



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS  
CURSO DE BACHARELADO EM QUÍMICA**

**JOYCE ELLEN DE ALMEIDA SOUSA**

**ESTUDO DA VARIAÇÃO METABOLÔMICA DAS FOLHAS DO GUARANÁ  
(*Paullinia cupana*) EM RESPOSTA AO ESTRESSE BIÓTICO**

**FORTALEZA**

**2016**

JOYCE ELLEN DE ALMEIDA SOUSA

**ESTUDO DA VARIAÇÃO METABOLÔMICA DAS FOLHAS DO GUARANÁ  
(*Paullinia cupana*) EM RESPOSTA AO ESTRESSE BIÓTICO**

Monografia submetida à Coordenação do Curso de Bacharelado em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do grau de Bacharel em Química com habilitação em Química Industrial.

Orientador didático-pedagógico:  
Profa. Dra. Helena Becker

Orientador Profissional:  
Dr. 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)

---

- A448e Almeida Sousa, Joyce Ellen de.  
Estudo da variação metabólica das folhas do guaraná ( Paullinia cupana) em resposta ao estresse biótico / Joyce Ellen de Almeida Sousa. – 2016.  
57 f. : il. color.
- Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Química, Fortaleza, 2016.  
Orientação: Prof. Dr. Guilherme Julião Zocolo.  
Coorientação: Profa. Dra. Helena Becker.
1. Guaraná. 2. Metabólito secundário. 3. Quimiometria. 4. UPLC-QTOF-MS. I. Título.
- CDD 540
-

JOYCE ELLEN DE ALMEIDA SOUSA

**ESTUDO DA VARIAÇÃO METABOLÔMICA DAS FOLHAS DO GUARANÁ  
(*Paullinia cupana*) EM RESPOSTA AO ESTRESSE BIÓTICO**

Monografia apresentada ao Curso de Bacharelado em Química, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do Título de Bacharel em Química com habilitação em Química Industrial.

Aprovada em: 01/07/2016.

BANCA EXAMINADORA

---

Profa. Dra. Helena Becker (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Dr. Guilherme Julião Zocolo (Orientador)  
Embrapa Agroindústria Tropical - EMBRAPA

---

Profa. Dra. Gláucia Simone Lopes  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dedico este trabalho em especial ao meus pais, José e Helena, meu irmão Felipe, meu namorado Avelino e a todos meus familiares e amigos por estarem sempre comigo nos momentos importantes da minha vida e por terem contribuído de alguma forma na minha vida acadêmica.

## AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado força, ampliado meu horizonte e ter iluminado minha vida.

A meus pais José Melo e Helena Velma, meu irmão Felipe e meu namorado Avelino, por todo amor, carinho, força, educação, incentivo, apoio e dedicação em todos os momentos da minha vida.

À Profa. Dra. Helena Becker, pela orientação e pelos conselhos.

Ao Dr. Guilherme Julião Zocolo, pela orientação, ensinamentos, amizade e paciência, durante toda jornada do desenvolvimento dessa monografia.

À Embrapa Agroindústria Tropical- Laboratório de Multiusuários de Produtos Naturais (LMQPN), pela oportunidade de realizar este trabalho.

Ao Dr. Gilvan Ferreira da Silva da Embrapa Amazônia Ocidental, por ter fornecido o material vegetal.

Aos colegas do LMPN, Lorena, Paulo, Tigressa, Camila e Sávio pela ajuda no trabalho desenvolvido.

À Universidade Federal do Ceará, pela oportunidade de fazer o curso de Química bacharelado.

Aos amigos do Laboratório de Produtos e Tecnologia em Processos - LPT, principalmente à Prof. Dra. Selma, ao Prof. Dr. Claudenilson e João Paulo, pela amizade, discussões, ensinamento e oportunidade de iniciar meus trabalhos acadêmicos como bolsista de iniciação científica.

À Universidade de Alberta, onde tive o privilégio de fazer parte da minha graduação e adquirir novos conhecimentos.

Ao Prof. Michael J. Serpe, da Universidade de Alberta, por ter me acolhido em seu laboratório de pesquisa, onde tive a oportunidade de trabalhar com polímeros.

Ao Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelas bolsas de iniciação científica (PIBIC) e de graduação sanduíche (CsF), atividades que contribuíram enormemente na minha formação pessoal e acadêmica.

A todos os professores da UFC e da Universidade de Alberta, pelo grande aprendizado oferecido ao longo do curso.

A todos os meus amigos da UFC, pela amizade, convivência e pelos bons momentos que passamos juntos.

A todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

“Se você encontrar um caminho sem obstáculos, ele provavelmente não leva a lugar nenhum”.

Frank Clark

## RESUMO

O guaraná (*Paullinia cupana*) é uma planta nativa brasileira, cujas sementes são usadas para produzir uma ampla gama de produtos alimentícios e, por ser rico em cafeína é consumido principalmente por sua atividade estimulante, o que gera um grande potencial de mercado, sendo produzido e comercializado principalmente pelos estados Amazônicos. O perfil metabólico do guaraná é rico em compostos fenólicos pertencentes a classe dos flavanoides, que contribuem com diversas funções nas plantas, entre elas, atuam como agentes antioxidantes e como defensores naturais contra microrganismos patogênicos. Este trabalho visou avaliar o perfil dos metabólitos secundários presentes na planta saudável e doente (infectada por *Fusarium decemcellulare*) empregando UPLC-QTOF-MS<sup>E</sup> combinada com análise estatística multivariada, quimiometria. A impressão digital característica foi realizada no modo de ESI negativo, sendo observado desprotonação das moléculas [M-H]<sup>-</sup>. Um total de 10 metabólitos secundários foram identificados nas amostras de folha de guaraná. A análise de componentes principais (PCA) mostrou diferenças significativas entre amostra saudáveis e doentes. Os metabólitos responsáveis pela diferenciação foram analisados por Análise Discriminante por Projeções Ortogonais a Mínimos Quadrados Parciais (OPLS-DA). A aplicação de métodos quimiométricos permitiu a identificação dos principais biomarcadores de estresse biótico, sendo a epicatequina o biomarcador encontrado na planta saudável e na planta doente os biomarcadores identificados foram o dímero de procianidina do tipo B e A, responsáveis provavelmente pela resposta ao estresse biótico.

**Palavras-chave:** Guaraná. Metabólito secundário. Quimiometria. UPLC-QTOF-MS<sup>E</sup>.

## ABSTRACT

Guarana, *Paullinia cupana*, is a Brazilian native plant whose seeds are used to produce a wide range of food products and to be rich in caffeine is consumed mainly for its stimulating activity, which creates a great potential for the market, being produced and marketed mainly by Amazon states. Guarana metabolic profile is rich in phenolic compounds of flavonoid class which contribute various functions in plants including, act as antioxidants and as natural defensive against plant pathogenic microorganisms. The purpose of this study was to evaluate the present secondary metabolites in healthy and diseased plant (infected by *Fusarium decemcellulare*) employing UPLC-QTOF-MS<sup>E</sup> combined with multivariate statistical analysis, chemometrics. The characteristic fingerprint was carried out in the negative ESI mode being observed deprotonation of molecules ([M-H]). A total of 10 secondary metabolites have been identified in samples of guarana sheet. The principal component analysis (PCA) showed significant differences between healthy and diseased sample. The metabolites responsible for the differentiation were analyzed by Orthogonal Partial Least Squares - Discriminant Analysis (OPLS-DA). The application of chemometric techniques has enabled the identification of biomarkers main biotic stress, being epicatechin the biomarker found in healthy plant and diseased plants the identified biomarkers were dimer procyanidin B-type and A, probably responsible for the response to biotic stress. After the discrimination of metabolites was identified catechin, epicatechin, dimer type B and A procyanidin and trimer type A procyanidin as the main metabolite responsible for the breakdown of the plant samples.

**Keywords:** Guarana. Secondary Metabolite. Chemometrics. UPLC-QTOF-MS<sup>E</sup>.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Localização de Maués e representação da planta guaraná.....	16
Figura 2	– Fórmula estrutural da cafeína.....	17
Figura 3	– Propriedades terapêuticas.....	18
Figura 4	– Principais fatores que podem influenciar o acúmulo de metabólitos.....	19
Figura 5	– Fórmulas estruturais: a) Esqueleto básico dos flavanoides; b) Flavan-3 ol; c) Procianidina.....	20
Figura 6	– Fórmula estrutural dos isômeros de catequina.....	21
Figura 7	– As estruturas químicas de procianidinas diméricas tipo-B: 1 epicatequina-(C4-C8)- catequina e dimérica tipo A procianidinas 3epicatequina- (C2-O7)- epicatequina.....	22
Figura 8	– Superbrotamento nos ramos, hipertrofia floral e galha no tronco.....	23
Figura 9	– Esquema básico do espectrômetro de massa.....	24
Figura 10	– Ilustração do processo de formação de íons numa fonte de eletrospray..	25
Figura 11	– Funcionamento ilustrativo do PCA.....	27
Figura 12	– Ilustração entre os modelos PLS-DA e OPLS-DA.....	28
Figura 13	– Procedimento de extração.....	33
Figura 14	– Equipamento- UPLC-QTOF-MS <sup>E</sup> .....	34
Figura 15	– Estrutura das procianidinas diméricas do tipo A.....	36
Figura 16	– Estrutura das procianidinas diméricas do tipo B.....	36
Figura 17	– Cromatograma da planta guaraná saudável e doente.....	37
Figura 18	– Espectro de massa da procianidina tipo A e tipo B, respectivamente com a razão m/z que caracteriza cada ligação.....	40
Figura 19	– Espectro de massa do padrão da procianidina tipo A e tipo B respectivamente.....	41
Figura 20	– Cromatograma dos padrões catequina e epicatequina, respectivamente.	42

Figura 21	– Principal fragmentação de procianidina do tipo B dimérica.....	43
Figura 22	– Cromatograma do padrão procianidina tipo B <sub>2</sub> .....	44
Figura 23	– Principal fragmentação de procianidina do tipo A trimérica.....	44
Figura 24	– Principal fragmentação de procianidina do tipo A dimérica.....	45
Figura 25	– Cromatograma do padrão procianidina tipo A <sub>2</sub> .....	46
Figura 26	– Análise de Componentes Principais (PCA) em 3D - Gráfico de scores da PC1 x PC2 dos dados usando o tempo de retenção e razão massa carga (tr-m/z) das amostras de guaraná.....	47
Figura 27	– Gráfico de score em modelos de duas classes de acordo com a OPLS-DA: amostras da planta saudável e amostras da planta doente do guaraná.....	49
Figura 28	– Gráficos de dispersão (S-plot) exibindo a covariância p[1] x correlação. p[1](corr)(loadings) em modelos de duas classes de acordo com a OPLS-DA: planta saudável e planta doente do guaraná. O quadrante superior direito do S-plot mostra os componentes que são elevados nas amostras codificadas como 1, enquanto o quadrante inferior esquerdo mostra os constituintes mais abundantes nas amostras codificadas como. 1.....	50

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Produção do Guaraná nos estados brasileiros em 2011.....	15
Tabela 2	– Padrões utilizados .....	32
Tabela 3	– Constituintes identificados ou tentativamente identificados em Paullinia cupana da planta saudável.....	38
Tabela 4	– Constituintes identificados ou tentativamente identificados em Paullinia cupana da planta doente.....	39
Tabela 5	– Dados atribuídos aos Biomarcadores responsáveis pela separação das amostras do gráfico S-plot.....	50

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ESI	Ionização por eletrospray
MS	Espectroscopia de massa
<i>m/z</i>	Razão massa sobre carga
OLPS-DA	Análise Discriminante por Projeções Ortogonais a Mínimos Quadrados Parciais
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCA	Análise de Componentes Principais
QTOF	Quadrupolo tempo de voo
UPLC	Cromatografia líquida de ultra pressão

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2</b>	<b>FUNDAMENTOS TEÓRICOS</b> .....	15
<b>2.1</b>	<b>Cultura do guaraná</b> .....	15
<b>2.2</b>	<b>Aspecto botânico</b> .....	16
<b>2.3</b>	<b>Área de produção</b> .....	16
<b>2.4</b>	<b>Propriedades terapêuticas</b> .....	17
<b>2.5</b>	<b>Metabólitos secundários</b> .....	18
<b>2.5.1</b>	<i>Flavonoides</i> .....	20
<b>2.6</b>	<b>Estresse biótico</b> .....	22
<b>2.7</b>	<b>Métodos analíticos</b> .....	23
<b>2.7.1</b>	<i>UPLC-QTOF-MS<sup>E</sup></i> .....	23
<b>2.7.2</b>	<i>Quimiometria</i> .....	26
<b>2.7.2.1</b>	<i>Análise de componentes principais – PCA</i> .....	27
<b>2.7.2.2</b>	<i>Mínimos quadrados parciais – PLS</i> .....	28
<b>2.7.2.2.1</b>	<i>Análise Discriminante por Projeções Ortogonais a Mínimos Quadrados Parciais – OPLS-DA</i> .....	28
<b>3</b>	<b>OBJETIVO</b> .....	30
<b>3.1</b>	<b>Geral</b> .....	30
<b>3.2</b>	<b>Específicos</b> .....	30
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODO</b> .....	31
<b>4.1</b>	<b>Materiais</b> .....	31
<b>4.1.1</b>	<i>Instrumentos</i> .....	31
<b>4.1.2</b>	<i>Reagentes e padrões</i> .....	31
<b>4.2</b>	<b>Procedimento experimental</b> .....	32
<b>4.3</b>	<b>Equipamento</b> .....	33
<b>4.3.1</b>	<i>Condições de análise</i> .....	34
<b>4.3.2</b>	<i>Condições do massa de alta resolução –QTOF</i> .....	34
<b>4.4</b>	<b>Análise quimiométrica</b> .....	34
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	35
<b>5.1</b>	<b>Caracterização química via UPLC-QTOF-MS<sup>E</sup></b> .....	35
<b>5.2</b>	<b>Análise de componentes principais da planta saudável e doente de</b>	46

	<b>guaraná.....</b>	
<b>5.3</b>	<b>Análise de OPLS-DA das amostras de guaraná.....</b>	<b>47</b>
<b>5.3.1</b>	<b><i>Comparação entre as amostras da planta saudável e doente.....</i></b>	<b>48</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>52</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>53</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Desde as antigas civilizações, as propriedades terapêuticas de plantas têm sido descobertas e seu conhecimento repassado de geração em geração. A Organização Mundial de Saúde (OMS) divulgou que em 1990, de 65-80% da população dos países em desenvolvimento, utilizam plantas medicinais nos cuidados à saúde (AKERELE, 1993).

O guaraná (*Paullinia cupana*) é um dos produtos típicos da Amazônia mais conhecidos no Brasil, sendo muito utilizado por causar estímulo do sistema nervoso central. A expansão da cultura do guaraná gerou um mercado com grande potencial já sendo comercializado na indústria farmacêutica, no comércio de bebidas à base da planta e exportação do pó da semente para usos diversos, entre outros (CARVALHO et al., 2008).

O guaraná apresenta agentes de defesa que contribuem para a sobrevivência da planta, sendo a catequina, epicatequina e procianidrina os principais metabólitos secundários encontrados, porém a sua quantidade pode ser alterada por diversos fatores, como a temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, nutrientes, altitude, poluição atmosférica e ataque de patógenos, entre outros. Assim, a concentração desses metabólitos é diferente numa planta doente e saudável. (TAIZ & ZEIGER, 2013).

A cromatografia líquida de ultra pressão (UPLC) é uma técnica que vem sendo usada na investigação dos diferentes metabólitos secundários e, por gerar um grande volume de dados, a quimiometria tem se tornado uma ferramenta extremamente útil no que tange a interpretação de dados complexos e tem sido empregada cada vez com mais frequência. Dentro desse universo encontram-se as duas ferramentas amplamente utilizadas em análise de perfil metabólico de alimentos: Análise de Componentes Principais (PCA) e a Análise Discriminante por Projeções Ortogonais a Mínimos Quadrados Parciais (OPLS-DA).

A PCA pode ser um poderoso método sendo útil para o reconhecimento de padrões, tendência e agrupamento enquanto OPLS-DA pode ser útil para uma melhor interpretação dos resultados, classificação e identificação de biomarcadores responsáveis por essa diferenciação (KHAKIMOV et al., 2015).

O presente trabalho tem como objetivo comparar o perfil metabólico de folhas de guaraná da planta saudável e doente, empregando UPLC-QTOF-MS<sup>E</sup> associado as ferramentas quimiométricas. A partir da interpretação desses dados, pretende-se obter informações que auxiliem no entendimento dos processos de resposta ao estresse biótico da espécie.

## 2 FUNDAMENTOS TEÓRICOS

### 2.1 Cultura do guaraná

O nome guaraná também conhecido como guaranazeiro vem do tupi “Wara’ná” que significa “arvore que sobe apoiada em outra” (ARAÚJO, 2009). O guaranazeiro é uma planta nativa e cultivada no Brasil, maior país da América do Sul, o qual possui clima tropical predominantemente e apresenta uma grande biodiversidade sendo fonte de recursos naturais renováveis. Diante disso, o estado do Amazonas se torna a região ideal para o desenvolvimento do guaraná, pois apresenta condições climáticas e de solo satisfatória, com temperatura elevada e solos mais profundos e bem drenados, o que leva a um melhor cultivo da planta. Essas condições também são encontradas no Acre, Pará, Bahia e Mato Grosso, como mostra a Tabela 1 (SCHIMPL et al., 2013).

Tabela 1 Produção do Guaraná nos estados brasileiros em 2011.

<b>Estados Brasileiros</b>	<b>Área Plantada (ha)</b>	<b>Área Colhida (ha)</b>	<b>Produção (ton)</b>	<b>Rendimento (kg/ha)</b>	<b>Produção relativa (%)</b>
Acre	27	27	3	111	0.1
Amazonas	6743	3349	599	179	16.0
Pará	41	41	21	512	0.6
Bahia	7054	6749	2907	431	77.4
Mato Grosso	600	517	224	433	6.0
Total	14465	10683	3754	351	100

Fonte: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria>, acessado em 15/04/2016

Os dados da tabela mostram que os estados do Amazonas e da Bahia englobam mais que 90% da produção relativa do guaraná no Brasil. Entretanto, o estado da Bahia tem um rendimento em (kg/ha) superior ao do estado do Amazonas, aproximadamente 2,5 vezes maior. A baixa produtividade no Amazonas está relacionada com o desenvolvimento de doenças pela ação de pragas que prejudicam a saúde da planta guaraná, crescimento e desenvolvimento, e também devido a mão de obra não qualificada dos produtores rurais. (SCHIMPL et al., 2013).

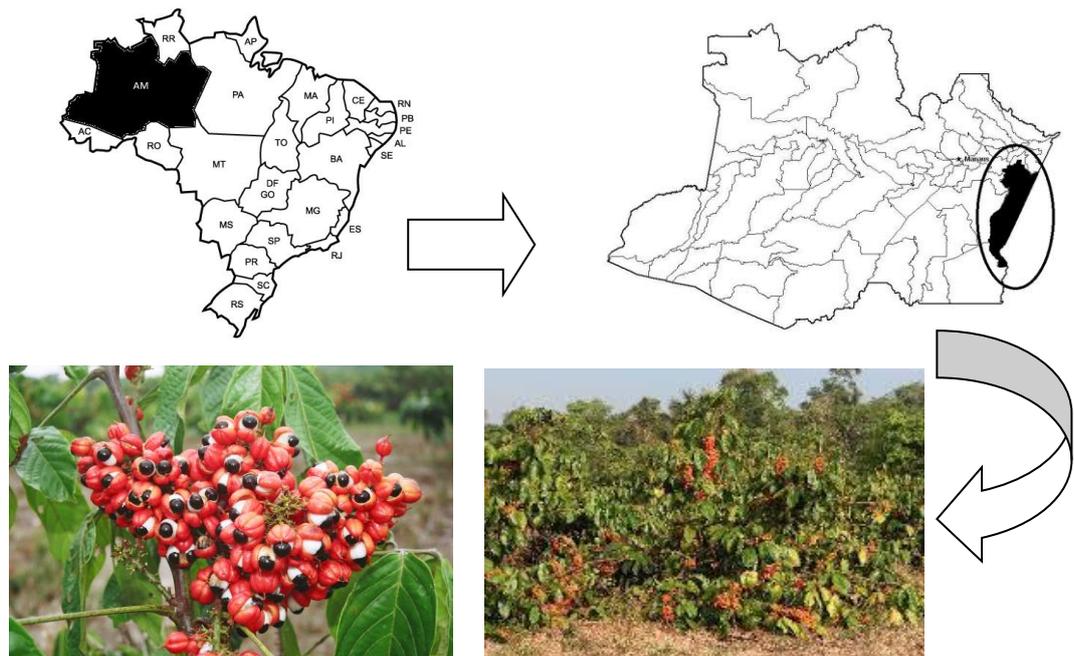
Apesar do aumento do interesse no guaraná por sua ação medicinal e propriedade estimulante, a ação dos fungos na planta leva a uma diminuição do aproveitamento dos recursos naturais

da floresta Amazônica, que prejudica a geração de produtos e processos economicamente viáveis.

## 2.2 Aspecto botânico

O guaraná, pertencente à família das *Sapindáceas*, sendo cultivado há vários anos por diversas tribos indígenas, sendo a principal área produtora do estado do Amazonas o município de Maués. É uma planta tropical, adaptada ao clima quente e úmido, arbustiva, lenhosa, trepadeira, que no seu habitat natural se apoia nas árvores da floresta, chegando a atingir 10 metros de altura (Figura 1). A planta tem folhas grandes de coloração verde escuro, possui folículo curto ou longo-peciolados e suas flores crescem em forma de cachos e rendem muitos frutos que são formados por cápsulas vermelho-laranja, quando maduro, as sementes apresentam colocação castanho escuro (GONÇALVES, 1971; HENMAN, 1982).

Figura 1 – Localização de Maués e representação da planta guaraná.



Fonte: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/ComTec642008.pdf>, acessado em 16/06/2016.

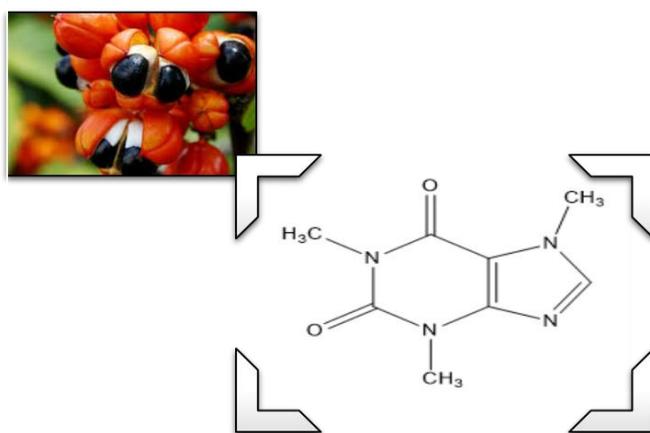
## 2.3 Área de produção

O Brasil é o principal produtor do guaraná além da Venezuela e Peru, que comercializam somente uma pequena área. A produção nacional tem se dado em torno de 4 mil toneladas/ano. Dessa produção, o guaraná em ramas, as sementes torradas, tem a seguinte destinação: 70% é absorvido pelas indústrias de refrigerantes gaseificados, enquanto que os

30% restantes são comercializados sob a forma de xarope, pó, bastão, extrato para consumo interno e para a exportação (SUFRAMA, 2003).

As sementes correspondem a uma porção da planta comumente utilizada além das flores e frutos, e se caracterizam pela presença da cafeína, o principal constituinte químico ativo descrito no guaraná (Figura 2). A maior concentração de cafeína encontrada no guaraná está na semente com um teor de 2,5-5%, embora esteja presente em toda a planta em menor teor. Estes teores são bem superiores ao do café (cerca de 4 vezes), 10 vezes maior do que o do chá, e 30 vezes maior do que o do cacau. Sabe-se ainda que a cafeína é consumida em todo o mundo, atingindo cerca de 80% da população mundial. (CARLINI, 2003; EDWARDS et al., 2005; OGAWA; UEKI, 2007).

Figura 2 – Fórmula estrutural da cafeína.



Fonte: Elaborada pelo autor.

## 2.4 Propriedades terapêuticas

O guaraná possui diversas funções terapêuticas, dentre as quais a que é a mais conhecida é a de estimulante do sistema nervoso central, devido a presença da cafeína e de outras substâncias que acrescentam uma característica nutricional e medicinal. Estudos também revelaram que a ingestão do guaraná está diretamente relacionada com a melhora do humor, aumento da resistência nos esforços mentais e musculares, diminuindo a fadiga, fatores que contribuem para a redução de peso e gordura. (DOHERTY; PM, 2004; LORIST; TOPS, 2003).

Figura 3 – Propriedades terapêuticas.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Além disso, o guaraná também desempenha uma importante função cardiovascular, estimulando a contração e aumentando a taxa de batimentos, também é regulador das funções intestinais e é usado como anestésico, utilizando para combater as enxaquecas. A literatura também reporta para o guaraná efeitos quimiopreventivos e antitumoral, em vários modelos experimentais realizados *in vitro* e *in vivo* (FUKUMASU, 2008).

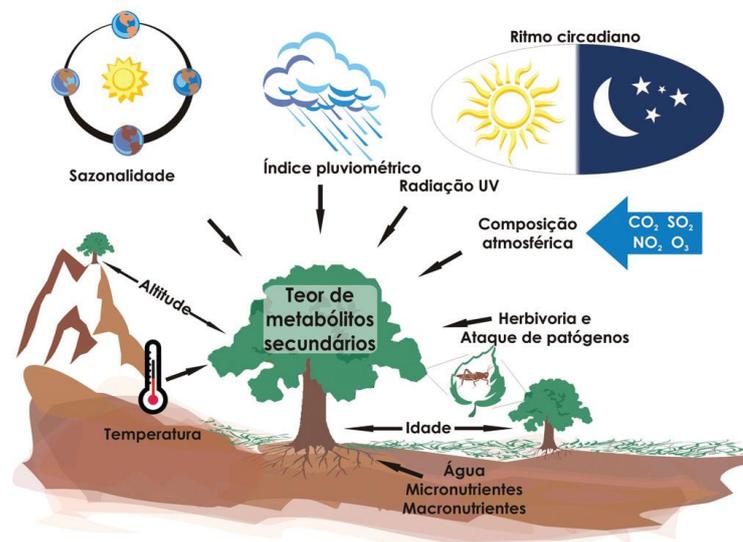
## 2.5 Metabólitos secundários

As reações químicas que ocorrem dentro da célula representam o metabolismo celular e, essas reações produzem ou transformam os compostos químicos, os quais recebem o nome de metabólitos, que por sua vez podem ser divididos em metabólitos primários e metabólitos secundários (TAIZ & ZEIGER, 2013).

Os processos bioquímicos essenciais à vida derivam do metabolismo primário, que se caracteriza pela grande produção de metabólitos que envolvem as várias reações químicas que realizam a transformação de moléculas de nutrientes nas unidades constitutivas essenciais da célula, sendo assim o metabolismo primário caracteriza-se como a base para a construção de moléculas essenciais as funções fisiológicas dos vegetais. O metabolismo secundário caracteriza-se pela biossíntese de micromoléculas com diversidade e complexidade estrutural, produção em pequena escala, distribuição restrita e especificidade, ou seja, certos metabólitos secundários são restritos a uma espécie vegetal enquanto os primários são encontrados em todo o reino vegetal (TAIZ & ZEIGER, 2013).

A produção desses componentes tem como função proteger a planta contra herbívoros, infecções por microrganismo patogênicos e agem como atrativos para animais polinizadores. A síntese de metabólitos secundários é influenciada por diversos fatores como sazonalidade, ritmo circadiano e desenvolvimento, temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, nutrientes, altitude, poluição atmosférica, indução por estímulos mecânicos ou ataque de patógenos alteram a sua quantidade e, muitas vezes, até a natureza dos constituintes ativos presentes no tecido, como mostra na Figura 4 (GOBBO-NETO; LOPES, 2007)(GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

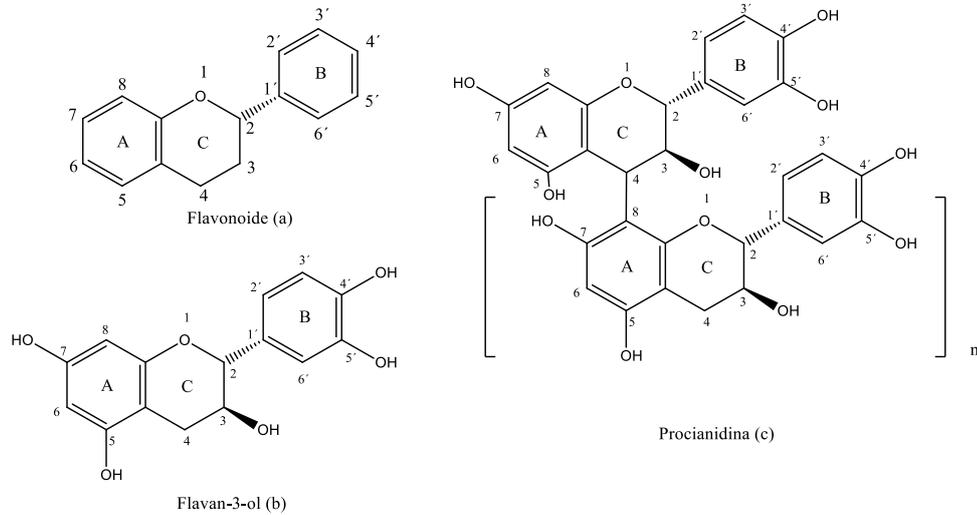
Figura 4 – Principais fatores que podem influenciar o acumulo de metabólitos.



Fonte: GOBBO-NETO; LOPES, 2007.

Existem três grandes grupos de metabólitos secundários: compostos fenólicos, terpenos e compostos nitrogenados (TAIZ & ZEIGER, 2013). No guaraná os metabólitos secundários que serão estudados são os flavanoides que constituem a maior classe de compostos fenólicos, apresentando uma estrutura química contendo dois anéis aromáticos (A e B) unidos por um anel heterocíclico oxigenado (C) (Figura 5).

Figura 5 – Fórmulas estruturais: a) Esqueleto básico dos flavanoides; b) Flavan-3-ol; c) Procianidina.

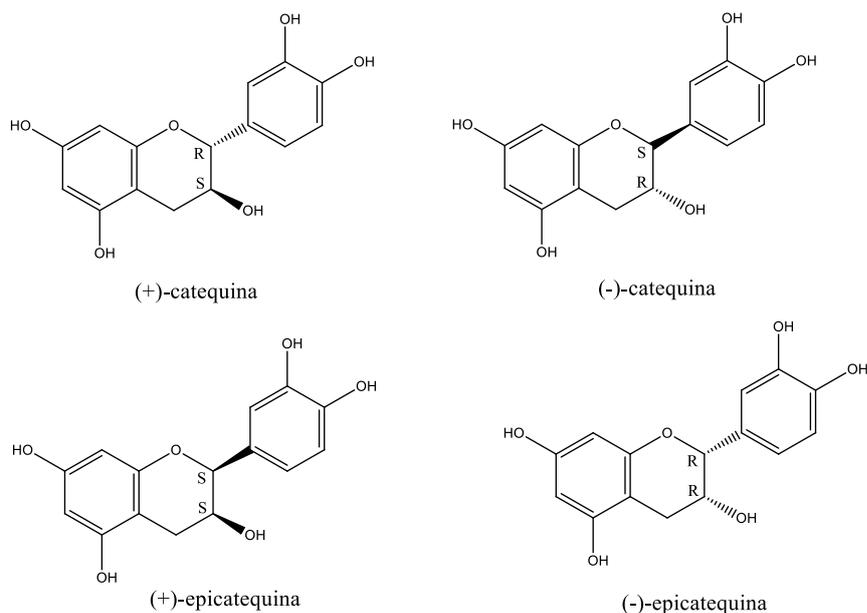


Fonte: Adaptação de TAIZ & ZEIGER, 2013.

### 2.5.1 Flavanoides

A catequina é um tipo de flavanoide pertencente à família dos flavan-3-ol e constituída por centros quirais, dos quais resultam em dois estereoisômeros: *trans*-catequina e *cis*-epicatequina, diferenciando apenas na fórmula estrutural. Na natureza existem os quatro isômeros (Figura 6), (+), (-) -catequina e (+), (-) -epicatequina, porém a (+) -catequina e (-) -epicatequina são as formas mais encontrada (RINALDO et al., 2014). São amplamente encontradas em frutas: maçã e açaí e, em bebidas: vinhos, chá verde, chá preto e no guaraná.

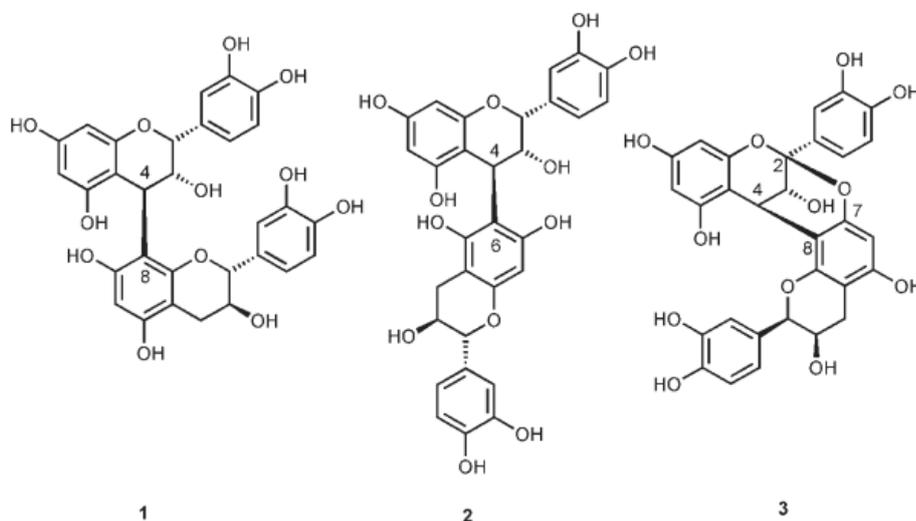
Figura 6 – Fórmula estrutural dos isômeros de catequina.



Fonte: Adaptação de RINALDO et al., 2014.

O guaraná apresenta além da catequina e a epicatequina como principais constituintes do metabolismo secundário, os taninos condensados, também chamados de proantocianidinas, sendo formado pela condensação de duas ou mais unidades do monômero flavan-3-ol. Os taninos condensados possuem uma variedades de grupo dentro os quais, a prociadininas são consideradas como a maior classe (TALA et al., 2013). As procianidinas podem apresentar dois tipos de ligação, tipos A e B (Figura 7), que variam na ligação na unidade do flavanoide. As do tipo B são caracterizadas por unidades Flavanoides ligados, entre C-4 e C-6 da unidade de extensão de cadeia ou C-4 e C-8 da unidade de terminação de cadeia. As procianidinas do tipo A diferem das do tipo B, por possuir uma ligação éter adicional em C-2 (TALA et al., 2013).

Figura 7 – As estruturas químicas de procianidinas diméricas tipo-B: 1 epicatequina- (C4-C8) -catequina, 2 epicatequina- (C4-C6) -catequina e dimérica tipo A procianidinas, 3 epicatequina- (C2-O7) –epicatequina.



Fonte: RODRIGUES et al., 2007.

Os compostos fenólicos presentes no guaraná contribuem com diversas funções nas plantas, entre elas, os flavanoides atuam como agentes antioxidantes e como defensores naturais da planta contra microrganismos patogênicos, como vírus, bactérias e fungos, além de proteger os vegetais contra incidências de raios ultravioletas e atrair animais com finalidade de polinização (TAIZ & ZEIGER, 2013).

Os metabólitos secundários desempenham uma importante função na adaptação das plantas ao ambiente e, devido aos efeitos benéficos podem aumentar a sobrevivência de uma espécie atuando como agentes defensores.

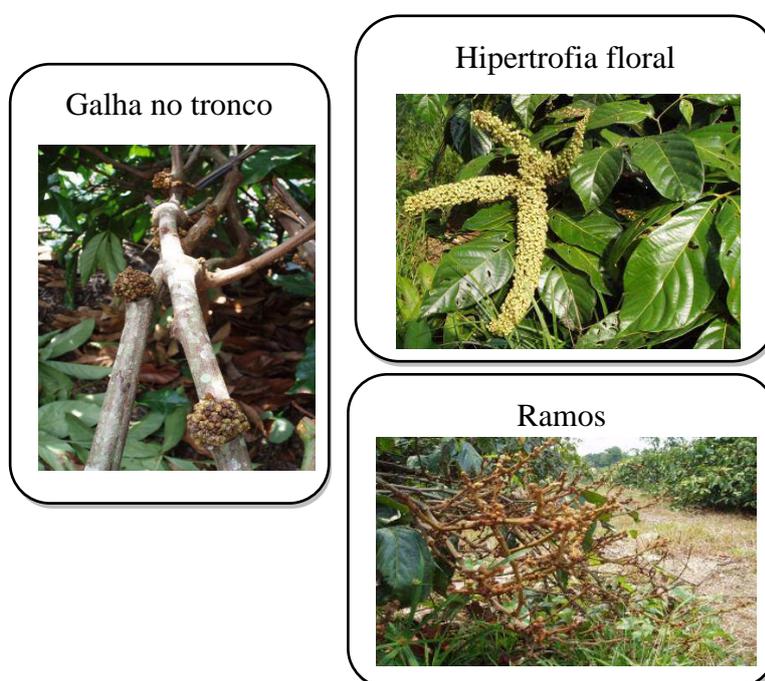
## 2.6 Estresse biótico

Um dos grandes problemas que o guaranzeiro vem sofrendo é ataque de agentes patogênicos que causam o superbrotamento nas plantas, que acaba prejudicando a expansão do cultivo do guaraná, limitando sua produção. A doença do guaraná é causada pelo fungo *Fusarium decemcellulare* que retarda o crescimento de mudas e causa diversos outros sintomas na planta adulta. Ocorrem brotações excessivas ao longo dos ramos; formando uma massa densa e desuniforme, em consequência da multiplicação exagerada de células; hipertrofia floral, aumento do tamanho das células dando às flores um aspecto de cálice compacto e endurecido, impedindo a polinização e causando a morte dos tecidos; e galhas no

tronco, formação de uma massa compacta nas gemas da planta que impede a formação de novos ramos, como mostrado na Figura 8 (ARAÚJO et al., 2006).

Uma forma de fazer o controle da praga é realizando inspeções periódicas para identificar plantas com superbrotamento. As mudas com essa doença devem ser queimadas, os ramos afetados devem ser eliminados e em alguns casos é necessário a completa eliminação da planta, quando apresentar os sintomas galha no tronco. Em complemento, é imprescindível a utilização de pulverizadores com fungicidas como medida preventiva (ARAÚJO et al., 2006).

Figura 8 – Superbrotamento nos ramos, hipertrofia floral e galha no tronco.



Fonte: [http://servicos.cpa.embrapa.br/ComTec\\_45\\_2006.pdf](http://servicos.cpa.embrapa.br/ComTec_45_2006.pdf), acessado em 15/04/2016.

## 2.7 Métodos analíticos

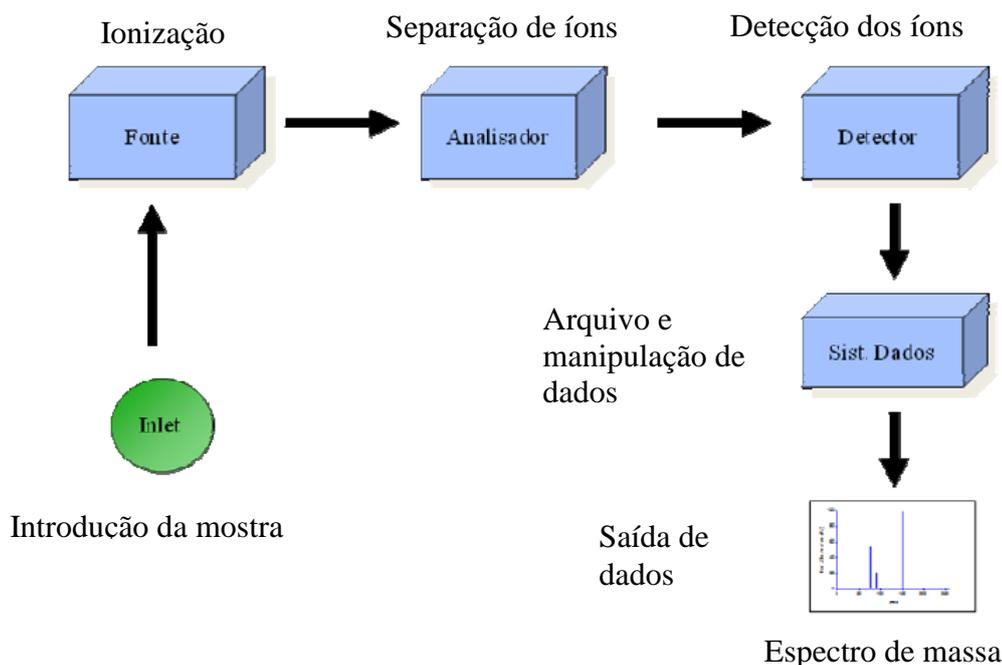
### 2.7.1 UPLC-QTOF-MSE

Com o objetivo de avaliar a variação dos metabólitos secundários do guaraná em resposta ao estresse biótico, um sistema UPLC-QTOF-MS foi utilizado para investigar o perfil metabólico dessa amostra. Essa nova técnica de cromatografia líquida foi desenvolvida para se obter uma maior eficiência na separação dos compostos, a cromatografia líquida de ultra pressão (UPLC).

Esta técnica utiliza pressões mais elevadas, permite uso de colunas em aço inoxidável com diâmetro interno na ordem dos 2 mm, empacotadas com partículas de tamanho muito pequeno, inferiores a 2  $\mu\text{m}$ . O consumo de solvente é relativamente inferior e a vazão aplicada para a eluição das amostras pela fase estacionária é menor. Assim, o cromatograma apresenta uma maior resolução, grau de separação entre os picos constituintes de uma amostra, e uma maior sensibilidade de detecção dos compostos presentes nas amostras (LIU et al., 2015; WAN et al., 2013).

O UPLC quando acoplado ao espectrômetro de massa que é usado como detector confere alta seletividade e sensibilidade. Assim, a caracterização das moléculas se dá pela relação massa/carga ( $m/z$ ) de íons, determinando o peso molecular e informações importantes da estrutura química (CIENFUEGOS & VAITSMAN, 2000). Na Figura 9 temos um esquema simples de um espectrômetro de massa

Figura 9 – Esquema básico do espectrômetro de massa.



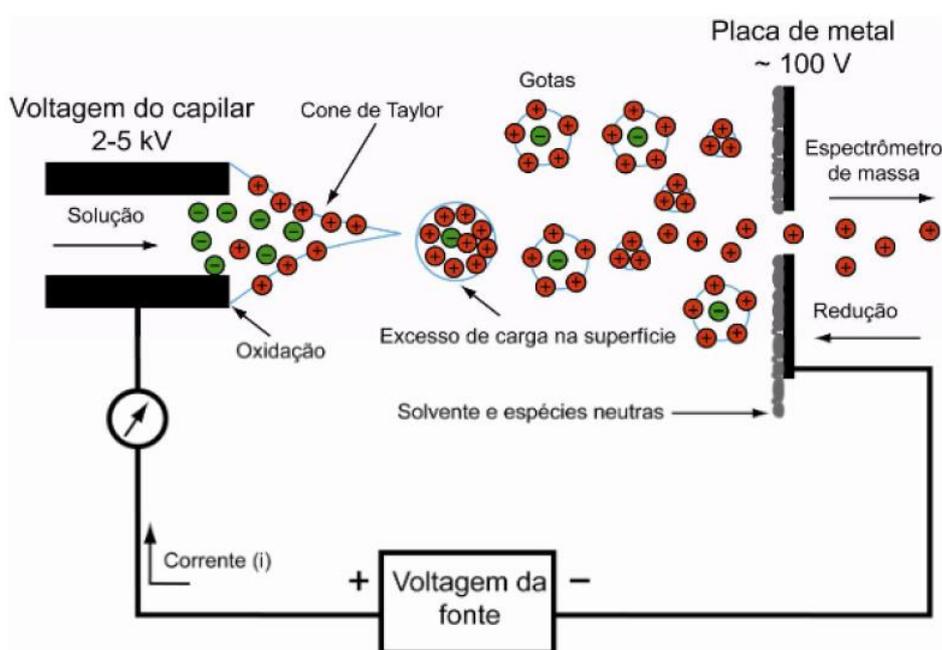
Fonte: LORDEIRO, 2010.

O modo de ionização utilizado nessa técnica é a eletrospray, ESI-MS, que possibilita uma maior sensibilidade, seletividade e consumo reduzido da amostra. Nesse processo é necessária uma fonte de alta tensão que esteja em contato com a solução contendo os analitos. O líquido proveniente da coluna cromatográfica entra em um nebulizador capilar junto com o gás inerte,  $\text{N}_2(\text{g})$ . O potencial elétrico aplicado entre o nebulizador e a entrada do espectrômetro de massa dá origem a um excesso de carga na fase líquida através de reações redox, gerando um forte campo elétrico na saída do capilar que, misturado com o gás inerte,

produz um aerossol que estará enriquecido por íons positivos ou negativos, dependendo do potencial aplicado. Conforme a densidade de carga aumenta no capilar, ocorre uma deformação, o líquido eletricamente carregado que sai pelo capilar forma um cone, o qual é denominado de cone de Taylor que se transforma em um fino filamento e se dispersa em gotículas muito pequenas (HARRIS,2012).

A Figura 10 ilustra o processo que acontece em uma fonte ESI. Uma solução contendo íons é passada por um capilar onde é aplicada uma alta tensão, positiva ou negativa, ocorrendo então a redução/oxidação de alguns íons. Na etapa seguinte é formado um spray eletrolítico. As gotículas carregadas começam a diminuir de tamanho devido à evaporação do solvente, até o momento em que são obtidos os íons isolados (HARRIS,2012; LORDEIRO, 2010).

Figura 10 – Ilustração do processo de formação de íons numa fonte de eletrospray.



Fonte: LORDEIRO, 2010.

No nosso estudo, o método de separação de íons, o analisador utilizado é o espectrômetro híbrido com quadrupolo e de tempo de voo (QTOF). O espectrômetro com quadrupolo usa quatro barras sujeitas a uma diferença de potencial. Variando essas voltagens, somente íons com uma razão  $m/z$  determinada irão atravessar no centro do quadrupolo, enquanto que os outros íons serão desviados da trajetória central. Um espectro de massa é obtido a partir do monitoramento dos íons que atinge a extremidade do quadrupolo sem tocar nos polos. O analisador de massa por tempo de voo, usa as diferenças de tempo que os íons de diferentes  $m/z$  levam para cruzar o sistema de separação de íons. Os íons são acelerados por

um campo externo e levados com uma energia cinética igual a  $\frac{1}{2}mv^2$ , na qual “m” é a massa do íon e “v” a sua velocidade. Sendo a energia cinética a mesma e a massa diferente, os íons mais leves se deslocaram mais rapidamente que os íons mais pesados, assim os íons acelerados se deslocam em direção ao detector em ordem crescente de massa. (YUNES & CALIXTO, 2001; CIENFUEGOS & VAITSMAN, 2000).

O sistema de detecção MS/MS é empregado pelo seu alto grau de seletividade e sensibilidade podendo identificar e quantificar os analitos.

Todas estas vantagens vieram a contribuir para a separação cromatográfica de analitos, reduzindo o tempo de análise, facilidade de operação e capacidade de analisar uma taxa  $m/z$  maior.

### **2.7.2 Quimiometria**

A combinação da técnica cromatográfica usada com a análise multivariada de dados fornece informações de similaridades e diferenças entre amostras sendo possível identificar os principais metabólitos responsáveis pela discriminação das amostras de uma planta, por exemplo.

A Quimiometria utiliza ferramentas matemáticas e estatísticas para obtenção do máximo de informações com a análise dos dados obtidos. Em química as técnicas quimiométricas fazem uso da manipulação de vetores e matrizes, o que reduz a seletividade instrumental pela utilização de um número grande de sinais, abrangendo um gama maior de informações (ARAÚJO et al., 2006; ROBSON, 2001).

Os métodos de análises exploratória decompõem uma matriz de dado X, de modo que as novas matrizes são produto de duas novas variáveis em: X (NxK) , onde N é o número de amostra e k o número de variáveis, assim, a avaliação inicial dos dados permite revelar quais amostras são semelhantes ou diferentes entre si, através da visualização de agrupamentos em gráficos ou diagramas (KHAKIMOV et al., 2015).

No tratamento dos dados as ferramentas mais utilizadas na quimiometria são a regressão por mínimos quadrados parciais (PLS, Partial Least Squares), regressão por componentes principais (PCR, Principal Regression Components), além das técnicas de reconhecimento de padrões (PCA, Principal Components Analysis) e (HCA, Hierarchical Cluster Analysis). Neste trabalho foram utilizadas: PCA e análise discriminante por mínimos quadrados parciais ortogonal (OPLS-DA, Orthogonal Partial Least Squares-Discriminant Analysis).

### 2.7.2.1 Análise de componentes principais – PCA

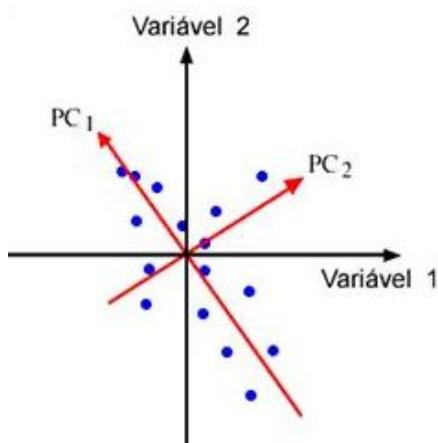
A PCA é uma técnica útil para o reconhecimento de padrões, não supervisionados, que fornece informações sobre tendência a formação de grupos no conjunto de dados. A técnica reduz o número de variáveis presente, de modo a expressar as informações relevantes contidas nas primeiras variáveis em um menor número possíveis de variáveis, descrevendo as principais variações da matriz de dados (BRERETON, R. , 2007).

A PCA é resultado de uma decomposição da matriz de dados originais,  $X$ , em termos do produto de duas pequenas matrizes  $T$  e  $P'$ , de modo a manter o máximo de informação de  $X$  (Figura 11), assim a PCA pode ser representada da seguinte forma, equação 1.

$$X = T \times P' + E \quad (1)$$

Onde,  $T$  é a matriz dos escores referente às amostras e contém as novas coordenadas do sistema de eixos;  $P$  é matriz de loadings, referente às variáveis onde os elementos de cada coluna correspondem aos coeficientes das combinações das variáveis originais e  $E$  é a matriz dos desvios entre as projeções e as coordenadas originais, denominadas de resíduo (BRERETON, 2007; KHAKIMOV et al., 2015).

Figura 11 – Funcionamento ilustrativo do PCA.



Fonte: [www.google.com.br/funcionamentodeumpca](http://www.google.com.br/funcionamentodeumpca), acessado em 03/06/16.

A escolha das matrizes  $T$  e  $P'$  deve ser feita de tal modo a maximizar a variância de  $X$  nas primeiras componentes, ou seja, as primeiras componentes principais, de maiores valores de variância contenham a maior parte da informação relevante, e que as restantes sejam apenas ruído. Assim, a técnica é útil para simplificar uma série de dados utilizando gráficos bidimensionais e tridimensionais que auxiliam na distinção dos grupos na amostra.

### 2.7.2.2 Mínimos quadrados parciais – PLS

A PLS é uma técnica de análise de dados multivariados utilizada para relacionar uma ou mais variáveis resposta (Y) com diversas variáveis independentes (X), baseada no uso de fatores. Assim sendo, no PLS as matrizes X e Y são decompostas simultaneamente em uma soma de variáveis. A matriz X é decomposta usando a equação anterior e a matriz Y segue a seguinte equação 2.

$$Y = U \times Q' + F \quad (2)$$

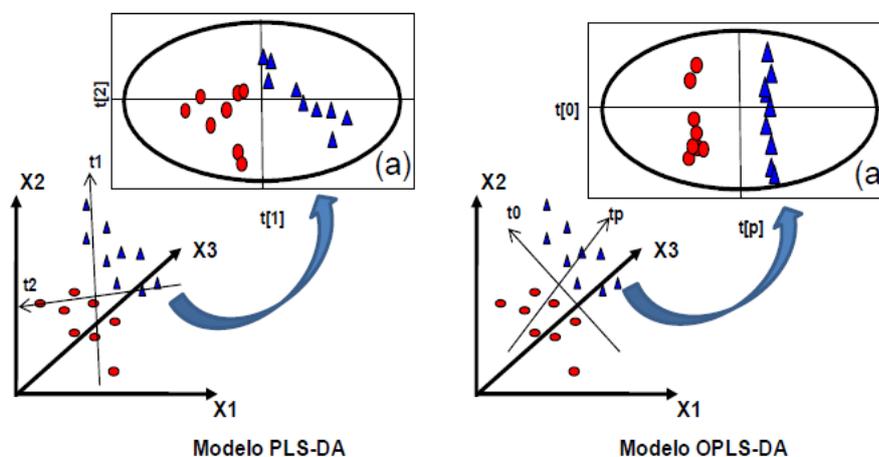
Onde U é a matrizes de escores, Q' é a matrizes dos loadings e F são os resíduos da matriz Y. Assim, uma relação linear entre as duas matrizes de dados X e Y deve existir correlacionando a matriz de escores e de loadings (KHAKIMOV et al., 2015).

#### 2.7.2.2.1. Análise Discriminante por Projeções Ortogonais a Mínimos Quadrados Parciais – OPLS-DA

O OPLS-DA é uma derivação do PLS que é muito usado na determinação de metabólitos (TRYGG; WOLD, 2002). A técnica é um método supervisionado introduzido como uma melhoria do método PLS-DA e usado para discriminar duas ou mais componentes.

É baseado na remoção da variável da matriz X que não está relacionada a matriz Y, ou seja, remove a variável que esta ortogonal a matriz Y. A separação dessa variável é realizada por meio de rotações no PLS-DA original, Figura 12 (WIKLUND et al., 2008).

Figura 12 – Ilustração entre os modelos PLS-DA e OPLS-DA.



Fonte: WIKLUND et al., 2008.

Isso gera uma melhor interpretação dos resultados, classificação e identificação de biomarcadores (KHAKIMOV et al., 2015). Dessa forma, essa técnica vem sendo empregada

na análise de metabolômica de folha de alcachofra (FARAG et al., 2013), identificação de compostos interessantes bioquímicos usando modelos de classe OPLS (WIKLUND et al., 2008).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Geral

- ✚ Este trabalho visou avaliar o perfil dos metabólitos secundários presentes em uma planta saudável e outra doente (infectada por *Fusarium* sp) empregando UPLC-QTOF-MS<sup>E</sup> combinada com análise estatística multivariada, Quimiometria.

#### 3.2 Específicos

- ✚ Obter um fingerprint metabólico, impressão digital, essencial para determinar as diferenças de expressão metabolômica entre espécies de folha de guaraná saudáveis e infectadas;
- ✚ A partir de métodos quimiométricos de análise multivariada (PCA, OPLS-DA e S-Plot), diferenciar amostras vegetais submetidas a condições de estresse biótico (Infecção por *Fusarium decemcellulare*);
- ✚ A partir da interpretação dos resultados obtidos, utilizando a quimiometria, determinar os biomarcadores associados a resposta causada pelo estresse biótico.

## 4 MATERIAL E MÉTODO

### 4.1 Materiais

- Tubos de ensaio de 15 mL
- Estante para tubos de ensaio
- Seringa de vidro com agulha
- Pipeta automática de 1000 µL com ponteiras
- Vials para UPLC-MS
- Filtros de PTFE de tamanho de poro 0,22 µm
- Vidrarias auxiliares: proveta, becker, erlenmeyer
- Hexano PA
- Etanol PA
- Água Milli Q

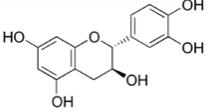
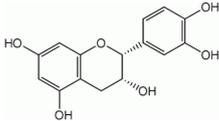
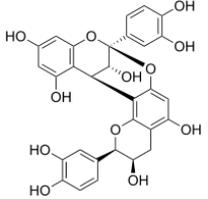
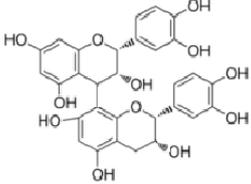
#### 4.1.1 Instrumentos

- Balança analítica
- Vortex para agitação de tubos de ensaio
- Banho ultrassom de potência fixa de 135 W
- Centrífuga

#### 4.1.2 Reagentes e padrões

Os reagentes utilizados para o desenvolvimento deste trabalho foram provenientes da LiChrosolv<sup>®</sup>, solventes para cromatografia líquida, e da Aldrich Chemical Company e foram utilizados sem nenhuma purificação previa. A água de alta pureza foi produzida pelo sistema Milli - Q da Millipore. As amostras de guaraná foram obtidas da Embrapa Amazônia Ocidental e foram acondicionadas sob refrigeração, temperatura aproximada de 2° C, até o momento da análise. O padrão de (+)-catequina (Lote BCBF0735V) foi obtido na Sigma - EUA, os padrões de (-)-Epicatequina (Lote 13021817), Procianidina B2 (Lote 13021848) e Procianidina A2 (Lote 13021802) foram obtidos na Extrasynthese – França, Tabela 2.

Tabela 2 – Padrões utilizados.

Nome	Nome IUPAC	Massa Molar (g/mol)	Classe	Fórmula Molecular	Fórmula Estrutural
Catequina	(2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> )-2-(3,4-dihidroxifenil)-3,4-dihidro-2 <i>H</i> -cromone-3,5,7-triol	290,24	Flavanoide	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	
Epicatequina	(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> )-2-(3,4-dihidroxifenil)-3,4-dihidro-2 <i>H</i> -cromone-3,5,7-triol	290,24	Flavanoide	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	
Procianidina tipo A	(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,8 <i>S</i> ,14 <i>R</i> ,15 <i>R</i> )-2,8-bis(3,4-dihidroxifenil)-2,3,4,14-tetrahidro-8,14-metanobenzo[7,8][1,3]dioxolano[4,5- <i>h</i> ]cromeno-3,5,11,13,15-pentanol	576,12	Flavanoide	C <sub>30</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub>	
Procianidina Tipo B	(2 <i>R</i> ,2' <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,3' <i>R</i> ,4 <i>R</i> )-2,2'-bis(3,4-dihidroxifenil)-3,3',4,4'-tetrahidro-2 <i>H</i> ,2' <i>H</i> -4,8'-bicromeno-3,3',5,5',7,7'-hexol	578,52	Flavanoide	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>	

Fonte: Elaborada pelo autor.

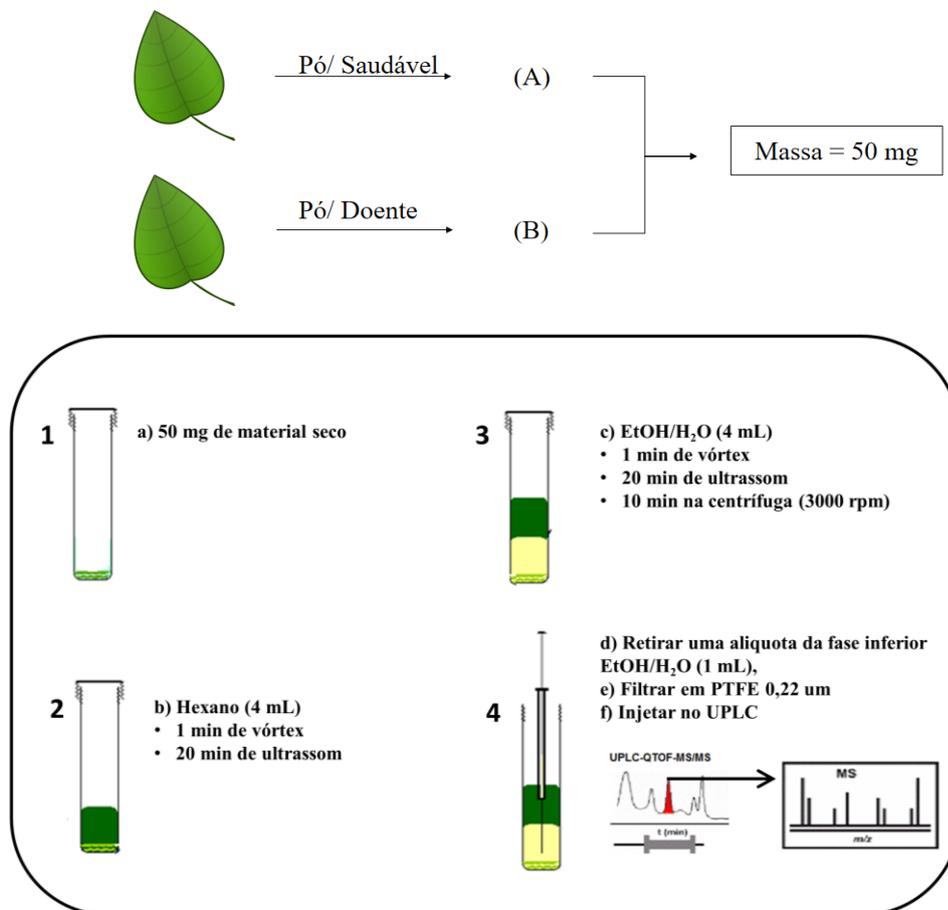
## 4.2 Procedimento experimental

A Figura 13 ilustra a metodologia de extração adaptada de Chagas-Paula et al (2015) e Nehme et al (2008) onde uma amostra de 50 mg da folha da planta (saudável e doente) foi pesada em uma balança analítica e transferida para um tubo de ensaio de 15 mL. Em seguida foi adicionado 4 mL de hexano PA. A mistura foi homogeneizada em vórtex por 1 minuto e realizada a extração de compostos apolares em banho ultrassônico por 20 minutos com potência fixa (135 W). Na etapa seguinte foi adicionado à mistura 4 mL de solução etanol/água (7:3). A mistura foi homogeneizada em vórtex por 1 minuto e realizada a extração de compostos polares em banho ultrassônico por mais 20 minutos. Posteriormente a centrifuga foi utilizada para decantar o extrato não dissolvido à 3000 rpm por 10 minutos.

Uma alíquota de 1 mL da fase inferior polar (etanol/água) foi retirada e filtrada em filtro de PTFE de 0,22 µm e o filtrado foi recolhido em vials e encaminhado para análise em UPLC.

A Figura 13 ilustra de forma resumida a metodologia de preparação de extratos por partição líquido-líquido utilizando ultrassom para análise em UPLC.

Figura 13 – Procedimento de extração.



Fonte: Adaptado de NEHME et al., 2008.

### 4.3 Equipamento

A identificação e quantificação dos metabólitos secundários foi realizada em um sistema cromatográfico Waters composto de um cromatografia líquida de ultra performance (UPLC™), modelo Aquilty, acoplado a um espectrômetro de massa tipo tandem modelo Premier XE. A Figura 14 ilustra o sistema utilizado.

Figura 14 – Equipamento- UPLC-QTOF-MS<sup>E</sup>.



Fonte: Elaborada pelo autor.

#### **4.3.1 Condições de análise**

A análise foi realizada em um sistema Acquity UPLC (Waters), acoplado a um sistema de Quadrupolo/ empo de Voo (QtoF, Waters) pertencente a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA. As corridas cromatográficas foram realizadas em uma coluna Waters Acquity UPLC BEH (150 x 2,1 milímetros, 1,7  $\mu\text{m}$ ), 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 de 2% a 95% B (15 min), vazão de 0,4 mL/min e volume de injeção de 5  $\mu\text{L}$ .

#### **4.3.2 Condições do massa de alta resolução –QTOF**

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. Leucina encefalina foi utilizada como lock mass. O modo de aquisição foi MS<sup>E</sup>. O instrumento foi controlado pelo software Masslynx 4.1 (Waters Corporation).

#### **4.4 Análise quimiométrica**

As análises foram realizadas nas seguintes condições: tempo de retenção 2,50 a 6 min, entre 120 a 1180 Da. Um fingerprint metabólico foi criado usando o tempo de retenção, razão massa carga ( $m/z$ ). O método utilizado para gerar o PCA foi centrado na média, indicado para dados espectroscópicos, pois desconsidera ruídos nos espectros. Os resultados dos pares  $t_r$ - $m/z$ , tempo de retenção das mostras e intensidade dos íons foram analisados por PCA e OPLS-DA.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Caracterização química via UPLC-QTOF-MS<sup>E</sup>

O extrato de guaraná foi investigado através em um equipamento de cromatografia de ultra performance acoplado a um espectrômetro massas de alta resolução. O conjunto de técnicas permite a separação e caracterização de misturas complexas, e possibilitam a identificação e quantificação de moléculas alvo. As informações geradas a partir dos espectros de massas e de padrões de referência permitiram a identificação de dez compostos caracterizados como um catequina, epicatequina, e procianidinas, sendo representados na Tabela 3.

As procianidinas pertencem a uma classe de taninos condensados da série flavan-3-ol, podendo apresentar dois tipos de ligações, tipo A e B, que variam na ligação na unidade do flavanoide. As ligações do tipo B se caracterizam pela ligação interflavanoide que é estabelecida entre o carbono C4 e o carbono C6 ou C8. As ligações do tipo A diferem das do tipo B, por possuir uma ligação éter adicional em C-2 (C2-O-C7). As Figuras 15 e 16 ilustram esses dois tipos de ligações (RODRIGUES et al., 2007).

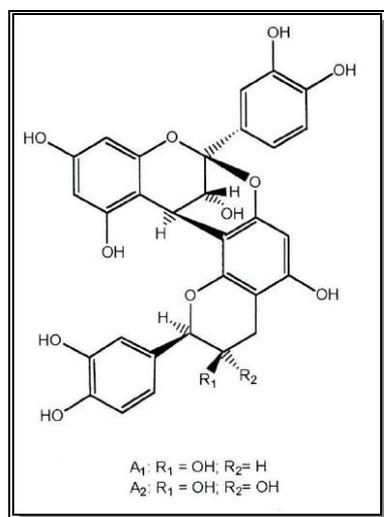
As procianidinas apresentam uma razão  $m/z$  característico tanto para o tipo A quanto para o tipo B, como mostra a Figura 18. As procianidinas do tipo A apresentam os íons 575, 863, 1151 com diferença de  $m/z$  de 288 Da entre os fragmentos formada por dímeros, trímeros e tetrâmeros respectivamente. As procianidinas do tipo B apresentam íons em 577, 865 e 1153 e diferenciam do tipo A em 2 unidades de massas. Nesse estudo foi observado procianidinas com baixo grau de polimerização, variando entre 2 a 3 unidades de (epi)catequinas condensadas (RODRIGUES et al., 2007).

Os mecanismos de fragmentação permitiram a identificação e caracterização das procianidinas. Neste composto há três mecanismos principais: a fissão heterocíclica do anel B com perda de 126 Da (Heterocyclic Ring Forming fission, HRF); Retro Diels-Alder com perda de 152 Da; saída de água; e fissão quinona metideo (quinone methide fission (QM) (RODRIGUES et al., 2007).

Os metabólitos obtidos, catequina, epicatequina e procianidinas diméricas e triméricas foram identificados com base nos espectros de massas de alta resolução, comparação dos tempos de retenção dos padrões analíticos com as amostras obtidas, e por meio da comparação com dados da literatura, o cromatograma da planta saudável e doente

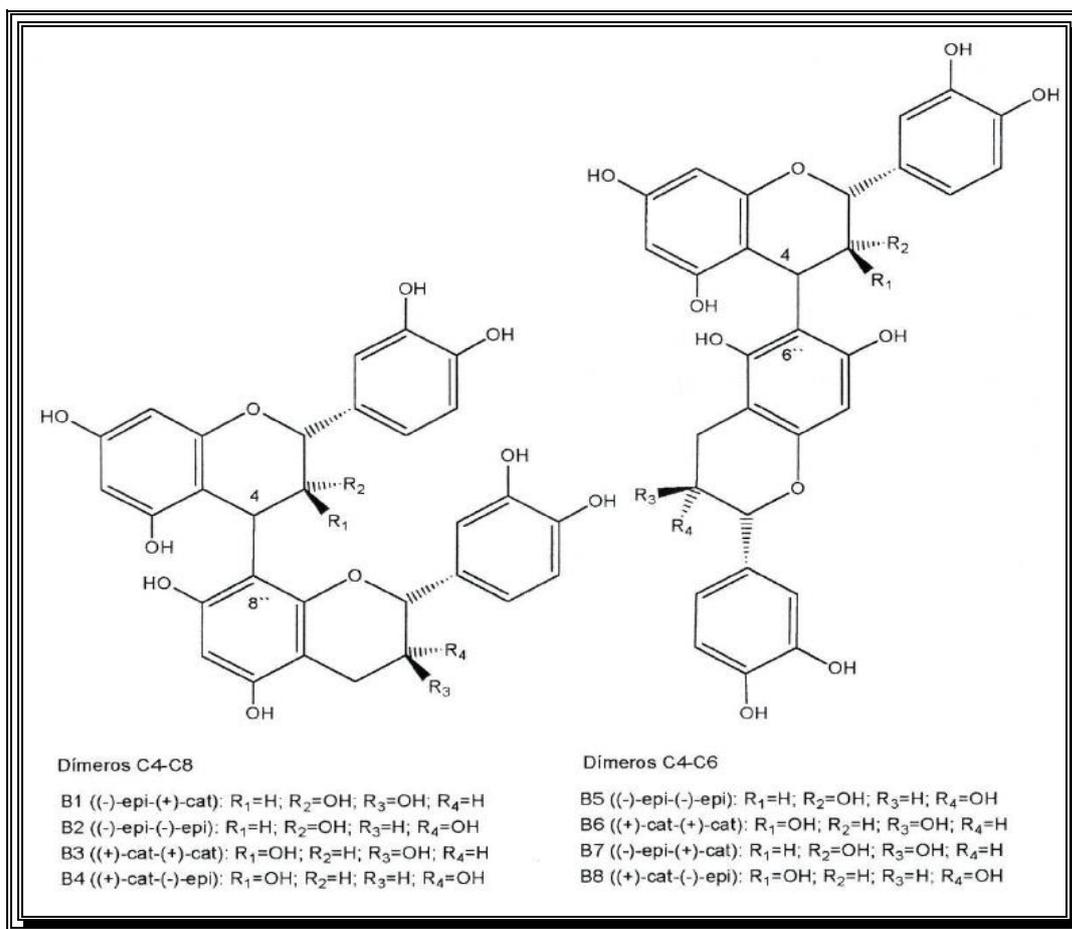
está representado na Figura 17 e o espectro de massa da procianidina na Figura 19.

Figura 15 – Estrutura das procianidinas diméricas do tipo A.



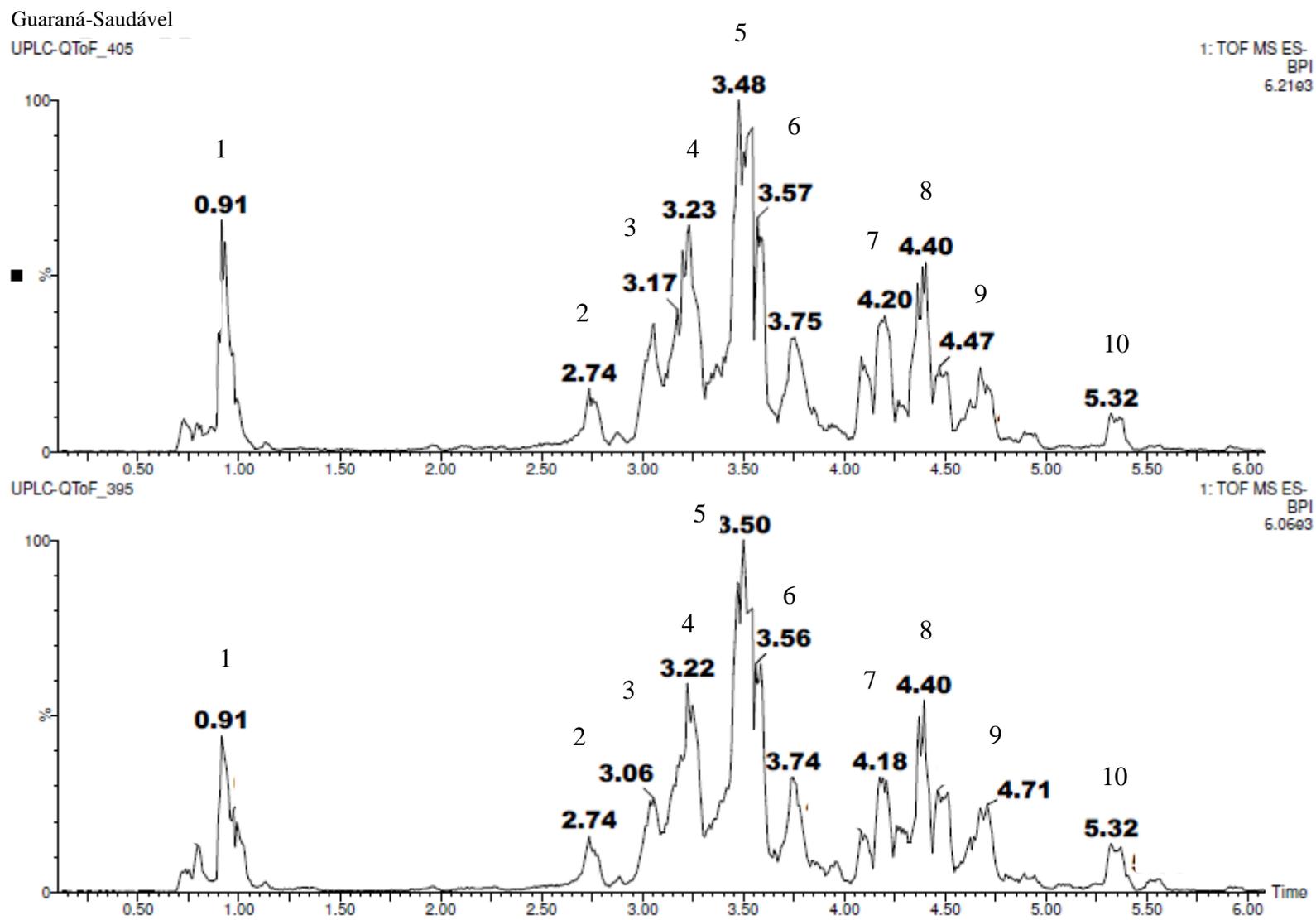
Fonte: Porto,2002.

Figura 16 – Estrutura das procianidinas diméricas do tipo B.



Fonte: Porto,2002

Figura 17 – Cromatograma da planta guaraná saudável e doente



Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 3 – Constituintes identificados ou tentativamente identificados em Paullinia cupana da planta saudável.

<b>Pico no.</b>	<b>t<sub>r</sub> min</b>	<b>[M-H]<sup>-</sup> Calculado</b>	<b>[M-H]<sup>-</sup> Observado</b>	<b>Fragmentos de íons (MS/MS)</b>	<b>Fórmula Molecular</b>	<b>ppm (erro)</b>	<b>Tentativa Identificação</b>	<b>Referências</b>
<b>1</b>	0,91	191,0556	191,0534	165,0371;	C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	11,5	Ácido quínico	(Senthilkumar et al., 2015)
<b>2</b>	2,73	1151,2457	1151,2577	863,1918; 577,1349; 425,0923; 407,0844; 289,0674	C <sub>60</sub> H <sub>48</sub> O <sub>24</sub>	10,4	Mix- Prc tipo-A trímero e Prc tipo-B dímero	
<b>3</b>	2,97	289,0712	289,0698	245,0801; 205,0483	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	4,8	Catequina **	Padrão*
<b>4</b>	3,23	577,1346	577,1344	451,1024; 425,0829; 407,0737; 289,0679	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>	0,3	Prc tipo-B dímero	(ZHANG; ZHU, 2015)
<b>5</b>	3.49	289,0712	289,0702	245,0793; 205,0482	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	3,5	Epicatequina **	Padrão*
<b>6</b>	3.61	863,1882	863,1851	711,1314; 577,1321; 451,1017; 411,0658; 289,0697	C <sub>45</sub> H <sub>36</sub> O <sub>18</sub>	3,2	Prc tipo-A trímero	(Galaverna et al., 2015)
<b>7</b>	4,18	577,1346	577,1323	451,1026; 425,0862; 407,0736; 289,0691	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>	4,0	Prc tipo-B dímero	(ZHANG; ZHU, 2015)
<b>8</b>	4,37	575,1190	575,1198	449,0905; 423,0706; 289,0710	C <sub>30</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub>	1,4	Prc tipo-A dímero	(QIANG et al., 2015)
<b>9</b>	4,71	861,1667	861,1689	575,1163; 449,0900, 423,0718; 289,0706	C <sub>45</sub> H <sub>34</sub> O <sub>18</sub>	2,6	Double A-type linked Trímers	(ZHANG; ZHU, 2015)
<b>10</b>	5,34	575,1190	575,1183	449,0926; 289,0593	C <sub>30</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub>	1,2	Prc tipo-A dímero	(QIANG et al., 2015)

\*Identificado através de comparação com o padrão

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 4 – Constituintes identificados ou tentativamente identificados em *Paullinia cupana* da planta doente.

<b>Pico no.</b>	<b>t<sub>r</sub> min</b>	<b>[M-H]<sup>-</sup> Calculado</b>	<b>[M-H]<sup>-</sup> Observado</b>	<b>Fragmentos de íons (MS/MS)</b>	<b>Fórmula Molecular</b>	<b>ppm (erro)</b>	<b>Tentativa Identificação</b>	<b>Referências</b>
<b>1</b>	0,91	191,0556	191,0534	165,0403	C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	11,5	Ácido quínico	(SENTHILKUMAR et al., 2015)
<b>2</b>	2,77	1151,2575	1151,2582	863,1855; 577,1345; 425,0836; 407,0749; 289,0700	C <sub>60</sub> H <sub>48</sub> O <sub>24</sub>	7,7	Mix- Prc tipo-A trímero e Prc tipo-B dímero	
<b>3</b>	3,05	289,0653	289,0697	245,0787; 205,0499	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	1,5	Catequina **	Padrão*
<b>4</b>	3,23	577,1346	577,1379	451,1043; 425,0848; 407,0761; 289,0692	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>	5,7	Prc tipo-B dímero	(ZHANG; ZHU, 2015)
<b>5</b>	3.50	289,0712	289,0700	245,0795; 205,0472	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	1,2	Epicatequina **	Padrão*
<b>6</b>	3.57	863,1823	863,1854	711,1361; 573,1041; 451,1006; 411,0691; 289,0689	C <sub>45</sub> H <sub>36</sub> O <sub>18</sub>	3,1	Prc tipo-A trímero	(GALAVERNA et al., 2015)
<b>7</b>	4,18	577,1346	577,1328	451,1046; 425,0862; 407,0762; 289,0698	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>	3,1	Prc tipo-B dímero	(ZHANG; ZHU, 2015)
<b>8</b>	4,39	575,1190	575,1151	449,0901; 423,0697; 407,0688; 289,0719	C <sub>30</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub>	6,8	Prc tipo-A dímero	(QIANG et al., 2015)
<b>9</b>	4,67	861,1667	861,1702	575,1181; 449,0870; 423,0717; 289,0702	C <sub>45</sub> H <sub>34</sub> O <sub>18</sub>	4,1	Double A-type linked Trimers	(ZHANG; ZHU, 2015)
<b>10</b>	5,35	575,1190	575,1180	449,0876; 423,0746; 407,0799; 289,0701	C <sub>30</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub>	1,7	Prc tipo-A dímero	(QIANG et al., 2015)

\* Identificado através de comparação com o padrão

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 18 – Espectro de massa da procianidina tipo A e tipo B, respectivamente, com a razão m/z que caracteriza cada ligação.

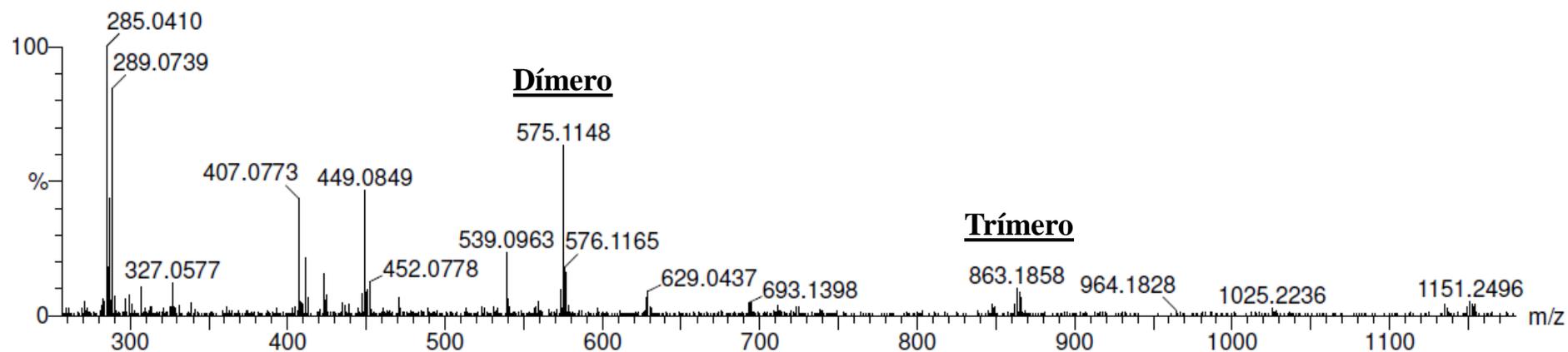
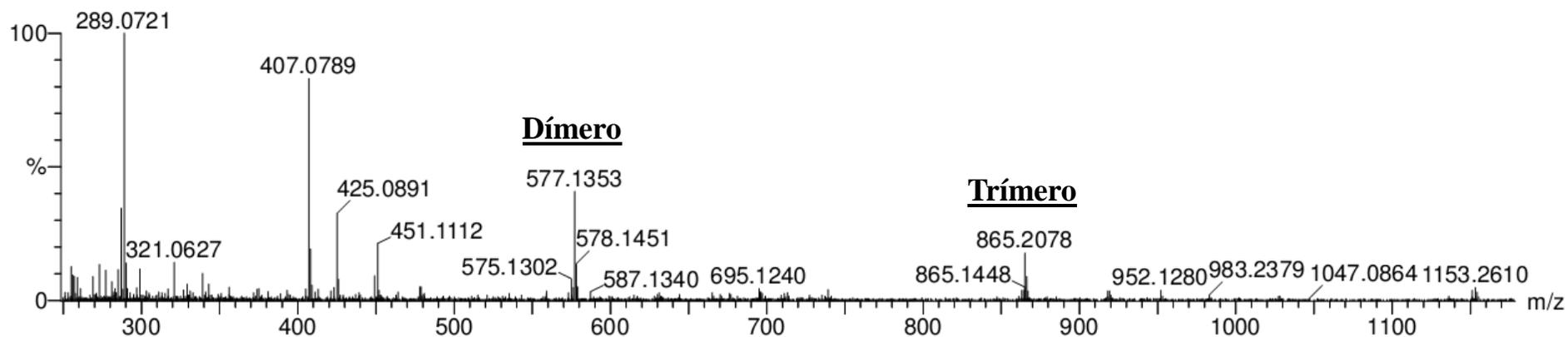
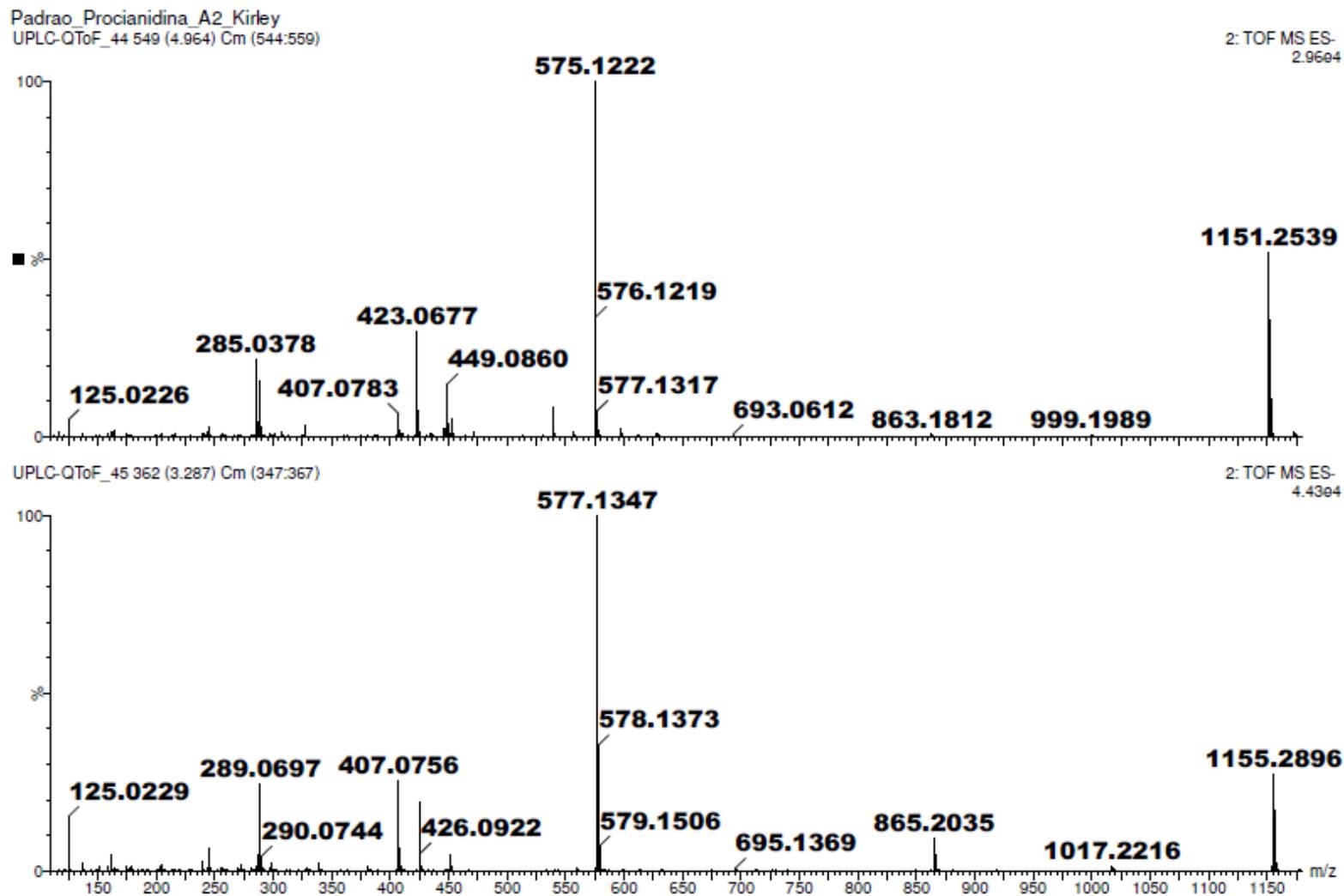
**Monômero****Monômero**

Figura 19 – Espectro de massa do padrão da procianidina tipo A e tipo B, respectivamente.

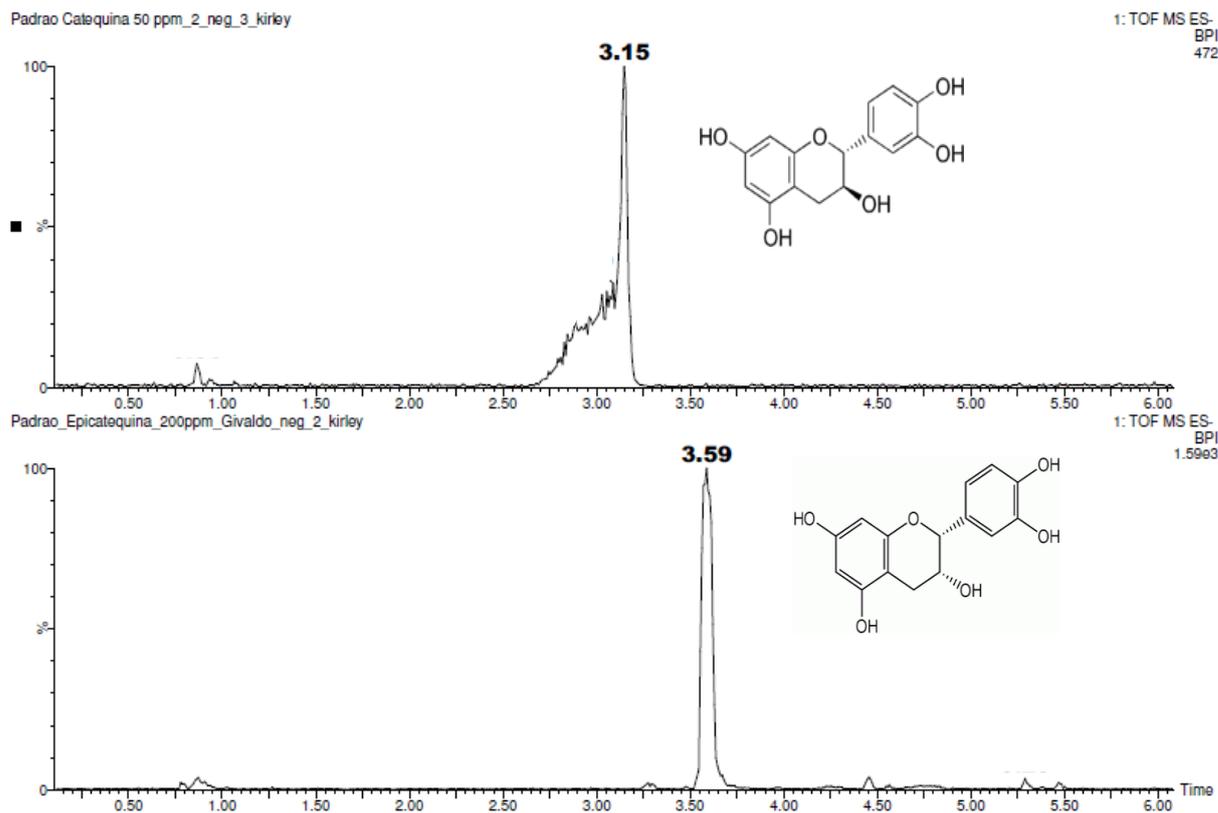


Fonte: Elaborada pelo autor.

O pico 1 mostrou um  $[M-H]^-$  em  $m/z$  191 com um fragmento em  $m/z$  165. O composto foi identificado como ácido quínico (SENTHILKUMAR et al., 2015).

Os picos 3 e 5 foram identificados como catequina e epicatequina através do íon precursor em  $m/z$  289 que apresentou um tempo de retenção semelhante aos padrões. O cromatograma desses padrões se encontra na Figura 20.

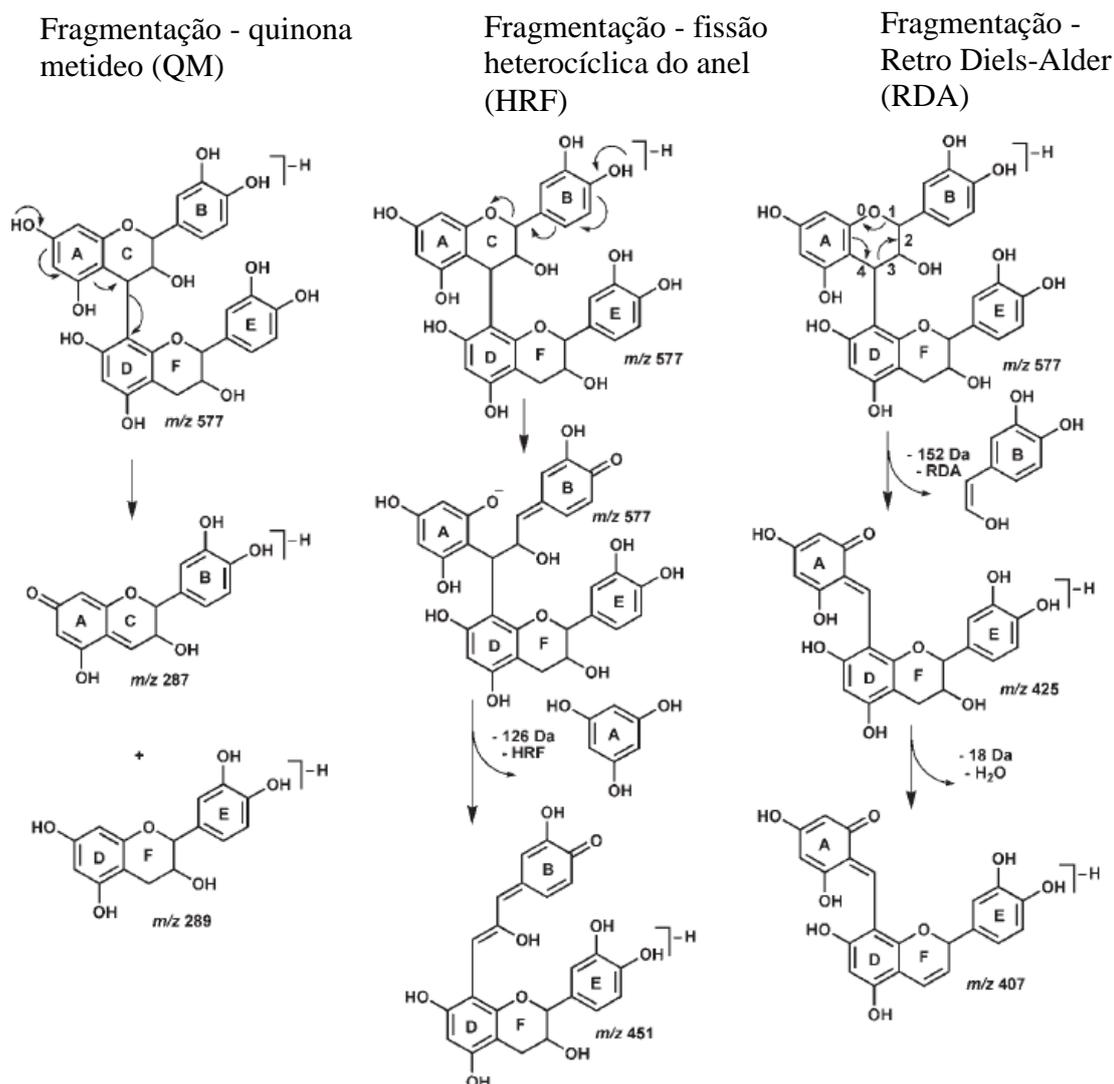
Figura 20 – Cromatograma dos padrões catequina e epicatequina, respectivamente.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Os picos 4 e 7 mostraram um íon precursor em  $m/z$  577. Na Figura 21 está representada a proposta de fragmentação, com íons fragmentos em  $m/z$  425  $[M-H-125]^-$  que é formado pela fragmentação de Retro Diels-Alder de uma unidade de (epi)catequina superior e perda do grupo B;  $m/z$  407  $[M-H-18]^-$  refere-se eliminação da água, provavelmente na posição 3-OH do anel F, por sua vez, mais estável que o  $m/z$  425, provavelmente por conta da formação da ligação no anel F;  $m/z$  451  $[M-H-126]^-$ , oriundo da fissão heterocíclica do anel B (HRF) e saída do 1,3,5-triidroxibenzeno e  $m/z$  289  $[M-H-288]^-$ , quinona metideo (Quinone methide, perda de (epi)catequina formada pela ligação interflavonoídica, consistente com dímeros de procianidinas do tipo B, (epi)catequina-(epi)-catequina (QIANG et al., 2015; RODRIGUES et al., 2007; ZHANG; ZHU, 2015).

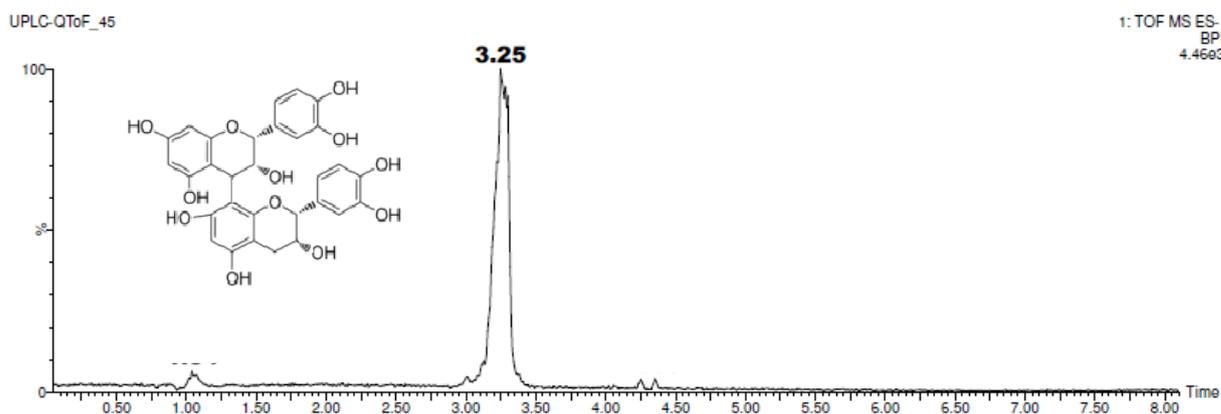
Figura 21 – Principal fragmentação de procianidina do tipo B dimérica.



Fonte: Baseado no trabalho de RODRIGUES et al., 2007.

A Figura 22 demonstra o cromatograma do padrão de procianidina tipo B<sub>2</sub> com tempo de retenção de 3,25 min. Os picos 4 e 7 apresentam tempo de retenção de 3,23 e 4,18, respectivamente, apesar do tempo de retenção não ser o mesmo para os dois, o íon precursor em 577 e os fragmentos correspondem ao do padrão, portanto podemos concluir que o composto do pico 4 é o mesmo do padrão, procianidina tipo B<sub>2</sub> e o composto do pico 7 é uma procianidinas do tipo B, só não sendo do tipo B<sub>2</sub>.

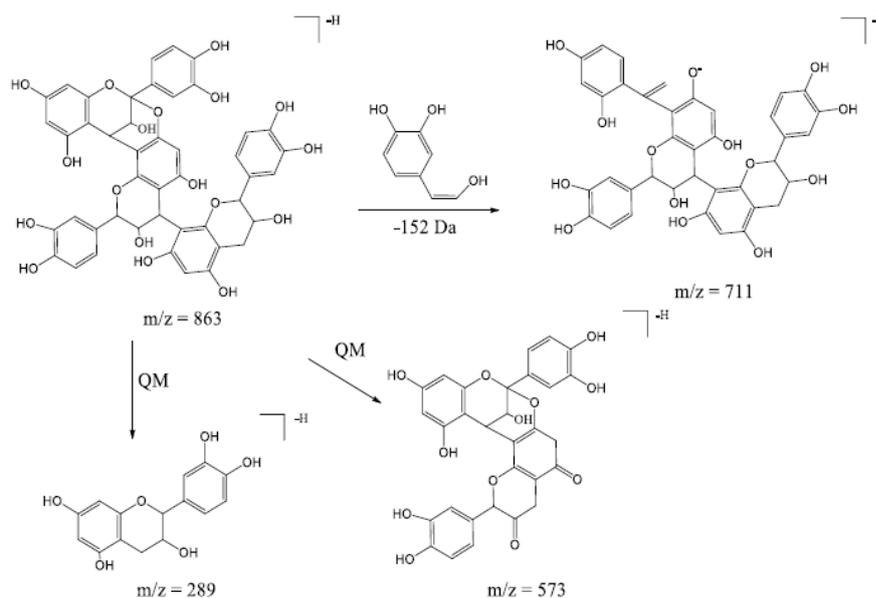
Figura 22 – Cromatograma do padrão procianidina tipo B<sub>2</sub>.



Fonte: Elaborada pelo autor.

A ligação de trimeros com somente uma ligação tipo A podem apresentar (epi)catequina-A-(epi)cat-(epi)cat com fragmentos em  $m/z$  573 e 289 gerados da clivagem QM entre meio e a unidade terminal ou (epi)cat-(epi)cat-A-(epi)cat com fragmentos em  $m/z$  575 e 289 a partir QM clivagem entre top e a unidade do meio. O pico 6 apresentaram um íon precursor em  $m/z$  863, apresentando fragmentos em  $m/z$  711, 573 e 289. O fragmento em  $m/z$  711 é formado a partir de retro Diels Alder da unidade de (epi)catequina com perda de 152 Da. Baseado no fragmentos da Figura 23 e no espectro de massa da Figura 18, o pico 6 foi caracterizados como (epi)cat-A-(epi)cat-(epi)cat (GALAVERNA et al., 2015).

Figura 23 – Principal fragmentação de procianidina do tipo A trimérica.

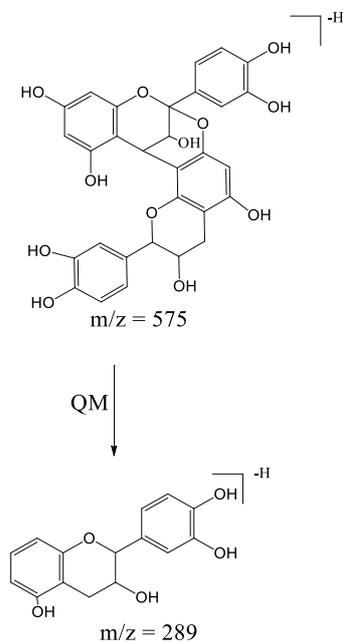


Fonte: Adaptação de GALAVERNA et al., 2015.

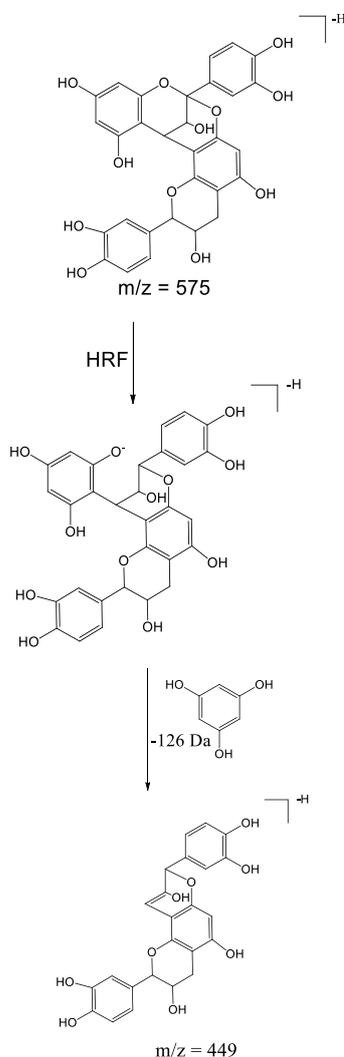
Os picos 8 e 10 mostraram um íon precursor em  $m/z$  575, na Figura 24 está representada proposta de fragmentação para esse íon, mostrando fragmentos em  $m/z$  449 [M-H-126]<sup>-</sup>, HRF; 423 [M-H-152]<sup>-</sup>, Retro Diels-Alder de uma unidade de (epi)catequina ligada; e 289 [M-H-288]<sup>-</sup>, QM clivagem de uma unidade de (epi)-catequina. Os dados mostram que os picos são formados por dímeros de procianidina tipo A (C<sub>30</sub>H<sub>23</sub>O<sub>12</sub>) (QIANG et al., 2015), este por sua vez, apresenta em sua estrutura dois prótons a menos que o dímero de procianidina do tipo B (LIN et al., 2012).

Figura 24 – Principal fragmentação de procianidina do tipo A dimérica

Fragmentação - quinona metideo (QM)



Fragmentação - fissão heterocíclica do anel (HRF)



Fragmentação - Retro Diels-Alder (RDA)

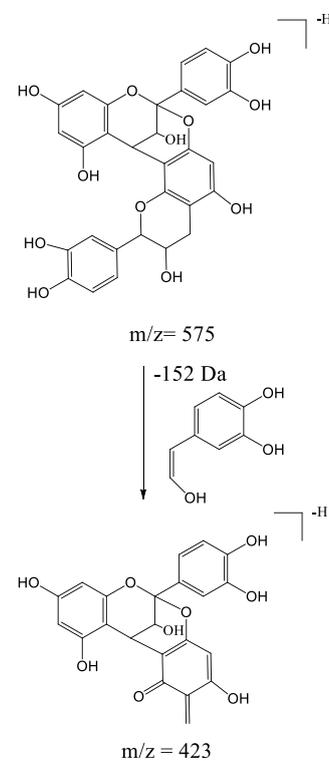
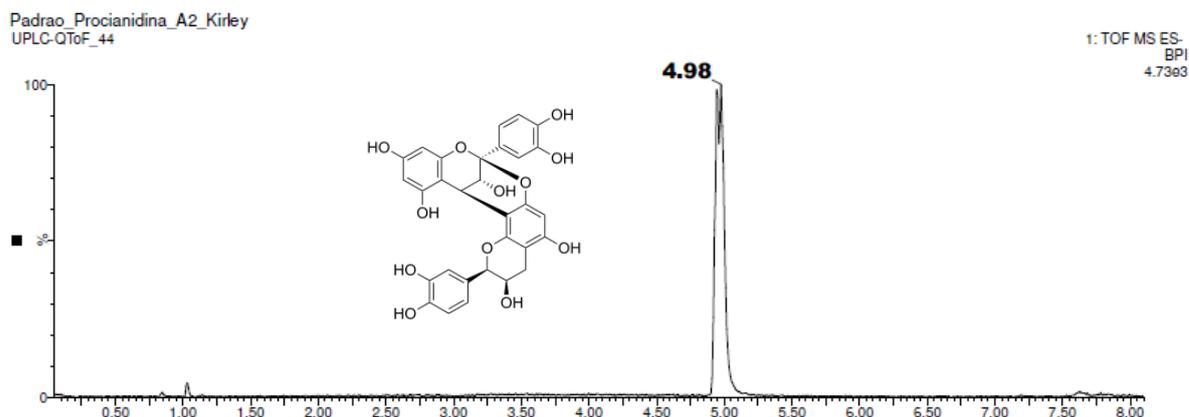


Figura 25 – Cromatograma do padrão procianidina tipo A<sub>2</sub>.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Na Figura 25 está o cromatograma do padrão de procianidina tipo A<sub>2</sub> com tempo de retenção de 4,98 min. Os picos 8 e 10 apresentam tempo de retenção de 4,39 e 5,35 min respectivamente, apesar do tempo de retenção não ser o mesmo, o íon percorrido em 575 e os fragmentos correspondem ao do padrão, portanto podemos concluir que os compostos do pico 8 e 10 são procianidinas do tipo A, só não sendo do tipo A<sub>2</sub>.

O pico 2 apresentou um íon precursor em  $m/z$  1151, com fragmentos em  $m/z$  863 [M-H-288]<sup>-</sup>, 577 [M-H-574]<sup>-</sup> gerados da clivagem QM entre meio e a unidade terminal, 425 [M-H-125]<sup>-</sup> que é formado pela fragmentação de Retro Diels-Alder de uma unidade de (epi)catequina superior e perda do grupo B;  $m/z$  407 [M-H-18]<sup>-</sup> refere-se eliminação da água, e  $m/z = 289$  [M-H-288]<sup>-</sup>, clivagem QM de uma unidade de (epi)-catequina, que corresponde a uma mistura dos fragmentos da procianidina tipo A trímero e procianidina tipo B dímero. O pico 9 mostrou um íon precursor em  $m/z$  861 compatível com a presença de um trímero de procianidina ligados por duas ligações do tipo A (ZHANG; ZHU, 2015).

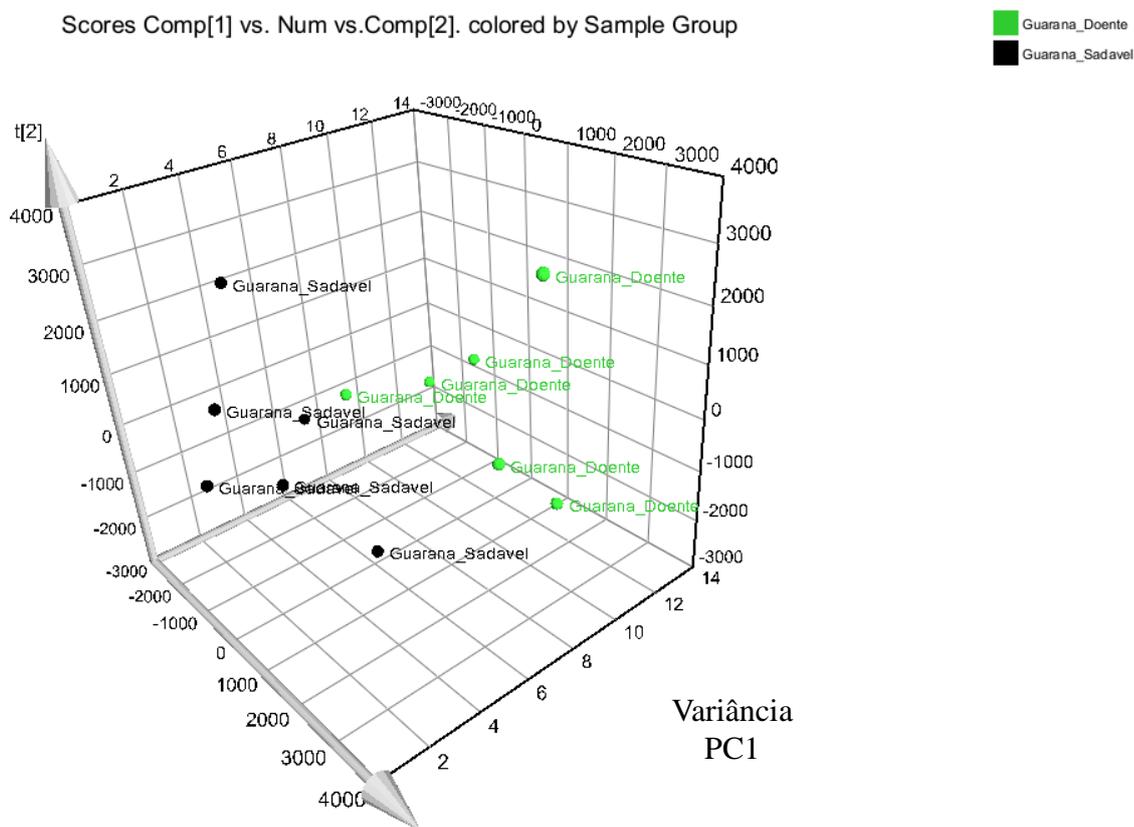
## 5.2 Análise de componentes principais da planta saudável e doente de guaraná

Análise de Componentes Principais (PCA) representada na Figura 26 em 3D, foi realizada com objetivo de discriminar amostras da planta saudável e doente de guaraná oriundas da Amazônia, de acordo com do perfil metabólico, por meio dos dados de tempo de retenção e razão massa carga ( $T_r$ - $m/z$ ), obtidos a partir da análise de amostras de guaraná por UPLC-QTOF-MS.

É possível identificar a tendência de formação de dois grupos majoritários distribuídos sob a primeira componente principal (PC1). A esquerda da PC1 (*scores* negativos) encontra-se um grupo formado por amostras da planta saudável, do lado direito (*scores*

positivos de PC1) encontra-se as amostras da planta doente.

Figura 26 – Análise de Componentes Principais (PCA) em 3D - Gráfico de scores da PC1 x PC2 dos dados usando o tempo de retenção e razão massa carga ( $t_r$ - $m/z$ ) das amostras de guaraná.



Fonte: Elaborada pelo autor.

### 5.3 Análise de OPLS-DA das amostras de guaraná

O modelo de OPLS-DA foi aplicado aos dados de UPLC-QTOF-MS<sup>E</sup> a fim de se comparar os grupos de amostras, sendo utilizado o gráfico de scores e gráfico de dispersão (S-plot) para visualização desses grupos. Os valores de  $t_r$ - $m/z$  serviram de base para identificação ou tentativamente de identificação dos potenciais biomarcadores responsáveis pela classificação e separação das amostras.

O gráfico de scores resume observações em termos de tendências e padrões no conjunto de dados e separando do ruído e o S-plot utiliza os valores de tempo de retenção e carga/massa ( $t_r$ - $m/z$ ) para identificar os responsáveis pela separação das amostras. O gráfico projeta a variância em função da correlação das variáveis (loadings) ou os metabólitos, neste caso, resultante da componente de previsão do modelo OPLS-DA onde o valor de Y máximo é igual a 1, perfil de correlação. Os íons com alto valor de Y e X, covariância, são localizados

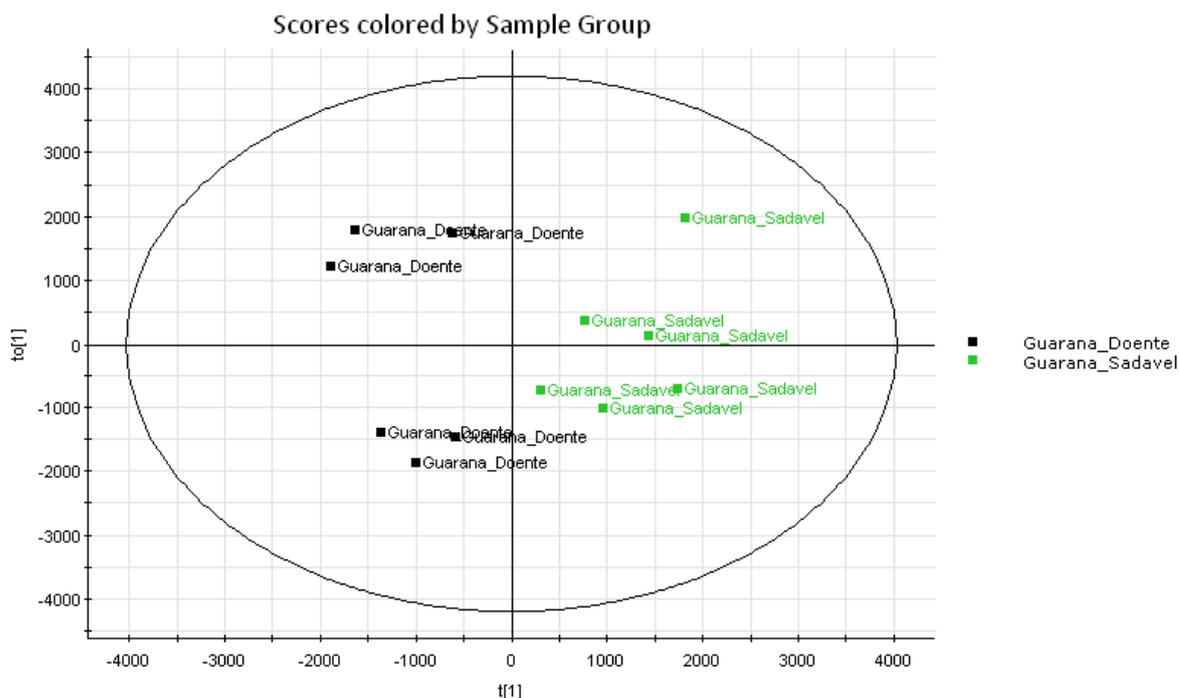
distante da origem e, conseqüentemente, contribuem significativamente para separação das classes (LIU et al., 2015).

A separação visual dos perfis das amostras nos dados obtidos é importante para se ter um bom resultado além da utilização da validação para verificar a precisão e confiabilidade do modelo. Essa verificação se dá por meio parâmetros como  $R^2Y$  e  $Q^2$ . O  $R^2Y$  trata-se da variação de  $Y$  explicada pelo modelo além de verificar o grau de ajuste. O  $Q^2$  é usado para verificar a capacidade preditiva do modelo, e explica a fração da variação de  $Y$  que pode ser predita pelo modelo e avalia a qualidade estatística do modelo (WU et al., 2015). A previsão do modelo será melhor quando os parâmetros  $R^2Y$  e  $Q^2$  se aproximam de 1. No entanto, quando o  $R^2Y$  e  $Q^2$  são superiores a 0,5 pode-se acreditar que o modelo tem boa previsão (SHANG et al., 2014).

### **5.3.1 Comparação entre as amostras da planta saudável e doente**

Ao analisar o gráfico de score gerado pelo OPLS-DA, representado na Figura 27, entre as amostras da planta saudável e doente do guaraná, é possível notar a clara separação dos dois grupos de amostras. Os scores de OPLS-DA exibem a separação dos grupos com valores de  $R^2Y=0,83$  e  $Q^2=0,62$ . Esse resultado sugere que o modelo explica 83% das variações de  $Y$ , com habilidade preditiva de 62%, sugere-se, assim, que o modelo está bem estabelecido e tem boa previsão.

Figura 27 – Gráfico de score em modelos de duas classes de acordo com a OPLS-DA: amostras da planta saudável e amostras da planta doente do guaraná.



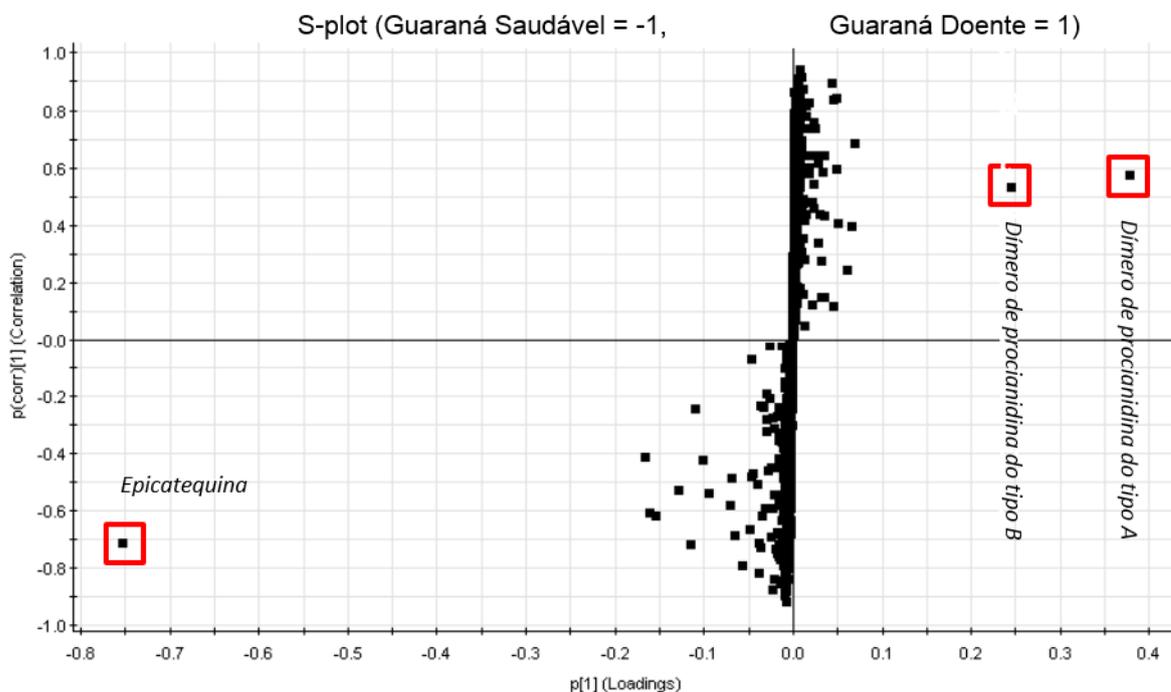
Fonte: Elaborada pelo autor.

Esses baixos valores de parâmetro de qualidade do modelo ( $R^2Y$  e  $Q^2$ ), pode estar relacionado com o fato de que as amostras terem origens geográfica próximas, ou seja, todas da região Amazônica e por estarem próxima podem apresentar perfis químicos “semelhantes”.

Apesar de ambas as amostras serem da mesma planta e da mesma região é observado a formação de dois grupos, pois como se tratam de amostras da planta doente, o estresse biótico causado pelo fungo tem como consequência a produção de metabólitos secundários que tem como função proteger a planta.

Na Figura 28 está representado o gráfico de dispersão (S-plot), na parte inferior estão os íons que foram responsáveis pela classificação das amostras da planta saudável e acima os íons responsáveis pelas amostras da planta doente. Os íons que contribuíram para a separação observada no gráfico de score foram destacados em vermelho no gráfico S-plot como potenciais biomarcadores, cada ponto representa o par de tempo de retenção/razão massa/carga ( $t_r$ - $m/z$ ).

Figura 28 – Gráficos de dispersão (S-plot) exibindo a covariância  $p[1]$  x correlação  $p[1](corr)(loadings)$  em modelos de duas classes de acordo com a OPLS-DA: planta saudável e planta doente do guaraná. O quadrante superior direito do S-plot mostra os componentes que são elevados nas amostras codificadas como 1, enquanto o quadrante inferior esquerdo mostra os constituintes mais abundantes nas amostras codificadas como -1.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 5. Dados atribuídos aos biomarcadores responsáveis pela separação das amostras do gráfico S-plot.

Biomarcadores	Tempo de retenção	Massa	P[1]	P(corr)[1]
Dímero de procianidina do tipo B	3.23	577.1342	0.245174	0.53146
Epicatequina	3.51	289.0701	-0.752021	-0.715585
Dímero de procianidina do tipo A	4.29	575.1196	0.378621	0.573573

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os valores de  $t_r-m/z$  serviram de base para identificação ou tentativamente de identificação dos potenciais biomarcadores responsáveis pela classificação e separação das amostras. Três biomarcadores foram identificados como sendo: epicatequina ( $t_r-m/z$  3.51\_289.0701), dímero de procianidina do tipo A ( $t_r-m/z$  4.39\_575.1196) e dímero de

procianidina do tipo B ( $t_r$ - $m/z$  3.23\_577.1342).

Os compostos dímero de procianidina do tipo A e dímero de procianidina do tipo B foram responsáveis pela diferenciação das amostras da planta doente, portanto pode-se atribuir a essas duas substâncias a função de defesa frente ao estresse biótico que a planta foi submetida, ou seja, as duas substâncias estão dando uma resposta a infecção gerada pelo fungo. Já a epicatequina foi o principal biomarcador responsável pela diferenciação das amostras da planta saudável.

De fato, o dímero de procianidina do tipo A e dímero de procianidina do tipo B apresentam intensidade relativamente maior nas amostras da planta doente, quando comparada com a intensidade observada em amostras da planta saudável, pode-se inferir-se, então que as amostras da planta doente têm em sua composição maior contribuição desses compostos quando comparadas com as amostras da planta saudável. Enquanto as amostras da planta saudável possuem contribuição maior da epicatequina em sua composição.

## 6 CONCLUSÃO

Neste estudo foi desenvolvido um método para análise do perfil metabólico de folhas de guaraná de duas amostras diferentes de planta saudável e doente, usando um método rápido e sensível, para caracterizar os metabólitos secundários presente na planta. A análise permitiu identificar 10 compostos, caracterizados como catequina, epicatequina, ácido quínico e procianidina do tipo A e B.

Dos dados obtidos das análises de componentes principais foi possível discriminar as amostras de acordo com o perfil metabólico e identificar a tendência de formação de dois grupos majoritários

O modelo OPLS-DA foi construído para pesquisar diferenças individuais e os potenciais biomarcadores metabólicos que podem realmente refletir as diferenças entre as amostras saudáveis e doentes. A análise mostrou que a epicatequina foi a responsável pela discriminação das amostras saudáveis, e dímero de procianidina do tipo B e dímero de procianidina do tipo A foram os responsáveis pela discriminação das amostras doentes, mostrando que ao sofrer um estresse biótico a produção dos taninos condensados é essencial para proteção da planta.

Portanto, o conhecimento relacionado a resposta ao estresse biótico dessa planta resulta em um ganho no que concerne a informações relacionadas a variabilidade química que é essencial para explicar a ecofisiologia de um determinado organismo e, com isso, fazer previsões sobre adaptação e regulação em condições ambientais adversas. As informações geradas são de grande importância, pois o guaraná é uma cultura de valor para a economia brasileira.

## REFERÊNCIAS

- AKERELE, O. Summary of WHO guidelines for the assessment of herbal medicines. **HerbalGram**, 28: 13-19, 1993.
- ARAÚJO, J. C. PEREIRA, J.C; GASPAROTTO, L; ARRUDA, M. R. **O complexo superbrotamento do guaranazeiro e seu controle** Manaus Embrapa Amazônia Ocidental, 2006. Disponível em:  
<[http://servicos.cpaa.embrapa.br/livraria/arquivos\\_gratis/ComTec\\_45\\_2006.pdf](http://servicos.cpaa.embrapa.br/livraria/arquivos_gratis/ComTec_45_2006.pdf)>
- BRERETON, R. G (UNIVERSITY OF BRISTOL, U. **Applied Chamometrics for Scientists**. Chichester: The Atrium, 2007.
- CARLINI, E. A. Plants and the central nervous system. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 75, n. 3, p. 501–512, 2003.
- CARVALHO, A. C. B; BALBINO, E. E; MACIEL, A. PERFEITO, J. P. S. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 2, p. 314–319, 2008.
- CIENFUEGOS,F; VAITSMAN,D. Análise Instrumental. Rio de Janeiro.Editora Interciência, 2000.
- CHAGAS-PAULA, D; ZHANG, T; COSTA, F. Edrada-Ebel, RuAngelie. A Metabolomic Approach to Target Compounds from the Asteraceae Family for Dual COX and LOX Inhibition. **Metabolites**, v. 5, n. 3, p. 404–430, 2015.
- DOHERTY, M.; PM, S. Effects of caffeine ingestion on exercise testing: a meta-analysis. **International Journal of Sport Nutrition & Exercise Metabolism**, v. 14, n. 6, p. 626–646 21p, 2004.
- EDWARDS, H. G. M; FARWELL, D. W; OLIVEIRA, L. F. C; ALIA, J.M; LE, M; AMEIDA, M. V. FT-Raman spectroscopic studies of guarana and some extracts. v. 532, p. 177–186, 2005.
- FARAG, M. A; EL-AHMADY, S. H; ELIAN, F. S; WESSJOHANN, L. A. Metabolomics driven analysis of artichoke leaf and its commercial products via UHPLC-q-TOF-MS and chemometrics. **Phytochemistry**, v. 95, p. 177–187, 2013.
- FUKUMASU, H. Sobre os efeitos quimiopreventivos e antitumorais do guaraná , Paullinia cupana var. sorbilis, em modelo experimentais in vivo e in vitro. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2008.
- GALAVERNA, R. S; SAMPAIO, P. T. B; BARATA, L. E. S; EBERLIN, M. N; FIDELIS, C. H. V. Differentiation of two morphologically similar Amazonian Aniba species by mass spectrometry leaf fingerprinting. **Analytical Methods**, v. 7, p. 1984–1990, 2015.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374–381, 2007.
- GONÇALVES, J. R. C. **A cultura do guaraná**. Belém: Instituto de Pesquisas e Experimentação Agropecuárias do Norte, 1971.

HARRYS, D. C. *Análise Química Quantitativa*. Rio de Janeiro : Livros técnicos e Científicos Editora- LTC, 8ª edição, 2010.

HENMAN, A. Guaraná (*Paullinia Cupana* Var. *Sorbilis*): Ecological and perspectives on an economic plant of the central amazon basin. v. 6, p. 311–338, 1982.

KHAKIMOV, B.; GURDENIZ, G.; ENGELSEN, S. B. Trends in the Application of Chemometrics to Foodomics Studies. **Acta Alimentaria**, v. 44, n. 1, p. 4–31, 2015.

LIN, W. S.; YANG, C. M.; KUO, B. J. Classifying cultivars of rice (*Oryza sativa* L.) based on corrected canopy reflectance spectra data using the orthogonal projections to latent structures (O-PLS) method. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 115, p. 25–36, 2012.

LIU, X. W.; ZHANG, F.; GAO, S. H.; JIANG, B.; CHEN, W. S. Metabolite profiling of Zi-Shen pill in rat biological specimens by UPLC-Q-TOF/MS. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 13, n. 2, p. 0145–0160, 2015.

LORDEIRO, R. A. Construção de uma fonte EASI-MS (EASY AMBIENT SONIC-SPRAY IONIZATION) para análise direta de superfícies e suas aplicações em amostras de interesse forense. [s.l.] Universidade Federal de Minas Gerais, 2010.

LORIST, M. M.; TOPS, M. Caffeine, fatigue, and cognition. **Brain and Cognition**, v. 53, n. 1, p. 82–94, 2003.

NEHME, C. J. MORAES, P. L. R.; TININIS, A. G.; CAVALHEIRO, A. J. Intraspecific variability of flavonoid glycosides and styrylpyrones from leaves of *Cryptocarya mandiocana* Meisner (Lauraceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 36, n. 8, p. 602–611, ago. 2008.

OGAWA, N.; UEKI, H. Clinical importance of caffeine dependence and abuse. **Psychiatry and Clinical Neurosciences**, v. 61, n. 3, p. 263–268, 2007.

QIANG, L. LUO, F.; ZHAO, X.; LIU, Y.; HU, G.; SUN, C.; LI, X.; CHEN, K. Identification of proanthocyanidins from litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) pulp by LC-ESI-Q-TOF-MS and their antioxidant activity. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. 1–17, 2015.

RINALDO, D. BATISTA, J. M.; RODRIGUES, J.; BENFATTI, A. C.; RODRIGUES, C. M.; SANTOS, L. C.; FURLAN, M. Ab Initio Electronic Circular Dichroism of Fullerenes, Single-Walled Carbon Nanotubes, and Ligand-Protected Metal Nanoparticles. **Chirality**, v. 26, n. April, p. 553–562, 2014.

RODRIGUES, C. M. RINALDO, D.; SANTOS, L. C.; MONTORO, P.; PIACENTE, S.; PIZZA, C.; HIRUMA-LIMA, C. A.; SOUZA BRITO, A. R. M.; VILEGAS, W. Metabolic fingerprinting using direct flow injection electrospray ionization tandem mass spectrometry for the characterization of proanthocyanidins from the barks of *Hancornia speciosa*. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 21, n. 12, p. 1907–1914, 2007.

SCHIMPL, F. SILVA, J. GONÇALVES, J. MAZZAFERA, P. Guarana : Revisiting a highly caffeinated plant from the Amazon. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 150, n. 1, p. 14–31, 2013.

SENTHILKUMAR, S. R. SIVAKUMAR, T. ARULMOZHI, K. T. MYTHILI, N. Gas chromatography-mass spectroscopy evaluation of bioactive phytochemicals of commercial green teas (*Camellia sinensis*) of India. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 8, n. 3, p. 278–282, 2015.

TALA, V. R. S. SILVA, V. C. RODRIGUES, C. M. NKENGFAK, A. E SANTOS, L. C. VILEGAS, W. Characterization of proanthocyanidins from *Parkia biglobosa* (Jacq.) G. Don. (Fabaceae) by flow injection analysis - Electrospray ionization ion trap tandem mass spectrometry and liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. **Molecules**, v. 18, n. 3, p. 2803–2820, 2013.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia Vegetal*. Porto Alegre. Artmed Editora LTDA. 5ª Edição. 2013.

TRYGG, J.; WOLD, S. Orthogonal projections to latent structures (O-PLS). **Journal of Chemometrics**, v. 16, n. 3, p. 119–128, 2002.

YUNES, R.A; CALIXTO, J.B. *Plantas Medicinais sob a ótica da Química Medicinal Moderna*. Editora Argos, 2001.

WAN, J. B. BAI, X. CAI, X. J. RAO, Y. WANG, Y. S. WANG, Y. T. Chemical differentiation of Da-Cheng-Qi-Tang, a Chinese medicine formula, prepared by traditional and modern decoction methods using UPLC/Q-TOFMS-based metabolomics approach. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 83, p. 34–42, 2013.

WIKLUND, S. JOHANSSON, E. SJÖSTRÖM, L. MELLEROWICZ, E. J. EDLUND, U. SHOCKCOR, J. P. GOTTFRIES, J. MORITZ, T. TRYGG, J. Visualization of GC/TOF-MS-Based Metabolomics Data for Identification of Biochemically Interesting Compounds Using OPLS Class Models. **Analytical Chemistry**, v. 80, n. 1, p. 115–122, 2008.

ZHANG, S.; ZHU, M. J. Characterization of Polyphenolics in Grape Pomace Extracts Using ESI Q-TOF MS/MS. **Journal of Food Science and Nutrition**, v. 1, n. 001, p. 1–10, 2015.