

ANA PAULA DIAS DA SILVA

CARACTERIZAÇÃO DE METABÓLITOS NÃO VOLÁTEIS  
DA CANA-DE-AÇÚCAR

Orientador: Prof. Dr. Alberto José Cavalheiro

Araraquara

2012

ANA PAULA DIAS DA SILVA

CARACTERIZAÇÃO DE METABÓLITOS NÃO VOLÁTEIS  
DA CANA-DE-AÇÚCAR

Dissertação apresentada ao Instituto  
de Química, Universidade Estadual  
Paulista, como parte dos requisitos  
necessários para obtenção do título de  
Mestre em Química

Orientador: Prof. Dr. Alberto José Cavalheiro

Araraquara

2012

# CURRÍCULO

## ANA PAULA DIAS DA SILVA

### Dados Pessoais

**Filiação:** Pedro Ferreira da Silva e Regina Célia Custódio Dias Silva

**Nascimento:** 03/03/1988 – Casa Branca/SP – Brasil

### Formação Acadêmica/Titulação

**2010 – atual Mestrado em Química**  
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho,  
UNESP, Araraquara/SP, Brasil  
Título: Caracterização de metabólitos não voláteis da cana de  
açúcar  
Orientador: Prof. Dr. Alberto José Cavalheiro  
Bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de  
Nível Superior

**2006 – 2009 Graduação em Química (Bacharelado em Química  
Tecnológica)**  
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho,  
UNESP, Araraquara/SP, Brasil  
Título: Relatório de Estágio Supervisionado – Identificação  
preliminar de substâncias presentes em extratos de folhas de  
cana-de-açúcar utilizando técnicas cromatográficas  
Orientador: Prof. Dr. Alberto José Cavalheiro  
Bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e  
Tecnológico

### Experiência Profissional

**2006 – 2009 Química Jr. Projetos e Consultoria**  
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho,  
UNESP, Araraquara/SP, Brasil  
Vínculo livre  
Gestão 2006 – 2007: Gerente de Projetos  
Gestão 2007 – 2008: Gerente de Eventos  
Gestão 2008 – 2009: Membro do Conselho Fiscal

### Produção Bibliográfica

#### Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)

1. SILVA, A. P. D.; LEME, G. M.; CAVALHEIRO, A. J. Chlorogenic acids from leaves of sugarcane In: III BCNP – Brazilian Conference on Natural Products, 2011, Ouro Preto. **III Brazilian Conference on Natural Products**, 2011.

2. LEME, G. M.; TOMAZ, P. R. U.; COQUEIRO, A.; SILVA, A. P. D.; CAVALHEIRO, A. J.; HOJO, O.; BOLZANI, V. S. Desenvolvimento de método para extração de metabólitos secundários de folhas de cana de açúcar, visando análise metabolômica In: 33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2010, Águas de Lindóia. **33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2010.**

3. TOMAZ, P. R. U.; SILVA, A. P. D.; LEME, G. M.; HOJO, O.; BOLZANI, V. S.; CAVALHEIRO, A. J. Otimização da extração de metabólitos primários de folhas de cana de açúcar (*Saccharum officinarum*) através de planejamento multifatorial In: 33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2010, Águas de Lindóia. **33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2010.**

## **Eventos**

### **Participação em eventos**

Congresso Internacional: III BCNP – Brazilian Conference on Natural Products, Ouro Preto – MG, de 29/10/2011 a 02/11/2011 – “Chlorogenic acids from leaves of sugarcane”.

Palestra – “Identificação de substâncias presentes em extratos de folhas de cana-de-açúcar” na disciplina Interações Alelopáticas entre plantas; Elenco de disciplinas do Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Produção Vegetal), UNESP – Jaboticabal. Ministrada em maio de 2011, totalizando uma hora.

### **Organização de eventos**


Participação na Comissão Organizadora do XI Encontro das empresas juniores da UNESP (ENEJUNESP), 2009.

ANA PAULA DIAS DA SILVA

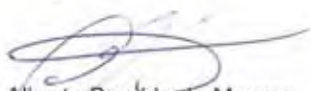
Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Araraquara, 05 de julho de 2012.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Alberto José Cavalheiro (Orientador)  
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Prof. Dr. Luiz Alberto Berardo de Moraes  
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras – USP, Ribeirão Preto



Prof.ª Dr.ª Janete Harumi Yariwake  
Instituto de Química de São Carlos – USP, São Carlos

Aos meus pais, Pedro e Regina, pelo apoio em todos os momentos, especialmente os mais difíceis, pelo companheirismo e amor incondicional.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador, Prof. Dr. Alberto José Cavalheiro, pelos ensinamentos, dedicação no decorrer dos trabalhos, paciência e pela amizade.

Aos meus pais pelo amor, companheirismo, apoio e por sempre acreditarem em mim.

Às minhas irmãs, Mariana e Bruna, pela grande amizade e amor, por me incentivarem e estarem comigo sempre, nas conquistas e nos momentos mais difíceis.

Ao meu namorado, Cayo, pelo amor, companheirismo, amizade e apoio em todas as minhas decisões.

Aos amigos que conquistei em Araraquara, pelos bons momentos de convivência e diversão, pelos conselhos e ajuda nas dificuldades.

Aos amigos de Tambaú, pela parceria e companheirismo de muitos anos e pela paciência nos períodos de ausência.

A todos os amigos do laboratório NuBBE por compartilharem todas as conquistas e dificuldades do grupo, pela grande ajuda e colaboração no desenvolvimento deste trabalho e pelos bons momentos de convivência.

Ao Alberto Alécio e Guilherme Zocolo, pelos experimentos de massas e ao Nivaldo Borale pelos experimentos de RMN.

Ao Prof. Norberto Peporine Lopes do Departamento de Química Orgânica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo e aos técnicos Cristina e Tomaz pelos experimentos de massas.

Aos professores e funcionários do Instituto de Química pela disposição para tirar minhas dúvidas e pelo apoio na realização deste trabalho, em especial à bibliotecária Cristina pela ajuda.

À CAPES pela bolsa concedida.

Ao Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais (NuBBE), Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química – UNESP, Araraquara.

*“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original.”*  
*Albert Einstein*

## RESUMO

O Brasil é atualmente o maior produtor mundial de cana-de-açúcar. O seu cultivo ocupa cerca de 8 milhões de hectares e apresenta duas safras anuais, o que garante a produção de açúcar e etanol para os mercados interno e externo, sendo assim uma cultura de grande interesse econômico para o país. Baseando-se na necessidade de uma avaliação sistemática do metabolismo primário e secundário da cana-de-açúcar, visando à obtenção de um perfil metabólico detalhado de vários cultivares e a construção de um banco de dados metabólicos desta espécie, este projeto de mestrado teve como objetivo caracterizar os metabólitos não voláteis presentes em amostras de extratos de cana-de-açúcar, usando técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e cromatografia gasosa (CG), acopladas a métodos espectrométricos de alto desempenho (DAD e EM), padrões comerciais e análises por RMN *off line*. As estratégias utilizadas consistiram na partição do extrato hidroalcoólico de folhas de cana-de-açúcar por extração líquido-líquido e posteriormente fracionamento por extração em fase sólida C18, obtendo-se frações de menor complexidade. As frações obtidas foram analisadas por RMN, CLAE-DAD-EM, CLAE-EM/EM e CG-EM. A análises por CLAE-DAD-EM e CLAE-IES-EM/EM possibilitaram a identificação de duas séries de isômeros de posição de ácidos clorogênicos (ácido 3-cafeoilquínico, ácido 4-cafeoilquínico e ácido 5-cafeoilquínico; ácido 3-feruloilquínico, ácido 4-feruloilquínico e ácido 5-feruloilquínico) e de cinco flavonóides glicosilados (orientina, vitexina, diosmetina-8-C-glicosídeo, tricina 4'-O-(eritro ou treo)-guaiacilgliceril éter-7-O-glucopiranosídeo e swertisina). Estas técnicas mostraram-se eficientes ferramentas na identificação de substâncias em misturas e os experimentos de EM<sup>2</sup> e EPI (espectro de íons produto) foram de grande importância para a confirmação destas identificações. Os experimentos por CG-EM resultaram na identificação de 61 metabólitos presentes nas frações analisadas, sendo principalmente: aminoácidos, ácidos orgânicos, álcoois de açúcar, açúcares e ácidos clorogênicos. A silição das amostras possibilitou a volatilização e estabilidade destes metabólitos polares. A identificação deste grande número de substâncias foi possível devido a comparação dos espectros de massas com as bibliotecas de dados (NIST e WILEY) e dos índices de retenção calculados com os encontrados na literatura.

**Palavras-chave:** Cana-de-açúcar. CLAE-EM. CG-EM. Ácidos clorogênicos. Flavonóides glicosilados.

## ABSTRACT

Brazil is currently the largest producer of sugarcane. Its cultivation occupies about 8 million hectares and has two harvests per year, which ensures that Brazil produces sugar and ethanol to the domestic and foreign markets. Therefore, this is a crop of great economic interest for the country. Based on the need for a systematic evaluation of primary and secondary metabolism of sugarcane in order to obtain a comprehensive metabolic profile of sugarcane cultivars and building a metabolic database of this species, this project has as objective to characterize the non-volatile metabolites present in samples of extracts from cane sugar leaves, using high performance liquid chromatography (HPLC) and gas chromatography (GC) hifenated with spectroscopic methods (DAD and MS), trading standards and *off-line* analysis by NMR. The strategies used included the liquid-liquid partition of hydroalcoholic extract from leaves and subsequent fractionation by solid phase extraction on C18, to obtain fractions with lower complexity. The fractions were analyzed by NMR, HPLC-DAD-MS, GC-MS and HPLC-MS/MS. The analysis by HPLC-DAD-MS and HPLC--MS/MS allowed the identification of two sets of position isomers of chlorogenic acid (3-caffeoylquinic acid, 4-caffeoylquinic acid and 5-caffeoylquinic acid; 3-feruloylquinic acid, 4-feruloylquinic acid and 5-feruloylquinic acid) and five flavonoid glycosides (orientin, vitexin, diosmetin-8-C-glucoside, tricetin 4'-O-(erythro or threo guaiacylglyceryl) ether-7-O-glucopyranoside and swertisin). These techniques are an effective tool to identify substances in mixtures and the experiments of MS<sup>2</sup> and EPI (product ion spectrum) were very important to confirm these identifications. The GC-MS experiments resulted in the identification of metabolites present in the 61 fractions analyzed, and especially: amino acids, organic acids, sugar alcohols, sugars and chlorogenic acids. Derivatization of the samples with MSTFA allowed to volatilization and stability of these polar metabolites. The identification of this large number of substances was made possible by comparison of mass spectra with library data (NIST and Wiley) and retention rates calculated with the literature

**Keywords:** Sugarcane. HPLC-MS. GC-MS. Chlorogenic acids. Flavonoid glycosides.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Mapa da produção de cana-de-açúcar no Brasil.	<b>19</b>
<b>Figura 2.</b> Compostos fenólicos e estilbenos já identificados em amostras de cana-de-açúcar ou em produtos obtidos a partir da planta.	<b>22</b>
<b>Figura 3.</b> Lignanas identificadas como constituintes de “kokuto”, no Japão.	<b>23</b>
<b>Figura 4.</b> Flavonas e antocianinas já identificadas em estudos químicos de cana-de-açúcar.	<b>24</b>
<b>Figura 5.</b> Triterpenos identificados em estudos químicos de cana-de-açúcar.	<b>25</b>
<b>Figura 6.</b> Esteróides identificados em estudos químicos de cana-de-açúcar.	<b>26</b>
<b>Figura 7.</b> Mecanismo de uma reação de oximação.	<b>31</b>
<b>Figura 8.</b> Exemplo de uma reação de metoximação seguida de sililação de um esteroide.	<b>31</b>
<b>Figura 9.</b> Isômeros <i>syn</i> e <i>anti</i> das oximas.	<b>31</b>
<b>Figura 10.</b> Esquema de um analisador de ion-trap.	<b>38</b>
<b>Figura 11.</b> Esquema de um analisador de triplo quadrupolo.	<b>39</b>
<b>Figura 12.</b> Fluxograma dos processos experimentais realizados.	<b>42</b>
<b>Figura 13.</b> Fluxograma do processo de fracionamento por extração líquido-líquido do extrato hidroalcoólico.	<b>43</b>
<b>Figura 14.</b> Cromatogramas do extrato hidroalcoólico e das frações obtidas por extração líquido-líquido em CLAE-DAD, registrados em 254 nm.	<b>50</b>
<b>Figura 15.</b> Cromatogramas das subfrações obtidas por EFS-C18 analisadas por CLAE-DAD, registrados a 254 nm.	<b>52</b>
<b>Figura 16.</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H obtido para a F1.	<b>53</b>
<b>Figura 17.</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H obtido para a F2.	<b>53</b>
<b>Figura 18.</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H obtido para a F3.	<b>54</b>
<b>Figura 19.</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H obtido para a F4.	<b>54</b>
<b>Figura 20.</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H obtido para a F5.	<b>54</b>
<b>Figura 21.</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H obtido para a F6.	<b>55</b>
<b>Figura 22.</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H obtido para a F7.	<b>55</b>
<b>Figura 23.</b> Ácidos clorogênicos identificados por CLAE-DAD-EM.	<b>68</b>
<b>Figura 24.</b> Flavonóides identificados por CLAE-DAD-EM.	<b>68</b>
<b>Figura 25.</b> Espectro de íon produto do íon precursor <i>m/z</i> 353, do ácido 4-cafeoilquínico.	<b>70</b>
<b>Figura 26.</b> Espectro de íon produto do íon precursor <i>m/z</i> 353, do ácido 3-cafeoilquínico.	<b>71</b>

<b>Figura 27.</b> Espectro de íon produto do íon precursor $m/z$ 353, do ácido 5-cafeoilquínico.	<b>71</b>
<b>Figura 28.</b> Espectro de íon produto do íon precursor $m/z$ 367, do ácido 4-feruloilquínico.	<b>72</b>
<b>Figura 29.</b> Espectro de íon produto do íon precursor $m/z$ 367, do ácido 3-feruloilquínico.	<b>73</b>
<b>Figura 30.</b> Espectro de íon produto do íon precursor $m/z$ 367, do ácido 5-feruloilquínico.	<b>73</b>
<b>Figura 31.</b> Estrutura química geral de uma flavona.	<b>74</b>
<b>Figura 32.</b> Confirmação da identificação da orientina (MM: 448). EPI no modo positivo do íon $m/z$ 449 e EPI no modo negativo do íon $m/z$ 447.	<b>75</b>
<b>Figura 33.</b> Confirmação da identificação da vitexina (MM: 432). EPI no modo positivo do íon $m/z$ 433 e EPI no modo negativo do íon $m/z$ 431.	<b>76</b>
<b>Figura 34.</b> Confirmação da identificação da diosmetina-8-C-glicosídeo (MM: 462). EPI no modo positivo do íon $m/z$ 463 e EPI no modo negativo do íon $m/z$ 461	<b>77</b>
<b>Figura 35.</b> Confirmação da identificação da tricina 4'-O-(eritro ou treo)-guaiacilgliceril éter-7-O-glucopiranosídeo (MM: 688). EPI no modo positivo do íon $m/z$ 689 e EPI no modo negativo do íon $m/z$ 687.	<b>78</b>
<b>Figura 36.</b> TIC (cromatograma de íons totais) da subfração F4 no modo positivo; EM <sup>2</sup> do íon $m/z$ 447 no modo positivo.	<b>79</b>
<b>Figura 37.</b> Cromatogramas obtidos por CG-DIC e CG-EM para a fração FH <sub>2</sub> O.	<b>80</b>
<b>Figura 38.</b> Cromatogramas obtidos por CG-DIC e CG-EM para a subfração F1e2.	<b>81</b>
<b>Figura 39.</b> Cromatogramas obtidos por CG-DIC e CG-EM para a subfração F3.	<b>81</b>
<b>Figura 40.</b> Cromatogramas da amostra de padrões de <i>n</i> -alcanos analisados por CG-DIC e CG-EM.	<b>82</b>
<b>Figura 41.</b> Cromatograma da mistura de padrões 1 analisada por CG-EM.	<b>83</b>
<b>Figura 42.</b> Cromatograma da mistura de padrões 2 analisada por CG-EM.	<b>83</b>
<b>Figura 43.</b> Cromatograma da mistura de padrões 3 analisada por CG-EM.	<b>83</b>
<b>Figura 44.</b> Cromatograma da mistura de padrões 4 analisada por CG-EM.	<b>84</b>
<b>Figura 45.</b> Espectros de massa obtidos para os isômeros de posição do ácido cafeoilquínico.	<b>87</b>
<b>Figura 46.</b> Íons característicos da fragmentação do ácido cafeoilquínico.	<b>88</b>
<b>Figura 47.</b> Espectros de massa obtidos para os isômeros de posição do ácido feruloilquínico.	<b>88</b>
<b>Figura 48.</b> Íons característicos da fragmentação do ácido feruloilquínico.	<b>89</b>

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Massas das frações obtidas por extração líquido-líquido de 20 g do extrato hidroalcoólico. **49**
- Tabela 2.** Massas das subfrações obtidas por extração em fase sólida em C18 da subfração BuOH. **51**
- Tabela 3.** Metabólitos identificados por CG-EM com seus respectivos tempos de retenção ( $t_R$ ), índice de retenção calculado ( $IR_{Cal}$ ), índice de retenção encontrados na literatura ( $IR_{Lit}$ ), porcentagem de similaridade do espectro de massas com a biblioteca de dados e as frações em que foram identificados os metabólitos. **85**
- Tabela 4.** Abundância relativa (%) dos íons  $m/z$  345 e  $m/z$  307 para os isômeros de posição do ácido cafeoilquínico trimetilsililado. **88**

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcOEt: Acetato de etila  
CG: Cromatografia gasosa  
CLAE: Cromatografia líquida de alta eficiência  
DAD: Detector de arranjos de diodos  
DIC: Detector de ionização em chama  
DMSO: Dimetilsulfóxido  
EFS: Extração em fase sólida  
ELL: Extração líquido-líquido  
EM: Espectrometria de massas  
EMS: Varredura total (*Enhanced mass spectrometry*)  
EPI: Espectro de íons produtos (*Enhanced product ion*)  
GMD: *Golm Metabolome Database*  
IES: Ionização por “electrospray”  
EtOH: Etanol  
FIPA: Fotoionização à pressão atmosférica  
IE: Ionização por impacto de elétrons  
IQ: Ionização química  
IQPA: Ionização química à pressão atmosférica  
MeOH: Metanol  
MEOX: Metoxima  
MM: Massa molecular  
MSTFA: N-metil-N-(trimetilsilil)-trifluoroacetamina  
*n*-BuOH: Butanol  
NIST: *National Institute of Standards and Technology*  
Q-TOF: Analisador híbrido triplo quadrupolo com tempo de voo  
Q-TRAP: Analisador híbrido triplo quadrupolo com ion-trap  
RMN: Ressonância magnética nuclear  
TIC: Cromatograma de íons totais (*Total ion chromatogram*)  
TMS: Trimetilsilil  
TOF: Analisador de tempo de voo (*Time of flight*)  
UNICA: União da indústria de cana-de-açúcar  
UV: Ultravioleta

## SUMÁRIO

1. <b>Introdução</b> .....	15
2. <b>Objetivos</b> .....	17
3. <b>Revisão da literatura</b> .....	18
3.1. Cana-de-açúcar .....	18
3.2. Metabolômica no estudo da cana-de-açúcar .....	19
3.3. Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) .....	30
3.4. Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM) .....	35
4. <b>Materiais e métodos</b> .....	41
4.1. Material Vegetal .....	41
4.2. Extração .....	41
4.3. Estratégias experimentais .....	41
4.4. Fracionamento do extrato hidroalcoólico por Extração Líquido-Líquido .....	42
4.5. Fracionamento por Extração em Fase Sólida (EFS) .....	43
4.6. Análises por CLAE-DAD-EM .....	45
4.7. Análises por CG-EM .....	47
5. <b>Resultados e discussão</b> .....	49
5.1. Extração .....	49
5.2. Fracionamento do extrato hidroalcoólico por Extração Líquido-Líquido .....	49
5.3. Fracionamento por Extração em Fase Sólida (EFS) .....	50
5.4. Análises por CLAE-DAD-EM .....	56
5.4.1. CLAE-DAD-EM da subfração F1e2 .....	57
5.4.2. CLAE-DAD-EM da subfração F3 .....	61
5.4.3. CLAE-DAD-EM da subfração F4 .....	63
5.4.4. Identificação de ácidos clorogênicos .....	68
5.4.5. Identificação de flavonoides .....	74
5.5. Análises por CG-EM .....	80
6. <b>Conclusões</b> .....	90
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	92
<b>ANEXOS</b> .....	100

## 1. Introdução

Atualmente o Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, sendo o interior paulista a região de maior cultivo, devido ao clima tropical favorável. O seu cultivo é de grande interesse econômico, pois a planta é a principal matéria prima para a produção de açúcar (sacarose) e álcool (etanol), além de alguns subprodutos, como fertilizantes (obtidos da vinhaça) e até mesmo energia elétrica obtida através da queima do bagaço.

Metabolômica é a área das ciências “ômicas” que analisa o conjunto de metabólitos produzidos e/ou modificados por um organismo, o metaboloma, visando à compreensão das redes metabólicas e da composição micromolecular desses organismos.

Análises metabolômicas permitem obter uma extensa visão do perfil metabólico do vegetal e sua rede regulatória, possibilitando a identificação de fatores que possam ser manipulados para o aumento de produtividade em compostos energéticos e também na identificação de características moleculares que possibilitem à espécie vegetal maior resistência a situações de estresse. (Dixon et al. 2006)

O entendimento dessas respostas metabólicas permitirá um planejamento mais específico e manejo de características selecionadas, visando o desenvolvimento de variedades com maior potencial econômico. Porém, uma investigação completa do metaboloma é dificultada pela complexidade e dinâmica metabólica dos organismos.

Poucos estudos foram realizados até o momento visando à caracterização de metabólitos micromoleculares de cana-de-açúcar. Estudos realizados anteriormente no Instituto de Química – UNESP Araraquara – NuBBE (Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais) visando o estabelecimento de métodos cromatográficos para análise metabolômica de cana-de-açúcar já demonstraram a grande complexidade de metabólitos micromoleculares desta espécie:

- do extrato aquoso é possível obter pelo menos 100 picos cromatográficos em análise por cromatografia gasosa, após silição dos metabólitos polares. Um protocolo de extração e preparação das amostras foi

desenvolvido, assim como a otimização das condições cromatográficas (Tomaz 2011);

- do extrato hidroalcoólico também são obtidos quase uma centena de picos na análise do extrato por CLAE-DAD (Leme 2011).

Sendo assim, a identificação da maioria dos metabólitos de uma matriz vegetal é a etapa inicial para o estudo metabolômico da planta. Esta identificação é possível através da utilização de técnicas hífenadas, ou seja, o acoplamento de um sistema cromatográfico a um detector espectroscópico ou espectrométrico, como CLAE-DAD, CLAE-DAD-EM e CG-EM, e através do uso de padrões comerciais, visando à obtenção de informações estruturais de metabólitos de interesse diretamente de uma mistura complexa.

## 2. Objetivos

Baseando-se na necessidade de uma avaliação sistemática do metabolismo primário e secundário da cana-de-açúcar, visando à obtenção de um perfil metabólico detalhado de vários cultivares e a construção de um banco de dados metabólicos desta espécie, propõe-se como objetivo geral dessa dissertação a caracterização de metabólitos não voláteis presentes em amostras de extratos de cana-de-açúcar, usando técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e cromatografia gasosa (CG), preferencialmente acopladas a métodos espectrométricos de alto desempenho (DAD e EM), padrões comerciais e análises por RMN *off line*.

## 3. Revisão da literatura

### 3.1. Cana-de-açúcar

Cana-de-açúcar, planta da família das gramíneas (Poaceae), é originária do sudeste asiático, onde foi cultivada desde tempos remotos a partir da espécie *Saccharum officinarum*. (Casu et al. 2004)

A família Poaceae, também representada pelo milho, sorgo, arroz e outras gramíneas, tem como principais características a forma da inflorescência (espiga), o crescimento do caule em colmos, as folhas com lâminas de sílica em suas bordas e bainha aberta. O cultivo da cana-de-açúcar ocorre principalmente em países tropicais e subtropicais, para obtenção de açúcar, álcool e aguardente, devido ao alto teor de sacarose contido em seu caule. Os subprodutos gerados pela indústria também são utilizados, sendo a vinhaça para a produção de fertilizantes e o bagaço para geração de energia elétrica. (UNICA, 2012)

No Brasil, maior produtor mundial de cana-de-açúcar, o cultivo concentra-se na região sudeste, principalmente no interior paulista. A cana ocupa cerca de 8 milhões de hectares ou cerca de 2% de toda a terra arável do País e apresenta duas safras anuais, o que garante a produção de açúcar e etanol para os mercados interno e externo, sendo assim uma cultura de grande interesse econômico para o país. (UNICA, 2012)

Os biocombustíveis, vislumbrados como fontes renováveis e não poluentes de energia, tem recebido por isso atenção crescente. A sua produção a partir da cana-de-açúcar tem merecido ênfase especial, devido ao seu cultivo ter crescido de forma impressionante no Brasil, a ponto de se tornar uma cultura agrícola de importância estratégica para a econômica nacional.

**Figura 1.** Mapa da produção de cana-de-açúcar no Brasil.



**Fonte:** NIPE-Unicamp, IBGE e CTC.

O cruzamento da espécie *Saccharum officinarum* com outras quatro do mesmo gênero permitiu o desenvolvimento de diversas novas variedades. O melhoramento genético da espécie teve início antes de 1950, com tentativas de cruzamento intensivo entre espécies selvagens, com o objetivo de obter variedades com melhores características agrônômicas, incluindo resistência a doenças. (Casu et al. 2004)

Variedades modernas de cana-de-açúcar são derivadas principalmente de cruzamento interespecífico entre a cana nobre *S. officinarum* e a espécie selvagem *S. spontaneum*. Como resultado, as variedades híbridas atuais de cana possuem um genoma interespecífico complexo, com o número de cromossomos variando de 100 a 130 (Hoarau et al 2005). Esta complexidade genômica torna o melhoramento da cana-de-açúcar uma tarefa muito difícil. (Casu et al. 2004)

### 3.2. Metabolômica no estudo da cana-de-açúcar

O crescimento das plantas, assim como seu ciclo de vida, envolvem sequências complexas de expressão gênica altamente controladas, além de respostas e adaptações ao meio ambiente onde estão sujeitas a várias situações de estresses bióticos e abióticos que podem modificar essa expressão.

Metabolômica é uma abordagem promissora para o estudo dos processos ecofisiológicos de um organismo, monitorando através de técnicas analíticas de alto desempenho como CG-EM, CLAE-DAD-EM e RMN o maior número possível de metabólitos micromoleculares dos seus vários órgãos e tecidos.

Análises metabolômicas permitem obter uma extensa visão do perfil metabólico do vegetal e sua rede regulatória, possibilitando a identificação de fatores que possam ser manipulados para o aumento de produtividade em compostos energéticos e também na identificação de características moleculares que possibilitem à espécie vegetal maior resistência a situações de estresse (Dixon et al. 2006). O entendimento das respostas metabólicas permitirá planejamento mais específico e manejo de características selecionadas, visando o desenvolvimento de variedades com maior potencial econômico.

As aplicações têm crescido e vem se tornando uma estratégia de abordagem complementar a genômica, transcriptômica e proteômica, com o objetivo de determinação de função e regulação de genes em microorganismos (Raamsdonk et al. 2001), plantas (Roessner et al. 2001) e animais. Algumas aplicações dessa abordagem incluem:

- Determinação de biomarcadores metabólicos cujas alterações são indicativas da presença de uma doença ou uma resposta às intervenções baseadas em fármacos;
- Determinação de efeitos de estresses bioquímicos ou ambientais sobre plantas ou microorganismos, incluindo plantas geneticamente modificadas;
- Caracterização de alterações na constituição micromolecular em organismos transgênicos.

A produção de sacarose a partir de cana-de-açúcar teve origem por volta do ano 350, na Índia, porém a sua estrutura molecular só foi elucidada após aproximadamente 3 décadas de estudo, em 1927 (Avery, Haworth e Hirst, 1927).

Começam a aparecer na literatura relatos sobre outros constituintes químicos micromoleculares da cana-de-açúcar somente a partir da década de 1930. Em revisão de 1957, Burr e colaboradores publicaram o que era conhecido à época sobre sua constituição química. Em relação às micromoléculas, é citada a ocorrência de pirogalol, ácido protocatecuico e vanilina na fração lignínica; vitamina A, inositol, fitina e os ácidos aconítico, cítrico, fumárico, glicólico, málico, mesacônico, oxálico, succínico, siríngico e ascórbico foram identificados na garapa; tiamina, riboflavina, ácido pantotênico, niacina e biotina nos colmos; ácido fólico no melão; além de piridoxina e ácido ascórbico nas folhas. Da graxa exterior dos colmos foram obtidos álcool miricílico e hidrocarbonetos. Ácidos palmítico e linoleico, estigmasterol, sitostetol, glicerol, clorofila e caroteno foram obtidos de extratos da planta. Entre os compostos fosforados, até 1957 já haviam sido identificados em cana-de-açúcar frutose difosfato, glicose-1-P, glicose-6-P, adenosina trifosfato, ácido fosfomálico e ácido glicérico-3-P. Entre os aminoácidos, asparagina era frequentemente encontrada em grande quantidade no melão, mas também já havia sido relatada a ocorrência de ácido aspártico e glutâmico, lisina, alanina, valina, ácido  $\gamma$ -aminobutírico, leucina, isoleucina, glicina, serina, glutamina, fenilalanina, norleucina, tirosina, cisteína, metionina, norvalina, ácido  $\alpha$ -amino isobutírico, prolina e treonina.

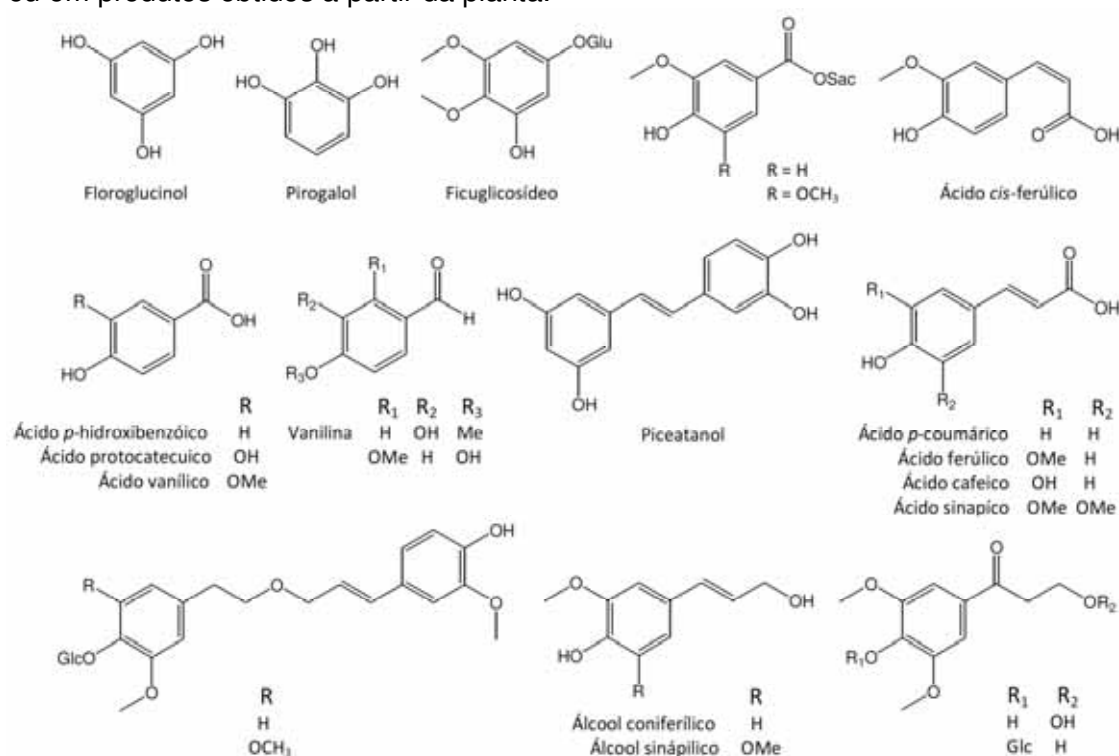
A ocorrência de substâncias fenólicas em cana-de-açúcar foi estudada preliminarmente por Stevens (Stevens, 1959), que verificou na cutícula do vegetal a presença de pigmento cuja aglicona apresentou características similares à cianidina. A ocorrência de antocianinas em cana já havia sido proposta por Sakuma e Momose, em 1935. Em 1994 vários compostos fenólicos foram identificados do bagaço de cana-de-açúcar: ácido *p*-coumárico, ácido ferulico, *p*-hidroxibenzaldeído, vanilina e ácido vanílico (Leal et al., 1994).

Williams e colaboradores realizaram um vasto estudo sobre a composição química no complexo *Saccharum*, que envolveu a investigação de 120 plantas dos gêneros *Saccharum*, *Erianthus*, *Ripidium*, *Miscanthus*, *Narenga*, *Sclerostachya*, *Imperata*, incluindo híbridos interespecíficos e intergenéricos e variedades comerciais de cana-de-açúcar (Williams, Harborne & Smith, 1974). O estudo indica as flavonas de folhas como potenciais marcadores sistemáticos, acrescentando que *Saccharum officinarum*, *S. edule*,

*S. robustum* e *Erianthus maximus* podem ser facilmente distinguidos de *S. spontaneum*, *Narenga*, *Miscanthus*, *Imperata*, *Scleostachya*, *Ripidium* e outras espécies de *Erianthus* pela presença de bissulfatos de tricina-7-*O*-glicosídeo e tricina-7-*O*-neohesperidosídeo e tricina-7-*O*-diglicosídeo.

No mesmo estudo foi observado que as espécies de *Erianthus*, todas africanas, podem ser distinguidas de *Ripidium*, que ocorrem nas Américas, pela presença de uma luteolina di-*C*-glicosídeo apenas no gênero *Ripidium*. A identificação de várias substâncias foi incompleta, porém outras flavonas *C*- e *O*-glicosídeos foram encontradas em todos os gêneros estudados: iso-orientina, iso-vitexina, iso-orientina-*O*-raminosilglicosídeo, iso-orientina 7-*O*-glicosídeo e três luteolina di-*C*-glicosídeos (Williams, Harborne & Smith, 1974)

**Figura 2.** Compostos fenólicos e estilbenos já identificados em amostras de cana-de-açúcar ou em produtos obtidos a partir da planta.



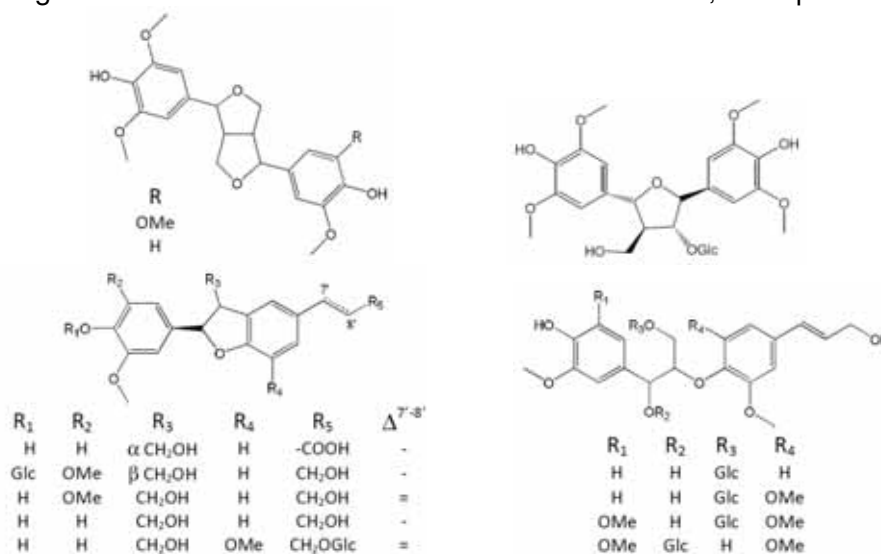
Trabalhos mais refinados, empregando técnicas como CLAE-DAD-EM, começam a surgir a partir de 2005, buscando a caracterização de flavonas de folhas de plantas híbridas, transgênicas e em garapa a partir de cultivares brasileiros de cana-de-açúcar. Nestes estudos foram descritas várias flavonas *O* e *C*-glicosiladas, incluindo diosmetina-8-*C*-glicosídeo-arabinosídeo,

diosmetina-8-*C*-glicosídeo, tricina-7-*O*-raminosilgalactoronídeo, tricina-4'-*O*-(*eritro* ou *treo*-guaiacilgliceril) éter e tricina-4'-*O*-(*eritro* ou *treo*-guaiacilgliceril) éter-7-*O*-glicopiranosídeo, tricina-7-*O*-raminosil-galactoronídeo, tricina-7-*O*-neohesperosídeo, tricina-7-*O*-neoesperosídeo-4'-*O*-ramnosídeo, tricina-7-*O*-metilglucuronídeo, tricina-7-*O*-neoesperosídeo-4'-*O*-ramnosídeo, orientina, vitexina, luteolia-8-*C*-raminosil-glicosídeo, 4',5'-dimetil-luteolina-8-*C*-glicosídeo, luteolina-8-*C*-glucosil-7-*O*-glucuronídeo, schaftosídeo, isoschaftosídeo e 7-*O*-metilapigenina-6-*C*-glicosídeo (Colombo *et al*, 2005; Colombo *et al*, 2006; Colombo, Yariwake, McCullagh, 2008; Vila *et al*, 2008; Colombo *et al*, 2009).

A ação antiproliferativa e antioxidante observada por Duarte-Almeida e colaboradores (2006 e 2007) na garapa obtida de cana-de-açúcar (cultivar SP813250) foi atribuída aos constituintes fenólicos apigenina, luteolina, ácido caféico, ácido hidroxicinâmico e ácido sinápico, além de tricina-7-*O*-β-(6''-metoxicinâmil)-glicosídeo.

No Japão e em seus arredores é preparado através da cana-de-açúcar o *kokuto*, um tipo de açúcar bruto similar à rapadura, sua composição química foi estudada, resultando na descrição de vários compostos fenólicos, muitos com propriedades antioxidantes, incluindo várias lignanas (Nakasone *et al* 1996; Takara *et al* 2002 e 2003).

**Figura 3.** Lignanas identificadas como constituintes de “kokuto”, no Japão.

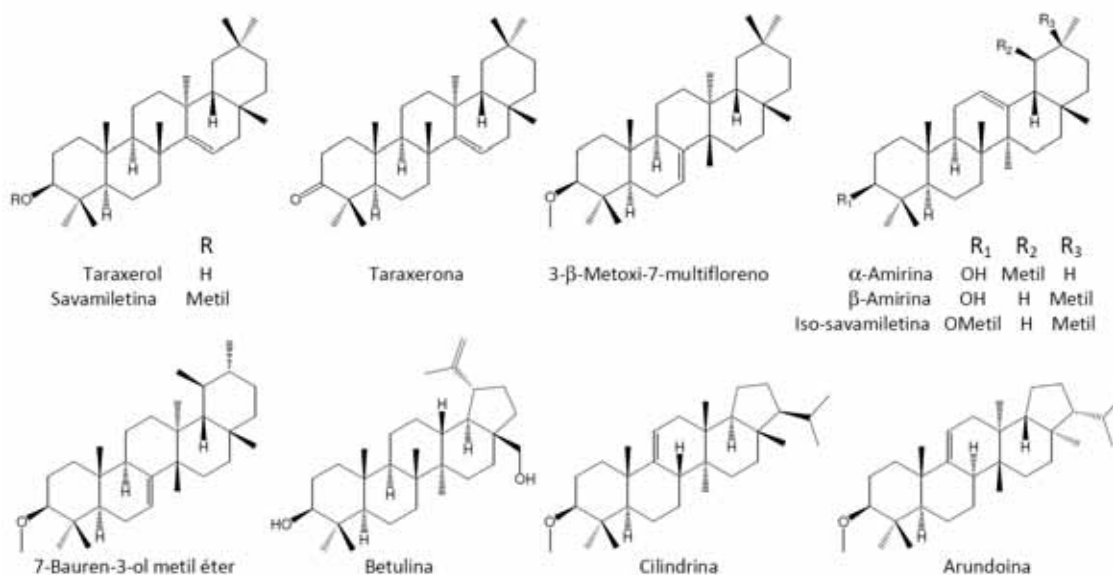




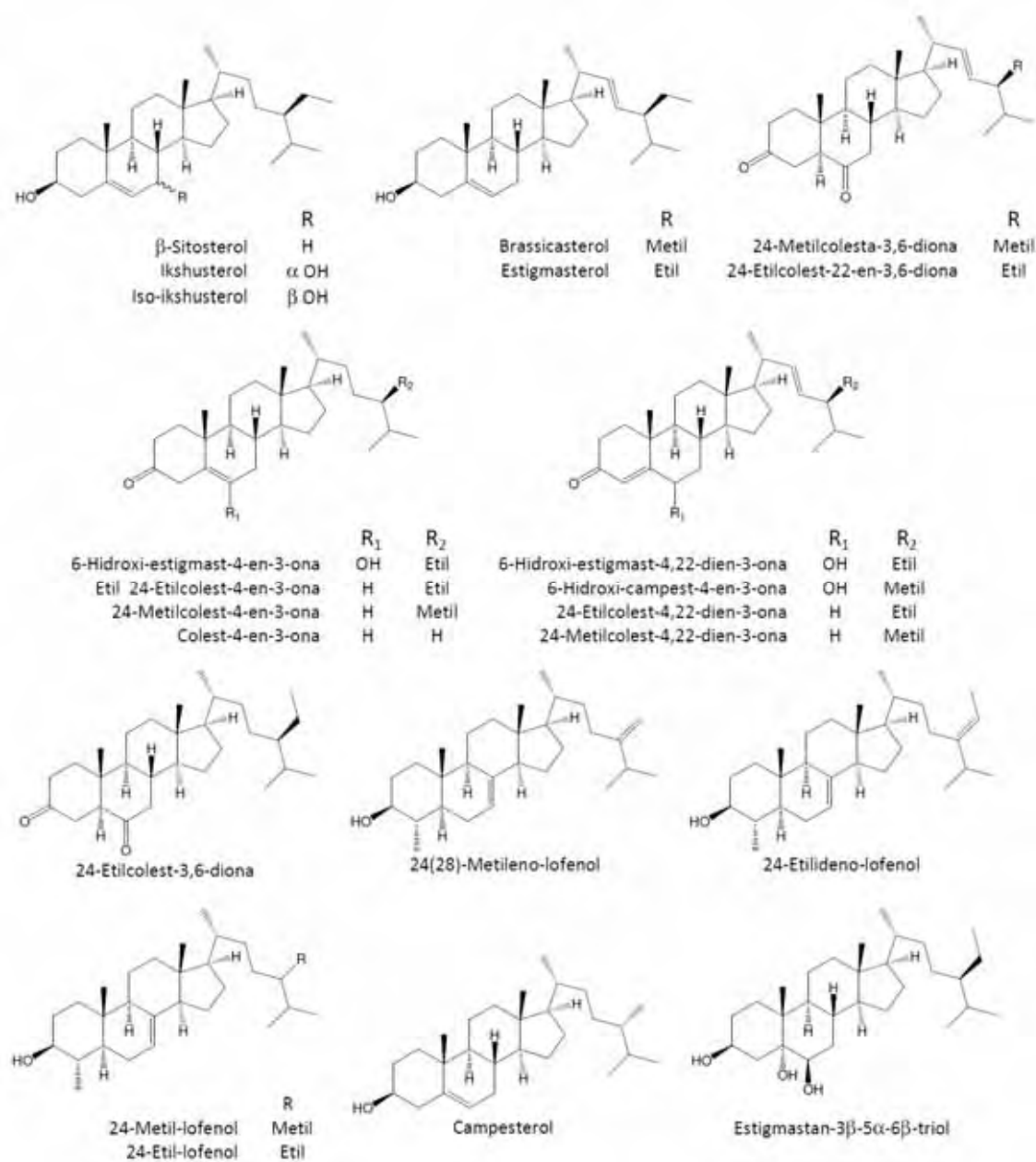
Os primeiros triterpenos identificados nas folhas de *Saccharum officinarum* L. foram arundoina (fernenol metil éter) e taraxerol metil éter (savamiletina) (Bryce *et al*, 1967). Posteriormente, foram caracterizados  $\beta$ -sitosterol, estigmasterol e os compostos minoritários taraxerol,  $\beta$ -amirina, betulina,  $\beta$ -amirina metil éter (iso-savamiletina), fernenol, cilindrina, 24-metilofenol, 24-etil-lofenol, estigmasten-5-en-3 $\beta$ -diol (ikshusterol), estigmasten-5-en-3 $\beta$ -diol (epi-ikshusterol) e estigmastan-3 $\beta$ , 5 $\alpha$ , 6 $\beta$ -triol (Deshmane & Dev, 1971).

Os triterpenos e esteróides campesterol;  $\beta$ -sitosterol; estigmasterol; 24-metilcolesta-3,6-diona; 24-etilcolesta-3,6-diona; 24-etilcolest-22-en-3,6-diona; 6-hidroxi-campest-4-en-3-ona; 6-hidroxiestigmast-4,22-dien-3-ona; colest-4-en-3-ona; 24-metilcolest-4-en-3-ona; 24-metilcolesta-4,22-dien-3-ona; 24-etilcolest-4-en-3-ona e 24-etilcolesta-4,22-dien-3-ona foram isolados da torta de filtro da cana-de-açúcar (Georges *et al*, 2006). Torta de filtro é um resíduo obtido na fabricação do açúcar, depois que as borras resultantes da clarificação têm a sacarose residual extraída. Este resíduo tem sido empregado na adubação orgânica (Pereira *et al*, 2005).

**Figura 5.** Triterpenos identificados em estudos químicos de cana-de-açúcar.



**Figura 6.** Esteróides identificados em estudos químicos de cana-de-açúcar.



Nos trabalhos citados acima foram realizados o isolamento e caracterização estrutural de compostos obtidos de diferentes órgãos da cana-de-açúcar e também de produtos e subprodutos oriundos do processamento do vegetal. Portanto vale ressaltar que muitas dessas substâncias podem ser resultadas de hidrólise, rearranjos e isomerizações causadas pelos processos térmicos e alcalinos envolvidos na preparação de melaço, rapadura e *kokuto*, principalmente.

Sabe-se que as mudanças metabólicas constituem a principal característica, como resultado de modificações genéticas e também como resultado de interações entre planta e patógenos, pragas, e com o ambiente. (Allwood et al, 2008)

Os primeiros trabalhos relacionando alterações na constituição química de cana-de-açúcar com situações de estresse começam a aparecer em 1934 e associaram floroglucinol (1,3,5-triidroxibenzeno) ao cultivo sob deficiência de potássio (Hartt 1934). Posteriormente, foi associado o aumento expressivo do teor de aminoácidos quando a cana-de-açúcar foi submetida à seca (Wiggins e Williams 1955).

Piceatanol foi isolado e caracterizado a partir do extrato clorofórmico dos colmos de *Saccharum* sp. (cultivares CP807, C 33-324 e CP36-13). Este estilbeno foi biossintetizado pela planta quando inoculada com o fungo *Colletotrichum falcatum*, conhecido como podridão vermelha (Brinker & Seigler, 1991), sendo caracterizado como fitoalexina (substâncias produzidas pelo vegetal como resposta a presença de patógenos invasores). Estilbenos como o piceatanol, resveratrol e pinosilvina também foram localizados em outras espécies de Poaceae infectadas com fungos endofíticos (Powell *et al*, 1994). Kumar e Narayanaswamy (2006) também tentaram relacionar os níveis de ácidos carboxílicos,  $\alpha$ -hidroxi ácidos e aminoácidos com o desenvolvimento da podridão vermelha.

Metabólitos secundários são sintetizados a partir de intermediários do metabolismo primário do carbono. Considera-se que a síntese aumentada desses metabólitos estão relacionadas à proteção das estruturas celulares à danos oxidativos, sob condições de estresse (Chalker-Scott e Fuchigami 1989; Close e McArthur 2002; Winkel-Shirley 2002; Wahid e Ghazanfar 2006). Os compostos fenólicos são antioxidantes poderosos, importantes na proteção de tecidos sob estresse (Dixon and Paiva 1995; Sgherri et al. 2004). Eles são quimicamente heterogêneos, incluindo flavonóides, ligninas e taninos. Desempenham ampla variedade de funções, incluindo defesa contra herbívoros e patógenos, suporte mecânico, atração de polinizadores, absorção de luz e ação inibitória sobre plantas vizinhas competidoras (Harborne and Williams 2000; Taiz and Zeiger 2002).

Recentemente, o papel dos compostos fenólicos foi revisado devido às evidências de seu maior envolvimento na tolerância ao estresse oxidativo do que na defesa contra herbívoros (Close and McArthur 2002; Wahid and Ghazanfar 2006). Antocianinas foram produzidas sob várias condições de estresse, incluindo UV-B (Mendez et al. 1999), seca (Balakumar et al. 1993), baixa temperatura (Krol et al. 1995), deficiência de nutrientes (Rajendran et al. 1992), ozônio (Foot et al. 1996), e salinidade (Wahid and Ghazanfar 2006).

Fontaniella & Vicente (2003) avaliaram os níveis de compostos fenólicos em dois cultivares de cana-de-açúcar com susceptibilidades diferentes em relação à escaldadura das folhas, uma doença causada pela bactéria *Xanthomonas albilineans*. Os sucos obtidos dos dois cultivares infectados apresentaram níveis significativamente aumentados de atividade de putresceína e ornitina descarboxilase. No entanto, os patógenos induziram mudanças diferentes nos dois cultivares, em etapas metabólicas subsequentes. Enquanto espermidina desapareceu completamente no cultivar altamente susceptível C 439-52, um aumento no teor dessa substância foi observado no cultivar moderadamente susceptível L 55-5. O metabolismo de ácidos fenólicos também foi diferente nos dois cultivares. Em resumo, este estudo demonstrou que a composição de poliaminas e ácidos fenólicos no suco da cana-de-açúcar foi alterada de forma diferenciada pela infecção por *X. albilineans*.

Ropenack e colaboradores (1998) relacionaram o aumento nos níveis de poliaminas e ácidos fenólicos em tecidos vegetais com a diminuição na eficiência da infestação fúngica e viral, incluindo inibição da germinação de esporos de fungos e reforço da parede celular vegetal tornando-as mais resistentes à ação de enzimas hidrolíticas. Poliamidas também foram identificadas em garapa (Rodríguez et al., 2000).

Várias associações entre níveis de açúcares e expressão gênica já foram relatadas. Os açúcares palatinose, turanose, celobiose, gentiobiose, lactilose e leucrose foram relacionados à supressão de sinalização de giberelinas em embriões de cevada (Loreti et al 2000). Além de sacarose, o açúcar mais abundante na cana-de-açúcar, glicose e frutose estão sempre presentes em baixas concentrações em cana-de-açúcar. Adicionalmente outros 32 açúcares solúveis já foram detectados em concentrações mínimas em várias espécies e híbridos do complexo *Saccharum* (Glassop et al. 2010). O

eventual papel dessas substâncias na modulação de sinais fisiológicos, incluindo crescimento vegetal e resposta a estresses ainda não é entendido.

Levando em consideração as importantes associações já realizadas entre o metabolismo de cana-de-açúcar em condições de estresse e sabendo-se que grande parte deste metabolismo ainda não é entendida, estudos metabolômicos detalhados são plenamente justificados no sentido de auxiliar no melhoramento genético da cana-de-açúcar, visando tanto o aumento da produtividade de sacarose, como também a maior adaptabilidade a novas fronteiras agrícolas e maior resistência às condições de estresse biótico e abiótico.

A etapa inicial para o estudo e entendimento do metabolismo da cana-de-açúcar é a identificação dos metabólitos tanto primários quanto secundários da planta. Uma vez que já foi demonstrada a grande complexidade da matriz metabólica da planta e que poucos estudos foram realizados até o momento visando à caracterização de metabólitos micromoleculares da cana-de-açúcar.

Esta identificação se baseia na análise de extratos polares e apolares ou subfrações obtidas por EFS ou ELL utilizando técnicas hifenadas (CLAE-DAD, CLAE-EM, CG-EM), as quais possibilitam rápida classificação/diferenciação das amostras, e identificação precisa de grande número de metabólitos em mistura. Utiliza-se CG-EM para a análise de compostos voláteis ou derivados voláteis de compostos sem essas características desejadas (como ácidos graxos, aminoácidos e açúcares) e CLAE-DAD-EM para a análise de muitos metabólitos secundários e outros não analisáveis por cromatografia gasosa. Outra estratégia é a utilização de padrões comerciais e, em último caso, isolamento e elucidação estrutural por técnicas espectrométricas *off line* (principalmente RMN).

### 3.3. Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)

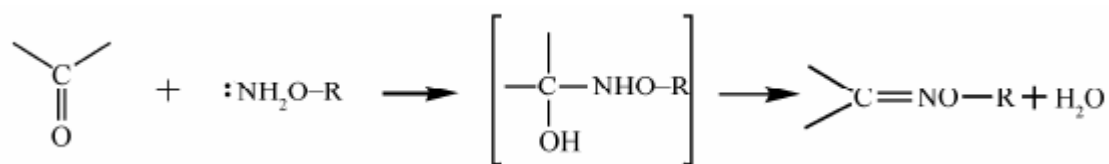
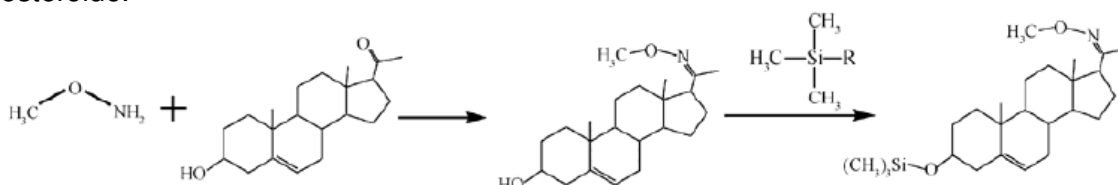
Em metabolômica, CG-EM é descrita como ferramenta de primeira escolha (Harrigan e Goodacre 2003), apesar da limitação em relação aos compostos não voláteis e de alto peso molecular, sua reprodutibilidade é um ponto extremamente importante e os vários bancos de espectros comerciais (NIST, WILEY) podem ajudar na identificação dos compostos.

Cromatografia gasosa é uma técnica de separação com poder de resolução excelente, tornando possível à análise de centenas de substâncias de uma mesma amostra. Outro fator positivo é sua detectabilidade, que dependendo do tipo de substância analisada e do detector empregado pode chegar até cerca de  $10^{-12}$  g. Essa característica possibilita a análise de pequenas quantidades de amostras, o que em certos casos limita a utilização de outras técnicas. (Collins et al., 1997)

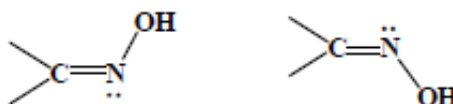
A grande limitação da cromatografia gasosa é só poder ser empregada na análise de substâncias voláteis e estáveis termicamente, porém em alguns casos essa dificuldade pode ser contornada pela preparação de derivados com estas características. (Collins et al., 1997)

Para análise de metabólitos não voláteis por cromatografia gasosa, Roessner e colaboradores (Roessner et al, 2000) propõem um método baseado nas reações de metoximação e posterior sililação dos metabólitos da amostra, o que torna os seus derivados analisáveis por CG. O método consiste no tratamento do extrato ou fração com cloridrato de metoxiamina (em piridina) e então com reagente sililante MSTFA (*N*-metil-*N*-[trimetilsilil]-trifluoroacetamida).

As reações de formação de oximas são necessárias antes da sililação porque a derivação direta de monossacarídeos com TMS leva a uma série de picos cromatográficos diferentes relacionados às estruturas cíclicas epiméricas e à cadeia aberta dessas substâncias. A conversão das carbonilas de aldeídos e cetonas em oximas (metoxiamina) antes de formar os éteres de TMS, impede a ciclização dos monossacarídeos limitadas pela ligação C=N, resultando apenas na formação de formas *syn* e *anti* abertas e ainda protege a molécula contra a descarboxilação (Gullberg et al 2004). Nas figuras 7 e 8 são apresentados os mecanismos das reações de derivação.

**Figura 7.** Mecanismo de uma reação de oximação.**Fonte:** Fang *et al.*, 2010**Figura 8.** Exemplo de uma reação de metoximação seguida de silição de um esteróide.**Fonte:** Fang *et al.*, 2010

O mecanismo da reação de metoximação baseia-se na reação de adição nucleofílica de nitrogênio em grupamentos aldeídos ou cetonas. Os elétrons  $\pi$  da ligação dupla carbono-oxigênio ( $C=O$ ) são fortemente deslocados para o átomo de oxigênio, sendo assim o átomo de carbono torna-se um centro deficiente em elétrons e o oxigênio um centro rico em elétrons. Desta forma é facilitado o ataque nucleofílico no átomo de carbono, que tem pouco impedimento estérico acima ou abaixo do plano. Com o ataque nucleofílico, realizado pelo átomo de nitrogênio básico da metoxiamina, tem-se um intermediário quaternário, o qual forma a oxima através da liberação de uma molécula de água. (Fang *et al.*, 2010) Na Figura 9 são mostradas as formas *syn* e *anti* abertas formadas na reação de metoximação.

**Figura 9.** Isômeros *syn* e *anti* das oximas.**Fonte:** Fang *et al.*, 2010

Os equipamentos para cromatografia gasosa são compostos de: sistema de gás de arraste, controlador de vazão e regulador de pressão, sistema de injeção da amostra, coluna cromatográfica, sistema de detecção e registrador. (Collins et al., 1997) Entre os detectores mais comumente empregados em cromatografia gasosa na área de produtos naturais estão o detector de ionização em chama (DIC) e o detector de espectrometria de massas (EM).

O detector de ionização em chama (DIC) foi proposto pelos grupos de pesquisa de Harley e de McWilliam e Dewar em 1958. (Bartle e Myers, 2002) Seu funcionamento baseia-se no princípio de que a condutividade elétrica de um gás é diretamente proporcional à quantidade de partículas carregadas nele presentes. O gás de arraste (inerte), proveniente da coluna, passa pela chama e alguns compostos eluídos serão queimados juntamente com o gás hidrogênio, utilizado como combustível na chama. O comburente mais utilizado é o ar sintético, mas também pode ser utilizado oxigênio. (Lanças, 1993)

Quando passa pela chama de hidrogênio apenas o gás de arraste puro (geralmente Hélio), apenas uma corrente muito pequena (da ordem de  $10^{-14}$  A) fluirá. Por outro lado, quando houver compostos orgânicos na amostra vaporizada, a chama queimará estes compostos formando  $\text{CO}_2$ , água e partículas portadoras de carga. A corrente elétrica resultante desse fluxo de partículas carregadas é a base para a quantificação das amostras eluídas na coluna. (Lanças, 1993).

A relação existente entre os gases envolvidos no processo de combustão é um parâmetro de grande influência no desempenho do detector de ionização de chama. A razão mais comumente utilizada é 1:1:10 (gás de arraste : hidrogênio : ar sintético) porém os fluxos ideais devem ser determinados experimentalmente, para cada sistema utilizado. O DIC possui grande aplicabilidade, sendo um detector quase universal na cromatografia de compostos orgânicos voláteis ou de derivados de compostos não voláteis. Tal universalidade, acoplada a sua sensibilidade, estabilidade e resposta rápida, faz com que seja um detector comumente utilizado em cromatografia gasosa. (Ciola, 1985)

A abordagem moderna mais eficaz para investigar a composição de misturas complexas de compostos orgânicos é a separação dos componentes através de colunas capilares, seguida da sua identificação por espectrometria de massas (CG-EM). O campo de aplicações desta técnica tem crescido consideravelmente devido à possibilidade de se transformar compostos não voláteis ou termicamente instáveis em diferentes tipos de derivados voláteis e bastante estáveis. (Babushok e Zenkevich, 2009)

A cromatografia gasosa pode ser combinada com a espectrometria de massas de maneira relativamente simples, pois as características de funcionamento do cromatógrafo a gás são suficientemente compatíveis com a necessidade de alto vácuo do espectrômetro de massas. (Chiaradia *et al.*, 2008)

Em CG-EM dois métodos de ionização são mais empregados, a ionização por impacto de elétrons (IE) e a ionização química (IQ). (Vékey, 2001) Na IE o analito de interesse, em fase gasosa, é bombardeado com elétrons de alta energia, geralmente 70 eV, o que permite a comparação dos dados espectrais obtidos com a vasta gama de bibliotecas de dados disponíveis, facilitando a identificação dos metabólitos. (Ardrey, 2003)

Vários processos são desencadeados quando as moléculas do analito absorvem esta energia, dentre os quais o mais simples é aquele em que o analito é ionizado pela remoção de um único elétron ( $M^+$ ). Durante este processo são requeridos tipicamente 10 eV, o restante da energia gera fragmentação dos analitos. Esta fragmentação, se muito rápida, pode dificultar, ou mesmo impedir, a observação do íon molecular no espectro, sendo este um dos maiores problemas na aplicação de IE. (Chiaradia *et al.*, 2008)

A técnica de IQ foi desenvolvida especialmente para aumentar a produção do íon molecular e reduzir as fragmentações associadas à ionização por elétrons (IE). As moléculas do analito, em fase gasosa, são introduzidas na câmara de ionização, que contém um gás reagente. Esta mistura é então bombardeada com elétrons, assim como na IE, porém como o gás reagente está em excesso em relação ao analito, ele é ionizado quase que exclusivamente. Passam a ocorrer então reações entre os íons do gás reagente e as moléculas neutras do analito, que dão origem às moléculas

protonadas do analito  $[M+H]^+$ . A energia envolvida no processo é relativamente baixa, sendo assim quase não são observadas fragmentações. (Vékey, 2001)

O espectro de massas é o principal parâmetro de identificação na análise por CG-EM, porém, uma informação adicional valiosa é fornecida pelos parâmetros de retenção dos componentes na coluna cromatográfica. (Babushok e Zenkevich, 2009)

Uma necessidade especial na utilização de um parâmetro adicional, como o índice de retenção, aparece durante a análise CG-EM de isômeros, bem como de componentes em menores concentrações em misturas para os quais é muitas vezes difícil registrar um espectro de massa de qualidade elevada. Índice de retenção é o parâmetro mais reprodutível e, portanto, mais comumente utilizado em cromatografia gasosa. Considerando que, uma investigação de misturas complexas de compostos orgânicos exige uma separação utilizando uma programação de temperatura; são calculados com maior frequência os índices de retenção para gradientes de temperatura lineares sugeridos por van den Dool e Kratz. (van den Dool e Kratz, 1963)

É muito raro encontrar informações de espectros de massas e índices de retenção juntos, em um único banco de dados. Uma das bases de dados mais completa (NIST – *National Institute of Standards and Technology*) contém um grande número de valores individuais de índices de retenção e índices de Kovats (calculados para programas isotérmicos de temperatura). (NIST Chemistry web-book, 2012)

Outra base de dados utilizada neste trabalho foi a GMD – *Golm Metabolome Database*, também bastante completa, nela estão disponíveis os índices de retenção e também alguns espectros de massas de metabólitos analisados e as condições em que foram realizadas estas análises. (GMD, 2012)

Porém, existem numerosos casos que os valores apresentados para os mesmos compostos em condições semelhantes de separação em colunas com fases estacionárias do mesmo tipo diferem por dezenas de unidades de índice, o que complica consideravelmente a utilização destes valores. É difícil encontrar as razões de tais discrepâncias, podendo ser: propriedades físico-químicas específicas dos compostos, a qualidade das colunas, as condições de

separação, ou erros na identificação/quantificação. (Isidorov e Szczepaniak, 2009)

O trabalho realizado por Isidorov e Szczepaniak em 2009 traz a análise de aproximadamente 400 metabólitos por CG-EM, com seus respectivos índices de retenção obtidos em algumas colunas cromatográficas mais comuns. Foi analisada uma grande variedade de classes de metabólitos (incluindo: ácidos cinâmicos, flavonóides, compostos fenólicos, carboidratos, açúcares, esteróides, compostos carboxílicos, entre outros), sendo que grande parte destas substâncias foi derivada antes da análise. O estudo é relevante principalmente por apresentar dados de retenção de compostos com peso molecular superior a 300 para os quais havia pouca informação disponível nas bases de dados mais antigas.

Gao e colaboradores também apresentaram importante contribuição na análise de flavonóides derivados por CG-EM, fornecendo dados de índice de retenção para 34 flavonóides não glicosilados, utilizando a abordagem da cromatografia gasosa de duas dimensões, CGxCG-DIC e CGxCG-EM. (Gao et al., 2010)

### **3.4. Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM)**

Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é a técnica de separação mais utilizada em metabolômica, pois tem a capacidade de realizar separações de uma grande quantidade de compostos presentes em vários tipos de amostras em um período de tempo curto, com alta resolução, eficiência e sensibilidade. (Collins et al., 1997)

O termo técnicas hifenadas refere-se ao acoplamento de um sistema cromatográfico a um detector espectroscópico ou espectrométrico e visa a obtenção de informações estruturais de metabólitos de interesse diretamente de uma mistura complexa. Esta técnica representa grande vantagem em comparação com processo clássico de isolamento e elucidação estrutural. (Gobbo-Neto 2007).

O detector mais comum na cromatografia líquida de alta eficiência é o detector UV/vis com arranjo de diodos, combinação conhecida como CLAE-UV-DAD, uma vez que muitos analitos absorvem radiação ultravioleta. Os instrumentos possuem lâmpadas de deutério, xenônio ou tungstênio e um monocromador, de modo que se pode escolher o comprimento de onda ótimo para os analitos em questão. O sistema usa um conjunto de fotodiodos para registrar o espectro inteiro de cada soluto assim que ele é eluído, diferente do detector UV/vis no qual a detecção do pico é feita em um único comprimento de onda. (Skoog et al., 2006)

Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (CLAE-EM) é considerada uma poderosa ferramenta para a elucidação estrutural e análise de matrizes complexas, possibilitando a caracterização de compostos conhecidos e desconhecidos com alta sensibilidade e seletividade. (Pacífico et al., 2011)

O espectro de massas gerado fornece informações muito úteis sobre a massa molecular e a estrutura dos analitos. A sensibilidade da detecção por EM, bem como a possível formação de adutos, e a fragmentação do analito dependem da fonte de ionização utilizada, o que implica em resultados diferentes e muitas vezes complementares através de uso de diferentes instrumentos. (González et al., 2007)

Na espectrometria de massas é necessária um íon no estado gasoso, enquanto o efluente da coluna de cromatografia líquida é constituída por um analito dissolvido em um solvente. Sendo assim, uma das mais importantes funções de uma interface empregada em CLAE-EM é remover toda ou, pelo menos, uma parte significativa da fase móvel. Além disso, os compostos que são separados por CLAE são relativamente pouco voláteis e/ou sensíveis à temperatura, desta forma não é possível ionizá-los utilizando as técnicas de ionização mais comuns, sendo necessário o desenvolvimento de interfaces com formas de ionização alternativas. As fontes de ionização mais empregadas são ionização por “electrospray” (IES), ionização química à pressão atmosférica (IQPA) e, mais recentemente, a fotoionização à pressão atmosférica (FIPA). (Chiaradia *et al.*, 2008)

Na IES, a fase móvel na qual se encontra o analito passa através de um capilar, à pressão atmosférica, mantido sob alta voltagem. Na saída do capilar se formam pequenas gotas altamente carregadas (“spray”) que são dessolvatadas ao se deslocarem no sentido contrário ao posicionamento de um eletrodo, a pressão atmosférica. A dessolvatação ocorre através de uso de fluxo contínuo de gás seco (geralmente  $N_2$ ) na região do “spray”. Com a dessolvatação, o tamanho das gotas começa a diminuir, até o ponto em que a força de repulsão entre as cargas similares seja maior que a tensão superficial (forças de coesão da fase líquida). Ocorre então a chamada “explosão coulômbica”, que gera gotas com tamanhos equivalentes a 10% do tamanho das gotas originais. Essas explosões continuam até que são produzidos íons do analito, que são transferidos para o interior do espectrômetro de massas por dispositivos de focalização. (Ardrey, 2003)

A técnica de ionização por “electrospray” (IES) é amplamente utilizada por ser uma fonte de ionização suave, ou seja, gera íons protonados  $[M+H]^+$ , no modo positivo e íons desprotonados  $[M-H]^-$ , no modo negativo. (Pacífico et al., 2011) A energia empregada nestas fontes de ionização não é suficiente para gerar uma fragmentação significativa das moléculas do analito.

Também pode ocorrer a formação de adutos entre os íons moleculares e  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $NH_4^+$ ,  $HCOO^-$  e  $CH_3COO^-$ , que são espécies iônicas presentes nas fases móveis e nos modificadores adicionados a elas. Como neste caso a ionização ocorre diretamente na solução, compostos sensíveis à temperatura podem ser ionizados sem sofrer degradação. Esta técnica pode ser aplicada a compostos com massas molares relativamente altas, pois são gerados íons com múltiplas cargas, ou seja, o espectrômetro de massas mede a razão massa/carga ( $m/z$ ) dos íons. (Chiaradia *et al.*, 2008)

Os espectrômetros de massas apresentam alguns tipos de analisadores, com características distintas, como: quadrupolo, tempo de voo, ion trap, triplo quadrupolo e mais recentemente o analisadores híbridos Q-TOF e Q-Trap. Neste trabalho foram utilizados dois equipamentos, um LC-ESI-ITMS (cromatógrafo líquido acoplado a espectrometria de massas com ionização por “electrospray” e analisador ion trap) e um LC-ESI-Q-TrapMS (cromatógrafo

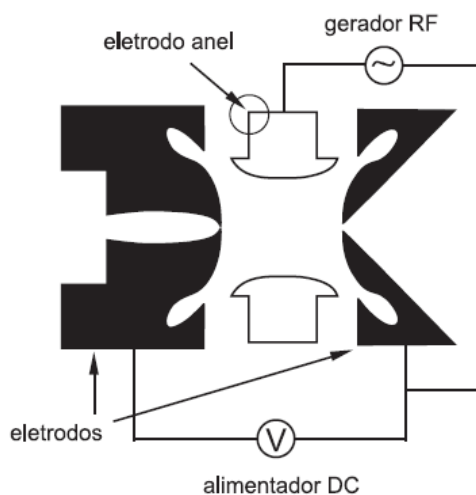
líquido acoplado a espectrometria de massas com ionização por “electrospray” e analisador híbrido linear quadrupolo / ion trap).

O analisador *ion-trap* (Figura 10) funciona como um quadrupolo tridimensional que “captura” todos os íons que são introduzidos em seu interior. Eles os mantêm “aprisionados” até que uma determinada radiofrequência é aplicada tornando os íons de certa razão  $m/z$  instáveis, de forma que são libertados e detectados. (Chiaradia *et al.*, 2008)

IT-MS supera analisador de quadrupolo uma vez que uma sensibilidade semelhante é obtida conseguindo-se o monitoramento de íons selecionados e varredura completa (*full scan*). Além disso, permite a fragmentação em múltiplos estágios  $EM^n$ , o que o torna um instrumento adequado para fins de identificação e análise quantitativa. (González *et al.*, 2007)

A alta sensibilidade de varredura permite a identificação/confirmação e quantificação dos metabólitos em uma única análise. (Millán *et al.*, 2007)

**Figura 10.** Esquema de um analisador de ion-trap. Onde, RF= radiofrequência e DC= corrente contínua.

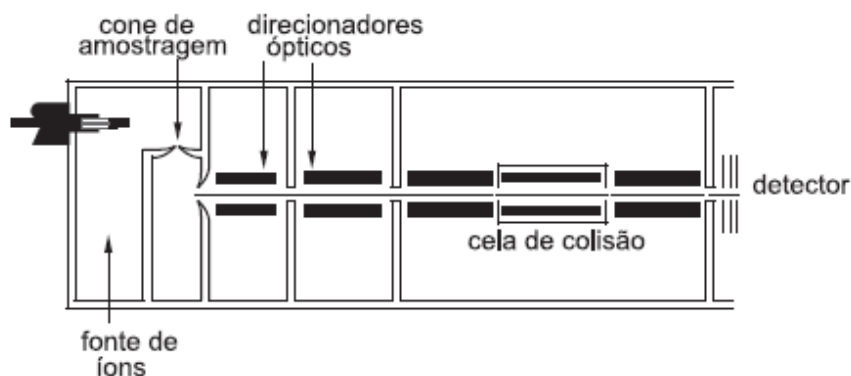


**Fonte:** Chiaradia *et al.*, 2008

O instrumento triplo quadrupolo (Figura 11) é utilizado em análises CLAE-EM/EM e é constituído por três quadrupolos em série. O segundo quadrupolo não é utilizado para separar íons de mesma razão  $m/z$ , mas sim como cela de colisão, na qual ocorre a fragmentação dos íons selecionados no primeiro quadrupolo geralmente por dissociação induzida por colisão com um

gás inerte e também é empregado como direcionador dos íons produzidos ao terceiro quadrupolo. (Chiaradia *et al.*, 2008)

**Figura 11.** Esquema de um analisador de triplo quadrupolo.



**Fonte:** Chiaradia *et al.*, 2008

A abordagem mais comum em CLAE-EM utiliza analisadores de quadrupolo, porém recentemente vem sendo empregado o Q-Trap, um analisador híbrido linear no qual o último módulo do analisador triplo quadrupolo é substituído por um analisador ion trap. E este tipo de analisador também permite a espectrometria de massas sequencial (EM<sup>n</sup>). (Diniz, 2011)

Esta associação apresenta vantagens em relação ao analisador de quadrupolo, uma vez que fornece um aumento na sensibilidade das análises, juntamente com a possibilidade de se obter informação estrutural adicional com os espectros de íon produto. (Gómez *et al.*, 2008)

A espectrometria de massas sequencial (EM/EM) fornece grande informação estrutural e permite a identificação dos metabólitos exclusivamente através da análise da fragmentação característica de sua estrutura. (Pacífico, 2011)

Ultimamente, na área de produtos naturais, CLAE-EM/EM tem sido aplicada na desreplicação de amostras complexas, ou seja, na rápida caracterização da mistura estabelecendo quais constituintes já foram previamente identificados. Nas últimas décadas, tem se tornado uma importante ferramenta na identificação e/ou confirmação de compostos

químicos desconhecidos, graças ao desenvolvimento da espectrometria de massas seqüencial (EM/EM e EM<sup>n</sup>). (Gobbo-Neto 2007).

Nas análises EM/EM um íon precursor é selecionado e transferido para a cela de colisão para ser fragmentado, os íons resultantes são altamente indicativos da estrutura do íon precursor, dados que juntamente com as informações de massa molecular de alta resolução possibilitam a identificação de compostos desconhecidos. (Gobbo-Neto 2007).

## 4. Materiais e métodos

### 4.1. Material Vegetal

Os materiais vegetais utilizados foram folhas de cana-de-açúcar do cultivar RB 85-5453. Estas foram fornecidas pela USINA ZANIN, Araraquara-SP, e foram coletadas com cerca de seis meses de idade.

### 4.2. Extração

As folhas de cana-de-açúcar foram picadas, secas em estufa a 40°C por 3 dias e trituradas em moinho de facas.

Em seguida realizaram-se as extrações utilizando-se como solvente a mistura hidroalcoólica MeOH/H<sub>2</sub>O 1:1. A massa de material vegetal seco utilizada foi 1232,83 g para um volume de solvente de 5,2 L. As extrações foram realizadas em ultrassom durante 1 hora, sendo que o material vegetal foi extraído 5 vezes consecutivas, recolhendo-se os extratos através de filtração.

Secou-se então o solvente sob pressão reduzida através de rota evaporador e em seguida realizou-se a pesagem do extrato obtido.

### 4.3. Estratégias experimentais

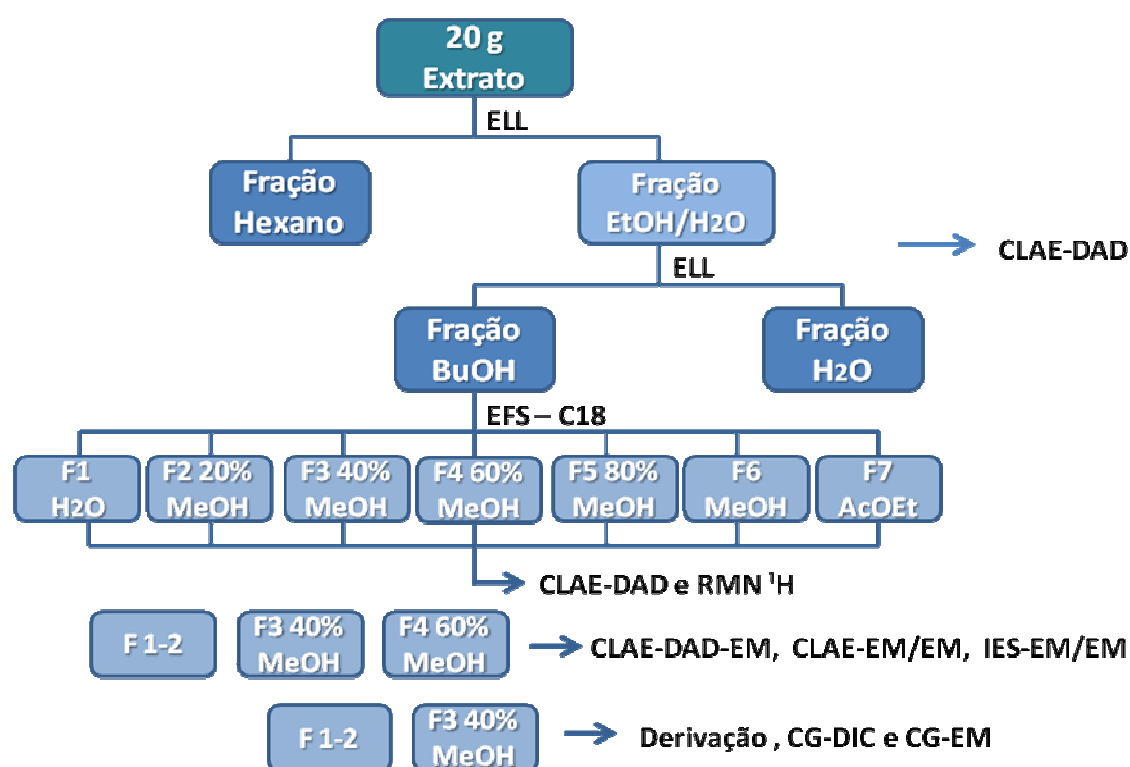
Como estratégia experimental adotou-se a partição do extrato bruto hidroalcoólico por ELL e EFS, buscando-se frações com menor complexidade metabólica.

Estas frações obtidas foram então analisadas por CLAE-DAD, CLAE-DAD-EM e CG-EM buscando a identificação de substâncias conhecidas através de desreplicação e de substâncias desconhecidas através de dados de retenção, dados espectrométricos (espectros no UV, espectros de massas e RMN) e comparação com alguns padrões comerciais (Figura 12).

Para facilitar a identificação de substâncias conhecidas por CLAE-DAD-EM, foi construído um banco de dados com as substâncias já identificadas em cana-de-açúcar. Os dados espectrométricos destas substâncias foram utilizados como um filtro facilitando a desreplicação.

A identificação por CG-EM foi baseada na comparação dos espectros de massas com bibliotecas de dados disponíveis (NIST e WILEY), comparação dos índices de retenção calculados com os encontrados na literatura (bases de dados – WebNIST, GMD) e análises de padrões comerciais. Foi realizada a derivação das amostras para possibilitar a volatilização e estabilidade dos compostos polares.

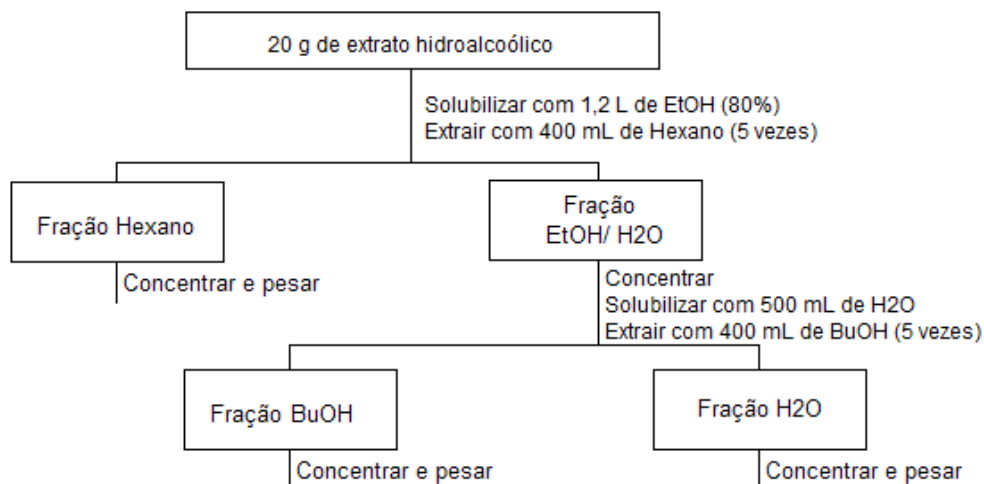
**Figura 12.** Fluxograma dos processos experimentais realizados.



#### 4.4. Fracionamento do extrato hidroalcoólico por Extração Líquido-Líquido

O extrato hidroalcoólico foi fracionado através de extração líquido-líquido com diferentes solventes, de acordo com o procedimento descrito na Figura 13.

**Figura 13.** Fluxograma do processo de fracionamento por extração líquido-líquido do extrato hidroalcoólico.



Os solventes das frações foram evaporados em rota evaporador e em seguida realizou-se a pesagem.

As frações obtidas e também o extrato hidroalcoólico foram analisados em CLAE-UV-DAD Shimadzu<sup>®</sup>, sendo as amostras preparadas a uma concentração de 10 mg/mL, utilizando-se MeOH para dissolver a fração hexânica, enquanto para as frações BuOH e H<sub>2</sub>O e para o extrato hidroalcoólico utilizou-se a mistura MeOH/H<sub>2</sub>O 1:1. Foi utilizada coluna Kinetex<sup>®</sup> Phenomenex C18 (160 x 4.6 mm, 2,6 µm), injetando-se um volume de 20 µL de cada amostra.

A fase móvel consistiu em água com 0,1% de ácido acético (solvente A) e metanol com 0,1 % de ácido acético (solvente B) sendo as condições de gradiente: 0-45 min, 10-50% B; 45-55 min, 50-100% B; 55-60 min, 100% B. Recondicionamento da coluna: 60-65 min, 100-10% B. Tempo de equilíbrio: 15 minutos a 10% B. Foi utilizada uma vazão de 1,0 mL/min e a temperatura da coluna foi mantida a 40°C. A detecção foi feita no UV, sendo os espectros de cada pico cromatográfico registrados entre 200 – 400 nm. Os cromatogramas foram registrados em 254 nm.

#### 4.5. Fracionamento por Extração em Fase Sólida (EFS)

A fração BuOH obtida através de partição do extrato hidroalcoólico por extração líquido-líquido, foi novamente fracionada por extração em fase sólida utilizando-se coluna com fase estacionária C18.

Utilizou-se uma massa de 2,90 g da fração BuOH, que foi dissolvida em água e uma pequena quantidade de MeOH.

A fase estacionária utilizada para o empacotamento da coluna foi 30 g de C18 Backerbond Octadecyl 40  $\mu\text{m}$ , proporção de 1:10 (massa da amostra / massa da fase estacionária). Após o empacotamento, calcularam-se então o volume morto e o volume de eluição da coluna:

- Volume morto =  $V_m = 0,5 (H \cdot d^2)$   
Sendo: d = diâmetro da coluna (em cm);  
H = altura da fase estacionária (em cm).

$$V_m = 0,5 (10,5 \cdot (2,8)^2) \approx 41 \text{ mL}$$

- Volume de Eluição = 3.  $V_m \approx 120 \text{ mL}$

A fase estacionária foi então ativada com 120 mL de MeOH e em seguida condicionada com o primeiro solvente de eluição, 120 mL de  $\text{H}_2\text{O}$ . Aplicou-se a amostra e então as sete misturas de solventes para eluição da amostra:

- F1: 120 mL de  $\text{H}_2\text{O}$ ;
- F2: 120 mL de MeOH/  $\text{H}_2\text{O}$  20:80;
- F3: 120 mL de MeOH/  $\text{H}_2\text{O}$  40:60;
- F4: 120 mL de MeOH/  $\text{H}_2\text{O}$  60:40;
- F5: 120 mL de MeOH/  $\text{H}_2\text{O}$  80:20;
- F6: 120 mL de MeOH;
- F7: 120 mL de AcOEt.

As sete subfrações obtidas foram secas sob pressão reduzida em rota evaporador e pesadas.

Prepararam-se então amostras de cada subfração para análise em CLAE-DAD Shimadzu<sup>®</sup> com coluna analítica a uma concentração de 10

mg/mL, sendo que as subfrações de 1 a 5 foram preparadas utilizando como solvente a mistura MeOH/H<sub>2</sub>O 1:1 e as subfrações 6 e 7 utilizando MeOH.

As amostras foram analisadas utilizando coluna Luna<sup>®</sup> C18 Phenomenex (2) (250 x 4,6 mm, 5 µm), sendo a fase móvel composta por água com 0,1% de ácido acético (solvente A) e metanol com 0,1 % de ácido acético (solvente B). As condições de gradiente foram: 0-35 min, 5-100% B; 35-42 min, 100% B. Recondicionamento da coluna: 42-45 min, 100-5% B. Tempo de equilíbrio de 15 minutos a 5% B. O volume injetado de cada amostra foi de 20 µL.

Foi utilizada uma vazão de 1,0 mL/min e a temperatura da coluna foi mantida a 40 °C. A detecção foi feita no UV, sendo os espectros de cada pico cromatográfico registrados entre 200 – 400 nm e os cromatogramas registrados em 254 nm.

As subfrações também foram analisadas por RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C utilizando-se DMSO deuterado como solvente. Foi utilizado um espectrômetro de RMN VARIAN<sup>®</sup> INOVA de 500 MHz à temperatura de 28 °C. Após análise do perfil cromatográfico e por RMN das subfrações F1 e F2 estas foram reunidas em uma única fração renomeada F1e2.

#### **4.6. Análises por CLAE-DAD-EM**

As subfrações F1e2, F3 e F4 foram analisadas por CLAE-DAD-EM. As amostras foram preparadas a uma concentração de 10 mg/mL, utilizando como solvente a mistura MeOH/H<sub>2</sub>O 1:1.

Foi utilizada coluna Kinetex<sup>®</sup> C18 (160 x 4.6 mm, 2,6 µm), injetando-se um volume de 25 µL de cada amostra. A fase móvel consistiu em água com 0,1% de ácido acético (solvente A) e metanol com 0,1 % de ácido acético (solvente B) sendo as condições de gradiente: 0-45 min, 10-50% B; 45-55 min, 50-100% B; 55-60 min, 100% B. Recondicionamento da coluna: 60-65 min, 100-10% B. Tempo de equilíbrio de 15 min a 10% B. Foi utilizada uma vazão de 1,0 mL/min. Os cromatogramas obtidos com o detector UV foram registrados em 254nm.

As condições utilizadas no espectrômetro de massas LCQ FLEET (THERMO SCIENTIFIC) foram: ionização por IES, modos positivo e negativo, e potencial de + 20 Volts ou – 20 Volts. Como nebulizador utilizou-se gás N<sub>2</sub>.

Também foram realizadas análises por IES-EM/EM da subfração F4 através de infusão direta à concentração de 1 mg/mL. As condições no espectrômetro de massas LCQ FLEET (THERMO SCIENTIFIC) foram: ionização no modo positivo, com um potencial de + 20 Volts, bomba de infusão com fluxo de 20 µL/min. Como nebulizador utilizou-se gás N<sub>2</sub> e nos experimentos de EM<sup>2</sup> utilizou-se He como gás de colisão.

Para confirmar a identificação de alguns metabólitos foram realizadas análises por CLAE-EM/EM a fim de se obter a fragmentação de alguns íons selecionados (EPI - espectros de íons produtos). Os experimentos foram realizados em um espectrômetro de massas ion trap linear (3200 QTrap; Applied Biosystems) equipado com um Turbo Ion Spray conectado ao sistema de cromatografia líquida. Para obter os dados espectrais, foram aplicados 500 °C na temperatura do vaporizador e uma voltagem de 4,5 kV no Turbo Ion Spray no modo de ionização negativo. O potencial de dessolvatação foi ajustado para 50 V e N<sub>2</sub> foi usado como gás de colisão.

Desenvolveu-se um método que consistiu primeiramente de uma varredura total (EMS - *Enhanced Mass Spectrometry*) e *enhanced product ion* (EPI). Amostras foram diluídas com MeOH:H<sub>2</sub>O 1:1 com 0,1 % de ácido acético. Foi utilizada coluna Kinetex<sup>®</sup> Phenomenex C18 (160 x 4.6 mm, 2,6 µm). A fase móvel consistiu em água com 0,1% de ácido acético (solvente A) e metanol com 0,1 % de ácido acético (solvente B) sendo as condições de gradiente: 0-45 min, 10-50% B; 45-55 min, 50-100% B; 55-60 min, 100% B. Recondicionamento da coluna: 60-65 min, 100-10% B. Tempo de equilíbrio de 15 min a 10% B. A vazão foi de 800 µL/min.

Para as análises de EPI, a velocidade de varredura foi de 4000 uma/s, energia de colisão de 30 V com spread de 20V e 60 ms para a captura de íon. Todos os experimentos foram realizados na faixa de 50 a 600 *m/z*.

#### 4.7. Análises por CG-EM

A fração FH<sub>2</sub>O e as subfrações F1e2 e F3 foram analisadas por CG-EM após serem submetidas a reações de derivação. Para isso foram utilizados aproximadamente 15 mg de cada fração, pesados separadamente em frascos preparativos.

Na reação de metoximação a massa pesada de cada fração foi então ressolubilizada com 1 mL de solução de cloridrato de metoxiamina 20 mg/mL em piridina, e mantida a 30° C por 90 minutos para formação das oximas.

A seguir as amostras foram sililadas durante 30 min a 37°C com 1 mL de MSTFA (N-metil-N-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida). Após ficarem em repouso na geladeira por 24 horas as amostras puderam então ser analisadas por cromatografia gasosa.

O método de análise em cromatografia gasosa foi primeiramente otimizado em CG-DIC Varian<sup>®</sup> CP 3800, sendo estabelecidas as seguintes condições: modo de injeção split 1:10; temperatura no injetor a 230°C; programa de aquecimento da coluna: 70°C isotérmico por 5 min, seguido por aumento da temperatura a uma taxa de 5°C/min até 145°C, então a uma taxa de 2°C/min até 200°C, e a uma taxa de 6°C/min até 290°C permanecendo em 290°C por 20 min, totalizando um tempo de corrida de 82,5 min; temperatura no detector a 310°C; gás de arraste: nitrogênio a uma vazão de 1,0 mL/min. Foi utilizada uma coluna SPB 5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm).

As frações preparadas foram então analisadas por CG-EM Shimadzu<sup>®</sup> QP 2010, utilizando técnica de ionização por elétrons e uma energia de 70 eV, a faixa de aquisição dos espectros foi de 50 a 700 Daltons e foram utilizadas as mesmas condições cromatográficas estabelecidas para CG-DIC.

Para auxiliar a identificação dos metabólitos nas frações, também foram analisados, nas mesmas condições citadas acima, uma série de padrões comerciais de ácidos orgânicos, açúcares e álcoois de açúcares. Realizaram-se as reações de derivação para cada padrão separadamente, partindo-se de 1 mg de cada padrão e utilizando 100 µL de cada reagente. Os padrões foram analisados em CG-DIC isoladamente e para análise em CG-EM foram preparadas misturas de padrões para diminuir o tempo de análise, foram utilizados padrões com tempos de retenção ligeiramente diferentes para

compor a mesma mistura. A seguir são apresentadas as 4 misturas de padrões preparadas para análise em CG-EM:

- Mistura 1: glicerol, ácido trans-cinâmico, xilose, ribitol, frutose e ácido ascórbico;
- Mistura 2: ácido benzóico, ácido fumárico, ácido 3-hidroxicinâmico, arabinose, xilitol e galactose;
- Mistura 3: ácido tartárico, ribose, ácido cítrico, glicose e sorbitol;
- Mistura 4: ácido oxálico, ácido malônico, ácido adípico, ácido quínico e manose.

Foi analisada uma amostra de padrão da série homóloga de n-alcenos C<sub>8</sub>-C<sub>40</sub> para posterior cálculo do índice de retenção, para isso a solução estoque do padrão de n-alcenos a 40 µg/mL foi diluída com hexano para 10 µg/mL.

Para o cálculo do índice de retenção ( $I_x$ ) foi utilizada equação de Van den Dool e Kratz, indicada para gradientes lineares de temperatura:

$$I_x = 100_n + 100 \left( \frac{t_x - t_n}{t_{n+1} - t_n} \right)$$

onde n é número de carbonos do n-alceno anterior ao metabólito,  $t_x$  é o tempo de retenção do metabólito de interesse,  $t_n$  é o tempo de retenção do n-alceno eluído imediatamente antes do metabólito e  $t_{n+1}$  é o tempo de retenção do n-alceno eluído imediatamente depois do metabólito.

## 5. Resultados e discussão

### 5.1. Extração

Ao ser realizada a extração do material vegetal obteve-se uma massa total de 152,58 g de extrato hidroalcoólico, o que corresponde a um rendimento de 12,38%.

### 5.2. Fracionamento do extrato hidroalcoólico por Extração Líquido-Líquido

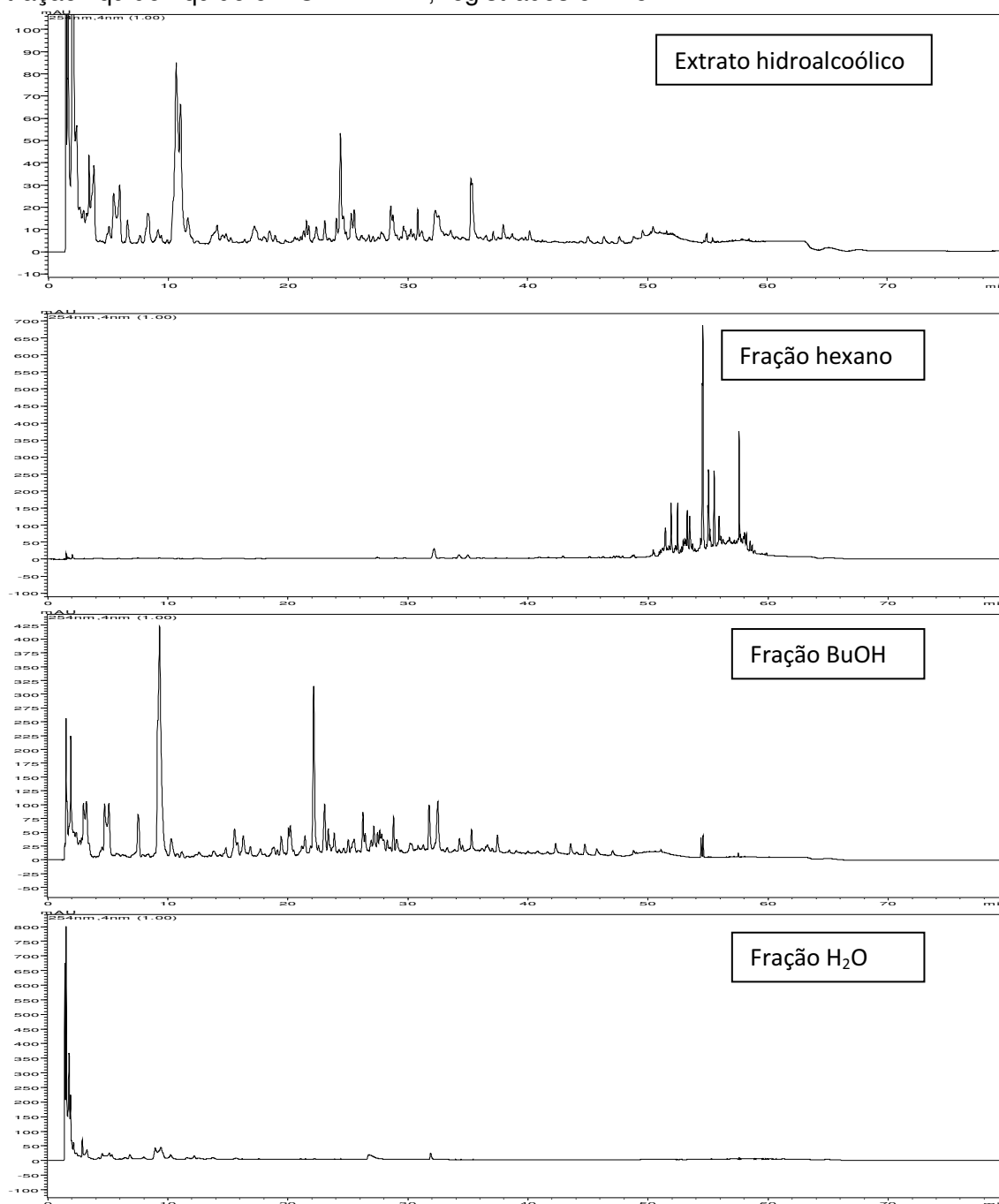
Foram obtidas três frações a partir do fracionamento de 20 g do extrato hidroalcoólico por extração líquido-líquido, Fração hexano, Fração BuOH e Fração H<sub>2</sub>O. As massas obtidas para cada fração estão listadas na Tabela 1.

**Tabela 1.** Massas das frações obtidas por extração líquido-líquido de 20 g do extrato hidroalcoólico

Fração	Massa (g)	(%)
Hexano	0,06	0,30
BuOH	2,95	14,75
H <sub>2</sub> O	12,91	64,55
Recuperado	15,92	79,60

Os resultados deste fracionamento demonstraram boa separação entre as faixas polar, intermediária e mais apolar do extrato, simplificando a composição das frações, como pode ser observado nos cromatogramas obtidos em CLAE-DAD (Figura 14).

**Figura 14.** Cromatogramas do extrato hidroalcoólico e das frações obtidas por extração líquido-líquido em CLAE-DAD, registrados em 254 nm.



### 5.3. Fracionamento por Extração em Fase Sólida (EFS)

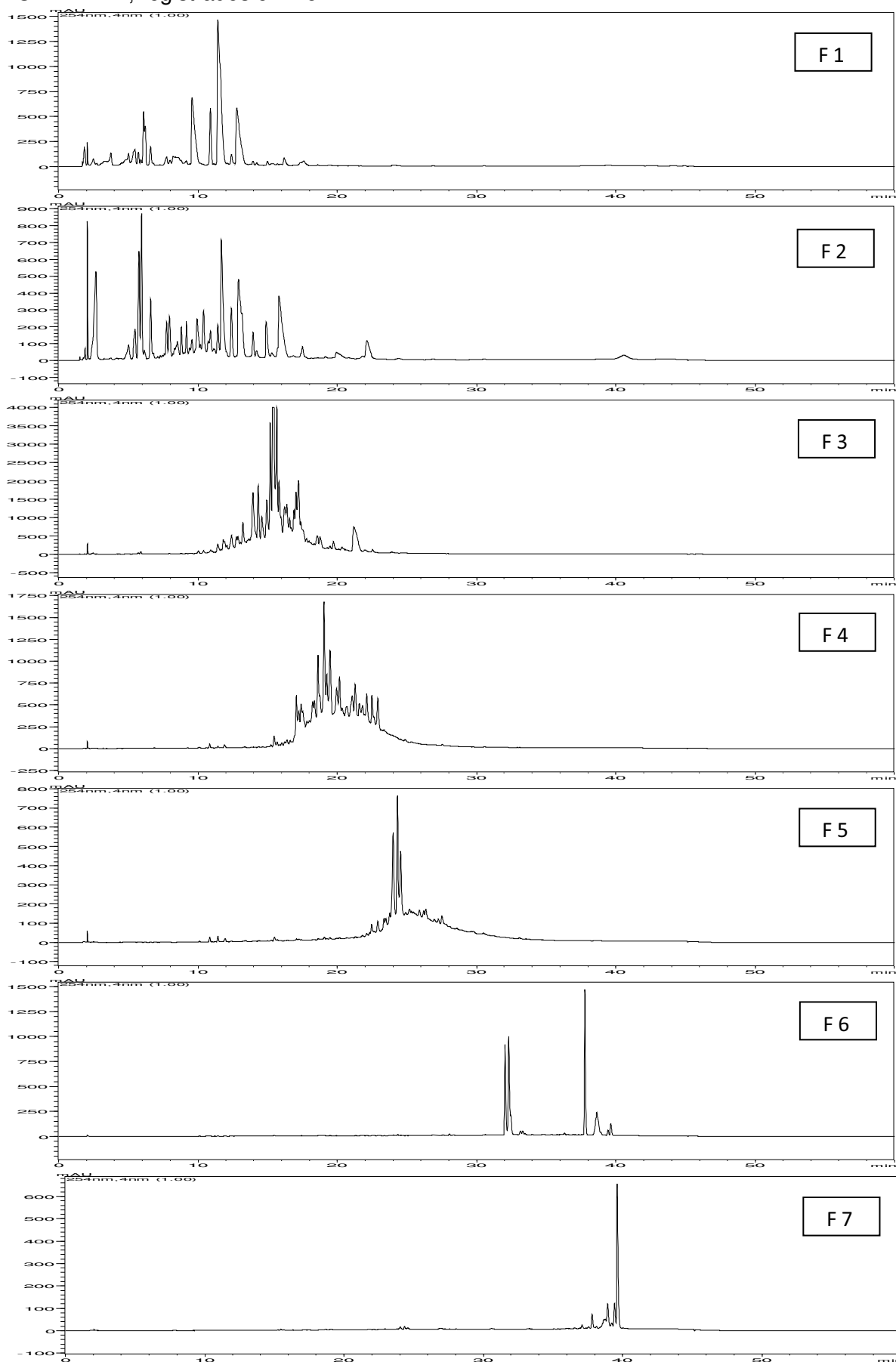
Após a extração em fase sólida de 2,90 g da Fração BuOH foram obtidas 7 subfrações (nomeadas F1 a F7). Na Tabela 2 são mostradas as massas de cada subfração obtida.

**Tabela 2.** Massas das subfrações obtidas por extração em fase sólida em C18 da fração BuOH.

Fração	Eluente	Massa (g)	(%)
F1	H <sub>2</sub> O	1,47	55,47
F2	MeOH/Água 20:80	0,10	3,77
F3	MeOH/Água 40:60	0,53	20,00
F4	MeOH/Água 60:40	0,42	15,49
F5	MeOH/Água 80:20	0,07	2,64
F6	MeOH	0,05	1,89
F7	AcOEt	0,01	0,38
Recuperado		2,65	99,64

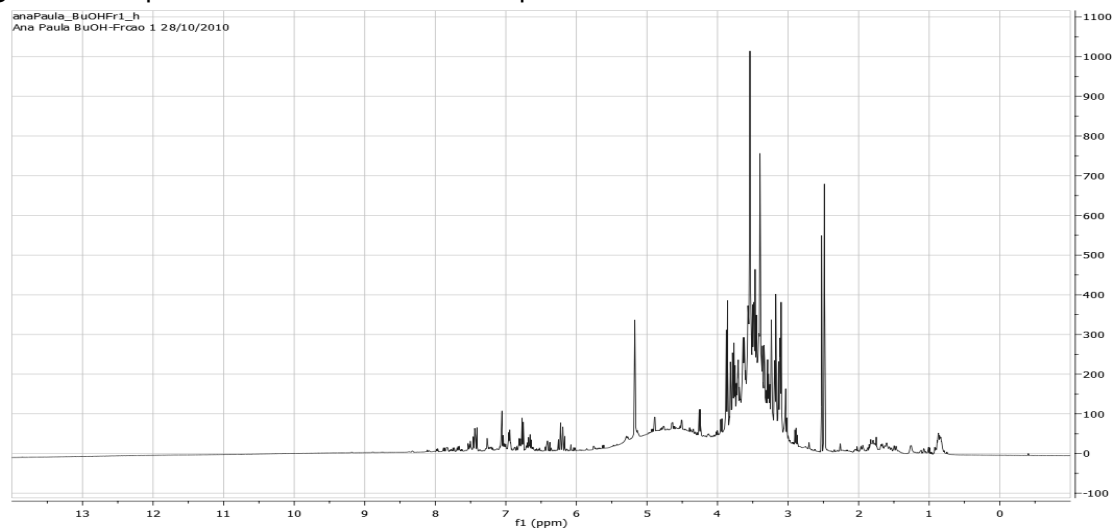
O fracionamento possibilitou a obtenção de subfrações de menor complexidade, além de oferecer boa separação entre os metabólitos de diferentes polaridades, facilitando as etapas seguintes de identificação por técnicas hífenadas. Na figura 15 são mostrados os cromatogramas das subfrações analisadas por CLAE-DAD.

**Figura 15.** Cromatogramas das subfrações obtidas por EFS-C18 analisadas em CLAE-DAD, registrados em 254 nm.

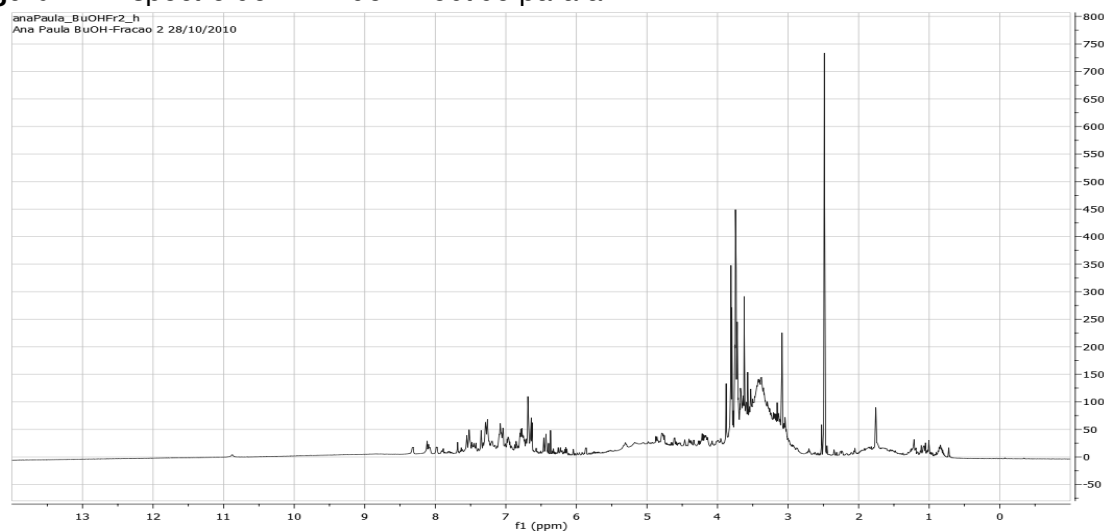


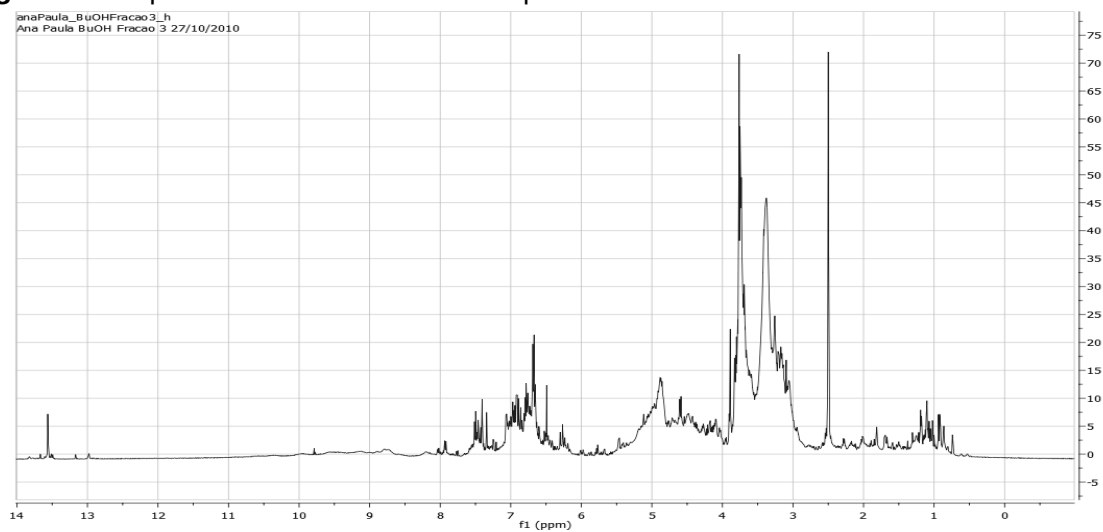
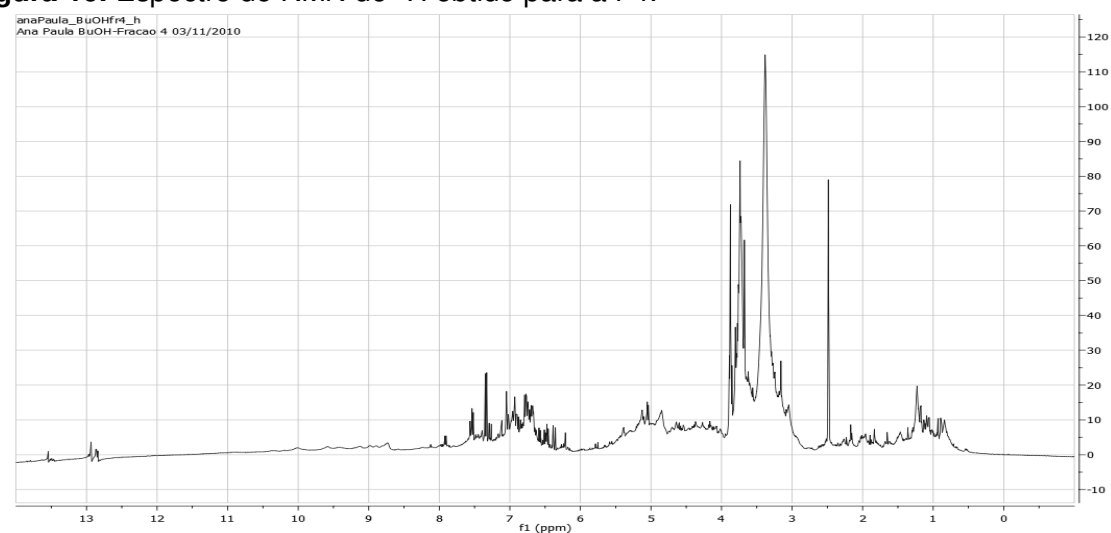
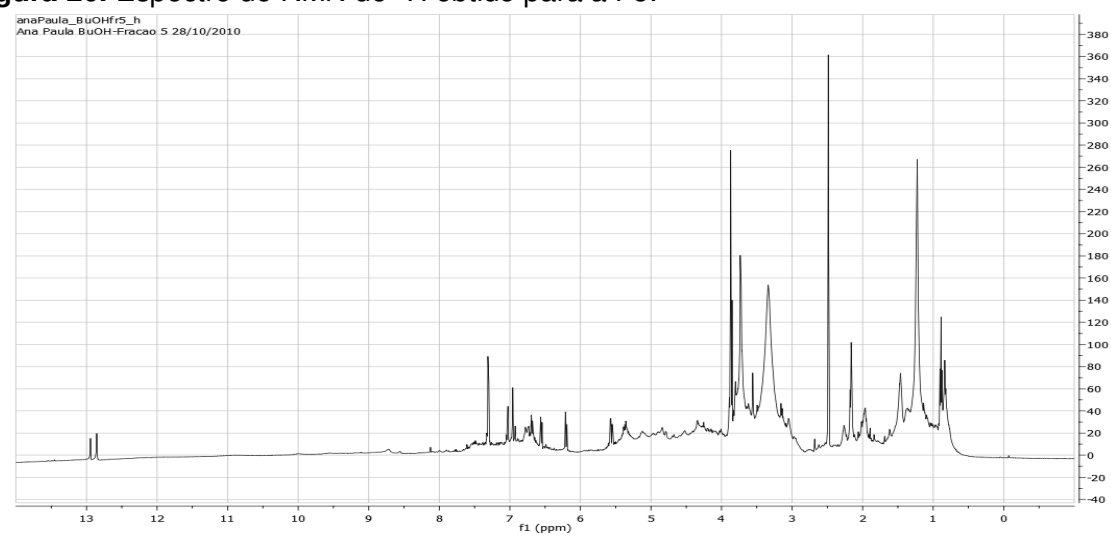
As subfrações também foram analisadas por RMN de  $^1\text{H}$  e as informações obtidas através de seus perfis, juntamente com as informações obtidas pelos espectros no UV das análises por CLAE-DAD, possibilitaram a sugestão de algumas classes de metabólitos presentes em cada subfração, facilitando e direcionando as próximas etapas de identificação.

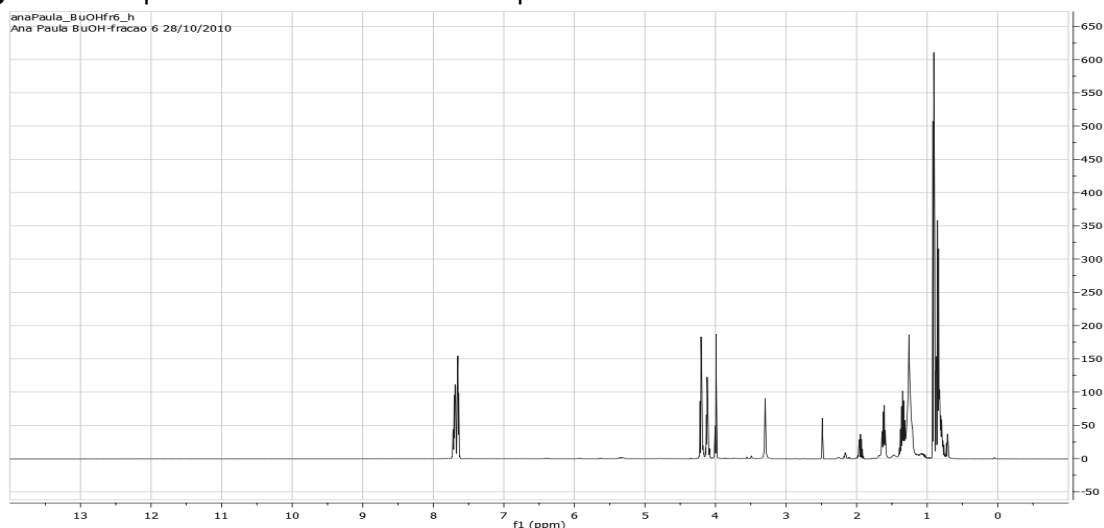
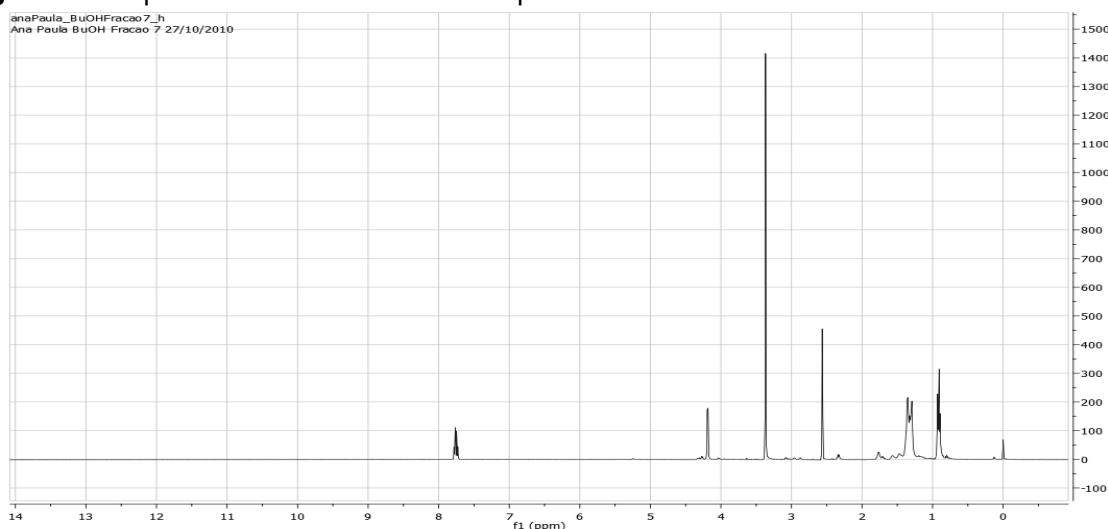
**Figura 16.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  obtido para a F1.



**Figura 17.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  obtido para a F2.



**Figura 18.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  obtido para a F3.**Figura 19.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  obtido para a F4.**Figura 20.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  obtido para a F5.

**Figura 21.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  obtido para a F6.**Figura 22.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  obtido para a F7.

Por apresentarem tanto perfis cromatográficos quanto os perfis por RMN de  $^1\text{H}$  semelhantes as subfrações F1 e F2 foram reunidas em uma única fração para o restante das análises sendo renomeada F1e2. Esta fração apresenta as substâncias mais polares do extrato, através dos espectros de RMN pode-se observar grande presença de açúcares (majoritários, com sinais entre 3 e 5 ppm), mas também evidencia-se a presença de compostos fenólicos, devido aos sinais observados na região dos compostos aromáticos, sinais entre 6 e 8 ppm. Esta informação se confirma pelos espectros de UV dos picos observados por CLAE-DAD, que apresentam máximos de absorção em 290 e 325 nm, bandas características de ácidos clorogênicos.

Já as subfrações F3, F4 e F5 de polaridade intermediária, apresentam sinais na região dos aromáticos mais intensos (entre 6 e 8 ppm), e também apresentam sinais de açúcar (entre 3 e 5 ppm), o que indica a presença de flavonóides glicosilados, grupo de substâncias muito comuns em extratos de cana-de-açúcar. Esta informação é reforçada pelos espectros de UV destas frações, que apresentam substâncias com máximos de absorção em aproximadamente 280 e 340 a 350 nm, bandas características de flavonas.

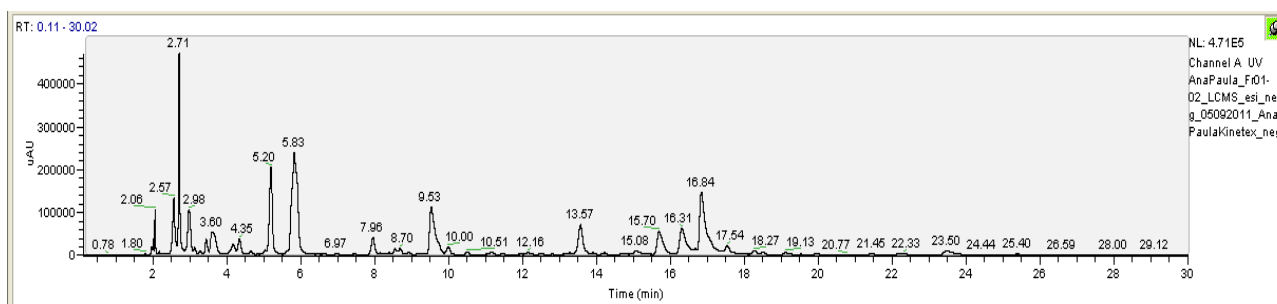
As subfrações F6 e F7, mais apolares, apresentaram perfis por RMN de  $^1\text{H}$  mais simplificados e indicam a presença de uma ou duas substâncias majoritárias, porém os sinais obtidos para as duas frações seguem o padrão de ftalatos (sinais de compostos aromáticos entre 6 e 8 ppm, referentes a substituição orto do anel), indicando a contaminação destas frações.

#### **5.4. Análises por CLAE-DAD-EM**

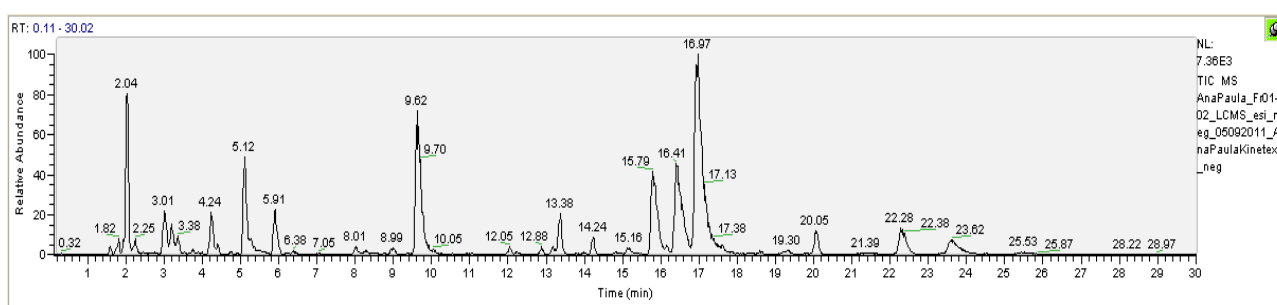
As subfrações F1e2, F3 e F4 foram analisadas por CLAE-DAD-EM, tanto no modo positivo, quanto no negativo. Todos os espetros registrados no modo positivo apresentaram sinais em  $m/z$  279 e  $m/z$  205, provavelmente resultantes de algum resíduo no aparelho (como por exemplo, ftalatos) e que portanto não serão considerados. A seguir são apresentados os resultados obtidos para cada fração.

### 5.4.1. CLAE-DAD-EM da subfração F1e2

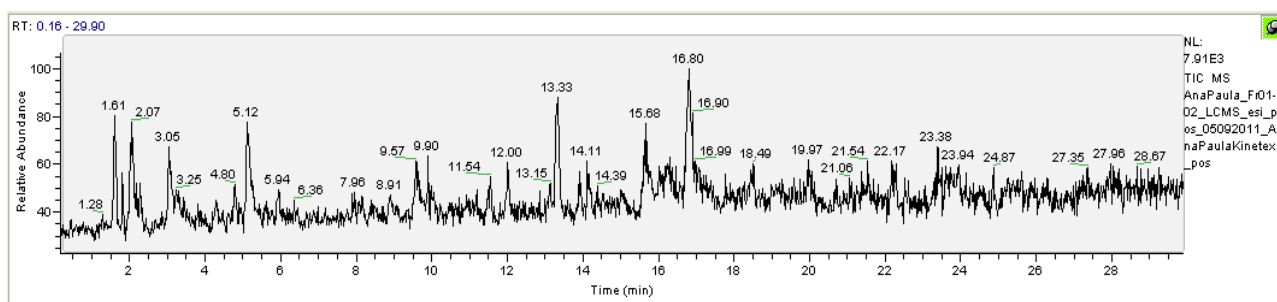
F1e2 – detector UV (254 nm):



F1e2 – detector EM (modo negativo):



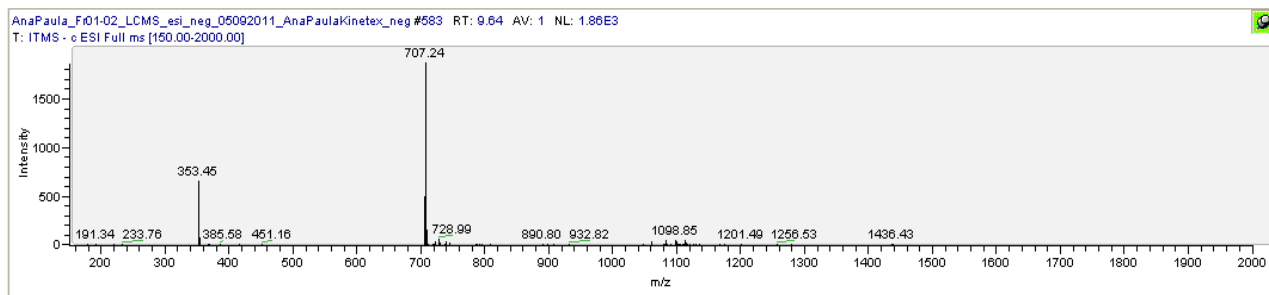
F1e2 – detector EM (modo positivo):



Analisando os dados espectrométricos juntamente com os tempos de retenção foi possível a identificação de 6 ácidos clorogênicos nesta fração (Figura 23), sendo 3 isômeros do ácido cafeoilquínico e 3 isômeros do ácido feruloilquínico. A seguir são apresentados os espectros de massas (nos modos positivo e negativo) e espectros no UV dos picos identificados, de acordo com sua ordem de eluição:

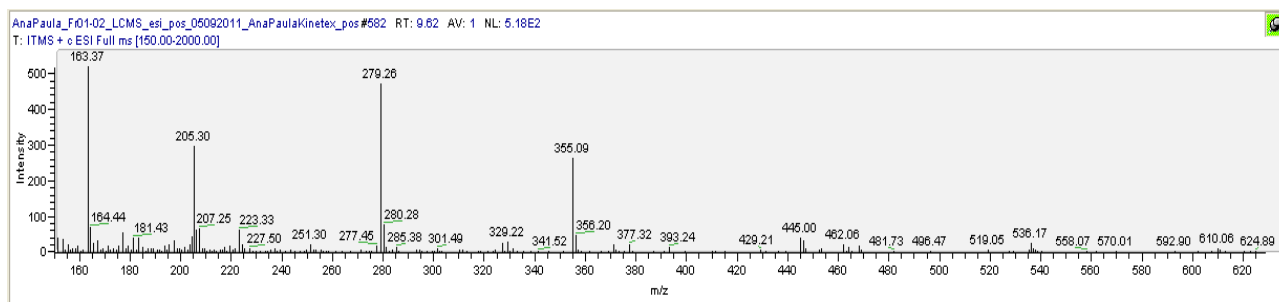
- Tempo de retenção 9,62 min – Ácido 3-cafeoilquínico (MM: 354)

Modo negativo:  $[M-H]^-$ : 353,45



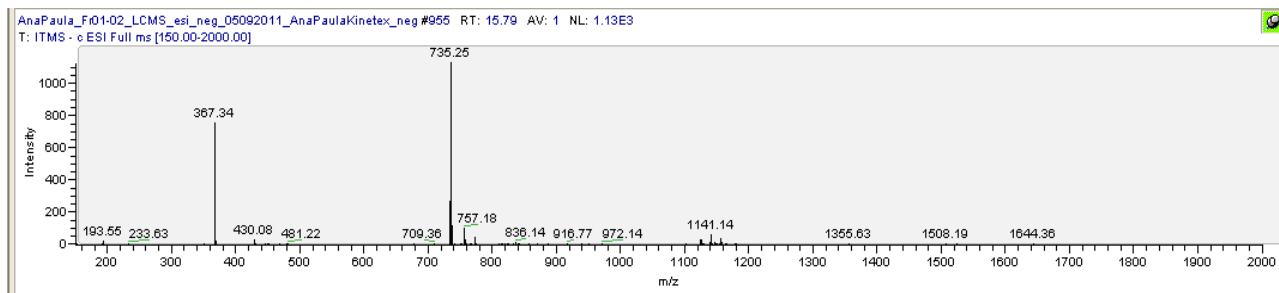
Modo positivo:  $[M+H]^+$ : 355,09

$[M+H-192]^+$ : 163,37 (perda de ácido quínico)



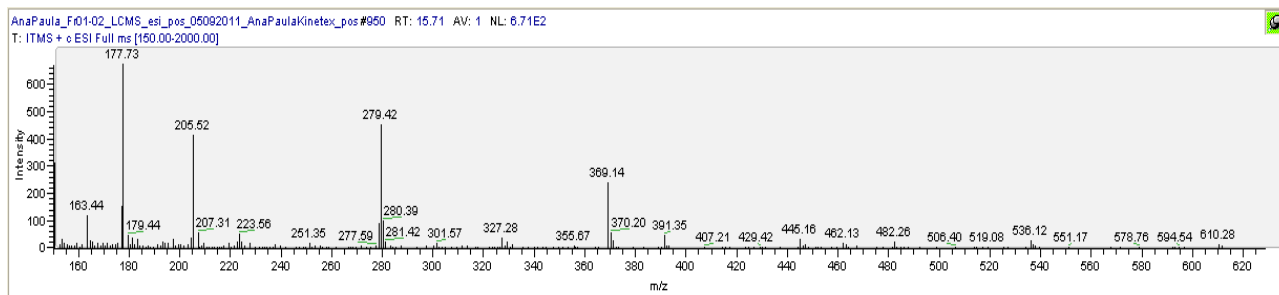
- Tempo de retenção 15,79 min – Ácido 3-feruloilquínico (MM: 368)

Modo negativo:  $[M-H]^-$ : 367,34



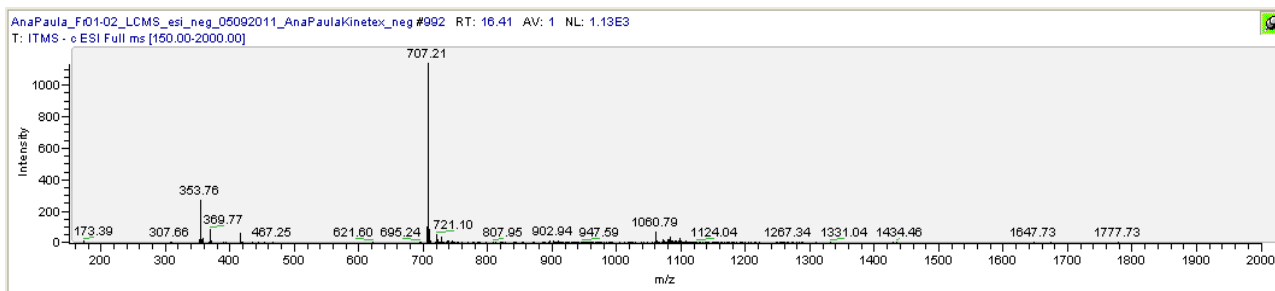
Modo positivo:  $[M+H]^+$ : 369,14

$[M+H-192]^+$ : 177,73 (perda de ácido quínico)



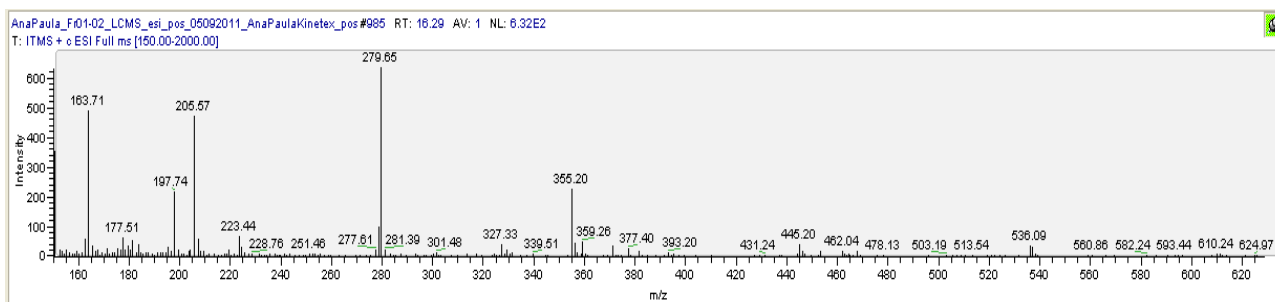
- Tempo de retenção 16,41 min – Ácido 4-cafeoilquínico (MM: 354)

Modo negativo:  $[M-H]^-$ : 353,76



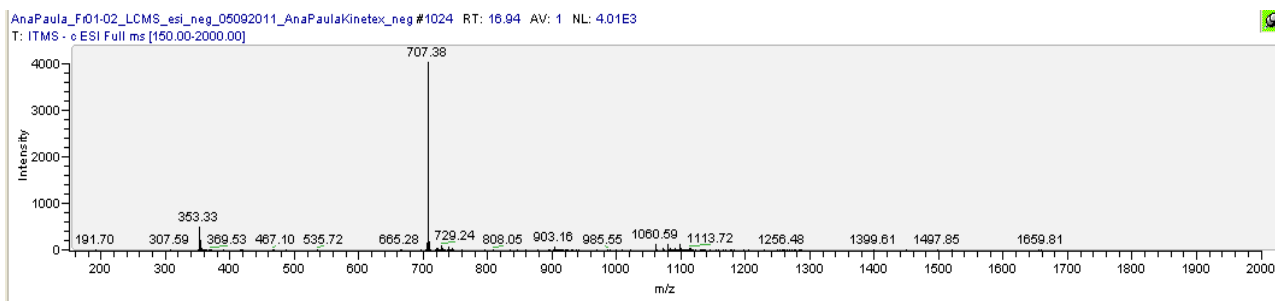
Modo positivo:  $[M+H]^+$ : 355,20

$[M+H-192]^+$ : 163,71 (perda de ácido quínico)



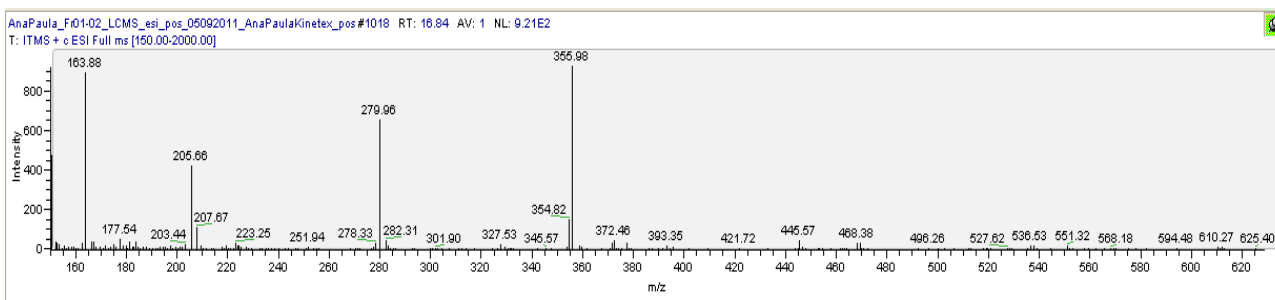
- Tempo de retenção 16,97 min – Ácido 5-cafeoilquínico (MM: 354)

Modo negativo:  $[M-H]^-$ : 353,33



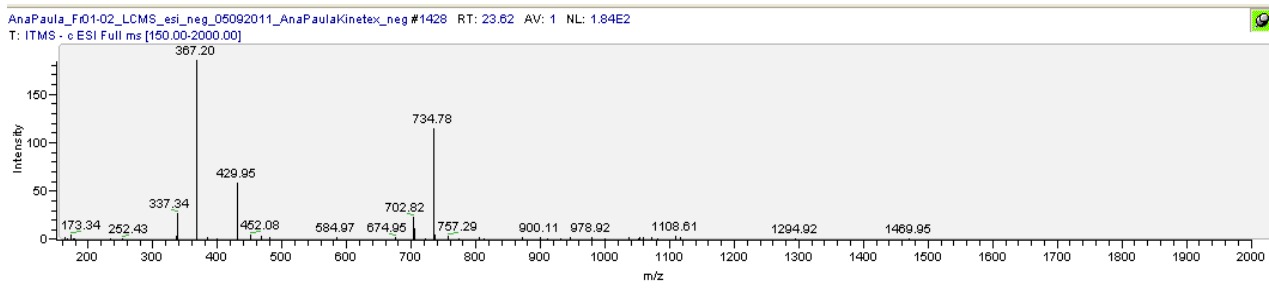
Modo positivo:  $[M+H]^+$ : 355,98

$[M+H-192]^+$ : 163,88 (perda de ácido quínico)



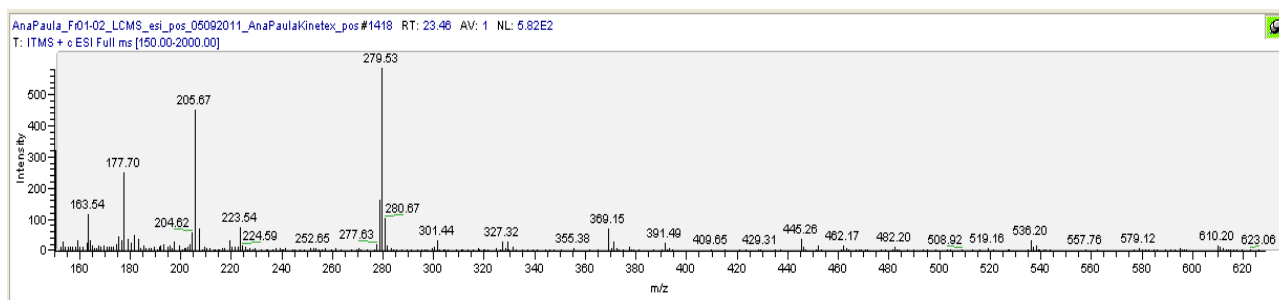
- Tempo de retenção 23,62 min – Ácido 4-feruloilquínico (MM: 368)

Modo negativo:  $[M-H]^-$ : 367,20



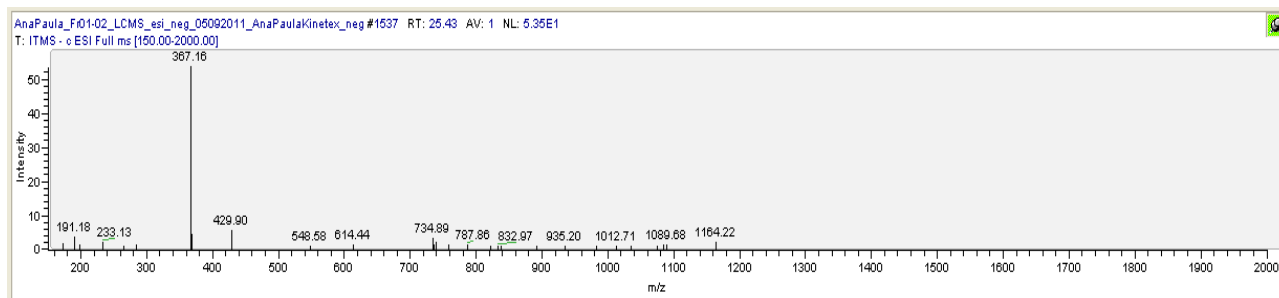
Modo positivo:  $[M+H]^+$ : 369,15

$[M+H-192]^+$ : 177,70 (perda de ácido quínico)



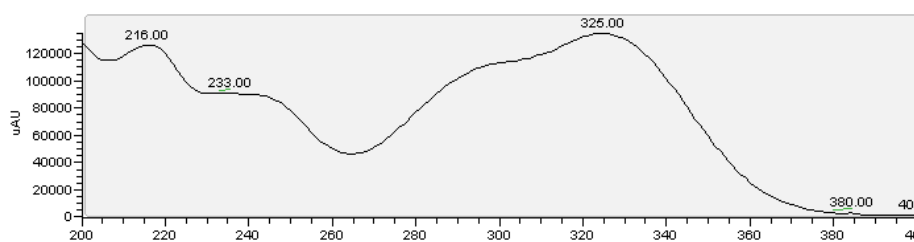
- Tempo de retenção 25,53 min – Ácido 5-feruloilquínico (MM: 368)

Modo negativo:  $[M-H]^-$ : 367,16



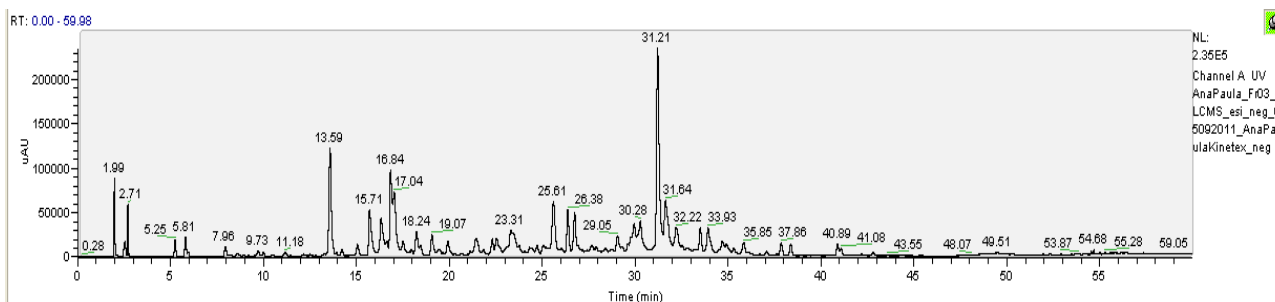
Modo positivo: não detectado

Todos os espectros no UV para os picos relacionados acima seguem padrão de ácidos clorogênicos com bandas de absorção em 299 e 325 nm:

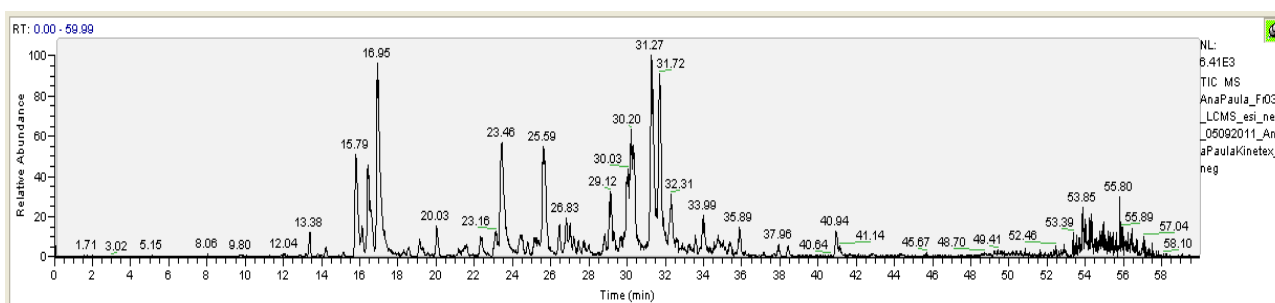


### 5.4.2. CLAE-DAD-EM da subfração F3

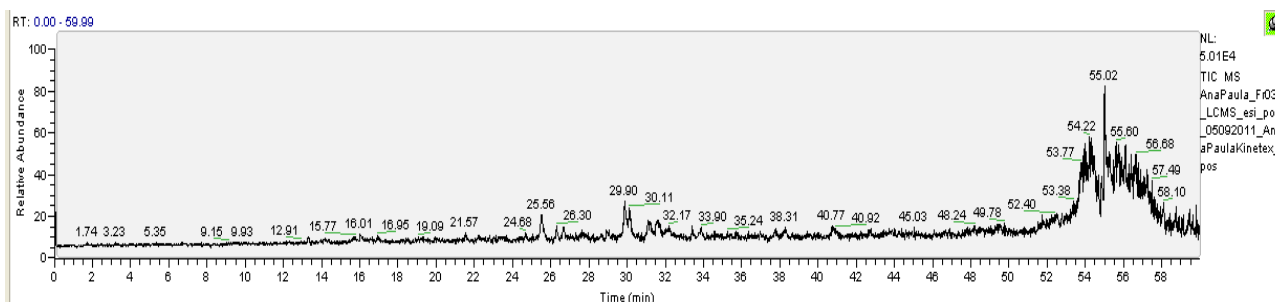
F3 – Detector UV (254 nm):



F3 – Detector EM (modo negativo):



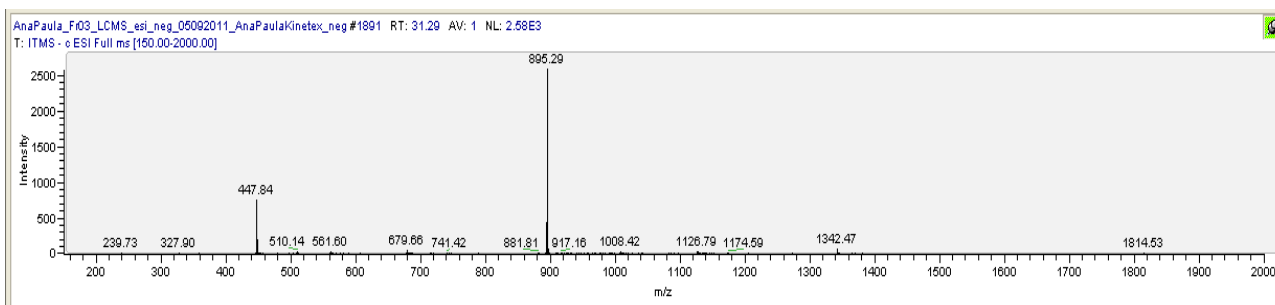
F3 – Detector EM (modo positivo):



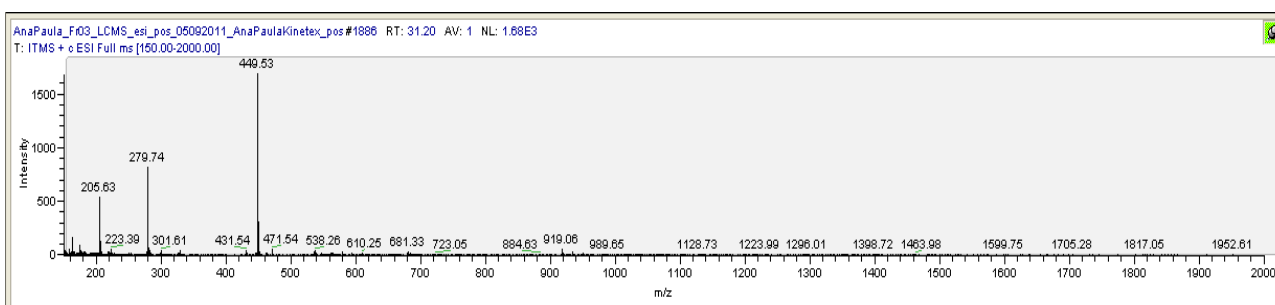
Nesta fração também foram identificados os mesmos ácidos clorogênicos presentes na fração F1e2, além de um flavonóide, orientina (Figuras 23 e 24). Os espectros de massas no modo positivo ficaram com intensidades muito baixa e difícil visualização, porém por comparação dos tempos de retenção, espectros no modo negativo e espectros no UV a identificação foi comprovada. A seguir são apresentados os tempos de retenção e valores de massa dos ácidos clorogênicos identificados novamente nesta fração; e os espectros de massas (modos positivo e negativo) e espectro no UV da orientina, de acordo com sua ordem de eluição:

- Tempo de retenção 9,80 min – Ácido 3-cafeoilquínico (MM: 354)
- Tempo de retenção 15,79 min – Ácido 3-feruloilquínico (MM: 368)
- Tempo de retenção 16,44 min – Ácido 4-cafeoilquínico (MM: 354)
- Tempo de retenção 16,94 min – Ácido 5-cafeoilquínico (MM: 354)
- Tempo de retenção 23,46 min – Ácido 4-feruloilquínico (MM: 368)
- Tempo de retenção 25,16 min – Ácido 5-feruloilquínico (MM: 368)
- Tempo de retenção 31,29 min – Orientina (MM: 448)

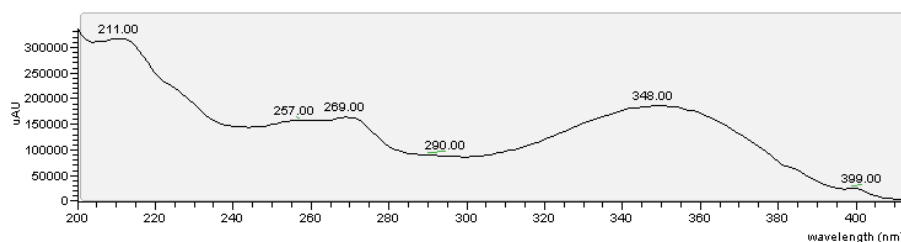
Modo negativo:  $[M-H]^-$ : 447,84



Modo positivo:  $[M+H]^+$ : 449,53

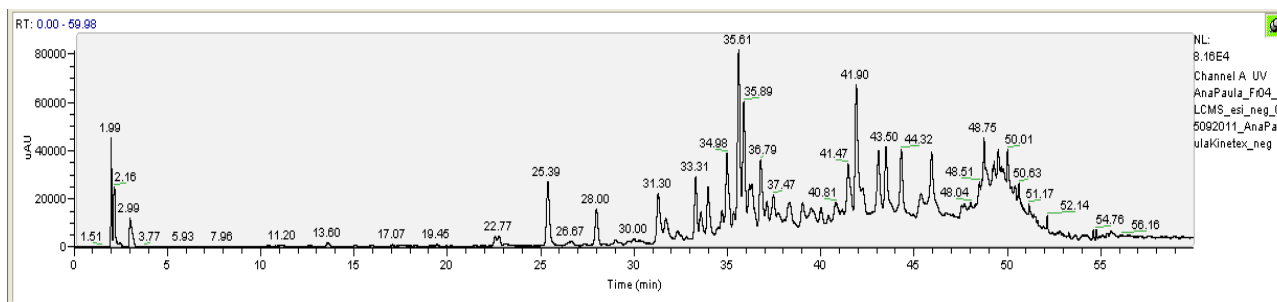


Espectro no UV:

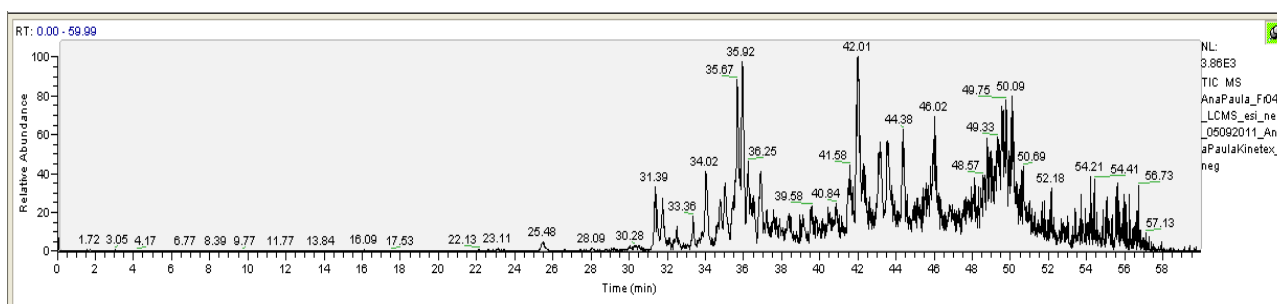


### 5.4.3. CLAE-DAD-EM da subfração F4

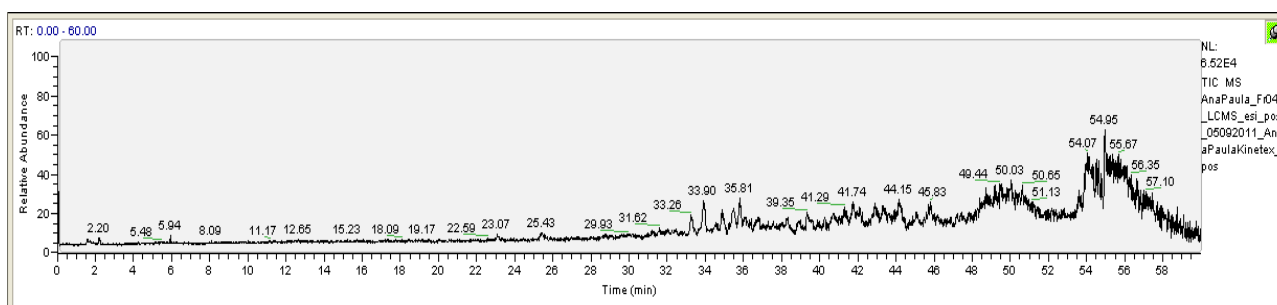
F4 – Detector UV (254 nm):



F4 – Detector EM (modo negativo):



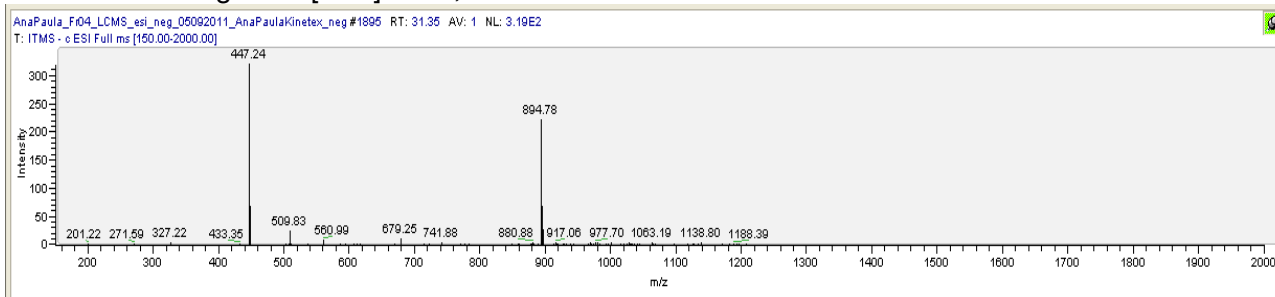
F4 – Detector EM (modo positivo):



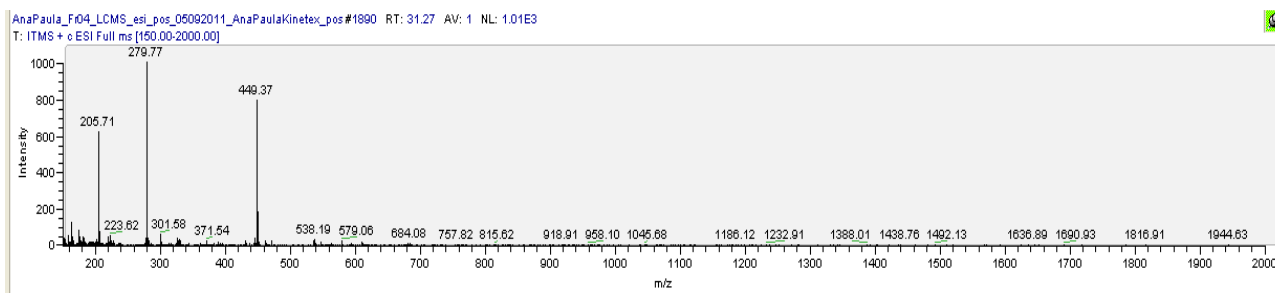
Foram identificados nesta fração 4 flavonóides: orientina (também presente da fração F3), vitexina, diosmetina-8-C-glicosídeo e tricina-4'-O-(eritro ou treo)-guiacilgliceril éter-7-O-glucopiranosídeo (Figura 24). A seguir são apresentados os espectros de massa (modos positivo e negativo) e espectros no UV dos picos identificados, de acordo com sua ordem de eluição:

- Tempo de retenção 31,39 min – Orientina (MM: 448) ou Iso-orientina.

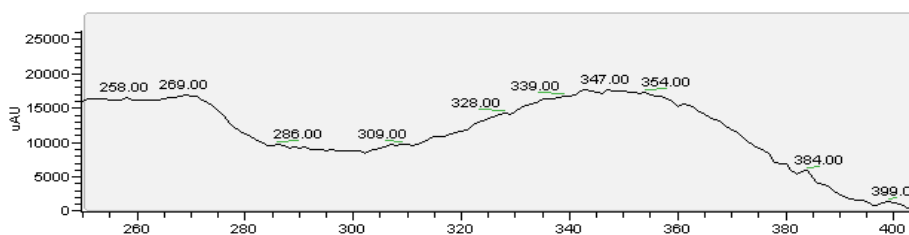
Modo negativo:  $[M-H]^-$ : 447,28



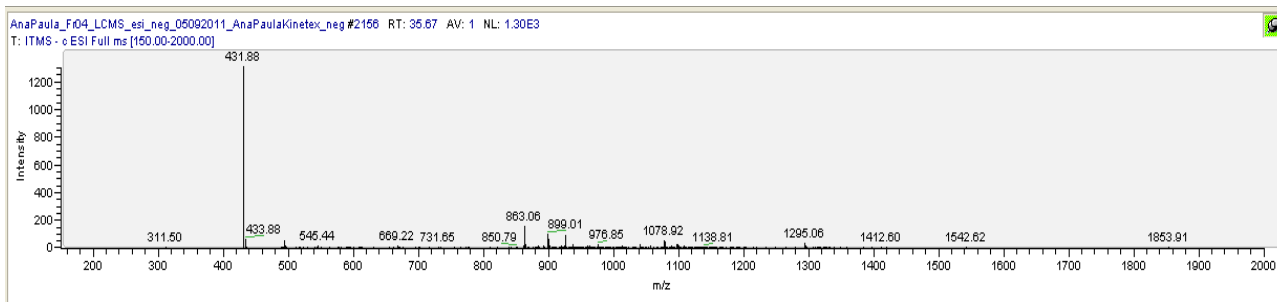
Modo positivo:  $[M+H]^+$ : 449,38



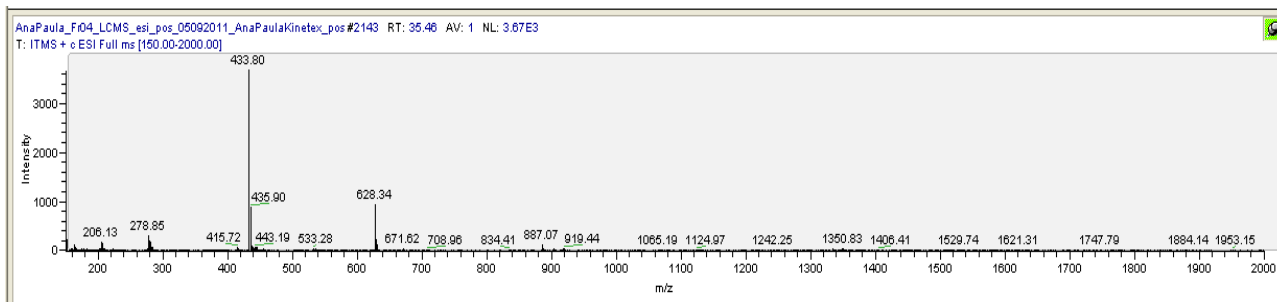
Espectro no UV:



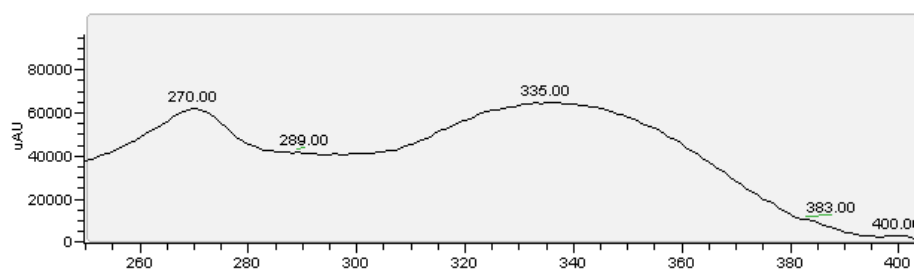
- Tempo de retenção 35,67 min – Vitexina (MM: 432)  
Modo negativo:  $[M-H]^-$ : 431,88



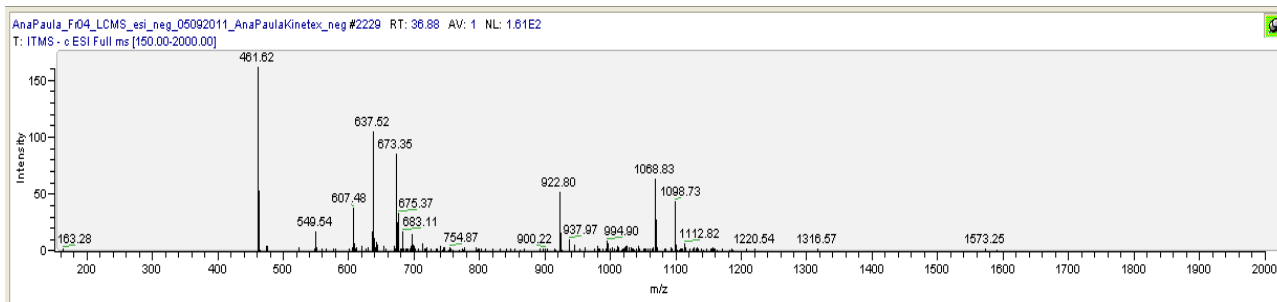
Modo positivo:  $[M+H]^+$ : 433,80



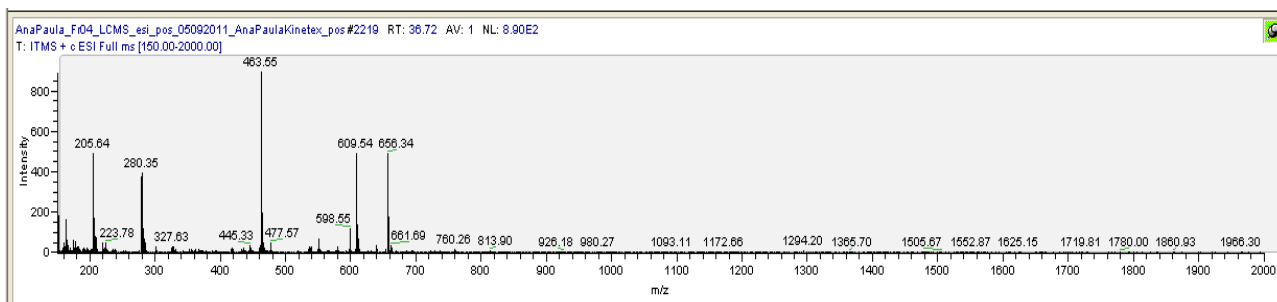
Espectro no UV:



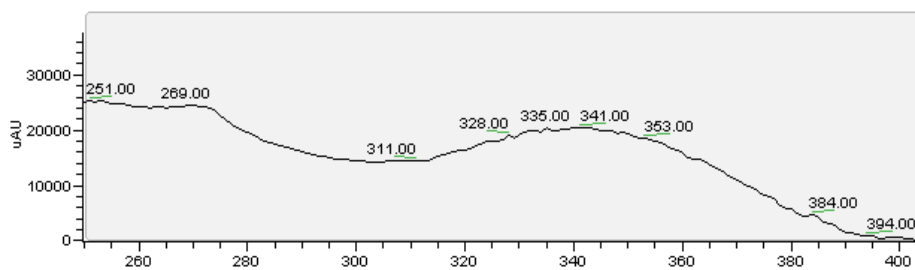
- Tempo de retenção 36,92 min – Diosmetina-8-C-glicosídeo (MM: 462)  
Modo negativo:  $[M-H]^-$ : 461,62



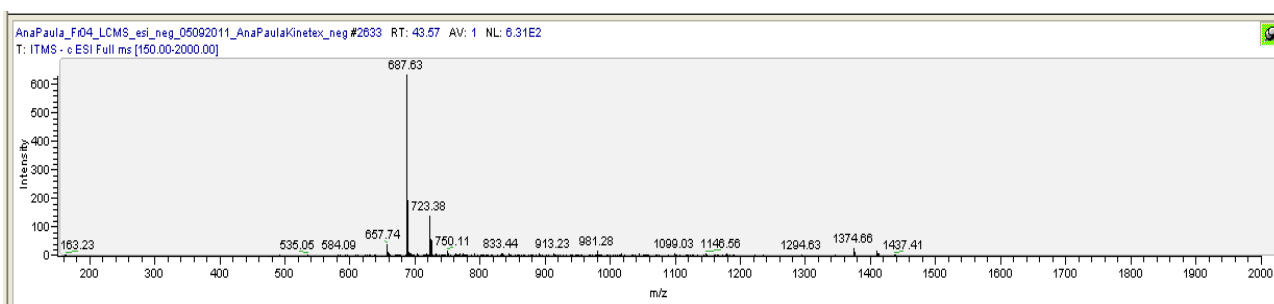
Modo positivo:  $[M+H]^+$ : 463,55



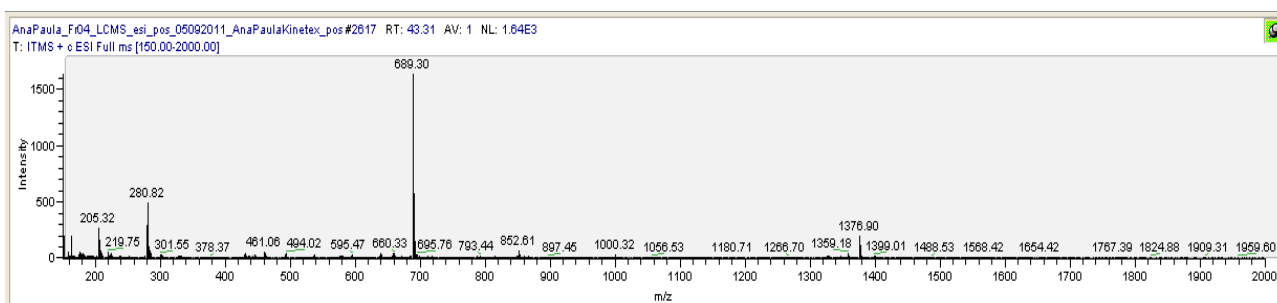
Espectro no UV:



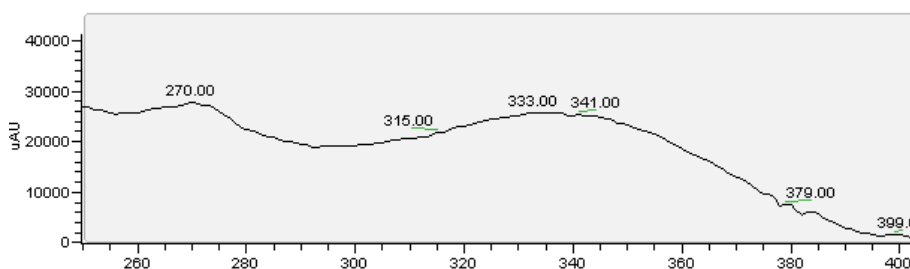
- Tempo de retenção 43,57 min – Tricina 4'-O-(eritro ou treo)-guaiacilgliceril éter-7-O-glucopiranosídeo (MM: 688)  
Modo negativo:  $[M-H]^-$ : 687,53



Modo positivo:  $[M+H]^+$ : 689,71

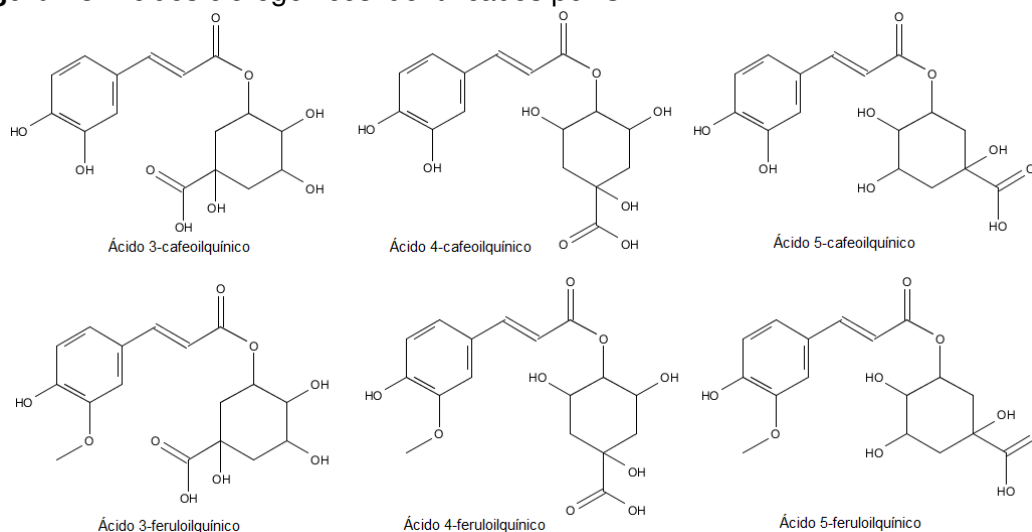


Espectro no UV:

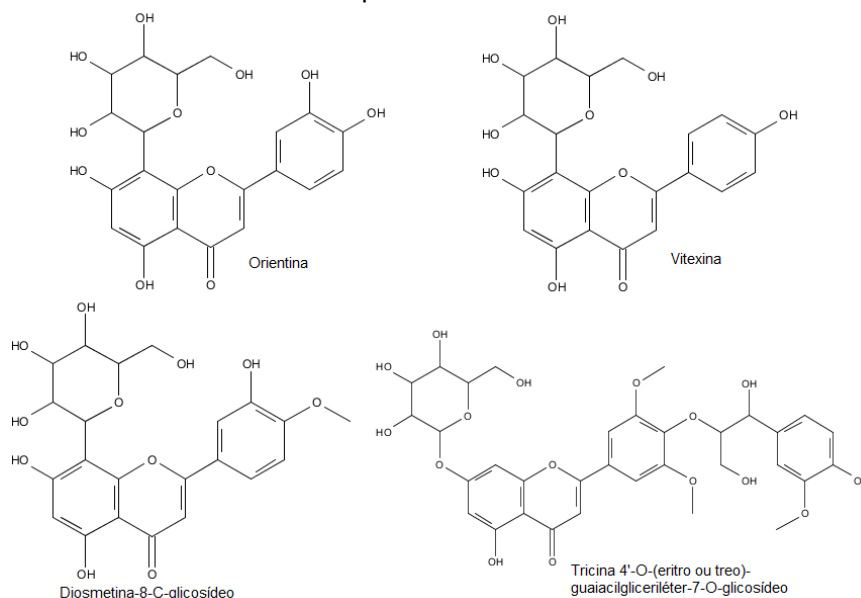


A seguir, nas Figuras 23 e 24, são mostradas as estruturas das substâncias identificadas nas três frações analisadas por CLAE-DAD-EM.

**Figura 23.** Ácidos clorogênicos identificados por CLAE-DAD-EM.



**Figura 24.** Flavonóides identificados por CLAE-DAD-EM.



#### 5.4.4. Identificação de ácidos clorogênicos

A esterificação de um ou mais tipos de ácidos trans-cinâmicos (cinâmico, cumárico, cafeico, ferúlico e dimetoxicinâmico) com uma ou mais das quatro hidroxilas do ácido quínico resulta em uma classe de metabólitos secundários denominados ácidos clorogênicos. Isto implica na formação de uma série de isômeros de posição para cada ácido trans-cinâmico, resultante da esterificação em cada uma das posições do ácido quínico; por exemplo, a série de quatro isômeros de posição para os ácidos cafeoilquínicos (ácido

cafeico esterificado em cada uma das 4 hidroxilas do ácido quínico). Normalmente é encontrada em uma planta toda a série de isômeros de posição de um determinado ácido, com excessão dos derivados com esterificação na posição 1 do ácido quínico, que são de ocorrência relativamente rara, portanto muitas plantas produzem somente os derivados com esterificações nas posições 3, 4 e 5 (Gobbo-Neto 2007).

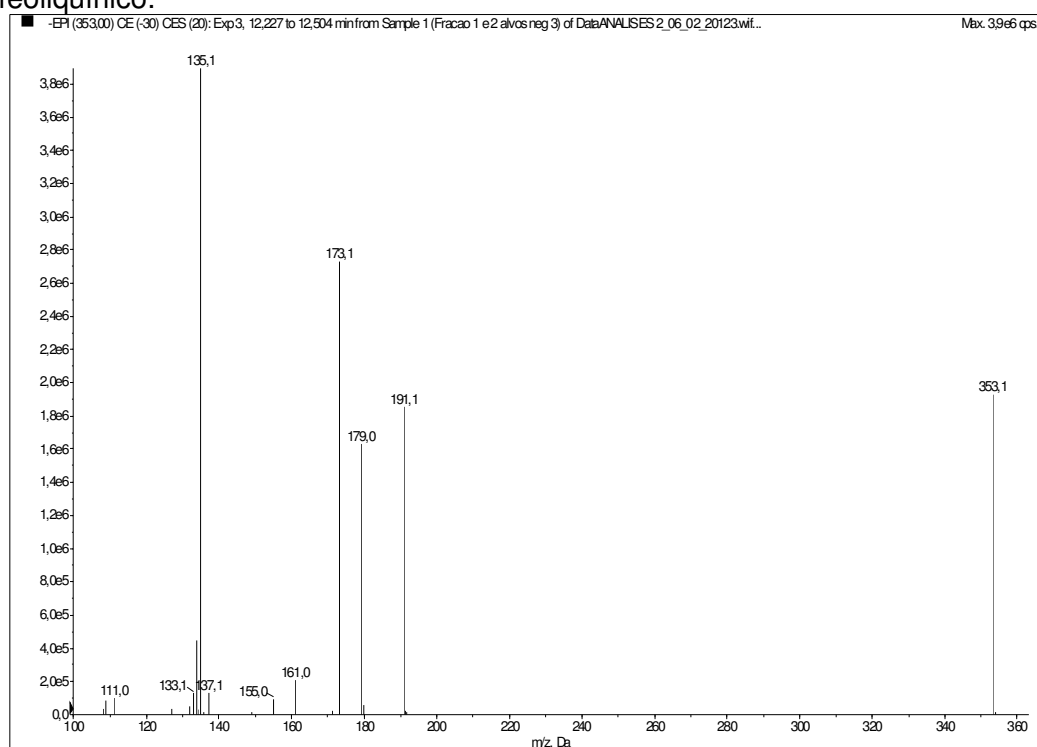
A identificação dos ácidos clorogênicos encontrados nas frações analisadas foi feita com base na espectrometia de massas, utilizando principalmente os espectros de íons produtos (EPI) no modo de ionização negativa, mas também utilizaram-se os dados de tempos de retenção relativos em coluna C18 e espectros no UV.

O mecanismo de fragmentação dos ácidos clorogênicos é influenciado fundamentalmente pela facilidade de perda de uma unidade de ácido cafeico, ou ferúlico, esterificada em uma posição específica do ácido quínico, determinada pela sua proximidade espacial com a carboxila ou hidroxila no carbono 1 do ácido quínico. No caso dos derivados 5-acil, um H da carboxila do ácido quínico é abstraído para a eliminação da unidade cafeica; no caso dos derivados 3-acil, é abstraído um H da hidroxila em 1; e no caso dos derivados 4-acil, como não há proximidade espacial com a carboxila ou hidroxila em 1, é necessária a eliminação de H<sub>2</sub>O a partir de uma das hidroxilas vizinhas (nas posições 3 ou 5 do ácido quínico) antes da eliminação da unidade cafeica. Estas diferenças na fragmentação levam a marcantes diferenças na intensidade e natureza dos íons produtos nos espectros de segunda geração, possibilitando a diferenciação entre os isômeros posicionais. (CLIFFORD *et al.* 2003)

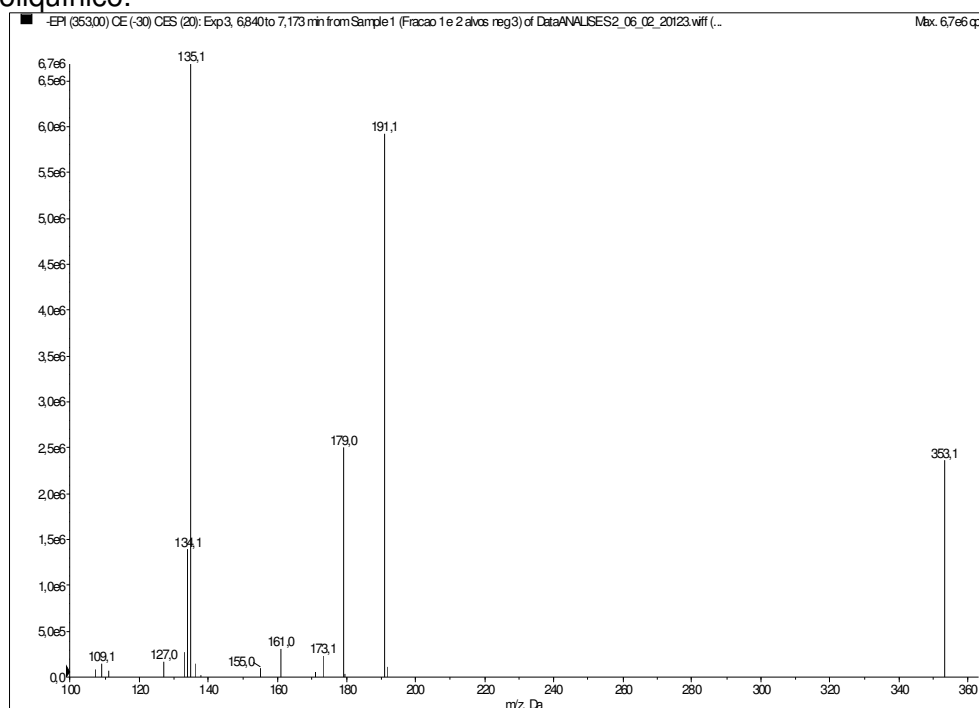
Os picos cromatográficos que apresentaram o íon de  $m/z$  353 como pico base nos espectros de massas no modo negativo e o íon de  $m/z$  355 no modo positivo indicam a presença de ácido cafeoilquínico (MM: 354 u). Os espectros no UV obtidos para estes mesmos picos cromatográficos conferem com espectros característicos desta substância (UV máx: 299 e 325 nm). Em cada fração (F1e2 e F3) são encontrados 3 picos cromatográficos com estas características e os espectros de íons produtos para o íon precursor  $m/z$  353 diferem entre si, possibilitando a distinção entre os isômeros.

O espectro de íons produto para o pico com tempo de retenção 16,41 min (Figura 25) apresentou  $m/z$  173 (referente a unidade de ácido quínico desidratada) como pico base,  $m/z$  191 (referente a perda da unidade cafeoil) e  $m/z$  179 (referente a perda da unidade quínica). Como o fragmento  $m/z$  173 só aparece em ácidos clorogênicos que possuem a unidade de ácido cafeico esterificada na posição 4 do ácido quínico, o pico foi atribuído ao ácido 4-cafeoilquínico. A fragmentação do pico com tempo de retenção 9,62 min (Figura 26) gerou  $m/z$  191 como pico base e  $m/z$  179 com intensidade relativa de 50%. Já o pico com tempo de retenção 16,97 min (Figura 27) produziu  $m/z$  191 como pico base e  $m/z$  179 com intensidade relativa bem menor. Sabendo-se que o padrão de eluição observado para os 3 ácidos cafeoilquínicos em C18 é: tR do ácido 3-cafeoilquínico < tR do ácido 4-cafeoilquínico < tR do ácido 5-cafeoilquínico (Gobbo-Neto 2007) e observando as intensidades relativas do íon  $m/z$  179 atribuiu-se o pico com tempo de retenção 9,62 min ao ácido 3-cafeoilquínico e o pico com tempo de retenção 16,97 min ao ácido 5-cafeoilquínico.

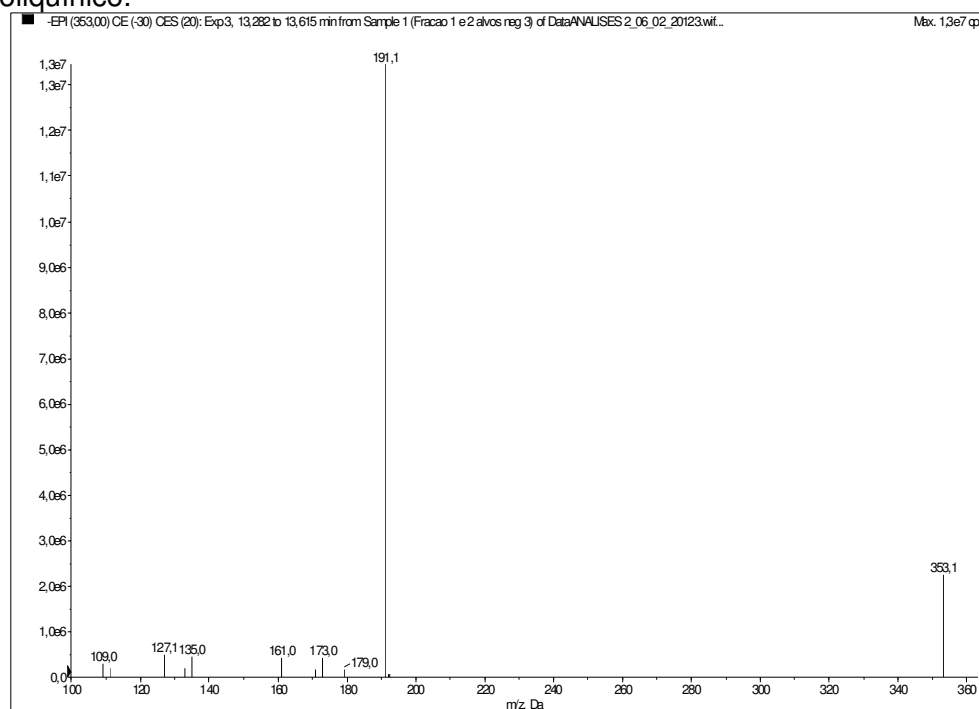
**Figura 25.** Espectro de íon produto do íon precursor  $m/z$  353 do ácido 4-cafeoilquínico.



**Figura 26.** Espectro de íon produto do íon precursor  $m/z$  353 do ácido 3-cafeoilquínico.



**Figura 27.** Espectro de íon produto do íon precursor  $m/z$  353 do ácido 5-cafeoilquínico.

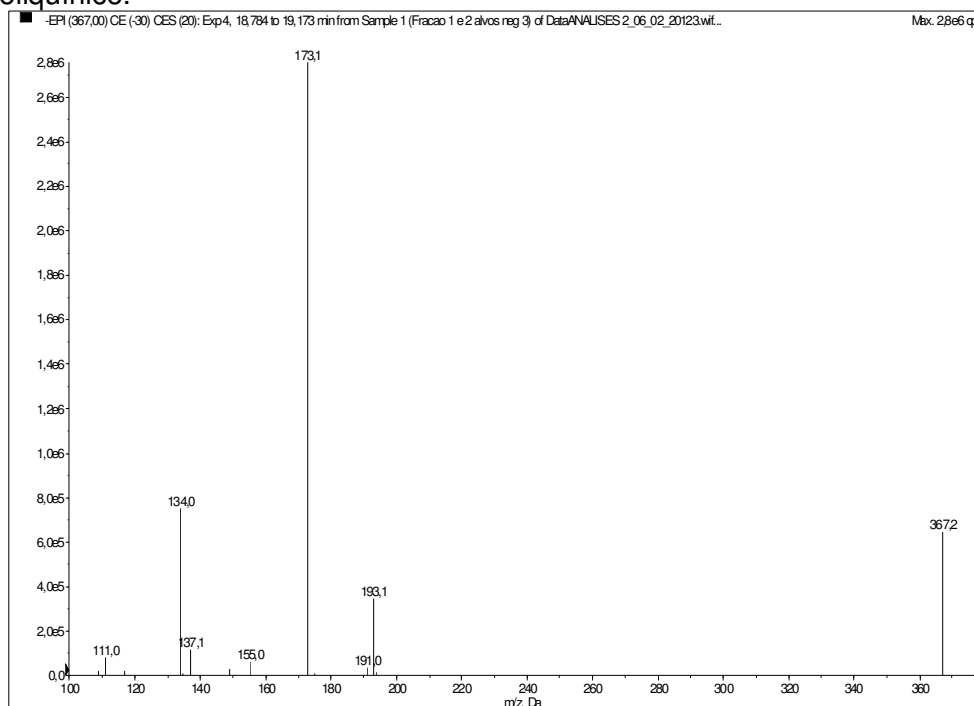


Já os picos cromatográficos que apresentaram o íon de  $m/z$  367 como pico base nos espectros de massas no modo negativo e o íon de  $m/z$  369 no modo positivo (14 unidades de massa atômica maiores que os ácidos

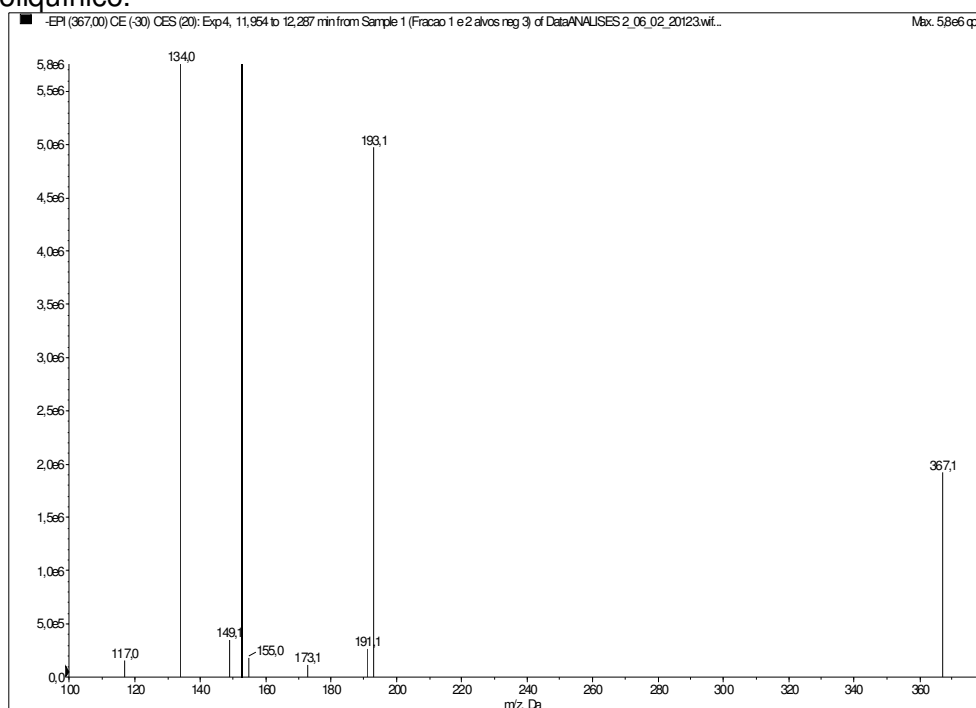
cafeoilquínicos) indicam a presença do ácido feruloilquínico (MM: 368 u). O padrão de espectro no UV para esta substância é exatamente o mesmo que para o ácido cafeoilquínico (UV máx: 299 e 325 nm). Em cada fração (F1e2 e F3) são encontrados 3 picos cromatográficos com estas características, sendo que os espectros de íons produtos para o íon precursor  $m/z$  367 diferem entre si, possibilitando a distinção entre os isômeros.

O espectro de EPI para o pico com tempo de retenção 23,62 min (Figura 28) apresentou  $m/z$  173 o que evidencia a acilação na posição 4 do ácido quínico, atribuindo-se então este pico ao ácido 4-feruloilquínico. A fragmentação do pico com tempo de retenção 15,79 min (Figura 29) gerou  $m/z$  193 como pico base e  $m/z$  191. Já o pico com tempo de retenção 25,53 min (Figura 30) produziu  $m/z$  191 como pico base. Sabendo-se que o padrão de eluição observado em fase reversa C18 para os 3 ácidos feruloilquínicos é: tR do ácido 3-feruloilquínico < tR do ácido 4-feruloilquínico < tR do ácido 5-feruloilquínico (Gobbo-Neto 2007), atribuiu-se o pico com tempo de retenção 15,79 min ao ácido 3-feruloilquínico e o pico com tempo de retenção 25,53 min ao ácido 5-feruloilquínico.

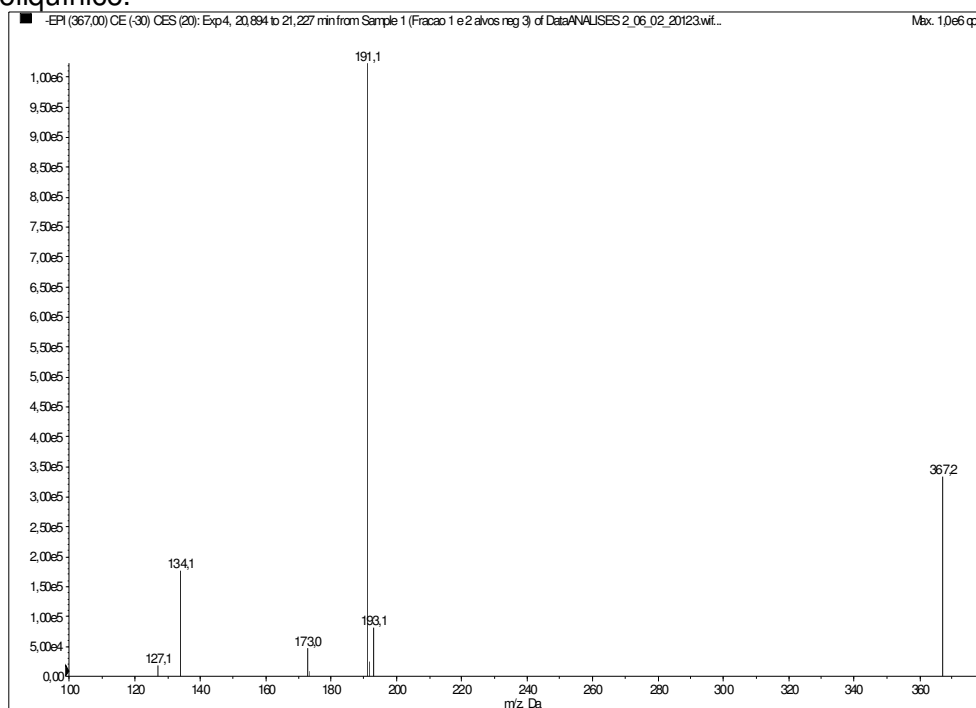
**Figura 28.** Espectro de íon produto do íon precursor  $m/z$  367 do ácido 4-feruloilquínico.



**Figura 29.** Espectro de íon produto do íon precursor  $m/z$  367 do ácido 3-feruloilquínico.



**Figura 30.** Espectro de íon produto do íon precursor  $m/z$  367 do ácido 5-feruloilquínico.

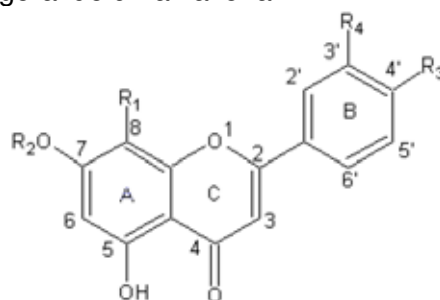


A identificação das séries de isômeros dos ácidos clorogênicos (ácidos cafeoilquínico e feruloilquínico) deve ser destacada, uma vez que é o primeiro relato da presença destas substâncias em extratos de folhas de cana-de-açúcar.

### 5.4.5. Identificação de flavonóides

As flavonas são as classes de flavonóides mais abundantes na cana-de-açúcar assim como seus derivados metilados e glicosilados, estando presentes tanto os O-glicosídeos como os C-glicosídeos. Apresentam grande absorção no UV exibindo duas bandas características: banda I (320-385 nm) – absorção do anel B e banda II (250-285 nm) – absorção do anel A. (Vila 2006)

**Figura 31.** Estrutura química geral de uma flavona.

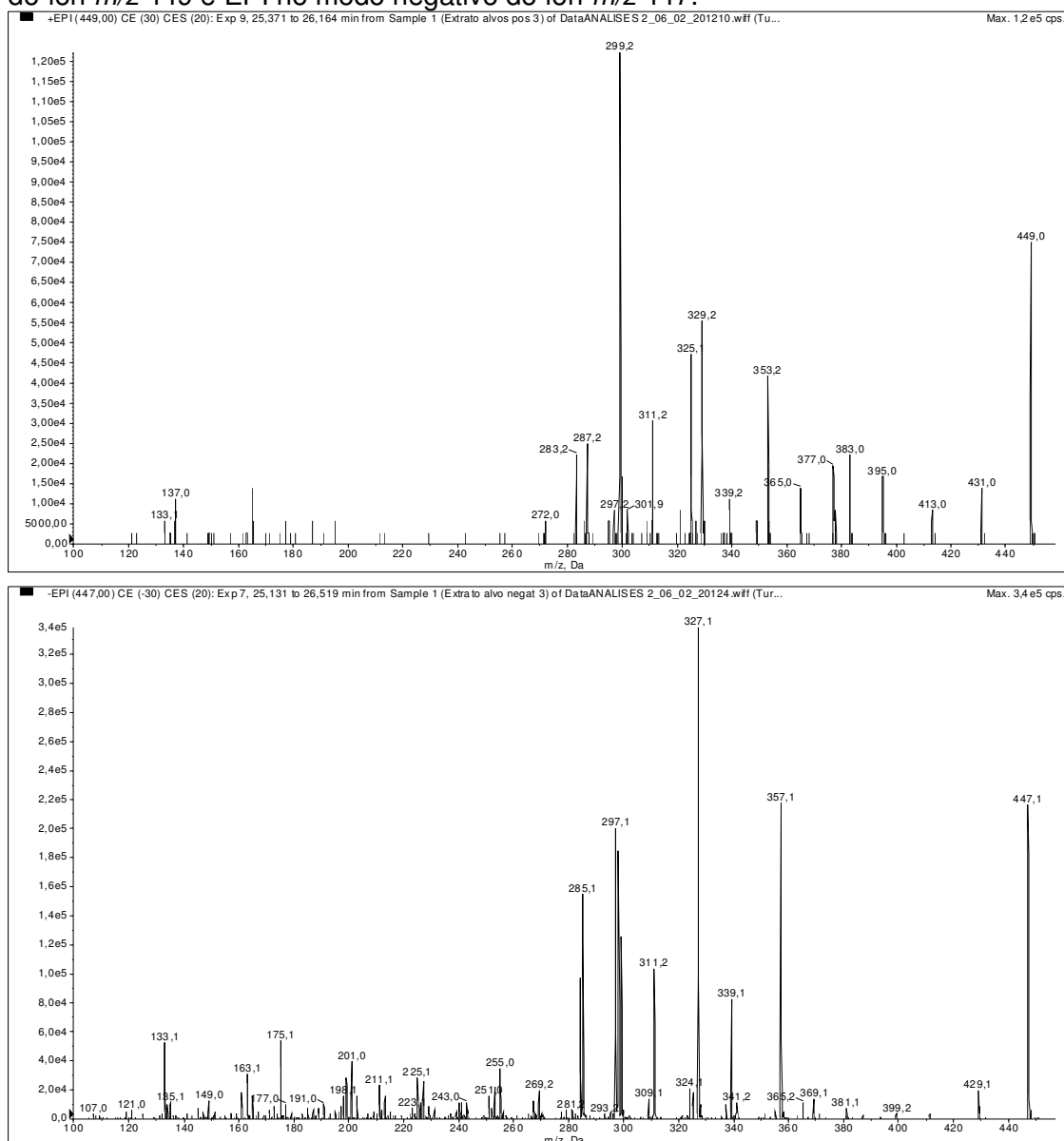


**Fonte:** Vila 2006.

A identificação foi feita através dos dados de espectrometria de massas, utilizando tanto os espectros no modo de ionização negativo quanto no modo positivo e espectros no UV, todos coerentes com o padrão de espectro de flavonas. Para confirmação das identificações foram realizadas análises por CLAE--EM/EM.

Dos flavonóides identificados a orientina, a vitexina e a diosmetina-8-C-glicosídeo são flavonas C-glicosiladas, as quais apresentam fragmentações bem definidas na literatura, referentes principalmente a fragmentação do açúcar. As principais perdas são -150 u, -120 u, -90 u e -60 u, sendo que na maioria dos casos são melhor visualizadas no modo negativo, pois o modo positivo gera muita fragmentação, dificultando a elucidação estrutural (Figuras 32, 33 e 34). Já a tricina 4'-O-(eritro ou treo)-guaiacilgliceril éter-7-O-glucopiranosídeo é uma flavona O-glicosilada, que apresenta como principal fragmentação a perda da unidade de açúcar (figura 35).

**Figura 32.** Confirmação da identificação da orientina (MM:448). EPI no modo positivo do íon  $m/z$  449 e EPI no modo negativo do íon  $m/z$  447.



### Orientina (MM:448)

Fragmentação – modo positivo:

$[M+H]^+$  449

$[M+H-18]^+$  431 ( $-H_2O$ )

$[M+H-36]^+$  413 ( $-2H_2O$ )

$[M+H-54]^+$  395 ( $-3H_2O$ )

$[M+H-30-36]^+$  383 ( $^{2,3}X^+ - 2H_2O$ )

$[M+H-96]^+$  353 ( $^{0,4}X^+ - 2H_2O$ )

$[M+H-120]^+$  329 ( $^2X^+$ )

$[M+H-150]^+$  299 ( $^1X^+$ )

Fragmentação – modo negativo:

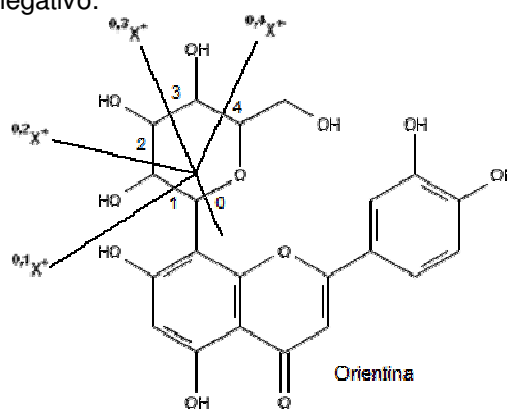
$[M-H]^-$  447

$[M-H-18]^-$  429 ( $-H_2O$ )

$[M-H-90]^-$  357 ( $^3X^+$ )

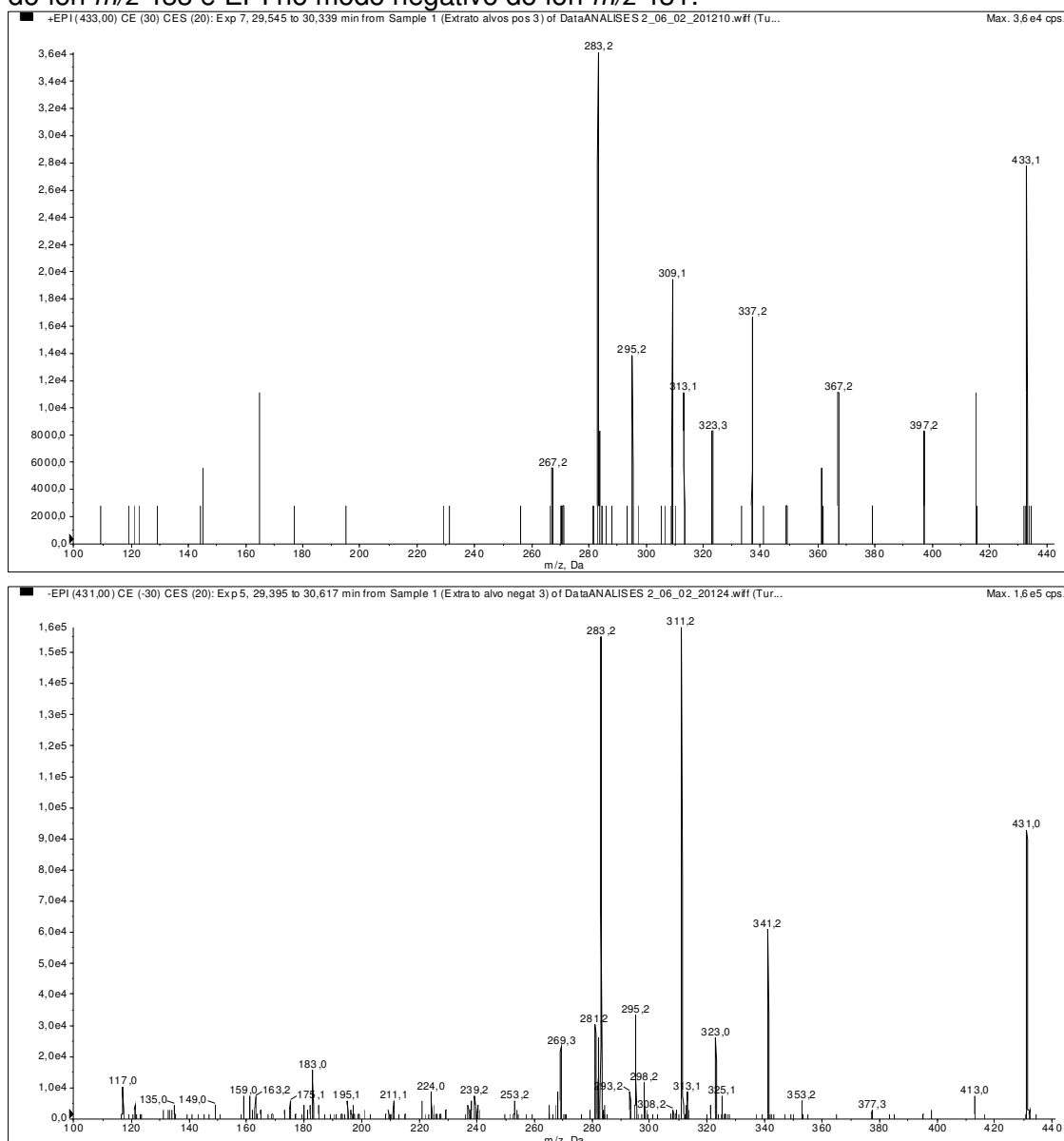
$[M-H-120]^-$  327 ( $^2X^+$ )

$[M-H-150]^-$  297 ( $^1X^+$ )



Nomenclatura de fragmentação baseada em Domon e Costello, citados por Colombo, 2009.

**Figura 33.** Confirmação da identificação da vitexina (MM:432). EPI no modo positivo do íon  $m/z$  433 e EPI no modo negativo do íon  $m/z$  431.



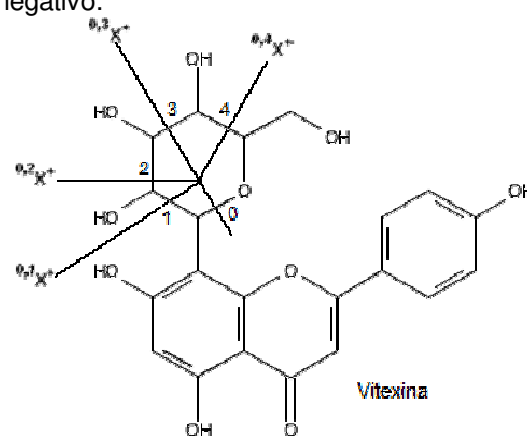
### Vitexina (MM: 432)

Fragmentação – modo positivo:

- [M+H]<sup>+</sup> 433
- [M+H-18]<sup>+</sup> 415 (-H<sub>2</sub>O)
- [M+H-36]<sup>+</sup> 397 (-2H<sub>2</sub>O)
- [M+H-54]<sup>+</sup> 379 (-3H<sub>2</sub>O)
- [M+H-30-36]<sup>+</sup> 367 (<sup>2,3</sup>X<sup>+</sup> - 2H<sub>2</sub>O)
- [M+H-96]<sup>+</sup> 337 (<sup>0,4</sup>X<sup>+</sup> - 2H<sub>2</sub>O)
- [M+H-120]<sup>+</sup> 313 (<sup>2</sup>X<sup>+</sup>)
- [M+H-150]<sup>+</sup> 283 (<sup>1</sup>X<sup>+</sup>)

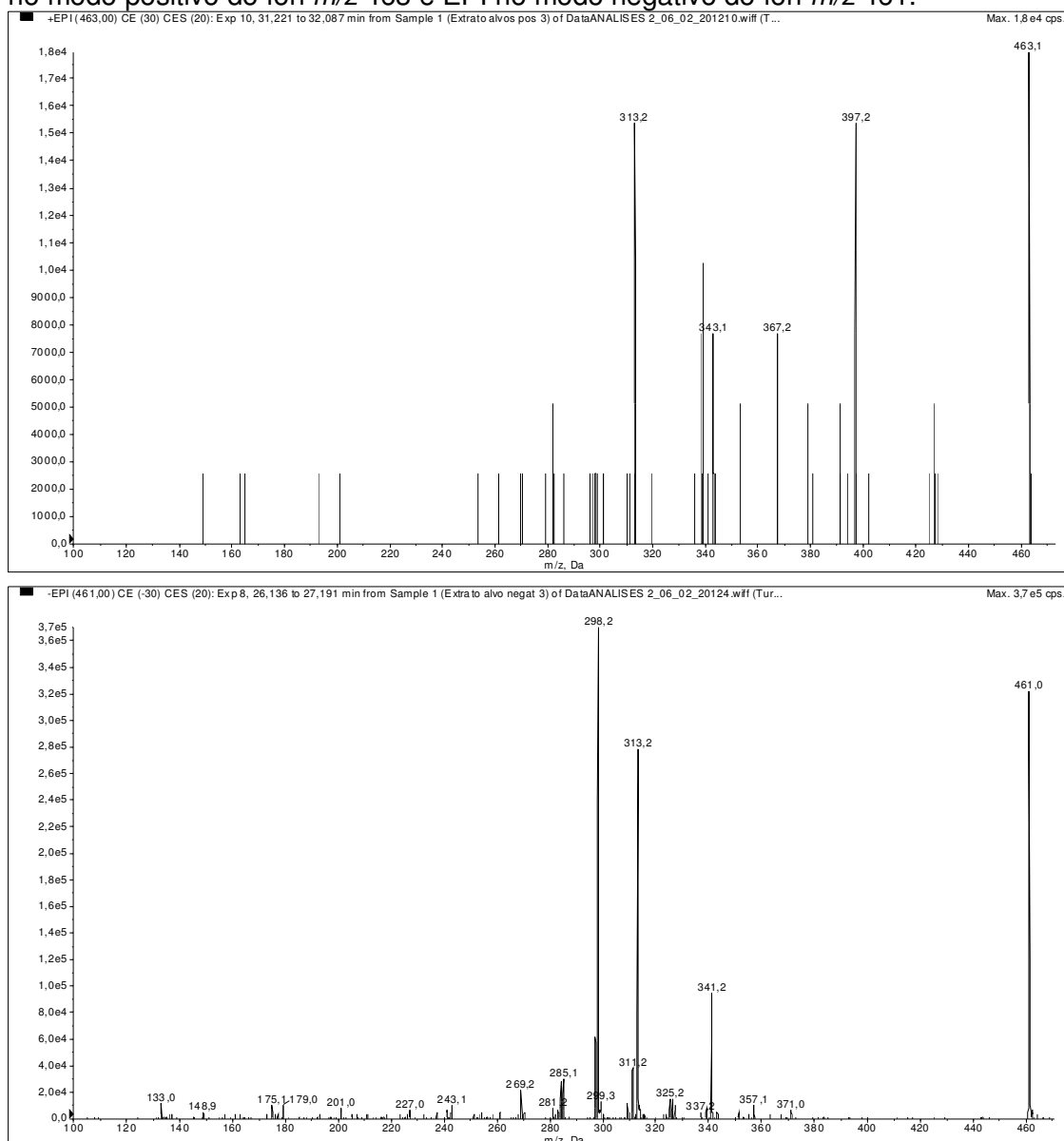
Fragmentação – modo negativo:

- [M-H]<sup>-</sup> 431
- [M-H-18]<sup>-</sup> 413 (-H<sub>2</sub>O)
- [M-H-54]<sup>-</sup> 377 (-3H<sub>2</sub>O)
- [M-H-90]<sup>-</sup> 341 (<sup>3</sup>X<sup>-</sup>)
- [M-H-120]<sup>-</sup> 311 (<sup>2</sup>X<sup>-</sup>)
- [M-H-150]<sup>-</sup> 281 (<sup>1</sup>X<sup>-</sup>)



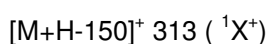
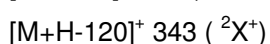
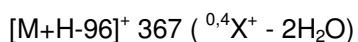
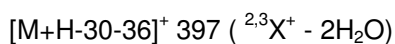
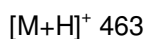
Nomenclatura de fragmentação baseada em Domon e Costello, citados por Colombo, 2009.

**Figura 34.** Confirmação da identificação da diosmetina-8-C-glicosídeo (MM:462). EPI no modo positivo do íon  $m/z$  463 e EPI no modo negativo do íon  $m/z$  461.

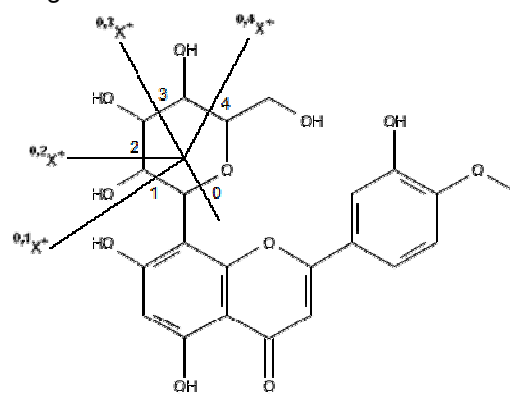
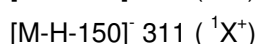
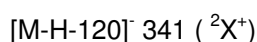
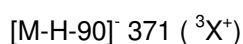
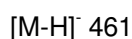


### Diosmetina-8-C-glicosídeo (MM: 462)

Fragmentação – modo positivo:

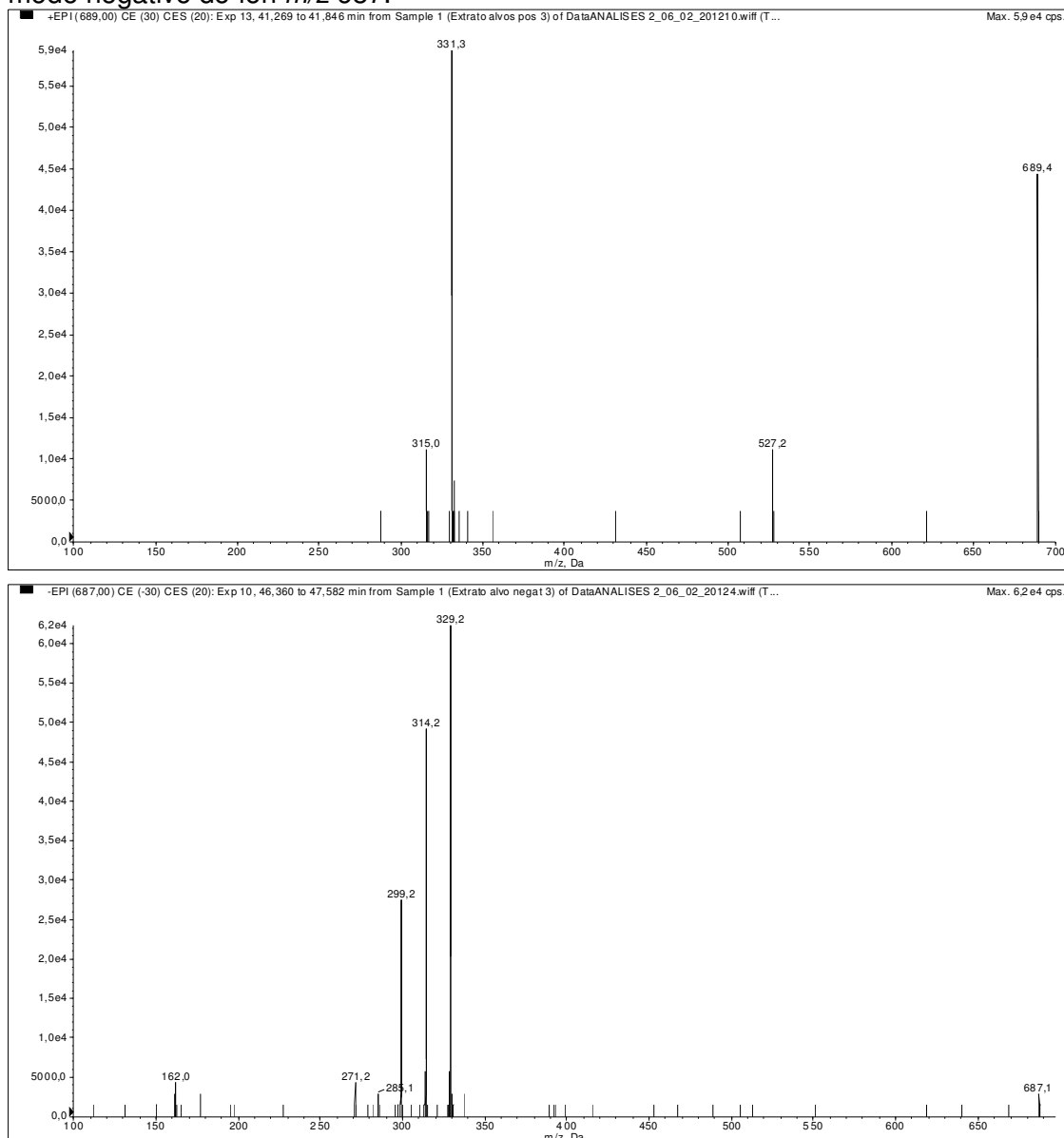


Fragmentação – modo negativo:



Nomenclatura de fragmentação baseada em Domon e Costello, citados por Colombo, 2009.

**Figura 35.** Confirmação da identificação da tricina 4'-O-(eritro ou treo)-guaiacilgliceril éter-7-O-glucopiranosídeo (MM:688). EPI no modo positivo do íon  $m/z$  689 e EPI no modo negativo do íon  $m/z$  687.



### Tricina 4'-O-(eritro ou treo)-guaiacilgliceril éter-7-O-glucopiranosídeo (MM:688)

Fragmentação – modo positivo:

$[M+H]^+$  689

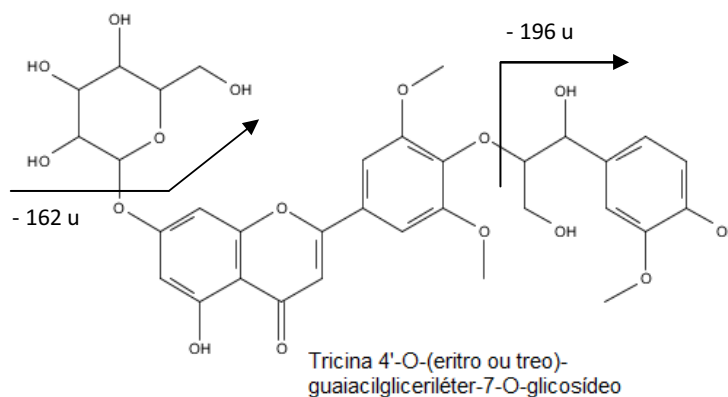
$[M+H-162]^+$  527

$[M+H-162-196]^+$  331

Fragmentação – modo negativo:

$[M-H]^-$  687

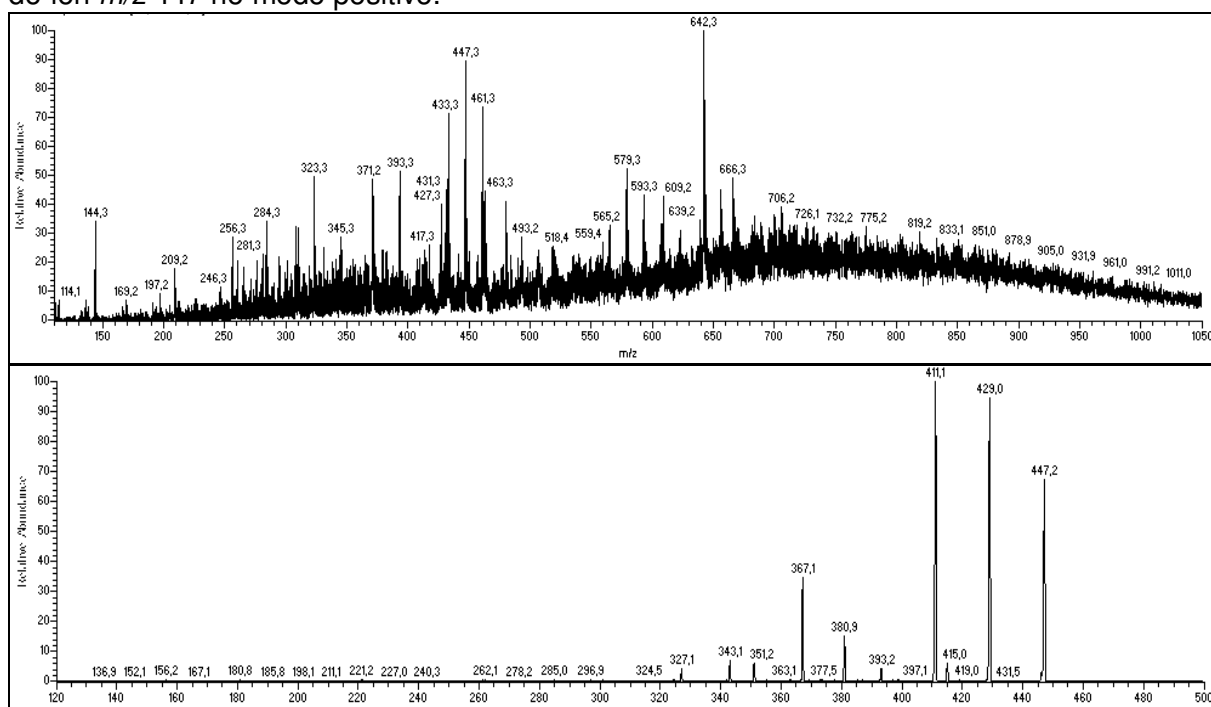
$[M-H-162-196]^-$  329



Nomenclatura de fragmentação baseada em Domon e Costello, citados por Colombo, 2009.

A fração F4 foi analisada por IES-EM/EM através de infusão direta a uma concentração de 1 mg/mL no modo positivo. Através dos dados de EM<sup>2</sup> obtidos e comparação com dados de fragmentação já publicados na literatura (Colombo et al. 2008 e 2009) foi possível a confirmação da identificação de outro flavonóide: swertisina (7-O-metilapigenina-6-C-glicosídeo).

**Figura 36.** TIC (cromatograma de íons totais) da subfração F4 no modo positivo; EM<sup>2</sup> do íon  $m/z$  447 no modo positivo.



**Swertisina (MM: 446)**

Fragmentação – modo positivo:

$[M+H]^+ = 447$

$[M+H-18]^+ = 429 (-H_2O)$

$[M+H-36]^+ = 411 (-2H_2O)$

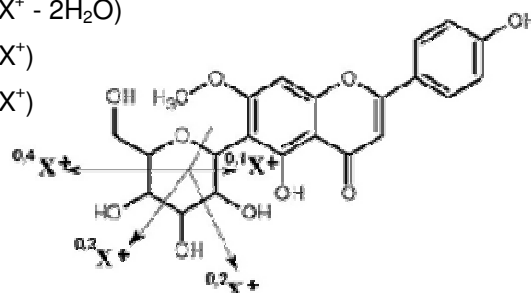
$[M+H-54]^+ = 393 (-3H_2O)$

$[M+H-30-36]^+ = 381 ({}^{2,3}X^+ - 2H_2O)$

$[M+H-96]^+ = 351 ({}^{0,4}X^+ - 2H_2O)$

$[M+H-120]^+ = 327 ({}^2X^+)$

$[M+H-150]^+ = 297 ({}^1X^+)$



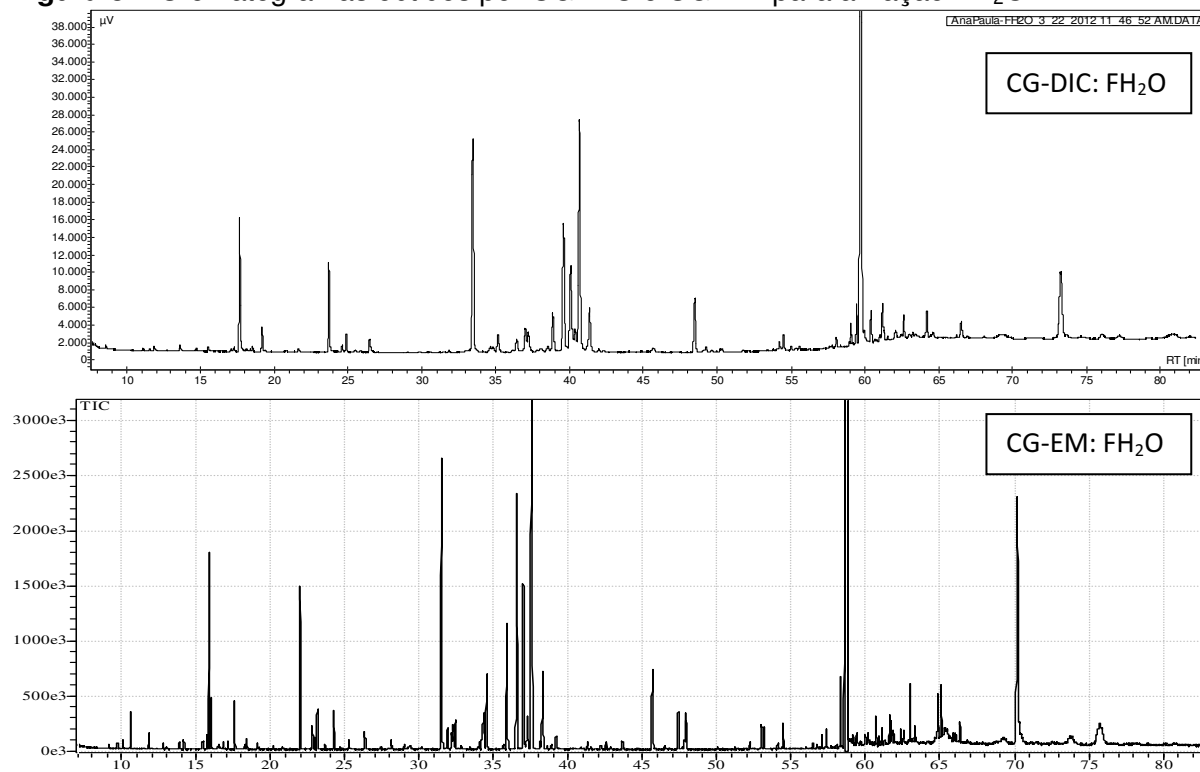
Nomenclatura de fragmentação baseada em Domon e Costello, citados por Colombo, 2009.

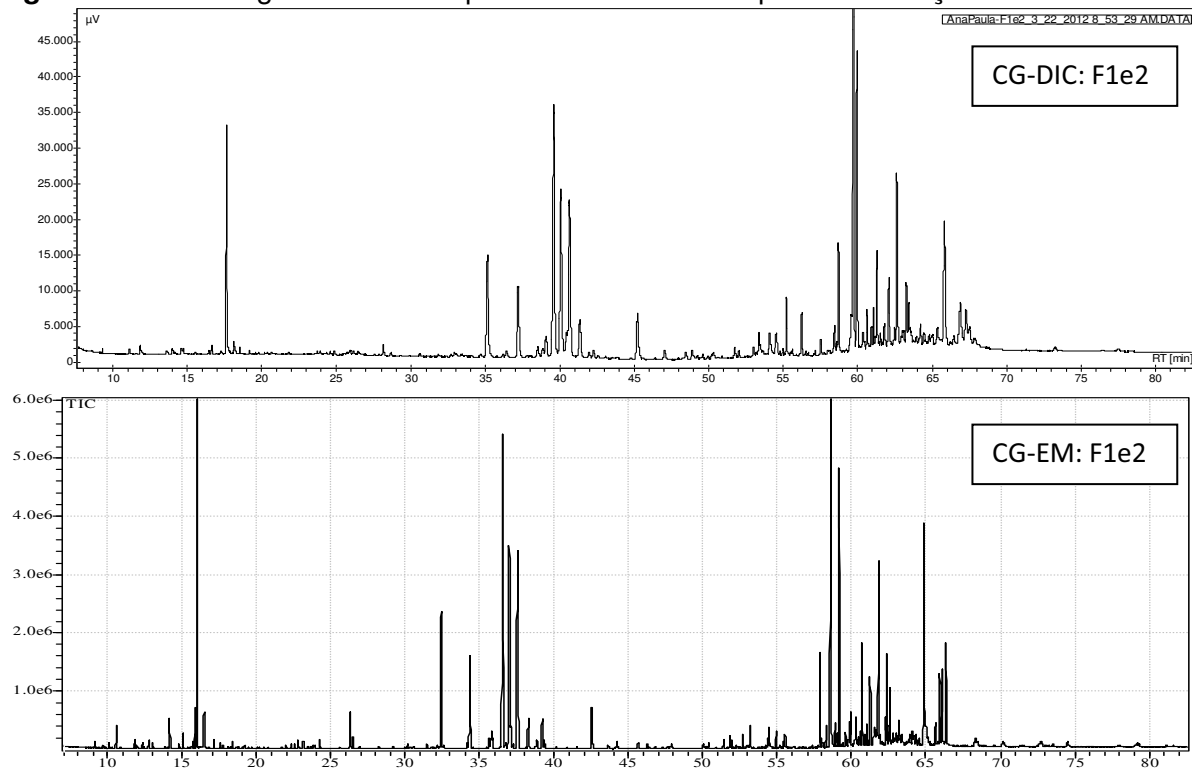
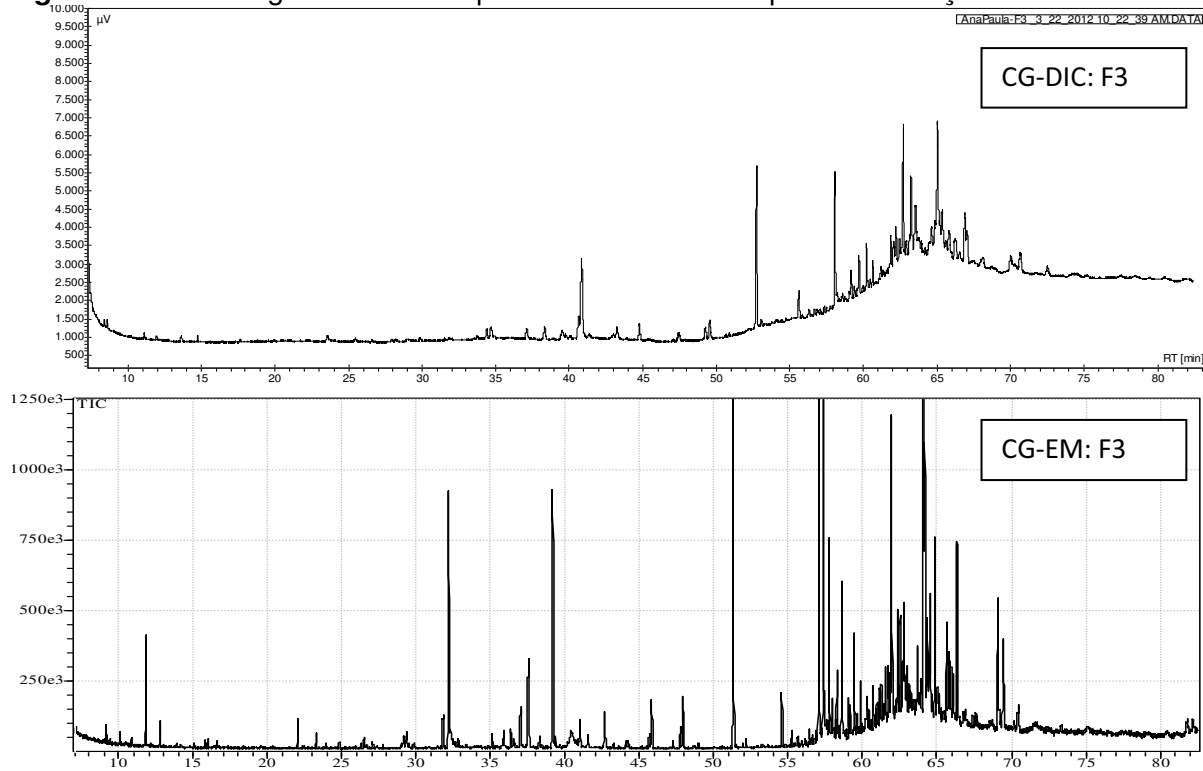
## 5.5. Análises por CG-EM

Antes das análises das frações por cromatografia gasosa foi realizado o processo de derivação, para que fosse possível a volatilização e estabilização térmica dos compostos polares presentes nestas frações. Foram realizadas duas reações de derivação, a metoximação e a sililação.

A seguir são apresentados os cromatogramas obtidos nas análises por CG-DIC e CG-EM da fração FH<sub>2</sub>O e subfrações F1e2 e F3, após derivação.

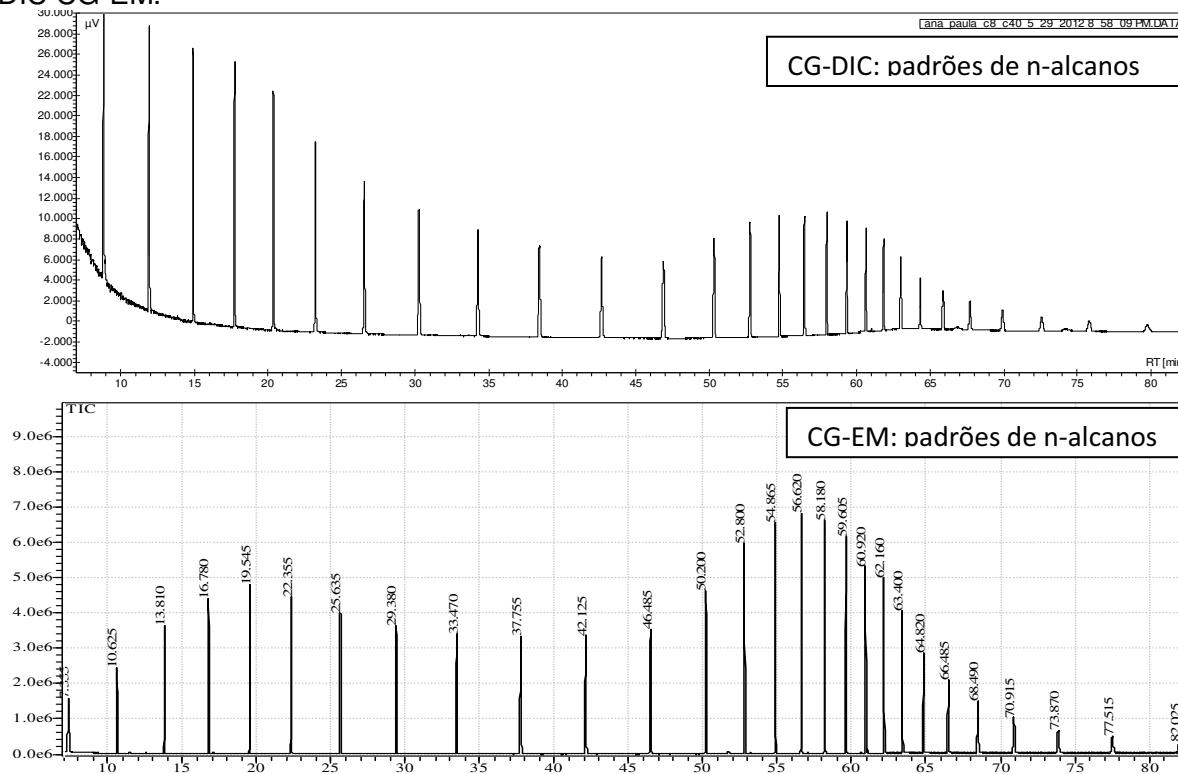
**Figura 37.** Cromatogramas obtidos por CG-DIC e CG-EM para a fração FH<sub>2</sub>O.



**Figura 38.** Cromatogramas obtidos por CG-DIC e CG-EM para a subfração F1e2.**Figura 39.** Cromatogramas obtidos por CG-DIC e CG-EM para a subfração F3.

Foi analisada nas mesmas condições utilizadas para as frações, uma amostra de padrões de n-alcenos de C<sub>8</sub> a C<sub>40</sub>, para cálculo do índice de retenção.

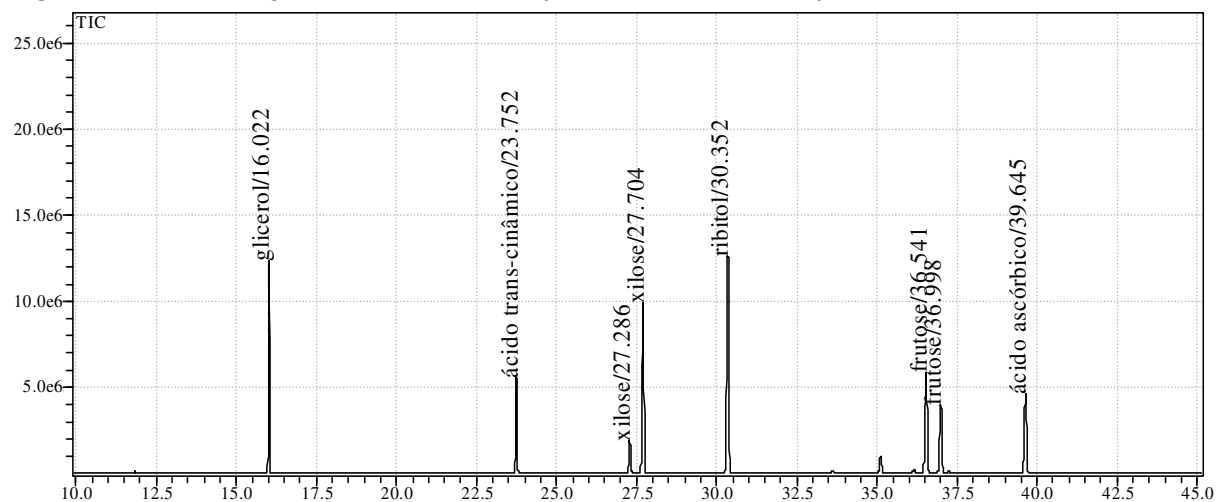
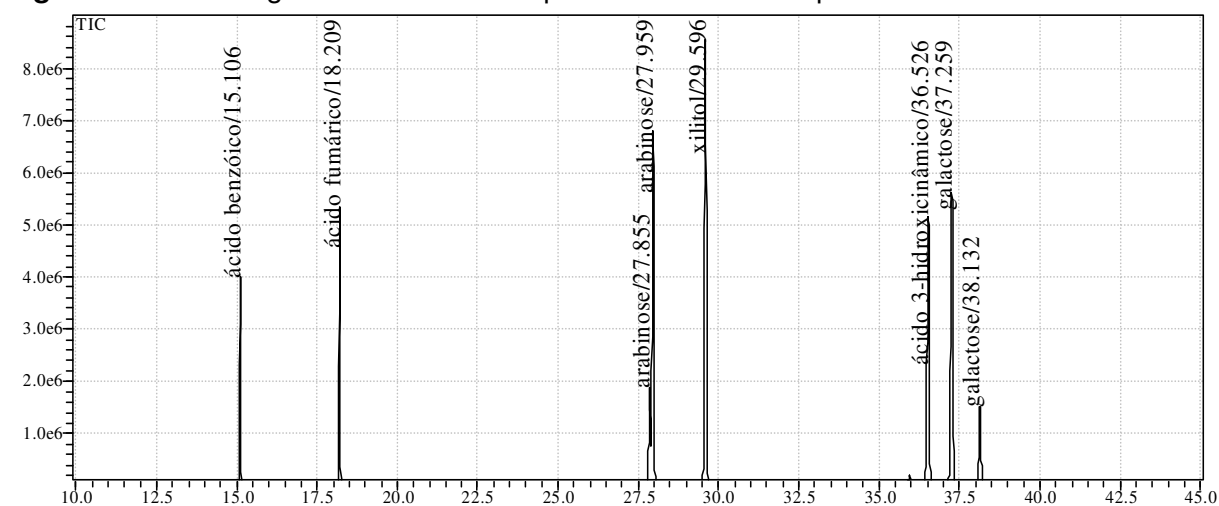
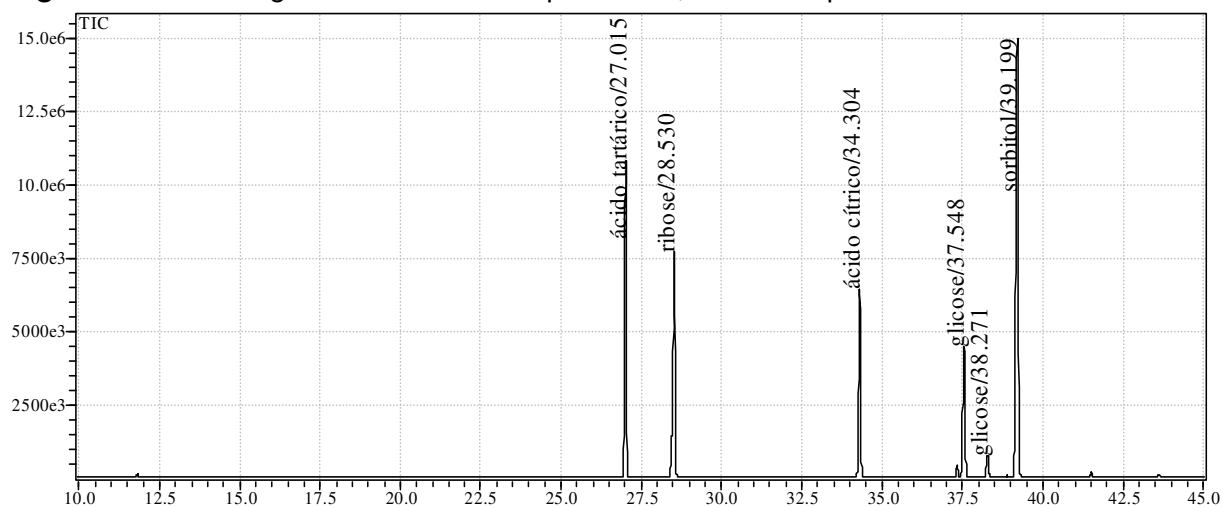
**Figura 40.** Cromatogramas da amostra de padrões de n-alcenos analisada por CG-DIC CG-EM.

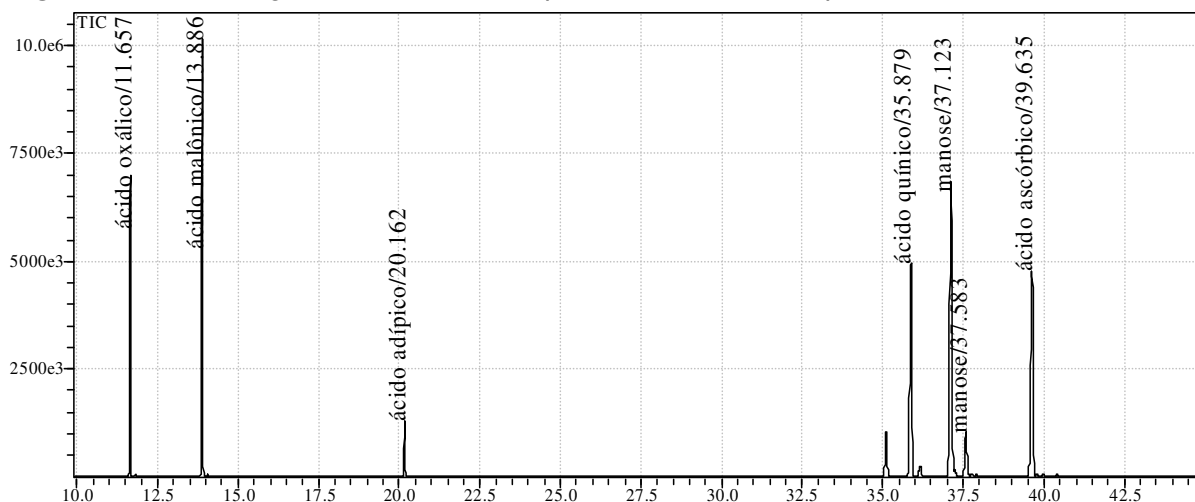


Nas condições utilizadas para análise dos padrões de n-alcenos, foram identificados os hidrocarbonetos de C<sub>10</sub> a C<sub>37</sub>, sendo que os respectivos tempos de retenção foram utilizados para o cálculo do índice de retenção dos picos cromatográficos das amostras.

A identificação dos metabólitos derivados foi feita através de comparação dos seus espectros de massas com aqueles das bibliotecas de dados NIST e WILEY, pela comparação dos índices de retenção obtidos experimentalmente com valores tabelados (Golm Metabolome Database – Max Planck Institute e WebNIST) e em alguns casos através de comparação com padrões comerciais injetados nas mesmas condições.

A seguir são apresentados os cromatogramas das misturas de padrões comerciais analisados por CG-EM. Os cromatogramas dos padrões analisados isoladamente por CG-DIC são apresentados nos Anexos 1 a 22.

**Figura 41.** Cromatograma da mistura de padrões 1 analisada por CG-EM.**Figura 42.** Cromatograma da mistura de padrões 2 analisada por CG-EM.**Figura 43.** Cromatograma da mistura de padrões 3, analisada por CG-EM.

**Figura 44.** Cromatograma da mistura de padrões 4, analisada por CG-EM.

Alguns dos padrões de açúcares analisados apresentam dois picos cromatográficos, como por exemplo a galactose que aparece nos tempos de retenção 37,259 min e 38,132 min. Isto se deve à formação dos estereoisômeros *syn* e *anti* dos seus derivados metoximados, porém os espectros de massas de ambos os picos cromatográficos são iguais. Os espectros de massas obtidos para cada padrão são apresentados nos Anexos 23 a 51.

Na Tabela 3 são mostrados os 61 metabólitos que foram identificados por CG-EM nas frações analisadas, assim como os seus respectivos tempos de retenção, índices de retenção calculados e encontrados na literatura, similaridade do espectro de massas com o espectro das bibliotecas de dados (NIST e WILEY) e as frações em que o metabólito foi identificado. Os espectros de massas de cada substância identificada por CG-EM são apresentados nos Anexos 52 a 112.

**Tabela 3.** Metabólitos identificados por CG-EM com seus respectivos tempos de retenção (tR), índice de retenção calculado (IR<sub>Cal</sub>), índice de retenção encontrados na literatura (IR<sub>Lit</sub>), porcentagem de similaridade do espectro de massas com a biblioteca de dados e as frações em que foram identificados os metabólitos.

	<b>Metabólito</b>	<b>tR (min)</b>	<b>IR<sub>Cal</sub></b>	<b>IR<sub>Lit</sub></b>	<b>Similaridade</b>	<b>Frações</b>
1	ácido láctico 2TMS	9,124	1054	1057	93%	F1e2; F3
2	ácido glicólico 2TMS	9,700	1072	1078	84%	F1e2; FH2O
3	Valina TMS	10,078	1083	1083	91%	F1e2; FH2O
4	alanina TMS	10,570	1098	1087	97%	F1e2; FH2O
5	ácido hidracrílico 2TMS	11,978	1142	1144	87%	F1e2
6	ácido hidroxibutírico 2TMS	12,477	1158	1163	82%	F1e2
7	ácido malônico 2TMS*	13,865	1202	1207	89%	F1e2; FH2O
8	valina 2TMS	14,170	1212	1222	94%	F1e2; FH2O
9	dietilenoglicol 2TMS	15,085	1243	1238	95%	F1e2
10	serina 2TMS	15,439	1255	1255	80%	FH2O
11	2-aminoetanol 3TMS	15,682	1263	1265	87%	FH2O
12	ácido fosfórico 3TMS	15,874	1269	1283	96%	FH2O
13	leucina 2TMS	15,878	1270	1264	91%	F1e2
14	glicerol 3TMS*	16,007	1274	1267	96%	F1e2; FH2O; F3
15	isoleucina 2TMS	16,482	1290	1294	90%	F1e2
16	prolina 2TMS	16,543	1292	1297	80%	F1e2; FH2O
17	ácido fenilacético TMS	16,600	1294	1303	84%	F3
18	glicina 3TMS	16,807	1301	1304	86%	FH2O
19	ácido succínico 2TMS	17,150	1313	1314	93%	F1e2; FH2O
20	ácido glicérico 3TMS	17,584	1329	1336	93%	F1e2; FH2O
21	uracila 2TMS	17,721	1334	1346	88%	F1e2
22	serina 3TMS	18,429	1360	1363	85%	FH2O
23	treonina 3TMS	19,091	1384	1389	80%	F1e2; FH2O
24	ácido glutárico 2TMS	19,676	1405	1407	73%	F1e2
25	alanina 3TMS	20,187	1423	1427	86%	FH2O
26	homoserina 3TMS	20,829	1446	1447	81%	FH2O
27	ácido málico 3TMS	21,967	1486	1487	89%	F1e2; FH2O
28	eritritol 4TMS	22,556	1506	1505	89%	F1e2
29	ácido piroglutâmico 2TMS	22,791	1513	1510	91%	F1e2; FH2O
30	ácido aspártico 3TMS	22,936	1518	1517	90%	FH2O
31	ácido treônico 4TMS	24,254	1558	1567	91%	F1e2; FH2O
32	fenilalanina 2TMS	26,314	1618	1640	94%	F1e2
33	ácido glutâmico 3TMS	26,346	1619	1614	86%	FH2O
34	ácido 4-hidroxibenzoico 2TMS	26,468	1622	1637	90%	F1e2; F3
35	ácido p-hidroxifenilacético 2TMS	26,913	1634	1648	86%	F1e2
36	asparagina 3TMS	28,107	1666	1664	87%	FH2O
37	xilitol 5TMS*	29,167	1694	1700	82%	F1e2

38	ribitol 5TMS*	30,148	1719	1721	88%	F1e2
39	ácido cis-aconítico 3TMS	31,500	1752	1754	93%	FH2O
40	ácido isovalínico 2TMS	31,796	1759	1760	92%	F3
41	ácido ribônico 5TMS	31,891	1761	1742	94%	FH2O
42	ácido cítrico 4TMS*	34,517	1824	1837	94%	FH2O
43	adenina 2TMS	35,778	1854	1885	92%	F1e2
44	frutose 1MEOX 5TMS*	36,529	1871	1850	92%	F1e2; FH2O; F3
	frutose 1MEOX 5TMS*	36,973	1882	1850	93%	F1e2; FH2O; F3
45	galactose 1MEOX 5TMS*	37,241	1888	1866	86%	F1e2; FH2O
46	glicose 1MEOX 5TMS*	37,541	1895	1874	85%	F1e2; FH2O; F3
	galactose 1MEOX 5TMS*	38,134	1909	1866	82%	FH2O
	glicose 1MEOX 5TMS*	38,267	1912	1874	85%	F1e2; FH2O; F3
47	manitol 6TMS	38,882	1926	1923	87%	FH2O
48	ácido p-cumárico 2TMS	39,157	1932	1948	92%	F3
49	tirosina 3TMS	39,185	1933	1958	94%	F1e2
50	ácido galactônico 6TMS	42,531	2009	1991	84%	FH2O
51	ácido palmítico TMS	44,120	2046	2047	86%	F3
52	inositol 6TMS	45,644	2081	2096	87%	F1e2; FH2O
53	ácido ferúlico 2TMS	45,810	2085	2104	87%	F3
54	ácido cafeico 3TMS	47,874	2137	2152	78%	F1e2; FH2O; F3
55	sacarose 8TMS	58,590	2629	2714	92%	F1e2; FH2O; F3
56	ácido 5-feruloilquínico 6TMS	64,515	3079	-	-	F1e2; F3
57	ácido 5-cafeoilquínico 6TMS	64,845	3102	3190	-	F1e2; F3
58	ácido 4-feruloilquínico 6TMS	65,645	3150	-	-	F1e2; F3
59	ácido 4-cafeoilquínico 6TMS	65,930	3167	3240	-	F1e2; F3
60	ácido 3-feruloilquínico 6TMS	66,075	3175	-	-	F1e2; F3
61	ácido 3-cafeoilquínico 6TMS	66,330	3191	3260	-	F1e2; F3

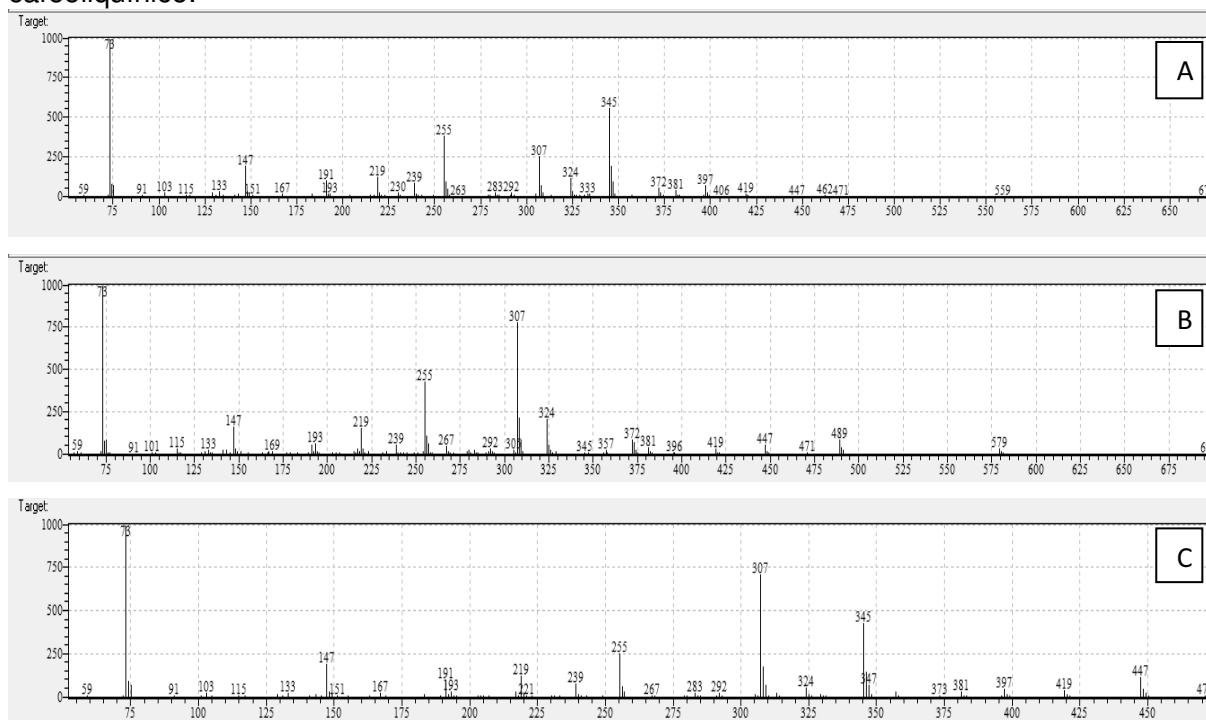
\*além do índice de retenção, estes padrões foram identificados por comparação com padrões comerciais.

Nas três frações analisadas o pico mais intenso aparece no tempo de retenção de 58,590 min e corresponde a sacarose 8TMS, o que já era esperado, uma vez que foram analisadas frações polares, solúveis em água, e sabe-se que este açúcar é o principal metabólito produzido pela cana-de-açúcar.

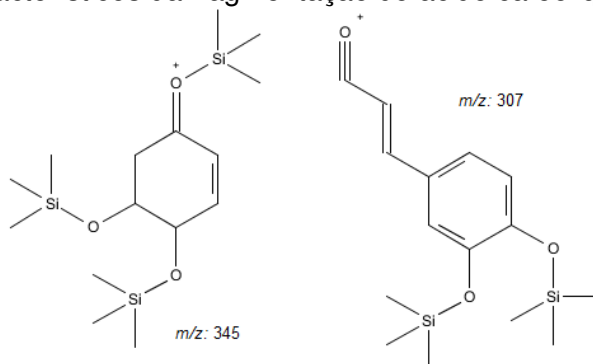
Para alguns metabólitos identificados, como o caso dos ácidos clorogênicos (metabólitos 56 a 61), não foram encontrados espectros de massa nas bibliotecas de dados NIST e WILEY para comparação. Porém a identificação foi possível através da análise da fragmentação obtida com dados já relatados na literatura. A identificação também foi facilitada devido ao fato

destes ácidos clorogênicos também terem sido identificados por CLAE-DAD-EM nas mesmas frações.

**Figura 45.** Espectros de massa obtidos para os isômeros de posição do ácido cafeoilquínico. A: ácido 5-cafeoilquínico; B: ácido 4-cafeoilquínico; C: ácido 3-cafeoilquínico.

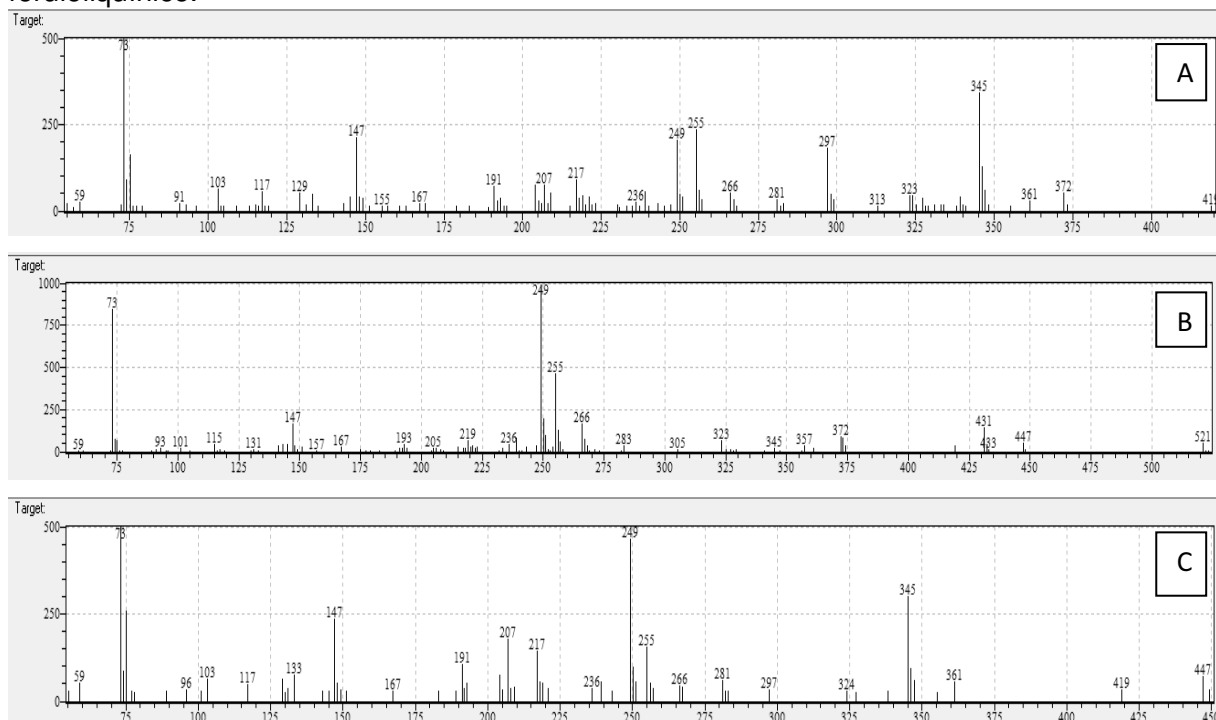


Na figura 45 são apresentados os espectros de massa dos isômeros de posição do ácido cafeoilquínico. A identificação destes metabólitos baseia-se principalmente na presença dos íons característicos da fragmentação em  $m/z$  345 e  $m/z$  307 (Figura 46), resíduos respectivamente da fragmentação do ácido quínico e do grupamento cafeoil. Os isômeros puderam ser diferenciados de acordo com a abundância relativa (%) destes íons, como mostrado na Tabela 4. Outro dado utilizado para a confirmação foi o índice de retenção calculado que está relativamente próximo ao valor encontrado na literatura. (Fuchs et. al 1996)

**Figura 46.** Íons característicos da fragmentação do ácido cafeoilquínico.**Tabela 4.** Abundância relativa (%) dos íons  $m/z$  345 e  $m/z$  307 para os isômeros de posição do ácido cafeoilquínico trimetilsililado.

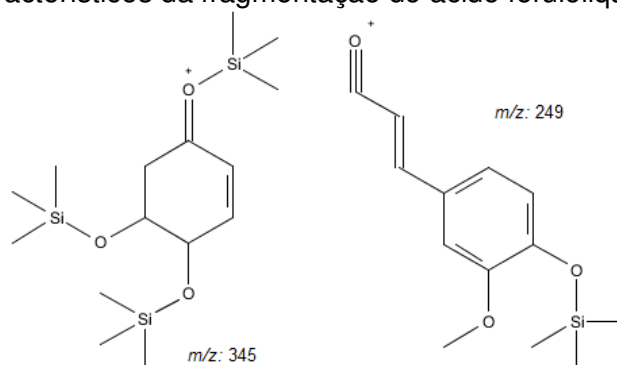
Isômero	$m/z$ 345	$m/z$ 307
Ácido 3-cafeoilquínico	95	100
Ácido 4-cafeoilquínico	2	100
Ácido 5-cafeoilquínico	100	42

Na Figura 47 são apresentados os espectros de massa para os isômeros de posição do ácido feruloilquínico, que segue a mesma ordem de eluição que os isômeros do ácido cafeoilquínico.

**Figura 47.** Espectros de massa obtidos para os isômeros de posição do ácido feruloilquínico. A: ácido 5-feruloilquínico; B: ácido 4-feruloilquínico; C: ácido 3-feruloilquínico.

Neste caso os íons característicos da fragmentação são  $m/z$  345 (referente ao grupamento do ácido quínico) e  $m/z$  249 referente ao grupamento feruloil (Figura 48). A diferenciação entre os isômeros também baseia-se na abundância relativa (%) entre os íons, e esta porcentagem segue o mesmo padrão observado para os isômeros do cafeoilquínico.

**Figura 48.** Íons característicos da fragmentação do ácido feruloilquínico.



A identificação das séries de isômeros dos ácidos clorogênicos por CG-EM foi possível devido a derivação das substâncias e demonstra que mesmo substâncias polares e de peso molecular mais elevado podem ser analisados por cromatografia gasosa, técnica mais robusta e reprodutível que a CLAE-DAD-EM.

## 6. Conclusões

O estudo do extrato hidroalcoólico das folhas de cana-de-açúcar demonstrou a grande complexidade da matriz metabólica desta espécie. Sendo assim o fracionamento do extrato foi importante para possibilitar a identificação dos metabólitos em misturas, sem a necessidade de isolamento e elucidação estrutural por técnicas *off line* de substâncias já conhecidas.

O tratamento inicial do extrato e das frações obtidas por CLAE-DAD e análises por RMN possibilitaram uma visão geral da composição e das classes de substâncias presentes em cada fração, facilitando as etapas de identificação posteriores.

A análises por CLAE-DAD-EM e CLAE-EM/EM possibilitaram a identificação de duas séries de isômeros de posição de ácidos clorogênicos (ácido 3-cafeoilquínico, ácido 4-cafeoilquínico e ácido 5-cafeoilquínico; ácido 3-feruloilquínico, ácido 4-feruloilquínico e ácido 5-feruloilquínico), substâncias inéditas em extratos de folhas de cana-de-açúcar e também de cinco flavonóides glicosilados (orientina, vitexina, diosmetina-8-C-glicosídeo, tricina 4'-O-(eritro ou treo)-guaiacilgliceril éter-7-O-glucopiranosídeo e swertisina). Estas técnicas se mostraram uma eficiente ferramenta na identificação de substâncias em misturas e os experimentos de EM<sup>2</sup> e EPI (espectro de íons produto) foram de grande importância para a confirmação destas identificações.

Os experimentos por CG-EM resultaram na identificação de 61 metabólitos presentes nas frações analisadas, sendo principalmente: aminoácidos, ácidos orgânicos, álcoois de açúcar, açúcares e ácidos clorogênicos. A derivação das amostras possibilitou a volatilização e estabilidade destes metabólitos polares. A identificação deste grande número de substâncias foi possível devido a comparação dos espectros de massas com as bibliotecas de dados (NIST e WILEY) e dos índices de retenção calculados com os encontrados na literatura.

Sendo assim, pode-se concluir que as análises por CG-EM se mostraram mais eficientes para análises metabólicas dos extratos e das frações estudadas, uma vez que possibilitaram a identificação de um número elevado

de substâncias (61 metabólitos) com maior facilidade e em uma única análise (apesar da necessidade das reações de derivação).

As análises por CLAE-EM não foram tão representativas da composição das frações, pois um número grande de metabólitos não foram identificados. Porém, com os experimentos de espectrometria de massas sequencial foi possível a rápida confirmação da identificação de algumas classes de metabólitos, sendo essa uma técnica mais eficiente no monitoramento de substâncias de interesse, possibilitando a identificação e acompanhamento dos metabólitos através de análises por infusão direta do extrato (sem a necessidade de derivação das amostras).

Desta forma, durante a realização deste projeto de mestrado foi possível a aplicação e aprendizado de várias técnicas separação e identificação de metabólitos (primários e secundários) e a melhor diferenciação entre as aplicações de cada técnica utilizada (CG-EM e CLAE-EM).

Este trabalho vem contribuir para os estudos metabômicos iniciais de cana-de-açúcar e auxiliar nos que virão a seguir, como experimentos de cultivo, identificação de marcadores responsáveis por mudanças metabólicas em situações de estresse, entre outros.

## REFERÊNCIAS

ALLWOOD, J. W.; ELLIS, D. I.; GOODACRE, R. Metabolomic technologies and their application to the study of plants and plant-host interactions. **Physiol Plant**, v. 132, p. 117-135, 2008.

ARDREY, R. E. **Liquid chromatography-mass spectrometry: an introduction**. London: John Wiley & Sons, 2003.

AVERY, J.; HAWORTH, W. N.; HIRST, E. L. The constitution of the disaccharides. Part XV. Sucrose. **Journal of the Chemical Society**, p. 2308-2318, 1927. DOI: 10.1039/JR270002308.

BABUSHOK, V. I.; ZENKEVICH, I. G. Retention indices for most frequently reported essential oil compounds in GC. **Chromatographia**, v. 69, p. 257-269, 2009.

BALAKUMAR, T.; HANI, V.; VINCENT, B.; PALIWAL, K. On the interaction of UV-B radiation (280-315 nm) with water stress in crop plants. **Physiologia Plantarum**, v. 87, p. 217-222, 1993.

BARTLE, K. D.; MYERS, P. History of gas chromatography. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 21, n. 9/10, p. 547-557, 2002.

BRINKER, A. M.; SEIGLER, D. S. Isolation and identification of piceatannol as a phytoalexin from sugar cane. **Phytochemistry**, v. 30, p. 3229-3232, 1991.

BRYCE, T. A.; MARTIN-SMITH, M.; OSSKE, G.; SCHREIBER, K.; SUBRAMANIAN, G. Sterols and triterpenoids - XI. Isolation of arundoin and sawamilletin from Cuban sugar cane wax. **Tetrahedron**, v. 23, p. 1283-1296, 1967.

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

CASU, R. E.; DIMMOCK, C. M.; CHAPMAN, S. C.; GROF, C. P. L.; McINTYRE, C. L.; BONNETT, G. D.; MANNERS, J. M. Identification of differentially expressed transcripts from maturing stem of sugarcane by in silico analysis of stem expressed sequence tags and gene expression profiling. **Plant Molecular Biology**, v. 54, p. 503-517, 2004.

CHALKER-SCOTT, L.; FUCHIGAMI, L. H. The role of phenolic compounds in plant stress responses. In: LI, P. H. (Ed.). **Low temperature stress physiology in crops**. Boca Raton: CRC Press, 1989. p. 67-79.

CHIARADIA, C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, v. 31, p. 623-636, 2008.

- CIOLA, R. **Fundamentos da cromatografia a gás**. São Paulo: Edgard Blücher, 1985.
- CLIFFORD, M. N.; JOHNSTON, K. L.; KNIGHT, S.; KUHNERT, N. Hierarchical scheme for LC-MS<sup>n</sup> identification of chlorogenic acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 2900-2911, 2003.
- CLOSE, D. C.; McARTHUR, C. Rethinking the role of many plant phenolics: protection from photodamage not herbivores? **Oikos**, v. 99, p. 166-72, 2002.
- COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Introdução a métodos cromatográficos**. 7. ed. Campinas: Ed. UNICAMP, 1997.
- COLMER, T. D.; CORRADINI, F.; CAWTHRAY, G. R.; MARINUS, O. L. Analysis of dimethylsulphoniopropionate (DMSP), betaines and other organic solutes in plant tissue extracts using HPLC. **Phytochemical Analysis**, v. 11, p. 163-168, 2000.
- COLOMBO, R.; YARIWAKE, J. H.; McCULLAGH, M. Study of C- and O-glycosylflavones in sugarcane extracts using liquid chromatography-exact mass measurement mass spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, p. 483-490, 2008.
- COLOMBO, R.; YARIWAKE, J. H.; QUEIROZ, E. F.; NDJOKO, K.; HOSTETTMANN, K. On-line identification of sugarcane (*Sacharum officinarum* L.) methoxyflavones by liquid-chromatography-UV detection postcolumn derivatization and liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1082, p. 51-59, 2005.
- COLOMBO, R.; YARIWAKE, J. H.; QUEIROZ, E. F.; NDJOKO, K.; HOSTETTMANN, K. On-line identification of further flavone C- and O-glycosides from sugarcane (*Saccharum officinarum* L., Gramineae) by HPLC-UV-MS. **Phytochemical Analysis**, v. 17, p. 337-343, 2006.
- COLOMBO, R.; YARIWAKE, H. H.; QUEIROZ, E. F.; NDJOKO, K.; HOSTETTMANN, K. On-line identification of minor flavones from sugarcane juice by LC/UV/MS and post-column derivatization. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, p. 1574-1579, 2009.
- DESHMANE, S. S.; DEV, S. Higher isoprenoids-II: triterpenoids and steroids of *Saccharum officinarum* L. **Tetrahedron**, v. 27, p. 1109-1118, 1971.
- DINIZ, E. R. **Uso da técnica de espectrometria de massas com ionização eletrospray (ESI-MS) para o estudo do mecanismo de reações orgânicas e avaliação do perfil de fragmentação de bis-hidroxiiminas aromáticas**. 2011. 93 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica)- Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.
- DIXON, R. A.; PAIVA, N. L. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. **Plant Cell**, v. 7, p. 1085-1097, 1995.

DIXON, R. A.; GANG, D. R.; CHARLTON, A. J.; FIEHN, O.; KUIPER, H. A.; REYNOLDS, T. L.; TJEERDEMA, R. S.; JEFFERY, E. H.; GERMAN, J. B.; RIDLEY, W. P.; SEIBER, J. N. Applications of metabolomics in agriculture. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 8984-8994, 2006.

DUARTE-ALMEIDA, J. M.; NEGRI, G.; SALATINO, A. Antiproliferative and antioxidant activities of a tricin acylated glycoside from sugarcane (*Saccharum officinarum*) juice. **Phytochemistry**, v. 68, p. 1165-1171, 2007.

DUARTE-ALMEIDA, J. M.; VIDAL NOVOA, A.; LINARES, A. F.; LAJOLO F. M.; GENOVESE, M. I. Antioxidant activity of phenolic compounds from sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) juice. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 61, p. 187-192, 2006.

FANG, K.; PAN, X. J.; HUANG, B.; LIU, J. L.; WANG, Y.; GAO, J. P. Progress on keto groups derivatization of steroid hormones in gas chromatography-mass spectrometry analysis. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v. 38, p. 743-751, 2010.

FONTANIELLA, B.; VICENTE, C.; LEGAZ, M. E.; DE ARMAS, R.; RODRÍGUEZ, C. W.; MARTÍNEZ, M.; PIÑÓN, D.; ACEVEDO, R.; SOLAS, M. T. Yellow leaf syndrome modifies the composition of sugarcane juices in polysaccharides, phenols and polyamines. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 41, p. 1027-1036, 2003.

FOOT, J. P.; CAPORN, S. J. M.; LEE, J. A.; ASHENDEN, T. W. The effect of long-term ozone fumigation on the growth, physiology and frost sensitivity of *Calluna vulgaris*. **New Phytologist**, v. 133, p. 503-511, 1996.

FUCHS, C.; SPITELLER, G. Rapid and easy identification of isomers of coumaroyl- and caffeoyl-D-quinic acid by gas chromatography/mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 31, p. 602-608, 1996.

GAO, X.; WILLIAMS, S. J.; WOODMAN, O. L.; MARRIOTT, P. J. Comprehensive two-dimensional gas chromatography, retention indices and time-of-flight mass spectra of flavonoids and chalcones. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 8317-8326, 2010.

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

GLASSOP, D.; ROESSNER, U.; BACIC, A.; BONNETT, G. D. Changes in the sugarcane metabolome with stem development. Are they related to sucrose accumulation? **Plant and Cell Physiology**, v. 48, p. 573-584, 2007.

GLASSOP, D.; RYAN, L. P.; BONNETT, G. D.; RAE, A. L. The complement of soluble sugars in the *Saccharum* complex. **Biological Sciences**, v. 3, p. 110-122, 2010.

GOBBO NETO, L. **Emprego de técnicas hifenadas na identificação de metabólitos secundários de *Lychnophora ercoides* Mart. (Asteraceae) e determinação de suas variações populacionais e temporais.** 2007. 254 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) -Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

GOLM METOLOME DATABASE. **Spectrum library search & prediction of functional groups.** Disponível em: <<http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/analysisinput.aspx>>. Acesso em: 18 jun. 2012.

GÓMEZ, M. J.; MARTÍNEZ BUENO, M. J.; AGUERA, A.; HERNANDO, M. D.; FERNANDÉZ-ALBA, A. R.; MEZCUA, M. Evaluation of ozone-based treatment processes for wastewater containing microcontaminants using LC-QTRAP-MS and LC-TOF/MS. **Water Science and Technology**, v. 57, p. 41-48, 2008.

GONZÁLEZ, S.; PETROVIC, M.; BARCELÓ, D. Advanced liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS) methods applied to wastewater removal and the fate of surfactants in the environment. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, p. 116-124, 2007.

GULLBERG, J.; MORITZ, T.; SJÖSTRÖM, M.; NORDSTRÖM, A.; JONSSON, P. Design of experiments: an efficient strategy to identify factors influencing extraction and derivatization of *Arabidopsis thaliana* samples in metabolomic studies with gas chromatography/mass spectrometry. **Analytical Biochemistry**, v. 331, p. 283-295, 2004.

HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v. 55, p. 481-504, 2000.

HARRIGAN, G. G.; GOODACRE, R. **Metabolic profiling**: its role in biomarker discovery and gene function analysis. London: Kluwer, 2003.

HARTT, C. E. Some effects of potassium upon the growth of sugar cana and upon the absorption and migration of ash constituents. **Plant Physiology**, v. 9, p. 399-490, 1934.

ISIDOROV, V. A.; SZCZEPANIAK, L. Gas chromatography retention indices of biologically and environmentally important organic compounds on capillary columns with low-polar stationary phases. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 8998-9007, 2009.

KOSHIOKA, M.; PHAARIS, R. P.; MOORE, P. H. Identification of gibberellins A<sub>4</sub> and A<sub>36</sub> in sugarcane apices by gas chromatography-selected ion monitoring. **Plant Physiol**, v. 48, p. 2395-2396, 1984.

KROL, M.; GRAY, G. R.; HURRY, V. M.; O'QUIST, G.; MALEK, L.; HUNER, N. P. A. Low-temperature stress and photoperiod affect an increased tolerance to photoinhibition in *Pinus banksiana* seedlings. **Canadian Journal of Botany**, v. 73, p. 1119-1127, 1995.

KUMAR, N.; NARAYANASWAMY, R. Studies of amino acids in redrot disease infected sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) by HPLC. **Asian Journal of Chemistry**, v. 18, p.1512-1514, 2006.

LANÇAS, F. M. **Cromatografia em fase gasosa**. Sao Carlos: Acta, 1993.

LEAL, E. R.; RODRÍGUEZ-VÁSQUEZ, R.; GALINDO, T. Separation of phenolic compounds from sugarcane bagasse pith and their determination by HPLC. **Journal of Wood Chemistry and Technology**, v. 14, p. 369-382, 1994.

LEME, G. M. **Desenvolvimento de método analítico para estudo metabolômico de cana-de-açúcar**. 2011. 124 f. Dissertação (Mestrado em Química) -Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2011.

LORETI, E.; ALPI, A.; PERATA, P. Glucose and disaccharide-sensing mechanisms modulate the expression of alpha-amylase in barley embryos. **Plant Physiology**, v. 123, p. 939-948, 2000.

MENDEZ, M.; JONES, D. G.; MANETAS, Y. Enhanced UV-B radiation under field conditions increases anthocyanin and reduces the risk of photoinhibition but does not affect growth in the carnivorous plant *Pinguicula vulgaris*. **New Phytologist**, v. 144, p. 275-82, 1999.

MILLÁN, S.; SAMPEDRO, M. C.; UNCETA, N.; GOICOLEA, A.; BARRIO, R. J. Simple and rapid determination of biogenic amines in wine by liquid chromatography–electrospray ionization ion trap mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 584, p. 145-152, 2007.

NAKASONE, Y.; TANAKARA, K.; WADA, K.; TANAKA, J.; YOGI, S. Antioxidative compounds isolated from *Kokuto*, non-centrifuged cane sugar. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 60, p. 1714-1716, 1996.

NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY. **Livro de química na web**. Disponível em: <<http://webbook.nist.gov/chemistry/>>. Acesso em: 18 jun. 2012.

PACÍFICO, M.; NAPOLITANO, A.; MASULLO, M.; HILARIO, F.; VILEGAS, W.; PIACENTE, S.; SANTOS, L. C. Metabolite fingerprint of “capim dourado” (*Syngonanthus nitens*), a basis of Brazilian handicrafts. **Industrial Crops and Products**, v. 33, p. 488-196, 2011.

PEREIRA, J. R.; FERREIRA, G. B.; GONDIM, T. M. S.; SANTOS, J. W.; VALE, D. G. Adubação orgânica com torta de filtro de cana-de-açúcar no algodoeiro semiperene BRS. 200 no Cariri Cearense. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ALGODÃO, 5., 2005, Salvador. **Anais...** Campina Grande: EMBRAPA Algodão, 2005.

POWELL, R. G.; TEPASKE, M. R.; PLATTNER, R. D.; WHITE, J. F.; CLEMENT, S. L. Isolation of resveratrol from *Festuca versuta* and evidence for the widespread occurrence of this stilbene in the Poaceae. **Phytochemistry**, v. 35, p. 335-338, 1994.

RAAMSDONK, L. M.; TEUSINK, B.; BROADHURST, D.; ZHANG, N. S.; HAYES, A.; WALSH, M. C.; BERDEN, J. A.; BRINDLE, K. M.; KELL, D. B.; ROWLAND, J. J.; WESTERHOFF, H. V.; VAN DAM, K.; OLIVER, S. G. A functional genomics strategy that uses metabolome data to reveal the phenotype of silent mutations. **Nature Biotechnology**, v. 19, p. 45-50, 2001.

RAJENDRAN, L.; RAVISHANKAR, G. A.; VENKATARAMAN, L. V.; PRATHIBA, K. R. Anthocyanin production in callus cultures of *Daucus carota* as influence by nutrient stress and osmoticum. **Biotechnolgy Letters**, v. 14, p. 707, 1992.

RODRÍGUEZ, C. W.; DE ARMAS, R.; VICENTE, C.; LEGAZ, M. R. Changes in free and conjugated polyamines during starvation of sugarcane juices as analyzed by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 881, p. 531-541, 2000.

ROESSNER, U.; WAGNER, C.; KOPTA, J.; TRETHERWEY, R. N.; WILLMITZER, L. Simultaneous analysis of metabolites in potato tuber by gas chromatography-mass spectrometry. **The Plant Journal**, v.23, p. 131-142, 2000.

ROESSNER, U.; LUEDEMANN, A.; BRUST, D.; FIEHN, O.; LINKE, T.; WILLMITZER, L.; FERNIE, A. R. Metabolic profiling allows comprehensive phenotyping of genetically or environmentally modified plant systems. **The Plant Cell**, v.13, p. 11-29, 2001.

ROPENACK, E.; PARR, A.; SCHULZE-LEFERT, P. Structural analysis and dynamics of soluble cell wall bound barley phenolics and their role in a broad-spectrum resistance to the powdery mildew fungus. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p. 9013-9022, 1998.

SGHERRI, C.; STEVANOVIC, B.; NAVARI-IZZO, F. Role of phenolics in the antioxidative status of the resurrection plant *Ramonda serbica* during dehydration and rehydration. **Physiologia Plantarum**, v. 122, p. 478-488, 2004.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J. **Fundamentos de química analítica**. Rio de Janeiro: Cengage Learning, 2006.

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

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. 3rd ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2002.

TAKARA, K.; MATSUI, D.; WADA, K.; ICHIBA, T.; NAKASONE, Y. New antioxidative phenolic glucosides isolated from *Kokuto* non-centrifuged cane sugar. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 66, p. 29-35, 2002.

TAKARA, K.; MATSUI, D.; WADA, K.; ICHIBA, T.; CHINEN, I.; NAKASONE, Y. New phenolic compounds from *Kokuto*, non-centrifuged cane sugar. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 67, p. 376-379, 2003.

TOMAZ, P. R. U. **Desenvolvimento e validação de método de análise por cromatografia gasosa para metabólitos polares de folhas de cana-de-açúcar e aplicação na avaliação da influência do teor de CO<sub>2</sub> atmosférico na composição de metabólitos polares de cana-de-açúcar**. 2011. 121 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2011.

UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR. **Setor sucroenergético: cultivo de cana hoje**. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/content/show.asp?cntCode=9E97665F-3A81-46F2-BF69-26E00C323988>>. Acesso em: 05 jun. 2012.

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P. D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 11, p. 463-471, 1963.

VÉKEY, K. Mass spectrometry and mass-selective detection in chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 921, n. 2, p. 227-236, 2001.

VILA, F. C. **Identificação dos flavonóides com atividade antioxidante da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.)**. 2006. 68 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

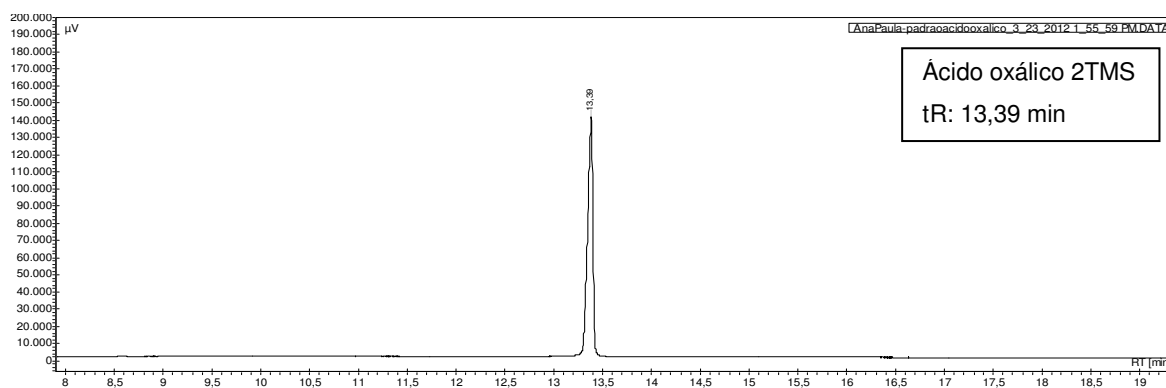
VILA, F. C.; COLOMBO, R.; LIRA, T.; YARIWAKE, J. H. HPLC microfractionation of flavones and antioxidant (radical scavenging) activity of *Saccharum officinarum* L. **Journal of the Brazilian Chemistry Society**, v. 19, p. 903-908, 2008.

WIGGINS, L. F.; WILLIAMS, J. H. Amino acid content of West Indies sugar cane. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** v. 3, p. 341-45, 1955.

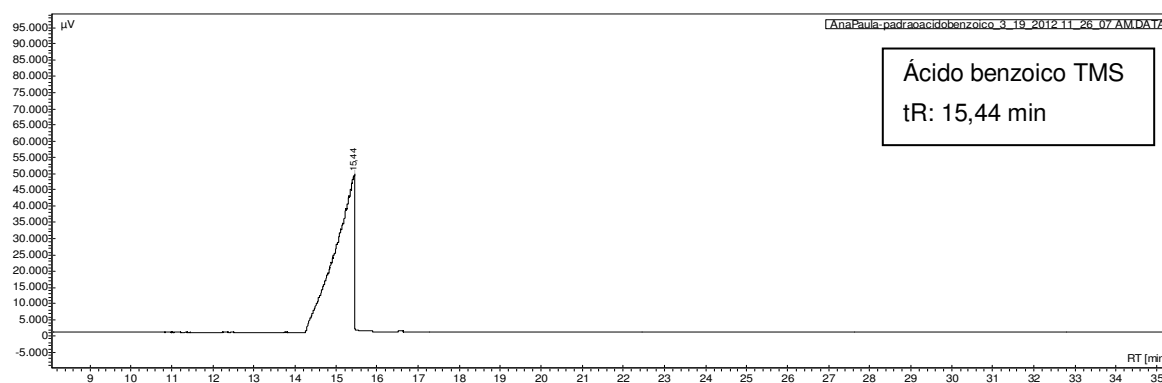
WILLIAMS, C. A.; HARBORNE, J. B.; SMITH, P. The taxonomic significance of leaf flavonoids in *Saccharum* and related genera. **Phytochemistry**, v. 13, p. 1141-1149, 1974.

WINKEL-SHIRLEY, B. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress.  
**Current Opinion in Plant Biology**, v. 5, p. 218-223, 2002.

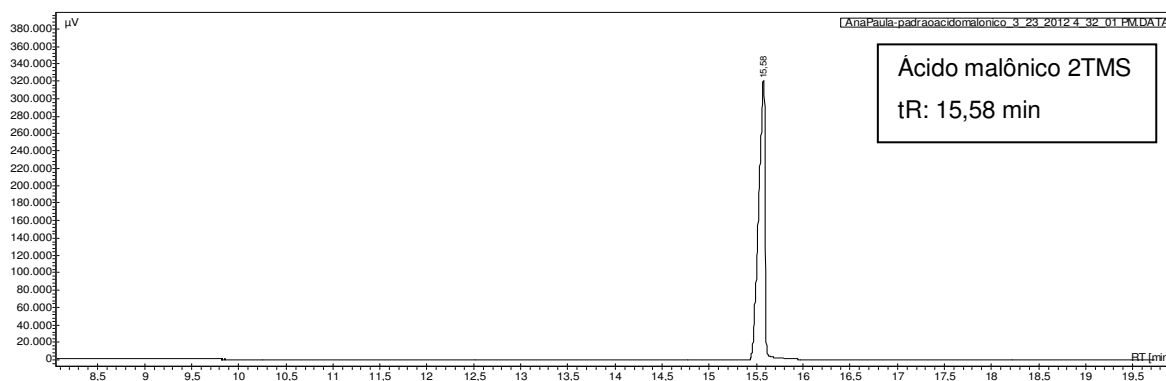
## **ANEXOS**



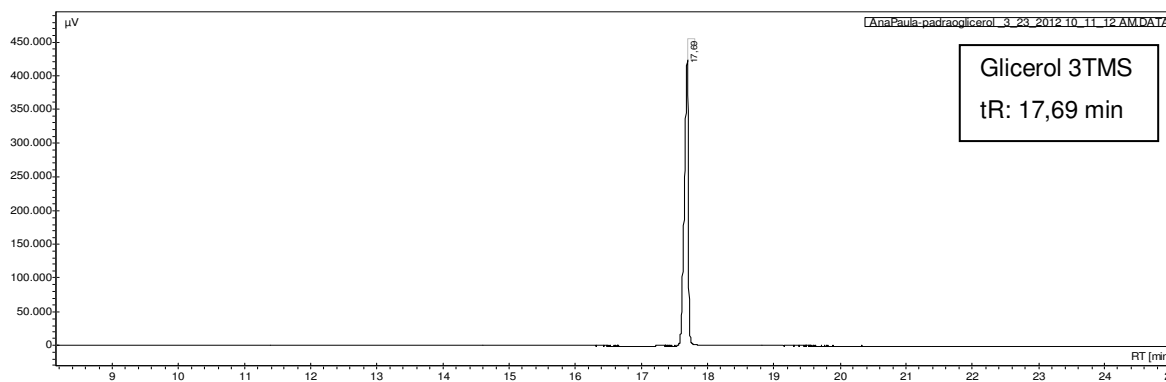
**Anexo 1.** Cromatograma do ácido oxálico 2TMS analisado por CG-DIC.



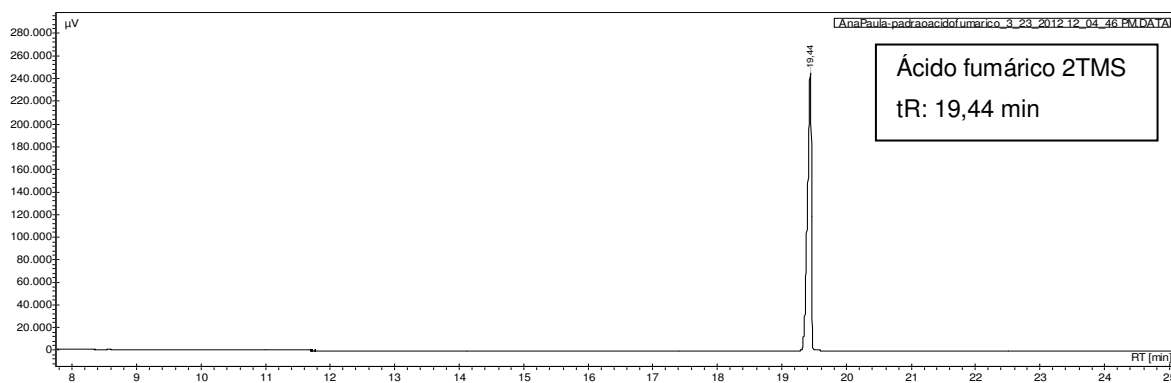
**Anexo 2.** Cromatograma do ácido benzoico TMS analisado por CG-DIC.



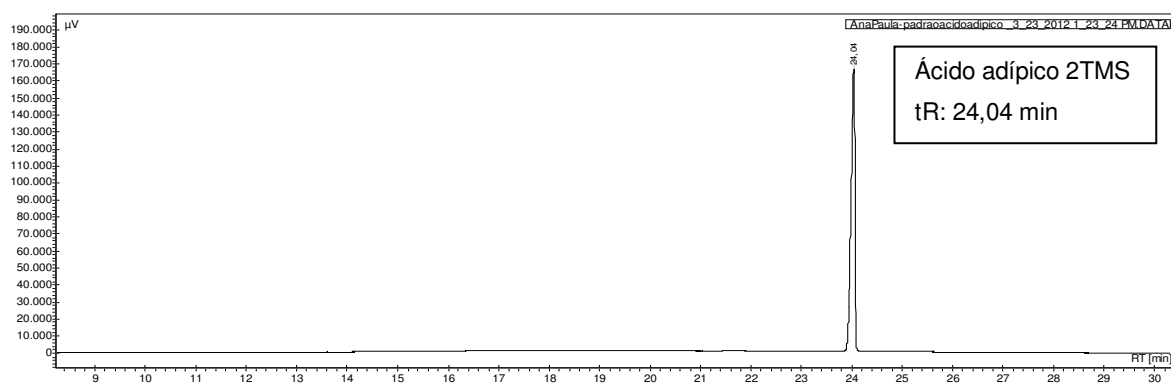
**Anexo 3.** Cromatograma do ácido malônico 2TMS analisado por CG-DIC.



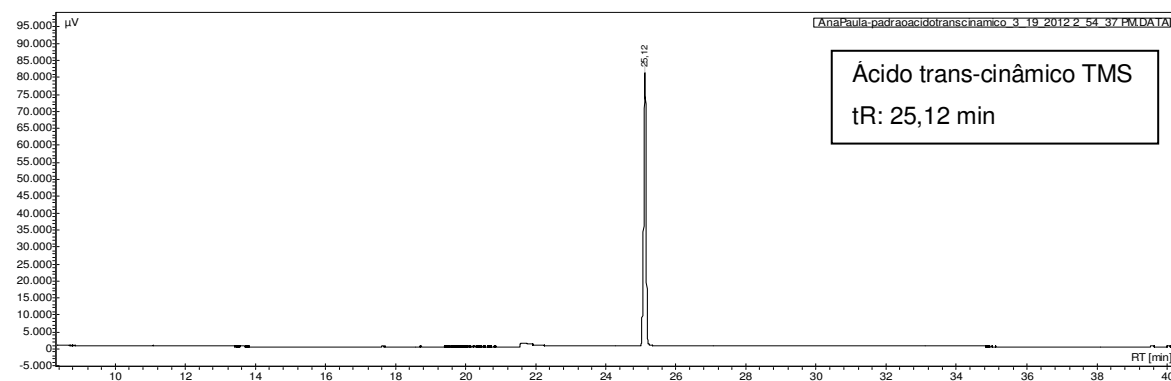
**Anexo 4.** Cromatograma do glicerol 3TMS analisado por CG-DIC.



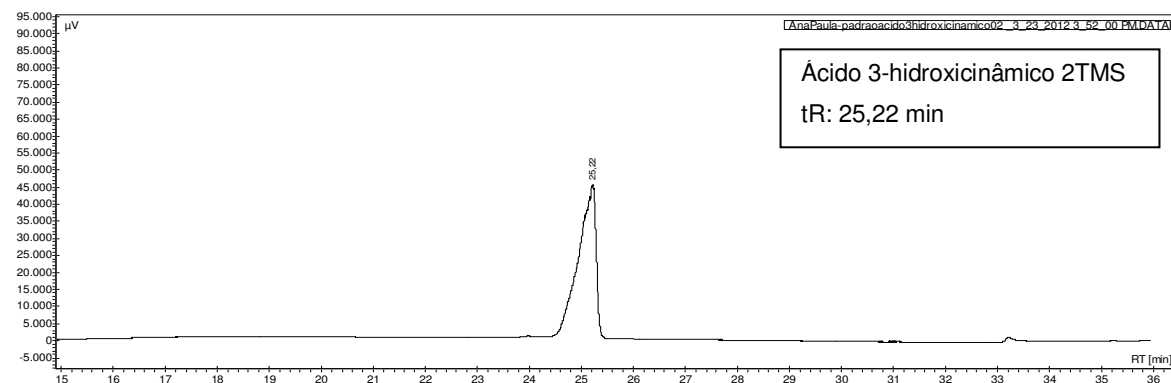
Anexo 5. Cromatograma do ácido fumárico 2TMS analisado por CG-DIC.



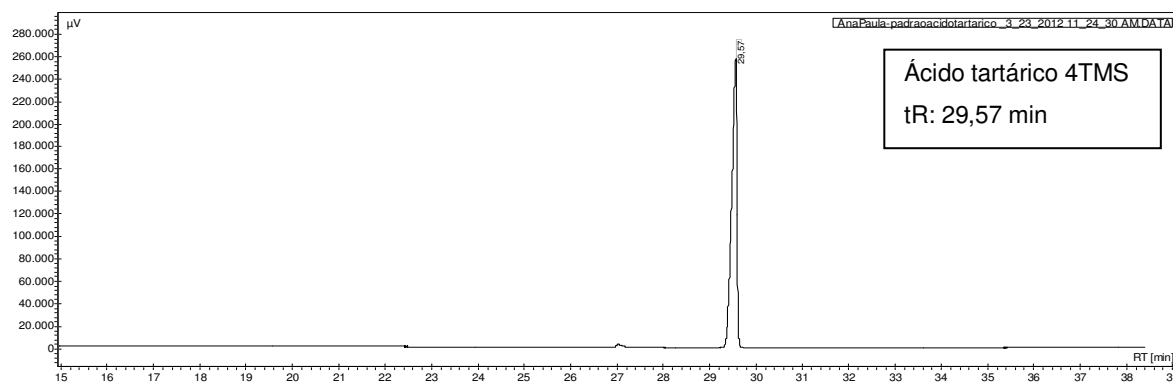
Anexo 6. Cromatograma do ácido adípico 2TMS analisado por CG-DIC.



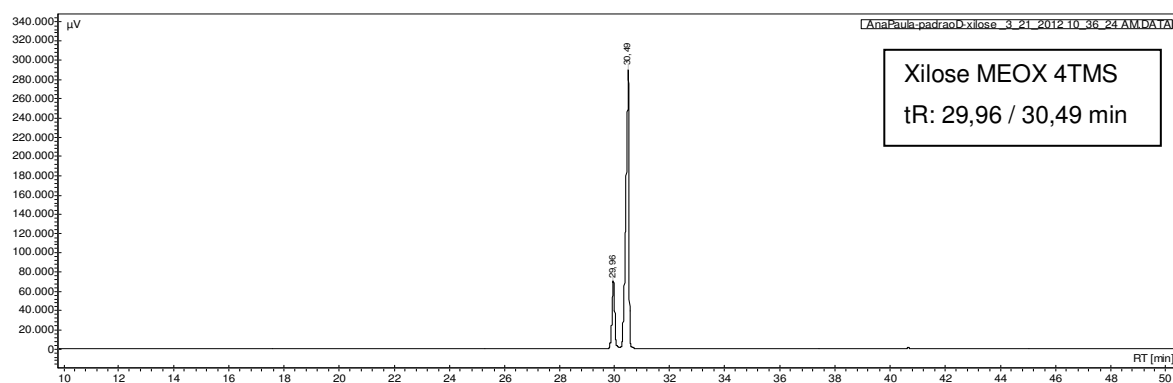
Anexo 7. Cromatograma do ácido trans-cinâmico TMS analisado por CG-DIC.



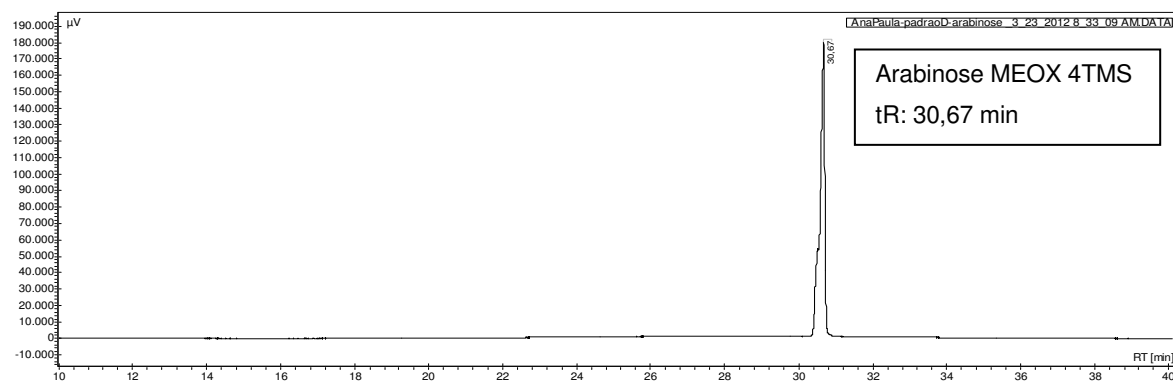
Anexo 8. Cromatograma do ácido 3-hidroxicinâmico 2TMS analisado por CG-DIC.



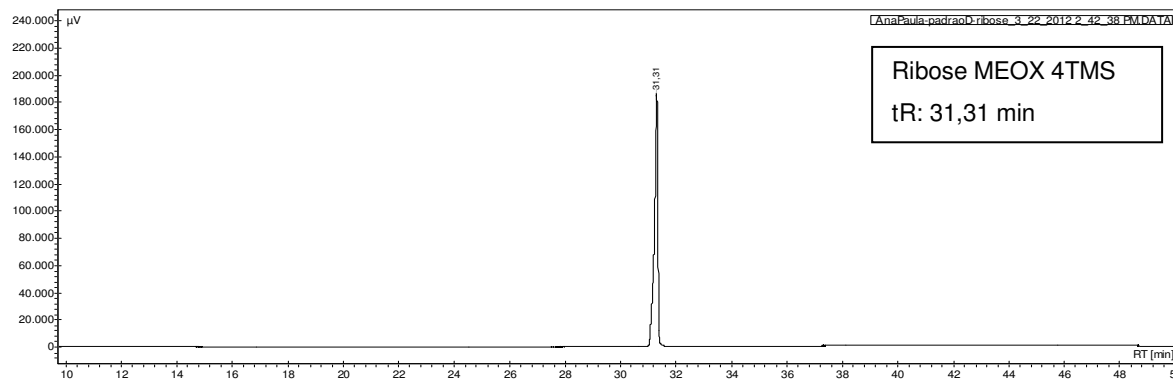
**Anexo 9.** Cromatograma do ácido tartárico 4TMS analisado por CG-DIC.



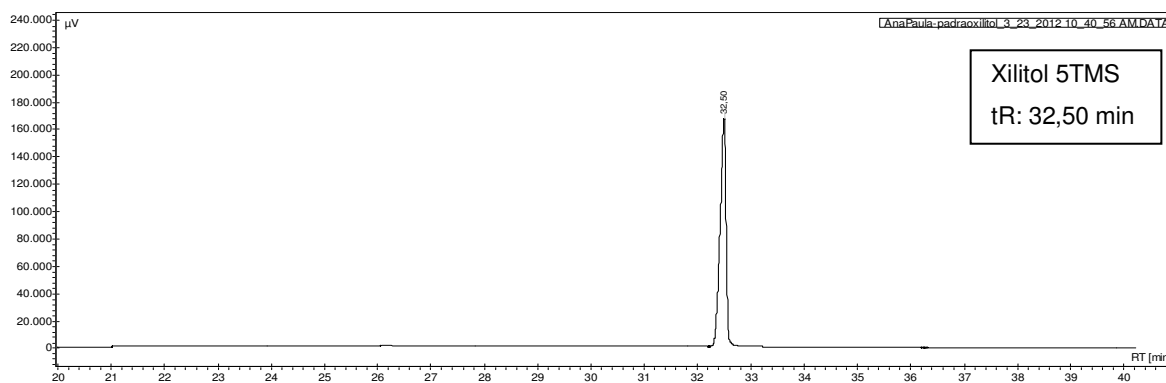
**Anexo 10.** Cromatograma da xilose MEOX 4TMS analisada por CG-DIC.



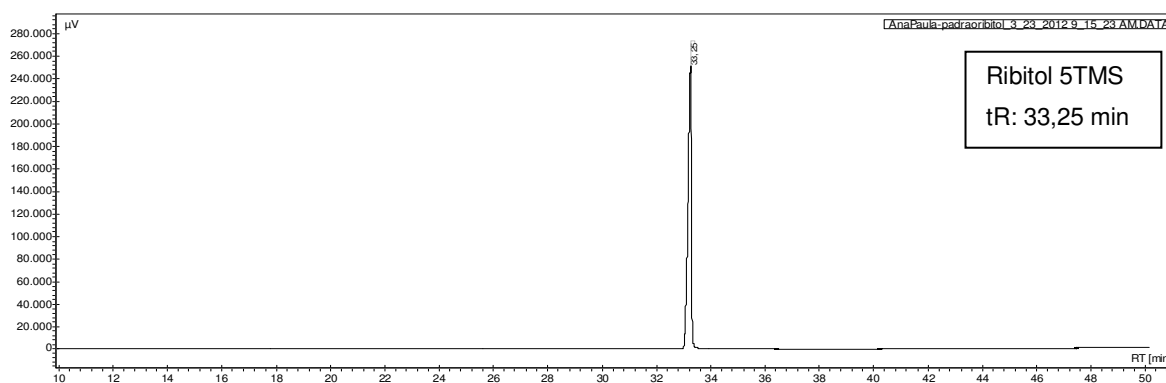
**Anexo 11.** Cromatograma da arabinose MEOX 4TMS analisada por CG-DIC.



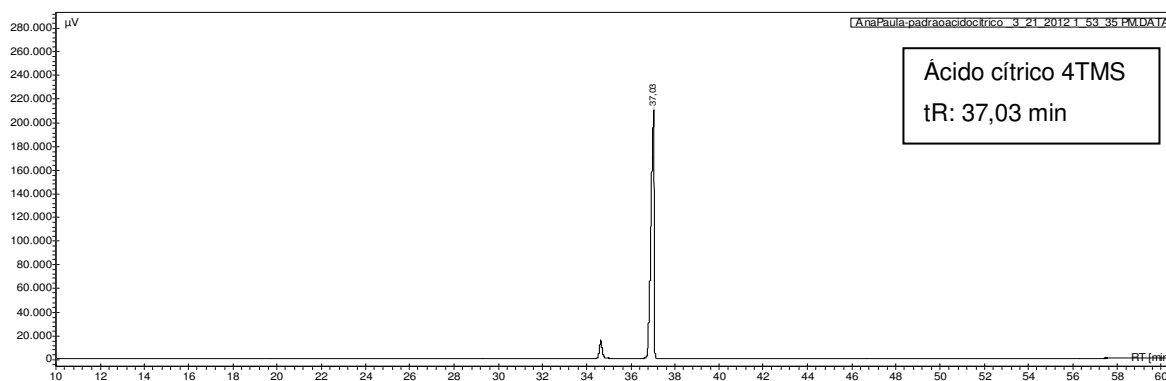
**Anexo 12.** Cromatograma da ribose MEOX 4TMS analisada por CG-DIC.



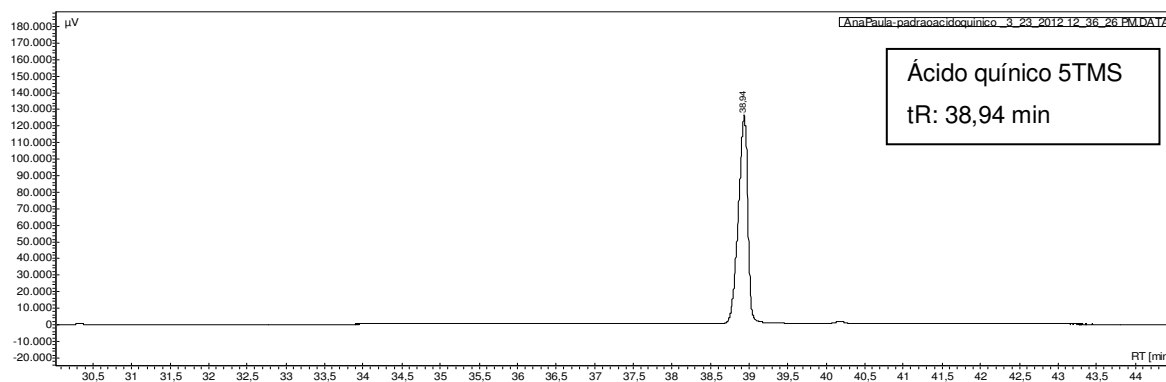
Anexo 13. Cromatograma do xilitol 5TMS analisado por CG-DIC.



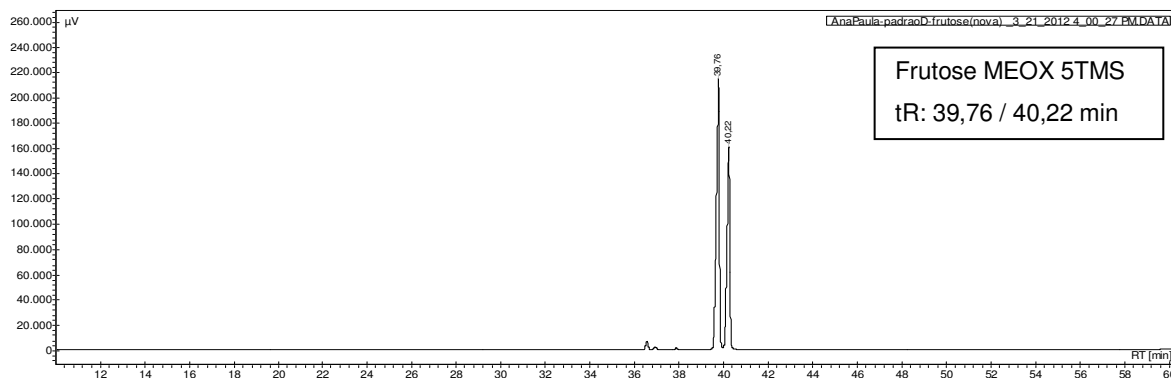
Anexo 14. Cromatograma do ribitol 5TMS analisado por CG-DIC.



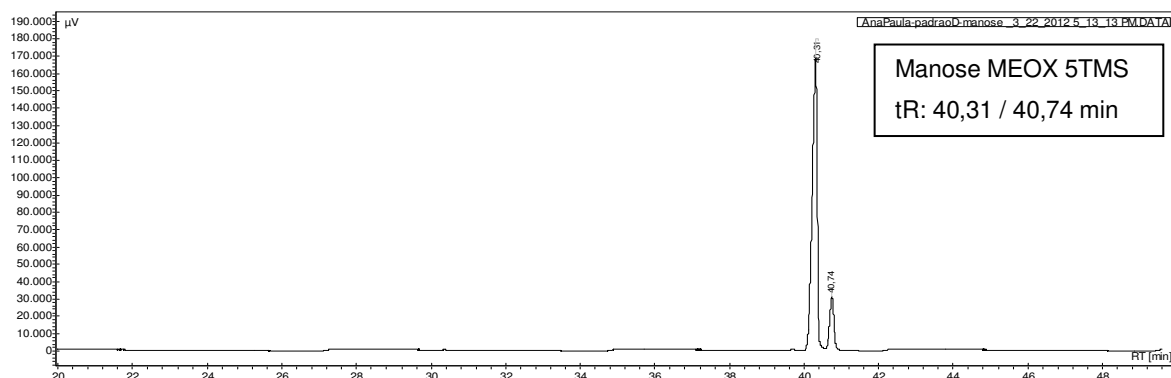
Anexo 15. Cromatograma do ácido cítrico 4TMS analisado por CG-DIC.



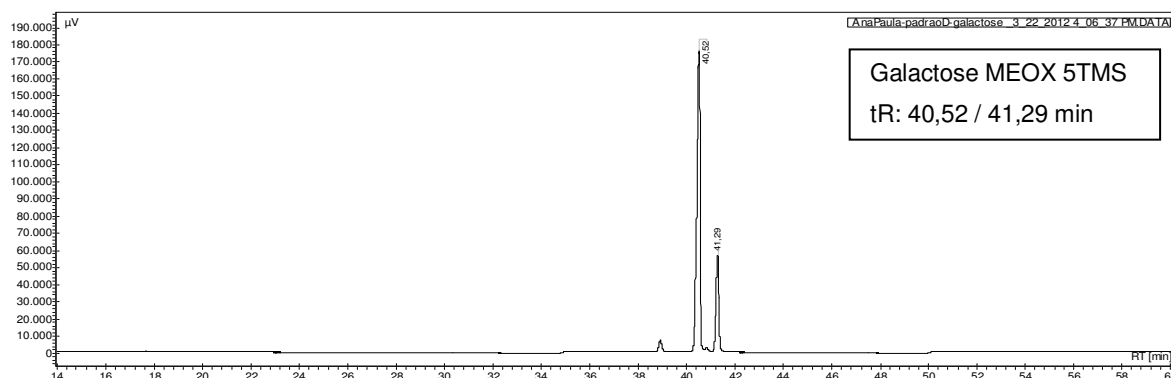
Anexo 16. Cromatograma do ácido quínico 5TMS analisado por CG-DIC.



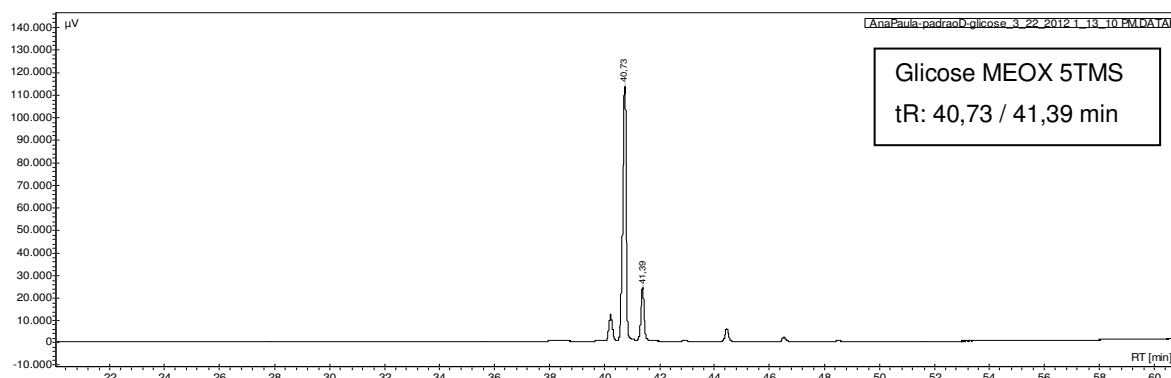
Anexo 17. Cromatograma da ácido frutose MEOX 5TMS analisada por CG-DIC.



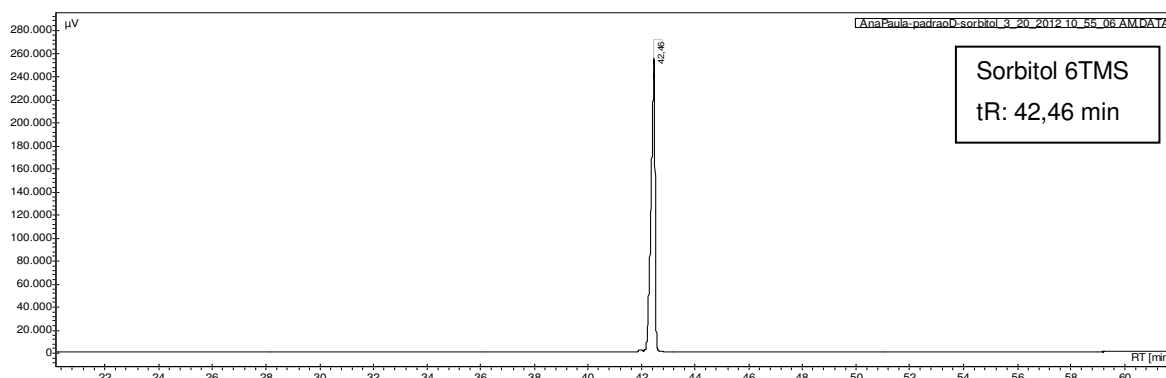
Anexo 18. Cromatograma da ácido manose MEOX 5TMS analisada por CG-DIC.



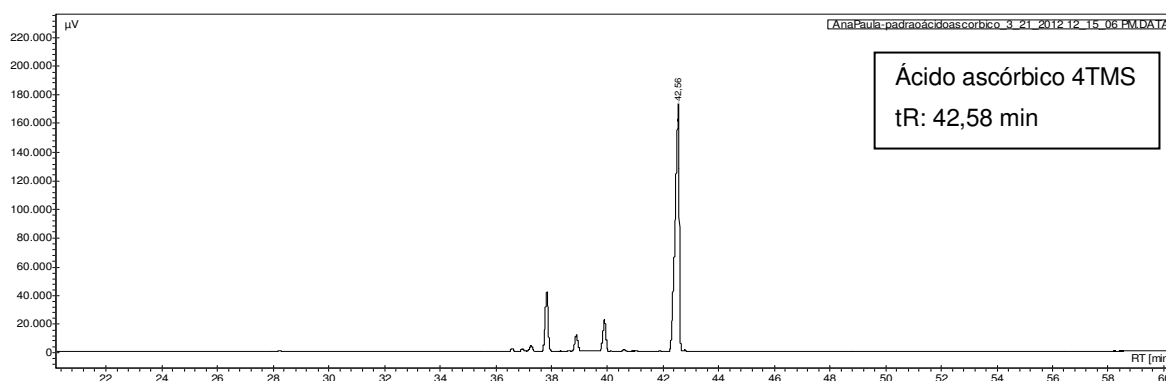
Anexo 19. Cromatograma da ácido galactose MEOX 5TMS analisada por CG-DIC.



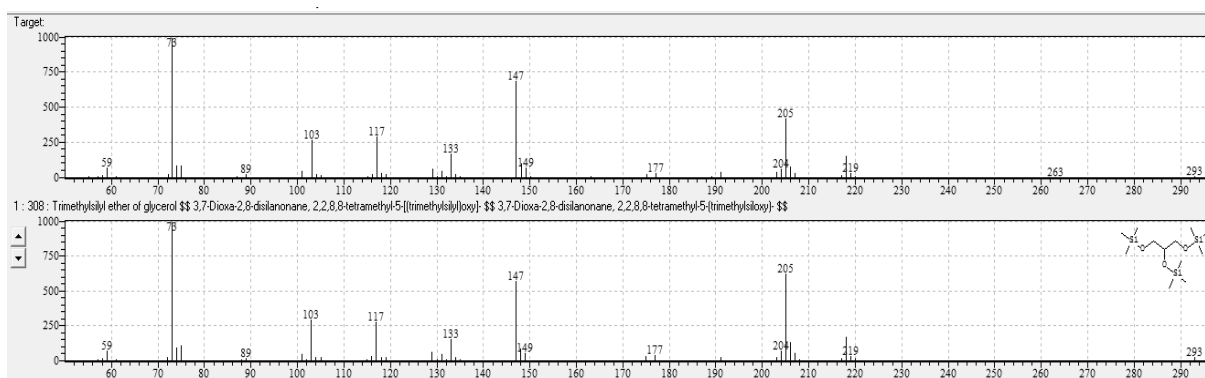
Anexo 20. Cromatograma da glicose MEOX 5TMS analisada por CG-DIC.



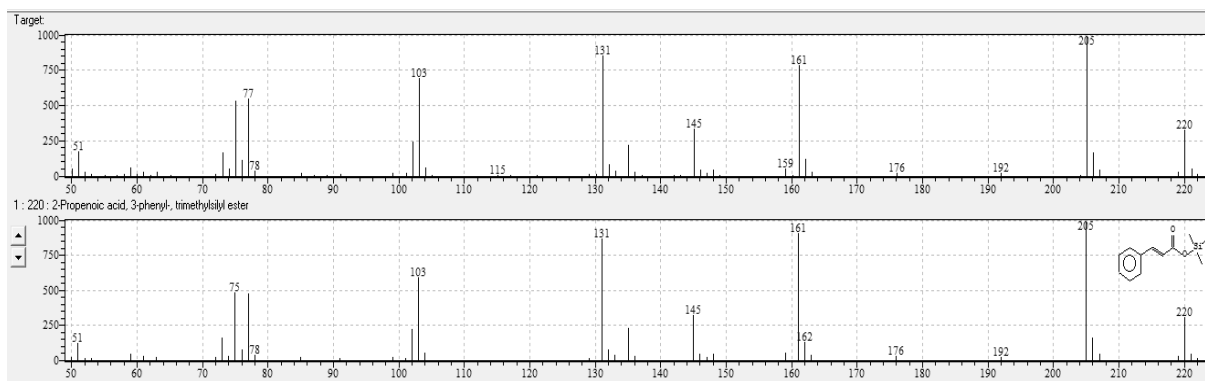
**Anexo 21.** Cromatograma do sorbitol 6TMS analisado por CG-DIC.



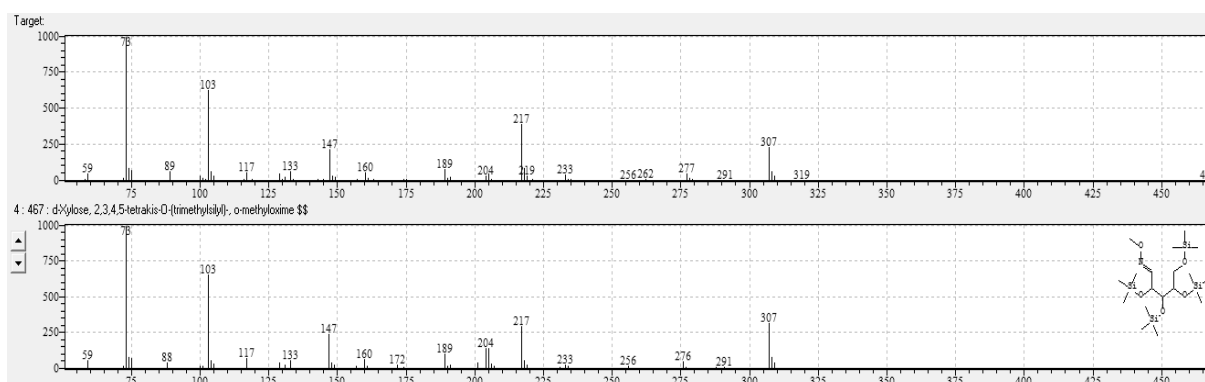
**Anexo 22.** Cromatograma do ácido ascórbico 4TMS analisado por CG-DIC.



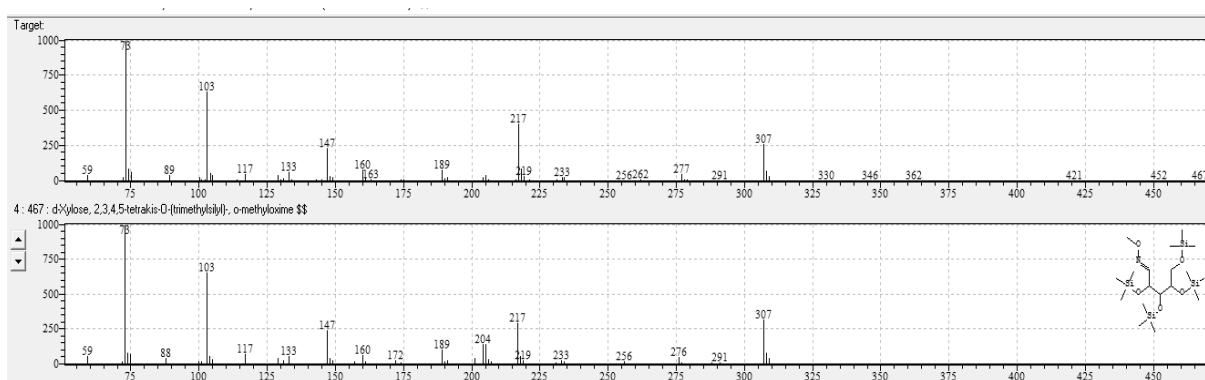
**Anexo 23.** Espectro de massas obtido por CG-EM para o glicerol 3TMS – 96% de similaridade com espectro da biblioteca de dados (tR: 16,022 min); Mistura 1.



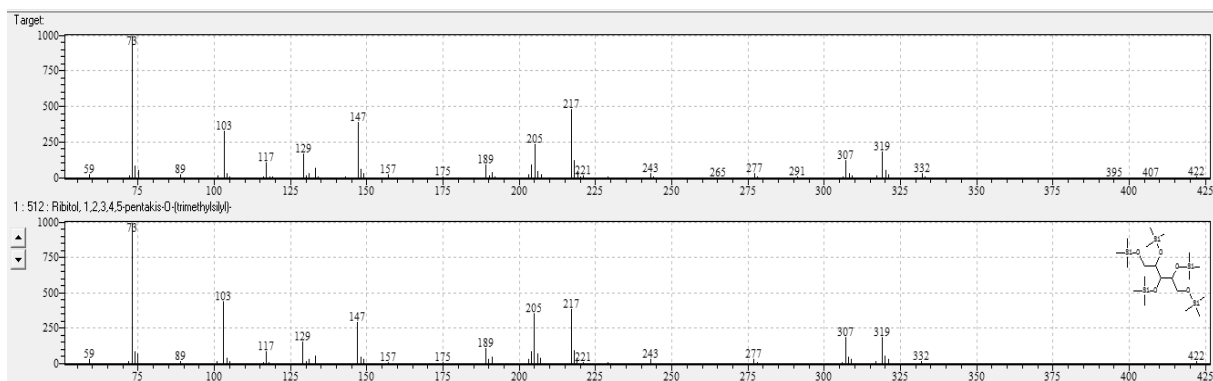
**Anexo 24.** Espectro de massas obtido por CG-EM para o ácido trans-cinâmico TMS – 97% de similaridade com espectro da biblioteca de dados (tR: 23,752 min); Mistura 1.



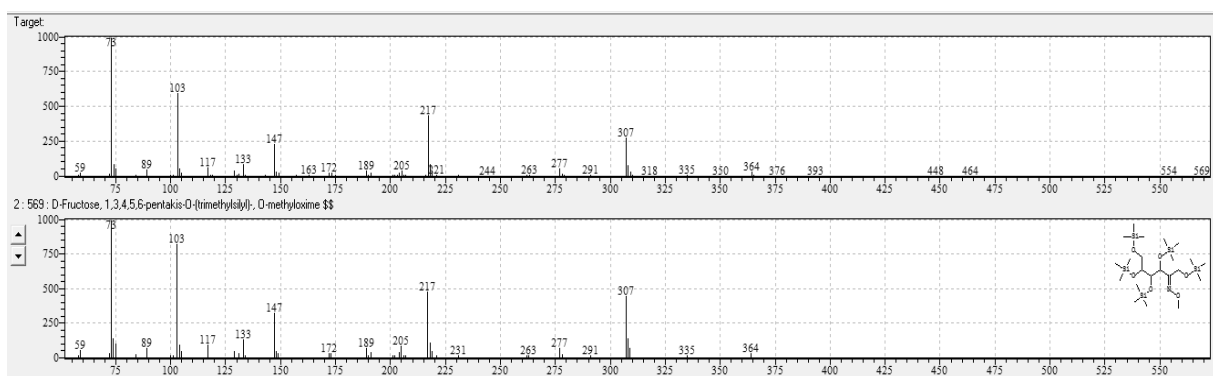
**Anexo 25.** Espectro de massas obtido por CG-EM para a xilose MEOX 4TMS (pico 1) – 90% de similaridade com espectro da biblioteca de dados (tR: 27,286 min); Mistura 1.



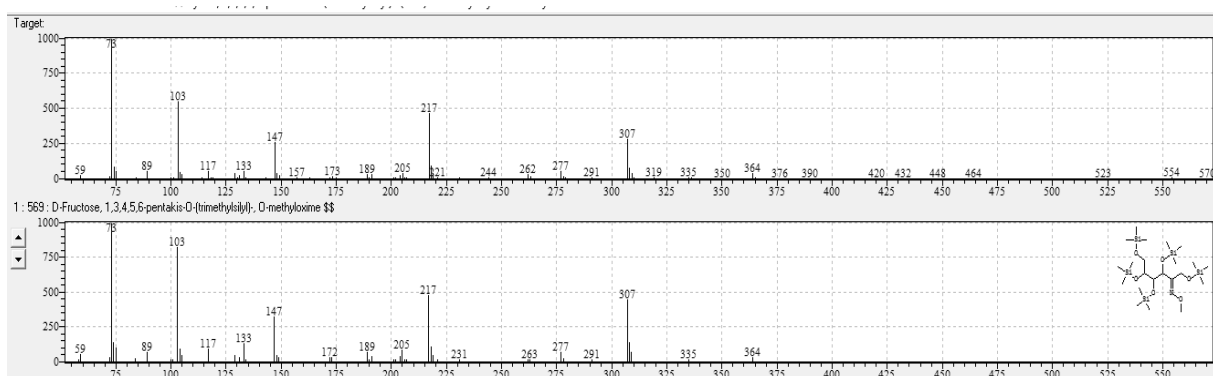
**Anexo 26.** Espectro de massas obtido por CG-EM para a xilose MEOX 4TMS (pico 2) – 91% de similaridade com espectro da biblioteca de dados (tR: 27,704 min); Mistura 1.



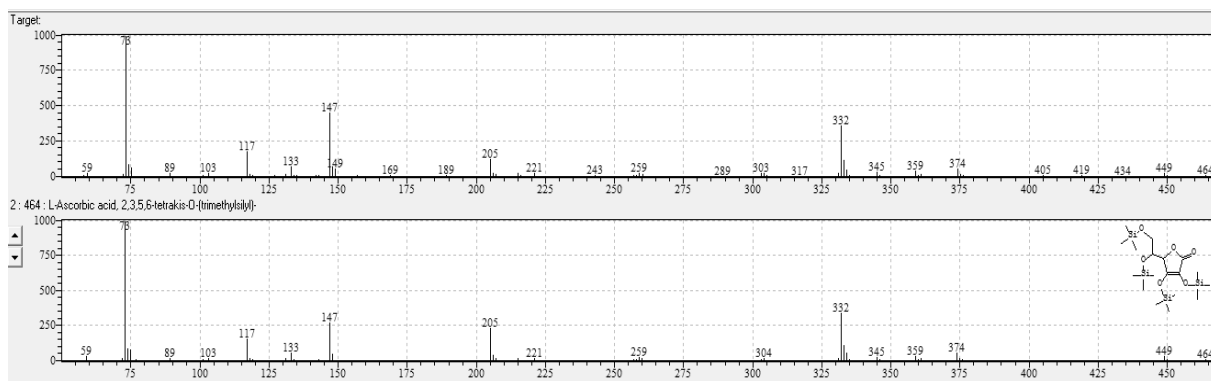
**Anexo 27.** Espectro de massas obtido por CG-EM para o ribitol 5TMS – 95% de similaridade com espectro da biblioteca de dados (tR: 30,352 min); Mistura 1.



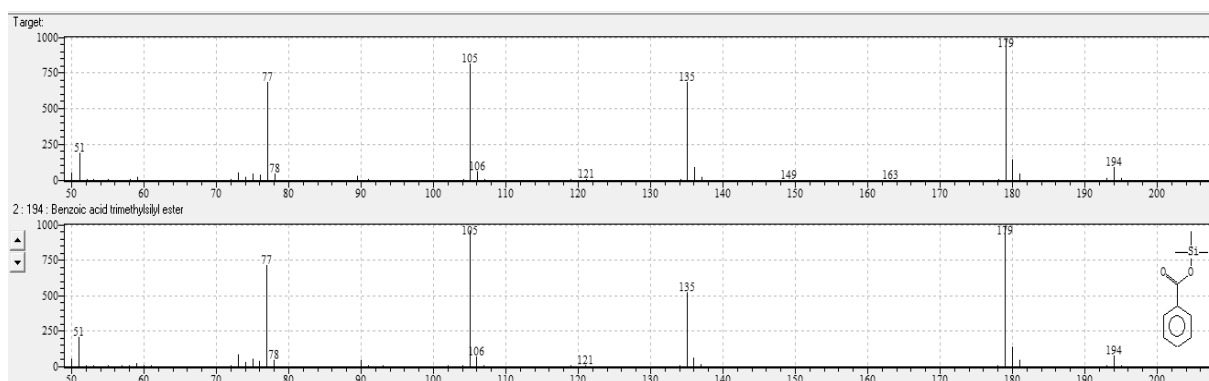
**Anexo 28.** Espectro de massas obtido por CG-EM para a frutose MEOX 5TMS (pico 1) – 93% de similaridade com espectro da biblioteca de dados (tR: 36,541 min); Mistura 1.



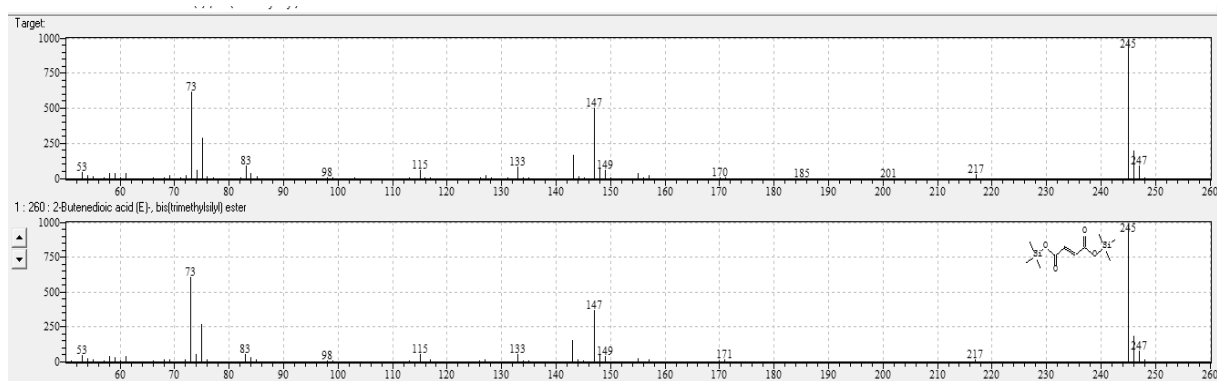
**Anexo 29.** Espectro de massas obtido por CG-EM para a frutose MEOX 5TMS (pico 2) – 92% de similaridade com espectro da biblioteca de dados (tR: 36,998 min); Mistura 1.



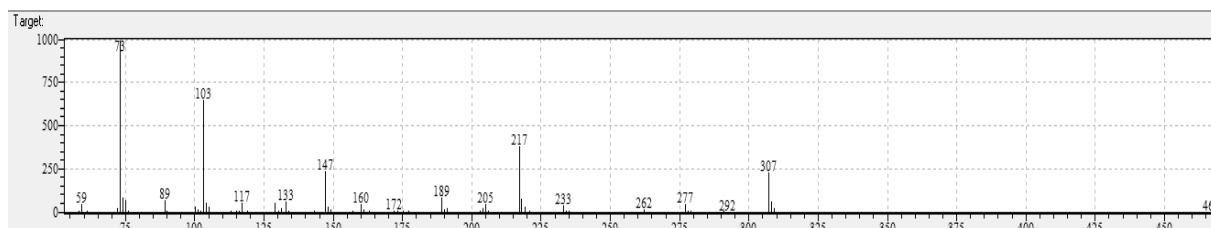
**Anexo 30.** Espectro de massas obtido por CG-EM para o ácido ascórbico 4TMS – 95% de similaridade com espectro da biblioteca de dados (tR: 39,645 min); Mistura 1.



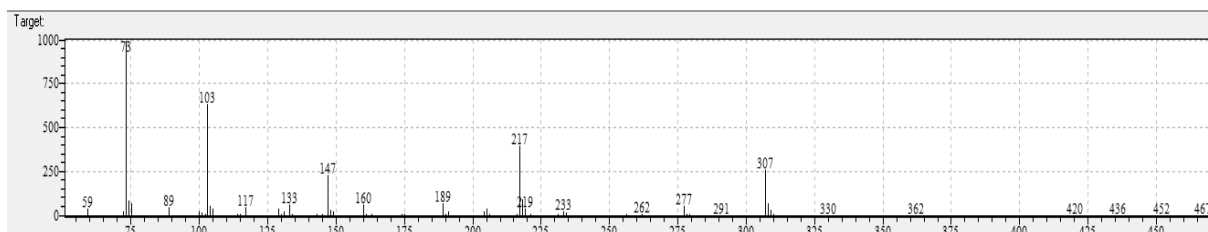
**Anexo 31.** Espectro de massas obtido por CG-EM para o ácido benzóico TMS – 96% de similaridade com espectro da biblioteca de dados (tR: 15,106 min); Mistura 2.



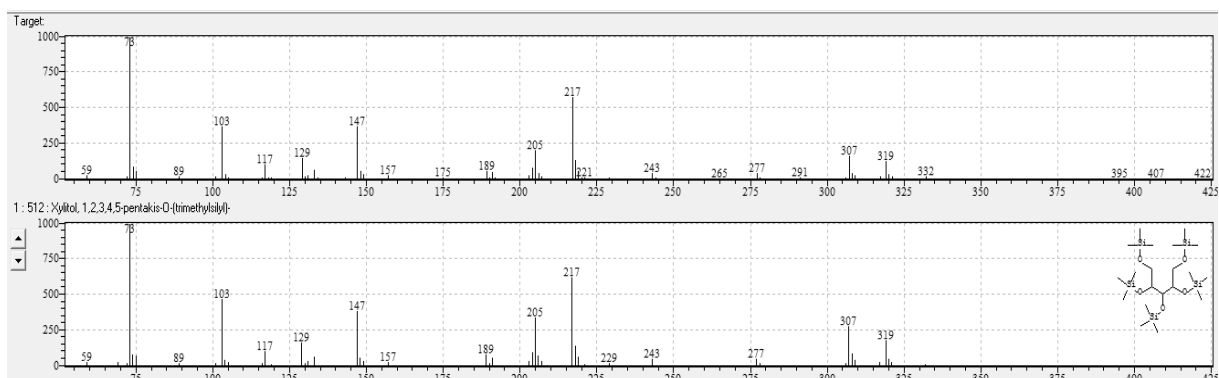
**Anexo 32.** Espectro de massas obtido por CG-EM para o ácido fumárico 2TMS – 97% de similaridade com espectro da biblioteca de dados (tR: 18,209 min); Mistura 2.



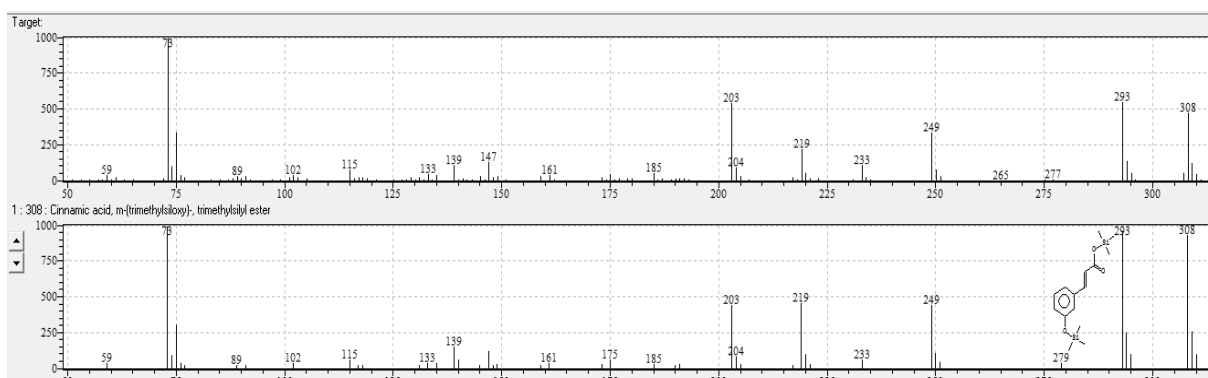
**Anexo 33.** Espectro de massas obtido por CG-EM para a arabinose MEOX 4TMS (pico 1) – não identificado pela biblioteca de dados (tR: 27,855 min); Mistura 2.



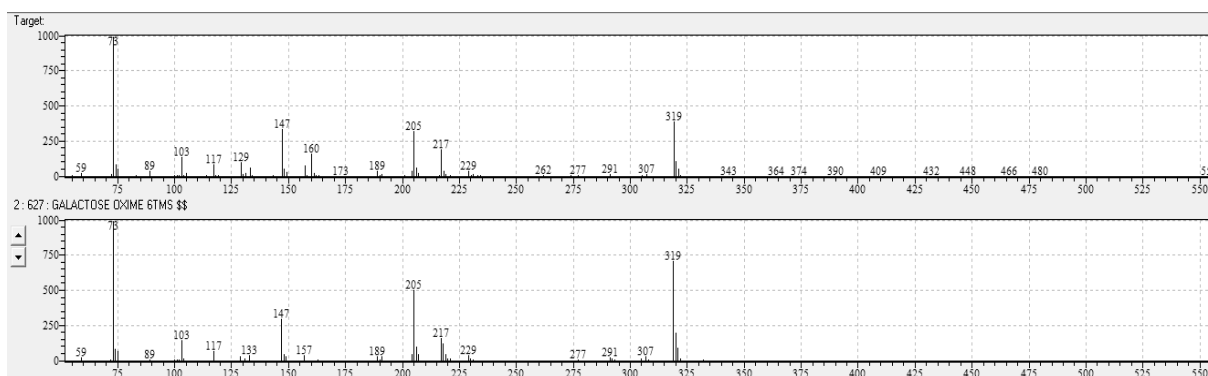
**Anexo 34.** Espectro de massas obtido por CG-EM para a arabinose MEOX 4TMS (pico 2) – não identificado pela biblioteca de dados (tR: 27,959 min); Mistura 2.



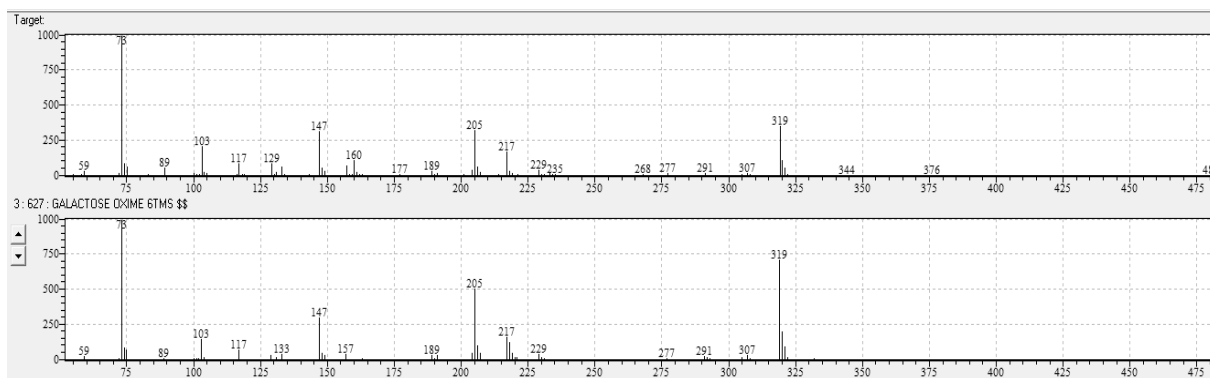
**Anexo 35.** Espectro de massas obtido por CG-EM para o xilitol 5TMS – 95% de similaridade com espectro da biblioteca de dados (tR: 29,596 min); Mistura 2.



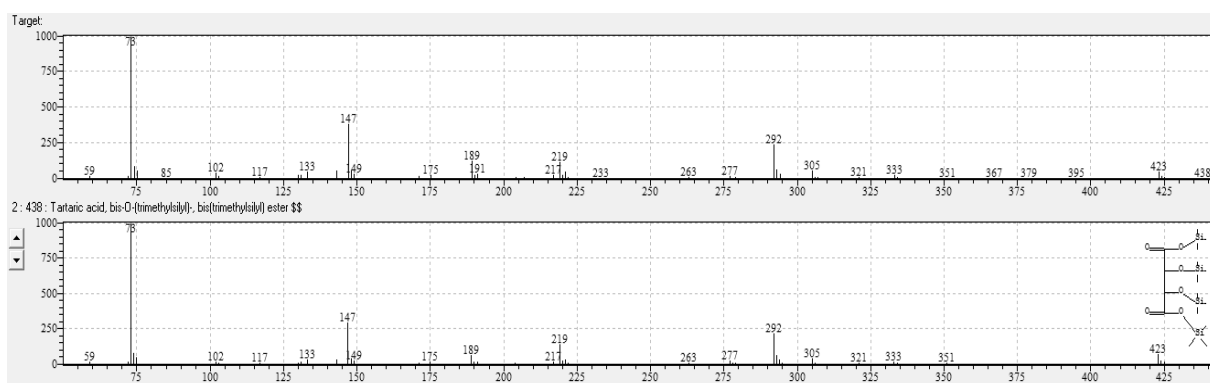
**Anexo 36.** Espectro de massas obtido por CG-EM para o ácido 3-hidroxicinâmico 2TMS – 89% de similaridade com espectro da biblioteca de dados (tR: 36,526 min); Mistura 2.



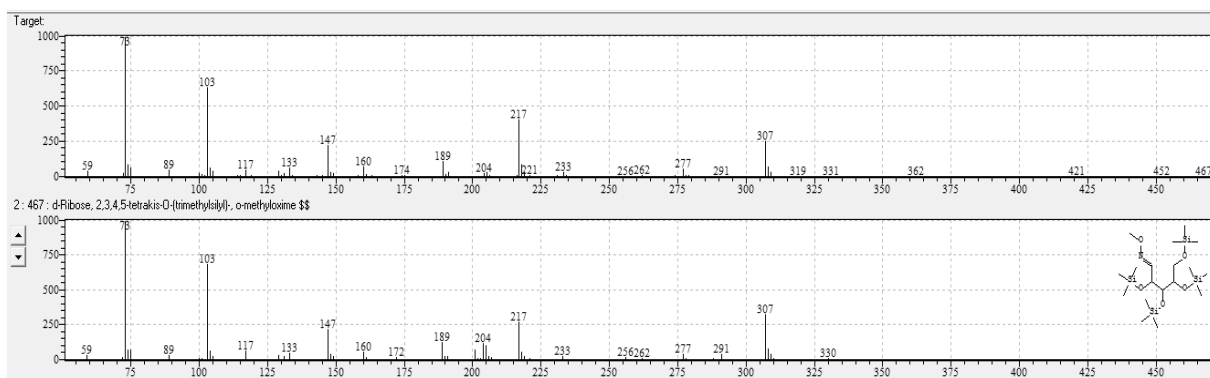
**Anexo 37.** Espectro de massas obtido por CG-EM para a galactose MEOX 6TMS (pico 1) – 89% de similaridade com espectro da biblioteca de dados (tR: 37,259 min); Mistura 2.



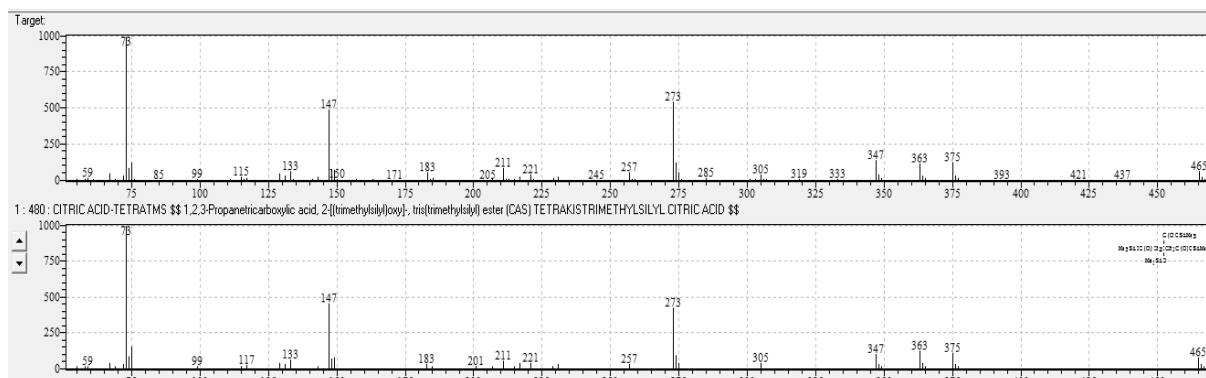
**Anexo 38.** Espectro de massas obtido por CG-EM para a galactose MEOX 6TMS (pico 2) – 89% de similaridade com espectro da biblioteca de dados (tR: 38,132 min); Mistura 2.



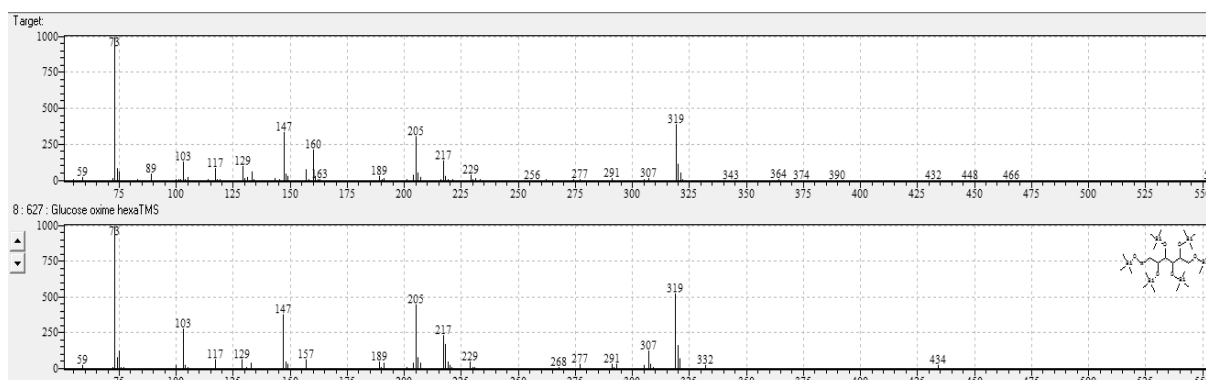
**Anexo 39.** Espectro de massas obtido por CG-EM para o ácido tartárico 4TMS – 95% de similaridade com espectro da biblioteca de dados (tR: 27,015 min); Mistura 3.



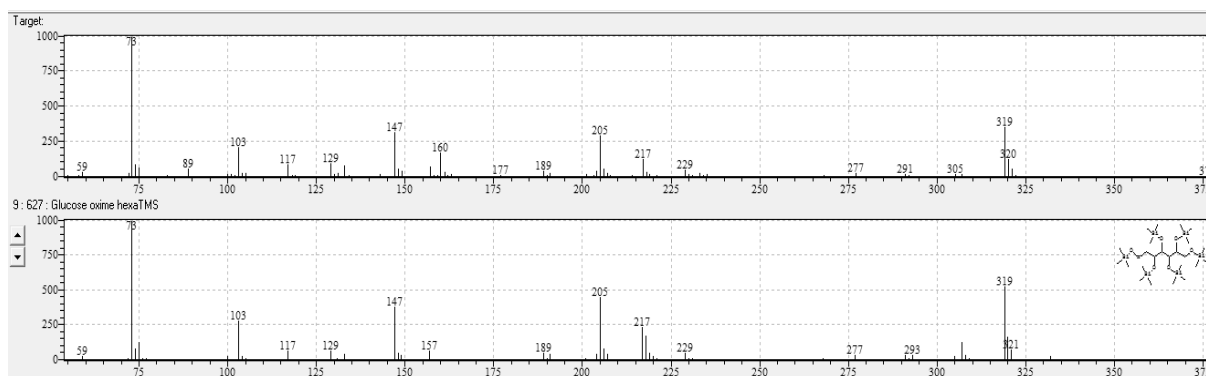
**Anexo 40.** Espectro de massas obtido por CG-EM para a ribose MEOX 4TMS – 92% de similaridade com espectro da biblioteca de dados (tR: 28,530 min); Mistura 3.



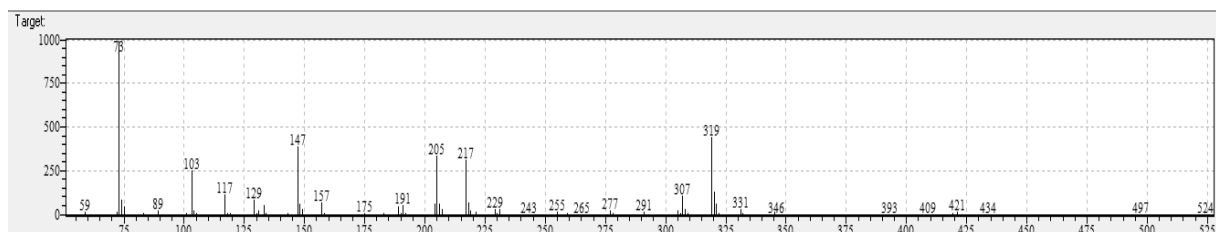
**Anexo 41.** Espectro de massas obtido por CG-EM para o ácido cítrico 4TMS – 95% de similaridade com espectro da biblioteca de dados (tR: 34,304 min); Mistura 3.



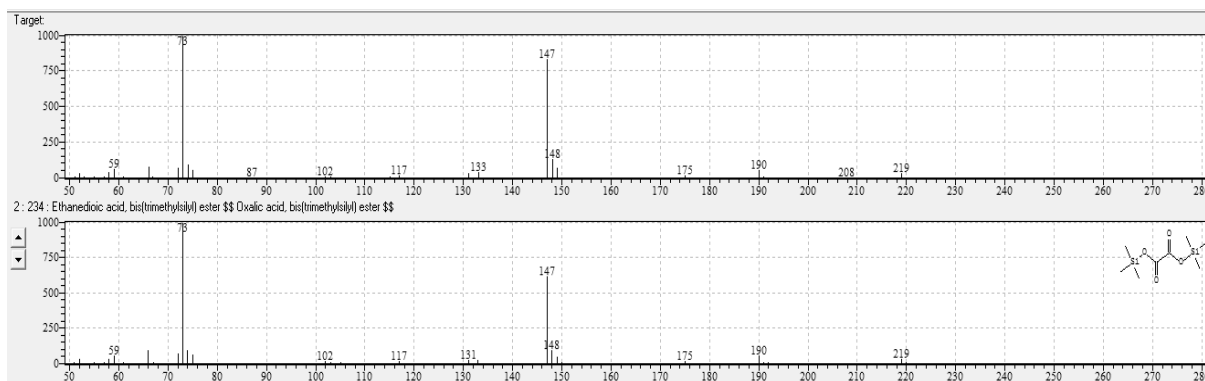
**Anexo 42.** Espectro de massas obtido por CG-EM para a glicose MEOX 6TMS (pico 1) – 85% de similaridade com espectro da biblioteca de dados (tR: 37,548 min); Mistura 3.



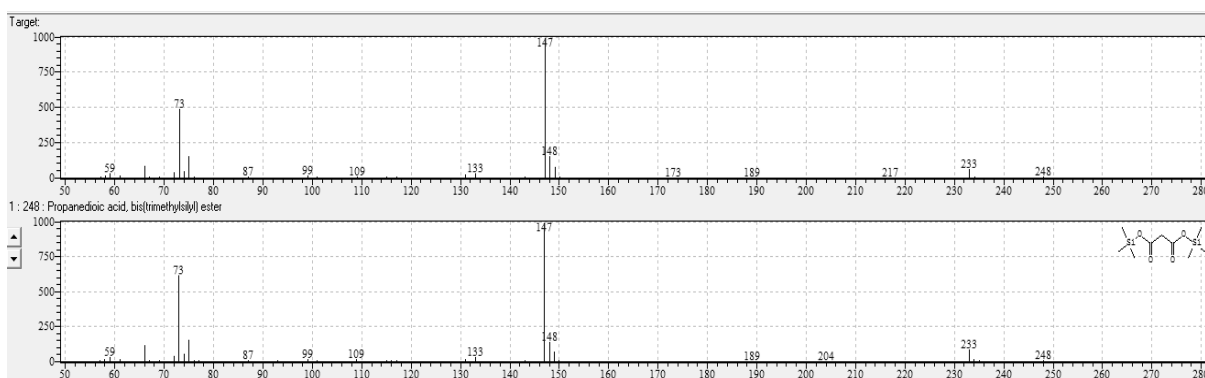
**Anexo 43.** Espectro de massas obtido por CG-EM para a glicose MEOX 6TMS (pico 2) – 86% de similaridade com espectro da biblioteca de dados (tR: 38,271 min); Mistura 3.



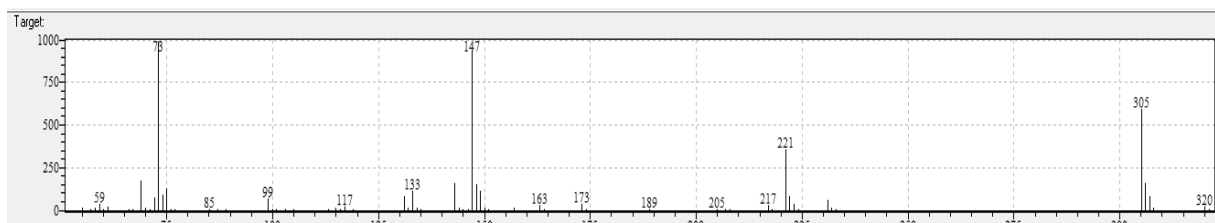
**Anexo 44.** Espectro de massas obtido por CG-EM para o sorbitol 6TMS – não identificado pela biblioteca de dados (tR: 39,199 min); Mistura 3.



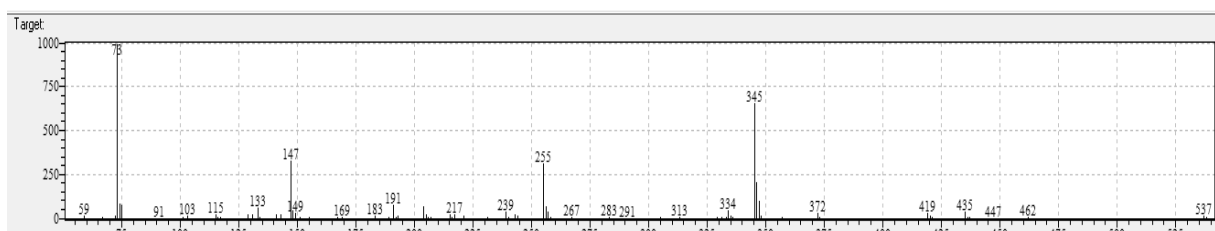
**Anexo 45.** Espectro de massas obtido por CG-EM para o ácido oxálico 2TMS – 95% de similaridade com a biblioteca de dados (tR: 11,657 min); mistura 4.



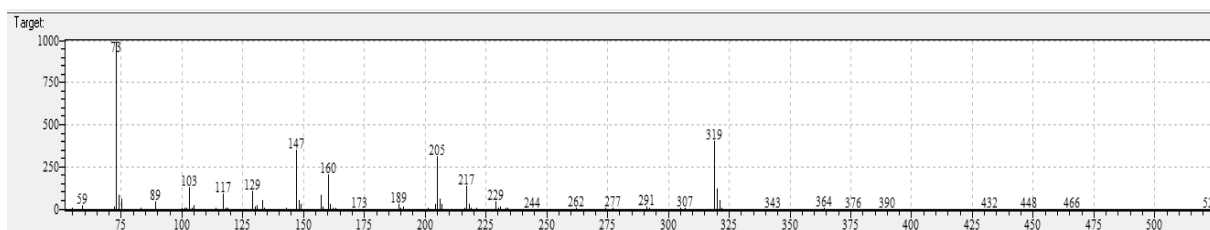
**Anexo 46.** Espectro de massas obtido por CG-EM para o ácido malônico 2TMS – 96% de similaridade com a biblioteca de dados (tR: 13,886 min); Mistura 4.



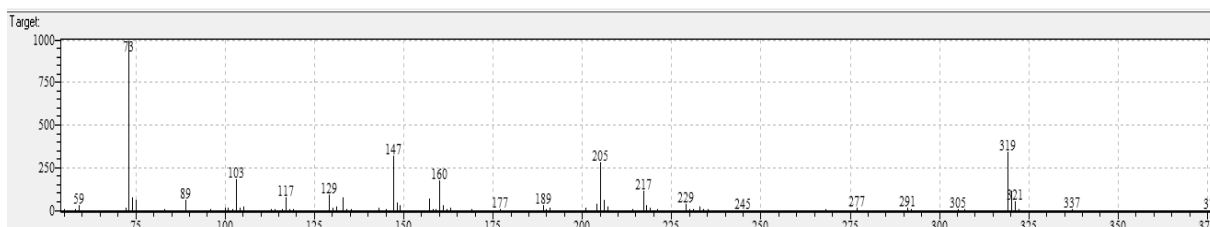
**Anexo 47.** Espectro de massas obtido por CG-EM para o ácido adípico 2TMS – não identificado pela biblioteca de dados (tR: 20,162 min); Mistura 4.



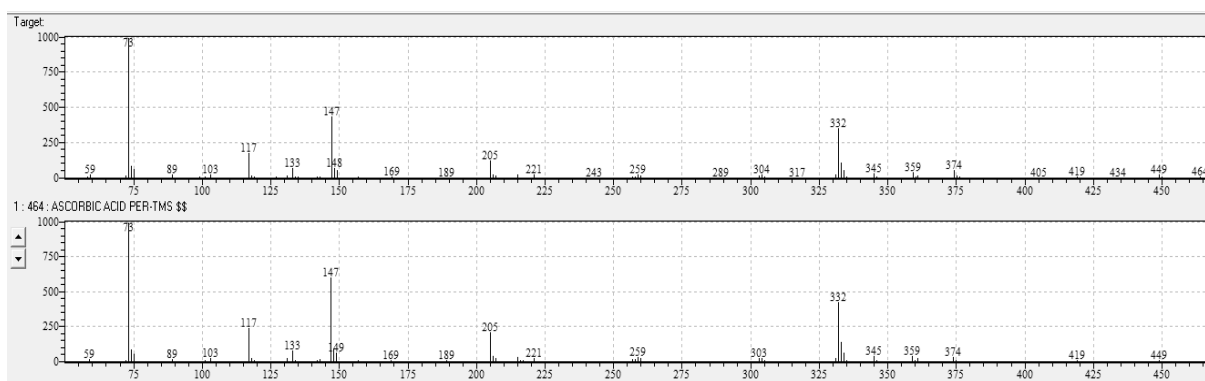
**Anexo 48.** Espectro de massas obtido por CG-EM para o ácido quálico 5TMS – não identificado pela biblioteca de dados (tR: 35,879 min); Mistura 4.



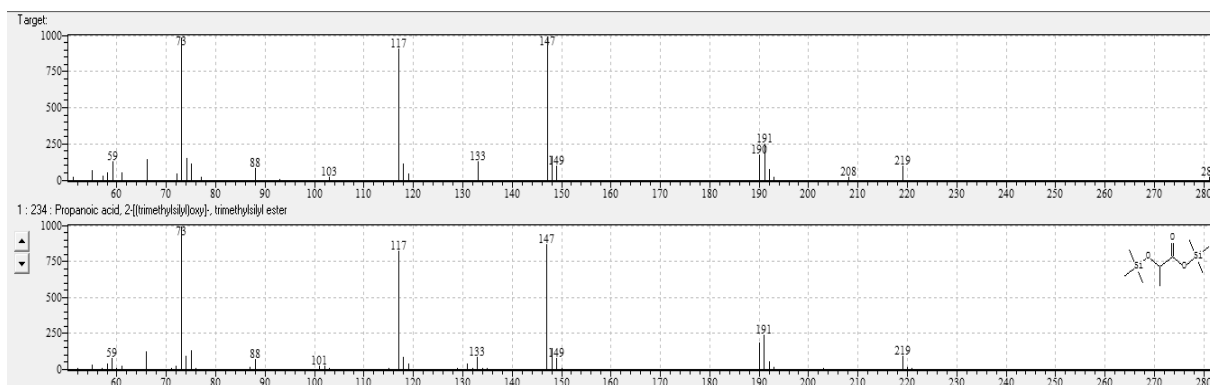
**Anexo 49.** Espectro de massas obtido por CG-EM para a manose MEOX 5TMS (pico 1) – não identificado pela biblioteca de dados (tR: 37,123 min); Mistura 4.



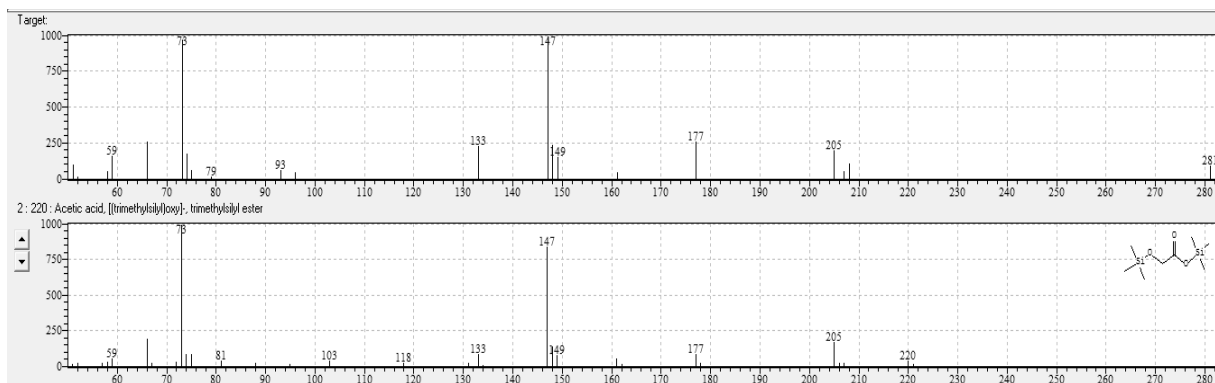
**Anexo 50.** Espectro de massas obtido por CG-EM para a manose MEOX 5TMS (pico 2) – não identificado pela biblioteca de dados (tR: 37,583 min); Mistura 4.



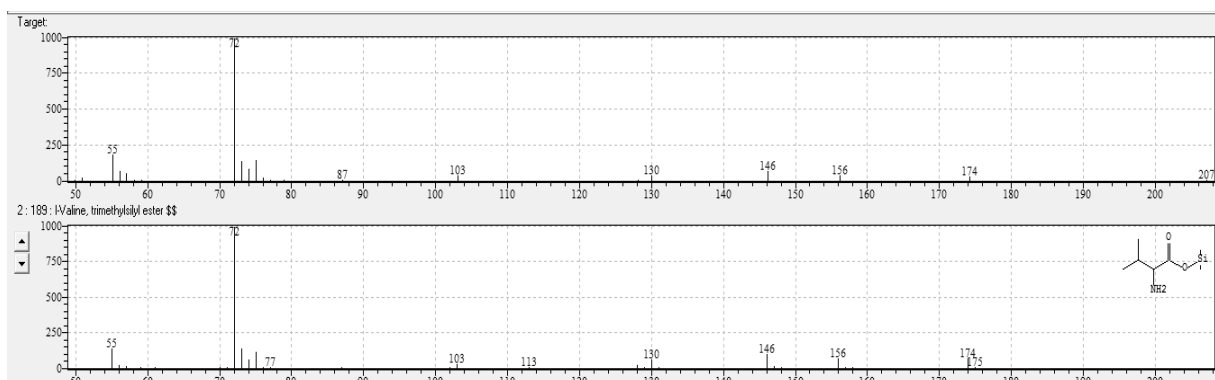
**Anexo 51.** Espectro de massas obtido por CG-EM para o ácido ascórbico 4TMS – 94% de similaridade com a biblioteca de dados (tR: 39,635 min); Mistura 4.



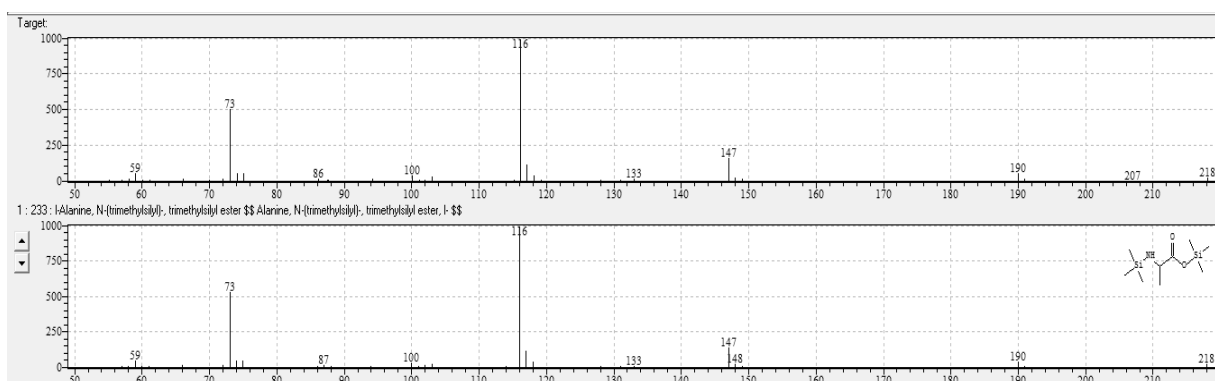
**Anexo 52.** Espectro de massas obtido por CG-EM para o metabólito 1: ácido láctico 2TMS.



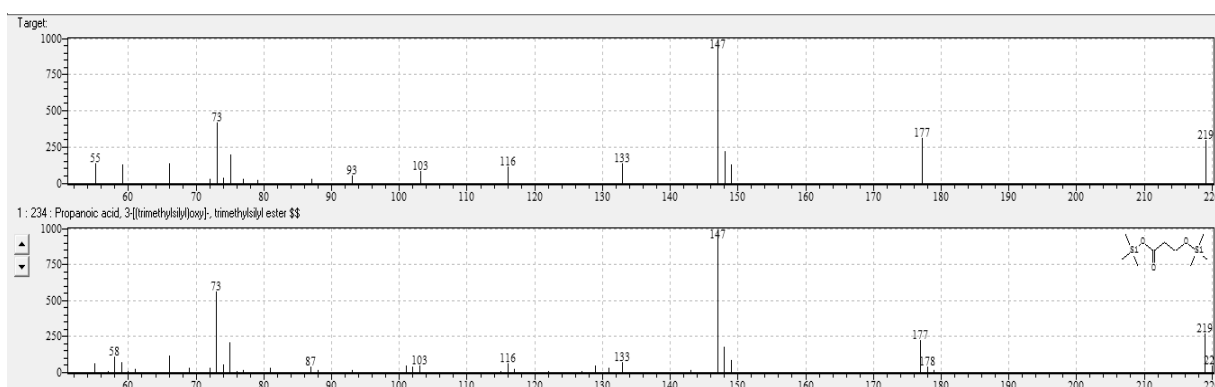
**Anexo 53.** Espectro de massas obtido por CG-EM para o metabólito 2: ácido glicólico 2TMS.



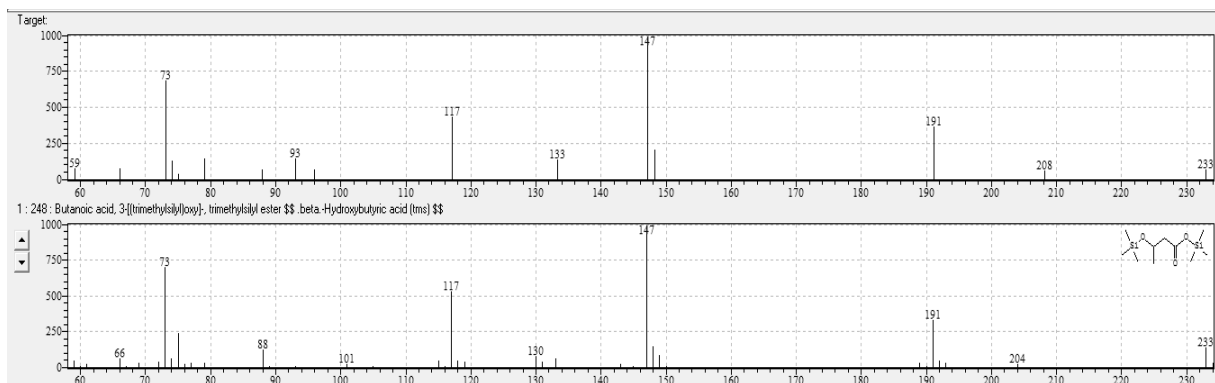
**Anexo 54.** Espectro de massas obtido por CG-EM para o metabólito 3: valina TMS.



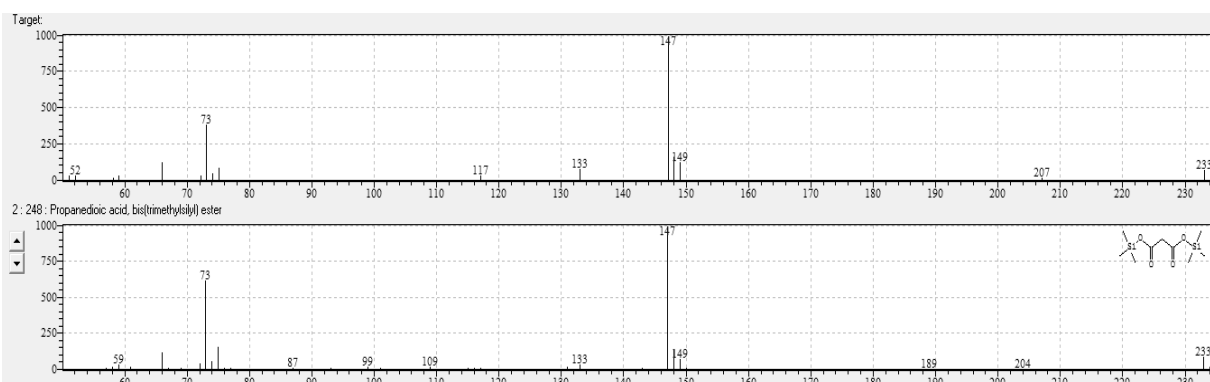
**Anexo 55.** Espectro de massas obtido por CG-EM para o metabólito 4: alanina TMS.



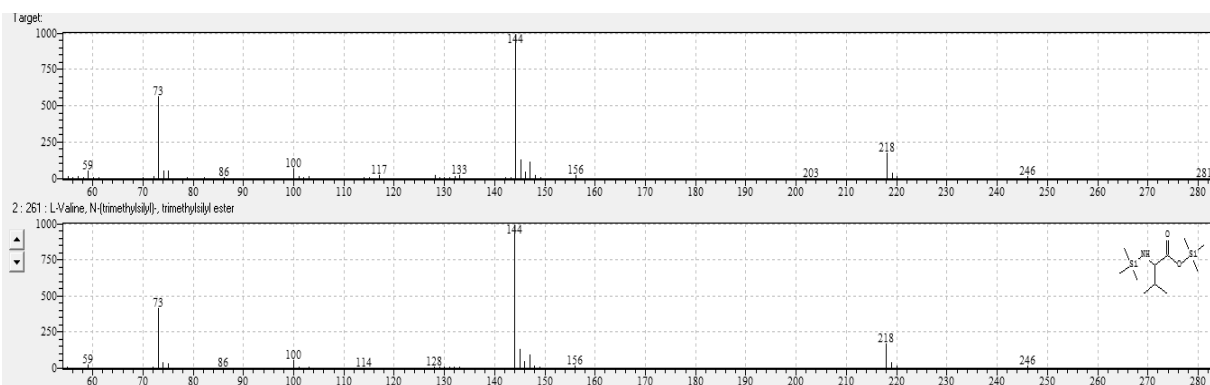
**Anexo 56.** Espectro de massas obtido por CG-EM para o metabólito 5: ácido hidrácrico 2TMS.



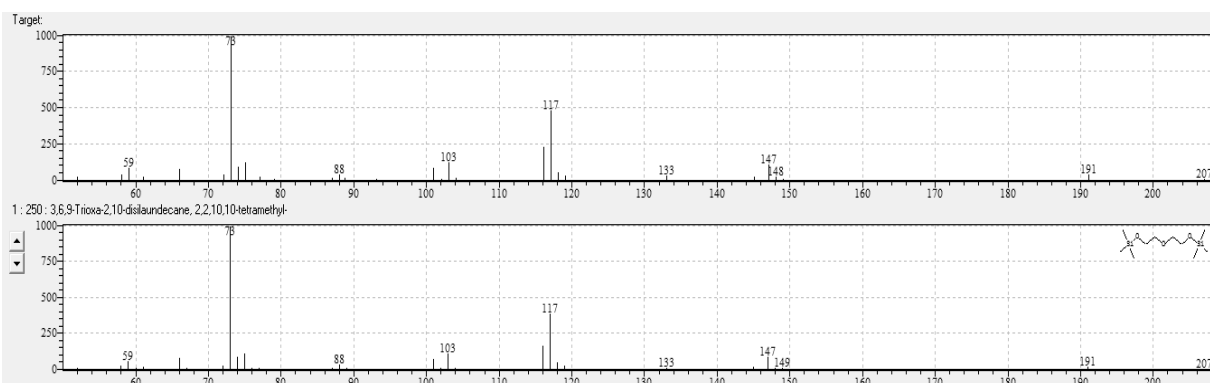
**Anexo 57.** Espectro de massas obtido por CG-EM para o metabólito 6: ácido hidroxibutírico 2TMS.



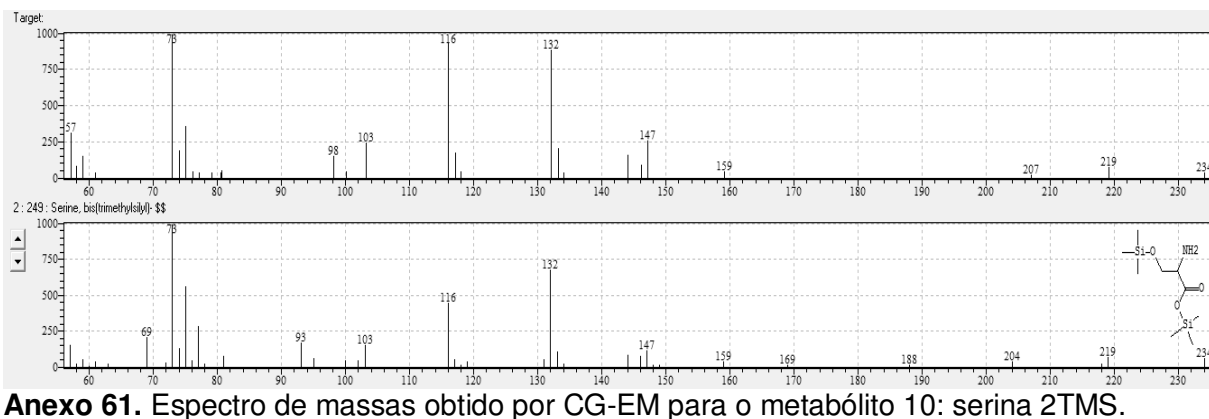
**Anexo 58.** Espectro de massas obtido por CG-EM para o metabólito 7: ácido malônico 2TMS.



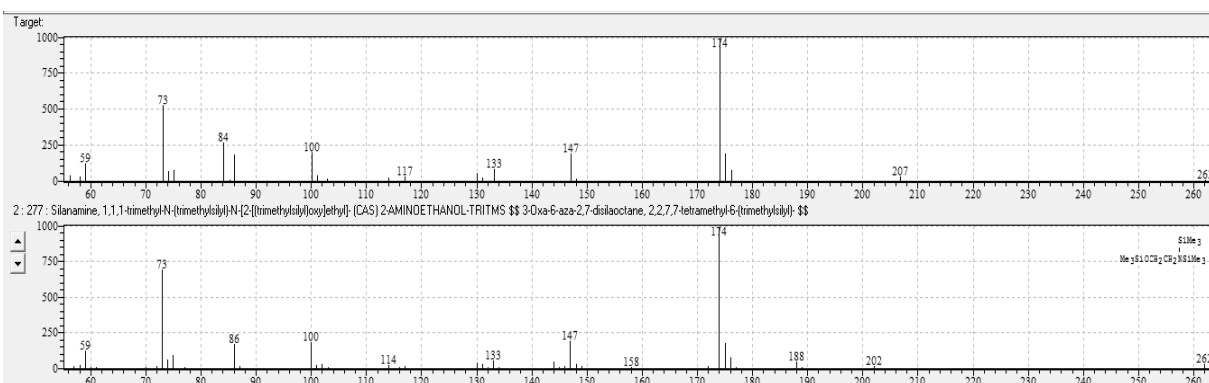
**Anexo 59.** Espectro de massas obtido por CG-EM para o metabólito 8: valina 2TMS.



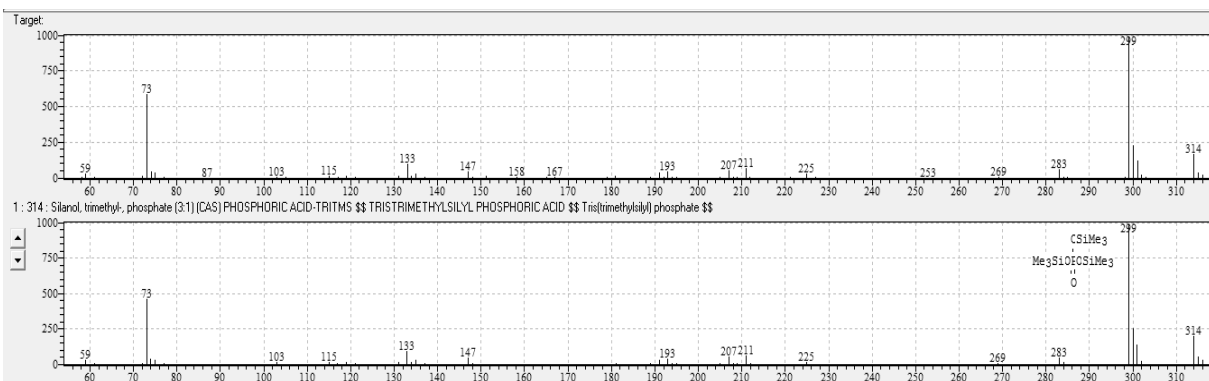
**Anexo 60.** Espectro de massas obtido por CG-EM para o metabólito 9: dietilenoglicol 2TMS.



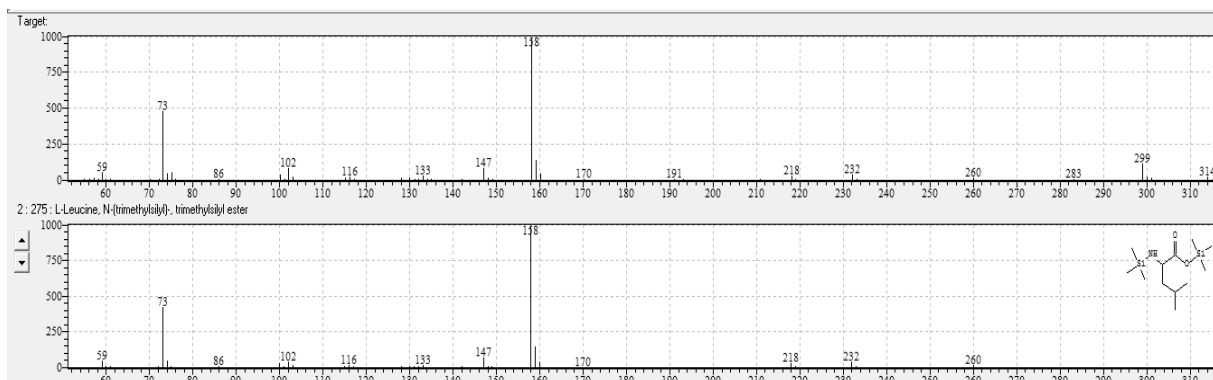
**Anexo 61.** Espectro de massas obtido por CG-EM para o metabólito 10: serina 2TMS.



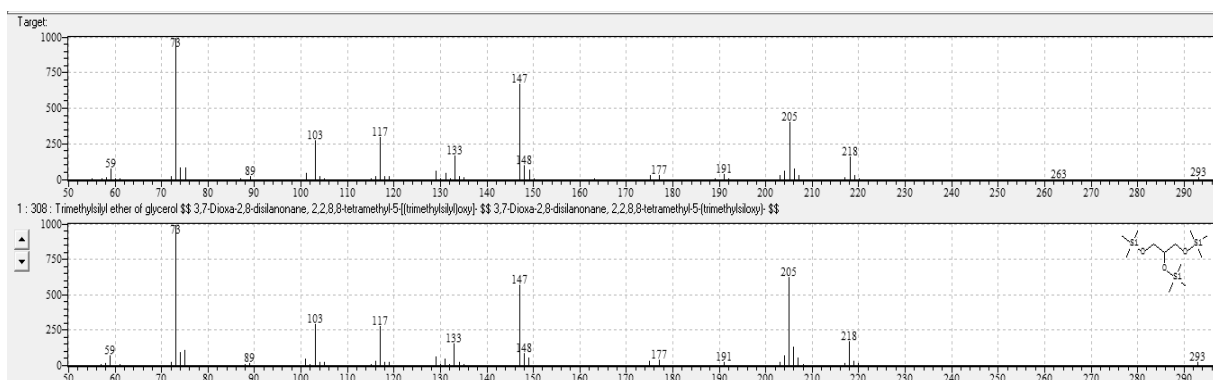
**Anexo 62.** Espectro de massas obtido por CG-EM para o metabólito 11: 2-aminoetanol 3TMS.



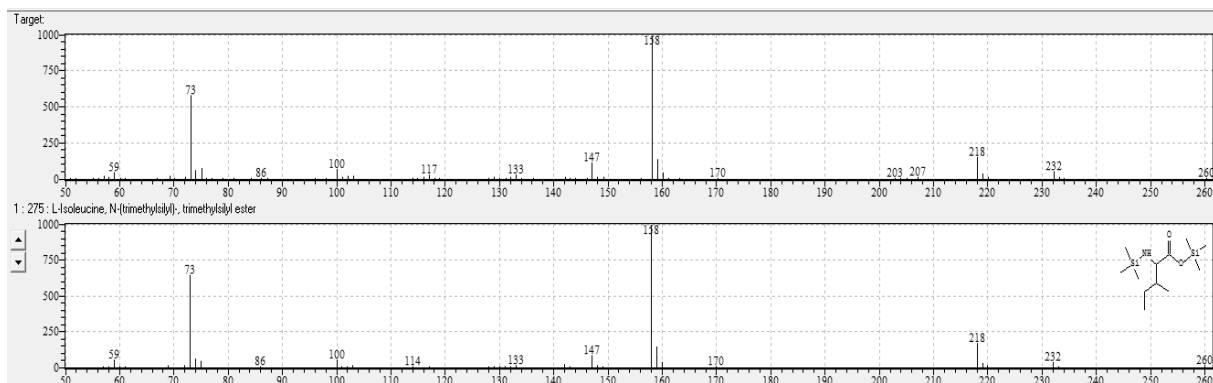
**Anexo 63.** Espectro de massas obtido por CG-EM para o metabólito 12: ácido fosfórico 3TMS.



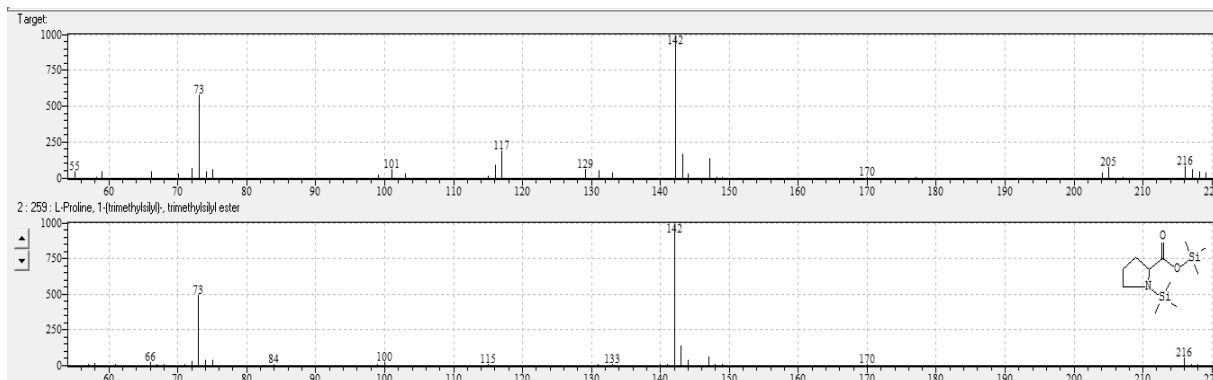
**Anexo 64.** Espectro de massas obtido por CG-EM para o metabólito 13: leucina 2TMS.



**Anexo 65.** Espectro de massas obtido por CG-EM para o metabólito 14: glicerol 3TMS.

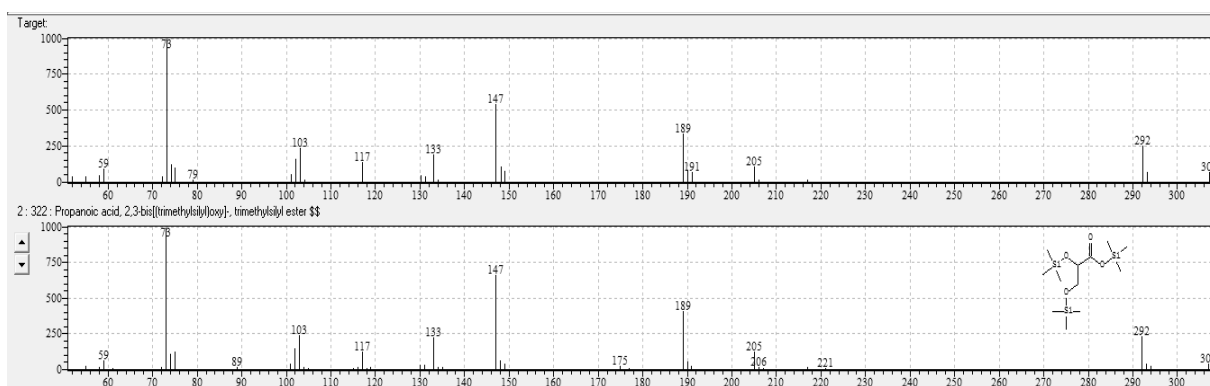


**Anexo 66.** Espectro de massas obtido por CG-EM para o metabólito 15: isoleucina 2TMS.

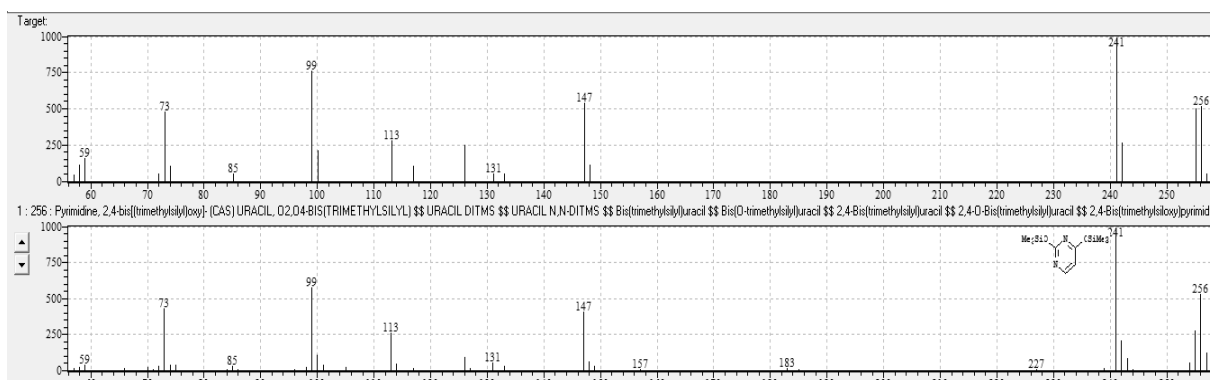


**Anexo 67.** Espectro de massas obtido por CG-EM para o metabólito 16: prolina 2TMS.

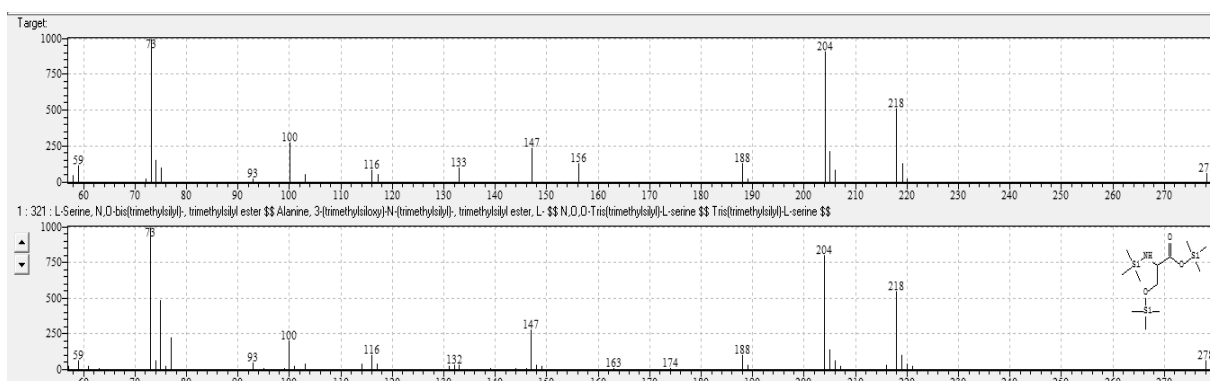




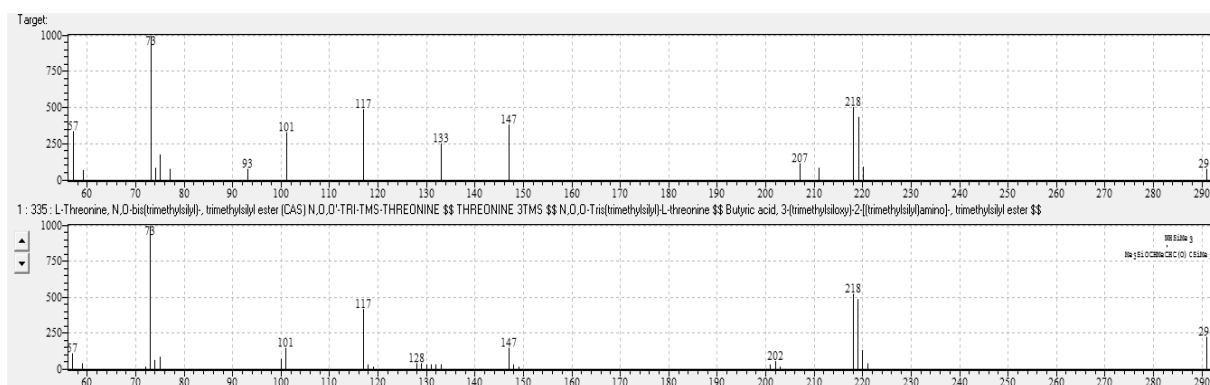
**Anexo 71.** Espectro de massas obtido por CG-EM para o metabólito 20: ácido glicérico 3TMS.



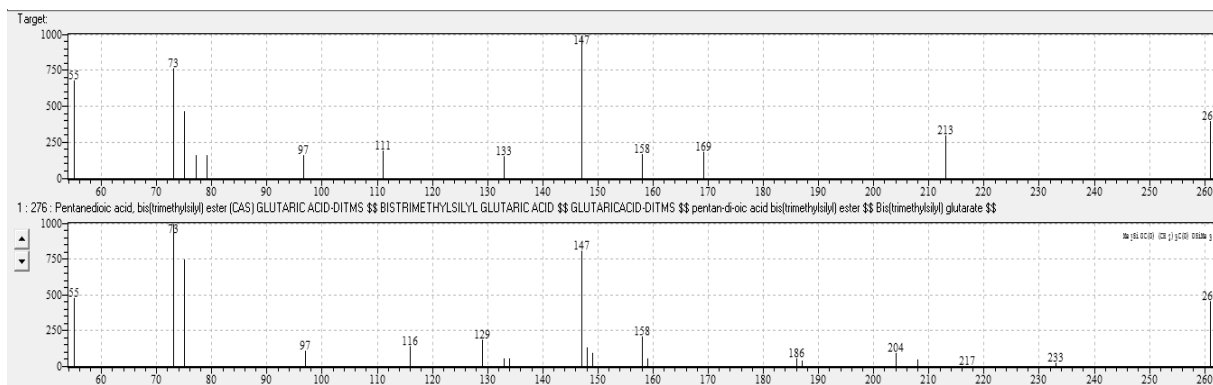
**Anexo 72.** Espectro de massas obtido por CG-EM para o metabólito 21: uracila 2TMS.



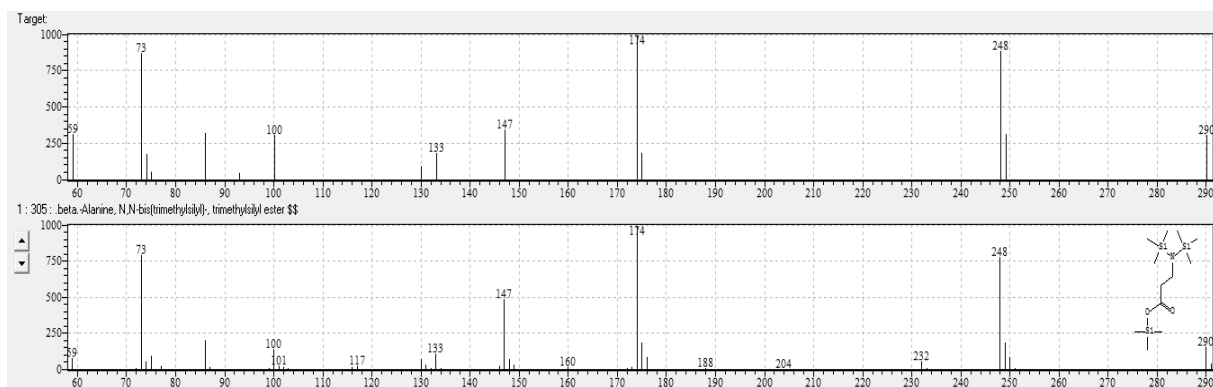
**Anexo 73.** Espectro de massas obtido por CG-EM para o metabólito 22: serina 3TMS.



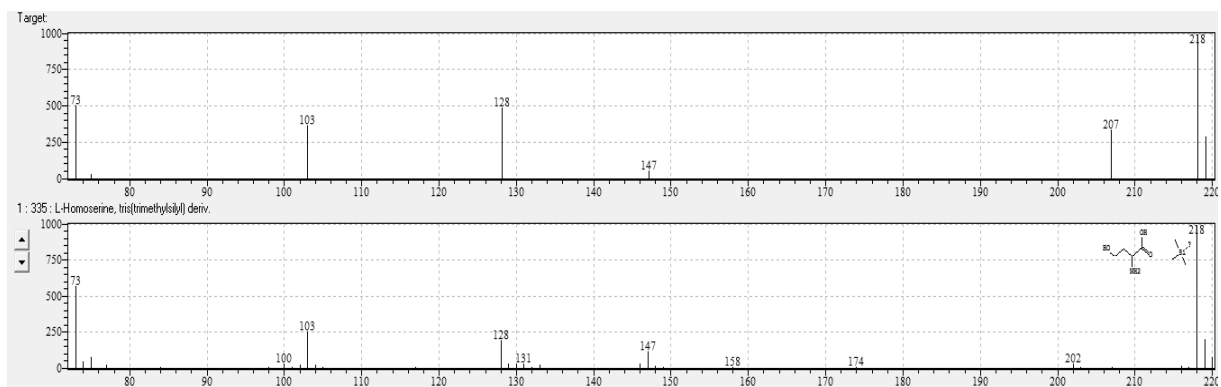
**Anexo 74.** Espectro de massas obtido por CG-EM para o metabólito 23: treonina 3TMS.



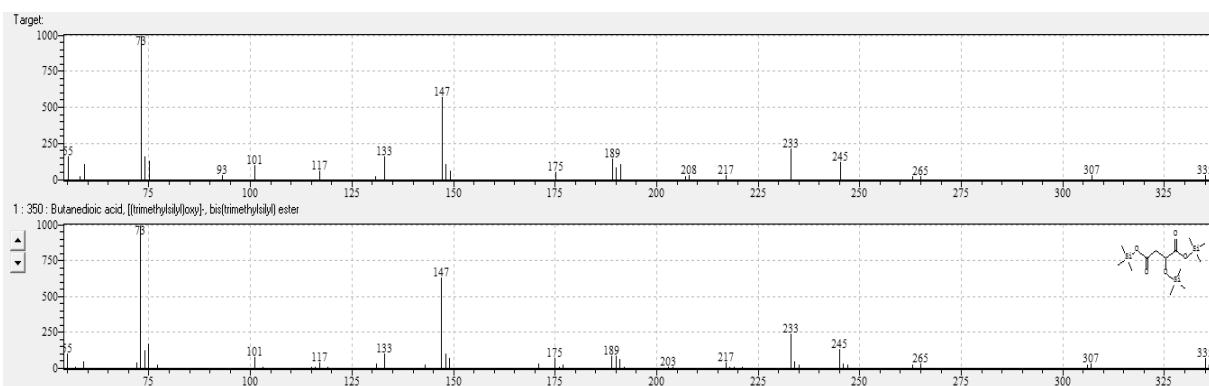
**Anexo 75.** Espectro de massas obtido por CG-EM para o metabólito 24: ácido glutárico 2TMS.



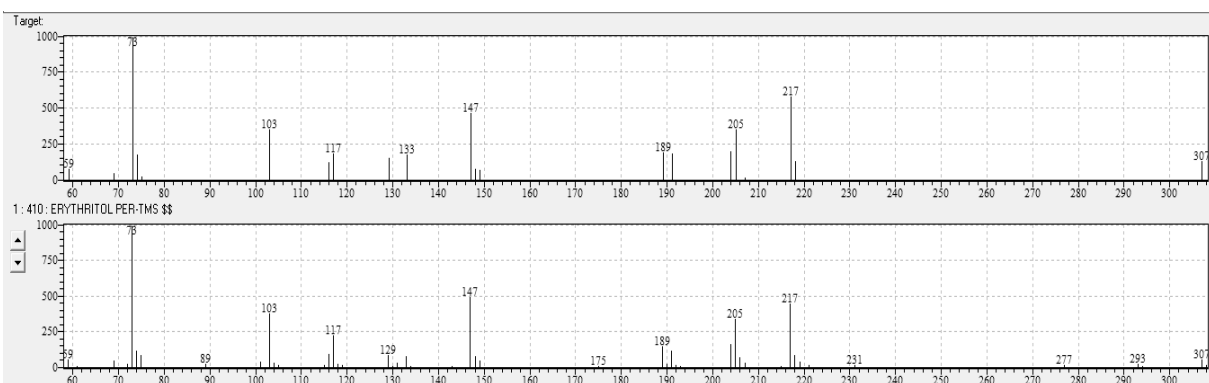
**Anexo 76.** Espectro de massas obtido por CG-EM para o metabólito 25: alanina 3TMS.



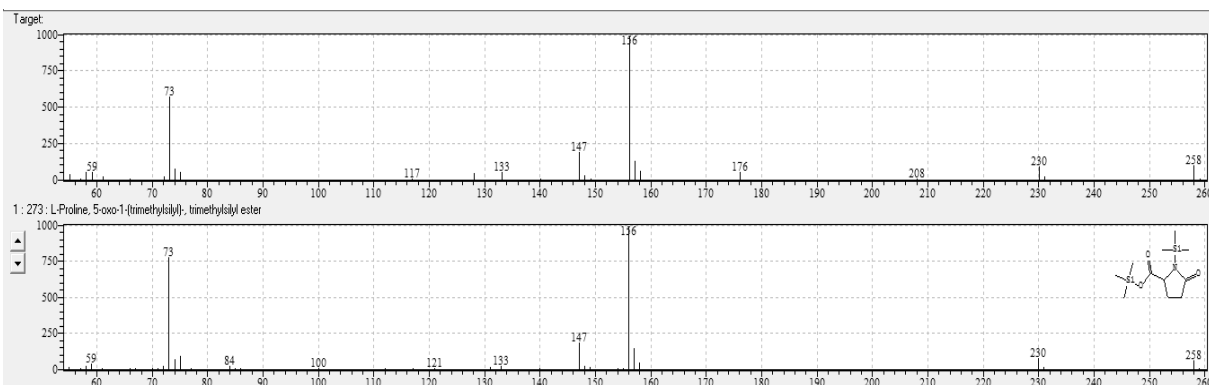
**Anexo 77.** Espectro de massas obtido por CG-EM para o metabólito 26: homoserina 3TMS.



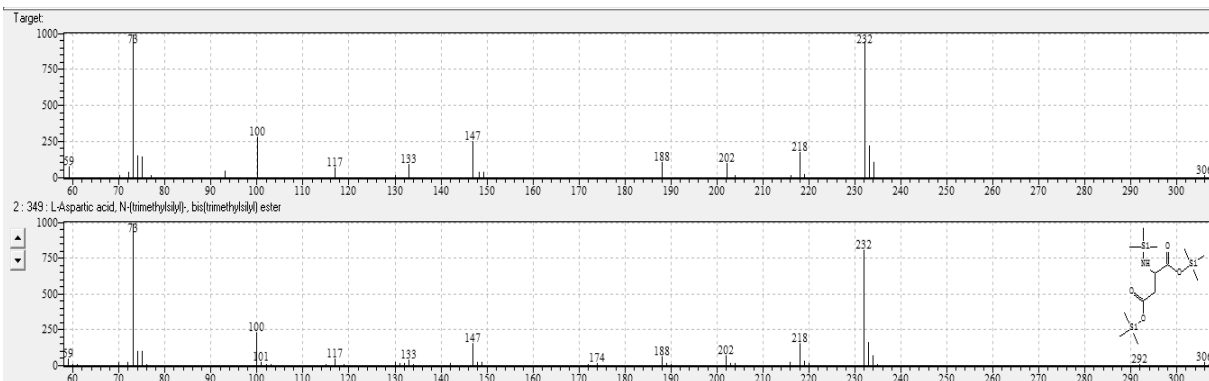
**Anexo 78.** Espectro de massas obtido por CG-EM para o metabólito 27: ácido málico 3TMS.



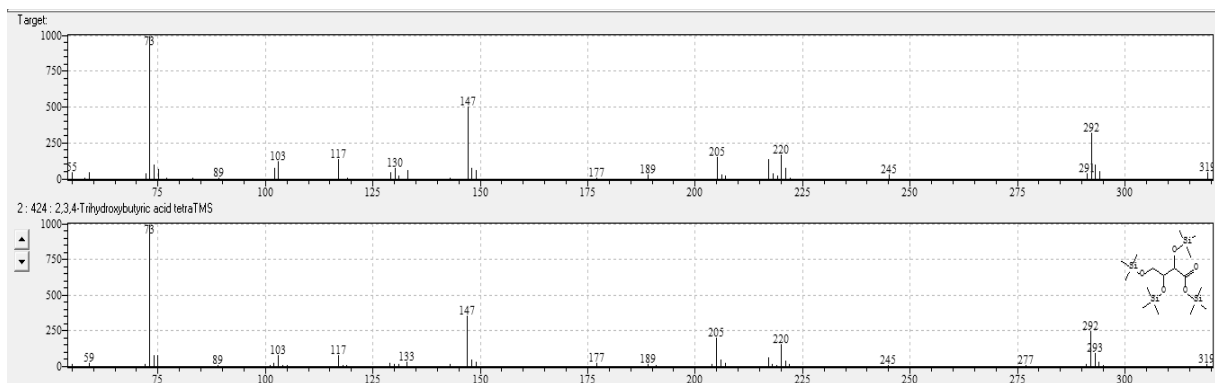
**Anexo 79.** Espectro de massas obtido por CG-EM para o metabólito 28: eritritol 4TMS.



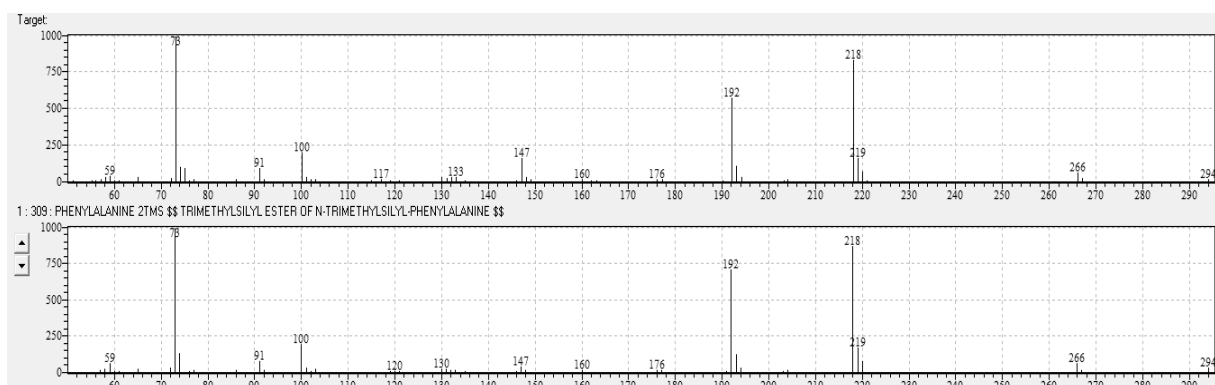
**Anexo 80.** Espectro de massas obtido por CG-EM para o metabólito 29: ácido pir glutâmico 2TMS.



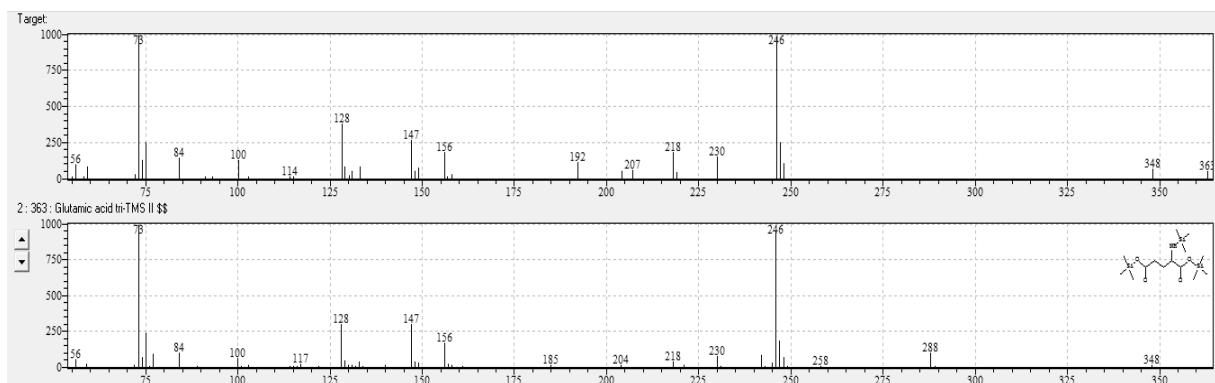
**Anexo 81.** Espectro de massas obtido por CG-EM para o metabólito 30: ácido aspártico 3TMS.



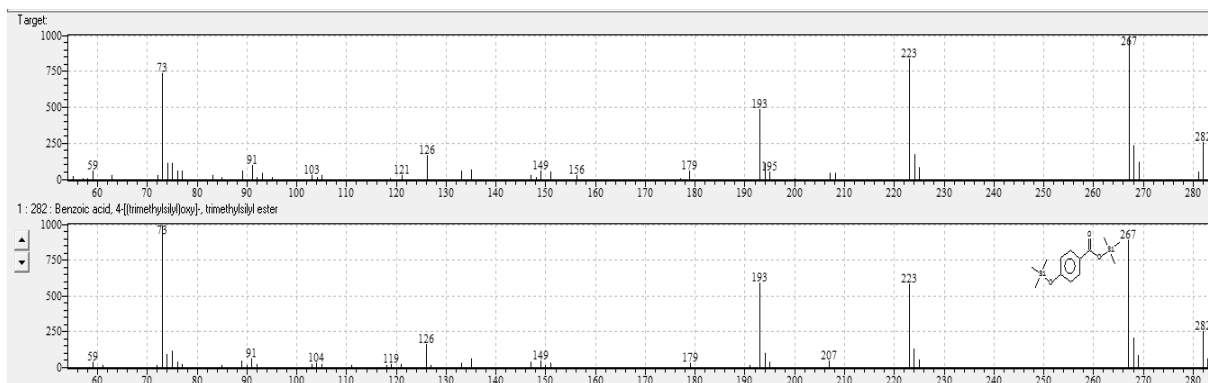
**Anexo 82.** Espectro de massas obtido por CG-EM para o metabólito 31: ácido treônico 4TMS.



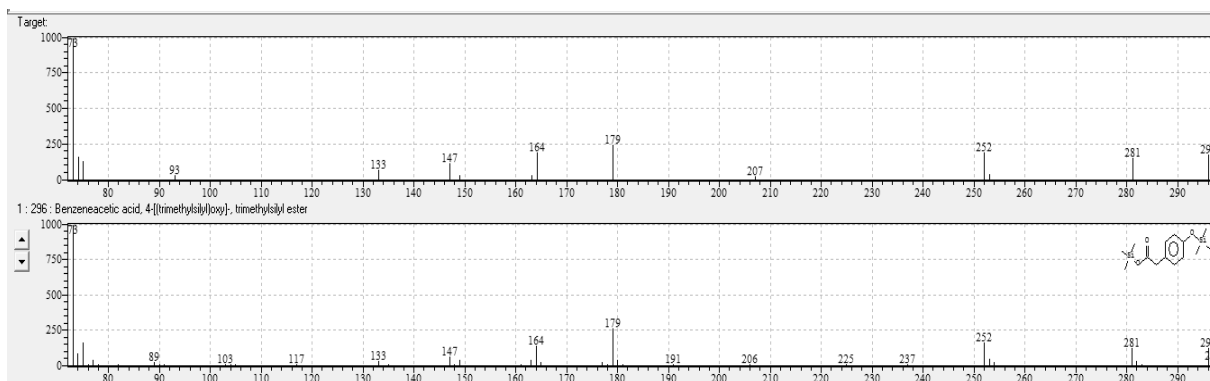
**Anexo 83.** Espectro de massas obtido por CG-EM para o metabólito 32: fenilalanina 2TMS.



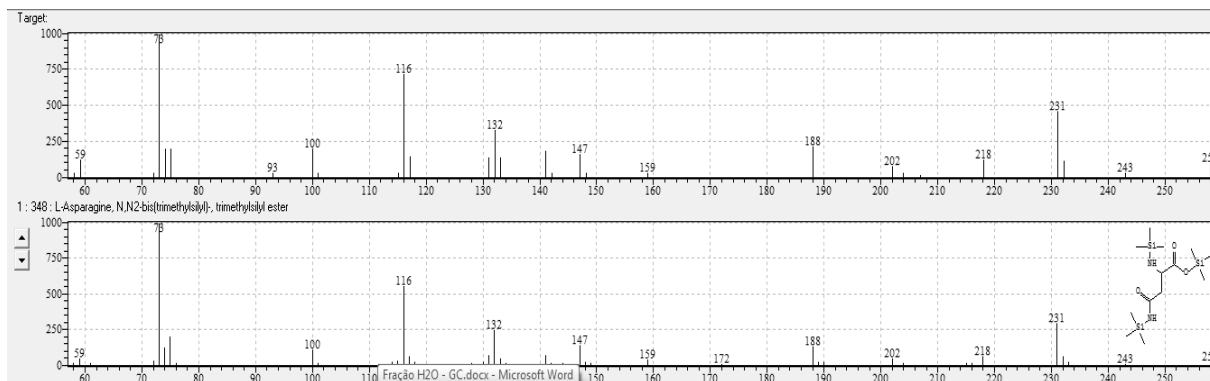
**Anexo 84.** Espectro de massas obtido por CG-EM para o metabólito 33: ácido glutâmico 3TMS.



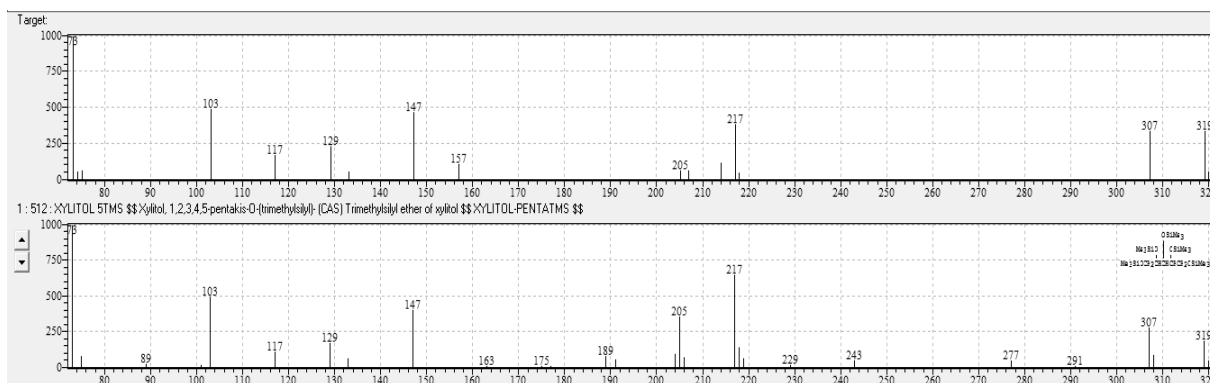
**Anexo 85.** Espectro de massas obtido por CG-EM para o metabólito 34: ácido 4-hidroxibenzóico 2TMS.



**Anexo 86.** Espectro de massas obtido por CG-EM para o metabólito 35: ácido p-hidroxifenilacético 2TMS.

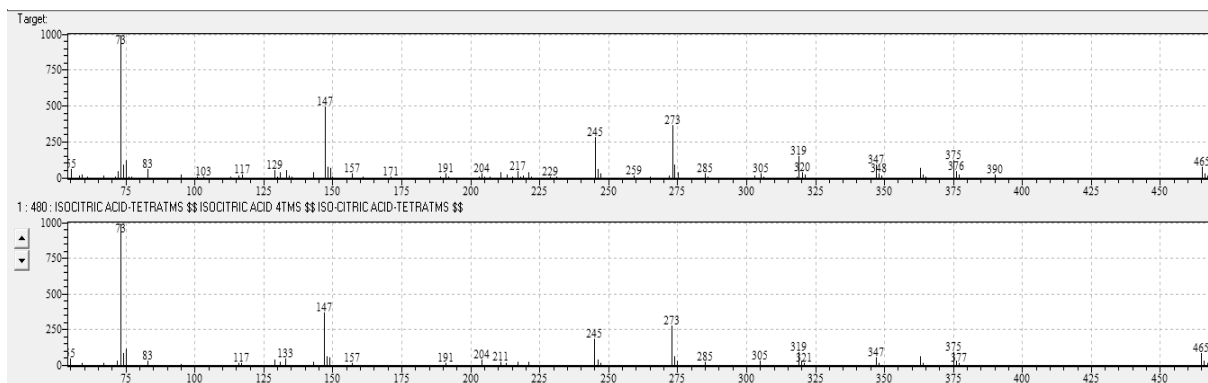


**Anexo 87.** Espectro de massas obtido por CG-EM para o metabólito 36: asparagina 3TMS.

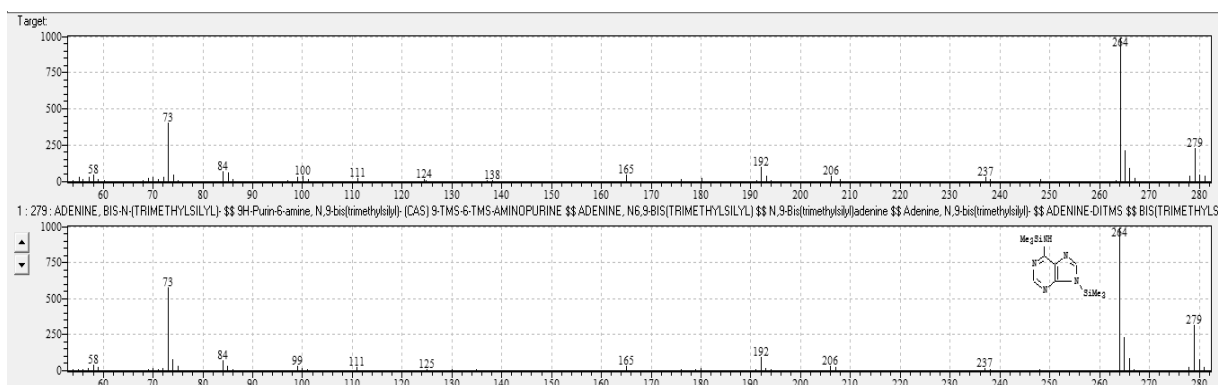


**Anexo 88.** Espectro de massas obtido por CG-EM para o metabólito 37: xilitol 5TMS.

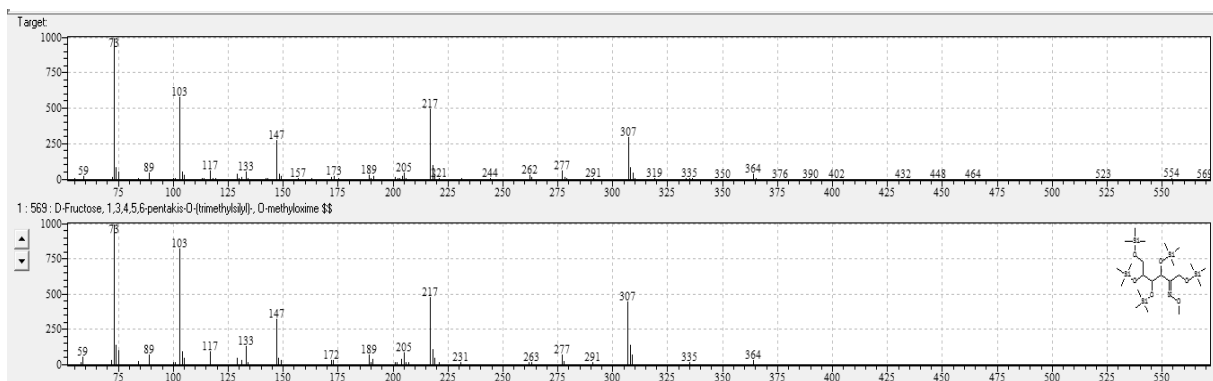




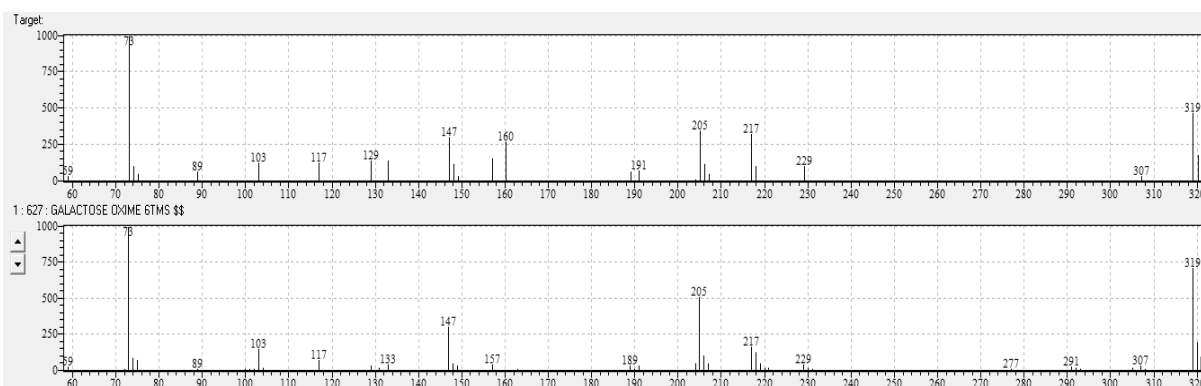
**Anexo 93.** Espectro de massas obtido por CG-EM para o metabólito 42: ácido cítrico 4TMS.



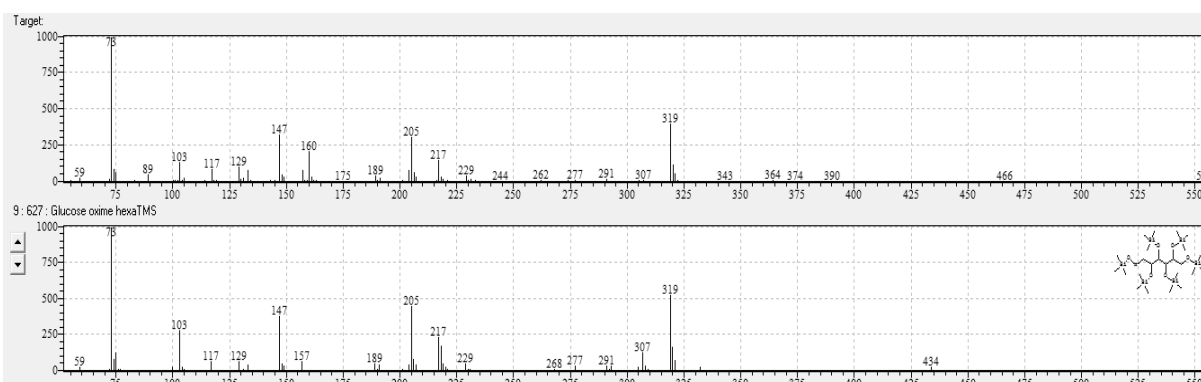
**Anexo 94.** Espectro de massas obtido por CG-EM para o metabólito 43: adenina 2TMS.



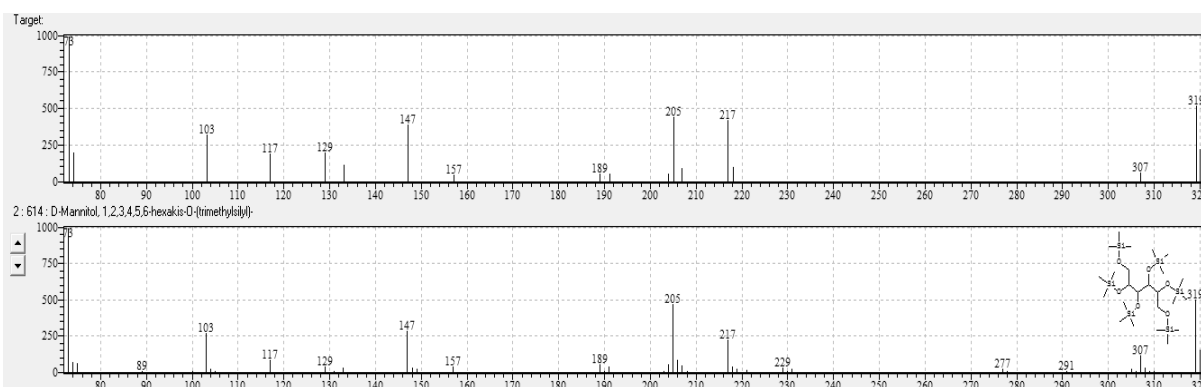
**Anexo 95.** Espectro de massas obtido por CG-EM para o metabólito 44: frutose MEOX 5TMS.



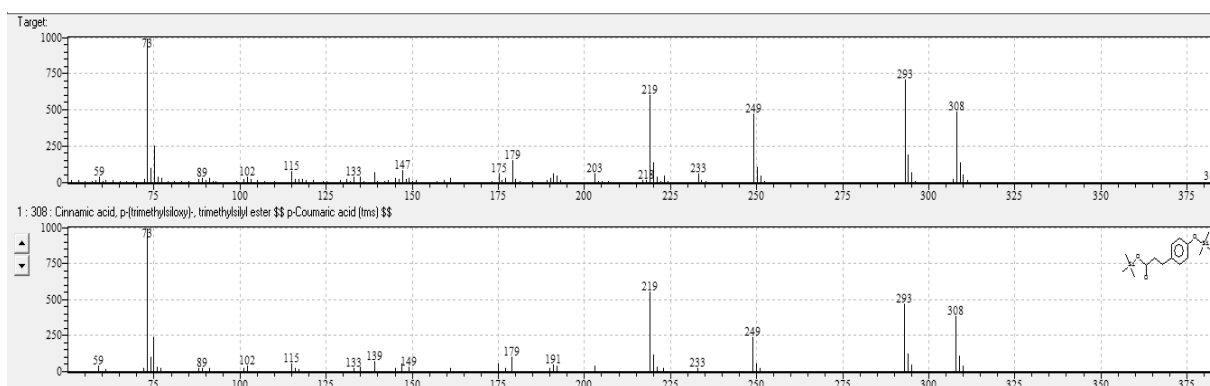
**Anexo 96.** Espectro de massas obtido por CG-EM para o metabólito 45: galactose MEOX 5TMS.



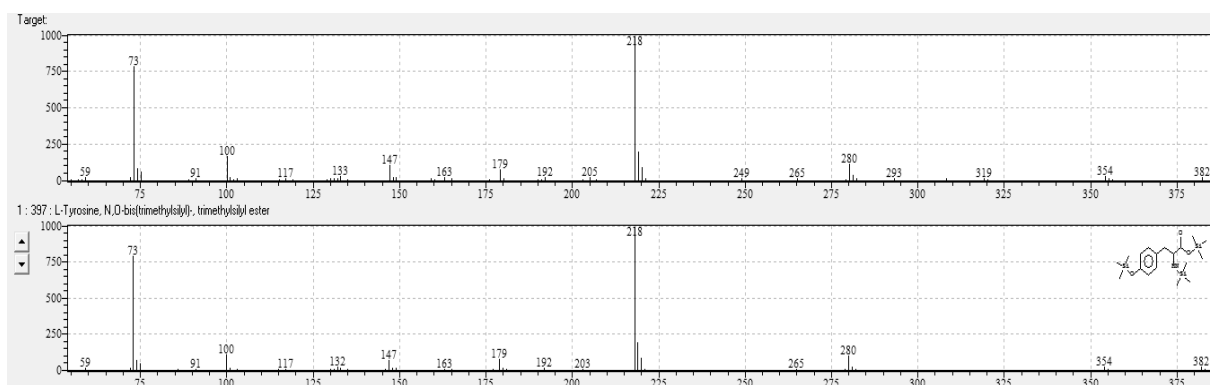
**Anexo 97.** Espectro de massas obtido por CG-EM para o metabólito 46: glicose MEOX 5TMS.



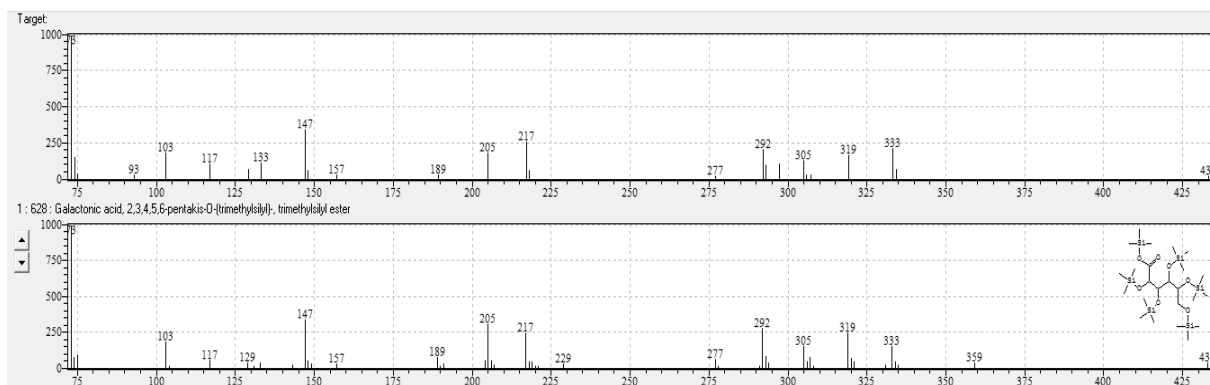
**Anexo 98.** Espectro de massas obtido por CG-EM para o metabólito 47: manitol 6TMS.



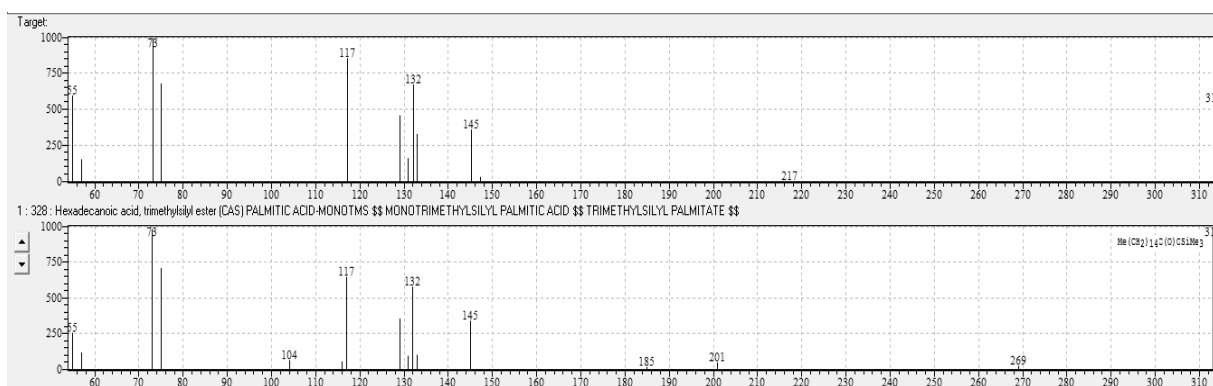
**Anexo 99.** Espectro de massas obtido por CG-EM para o metabólito 48: ácido p-cumárico 2TMS.



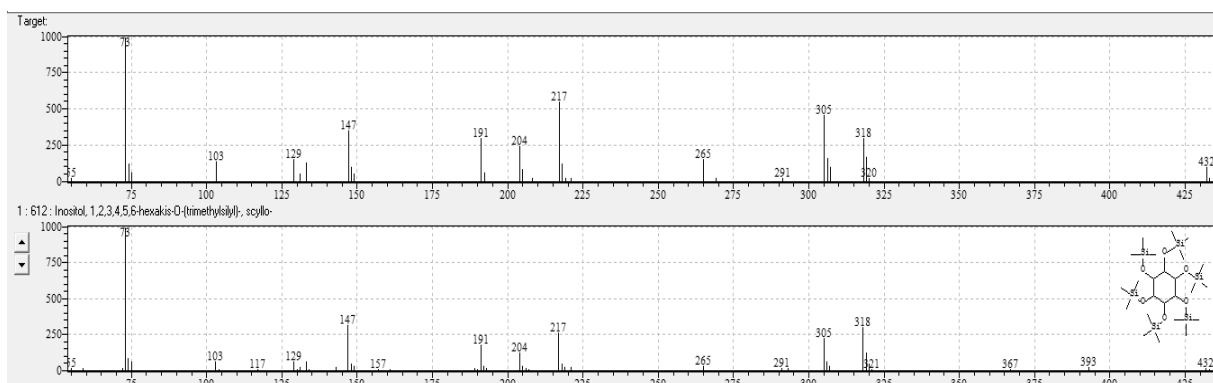
**Anexo 100.** Espectro de massas obtido por CG-EM para o metabólito 49: tirosina 3TMS.



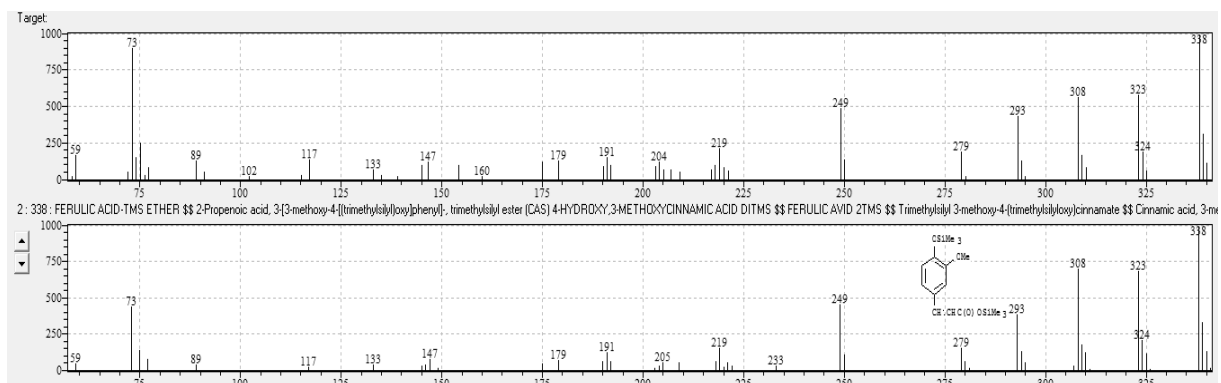
**Anexo 101.** Espectro de massas obtido por CG-EM para o metabólito 50: ácido galactônico 6TMS.



**Anexo 102.** Espectro de massas obtido por CG-EM para o metabólito 51: ácido palmítico TMS.

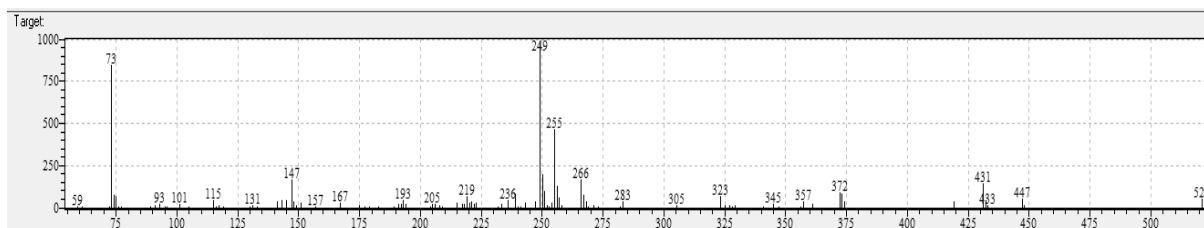


**Anexo 103.** Espectro de massas obtido por CG-EM para o metabólito 52: inositol 6TMS.

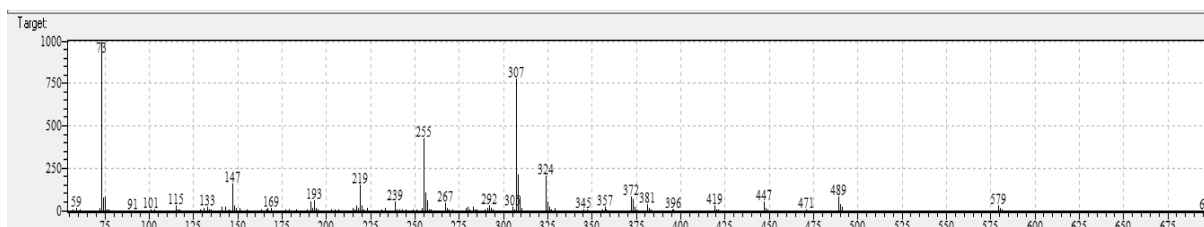


**Anexo 104.** Espectro de massas obtido por CG-EM para o metabólito 53: ácido ferúlico 2TMS.

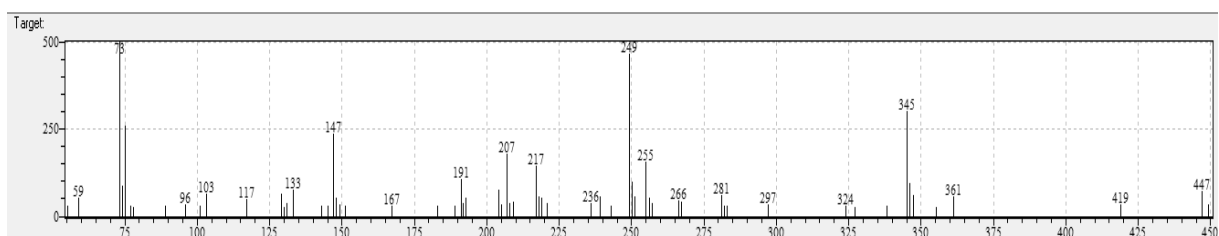




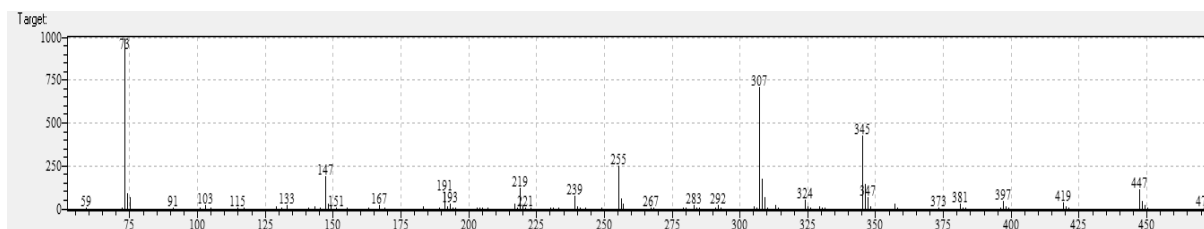
**Anexo 109.** Espectro de massas obtido por CG-EM para o metabólito 58: ácido 4-feruloilquínico 6TMS – Não identificado pela biblioteca de dados.



**Anexo 110.** Espectro de massas obtido por CG-EM para o metabólito 59: ácido 4-cafeoilquínico 6TMS – Não identificado pela biblioteca de dados.



**Anexo 111.** Espectro de massas obtido por CG-EM para o metabólito 60: ácido 3-feruloilquínico 6TMS – Não identificado pela biblioteca de dados.



**Anexo 112.** Espectro de massas obtido por CG-EM para o metabólito 61: ácido 3-cafeoilquínico 6TMS – Não identificado pela biblioteca de dados.