



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA E FÍSICO-QUÍMICA
CURSO DE QUÍMICA BACHARELADO

THIAGO KELVIN BRITO MATOS

ESTUDOS DE VARIABILIDADE METABOLÔMICA DE ESPÉCIES DE PALMA

FORTALEZA

2016

THIAGO KELVIN BRITO MATOS

ESTUDOS DE VARIABILIDADE METABOLÔMICA DE ESPÉCIES DE PALMA

Monografia apresentada ao Curso de Bacharelado em Química do Departamento de Química Analítica e Físico-química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel em Química com Habilitação Industrial.

Orientador Pedagógico: Prof.^a Dr.^a Gisele Simone Lopes

Orientador Profissional: Dr.^o Guilherme Julião Zocolo.

FORTALEZA

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M382e Matos, Thiago Kelvin Brito.

Estudos de variabilidade metabolômica de espécies de palma / Thiago Kelvin Brito Matos. – 2016.
41 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências,
Curso de Química, Fortaleza, 2016.

Orientação: Profa. Dra. Gisele Simone Lopes.

Coorientação: Prof. Dr. Guilherme Julião Zocolo.

1. Opuntia. 2. Metaboloma. I. Título.

CDD 540

THIAGO KELVIN BRITO MATOS

ESTUDOS DE VARIABILIDADE METABOLÔMICA DE ESPÉCIES DE PALMA

Monografia apresentada ao Curso de Bacharelado em Química do Departamento de Química Analítica e Físico-química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel em Química com Habilitação Industrial.

Aprovada em 24/06/2016

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Gisele Simône Lopes (Orientadora pedagógica)
Universidade Federal do Ceará

Dr. Guilherme Julião Zocolo (Orientador profissional)
Embrapa Agroindústria Tropical

Dr. Edy Sousa de Brito
Embrapa Agroindústria Tropical

À minha família, que me apoiou durante toda a vida e se dedicaram para que eu me tornasse quem sou hoje.

AGRADECIMENTOS

À minha família, principalmente minha irmã, com quem moro em Fortaleza e que sempre pode me ajudar no possível para tornar os dias menos cansativos.

Ao pesquisador e meu orientador profissional, Guilherme Julião Zocolo, que não apenas aceitou o convite, mas sim me acompanhar nesta caminhada de novos conhecimentos.

À minha orientadora pedagógica Prof.^a Dr.^a Gisele Simone Lopes por aceitar me orientar nesse projeto e ser sempre solicita quando precisei da sua ajuda.

À Embrapa Agroindústria Tropical pela oportunidade e pela infraestrutura fornecida para o desenvolvimento deste trabalho.

À equipe técnica da Embrapa Agroindústria Tropical, pela recepção e a convivência agradável ao longo dos dias.

Agradeço em especial ao analista Paulo Riceli, pela grande ajuda que recebi durante o trabalho e por estar sempre disposto a ajudar.

Agradeço imensamente aos meus amigos Luís Alves e Lucas Catunda, por me ajudarem na construção trabalho sempre debatendo comigo sobre os temas para que pudéssemos dividir os conhecimentos específicos e gerais relativos ao projeto.

Agradeço aos meus amigos Amanda Lemos, Davi Rabelo, Igor Alves, Lícia Luz e Luiza Sena por estarem sempre ao meu lado durante o todo o semestre e pela ajuda mutua, já que nesse semestre, somos todos monografistas.

Agradeço a todos os meus amigos das turmas de 2012.1 e 2013.1, especialmente os que encontraram a felicidade em outro curso de graduação. Que possamos manter a amizade por muito mais tempo, pois a distância física não será suficiente para nos distanciar.

RESUMO

A palma forrageira é uma cultura de grande importância nas regiões do semiárido nordestino, o que afeta diretamente o sucesso econômico da pecuária dessa região. É utilizada principalmente como planta forrageira, pois essa cactácea é capaz de produzir grande quantidade de matéria verde mesmo em longos períodos sem chuva. Entretanto, esta planta está sujeita ao ataque por pragas, em especial a Cochonilha do Carmim. Apesar de existirem espécies de palma resistentes ao patógeno, a base metabolônica dessa resistência não é conhecida e estudos que visam estabelecer uma relação entre a composição química e a resistência do hospedeiro ao patógeno ainda não foram explorados. O estudo da variabilidade metabolônica deste trabalho foi realizado em 4 amostras de palma: palma gigante (controle), palma doce, palma IPA e palma orelha de elefante. Este estudo propõe comparar o nível de metabolitos em cladódios de diferentes cultivares de palma, com resistência diferencial ao patógeno, realizando análises por cromatografia de ultra performance acoplada a espectrometria de massas de alta resolução (UPLC-QTOF-MS^E). O software MassLynx, (Waters Corporation) foi utilizado para o tratamento dos dados do UPLC. Todas as fórmulas moleculares possíveis foram calculadas. Essas análises visam confirmar a relação entre as substâncias detectadas com a resistência da palma a cochonilha. Neste estudo, pôde-se verificar a ocorrência de flavonoides do grupo das isoramnetinas como grande grupo diferenciador entre as espécies de palma.

Palavras-chave: Opuntia. Estudo de Metaboloma. UPLC-QTOF-MS^E.

ABSTRACT

The prickly pear is a cultivation that has big importance on the Brazilian northeast semiarid area, which affects directly the economic success of this area. The prickly pear is mainly used as a forage plant, because this cactaceous is able to produce a great amount of green matter even in long rainless periods. However, the prickly pear is being attacked by a plague, especially the Carmine Cochineal. Although there are species that are resistant to this pathogen, the metabolomics base of this resistance is not known and studies that focus on establish a relation between the chemical composition and the resistance to the pathogen of the host are yet not explored. The metabolomics study of this research was done in four samples of prickly pear: giant pear (control), IPA pear, elephant ear pear e sweet pear. The study also proposes to compare the metabolites level in different cladodes from different prickly pear cultivars, in which each cultivar has a different level of resistance to the pathogen, by chromatographic analysis in an ultra-performance system coupled with a high-resolution mass spectrometry (UPLC-QTOF-MS^E). The MassLynx software, (Waters Corporation) was used to process the UPLC data. All possible molecular formulas were calculated. These analyses aim to confirm the relation between the detected substances with the prickly pear resistance to the Carmine Cochineal. It was possible to verify the occurrence of flavonoids from the isorhamnetins as the big differentiating group among the prickly pear species.

Keywords: Opuntia. Metabolomics. UPLC-QTOF-MS^E.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – principais espécies de Palma Forrageira cultivadas no Brasil (Gigante a esquerda e miúda a direita).....	3
Figura 2 - Frutos da Opuntia Ficus-indica.....	5
Figura 3 - Cochonilha do Carmim (macho à esquerda e fêmea à direita)	6
Figura 4 – Estrutura do ácido carmínico complexado com alumínio.....	7
Figura 5 - Palma forrageira após ataque de praga	8
Figura 6- Esquema apresentando o fluxo de trabalho em estudos de metabolômica.....	12
Figura 7 - Esquema representativo de um sistema de cromatografia	14
Figura 8 - Modelo de ionização por electrospray	15
Figura 9 - Exemplo de quadrupolo e principais componentes	16
Figura 10- Esquema explicativo de um analisador TOF	16
Figura 11 – Comparação dos perfis cromatográficos do extrato da palma controle analisado nos modos positivo e negativo.	22
Figura 12 - Cromatograma das amostras com moléculas identificadas: A – palma Gigante... ..	27
Figura 13 - Espectro MS/MS composto 18 – isoramnetina.	30
Figura 14 - Espectro MS/MS do composto 14 - Isoramnetina-ramnosil-hexosídeo.	31
Figura 15 - Espectro MS/MS do composto 15 - Isoramnetina-3-O-glucose.....	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Taxa de sobrevivência e produção de cladódios de plantas O. aurantiaca em um período de 5 anos	8
Tabela 2- Característica de subespécies de palma.....	9
Tabela 3 – Massa seca das amostras de palma após primeira liofilização.	21
Tabela 4 - Homogeneização das amostras de palma com terra diatomácea.....	21
Tabela 5 - Massa dos extratos de palma após a finalização do processo de extração.	21
Tabela 6 – Componentes das amostras de Palma no modo de ionização negativo	24
Tabela 7 – Componentes das amostras de Palma no modo de ionização positivo	25
Tabela 8 – Distribuição de metabólitos nas amostras de palma (modo negativo)	26
Tabela 9 – Distribuição de metabólitos nas amostras de palma (modo positivo)	26

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1	Palma Forrageira	2
2.1.1	Palma Forrageira no mundo	3
2.1.2	Palma Forrageira no Brasil.....	4
2.2	Aplicações de Palma Forrageira	4
2.3	Cochonilha	5
2.3.1	Produção de corante a base de cochonilha	7
2.3.2	Cochonilha para controle biológico de palma	8
2.4	Espécies de palma e a cochonilha	9
2.5	Metabolômica	10
2.5.1	Impressão digital metabólica	11
2.6	Visão de um estudo metabolômico	11
2.6.1	Coleta de amostras e extração.....	12
2.6.2	Aquisição de dados.....	13
2.6.2.1	Cromatografia Líquida	13
2.6.2.2	Espectrometria de massas.....	14
3	OBJETIVOS	17
3.1	Objetivo Geral	17
3.2	Objetivos Específicos	17
4	MATERIAIS E MÉTODOS	18
4.1	Material Botânico.....	18
4.2	Preparo de Amostras	18
4.3	Experimentos em UPCL-QTOF-MS^E	19

4.4	Identificação estrutural	19
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
5.1	Rendimento.....	21
5.2	Análise em UPLC-QTOF-MS^E	22
5.3	Identificação molecular	23
6	CONCLUSÃO.....	33
	REFERÊNCIAS	34

1 INTRODUÇÃO

A palma forrageira é uma cactácea que vem sido cultivada nas áreas mais secas ao redor do mundo com o objetivo de produção de alimentos para gado (forragem), frutos, cosméticos, medicamentos naturais e até alimentação humana em alguns países que fazem a utilização dos cladódios da palma para complemento alimentar (SENAR, 2013).

O Semiárido Brasileiro possui uma área de 969.589,4 km², a qual representa 60% da região Nordeste e 11,39% do território nacional (MINISTÉRIO DA INTEGRAÇÃO NACIONAL, 2005). De acordo com o serviço nacional de aprendizagem rural, SENAR (2013), a palma se adapta bem ao semiárido por ter um metabolismo especializado, chamado de Metabolismo Ácido das Cactáceas (MAC), que produz grande quantidade de matéria verde em períodos de pouca chuva. Porém, esse cacto é atacado por pragas, em especial a cochonilha do carmim. O ataque pode comprometer de maneira parcial ou total uma cultura, portanto, é necessário o controle dessas pragas.

Dentre os métodos mais comuns de controle da praga, o uso de clones resistentes é a melhor alternativa para manter o crescimento da área de cultivo. As demais estratégias, como controle biológico ou controle químico são economicamente inviáveis, considerando a tecnologia disponível nas áreas de plantio (QUEIROZ, 2014).

Nem todas as espécies de Palma apresentam resistência natural a cochonilha do carmim. Já foi observado que clones de palma forrageira Orelha de Elefante e palma Miúda (ou Doce) possuem resistência à cochonilha-do-carmim, enquanto o clone Redonda é altamente suscetível ao ataque dessa praga (SILVA e SAMPAIO, 2015). Porém não foram identificados quais componentes conferem a resistência ao ataque das cochonilhas.

Um meio rápido de diferenciar entre diversas espécies de uma mesma planta, é a realização de um estudo do metaboloma desse conjunto. O estudo trata-se de uma combinação de técnicas analíticas e estatísticas, que proporciona informações sobre as semelhanças e diferenças da gama dinâmica de metabólitos em organismos (MAO e BAI, 2014). O presente estudo foi realizado em 4 espécies de palma com o intuito de se construir a base metabolômica da palma: Palma gigante, palma IPA, palma orelha de elefante e palma doce com o objetivo de identificar possíveis metabólitos que conferem resistência a praga.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PALMA FORRAGEIRA

A palma, originária no México, é uma cultura permanente de importância na indústria agronômica na região Nordeste do Brasil. Apesar do nome singular, é representada por inúmeras espécies com destaque a *Opuntia ficus-indica* por sua vasta utilização agronômica na produção de frutas comestíveis e cladódios, que podem ser utilizados como alimento (forragem) para animais, inclusive para o homem (SOUZA et al., 2008).

A palma é considerada uma das melhores opções para a produção de forragem em sistema de sequeiro no semiárido, associada à disponibilidade ao consumo dos animais, mesmo sob período de estiagem prolongada, com capacidade de atingir altas produtividades de biomassa por área, sendo a cultura mais estável ao longo do tempo (ROCHA, 2012).

Opuntia são arbustos verticais que podem chegar de 3,5 a 5 metros de altura. O sistema radicular é extenso, densamente ramificado e com muitas raízes superficiais finas que são absorventes e altamente adequadas para zonas áridas. O comprimento das raízes está intimamente relacionado com as condições agroambientais e com as práticas de gestão de culturas - particularmente o uso e aplicação de irrigação e fertilizantes (SÁENZ, 2013).

A palma forrageira é uma planta rústica que tem um bom desenvolvimento em região com pouca chuva. Entretanto, informações sobre umidade do ar e do solo, temperatura média do dia e da noite são determinantes na produção (ROCHA, 2012).

Os aspectos fisiológicos da palma que a torna uma opção interessante para zonas áridas e semiáridas são: cutícula impermeável que retém água no interior da planta, menor número de estômatos e ao aparelho fotossintético (ROCHA, 2012). Cada órgão das plantas de palma possui adaptações de extrema eficiência no aproveitamento da água, com captação da energia solar durante o dia e a fixação do CO₂ durante a noite, que a diferencia da maioria das outras plantas (RAMOS, 2011).

De acordo com a Food and Agriculture Organization (FAO) (2013), a taxonomia da palma é altamente complexa por algumas razões: os seus fenótipos mostram elevada variabilidade de acordo com as condições ambientais prevalecentes, a poliploidia é um

fenômeno comum e a palma pode se reproduzir tanto sexuada quanto assexuada e ela possui vários híbridos interespecíficos.

2.1.1 Palma Forrageira no mundo

A palma tem a variabilidade de germoplasma mais vasta, bem como o maior número de usos, e cresce também em várias outras partes do mundo como a África, Austrália, a bacia do Mediterrâneo, e algumas partes da Ásia (YAHIA, 2011).

Em todo o mundo, já foram catalogados, aproximadamente, 300 espécies de cactáceas pertencentes ao gênero *Opuntia*, que estão distribuídas desde o Canadá até a Argentina (SILVA, 2012). A planta se espalhou ainda mais quando foi transportada por pessoas como produtos de negociadores e vendidas pela África, Ásia, Europa e Austrália, onde as plantas foram cultivadas, mas também tiveram um crescimento silvestre, e continuaram a fornecer alimentos e materiais (SÁENZ, 2013).

Figura 1 – principais espécies de Palma Forrageira cultivadas no Brasil (Gigante a esquerda e miúda a direita)



Fonte: ROCHA (2012).

De acordo com Silva et al (2012) vários países estão cultivando a Palma, tais como Itália, Espanha, Portugal, Israel, África do Sul, Egito, Líbia, Tunísia, Marrocos, México, Estados Unidos da América, Colômbia, Bolívia, Peru, Brasil e Chile. O México destaca-se como maior produtor de frutos e verduras a partir da Palma (SILVA, 2012).

2.1.2 Palma Forrageira no Brasil

De acordo com Rocha (2012), a introdução de Palma no país ocorreu no final do século XVIII. A priori, era destinada à criação de uma cochonilha capaz de produzir corante muito utilizado na química têxtil da época. E somente no início do século XX, como planta forrageira.

No semiárido brasileiro, adaptou-se bem devido à capacidade adaptativa do gênero *Opuntia*, principalmente por conta da rusticidade e capacidade de resistir a climas áridos e semiáridos com uma baixa demanda de água e altas temperaturas (SOUZA, MOURA, *et al.*, 2008.).

O Brasil possui a maior área de plantio de Palma no mundo, superior a 500 mil hectares predominantemente no Nordeste (SILVA *et al.*, 2012) e apresenta diversas funções: alimentação animal e humana, função medicinal e elaboração e composição de cosméticos (SILVA, 2012). O Brasil tem como principal espécie a *Opuntia ficus-indica*, também conhecida como palma forrageira Gigante (SILVA e DONATO, 2016).

2.2 APLICAÇÕES DE PALMA FORRAGEIRA

Segundo Silva e Donato (2016), a palma representa um suporte fundamental na alimentação do gado na região semiárida brasileira, por causa da alta tolerância aos períodos de seca, que podem durar até 5 meses seguidos, e ainda assim manter a sua atividade fotossintética. A palma apresenta baixo teor de matéria seca e elevada concentração de água, constituído de 90% de água e apenas 10% de matéria seca (RIBEIRO, 2010), o que a torna um alimento importante para os rebanhos em períodos de longas estiagens, pois fornece não apenas alimento verde, mas também fornece uma grande quantidade de água para os animais (SILVA *et al.*, 2012).

A palma é rica em vitaminas e em carboidratos, nutrientes escassos na vegetação da região Nordeste. Adicionalmente a esses nutrientes, a palma também apresenta uma quantidade importante de minerais como Ca^{+2} , Mg^{+2} , Na^+ , K^+ , Fe^{+2} e fibras como lignina, celulose, hemicelulose, pectina e aminoácidos (RIBEIRO, 2010).

A base da alimentação do rebanho leiteiro, na maior parte do ano, é composta de dois tipos de palmas forrageiras: *Opuntia ficus-indica* Mill e *Nopalea cochenillifera* Salm-Dyck, por serem culturas adaptadas às condições edafo-climáticas e apresentarem alta produção por unidade de área (MELO, 2006). Porém, a palma apresenta baixa porcentagem de fibra, comparada com alimentos volumosos, podendo causar distúrbios metabólicos, como diarreias, necessitando, portanto, de complementação com outros volumosos, como silagens, fenos e capins (MELO, 2006).

A FAO (2013) mostra que as frutas da palma também têm diversas aplicações na indústria de alimentos como por exemplo na produção de sucos, geleias e bebidas alcoólicas fermentadas; onde esses produtos são bastante difundidos no México. O fruto de palma é atraente para produção de alimentos, o que ocasionou um aumento na procura do mercado por esse fruto e seus derivados, o que tem levado pesquisadores a desenvolver técnicas para aumentar o tempo de armazenamento do produto (LOPES, 2013).

Figura 2 - Frutos da *Opuntia Ficus-indica*



Fonte: Lopes (2013).

2.3 COCHONILHA

A cochonilha é um inseto pertencente à família *Dactylopiidae*, e parasitam cactos em áreas tropicais e subtropicais do México e América do Sul (CHIELI, 2016). Insetos

Dactylopius, "cochonilhas", tem seus corpos, coloridos de vermelho, e que são cobertos com uma secreção conspícuia branca e cerosa (CHÁVEZ-MORENO, 2010).

A cochonilha do carmim, principal praga da palma, é um inseto de origem mexicana que apresenta metamorfose completa e um ciclo de vida de aproximadamente 90 dias, com variações dependendo do ambiente, principalmente temperatura. O inseto adulto macho é alado, e morre logo após a cópula. As fêmeas têm aparência semelhante a um carapato, medem em média 6,0 por 4,7 mm, possuem aparelho bucal picador-sugador, colocam 400 a 600 ovos e, após a postura dos ovos, morrem (CHIACCHIO, 2008).

Figura 3 - Cochonilha do Carmim (macho à esquerda e fêmea à direita)



Fonte: Lopes (2013).

Até a segunda metade do século 19, antes do advento dos corantes sintéticos, apenas corantes naturais eram utilizados. Um dos principais corantes utilizados em todo o mundo foi a cochonilha, corante de cor carmim e principal corante desta tonalidade, de importância histórica (BŁYSKAL, 2015). A introdução de palma no Brasil no final do século XVIII, a priori, era destinada à criação de uma espécie de cochonilha (*Dactylopius coccus*) capaz de produzir este corante (ROCHA, 2012).

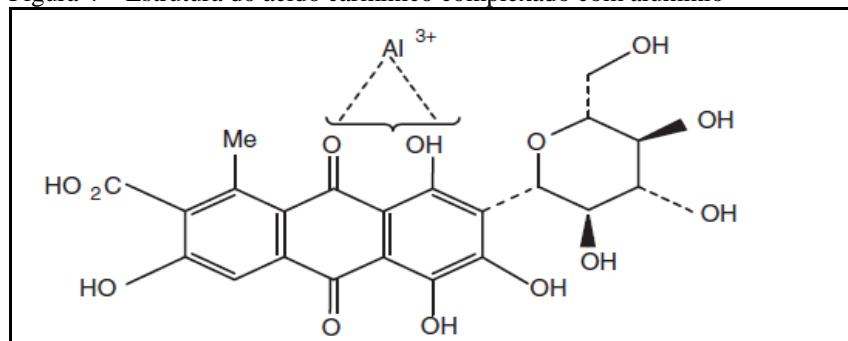
O corante cochonilha pode existir como dois produtos: extrato simples contendo ácido carmínico e quantidades consideráveis de produtos solúveis nesse ácido. O segundo produto é chamado simplesmente de carmim. (HORST e ARND , 2011).

2.3.1 Produção de corante a base de cochonilha

A fonte do corante, de cor vermelha, é a fêmea dos insetos *Dactylopius coccus* Costa pertencentes à subordem *Coccoidea*. Eles vivem apenas em cactos, preferindo *Opuntia cochenillifera* sem espinhos (Palma Forrageira) ou *Nopalea cochenilli* (Palma doce) (BŁYSKAL, 2015). Também de acordo com Błyskal (2015) mulheres Incas aplicavam cochonilha como um cosmético, ceramistas como uma decoração, decoradores usavam em paredes, e os artistas pintando seus afrescos com o corante. Mas mais frequentemente, foi usado em têxteis, produzindo vários tecidos tingidos com corante de cochonilha.

De acordo com Horst e Arnd (2011), o corante natural da cochonilha é o ácido Carmínico. O seu isolamento é obtido como um sal de cálcio de um complexo de alumínio aniónico de ácido carmínico desprotonado como ligante. A figura 2 mostra a estrutura do ácido carmínico após ser isolado.

Figura 4 – Estrutura do ácido carmínico complexado com alumínio



Fonte: Horst e Arnd (2011).

O processamento industrial convencional de corante de cochonilha é um processo de múltiplas etapas, constituído por tratamento com solventes orgânicos, extração alcalina, separação sólido-líquido (floculação e filtração), a formação subproduto insolúvel, a recuperação do precipitado (centrifugação), solubilização do ácido carmínico e concentração (BORGES , 2011).

De acordo com Borges (2011), recentes pesquisas tentam usar novas formas de extração para obtenção de ácido carmínico: extração por líquido pressurizado e extração com fluido supercrítico. Essas técnicas de extração podem proporcionar uma maior seletividade, por não extraírem juntamente com o ácido carmínico proteínas derivadas dos insetos, e

tempos mais curtos de extração, além de serem mais efetivas, aumentando a qualidade do produto.

2.3.2 Cochonilha para controle biológico de palma

De acordo com CHIELI (2016), a cochonilha se alimenta primariamente de Palma e como trata-se de insetos sésseis, se instalam nos cactos e colonizam a planta como um todo. Um estudo de controle biológico realizado na África do Sul, onde 255 plantas foram utilizadas, nas quais 103 não foram colonizadas por cochinilhas e 152 foram atacadas. O estudo mostrou que a cochonilha é de longe o mais importante agente de controle biológico de *O. aurantiaca* na África do Sul. Os insetos são prejudicados pela chuva e parecem florescer em condições quentes e secas (MORAN e ZIMMERMANN, 1991).

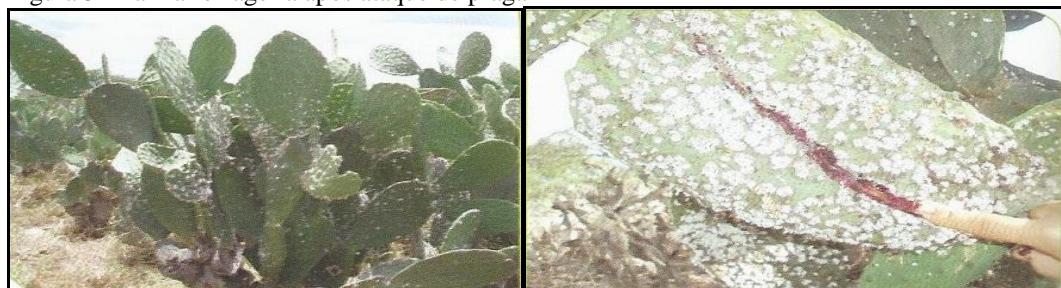
Tabela 1 - Taxa de sobrevivência e produção de cladódios de plantas *O. aurantiaca* em um período de 5 anos

	Sem colonização	Colonizado por cochonilha
Sobrevivência da Palma (%)	100	23
Total de cladódios produzidos	17348	3666
Média de cladódios por planta	168	24
Cladódios que enraizaram (%)	63	6

Fonte: Moran e Zimmermann (1991).

A tabela 1 mostra a influência da colonização de cochinilhas no desenvolvimento da palma. No estudo, 77% das palmas atacadas pelas cochinilhas morrem, e apenas 6% dos cladódios enraizaram, queda de 90% em comparação com as palmas não atacadas. Isso define porque as plantas colonizadas não produzem forragem suficiente para ser utilizada na pecuária como alimento de gado. A figura 5 mostra a consequência dos ataques.

Figura 5 - Palma forrageira após ataque de praga



Fonte: SENAR (2013).

Um segundo estudo com 4 tipos de insetos para realização do controle biológico, a mariposa *Cactoblastis cactorura*, a cochonilha *Dactylopius opuntiae* e dois besouros, *Archagocheirus funestus* e *Metamasius spinolae*, mostrou que a cochonilha é o inseto que mais contribuiu para a devastação de quase 75% da área com palma forrageira, incluindo as áreas mais densas, os outros insetos tiveram ação mais local e isolada (ZIMMERMANN e MORAN, 1991).

2.4 ESPÉCIES DE PALMA E A COCHONILHA

A palma forrageira é uma angiosperma pertencente à família das cactáceas. Nessa família existem 178 gêneros com cerca de 2.000 espécies conhecidas; todavia as espécies dos gêneros *Opuntia* e *Nopalea*, são as mais utilizadas como forrageiras (OLIVEIRA, 2011).

A tabela 2 apresenta características das espécies de palma incluindo a resistência à praga chamada de cochonilha do carmim. Estão especificadas na tabela as 4 espécies que são mais plantadas na região nordeste do Brasil e que formam a dieta do gado dessa região semiárida.

Tabela 2- Característica de subespécies de palma

Característica	Espécie de palma			
	Gigante	Redonda	Doce	Orelha de elefante
Porte	Grande	Médio	Pequeno	Pequeno
Produtividade	Alta	Baixa	Baixa	Média
Valor nutricional	Baixo	Baixo	Alto	Alto
Resistencia a Praga	Suscetível	Suscetível	Resistente	Resistente

Fonte: Rocha (2012) e SENAR (2013)

É possível destacar na tabela que fatores como porte, produtividade e valor nutricional não influenciam na resistência ou suscetibilidade da palma a ataques da cochonilha do carmim. Portanto, se faz necessário um estudo de palma visando entender o funcionamento metabolômico da palma, para a determinação de biomarcadores possivelmente responsáveis por essa característica presente apenas em algumas espécies de palma.

2.5 METABOLÔMICA

Metabolômica, é um novo campo das ciências denominadas “ômicas”, que tem sua base na identificação/catalogação de metabólitos totais em organismos. As expectativas são de que se torne uma ferramenta poderosa para a genômica funcional (KRASTANOV, 2010).

A metabolômica é definida como a medição de todos os metabólitos, metaboloma, num determinado sistema (célula, tecido ou organismo) sob um dado conjunto de condições (ERNST, 2013). Estudos de metaboloma permitem a compreensão das funções fisiológicas e por consequencia dos potenciais biomarcadores encontrados em estudos intra e interespecíficos (TAKAYAMA e MOCHIZUKI, 2015).

A palavra metaboloma foi primeiramente sugerida por Stephen Oliver para designar o conjunto de compostos de baixa massa molecular sintetizados por um organismo. Algum tempo depois, foi definido metabolômica como o estudo de todos os compostos químicos de baixa massa molecular, metabólitos, presentes em organismo e que são produtos finais das funções celulares (FRAIGE, 2012).

De acordo com Queiroz, Wolfender, *et al.*, (2014), essa ciência tem como objetivo final a análise detalhada tanto qualitativamente quanto quantitativamente dos metabólitos de uma planta, que incluem intermediários metabólicos, hormônios, moléculas sinalizadoras e metabólitos secundários.

Ao longo da última década, o estudo metabolômico emergiu como uma ferramenta poderosa utilizada numa variedade de campos muito diferentes para o desenvolvimento de hipóteses, para elaborar as funções dos genes desconhecidos e a descoberta de biomarcadores (BOOTH, WELJIE e TURNER, 2013).

Metabolômica é uma ciência transdisciplinar, complexa que contempla áreas tais como: química orgânica, química analítica, quimiometria, informática e biociênciia. É o estudo de como o perfil metabólico de um complexo sistema biológico muda em resposta a estresses como doenças, exposição a substâncias tóxicas, ou mudança na dieta (KRASTANOV, 2010).

De acordo com Enrst (2013), ainda não é possivel uma análise completa de todos os metabólitos presentes na metaboloma de um organismo. Alguns termos foram introduzidos para poder diferenciar as distintas maneiras de se analisar um metaboloma. Tratam-se de

termos como: impressão digital metabólica, catalogação de metabólitos e análise de metabólito alvo, dentre os quais destaca-se a impressão digital metabólica.

2.5.1 Impressão digital metabólica

A chamada “impressão digital metabólica” é uma triagem rápida de alto rendimento visando a classificação da amostra por reconhecimento de padrões (OLIVEIRA, 2015). Grandes diferenças entre as amostras são encontradas através de análise multivariada de dados dos espectros de picos não identificados (ERNST, 2013).

Metabolômica e impressão digital metabólica estão sendo extensivamente empregados para uma melhor compreensão das mudanças biológicas induzidas por fatores endógenos ou exógenos (BARRI e HOLMER-JENSEN, 2012).

Queiroz, Wolfender, *et al.*, (2014) discutem que o objetivo não é a identificação de cada metabolito individualmente, mas sim a comparação de padrões de diferentes impressões digitais e as suas mudanças em um dado sistema biológico. Outra característica marcante é que pode ser realizada sem a separação cromatográfica prévia dos componentes de um extrato.

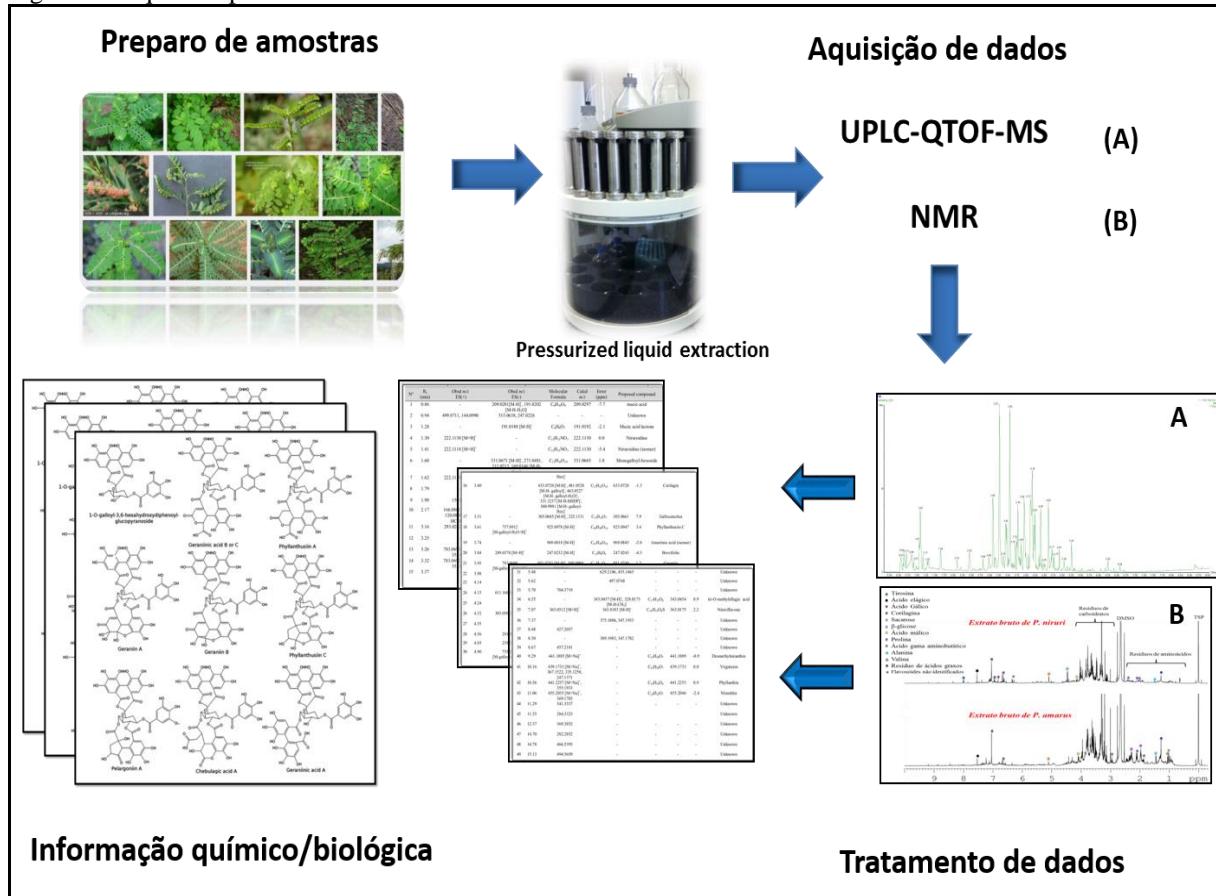
A variação de metabólitos é observada, principalmente, analisando o total de mudanças de padrões cromatográficos sem o conhecimento prévio dos compostos investigados; portanto, a identificação do metabolito não é obrigatória. Esta abordagem não é iniciada por uma hipótese a priori, o que a torna aberta a novas descobertas (KRASTANOV, 2010).

2.6 VISÃO DE UM ESTUDO METABOLÔMICO

No campo de estudos vegetais, a metabolômica está desempenhando um papel cada vez mais importante, pois pode proporcionar a descoberta de compostos ativos em extratos complexos de plantas, que não podem ser identificados por métodos convencionais. Esse tipo de abordagem holística modificou consideravelmente a maneira como as questões biológicas são investigadas (QUEIROZ, WOLFENDER, *et al.*, 2014).

A figura 6 traz, resumidamente, as etapas para prosseguir em um estudo metabolômico de uma planta. Técnicas analíticas são utilizadas em conjunto para construir uma base de dados sobre o extrato do organismo em questão. Os dados então são tratados por métodos quimiométricos para a identificação dos biomarcadores, compostos ativos.

Figura 6- Esquema apresentando o fluxo de trabalho em estudos de metabolômica.



Fonte: Feito pelo autor.

2.6.1 Coleta de amostras e extração

O método de coleta varia de acordo com o tipo de estudo (fisiologia vegetal, fenotipagem, quimiotaxonomia, resposta ao estresse, etc.). Sob condições controladas, a variabilidade biológica das plantas tende a diminuir (QUEIROZ, WOLFENDER, *et al.*, 2014).

Um passo crucial que influencia o resultado de experiências metabolômicas em plantas é a extração. A extração do material vegetal deve ocorrer dentro de um prazo muito curto para evitar que processos bioquímicos ocorram (ERNST, 2013).

Segundo Krastanov (2010), o tipo de extração usado é dependente do grupo alvo de metabólitos a serem investigados e deve estar em conformidade com as características químicas. Isto porque o agente de extração vai afetar a recuperação de diferentes classes de metabólitos. Como o estudo de metabolômica envolve a criação de um perfil para todos os metabólitos, a seleção de um procedimento de extração ótima deve ser investigada juntamente com a escolha plataforma analítica, para desenvolver-se um sistema eficiente nos dois quesitos.

2.6.2 Aquisição de dados

Métodos tais como espectrometria de massa acoplada a cromatografia gasosa ou cromatografia líquida (GC-MS e LC-MS), espectrometria de massa de injeção direta (DIMS), ressonância magnética nuclear (RMN), espectrometria de massa de eletroforese capilar (CE-MS), cromatografia líquida de alta performance com detector de arranjo de fotodiodos (HPLC-PDA) e cromatografia de camada delgada com detecção por UV (CCD-UV), entre outros, têm sido descritos como métodos utilizados para a análise e aquisição de dados (ERNST, 2013).

As propriedades físico-químicas específicas de diferentes grupos de metabólitos aumentam ainda mais a complexidade de estudos metabolômicos, que têm sido a força motriz para o desenvolvimento de vários protocolos, bem como a aplicação de uma vasta gama de plataformas analíticas (GROMSKI e MUHAMADALI, 2015).

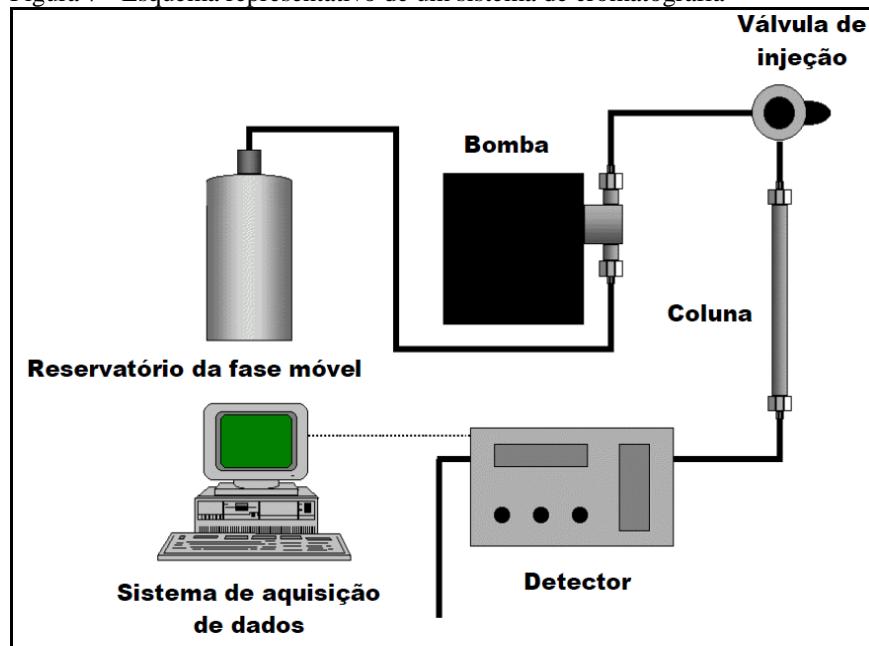
2.6.2.1 Cromatografia Líquida

Cromatografia Líquida é a mais amplamente utilizada de todas as técnicas de separação analítica. As razões para a popularidade do método é sua sensibilidade, pronta adaptabilidade às determinações quantitativas precisas, facilidade de automação, adequação para a separação de espécies voláteis termicamente frágeis ou não, e acima de tudo, a sua

aplicabilidade generalizada a substâncias que são importantes para a indústria (SKOOG, HOLLER e CROUCH, 2007).

Segundo Fraige, (2012) a cromatografia é um método físico de separação no qual os componentes a serem separados são distribuídos seletivamente entre duas fases imiscíveis, uma fase móvel e uma fase estacionária. Um sistema de cromatografia é constituído basicamente de uma bomba de alta pressão para eluição da fase móvel, injetor, coluna cromatográfica, detector e o sistema de aquisição de dados, como apresentado na figura abaixo.

Figura 7 - Esquema representativo de um sistema de cromatografia



Fonte: Fraige, (2012).

De acordo com Ernst (2013), técnicas de separação, tais como cromatografia líquida, pode ser acoplada a espectrometria de massas para estudo metabolômicos.

2.6.2.2 Espectrometria de massas

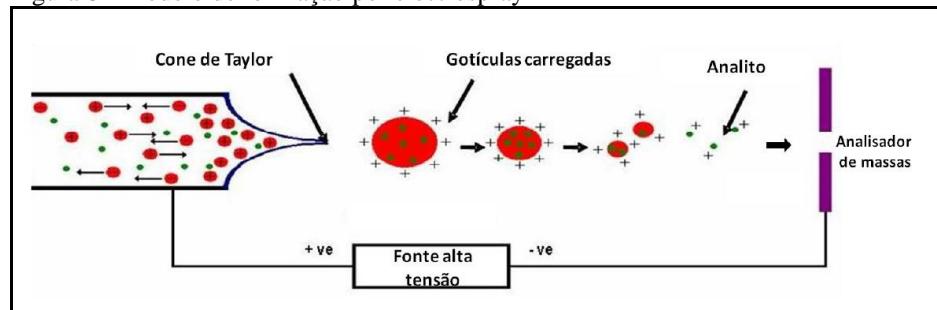
Skoog, Holler e Crouch (2007), definem a espectrometria de massas como uma técnica amplamente aplicável a todos os instrumentos analíticos, no sentido de que a técnica é capaz de fornecer informações sobre a composição química e molecular de estruturas inorgânicas, orgânicas e biológicas; a composição qualitativa e quantitativa de misturas

complexas, a estrutura e a composição de superfícies sólidas, e proporções de isótopos de átomos em amostras.

Nos estudos de metabolômica utilizando espectrometria de massas, existem dois passos críticos: a ionização dos metabólicos e a separação dos íons pelo analisador de massas. Para separação dos íons, podem se utilizar instrumentos com alta e baixa resolução. O tipo de resolução do instrumento vai influenciar, de forma consequente, o número de sinais detectados (QUEIROZ, WOLFENDER, *et al.*, 2014).

Nesse trabalho, a fonte de ionização utilizada foi por electrospray (ESI). Esse processo de ionização ocorre a pressão e temperatura atmosférica. Uma solução levemente básica ou ácida contendo a amostra é bombeada através de um tubo capilar metálico submetido a uma diferença de potencial e forma-se um aerossol (spray) com gotículas carregadas que ao passar por um gás secante causa evaporação do solvente. As gotículas tornam-se cada vez menores de modo que a densidade de carga torna-se tão alta que as moléculas carregadas são ejetadas para fase gasosa, seguindo para o analisador de massas (FRAIGE, 2012).

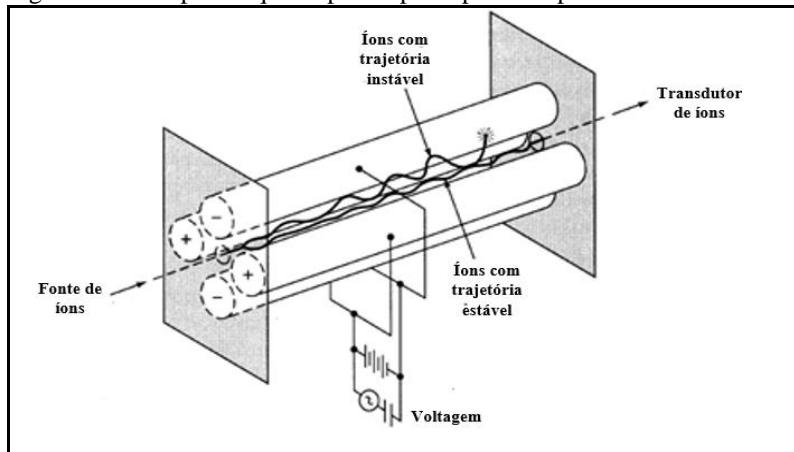
Figura 8 - Modelo de ionização por electrospray



Fonte: Fraige (2012).

O tipo de analisador utilizado foi um Quadrupolo acoplado a um analisador de Tempo-de-Voo (QTOF). O coração de um instrumento quadrupolo são os quatro cilíndricos paralelos (originalmente hiperbólicas) hastes que servem como eletrodos. Hastes opostas são conectadas eletricamente, um par anexado ao terminal positivo de uma fonte elétrica variável e o outro par ao terminal negativo (SKOOG, HOLLER e CROUCH, 2007). Um esquema de composição de um quadrupolo é mostrado na figura 9.

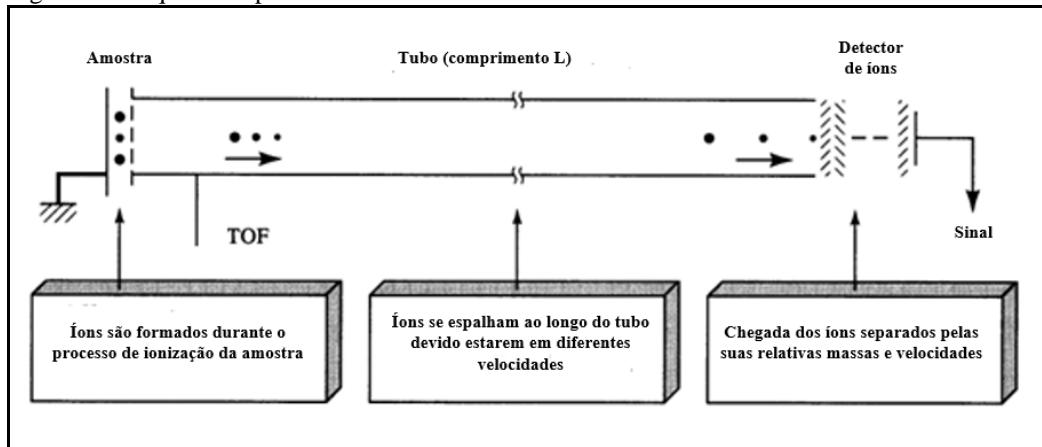
Figura 9 - Exemplo de quadrupolo e principais componentes



Adaptado de: Skoog, Holler e Crouch (2007).

Em instrumentos de Tempo-de-Voo (TOF) os íons que entram no tubo, idealmente, deveriam ter a mesma energia cinética, as suas velocidades variam de maneira inversa em relação com as suas massas, com as partículas mais leves chegando ao detector mais cedo do que as mais pesadas (SKOOG, HOLLER e CROUCH, 2007). A figura 10 traz um esquema mostrando todas as etapas envolvidas no analisador Tempo-de-Voo.

Figura 10- Esquema explicativo de um analisador TOF



Adaptado de: Skoog, Holler e Crouch (2007).

Os dados brutos de metabolômica apresentam uma mina de ouro de informação. Para garantir que a informação metabólica apresente conhecimento valioso, considerável análise de dados é necessária. A Quimiometria tornou-se uma ferramenta crucial e dedicada para extrair informações valiosas de dados (YI e DONG, 2016).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho é realizar um estudo metabolômico relativo a resistência e suscetibilidade de diferentes tipos de Palma a pragas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

A partir do uso da técnica de impressão digital metabólica, encontrar e identificar os princípios ativos que expressam resistência a pragas.

Realizar caracterizações utilizando o sistema acoplado UPLC-QTOF-MS^E para o melhor entendimento das diferenças entre as espécies de Palma e auxiliar na identificação dos biomarcadores de resistência.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAL BOTÂNICO

As espécies palma IPA sertarea, palma orelha de elefante, palma doce (ou miúda) e palma gigante (controle), única amostra suscetível ao ataque da cochonilha do carmim, foram cedidas pela Empresa de Pesquisa Agropecuária do Rio Grande do Norte (EMPARN) e cultivadas na Fazenda Alberto-Antônio no município de Trairi, estado do Ceará.

4.2 PREPARO DE AMOSTRAS

O material foi cortado em cubos de 1cm x 1cm, liofilizados por 4 dias e triturados em moinho analítico. Em seguida as amostras foram encaminhadas para o processo de extração através do sistema de extração por solvente acelerado (ASE). As amostras foram homogeneizadas com terra diatomácea (Dionex), adicionadas a células de 66,0 mL e extraídas com solução 70% (v/v) de etanol/água a temperatura de 80°C, em 3 ciclos de extração com 10 minutos de duração. Os extratos foram evaporados em um rotaevaporador rotativo e liofilizados. O material foi condicionado em geladeira para posterior análise em UPLC-QTOF-MS^E.

Foram retirados 15 mg das amostras do extrato etanólico e solubilizadas em 3,0 mL de uma solução MeOH/H₂O 90/10 (v/v), que foi preparada utilizando-se H₂O Milli-Q. Em seguida deixaram-se as 4 soluções por 10 minutos no ultrassom para melhor solubilização. As soluções foram filtradas em membrana de 0,45 µm/ 0,25 mm PTFE previamente ativados com cerca de 2,0 mL de MeOH. Foram utilizados um cartucho C18-E (55 um, 70 A) de 100,0 mg/ 3,0 mL para cada amostra. Os cartuchos foram ativados com 10,0 mL de metanol e condicionados com 10,0 mL de H₂O Milli-Q. Cada amostra foi aplicada a um cartucho e eluida com 1,0 mL de H₂O Milli-Q. O eluato foi coletado e filtrado em membrana de 0,22 µm PTFE previamente ativada com 2,0 mL de MeOH.

4.3 EXPERIMENTOS EM UPCL-QTOF-MS^E

A análise foi realizada em um sistema Acquity UPLC (Waters), acoplado a um sistema de Quadrupolo/Tempo de Voo (QTOF, Waters) pertencente a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA. As corridas cromatográficas foram realizadas em uma coluna C18 Waters Acquity UPLC BEH (150 x 2,1 milímetros, 1,7µm), temperatura fixa de 40 °C, fases móveis água com 0,1% de ácido fórmico (A) e acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico (B), gradiente variando 0-15 min (2-95%) de B; (15,1-17) min (100%) de B; (17,1-19,1) min (2%) de B, fluxo de 0,4 mL/min e volume de injeção de 5 µl. O modo ESI⁻ foi adquirido na faixa de 110-1180 Da, temperatura da fonte fixa a 120 °C, temperatura de dessolvatação 350 °C, fluxo do gás dessolvatação de 500 L/h, cone de extração de 0,5 V, voltagem capilar de 2,6 kV. Em baixo scan, a tensão de cone foi 35 V, energia de colisão de 5 eV (trap). O modo ESI⁺ foi adquirido na faixa de 110-1180 Da, temperatura da fonte fixa a 120 °C, temperatura de dessolvatação 350 °C, fluxo do gás dessolvatação de 500 L/h, cone de extração de 0,5 V, voltagem capilar de 3.2 kV. Em baixo scan, a tensão de cone foi 35 V, energia de colisão de 5 eV (trap). Em alto scan, a tensão do cone foi de 35 V, com uma rampa de energia de colisão de 20-40 eV rampa (trap). Leucina encefalina foi utilizada como lock mass. O modo de aquisição foi MS^E. O instrumento foi controlado pelo software Masslynx 4.1 (Waters Corporation).

As amostras foram injetadas em triplicadas nos modos de ionização positivo e negativo. Obteve-se um conjunto de cromatogramas e espectros de massa para cada uma das 4 amostras de palma.

4.4 IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL

Para a identificação estrutural, foram consideradas as fórmulas moleculares e os valores de *m/z* obtidos a partir de espectros de alta resolução, observados nos picos cromatográficos de maior intensidade. A partir de cada fórmula, foi determinado o erro relativo em ppm. Somente fórmulas moleculares com valores inferiores a 10 ppm de erro foram consideradas para estudos posteriores em MS/MS. As propostas estruturais das moléculas foram realizadas através dos dados de MS/MS, por meio do estabelecimento de

padrões de fragmentação racionais (BOUSLIMANI et al., 2014; KIND; FIEHN, 2007, 2010; MOCO et al., 2007; YULIANA et al., 2013).

Os dados foram processados usando o software MassLynx 4.1(Waters Corporation). A comparação de todos os picos de LC foi realizada utilizando um desvio de tolerância de tempo de retenção $\pm 0,05$ min e uma tolerância massa exata de $\pm 0,05$ Da. Para picos não identificados, todas as possíveis fórmulas moleculares foram extraídas (elementos C, H, N, O, a tolerância de 10 ppm, pelo menos, 2 átomos de carbono) com a ferramenta composição elementar do MassLynx.

O erro em ppm é calculado pela seguinte equação que leva em consideração a massa observada no espectrômetro de massas e a massa calculada pela ferramenta composição elementar do software MassLynx.

$$\frac{(\text{Massa Observada} - \text{Massa Calculada})}{\text{Massa Observada}} \times 10^6 \quad (\text{eq. 1})$$

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 RENDIMENTO

A retirada de água da palma é o primeiro passo do preparo da amostra, já que cerca de 90% da massa de palma é água (SILVA e DONATO, 2016). Após as amostras serem picadas em formato de cubos e liofilizadas por 4 dias, foram pesadas e os resultados estão dispostos na tabela 3.

Tabela 3 – Massa seca das amostras de palma após primeira liofilização.

Amostra	Massa inicial (g)	Massa (g)	% Massa seca
Palma gigante (controle)	503,20	31,21	6.20
Palma doce	82,54	5,40	6.54
Palma IPA	100,65	6,20	6.16
Palma orelha de elefante	255,33	19,00	7.44

A queda brusca de massa sugere que a água livre nas amostras foi retirada e pode-se prosseguir com o preparo das amostras. Antes de seguirem para o ASE, para a extração as amostras foram homogeneizadas com a terra diatomácea e então seguiram para a extração. A tabela 4 mostra a proporção de massas entre amostra e terra diatomácea e a tabela 5 mostra a eficiência de cada extração. Os extratos foram liofilizados novamente para a retirada da água da solução. As amostras então foram refrigeradas até poderem ser analisadas no UPLC-QTOF-MS^E.

Tabela 4 - Homogeneização das amostras de palma com terra diatomácea

Amostra	Massa de amostra (g)	Terra diatomácea (g)
Palma gigante (controle)	2,0001	2,0018
Palma doce	2,0001	2,0049
Palma IPA	2,0002	2,0025
Palma orelha de elefante	2,0004	2,0036

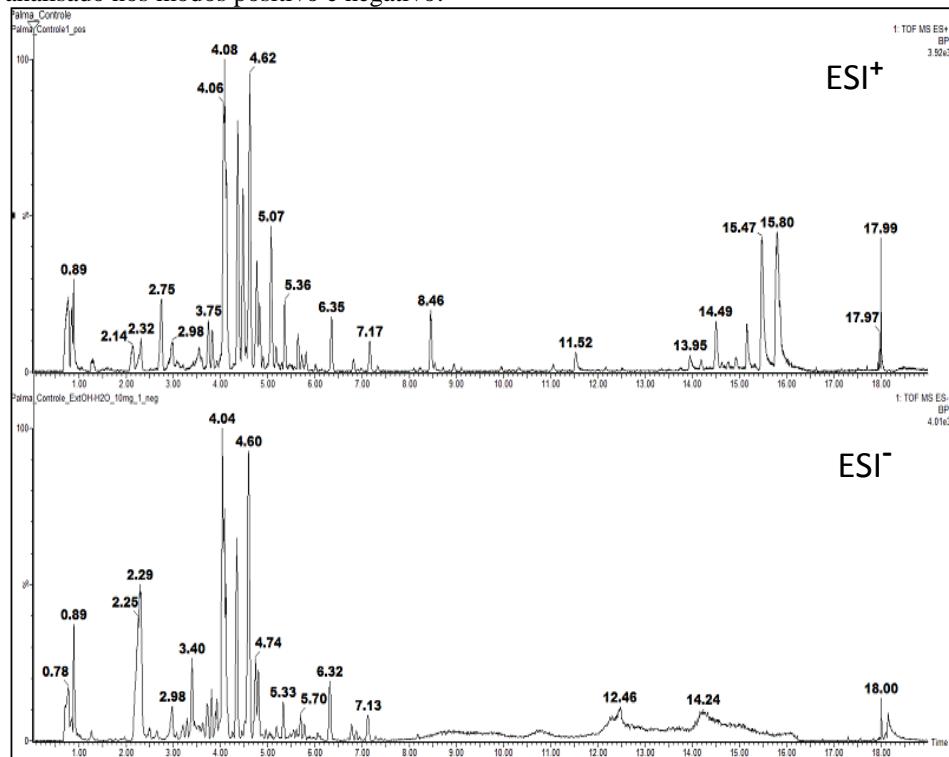
Tabela 5 - Massa dos extratos de palma após a finalização do processo de extração.

Amostra	Massa final (g)	% de rendimento
Palma gigante (controle)	0,8330	0.17
Palma doce	0,7873	0.95
Palma IPA	0,5486	0.55
Palma orelha de elefante	0,7955	0.31

5.2 ANÁLISE EM UPLC-QTOF-MS^E

Os cromatogramas no modo positivo e negativo da palma controle podem ser vistos na Fig. 11.

Figura 11 – Comparação dos perfis cromatográficos do extrato da palma controle analisado nos modos positivo e negativo.



No cromatograma foi possível observar que alguns picos não aparecem nos dois modos de ionização. Um exemplo é o pico no tempo de retenção 2,75 minutos no cromatograma do modo positivo, indicando uma substância que preferencialmente se ioniza negativamente. Apesar de a utilização dos dois modos de ionização serem principalmente para a confirmação dos compostos presentes nos extratos, auxiliando na identificação das moléculas através da ionização positiva e negativa, alguns casos específicos como esse também podem acontecer. Cada pico do cromatograma apresenta um espectro de massas a ser analisado. Foram feitos espectro de MS e MS/MS, e o estudo dos fragmentos das moléculas no extrato. Foi observado que os metabólitos de interesse para a identificação encontram-se até o tempo de retenção de 9 minutos. Após esse tempo são encontrados compostos que também aparecem no branco da extração.

5.3 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

Os espetros de MS e MS/MS são fundamentais para a identificação molecular dos componentes do extrato de palma. Baseado na idetificação prévia de metabólitos já relatados na literatura para o gênero *Opuntia*, foram criadas tabelas de identificação das estruturas presentes que posteriormente foram usadas como referência para a identificação dos componentes dos extratos das amostras de palma.

As tabelas 6 e 7 trazem as estruturas identificadas nos extratos de palma, suas fragmentações de maior intensidade e referências que corroboraram nas identificações desses metabólitos em outras amostras de palma. As moléculas não identificadas foram caracterizadas como n.i.

As tabelas 8 e 9 mostram como esses metabólitos estão distribuídos entre as 4 amostras de palma estudadas. A intensidade do sinal foi feita pela relação sinal/ruído, calculada pelo MassLynx. Caso a mesma fosse entre 3 e 10, é considerado +, caso fosse entre 10 e 40 é considerado ++, caso a relação sinal/ruído fosse entre 40 e 150 é considerado +++ e caso fosse acima de 150, ++++. O sinal - simboliza que o metabólito não foi encontrado no extrato em questão

Tabela 6 – Componentes das amostras de Palma no modo de ionização negativo

Pico	t_r (min)	[M-H] ⁻ Observado	[M-H] ⁻ Calculado	Erro (ppm)	Fragmentos Íons (MS/MS)	Fórmula Molecular	Tentativa de identificação	Referências
1	2,30	255,0442	255,0446	-1,6	193,0504 ; 165,0513	C ₁₁ H ₁₂ O ₇	Ácido piscídico	(SEMEDO, 2012)
2	2,50	447,1132	447,1139	-1,6	315,0822 ; 152,0092	C ₁₈ H ₂₄ O ₁₃	n.i	-
3	2,98	959,3252	959,3244	-0,8	813,2678 ; 285,0390	C ₃₉ H ₆₁ O ₂₇	n.i	(SEMEDO, 2012)
4	3,21	239,0562	239,0556	2,5	179,0379 ; 149,0596	C ₁₁ H ₁₃ O ₆	Ácido eucômico	(ASTELLO-GARCÍA, <i>et al.</i> , 2015)
5	3,40	533,1458	533,1448	1,9	405,2111 ; 259,0593	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	n.i	-
6	3,45	785,2131	785,2140	-1,1	623,1552 ; 315,0493	C ₃₄ H ₄₂ O ₂₁	Isoramnetina-3-O-rutinosídeo-7-O-glucosídeo	(SALEEM, KIM, <i>et al.</i> , 2006)
7	3,71	755,2025	755,2035	-1,3	445,1144 ; 300,0255	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₀	Luteolina-ramnose-dihexosídeo	(FARAG, 2014)
8	3,81	785,2099	785,2082	2,2	639,1596 ; 477,1149 314,0414	C ₄₁ H ₃₈ O ₁₆	Isoramnetina-3-O-rutinosídeo-4-O-glucosídeo IV	(AQUINO, 1987)
9	3,85	771,1977	771,1984	-0,9	609,1472 ; 301,0302	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₁	Quercetina-ramnosil-dihexosídeo	(FARAG, 2014)
10	3,92	931,2719	931,2661	6,8	417,1549 ; 315,0480	C ₄₇ H ₄₇ O ₂₀	n.i	-
11	4,04	769,2183	769,2191	-1,0	755,2180 ; 623,1737 314,0342	C ₃₄ H ₄₂ O ₂₀	Isoramnetina-diramnosídeo-glucosídeo	(MATA, 2016)
12	4,26	785,2099	785,2082	2,2	315,0420 ; 314,0414	C ₄₁ H ₃₈ O ₁₆	Isoramnetina-3-O-rutinosídeo-4-O-glucose V	(AQUINO, 1987)
13	4,33	609,1442	609,1456	-3,1	314,0375 ; 300,0258	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	Isoramnetina 3-O-lixose-glucose	(SEMEDO, 2012)
14	4,60	623,1629	623,1612	2,7	315,0414 ; 300,0242	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	Isoramnetina 3-O-ramnosil-hexosídeo	(FARAG, 2014)
15	4,74	477,0992	477,1033	-8,6	315,0474 ; 299,0164	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	Isoramnetina-3-O-glucose I	(BRITO, RAMIREZ, <i>et al.</i> , 2014)
16	4,80	477,1005	477,1033	-5,9	314,0411 ; 299,0217	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	Isoramnetina-3-O-glucose II	(BRITO, RAMIREZ, <i>et al.</i> , 2014)
17	5,75	801,2231	801,2242	-1,4	314,0381	C ₃₈ H ₄₂ O ₁₉	Isoramnetina-3-O-triglucosideo	(SCHMIDT, <i>et al.</i> , 2010)
18	6,32	315,0513	315,0505	2,5	300,0272 ; 271,0228	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	Isoramnetina	(SON, LEE, <i>et al.</i> , 2014)
19	6,75	603,2938	-	-	-	-	n.i	-
20	6,92	533,2997	-	-	-	-	n.i	-
21	7,13	285,0387	285,0399	-4,2	255,0292 ; 227,0335	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	Kaempferol	(SON, LEE, <i>et al.</i> , 2014)

Tabela 7 – Componentes das amostras de Palma no modo de ionização positivo

Pico	t_r (min)	$[M+H]^+$ Observado	$[M+H]^+$ Calculado	Erro (ppm)	Fragmentos Íons (MS/MS)	Fórmula Molecular	Tentativa de identificação	Referências
1	2,13	166,0869	166,0868	0,6	120,0813	$C_9H_{11}NO_2$	Fenilalanina	(WRONA, <i>et al.</i> , 2016)
2	2,30	257,0655	257,0661	-2,3	193,0510 ; 144,0447	$C_{11}H_{11}O_7$	Ácido piscídico	-
3	2,75	205,0976	205,0977	-0,5	188,0723 ; 146,0608 143,0740	$C_{11}H_{12}N_2O_2$	Triptofano	(WRONA, <i>et al.</i> , 2016)
4	3,45	479,1200	479,1190	2,1	317,0628	$C_{22}H_{22}O_{12}$	Isoramnetina hexosídeo I	(ABU-REIDAH, ALI-SHTAY, <i>et al.</i> , 2014)
5	3,74	757,2194	757,2191	0,4	447,1725 ; 303,0504	$C_{33}H_{40}O_{20}$	Luteolina-ramnose-dihexosídeo	-
6	4,08	771,2399	771,2348	6,6	757,2249 ; 317,0620	$C_{34}H_{42}O_{20}$	Isoramnetina-3- <i>O</i> -ramnosideo-rutinosideo	-
7	4,37	647,1675	-	-	-	-	n.i	-
8	4,62	625,1794	625,1769	4,0	317,0620 ; 302,0424	$C_{28}H_{32}O_{16}$	Isoramnetina 3- <i>O</i> -ramnosídeo-hexosídeo	-
9	4,75	479,1227	479,1190	7,7	317,0646 ; 287,0539	$C_{22}H_{22}O_{12}$	Isoramnetina 3- <i>O</i> -glucosídeo	-
10	5,06	512,2746	-	-	-	-	n.i	-
11	5,60	526,2972	-	-	-	-	n.i	-
12	6,34	317,0663	317,0661	0,6	302,0424 ; 274,0480	$C_{16}H_{12}O_7$	Isoramnetina	(ABU-REIDAH, ALI-SHTAY, <i>et al.</i> , 2014)
13	6,77	605,3230	-	-	-	-	n.i	-
14	7,16	287,0540	287,0566	-5,6	257,0501 ; 229,0490	$C_{15}H_{10}O_6$	Kaempferol	(ABU-REIDAH, ALI-SHTAY, <i>et al.</i> , 2014)
15	7,42	573,2527	-	-	-	-	n.i	-

Tabela 8 – Distribuição de metabólitos nas amostras de palma (modo negativo)

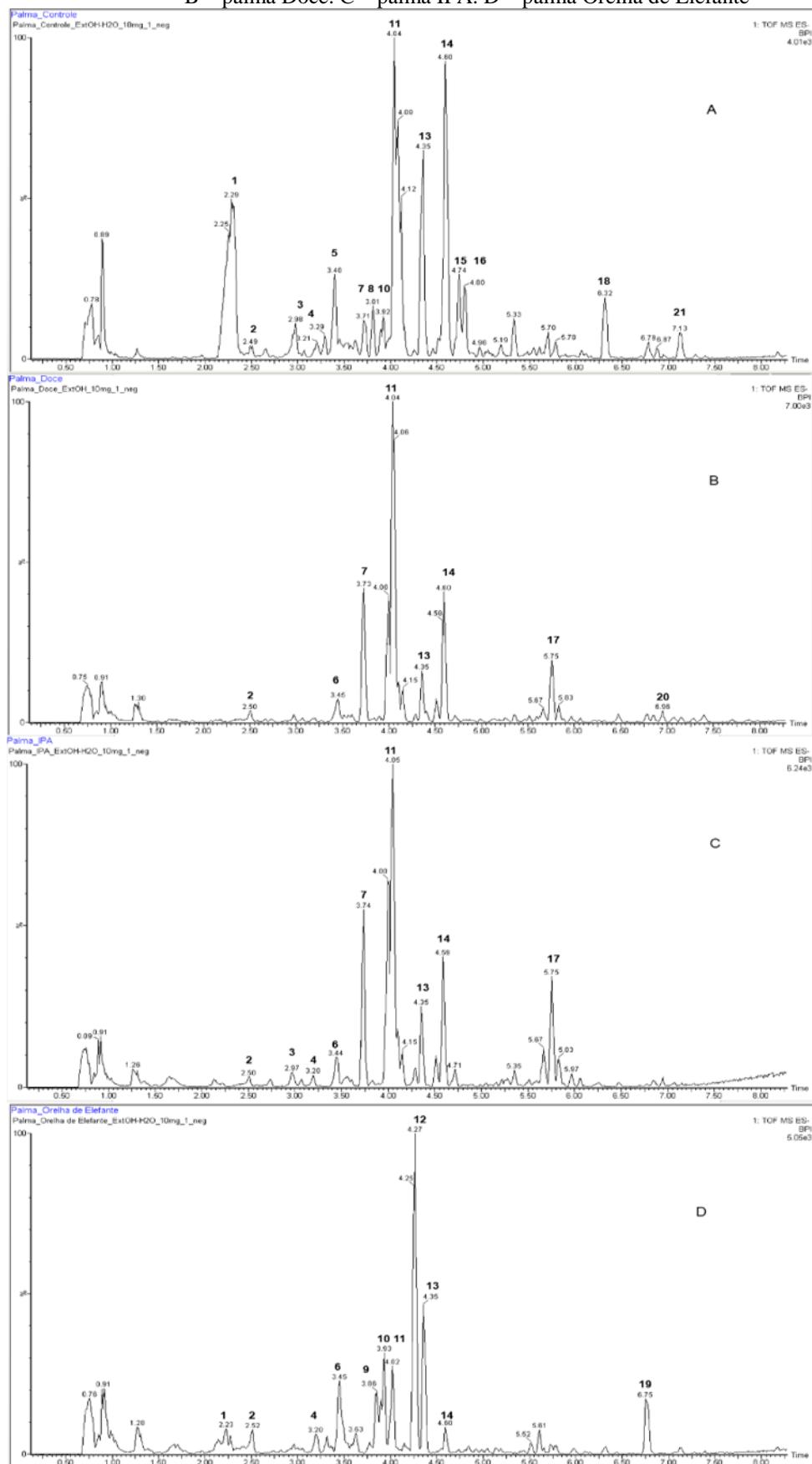
Pico	t_r (min)	Nome	Palma Controle (s)	Palma Doce (r)	Palma IPA (r)	Palma Orelha (r)
1	2,30	Ácido piscídico	+++	-	-	-
2	2,50	n.i	+	+	+	+
3	2,98	n.i	++	+	++	-
4	3,21	Ácido eucômico	++	+	+	++
5	3,40	n.i	+++	-	-	-
6	3,45	Isoramnetina-3-O-rutinosídeo-7-O-glucosídeo	-	-	+	+++
7	3,71	Luteolina-ramnose-dihexosídeo	++	+++	++++	-
8	3,81	Isoramnetina-3-O-rutinosídeo-4-O-glucosídeo IV	++	-	-	-
9	3,85	Quercetina-ramnosil-dihexosídeo	-	-	-	++
10	3,92	n.i	++	-	-	+++
11	4,04	Isoramnetina-diramnosídeo-glucosídeo	++++	+++	+++	++
12	4,26	Isoramnetina-3-O-rutinosídeo-4-O-glucose V	-	-	-	++++
13	4,33	Isoramnetina 3-O-lixose-glucose	++++	++	+++	+++
14	4,60	Isoramnetina 3-O-ramnosil-hexosídeo	++++	+++	+++	+
15	4,74	Isoramnetina-3-O-glucose I	+++	-	-	-
16	4,80	Isoramnetina-3-O-glucose II	+++	-	-	-
17	5,75	Isoramnetina-3-O-triglucosídeo	-	++	+++	-
18	6,32	Isoramnetina	+++	-	-	-
19	6,75	n.i	-	-	-	+++
20	6,92	n.i	-	+	-	-
21	7,13	Kaempferol	++	-	-	-

Tabela 9 – Distribuição de metabólitos nas amostras de palma (modo positivo)

Pico	T_r (min)	Nome	Palma Controle (s)	Palma Doce (r)	Palma IPA (r)	Palma Orelha (r)
1	2,13	Fenilalanina	+	+	+	+
2	2,30	Ácido piscídico	+	-	-	-
3	2,75	Triptofano	+	+	+	+
4	3,45	Isoramnetina hexosídeo I	-	-	-	+
5	3,74	Luteolina-ramnose-dihexosídeo	+	+	+	-
6	4,08	Isoramnetina-3-O-ramnosídeo-rutinosídeo	+	+	+	+
7	4,37	n.i	-	-	-	+
8	4,62	Isoramnetina 3-O-ramnosídeo-hexosídeo	+	+	+	+
9	4,75	Isoramnetina 3-O-glucosídeo	+	-	-	-
10	5,06	n.i	+	+	+	+
11	5,60	n.i	+	+	+	-
12	6,34	Isoramnetina	+	-	-	+
13	6,77	n.i	-	-	-	+
14	7,16	Kaempferol	+	-	-	+
15	7,42	n.i	-	-	+	-

Razão sinal/ruído menor que 25 (+); maior que 25 e menor que 70 (++); maior que 70 e menor que 140 (+++) e maior que 140 (+++).

Figura 12 - Cromatograma das amostras com moléculas identificadas: A – palma Gigante. B – palma Doce. C – palma IPA. D – palma Orelha de Elefante



O composto 1, t_r de 2,30 minutos, possui $[M-H]^-$ 255,0442 Da e foi identificado como ácido piscídico. Essa molécula já foi reportada anteriormente em amostras de *Opuntia* por Semedo (2012). O íon de $m/z = 193,0510$ Da foi gerado pela perda de H_2O seguido pela perda de CO_2 . A presença de ácido piscídico nas amostras foi confirmado pelo modo de ionização positivo, pico 2 da tabela 7, com fragmentações semelhantes às do modo negativo, acrescentando-se o íon $m/z = 144,0447$ Da.

O composto 2, t_r de 2,50 minutos, trata-se de uma molécula não identificada, de $[M-H]^-$ 447,1132 Da, e não citada em nenhuma referência consultada. Porém, essa molécula possui fragmentações características do grupo das isoramnetinas, o íon $m/z = 315,0822$ Da. O íon $m/z = 152,0092$ Da seria o grupo ligado diretamente a isoramnetina, portanto o composto pode-se tratar de um derivado da isoramnetina. O composto não foi detectado em ESI⁺

O composto 3, t_r 2,98 minutos, também se trata de uma molécula não identificada, de $[M-H]^-$ 959,3252 Da, porém ela foi detectada por Semedo (2012). A molécula não respondeu no modo positivo de ionização e suas fragmentações mostram que provavelmente é um derivado do kaempferol devido ao fragmento $m/z = 285,0390$ Da. De acordo com Semedo (2012) o $m/z = 813,2678$ Da deve-se a perda de um ramnosídio, que possui massa 146 Da.

O composto 4, t_r 3,21 minutos, foi identificado como ácido eucômico e foi descrito no artigo de Astello-García, et al (2015). O fragmento que deu origem ao pico $m/z = 179,0379$ Da mostra a perda de um de um grupo ácido acético da molécula de ácido eucômico, uma perda de 60 Da em relação ao $[M-H]^-$ 239,0562 Da. A molécula não responde ao modo de ionização positivo e já foi reportada em amostras de *Opuntia* anteriormente (GINIESTRA, 2010).

O composto 5, t_r 3,40, não foi identificado e não possui nenhuma referência na literatura consultada a seu respeito. Possui fragmentações em $m/z = 259,0593$ e 405,2111 Da e $[M-H]^-$ 533,1458 Da. O composto não foi detectado no modo positivo.

O composto 6, t_r 3,45 minutos, foi identificado como Isoramnetina-3-*O*-rutinosídeo-7-*O*-glucosídeo e foi descrito por Saleem, et al. (2006), o composto tem $[M-H]^-$ 785,2131 Da e possui fragmentações características. O fragmento $m/z = 315,0493$ Da é característico das isoramnetinas e o $m/z = 623,1552$ Da é a perda de 162 Da, referente a perda do glucosídeo ligado a molécula.

O composto no t_R 3,45 minutos apresentou um íon $[M-H]^-$ em 785,2131. Foram observados fragmentos em m/z 623,1552 referente a perda de glucose $[M-H-162]$ e m/z

315,0493 característico das isoramnetinas. O composto foi tentativamente caracterizado como Isoramnetina-3-O-rutinosídeo-7-O-glucosídeo e descrito anteriormente por Saleem, *et al.* (2006).

O composto 7, t_r 3,71 minutos, descrito apenas no modo negativo por Farag (2014), trata-se da luteolina-ramnose-dihexosídeo, possui $[M-H]^-$ 755,2025 Da e $[M+H]^+$ 757,2191 Da. O fragmento $m/z = 445,1144$ Da deve-se a perda de uma unidade de hexosídeo (162 Da) e a unidade de rhamnose (146 Da).

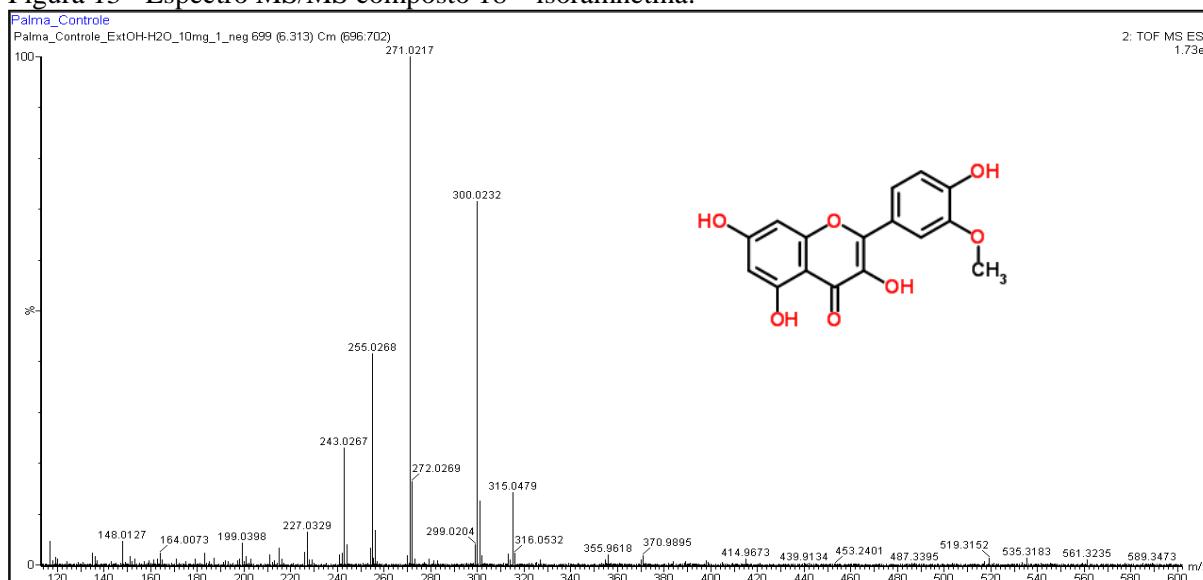
O composto 8, t_r 3,81 minutos, descrito por Aquino (1987) e que não foi detectado no modo positivo de ionização, é a Isoramnetina-3-*O*-rutinose-4-*O*-glucose I e possui os fragmentos $m/z = 639,1596$ e 477,1149 Da. O primeiro relativo a perda de uma rhamnose e o segundo que seria a perda da glicose ligada a essa rhamnose, resultando numa rutinose, da molécula, além o fragmento característico das isoramnetinas em torno de 315 Da.

O composto 9, t_r 3,85 minutos, descrito por Farag (2014), é a Quercetina-ramnosil-dihexosídeo, $[M-H]^-$ 771,1977 Da. O composto possui a fragmentação característica da quercetina, $m/z = 301,0302$ Da e também um fragmento referente a perda de uma das unidades de hexosídeo (162 Da) $m/z = 609,1472$ Da. O composto não foi detectado em modo positivo.

O composto 10, t_r 3,92 minutos, é uma molécula não identificada e sem nenhuma referência na literatura consultada. O composto não é detectado no modo positivo e não possui nenhuma fragmentação característica de nenhum dos grupos presente nas amostras.

Assim como os compostos 2, 6 e 8 os compostos 11, 12, 14, 15, 16 e 17 fazem parte do grupo das isoramnetinas, estes grupos possuem fragmentos característicos ao grupo das isoramnetinas, com íons diagnóstico em 314 e 315 Da. Além do composto 18, identificado como a própria molécula de isoramnetina, $[M-H]^-$ 315,0513 Da e $[M+H]^+$ 317,0663 Da, descrita por Son, *et al.*, (2014) por Abu-Reidah, *et al.* (2014). A figura 13 abaixo traz o espectro MS/MS da isoramnetina.

Figura 13 - Espectro MS/MS composto 18 – isoramnetina.



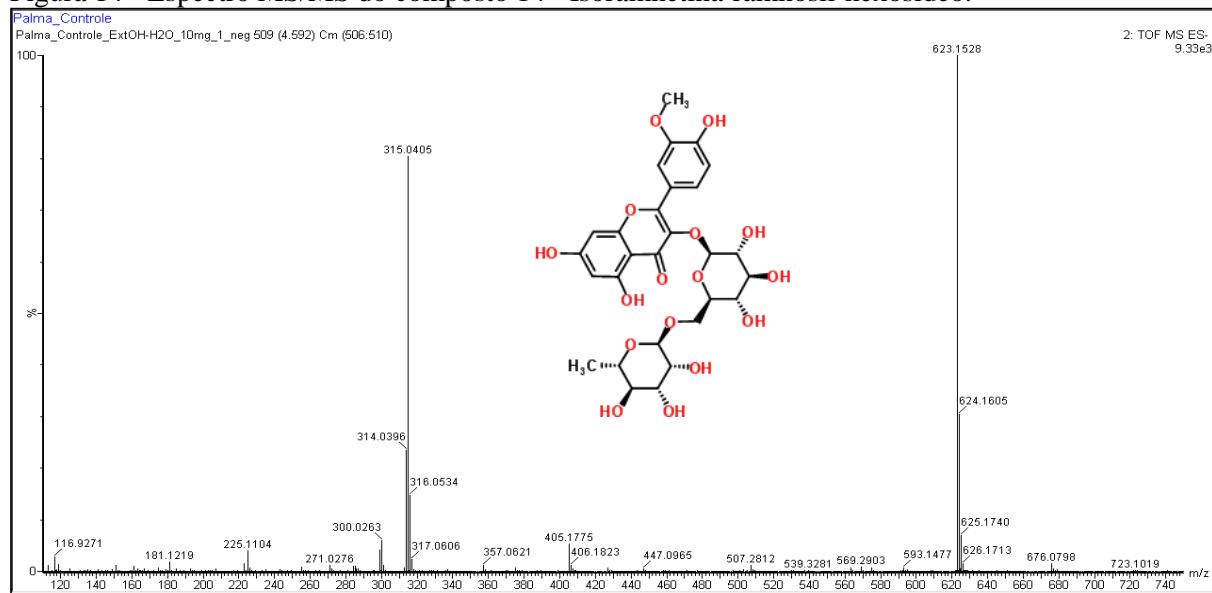
O composto 11, t_r 4,04 minutos, descrito no modo negativo por Mata (2016) trata-se da Isoramnetina-diramnosídeo-glucosídeo, $[M-H]^-$ 769,2183 Da e $[M+H]^+$ 771,2399 Da. O fragmento $m/z = 623,1737$ Da se deve a perda de uma unidade de ramnosídio do composto, 146 Da. O fragmento $m/z = 755,2180$ Da é relativo a uma perda de CH_2 da molécula.

O composto 12, t_r 4,26 min e encontrado apenas na amostra de palma orelha de elefante, é um isômero do composto 8, encontrado apenas na palma controle, descrito por Aquino (1987). Possui o mesmo fragmento $m/z = 473,1714$ Da que seria a perda da rutinose da molécula e o fragmento característico das isoramnetinas em torno de 315 Da.

O composto 13, t_r 4,33 minutos, descrito por Semedo (2012) e não detectado no modo positivo, trata-se da Isoramnetina 3-*O*-lixose-glucose, $[M-H]^-$ 609,1442 Da. O fragmento $m/z = 314,0375$ é devido a perda das duas unidades de açúcar da molécula (162 Da +146 Da) restando a aglicona (SEMEDO, 2012).

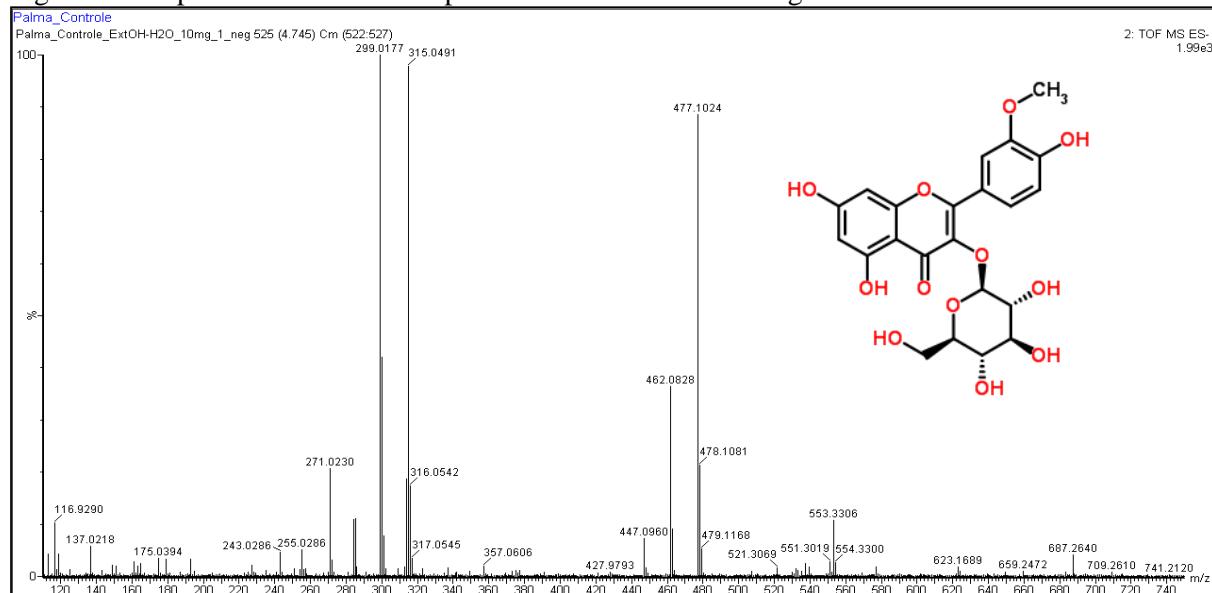
O composto 14, t_r 4,60 minutos foi identificado como Isoramnetina-ramnosilhexosídeo e descrito por Farag (2014), $[M-H]^-$ 623,1629 Da, O fragmento $m/z = 300,0242$ Da deve-se a perca das duas unidades de açúcar (162 Da do hexosídeo + 146 Da do ramnosídeo) e a conversão da isoramnetina para queracetina, perda de um grupo metila. A figura 14 abaixo traz o espectro MS/MS do composto 14.

Figura 14 - Espectro MS/MS do composto 14 - Isoramnetina-ramnosil-hexosídeo.



Os compostos 15 e 16, t_r 4,74 e 4,80 minutos, são isômeros do composto Isoramnetina-3-*O*-glucose ambos descritos por Brito (2014). O fragmento em torno de 315 Da indica a presença da isoramnetina. O que os diferencia é que o composto 15 foi detectado no modo positivo com $[M+H]^+$ 479,1227 Da. A figura 15 abaixo traz o espectro MS/MS de um desses isômeros (composto 15).

Figura 15 - Espectro MS/MS do composto 15 - Isoramnetina-3-*O*-glucose.



O composto 17, t_r 5,75 minutos, foi descrita por Schmidt, *et al.*, (2010) e foi identificado como Isoramnetina-3-*O*-triglucosideo, $[M-H]^-$ 801,2231 Da. O fragmento característico m/z = 314,0381 Da é originado pela perda das três glucoses ligadas a molécula de isoramnetina (3x162 Da). O composto não foi detectado no modo positivo.

Os compostos 19 e 20, t_r 6,75 e 6,92 minutos, são moléculas não identificadas e sem nenhuma referência na literatura consultada. Esses compostos também não apresentaram fragmentação e não foi possível calcular uma proposta de fórmula molecular. O composto 19 foi detectado no modo positivo de ionização, mas nas mesmas condições anteriores.

O composto 21, t_r 7,13 minutos, foi descrito por Son, *et al.*, (2014) no modo negativo e por Abu-Reidah, *et al.* (2014). O composto identificado como Kaempferol $[M-H]^-$ 285,0387 Da e $[M+H]^+$ 287,0540 Da. Os fragmentos m/z = 227,0335 Da e 255,0292 Da são característicos do Kaempferol de acordo com Son, *et al.*, (2014).

O composto 1', t_r 2,13 minutos, trata-se do pico 1 da tabela 7, foi descrito por Wrona *et al.* (2016) e identificado como o aminoácido fenilalanina, $[M+H]^+$ 166,0869 Da. O fragmento m/z = 120,0813 Da está descrito por Wrona *et al.* (2016) como um fragmento característico da fenilalanina, perda do grupo CHO_2 .

O composto 2', pico 3 da tabela 7 e t_r 2,75 minutos, foi descrito por Wrona *et al.* (2016) e identificado como o aminoácido triptofano, $[M+H]^+$ 205,0976 Da. Os fragmentos originados no MS/MS estão catalogados por Wrona *et al.* (2016) como fragmentos característicos da fenilalanina.

O composto 3', pico 4 da tabela 7 e t_r 3,45 minutos, foi descrito por Abu-Reidah, *et al.* (2014) e identificado como isoramnetina hexosídeo I, $[M+H]^+$ 479,1200 Da. O fragmento m/z = 317,0628 Da é devido a perca da unidade de hexosídio (162 Da), restando apenas a isoramnetina. O composto não é detectado no modo negativo.

Os compostos 4', 5', 6' e 7', picos 7, 10, 11 e 15 da tabela 7 e t_r 4,37, 5,06, 5,60 e 7,42 minutos respectivamente, não foram identificados e não possuem nenhuma referência na literatura consultada. Os valores de $[M+H]^+$ foram a única informação obtida, não foi possível calcular uma formula molecular e os compostos não apresentaram fragmentação.

6 CONCLUSÃO

O perfil dos metabolômicos majoritários das quatro amostras de palma foram estabelecidos por meio dos espectros MS e os espectros MS/MS que foram utilizados para as identificações. Diversas fontes da literatura corroboraram os compostos que foram identificados.

No total, 28 compostos foram tentativamente identificados e descritos anteriormente no gênero *Opuntia*. Os derivados da Isoramnetina, quercetina e kaempferol destacam-se como principais componentes da palma, apresentando grande variedade e intensidade nas amostras.

O modo de ionização positivo (ESI⁺) foi utilizado para a confirmação de compostos encontrados no modo negativo (ESI⁻), e detectar compostos não ionizados no ESI⁻ como os aminoácidos triptofano e fenilalanina.

Este estudo permitiu o estabelecimento do conhecimento da base metabolômica da resistência que até então não era conhecida, permitindo que futuras pesquisas que visem estabelecer uma relação entre a composição química e a resistência do hospedeiro ao patógeno possam ser explorados.

REFERÊNCIAS

- ABU-REIDAH, I. M. et al. HPLC–DAD–ESI-MS/MS screening of bioactive components from *Rhus coriaria* L. (Sumac) fruits. **Food Chemistry**, Nablus, Palestine, 12 Junho 2014. 179-191.
- AQUINO, R. . B. I. . D. M. . D. S. F. . S. O. P. C. . Phytochemical investigation on *Mercurialis annua*. **Biochem. Syst. Ecol.**, 1987. 667-669.
- ASTELLO-GARCÍA, M. G. et al. Chemical composition and phenolic compounds profile of cladodes from *Opuntia* spp. cultivars with different domestication gradient. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Luís Potosí, 30 Maio 2015. 119-130.
- BARRI, ; HOLMER-JENSEN, J. Metabolic fingerprinting of high-fat plasma samples processed by centrifugation and filtration-based protein precipitation delineates significant differences in metabolite information coverage. **Analytica Chimica Acta**, Frederiksberg, Dinamarca, 10 Janeiro 2012. 47– 57.
- BENAYADA, et al. Phenolic composition, antioxidant and anti-inflammatory activities of extracts from Moroccan *Opuntia ficus-indica* flowers obtained by different extraction methods. **Industrial Crops and Products**, Madrid, Spain, 26 Setembro 2014. 412-420.
- BŁYSKAL,. Fungal deterioration of a woollen textile dyed with cochineal. **Journal of Cultural Heritage**, Krakow, Poland, 11 Março 2015. 32-39.
- BOOTH, S. C.; WELJIE, A. M. W.; TURNER, R. J. Computational Tools for the Secondary Analysis of Metabolomics Experiments. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, Alberta, 5 Janeiro 2013. 1-13.

BORGES , M. E. Natural dyes extraction from cochineal (*Dactylopius coccus*). New extraction methods. **Food Chemistry**, Cannary Island, Spain, 16 Dezembro 2011. 1855-1860.

BOUSLIMANI, A. E. A. Mass spectrometry of natural products: current, emerging and future technologies. **Natural product reports**, v. 31, n. 6, p. 718–729, Junho 2014.

BRITO, et al. HPLC-UV-MS Profiles of Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Fruits from Three Citrus Species Consumed in Northern Chile. **Molecules**, Antofagasta, Chile, 29 Outubro 2014. 17400-17421.

CHAHDOURA, et al. Phytochemical characterization and antioxidant activity of the cladodes of *Opuntia macrorhiza* (Engelm.) and *Opuntia microdasys* (Lehm.). **Food & Function**, Bragança, Portugal, 30 Junho 2014. 2129-2136.

CHÁVEZ-MORENO, C. K. Metabolic profiling of *Dactylopius* (Hemiptera: Dactylopiidae) species pigments by geographical origin and hosts using multivariate data analysis. **Biochemical Systematics and Ecology**, Ciudad Universitaria, México, 17 Abril 2010. 671-679.

CHIACCHIO, F. P. B. Incidência da cochonilha do carmim em palma forrageira. **Bahia Agrícola** , v. 8, n. 2, p. 12-14, Novembro 2008.

CHIELI, A. Chromatographic and spectroscopic identification and recognition of ammoniacal cochineal dyes and pigments. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, Perugia, Italy, 9 Março 2016. 86-92.

ERNST, M. Mass spectrometry in plant metabolomics strategies: from analytical platforms to data acquisition and processing. **The Royal Society of Chemistry**, São Paulo, 3 Setembro 2013. 784–806.

FARAG, M. A. Metabolomic fingerprints of 21 date palm fruit varieties from Egypt using UPLC/PDA/ESI-qTOF-MS and GC-MS analyzed by chemometrics. **Food Research International**, Cairo, Egito, 20 Junho 2014. 218-226.

FRAIGE, K. **Estudo comparativo do perfil metabólico e proteômico de uvas (*Vitis vinifera*) durante o processo de maturação utilizando ferramentas bioanalíticas [Tese]**. Universidade de São Carlos. São Carlos, p. 210. 2012.

FUNARI, C. S. E. A. High resolution ultra high pressure liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry dereplication strategy for the metabolite profiling of Brazilian Lippia species. **Journal of chromatography. A**, v. 1259, p. 167-178, Outubro 2012.

GINIESTRA, G. . P. M. L. . B. R. N. . R. J. . M. G. . N. A. . L. C. R. B. . B. G. . F. C. B. . W. K. W. Anatomical, Chemical, and Biochemical Characterization of Cladodes from Prickly Pear [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.]. **Agricultural and Food Chemistry**, Messina, Italy, 15 Outubro 2010. 10323–10330.

GROMSKI, P. S.; MUHAMADALI,. A tutorial review: Metabolomics and partial least squares-discriminant analysis – a marriage of convenience or a shotgun wedding. **Analytica Chimica Acta**, Manchester, 11 Fevereiro 2015. 10-23.

HORST , K.; ARND , V. Absorption and luminescence spectra of cochineal. **Inorganic Chemistry Communications**, Regensburg, Germany, 19 Abril 2011. 1153-1155.

KIND, T.; FIEHN, O. Seven Golden Rules for heuristic filtering of molecular formulas obtained by accurate mass spectrometry. **BMC bioinformatics**, v. 8, p. 105, Janeiro 2007.

KIND, T.; FIEHN, O. Advances in structure elucidation of small molecules using mass spectrometry. **Bioanalytical reviews**, v. 2, n. 1-4, p. 23-60, Dezembro 2010.

KRASTANOV,. Metabolomics – The State of Art. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, Plovdiv, Bulgária, v. 24, n. 1, p. 1537-1543, Abril 2010. ISSN DOI: 10.2478/V10133-010-0001-Y.

LOPES, R. D. S. **Avaliação do efeito bioinseticida de linhagens de Isaria farinosa e dos extratos naturais de Caesalpinia ferrea sobre Dactylopius opuntiae (Hemiptera: Dactylopiidae) praga da forrageira (Opuntia ficus-indica) em Pernambuco [Tese]**. Universidade Federal de Pernambuco. Recife, p. 275. 2013.

MAO, Q.; BAI,. Discrimination of leaves of Panax ginseng and P. quinquefolius by ultra high performance liquid chromatography quadrupole/time-of-flight mass spectrometry based metabolomics approach. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Nanjing, 2 Maio 2014. 129-140.

MATA. A. , F. J. P. S. C . S. T . C. M. M. D. M. R. B. Contribution to the characterization of Opuntia spp. juices by LC-DAD-ESI-MS/MS. **Food Chemistry**, Lisboa, 12 Abril 2016.

MELO, A. A. S. Desempenho leiteiro de vacas alimentadas com caroço de algodão. **Pesq. agropec. bras**, Brasília, v. 41, n. 7, p. 1165-1171, Julho 2006.

MINISTÉRIO DA INTEGRAÇÃO NACIONAL. **Nova Delimitação do Semiárido Brasileiro**. Brasília, DF, p. 32. 2005.

MOCO, S. E. A. Metabolomics technologies and metabolite identification. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 9, p. 855-866, Outubro 2007.

MORAN, ; ZIMMERMANN, H. G. Biological control of jointed cactus, *Opuntia aurantiaca* (Cactaceae), in South Africa. **Agriculture. Ecosystems and Environment**, Amsterdã, 25 Março 1991. 5-21.

OLIVEIRA, J. D. **Avaliação genética de clones de duas espécies de palma (*Opuntia ficus-indica* Mill e *Nopalea cochenillifera* Salm-Dyck) para fins forrageiros**. Universidade Estadual de Feira de Santana. Feira de Santana, p. 75. 2011.

OLIVEIRA, T. B. **Emprego de ferramentas de quimioinformática no estudo do perfil metabólico de plantas e na desreplicação de matrizes vegetais [Tese]**. Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, p. 128. 2015.

QUEIROZ, E. F. et al. **Principios Ativos de Plantas Superiores**. 2. ed. São Carlos: Editora da Universidade Federal de São Carlos, 2014.

QUEIROZ, M. G. D. **TESE - Desempenho produtivo e parâmetros agrometeorológicos da palma forrageira, clone orelha de elefante mexicana, no semiárido brasileiro**. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, p. 83. 2014.

RAMOS, J. P. F. Crescimento Vegetativo de *Opuntia ficus-indica* em Diferentes Espaçamentos de Plantios. **Revista Caatinga**, Mossoró-CE, Julho-Setembro 2011. 41-48.

RIBEIRO, É. M. D. O. Study of carbohydrates present in the cladodes of *Opuntia ficus-indica* (fodder palm), according to age and season. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, n. 4, p. 933-939, Outubro 2010. ISSN 0101-2061.

ROCHA, J. E. D. S. **Palma Forrageira no Nordeste do Brasil: Estudo da Arte**. 1a. ed. Sobral, CE: [s.n.], v. I, 2012.

SÁENZ, C. S. Agro-industrial utilization of cactus pear. **Food and Agriculture Organization**, 2013. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/019/a0534e/a0534e.pdf>>. Acesso em: 22 Março 2016.

SALEEM, M. et al. Secondary metabolites from *Opuntia ficus-indica* var. saboten. **Phytochemistry**, Seoul, South Korea, 9 Junho 2006. 1390-1394.

SCHMIDT, S. et al. Identification of complex, naturally occurring flavonoid glycosides in kale (*Brassica oleracea* var. *sabellica*) by high-performance liquid chromatography diode-array detection/electrospray ionization multi-stage mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, Grossbeeren, Germany, 3 Maio 2010. 2009–2022.

SEMEDO, A. C. J. **Compostos bioativos de *Opuntia ficus-indica* [Dissertação]**. Universidade de Lisboa. Lisboa, p. 140. 2012.

SENAR. **Palma Forrageira - Cultivo da palma forrageira no semiárido brasileiro**. 1. ed. Brasília: coleção SENAR, v. 159, 2013.

SILVA , R. R. D.; SAMPAIO, E. V. D. S. B. Palmas forrageiras *Opuntia* *ficus-indica* e *Nopalea cochenillifera*: sistemas de produção e usos. **Revista GEAMA**, Recife, v. 2, n. 1, p. 131-141, 30 Setembro 2015. ISSN 2447-0740.

SILVA, J.; DONATO, S. L. R. Extraction/export of nutrients in *Opuntia ficus-indica* under different spacings and chemical fertilizers. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande-PB, v. 20, n. 3, p. 236-242, Janeiro 2016. ISSN 1807-1929.

SILVA, N. G. M. **Produtividade, Morfometria e Acúmulo de Nutrientes da Palma Forrageira sob doses de adubação orgânica e densidades de plantio.** Universidade Federal Rural De Pernambuco Universidade Federal Da Paraíba Universidade Federal Do Ceará. Recife-PE, p. 97. 2012.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Principles of Instrumental Analysis.** 6. ed. Stanford: Thomson, v. I, 2007.

SON, J.-E. et al. Flavonols from the Ripe Fruits of Opuntia Ficus-indica var. saboten Protect Neuronal PC-12 Cells Against Oxidative Stress. **Journal of Food Biochemistry**, Gyeonggi, 13 Junho 2014. 518-526.

SOUZA, L. S. B. D. et al. Indicadores climáticos para o zoneamento agrícola da palma forrageira (*Opuntia* sp.), n. JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA, p. 28, 2008.

TAKAYAMA, ; MOCHIZUKI,. A novel approach for LC-MS/MS-based chiral metabolomics fingerprinting and chiral metabolomics extraction using a pair of enantiomers of chiral derivatization reagents. **Analytica Chimica Acta**, Shizuoka, 22 Outubro 2015. 73-84.

WRONA, et al. Ultra high performance liquid chromatography coupled to quadruple time-of-flight with MSE technology used for qualitative analysis of non-volatile oxidation markers in sliced packed mushrooms (*Agaricus Bisporus*). **Journal of Chromatography A**, Zaragoza, Spain, 7 Janeiro 2016. 73-83.

YAHIA, E. M. Y. Nutritional components and anti-oxidant capacity of ten cultivars and lines of cactus pear fruit (spp). **Food Research International**, Querétaro, Mexico, 22 Fevereiro 2011. 2311-2318.

YI, ; DONG,. Chemometric methods in data processing of mass spectrometry-based metabolomics: A review. **Analytica Chimica Acta**, Kunming, 16 Fevereiro 2016. 17-34.

YULIANA, N. D. E. A. Metabolomics for the rapid dereplication of bioactive compounds from natural sources. **Phytochemistry Reviews**, v. 12, n. 2, p. 293-304, Abril 2013.

ZIMMERMANN, ; MORAN,. Biological control of prickly pear, *Opuntia ficus-indica* (Cactaceae), in South Africa. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, South Africa, 25 Março 1991. 29-35.