



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

PEDRO HENRIQUE HATUMURA

**ANÁLISE EXPLORATÓRIA DE SOLVENTES
EXTRATORES DOS PRECURSORES DO FITOHÔRMONIO
AUXINA EM EXTRATOS DE FOLHAS DE *Coffea arabica* L.**

Londrina
2019

PEDRO HENRIQUE HATUMURA

**ANÁLISE EXPLORATÓRIA DE SOLVENTES
EXTRATORES DOS PRECURSORES DO FITOHÔRM
ONIO AUXINA EM EXTRATOS DE FOLHAS DE
Coffea arabica L.**

Tese apresentada junto à Universidade Estadual de Londrina, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Química, Curso de Doutorado em Química - Associação Ampla UEL/UEPG/UNICENTRO, para a obtenção do título de Doutor – Área de concentração: Química Analítica.

Orientador: Profa. Dra. Ieda Spacino Scarminio

Londrina
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Hatumura, Pedro Henrique.

ANÁLISE EXPLORATÓRIA DE SOLVENTES EXTRATORES DOS PRECURSORES DO FITOHORMÔNIO AUXINA EM EXTRATOS DE FOLHAS DE *Coffea arabica* L. / Pedro Henrique Hatumura. - Londrina, 2019.
103 f.

Orientador: Ieda Spacino Scarminio.

Tese (Doutorado em Química) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2019.
Inclui bibliografia.

1. quimiometria - Tese. 2. fitohormônio - Tese. 3. *Coffea arabica* - Tese. 4. planejamento de misturas - Tese. I. Scarminio, Ieda Spacino. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

PEDRO HENRIQUE HATUMURA

**ANÁLISE EXPLORATÓRIA DE SOLVENTES EXTRATORES DOS
PRECURSORES DO FITOHÔRMONIO AUXINA EM EXTRATOS DE FOLHAS
DE *Coffea arabica* L.**

Tese apresentada junto à Universidade Estadual de Londrina, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Química, Curso de Doutorado em Química - Associação Ampla UEL/UEPG/UNICENTRO, para a obtenção do título de Doutor – Área de concentração: Química Analítica.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Ieda Spacino Scarminio
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Isabel Craveiro Moreira
Universidade Tecnológica Federal do Paraná –
UTFPR

Profa. Dra. Audrey Alesandra Stingen Garcia
Lonni
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Dionisio Borsato
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Mario Henrique Montazzolli Killner
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 11 de Abril de 2019.

AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Ieda Spacino Scarminio, pelo incentivo e orientação na condução desta pesquisa, pelos conselhos, pela confiança depositada, pelo carinho, pela amizade e pelos conhecimentos compartilhados. Obrigado pela maneira exemplar que se apresentou como pesquisadora, orientadora, professora e como pessoa, em todos os momentos do meu doutorado.

À pesquisadoras Miroslava Rakocevic (EMBRAPA-Campinas), pelas orientações na área agronômica.

Ao Professor Dr. Fernando César de Macedo Jr. e à técnica Vanessa Liberatti, do Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear da UEL pelas sugestões no preparo das amostras e a realização das análises.

Ao Professor Dr. Cesar Tischer e à técnica Cristina, do Laboratório de Análise de Materiais e Moléculas da UEL pelas sugestões no preparo das amostras e a realização das análises.

A minha amiga Amélia Elana Terrile, obrigado por ter sempre a mão estendida para me ajudar e pela sua companhia nos cursos e viagens de estudos.

Aos meus amigos do LQCN: Gustavo Galo Marcheafave, Sabrina Afonso, Galileu Bernardes Malta, Cláudia Domiciano Tormeno e Fabiano Bueno, presentes em todos os momentos, pela alegria e amizade sincera.

Aos professores do Curso do Doutorado Associação Ampla UEL/UEPG/UNICENTRO, pelo estímulo e palavras de alento.

Ao meu irmão, Paulo Roberto Hatumura e a minha mãe, Carmen Aparecida Peres, por sempre incentivarem a minha vida acadêmica.

HATUMURA, Pedro Henrique. **Análise exploratória de solventes extratores dos precursores do fitohormônio auxina em extratos de folhas de *Coffea arabica* L.** 2019. 103 p. Tese (Curso de Doutorado em Química - Associação Ampla UEL/UEPG/UNICENTRO) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

RESUMO

Os fitohormônios são essenciais para a maioria das funções fisiológicas da planta, mas sua análise é bem complexa sendo necessário muito tempo para a preparação do extrato. Neste estudo, foram investigados os principais solventes para a extração de fitohormônios nas folhas de *Coffea arabica* com a utilização de um planejamento experimental simplex-centroide de três componentes, com o objetivo de otimizar o solvente extrator das auxinas e de outros fitohormônios. Os extratos foram analisados por ressonância magnética e espectrometria de massa. Os resultados mostraram que as abundâncias relativas mais elevadas para o padrão da principal auxina, ácido indol-3-acético (AIA), foram obtidas pela mistura acetonitrila:metanol 80%: acetona 80% (1:1:1 v/v/v). Os espectros de RMN ¹H foram submetidos à análise exploratória (Análise de Componentes Principais e Análise de Agrupamento Hierárquica). Com a aplicação desses métodos nos dados obtidos foi possível diferenciar extratos da cultivar IAPAR 59 e da cultivar IPR 106 das folhas de *Coffea arabica*. Os ácidos clorogênicos foram responsáveis por essa discriminação, indicando uma maior concentração deles na cultivar IPR 106. Por meio da espectrometria de massa confirmou-se a presença de alguns precursores do AIA mostrando que a principal via do AIA nas folhas de *Coffea arabica* seria: triptofano-triptamina-indol-3-acetaldeído-AIA. Três conjugados do AIA também foram identificados e as abundâncias relativas mais elevadas para estes metabólitos foram obtidas pelo metanol 80%. A cultivar IPR 106 apresentou uma maior concentração relativa destes conjugados do AIA se comparada com a cultivar IAPAR 59. Outros dois fitohormônios foram investigados, a zeatina e o ácido jasmônico, os extratos obtidos a partir do ponto central do planejamento de misturas mostraram as maiores abundâncias relativas para a zeatina enquanto que o solvente acetonitrila mostrou-se o melhor extrator para o ácido jasmônico as misturas binárias com acetona 80%. A concentração relativa do ácido jasmônico na cultivar IAPAR 59 foi o dobro da cultivar IPR 106.

Palavras chave: AIA; IAPAR 59; IPR 106; RMN ¹H; quimiometria; espectrometria de massa; ácido jasmônico; zeatina; planejamento experimental simplex-centroide.

HATUMURA, Pedro Henrique. **Análise exploratória de solventes extratores dos precursores do fitohormônio auxina em extratos de folhas de *Coffea arabica* L.** 2019. 103 p. Tese (Curso de Doutorado em Química - Associação Ampla UEL/UEPG/UNICENTRO) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

ABSTRACT

Phytohormones are essential for most of the plant physiological functions, but their analysis is quite complex and much time is required for the extract preparation. In this study, the main solvents for the auxin's extraction from *Coffea arabica* leaves were investigated using a simplex-centroid experimental design with three components, with the objective of optimizing the auxins, and other phytohormones, extracting solvent. The extracts were analyzed by magnetic resonance and mass spectrometry. The results showed that the highest relative abundances for the standard of the main auxin, indole-3-acetic acid (IAA), were obtained by the mixture acetonitrile:80% methanol:80% acetone (1: 1: 1 v / v / v). ¹H NMR spectra were subjected to the exploratory analysis (Principal Component Analysis and Hierarchical Cluster Analysis). With the application of these methods in the obtained data it was possible to differentiate extracts of IAPAR 59 cultivar and IPR 106 cultivar from *Coffea arabica* leaves. Chlorogenic acids were responsible for this discrimination, indicating a higher concentration of them in the IPR 106 cultivar. Mass spectrometry confirmed the presence of some AIA precursors, showing that the main AIA pathway in the leaves of *Coffea arabica* was tryptophan-tryptamine-indole-3-acetaldehyde-AIA. Three IAA conjugates were also identified and the highest relative abundances for these metabolites were obtained by 80% methanol. The IPR 106 cultivar presented a higher relative concentration of these AIA conjugates compared to the cultivar IAPAR 59. Two other phytohormones were investigated, zeatin and jasmonic acid, the extracts obtained from the mixture design central point showed the greatest relative abundances for the zeatin while the best solvent extractor for the jasmonic acid was acetonitrile. The jasmonic acid relative concentration in the IAPAR 59 cultivar was double that in the cultivar IPR 106.

Key words: IAA; IAPAR 59; IPR 106; ¹H NMR; chemometrics; mass spectrometry; jasmonic acid; zeatin; simplex-centroid experimental design.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO II

- Figura 1** – Planejamento de misturas simplex-centroide com 3 componentes. 15
- Figura 2** – Curvas de nível do modelo quadrático para o rendimento em massa dos extratos das folhas da cultivar Iapar 59. 19
- Figura 3** – Curva de nível do modelo cúbico especial para o rendimento em massa dos extratos da cultivar IPR 106. 20
- Figura 4** – Espectro de RMN ^1H do padrão AIA. 21
- Figura 5** – Espectros de RMN comparando a mesma amostra fortificada e não fortificada com padrão AIA, onde as setas azuis evidenciam os sinais referentes ao padrão AIA. 22
- Figura 6** – Curva de nível predita pelo modelo especial cúbico da área dos sete sinais característicos do padrão AIA dos extratos fortificados de folhas da cultivar IAPAR 59. 24
- Figura 7** – Espectros de RMN ^1H de um extrato da folha de cafeeiro do cultivar IAPAR 59 onde destaca-se 5 sinais característicos da trigonelina. 25
- Figura 8** – Curva de nível preditas pelo modelo quadrático da soma das áreas dos sinais característicos de trigonelina dos extratos das folhas da cultivares IAPAR 59. 26
- Figura 9** – Curva de nível predita pelo modelo quadrático da soma das área dos sinais característicos de trigonelina dos extratos das folhas da cultivar IPR 106. 27
- Figura 10** – Dendrograma da AH dos dados espectrais de RMN para as cultivares IAPAR 59 (não negrito) e IPR 106 (negrito), onde “a” representa as amostras autossombreadas e “b” as amostras sem autossombreamento, enquanto as cores representam as diferentes fases extratores. 30

Figura 11 – Gráfico de escores CP1xCP2 dos dados espectrais de RMN da região de campo alto para as cultivares IAPAR 59 (não negrito) e IPR 106 (negrito), onde “a” representa as amostras autossombreadas e “b” as amostras sem autossombreamento. 30

Figura 12 – Loading da CP2 da ACP dos dados espectrais de RMN da região de campo alto. 31

Figura 13 – Gráfico de escores CP1xCP2 dos dados espectrais de RMN da região de campo alto das amostras dos extratos da folha do café para as cultivares IAPAR 59 (não negrito) e IPR 106 (negrito), onde “a” representa as amostras autossombreadas e “b” as amostras sem autossombreamento. 32

Figura 14 – Loading da CP1 da ACP dos dados espectrais de RMN da região de campo médio. 32

Figura 15 – Gráfico de escores CP2xCP4 dos dados espectrais de RMN da região de campo baixo para as cultivares IAPAR 59 (não negrito) e IPR 106 (negrito), onde “a” representa as amostras autossombreadas e “b” as amostras sem autossombreamento. 33

Figura 16 – Loading da CP2 da ACP dos dados espectrais de RMN da região de campo baixo. 34

Figura 7 – Loading da CP4 da ACP dos dados espectrais de RMN da região de campo baixo. 34

CAPÍTULO III

Figura 1 – Planejamento de misturas simplex-centroide com 3 componentes. 43

Figura 2 – Ciclo da biossíntese da auxina AIA. 47

- Figura 3** – Curvas de nível obtidas pelos sinais de metabólitos envolvidos no ciclo da biossíntese da auxina AIA, obtidos das amostras da cultivar Iapar 59. 50
- Figura 4** – Curvas de nível obtidas pelos sinais de metabólitos envolvidos no ciclo da biossíntese da auxina AIA, obtidos das amostras da cultivar IPR 106. 50
- Figura 5** – Curvas de nível das abundâncias relativas, obtidas por espectroscopia de massa (m/z), do modelo linear para o sinal do metabólito AIA-Glu, onde (a) representa os resultados obtidos dos extratos da cultivar Iapar 59 e (b) da IPR 106. 55
- Figura 6** – Curvas de nível das abundâncias relativas, obtidas por espectroscopia de massa (m/z), do modelo quadrático para o sinal do metabólito AIA-Asp, onde (a) representa os resultados obtidos dos extratos da cultivar Iapar 59 e (b) da IPR 106. 58
- Figura 7** – Curvas de nível das abundâncias relativas, obtidas por espectroscopia de massa (m/z), do modelo linear para o sinal do metabólito AIA-Val, onde (a) representa os resultados obtidos dos extratos da cultivar Iapar 59 e (b) da IPR 106. 60
- Figura 8** – Gráfico de barras das concentrações relativas dos metabólitos estudados. 61

CAPÍTULO IV

- Figura 1** – Planejamento de misturas simplex-centroide com 3 componentes. 72
- Figura 2** – Espectros de massa e a fórmula estrutural dos metabólitos: zeatina (a), rutina (b), mangiferina (c) e ácido jasmônico (d). 75

- Figura 3** – Curvas de nível do modelo cúbico especial para a intensidade do sinal m/z 77 para zeatina na cultivar IAPAR 59.
- Figura 4** – Curvas de nível do modelo cúbico especial para a intensidade do sinal m/z 79 para rutina na cultivar IAPAR 59.
- Figura 5** – Curvas de nível do modelo quadrático para a intensidade do sinal m/z para 80 mangiferina na cultivar IAPAR 59.
- Figura 6** – Curvas de nível do modelo cúbico especial para a intensidade do sinal m/z 81 para ácido jasmônico na cultivar IAPAR 59.
- Figura 7** – Curvas de nível do modelo cúbico especial para a intensidade do sinal m/z 83 para zeatina na cultivar IPR 106.
- Figura 8** – Curvas de nível do modelo cúbico especial para a intensidade do sinal m/z 85 para rutina na cultivar IPR 106.
- Figura 9** – Curvas de nível do modelo quadrático para a intensidade do sinal m/z para 86 mangiferina na cultivar IPR 106.
- Figura 10** – Curvas de nível do modelo cúbico especial para a intensidade do sinal 88 m/z para mangiferina na cultivar IPR106.
- Figura 11** – Gráfico de barras das concentrações relativas dos metabólitos estudados 88 para ambas as cultivares.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1 – Fases extratoras do planejamento simplex-centroide com 3 componentes e seus valores de polaridade e parâmetros solvatocrômicos.	3	16
Tabela 2 – Análise de variância para o ajuste dos modelos quadrático e cúbico especial de ambas as cultivares. Em vermelho destaca-se os termos significativos.	18	18
Tabela 3 – Deslocamento químico dos sinais do espectro de RMN ¹ H do padrão AIA.	21	21
Tabela 4 – Análise de variância para o ajuste do modelo cúbico especial da área dos sete sinais característicos do padrão AIA dos extratos fortificados de folhas da cultivar IAPAR 59. Em vermelho destaca-se os termos significativos.	23	23
Tabela 5 – Deslocamento químico dos sinais do espectro de RMN ¹ H característicos de trigonelina encontrados nas amostras da folha de cafeeiro.	25	25
Tabela 6 – Análise de variância para o ajuste do modelo quadrático da área dos sinais característicos de trigonelina dos extratos das folhas das cultivares IAPAR 59 e IPR 106.	28	28

CAPÍTULO III

Tabela 1 – Fases extratoras do planejamento simplex-centroide com 3 componentes: acetonitrila (acn), metanol 80% (Me) e acetona 80% (A) e suas proporções (v/v/v).	44	44
Tabela 2 – Polaridade e parâmetros solvatocrômicos das três componentes utilizadas no planejamento de misturas: acetonitrila, metanol 80% e acetona 80%.	44	44
Tabela 3 – Caracterização dos sinais de metabólitos presentes obtidos por espectroscopia de massa.	46	46
Tabela 4 – Equações dos modelos utilizados para cada metabólito para a cultivar Iapar 59.	48	48
Tabela 5 – Equações dos modelos utilizados para cada metabólito para a cultivar IPR 106.	48	48
Tabela 6 – Análise de variância para o ajuste dos modelos quadrático e cúbico especial da cultivar Iapar 59.	51	51
Tabela 7 – Análise de variância para o ajuste dos modelos quadrático e cúbico especial da cultivar IPR 106.	52	52

Tabela 8 – Caracterização dos sinais obtidos por espectroscopia de massa.	53
Tabela 9 – Equações dos modelos utilizados para o sinal do metabólito AIA-Glucose para ambas as cultivares.	54
Tabela 10 – Análise de variância para o ajuste do modelo linear para o sinal do metabólito AIA-Glu de ambas as cultivares.	54
Tabela 11 – Equações dos modelos utilizados para o sinal do metabólito AIA-Asp para ambas as cultivares.	56
Tabela 12 – Análise de variância para o ajuste do modelo linear para o sinal do metabólito AIA-Asp de ambas as cultivares.	56
Tabela 13 – Equações dos modelos utilizados para o sinal do metabólito AIA-Val para ambas as cultivares.	59
Tabela 14 – Análise de variância para o ajuste do modelo linear para o sinal do metabólito AIA-Val de ambas as cultivares.	59

CAPÍTULO IV

Tabela 1 – Composição das misturas extratoras e seus valores de polaridade e parâmetros solvatocrômicos.	72
Tabela 2 – Caracterização dos sinais obtidos por espectroscopia de massa.	75
Tabela 3 – Análise de variância para o ajuste do modelo cúbico especial da zeatina para a cultivar IAPAR 59.	76
Tabela 4 – Análise de variância para o ajuste do modelo cúbico especial da rutina para a cultivar IAPAR 59.	78
Tabela 5 – Análise de variância para o ajuste do modelo cúbico especial da zeatina para a cultivar IPR 106.	82
Tabela 6 – Análise de variância para o ajuste do modelo cúbico especial da rutina para a cultivar IAPAR 59.	84

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- α – acidez de um solvente
- β – basicidade de um solvente
- π – dipolaridade de um solvente
- A* – acetona 80%
- acn* – acetonitrila
- acn:A* – mistura acetonitrila:acetona 80%
- acn:Me* – mistura acetonitrila:metanol 80%
- acn:Me:A* – mistura acetonitrila:metanol 80%:acetona 80%
- AAH – Análise de Agrupamento Hierárquico
- ACP – análise de componente principal
- AIA – ácido indol-3-acético
- AJ – ácido jasmônico
- Ala – alanina
- ANOVA – Análise de variância
- Asp – ácido aspártico
- BBI – “Broad Band Inverse”, sonda de detecção de RMN
- °C – graus celsius
- CG – cromatografia gasosa
- CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência
- CP – componente principal
- Da – Dalton
- DMSO-d₆ – dimetilsulfóxido hexadeuterado
- EC – electroforese capilar
- EM – espectroscopia de massa
- F – estatística de Fisher
- Glc – glicose
- Glu – glutamato
- h – hora

H₂O – água
Hz – hertz
IAPAR – Instituto Agronômico do Paraná
IES – ionização por eletrospray
K – Kelvin
kV – quilovolt
L – litro
Me – metanol 80%
MeOH – metanol
Me:A – mistura metanol 80%:acetona 80%
MQep – médias quadráticas do erro puro
MQfaj – médias quadráticas da falta de ajuste
m/z – razão massa sobre a carga
mg – miligramas
MHz – mega-hertz
mL – mililitros
N – Nitrogênio
P.A. – “pro analyse”, alto grau de pureza
pH – potencial de hidrogênio
Phe – fenilalanina
ppb – partes por bilhão
ppm – partes por milhão
RMN – ressonância magnética
RMN ¹H – ressonância magnética de hidrogênio
xs – segundos
TMS – tetrametilsilano
UEL – Universidade Estadual de Londrina
v – volume
Val – valina

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	ix
LISTA DE TABELAS	xiii
LUSTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xv

CAPÍTULO I:

INTRODUÇÃO GERAL	2
------------------	---

CAPÍTULO II:

1. INTRODUÇÃO	12
2. MATERIAL E MÉTODOS	14
2.1. Coleta de amostra	14
2.2. Obtenção dos extratos	14
2.3. Análise em espectrômetro de ressonância magnética	16
2.4. Processamento dos dados	16
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
3.1. Rendimento em peso	17
3.2. Espectroscopia de RMN ¹ H	20
3.3. Análise de Agrupamentos Hierárquicos (AAH)	28
3.4. Análise de Componentes Principais (ACP)	29
4. CONCLUSÃO	35
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

CAPÍTULO III:

1. INTRODUÇÃO	40
---------------	----

2. MATERIAL E MÉTODOS	42
2.1. Coleta de amostras	42
2.2. Obtenção dos extratos	42
2.3. Preparo do extrato	44
2.4. Análise em espectrofotômetro de massa	45
2.5. Processamento dos dados	45
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
4. CONCLUSÃO	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
CAPÍTULO IV	
1. INTRODUÇÃO	68
2. MATERIAL E MÉTODOS	71
2.1. Coleta de amostras	71
2.2. Escolha dos solventes extratores	71
2.3. Preparo dos extratos	73
2.4. Análise em espectrometria de massa	73
2.5. Processamento dos dados	74
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	74
4. CONCLUSÃO	89
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90
CONCLUSÃO GERAL	101

CAPÍTULO 1



INTRODUÇÃO GERAL

O café é a segunda maior *commodity* do mundo¹. De acordo com a ABIC (Associação Brasileira da Indústria de Café) (2019) e a Organização Internacional do Café (OIC) (2018) o Brasil é o líder mundial, cuja produção foi estimada em 58,5 milhões de saca, a qual corresponde a cerca de 35% do consumo mundial. Em segundo lugar vem o Vietnã, seguido da Colômbia e da Indonésia. Esta planta pertence à família das Rubiaceae, sendo a *Coffea arabica* L. a espécie de planta de café mais importante mundialmente, se destacando comercialmente por gerar uma bebida de maior qualidade e importância². A parte mais estudada desta planta é o grão, resultando em inúmeros trabalhos na literatura³⁻⁵. A folha, um órgão essencial para a análise bioquímica deste vegetal⁶, apresenta uma quantidade bem menor.

As plantas devido à ausência de movimento celular, apresentam um vasto número de metabólitos que exercem um papel vital como moléculas de sinalização. Entre os vários metabólitos encontrados na droga vegetal podemos citar os fitohormônios, como os principais metabólitos para o desenvolvimento da planta, regulando o processo fisiológico mesmo em concentrações muito baixas e geralmente não apresentam nenhuma função nutricional, entretanto são fundamentais para controlar o crescimento dos vegetais⁷. As fases de crescimento da planta: germinação da semente⁸, formação de órgãos⁹, alongamento do caule vegetal¹⁰, senescência¹¹ e divisão celular¹² estão entre os processos regulados pelos fitohormônios. Além de serem importantes no papel de desenvolvimento da planta os hormônios vegetais protegem a planta do dano oxidativo ocasionado por estresse ambiental.

Estudos mostram o aumento da concentração do fitohormônios diante de condições estressantes^{13,14}.

De acordo com a sua estrutura e função fisiológica os fitohormônios podem ser divididos em: auxinas, citocininas, giberilinas, brassinosteróides, etileno, e ácidos abscísico, salicílico e jasmônico. Cada um deles tem o seu efeito biológico, mas a maioria dos fitohormônios apresenta efeitos sinérgicos ou antagônicos entre si^{15,16}. Para ajudar a entender estas atividades aditivas é necessária uma análise de múltiplas classes de fitohormônios, investigando a diversidade, bem como a concentração destes fitohormônios e dos metabólitos que estão relacionados a eles.

A escolha da fase extratora é essencial em estudos de metabólitos, principalmente no caso dos fitohormônios onde existem várias restrições para sua análise, devido a sua quantidade vestigial no nível de ppb por grama de peso seco. Geralmente, a quantidade e variedade de metabólitos presente pode chegar a 200.000 compostos diferentes^{17,18}. Além disso, muitos fitohormônios apresentam rápida degradação devido a exposição ao oxigênio do ar, a luz, a mudança de pH e o calor¹⁹.

O preparo do extrato é fundamental para qualquer tipo de análise de um material vegetal e esta etapa é governada pela fase extratora, que pode ser composta por um solvente puro ou uma mistura de solventes. Existem várias razões para se utilizar misturas de solventes ao invés de solventes puros, sendo a mais importante a versatilidade em variar os parâmetros solvatocrômicos da sua fase extratora, afetando assim a concentração e o tipo de metabólito extraído. Estes parâmetros foram introduzidos por Kamlet e Taft²⁰⁻²² e se apoiaram em três interações dos solventes: α (acidicidade), β (basicidade) e π (dipolaridade). A composição da mistura de solventes empregada é um grau de liberdade adicional à escolha dos diversos solventes. Os vários solutos a serem separados “interagem” de forma diferente

aos componentes da mistura de solventes, assim se distribuem diferentemente entre a fase estacionária e a móvel²³. A escolha dos solventes e a composição dos mesmos na fase extratora são fundamentais para se obter uma melhor separação dos componentes da mistura. Esta tarefa é bem complexa e demorada, para tal, precisa-se de uma metodologia para auxiliar nesta escolha. Assim sendo, a utilização de um planejamento de misturas simplex-centroide é fundamental nesta tarefa²⁴. Na literatura três solventes extratores são comumente utilizados em análises de fitohormônios: acetonitrila (ACN)^{19,25}, metanol 80% (MeOH:H₂O v/v)^{26,27} e acetona 80% (Acetona:H₂O v/v)²⁸.

Planejamento experimental é um conceito bem estabelecido para o planejamento e a execução de experimentos na análise exploratória^{29,30}. Um dos tipos de planejamento bastante utilizado é o planejamento de misturas, que explora como a alteração dos fatores puros na composição da mistura afeta as propriedades da mesma. Uma característica deste tipo de planejamento é que a soma dos componentes da mistura é 100%, isso significa que os fatores não podem ser manipulados completamente independentes um do outro. A proporção de cada um deles sempre vai ficar de 0 a 100%. Este tipo de análise é muito utilizado para otimizações, onde o objetivo é encontrar uma combinação de fatores correspondendo a um perfil de resposta ideal. Estes modelos são úteis na descrição do comportamento de misturas de solventes para extrair metabólitos de material vegetal^{30,31}.

A quantidade de material extraído depende das proporções dos solventes na extração usando modelos de mistura quadrática ou cúbica especial.

$$\hat{y} = \sum_i b_i x_i + \sum_i \sum_{\langle j \rangle} b_{ij} x_i x_j + \sum_i \sum_{\langle j \rangle} \sum_{\langle k \rangle} b_{ijk} x_i x_j x_k \quad [1]$$

A primeira soma da equação 1 contém termos lineares da mistura para todos os componentes do planejamento e descreve os efeitos relativos de extração dos componentes

puros na mistura. A segunda soma descreve as interações binárias entre os pares de solventes na extração processo. Um termo positivo significativo neste somatório sugeri que uma mistura binária de solventes indica aumento na extração em relação a cada solvente separadamente. A última soma contém termos que serão importantes para verificar as interações ternárias entre a mistura de solventes. O planejamento simplex-centroide permite avaliar modelos por meio da superfície de resposta otimizada, a qualidade dos modelos são julgadas pela análise de variância (ANOVA) dos resultados da regressão³⁰.

O objetivo geral desta tese foi a busca da otimização do solvente extrator das auxinas e seus precursores, de outros fitohormônios (citocininas e ácido jasmônico) e de metabólitos que apresentem relação com os fitohormônios (rutina e mangiferina). Além disso, o estudo da análise múltipla da abundância relativa destes metabólitos, com a finalidade de se buscar uma maior compreensão das complexas relações entre as auxinas e outros fitohormônios, assim como, as relações dos hormônios vegetais com outros metabólitos presentes na planta, as quais são intrínsecas ao desenvolvimento do vegetal.

No Capítulo 2, uma análise exploratória foi realizada com o objetivo de investigar os principais solventes extratores de auxinas utilizando um planejamento de mistura do tipo simplex-centroide de três componentes em amostras de folha de *Coffea arabica* utilizando análise por espectroscopia de ressonância magnética de hidrogênio (RMN ¹H). Além disso, as técnicas quimiométricas de Análise de Agrupamento Hierárquico (AAH) e Análise de Componentes Principais (ACP) foram utilizadas para investigar os metabólitos discriminantes entre as duas cultivares (Iapar 59 e IPR 106).

No Capítulo 3, o objetivo geral foi investigar a biossíntese das auxinas por espectroscopia de massa (EM) em folhas de *Coffea arabica L.* com o auxílio de uma análise

exploratória para avaliar os efeitos dos solventes extratores sobre os metabólitos da biossíntese do ácido indol-3-acético (AIA) e dos AIA-conjugados presentes na planta.

No Capítulo 4, foi realizada a investigação de dois fitohormônios de classes diferentes (citocininas e ácido jasmônico) e de dois metabólitos (rutina e mangiferina) que apresentam relação com os hormônios vegetais em folhas de *Coffea arabica* L. por espectrometria de massa com o auxílio de uma análise exploratória.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Janissen, B.; Huynh, T. Resources , Conservation & Recycling Chemical Composition and Value-Adding Applications of Coffee Industry by-Products : A Review. *Resour. Conserv. Recycl.* **2018**, *128*, 110–117. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2017.10.001>.
- (2) Wang, N.; Lim, L. Fourier Transform Infrared and Physicochemical Analyses of Roasted Coffee. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 5446–5453.
- (3) Broissin-Vargas, L. M.; Snell-Castro, R.; Godon, J. J.; González-Ríos, O. Impact of Storage Conditions on Fungal Community Composition of Green Coffee Beans *Coffea Arabica* L . Stored in Jute Sacks during 1 Year. *J. Appl. Microbiol.* **2017**, *124*, 547–558. <https://doi.org/10.1111/jam.13656>.
- (4) Luca, S. De; Ciotoli, E.; Biancolillo, A.; Bucci, R.; Magrì, A. D.; Marini, F. Simultaneous Quantification of Caffeine and Chlorogenic Acid in Coffee Green Beans and Varietal Classification of the Samples by HPLC-DAD Coupled with Chemometrics. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2018**, *25*, 28748–28759.
- (5) Wang, X.; Meng, Q.; Peng, X.; Hu, G.; Qiu, M. Identifi Cation of New Diterpene Esters from Green Arabica Co Ff Ee Beans , and Their Platelet Aggregation Accelerating Activities. *Food*

Chem. **2018**, *263*, 251–257. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.04.081>.

- (6) Nutman, F. J. Studies of the Physiology of *Coffea Arabica*: I . Photosynthesis of Coffee Leaves under Natural Conditions. *Ann. Bot.* **2019**, *1* (3), 353–367.
- (7) Sauer, M.; Robert, S.; Kleine-Vehn, J. Auxin: Simply Complicated. *J. Exp. Bot.* **2013**, *64*, 2577–2665.
- (8) Sánchez-Rodríguez, C.; Rubio-Somoza, I.; Sibout, R.; Persson, S. Phytohormones and the Cell Wall in *Arabidopsis* during Seedling Growth. *Trends Plant Sci.* **2010**, *15* (5), 291–301. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.03.002>.
- (9) Magyar-Tábori, K.; Dobránszki, J.; da Silva, J. A. T.; Bulley, S. M.; Hudák, I. The Role of Cytokinins in Shoot Organogenesis in Apple. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* **2010**, *101*, 251–267. <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9696-6>.
- (10) Mander, L. N. Twenty Years of Gibberellin Research †. *Nat. Prod. Rep.* **2003**, *20*, 49–69. <https://doi.org/10.1039/b007744p>.
- (11) Rybel, B. de; Audenaert, D.; Beeckman, T.; Kepinski, S. The Past, Present, and Future of Chemical Biology in Auxin Research. *ACS Chem. Biol.* **2009**, *4* (12), 987–998.
- (12) Mapelli, S.; Frova, C.; Torti, G.; Soressi, G. P. Relationship between Set , Development and Activities of Growth Regulators in Tomato Fruits. *Plant Cell Physiol.* **1978**, *19* (7), 1281–1288.
- (13) Atici, Ö.; Açar, G.; Battal, P. Changes in Phytohormone Contents in Chickpea Seeds Germinating under Lead or Zinc Stress. *Biol. Plant.* **2005**, *49* (2), 215–222. <https://doi.org/10.1007/s10535-005-5222-9>.
- (14) Messing, S. A. J.; Gabelli, S. B.; Echeverria, I.; Vogel, J. T.; Guan, J. C.; Tan, B. C.; Klee, H. J.; McCarty, D. R.; Amzel, L. M. Structural Insights into Maize Viviparous14, a Key Enzyme

in the Biosynthesis of the Phytohormone Abscisic Acid. *Plant Cell* **2010**, 22 (9), 2970–2980.
<https://doi.org/10.1105/tpc.110.074815>.

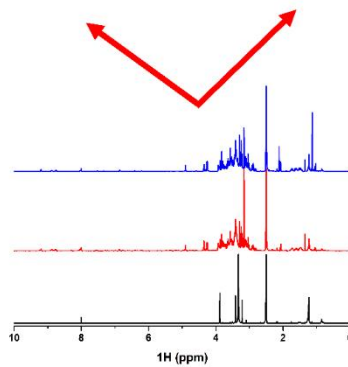
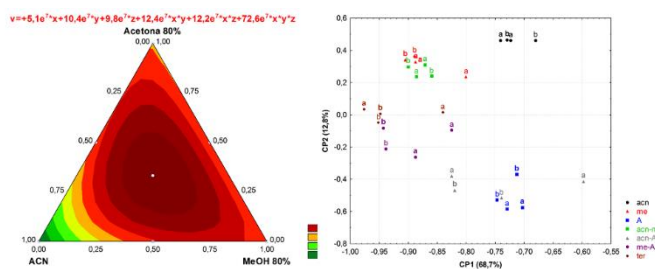
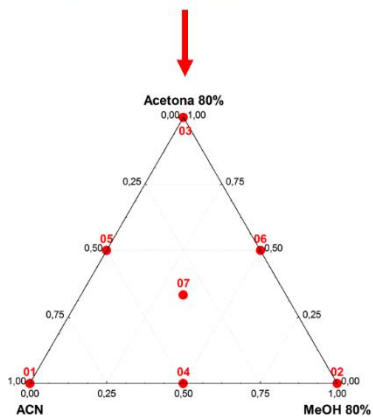
- (15) Aloni, R.; Aloni, E.; Langhans, M.; Ullrich, C. I. Role of Cytokinin and Auxin in Shaping Root Architecture : Regulating Vascular Differentiation , Lateral Root Initiation , Root Apical Dominance and Root Gravitropism. *Ann. Bot.* **2006**, 97, 883–893.
<https://doi.org/10.1093/aob/mcl027>.
- (16) Reymond, P.; Farmer, E. E. Jasmonate and Salicylate as Global Signals for Defense Gene Expression. *Curr. Opin. Plant Biol.* **1998**, 1, 404–411.
- (17) Chen, N.-D.; Chen, N.-F.; Li, J.; Cao, C.-Y.; Wang, J.-M.; Huang, H.-P. Similarity Evaluation of Different Origins and Species of Dendrobiums by GC-MS and FTIR Analysis of Polysaccharides. *Int. J. Anal. Chem.* **2015**, 2015, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2015/713410>.
- (18) Fiehn, O. Metabolomics – the Link between Genotypes and Phenotypes. *Plant Mol. Biol.* **2002**, 48, 155–171.
- (19) Barkawi, L. S.; Tam, Y.; Tillman, J. A.; Pederson, B.; Calio, J.; Al-amier, H.; Emerick, M.; Normanly, J.; Cohen, J. D. A High-Throughput Method for the Quantitative Analysis of Indole-3-Acetic Acid and Other Auxins from Plant Tissue Q. *Anal. Biochem.* **2008**, 372, 177–188. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2007.08.009>.
- (20) Taft, R. W.; Kamlet, M. J. The Solvatochromic Comparison Method . 2 . The α -Scale of Solvent Hydrogen-Bond Donor (HBD) Acidities. *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, 98, 2886–2894.
- (21) Kamlet, M. J.; Taft, R. W. The Solvatochromic Comparison Method. I. The β -Scale of Solvent Hydrogen-Bond Acceptor (HBA) Basicities. *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, 98, 377–383.
- (22) Kamlet, M. J.; Abboud, J. L.; Taft, R. W. The Solvatochromic Comparison Method . 6 . The Π^* Scale of Solvent Polarities. *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, 99, 6027–6038.

<https://doi.org/10.1021/ja00460a031>.

- (23) Marcus, Y. *Solvent Mixtures: Properties and Selective Solvation*; Marcel Dekker: New York, 2002.
- (24) Moreira, I.; Scheel, G. L.; Hatumura, P. H.; Scarminio, I. S. EFEITO DO SOLVENTE NA EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS CLOROGÊNICOS, CAFEÍNA E TRIGONELINA EM *Coffea Arabica*. *Quim. Nov.* **2014**, *37* (1), 39–43.
- (25) Tivendale, N. D.; Cohen, J. D. Analytical History of Auxin. *J. Plant Growth Regul.* **2015**, *34* (4), 708–722. <https://doi.org/10.1007/s00344-015-9519-4>.
- (26) Lu, Q.; Chen, L.; Lu, M.; Chen, G.; Zhang, L. Extraction and Analysis of Auxins in Plants Using Dispersive Liquid - Liquid Microextraction Followed by High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, 2763–2770. <https://doi.org/10.1021/jf903274z>.
- (27) Quittenden, L. J.; Davies, N. W.; Smith, J. A.; Molesworth, P. P.; Tivendale, N. D.; Ross, J. J. Auxin Biosynthesis in Pea : Characterization of The. *Plant Physiol.* **2009**, *151* (November), 1130–1138. <https://doi.org/10.1104/pp.109.141507>.
- (28) Atsuda, F. M.; Iyazawa, H. M.; Akasa, K. W.; Iyagawa, H. M. Quantification of Indole-3-Acetic Acid and Amino Acid Conjugates in Rice by Liquid Chromatography – Electrospray Ionization – Tandem Mass Spectrometry. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2005**, *69* (4), 778–783.
- (29) Box, G. E. P.; Hunter, W. G.; Hunter, J. S. *Statistics for Experimenters*; Wiley: New York, 1978.
- (30) Bruns, R.; Scarminio, I. S.; Neto, B. de B. *Statistical Design - Chemometrics*; Elsevier Science: Campinas, 2006.
- (31) Souza, E. B. R. de; Silva, R. R. da; Afonso, S.; Scarminio, I. S. Enhanced Extraction Yields

and Mobile Phase Separations by Solvent Mixtures for the Analysis of Metabolites in *Annona Muricata* L. Leaves. *J. Sep. Sci.* **2009**, *32*, 4176–4185.
<https://doi.org/10.1002/jssc.200900375>.

CAPÍTULO II



OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA EXTRATOR DE AUXINAS POR ESPECTROSCOPIA DE RMN ¹H

1. INTRODUÇÃO

As auxinas são consideradas os fitohormônios de maior importância pois regulam a divisão, expansão e diferenciação celular, além da floração^{1,2} e também foi o primeiro fitohormônio a ser identificado³. O ácido 3-indol acético (AIA) é a auxina mais abundante encontrada nas plantas e também a mais importante fisiologicamente. Ele é fundamental em vários processos de crescimento e desenvolvimento da planta: alongação celular, desenvolvimento do fruto, formação de raiz lateral, regulamentação da dominância apical, diferenciação vascular^{4,5}. Apesar dos vários trabalhos encontrados na literatura sobre análise de auxinas, o seu estudo ainda é pouco conclusivo devido à baixa concentração destes nas plantas no nível de ppb⁶. Além disso existem outros empecilhos na análise das auxinas nos vegetais em geral⁷ como, alta quantidade de interferentes encontrados no extrato bruto sua característica de alta aderência em recipientes de vidro, a rápida degradação em presença do ar, luz, mudança de pH e calor.

A preparação do extrato é fundamental e complexa para as análises desse metabólito. A primeira etapa deste processo é a coleta das folhas do café, onde a velocidade é fundamental para que não ocorra mudanças nos níveis de. Uma maneira de realizar esta etapa é o congelamento imediato da amostra com o auxílio de nitrogênio líquido. A segunda etapa é moer as folhas para garantir a homogeneização da amostra, que também é realizada com o auxílio do nitrogênio líquido. A terceira etapa é a extração com o solvente que extraía a maior

quantidade de auxina com a menor quantidade de compostos interferentes. Para isso, utilizamos um planejamento de misturas.

A espectroscopia de ressonância magnética (RMN) é uma técnica bastante utilizada em análises metabolômicas, pois é possível obter impressões digitais de metabólitos com bastante especificidade⁸. Além disso é uma técnica de análise rápida e com boa reprodutibilidade, as únicas variáveis são o solvente utilizado e a força do campo magnético⁹. Uma das dificuldades encontradas ao se utilizar esta técnica com amostras complexas, é a sobreposição de sinais devido aos vários tipos de interações encontradas nos diversos metabólitos do extrato da amostra, dificultando a caracterização dos sinais obtidos¹⁰.

A quimiometria é uma ferramenta muito utilizada para ajudar a elucidar as dificuldades encontradas na análise de um conjunto de dados extenso e complexo, como é o caso dos espectros de RMN de amostras de produtos naturais. Para este tipo de análise pode-se destacar a Análise de Agrupamentos Hierárquicos (AAH) e Análise de Componentes Principais (ACP)¹¹.

Este trabalho tem como objetivo estudar as principais fases extratoras utilizadas na análise de auxinas em folhas de *Coffea arabica L.* com o auxílio da técnica de espectroscopia de RMN ¹H.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. COLETA DE AMOSTRAS

A coleta das folhas das cultivares IAPAR 59 e IPR 106 foi realizada no dia três de outubro de 2014, em triplicata na sede do Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR) em Londrina (23°18'S, 51°17'O), Paraná, Brasil. Em cada cultivar coletou-se dois tipos de amostras, folhas com e sem autossombreamento. As amostras foram imersas em nitrogênio líquido, para evitar a degradação do fitohormônio (auxina). O tempo médio entre a coleta e a imersão em nitrogênio líquido foi de 15 segundos. Após a coleta as amostras foram transportadas para armazenamento em ultrafreezer (-80°C).

2.2. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

O planejamento experimental simplex-centroide com três componentes: *acn* = acetonitrila, *Me* = metanol 80% (MeOH:H₂O v/v) e *A* = acetona 80% (C₃H₆O:H₂O v/v), foi utilizado para o preparo dos extratos de acordo com a Figura 1. Os dados de fração em volume de cada um dos componentes estão apresentados na Tabela 1, bem como a polaridade e os parâmetros solvatocrômicos¹²⁻¹⁵. As folhas com autossobreamento e sem autossobreamento das cultivares IAPAR 59 e IPR 106, em triplicata, foram cortadas em tiras e depois separadas em sete porções de 215 mg, pesada em balança analítica Shimadzu modelo AY220, totalizando 42 amostras para cada cultivar. Quatorze novas amostras de folhas de 215 mg da cultivar IAPAR 59, foram fortificadas com 5 mg do padrão de AIA. Em todas amostras foram adicionadas 2 mg do antioxidante HTB (hidroxitolueno butilado) para

evitar a degradação das auxinas. Em cada amostra foram adicionados 20 mL da fase extratora, de acordo com o planejamento da Figura 1 e levada ao banho ultrassom Ultracleaner 1400 Unique por 30 minutos, a temperatura foi mantida próxima de 0°C com a utilização de gelo. Os solventes orgânicos utilizados foram acetonitrila J. T. Baker (Estados Unidos), acetona Impex (São Paulo, Brasil) e metanol Impex (São Paulo, Brasil), todos de grau P.A. Ao final da extração as amostras foram filtradas em papel filtro. Em seguida, o filtrado foi liofilizado até peso constante e diluídos em 400 µL de dimetilsulfóxido hexadeuterado Sigma-Aldrich (DMSO-d₆) 99.96% contendo 0.03% (v/v) de tetrametilsilano (TMS) para análise em RMN.

Figura 1. Planejamento de misturas simplex-centroide com 3 componentes.

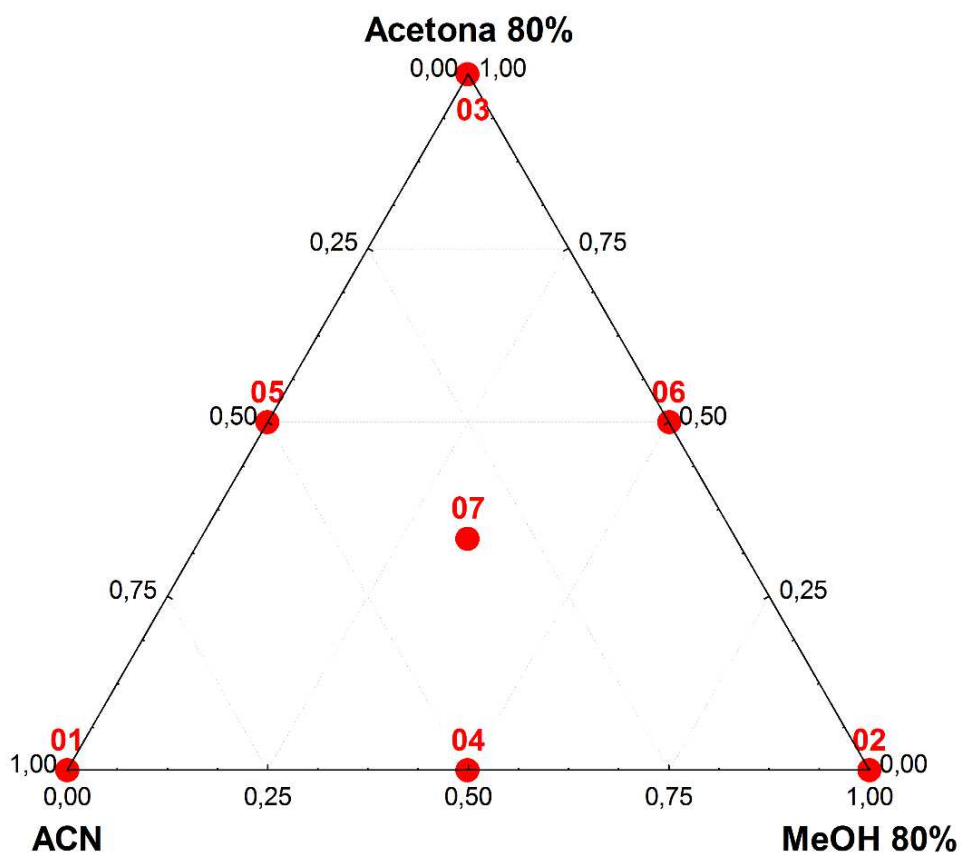


Tabela 1 - Fases extratoras do planejamento simplex-centroide com 3 componentes e seus valores de polaridade e parâmetros solvatocrômicos.

Fase extratora	Acetonitrila	MeOH 80%	Acetona 80%	Polaridade	Acidicidade α	Basicidade β	Dipolaridade π
<i>acn</i>	1	0	0	5,800	0,150	0,250	0,600
<i>Me</i>	0	1	0	6,180	0,440	0,246	0,314
<i>A</i>	0	0	1	6,180	0,144	0,318	0,538
<i>acnMe</i>	0,5	0,5	0	5,990	0,295	0,248	0,457
<i>acnA</i>	0,5	0	0,5	5,990	0,147	0,284	0,569
<i>MeA</i>	0	0,5	0,5	6,180	0,292	0,282	0,426
<i>AcnMeA</i>	0,33	0,33	0,33	6,053	0,245	0,271	0,484

2.3. ANÁLISE EM ESPECTRÔMETRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA

Os espectros de RMN ^1H foram obtidos no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear da UEL com espectrômetro Bruker Avance III, operando a frequência de 400 MHz. Foi utilizada sonda multinuclear inversa de 5 mm (BBI). Os parâmetros de aquisição foram: temperatura (298 K); janela espectral (8012.576 Hz); tempo de aquisição (4,09 s); número de pontos coletados (32768); número de scans (64).

2.4. PROCESSAMENTO DOS DADOS

O ACD/NMR Processor Academic Edition foi utilizado no processamento dos espectros de RMN. Calibrou-se a linha de base dos espectros de RMN utilizando-se o sinal do TMS como referência para o sinal em 0 ppm. Os espectros e o gráfico dos loadings foram

plotados usando o programa Origin Pro 8. A análise quimiométrica foi feita com a utilização do programa Statistica 7.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dividiu-se a análise dos resultados em duas partes. A fim de se obter uma quantificação do rendimento em massa e dos metabólitos observados nos espectros de RMN ^1H , construiu-se gráficos de curva de nível do planejamento de misturas simplex-centroide de três componentes. Para a segunda análise utilizou-se as ferramentas quimiométrica Análise Hierárquica (AH) e Análise de Componentes Principais (ACP) para estudar os diferentes agrupamentos encontrados no conjunto de dados dos espectros de RMN e identificar os metabólitos responsáveis pelas separações obtidas.

3.1. RENDIMENTO EM PESO

Com os pesos obtidos após a liofilização dos extratos das cultivares IAPAR 59 e IPR 106 foram construídos os modelos para o rendimento em massa quadrático e cúbico especial, respectivamente. As equações 1 e 2 mostram as equações polinomiais dos modelos para o rendimento em massa para as cultivares IAPAR 59 e IPR 106, respectivamente. A resposta prevista pelo modelo é representada por \hat{y} e as variáveis independentes são identificadas por *acn* (acetonitrila), *Me* (metanol 80%) e *A* (acetona 80%).

As equações ajustadas mostram que embora os coeficientes para *acn* não terem sido significativos ele mostra interação sinérgica com metanol 80% e acetona 80% para a cultivar IAPAR 59 e com metanol 80% para IPR 106.

$$\hat{y} = +0,0023_{(\pm 0,001)} acn + 0,0133_{(\pm 0,001)} Me + 0,0165_{(\pm 0,001)} A + 0,0356_{(\pm 0,006)} acn : Me + 0,0176_{(\pm 0,006)} acn : A + 0,0160_{(\pm 0,006)} Me : A$$

[1]

$$\hat{y} = +0,002_{(\pm 0,001)} acn + 0,015_{(\pm 0,001)} Me + 0,021_{(\pm 0,001)} A + 0,022_{(\pm 0,009)} acn : Me - 0,015_{(\pm 0,009)} acn : A - 0,010_{(\pm 0,009)} Me : A + 0,238_{(\pm 0,076)} acn : Me : A$$

[2]

Para investigar a significância a e a falta de ajuste dos modelos quadrático e cúbico especial, foi aplicada a análise de variância, para ambas as cultivares (Tabela 2). Esta tabela mostra que a razão entre as médias quadráticas da falta de ajuste e do erro puro (MQfaj/MQep) foi menor que o F crítico no nível de 95% de confiança, para ambas as análises, indicando que não há falta de ajuste em nenhum dos modelos utilizados.

Tabela 2 – Análise de variância para o ajuste dos modelos quadrático e cúbico especial de ambas as cultivares. Em vermelho destaca-se os termos significativos.

Cultivar	Soma quadrática	g. l.	Média quadrática	Valor de F calculado	Valor de F crítico	p
IAPAR 59						
Regressão	5,80E-4	5	1,16E-4	18,36	2,90	1,00E-6
Resíduos	9,50E-5	15	6,00E-6			
Falta de ajuste	9,00E-6	1	9,00E-6	1,51	4,60	0,24
Erro Puro	8,60E-5	14	6,00E-6			
Total	6,75E-4	20	3,40E-5			
IPR 106						
Regressão	7,41E-4	5	1,48E-4	11,78	2,96	1,30E-4
Resíduos	1,76E-4	14	1,30E-5			
Falta de ajuste	3,10E-5	1	3,10E-5	2,77	4,67	0,12
Erro Puro	1,45E-4	13	1,10E-5			
Total	9,17E-4	19	4,80E-5			

As Figuras 2 e 3 mostram as curvas de níveis para as cultivares IAPAR 59 e IPR 106, respectivamente. Analisando ambas as figuras observa-se que os extratos obtidos com *acn* apresentaram os menores rendimentos em massa e a mistura ternária *acn:Me:A* exibiu os extratos de maior rendimento para ambas as cultivares.

Figura 2. Curvas de nível do modelo quadrático para o rendimento em massa dos extratos das folhas da cultivar IAPAR 59.

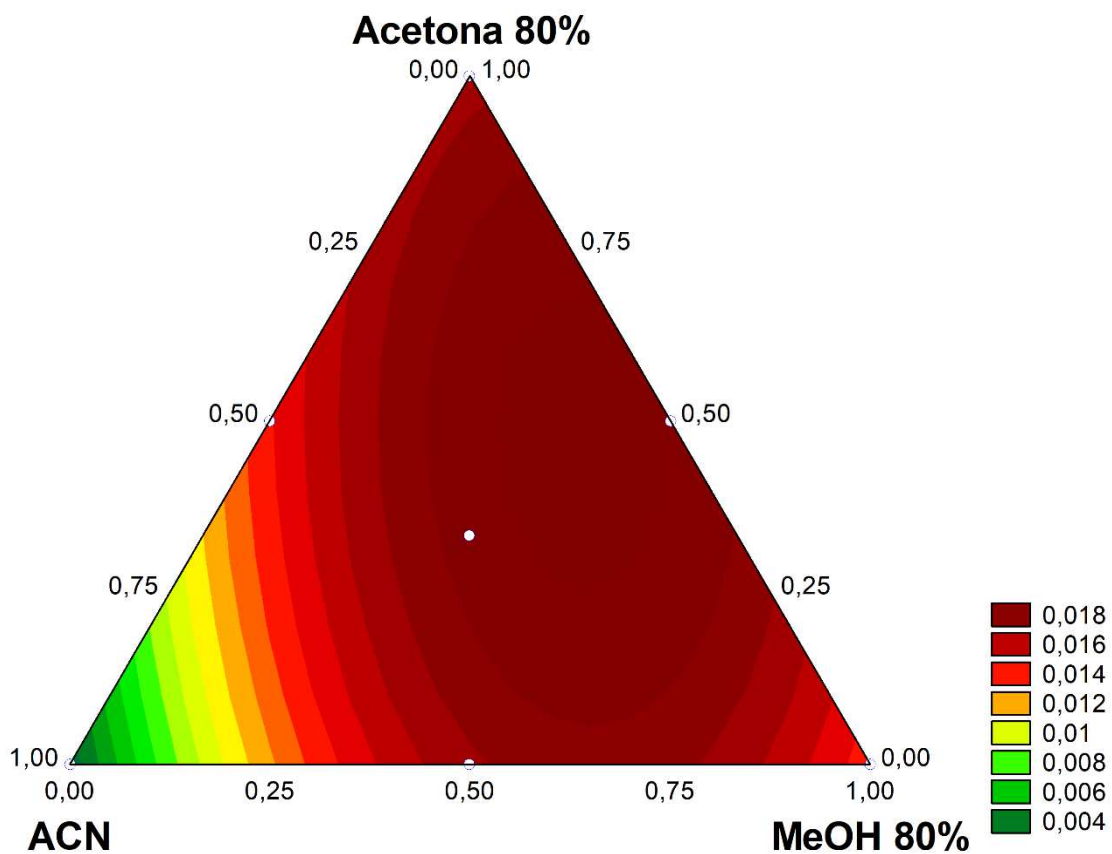
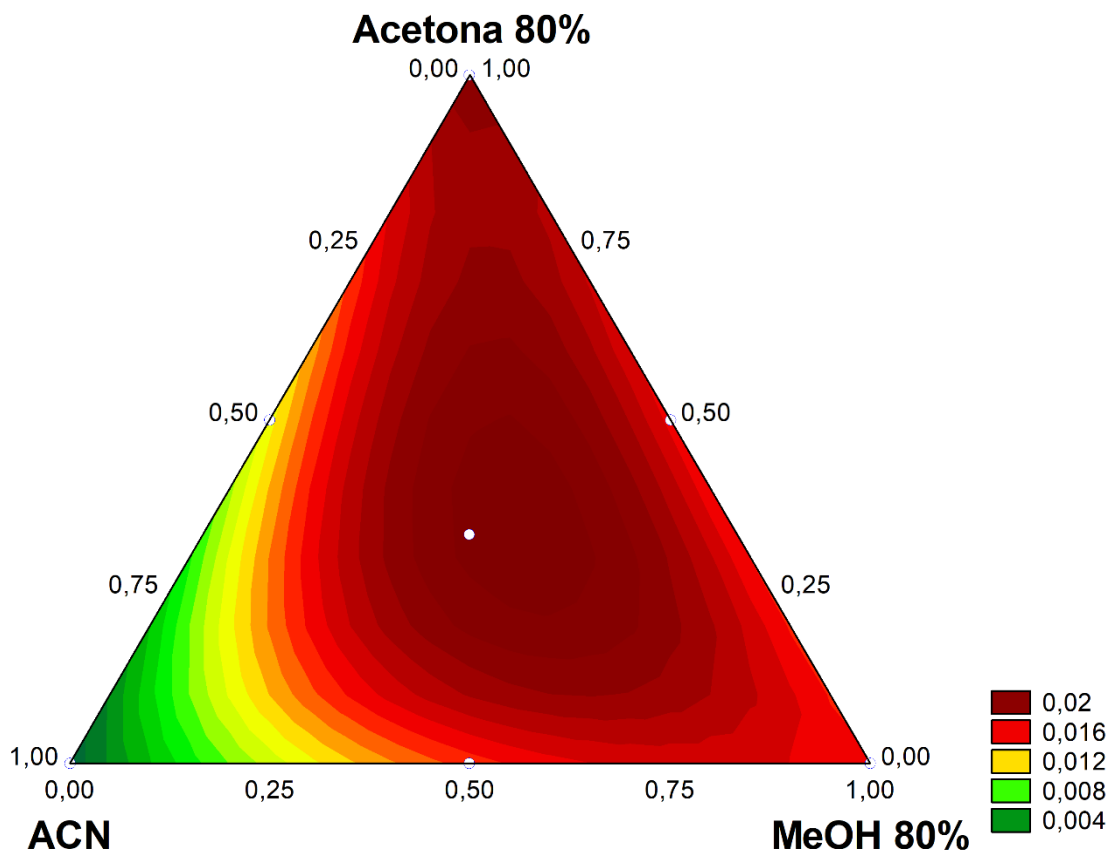


Figura 3. Curva de nível do modelo cúbico especial para o rendimento em massa dos extratos da cultivar IPR 106.



3.2. ESPECTROSCOPIA DE RMN ¹H

A Figura 4 mostra o espectro de RMN ¹H do padrão AIA. A Tabela 3 mostra os valores de deslocamento químico dos sete sinais característicos do AIA encontrados nos extratos fortificados com os valores encontrados na literatura.

Uma comparação entre os espectros de RMN ¹H do mesmo extrato obtido por acetonitrila da cultivar IAPAR 59, fortificado e não fortificado com o padrão AIA, está apresentada na Figura 4. O gráfico mostra a presença dos sete sinais referentes ao padrão

AIA na amostra fortificada e a falta deles, indicando a ausência de AIA na amostra não fortificada.

Figura 4. Espectro de RMN ^1H do padrão AIA.

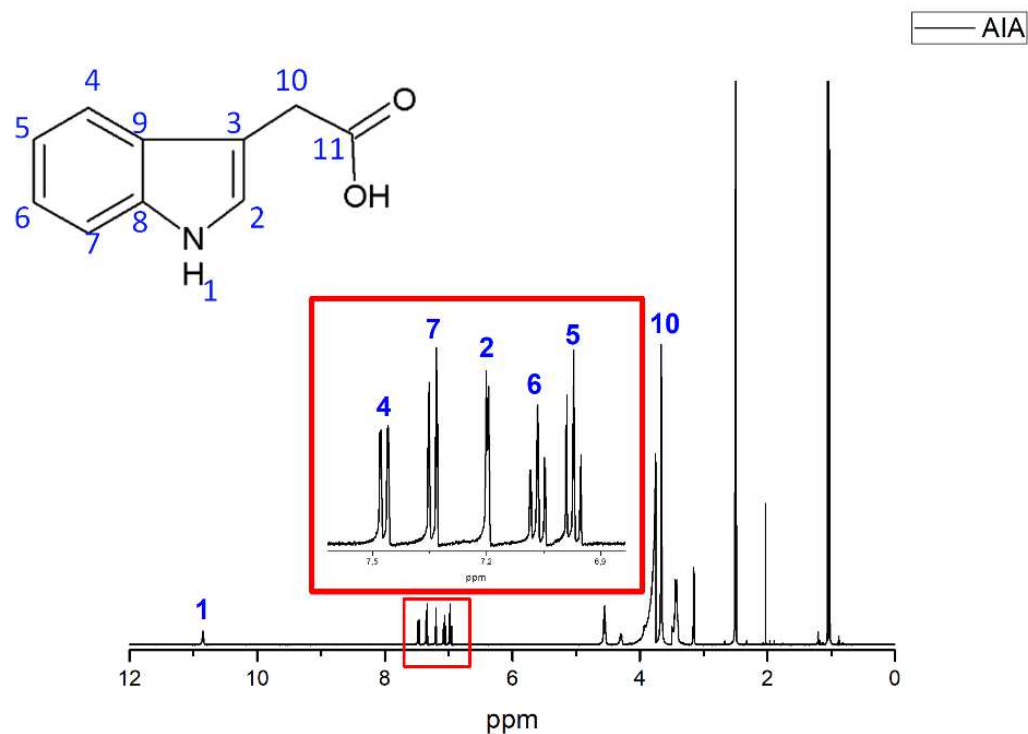
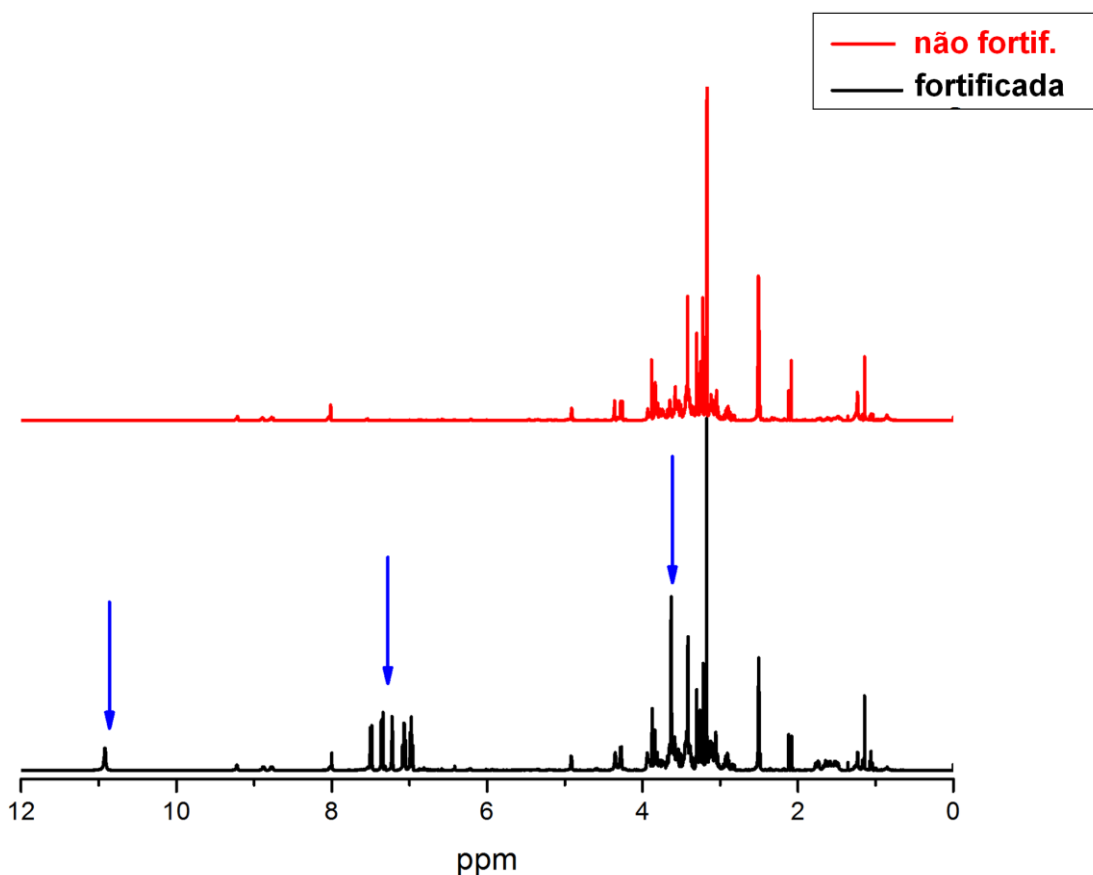


Tabela 3 – Deslocamento químico dos sinais do espectro de RMN ^1H do padrão AIA.

Sinal	Deslocamento químico (valor experimental em ppm)	Deslocamento químico (valor encontrado na literatura em ppm ¹⁶)
1	10,84	10,90
2	7,20	7,20
4	7,47	7,50
5	6,97	7,00
6	7,07	7,10
7	7,34	7,35
10	3,66	3,60

Figura 5. Espectros de RMN comparando a mesma amostra fortificada e não fortificada com padrão AIA, onde as setas azuis evidenciam os sinais referentes ao padrão AIA.



Para a escolha do solvente extrator para auxinas, a soma da área dos sete sinais referentes ao AIA, obtidos dos extratos fortificados da cultivar IAPAR 59, foram usados para a construção do modelo otimizado, a equação 3 mostra os coeficientes do respectivo modelo. A equação mostra que todos os termos apresentados foram significativos e positivos, indicando que as misturas apresentam um efeito sinérgico em relação aos componentes puros.

$$\hat{y} = +5,0 \times 10^7 \text{ acn} + 1,0 \times 10^8 \text{ Me} + 9,8 \times 10^7 \text{ A} + 1,2 \times 10^8 \text{ acn: Me} + 1,2 \times 10^8 \text{ acn: A} + 7,2 \times 10^8 \text{ acn: Me: A}$$

$(\pm 9,5 \times 10^6)$ $(\pm 8,7 \times 10^6)$ $(\pm 8,7 \times 10^6)$ $(\pm 4,6 \times 10^7)$ $(\pm 4,6 \times 10^7)$ $(\pm 3,0 \times 10^8)$

[3]

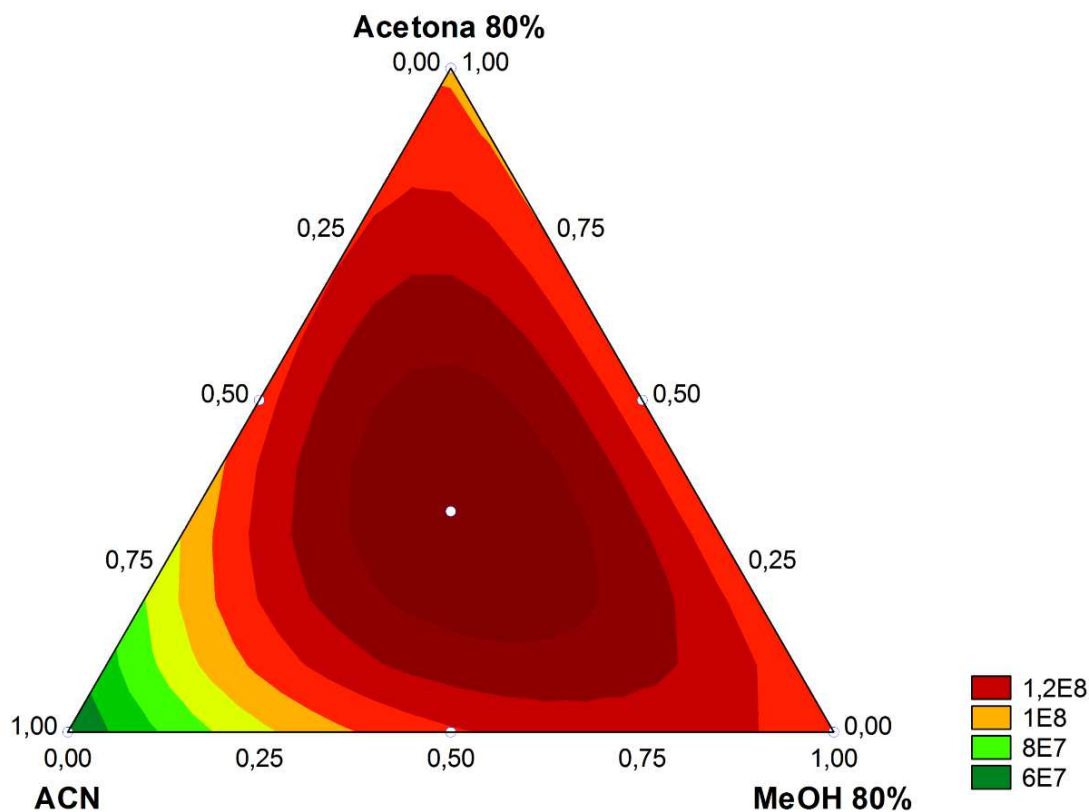
Para investigar a significância a e a falta de ajuste do modelo cúbico especial, foi aplicada a análise de variância (Tabela 4). Esta tabela mostra que a razão entre as médias quadráticas da falta de ajuste e do erro puro (MQfaj/MQep) foi menor que o F crítico no nível de 95% de confiança indicando que não há falta de ajuste no modelo utilizado.

Tabela 4 – Análise de variância para o ajuste do modelo cúbico especial da área dos sete sinais característicos do padrão AIA dos extratos fortificados de folhas da cultivar IAPAR 59. Em vermelho destaca-se os termos significativos.

	Soma quadrática	g. l.	Média quadrática	Valor de F calculado	Valor de F crítico	p
Regressão	1,21E+16	5	2,42E+15	8,79	2,90	0,0004
Resíduos	4,14E+15	15	2,76E+14			
Falta de ajuste	4,91E+14	1	4,91E+14	1,88	4,60	0,1914
Erro Puro	3,64E+15	14	2,60E+14			
Total	1,62E+16	20	8,13E+14			

Observa-se na figura 6 que os extratos obtidos com a mistura *acn:Me:A* apresentaram os maiores sinais. Esse resultado mostra a vantagem da mistura dos três solventes em relação a utilização destes de forma individual na interação com o AIA.

Figura 6. Curva de nível predita pelo modelo especial cúbico da área dos sete sinais característicos do padrão AIA dos extratos fortificados de folhas da cultivar IAPAR 59.



Na Figura 7, observa-se 5 sinais característicos de trigonelina¹⁰ encontrados nos espectros de RMN ¹H dos extratos analisados. A Tabela 5 mostra os valores de deslocamento químico destes sinais com os valores encontrados na literatura. Utilizando-se da área destes cinco sinais foram construídas curvas de nível. As equações 4 e 5 mostram os coeficientes dos modelos para a soma da área dos cinco sinais referentes a trigonelina para as cultivares IAPAR 59 e IPR 106, respectivamente.

Figura 7. Espectros de RMN ^1H de um extrato da folha de cafeeiro do cultivar IAPAR 59 onde destaca-se 5 sinais característicos da trigonelina.

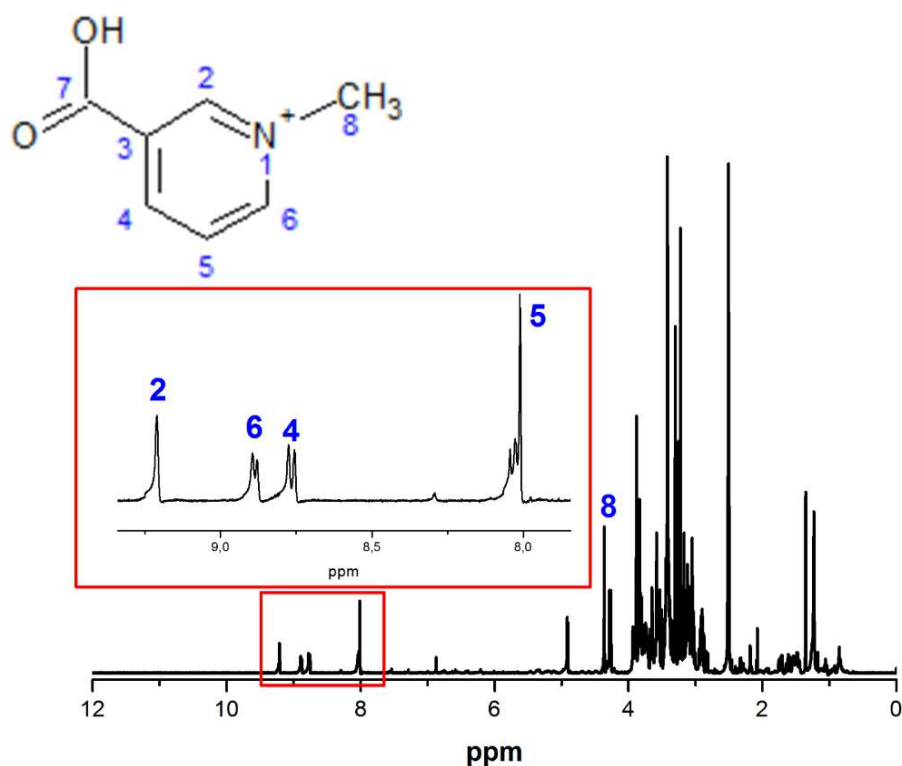


Tabela 5 – Deslocamento químico dos sinais do espectro de RMN ^1H característicos de trigonelina encontrados nas amostras da folha de cafeeiro.

Sinal	Deslocamento químico (valor experimental em ppm)	Deslocamento químico (valor encontrado na literatura em ppm ¹⁰)
2	9,15	9,07
6	8,87	8,80
4	8,78	8,78
5	8,00	8,04
8	4,35	4,40

$$\hat{y} = +1,2 \times 10^6 \text{ acn} + 3,3 \times 10^6 \text{ Me} + 4,0 \times 10^6 \text{ A} + 1,5 \times 10^7 \text{ acn} : \text{Me} + 1,0 \times 10^6 \text{ acn} : \text{A} - 6,3 \times 10^5 \text{ Me} : \text{A}$$

$(\pm 4,2 \times 10^5)$ $(\pm 4,2 \times 10^5)$ $(\pm 4,2 \times 10^5)$ $(\pm 1,9 \times 10^6)$ $(\pm 1,9 \times 10^6)$ $(\pm 1,9 \times 10^6)$

[4]

$$\hat{y} = +1,1 \times 10^6 \underset{(\pm 1,0 \times 10^6)}{acn} + 6,1 \times 10^6 \underset{(\pm 1,0 \times 10^6)}{Me} + 4,8 \times 10^6 \underset{(\pm 1,0 \times 10^6)}{A} + 1,8 \times 10^7 \underset{(\pm 4,7 \times 10^6)}{acn:Me} - 1,6 \times 10^6 \underset{(\pm 4,7 \times 10^6)}{acn:A} + 5,1 \times 10^6 \underset{(\pm 4,7 \times 10^6)}{Me:A} \quad [5]$$

As Figuras 8 e 9 mostram as curvas de nível preditas pelo modelo quadrático para as cultivares IAPAR 59 e IPR 106, respectivamente. A mistura *acn:Me* obteve os maiores valores de trigonelina para a cultivar IAPAR 59. Para a cultivar IPR 106 a mistura *acn:Me* (40%:60% v/v) apresenta os maiores valores previstos para os sinais deste metabólito.

Figura 8. Curva de nível preditas pelo modelo quadrático da soma das áreas dos sinais característicos de trigonelina dos extratos das folhas da cultivares IAPAR 59.

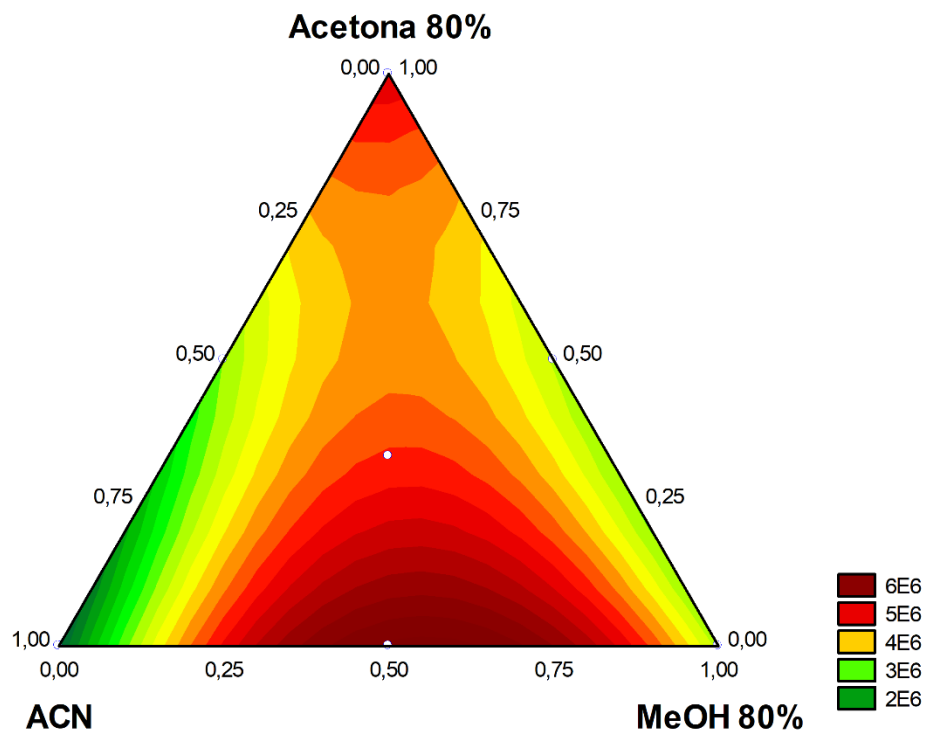
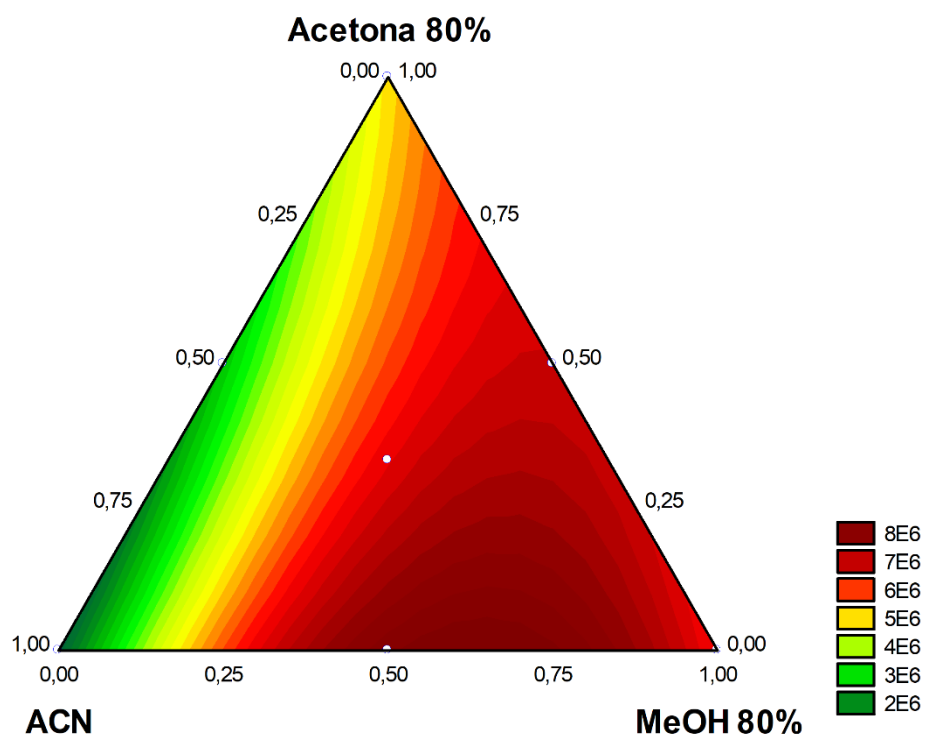


Figura 9. Curva de nível predita pelo modelo quadrático da soma das área dos sinais característicos de trigonelina dos extratos das folhas da cultivar IPR 106.



Para investigar a significância a e a falta de ajuste do modelo quadrático, foi aplicada a análise de variância, para ambas as cultivares (Tabela 6). Esta tabela mostra que a razão entre as médias quadráticas da falta de ajuste e do erro puro (MQ_{faj}/MQ_{ep}) foi menor que o F crítico no nível de 95% de confiança, para ambas as análises, indicando que não há falta de ajuste em nenhum dos modelos utilizados.

Tabela 6 – Análise de variância para o ajuste do modelo quadrático da área dos sinais característicos de trigonelina dos extratos das folhas das cultivares IAPAR 59 e IPR 106.

Cultivar	Soma quadrática	g. l.	Média quadrática	Valor de F calculado	Valor de F crítico	p
IAPAR 59						
Regressão	3,16E+12	5	3,32E+11	7,43	2,90	0,0010
Resíduos	1,27E+12	15	8,50E+10			
Falta de ajuste	1,04E+11	1	1,04E+11	1,25	4,60	0,2817
Erro Puro	1,17E+12	14	8,36E+10			
Total	4,43E+12	20	2,21E+11			
IPR 106						
Regressão	6,00E+12	5	1,20E+12	9,11	2,90	0,0003
Resíduos	1,97E+12	15	1,31E+11			
Falta de ajuste	2,13E+10	1	2,13E+10	0,15	4,60	0,7020
Erro Puro	1,95E+12	14	1,39E+11			
Total	7,98E+12	20	3,99E+11			

A partir dos dados espectrais obtidos por RMN construiu-se uma matriz de 19636 linhas e 28 colunas. Cada linha corresponde as intensidades de cada sinal para um determinado valor de deslocamento químico (ppm) e cada coluna uma amostra. Devido ao grande número de linhas, a análise dos dados foi dividida em três: campo alto (0,5 a 2,25 ppm), campo médio (2,75 a 5,25 ppm) e campo baixo (5,5 a 9,5 ppm).

3.3. ANÁLISE DE AGRUPAMENTOS HIERÁRQUICOS (AAH)

A Análise Hierárquica destes dados mostrou a presença de três grandes grupos na distância de ligação próxima a $2,75 \times 10^9$, Figura 10. O maior agrupamento é representado por todos os extratos com metanol 80% na sua fase extratora (*Me*, *acn:Me*, *Me:A* e *acn:Me:A*), em seguida temos o agrupamento com as amostras das fases extratoras *A* e *acn:A* e finalmente o terceiro grupo

com os quatro extratos da fase extratora *acn*. O gráfico indica que a presença do metanol 80% na fase extratora traz uma característica nos metabólitos do extrato que se sobressai se comparado com os outros 2 componentes.

3.4. ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (ACP)

A Figura 11 apresenta o gráfico dos escores CP1xCP2 da ACP, que explica 81,5% da variância total dos dados espectrais de RMN da região de campo alto. Observa-se que distribuição das amostras na CP2 apresenta três agrupamentos, um na região positiva (*acn*, *Me* e *acn:Me*), o segundo próximo da região do zero (*acn:Me:A*) e o terceiro na região negativa (*A*, *acn:A* e *Me:A*). Se observarmos a respectiva basicidade das fases extratoras destes grupos temos: primeiro grupo (0,250; 0,246 e 248), segundo grupo (0,271) e terceiro grupo (0,318; 0,284 e 0,282). Nota-se uma relação da CP2 com a basicidade da fase extratora. Observa-se na Figura 12, loading da CP2, sinais característicos de ácido quínico¹⁷ e dos aminoácidos valina¹⁸ e treonina¹⁹ na região negativa, enquanto que apenas um sinal característico de lipídios ficou evidente na região positiva. Estes resultados indicam uma relação da presença do solvente acetona 80% na fase extratora, que ocasiona um aumento na basicidade, com a extração de ácidos e aminoácidos.

Figura 10. Dendrograma da AH dos dados espectrais de RMN para as cultivares IAPAR 59 (não negrito) e IPR 106 (negrito), onde “a” representa as amostras autossombreadas e “b” as amostras sem autossombreamento, enquanto as cores representam as diferentes fases extratores.

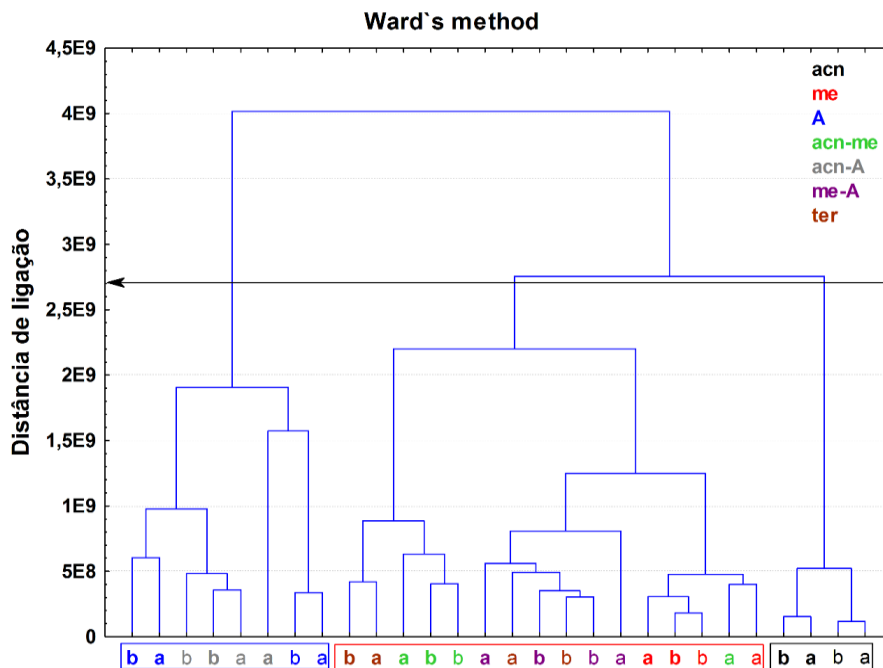


Figura 11. Gráfico de escores CP1xCP2 dos dados espectrais de RMN da região de campo alto para as cultivares IAPAR 59 (não negrito) e IPR 106 (negrito), onde “a” representa as amostras autossombreadas e “b” as amostras sem autossombreamento.

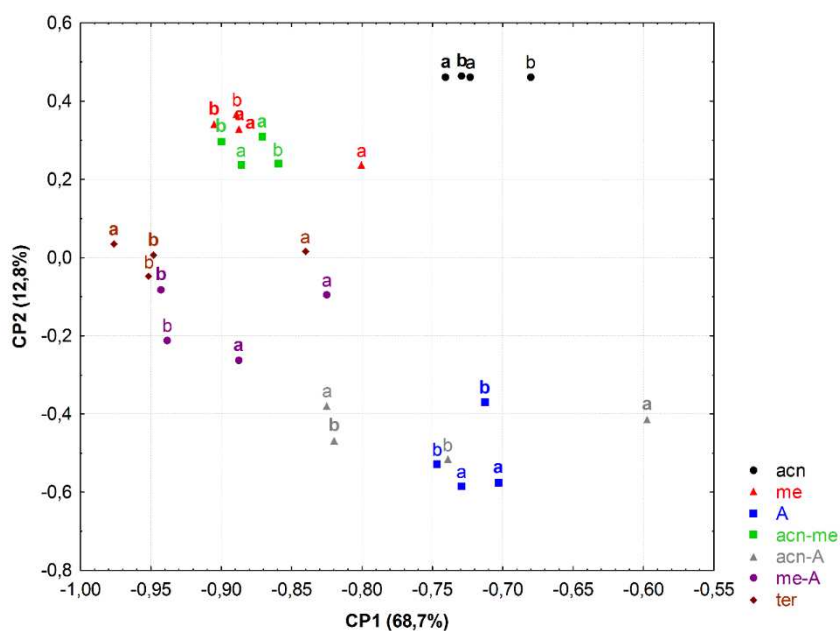
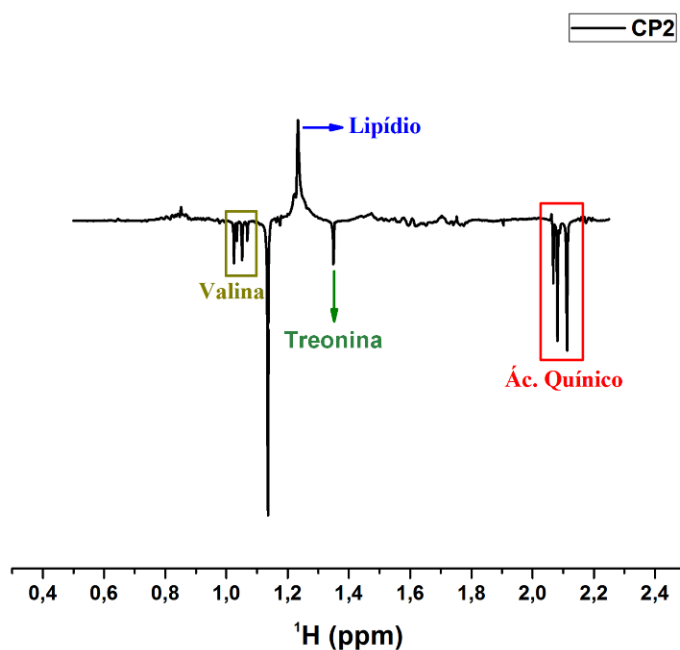


Figura 12. Loading da CP2 da ACP dos dados espectrais de RMN da região de campo alto.



A Figura 13 apresenta o gráfico de escores CP1xCP2 da ACP, que explica 83,6% da variância total dos dados espectrais de RMN da região de campo médio. Os extratos da fase extratora *acn* separaram-se do restante das amostras em ambas as CPs. O gráfico do loading da CP1 está apresentado na Figura 14, observa-se sinais característicos de trigonelina e açúcares (rafinose²⁰ e α -glucose^{21,22}), além de vários sinais na região comum de açúcares¹⁸ (2,75 - 4,00 ppm). Observa-se uma relação entre a região negativa da CP1 com metabólitos de açúcares simples (mono, di e trissacarídeo), evidenciando-se que a fase extratora *acn* apresentou a menor quantidade de açúcares, nota-se que este é o único ponto no planejamento de misturas que não apresenta água na sua composição. A grande quantidade de grupos –OH dos açúcares simples explica sua alta solubilidade em água²³ e a separação do grupo de extratos da fase extratora ACN.

Figura 13. Gráfico de escores CP1xCP2 dos dados espectrais de RMN da região de campo alto das amostras dos extratos da folha do café para as cultivares IAPAR 59 (não negrito) e IPR 106 (negrito), onde “a” representa as amostras autossombreadas e “b” as amostras sem autossombreamento.

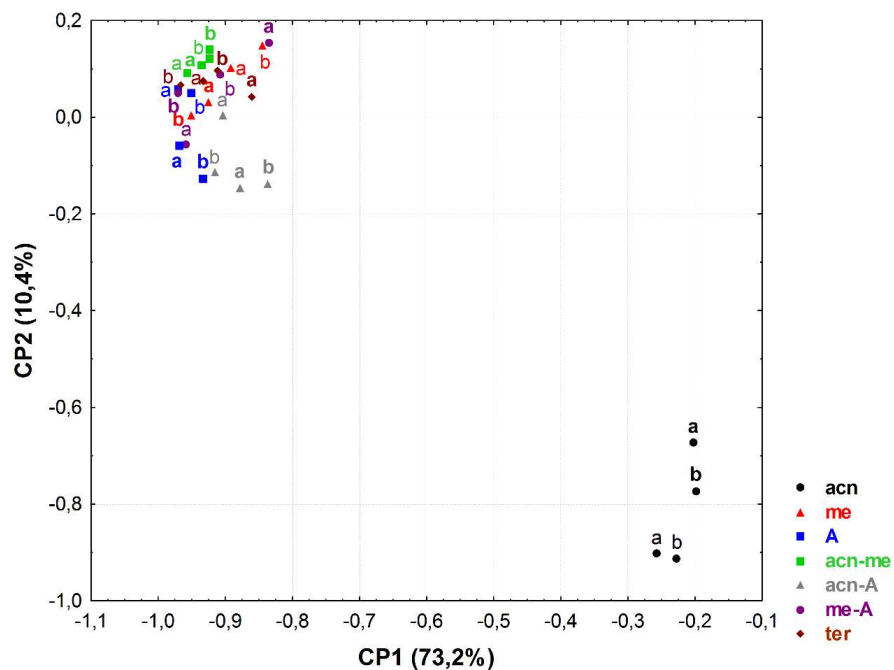
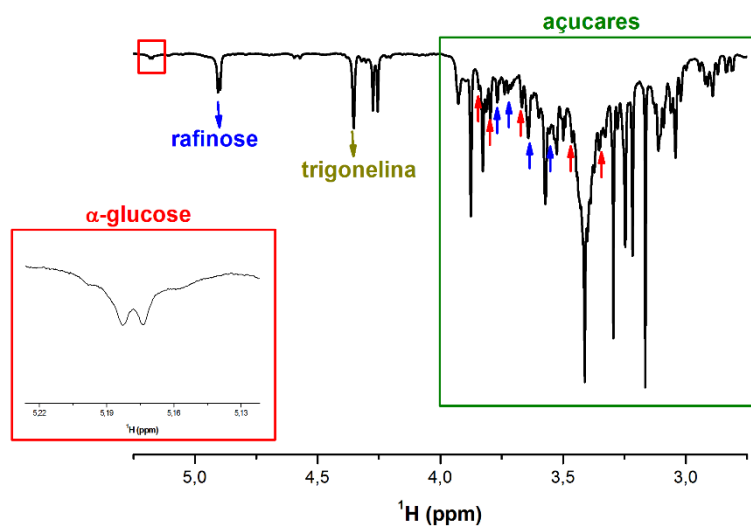
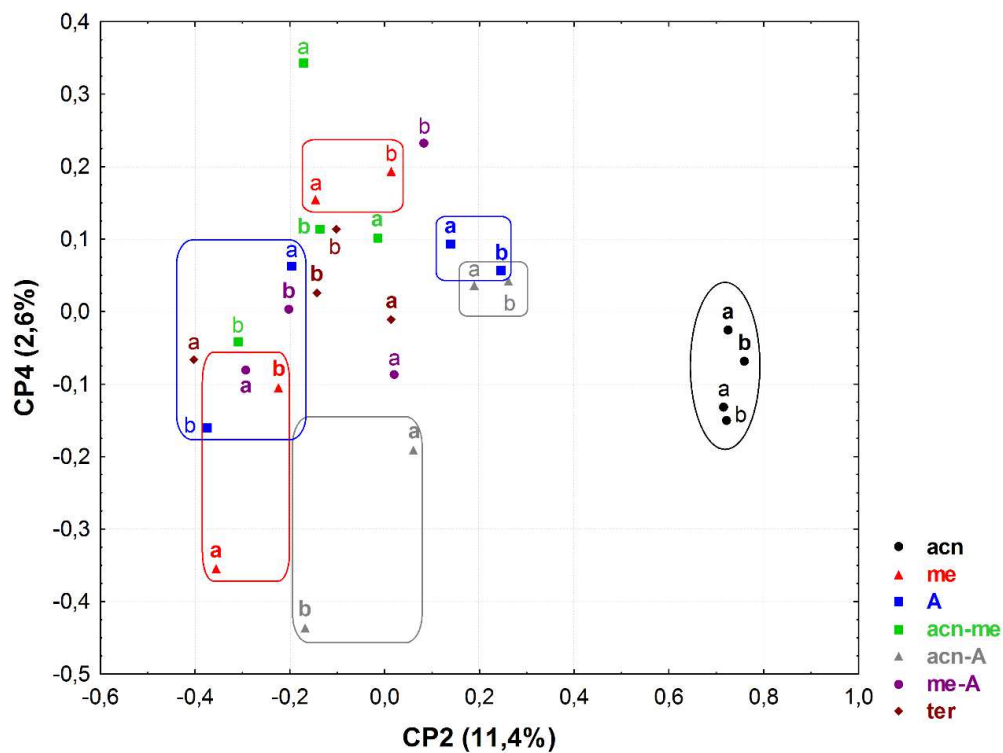


Figura 14. Loading da CP1 da ACP dos dados espectrais de RMN da região de campo médio



A Figura 15 apresenta o gráfico de escores CP2xCP4 da ACP, que explica 14,0% da variância total dos dados espectrais de RMN da região de campo baixo. O gráfico mostra a separação das amostras da fase extratora *acn* do restante das amostras na CP2 e a separação das cultivares IAPAR 59 e IPR 106 na fase extratora *A*, enquanto a CP4 separou as duas cultivares nas fases extratoras *Me* e *acn:A*. Os gráficos de loading das CP2 e CP4 estão apresentados nas Figuras 16 e 17, respectivamente.

Figura 15. Gráfico de escores CP2xCP4 dos dados espectrais de RMN da região de campo baixo para as cultivares IAPAR 59 (não negrito) e IPR 106 (negrito), onde “a” representa as amostras autossombreadas e “b” as amostras sem autossombreamento.



A Figura 16 mostra sinais característicos de guanosina^{22,24} na região positiva e trigonelina¹⁰ na região negativa da CP2, indicando que os extratos da fase *acn* apresentaram uma maior quantidade de guanosina e uma menor quantidade de trigonelina entre todas as fases extratoras.

A região negativa do loading da CP4, Figura 17, apresenta vários sinais na região característica de ácidos clorogênicos²⁵. A análise do gráfico de escores em conjunto com o loading para esta CP evidencia uma maior concentração de metabólitos de ácidos clorogênicos nas amostras do cultivar IPR 106.

Figura 16. Loading da CP2 da ACP dos dados espectrais de RMN da região de campo baixo.

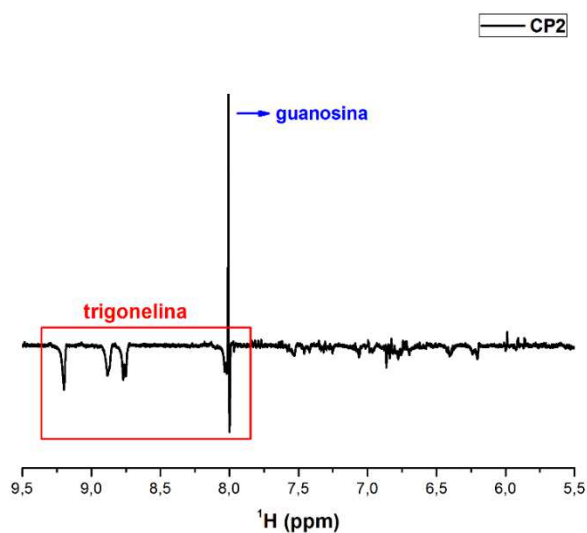
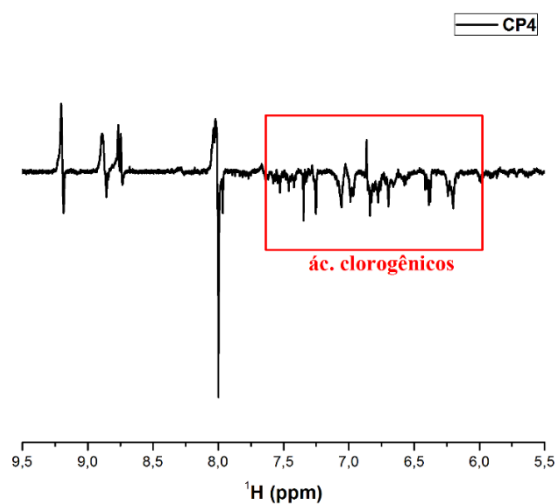


Figura 17. Loading da CP4 da ACP dos dados espectrais de RMN da região de campo baixo.



4. CONCLUSÃO

O planejamento de mistura foi importante para indicar a distribuição relativa dos pigmentos, ácidos de baixo peso molecular e trigonelina em ambas as cultivares, além do rendimento em massa e da distribuição do padrão AIA nas amostras fortificadas. O melhor solvente extrator para o AIA nas amostras fortificadas foi a mistura *acn:Me:A* (1:1:1 v/v/v). Além disso, a espectroscopia de RMN ¹H foi uma boa técnica para a identificação da auxina devido aos sinais bem característicos e da não existência de sinais interferentes próximos, apesar da desvantagem de ter baixa sensibilidade, quando comparada com outras técnicas, justificando a ausência dos sinais do AIA nas amostras não fortificadas.

A AH e ACP para o estudo dos dados de RMN permitiu a caracterização de perfis químicos dos extratos preparados nos diferentes solventes extratores bem como, a discriminação das cultivares analisadas.

A acetonitrila pura foi o pior solvente extrator, para a maioria dos metabólitos encontrados nos extratos, como açúcares, ácidos, pigmentos e trigonelina. Por outro lado, ele apresenta uma vantagem na análise de auxina, pois diminuiu a ação dos metabólitos interferentes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Spiess, G. M.; Hausman, A.; Yu, P.; Cohen, J. D.; Rampey, R. A.; Zolman, B. K. Auxin Input Pathway Disruptions Are Mitigated by Changes in Auxin Biosynthetic Gene Expression in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **2014**, *165*, 1092–1104.
- (2) Mashiguchi, K.; Keita, T.; Sakaic, T.; Sugawaraa, S.; Kawaideb, H.; Natsumeb, M.;

- Hanadaa, A.; Yaenoa, T.; Shirasua, K.; Yaod, H.; et al. The Main Auxin Biosynthesis Pathway in Arabidopsis. *PNAS* **2011**, *108*, 18512–18517.
- (3) Went, F. W. AUXIN, THE PLANT GROWTH-HORMONE. *Bot. Rev.* **1935**, *1* (48), 162–182.
 - (4) Larsson, E.; Franks, R. G.; Sundberg, E. Auxin and the Arabidopsis Thaliana Gynoecium. *J. Exp. Bot.* **2013**, *64*, 2619–2627.
 - (5) Gray, W. M.; Kepinski, S.; Rouse, D.; Leyser, O.; Estelle, M. Auxin Regulates SCFTTIR1-Dependent Degradation of AUX/IAA Proteins. *Nature* **2001**, *414*, 271–276.
 - (6) Izumi, Y.; Okazawa, A.; Bamba, T.; Kobayashi, A.; Fukusaki, E. Development of a Method for Comprehensive and Quantitative Analysis of Plant Hormones by Highly Sensitive Nanoflow Liquid Chromatography – Electrospray Ionization-Ion Trap Mass Spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **2009**, *648*, 215–225.
 - (7) Barkawi, L. S.; Tam, Y.; Tillman, J. A.; Pederson, B.; Calio, J.; Al-amier, H.; Emerick, M.; Normanly, J.; Cohen, J. D. A High-Throughput Method for the Quantitative Analysis of Indole-3-Acetic Acid and Other Auxins from Plant Tissue Q. *Anal. Biochem.* **2008**, *372*, 177–188.
 - (8) Pauli, G. F. QNMR — A Versatile Concept for the Validation of Natural Product Reference Compounds. *Phytochem. Anal.* **2001**, *42* (July 2000), 28–42.
 - (9) Verpoorte, R.; Choi, Y. H.; Kim, H. K. NMR-Based Metabolomics at Work in Phytochemistry. *Phytochem Rev* **2007**, *6* (February), 3–14.
 - (10) Wei, F.; Furihata, K.; Hu, F.; Miyakawa, T. Complex Mixture Analysis of Organic Compounds in Green Coffee Bean Extract by Two-Dimensional NMR Spectroscopy
Complex Mixture Analysis of Organic Compounds in Green Coffee Bean Extract by

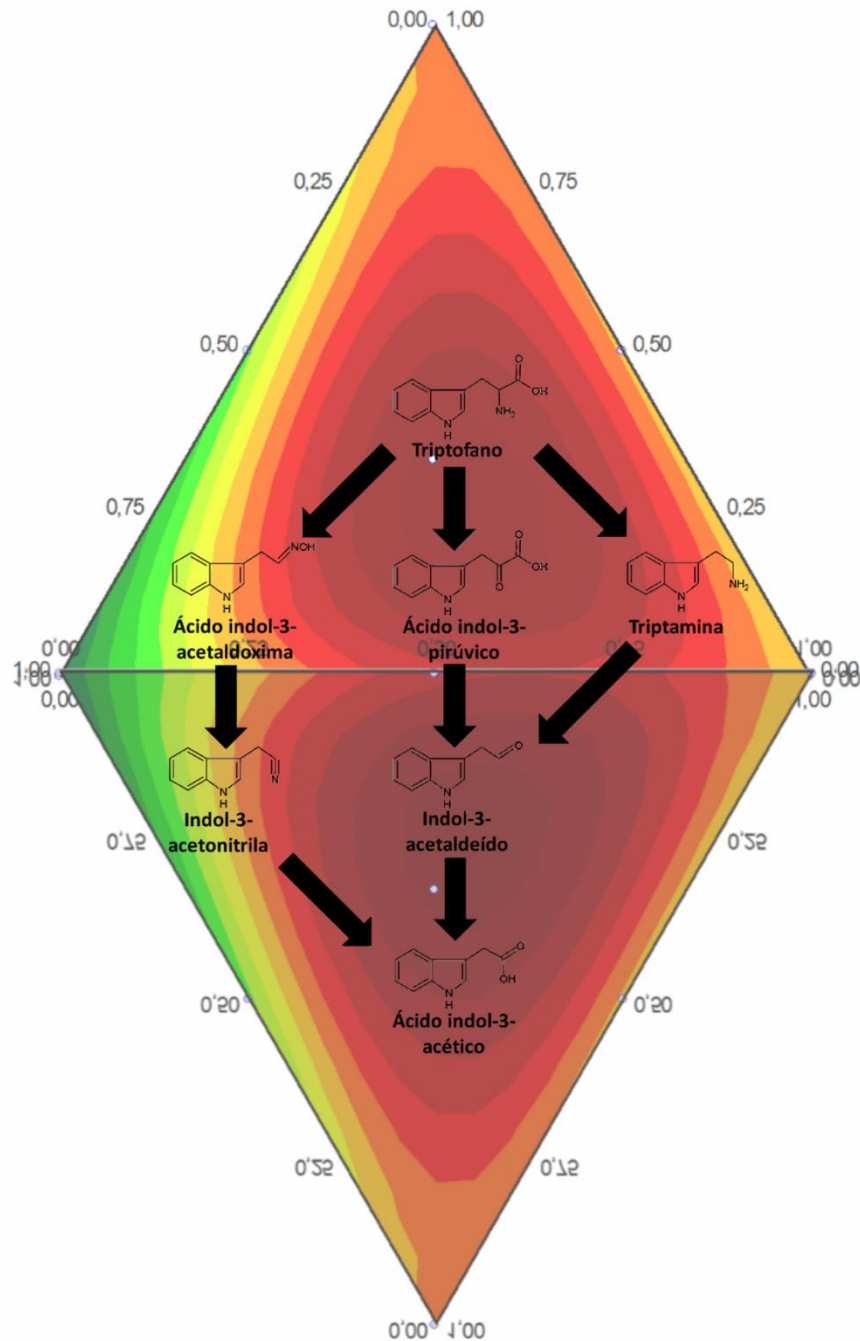
Two-Dimensional NMR Spectroscopy. **2010**, No. October 2016.

- (11) Neto, B. de B.; Scarminio, I. S.; Bruns, R. E. 25 Anos de Quimiometria No Brasil. *Quim. Nov.* **2006**, *29* (6), 1401–1406.
- (12) Snyder, L. R.; Carr, P. W. Review Solvatochromically Based Solvent-Selectivity Triangle. **1993**, *656*, 537–547.
- (13) Kamlet, M. J.; Taft, R. W. The Solvatochromic Comparison Method. I. The β -Scale of Solvent Hydrogen-Bond Acceptor (HBA) Basicities. *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *98*, 377–383.
- (14) Taft, R. W.; Kamlet, M. J. The Solvatochromic Comparison Method . 2 . The α -Scale of Solvent Hydrogen-Bond Donor (HBD) Acidities. *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 2886–2894.
- (15) Kamlet, M. J.; Abboud, J. L.; Taft, R. W. The Solvatochromic Comparison Method . 6 . The Π^* Scale of Solvent Polarities. *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *99*, 6027–6038.
- (16) Bozst, B. A.; Fluck, R. A.; Jameton, R. A.; Leber, P. A.; Varnes, J. G. A VERSATILE AND EFFICIENT METHOD OLOGY FOR THE PREPARATION OF CHOLINE ESTER AUXIN CONJUGATES. **1995**, *40* (4), 4–8.
- (17) Tavares, L. A.; Ferreira, A. G. Artigo. *Quim. Nov.* **2006**, *29* (5), 911–915.
- (18) Kim, H. K.; Choi, Y. H.; Verpoorte, R. NMR-Based Metabolomic Analysis of Plants. *Nat. Protoc.* **2010**.
- (19) Gall, G. Le; Colquhoun, I. J.; Defernez, M. Metabolite Profiling Using ^1H NMR Spectroscopy for Quality Assessment of Green Tea , *Camellia Sinensis* (L .). *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 692–700.
- (20) Li, A.; Li, Z.; Jia, J.; Qin, X. Chemical Comparison of Coat and Kernel of Mung Bean by Nuclear Magnetic Resonance-Based Metabolic Fingerprinting Approach.

Spectrosc. Lett. **2016**, *49* (March), 217–224.

- (21) Pacifico, S.; D'Abrosca, B.; Scognamiglio, M.; Gallicchio, M.; Potenza, N.; Piccolella, S.; Russo, A.; Fiorentino, A.; Fitochimica, L.; Universit, S. Metabolic Profiling of Strawberry Grape (*Vitis Â Labruscana* Cv . ' Isabella ') Components by Nuclear Magnetic Resonance (NMR) and Evaluation of Their Antioxidant and Antiproliferative Properties. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, 7679–7687.
- (22) Uawisetwathana, U.; Graham, S. F.; Kamolsukyonyong, W. Quantitative ¹ H NMR Metabolome Profiling of Thai Jasmine Rice (*Oryza Sativa*) Reveals Primary Metabolic Response during Brown Planthopper Infestation. *Metabolomics* **2015**, *11* (6), 1640–1655.
- (23) Raymond, K. W. *General Organic and Biological Chemistry*, 3rd ed.; John Wiley & Sons, 2009.
- (24) Locci, E.; Piras, C.; Mereu, S.; Marincola, F. C.; Scano, P.; Chimiche, S.; Universitaria, C.; Sestu, S. S. À. B. H NMR Metabolite Fingerprint and Pattern Recognition of Mullet (*Mugil Cephalus*) Bottarga. *J Agric Food Chem* **2011**, *59*, 9497–9505.
- (25) Bosco, M.; Toffanin, R.; Palo, D. De; Zatti, L.; Segre, A. High-Resolution ¹ H NMR Investigation of Coffee. *J Sci Food Agric* **1999**, *878* (November 1997), 869–878.

CAPÍTULO III



ANÁLISE EXPLORATÓRIA DA BIOSÍNTESE DA AUXINA

1. INTRODUÇÃO

As auxinas são consideradas os fitohormônios de maior importância pois regulam a divisão, expansão e diferenciação celular, além da floração^{1,2}, e foi o primeiro fitohormônio identificado³. O ácido 3-indol acético (AIA) é a auxina mais abundante encontrada nas plantas e também a mais importante, em vários processos de crescimento e desenvolvimento da planta^{4,5}.

Estudos mostram o aumento da concentração do fitohormônios diante de condições estressantes: estresse hídrico^{6,7}, acúmulo de metais pesados^{8,9}, salino¹⁰ e nutricional¹¹. A concentração de auxina deve ser rigidamente controlada, porque altas concentrações de AIA podem ocasionar um efeito de inibição no crescimento da planta. Esse controle é feito pela degradação, biossíntese, formação de conjugados e transporte do AIA na planta. Dependendo da espécie e da parte da planta a quantidade de AIA na sua forma não conjugada pode ser de apenas 25% do total de auxina na planta¹².

Existem três grandes grupos de conjugados do AIA: dois grupos de baixo peso molecular (os ésteres com grupos de açúcar e as amidas com aminoácidos) e o grupo de alto peso molecular formado por peptídeos e proteínas¹³. Cada planta pode apresentar composições diferentes de vários tipos de conjugados. Entre os ésteres pode-se encontrar: AIA-glucose¹⁴, AIA-myo-inositol¹⁵. As amidas reportadas são: AIA-Asp-N-Glc¹⁶, AIA-Glu-N-Glc¹⁶, AIA-N-glucose¹⁶, AIA-Asp¹⁷, AIA-Glu¹⁸, AIA-Ala¹⁹, AIA-Val¹⁶, AIA-Phe¹⁶, onde Asp (ácido aspártico), Glc (glicose), Glu (glutamato), Ala (alanina), Val (valina) e Phe (fenilalanina). Os conjugados de alto peso molecular apresentam o AIA

ligado a proteínas que ainda não foram identificadas, ou ainda, proteínas que já foram identificadas, mas a sua natureza ainda está sendo investigada.

O AIA conjugado é considerado uma auxina inativa e serve como uma fonte de auxina livre e o tipo de conjugado pode indicar para que este fitohormônio será utilizado, por exemplo, a síntese de conjugados com glucose geralmente ocorre quando a planta é exposta a um excesso de auxina¹³.

A biossíntese das auxinas nas plantas pode ser dividida em dois tipos: a triptofano-dependente e a triptofano-independente. Apesar da identificação das várias vias para a biossíntese do AIA em diferentes plantas, a análise do controle e da importância de cada via ainda é bastante limitada.

Um dos primeiros precursores do AIA identificado foi o triptofano e com sua descoberta a biossíntese do AIA foi proposta a partir da desaminação e descarboxilação do triptofano²⁰. Como consequência, várias outras vias triptofano-dependente foram sugeridas. Foi realizado um estudo com plantas mutantes incapazes de produzir triptofano para determinar se era possível sintetizar o AIA sem este precursor²¹. Os resultados mostraram que era possível, indicando a existência de uma outra via a do triptofano-independente. Algumas plantas mostram que é possível sintetizar o AIA pelos dois tipos de vias²², e que é bem provável que na maioria das plantas a síntese ocorra por várias vias metabólicas²³.

Apesar dos vários trabalhos encontrados na literatura sobre análise de fitohormônios, ainda são poucos aqueles que investigam a biossíntese das auxinas, assim como seus precursores e conjugados em folhas de *Coffea arábica L.*

O objetivo do presente estudo foi identificar o melhor solvente extrator para explorar a biossíntese do AIA em folhas de (*Coffea arabica* L.) em relação a abundância relativa pelos espectros de massa utilizando planejamento experimental simplex-centroide e superfície de resposta.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. COLETA DE AMOSTRAS

A coleta das folhas de *Coffea arabica* foi realizada no dia três de outubro de 2014, em triplicata, nos cultivares Iapar 59 e IPR 106 e imediatamente condicionada em nitrogênio líquido, e depois armazenada em ultrafreezer a -80°C. A coleta foi realizada na sede do Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR) em Londrina (23°18'S, 51°17'O), Paraná, Brasil.

2.2. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

Para a obtenção dos extratos foi utilizado um planejamento experimental simplex-centroide, Figura 1, o qual apresenta sete pontos representando as fases extratoras. A Tabela 1 mostra a variação da fração em volume de cada um dos 3 componentes nestes sete pontos, onde *acn* = acetonitrila, *Me* = metanol 80% (MeOH:H₂O v/v) e *A* = acetona 80% (C₃H₆O:H₂O v/v). A escolha dos solventes: acetonitrila, metanol 80% e acetona 80% baseou-se na busca na literatura de solventes que mostraram-se eficaz na extração de auxinas

(AIA)²⁴⁻²⁸ bem como diferentes valores nos três parâmetros solvatocrômicos, como mostra a Tabela 2, trazendo assim uma maior amplitude de interações ao planejamento.

De acordo com o modelo do planejamento, devem ser feitos experimentos com misturas de 7 composições diferentes: 3 experimentos com componentes puros, 3 experimentos de misturas binárias destes componentes e um ponto central, todos realizados em duplicata. As replicatas são necessárias para poder avaliar o erro experimental.

Figura 1. Planejamento de misturas simplex-centroide com 3 componentes.

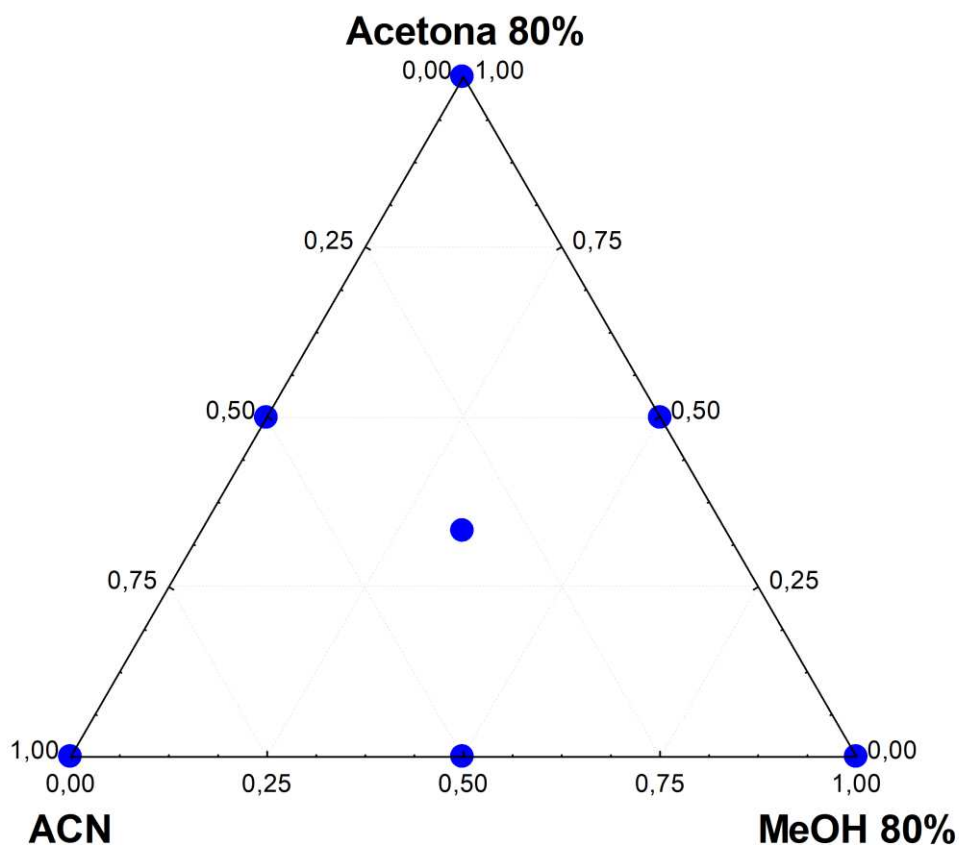


Tabela 1 – Fases extratoras do planejamento simplex-centroide com 3 componentes: acetonitrila (*acn*), metanol 80% (*Me*) e acetona 80% (*A*) e suas proporções (v/v/v).

Extrato	Solventes		
	Acetonitrila (<i>acn</i>)	Metanol (<i>Me</i>)	Acetona 80% (<i>A</i>)
<i>acn</i>	1,00	0	0
<i>Me</i>	0	1,00	0
<i>A</i>	0	0	1,00
<i>acn:Me</i>	0,50	0,50	0
<i>acn:A</i>	0,50	0	0,50
<i>Me:A</i>	0	0,50	0,50
<i>acn:Me:A</i>	0,33	0,33	0,33

Tabela 2 – Polaridade e parâmetros solvatocrômicos das três componentes utilizadas no planejamento de misturas: acetonitrila, metanol 80% e acetona 80%.

Fase extratora	Polaridade	Acidicidade α	Basicidade β	Dipolaridade π
<i>acn</i>	5,800	0,150	0,250	0,600
<i>Me</i>	6,180	0,440	0,246	0,314
<i>A</i>	6,180	0,144	0,318	0,538
<i>acn:Me</i>	5,990	0,295	0,248	0,457
<i>acn:A</i>	5,990	0,147	0,284	0,569
<i>Me:A</i>	6,180	0,292	0,282	0,426
<i>acn:Me:A</i>	6,053	0,245	0,271	0,484

2.3. PREPARO DO EXTRATO

Para o IAPAR 59 e IPR 106, pesou-se 215 mg de folha para cada extrator do planejamento experimental, Tabela 1, em balança Shimadzu AY220 e adicionou-se 20 mL da sua respectiva fase extratora, em frasco de 25 mL com tampa. A mistura foi submetida a banho de ultrassom Ultracleaner 1400 Unique por 20 minutos. A temperatura foi mantida a próxima de 0°C com gelo. A necessidade deste procedimento deve-se ao fato da

temperatura do banho aumentar durante o processo de ultrassonicação. Com isso, evita-se a perda do solvente por evaporação e a oxidação de compostos. Em seguida as amostras foram filtradas e o filtrado foi armazenado em freezer Electrolux Super FE26, a -20 °C. Os extratos foram liofilizados até peso constante e ressolubilizados em 2 mL de acetonitrila.

2.4. ANÁLISE EM ESPECTROFOTÔMETRO DE MASSA

A solução do extrato diluída foi injetada diretamente na fonte do espectrômetro de massa Bruker, equipado com analisador quadrupólo e ionização por electrospray (IES). A análise foi operada no modo positivo e negativo. Os dados foram adquiridos no modo de varredura usando uma gama de m/z de 80 a 1000 Da. As condições da fonte de ionização foram: voltagem capilar de 3 kV, 150 °C de temperatura da fonte, 80 L h⁻¹ de fluxo de gás do cone, 800 L h⁻¹ de fluxo de gás de dessolvatação e 350 °C de temperatura de dessolvatação. O gás de nitrogênio utilizado na nebulização apresentava 99% de pureza.

2.5. PROCESSAMENTO DOS DADOS

O processamento dos espectros de massa foram realizados com a utilização do programa da Bruker Data Analysis. Para a obtenção das curvas de nível foi utilizado o programa Statistica 7.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 3 apresenta sinais de massa/carga encontrados nos espectros de massa dos extratos e a identificação desses metabólitos, todos relacionados a biossíntese da auxina e a comparação com a literatura. Analisando a Figura 2 e os sinais obtidos na Tabela 3 podemos observar a via triptofano:triptamina:indol-3-acetoaldeído:AIA, sendo que apenas o sinal do AIA não foi detectado. Além disso, pode-se observar o sinal do indol-3-acetonitrila o que pode indicar a presença de outras vias, considerando a sua baixa intensidade em relação aos outros sinais (cerca de 20 vezes menor) e a não presença de outros sinais desta via, como o ácido indol-3-acetaldoxima, podemos inferir que esta não é a rota principal para a biossíntese do AIA.

Tabela 3 – Caracterização dos sinais de metabólitos presentes obtidos por espectroscopia de massa.

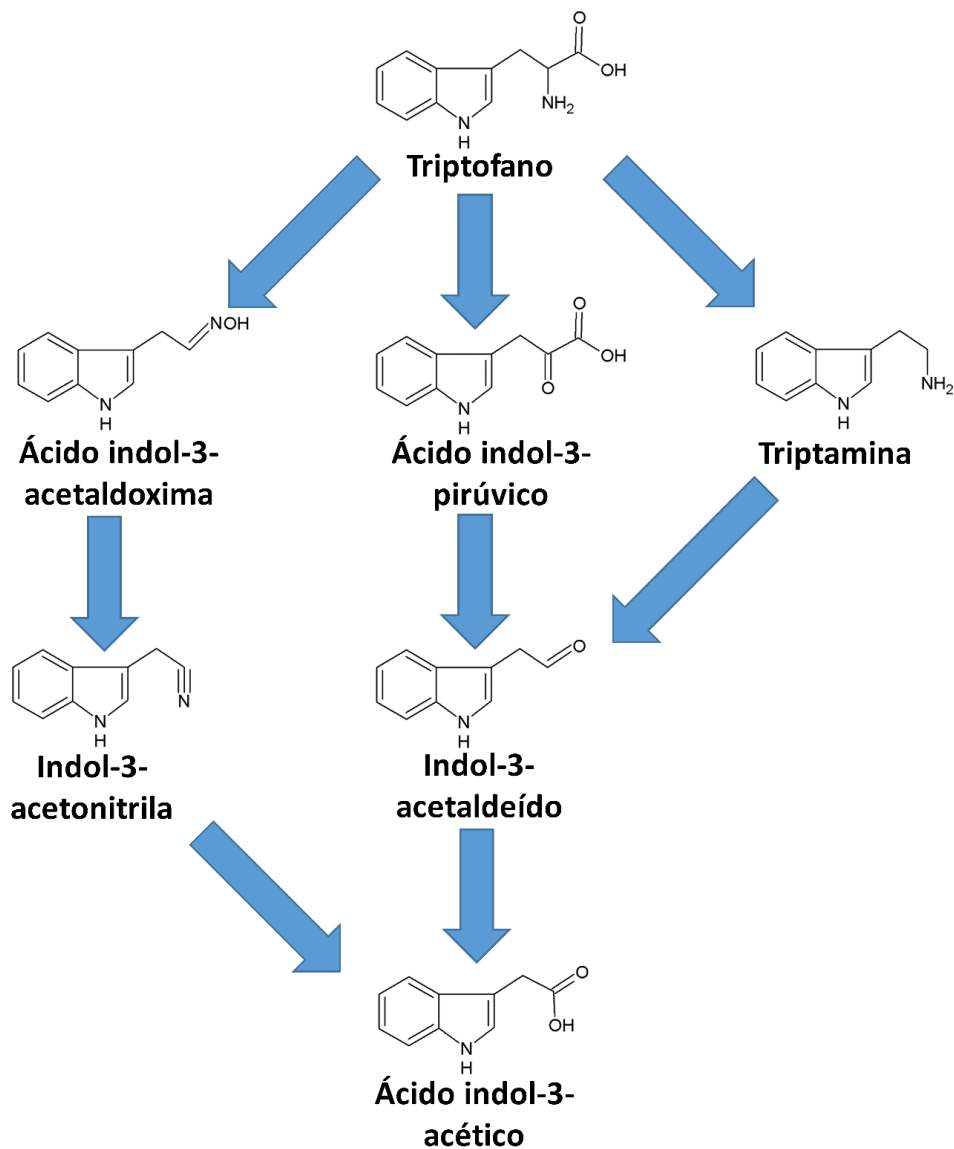
Metabólito	Sinal obtido (m/z)	Sinal encontrado na literatura (m/z)*	Modo
Triptofano	203,0600	203,0800	Negativo
	116,0390	116,0507	Negativo
	142,0514	142,0652	Negativo
	205,0700	205,1000	Positivo
Triptamina	144,1014	144,1000	Positivo
Indol-3-Acetoaldeído	158,0470	158,0606	Negativo
	160,0400	160,0762	Positivo
Indol-3-Acetonitrila	155,1076	155,1000	Negativo
	157,1024	157,1000	Positivo

*Valores retirados do site <http://www.massbank.jp/>

Para analisar o efeito do solvente extrator na extração dos principais precursores do AIA, foram utilizadas as intensidades de cada amostra no respectivo sinal de

cada metabólito e investigados por modelos de misturas. A escolha do modelo da curva de nível baseou-se na busca do modelo mais simples que fosse significativo e não apresentasse falta de ajuste. O mesmo conceito foi utilizado para a busca dos modelos de todos os gráficos de curva de nível apresentados neste estudo.

Figura 2. Ciclo da biossíntese da auxina AIA.



As Tabelas 4 e 5 mostram as equações polinomiais dos respectivos modelos para cada metabólito para as cultivares Iapar 59 e IPR 106, respectivamente. A resposta prevista pelo modelo é representada por \hat{y} e as variáveis independentes são identificadas por *acn* = acetonitrila, *Me* = metanol 80% e *A* = acetona 80%. Entre parêntese está o modelo utilizado para cada metabólito. Os termos significativos estão destacados em vermelho.

Tabela 4 – Equações dos modelos utilizados para cada metabólito para a cultivar Iapar 59.

Metabólito	Equação ajustada dos modelos utilizados
Triptofano	$\hat{y} = + 555_{(\pm 306)} acn + 715_{(\pm 335)} Me + 702_{(\pm 306)} A + 4073_{(\pm 1539)} acn : Me - 753_{(\pm 1539)} Me : A$
Tryptamina	$\hat{y} = + 2062_{(\pm 1076)} acn + 5325_{(\pm 982)} Me + 2108_{(\pm 982)} A - 7455_{(\pm 5200)} acn : Me + 3415_{(\pm 5200)} acn : A - 17250_{(\pm 34689)} acn : Me : A$
Indole-3-Acetaldehyde	$\hat{y} = + 264_{(\pm 163)} acn + 1035_{(\pm 149)} Me + 1066_{(\pm 149)} A + 1940_{(\pm 788)} acn : Me - 516_{(\pm 788)} acn : A + 7396_{(\pm 5261)} acn : Me : A$
Indole-3-Acetonitrile	$\hat{y} = + 150_{(\pm 7,7)} acn + 88_{(\pm 7,1)} Me + 167_{(\pm 7,1)} A + 224_{(\pm 37,5)} acn : Me + 342_{(\pm 37,5)} acn : A - 1536_{(\pm 250,6)} acn : Me : A$

Tabela 5 – Equações dos modelos utilizados para cada metabólito para a cultivar IPR 106.

Metabólito	Equação ajustada dos modelos utilizados
Tryptophan	$\hat{y} = + 569_{(\pm 293)} acn + 955_{(\pm 320)} Me + 664_{(\pm 293)} A + 3513_{(\pm 1474)} acn : Me - 799_{(\pm 1474)} Me : A$
Tryptamina	$\hat{y} = + 1629_{(\pm 493)} acn + 4996_{(\pm 450)} Me + 1750_{(\pm 450)} A - 4728_{(\pm 2385)} acn : Me + 3112_{(\pm 2385)} acn : A - 19753_{(\pm 15907)} acn : Me : A$
Indole-3-Acetaldehyde	$\hat{y} = + 299_{(\pm 76)} acn + 957_{(\pm 84)} Me + 1085_{(\pm 76)} A + 2515_{(\pm 406)} acn : Me - 637_{(\pm 406)} Me : A + 14616_{(\pm 2714)} acn : Me : A$
Indole-3-Acetonitrile	$\hat{y} = + 176_{(\pm 8,5)} A + 100_{(\pm 7,7)} Me + 171_{(\pm 7,7)} A + 398_{(\pm 41,0)} acn : Me + 317_{(\pm 41,0)} acn : A - 2120_{(\pm 273,8)} acn : Me : A$

As Figuras 3 e 4 apresentam as curvas de níveis preditas pelos modelos escolhidos para cada um dos metabólitos apresentados na Tabela 3, para ambas as cultivares. Observa-se que os resultados obtidos são similares para as duas cultivares.

No modelo do metabólito triptofano nota-se a maior intensidade na mistura *acn-me*, onde temos a característica de maior dipolaridade de *acn* e de maior acidez de *me*. Essa combinação de mistura pode ser explicada devido a característica mais polar deste metabólito assim como sua basicidade devido aos agrupamentos amina.

Os resultados previstos no modelo da triptamina indicam a maior intensidade com o solvente *Me*, o qual apresenta o maior valor de acidez, este metabólito se diferencia do triptofano devido a perda do grupo carboxila, assim sendo, ele perdeu acidez se tornando mais básico o que explica os resultados obtidos.

O modelo que apresentou a maior diferença entre as duas cultivares foi o do índole-3-acetonitrila. Para a cultivar Iapar 59 observa-se maior intensidade apenas na mistura *acn:A*, enquanto que para a cultivar IPR 106 ocorreu ponto de sela com as misturas *acn:Me* também apresenta um resultado semelhante ao desta mistura. Esta discrepância nos resultados dificulta a análise, mas ambas as misturas contêm o solvente *acn*, com maior dipolaridade entre os três. A presença do grupo nitrila neste metabólito é um indício de que as misturas com *acn* poderiam aumentar a extração desse metabólito.

Analisando a curva de nível do índole-3-acetaldeído, observa-se uma grande área de alta intensidade e apenas uma pequena área de baixa concentração, a posição relacionada com o solvente *acn*. Examinando-se a estrutura química deste composto observa-se uma menor polaridade em relação aos outros metabólitos aqui estudados, o que está de acordo com este resultado, sabendo-se que este solvente apresenta a maior dipolaridade dentro do planejamento.

Figura 3. Curvas de nível obtidas pelos sinais de metabólitos envolvidos no ciclo da biossíntese da auxina AIA, obtidos das amostras da cultivar Iapar 59.

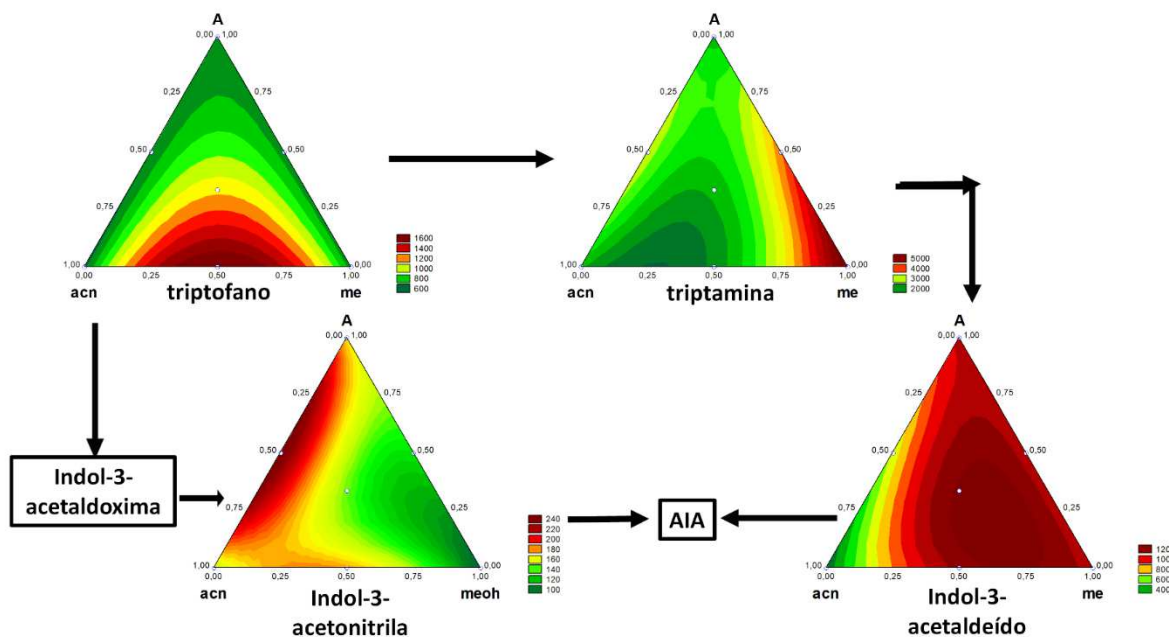
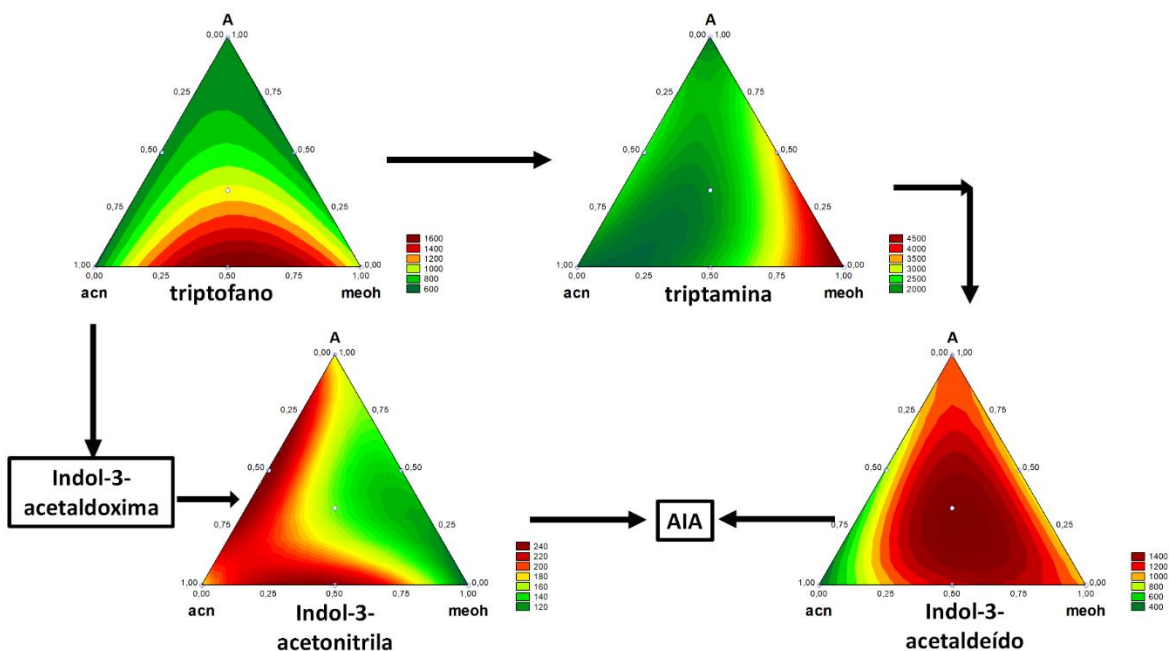


Figura 4. Curvas de nível obtidas pelos sinais de metabólitos envolvidos no ciclo da biossíntese da auxina AIA, obtidos das amostras da cultivar IPR 106.



Para investigar a significância e a falta de ajuste dos modelos quadrático e cúbico especial, foi aplicada a análise de variância, para ambas as cultivares (Tabelas 6 e

7). Estas tabelas mostraram que a razão entre as médias quadráticas da falta de ajuste e do erro puro (MQfaj/MQep) foi menor que o F crítico no nível de 95% de confiança, para todas as análises, indicando que não há falta de ajuste em nenhum dos modelos utilizados. A análise dos metabólitos triptofano e triptamina na cultivar Iapar 59 e triptofano na cultivar IPR 106 indicaram que a razão entre as médias quadráticas da regressão e do resíduo foi menor que o F crítico no nível de 95% de confiança, mostrando que estes modelos não são significativos.

Tabela 6 – Análise de variância para o ajuste dos modelos quadrático e cúbico especial da cultivar Iapar 59.

Metabólito	Soma quadrática	g. l.	Média quadrática	Valor de F calculado	Valor de F crítico	p
Triptofano						
Regressão	1,86E+6	3	6,20E+5	2,96	3,71	0,0838
Resíduos	2,09E+6	10	2,09E+5			
Falta de ajuste	2,71E+5	3	9,04E+4	0,34	4,35	0,7922
Erro Puro	1,82E+6	7	2,60E+5			
Total	3,95E+6	13	3,04E+5			
Triptamina						
Regressão	1,93E+7	5	3,87E+6	1,67	3,69	0,2465
Resíduos	1,85E+7	8	2,31E+6			
Falta de ajuste	6,21E+5	1	6,21E+5	0,24	5,59	0,6373
Erro Puro	1,79E+7	7	2,56E+6			
Total	3,79E+7	13	2,91E+6			
Indol-3-Acetoaldeído						
Regressão	1,50E+6	4	3,75E+5	7,52	3,63	0,0060
Resíduos	4,49E+5	9	4,99E+4			
Falta de ajuste	2,29E+4	2	1,14E+4	0,18	4,74	0,8325
Erro Puro	4,26E+5	7	6,09E+4			
Total	1,95E+6	13	1,50E+5			
Indol-3-Acetonitrila						
Regressão	2,78E+4	5	5569,28	46,00	3,69	1,1E-5
Resíduos	968,50	8	121,06			
Falta de ajuste	3,00	1	3,00	0,02	5,59	0,8869
Erro Puro	965,50	7	137,92			
Total	2,88E+4	13	2216,53			

Tabela 7 – Análise de variância para o ajuste dos modelos quadrático e cúbico especial da cultivar IPR 106.

Metabólito	Soma quadrática	g. l.	Média quadrática	Valor de F calculado	Valor de F crítico	p
Triptofano						
Regressão	1,78E+6	4	4,45E+5	2,14	3,63	0,1572
Resíduos	1,87E+6	9	2,07E+5			
Falta de ajuste	2,23E+5	1	2,23E+5	0,47	5,59	0,6403
Erro Puro	1,64E+6	7	2,35E+5			
Total	3,35E+6	13	2,80E+5			
Triptamina						
Regressão	1,75E+7	5	3,50E+6	7,18	3,69	0,0078
Resíduos	3,90E+6	8	4,87E+5			
Falta de ajuste	8,01E+5	1	8,01E+5	1,81	5,59	0,2202
Erro Puro	3,09E+6	7	4,42E+5			
Total	2,14E+7	13	1,64E+6			
Indol-3-Acetoaldeído						
Regressão	1,81E+11	5	3,62E+10	5,14	3,69	0,02
Resíduos	5,63E+10	8	7,042E+9			
Falta de ajuste	5,87E+8	1	5,87E+8	0,07	5,59	0,79
Erro Puro	5,57E+10	7	7,96E+9			
Total	2,37E+11	13	1,82E+10			
Indol-3-Acetonitrila						
Regressão	3,57E+4	5	7156,72	49,52	3,69	8,0E-6
Resíduos	1156,08	8	144,51			
Falta de ajuste	24,08	1	24,08	0,14	5,59	0,7110
Erro Puro	1132,00	7	161,71			
Total	3,69E+4	13	2841,51			

A não detecção do sinal do AIA pode ser explicada pelos sinais apresentados na Tabela 8, estes sinais são todos de conjugados do AIA, indicando que esta auxina está presente nas amostras, em sua maior parte, na forma conjugada e não na sua forma livre.

Tabela 8 – Caracterização dos sinais obtidos por espectroscopia de massa

Metabólito	Sinal obtido (m/z)	Sinal encontrado na literatura (m/z)*	Modo
AIA-Glucose	336,0973	336,1083	Negativo
	338,1004	338,1239	Positivo
AIA-Asp	289,0775	289,0824	Positivo
AIA-Val	130,0869	130,0640	Positivo
	275,1224	275,1395	Positivo

*Valores retirados do site <http://www.massbank.jp/>

A Tabela 9 mostra as equações polinomiais dos respectivos modelos utilizados para o sinal do metabólito AIA-Glucose das cultivares Iapar 59 e IPR 106.

A Tabela 10 mostra os resultados da ANOVA, indicando que não houve falta de ajuste em nenhum dos modelos.

As Figuras 5a-b apresentam as curvas de níveis previstas pelo modelo linear para o metabólito AIA-Glucose, a) IAPAR 59 e b) IPR 106. Observa-se que os resultados obtidos para as duas cultivares são bem similares. As misturas que apresentam a maior quantidade de água (20%) em suas frações: *Me*, *A* e *Me:A* mostraram as maiores intensidades deste sinal indicando uma relação da água com a extração deste metabólito. Como a glucose é um açúcar, e esta classe de metabólitos é solúvel em água, os resultados são coerentes com a identificação deste metabólito. Além disso, este resultado mostra que as interações com o grupo ligado ao AIA são fundamentais na sua extração.

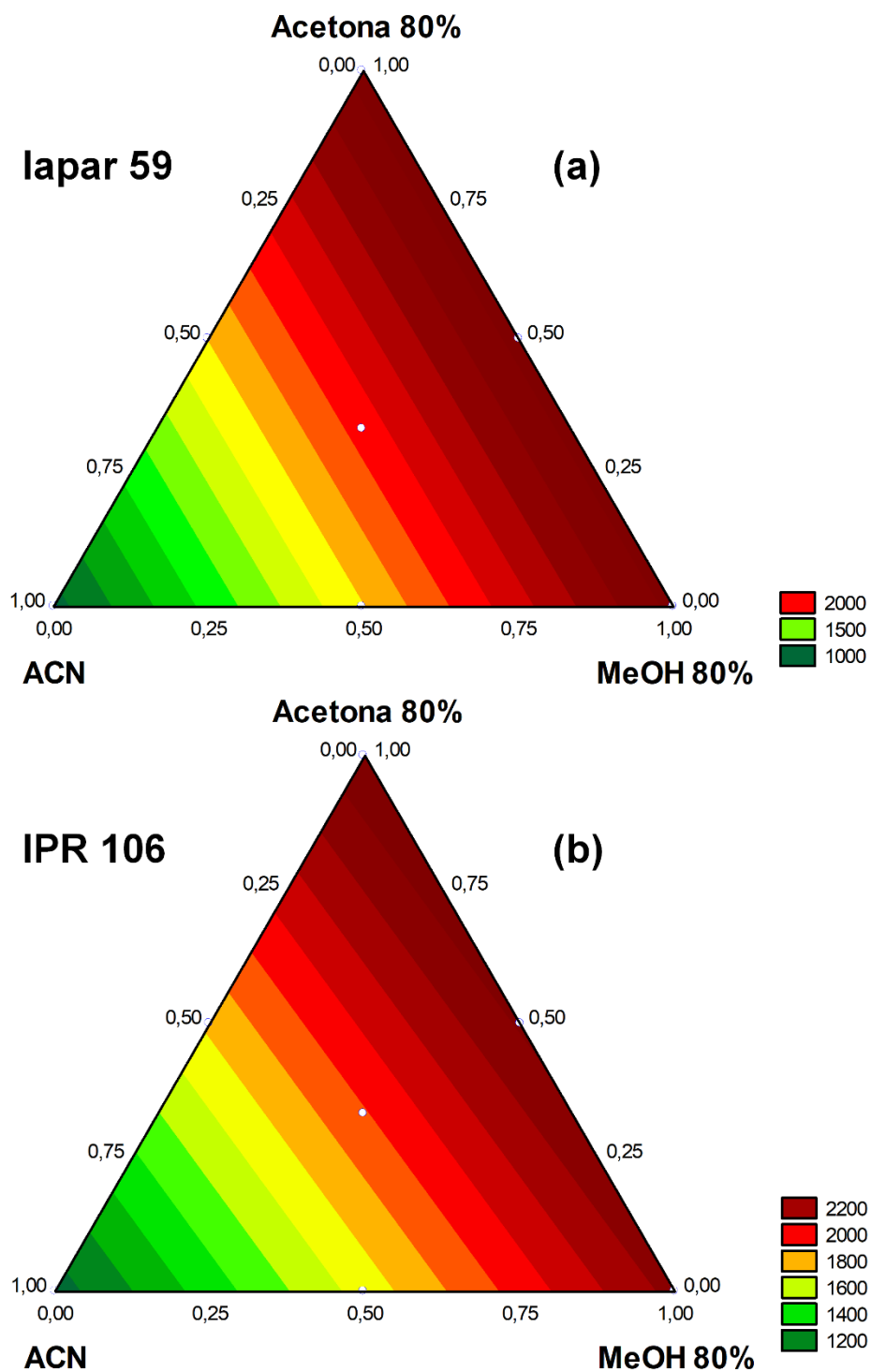
Tabela 9 – Equações dos modelos utilizados para o sinal do metabólito AIA-Glucose para ambas as cultivares.

Cultivar	Equação ajustada dos modelos utilizados
Iapar 59	$\hat{y} = + \underset{(\pm 309)}{1051} acn + \underset{(\pm 309)}{2236} Me + \underset{(\pm 309)}{2391} A$
IPR 106	$\hat{y} = + \underset{(\pm 304)}{962} acn + \underset{(\pm 304)}{2430} Me + \underset{(\pm 304)}{2445} A$

Tabela 10 – Análise de variância para o ajuste do modelo linear para o sinal do metabólito AIA-Glu de ambas as cultivares.

Cultivar	Soma quadrática	g. l.	Média quadrática	Valor de F calculado	Valor de F crítico	p
Iapar 59						
Regressão	2,68E+6	2	1,34E+6	4,75	3,91	0,0325
Resíduos	3,11E+6	11	2,82E+5			
Falta de ajuste	1,32E+5	4	3,30E+5	1,29	4,12	0,3593
Erro Puro	1,78E+6	7	2,55E+5			
Total	5,79E+6	13	4,45E+5			
IPR 106						
Regressão	3,62E+6	2	1,81E+6	6,60	3,91	0,0130
Resíduos	3,01E+6	11	2,74E+5			
Falta de ajuste	8,71E+5	4	2,17E+5	0,71	4,12	0,6100
Erro Puro	2,14E+6	7	3,06E+5			
Total	6,64E+6	13	5,11E+5			

Figura 5. Curvas de nível das abundâncias relativas, obtidas por espectroscopia de massa (m/z), do modelo linear para o sinal do metabólito AIA-Glu, onde (a) representa os resultados obtidos dos extratos da cultivar Iapar 59 e (b) da IPR 106.



A Tabela 11 mostra as equações polinomiais dos respectivos modelos utilizados para o sinal do metabólito AIA-Asp das cultivares Iapar 59 e IPR 106.

A Tabela 12 mostra o resultado da ANOVA, indicando que não houve falta de ajuste em nenhum dos modelos.

Tabela 11 – Equações dos modelos utilizados para o sinal do metabólito AIA-Asp para ambas as cultivares.

Cultivar	Equação ajustada dos modelos utilizados
Iapar 59	$\hat{y} = + 592 acn + 1803 Me + 949 A - 1436 acn : Me - 1520 Me : A - 1520 acn : Me : A$ $(\pm 124) \quad (\pm 136) \quad (\pm 124) \quad (\pm 659) \quad (\pm 659) \quad (\pm 4398)$
IPR 106	$\hat{y} = + 514 acn + 1767 Me + 981 A - 870 acn : Me - 2095 Me : A$ $(\pm 113) \quad (\pm 124) \quad (\pm 113) \quad (\pm 570) \quad (\pm 570)$

Tabela 12 – Análise de variância para o ajuste do modelo linear para o sinal do metabólito AIA-Asp de ambas as cultivares.

Cultivar	Soma quadrática	g. l.	Média quadrática	Valor de F calculado	Valor de F crítico	p
Iapar 59						
Regressão	2,68E+6	4	1,34E+6	4,75	3,91	0,0325
Resíduos	3,11E+6	9	2,82E+5			
Falta de ajuste	1,32E+5	4	3,30E+5	1,29	4,12	0,3593
Erro Puro	1,78E+6	7	2,55E+5			
Total	5,79E+6	13	4,45E+5			
IPR 106						
Regressão	1,89E+6	4	4,72E+5	15,18	3,63	0,0004
Resíduos	2,80E+5	9	3,11E+4			
Falta de ajuste	8,49E+4	2	4,24E+4	1,52	4,74	0,2825
Erro Puro	1,95E+5	7	2,79E+4			
Total	2,17E+6	13	1,67E+5			

As Figuras 6a-b apresentam as curvas de níveis previstas pelo modelo quadrático para o metabólito AIA-Asp, a) IAPAR 59 e b) IPR 106. Observa-se que os resultados obtidos para as duas cultivares são bem similares. O solvente extrator *Me* mostrou as maiores intensidades deste sinal indicando que na extração existe uma relação do aminoácido com este solvente. Na literatura existem vários trabalhos que mostram a utilização do metanol em misturas com a água em diferentes proporções para a extração e separação de aminoácidos²⁹, justificando os resultados apresentados.

A Tabela 13 mostra as equações polinomiais dos respectivos modelos utilizados para o sinal do metabólito AIA-Val das cultivares Iapar 59 e IPR 106.

A Tabela 14 mostra que não houve falta de ajuste em nenhum dos modelos.

As Figuras 7a-b apresentam as curvas de níveis preditas pelo modelo linear para o metabólito AIA-Val, a) IAPAR 59 e b) IPR 106. O solvente extrator *Me* mostrou maiores intensidades que a *A* e *acn*, mas diferente dos resultados do AIA-Asp, a fase extratora *A* apresentou valores bem próximos deste solvente. Apesar da distribuição do AIA-Val ser similar em ambas as cultivares, os resultados da cultivar IPR 106 apresentaram, em todos os pontos do planejamento de misturas, uma concentração maior que a da cultivar Iapar 59, indicando que esta cultivar pode apresentar uma maior concentração deste metabólito.

Figura 6. Curvas de nível das abundâncias relativas, obtidas por espectroscopia de massa (m/z), do modelo quadrático para o sinal do metabólito AIA-Asp, onde (a) representa os resultados obtidos dos extratos da cultivar Iapar 59 e (b) da IPR 106.

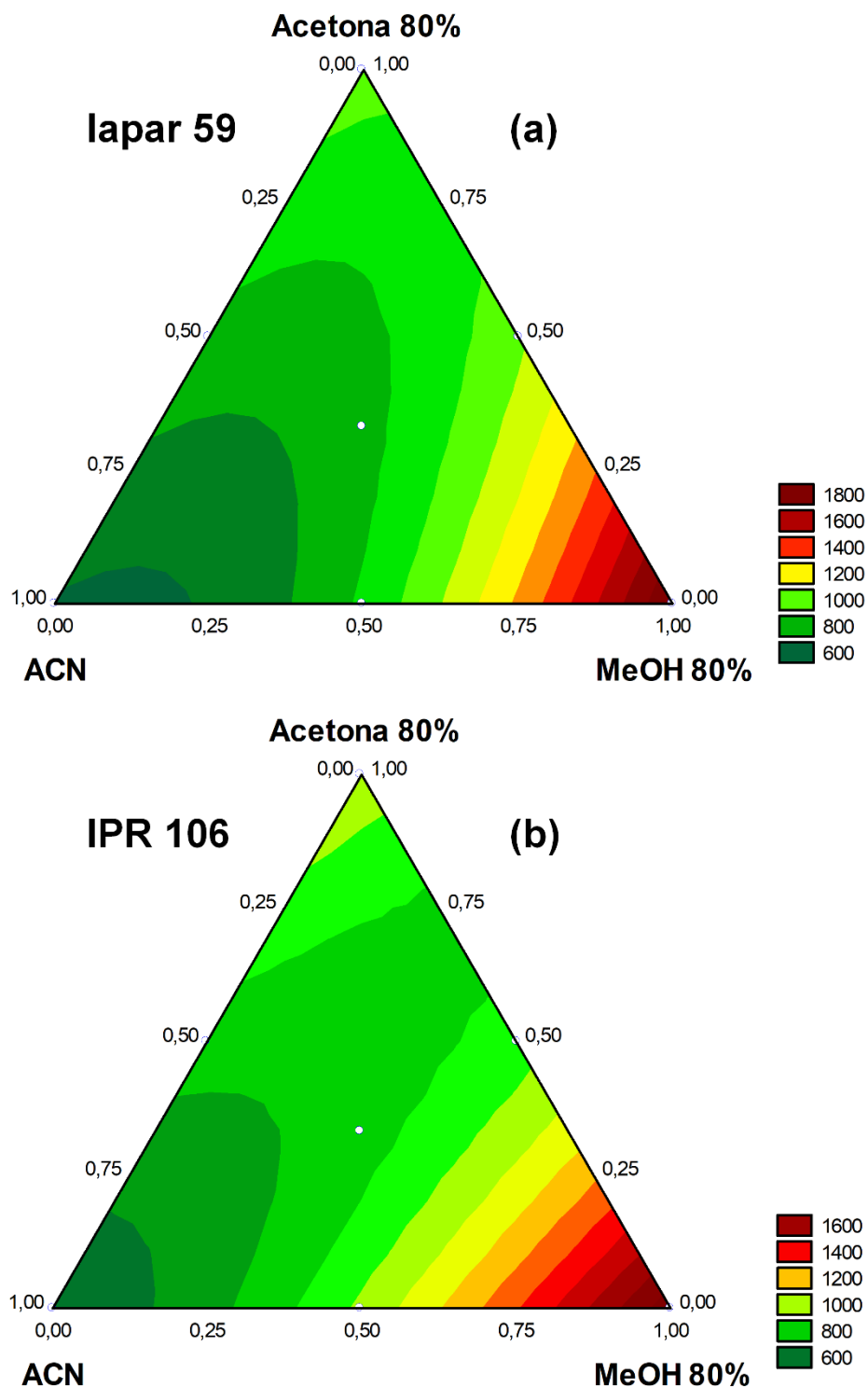


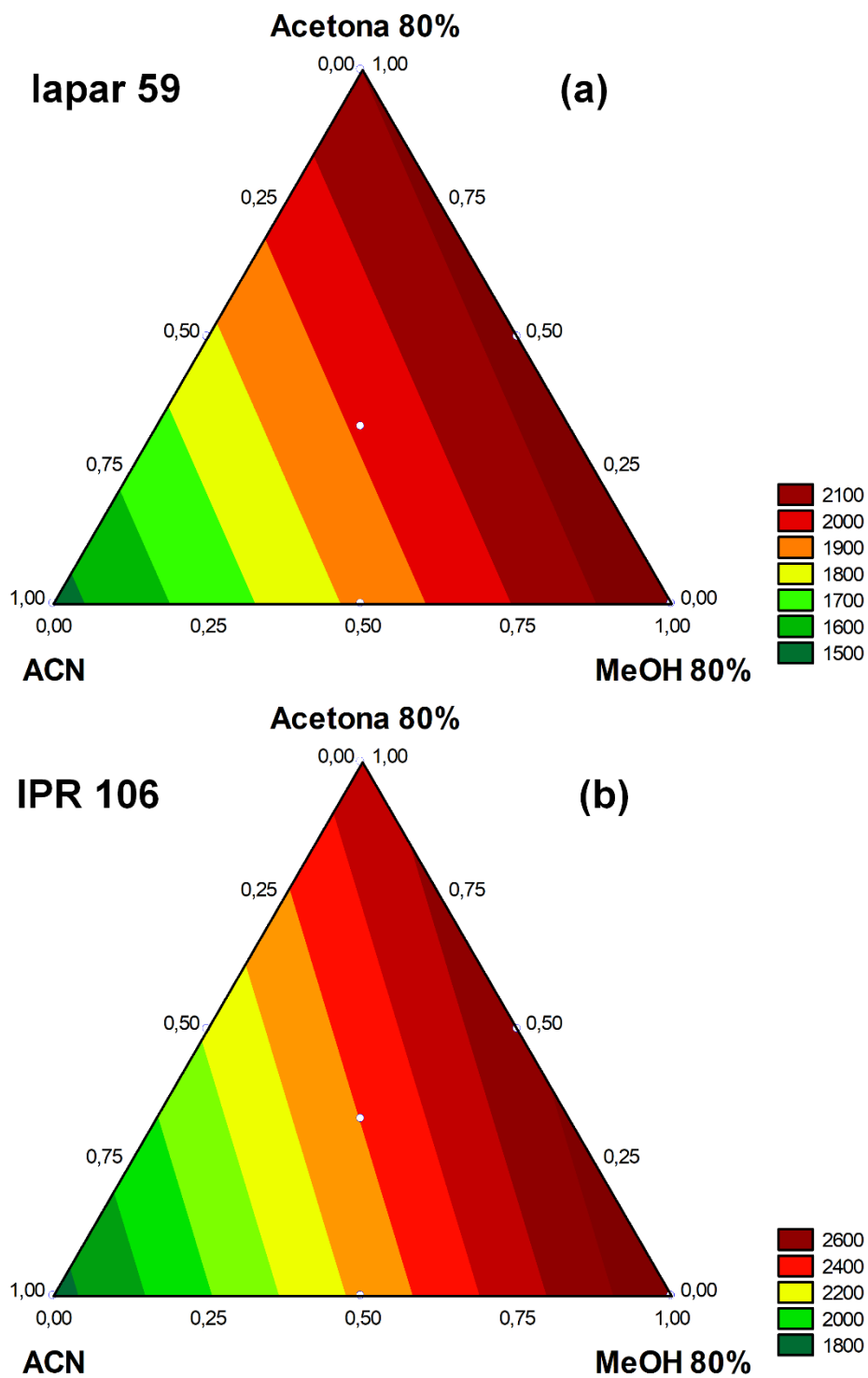
Tabela 13 – Equações dos modelos utilizados para o sinal do metabólito AIA-Val para ambas as cultivares.

Cultivar	Equação ajustada dos modelos utilizados
Iapar 59	$\hat{y} = + 1463_{(\pm 87)} acn + 2188_{(\pm 87)} Me + 2101_{(\pm 87)} A$
IPR 106	$\hat{y} = + 1762_{(\pm 154)} acn + 2687_{(\pm 154)} Me + 2466_{(\pm 154)} A$

Tabela 14 – Análise de variância para o ajuste do modelo linear para o sinal do metabólito AIA-Val de ambas as cultivares.

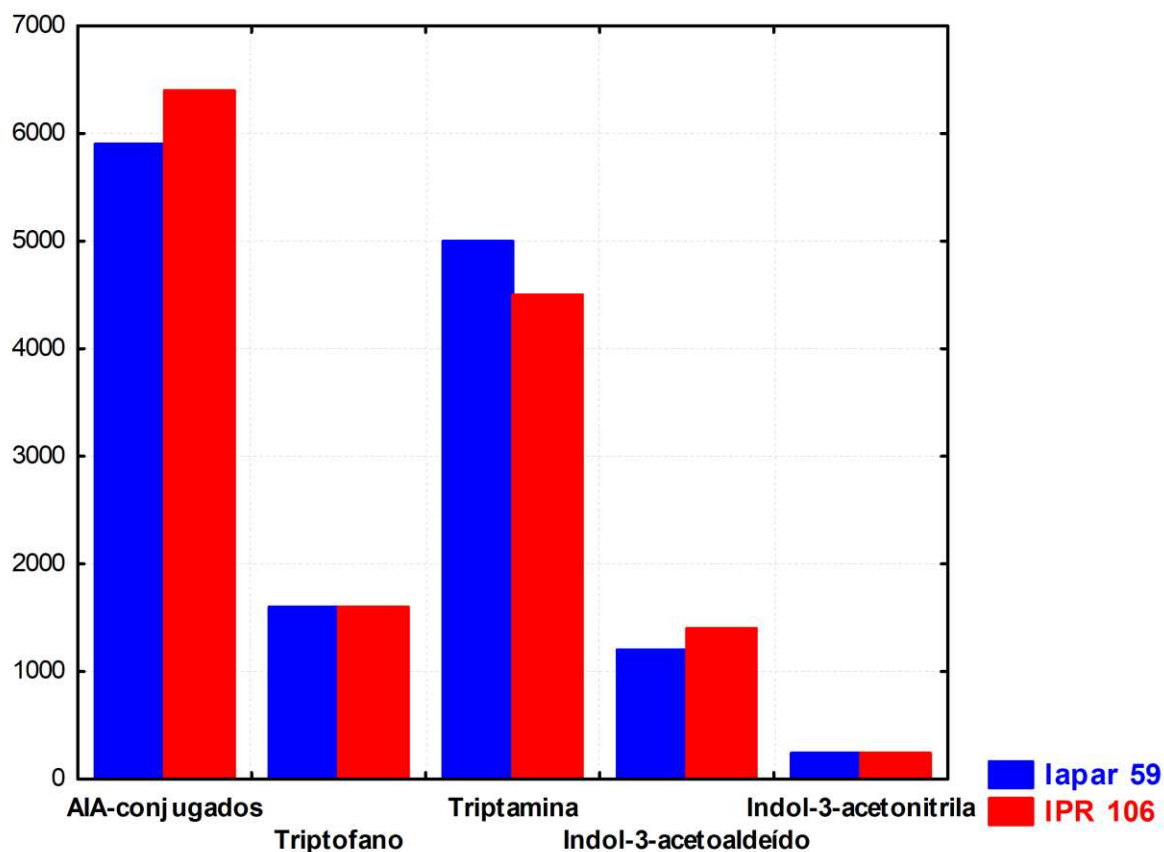
Cultivar	Soma quadrática	g. l.	Média quadrática	Valor de F calculado	Valor de F crítico	p
Iapar 59						
Regressão	7,83E+5	2	3,91E+5	17,21	3,98	0,0004
Resíduos	2,50E+5	11	2,27E+4			
Falta de ajuste	1,04E+5	4	2,60E+4	1,25	4,12	0,3722
Erro Puro	1,45E+5	7	2,08E+4			
Total	1,03E+6	13	7,95E+4			
IPR 106						
Regressão	1,16E+6	2	5,82E+5	8,25	3,98	0,0064
Resíduos	7,76E+5	11	7,05E+4			
Falta de ajuste	4,88E+5	4	1,22E+5	2,97	4,12	0,0993
Erro Puro	2,87E+5	7	4,11E+4			
Total	1,94E+6	13	7,95E+4			

Figura 7. Curvas de nível das abundâncias relativas, obtidas por espectroscopia de massa (m/z), do modelo linear para o sinal do metabólito AIA-Val, onde (a) representa os resultados obtidos dos extratos da cultivar Iapar 59 e (b) da IPR 106.



A Figura 8 apresenta o gráfico de barras com as abundâncias relativas dos metabólitos da biossíntese do AIA e dos conjugados AIA-glucose, AIA-Asp e AIA-Val. Para cada metabólito foi usado a concentração do solvente extrator do planejamento de misturas com os maiores valores de abundância relativa. Para os AIA-conjugados foram somados os valores dos três metabólitos: AIA-glucose, AIA-Asp e AIA-Val. Observa-se pela figura que os metabólitos de maior concentração da biossíntese da auxina são o AIA conjugado e a triptamina. Observa-se também que o AIA conjugado é maior no IPR 106 em relação ao IAPAR 59 e o contrário para a triptamina. Além disso, independentemente da concentração do AIA livre a concentração da sua forma conjugada é a maior entre os metabólitos da biossíntese do AIA.

Figura 8. Gráfico de barras das concentrações relativas dos metabólitos estudados.



4. CONCLUSÃO

Os metabólitos identificados nas amostras indicaram que a via tryptophan-tryptamina-indole-3-acetaldehyde-AIA apresentou-se como a principal via para a biossíntese de auxinas. Além disso, a não detecção do sinal do AIA apontou para a possibilidade de a maior parte do AIA disponível na planta não estar na sua forma livre, o que foi corroborado com a detecção de vários sinais de conjugados do AIA.

A análise das curvas de níveis dos metabólitos presentes na biossíntese da auxina mostrou que para os metabólitos triptofano, triptamina, índol-3-acetaldeído e índol-3-acetonitrila os melhores solventes extratores foram: *acn:Me*, *Me*, *acn:Me:A* e *acn:A*, respectivamente.

Os resultados das análises das curvas de níveis do conjugado AIA-Glucose apresentou as misturas com maior quantidade de água, *Me*, *A* e *Me:A* como os melhores solventes extratores, enquanto os outros dois conjugados (AIA-Asp e AIA-Val) tiveram o solvente *Me* extraíndo a maior quantidade destes metabólitos.

A soma da intensidade dos sinais dos metabólitos AIA-conjugados mostrou que a concentração de auxina nesta forma é significativamente maior que todos os outros metabólitos detectados da biossíntese do AIA, para as duas cultivares, sendo que a abundância relativa da cultivar IPR 106 foi maior que a da cultivar IAPAR 59. Esse resultado justifica a ausência da detecção do sinal do AIA livre, pois a sua maior parte está na forma conjugada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

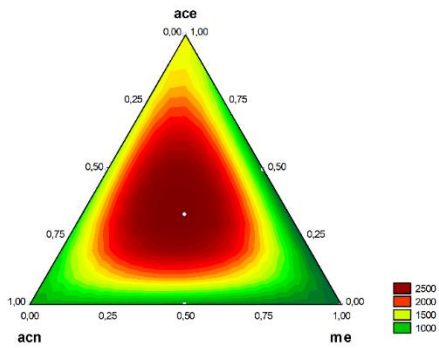
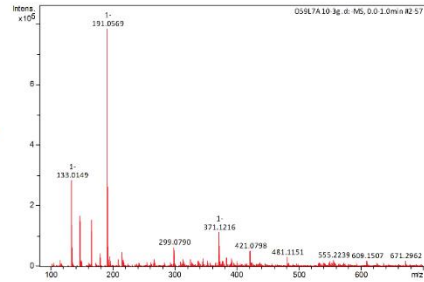
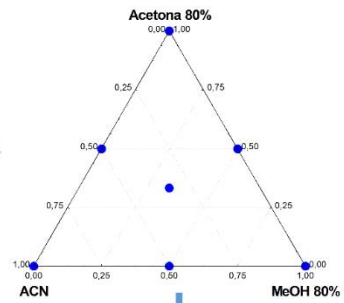
- (1) Spiess, G. M.; Hausman, A.; Yu, P.; Cohen, J. D.; Rampey, R. A.; Zolman, B. K. Auxin Input Pathway Disruptions Are Mitigated by Changes in Auxin Biosynthetic Gene Expression in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **2014**, *165*, 1092–1104.
- (2) Mashiguchi, K.; Keita, T.; Sakaic, T.; Sugawaraa, S.; Kawaideb, H.; Natsumeb, M.; Hanadaa, A.; Yaenaa, T.; Shirasua, K.; Yaod, H.; et al. The Main Auxin Biosynthesis Pathway in Arabidopsis. *PNAS* **2011**, *108*, 18512–18517.
- (3) Went, F. W. AUXIN, THE PLANT GROWTH-HORMONE. *Bot. Rev.* **1935**, *1* (48), 162–182.
- (4) Larsson, E.; Franks, R. G.; Sundberg, E. Auxin and the Arabidopsis Thaliana Gynoecium. *J. Exp. Bot.* **2013**, *64*, 2619–2627.
- (5) Gray, W. M.; Kepinski, S.; Rouse, D.; Leyser, O.; Estelle, M. Auxin Regulates SCFTTIR1-Dependent Degradation of AUX/IAA Proteins. *Nature* **2001**, *414*, 271–276.
- (6) Pospisilová, J. Interaction of Cytokinins and Abscisic Acid during Regulation of Stomatal Opening in Bean Leaves. *Photosynthetica* **2003**, *41* (1), 49–56.
- (7) Zeevaart, J. A. D.; Creelman, R. A. METABOLISM AND PHYSIOLOGY OF ABSCISIC ACID ! *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **1988**, *39*, 439–473.
- (8) Monni, S.; Uhlig, C.; Hansen, E.; Magel, E. Ecophysiological Responses of *Empetrum Nigrum* to Heavy Metal Pollution. *Environ. Pollut.* **2001**, *112* (2), 121–129.
- (9) Atici, Ö.; Ađar, G.; Battal, P. Changes in Phytohormone Contents in Chickpea Seeds Germinating under Lead or Zinc Stress. *Biol. Plant.* **2005**, *49* (2), 215–222.

- (10) Hasegawa, P. M.; Bressan, R. A.; Zhu, J.-K.; Bohnert, H. J. CONTENTS. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **2000**, *51*, 463–499.
- (11) Gómez-Cadenas, A.; Mehouchi, J.; Tadeo, F. R.; Primo-millo, E.; Talon, M. Hormonal Regulation of Fruitlet Abscission Induced by Carbohydrate Shortage in Citrus. *Planta* **2000**, *210*, 636–643.
- (12) Ludwig-Muller, J. Auxin Conjugates : Their Role for Plant Development and in the Evolution of Land Plants. *J. Exp. Bot.* **2011**, *62* (6), 1757–1773.
- (13) Bajguz, A.; Piotrowska, A. Phytochemistry Conjugates of Auxin and Cytokinin. *Phytochemistry* **2009**, *70* (8), 957–969.
- (14) Tam, Y. Y.; Epstein, E.; Normanly, J. Characterization of Auxin Conjugates in Arabidopsis . Low Steady-State Levels of Indole-3-Acetyl-Aspartate ., *Plant Physiol.* **2000**, *123* (June), 589–595.
- (15) Michalczuk, L.; Bandurski, R. S. Enzymic Synthesis of 1-O-Indol-3-Ylacetyl-F1-D-Glucose and Indol-3-Ylacetyl-Myo-Inositol. *Biochem. J.* **1982**, *207*, 273–281.
- (16) Kai, K.; Miyagawa, H. Three Oxidative Metabolites of Indole-3-Acetic Acid from Arabidopsis Thaliana. *Phytochemistry* **2007**, *68*, 1651–1663.
- (17) Andersson, B.; Sandberg, G. IDENTIFICATION OF ENDOGENOUS N- (3-INDOLEACETYL) ASPARTIC ACID IN SCOTS PINE (PINK5 SYLVESTRIS L .) BY COMBINED GAS CHRO- SPECTROMETRY , USING HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY FOR QUANTIFICATION. *J. Chromatogr.* **1982**, *238*, 151–156.
- (18) Sonner, J. M.; Purves, W. K. Natural Occurrence of Indole-3-Acetylaspartate and Indole-3- Acetylglutamate in Cucumber Shoot Tissue. *Plant Physiol.* **1985**, *77*, 784–785.

- (19) Östin, A.; Moritz, T.; Sandbergt, G. Liquid Chromatography / Mass Spectrometry of Conjugates and Oxidative Metabolites of Indole-3-Acetic Acid. *Biol. Mass Spectrom.* **1992**, *21*, 292–298.
- (20) Bandurski, R. S.; Cohen, J. D.; Slovin, J. P.; Reinecke, D. M. Auxin Biosynthesis and Metabolism. In *Plant Hormones*; Springer: Dordrecht, 1995; pp 39–65.
- (21) Wright, A. D.; Sampson, M. B.; Neuffer, M. G.; Michalczuk, L.; Slovin, J. P.; Cohen, J. D. Indole-3-Acetic Acid Biosynthesis in the Mutant Maize Orange Pericarp, a Tryptophan Auxotroph. *Science (80-.)*. **1991**, *254*, 998–1000.
- (22) Östin, A.; Ilic, N.; Cohen, J. D. An in Vitro System from Maize Seedlings for Tryptophan- Independent Indole-3-Acetic Acid Biosynthesis 1 □ a Ilic. *Plant Physiol.* **1999**, *119*, 173–178.
- (23) Sitbon, F.; Astot, C.; Edlund, A.; Crozier, A.; Sandberg, G. The Relative Importance of Tryptophan-Dependent and Tryptophan-Independent Biosynthesis of Indole-3-Acetic Acid in Tobacco during Vegetative Growth. *Planta* **2000**, *211*, 715–721.
- (24) Jones, S. E.; Demeo, J. S.; Davies, N. W.; Noonan, S. E.; Ross, J. J. Stems of the Arabidopsis Pin1-1 Mutant Are Not Deficient in Free Indole-3-Acetic Acid. *Planta* **2005**, *222*, 530–534.
- (25) Quittenden, L. J.; Davies, N. W.; Smith, J. A.; Molesworth, P. P.; Tivendale, N. D.; Ross, J. J. Auxin Biosynthesis in Pea : Characterization of The. *Plant Physiol.* **2009**, *151* (November), 1130–1138.
- (26) Lu, Q.; Chen, L.; Lu, M.; Chen, G.; Zhang, L. Extraction and Analysis of Auxins in Plants Using Dispersive Liquid - Liquid Microextraction Followed by High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, 2763–2770.

- (27) Barkawi, L. S.; Tam, Y.; Tillman, J. A.; Pederson, B.; Calio, J.; Al-amier, H.; Emerick, M.; Normanly, J.; Cohen, J. D. A High-Throughput Method for the Quantitative Analysis of Indole-3-Acetic Acid and Other Auxins from Plant Tissue Q. *Anal. Biochem.* **2008**, *372*, 177–188.
- (28) Tivendale, N. D.; Cohen, J. D. Analytical History of Auxin. *J. Plant Growth Regul.* **2015**, *34* (4), 708–722.
- (29) Henry-Silva, G. G.; Camargo, A. F. M. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE MACRÓFITAS AQUÁTICAS FLUTUANTES UTILIZADAS NO TRATAMENTO DE EFLUENTES DE AQUICULTURA. *Planta Daninha* **2006**, *24* (1), 21–28.

CAPÍTULO 4



ANÁLISE EXPLORATÓRIA E OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA EXTRATOR DE FITOHORMÔNIOS POR ESPECTROMETRIA DE MASSA

1. INTRODUÇÃO

Fitohormônios, além de serem importantes no papel do desenvolvimento da planta, protegem também do dano oxidativo ocasionado por estresse ambiental¹⁻⁴. Entre os principais tipos de fitohormônios podemos citar: auxinas, citocininas, ácido jasmônico, etileno, giberilinas e ácido abscísico.

As citocininas são uma classe importante destes metabólitos, as quais são definidas pela sua habilidade em promover a divisão celular, diferenciação de cloroplastos, senescência das folhas^{5,6} e o controle do crescimento em vários processos da planta⁷. Segundo Skoog e Miller, a relação conjunta entre os fitohormônios citocininas e as auxinas, é importante pela formação e desenvolvimento do caule e da folha das plantas⁸. A zeatina é a primeira citocinina isolada de uma planta⁹ e a principal representante dessa classe. Algumas citocininas apresentam efeitos antienvhecimento, anticarcinogênico e anti-trombóticos^{10,11}, sendo de grande importância para fisiologistas de plantas. Além disso, estes fitohormônios são importantes na indução de metabólitos secundários, estimulando ou inibindo a biossíntese de xantonas, clorofilas a e b, carotenoides e flavonoides^{12,13}. Um estudo de grande interesse para a comunidade científica é o acúmulo de flavonoides em plantas ocasionado pela zeatina¹⁴, porque eles podem servir como comunicadores da planta com o ambiente, devido a sua coloração e cheiro. Além disso, a quantidade de flavonoides na planta pode ser considerada como um parâmetro de sua capacidade antioxidante¹⁵.

A rutina, conhecida como vitamina P, é um flavonoide que sofre inibição pela presença das citocininas¹³. Esta vitamina é encontrada em diversas plantas¹⁶⁻¹⁸, sendo o flavonoide dominante em muitas delas^{19-21,15}. Esse metabólito apresenta efeitos benéficos para a dieta e controle de pressão sanguínea¹³. Entre as suas atividades biológicas estão: anticancerígena²², antioxidante²³, antienvelhecimento²⁴, anti-inflamatório²⁵ e antidiabético²⁶. Além disso, esse flavonoide teria relação com o crescimento da raiz da planta²⁷ e da proteção contra a radiação ultravioleta²⁸.

As xantonas também apresentam características de grande relevância para a comunidade científica devido a sua ampla gama de fatores biológicos e propriedades farmacológicas, tais como antimicrobiano, citotóxico e antioxidante²⁹. A mangiferina pertencente a classe das glucoxantonas, isolada originalmente da mangueira (*Mangifera indica* L.). A sua concentração em plantas é significativamente aumentada na presença de citocininas³⁰. Essa xantona é encontrada em várias plantas, incluindo a do café³¹⁻³⁴ e é conhecida pelas atividades antidiabética³⁵, antioxidativa³⁶, antibacteriana³⁷, antialérgica³⁸ e analgésica³⁹. Altas concentrações deste metabólito podem induzir a produção de clorofila e auxina^{40,41}.

O ácido jasmônico (AJ) é um fitohormônio natural da família das oxilipinas, atuando como um regulador natural de crescimento das plantas, regulando os processos bioquímico, fisiológico e morfológico, em especial, ele é responsável por várias respostas de defesa das plantas contra estresses abióticos e bióticos^{42,43}. O AJ está principalmente relacionado com a defesa da planta contra danos, herbívoros e patógenos necrotróficos⁴⁴, sendo fundamental na defesa da planta *Solanum lycopersicum* contra a lagarta (*Manduca quinquemaculata*)⁴⁵ e na defesa do vegetal *Arabidopsis thaliana* contra moscas (*Bradysia impatiens*)⁴⁶. O AJ também influencia vários aspectos do crescimento e

desenvolvimento da planta, incluindo desenvolvimento da flor e do fruto, inibição da germinação do pólen e da semente e restrição do crescimento da raiz⁴⁷. A regulação do AJ na planta também está relacionada com as citocininas, as quais mostram um efeito de inibição com este fitohormônio⁴⁸⁻⁵². Além disso, este metabólito é utilizado amplamente nas indústrias farmacêutica e cosmética, devido a suas atividades de renovação da epiderme, alisamento da textura da pele, estimulação do crescimento de fibras de queratina humana e inibição da queda de cabelo, apresentando inúmeras vantagens para o tratamento de diferentes tipos de alopecias⁵³.

Extratos de plantas são misturas complexas de múltiplos componentes. O principal problema associado à análise de hormônios vegetais é que a quantidade de fitohormônios é muito baixa, geralmente na faixa de 0,1 a 50 ng g⁻¹ de peso fresco. Sendo assim, o procedimento de extração é um passo importante da análise, mas às vezes insuficientemente considerado no método analítico. Solventes como metanol, acetonitrila, acetona, éter etílico, diclorometano, clorofórmio, misturas de metanol:água, acetona:água, propanol:água, clorofórmio:propanol, são frequentemente utilizados na extração de fitohormônios⁵⁴⁻⁶³. As técnicas de detecção para fitohormônios mais utilizadas são: bioensaios⁶⁴, imunoenensaios⁶⁵, eletroanálise⁶⁶, cromatografia gasosa (CG)⁶⁷, electroforese capilar (EC)⁶⁸ e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)⁶⁹, sendo a maioria dessas técnicas acoplada com diversos detectores. Recentemente, a espectrometria de massa (EM)^{70,71} tem se destacado, tanto em análises qualitativas quanto quantitativas, sendo uma ferramenta poderosa mesmo quando não acoplada a outra técnica.

Apesar dos vários trabalhos encontrados na literatura sobre análise de fitohormônios, não foram encontrados nenhum abordando a otimização do solvente

extrator para esses metabólitos. Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi otimizar o sistema extrator da citocininas (zeatina) e do ácido jasmônico e outros metabólitos secundários que apresentam relação direta com estes fitohormônios em folhas de *Coffea arabica* L. usando planejamento de misturas e espectrometria de massa.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. COLETA DE AMOSTRAS

A coleta das folhas de *Coffea arabica* foi realizada no dia três de outubro de 2014, em triplicata, nos cultivares IAPAR 59 e IPR 106. A coleta foi realizada na sede do Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR) em Londrina (23°18'S, 51°17'O), Paraná, Brasil.

2.2. ESCOLHA DOS SOLVENTES EXTRATORES

Para a obtenção dos extratos foi utilizado um planejamento experimental simplex-centroide, Figura 1. A Tabela 1 mostra a composição das misturas de acn = acetonitrila, Me = metanol 80% (MeOH:H₂O v/v) e A = acetona 80% (C₃H₆O:H₂O v/v) para os sete pontos da Figura 1. Os solventes orgânicos utilizados foram de grau analítico e obtidos da F. MAIA (São Paulo, Brasil). Estes solventes foram escolhidos por mostrarem eficiência na extração de fitohormônios, bem como variação nos três parâmetros solvatocrômicos. Todos os experimentos foram realizados em duplicatas.

Figura 1. Planejamento de misturas simplex-centroide com 3 componentes.

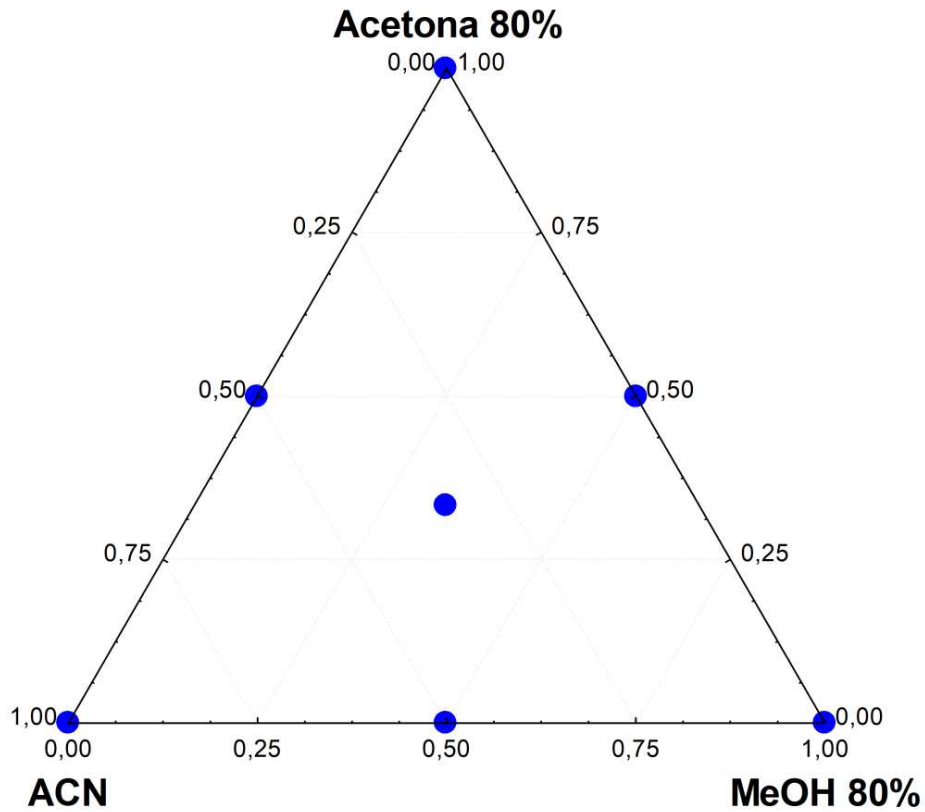


Tabela 1 Composição das misturas extratoras e seus valores de polaridade e parâmetros solvatocrômicos.

Fase extratora	Acetonitrila	MeOH 80%	Acetona 80%	Polaridade	Acidicidade α	Basicidade β	Dipolaridade π
<i>acn</i>	1	0	0	5,800	0,150	0,250	0,600
<i>Me</i>	0	1	0	6,180	0,440	0,246	0,314
<i>A</i>	0	0	1	6,180	0,144	0,318	0,538
<i>acn:Me</i>	0,5	0,5	0	5,990	0,295	0,248	0,457
<i>acn:A</i>	0,5	0	0,5	5,990	0,147	0,284	0,569
<i>Me:A</i>	0	0,5	0,5	6,180	0,292	0,282	0,426
<i>acn:Me:A</i>	0,33	0,33	0,33	6,053	0,245	0,271	0,484

2.3. PREPARO DOS EXTRATOS

Pesou-se 215 mg das folhas de *Coffea arabica* L. para cada ponto do planejamento de mistura em balança Shimadzu AY220 e adicionou-se 20 mL de cada solvente puro ou misturas de solventes em frasco de 25 mL com tampa. A mistura foi submetida a banho de ultrassom Ultracleaner 1400 Unique por 20 minutos. A temperatura foi mantida próxima de 0°C com gelo. A necessidade deste procedimento deve-se ao fato da temperatura do banho aumentar durante o processo de ultrassonicação e também, evita-se a perda do solvente por evaporação e a oxidação de compostos. Em seguida as amostras foram filtradas e os filtrados foram armazenados em freezer Electrolux Super FE26, a -20 °C. Os extratos foram ressolubilizados em 2 mL de acetonitrila para a análise por espectrometria de massa.

2.4. ANÁLISE EM ESPECTROMETRIA DE MASSA

A solução do extrato diluída foi injetada diretamente na fonte do espectrômetro de massa Bruker, equipado com analisador quadrupólo e ionização por eletrospray (IES). A análise foi operada no modo positivo e negativo. Os dados foram adquiridos no modo de varredura usando uma gama de m/z de 80 a 1000 Da. As condições da fonte de ionização foram: voltagem capilar de 3 kV, 150 °C de temperatura da fonte, 80 L h⁻¹ de fluxo de gás do cone, 800 L h⁻¹ de fluxo de gás de dessolvatação e 350 °C de temperatura de dessolvatação. O teor do gás de nitrogênio utilizado na nebulização foi de 99% de pureza.

2.5. PROCESSAMENTO DOS DADOS

O processamento dos espectros de EM foram realizados com a utilização do programa da Bruker, Data Analysis. Para a análise estatística foi utilizado o programa Statistica 7.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O primeiro passo nesse trabalho foi a análise dos espectros de massa para investigar a presença dos fitohormônios e metabólitos secundários que apresentam relação direta com eles. A Figura 2a-2d mostra os espectros de massa dos fitohormônios, zeatina e ácido jasmônico e do flavonoide rutina e da xantona mangiferina, encontrados nos extratos, bem como, a estrutura dos metabólitos e os sinais m/z dos respectivos íons. Na Tabela 2, são apresentados os sinais obtidos e os encontrados na literatura. Comparando os resultados da Tabela 2, observa-se a concordância entre eles.

No segundo passo, as intensidades dos sinais m/z de cada íon, zeatina, rutina, mangiferina e ácido jasmônico para cada ponto do planejamento de mistura foram usados como resposta para otimização do sistema extrator. Foram testados os modelos linear, quadrático e cúbico especial para cada metabólito para as cultivares IAPAR 59 e IPR 106.

Figura 2. Espectros de massa e a fórmula estrutural dos metabólitos: zeatina (a), rutina (b), mangiferina (c) e ácido jasmônico (d)

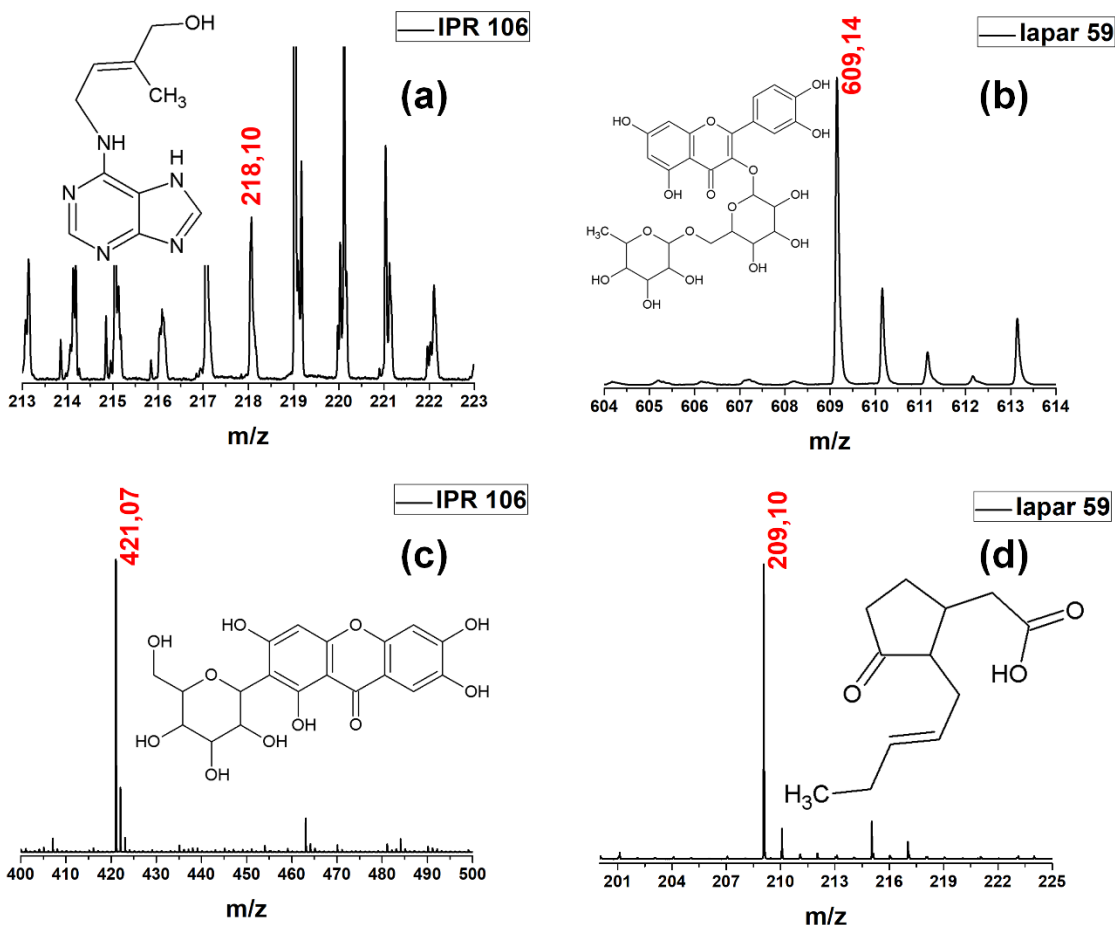


Tabela 2 – Caracterização dos sinais obtidos por espectroscopia de massa.

Metabólito	Sinal obtido (m/z)	Sinal encontrado na literatura (m/z)	Modo
Zeatina	218,10	218,10	Negativo
	220,12	220,11	Positivo
Rutina	609,14	609,13	Negativo
Mangiferina	421,07	421,07	Negativo
Ácido Jasmônico	209,10	209,11	Negativo

Para a zeatina na cultivar IAPAR 59 os modelos linear e quadrático apresentaram falta de ajuste, sendo assim o modelo cúbico especial foi usado para a

modelagem. Os coeficientes significativos estão destacados em vermelho na equação 1. O maior coeficiente linear foi apresentado pela acetona seguido da acetonitrila. Os coeficientes dos termos quadráticos não são significativos e o termo cúbico é significativo no nível de 95%, mostrando que ele é superior ao modelo quadrático.

$$\hat{y} = +866_{(\pm 310)} acn + 590_{(\pm 310)} Me + 1601_{(\pm 339)} A + 164_{(\pm 1642)} acn:A - 1761_{(\pm 1642)} Me:A + 52459_{(\pm 10952)} acn:Me:A \quad [1]$$

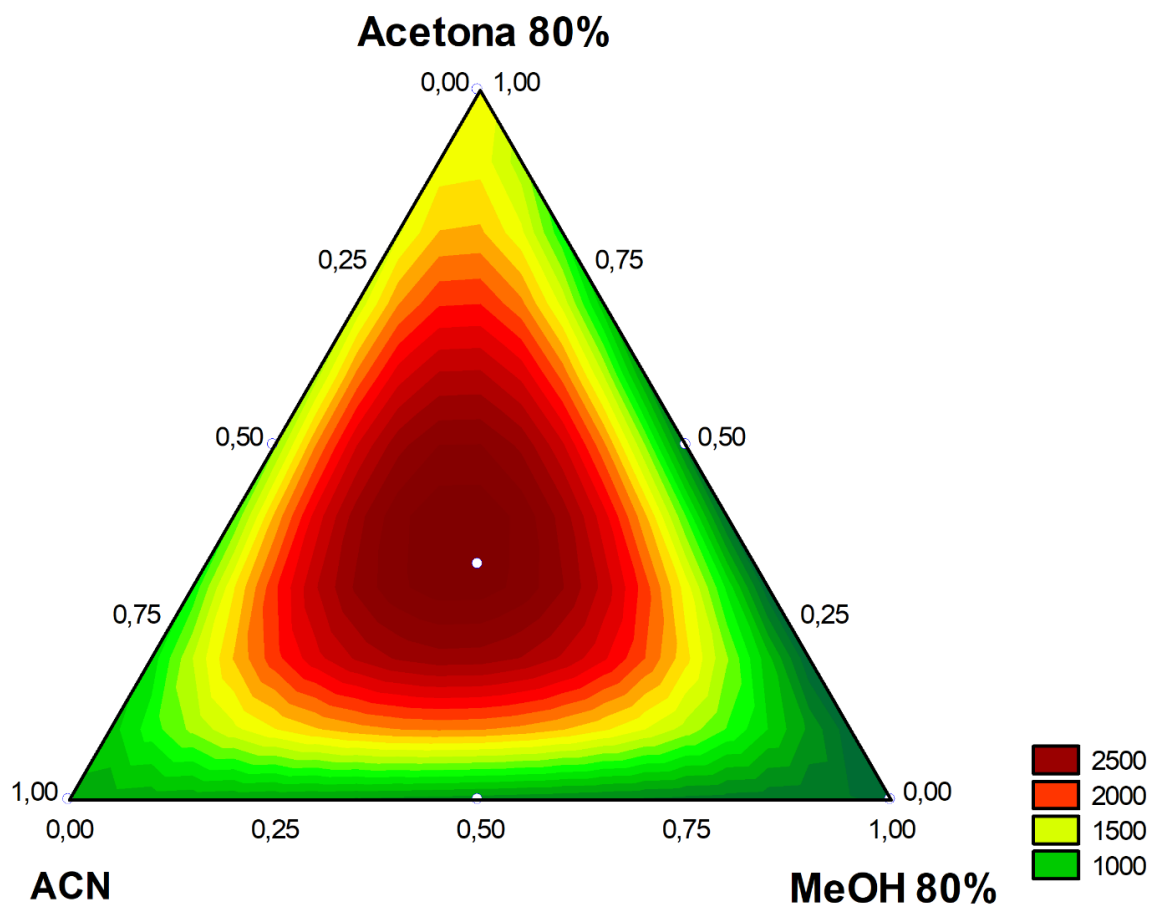
O resultado da análise de variância mostrou que não existe falta de ajuste, porque a razão entre as médias quadráticas da falta de ajuste e do erro puro (MQfaj/MQep) foi menor que o F crítico (F_{crit}) no nível de 95% de confiança, tabela 3.

Tabela 3 – Análise de variância para o ajuste do modelo cúbico especial da zeatina para a cultivar IAPAR 59.

Metabólito	Soma quadrática	g. l.	Média quadrática	Valor de F calculado	Valor de F crítico	p
Zeatina						
Regressão	7,35E+6	5	1,47E+6	6,36	3,69	0,01
Resíduos	1,84E+6	8	2,31E+5			
Falta de ajuste	1,39E+5	1	1,39E+5	0,57	5,59	0,47
Erro Puro	1,70E+6	7	2,44E+5			
Total	9,20E+6	13	7,08E+5			

Suas curvas de nível estão apresentadas na Figura 3. Os maiores valores de intensidade para o íon zeatina previsto pelo modelo são obtidos no centro do triângulo indicando que a mistura ternária *acn:Me:A* (1:1:1 v/v/v) é o melhor solvente extrator para esse fitohormônio, prevendo um valor de 2500.

Figura 3. Curvas de nível do modelo cúbico especial para a intensidade do sinal m/z para zeatina na cultivar IAPAR 59.



Os modelos linear e quadrático mostraram falta de ajuste para a rutina, na cultivar IAPAR 59, sendo assim o modelo cúbico especial foi usado, equação 2.

$$\hat{y} = +6,6 \times 10^3 \underset{(\pm 5738)}{acn} + 2,4 \times 10^4 \underset{(\pm 5738)}{Me} + 2,9 \times 10^4 \underset{(\pm 6286)}{A} + 2,3 \times 10^5 \underset{(\pm 30365)}{acn:A} + 1,6 \times 10^6 \underset{(\pm 30365)}{Me:A} - 1,1 \times 10^6 \underset{(\pm 202533)}{acn:Me:A}$$

[2]

O coeficiente para a acetona é um pouco maior do que o coeficiente do metanol. Aqui os termos quadráticos e o cúbico são significativos no nível de 95%. A análise de variância mostrou que não existe falta de ajuste e a regressão é estatisticamente significativa, Tabela 4. Suas curvas de nível estão apresentadas na Figura 4. Observa-se nessa Figura, que existe ponto de sela, ou seja, duas regiões de máximo. Os maiores valores de intensidade previstos para o íon rutina pelo modelo são obtidos com misturas binárias de *acn:A* (50%:50% v/v) ou *Me:A* (50%:50% v/v), sendo o melhor solvente extrator para a rutina a mistura *acn:A*, prevendo um valor de 70000.

Tabela 4 – Análise de variância para o ajuste do modelo cúbico especial da rutina para a cultivar IAPAR 59.

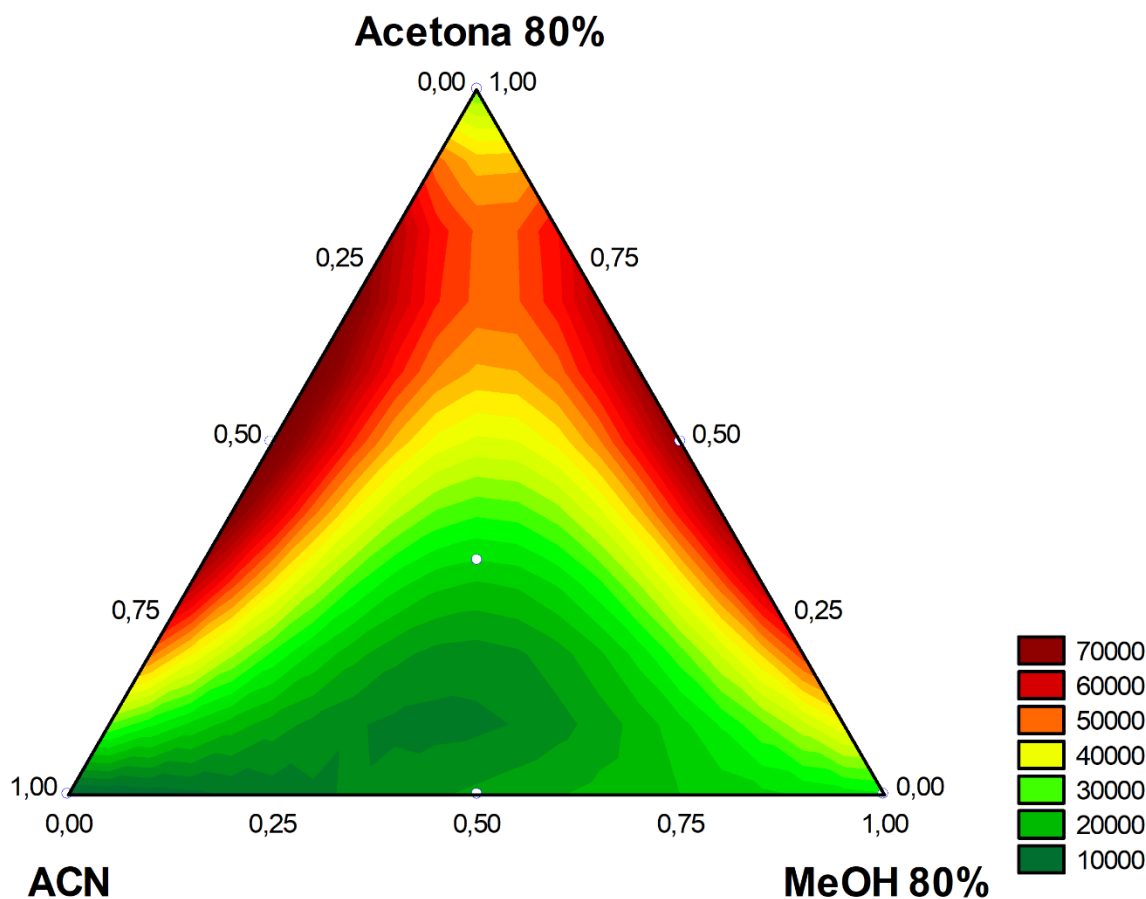
Metabólito	Soma quadrática	g. l.	Média quadrática	Valor de F calculado	Valor de F crítico	p
Rutina						
Regressão	8,58E+9	5	1,71E+9	21,72	3,69	1,83E-4
Resíduos	6,32E+8	8	7,90E+7			
Falta de ajuste	1,58E+6	1	1,58E+6	0,02	5,59	0,89
Erro Puro	6,30E+8	7	9,01E+7			
Total	9,21E+9	13	7,09E+8			

Para a mangiferina, na cultivar IAPAR 59, o modelo linear e o cúbico especial mostraram falta de ajuste, sendo assim o modelo quadrático foi usado, equação 3.

$$\hat{y} = +4,0 \times 10^4 \underset{(\pm 40253)}{acn} + 5,9 \times 10^4 \underset{(\pm 40253)}{Me} + 1,0 \times 10^5 \underset{(\pm 40253)}{A} + 1,1 \times 10^5 \underset{(\pm 185035)}{acn:Me} + 9,4 \times 10^5 \underset{(\pm 185035)}{acn:A} + 7,8 \times 10^5 \underset{(\pm 185035)}{Me:A}$$

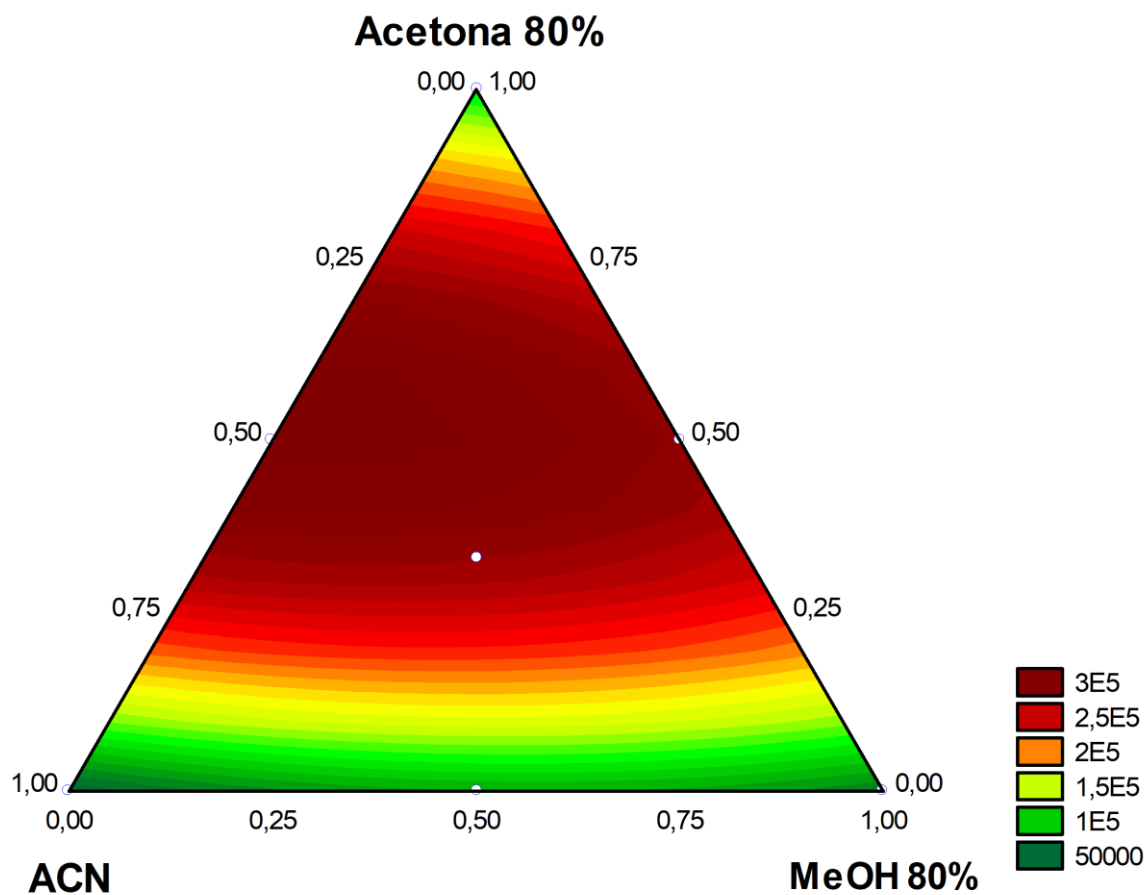
[3]

Figura 4. Curvas de nível do modelo cúbico especial para a intensidade do sinal m/z para rutina na cultivar IAPAR 59.



Observa-se que os coeficientes lineares e a interação *acn:Me* não são significativas no nível de 95%. Esse resultado mostra que acetonitrila, metanol ou a mistura binária de *acn:Me* não são bom extratores para a mangiferina. A análise de variância mostrou que não existe falta de ajuste, a razão da média quadrática da falta de ajuste pela média quadrática do erro puro foi $F_{cal} = 0,07$ enquanto que $F_{crit} = 5,59$ para 1 e 7 graus de liberdade. Suas curvas de nível estão apresentadas na Figura 5. A Tabela S₁ da ANOVA para a mangiferina pode ser vista no material suplementar.

Figura 5. Curvas de nível do modelo quadrático para a intensidade do sinal m/z para mangiferina na cultivar IAPAR 59.



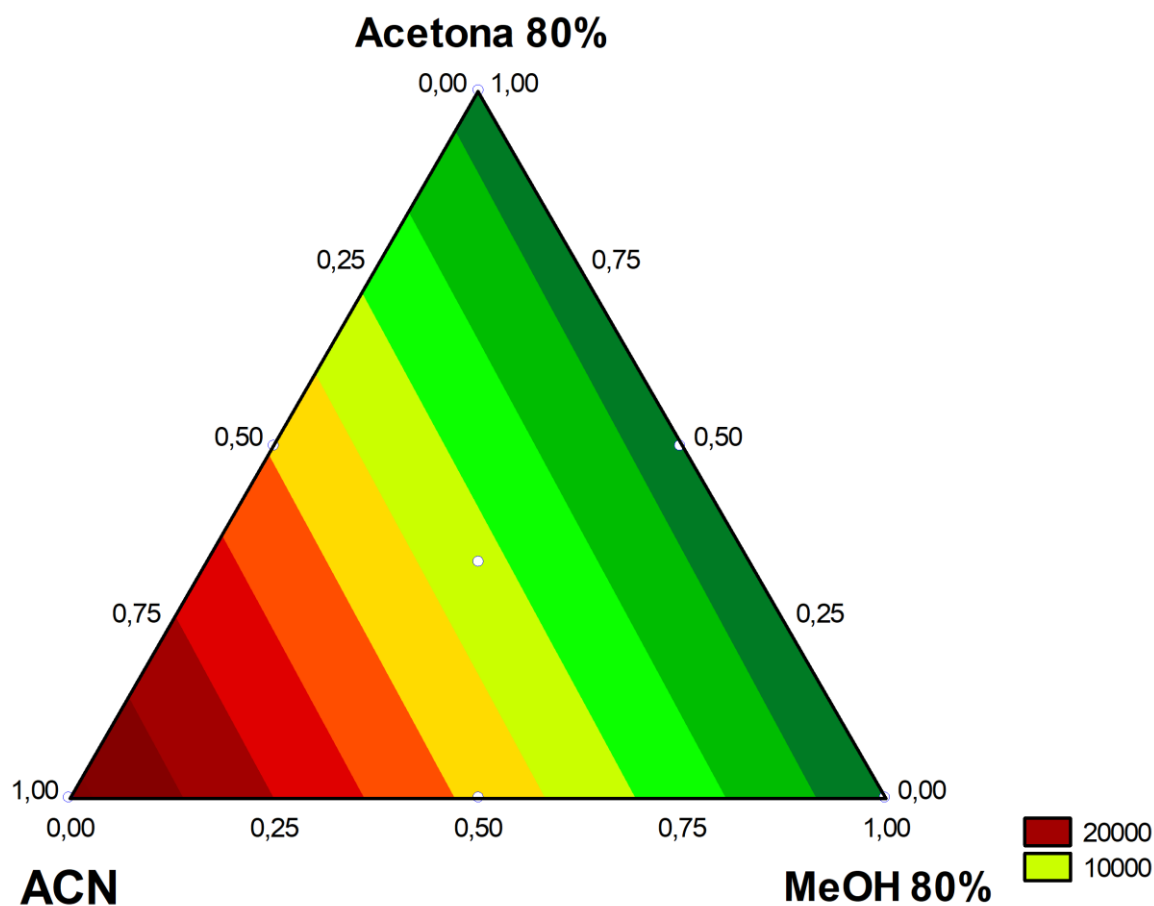
Observa-se nessa figura que o maior valor previsto de intensidade para o íon mangiferina pelo modelo são obtidos com misturas binárias de 60%A:40%*acn* (v/v) ou a mistura ternária em torno de 66%A:17%*Me*:17%*acn* (v/v/v). Considerando o custo dos reagentes pode-se escolher a mistura ternária como o melhor solvente extrator para a mangiferina, prevendo um valor de 3×10^5 .

Para o ácido jasmônico o modelo quadrático e o cúbico especial mostraram falta de ajuste, sendo assim o modelo linear foi usado. O único termo significativo no nível de 95% no modelo linear foi o coeficiente para a acetonitrila, equação 4.

$$\hat{y} = +23143_{(\pm 5443)} acn + 584_{(\pm 5443)} Me + 1288_{(\pm 5443)} A \quad [4]$$

A análise de variância mostrou que não existe falta de ajuste, a razão da média quadrática da falta de ajuste pela média quadrática do erro puro foi $F_{\text{cal}} = 1,12$ enquanto que $F_{\text{crit}} = 5,59$ para 4 e 7 graus de liberdade. A Tabela S₂ da ANOVA para o ácido jasmônico pode ser vista no material suplementar. Suas curvas de nível estão apresentadas na Figura 6. Observa-se nessa figura que o maior valor previsto de intensidade para o íon do ácido jasmônico pelo modelo linear, é obtido com acetonitrila pura, prevendo um valor de 20000.

Figura 6. Curvas de nível do modelo cúbico especial para a intensidade do sinal m/z para ácido jasmônico na cultivar IAPAR 59.



Na cultivar IPR 106, para a zeatina, os modelos linear e quadrático apresentaram falta de ajuste, sendo assim o modelo cúbico especial foi usado para a

modelagem. Os coeficientes significativos estão destacados em vermelho na equação 5. O maior coeficiente linear foi apresentado pela acetonitrila seguido do metanol 80%. Dos coeficientes dos termos quadráticos apenas a mistura metanol 80%:Acetona 80% (1:1 v/v) foi significativo e o termo cúbico é significativo no nível de 95%.

$$\hat{y} = +1105_{(\pm 218)} acn + 585_{(\pm 218)} Me + 477_{(\pm 239)} A + 2072_{(\pm 1158)} acn : A + 3959_{(\pm 1158)} Me : A + 40732_{(\pm 7724)} acn : Me : A$$

[5]

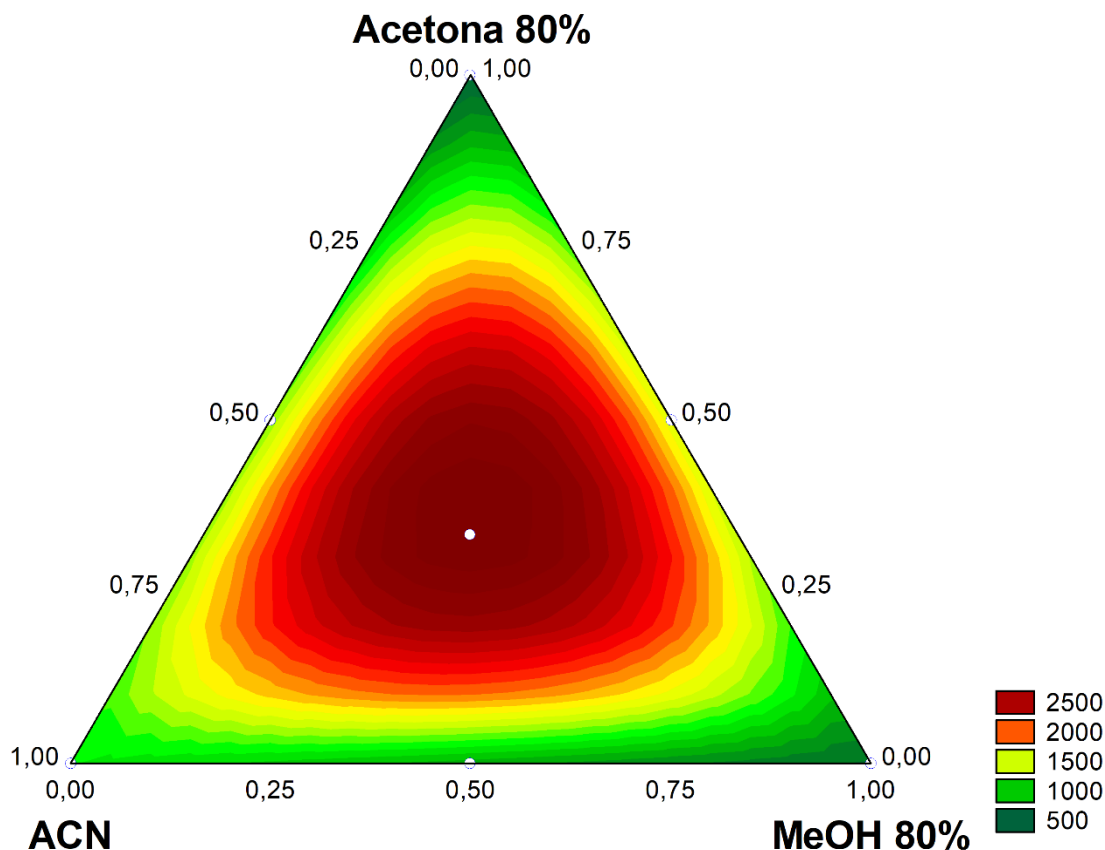
O resultado da análise de variância mostrou que não existe falta de ajuste, porque a razão entre as médias quadráticas da falta de ajuste e do erro puro (MQfaj/MQep) foi menor que o F crítico (F_{crit}) no nível de 95% de confiança, tabela 5.

Tabela 5 – Análise de variância para o ajuste do modelo cúbico especial da zeatina para a cultivar IPR 106.

Metabólito	Soma quadrática	g. l.	Média quadrática	Valor de F calculado	Valor de F crítico	p
Zeatina						
Regressão	8,05E+6	5	1,61E+6	14,01	3,69	0,0008
Resíduos	9,19E+5	8	1,14E+5			
Falta de ajuste	4921	1	4921	0,04	5,59	0,8516
Erro Puro	9,14E+5	7	1,30E+5			
Total	8,97E+6	13	6,90E+5			

Suas curvas de nível estão apresentadas na Figura 7. Os maiores valores de intensidade para o íon zeatina previsto pelo modelo são obtidos no centro do triângulo indicando que a mistura ternária *acn:Me:A* (1:1:1 v/v/v) é o melhor solvente extrator para esse fitohormônio, prevendo um valor de 2500.

Figura 7. Curvas de nível do modelo cúbico especial para a intensidade do sinal m/z para zeatina na cultivar IPR 106.



Para a rotina, na cultivar IPR 106, os modelos linear e quadrático mostraram falta de ajuste, sendo assim o modelo cúbico especial foi usado, equação 6

$$\hat{y} = +9,5 \times 10^3 acn + 2,0 \times 10^4 Me + 2,0 \times 10^4 A + 1,3 \times 10^5 acn:A + 1,5 \times 10^5 Me:A - 6,8 \times 10^5 acn:Me:A$$

(± 58267) (± 58267) (± 63698) $(\pm 2,9 \times 10^5)$ $(\pm 2,9 \times 10^5)$

[6]

O único termo não significativo foi a acetonitrila, mas a sua mistura acn:A apresentou valores significativos, bem como da mistura Me:A, indicando um efeito sinérgico. Aqui os termos quadráticos e o cúbico são significativos no nível de 95%. A análise de variância mostrou que não existe falta de ajuste e a regressão é estatisticamente significativa, Tabela 6. Suas curvas de nível estão apresentadas na Figura 8. Observa-se nessa Figura, que

existe ponto de sela, ou seja, duas regiões de máximo. Os maiores valores de intensidade previstos para o íon rutina pelo modelo são obtidos com misturas binárias de *acn:A* (50%:50% v/v) ou *Me:A* (50%:50% v/v), sendo o melhor solvente extrator para a rutina a mistura *Me:A*, prevendo um valor de 50000.

Tabela 6 – Análise de variância para o ajuste do modelo cúbico especial da rutina para a cultivar IAPAR 59.

Metabólito	Soma quadrática	g. l.	Média quadrática	Valor de F calculado	Valor de F crítico	p
Rutina						
Regressão	4,02+9	5	8,05E+8	6,34	3,69	0,01
Resíduos	1,01E+9	8	1,27E+8			
Falta de ajuste	6,83E+5	1	6,83E+5	4,71E-3	5,59	0,95
Erro Puro	1,01E+9	7	1,45E+8			
Total	5,04E+9	13	3,87E+8			

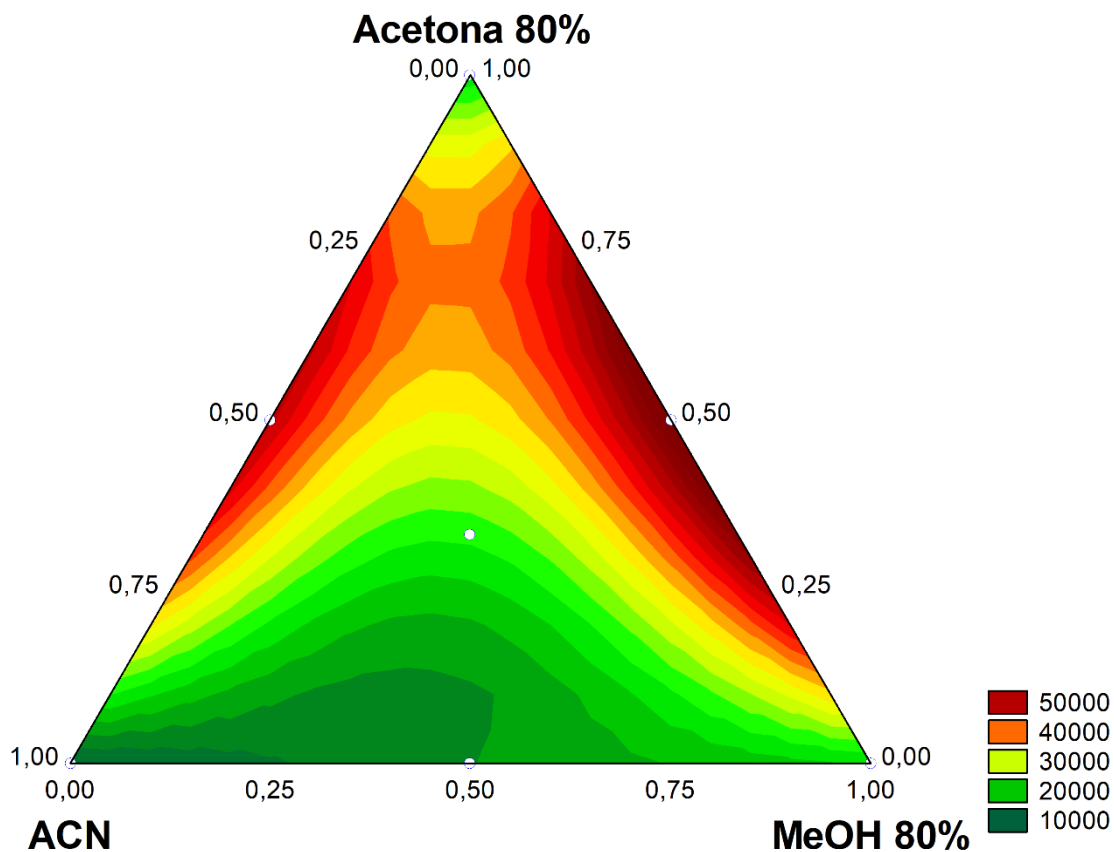
Para a mangiferina, na cultivar IPR 106, o modelo linear e o cúbico especial mostraram falta de ajuste, sendo assim o modelo quadrático foi usado, equação 7.

$$\hat{y} = +6,0 \times 10^4 acn + 9,6 \times 10^4 Me + 8,9 \times 10^4 A + 9,4 \times 10^5 acn:A + 8,3 \times 10^5 Me:A$$

(± 58267) (± 58267) (± 63698) $(\pm 2,9 \times 10^5)$ $(\pm 2,9 \times 10^5)$

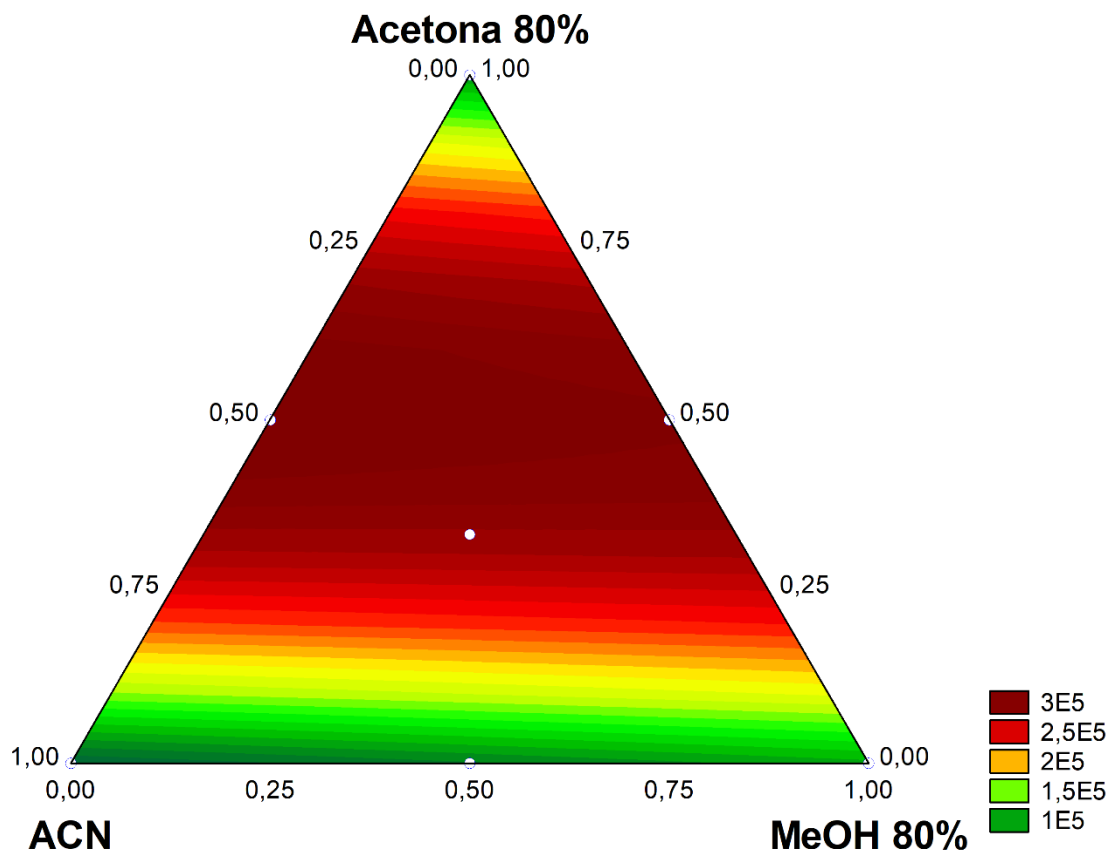
[7]

Figura 8. Curvas de nível do modelo cúbico especial para a intensidade do sinal m/z para rutina na cultivar IPR 106.



Observa-se que os coeficientes lineares não são significativas no nível de 95%. Esse resultado mostra que acetonitrila e metanol 80% não são bons extratores para a mangiferina. A análise de variância mostrou que não existe falta de ajuste, a razão da média quadrática da falta de ajuste pela média quadrática do erro puro foi F calculado (F_{cal}) = 0,07 enquanto que F_{crit} = 5,59 para 1 e 7 graus de liberdade. Suas curvas de nível estão apresentadas na Figura 9. A Tabela S₃ da ANOVA para a mangiferina na cultivar IPR 106 pode ser vista no material suplementar.

Figura 9. Curvas de nível do modelo quadrático para a intensidade do sinal m/z para mangiferina na cultivar IPR 106.



Observa-se nessa figura que o maior valor previsto de intensidade para o íon mangiferina pelo modelo são obtidos com misturas binárias de 60%A:40%acn (v/v) e 50%Me:50%A ou a mistura ternária em torno de 66%A:17%Me:17%acn (v/v/v). Considerando o custo dos reagentes pode-se escolher a mistura binária Me:A (1:1 v/v) como o melhor solvente extrator para a mangiferina, prevendo um valor de $3e^{+5}$.

Para o ácido jasmônico os modelos quadrático e cúbico especial mostraram falta de ajuste, sendo assim o modelo linear foi usado. O único termo significativo no nível de 95% no modelo linear foi o coeficiente para a acetonitrila, equação 8.

$$\hat{y} = +10417_{(\pm 1072)} acn + 3413_{(\pm 1072)} Me + 2916_{(\pm 1072)} A \quad [8]$$

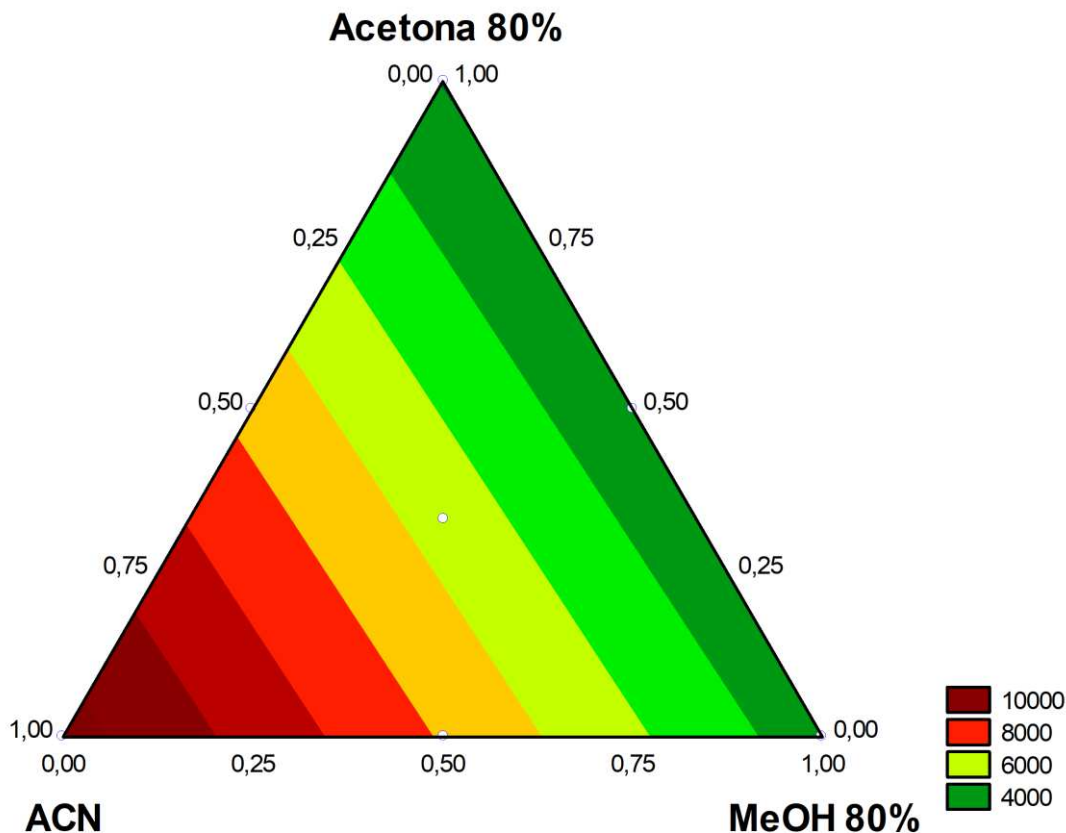
A análise de variância mostrou que não existe falta de ajuste, a razão da média quadrática da falta de ajuste pela média quadrática do erro puro foi $F_{cal} = 1,12$ enquanto que $F_{crit} = 5,59$ para 4 e 7 graus de liberdade. A Tabela S₄ da ANOVA para o ácido jasmônico pode ser vista no material suplementar. Suas curvas de nível estão apresentadas na Figura 10.

Observa-se nessa figura que o maior valor previsto de intensidade para o íon do ácido jasmônico pelo modelo linear, é obtido com acetonitrila pura, prevendo um valor de 10000.

A Figura 11a-11b mostra os gráficos de barra das concentrações relativas dos fitohormônios e dos metabólitos, mangiferina e rutina, para IAPAR 59 e IPR 106.

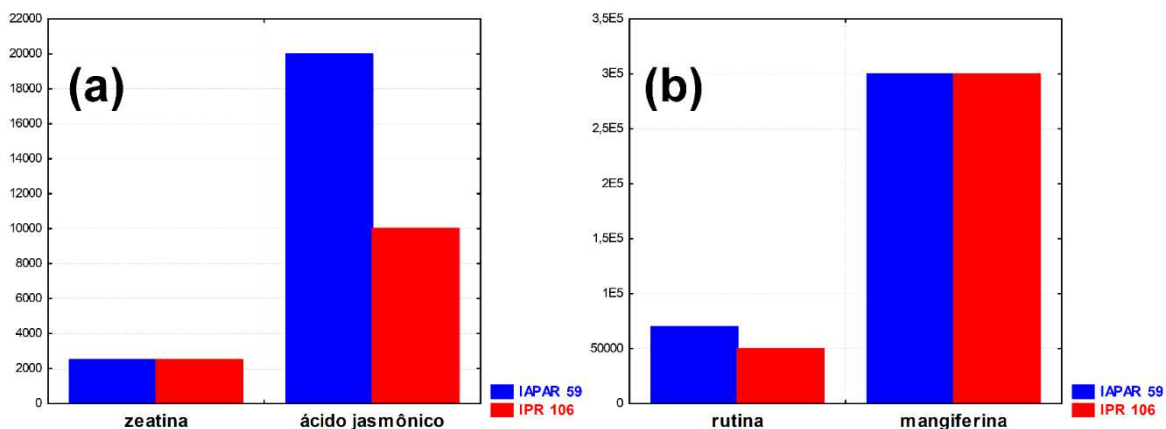
Na Figura 11a observa-se que a abundância relativa para a zeatina nas duas cultivares são semelhantes enquanto que a abundância relativa do ácido jasmônico para a cultivar IAPAR 59 é o dobro da cultivar IPR 106.

Figura 10. Curvas de nível do modelo cúbico especial para a intensidade do sinal m/z para mangiferina na cultivar IPR106.



Na Figura 11b observa-se um leve aumento na abundância relativa da rutina para IAPAR 59 é ligeiramente maior que para a IPR 106, enquanto que a abundância relativa para a mangiferina é igual para as duas cultivares.

Figura 11. Gráfico de barras das concentrações relativas dos metabólitos estudados para ambas as cultivares.



4. CONCLUSÃO

A composição da mistura do ponto central do planejamento, acetonitrila:metanol 80%:acetona 80% (1:1:1 v/v/v), apresentou melhor eficiência para extração de zeatina para ambas cultivares.

Para a rutina a melhor fase extratora é composta por acn:A para o IAPAR 59 e Me:A para a IPR 106. Para mangiferina as maiores abundâncias relativas foram obtidas com a mistura binária acn:A (60:40) ou mistura ternária (66:17:17) para IAPAR 59 e IPR 106 e acetonitrila para o ácido jasmônico para as duas cultivares.

A abundância relativa do ácido jasmônico foi muito maior do que a da zeatina, em ambas as cultivares, esta diferença de concentração pode ser explicada pelo efeito de inibição que estes dois fitohormônios tem entre si. A mangiferina mostrou uma concentração superior à da rutina nas duas cultivares, o que pode ser ocasionado pela presença da citocinina (zeatina) pois este fitohormônio inibe a rutina e pode aumentar significativamente a concentração da mangiferina. A cultivar IAPAR 59 apresentou maior abundância relativa de rutina, em torno de 40% maior do que na cultivar IPR 106, e do ácido jasmônico o dobro em relação a cultivar IPR 106.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Pospisilová, J. Interaction of Cytokinins and Abscisic Acid during Regulation of Stomatal Opening in Bean Leaves. *Photosynthetica* **2003**, *41* (1), 49–56.
- (2) Monni, S.; Uhlig, C.; Hansen, E.; Magel, E. Ecophysiological Responses of *Empetrum Nigrum* to Heavy Metal Pollution. *Environ. Pollut.* **2001**, *112* (2), 121–129.
- (3) Atici, Ö.; Açar, G.; Battal, P. Changes in Phytohormone Contents in Chickpea Seeds Germinating under Lead or Zinc Stress. *Biol. Plant.* **2005**, *49* (2), 215–222.
- (4) Messing, S. A. J.; Gabelli, S. B.; Echeverria, I.; Vogel, J. T.; Guan, J. C.; Tan, B. C.; Klee, H. J.; McCarty, D. R.; Amzel, L. M. Structural Insights into Maize Viviparous14, a Key Enzyme in the Biosynthesis of the Phytohormone Abscisic Acid. *Plant Cell* **2010**, *22* (9), 2970–2980.
- (5) Skoog, F.; Strong, F. M.; Miller, C. O. Cytokinins. *Science* (80-). **1965**, *148*, 532–534.
- (6) Werner, T.; Motyka, V.; Strnad, M.; Schmülling, T. Regulation of Plant Growth by Cytokinin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, *98* (18), 10487–10492.
- (7) Mok, M. C. In Cytokinins Chemistry, Activity and Function. In *Cytokinins Chemistry, Activity and Function*; CRC: Boca Raton, FL., 1994.
- (8) Miller, C. O.; Skoog, F.; Von Saltza, M. H.; Strong, F. M. Kinetin, a Cell Division Factor from Deoxyribonucleic Acid. *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77* (5), 1392.
- (9) Letham, D. S. No Title. *Life Sci.* **1963**, No. 2, 569.
- (10) Vermeulen, K.; Strnad, M.; Krystof, V.; Havlíček, L.; Aa, A. Van Der; Lenjou, M.; Nijs, G.; Rodrigus, I.; Stockman, B. Antiproliferative Effect of Plant Cytokinin

- Analogues with an Inhibitory Activity on Cyclin-Dependent Kinases. *Leukemia* **2002**, *16*, 299–305.
- (11) Rattan, S. I. S.; Sodagam, L. Gerontomodulatory and Youth-Preserving Effects of Zeatin on Human Skin Fibroblasts Undergoing Aging In Vitro. *Rejuvenation Res.* **2005**, *8* (1), 46–57.
- (12) Aremu, A. O.; Bairu, M. W.; Szücová, L.; Dolezal, K.; Finnie, J. F.; Van Staden, J. Assessment of the Role of Meta-Topolins on in Vitro Produced Phenolics and Acclimatization Competence of Micropropagated ‘Williams’ Banana. *Acta Physiol. Plant.* **2012**, No. 34, 2265–2273.
- (13) Lee, Y.; Lee, D. E.; Lee, H. S.; Kim, S. K.; Lee, W. S.; Kim, S. H.; Kim, M. W. Influence of Auxins, Cytokinins, and Nitrogen on Production of Rutin from Callus and Adventitious Roots of the White Mulberry Tree (*Morus Alba* L.). *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* **2011**, *105* (1), 9–19.
- (14) Gabr, A. M. M.; Arafa, N. M.; El-Ashry, A. A. E. L.; El-Bahr, M. K. Impact of Zeatin and Thidiazuron on Phenols and Flavonoids Accumulation in Callus Cultures of Gardenia (*Gardenia Jasminoides*). *Pakistan J. Biol. Sci.* **2017**, *20* (7), 328–335.
- (15) Stoyanova-Bakalova, E.; Nikolova, M.; Maksymiec, W. Effects of Cu²⁺, Cytokinins and Jasmonate on Content of Two Flavonols Identified in Zucchini Cotyledons. *ACTA Biol. CRACOVENSIA Ser. Bot.* **2009**, *51* (2), 77–83.
- (16) Gullón, B.; Lú-Chau, T. A.; Moreira, M. T.; Lema, J. M.; Eibes, G. Rutin: A Review on Extraction, Identification and Purification Methods, Biological Activities and Approaches to Enhance Its Bioavailability. *Trends Food Sci. Technol.* **2017**, *67*, 220–235.
- (17) Moghaddasian, B.; Eradatmand Asli, D.; Alaghemand, A. Simultaneous

- Determination of Rutin and Quercetin in Different Parts of Capparis Spinosa. *Bull. Environ. Pharmacol. Life Sci.* **2013**, *2* (January), 35–38.
- (18) Seal, T. Quantitative HPLC Analysis of Phenolic Acids , Flavonoids and Ascorbic Acid in Four Different Solvent Extracts of Two Wild Edible Leaves , Sonchus Arvensis and Oenanthe Linearis of North-Eastern Region in India. *J. Appl. Pharm. Sci.* **2016**, *6* (02), 157–166.
- (19) Mocan, A.; Crişan, G.; Vlase, L.; Crişan, O.; Vodnar, D. C.; Raita, O.; Gheldiu, A. M.; Toiu, A.; Oprean, R.; Tilea, I. Comparative Studies on Polyphenolic Composition, Antioxidant and Antimicrobial Activities of Schisandra Chinensis Leaves and Fruits. *Molecules* **2014**, *19* (9), 15162–15179.
- (20) Mocan, A.; Vlase, L.; Vodnar, D. C.; Gheldiu, A. M.; Oprean, R.; Crisan, G. Antioxidant, Antimicrobial Effects and Phenolic Profile of Lycium Barbarum L. Flowers. *Molecules* **2015**, *20* (8), 15060-15071A.
- (21) Benedec, D.; Hanganu, D.; Oniga, I.; Filip, L.; Bischin, C.; Silaghi-Dumitrescu, R.; Tiperciuc, B.; Vlase, L. Achillea Schurii Flowers: Chemical, Antioxidant, and Antimicrobial Investigations. *Molecules* **2016**, *21* (8), 1–12.
- (22) Kreft, S. Rutin in Buckwheat Herbs Grown at Different UV-B Radiation Levels: Comparison of Two UV Spectrophotometric and an HPLC Method. *J. Exp. Bot.* **2002**, *53* (375), 1801–1804.
- (23) Yang, J.; Guo, J.; Yuan, J. In Vitro Antioxidant Properties of Rutin. *LWT - Food Sci. Technol.* **2008**, *41* (6), 1060–1066.
- (24) Grinberg, L. N.; Rachmilewitz, E. A.; Newmarks, H. Protective Effects of Rutin Against Hemoglobin Oxidation. *Biochem. Pharmacol.* **1994**, *48* (4), 643–649.
- (25) Selloum, L.; Bouriche, H.; Tigrine, C.; Boudoukha, C. Anti-Inflammatory Effect of

- Rutin on Rat Paw Oedema, and on Neutrophils Chemotaxis and Degranulation. *Exp. Toxicol. Pathol.* **2003**, *54* (4), 313–318.
- (26) Ghorbani, A. Mechanisms of Antidiabetic Effects of Flavonoid Rutin. *Biomed. Pharmacother.* **2017**, *96* (September), 305–312.
- (27) Mahdieh, M.; Noori, M.; Hoseinkhani, S. Studies of *in Vitro* Adventitious Root Induction and Flavonoid Profiles in *Rumex Crispus*. *Adv. Life Sci.* **2015**, *5* (3), 53–57.
- (28) Hinneburg, I.; Neubert, R. H. H. Influence of Extraction Parameters on the Phytochemical Characteristics of Extracts from Buckwheat (*Fagopyrum Esculentum*) Herb. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53* (1), 3–7.
- (29) Fotie, J.; Bohle, D. Pharmacological and Biological Activities of Xanthones. *Antiinfect. Agents Med. Chem.* **2006**, *5* (1), 15–31.
- (30) Dević, M.; Momčilović, I.; Krstić, D.; Maksimović, V.; Konjević, R. In Vitro Multiplication of Willow Gentian (*Gentiana Asclepiadea* L.) and the Production of Gentiopicroside and Mangiferin. *Phyt. - Ann. Rei Bot.* **2006**, *46* (1), 45–54.
- (31) Wauthoz, N.; Balde, A. Ethnopharmacology of *Mangifera Indica* L. Bark and Pharmacological Studies of Its Main C-Glucosylxanthone, Mangiferin. *Int. J. Biomed. Pharm. Sci.* **2007**, *1* (2), 112–119.
- (32) Richardson, P. M. Review The Taxonomic Significance of C-Glycosylxanthones in Flowering Plants The Angiosperms in Which Mangiferin and Other C-. **1983**, *11* (4), 371–375.
- (33) Richardson, P. M. The Taxonomic Significance of Xanthones in Ferns. *Biochem. Syst. Ecol.* **1984**, *12* (1), 1–6.
- (34) Talamond, P.; Mondolot, L.; Gargadennec, A.; de Kochko, A.; Hamon, S.; Fruchier, A.; Campa, C. First Report on Mangiferin (C-Glucosyl-Xanthone) Isolated from

Leaves of a Wild Coffee Plant, *Coffea Pseudozanguebariae* (Rubiaceae). *Acta Bot. Gall.* **2008**, *155* (4), 513–519.

- (35) Miura, T.; Ichiki, H.; Hashimoto, I.; Iwamoto, N.; Kao, M.; Kubo, M.; Ishihara, E.; Komatsu, Y.; Okada, M.; Ishida, T.; et al. Antidiabetic Activity of a Xanthone Compound, Mangiferin. *Phytomedicine* **2001**, *8* (2), 85–87.
- (36) Luo, F.; Lv, Q.; Zhao, Y.; Hu, G.; Huang, G.; Zhang, J.; Sun, C.; Li, X.; Chen, K. Quantification and Purification of Mangiferin from Chinese Mango (*Mangifera Indica* L.) Cultivars and Its Protective Effect on Human Umbilical Vein Endothelial Cells under H₂O₂-Induced Stress. *Int. J. Mol. Sci.* **2012**, *13* (9), 11260–11274.
- (37) Singh, S. K.; Kumar, Y.; Kumar, S. S.; Sharma, V. K.; Dua, K.; Samad, a. Antimicrobial Evaluation of Mangiferin Analogues. *Indian J. Pharm. Sci.* **2009**, *71* (3), 328–331.
- (38) Perrucci, S.; Fichi, G.; Buggiani, C.; Rossi, G.; Flamini, G. Efficacy of Mangiferin against *Cryptosporidium Parvum* in a Neonatal Mouse Model. *Parasitol. Res.* **2006**, *99* (2), 184–188.
- (39) Dar, A.; Faizi, S.; Naqvi, S.; Roome, T.; Zikr-ur-Rehman, S.; Ali, M.; Firdous, S.; Moin, S. T. Analgesic and Antioxidant Activity of Mangiferin and Its Derivatives: The Structure Activity Relationship. *Biol. Pharm. Bull.* **2005**, *28* (4), 596–600.
- (40) Augustyn, W. A.; Regnier, T.; Combrinck, S.; Botha, B. M. Metabolic Profiling of Mango Cultivars to Identify Biomarkers for Resistance against *Fusarium* Infection. *Phytochem. Lett.* **2014**, *10*, civ–cx.
- (41) Kaur, A.; Kaur, N. Mango Malformation: A Fungal Disease, Physiological Disorder or Malady of Stress. *J. Appl. Nat. Sci.* **2018**, *10* (1), 403–409.
- (42) Seo, H. S.; Kim, S. K.; Jang, S. W.; Choo, Y. S.; Sohn, E. Y.; Lee, I. J. Effect of

- Jasmonic Acid on Endogenous Gibberellins and Abscisic Acid in Rice under NaCl Stress. *Biol. Plant.* **2005**, *49* (3), 447–448.
- (43) Horbowicz, M.; Mioduszevska, H.; Koczkodaj, D.; Saniewski, M. THE EFFECT OF Cis -JASMONE , JASMONIC ACID AND METHYL JASMONATE ON ACCUMULATION OF ANTHOCYANINS AND PROANTHOCYANIDINS IN SEEDLINGS OF COMMON BUCKWHEAT (FAGOPYRUM ESCULENTUM MOENCH). *Acta Soc. Bot. Pol.* **2009**, *78* (4), 271–277.
- (44) Andolfi, A.; Maddau, L.; Cimmino, A.; Linaldeddu, B. T.; Basso, S.; Deidda, A.; Serra, S.; Evidente, A. Phytochemistry Lasiojasmonates A – C , Three Jasmonic Acid Esters Produced by Lasiodiplodia Sp ., a Grapevine Pathogen. *Phytochemistry* **2014**, *103*, 145–153.
- (45) Howe, G. A.; Lightner, J.; Browse, J.; Ryan, C. A. An Octadecanoid Pathway Mutant (JL5) of Tomato 1 s Compromised in Signaling for Defense against Insect Attack. *Am. Soc. Plant Physiol.* **1996**, *8* (November), 2067–2077.
- (46) McConn, M.; Creelman, R. A.; Bell, E.; Mullet, J. E.; Browse, J. Jasmonate Is Essential for Insect Defense in Arabidopsis. *Plant Biol.* **1997**, *94* (May), 5473–5477.
- (47) Wasternack, C. Jasmonates : An Update on Biosynthesis , Signal Transduction and Action in Plant Stress Response , Growth and Development. *Ann. Bot.* **2007**, *100*, 681–697.
- (48) Weidhase, A.; Lehmann, J.; Krameu, H.; Sembdner, G. Degradation of Ribulose-1, 5-Bisphosphate Carboxylase and Chlorophyll in Senescing Barley Leaf s ^ Iments Triggered by Jasmonic Acid Methyl ^ Ter , and Counteraction by Cytokinin. *Physiol. Plant.* **1987**, *69*, 161–166.
- (49) Ueda, J.; Kato, J. Inhibition of Cytokinin-Induced Plant Growth by Jasmonic Acid and

- Its Methyl Ester. *Physiol. Plant.* **1982**, *54*, 249–253.
- (50) Tamogami, S.; Rakwal, R.; Kodama, O. Rice Leaves (*Oryza Sativa L.*) Is under the Control of Cytokinins And. *FEBS Lett.* **1997**, *412* (1), 61–64.
- (51) Sano, H.; Seo, S.; Koizumi, N.; Niki, T.; Iwamura, H.; Ohashi, Y. Regulation by Cytokinins of Endogenous Levels of Jasmonic and Salicylic Acids in Mechanically Wounded Tobacco Plants. *Plant Cell Physiol.* **1996**, *37* (6), 762–769.
- (52) Biondi, S.; Scoccianti, V.; Scaramagli, S.; Ziosi, V.; Torrigiani, P. Auxin and Cytokinin Modify Methyl Jasmonate Effects on Polyamine Metabolism and Ethylene Biosynthesis in Tobacco Leaf Discs. *Plant Sci.* **2003**, *165*, 95–101.
- (53) Kapuscinska, A.; Olejnik, A.; Nowak, I. The Conjugate of Jasmonic Acid and Tetrapeptide Compound †. **2016**, 9007–9011.
- (54) Rivier, L.; Crozier, A. *Principles and Practice of Plant Hormone Analysis*; Academic Press: London, 1987.
- (55) Hooykaas, P. J. J.; Hall, M. A.; Libbenga, K. R. *Biochemistry and Molecular Biology of Plant Hormones*; Elsevier: Amsterdam, 1999.
- (56) Fujita, S.; Ohnishi, T.; Watanabe, B.; Yokota, T.; Takatsuto, S.; Fujioka, S.; Yoshida, S. Arabidopsis CYP90B1 Catalyses the Early C-22 Hydroxylation of C 27 , C 28 and C 29 Sterols. *Plant J.* **2006**, *45*, 765–774.
- (57) Mueller, M. J.; Mène-Saffrané, L.; Grun, C.; Karg, K.; Farmer, E. E.; Mueller, M. J.; Me, L. Oxylin Analysis Methods. *Plant J.* **2006**, *45*, 472–489.
- (58) Hedden, P. QUANTITATIVE ANALYSIS OF. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **1993**, *44* (12), 107–129.
- (59) Brenner, M. L. Modern Methods for Plant Grow Substance Analysis. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **1981**, *32*, 511–538.

- (60) Tucker, G. A.; Roberts, J. A. Plant Hormone Protocols. In *Methods in Molecular Biology*; Humana Press: Totowa, 2000; p 141.
- (61) Barkawi, L. S.; Tam, Y.; Tillman, J. A.; Pederson, B.; Calio, J.; Al-amier, H.; Emerick, M.; Normanly, J.; Cohen, J. D. A High-Throughput Method for the Quantitative Analysis of Indole-3-Acetic Acid and Other Auxins from Plant Tissue Q. *Anal. Biochem.* **2008**, *372*, 177–188.
- (62) Tivendale, N. D.; Cohen, J. D. Analytical History of Auxin. *J. Plant Growth Regul.* **2015**, *34* (4), 708–722.
- (63) Atsuda, F. M.; Iyazawa, H. M.; Akasa, K. W.; Iyagawa, H. M. Quantification of Indole-3-Acetic Acid and Amino Acid Conjugates in Rice by Liquid Chromatography – Electrospray Ionization – Tandem Mass Spectrometry. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2005**, *69* (4), 778–783.
- (64) Völksch, B.; Bublitz, F.; Fritsche, W. Coronatine Production by *Pseudomonas Syringae* Pathovars: Screening Method and Capacity of Product Formation. *J. Basic Microbiol.* **1989**, *7*, 463–468.
- (65) Morris, R. O.; Blevins, D. G.; Dietrich, J. T.; Durleyd, R. C. Cytokinins in Plant Pathogenic Bacteria and Developing Cereal Grains. *Aust. J. Plant Physiol.* **1993**, *20*, 621–637.
- (66) Kowalska, M.; Tian, F.; Smehilová, M.; Galuszka, P.; Frébort, I.; Napier, R.; Dale, N. Prussian Blue Acts as a Mediator in a Reagentless Cytokinin Biosensor. *Anal. Chim. Acta* **2011**, *701*, 218–223.
- (67) Bjorkman, P.; Tillberg, E. Acetylation of Cytokinins and Modified Adenine Compounds: A Simple and Non-Destructive Derivatization Method for Gas Chromatography-Mass Spectrometric Analysis. *Phytochem. Anal.* **1996**, *7*, 57–68.

- (68) Liu, B.; Zhong, X.; Lu, Y. Analysis of Plant Hormones in Tobacco Flowers by Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography Coupled with On-Line Large Volume Sample Stacking. *J. Chromatogr. A* **2002**, *945*, 257–265.
- (69) Ma, Z.; Ge, L.; Lee, A. S. Y.; Wan, J.; Yong, H.; Ngin, S.; Shi, E. Simultaneous Analysis of Different Classes of Phytohormones in Coconut (*Cocos Nucifera* L .) Water Using High-Performance Liquid Chromatography and Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry after Solid-Phase Extraction. *Anal. Chim. Acta* **2008**, *610*, 274–281.
- (70) Almeida-Trapp, M.; Mithöfer, A. Quantification of Phytohormones by HPLC-MS/MS Including Phytoplasma-Infected Plants. In *Methods in Molecular Biology*; Humana Press: New York, 2019; Vol. 1875, pp 345–358.
- (71) Zou, Y.; Meng, L.; Cui, M.; Zhao, J.; He, M.; Kim, J.; Zou, Y.; Meng, L.; Cui, M.; Zhao, J.; et al. Fast On-Fiber Derivatization and GC / MS Analysis of Phytohormones in Wheat Based on Pencil-Type Coated Carbon Fibers. *Food Chem.* **2018**.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela S₁ – Análise de variância para o ajuste do modelo quadrático da cultivar IAPAR 59.

Metabólito	Soma quadrática	g. l.	Média quadrática	Valor de F calculado	Valor de F crítico	p
Mangiferina						
Regressão	1,65E+11	5	3,30E+10	10,11	3,69	2,63E-3
Resíduos	2,61E+10	8	3,26E+9			
Falta de ajuste	4,22E+7	1	4,22E+7	0,01	5,59	0,91
Erro Puro	2,60E+10	7	3,72E+9			
Total	1,91E+11	13	1,47E+10			

Tabela S₂ – Análise de variância para o ajuste do modelo linear da cultivar IAPAR 59.

Metabólito	Soma quadrática	g. l.	Média quadrática	Valor de F calculado	Valor de F crítico	p
Ácido Jasmônico						
Regressão	8,22E+8	2	4,11E+8	4,69	3,98	0,0336
Resíduos	9,64E+8	11	8,76E+7			
Falta de ajuste	3,76E+8	4	9,41E+7	1,12	4,12	0,4181
Erro Puro	5,87E+8	7	8,39E+7			
Total	1,78E+9	13	1,37E+8			

Tabela S₃ – Análise de variância para o ajuste do modelo quadrático da cultivar IPR 106.

Metabólito	Soma quadrática	g. l.	Média quadrática	Valor de F calculado	Valor de F crítico	p
Mangiferina						
Regressão	1,81E+11	5	3,62E+10	5,14	3,69	0,02
Resíduos	5,63E+10	8	7,042E+9			
Falta de ajuste	5,87E+8	1	5,87E+8	0,07	5,59	0,79
Erro Puro	5,57E+10	7	7,96E+9			
Total	2,37E+11	13	1,82E+10			

Tabela S₄ – Análise de variância para o ajuste do modelo linear da cultivar IPR 106.

Metabólito	Soma quadrática	g. l.	Média quadrática	Valor de F calculado	Valor de F crítico	p
Ácido						
Jasmônico						
Regressão	8,73E+7	2	4,36E+7	12,83	3,98	0,0013
Resíduos	3,74E+7	11	3,40E+6			
Falta de ajuste	2,14E+7	4	5,36E+6	2,35	4,12	0,1519
Erro Puro	1,59E+7	7	2,27E+6			
Total	1,24E+8	13	9,59E+6			

CONCLUSÃO GERAL



CONCLUSÃO GERAL

Com a aplicação do planejamento de misturas simplex-centroide aos dados obtidos por espectroscopia de RMN foi possível encontrar a mistura dos três componentes (*acn*, *Me* e *A*) que apresentou a maior concentração relativa dos sinais do padrão AIA, que foi utilizado para fortificar extratos de folha de *Coffea arabica*, a mistura *acn:Me:A* (1:1:1 v/v/v) foi a que apresentou a maior concentração deste fitohormônio.

A AH mostrou que a fase extratora metanol 80% traz uma característica aos extratos que se sobressai se comparada as outras componentes puras do planejamento utilizado. A aplicação da ACP na região de campo alto dos espectros de RMN ¹H indicou uma separação dos extratos baseado na basicidade da fase extratora, enquanto que a mesma análise na região de campo médio dos mesmos extratos identificou a separação do solvente acetonitrila das outras, possivelmente por ser a única fase extratora que não continha água na sua composição. Esta região dos espectros de RMN ¹H também apresentou as fases extradoras *acn*, *Me*, *A* e *acn:A* que mostraram uma separação entre as duas cultivares analisadas (IAPAR 59 e IPR 106).

A análise por espectrometria de massa dos extratos mostrou que o principal caminho para a biossíntese das auxinas nas folhas de *Coffea arabica* é a via triptofano-triptamina-indol-3-acetaldeído-AIA. Também foi possível identificar vários conjugados da auxina, indicando que a maior parte do AIA não está na sua forma livre nas amostras analisadas. Com a utilização das curvas de níveis foi possível identificar o melhor solvente extrator para

os precursores do AIA, assim como para seus conjugados. A soma da concentração relativa do AIA-conjugado foi maior do que a de seus precursores.

Os espectros de massa também apresentaram informações sobre os fitohormônios zeatina e ácido jasmônico e de dois metabólitos que apresentam relações com hormônios vegetais, a mangiferina e a rutina. Os modelos obtidos mostraram as melhores fases extratoras para cada um desses metabólitos.

O solvente acetonitrila mostrou-se um bom extrator para o ácido jasmônico, além de apresentar as maiores concentrações relativas apresentou valores baixos para todos os outros metabólitos estudados.

Os extratos obtidos a partir do metanol 80% mostraram altas concentrações relativas para todos os AIA-conjugados, indicando que esse solvente pode ser utilizado em estudos de auxinas conjugadas.

As misturas binárias com acetona 80%, *acn:A* e *Me:A*, mostraram altos valores para extração dos flavonoides, rutina e mangiferina, mostrando uma interação destes solventes com esta classe de metabólitos.

O ponto central do planejamento, *acn:Me:A*, mostrou-se importante na extração do padrão AIA e do fitohormônio zeatina.