteriormente utilizados para a realização de uma análise de componentes principais e encontram-se relatados no apêndice F (p. 160)

3.4.2 Análise de componentes principais (PCA) dos dados obtidos por TSI-MS

Nesta etapa do estudo, 10 indivíduos em cada uma das duas condições avaliadas (NI e IS) tiveram suas folhas coletadas e, logo em seguida, analisadas. Dos dados obtidos, foram extraídas as intensidades dos principais íons detectados, a citar m/z 104,1; 116,1; 144,1; 150,1; 175,1; 182,1; 265,2; 318,4; 325,3; 343,3; 373,3 e 381,2. A análise multivariada dos dados normalizados resultou em 12 componentes principais com autovalores e porcentagens de variância discriminados na tabela 3.1.

Tabela 3.1 Autovalores e % da variância para cada componente principal após realização da análise de componentes principais.

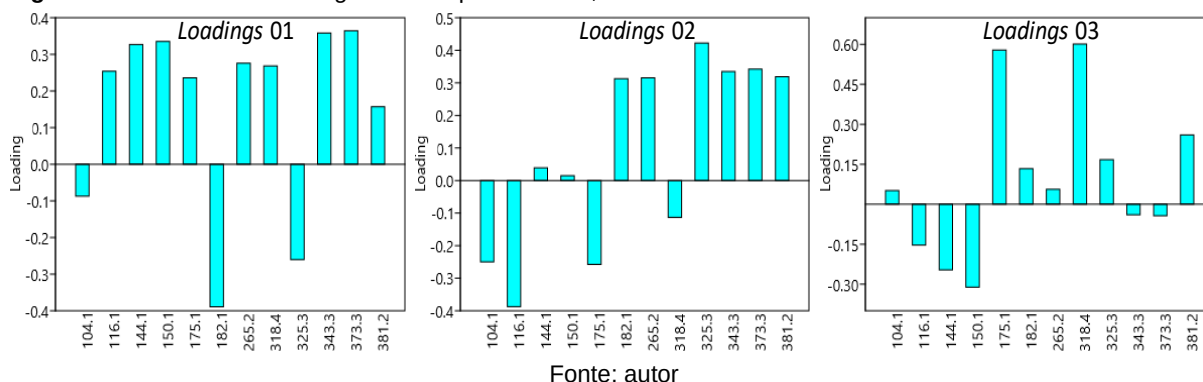
Componente	Autovalor	% Variância
1	3.70295	30.858
2	2.14455	17.871
3	1.69658	14.138
4	1.12998	9.4165
5	0.945681	7.8807
6	0.683478	5.6957
7	0.618297	5.1525
8	0.416997	3.475
9	0.355473	2.9623
10	0.169504	1.4125
11	0.0950514	0.79209
12	0.0414614	0.34551

Fonte: autor

A análise dos dados da tabela 3.1 (p. 112) demonstrou que a componente 01 apresentou maior variância em relação às demais. As componentes 02 e 03 apresentaram valores de variância próximos com diferença inferior a 5%, demonstrando uma possível similaridade. As demais componentes não variaram significativamente entre si, comparadas às componentes 01, 02 e 03.

A partir destes dados, foram gerados os gráficos de *loadings* para a escolha das componentes principais (PC), demonstrados na figura 3.24.

Figura 3.24 Gráficos de *loadings* das componentes 01, 02 e 03.

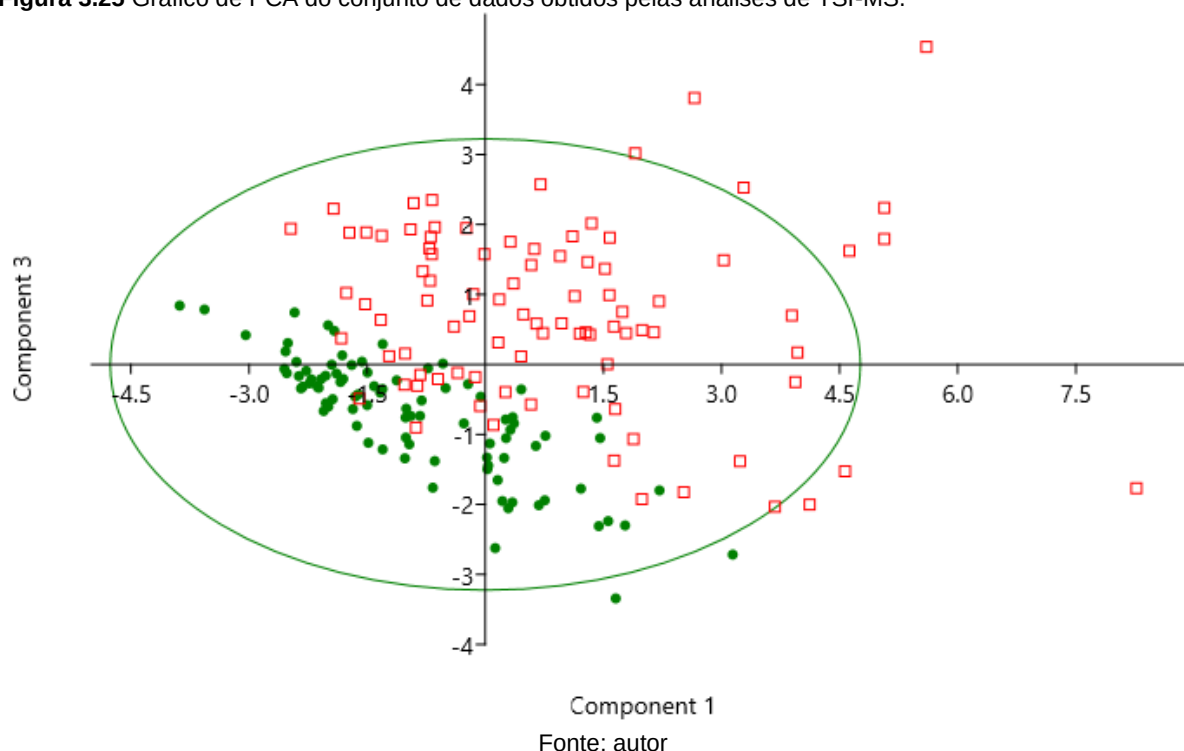


No gráfico de *loadings* 01 pôde-se observar, no eixo superior, as variáveis de interesse com *m/z* 175,1 e 318,4 representando a arginina e seu aduto com prolina betaína. Já no eixo inferior, observa-se as variáveis que apresentam *m/z* 104,1; 182,1 e 325,3, que não possibilitaram diferenciação entre indivíduos IS e NI, segundo a análise dos dados preliminares. Para o gráfico de *loadings* 02, as variáveis de interesse com *m/z* 175,1 e 318,4 apresentaram pouca representatividade no eixo inferior, devido à alta intensidade da variável com *m/z* 116,1, identificada como sendo o aminoácido prolina. No gráfico de *loadings* 03, as variáveis com *m/z* 175 e 318 demonstraram grande representatividade no eixo superior frente às demais variáveis. Com base no exposto, foi gerado o gráfico de PCA de indivíduos NI e IS, considerando as variáveis 182 e 325 como componente 01 e as variáveis 175 e 318 como componente 3, já que apresentaram maior representatividade como observado nos gráficos de *loadings* da figura 3.24.

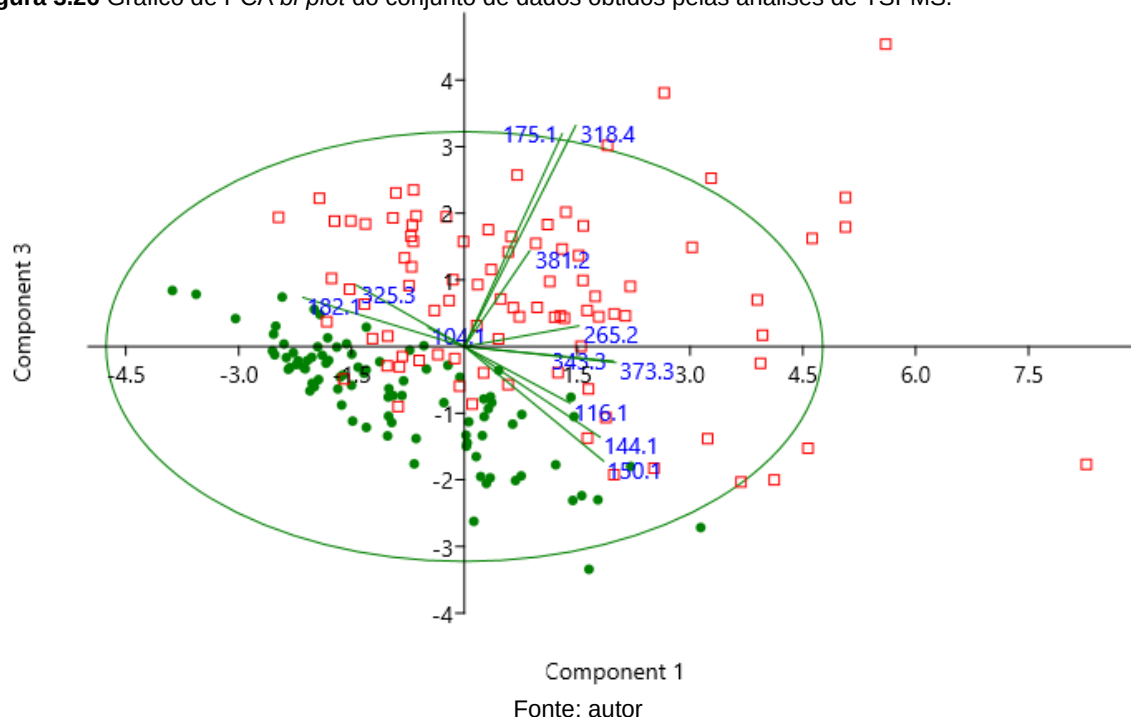
O gráfico de PCA, ilustrado na figura 3.25 (p. 114), demonstrou a formação de dois grupos: NI, representado pelos círculos em verde e IS, representado pelos quadrados em vermelho. O agrupamento dos indivíduos NI encontrou-se em sua

maioria na região inferior do gráfico, correspondente a valores negativos do eixo y. Já os indivíduos IS, dispersaram-se em direção oposta aos indivíduos NI, localizando-se na região correspondente a valores positivos do eixo y. Com base na elipse de confiança de 95%, observa-se que alguns indivíduos infectados se destacaram, aparecendo fora do agrupamento. Estes indivíduos IS supostamente apresentaram maiores intensidades dos íons de m/z 175 e 318, o que está de acordo com a observação do gráfico de *loadings* 3, no qual estas duas variáveis apresentaram maiores intensidades frente às demais.

Figura 3.25 Gráfico de PCA do conjunto de dados obtidos pelas análises de TSI-MS.



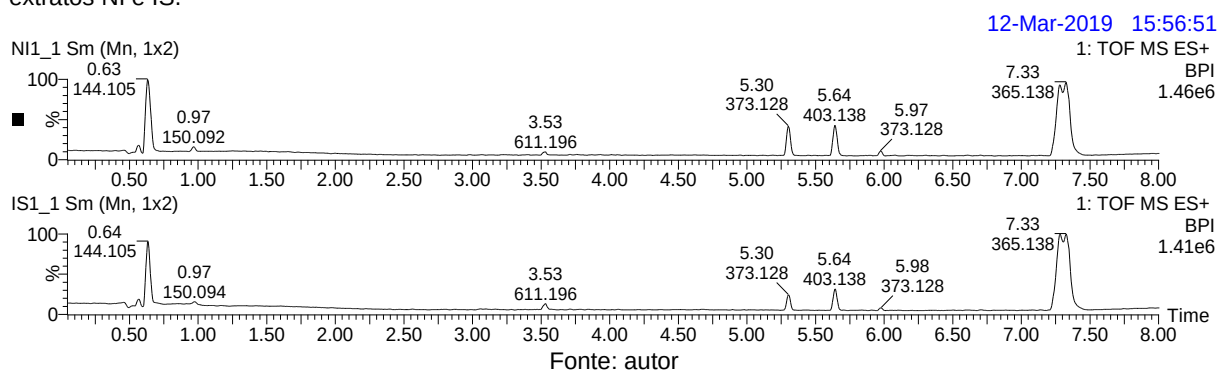
Com a finalidade de avaliar todas as variáveis simultaneamente, foi gerado o gráfico *bi-plot*, no qual são representadas as linhas de tendência das variáveis investigadas. Com base nesse gráfico, representado na figura 3.26 (p. 115), é possível demonstrar com maior clareza o destaque das variáveis arginina (m/z 175) e seu aduto com prolina betaína (m/z 318) no agrupamento dos indivíduos infectados.

Figura 3.26 Gráfico de PCA *bi-plot* do conjunto de dados obtidos pelas análises de TSI-MS.

Neste contexto, a técnica de TSI-MS mostrou-se capaz de diferenciar indivíduos NI e IS com base na intensidade dos marcadores arginina e seu aduto com prolina betaína. Com a intenção de validar esta observação, foram realizados experimentos de UPLC-QqTOF-MS^E dos extratos metanólicos de folhas de indivíduos NI e IS.

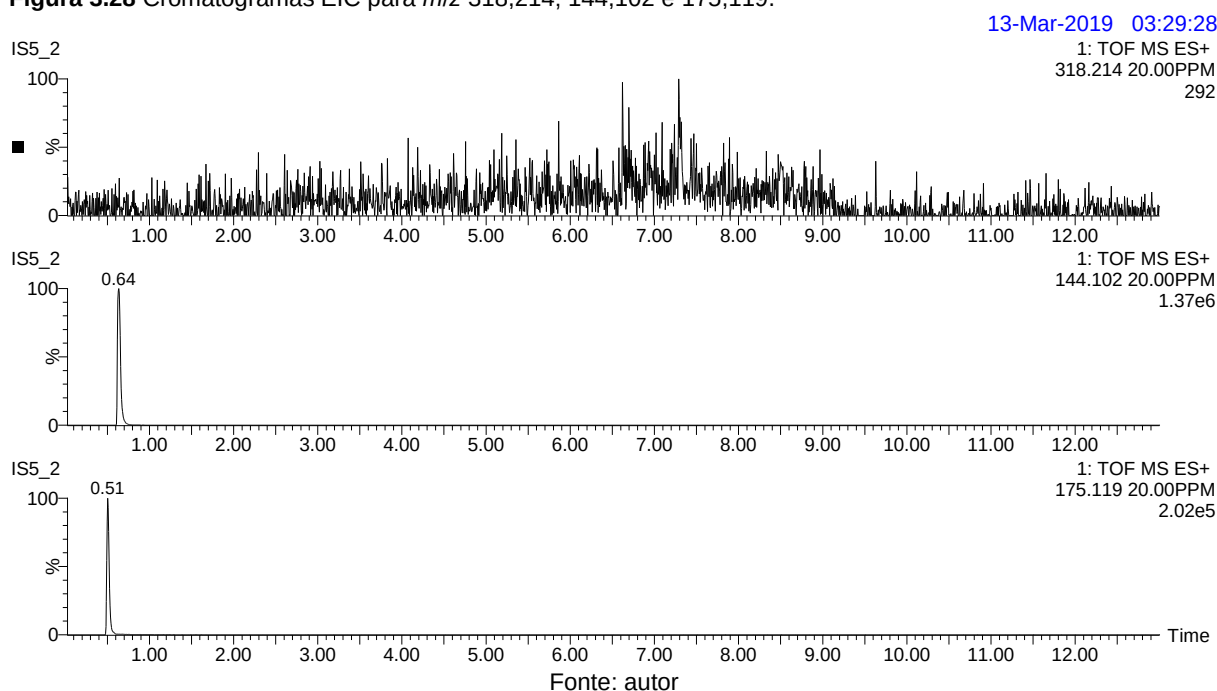
3.4.3 Avaliação dos possíveis biomarcadores por UPLC-ESI-QqTOF-MS^E

A figura 3.27 apresenta os cromatogramas de pico base (BPC) representativos dos extratos de folhas provenientes de indivíduos NI e IS.

Figura 3.27 Cromatogramas de pico base (BPC) obtidos através do experimento de UPLC-QqTOF-MS^E para os extratos NI e IS.

Um fato interessante a ser apontado nos dados de UPLC-ESI-QqTOF-MS^E é a ausência do sinal pertencente ao aduto [ProB+Arg]⁺, cuja m/z calculada é 318,2136. Esta ausência pode ser justificada pela diferença no tempo de retenção destes dois metabólitos, como demonstrado nos cromatogramas de íons extraídos da figura 3.28. Esta diferença implica que o processo de ionização ocorre separadamente para ambos os metabólitos, impedindo a formação desse aduto.

Figura 3.28 Cromatogramas EIC para m/z 318,214; 144,102 e 175,119.

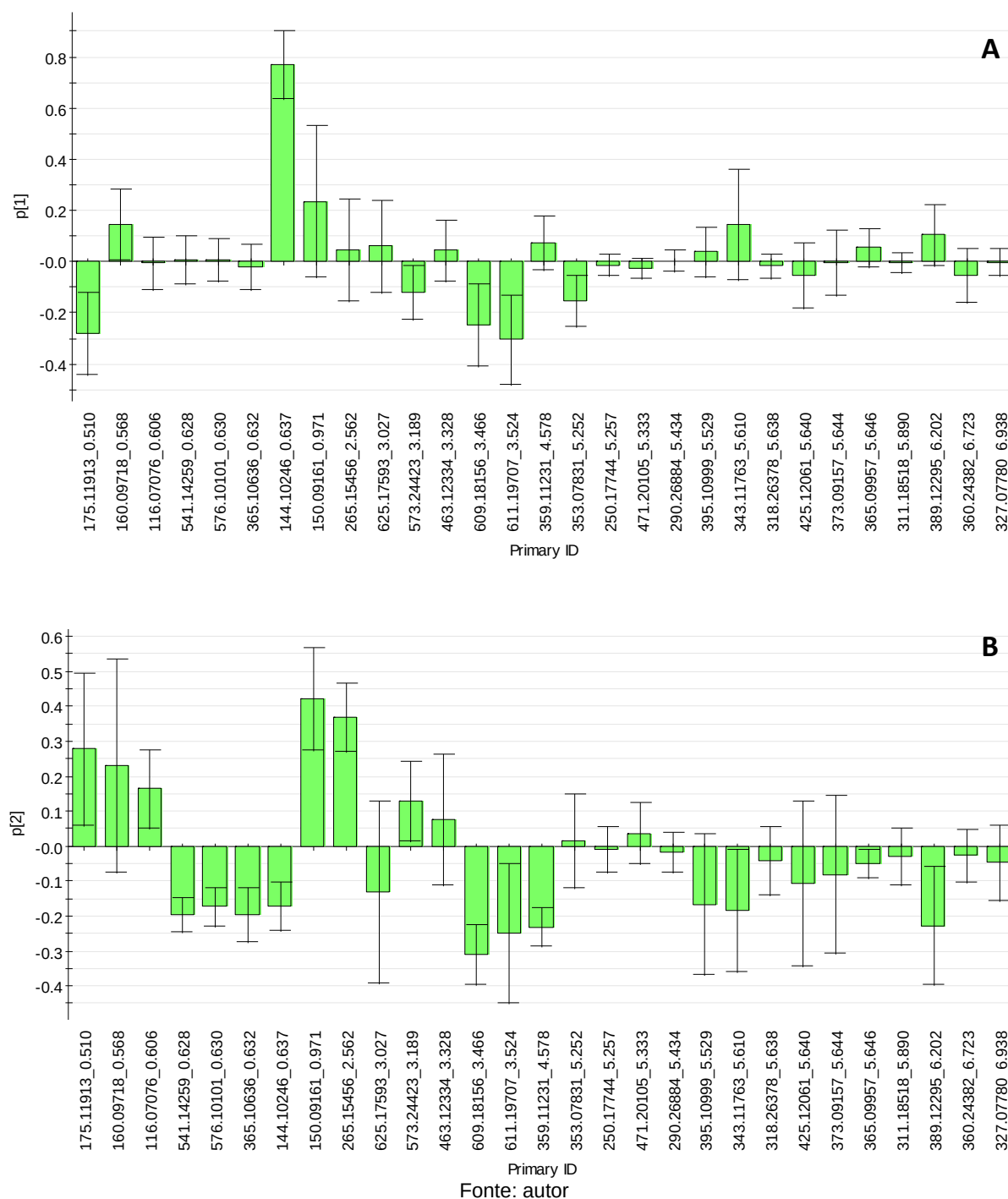


Nesta fase do trabalho, a deconvolução dos dados de cada cromatograma pelo software UNIFI®, gerou os cromatogramas de íons extraídos para cada metabólito detectado. Com base nas intensidades dos sinais e nos tempos de retenção, foi criada uma lista de marcadores a partir da qual foram gerados os gráficos de *loadings* da figura 3.29 (p. 117). A partir do gráfico de *loadings* para a componente 01, pôde-se verificar que a variável de interesse arginina (m/z 175,1191) e as variáveis em m/z 609,1816 e 611,1971 anotadas respectivamente como diosmina e hesperidina, demonstraram possuir maior representatividade no eixo inferior, enquanto no eixo superior, a prolina betaína (m/z 144,1025) apresentou-se como a variável de maior representatividade.

No gráfico de *loadings* para a componente 02 nota-se que as variáveis mais significativas, no eixo superior, foram aquelas que apresentaram m/z 150,0916 (não

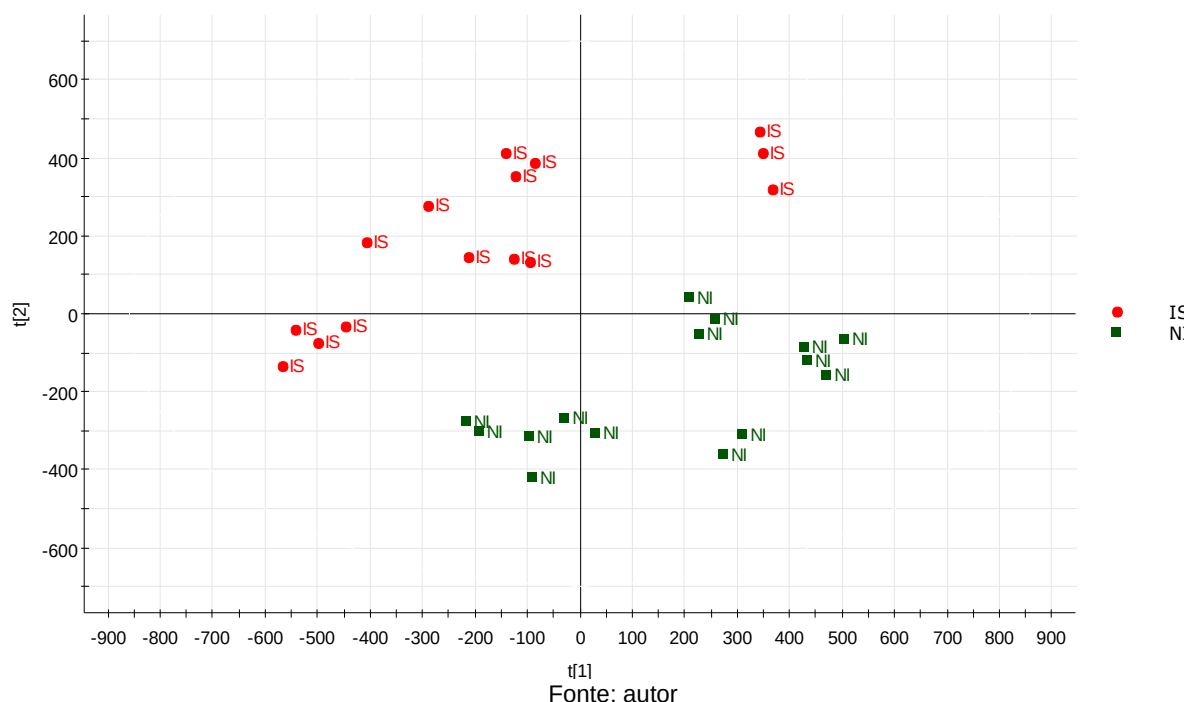
identificada), m/z 265,1546 (feruloilputrescina), e m/z 175,1191 (arginina). Já no eixo inferior, destacaram-se as variáveis em m/z 609,1816 e 611,1971 já mencionadas acima, m/z 359,1123 que pode corresponder às substâncias 5-hidroxi-3',4',6,7-tetrametoxiflavona ou 5-hidroxi-3',4',7,8-tetrametoxiflavona e m/z 389,1229 anotada como 5-desmetil-nobiletina.

Figura 3.29 Gráficos de *loadings* para as componentes 01 (A) e 02 (B).



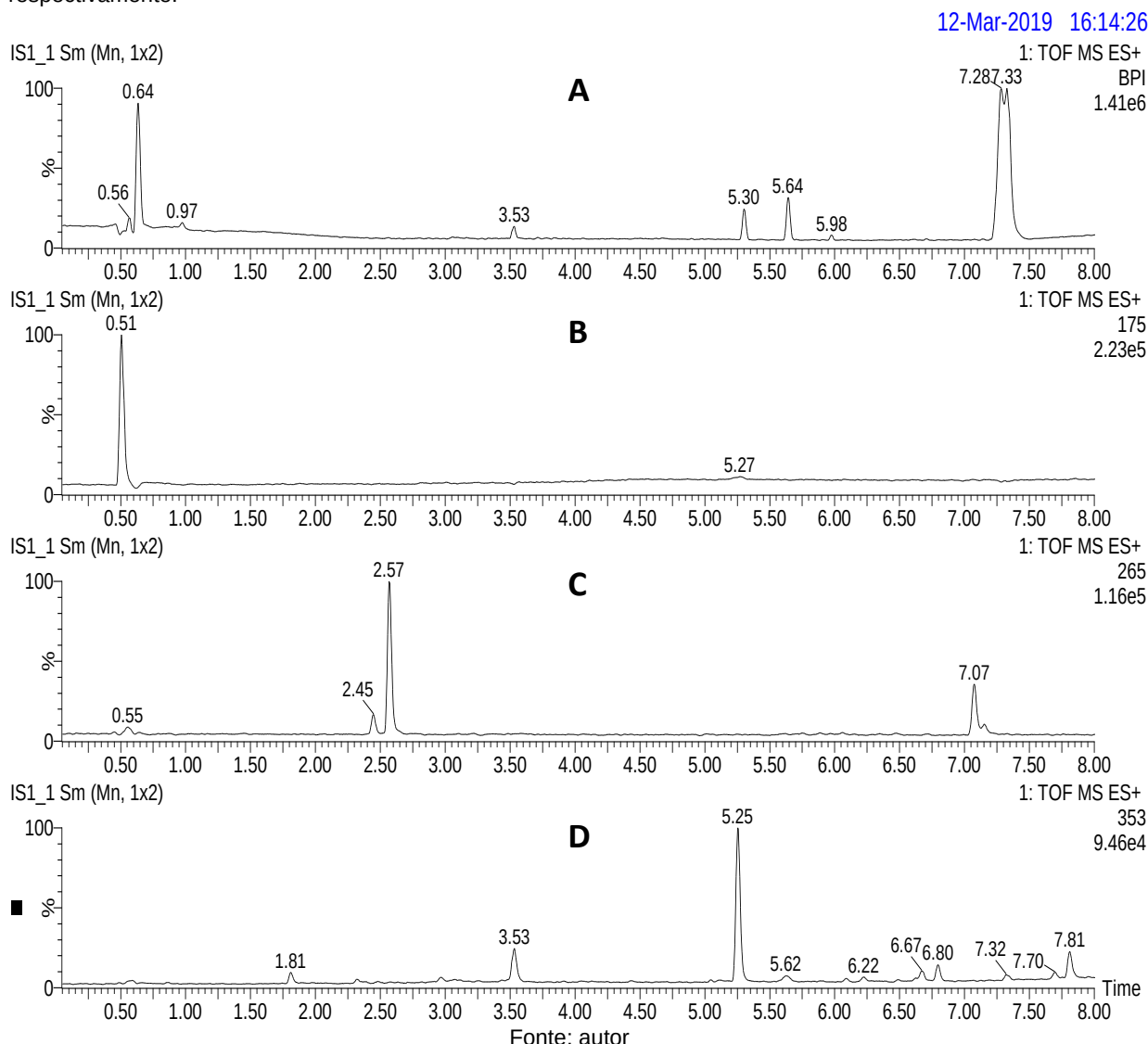
No gráfico de PCA retratado na figura 3.30, pôde-se observar a formação de dois grupos que representam os extratos das folhas de indivíduos NI, indicados pelos quadrados de cor verde e IS, representados por círculos vermelhos. O agrupamento que representa os indivíduos IS apresentou-se majoritariamente no eixo superior do gráfico de PCA, enquanto as amostras provenientes de indivíduos NI agruparam-se no eixo inferior deste gráfico.

Figura 3.30 Gráfico de PCA do conjunto de dados obtidos através das análises de UPLC-QqTOF-MS^E.



As linhas de tendência das variáveis consideradas neste estudo podem ser observadas no gráfico *bi-plot* apresentado na figura 3.31 (p. 119). Verifica-se, a partir deste gráfico que a variável de interesse, correspondente à arginina (m/z 175,1191), apresentou grande contribuição para o agrupamento dos indivíduos IS. Curiosamente, nestes experimentos pôde-se verificar que a variável feruloilputrescina (m/z 265,1546) também apresentou relevância para a ocorrência deste agrupamento no eixo superior do gráfico de PCA. Esta observação é corroborada pelos dados de TSI-MS, cujo gráfico *bi-plot* apresentado na figura 3.26 (p. 115) também apresenta uma linha de tendência para essa variável no agrupamento das amostras de indivíduos IS.

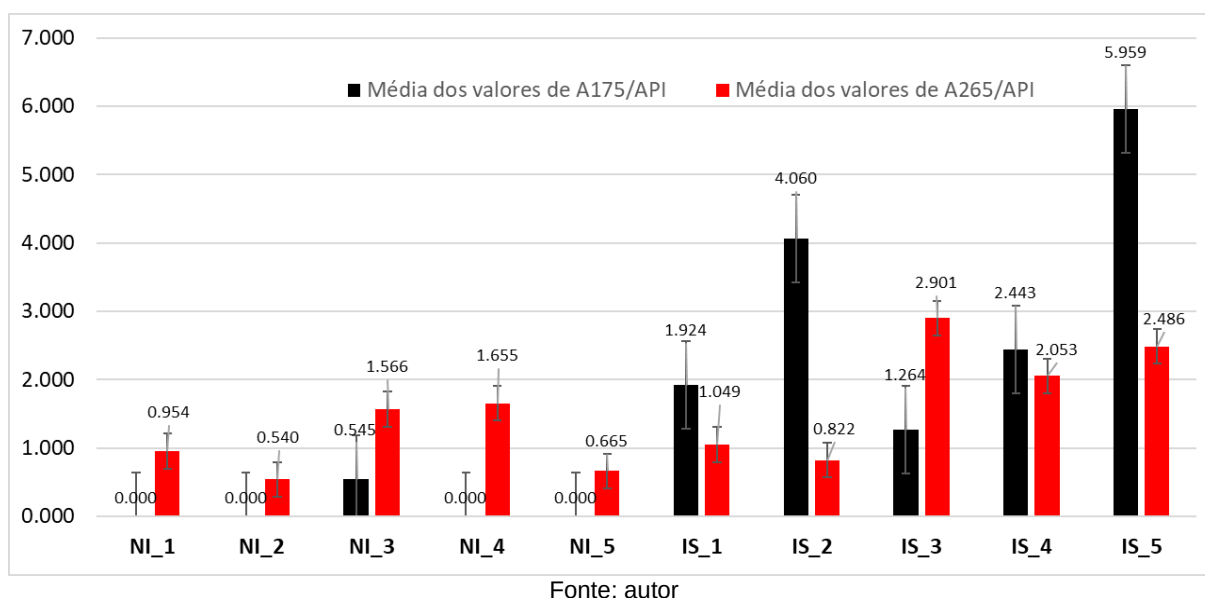
Figura 3.32 Cromatogramas BPC (A) e EIC (B, C e D) representativos de indivíduos IS. (B) representa o cromatograma obtido pela extração da razão m/z 175, enquanto C e D representam as razões m/z 265 e 353 respectivamente.



Os valores normalizados das áreas foram utilizados para gerar o gráfico de barras da figura 3.33 (p. 121), no qual tem-se no eixo y a média da razão das áreas das bandas cromatográficas correspondentes aos metabólitos de interesse pela área do padrão interno e no eixo x, as replicatas das amostras analisadas. Os valores de área e as médias juntamente com o desvio padrão encontram-se nas tabelas dos apêndices G (p. 165), H e I (p. 166). A análise do gráfico permitiu observar que em quatro das cinco amostras NI analisadas, o aminoácido arginina não foi detectado. Nas replicatas da amostra NI_3, o valor da média da razão A_{175}/API foi de 0,545. Em contrapartida, a arginina foi detectada em todas as amostras oriundas de indivíduos IS, sendo que os valores das médias de A_{175}/API situaram-se na faixa de 1,264 a

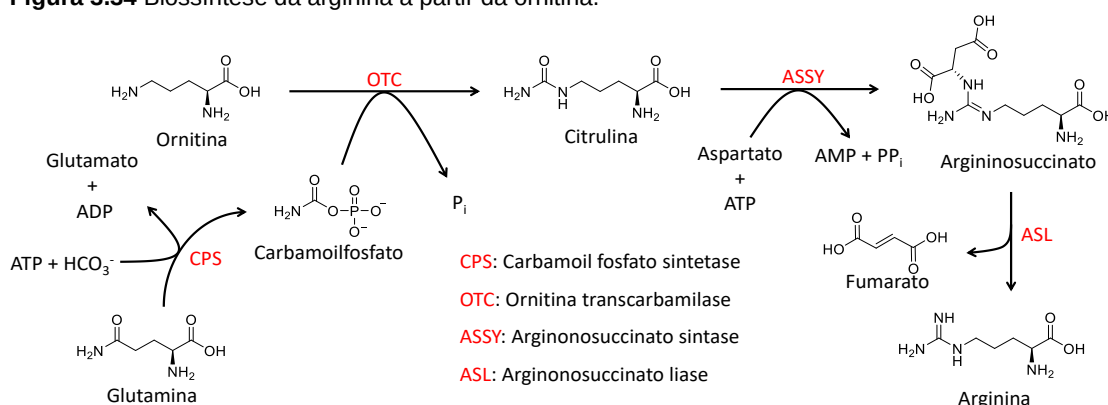
5,959. No caso da feruloilputrescina, as amostras IS mostraram uma tendência a apresentar maiores valores da média de A_{265}/API , sendo que estes valores foram maiores para as triplicatas das amostras IS_3, IS_4 e IS_5.

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.



Os resultados obtidos demonstraram que a arginina foi encontrada em maior teor em plantas infectadas com *Candidatus Liberibacter asiaticus*. A biossíntese linear deste metabólito, retratada na figura 3.34 (p. 122), envolve a formação do carbamoilfosfato a partir da glutamina e do ânion hidrogenocarbonato, por ação da enzima carbamoil fosfato sintetase. O grupo carbamoilfosfato gerado é utilizado na carbamilação da ornitina catalisada pela enzima ornitina transcarbamilase, que gera como produto a citrulina.⁴³ Esse metabólito, por sua vez, sofre a ação da enzima argininosuccinato sintase, reagindo com aspartato, fonte do terceiro átomo de nitrogênio que formará o grupo guanidila da arginina, dando origem à substância argininosuccinato.⁴⁴ Por fim, a enzima argininosuccinato liase é responsável por liberar uma molécula de ácido fumárico, dando origem à arginina.⁴⁵

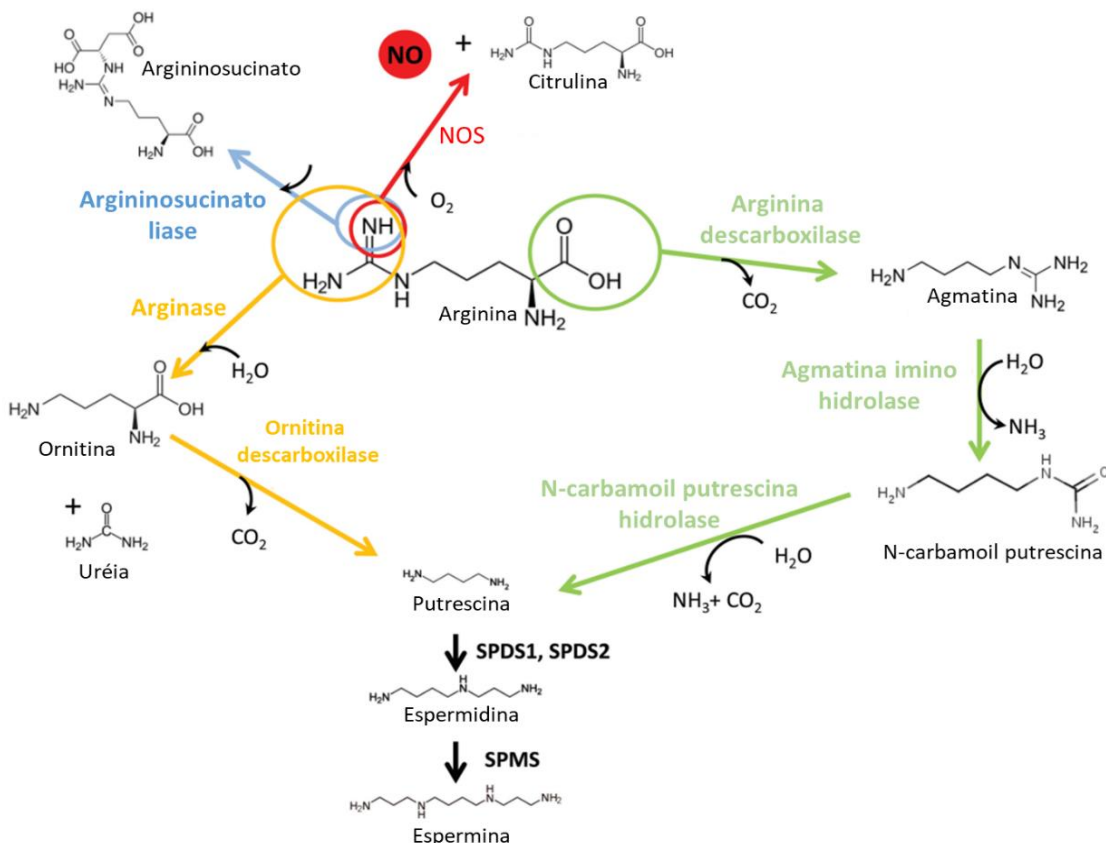
Figura 3.34 Biossíntese da arginina a partir da ornitina.



Fonte: adaptado da ref. [43]

No reino vegetal, o metabolismo da arginina, representado na figura 3.35, é responsável pela formação de substâncias que desempenham importantes funções na sinalização de defesa em situações de estresse abiótico e biótico, dentre elas o óxido nítrico (NO).⁴⁶ A produção deste metabólito ocorre pela dupla mono-oxigenação catalisada por uma enzima do tipo óxido nítrico sintase (*nitric oxide synthase* -NOS), que acarreta a conversão da arginina a citrulina.⁴⁷

Figura 3.35 Metabolismo da arginina demonstrando a formação de óxido nítrico e das poliaminas.



Fonte: adaptado da ref. [44]

Após sua formação, o óxido nítrico induz a expressão de genes de defesa como aqueles que codificam a produção da fenilalanina amônia liase (*phenylalanine ammonia lyase* – PAL).⁴⁸ Esta enzima é responsável por catalisar a transdesaminação da fenilalanina para gerar o ácido cinâmico, precursor dos fenilpropanóides, como por exemplo os ácidos cafeico, ferúlico e sinápico.⁴⁹ Compostos desta classe possuem a capacidade de induzir barreiras físicas e podem agir como antagonistas químicos contra microrganismos patogênicos.^{50; 51; 52}

A arginina também é precursora das poliaminas, uma importante classe de metabólitos que, nas plantas, estão relacionados a defesa, já que seu metabolismo está intimamente ligado à formação de espécies reativas de oxigênio, responsáveis pelo processo de resposta hipersensitiva, que envolve a morte de células vegetais na região onde ocorre a infecção.⁵³ A formação das poliaminas pode ocorrer a partir de duas vias ilustradas na figura 3.35. Em uma delas, indicada em amarelo, a arginina é convertida a ornitina e ureia pela enzima arginase. Posteriormente a ornitina sofre uma descarboxilação catalisada pela enzima ornitina descarboxilase dando origem à putrescina.⁵⁴ Na via descrita em verde, a enzima arginina descarboxilase catalisa a descarboxilação da arginina gerando como produto a agmatina que por sua vez é transformada em n-carbamoilputrescina através de uma reação catalisada pela enzima agmatina imino hidrolase. O produto desta reação é convertido em putrescina por ação da enzima n-carbamoilputrescina hidrolase.⁵⁵ A putrescina é a precursora de outras poliaminas como a espermidina e a espermina. As enzimas espermidinas sintases 1 e 2 são responsáveis por converter a putrescina em espermidina, pela transferência de um grupo aminopropil proveniente de uma S-adenosilmetionina descarboxilada à putrescina. A mesma transferência, agora catalisada pela espermina sintase, pode ocorrer tendo-se como substrato a espermidina, o que resulta, por fim, na molécula de espermina.⁵⁶

A putrescina e o ácido ferúlico, são os precursores da feruloilputrescina, uma substância da classe das amidas de ácidos hidroxicinâmicos (*hydroxycinnamic acid amides* – HCAA). Sua biossíntese consiste em uma reação de condensação entre a putrescina e o ácido ferúlico, catalisada pela enzima putrescina hidroxicinamoil-transferase.⁵⁷ Embora haja relatos de que metabólitos da classe das HCAAs são acumulados por plantas em situações de estresse biótico, sua função no mecanismo de defesa ainda não foi claramente descrita. No entanto, algumas propostas sugerem

que as HCAAs podem ser utilizados diretamente como agentes antimicrobianos, no espessamento da parede celular como resposta ao ataque de agentes patológicos, ou ainda como moléculas sinalizadoras.⁵⁸

3.5 CONCLUSÃO

A técnica de TSI-MS demonstrou ser capaz de diferenciar folhas de indivíduos NI e IS pela intensidade dos sinais correspondentes ao aminoácido arginina e seu aduto com prolina betaína. Os resultados obtidos puderam ser comprovados pelas análises de UPLC-QqTOF-MS^E dos extratos metanólicos de folhas de *Citrus sinensis*, os quais também apontaram uma tendência para maior produção da feruloilputrescina em indivíduos IS. Sob o ponto de vista biossintético, foi possível estabelecer uma relação entre a maior intensidade do sinal da arginina e a tendência à maior produção de feruloilputrescina, ambas apresentadas por indivíduos IS, com a possibilidade de produção de substâncias conhecidamente envolvidas em respostas a estresse metabólico causados pela infecção. Por esse motivo, a arginina pôde ser considerada um marcador para o HLB nas condições em que os indivíduos se encontravam. A técnica de TSI-MS mostrou-se bastante eficiente, provendo análises rápidas, com preparo de amostras bastante simplificado, dispensando a necessidade de extração dos metabólitos. Além disso, o uso de pequenas quantidades de solvente durante as análises representa uma grande vantagem frente às técnicas cromatográficas, o que coloca a TSI-MS em uma posição de destaque considerando-se os conceitos da química verde.

3.6 REFERÊNCIAS

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*" in 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* Kuwayama. **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.

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.

4.1 INTRODUÇÃO

A investigação acerca da história e da autenticidade de documentos integra o campo de estudos denominado documentoscopia forense.¹ Um documento pode ser elaborado de diversas formas, dentre elas por meio de impressão eletrônica ou mecânica, ou ainda, por escrita manual com lápis e canetas esferográficas.² Muitas questões da documentoscopia forense, principalmente aquelas relacionadas com a adulteração de documentos, podem ser estudadas pela análise da composição química das tintas que foram utilizadas na elaboração de um determinado documento.^{3; 4}

Nesse cenário, a química forense desempenha um papel fundamental pois fornece um poderoso conjunto de ferramentas analíticas capazes de promover a identificação de corantes em tintas.^{5; 6} Várias técnicas analíticas foram utilizadas na investigação de adulteração de documentos escritos com canetas esferográficas, com destaque para a cromatografia e para a espectrometria de massas.⁷⁻⁹

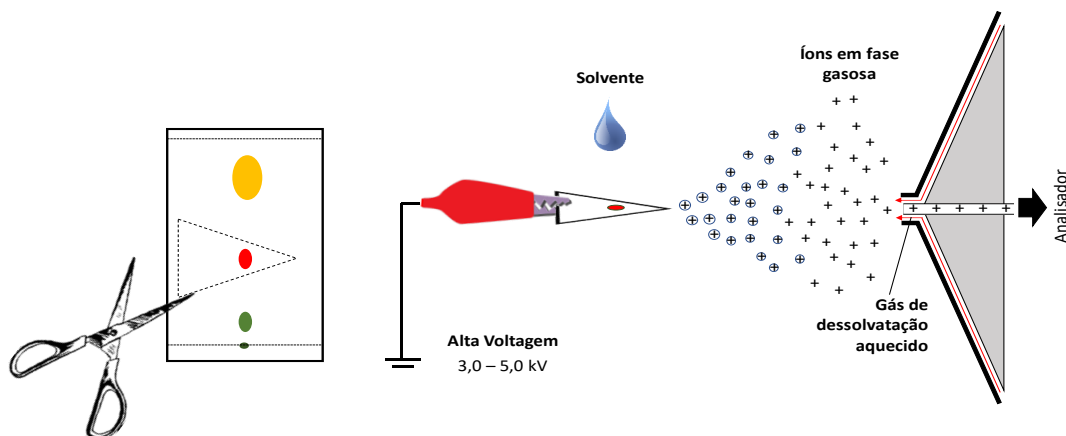
A cromatografia é uma técnica físico-química de separação de substâncias contidas em uma mistura. Essa separação ocorre devido à diferença das velocidades de migração de cada componente da mistura, transportados por uma fase móvel, ao longo de uma fase estacionária.¹⁰ Na cromatografia planar, a fase estacionária encontra-se distribuída sobre uma superfície plana enquanto a fase móvel, em estado líquido é geralmente constituída por uma mistura de solventes.¹¹

As poliamidas figuram entre os materiais utilizados como fase estacionária em cromatografia planar.¹² Sua utilização na cromatografia em camada delgada permitiu

dentre outras aplicações, a separação de catequinas¹³ e a análise de corantes alimentícios.¹⁴ Além disso, membranas de poliamida modificadas foram amplamente utilizadas na purificação de macromoléculas biológicas.¹⁵ No entanto, até o momento, não há relatos do emprego desta fase estacionária na análise dos corantes constituintes de tintas de caneta esferográfica.

Avanços tecnológicos recentes ocorridos no campo da espectrometria de massas possibilitaram seu acoplamento à cromatografia planar.¹⁶⁻¹⁹ Nesse contexto, as técnicas de ionização a pressão ambiente^{16; 20} desempenharam um papel muito importante, pois simplificaram sobremaneira o preparo de amostras,²¹ permitindo a análise direta das bandas cromatográficas geradas na separação.²² Um dos exemplos mais significativos deste tipo de técnica corresponde à ionização por *paper spray* (*paper spray ionization* – PSI),²³⁻²⁶ cujo acoplamento com a cromatografia planar está ilustrado na figura 4.1. Este conceito, aplicado à análise de bandas cromatográficas obtidas por separação em membrana de poliamida foi denominado ao longo deste trabalho, de ionização por *membrane spray* (*membrane spray ionization* – MeSI).

Figura 4.1 Esquema representativo da análise por cromatografia planar acoplada à espectrometria de massas.



Fonte: autor

Neste trabalho membranas de poliamida 66, comumente utilizadas na filtração de solventes, foram empregadas como fase estacionária no desenvolvimento de uma metodologia de baixo custo para a análise forense da composição de tintas de caneta esferográfica por cromatografia planar acoplada à MeSI-MS. O método desenvolvido foi aplicado na detecção de adulteração em documentos.

4.2 OBJETIVOS

No contexto do objetivo central da tese, esse trabalho consistiu no desenvolvimento de uma metodologia para detecção de adulterações em documentos escritos com canetas esferográficas, com base na identificação dos corantes empregados em suas tintas, por cromatografia em membrana de poliamida 66 (*polyamide membrane chromatography*-PMC) acoplada à espectrometria de massas (PMC-MeSI-MS). Os objetivos específicos envolveram:

1. o desenvolvimento de uma metodologia de análise de baixo custo para a identificação de corantes oriundos de tinta de caneta esferográfica por PMC-MeSI-MS utilizando materiais comuns em laboratórios químicos;
2. a elaboração de um método de amostragem da tinta empregada na escrita de um documento, visando sua transferência à membrana cromatográfica de poliamida sem ocorrência de danos que prejudiquem a interpretação do texto;
3. a aplicação do método de identificação de corantes, desenvolvido nos itens 1 e 2, na detecção de adulterações em documentos.

4.3 MATERIAIS E MÉTODOS

Membranas de poliamida 66 circulares com diâmetro de 47,0 mm e tamanho de poro de 0,2 μm (Whatman, Maidstone, Inglaterra) foram utilizadas como fase estacionária para cromatografia planar. Para promover a separação dos compostos, foi utilizado etanol com grau de pureza HPLC (Panreac, Darmstadt, Alemanha) como fase móvel. Ácido acético glacial P.A. ACS (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) e hidróxido de amônio 28-30% (JTBaker, Phillipsburg, EUA) foram empregados como modificadores de fase móvel. Foram analisadas as tintas das canetas Bic Crystal® preta, azul, vermelha e roxa, além das canetas pretas Kilometrica®, da marca Papermate, Top 2000®, da fabricante Compactor e Office®, da Jocar.

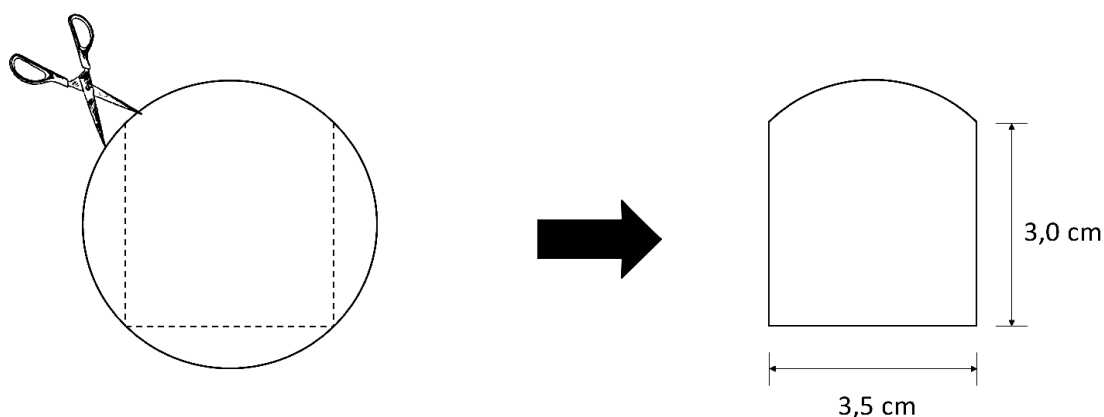
Uma câmara de luz ultravioleta UV Cabinet 4 (Cammag, Muttenz, Suíça) foi utilizada como uma forma auxiliar de revelação das bandas cromatográficas após separação por cromatografia em membrana de poliamida.

Os experimentos de espectrometria de massas das bandas cromatográficas de interesse foram realizados pela técnica denominada ionização por *membrane spray* (*membrane spray ionization* - MeSI) utilizando um espectrômetro de massas Amazon® (Bruker, Bremen, Alemanha) com configuração ESI-IT-MS, equipado com uma fonte de ionização modificada de modo a permitir a aplicação dessa técnica.

4.3.1 Análise por PMC

Para permitir sua aplicação nas análises de PMC, as membranas de poliamida foram cortadas de modo a produzir base e laterais retilíneas, com as dimensões especificadas na figura 4.2.

Figura 4.2 Preparação da membrana para realização dos experimentos de cromatografia planar.



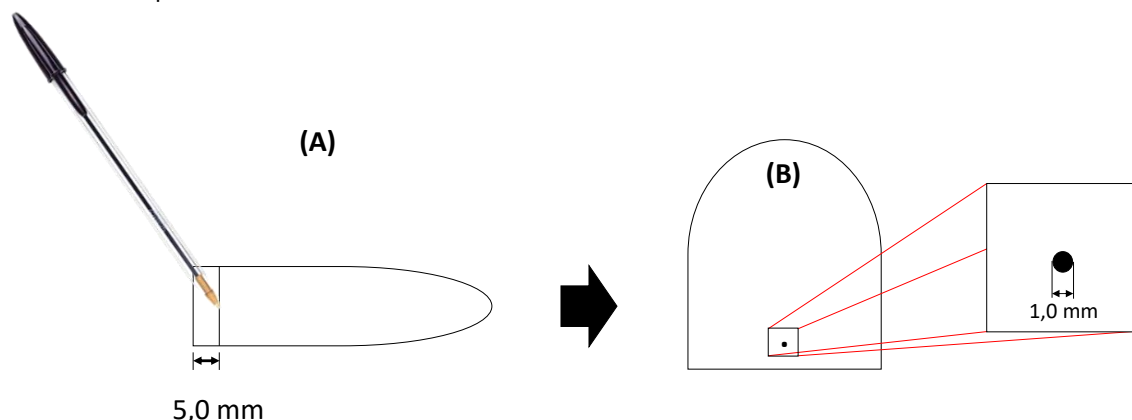
Fonte: autor

Os métodos de preparo de amostra, descritos a seguir, variaram de acordo com o propósito das análises.

4.3.1.1 Preparo de amostras para a identificação dos corantes de tinta de caneta esferográfica por PMC-MeSI-MS

O preparo de amostras para as análises da composição química de tinta de caneta por PMC-MESI-MS, foi realizado aplicando-se uma pequena mancha de aproximadamente 1,0 mm com a própria ponta da caneta a 5,0 mm da margem inferior da membrana como ilustrado na figura 4.3 (p. 135).

Figura 4.3 Esquema da metodologia utilizada na aplicação da amostra de tinta de caneta esferográfica na membrana de poliamida.

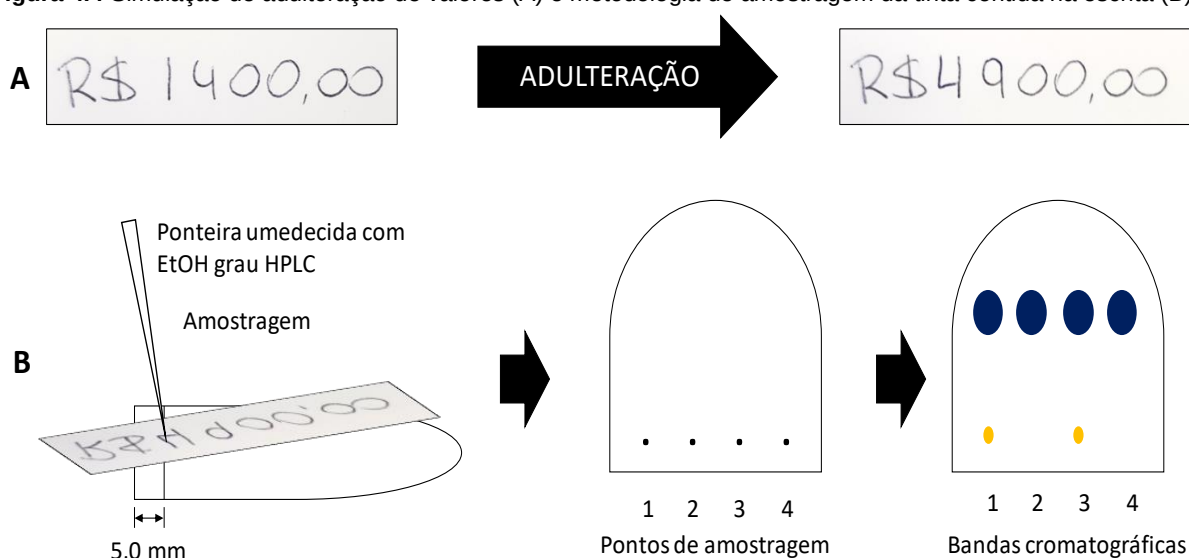


Fonte: autor

4.3.1.2 Preparo de amostra para a detecção de adulterações de escrita por PMC-MeSI-MS

A metodologia utilizada na análise da adulteração de documentos foi desenvolvida partindo-se de uma simulação de falsificação de valores. Nessa simulação, em um primeiro momento, utilizou-se uma caneta Bic Crystal® preta para escrever em folha de papel A4 o valor de R\$1400,00. Posteriormente, este valor foi adulterado para R\$4900,00 utilizando-se uma caneta de mesma cor, modelo Office®, da marca Jocar, como ilustrado pela figura 4.4.

Figura 4.4 Simulação de adulteração de valores (A) e metodologia de amostragem da tinta contida na escrita (B).



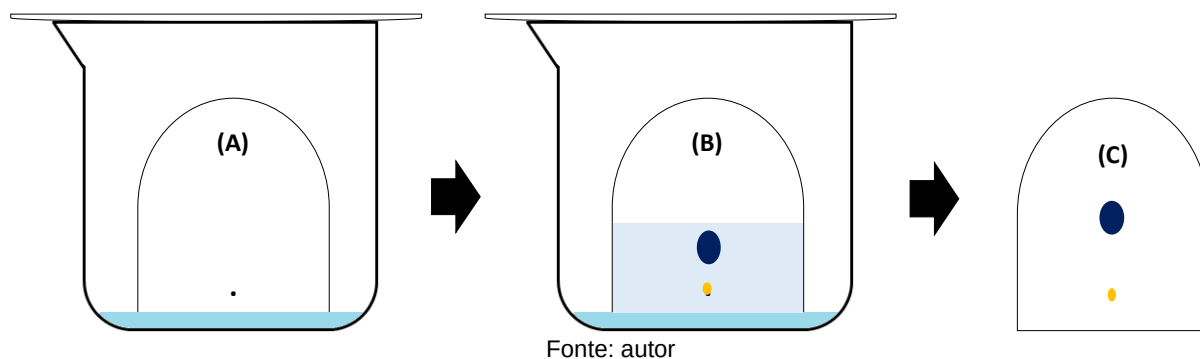
Fonte: autor

No procedimento de amostragem da tinta nas regiões de interesse, uma ponteira de micropipeta umedecida com EtOH grau de pureza HPLC, foi utilizada para pressionar o verso da escrita sobre o ponto de aplicação da membrana de poliamida, fazendo com que este solvente solubilizasse a tinta, transferindo-a para a membrana. Após este procedimento, promoveu-se prontamente a separação de componentes das tintas por PMC.

4.3.1.3 Eluição das amostras

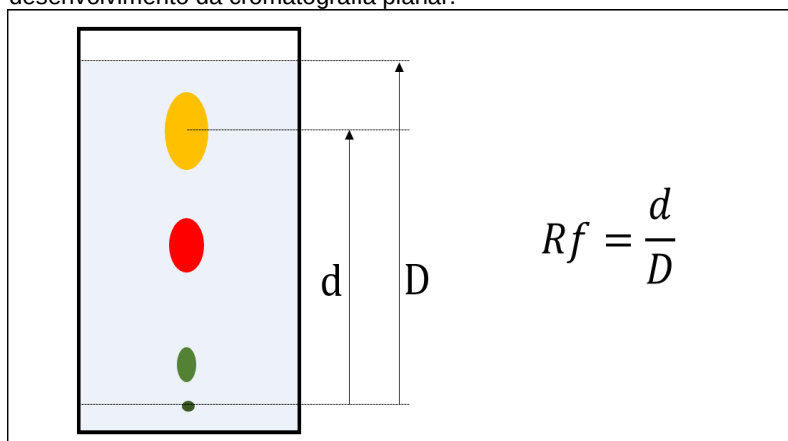
A separação das amostras, esquematizada na figura 4.5, foi realizada em um Becker de 100,0 mL, cuja extremidade foi fechada por um vidro de relógio. EtOH grau de pureza HPLC foi utilizado como eluente, ao qual, em alguns casos, foram adicionados os modificadores ácido acético ou hidróxido de amônio, ambos na concentração de 0,5% v/v. As corridas cromatográficas foram realizadas em sala climatizada, com temperatura média de 23 °C e interrompidas no momento em que a frente de solvente atingiu a altura de 3,0 cm em relação à base da membrana.

Figura 4.5 Esquema do procedimento de eluição das amostras de tintas de caneta esferográfica.



Os fatores de retenção (*retention fator* - R_f) de cada banda cromatográfica foram calculados através da razão entre a distância percorrida pela banda em questão (d), medida do ponto de aplicação até seu centro, e a distância percorrida pela frente de solvente (D), como ilustrado na figura 4.6 (p. 137).

Figura 4.6 Cálculo do fator de retenção das bandas cromatográficas após desenvolvimento da cromatografia planar.



Fonte: autor

4.3.2 Análise das bandas cromatográficas por MeSI-MS e MeSI-MS/MS

Para a realização das análises de MeSI-MS e MeSI-MS/MS, promoveu-se um corte triangular da região que continha as bandas cromatográficas, posicionando-as, posteriormente, a uma distância de 8,0 mm do cone de amostragem do espectrômetro de massas. Para a aquisição do espectro de massas, adicionou-se sobre a amostra 10,0 µL de EtOH grau HPLC e, em seguida, aplicou-se na entrada do capilar de transferência a tensão de -4500 V (modo positivo) ou +4500 V (modo negativo), a depender das características do analito. O gás de dessolvatação foi mantido a uma vazão de 2,0 Lmin⁻¹ e a uma temperatura de 250,0 °C. A faixa de aquisição utilizada nos experimentos foi de *m/z* 50-1000. O tempo máximo de acúmulo de íons no analisador foi ajustado a 50 ms. Os espectros de MeSI-MS foram gerados a partir de uma média de 5 espectros consecutivos. Os experimentos de MeSI-MS/MS foram realizados no modo *AutoMS/MS* no qual apenas íons com contagem superior a 5x10⁴ foram fragmentados. A janela de isolamento foi ajustada a 3 unidades de razão *m/z*. A fragmentação dos íons foi realizada por dissociação induzida por colisão (*collision induced dissociation* - CID), utilizando hélio como gás de colisão. A ativação dos íons foi realizada através de uma rampa de potencial de 0,4 a 4,0 V por ciclo de fragmentação. Em alguns casos os espectros de MS/MS foram adquiridos no modo manual MS/MS com a finalidade de otimizar as intensidades dos sinais do íon precursor e dos fragmentos e diminuir o nível de ruído do espectro de massas.

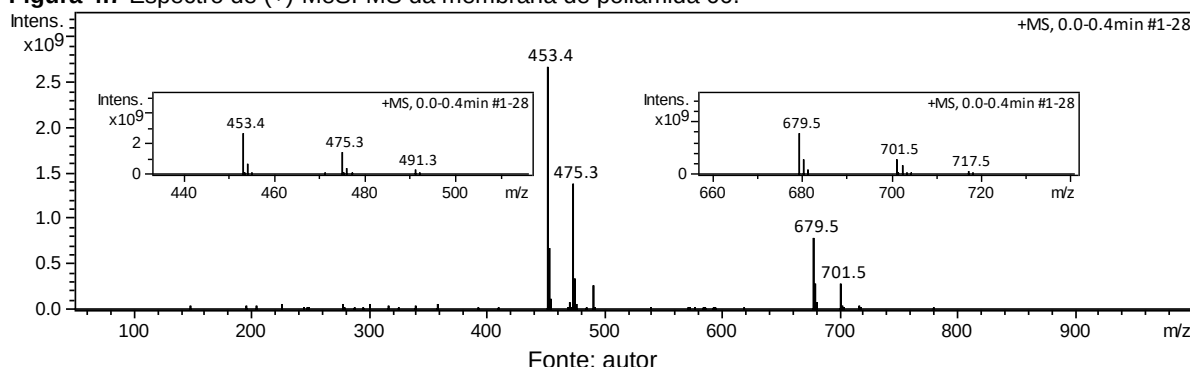
4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No desenvolvimento deste estudo, EtOH grau de pureza HPLC foi utilizado em todos os experimentos como solvente extrator e fase móvel de modo a diminuir o risco químico das metodologias desenvolvidas, considerando a toxicidade dos solventes empregados.

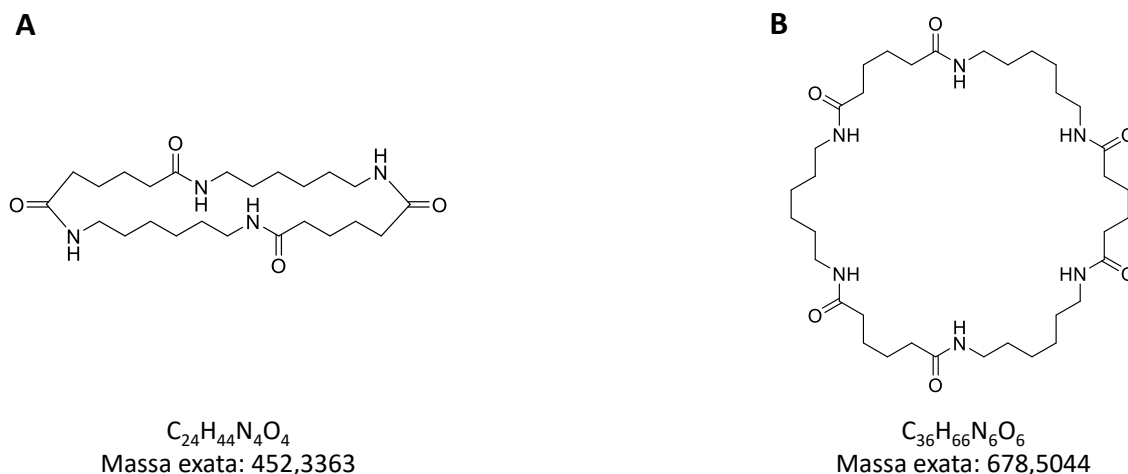
4.4.1 Aplicação da PMC-MeSI-MS na análise qualitativa de tintas de canetas esferográficas

Inicialmente analisou-se um exemplar da membrana de poliamida utilizada nos experimentos por (+)-MeSI-MS/MS com a finalidade de anotar os possíveis contaminantes oriundos da própria membrana. O espectro adquirido em modo positivo (Figura 4.7), apresentou dois grupos de sinais em m/z 453, 475 e 491; e m/z 679, 701 e 717. Em cada grupo, a diferença de m/z do primeiro para o segundo sinal foi de 22 unidades e do segundo para o terceiro, de 16 unidades. Este padrão é característico da formação de íons correspondentes à molécula protonada $[M+H]^+$, e cationizada, com formação de aduto com íons sódio $[M+Na]^+$ e potássio $[M+K]^+$. A partir desta observação, pôde-se constatar que apenas dois contaminantes interferem nas análises de (+)-MeSI-MS.

Figura 4.7 Espectro de (+)-MeSI-MS da membrana de poliamida 66.

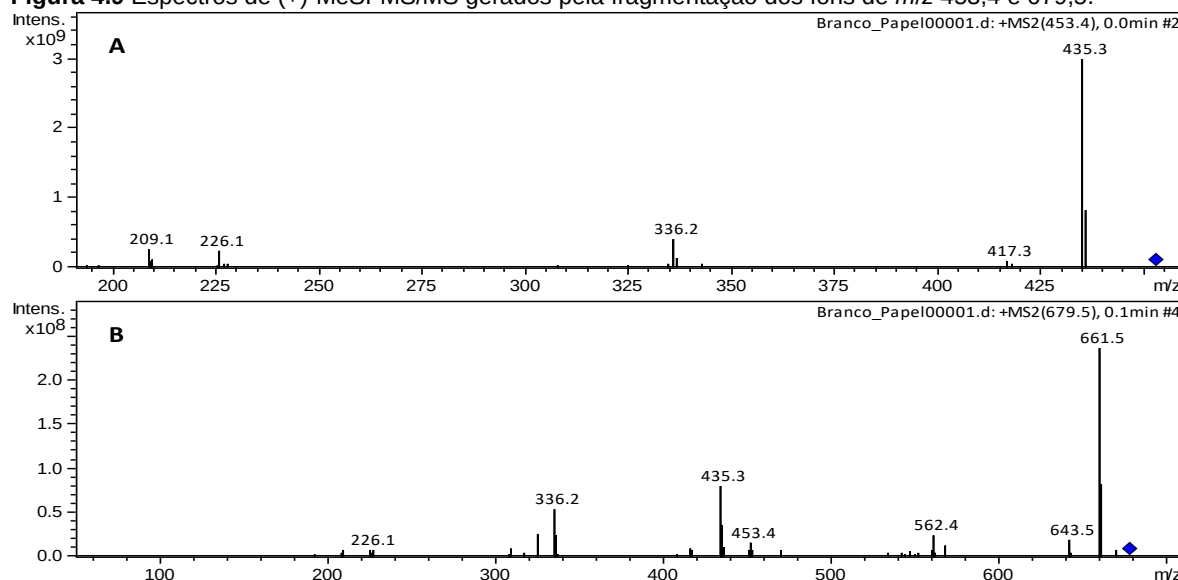


Com base em dados da literatura, pôde-se inferir que os dois grupos de sinais observados no espectro de MeSI-MS da membrana de poliamida correspondem a dois oligômeros cíclicos de poliamida 66.²⁷ As estruturas destes oligômeros encontram-se apresentadas na figura 4.8 (p. 139).

Figura 4.8 Estrutura química do dímero (A) e do trímero (B) de poliamida 66 descritos na literatura.

Fonte: autor

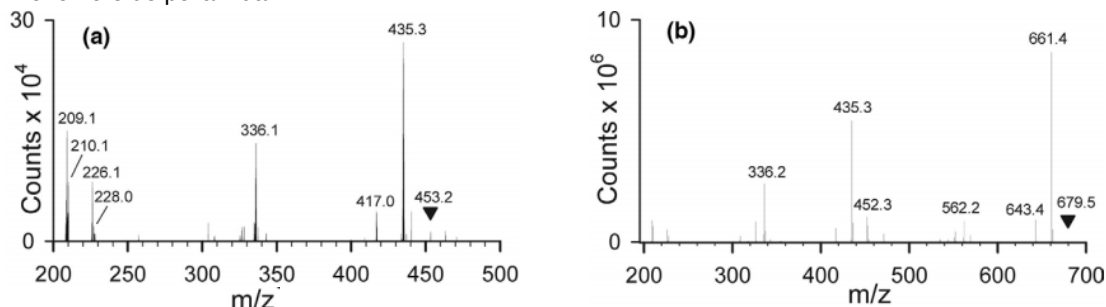
Com a finalidade de confirmar a estrutura destes contaminantes, foram realizados experimentos de MeSI-MS/MS, nos quais promoveu-se a dissociação dos íons de m/z 453 e 679. Os espectros de MS/MS adquiridos nessas análises encontram-se apresentados na figura 4.9.

Figura 4.9 Espectros de (+)-MeSI-MS/MS gerados pela fragmentação dos íons de m/z 453,4 e 679,5.

Fonte: autor

A comparação dos espectros de MS/MS adquiridos neste experimento com aqueles relatados na literatura (Figura 4.10, p. 140) permitiu comprovar a presença destes oligômeros na membrana analisada, já que o mesmo padrão de fragmentação foi observado.

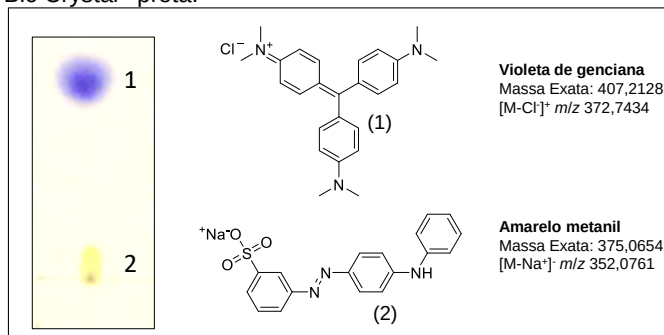
Figura 4.10 Espectros de (+)-ESI-MS/MS de oligômeros contendo duas (a) e três unidades (b) do monômero de poliamida.



Fonte: adaptado da ref. [27]

Após a anotação dos íons contaminantes, inicialmente analisou-se a tinta da caneta Bic Crystal® preta. No cromatograma obtido, apresentado na figura 4.11, foram observadas duas bandas: uma de coloração amarela, que apresentou uma maior retenção na membrana ($R_f = 0,05$), e outra banda de coloração violeta, que, por sua vez apresentou uma menor retenção ($R_f = 0,9$).

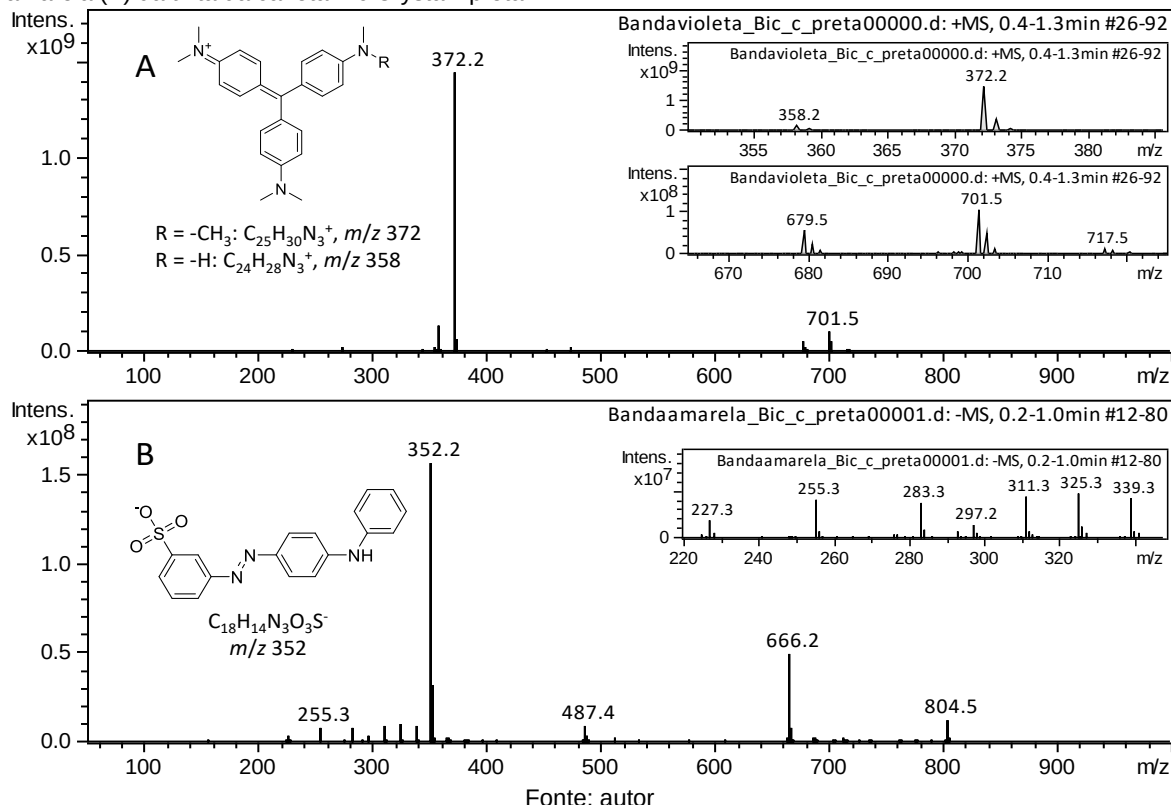
Figura 4.11 Cromatograma de tinta da caneta esferográfica Bic Crystal® preta.



Fonte: autor

Consta na literatura consultada que a tinta utilizada na caneta esferográfica Bic® preta é composta majoritariamente de dois componentes, o corante violeta de genciana e o amarelo de metanila, comercializados na forma de sais, cujas estruturas estão apresentadas na figura 4.11.²⁸ Para confirmar a identidade destes corantes, as duas bandas cromatográficas foram isoladas cortando-se a região que as compreende na forma de um triângulo. Essas partes da membrana foram então levadas ao espectrômetro de massas e acopladas à fonte de ionização do equipamento. Os espectros das bandas violeta, adquirido no modo positivo e amarela, adquirido no modo negativo encontram-se representados na figura 4.12 (p. 141).

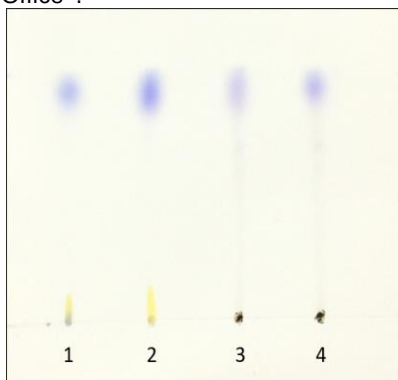
Figura 4.12 Espectros de (+)-MeSI-MS da banda de coloração violeta (A) e (-)-MeSI-MS da banda de coloração amarela (B) da tinta da caneta Bic Crystal® preta.



O espectro da banda violeta, apresentou um intenso sinal em m/z 372,2, correspondente ao íon $[M-Cl]^+$ do composto violeta de genciana. Neste mesmo espectro também é evidente a presença do sinal em m/z 358,2, que corresponde a um homólogo dessa substância, o qual apresenta deficiência de um grupo metila, o que explica a diferença de massa molecular de 14,0 Da. O espectro da banda amarela, adquirido em modo negativo, exibiu um intenso sinal em m/z 352,2, correspondente ao íon $[M-Na]^-$ do corante amarelo de metanila.

Dada a confirmação dos componentes da caneta Bic Crystal® preta, passou-se a utilizá-la como amostra padrão na análise das demais canetas pretas de marcas diferentes. Os cromatogramas obtidos estão representados na figura 4.13 (p. 142).

Figura 4.13 Cromatograma comparativo entre tintas de canetas esferográficas pretas. (1) Bic Crystal®; (2) Papermate Kilometrica®; (3) Compactor top 2000®; (4) Joccar Office®.

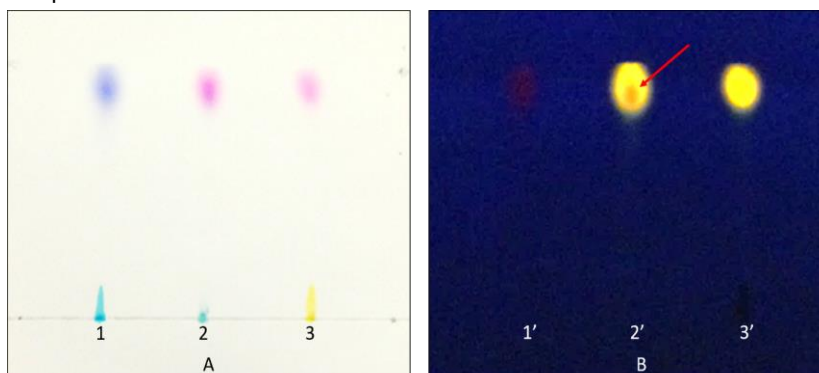


Fonte: autor

Com base nesses cromatogramas, foram verificados dois agrupamentos formados por pares diferentes de tintas com composições semelhantes. As canetas Compactor Top® 2000 e Joccar Office® não apresentaram a banda cromatográfica de coloração amarela, que, por outro lado, estava presente nos espectros das canetas Bic Crystal® e Papermate Kilometrica®, indicando, portanto, a ausência do amarelo de metanila na composição de suas tintas. No entanto, todas as canetas pretas apresentaram a banda correspondente ao violeta de genciana.

Para avaliar a capacidade da técnica em detectar misturas de diferentes tintas, comparou-se o cromatograma das canetas Bic Crystal® azul, Bic Crystal® roxa e Bic Crystal® vermelha, obtendo-se os cromatogramas da figura 4.14.

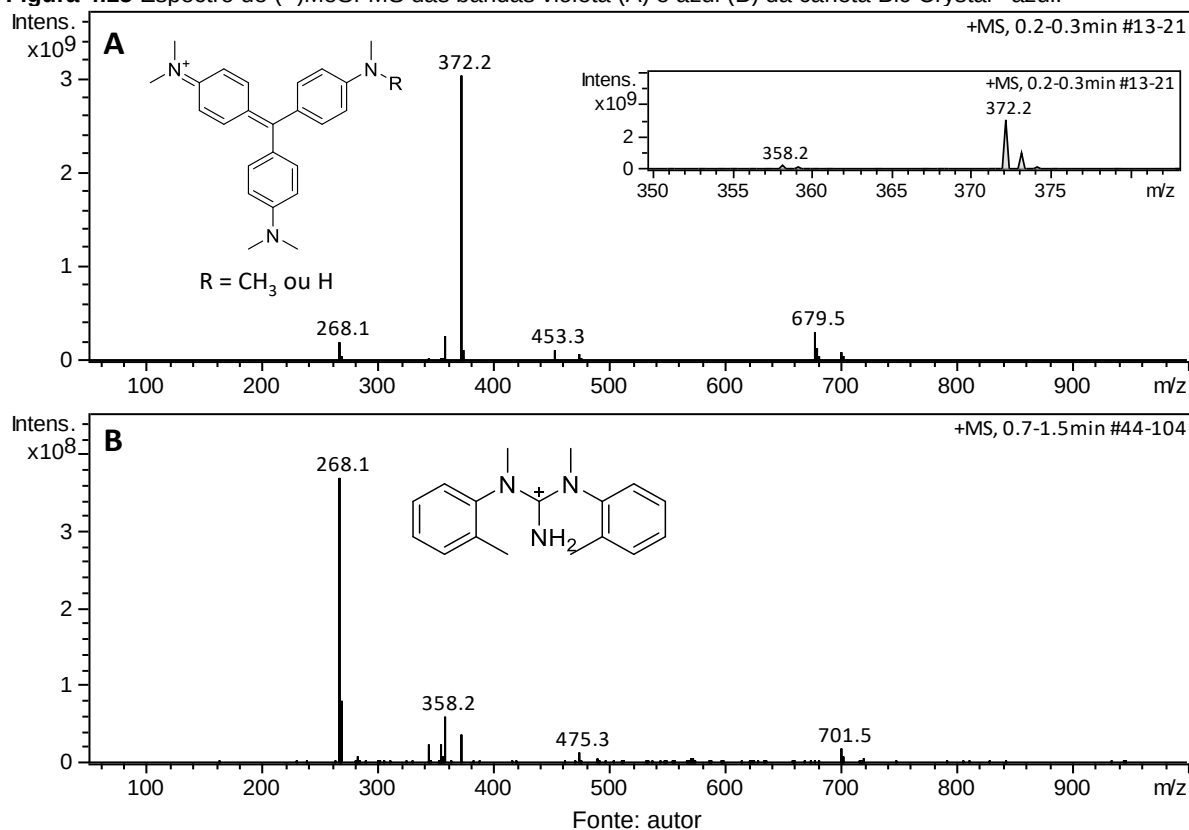
Figura 4.14 Cromatograma comparativo entre tintas de canetas esferográficas Bic Crystal® azul (1), Bic Crystal® roxa (2), Bic Crystal® vermelha (3). A imagem do cromatograma (A) foi obtida sob luz ambiente, enquanto a imagem do cromatograma (B) foi obtida sob luz UV com comprimento de onda de 254 nm.



Fonte: autor

Nesses cromatogramas, foram observadas duas bandas principais geradas pela separação dos componentes da tinta contida na caneta Bic Crystal® azul: uma de coloração azul clara, com um valor de R_f de 0,05 e outra banda violeta com R_f de 0,90. A análise destas bandas por (+)-MeSI-MS resultou no espectro A da figura 4.15, no qual foram observados os mesmos sinais correspondentes ao violeta de genciana e seu homólogo em m/z 372,2 e 358,2, respectivamente. O mesmo experimento foi realizado com a banda azul clara, obtendo-se o espectro B da figura 4.15, no qual, observou-se um intenso sinal em m/z 268,1. Consultando-se a literatura, pôde-se atribuir este sinal ao íon $[M+H]^+$ do corante 1,3-dimetil-1,3-ditolilguanidina, cuja estrutura encontra-se em destaque na figura 4.15.²⁹

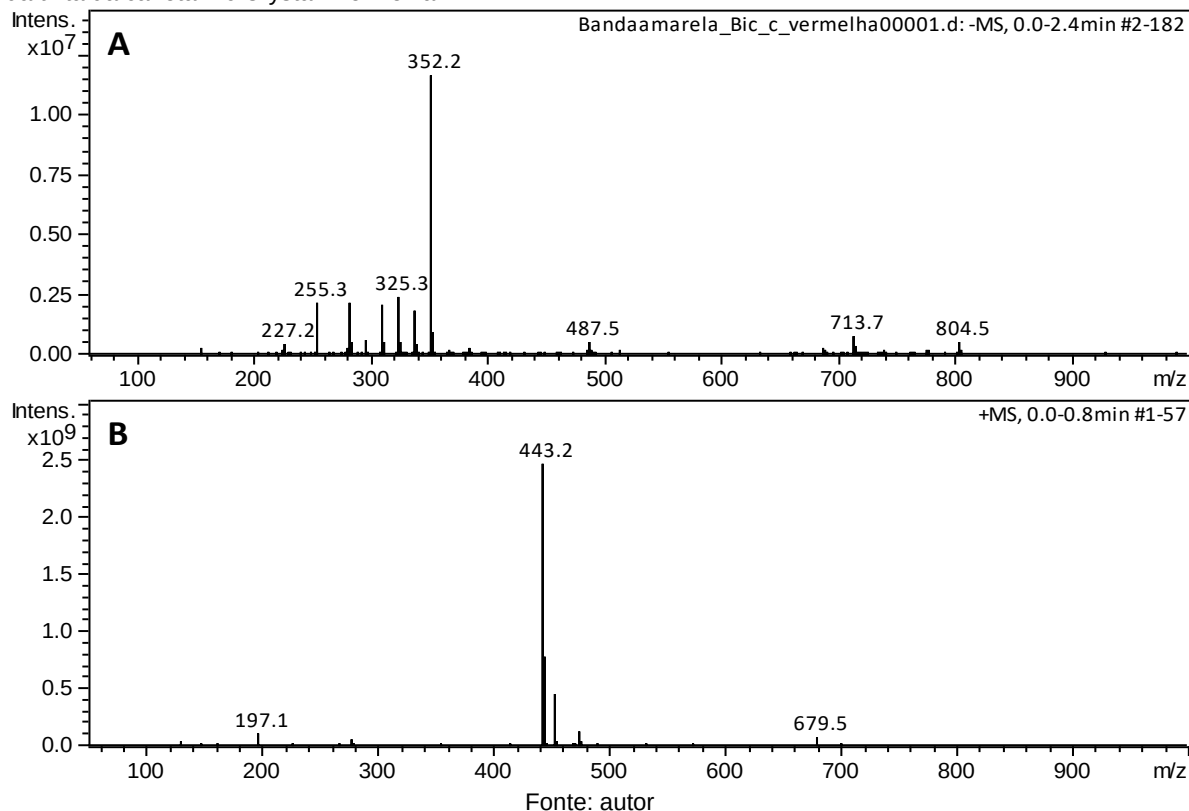
Figura 4.15 Espectro de (+)MeSI-MS das bandas violeta (A) e azul (B) da caneta Bic Crystal® azul.



A separação dos componentes da tinta da caneta Bic Crystal® vermelha resultou em duas bandas cromatográficas: uma amarela com valor de R_f de 0,05 e, portanto, compatível com o valor apresentado pelo corante amarelo de metanila, e uma de coloração rosa com R_f de 0,9. O espectro de massas correspondente à banda rosa foi adquirido em modo positivo e encontra-se ilustrado na figura 4.16-(A) (p. 144), já a banda amarela foi analisada no modo negativo e seu espectro é mostrado na

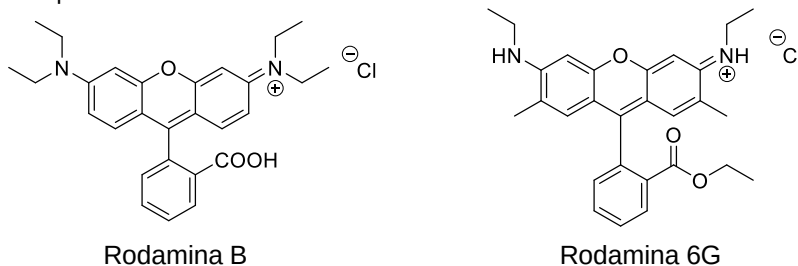
figura 4.16-(B), o qual apresentou um intenso sinal em m/z 352,2, confirmando, portanto a presença do amarelo de metanila na composição da tinta dessa caneta.

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.



Uma pesquisa na literatura revelou que dois dos principais componentes das tintas utilizadas na caneta Bic Crystal® vermelha são a rodamina B e a rodamina 6G,³⁰ cujas estruturas químicas são mostradas na figura 4.17.

Figura 4.17 Estruturas químicas dos corantes rodamina B e 6G utilizados como componentes de tintas vermelhas.



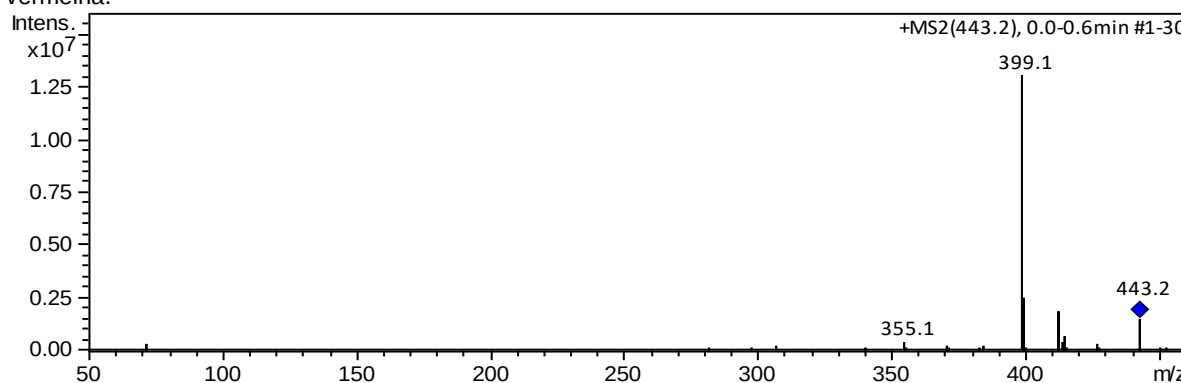
Massa molecular: 479,02 g mol⁻¹

[M-Cl]⁺: m/z 443,2329

Fonte: autor

A avaliação das estruturas químicas permitiu constatar que ambas possuem a mesma massa molecular, o que torna sua diferenciação em um espectro de massas do tipo *full scan* impraticável. No entanto, os espectros de MS/MS destes compostos exibem perfis distintos de sinais, sendo que na dissociação do íon $[M-Cl]^+$, correspondente à rodamina B há formação de um íon produto em m/z 399 que se apresenta como pico base, enquanto a rodamina 6G gera um pico base em m/z 415.³¹ Com base nessas diferenças, para caracterizar o corante em questão, foi realizado um experimento de MeSI-MS/MS, cujo espectro é apresentado na figura 4.18.

Figura 4.18 Espectro de (+)-MeSI-MS/MS da banda rosa que compõe a tinta da caneta Bic Crystal® de coloração vermelha.



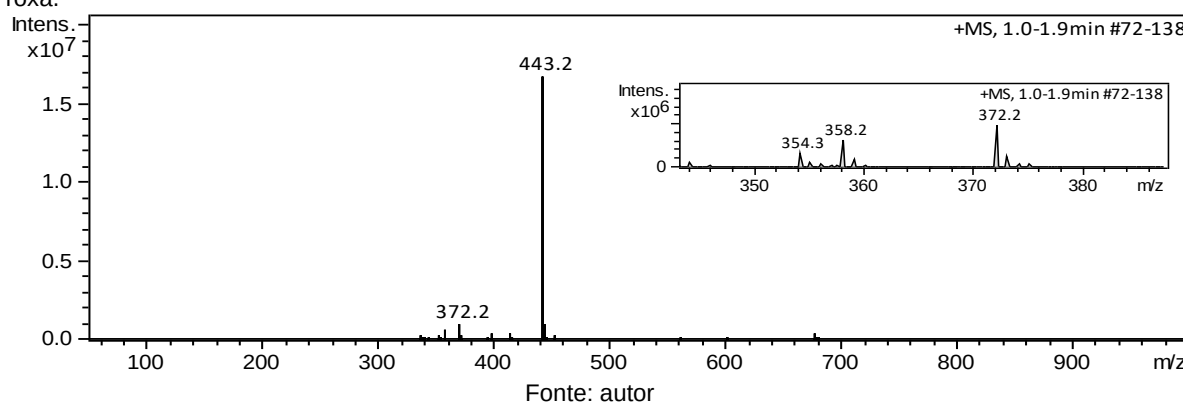
Fonte: autor

Nesse espectro torna-se evidente a formação do pico base em m/z 399,1, podendo-se, portanto, atribuir o sinal em questão à rodamina B.

Considerando agora o cromatograma da caneta Bic Crystal® roxa, foi possível observar a presença de corantes que fazem parte tanto da composição das tintas das canetas Bic Crystal® azul quanto da vermelha. O R_f da banda menos retida exibiu um valor de 0,9, e possui coloração rosa, sendo, portanto, possível atribuí-la à rodamina B. A banda mais retida, de coloração azul clara foi atribuída ao corante 1,3-dimetil-1,3-ditolilguanidina já que apresentou R_f semelhante ao obtido para esta substância na análise da tinta da caneta Bic Crystal® azul. Os cromatogramas desse experimento também foram avaliados sob luz UV com comprimento de onda de 254 nm. Nessas condições, a bandas de coloração rosa pertencentes às canetas vermelha e roxa exibiram uma intensa fluorescência. Esse fenômeno permitiu visualizar uma mancha escura na porção inferior da banda rosa correspondente à tinta da caneta de coloração roxa, indicada com uma seta vermelha na figura 4.14 (p. 142). Essa pequena mancha, de difícil visualização sob luz ambiente, sugeriu a ocorrência de uma coeluição da

rodamina B com o componente violeta de genciana, já que ambos possuem o mesmo fator de retenção. Baseado nessa hipótese, foi realizado um experimento de (+)-MeSI-MS da banda cromatográfica em questão, gerando o espectro da figura 4.19, no qual foi possível observar a presença dos sinais em m/z 372,2, 358 e 443,2, pertencentes ao violeta de genciana, seu homólogo e à rodamina B respectivamente. Esse resultado confirma, portanto, a coeluição destes componentes no experimento realizado.

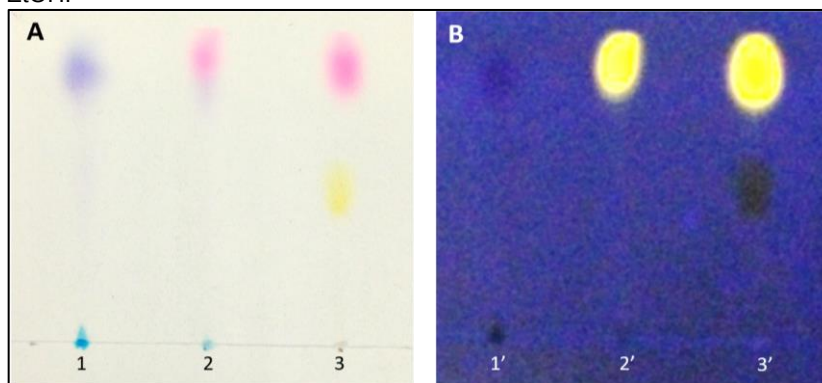
Figura 4.19 Espectro de (+)-MeSI-MS da banda rosa que compõe a tinta da caneta Bic Crystal® de coloração roxa.



Fonte: autor

Para tentar solucionar o problema de separação entre rodamina B e os corantes violeta de genciana e seu homólogo, utilizou-se hidróxido de amônio como modificador de fase móvel na concentração de 0,5% v/v. Esta condição foi planejada com o intuito de promover a desprotonação do grupo ácido da rodamina B, a fim de se verificar como esta condição afetaria sua retenção no processo cromatográfico. O cromatograma obtido nesse experimento está retratado na figura 4.20.

Figura 4.20 Cromatogramas das tintas de caneta Bic Crystal® azul, roxa e vermelha, obtidos utilizando-se como eluente uma solução 0,5% de NH₄OH em EtOH.

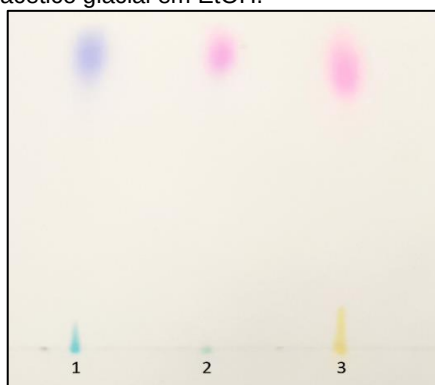


Fonte: autor

Nessa condição foi possível melhorar a separação entre a rodamina B e os componentes violeta de genciana e seu homólogo, o que pôde ser observado tanto pelo deslocamento da banda violeta para um fator de retenção menor ($R_f = 0,8$) quanto pela ausência da mancha escura na banda cromatográfica correspondente à rodamina B observada sob luz UV em 254nm. Além desse resultado, foi possível observar um nítido deslocamento da banda correspondente ao amarelo de metanila, cujo R_f passou de 0,05 para 0,5, demonstrando que a desprotonação desta substância, que possui um grupo ácido, resulta em uma menor interação com a fase estacionária.

Os resultados expostos acima mostraram um desvio do comportamento cromatográfico apresentado até então, causado pelo uso de modificador básico. Diante desse fato, um estudo dos efeitos de modificadores ácidos foi realizado utilizando-se como eluente uma solução de ácido acético glacial em EtOH, na concentração de 0,5% v/v. O cromatograma obtido encontra-se apresentado na figura 4.21. Nessas condições, foram observadas diferenças efetivas em relação ao uso de EtOH sem modificadores como fase móvel, já que os valores de R_f mantiveram-se equivalentes ao obtido no experimento inicial.

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.



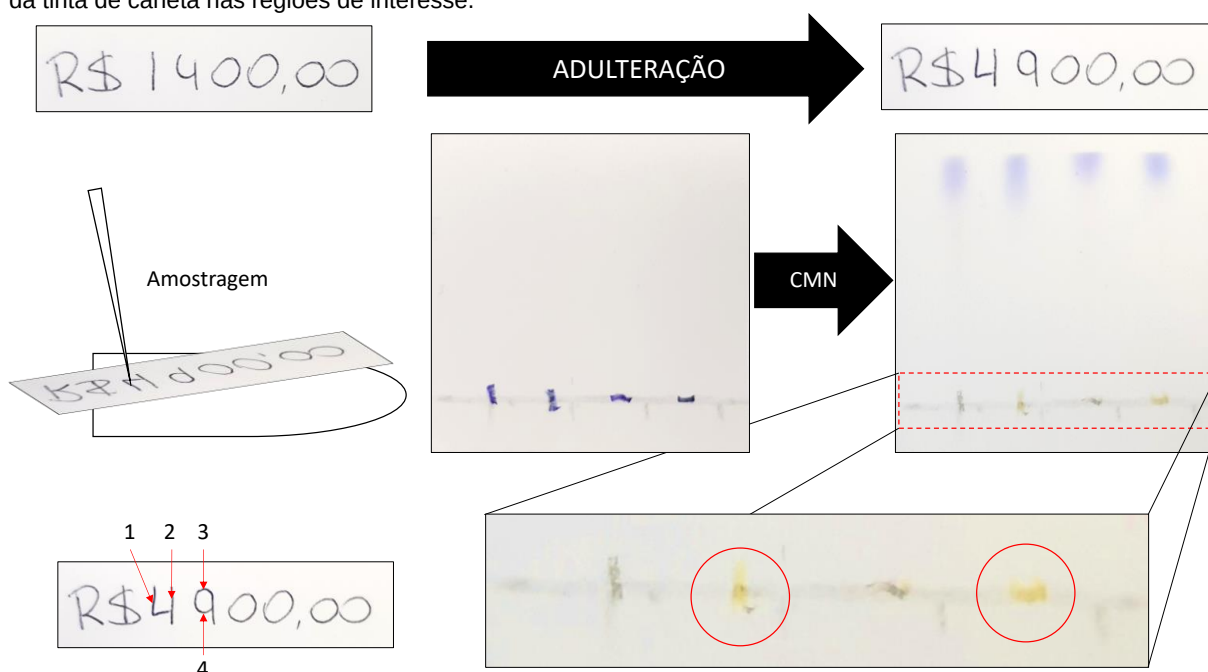
Fonte: autor

4.4.2 Aplicação da PMC-MeSI-MS na detecção de adulterações de documentos

A metodologia de análise de tintas de caneta esferográfica por PMC-MeSI-MS, desenvolvida nas etapas anteriores, foi utilizada na avaliação de adulteração de

documentos. Para tanto, simulou-se a adulteração do valor 1400, redigida manualmente sobre papel A4 com a caneta Bic Crystal® preta, adulterando-o para 4900, com a caneta Jocar Office® de mesma cor. Após a adulteração, pontos específicos da escrita foram transferidos para a membrana de poliamida, promovendo-se, posteriormente, sua separação. Nessa etapa, EtOH sem modificadores foi utilizado como solvente extrator e fase móvel. Os cromatogramas obtidos após o experimento de PMC encontram-se esquematizados na figura 4.22.

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.

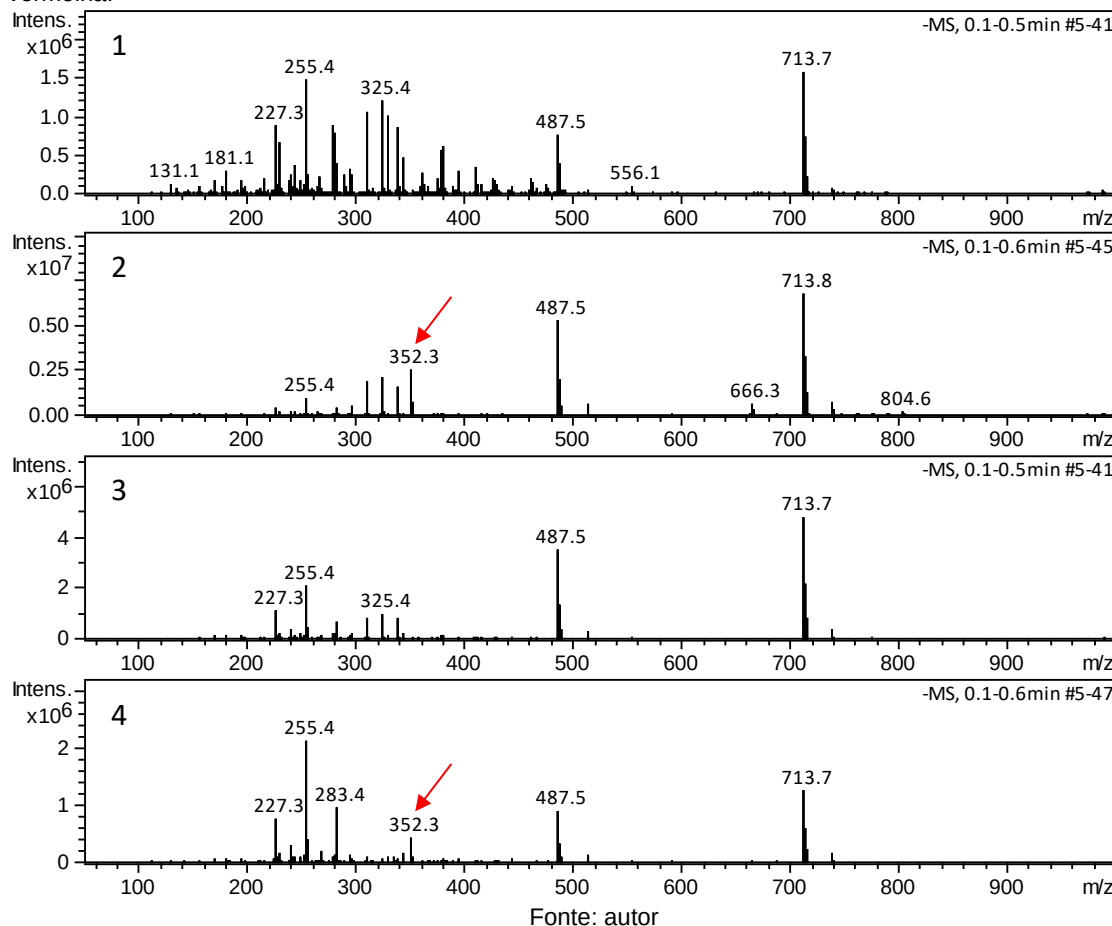


Fonte: autor

A partir desses cromatogramas foi possível estabelecer diferenças importantes na composição dos corantes. Os pontos correspondentes à escrita original, apontados na figura 4.22 com os números 2 e 4, deram origem às bandas correspondentes ao corante amarelo de metanila, circulas em vermelho. Nos pontos onde houve adulteração, as bandas de coloração amarela não foram observadas, evidenciando a diferença da composição química das tintas presentes nesses pontos em relação à tinta utilizada na escrita original. A comprovação da ausência do amarelo de metanila na composição da tinta proveniente das regiões de adulteração foi realizada por (-)-MeSI-MS das regiões correspondentes ao R_f desse corante. Nos espectros obtidos, ilustrados na figura 4.23 (p. 149), foi possível observar o sinal com m/z 352,3,

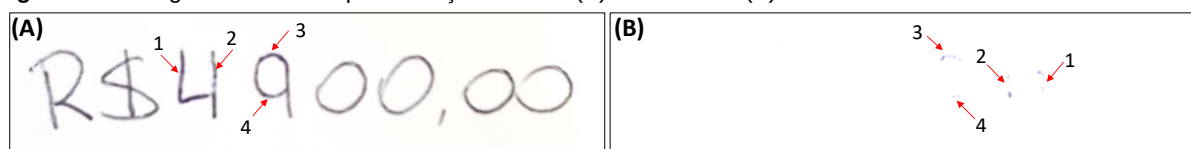
correspondente ao ânion do amarelo de metanila, apenas nas amostras de tinta oriundas da escrita original.

Figura 4.23 Espectros de (-)-MeSI-MS das regiões da membrana correspondentes ao *R_f* do corante amarelo de metanila. A presença do sinal correspondente a esse corante é apontada com uma seta vermelha.



Cabe salientar que, diferente do que ocorre com outros métodos relatados na literatura, nos quais a amostragem acarreta a destruição de parte do documento,^{29; 30} a metodologia empregada neste trabalho não prejudicou a integridade do documento, mantendo a escrita perfeitamente legível, como demonstrado na figura 4.24(A). No verso do papel (Figura 4.24(B)) foi possível observar os pontos de amostragem devido à solubilização da tinta pelo solvente extrator.

Figura 4.24 Imagem da escrita após extração da tinta (A) e seu verso (B).



4.5 CONCLUSÃO

Este trabalho possibilitou o desenvolvimento de uma metodologia simples, rápida, de baixo custo e risco químico para identificação de corantes de tinta de caneta por PMC-MeSI-MS. As propriedades cromatográficas das membranas de poliamida demonstraram-se adequadas a esta aplicação promovendo a separação dos corantes de maneira eficiente. O acoplamento da técnica de cromatografia planar à espectrometria de massas foi realizado com sucesso, o que possibilitou a obtenção de informações estruturais a partir da análise dos espectros adquiridos. O emprego da metodologia desenvolvida na detecção de adulterações em documentos escritos com caneta esferográfica foi realizado com êxito, permitindo identificar os pontos de adulteração de maneira simples e rápida, sem prejudicar a interpretação da escrita, que manteve suas características visuais praticamente inalteradas.

4.6 REFERÊNCIAS

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 electrospray 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.

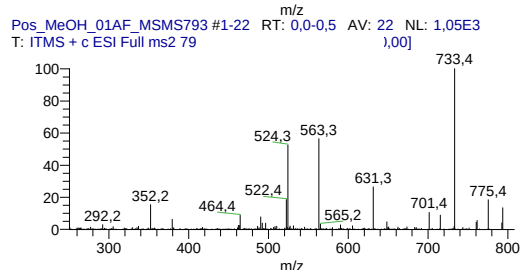
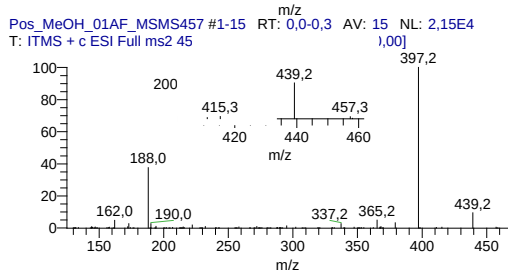
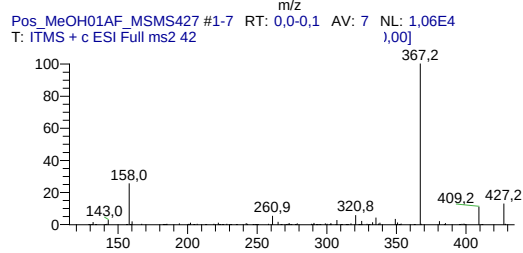
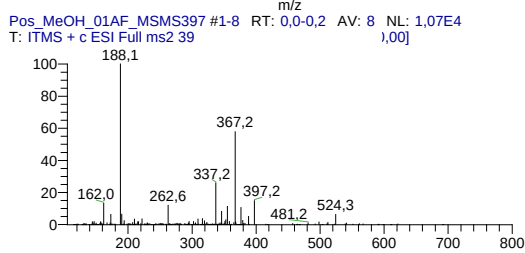
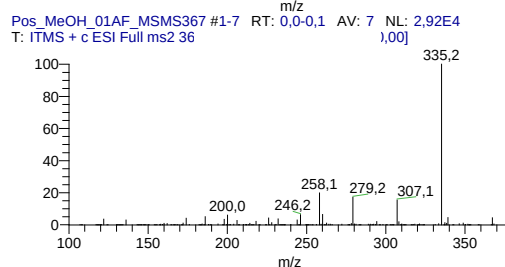
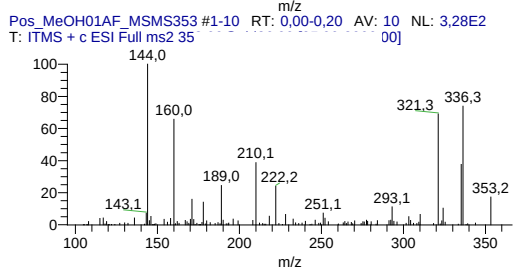
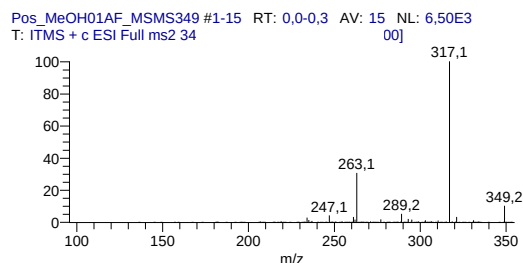
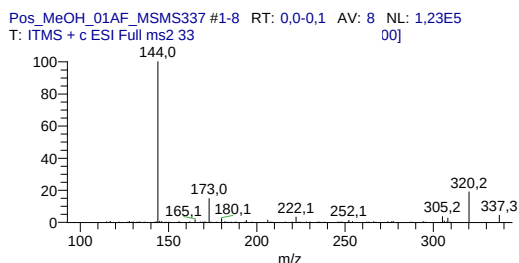
Considerações Finais

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.

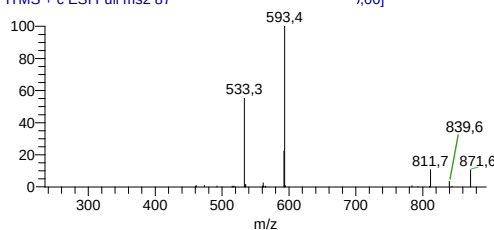
Diante desses resultados, pôde-se considerar que as técnicas de análise direta por espectrometria de massas possuem características extremamente vantajosas como a rapidez da análise, a simplicidade do preparo de amostras e a facilidade de acoplamento com técnicas de cromatografia planar. Além disso, 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.

Apêndices

Apêndice A. Espectros de (+)-TSI-MS/MS obtidos a partir da análise de folhas de *Catharanthus roseus*.



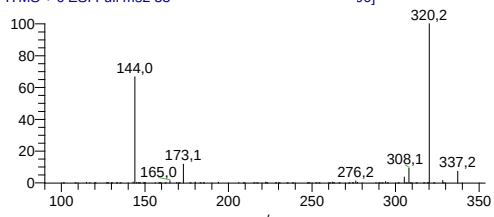
Pos_MeOH_01AF_MSMS871 #1 RT: 0,0 AV: 1 NL: 1,70E3
T: ITMS + c ESI Full ms2 87



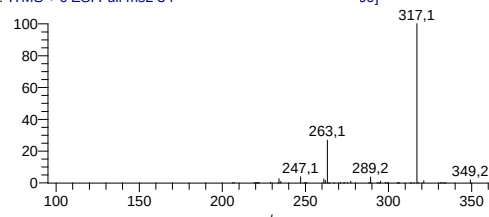
Fonte: autor

Apêndice B. Espectros de (+)-TSI-MS/MS obtidos a partir da análise de flores de *Catharanthus roseus*.

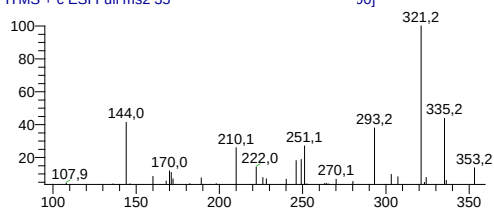
Pos_MeOH01AF_MSMS337 #1-7 RT: 0,00-0,13 AV: 7 NL: 5,16E4
T: ITMS + c ESI Full ms2 33



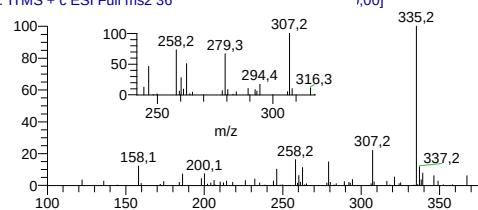
Pos_MeOH01AF_MSMS349 #1-6 RT: 0,00-0,11 AV: 6 NL: 3,59E4
T: ITMS + c ESI Full ms2 34



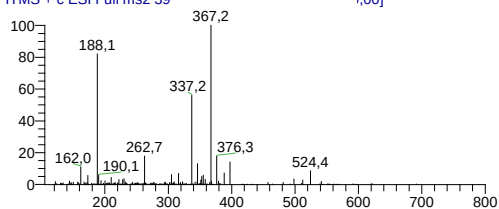
Pos_MeOH01AF_MSMS353 #1-13 RT: 0,00-0,3 AV: 13 NL: 1,24E3
T: ITMS + c ESI Full ms2 35



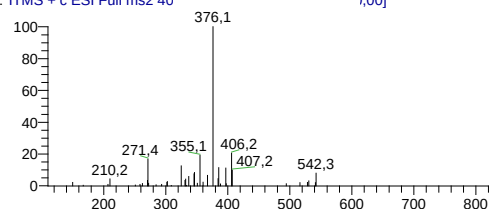
Pos_MeOH01AF_MSMS367 #1-8 RT: 0,00-0,2 AV: 8 NL: 3,89E2
T: ITMS + c ESI Full ms2 36



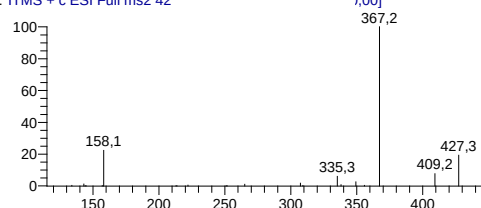
Pos_MeOH01AF_MSMS397 #1-8 RT: 0,00-0,16 AV: 8 NL: 1,56E3
T: ITMS + c ESI Full ms2 39



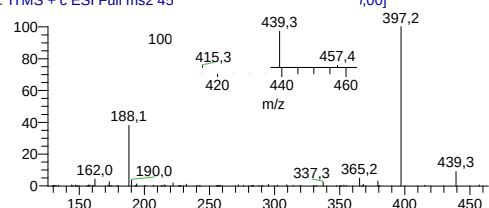
Pos_MeOH01AF_MSMS406 #1-6 RT: 0,00-0,1 AV: 6 NL: 2,64E2
T: ITMS + c ESI Full ms2 40



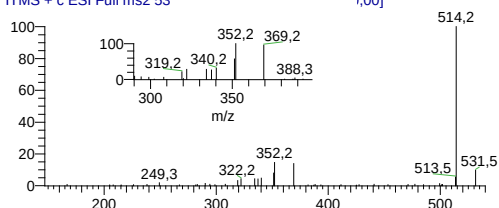
Pos_MeOH01AF_MSMS427 #1-22 RT: 0,00-0,5 AV: 22 NL: 4,54E2
T: ITMS + c ESI Full ms2 42



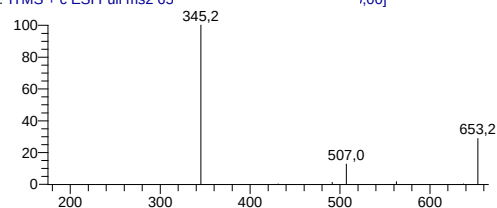
Pos_MeOH01AF_MSMS457 #1 RT: 0,00 AV: 1 NL: 2,04E4
T: ITMS + c ESI Full ms2 45



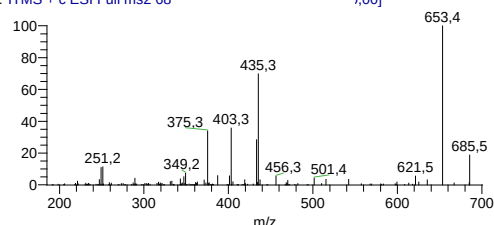
Pos_MeOH01AF_MSMS531 #1 RT: 0,0 AV: 1 NL: 9,78E2
T: ITMS + c ESI Full ms2 53



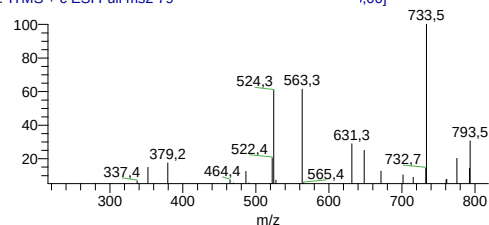
Pos_MeOH01AF_MSMS653 #4-9 RT: 0,07-0,18 AV: 6 NL: 2,64E2
T: ITMS + c ESI Full ms2 65



Pos_MeOH01AF_MSMS685 #1-6 RT: 0,00-0,1 AV: 6 NL: 1,44E3
T: ITMS + c ESI Full ms2 68

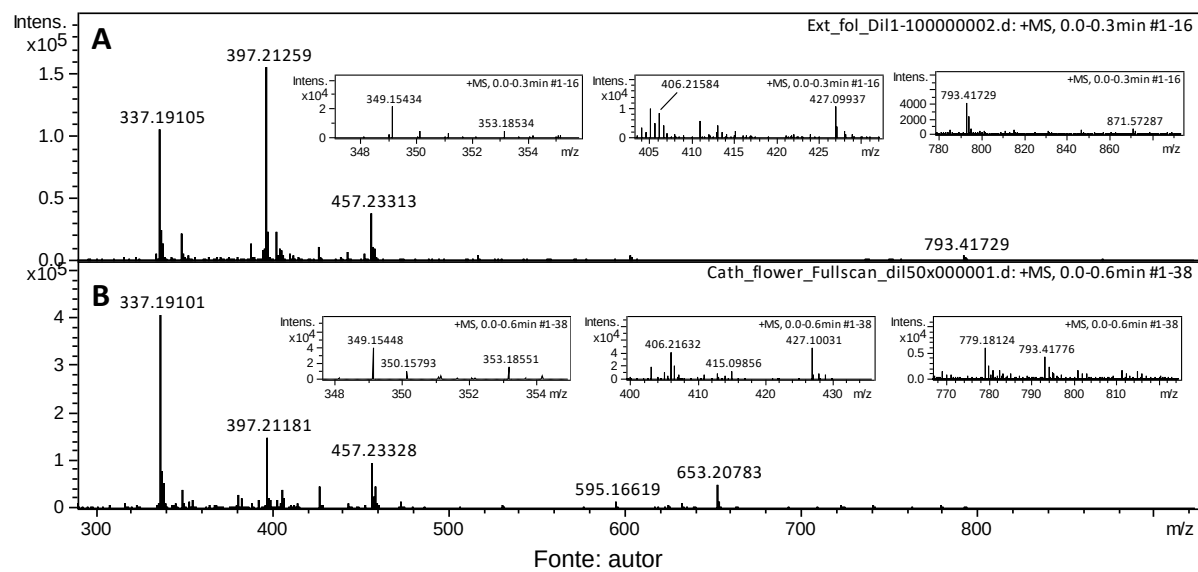


Pos_MeOH01AF_MSMS793 #1-8 RT: 0,00-0,2 AV: 8 NL: 1,87E2
T: ITMS + c ESI Full ms2 79



Fonte: autor

Apêndice C. Espectros de ESI-QqTOF-MS obtidos a partir da análise dos extratos de folhas (a) e flores (B) de *Catharanthus roseus*.



Apêndice D. Condições utilizadas nos processos de irrigação e fertirrigação, em estufa, dos indivíduos NI e IS.

Processo	Periodicidade	V(mL)/aplicação	Composição
Irrigação	4 vezes por semana	250	Água pura
Fertirrigação	1 vez por semana	250	Solução contendo fertilizantes nas seguintes concentrações (g/L):
			$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$: 900
			KNO_3 : 300
			$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$: 70
			MgSO_4 : 260
			EDTA (14,5% Cu): 10
			EDTA (14% Zn): 7
			EDTA (13% Mn): 5
			EDTA (6% Fe): 50
			H_3BO_3 : 3,5
			$(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$: 0,3

Fonte: autor

Apêndice E. Base de dados utilizada na anotação das bandas cromatográficas pelo software UNIFI®

Substância	Fórmula Molecular	Massa Exata	Referência
2-aminopropanol	C ₃ H ₉ NO	75,0684	36
2"-O-xilosilvitexina	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₃	548,1530	32
3,3',4',5,6,7,8-heptametoxiflavona	C ₂₂ H ₂₄ O ₉	432,1420	32
5,6,7,8,3',4',5'-heptametoxiflavona	C ₂₂ H ₂₄ O ₉	432,1420	32
5-desmetoxinobiletina	C ₂₀ H ₂₀ O ₇	372,1209	37
5-desmetilnobiletina	C ₂₀ H ₂₀ O ₈	388,1158	32
5-hidroxi-3',4',6,7-tetrametoxiflavona	C ₁₉ H ₁₈ O ₇	358,1053	37
5-hidroxi-3',4',7,8-tetrametoxiflavona	C ₁₉ H ₁₈ O ₇	358,1053	37
6,8-di-C-glicosilapigenina	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	594,1585	32
8-C-glicosildiosmetina	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	462,1162	32
alanina	C ₃ H ₇ NO ₂	89,0477	27
ácido aminobutírico	C ₄ H ₉ NO ₂	103,0633	27
apigenina-7-O-rutinosídeo	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	578,1636	31
arginina	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	174,1117	36
asparagina	C ₄ H ₈ N ₂ O ₃	132,0535	36
ácido aspártico	C ₄ H ₇ NO ₄	133,0375	36
colina	C ₅ H ₁₄ NO ⁺	104,1070	27
cisteína	C ₃ H ₇ NO ₂ S	121,0197	36
diosmina	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₅	608,1741	32
feruloilputrescine	C ₁₄ H ₂₀ N ₂ O	264,1474	32
glicose	C ₆ H ₁₂ O ₆	180,0634	27
ácido glutâmico	C ₅ H ₉ NO ₄	147,0532	36
glicina	C ₂ H ₅ NO ₂	75,0320	36
hesperidina	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅	610,1898	32
isosakuranetina-7-O-rutinosídeo	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₄	594,1949	32
isosinensetina	C ₂₀ H ₂₀ O ₇	372,1209	32
leucina/isoleucina	C ₆ H ₁₃ NO ₂	131,0946	36
luteolina-7-O-rutinosídeo	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	594,1585	36
n-acetil-L-prolina	C ₇ H ₁₁ NO ₃	157,0739	36
n-carboxiglicina	C ₃ H ₅ NO ₄	119,0219	36
n-metil-L-prolina	C ₆ H ₁₁ NO ₂	129,0790	36
nobiletina	C ₂₁ H ₂₂ O ₈	402,1315	32
ornitina	C ₅ H ₁₂ N ₂ O ₂	132,0899	36
fenilalanina	C ₉ H ₁₁ NO ₂	165,0790	36
prolina betaína	C ₇ H ₁₄ NO ₂ ⁺	144,1019	27
prolina	C ₅ H ₉ NO ₂	115,0633	27
putrescina	C ₄ H ₁₂ N ₂	88,1000	36
serina	C ₃ H ₇ NO ₃	105,0426	36
sinensetina	C ₂₀ H ₂₀ O ₇	372,1209	32
sacarose	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	342,1162	27
sinefrina	C ₉ H ₁₃ NO ₂	167,0946	36
tangeretina	C ₂₀ H ₂₀ O ₇	372,1209	37
tetrametilescutellareina	C ₁₉ H ₁₈ O ₆	342,1103	32
treonina	C ₄ H ₉ NO ₃	119,0582	27
triptofano	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	204,0899	27
tirosina	C ₉ H ₁₁ NO ₃	181,0739	27
valina	C ₅ H ₁₁ NO ₂	117,0790	27

Fonte: autor

Apêndice F. Dados brutos obtidos pelas análises de TSI-MS de indivíduos NI e IS.

	104.1	116.1	144.1	150.1	175.1	182.1	265.2	318.4	325.3	343.3	373.3	381.2
NI01_1_1	5785276	4548239	111307240	26853956	2397378	175427408	1789653	3404851	10758809	4570993	3672349	58997756
NI01_1_2	7627444	3912929	134164608	20617474	323607	182659856	950363	630540	4538095	8946583	11092532	20552934
NI01_1_3	4873802	2539817	157625168	21840412	946168	257106224	2475595	2321977	47600568	10529650	14501354	101891960
NI01_2_1	14699012	1941576	95744544	9588016	404086	178762096	1620900	1708218	26162024	3203596	4687822	94235928
NI01_2_2	12777841	1756660	86201952	7820035	557476	172425616	1367271	2541664	20375160	4650196	8389189	90318808
NI01_2_3	24264442	3279333	138312544	13162242	1033777	253689104	2385943	2708982	29963858	13576388	26613072	136749648
NI01_5_1	12263086	2758201	103808808	10468361	752827	174572576	1248493	2082902	14774563	6920139	11135207	85953288
NI01_5_2	7824908	4697968	194105296	11745578	574218	292227680	2528016	1447474	62304224	5006504	5272135	152916688
NI01_5_3	9821122	5484439	164865040	14589592	1937442	272932800	2793089	5836139	46731232	7357621	12402042	216433888
NI02_3_1	3093063	374780	94103880	21811018	1930006	183717360	1990196	5398499	22287342	5259262	6559028	40045184
NI02_3_2	3240729	1249832	132248976	23239710	3147505	208245200	2718865	4511585	13737193	21289232	30989002	50062616
NI02_3_3	7554116	825589	161309696	30391964	1393861	189007744	3784080	4537053	14925634	17440056	23140944	54814056
NI02_4_1	11088340	1784233	88728960	26544286	3973112	156366976	2538504	5884508	17641110	12834532	18773860	189582032
NI02_4_2	8382588	1822945	153397200	30210876	3621705	170697856	4748325	8349933	22564836	13866017	16015647	164547456
NI02_4_3	2989937	2356570	122633688	27216334	4902369	181745968	5659760	14754674	25914230	12532553	16706805	136027808
NI02_5_1	9087845	5376665	123757600	36040208	3776267	127957136	3618978	3062552	3390092	14620534	29025852	35762580
NI02_5_2	6106093	5421382	156217920	38175904	3996239	136703184	6526136	5165188	8316911	13561077	22258748	54458388
NI02_5_3	11104305	3757961	97690832	23053536	1849421	76383928	3212971	2461069	4994133	4792791	8926820	47127008
NI03_1_1	6782591	121438	68067400	24283862	258115	259496752	6198847	107328	66142656	8942643	11855735	123234288
NI03_1_2	7556217	351742	95591960	18443920	350340	225127616	6282201	2513711	28537164	18867562	20603670	102142656
NI03_1_3	6302260	161344	84677232	26883588	193419	370885856	11042432	2052715	97074208	14051513	16744804	121612584
NI03_2_1	3857360	315693	99025872	34955828	440158	341466208	8627167	141969	46459432	11264809	16527910	137050880
NI03_2_2	6151226	823286	98341104	22133914	274386	223318240	4314700	2400362	23058182	7918798	9889992	72093848
NI03_2_3	4226849	274626	69737184	26482824	315863	226195744	5236218	3903747	20494850	6631609	9962871	129228208
NI03_5_1	9181380	106998	87404552	21393634	147048	211862128	7108708	1687824	38134276	8550501	9814816	51591128
NI03_5_2	9184811	88792	107213024	34472940	181059	284541984	20221120	1003525	34883912	24493240	29311014	102234584
NI03_5_3	8480220	171032	83482464	18769784	365770	203742512	12275411	3945223	45495816	4580120	5860512	82522056
NI04_2_1	3433674	854286	84929184	16261414	1054930	153580752	1442900	2792861	18203814	4616173	6923361	86590072
NI04_2_2	4450279	1545533	135914256	27886994	802852	237044672	3361816	1638091	35147544	13461799	20219756	123548104
NI04_2_3	7231670	1211872	115804608	16543059	1104638	162928704	2521363	3313143	31778624	1974588	4891425	130500544
NI04_3_1	5762955	1533822	176227296	31250282	2733523	288766272	9954613	8991719	79227728	8042781	11535238	144054592
NI04_3_2	5703286	620741	125178816	13656983	880815	160522416	2682697	3617121	33530706	10702565	18156266	64484616
NI04_3_3	7291188	3313030	125819328	28984152	1258904	272448256	6942373	5455308	30509166	14146384	23664276	94749584
NI04_4_1	4351948	1622512	142453040	22975684	1837709	266444128	4132599	4039443	32884090	30909700	52172672	104236672
NI04_4_2	3489657	1108618	105784312	16893758	1115525	188660320	3215961	3340053	32755248	4061057	6663969	87859896
NI04_4_3	9883635	910711	175259312	21203524	105541	251679248	7179294	536346	68352544	16236985	23259652	117543872
NI05_1_1	3560979	1039621	113549296	23960024	717792	307325056	9655065	2554182	45521524	6794473	9552067	121835848
NI05_1_2	3708264	973594	119494240	33411910	417881	325184512	12197174	2173553	41704964	14572201	23540778	112691336
NI05_1_3	4487557	227712	75824456	17226394	410611	178501088	2943231	1056394	9128665	7073968	7457172	75007696
NI05_3_1	9188505	54724	80897168	16217780	150157	168777568	7487086	1977240	22890708	5317299	6376056	75559768
NI05_3_2	10526318	1143196	156365536	26336044	278823	409993536	31845244	1937472	1.22E+08	25627184	28543150	146740432
NI05_3_3	8727294	663824	113821768	22813940	406900	285675904	15179694	2580350	50122472	13122550	16825316	142328112
NI05_4_1	5258145	157146	72998192	16904660	195563	175774112	2983002	1647385	15171196	5241314	5189432	97211480
NI05_4_2	2986094	729827	113610848	32004376	482666	405821824	6590713	2044625	66911104	13044312	26025248	220280960

Apêndice F. Continuação.

	104.1	116.1	144.1	150.1	175.1	182.1	265.2	318.4	325.3	343.3	373.3	381.2
NI05 4 3	7630915	1699302	165609696	27678026	387092	335677600	9371913	132431	75353792	13917496	18655920	118828304
NI06 1 1	6082323	501804	89823576	22839344	187160	241136656	10212400	1464070	55029600	6647998	13969122	96865032
NI06 1 2	4513071	721453	119644984	27196936	385818	343021664	12012276	2415756	1.31E+08	4741152	10422183	143812544
NI06 1 3	7523953	1102321	73238952	11720898	68888	132316888	4164570	1416455	27068210	2577271	3852400	65877704
NI06 2 1	4652103	1872744	90523480	17307848	392327	127652112	2050350	2058847	9699050	4993753	6307412	59130612
NI06 2 2	5994142	3063388	101430400	16305619	1991456	117364000	1561131	2632920	7212648	8794712	10824327	43866452
NI06 2 3	5650155	3765058	125258256	19599860	1412573	225710960	2602640	117469	22816508	6249761	8664836	81876320
NI06 5 1	3895794	1698700	103366864	16121177	2545097	140402368	1888922	2753545	7220340	2904433	3444809	32069422
NI06 5 2	4303647	3150594	95479416	25456846	2589113	191208992	8689166	4323026	10524604	1987988	2393261	24056380
NI06 5 3	3832719	1067386	111243248	23707032	5755991	307730656	10947622	19755266	43977668	9295734	14260568	141731296
NI10 2 1	7197332	2636245	150833984	11541942	1043547	263492304	4333495	3670246	55802112	10225338	16084748	126340360
NI10 2 2	7857054	2155897	130306352	12772808	263169	190332528	4501706	2914527	42385404	6253191	8047134	166464528
NI10 2 3	8821388	2670757	142017696	11298368	415459	227050432	2758111	958811	32924778	6305222	10590875	74071696
NI10 3 1	8867090	3576671	143917024	19287260	162766	177006160	6833614	1219324	18339130	5860413	10599717	162798800
NI10 3 2	9003345	1586245	139386016	14791137	599026	237479776	5936006	2408669	46834280	9858995	14675961	139182272
NI10 3 3	8923375	1413473	134544672	13771623	464864	211708512	5025960	1239003	37590348	6101710	11906844	112940264
NI10 5 1	5692397	2099481	154535168	45910604	3483396	226011840	8691194	4701186	11353757	34802748	42901972	91143344
NI10 5 2	3514758	4747704	146757104	44365472	2068644	211877632	8701901	2185311	11148033	9630968	12919799	60213812
NI10 5 3	5109875	1186232	135300688	25258202	2251707	166261472	3449206	5452593	12466928	5623474	6748852	52121164
NI11 1 1	9525830	2792635	155574080	27637992	4304308	154090928	7033872	2518392	14689204	5678000	5799151	65146168
NI11 1 2	5349378	1520508	128654784	21789560	3792232	119101504	4592565	6689222	13549623	3625491	5590084	58974896
NI11 1 3	7814061	4713452	136544176	35341480	4312786	182902224	9308461	4873914	8572801	3739475	10435779	19666156
NI11 3 1	6615677	944982	159030208	21346680	359686	217627392	27312776	1661270	43412556	5679449	8239310	185304032
NI11 3 2	6497280	614727	133999184	20778400	204244	225283040	12996474	1795148	42317832	12381563	19889384	165822832
NI11 3 3	6461245	1234343	155753408	21352330	732344	294896576	12695846	4346858	75064768	3893136	6893176	244399696
NI11 4 1	6733846	587388	106720600	23061546	1113777	233698560	9717168	4585743	35598968	8476766	15591222	189114336
NI11 4 2	9410594	1552491	114007584	9125385	480756	124691240	6543442	2079262	17301384	17453672	27295064	98876704
NI11 4 3	6343766	434141	102499104	13795140	635775	134768000	4165333	952253	8731490	5569386	7776037	47007080
NI12 1 1	6605505	7269703	118528816	31051314	1281104	201455408	1798238	1165830	6894159	11725638	20128900	53699816
NI12 1 2	5286311	10975787	158550848	30429820	4744199	203893088	4875268	6012406	14968423	10750942	19291878	133900320
NI12 1 3	3409569	3439666	106265856	14415976	1919758	116700992	2264431	4087291	10376783	7110659	9620473	68567096
NI12 2 1	2402308	937728	94286016	16450943	915404	165666384	4922064	471262	13699636	5319657	7165578	132262832
NI12 2 2	5033294	1614132	154723424	29169274	486524	239627072	10457175	1910174	20338700	24757758	27955922	165383008
NI12 2 3	5120598	940995	110280176	25409818	264966	227322320	10973188	1861137	16357591	15559004	15934131	91040712
NI12 3 1	10274851	1716184	44679968	15836250	1209467	50157648	4663484	879759	3479633	2886549	3131406	22226256
NI12 3 2	8670076	3380074	181821936	28412252	2228553	181231840	14571827	7438333	32886314	16310968	19863340	157464160
NI12 3 3	9964717	2875415	148980320	21719902	3459942	167135968	8778564	6980549	19637872	10655792	11463736	109073632
NI15 1 1	4606564	3372504	138127232	54339604	2938193	272498848	8098248	5009493	20704564	18545564	24282796	211138192
NI15 1 2	2046666	800302	64361400	15877405	1886060	71871656	1023604	1051031	6074261	5682971	7491335	77085640
NI15 1 3	12583631	1772435	100061608	25363630	1476707	109967168	1107060	792934	6249804	8890801	7800740	56174632
NI15 2 1	5344969	3980040	129167544	59459684	899599	124499624	2724722	934156	2052073	6710956	9190460	41428440
NI15 2 2	3434350	2245185	122206272	34294812	421608	138456272	1200005	800414	2241704	4059362	5100673	25674002
NI15 2 3	3377910	4042355	217203472	23192088	231102	84863448	3735188	906737	10502459	19646286	24412996	89860784
NI15 5 1	6135719	4016559	213063296	40522580	196008	350798784	39747828	192826	49368804	24722930	34740180	339125184

Apêndice F. Continuação.

	104.1	116.1	144.1	150.1	175.1	182.1	265.2	318.4	325.3	343.3	373.3	381.2
NI15 5 2	10129622	2375569	128148400	24213286	273187	135639136	11145622	1263405	7128496	13061526	14499340	161578800
NI15 5 3	11027806	5031036	199014080	31401874	438965	378059648	28787940	733819	57217444	20037434	28299666	242890752
IS01 1 1	9518710	3529943	90890376	12267157	31388590	256597120	17866906	28346758	10833794	11439096	14355351	109010848
IS01 1 2	16093522	1904440	94927784	8111021	7597957	135647600	3374385	1836144	3367775	2333529	3586293	30085610
IS01 1 3	27248740	1847807	76218680	9126827	24726174	166338464	4936096	12235344	4913188	3715776	6604408	39016384
IS01 2 1	12903948	1469347	82628160	9255823	14146452	176777664	5701872	16574278	15161240	6528503	8745024	83691864
IS01 2 2	7376627	945903	75346264	12145920	16643639	181357104	6556482	31481856	18697164	11204056	12246383	130187600
IS01 2 3	9418952	1228728	82740400	11636120	24795366	182218160	7545215	28173418	17776576	8699414	11905522	123202856
IS01 5 1	3201624	507865	50823372	7184184	14439445	86619000	1621834	21476168	7833556	2910418	3645503	30671498
IS01 5 2	6563589	1193560	80381048	17081758	25604810	165244000	6017677	43770200	10062305	10772418	13968022	52715048
IS01 5 3	4789414	885766	97725064	23923048	15895359	290640416	10016182	46015060	57916860	11283986	14089195	100401560
IS02 2 1	2392541	3177121	170225168	30776446	23211972	191786016	20647504	34761848	18286166	13886451	17294930	190154560
IS02 2 2	4358846	3827511	159697200	26138856	29877968	215635536	33839204	65104992	25207174	22824720	32030530	167695840
IS02 2 3	10686178	2226378	100415840	9032764	15564935	95826896	3801231	27698716	13943676	8483750	8066985	120731896
IS02 4 1	2368752	5426006	184253600	37293204	68113816	140502752	23486078	1.79E+08	20993922	15073706	22917790	133831552
IS02 4 2	2110981	2599771	138496352	25461684	40322840	84424304	11150847	62615856	6620922	16880120	19559288	66584268
IS02 4 3	4131777	4447379	151654016	29360488	65627620	119049128	10027691	76693784	9129876	8585489	9395080	64109528
IS02 5 1	2921703	2397249	159127520	32551996	43097544	103006592	15109601	68871512	9010808	16950714	24084590	116309904
IS02 5 2	6747524	1778137	146155760	22576836	26312058	134150432	15255082	42171356	17103276	6963166	9231321	74059856
IS02 5 3	6445703	2404061	156380480	31265800	22779518	107728608	14251221	32086924	8813227	15433446	21288904	89169280
IS03 1 1	2370651	1587049	36763984	10186468	20971358	61154532	336147	2813210	696840	371726	362270	7701736
IS03 1 2	3310192	1626206	76852392	19581894	5086928	137181232	1778538	3232755	3842036	5658613	6425462	55479108
IS03 1 3	1692666	1683629	68952752	11473765	11314386	105818104	662268	6174466	4144286	2574965	3340529	49993340
IS03 4 1	2996380	692592	72148832	14123212	13144285	159100896	3404410	23500866	14555745	14900778	21227094	97679520
IS03 4 2	6779422	422004	49976416	13648120	2955050	124915568	3690102	4137665	10351115	2621320	2886080	112059656
IS03 4 3	2259590	637641	82543280	15391467	6039679	96255952	2565942	4634446	4807867	5788353	6743697	48514404
IS03 5 1	6142494	1159717	90091960	15559650	8559307	129777776	3358482	8136215	8635674	5626129	6434030	74161664
IS03 5 2	4288799	2549455	105810808	24493018	40101532	131457576	4289328	46742504	8904543	5314781	6169612	108766536
IS03 5 3	4002357	2862286	119103592	24066272	26980652	153321328	5134315	24420298	11426792	9075110	12180349	111036832
IS04 2 1	2392541	3177121	170225168	30776446	23211972	191786016	20647504	34761848	18286166	13886451	17294930	190154560
IS04 2 2	4358846	3827511	159697200	26138856	29877968	215635536	33839204	65104992	25207174	22824720	32030530	167695840
IS04 2 3	10686178	2226378	100415840	9032764	15564935	95826896	3801231	27698716	13943676	8483750	8066985	120731896
IS04 4 1	2368752	5426006	184253600	37293204	68113816	140502752	23486078	1.79E+08	20993922	15073706	22917790	133831552
IS04 4 2	2110981	2599771	138496352	25461684	40322840	84424304	11150847	62615856	6620922	16880120	19559288	66584268
IS04 4 3	4131777	4447379	151654016	29360488	65627620	119049128	10027691	76693784	9129876	8585489	9395080	64109528
IS04 5 1	2921703	2397249	159127520	32551996	43097544	103006592	15109601	68871512	9010808	16950714	24084590	116309904
IS04 5 2	6747524	1778137	146155760	22576836	26312058	134150432	15255082	42171356	17103276	6963166	9231321	74059856
IS04 5 3	6445703	2404061	156380480	31265800	22779518	107728608	14251221	32086924	8813227	15433446	21288904	89169280
IS05 1 1	970367	539187	59899448	17980526	7961539	178365296	3702231	13533332	21899140	8339575	12042223	96298976
IS05 1 2	1516628	1605174	108121680	21571922	22146720	204627472	8179849	44658664	25256410	14292027	22873452	131393032
IS05 1 3	2538632	1194936	104545408	16115673	25389552	226385744	5741798	53895400	38615512	10110893	15667854	133544120
IS05 2 1	4669454	1790073	98684672	12915741	26602712	170887760	13609954	43136900	15894022	15348336	20336620	121180728
IS05 2 2	8202313	1258134	46305412	10062105	24056798	89286528	8122751	46933336	8824814	12613798	16486943	169588416
IS05 2 3	6825822	3315106	135766272	15849241	45449400	203041888	16296251	79891000	23975206	16019972	22400186	158098208

Apêndice F. Continuação.

	104.1	116.1	144.1	150.1	175.1	182.1	265.2	318.4	325.3	343.3	373.3	381.2
IS05 5 1	4103887	1144157	132031216	36322752	9669750	152004464	11451848	22866124	26471520	12995619	26467642	294478880
IS05 5 2	2614860	1907116	107308640	21914364	15299998	133621712	12747255	30914662	22528072	7898671	14902441	231365440
IS05 5 3	1971329	1333040	76087688	8569647	5399521	81795376	3287679	18049946	12229563	5592506	11089547	94886992
IS06 1 1	769465	946727	35656480	11199839	5332893	70438600	2369766	5071706	3208415	13098895	18548724	105574496
IS06 1 2	940540	521223	50174448	9636342	3235716	70921504	1737452	2758592	2977190	6331755	6570578	50982952
IS06 1 3	1200651	1407064	120684432	29610190	6975278	165648928	9409455	11267331	14220767	18809472	28185106	144539424
IS06 3 1	1887663	1073586	114894448	19184792	7474861	143428048	3817629	15211111	17878544	4661649	6752976	95543976
IS06 3 2	3049841	1942399	140235424	20158832	19507408	167634208	4834886	52697300	32812928	6681210	13965389	151317824
IS06 3 3	2387456	1324595	121486568	16656991	11484202	135661696	5040111	29830780	20237148	12328003	18997664	96043208
IS06 4 1	1234165	2138471	128115312	18784864	16886770	161622816	4445657	34021840	16755995	15557071	23729556	106858224
IS06 4 2	2408586	2904733	111742144	29253516	14786135	208875696	7475424	10983332	9335470	14983931	25244608	128278024
IS06 4 3	2427489	1721709	107632720	17651850	13449662	136972032	4088179	14283611	7278969	6500624	8865473	76610512
IS07 3 1	832408	1069427	69394008	18272984	15716046	124883072	3970548	25365564	8014644	12440668	16222717	119603544
IS07 3 2	2458534	1242197	94225792	11712861	10129384	114266192	2563267	18320386	16410646	3903065	6343684	95438224
IS07 3 3	1472755	1280360	95779408	23026134	7985877	142745904	3825248	9060537	8990149	10720534	17906242	97089928
IS07 4 1	1664869	1679940	105848328	21694448	19512292	229352768	6980097	41519264	32107806	8502673	13190442	224373456
IS07 4 2	2460804	1098334	109713560	19634012	9215715	152602096	4605460	10437733	11136381	3203148	4779200	80548472
IS07 4 3	1972740	2857434	137355600	23590298	34919588	222069664	9670222	61266004	27863900	3222320	5677838	197879440
IS07 5 1	2581108	3368922	129987192	14209522	18820448	187566400	4632639	20018820	13407476	14635746	23278550	99296128
IS07 5 2	2331235	1717898	96289624	10619577	10192239	139179872	2958946	8633871	8697860	4196461	6732247	37587824
IS07 5 3	2426722	2142236	105741080	12392894	21508522	227741184	4953856	33722532	21642456	19007032	27122662	115860528
IS08 1 1	13699048	848810	58822632	7526301	21021460	100211000	1821872	26085336	8820482	2155097	2924989	40653044
IS08 1 2	8112551	2529120	77456448	12134728	17207382	130287112	4954641	36809812	10879029	8282979	13526954	68280448
IS08 1 3	7341254	1386481	72879816	15499256	17799698	199101024	8966079	34719292	29493956	3523749	5607879	156185984
IS08 2 1	5020085	1527718	54890456	8119458	18437714	109784896	1705772	31133710	7300383	7523701	12276442	57714308
IS08 2 2	15294895	1094537	50815052	8033835	16352136	115679712	3387305	20867820	11498084	4923151	8127588	102623888
IS08 2 3	24429288	879059	43464252	4024602	15216453	116640352	1822746	18636448	15108482	2671308	3720198	66385488
IS08 3 1	6893416	1434680	84796880	10795745	14620454	171544608	4055170	27444882	18307670	11435832	15710169	86749712
IS08 3 2	14078191	1193045	55239268	11104683	21603176	113972056	3944873	28471672	10779888	1711974	3079148	124491120
IS08 3 3	16793956	823905	41618648	5595360	17329080	102429120	1282325	22330636	12354732	2024311	2860138	72963776
IS09 1 1	15943508	3527728	208903696	54636020	43569504	132473648	9511867	1.22E+08	23748690	17356290	30519502	231797536
IS09 1 2	1821755	1326444	92621432	14156046	11041440	67493016	4338205	26267004	7510849	10818953	18070670	111146240
IS09 1 3	1423826	1363651	84147904	16221099	8248251	92998680	3970737	21349348	10299090	19238742	30036074	118202536
IS09 4 1	3281084	1445784	123045504	20026160	68884	100253008	9148836	488688	15161972	8509217	11390684	121499832
IS09 4 2	7249526	2333973	193521152	47506052	2474700	136560496	23183998	6197684	10621719	26668188	40180676	164195136
IS09 4 3	4905780	3318298	194612128	32942984	1171929	157512160	21372212	3334637	24477518	8075466	14027884	240750912
IS09 5 1	6229665	2315313	164335056	29313754	494183	124653152	17241412	777181	13138154	19279510	32929256	116711384
IS09 5 2	6327186	1718116	133437856	24592560	98348	93339088	10156817	210217	7397541	12050837	20795240	116854720
IS09 5 3	6565602	1610344	167362320	31661592	18580	151285216	9784095	540797	11529934	14411806	23839524	116474608
IS10 1 1	2068233	942833	44862032	11916428	24074436	87123256	2581304	23975980	6650283	4467394	6051297	78370064
IS10 1 2	2347554	2701594	86993448	25176330	21592964	184723536	6587983	19152542	13529388	13399877	18023306	145358288
IS10 1 3	1470331	1960209	92748344	26072356	23968430	182326432	7535501	23757304	11285256	23698184	31793248	113531296
IS10 4 1	11257805	3262203	133002320	20642044	12897536	270161760	12087654	18903048	30826588	11890613	18596752	114707832
IS10 4 2	9468270	2176645	96149248	10309324	17308228	146389616	4413486	32580834	23401592	5337280	5815775	82597024

Apêndice F. Continuação.

	104.1	116.1	144.1	150.1	175.1	182.1	265.2	318.4	325.3	343.3	373.3	381.2
IS10_4_3	7106769	1796056	104884048	17113286	9551076	207479904	7753927	13157991	20533890	7658564	11328624	85872704
IS10_5_1	4067639	1455788	97349952	15884065	13286302	148449104	4213528	19335804	12728565	10243501	15007797	81968568
IS10_5_2	2922739	2325847	126127928	14722452	19548876	175392496	5012249	57472212	31453236	16512850	20188548	88319248
IS10_5_3	2557223	1903849	121661744	20746170	15339784	182030224	8194514	45547276	22406380	20775512	29781196	88710640

Fonte: autor

Apêndice G. Valores das áreas das bandas cromatográficas referentes à arginina (A_{175}), feruloilputrescina (A_{265}) e à griseofulvina (API), utilizada como padrão interno.

Amostras	A_{175}	A_{265}	API
NI1_1	ND	3393.064	3522.536
NI1_2	ND	2968.351	3053.197
NI1_3	ND	3522.152	3799.216
NI2_1	ND	1638.15	4543.173
NI2_2	ND	1734.791	3041.294
NI2_3	ND	1749.363	3434.698
NI3_1	1528.84	4244.628	2660.019
NI3_2	1540.212	3878.267	3097.581
NI3_3	1619.297	4411.009	2869.794
NI4_1	ND	4237.749	2512.535
NI4_2	ND	4493.921	2634.304
NI4_3	ND	3821.274	2431.159
NI5_1	ND	1885.823	2822.146
NI5_2	ND	1788.104	2752.739
NI5_3	ND	1962.691	2896.268
IS1_1	8439.208	4137.049	3606.277
IS1_2	6203.176	3821.982	3797.344
IS1_3	7676.122	4238.765	4271.969
IS2_1	20303.463	4133.734	4905.545
IS2_2	18550.781	3762.22	4594.937
IS2_3	18544.34	3725.856	4631.833
IS3_1	3599.437	7821.716	2681.296
IS3_2	3738.675	8405.205	2816.359
IS3_3	3,428,554	8548.476	3051.364
IS4_1	8364.713	7401.32	3481.622
IS4_2	7979.897	6805.14	3284.096
IS4_3	9214.07	7237.801	3692.135
IS5_1	20607.225	8961.614	3553.236
IS5_2	20207.824	8480.394	3296.291
IS5_3	22207.857	8823.032	3735.906

Fonte: autor

Apêndice H. Valores de média, desvio padrão e coeficiente de variação calculados a partir dos dados do apêndice G para a área da banda cromatográfica da arginina.

A_{175}/API		Indivíduo NI			Indivíduo IS		
NI	IS	NI_Media	Desvio padrão_NI	Coeficiente de variação_NI	IS_Media	Desvio padrão_IS	Coeficiente de variação_NI
0.000	2.340	0.000	0.000	-	1.923	0.370	0.192
0.000	1.634						
0.000	1.797						
0.000	4.139						
0.000	4.037	0.000	0.000	-	4.060	0.070	0.017
0.000	4.004						
0.575	1.342						
0.497	1.327						
0.564	1.123	0.545	0.042	0.077	1.264	0.122	0.097
0.000	2.403						
0.000	2.430						
0.000	2.496						
0.000	5.800	0.000	0.000	-	2.443	0.048	0.020
0.000	6.131						
0.000	5.944						
0.000	5.944						
0.000	5.944	0.000	0.000	-	5.958	0.166	0.028
0.000	5.944						
0.000	5.944						
0.000	5.944						

Fonte: autor

Apêndice I. Valores de média, desvio padrão e coeficiente de variação calculados a partir dos dados do apêndice G para a área da banda cromatográfica da feruloilputrescina.

A_{265}/API		Indivíduo NI			Indivíduo IS		
NI	IS	Media	Desvio padrão	Coeficiente de variação	IS_Media	Desvio padrão_IS	Coeficiente de variação_NI
0.963	1.147	0.954	0.024	0.025	1.049	0.086	0.082
0.972	1.006						
0.927	0.992						
0.361	0.843						
0.570	0.819	0.540	0.043	0.080	0.822	0.019	0.024
0.509	0.804						
1.596	2.917						
1.252	2.984						
1.537	2.802	1.566	0.041	0.026	2.901	0.093	0.032
1.687	2.126						
1.706	2.072						
1.572	1.960						
0.668	2.522	1.655	0.073	0.044	2.053	0.084	0.041
0.650	2.573						
0.678	2.362						
0.678	2.362						
0.650	2.573	0.665	0.014	0.021	2.485	0.110	0.044
0.678	2.362						
0.678	2.362						
0.678	2.362						

Observação: Os valores destacados em vermelho foram considerados *outliers* e retirados do cálculo da média, desvio padrão e coeficiente de variação

Fonte: autor