

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS GRADUÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL**

TAMIRES OLIVEIRA DE MELO

**ANÁLISE DO PERFIL DE METABÓLITOS POLARES
EM TECIDO FOLIAR DE *Eucalyptus spp***

DISSERTAÇÃO

CURITIBA

2014

TAMIRES OLIVEIRA DE MELO

**ANÁLISE DO PERFIL DE METABÓLITOS POLARES
EM TECIDO FOLIAR DE *Eucalyptus spp***

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental, do Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná.
Área de concentração: Controle e Monitoramento Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Palimécio G. Guerrero Jr.

Coorientador: Dr. Fabrício Augusto Hansel.

CURITIBA

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Melo, Tamires Oliveira de
M528a Análise do perfil de metabólitos polares em tecido
2014 foliar de *Eucalyptus spp* / Tamires Oliveira de Melo.--
2014.
75 f.: il.; 30 cm

Texto em português, com resumo em inglês
Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica
Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Ciência
e Tecnologia Ambiental, Curitiba, 2014
Bibliografia: f. 59-68

1. *Eucalyptus grandis*. 2. *Eucalyptus benthamii*. 3.
Metabólitos. 4. Expressão gênica. 5. Fenótipo. 6.
Cromatografia a gás. 7. Espectrometria de massa. 8.
Tecnologia ambiental - Dissertações. I. Guerrero Junior,
Palímécio Gimenes. II. Hansel, Fabrício Augusto. III. Universidade
Tecnológica Federal do Paraná - Programa de Pós-graduação
em Ciência e Tecnologia Ambiental. IV. Título.

CDD 22 -- 363.7

Biblioteca Central da UTFPR, Câmpus Curitiba

TERMO DE APROVAÇÃO

Título da Dissertação n° 24

ANÁLISE DO PERFIL DE METABÓLITOS POLARES EM TECIDO FOLIAR DE *Eucalyptus spp*

Por

TAMIRES OLIVEIRA DE MELO

Dissertação apresentada às 14:00 horas do dia 04 de ABRIL de 2014, como requisito parcial para obtenção do título de MESTRE EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS, na área de concentração Tecnologias e Processos Ambientais da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Curitiba. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Palimécio Gimenes Guerrero Jr. (Orientador)
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental
Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR

Dr. Fabrício Augusto Hansel (Co-orientador)
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária- EMBRAPA

Dr^a. Marcela Guiotoku
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária- EMBRAPA

Prof. Dr. Francisco de Assis Marques
Programa de Pós-Graduação em Química - PPGQ
Universidade Federal do Paraná - UFPR

Visto da Coordenação:

Prof. Dr. Thomaz Aurélio Pagioro
Coordenador do PPGCTA

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me mostrar que Seus planos são melhores que os sonhos que eu havia planejado.

Aos meus pais pelo apoio, incentivo, cuidado e amor incondicional. Por serem meu referencial de conduta e terem me ensinado a importância da persistência e valor do trabalho.

À minha irmã por ser meu farol, a pessoa que me faz sempre ver luz e sentir a paz, que me impulsiona a sonhar e acreditar no impossível.

Ao meu noivo Jonathan, por todo carinho, paciência e cumplicidade; por ter me fortalecido e sustentado nos momentos de crise.

Ao meu orientador Palimécio Gimenes Guerrero Jr., pela atenção, auxílio, disponibilidade e parceria.

Ao Fabrício Augusto Hansel, por sua orientação e por estar sempre disposto a explicar por outros prismas aquilo que eu não compreendia. Pela paciência, apoio, incentivo e por ter me inspirado a crescer como pessoa e profissional.

Aos meus amigos e colegas do PPGCTA e da Embrapa Florestas: Dayanne Mendes Andrade, Tiélidy Lima, Patrícia Ribas Canedo, Franciele Lima, Adelson Raimundo Ângelo, Eduardo Lazo, Juçara Feitosa, Clarissa Fleury Rocha, Jane Cristina Lara Ribeiro, Ana Flávia Oliveira, Paulo Bairros, Maiara Soares que me proporcionaram momentos de alegria, e incentivaram o bom andamento do trabalho.

A pesquisadora Isabel Rodrigues Gerhardt e a Embrapa Florestas, que possibilitaram a realização do trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro durante todo o período do mestrado.

“A persistência é o menor caminho do êxito”.

Charles Chaplin

MELO, Tamires Oliveira. **Análise do perfil de metabólitos polares em tecido foliar de *Eucalyptus spp.*** 2014. 75 f. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2014.

RESUMO

A eucaliptocultura e sua propagação clonal têm sido empregadas no Brasil desde a década de 60, devido as características de produtividade, capacidade de adaptação e crescimento rápido, destacando-se as espécies de *Eucalyptus grandis* e seus híbridos, que apresentam bom rendimento para obtenção de pasta de celulose pelas indústrias do setor e, *E. benthamii* que possui resistência à temperaturas amenas seguidas de geadas. A análise do perfil metabólico para espécies de eucaliptos ainda não foi explorada, o que ocasiona dificuldades na identificação da expressão gênica de fenótipos de interesse comercial. Assim, o presente trabalho teve por objetivo aplicar e avaliar a metodologia normalmente utilizada para obtenção do perfil metabólico em tecido foliar em duas etapas de desenvolvimento (e.g. jovem e adulto) de *E. grandis* e *E. benthamii* em condição de campo, utilizando a técnica de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM), a técnica demonstrou ser eficiente para obtenção de um perfil de metabólitos polares, embora tenha apresentado menor sensibilidade para compostos nitrogenados e aminoácidos. Foi observado predominância de carboidratos em tecido foliar das espécies estudadas, fato que pode estar relacionado com o horário de coleta do material sob intensidade luminosa, pois açúcares não redutores como a sacarose possuem produção massiva durante o foto período sendo, então, metabolizada a outros compostos à noite. As análises de PCA (análise de componentes principais), amparadas por teste estatístico, demonstraram que existem metabólitos que contribuem mais significativamente para distinção entre as idades do tecido vegetal, sendo que os açúcares redutores são mais relevantes em tecido jovem e, açúcares não redutores, tais como a sacarose, são relevantes em tecido adulto. A presença de compostos exclusivos em tecido de *E. benthamii* tais como a fenilalanina, pode justificar o fato desta espécie ser mais utilizada para a obtenção de energia, já que este aminoácido está diretamente relacionado com a síntese de lignina. Ainda para a espécie de *E. benthamii* foram encontrados em maior abundância sacarose e derivados álcoois de açúcares que proporcionam maior resistência da planta ao frio. Não foram encontradas diferenças estatísticas entre a concentração de açúcares dentro do perfil de metabólitos estudados, que sustente a não utilização de *E. benthamii* para polpação de celulose.

Palavras-chave: metaboloma, expressão gênica, características fenóticas, tecido foliar.

MELO, Tamires Oliveira. **Analysis of polar metabolite profile in leaf tissue of *Eucalyptus* spp.** 2014. 75f. Dissertation, (Graduate Program in Environmental Science and Technology), Federal Technological University of Paraná. Curitiba, 2014.

ABSTRACT

Clonal propagation of the Eucalyptus, have been used in Brazil since the 60s, due to the characteristics of productivity, adaptability and rapid growth, especially *Eucalyptus grandis* and its hybrids, which have good performance to obtain paper pulp, and the *E. benthamii* that is resistant to mild temperatures followed by frost. The analysis of the metabolic profile for Eucalyptus species has not yet been explored, which leads to difficulties in the identification of gene expression phenotypes of commercial interest. Thus, the present study aimed to implement and evaluate the methodology typically used to obtain the metabolic profile in leaf tissue of two age stages (e.g. young and adult) of *E. grandis* and *E. benthamii* under field conditions. The metabolic profile was characterized by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), this technique proved effective for obtaining a profile of polar metabolites, although it had less sensitive to nitrogen compounds and amino acids. The predominance of carbohydrates was observed in leaf tissue of the studied species, which may be related to the time of collection of the material under light intensity, non-reducing sugars such as sucrose have massive production during the photoperiod, and they are metabolized to other compounds during the night. The PCA, trimmed by statistical test indicated that there were significantly more metabolites that contribute to the distinction between the ages of leaf tissue, and the more reducing sugars are important in young tissue and non-reducing sugars, such as sucrose, are relevant in adult tissue. The presence of unique compounds in tissue *E. benthamii* such as phenylalanine, can justify the fact that this species is nominated to be used in energy, since this amino acid is directly related to lignin synthesis. Besides *E. benthamii* has greater abundance sucrose and sugar alcohols compounds than *E. grandis*, which is related to a better resistance to cold. No statistical differences were found between the concentrations of glucose and galactose which supports the non-use of *E. benthamii* for pulping.

Keywords: metabolome, gene expression, phenotypic traits, leaf tissue.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Padrões analíticos utilizados durante as análises cromatográficas.....	25
TABELA 2. Padrões analíticos utilizados durante as análises cromatográficas.	33
TABELA 3. Compostos derivados identificados em extratos de folhas jovens e adultas de <i>Eucalyptus grandis</i>	38
TABELA 4. Compostos derivados identificados em extratos de folhas jovens e adultas de <i>Eucalyptus grandis</i>	40
TABELA 5. Compostos derivatizados identificados nos extratos de folhas adultas de <i>Eucalyptus grandis</i> (GA) e <i>E. benthamii</i> (BA).....	49

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Componentes básicos de um cromatógrafo em fase gasosa acoplado a um espectrômetro de massas (CG-EM).....	21
FIGURA 2. Esquema simplificado da formação de metoximas em meio básico.....	23
FIGURA 3. Esquema simplificado das reações de metoximação seguido de sililação em um açúcar redutor (Glicose).....	24
FIGURA 4. Tecido foliar de <i>E. benthamii</i> e <i>E. grandis</i> em idades jovem e adulta. .	26
FIGURA 5. Localização da Embrapa Florestas.....	27
FIGURA 6. Demonstração das repetições biológicas (1) e da área de coleta do material foliar na posição média da copa (2) com vista superior dos quadrantes (3).....	28
FIGURA 7. Cromatograma da corrente total de íons (TIC) dos padrões derivatizados na concentração de 400 nmol.mL ⁻¹	32
FIGURA 8. Espectro de massa de uma Frutose derivatizada (oximada com 5 grupos TMS).	34
FIGURA 9. Cromatograma da corrente total de íons de um extrato de folha adulta de <i>Eucalyptus grandis</i>	36
FIGURA 10. (A) Scores do conjunto de folhas jovens (GJ) e adultas (GA) de <i>E. grandis</i> . (B) Loadings dos dados destacando os açúcares redutores (55, 40) em tecido foliar jovem e de sacarose (103) para tecido adulto..	43
FIGURA 11. Histograma comparativo dos carboidratos identificados em extrato de tecido foliar jovem e adulto de <i>Eucalyptus grandis</i> . Onde **, p<0,01 e ns, p>0,05. ..	44
FIGURA 12. (A) Scores do conjunto de folhas jovens (BJ) e adultas (BA) de <i>E. benthamii</i> . (B) Loadings dos dados destacando os açúcares redutores (54, 56, 114) em tecido foliar jovem e de sacarose (103) para tecido adulto..	45
FIGURA 13. Histograma comparativo dos carboidratos identificados em tecido foliar jovem e adulto de <i>Eucalyptus benthamii</i> . Onde **, p<0,01 e ns, p>0,05.....	46
FIGURA 14. (A) Scores do conjunto de compostos nos extratos de folhas adultas de <i>E. grandis</i> (GA) e <i>E. benthamii</i> (BA). (B) Loadings dos dados para as distintas espécies..	50
FIGURA 15. Histogramas comparativos entre as classes dos compostos de (A) ácidos, (B) açúcares álcoois, (C) açúcares e (D) não identificados, extrato detectado adulto de <i>Eucalyptus grandis</i> e <i>E. benthamii</i> . Identificação Tabela 5 e apêndice A. Onde ***, p<0,001; **p<0,01 e ns, p>0,05.....	51
FIGURA 16. Biossíntese de lignina e outros compostos aromáticos via ácido xiquímico.	52
FIGURA 17. Etapa de assimilação de N ₂ do Ciclo de Krebs simplificado.....	54

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACOES

CG-EM	Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas
CL-EM	Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EM	Espectrometria de Massas
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
eV	Eletro Volts
GENOLYPTICUS	Rede Brasileira de Pesquisa do Genoma de Eucalyptus
h	Hora
JGI	<i>Joint Genome Institute</i>
KI	Índice de Kovats
PCA	Análise de Componentes Principais
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RNA_m	RNA mensageiro
TMS	Trimetilsilil
TMS-MO	Trimetilsilil-metoxioximas
TMSO	Trimetilsililoxi

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS	13
2.1 OBJETIVO GERAL	13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3 CONTEXTUALIZAÇÃO TEÓRICA	14
3.1 EUCALIPTOCULTURA	14
3.1.1 <i>Eucalyptus grandis</i> e <i>Eucalyptus benthamii</i>	15
3.2 GENÔMICA FUNCIONAL	16
3.2.1 Metabolômica	18
3.2.1.1 Perfil metabólico	18
3.2.1.2 Cromatografia gasosa acoplado à espectrometria de massa (CG-EM)	20
3.2.2 Técnicas de Derivatização	21
4 MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.1 REAGENTES	25
4.1.1 Sensibilidade	25
4.2 COLETA DO TECIDO FOLIAR	26
4.3 EXTRAÇÃO E DERIVATIZAÇÕES	28
4.4 ANÁLISE POR CG-EM.....	29
4.5 TRATAMENTO PÓS-ANÁLISES	29
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	31
5.1 MÉTODOS DE DERIVATIZAÇÃO E SENSIBILIDADE	31
5.2 IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE DE METABÓLITOS POLARES EM EUCALIPTO POR CG-EM.....	35
5.3 CARBOIDRATOS NA DISTINÇÃO ENTRE IDADES DE FOLHAS.....	42
5.4 ANÁLISE FENOTÍPICA DE <i>E. grandis</i> e <i>E. benthamii</i> ATRAVÉS DE PERFIL DE METABÓLITOS POLARES.....	48
6 CONCLUSÃO	57
7 PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS	58
REFERÊNCIAS	59
APÊNDICE A - Detalhes dos compostos não identificados em folhas jovens e adultas das espécies estudadas	69
APÊNDICE B – Fragmentogramas dos compostos não identificados com diferença estatística	71
APÊNDICE C – Cromatogramas da corrente total de íons das substâncias presentes no extrato de tecido foliar	73

1 INTRODUÇÃO

A demanda de produtos naturais pelo setor industrial, principalmente papelero e moveleiro, provenientes de plantas que ocorrem em ecossistemas florestais tem se intensificado nas últimas décadas. Devido às características de produtividade, capacidade de adaptação e crescimento rápido, o *Eucalyptus spp* tem sido cultivado amplamente desde a década de 60 (TURNBULL, 1999; DOUGHTY, 2002; CUNHA, 2006; MERCHANT et al., 2006; ROSA et al., 2009).

A eucaliptocultura no Brasil é baseada na silvicultura clonal, que seleciona genotipicamente plantas com características de rápido crescimento e com alta qualidade da madeira para fins específicos (XAVIER et al., 2003; GOULART, 2006; ROSA et al., 2009; DE VOS et al., 2007; STEANEA et al., 2011). O aperfeiçoamento da propagação clonal ocorreu com o advento das tecnologias genômicas durante a década de 80, que geraram uma grande quantidade de dados de sequência de DNA, permitindo uma visão ampla sobre o número de genes que constituem os organismos (SCHAUER et al., 2005). Entretanto, o conhecimento da sequência de genes de um organismo não é suficiente para entender os mecanismos de funcionalidade de uma célula. Como consequência, houve uma mudança de paradigma nas ciências biológicas, que atualmente concentram-se em desvendar a função do gene, ao invés de simplesmente sequenciar o DNA. Assim novos campos surgiram, dentre eles destaca-se a metabolômica (SCHAUER, et al., 2005; VILLAS-BÔAS et al, 2005; VILLAS-BÔAS; GOMBERT, 2006).

A metabolômica foi introduzida nos anos 2000 por Fiehn e colaboradores, a partir de observações de que as alterações em RNAm nem sempre resultavam em modificações nos níveis de proteínas, que uma vez traduzidas poderiam estar ou não biologicamente ativa. Como consequência, as alterações no transcriptoma ou no proteoma nem sempre correspondiam à alterações fenotípicas (SCHAUER; FERNIE, 2006). Os metabólitos desempenham importante papel nas diferentes vias do metabolismo celular, já que sua quantidade dentro de uma célula ou tecido é determinada pela concentração e propriedades das enzimas. Portanto, a quantidade de metabólitos representa uma informação integrativa da função molecular celular que define uma característica fenotípica em resposta a alterações ambientais ou genéticas (FIEHN, 2002; VILLAS BOAS; GOMBERT, 2006).

A análise do metaboloma tornou-se rotineiramente aplicável a espécies muito diversas como *Populus tremuloides* (álamo), *Arabidopsis thaliana* (erva-estrelada), *Nicotiana tabacum* (tabaco), entre outros, no qual o perfil metabólico é usado como uma ferramenta de diagnóstico para verificar a resposta da planta a um herbicida, a classificação de genótipos, estresses bióticos ou abióticos e principalmente no auxílio para decifrar a função de um gene (WAGNER et al., 2003; GULLBERG et al., 2004; JEONG et al., 2004; SCHAUER; FERNIE, 2006).

A obtenção de um perfil metabólico é feita normalmente através de técnicas cromatográficas ou por Ressonância Magnética Nuclear (RMN), sendo a técnica de Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM) amplamente difundida, já que permite alta eficiência na separação de misturas biológicas complexas (FIEHN et al., 2000a,b; FIEHN, 2002; JEONG et al., 2004; KRISHNAN; KRUCER; RATCLIFFE, 2005; SCHAUER et al., 2005; VILLAS-BÔAS et al., 2005; VILLAS- BÔAS; GOMBERT, 2006).

A análise do perfil metabólico para espécies de eucaliptos ainda não foi explorada, o que ocasiona dificuldades na identificação da expressão gênica de fenótipos de interesse comerciais (SUMMER, MENDES, DIXON; 2003; VILLAS-BÔAS; GOMBERT, 2006). Neste contexto propõe-se o estudo do perfil metabólico por CG-EM de duas espécies de *Eucalyptus* (*E. benthamii* e *E. grandis*) com diferentes características fenotípicas, buscando verificar suas semelhanças e diferenças, e avaliar o seu potencial como ferramenta para melhoramento genético. Com a geração de clones em florestas plantadas com alta especificidade, ocorrerá a diminuição dos impactos ambientais em florestas nativas. Desta maneira, um cultivar de alta qualidade terá um aproveitamento com maior eficiência, reduzindo, assim, a necessidade da área plantada devido a uma maior produtividade por hectare, diminuindo a pressão do setor industrial madeireiro por áreas de cultivo.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar o perfil metabólico de folhas de duas espécies de *Eucalyptus spp* em diferentes estágios de desenvolvimento utilizando cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extrair, derivatizar e analisar os metabólitos polares de tecido foliar de duas espécies de *Eucalyptus* (*E. benthamii* e *E. grandis*) por CG-EM;
- Identificar os metabólitos majoritários presentes no tecido foliar;
- Avaliar a eficácia de metodologias comumente utilizadas na obtenção do perfil metabólico em tecido foliar;
- Verificar diferenças no metaboloma de folhas de uma mesma espécie em duas fases de desenvolvimento (jovem e adulto);
- Comparar o perfil metabólico das duas espécies (*E. benthamii* e *E. grandis*) para uma determinada idade;
- Definir os metabólitos estatisticamente relevantes na distinção entre as folhas de diferentes idades e entre as duas espécies através de análise de PCA e teste ANOVA.

3 CONTEXTUALIZAÇÃO TEÓRICA

3.1 EUCALIPTOCULTURA

A família *Myrtaceae* compõe grande parte da vegetação natural australiana e de ilhas adjacentes. Entre os membros dessa família está o gênero *Eucalyptus*, o qual apresenta mais de 600 espécies (PRYOR, 1976; BOLAND, 1984; MERCHANT et al., 2006; STEANEA et al., 2011). Por produzirem madeira de importância comercial, algumas espécies de *Eucalyptus* são cultivadas em aproximadamente 100 países tropicais e subtropicais, destacando-se China, Índia, África do Sul, Chile e Brasil. Entretanto, cerca de vinte espécies e algumas outras poucas resultantes da hibridação interespecífica vêm sendo utilizadas em escala comercial (ALVES et al., 2004).

No setor mundial florestal, a industrialização da madeira de *Eucalyptus sp* vem se expandindo, principalmente por ser amplamente utilizada na obtenção de polpa de celulose pelas indústrias papeleiras (LEÃO, 2000; STEANEA et al., 2011; BRACELPA, 2013). Devido às características de produtividade, capacidade de adaptação, crescimento rápido, o *Eucalyptus sp* têm sido cultivado amplamente no Brasil desde a década de 60. Atualmente o Brasil detém a maior área de plantio mundial, correspondente a mais de 3,7 milhões de hectares (CUNHA, 2006; SBS, 2008).

Entre as espécies de eucalipto cultivadas no Brasil, destaca-se o *Eucalyptus grandis* e seu híbrido (*E. urograndis*), que é cultivado em alta escala na região Sudeste do país. Entretanto, existem algumas limitações para sua plantação na região, principalmente devido à ocorrência de temperaturas baixas acompanhadas de geadas. Assim, nessas áreas com restrição quanto à temperatura a espécie *E. benthamii* apresenta melhor adaptabilidade às condições climáticas, principalmente para produção de madeira para fins energéticos e sólidos madeiráveis (PALUDZYSZYN FILHO; SANTOS; FERREIRA, 2006).

Para melhorar as especificidades e a qualidade da madeira, técnicas de propagação (e.g. miniestaquia e microestaquia) são utilizadas na silvicultura clonal como ponto de partida para a seleção de genótipos superiores e, posteriormente propagação clonal massal (GOULART, 2006). Geralmente, o processo de seleção

desses genótipos é realizado na fase adulta, no qual o enraizamento de propágulos vegetativos e a formação de mudas é um grande desafio em razão da idade fisiológica do material (XAVIER et al., 2003; CUNHA, 2006; GOULART, 2006).

Assim, o desenvolvimento de metodologias capazes de selecionar indivíduos em idades jovens são de extrema importância na silvicultura clonal, e o perfil metabólico possui esse potencial, uma vez que pode indicar um fenótipo superior em organismos antes desse chegar à fase adulta (ASSIS; MAFIA, 2007).

Os indivíduos que apresentam características fenotípicas importantes ao setor industrial, tais como resistência à pragas, retenção de CO₂ atmosférico, rápido crescimento e resistência à variações climáticas são escolhidos para seleção de genótipos (ALFENAS, 2004; PALUDZYSZYN FILHO; SANTOS; FERREIRA, 2006; ASSIS E MAFIA, 2007; STEANEA et al., 2011). Neste contexto, o setor industrial madeireiro do Brasil possui posição de destaque internacional, principalmente quanto ao melhoramento genético de seus espécimes de *Eucalyptus spp.* Assim, em 2002 iniciou-se o projeto GENOLYPTUS (Rede Brasileira de Pesquisa do Genoma de Eucalyptus), financiado por instituições de pesquisa e indústrias do setor florestal. O projeto visa o sequenciamento e a determinação da função de genes para incorporação de tecnologias para melhoramento da produção vegetal, tornando-as mais produtivas e resistentes a pragas (KIRCH et al., 2005).

3.1.1 *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus benthamii*

O *E. grandis* é de ocorrência natural na faixa costeira da Austrália, sendo a espécie mais cultivada no Brasil, principalmente o híbrido *E. urograndis* (i.e. *E. urophila* x *E. grandis*), devido sua importância para a produção de pasta de celulose, grande adaptabilidade e rendimento volumétrico superior a de outras espécies cultivadas no país (POKE et al., 2005; SILVA et al., 2007). Sua madeira é considerada leve e fácil de trabalhar, além de possuir o dobro de celulose em relação à quantidade de lignina (62% para 31%) (TRUGILHO et al., 2003). Esta espécie apresenta boa aptidão ao solo e clima de regiões tropicais e subtropicais. Devido a sua importância econômica e utilização para produção clonal de materiais de elite, o *E. grandis* em 2008 foi escolhido para o sequenciamento total de DNA

pelo JGI (*Joint Genome Institute*) do departamento de energia dos Estados Unidos (JAHNS, 2008).

Em regiões com baixas temperaturas onde ocorrem geadas, o cultivo de algumas espécies de eucaliptos fica limitado em poucas espécies, como o *E. benthamii*. A área de ocorrência natural do *E. benthamii* na Austrália limita-se a pequenas populações ao oeste da cidade de Sydney (ALVES et al., 2011). Nesta região o *E. benthamii* é conhecido como “*Camden White Gum*” e, hoje é considerada uma espécie ameaçada de extinção, ocorrendo somente em duas populações pouco extensas (GARDINER, 2002).

Comercialmente o *E. benthamii* é indicado para plantios em regiões com geadas severas, onde apresenta bom crescimento. A princípio a espécie é adequada à produção de lenha, carvão, estacas, postes e moirões, mas não é recomendada para fins de serraria (HIGA et al., 2000). Em 1988, a EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) importou sementes de *E. benthamii* da Austrália, e estabeleceu uma área de produção de sementes em regiões de ocorrência de geadas severas nos estados de Santa Catarina, Paraná e Rio Grande do Sul. Os resultados iniciais mostraram que a espécie é bastante tolerante a geadas, suportando temperaturas negativas na fase inicial de desenvolvimento, sem efeitos negativos às plantas e apresentando características fenotípicas importantes à indústria como a utilização para fins energéticos (PALUDZYSZYN FILHO; SANTOS; FERREIRA, 2006; ALVES et al., 2011).

3.2 GENÔMICA FUNCIONAL

As plataformas tecnológicas conhecidas como “ômicas”, possuem o objetivo de isolar e identificar o maior número de biomoléculas de um mesmo grupo. A primeira “ômica” a ser desenvolvida, foi a genômica durante as décadas de 80 e 90, através da qual se pretendia elucidar o funcionamento celular de um organismo pelo sequenciamento genético (ROBETERSON, 2005). Entretanto, segundo Villas Bôas e Gombert (2006) “a sequência de todos os genes de um organismo não é suficiente para entender todos os mecanismos moleculares de uma célula”. Desta forma, a fim de relacionar informações obtidas através da genômica com o fenótipo apresentado

pelo organismo, surgiram as chamadas tecnologias da genômica funcional, que retornam à bioquímica clássica, onde se destacam a transcriptômica, proteômica e a metabolômica (FIEHM et al., 2000a; FIEHN, 2002; SUMMER; MENDES; DIXON, 2003; DUNN; ELLIS, 2005; VILLAS-BÔAS et al., 2005). Os primeiros estudos de genômica funcional em plantas foram realizados na *Arabidopsis thaliana*, e somente recentemente houve um interesse em espécies comerciais como arroz, cana-de-açúcar, pinus e eucalipto (POKE et al., 2005).

A função de um gene é identificada quando se determina suas espécies gênicas, ou seja, RNAs mensageiros (RNAm), proteínas e metabólitos (VILLAS-BÔAS; GOMBERT, 2006). Nesse contexto, a transcriptômica tem por objetivo reconhecer o conjunto de RNAm, que é o produto inicial da expressão gênica de um organismo. Além disso, a proteômica engloba o estudo das proteínas expressas e a metabolômica visa identificar os metabólitos que são produzidos pelo organismo (FIEHM, 2002; NAKANISHI; NUREKI, 2005; ROCHA et al., 2005; HALL, 2006).

Alterações fenotípicas nem sempre podem ser relacionadas com alterações no proteoma ou transcriptoma, isso porque as mudanças na transcrição do RNAm nem sempre ocasionam disfunção nos níveis de proteínas, e essas por sua vez, após traduzidas podem ou não estar enzimaticamente ativas (SUMMER; MENDES; DIXON, 2003; VILLAS-BÔAS; GOMBERT, 2006). Sabe-se que a concentração e a presença dos metabólitos dentro de uma célula são determinadas por ação de enzimas. Assim, o nível de metabólitos dentro de um organismo, representa uma informação integrativa da função molecular celular que define uma característica fenotípica em resposta às funções genéticas, às alterações ambientais e às ações antrópicas (e.g. aplicação de agroquímicos) (FIEHN, 2002; VILLAS BOAS; GOMBERT, 2006).

A interpretação dos dados metabolômicos é desafiador visando estabelecer uma correlação direta entre genes e metabólitos na área de biossíntese vegetal. Um mesmo metabólito participa de diferentes vias metabólicas, e em algumas espécies de organismos existe um número superior destes compostos em relação aos genes associados a eles, além do fato de que uma enzima pode originar mais de um metabólito, pois por algumas serem inespecíficas aceitam mais de um substrato, dando origem a mais de um metabólito (FIEHM et al., 2000a,b; FIEHN, 2002; VILLAS-BÔAS et al., 2005; VILLAS-BÔAS; GOMBERT, 2006).

3.2.1 Metabolômica

A metabolômica começou a ganhar destaque após as pesquisas iniciadas na área por Oliver Fiehm e colaboradores em 2000. Os metabólitos podem ser divididos em metabólitos primários e secundários e, esses constituem um conjunto diversificado de compostos e classes químicas, que são caracterizados por uma ampla variação nas propriedades físico-químicas devido a grande variedade de compostos (DUNN; ELLIS, 2005).

Os metabólitos primários estão envolvidos nas principais vias metabólicas que ocorrem nas células, e encontram-se dissolvidos no citosol. Entre eles estão os açúcares e seus derivados, ácidos carboxílicos, lipídios e aminoácidos (DIXON, 2001; HALL, 2006). Esses compostos apresentam-se em concentrações variáveis nas células, são polares e são encontrados em qualquer célula viva (VILLAS-BÔAS; GOMBERT, 2006).

Os metabólitos secundários são específicos de certos tipos de células ou organismos e normalmente não estão envolvidos em funções vitais ou no metabolismo básico, possuindo atribuições específicas como uma resposta a fatores externos (e.g. ataque de patógenos). Esse grupo é representado pelos alcalóides, terpenos, flavonóides, glicosídeos e taninos (DUNN; ELLIS, 2005; HALL, 2006).

Entre as abordagens analíticas existentes para a análise dos metabólitos, as propostas por Oliver Fiehm (2002) estão entre as mais utilizadas. Essas análises são divididas em dois grupos: análise direcionada e perfil metabólico, sendo que este último pode ser subdividido em “*fingerprinting*” e “*footprinting*”, os quais se referem aos compostos intra e extracelulares respectivamente (FIEHM, 2002; SUMMER; MENDES; DIXON, 2003; VILLAS-BÔAS; GOMBERT, 2006).

3.2.1.1 Perfil metabólico

A análise de um perfil metabólico envolve uma série de etapas, sendo todas passíveis de erros experimentais: (i) seleção do organismo, tecido ou célula a ser estudado; (ii) preparação da amostra; (iii) análise dos metabólitos e (iv) tratamento

dos dados (FIEHM et al., 2000a; SCHAUER et al. 2005; VILLAS-BÔAS; GOMBERT, 2006; ALLWOOD, et al., 2009).

A seleção do material de estudo deve ser realizada de forma cuidadosa, já que variações relacionadas à nutrição do organismo, hora e período da coleta, idade e tamanho das amostras, podem interferir na uniformidade e composição da amostra (FIEHM, 2002; ROBETERSON, 2005; ALLWOOD, et al., 2009);

A etapa de preparação da amostra é importante, devido a ocorrência de grande parte dos erros operacionais, como a introdução de artefatos analíticos. Para diminuir os erros o primeiro passo é interromper o metabolismo celular, já que os níveis de metabólitos variam rapidamente com alterações ambientais. A mudança drástica de temperatura é utilizada para manutenção das espécies químicas, armazenando a amostra à -40 °C com auxílio de nitrogênio líquido ou metanol frio (VILLAS-BÔAS; GOMBERT, 2006). Após, é necessário a extração dos metabólitos de interesse que é uma fase crítica, devido principalmente às características moleculares diferentes dos metabólitos. A extração é feita com solventes orgânicos, ou misturas contendo ou não água (FIEHM et al., 2000a,b; FIEHM, 2002; BEDAIR; SUMMER, 2008; ALLWOOD, et al., 2009). A concentração do extrato contendo os metabólitos é feita com liofilização ou evaporação a vácuo, e o extrato seco é ressuspenso para análises de RMN ou derivatizado para análises via CG-EM (FIEHM et al., 2000a,b; FIEHM, 2002; VILLAS-BÔAS; GOMBERT, 2006; BEDAIR; SUMMER, 2008; ALLWOOD, et al., 2009).

Os métodos analíticos amplamente utilizados para análise de metaboloma são a ressonância magnética nuclear (RMN) e a espectrometria de massas (EM). O RMN é utilizado principalmente para elucidação estrutural de metabólitos purificados e o CL-EM e CG-EM para a separação e identificação simultânea de diferentes compostos presentes em uma amostra (FIEHM et al., 2000a,b; FIEHM, 2002; KRISHNAN; KRUCER; RATCLIFFE, 2005; VILLAS-BÔAS; GOMBERT, 2006).

Os dados obtidos pelo emprego das análises instrumentais devem ser tabulados para possibilitar a interpretação dos resultados. Ferramentas estatísticas são utilizadas para facilitar a interpretação de vários dados rapidamente. (FIEHM, 2002; LUEDEMANN et al., 2008). Os principais métodos estatísticos empregados são a Análise de Componentes Principais ("*Principal Component Analysis*" - PCA) e as técnicas de agrupamento ("*Hierarchical Clustering Analysis*" - HCA)(FIEHM et al.,

2000a; FIEHM, 2002; DUNN; ELLIS, 2005; GOODAGRE, 2005, VILLAS-BÔAS et al., 2005; LUEDEMANN et al., 2008).

3.2.1.2 Cromatografia gasosa acoplado à espectrometria de massa (CG-EM)

Análises utilizando espectrometria de massas (EM) estão sendo amplamente empregadas no estudo de metaboloma, devido a este método espectrométrico apresentar várias vantagens em relação a outros. A resolução da EM, através da obtenção de espectros de massas, permite a diferenciação estrutural e caracterização dos compostos, além da separação de misturas complexas quando associado à técnicas cromatográficas (BARSCH et al., 2004; PATSCHKOWSKI; NIEHAUS, 2004; VILLAS-BÔAS; GOMBERT, 2006).

Entre as técnicas cromatográficas, a cromatografia gasosa (CG) permite a identificação de extratos orgânicos complexos (voláteis e semi-voláteis), através da separação dos analitos, entre uma fase móvel (uma gás de arraste) e uma estacionária (e.g. polímero). Os compostos são separados por suas diferentes propriedades físico-químicas e interações com a fase estacionária da coluna usando um gradiente crescente de temperatura (MEIER-AUGENSTEIN, 1999; COLLINS, BRAGA, BONATO, 1993). As partes essenciais de um cromatógrafo gasoso são: injetor onde a amostra é introduzida; uma coluna capilar que contém a fase estacionária; um forno com controle de temperatura; detector e sistema de fornecimento de um gás de arraste (Figura 1).

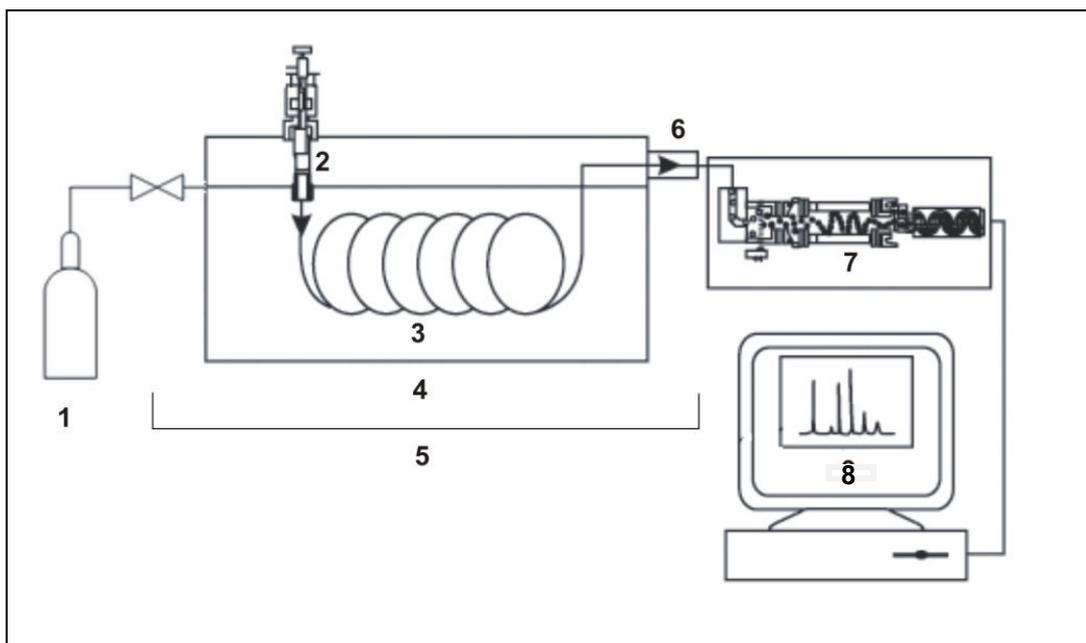


Figura 1. Componentes básicos de um cromatógrafo em fase gasosa acoplado a um espectrômetro de massas (CG-EM), no qual: (1) gás de arraste; (2) injetor; (3) coluna capilar; (4) forno; (5) CG; (6) interface CG-EM; (7) espectrômetro de massa; (8) aquisição dos dados. Fonte: O autor.

A espectrometria de massas (EM) quando combinada com a técnica de CG, fornece uma alta eficiência de separação de misturas biológicas complexas, uma vez que, no CG-EM, após a sua separação pelo cromatógrafo o composto é ionizado dando origem ao íon molecular (M^+), esse íon instável sofre quebras parciais, formando novos íons menores (fragmentos), os quais são separados pela relação de suas massas e quantificados conforme sua intensidade de formação (FIEHN, 2008; WAGNER, SEFKOW, KOPKA; 2002; AUGENSTEIN, 1999). O íon mais estável é chamado de pico base e, é a partir dele que os demais fragmentos são formados e distribuídos. Esse processo de ionização auxilia na identificação de substâncias desconhecidas, já que cada composto apresenta um espectro de massas característico, que muitas vezes pode ser comparado com espectros já publicados em bibliotecas de massas.

3.2.2 Técnicas de Derivatização

Na análise por CG-EM o composto a ser analisado deve ser volátil e termicamente estável, fato que não ocorre com metabólitos polares, como açúcares e aminoácidos, os quais possuem substituintes polares (e.g. OH, NH, COOH), que

podem ser oxidados. Assim estes compostos precisam ser derivatizados antes da análise. As derivatizações são mudanças produzidas na estrutura química das substâncias, que dentre outras coisas permite que as substâncias se tornem estáveis termicamente, sejam menos reativas e que interajam menos com a coluna cromatográfica (RUIZ-MATUTE et al., 2011; LUEDEMANN et al., 2008; MEDEIROS, SIMONEIT, 2007; SEFKOW, KOPKA; 2002; FIEHN, 2002; FIEHN et al., 2000a,b).

Como exemplo representativo os reagentes de sililação podem ser destacados na substituição de hidrogênios ácidos de agrupamentos de aminas, álcoois e ácidos, pelo grupo trimetilsilano (TMS), que sofre menor interação com a coluna cromatográfica. A sililação pode ser realizada com o uso de diferentes reagentes como: trimetilclorosilano (TCMS); N-metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida (MSTFA) e N, O-bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA) (ALLWOOD, et al., 2009). O MSTFA é a alternativa mais utilizada para reações de sililação na obtenção do perfil metabólico (HOFFMAN et al., 2010; ALWOOD et al., 2009; KOPKA, 2006; JEONG et al., 2004; FIEHN, 2002; FIEHN et al., 2000a,b).

Para análises de carboidratos é necessário que antes da sililação ocorra a formação de oximas para evitar processos de epimerização destes compostos (RUIZ-MATUTE et al., 2011; FIEHN et al., 2000b), sendo a formação de metiloximas em piridina o processo amplamente empregado para a proteção de carbonilas durante a obtenção do perfil metabólico (Figura 2; FALES; LUKKAINEN, 1965). A epimerização é um processo indesejado porque na análise cromatográfica ocasiona a formação de múltiplos picos correspondente a um mesmo composto ocasionando erros de identificação e quantificação. Na oximação pode ocorrer formação dos isômeros geométricos *syn* (*E*) e *anti* (*Z*) para um determinado composto, sendo que os sinais em forma de dois picos nos cromatogramas são estáveis independentemente da quantidade do analito analisado (FU-ZFAI et al., 2004; FIEHN et al., 2000b).

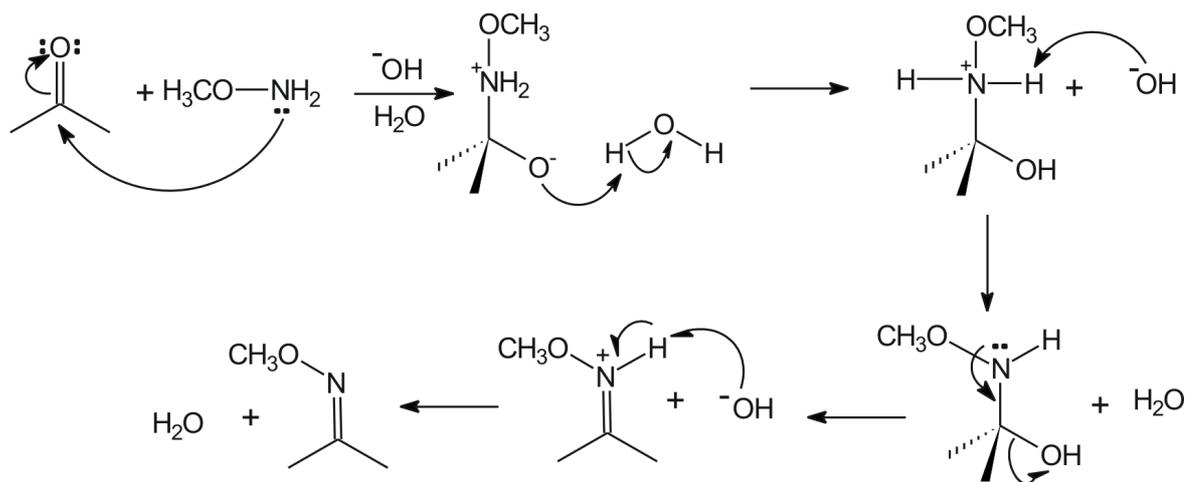
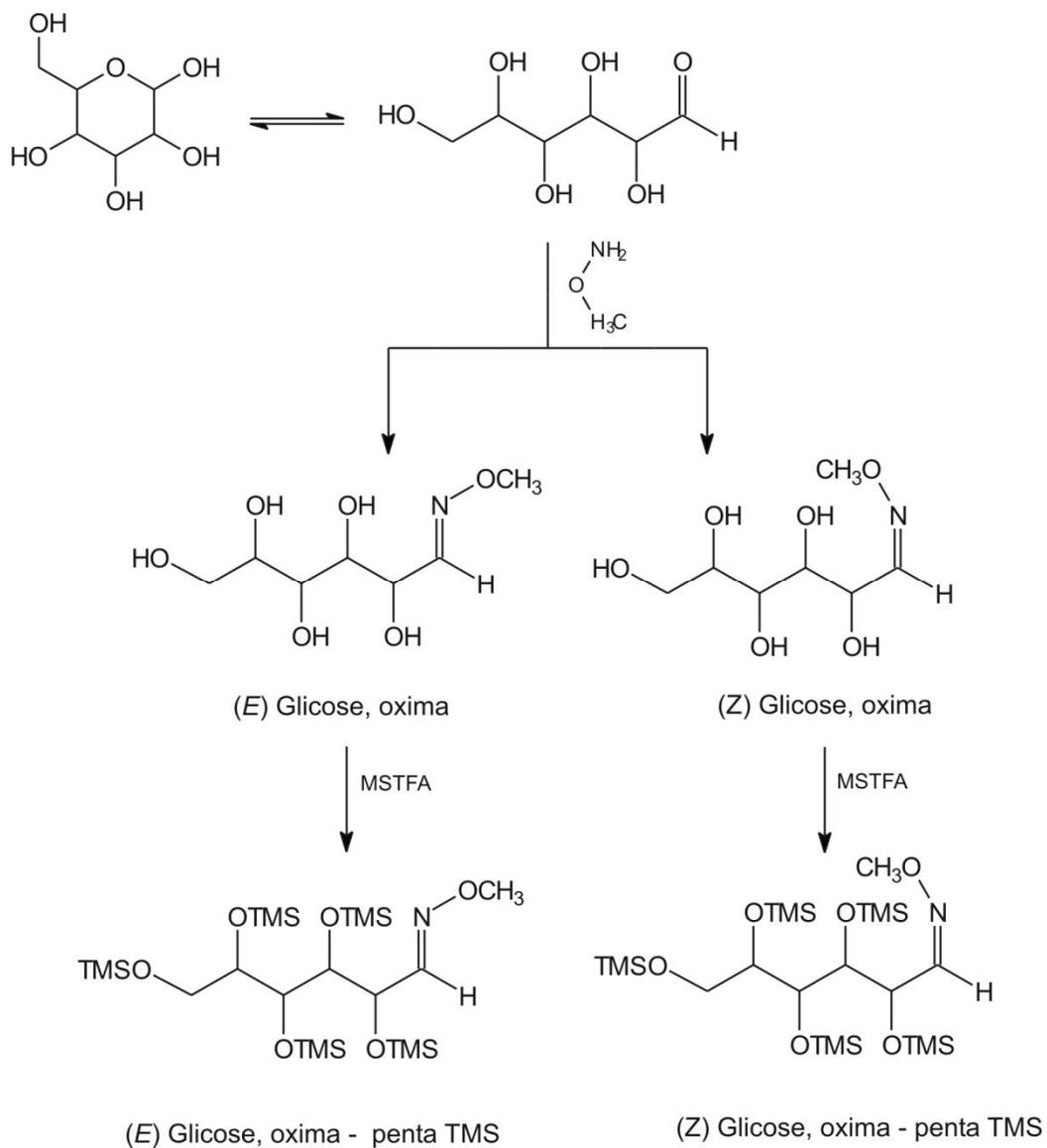


Figura 2. Esquema simplificado da formação de metoximas em meio básico.
 Fonte: Adaptado de Fales e Lukkainen (1965).

O processo de oximação mais comumente empregado é a metoximação, que seguida da sililação fornece para os carboidratos um derivado com grupos trimetilsilil (TMS) e metoxioximas (MO) (ALLWOOD, et al., 2009; RUIZ-MATUTE et al., 2011). A formação de TMS-MO é importante, em moléculas de açúcares por impedir o processo de transição entre a ciclização e a cadeia aberta destas substâncias, impedindo a formação de diversos isômeros. Esta metodologia é aplicável para determinações de misturas de hidratos de carbono complexos, uma vez que apresentam boas propriedades de fornecer cromatogramas simples (RUIZ-MATUTE et al., 2011).

O esquema completo envolvendo os processos de derivatização (metoximação seguido de silanização) é apresentado na Figura 3, e entre os diversos metabólitos identificados encontram-se: glicose, frutose, sacarose, maltose, galactose, sorbitol, glicerol, inositol, ácido benzoico, ácido aspártico, leucina, isoleucina, glicina, valina, serina, prolina, fenilalanina, putrecina (FIEHM et al., 2000a; SCHAUER et al. 2005; KOPKA, 2006; SCHAUER; FERNIE, 2006; MEDEIROS; SIMONEIT, 2007; STREHMEL, et al., 2008; RUIZ-MATUTE et al., 2011).



**Figura 3. Esquema simplificado das reações de metoximação seguido de silição em um açúcar redutor (Glicose).
Fonte: O autor.**

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 REAGENTES

Os reagentes N-metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida (MSTFA), hidrocloreto de metoxiamina e solução de hidrocarbonetos foram obtidos da Sigma-Aldrich (USA). Piridina, metanol e clorofórmio de grau CLAE foram obtidos da Merck (BR).

Os padrões com grau de pureza de 97-99% (Sigma-Aldrich, USA) utilizados nas análises foram preparados na concentração de 10 mg.mL⁻¹, com exceção dos aminoácidos que foram adquiridos em uma mistura comercial na concentração de 2,5 µmol.mL⁻¹, como demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1. Padrões analíticos utilizados durante as análises cromatográficas

Composto	Concentração (mg/mL)	Solvente *	Composto	Concentração (mg/mL)	Solvente Utilizado ¹
Aminoácidos*			Fosfatados		
Alanina	0,22	HCl	Frutose-6-fosfatase	10,00	H ₂ O
Arginina	0,44	HCl	Glicose-6-fosfatase	10,00	H ₂ O
Ácido Aspárico	0,33	HCl	Açúcares Alcoóis		
Cistina	0,30	HCl	Glicerol	10,00	MeOH
Ácido Glutâmico	0,37	HCl	Xilitol	10,00	MeOH
Glicina	0,19	HCl	Sorbitol	10,00	MeOH
Histidina	0,39	HCl	Mio-Inositol	10,00	H ₂ O
Isoleucina	0,33	HCl	Manitol	10,00	H ₂ O
Leucina	0,33	HCl	Açúcares		
Lisina	0,37	HCl	Glicose	10,00	H ₂ O
Metionina	0,37	HCl	Sacarose	10,00	MeOH
Fenilalanina	0,41	HCl	Frutose	10,00	MeOH/ H ₂ O (1:1)
Prolina	0,29	HCl	Galactose	10,00	MeOH
Serina	0,26	HCl	Arabinose	10,00	MeOH
Teonina	0,30	HCl	Maltose	10,00	MeOH
Tirosina	0,45	HCl	Ácidos		
Valina	0,29	HCl	Ácido Fumárico	10,00	MeOH
Triptofano	10,00	MeOH/ NH ₄ OH(4:1)	Ácido Glicérico	10,00	H ₂ O
Compostos nitrogenados			Ácido Isocitríco	10,00	MeOH/ H ₂ O (1:1)
Espermidina	10,00	MeOH	Ácido Málico	10,00	MeOH
Espermina	10,00	MeOH	Ácido Xiquímico	10,00	MeOH
Putrescina	10,00	H ₂ O	Ácido Succínico	10,00	H ₂ O
			Ácido Cítrico	10,00	H ₂ O

Nota: * HCl preparado na concentração de 0,1 mol L⁻¹.

4.1.1 Sensibilidade

O procedimento para verificação da resposta analítica dos metabolitos na CG-EM foi realizado partindo-se de uma solução base contendo 400 nmol.mL⁻¹ de cada

padrão (normalizada como 100%). A partir desta foram preparadas por diluição as soluções de 80%, 60%, 40%, 20% e 5%.

4.2 COLETA DO TECIDO FOLIAR

A coleta foi realizada no mês de maio de 2012, às 11:00 horas sob grande intensidade luminosa. Foram coletadas folhas em duas diferentes idades de desenvolvimento (e.g. jovem e adulto (Quadro 1, Figura 4)) de cinco repetições biológicas¹ de *E. benthamii* e *E. grandis*, com três anos de idade presentes na Embrapa Florestas Colombo-PR (49°09' 3" W e 25° 18' 40" S) (Figura 5).

Idade	Coloração	Posição no galho	Nervuras	Outras Características
Jovem	Verde com pontas avermelhadas	Ponta	Pouco desenvolvidas com ausência de material lenhoso	Aspecto oleoso; alta flexibilidade
Adulto	Verde	Mediana	Desenvolvidas com presença de material lenhoso	Oleosidade menos intensa, flexibilidade parcial

Quadro 1. Características das diferentes idades das folhas de *Eucalyptus* sp.

Fonte: O autor.



Figura 4. Tecido foliar de *E. benthamii* e *E. grandis* em idades jovem e adulta.
Fonte: <http://www.avondale.com.br> (2013); <http://www.cnpf.embrapa.br> (2013).

¹ Plantas provenientes de um mesmo clone (matriz).

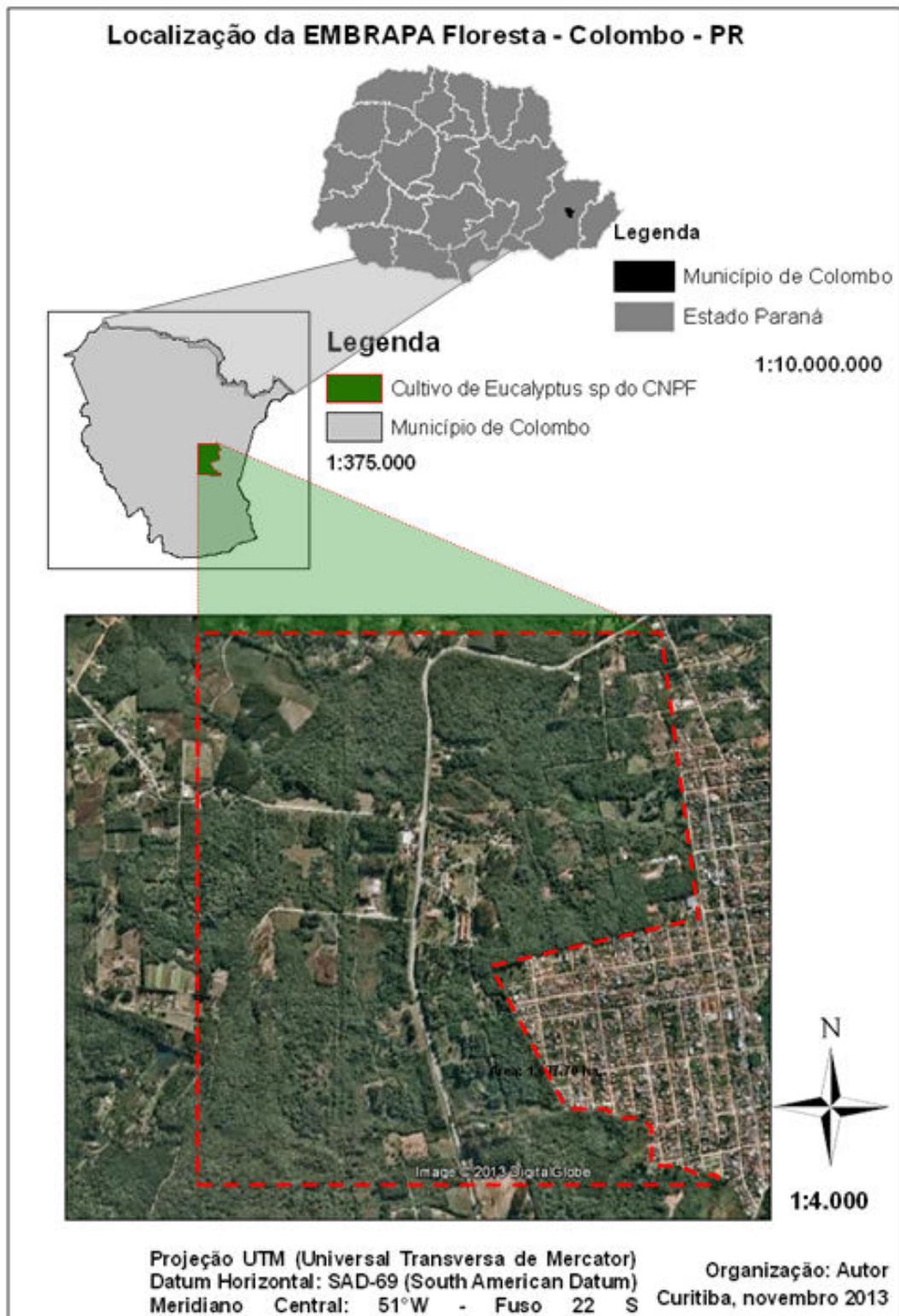


Figura 5. Localização da Embrapa Florestas.
Fonte: O autor.

O material vegetal foi coletado nos quatro quadrantes das cinco árvores, em região mediana da copa, e imediatamente imersa em nitrogênio líquido no momento do sacrifício das folhas (Figura 6). Após, as folhas foram maceradas em cadinho com $N_{2(l)}$ e armazenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, como descrito por Oliver Fiehm e colaboradores (2000b). As extrações foram feitas em quintuplicatas e as análises e tratamento dos dados foram realizadas somente em três amostras (triplicatas), separadas por idade e espécie.

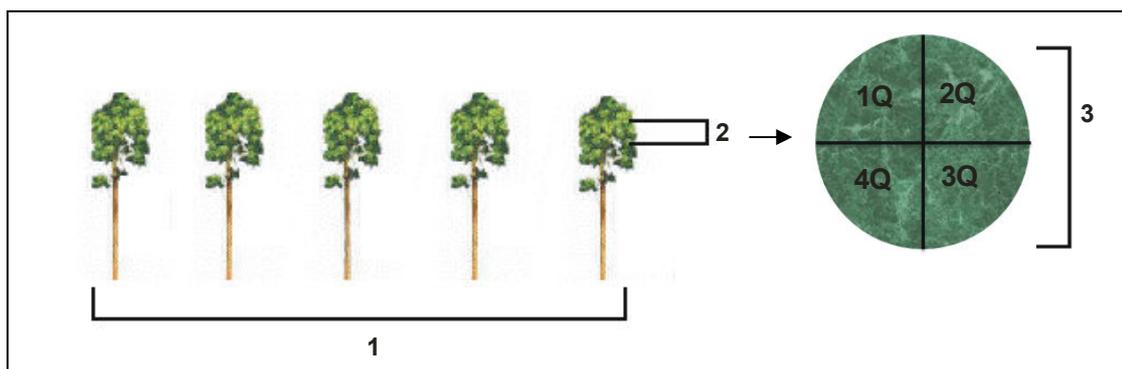


Figura 6. Demonstração das repetições biológicas (1) e da área de coleta do material foliar na posição média da copa (2) com vista superior dos quadrantes (3).
Fonte: O autor.

4.3 EXTRAÇÃO E DERIVATIZAÇÕES

Foram transferidos 100 mg do material vegetal anteriormente congelado e triturado com auxílio de $N_{2(l)}$, para um tubo de Eppendorf de 2 mL. A este material foi adicionado 1 mL de metanol e 35 μL de água para a realização da extração que ocorreu à $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 20 min. O tubo Eppendorf, contendo o material vegetal extraído, foi centrifugado durante 3 min à 12.000 rpm. O sobrenadante foi transportado para um tubo de ensaio de 5 mL com tampa de rosca e foram adicionados 1 mL de água e 750 μL de clorofórmio. A solução foi agitada em vortex e os tubos foram centrifugados durante 15 min a 4000 rpm. A fase metanol/água foi separada e transferida para tubo eppendorf e seca sob vácuo (Concentrador plus - Eppendorf) por 18 horas (FIEHN et al., 2000b).

A metoximação foi realizada adicionando no extrato seco 50 μL de uma solução de 20 mg de hidrocloreto de metoxiamina diluído em 1 mL de piridina ($40\text{ }^{\circ}\text{C}$, 90 min.). Na sililação foi utilizado 50 μL de MSTFA (N-metil-N-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida) ($40\text{ }^{\circ}\text{C}$, 90 min.) adicionado sobre os 50 μL da solução anterior.

4.4 ANÁLISE POR CG-EM

As análises cromatográficas foram realizadas utilizando injeção automática (TripPlus AS, Thermo) em um cromatógrafo gasoso (Focus GC, Thermo) acoplado a um espectrômetro de massa de íon trap (Polaris Q, Thermo). As amostras foram injetadas com divisão de fluxo 1:25 (1 min), e separadas através de coluna cromatográfica modelo DB-5 (30 m x 0,25 mm Thermo). A separação dos compostos foi feita com a temperatura do injetor à 280°C, linha de transferência 290 °C, gás de arraste hélio a 1,5 mL.min⁻¹, com fluxo constante e compensação à vácuo. Programação de temperatura do forno: 70 °C, isoterma de 4 min, aquecimento até 290 °C na taxa de 3 °C.min⁻¹, com isoterma final de 5 min. O espectrômetro de massas foi operado no modo positivo com ionização por impacto de elétrons à 70 eV, com temperatura da fonte de íons a 200 °C.

4.5 TRATAMENTO PÓS-ANÁLISES

Os metabólitos polares encontrados foram identificados através de seus espectros de massas, por comparação através do tempo de retenção com padrões, e através do seu Índice de Kovats (IK) (MSRI, 2012; SCHAUER et al., 2005). Os valores do IK para os compostos foram calculados com base na análise de uma mistura de hidrocarbonetos contendo alcanos lineares saturados com átomos de carbonos entre C₈ – C₃₆, utilizando a Equação 1.

$$IK = 100n + 100n \left(\frac{t_{Rn} - t_{Rz}}{t_{R(z+1)} - t_{Rz}} \right)$$

Equação 1. Cálculo do índice de Kovats. No qual: n é o número de carbonos do alcano com o tempo de retenção (t_{Rz}) imediatamente anterior ao composto, e t_{Rz+1} o tempo de retenção do alcano localizado imediatamente após o composto avaliado.

Os cromatogramas foram integrados e normalizados pela área. Apenas os metabólitos que ofereceram sinal/ruído acima de 150 e detectados em todas as réplicas foram incluídos nas análises estatísticas. Os resultados foram descritos utilizando média e desvio padrão de três repetições, e as diferenças entre as distribuições dos metabólitos foram avaliados por meio de análise de variância em níveis de probabilidade de 5% (teste ANOVA com Bonferroni), utilizando o programa GraphPad Prism 5[®].

A análise de componentes principais (PCA) também foi utilizada para reduzir a dimensão dos dados com o auxílio do software The Unscrambler[®] X 10.2.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 MÉTODOS DE DERIVATIZAÇÃO E SENSIBILIDADE

O método de metoximação seguido de silição é amplamente empregado para análises de metabólitos vegetais por cromatografia, possibilitando a análise e determinação de compostos de classes químicas diferentes (SCHAUER et al. 2005; KOPKA, 2006; SCHAUER; FERNIE, 2006; MEDEIROS; SIMONEIT, 2007; STREHMEL, et al., 2008; ALLWOOD, et al., 2009; MATUTE et al., 2011). Entretanto, vale salientar, que as oximas podem sofrer isomeria geométrica formando os isômeros *syn* (*E*) e *anti* (*Z*), que ocasionam a presença de dois picos nos açúcares redutores, por exemplo, os picos 35 e 35' referentes a maltose (Figura 7). A ocorrência de outros picos também foram identificados devido a etapa de silição, onde nem sempre ocorre a substituição de todas as hidroxilas por grupos TMS (FIEHN et al., 2000b; FU-ZFAI et al., 2004).

A análise dos cromatogramas deve ser cuidadosa, uma vez que alguns compostos podem sofrer coeluição, ou seja, em um mesmo pico existe a presença de dois compostos diferentes. Essa situação pode ser contornada através da comparação dos fragmentogramas, os quais usam diferentes fragmentos característicos de cada composto que está coeluinto. Desta maneira, é selecionado o íon específico de cada composto para realização da integração de área do pico, ao invés da corrente total de íons, o que possibilita, também, a quantificação relativa do composto sem que ocorra super ou hipo estimacão dos resultados (FIEHN, 2008; JEONG et al., 2004; WAGNER, SEFKOW, KOPKA, 2002).

Na Figura 7 essa situação é apresentada nos compostos 21 e 22 (ácido xiquímico e isocítrico), no qual para identificação e separação destes, foi utilizado o método de deconvolução, onde as distintas áreas de picos de cada composto foram separadas através da utilização dos íons característicos de cada substância m/z 204 e 273, para os compostos 21 e 22, respectivamente. Esses fragmentos são os íons base dos compostos, e específicos de cada substância, sendo o m/z 204 caracterizado pelo íon $[\text{TMSO}-\text{CH}_2=\text{CH}_2-\text{OTMS}]^+$ presente no ácido xiquímico e o m/z 273 por $[(\text{TMSO}-\text{C}=\text{O})-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}-(\text{OTMS}-\text{C}=\text{O})]^+$ característico do ácido isocítrico.

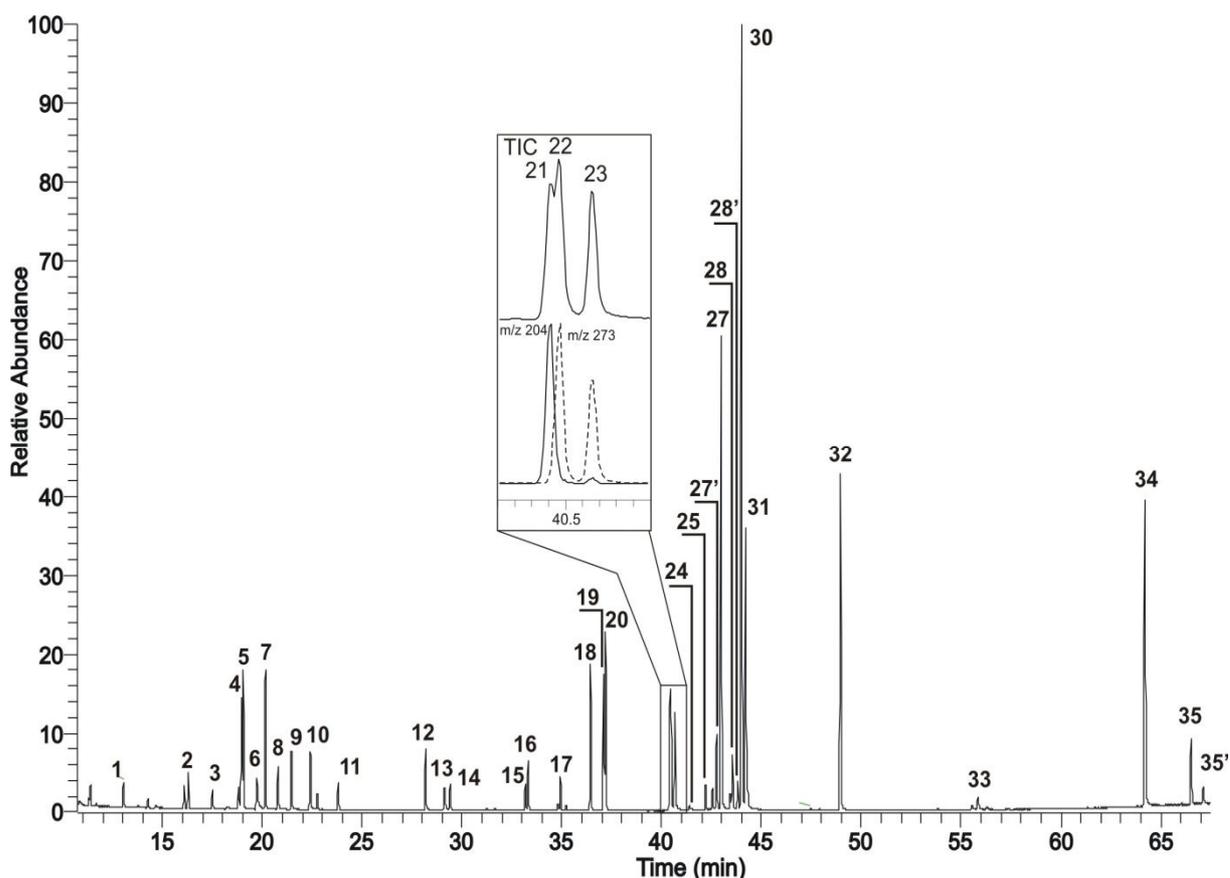


Figura 7. Cromatograma da corrente total de íons (TIC) dos padrões derivatizados na concentração de 400 nmol.mL^{-1} : (1) alanina, (2) valina, (3) serina, (4) leucina, (5) glicerol, (6) isoleucina, (7) glicina, (8) ácido succínico, (9) ácido glicérico, (10) ácido fumárico, (11) treonina, (12) ácido málico, (13) metionina, (14) ácido aspártico, (15) felilalamina, (16) ácido glutâmico, (17) arabinose, (18) xilitol, (19) putrescina, (20) ribitol, (21) ácido xiquímico, (22) ácido isocítrico, (23) ácido cítrico, (24) lisina, (25) frutose, (27 e 27') glicose, (28 e 28') galactose, (30) manitol, (31) sorbitol, (32) mio-inositol, (33) glicose-6-fosfatase, (34) sacarose e (35 e 35') maltose. No detalhe os cromatogramas das razões massa carga (m/z) 204 e 273 característicos do ácido xiquímico (21) e ácido isocítrico (22) respectivamente.

Os métodos de derivatização empregados, embora eficientes, não garantem que a resposta analítica de um determinado composto ou família de compostos seja semelhante (SCHAUER et al. 2005; KOPKA, 2006; SCHAUER; FERNIE, 2006; MEDEIROS, SIMONEIT, 2007; STREHMEL, et al., 2008; ALLWOOD, et al., 2009; RUIZ-MATUTE et al., 2011). Neste sentido, investigou-se a sensibilidade da técnica de CG-EM frente a alguns padrões em diferentes concentrações (i.e. açúcares, açúcares álcoois, compostos nitrogenados, aminoácidos, fosfatados e ácidos, na faixa de 20 a 400 nmol.mL^{-1} , Tabela 2).

Tabela 2. Detecção por CG-EM dos padrões derivatizados em diferentes concentrações.

ID	Composto	Concentração (nmol.mL ⁻¹)					
		20 (5%)	80 (20%)	160 (40%)	240 (60%)	320 (80%)	400 (100%)
Aminoácidos							
1	Alanina	-	+	+	+	+	+
2	Valina	-	-	+	+	+	+
3	Serina	-	-	+	+	+	+
4	Leucina	-	-	+	+	+	+
6	Isoleucina	-	-	+	+	+	+
7	Glicina	+	+	+	+	+	+
11	Treonina	-	+	+	+	+	+
13	Metionina	-	-	+	+	+	+
14	Ácido Aspárico	-	-	+	+	+	+
15	Fenilalanina	-	-	+	+	+	+
16	Ácido Glutâmico	-	+	+	+	+	+
24	Lisina	-	-	+	+	+	+
-	Prolina	-	-	+	+	+	+
-	Tirosina	-	-	-	-	-	+
-	Arginina	-	-	-	-	-	-
-	Cistina	-	-	-	-	-	-
-	Histidina	-	-	-	-	-	-
-	Triptofano	-	-	-	-	-	-
N-compostos							
19	Putrescina	-	-	+	+	+	+
-	Espermidina	-	-	-	-	-	+
-	Espermina	-	-	-	-	-	+
Fosfatados							
33	Glicose-6-fosfatase	-	+	+	+	+	+
-	Frutose-6-fosfatase	-	-	+	+	+	+
Açúcares álcoois							
5	Glicerol	+	+	+	+	+	+
18	Xilitol	+	+	+	+	+	+
30	Manitol	+	+	+	+	+	+
31	Sorbitol	+	+	+	+	+	+
32	Inositol	+	+	+	+	+	+
Açúcares							
17	Arabinose	+	+	+	+	+	+
25, 25'	Frutose	+	+	+	+	+	+
27, 27'	Glicose	+	+	+	+	+	+
28, 28'	Galactose	+	+	+	+	+	+
34	Sacarose	+	+	+	+	+	+
35,35'	Maltose	+	+	+	+	+	+
Ácidos							
8	Ácido Succínico	+	+	+	+	+	+
9	Ácido Glicérico	+	+	+	+	+	+
10	Ácido Fumárico	-	+	+	+	+	+
12	Ácido Málico	+	+	+	+	+	+
21	Ácido Chiquímico	+	+	+	+	+	+
22	Ácido Isocitríco	+	+	+	+	+	+
23	Ácido Cítrico	+	+	+	+	+	+

Nota: (+) Composto encontrado na concentração testada. (-) Composto não encontrado na concentração testada.

A análise dos resultados (Tabela 2) demonstrou que a sensibilidade de detecção é menor para os aminoácidos. Os compostos arginina, cistina, histidina e

triptofano não foram detectados em nenhuma das concentrações testadas. Os demais aminoácidos, a putrecina e a frutose-6-fosfatase não foram detectados em concentrações inferiores a 160 nmol.mL^{-1} . Os açúcares e ácidos, com exceção do ácido fumárico ($>80 \text{ nmol.mL}^{-1}$), foram detectados em toda a faixa de concentrações testadas. Pôde-se notar, também, que embora os compostos tenham sido preparados na mesma concentração, os sinais das substâncias, das distintas famílias de metabólitos, apresentaram-se de forma irregular, como é apresentado na Figura 7.

Os compostos analisados apresentam como característica os m/z $[M-15]^+$, correspondente a perda de uma metila da molécula ionizada e, o m/z 73 característico da presença do grupo TMS $[\text{Si}(\text{CH}_3)_3]^+$. Para os carboidratos, e seus derivados álcoois, a ionização segue um padrão, onde os espectros de massas de sacarídeos contendo o grupo pirano se caracterizam pelo fragmento de m/z 205, como no caso da glicose. Já os sacarídeos contendo o grupo furano (e.g. frutose) possuem o m/z 217 proeminente (pico base) (LAINE, SWEELEY, 1971; MEDEIROS; SIMONEIT, 2007; RUIZ-MATUTE et al., 2011). A Figura 8 apresenta o espectro de massa característico de uma frutose, açúcar redutor, (oximada e sililalizada), onde notam-se as distintas ionizações da molécula.

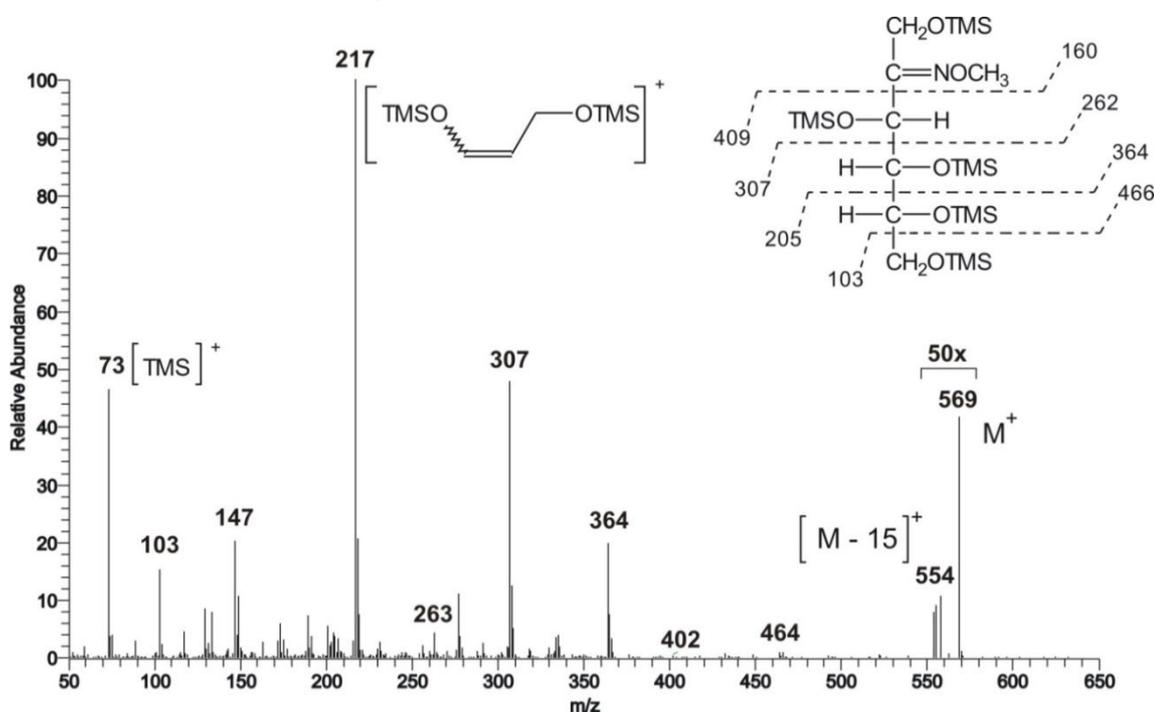


Figura 8. Espectro de massa de uma Frutose derivatizada (oximada com 5 grupos TMS). No detalhe ampliação de 50x na região referente ao íon molecular.

Fonte: O autor.

5.2 IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE DE METABÓLITOS POLARES EM EUCALIPTO POR CG-EM

Para a obtenção de um perfil metabólico de extratos de tecido vegetal as análises devem ser realizadas utilizando no mínimo três replicatas, para que seja possível uma base estatística para interpretação e validação dos dados (SUMMER et al., 2004).

A quantificação dos metabólitos encontrados pode ser qualitativa ou relativa (“semi” quantitativa). A primeira verifica apenas a presença ou ausência dos compostos de interesse. A segunda pode ser subdividida entre aquela que utiliza a soma da área relativa de todos os metabólitos, distribuindo-os para que a soma total das áreas seja 100 %, e quando da adição de um padrão interno, na qual é feita a relação entre a área do composto de interesse e o padrão, assumindo que todos os compostos tenham fatores de respostas similares (HOFFMAN et al., 2010; DIBROSSES, KOPKA, UDVAR, 2005; SUMMER et al., 2004).

A identificação dos constituintes ocorreu mediante comparação com padrões, análise dos espectros de massas e determinação do índice de Kovats (IK). A comparação do IK determinado com os valores estabelecidos foi feita com base na biblioteca MSRI disponível on-line (MSRI, 2012; STREHMEL et al., 2008; SCHAUER et al., 2005; WAGNER, SEFKOW, KOPKA, 2002). A utilização dessas três ferramentas possibilita uma identificação segura dos metabólitos polares presentes (Tabelas 3 e 4).

As Tabelas 3 e 4 apresentam a análise qualitativa, fragmentos característicos, índice de Kovats, massa molecular, e o número de substituintes da derivatização dos metabólitos identificados nos distintos tecidos vegetais das duas espécies de eucaliptos estudadas. Nas Tabelas 3 e 4, são observados uma alta abundância dos carboidratos em relação aos demais compostos, representando cerca de 50 % e 62 % para *E. grandis* e 51 % e 70 % em *E. benthamii* do total de compostos em tecido jovem e adulto respectivamente (Figura 9).

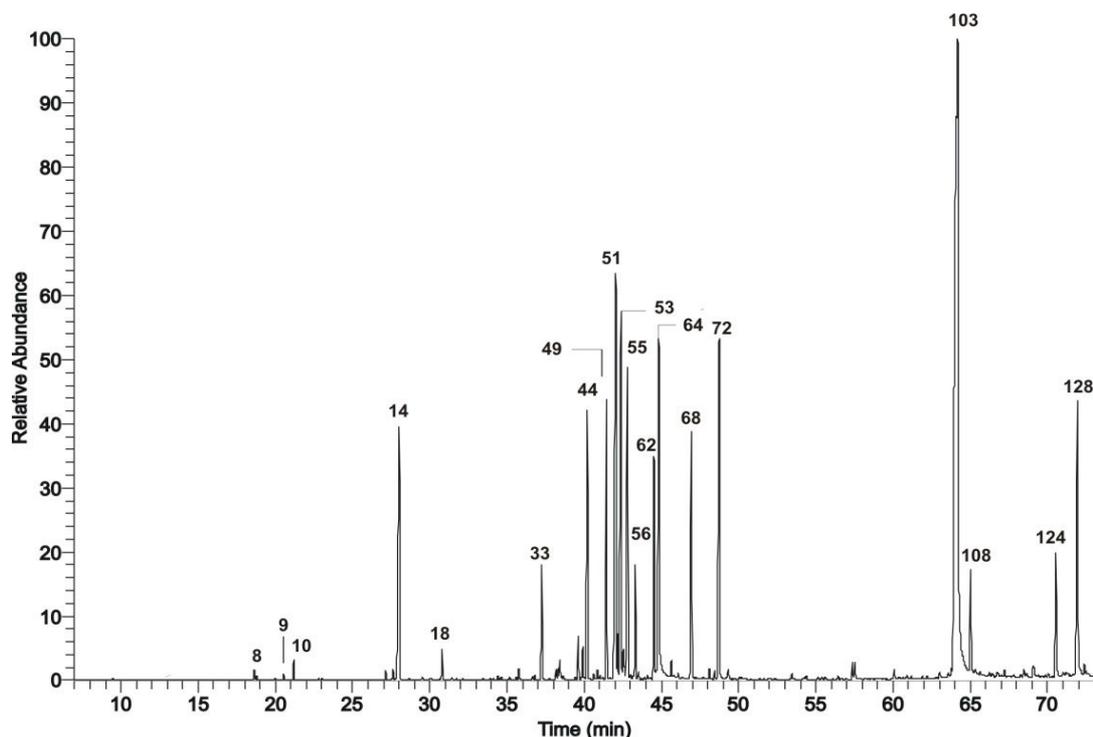


Figura 9. Cromatograma da corrente total de íons de um extrato de folha adulta de *Eucalyptus grandis*. A identificação dos compostos é apresentada na Tabela 3. O composto 14 não foi encontrado em todas as replicatas, e os compostos 33, 124 e 128 não foram identificados. Fonte: O autor.

A presença predominante de açúcares pode ser justificado, pela alta sensibilidade do método para carboidratos e também pelo horário de coleta do material (11:00 h), já que esses compostos estão diretamente relacionados com os processos bioquímicos envolvidos na fotossíntese (HOFFMAN et al., 2010; BERTAMINI; NEDUNCHEZHIAN, 2002; MAGEL; EINING, 2000; MAING, 2000).

Observando as Tabelas 3 e 4, verifica-se ainda que aminoácidos e compostos nitrogenados apresentaram menor predominância, devido ao (i) seu rápido consumo celular, pois estão envolvidos no processo de crescimento da planta, os quais são convertidos em outros compostos e (ii) pela técnica analítica empregada ser menos sensível para aminoácidos (TAIZ, ZEIGER; 2002).

Ácidos e açúcares álcoois, juntamente, representam aproximadamente 25 % e 29% do total de compostos encontrados em *E. grandis* e, 38 % e 25 % em *E. benthamii* em tecidos jovem e adulto, respectivamente.

O ácido cinâmico está relacionado com o crescimento e indução das raízes. Esse fato explica seu aparecimento exclusivo em tecido jovem de *E. benthamii* (Tabela 4), já que é sintetizado a partir da fenilalanina e convertido em ácido cumárico, que é um precursor na biossíntese de compostos fenólicos dando origem a lignina (WONG et al., 2005).

Cinquenta e seis compostos não identificados foram diferenciados e quantificados com base nos dados espectrais (Apêndice A). As dificuldades em identificar os compostos podem estar relacionadas a três fatores principais: (i) efeito matriz ocasionado pela grande quantidade e complexidade dos compostos no extrato, o que causou uma interferência nos espectros de massas, (ii) a difícil relação entre a substância e seu Índice de Kovats, quando da presença de isômeros e, (iii) falta de estudos na área de metabolômica com espécies florestais.

Tabela 3. Compostos derivados identificados em extratos de folhas jovens e adultas de *Eucalyptus grandis*.

(Continua)

ID ^a	Composto	IK ^b	Area Relativa (%)				Grupos adicionais	Fragmentos característicos (m/z)	MM ^c
			Jovem		Adulto				
8	Glicerol	1277,69	0,119	± 0,018	0,058	± 0,003	TMS (3)	73, 147, 149, 205, 217	308
14	Ácido málico	1490,51	5,840	± 4,459	-	-	TMS (3)	73, 147, 190, 233, 245	350
15	Eritritol	1510,22	0,030	± 0,013	-	-	TMS (4)	73, 103, 147, 205, 217	410
16	Ácido piro-glutâmico	1530,75	-	-	0,037	± 0,017	TMS (2)	73, 147, 156, 230	273
24	Xilose	1659,09	-	-	0,036	± 0,017	Oxima (1) TMS (4)	117, 147, 173, 205, 263	467
25	Ribose	1665,95	-	-	0,023	± 0,012	Oxima (1) TMS (4)	73, 103, 147, 217, 307	467
26	L-asparagina	1679,77	0,084	± 0,006	0,028	± 0,005	TMS (3)	73, 147, 188, 204, 307	348
28	Ribose	1694,67	0,343	± 0,126	0,132	± 0,048	Oxima (1) TMS (4)	73, 103, 147, 217, 307	467
30	Xilitol	1720,66	0,063	± 0,016	0,043	± 0,007	TMS (5)	73, 103, 117, 147, 217	512
37	Ácido ribônico	1762,73	0,216	± 0,145	-	-	TMS (5)	73, 103, 47, 217, 292	526
38	Ácido pentanóico	1766,94	0,178	± 0,034	-	-	TMS (1)	73, 75, 117, 159	174
39	Frutose	1769,63	-	-	0,293	± 0,094	Oxima (1) TMS (4)	73, 103, 147, 217	497
40	Alose	1775,12	0,704	± 0,145	0,317	± 0,092	Oxima (1) TMS (5)	73, 147, 217, 319	569
41	Alose	1796,52	-	-	0,032	± 0,007	Oxima (1) TMS (5)	73, 147, 217, 319	569
42	Xilose fosfatase	1801,83	0,124	± 0,063	0,121	± 0,062	Oxima (1) TMS (4)	73, 117, 147, 173, 205	590
43	Ácido glucônico	1813,74	0,448	± 0,118	-	-	TMS (6)	73, 147, 292, 305, 333	642
44	Ácido isocítrico	1819,71	3,856	± 0,272	4,094	± 0,158	TMS (4)	45, 73, 147, 273	480
45	Ácido cítrico	1831,98	0,487	± 0,626	0,359	± 0,159	TMS (4)	45, 73, 147, 273	480
46	Pinitol	1838,84	0,339	± 0,205	-	-	TMS (5)	73, 147, 217, 305	554
49	Ácido ascórbico	1856,15	1,687	± 1,294	1,086	± 0,562	TMS (3)	73, 117, 147, 205, 274	464
51	Frutose	1872,39	11,391	± 1,421	10,952	± 0,540	Oxima (1) TMS (5)	73, 103, 147, 217, 307	569
53	Frutose	1882,71	9,582	± 0,906	9,032	± 0,339	Oxima (1) TMS (5)	73, 147, 204, 217, 319	569
55	Glicose	1894,64	14,649	± 2,394	7,823	± 1,032	Oxima (1) TMS (5)	73, 103, 205, 217, 319	569
56	Glicose	1911,41	3,346	± 0,548	1,780	± 0,452	Oxima (1) TMS (5)	73, 147, 189, 205, 319	569
57	Lisina	1918,03	0,118	± 0,052	-	-	TMS (2)	49, 73, 84, 102, 156	304
59	Manitol	1929,28	-	-	0,033	± 0,004	TMS (6)	73, 147, 204, 217, 319	614
60	Sorbitol	1937,36	-	-	0,101	± 0,034	TMS (6)	73, 147, 204, 319	614
62	Ononitol	1949,07	-	-	3,970	± 0,113	TMS (6)	73, 147, 204, 319	614
64	Ácido gálico	1957,03	-	-	5,693	± 0,101	TMS (4)	73, 281, 443, 458	458
66	Ácido galactônico	1997,34	0,258	± 0,179	0,116	± 0,031	TMS (6)	73, 147, 205, 305, 333	628
68	scilo-Inositol	2023,99	6,729	± 0,218	4,936	± 0,001	TMS (6)	73, 147, 204, 217, 318	612
72	mio-Inositol	2080,64	6,773	± 0,575	8,424	± 0,115	TMS (6)	73, 147, 204, 217, 318	612
73	Ácido úrico	2100,00	0,172	± 0,051	0,215	± 0,014	TMS (4)	73, 147, 207, 383, 441	456

(Conclusão)

ID ^a	Composto	IK ^b	Area Relativa (%)				Grupos adicionais	Fragmentos característicos (m/z)	MM ^c
			Jovem		Adulto				
82	Espermidina	2199,03	-	-	0,015	± 0,001	TMS (4)	73, 84, 119, 204	433
85	Frutose-6-fosfatase	2314,8	0,046	0,012	0,034	± 0,003	Oxima (1) TMS (6)	73, 147, 217, 315, 459	721
86	Galactose-6-fosfatase	2348,8	-	-	0,080	± 0,015	Oxima (1) TMS (6)	73, 147, 217, 247, 299, 387	721
101	Turanose	2616,52	-	-	0,320	± 0,124	Oxima (1) TMS (8)	73, 103, 147, 217, 361	947
103	Sacarose	2634,58	9,946	± 1,957	29,30	± 3,109	TMS (8)	73, 169, 217, 361, 437	918
104	Ácido Docosanóico	2644,37	-	-	0,091	± 0,051	TMS (1)	73, 75, 146, 395, 427	412
108	Lactose	2687,21	-	-	0,734	± 0,406	Oxima (1) TMS (8)	73, 147, 205, 361, 451	947
110	Maltose	2724,23	0,108	± 0,071	0,107	± 0,014	Oxima (1) TMS (8)	73, 103, 147, 217, 361	947
112	Trehalose	2746,50	0,397	± 0,482	1,291	± 0,279	Oxima (1) TMS (8)	73, 103, 147, 217, 361	947
114	Maltose	2766,50	0,106	0,086	0,192	± 0,007	Oxima (1) TMS (8)	73, 103, 147, 217, 361	947

Nota: a) Identificação; b) índice de Kovats; c) massa molar.

Fonte: O autor.

Tabela 4. Compostos derivados identificados em extratos de folhas jovens e adultas de *Eucalyptus benthamii*.

(Continua)

ID ^a	Composto	IK ^b	Area Relativa (%)				Grupos adicionais	Fragmentos característicos (m/z)	MM ^c
			Jovem		Adulto				
3	Ácido propanóico	1060,82	0,023	±0,014	0,025	±0,003	TMS (1)	45, 73, 75, 131, 146	146
4	Glicina	1141,43	-	-	0,082	±0,023	TMS (1)	47, 73, 103, 114, 132	147
5	Ácido heptnóico	1169,61	-	-	0,028	±0,005	TMS (1)	45, 73, 103, 105, 115	202
7	Leucina	1272,92	0,078	±0,018	0,070	±0,014	TMS (2)	59,73, 133, 147, 158	275
8	Glicerol	1277,69	0,148	±0,004	0,149	±0,031	TMS (3)	73, 147, 149, 205, 217	308
9	Ácido succínico	1315,42	0,095	±0,030	0,064	±0,017	TMS (2)	55, 73, 129, 147, 247	262
12	Alanina	1369,41	0,122	±0,037	0,174	±0,048	TMS (2)	45, 59, 73, 116, 147, 190	233
14	Ácido málico	1490,51	0,818	±0,240	0,954	±0,151	TMS (3)	73, 147, 190, 233, 245	350
18	Fenilalanina	1564,82	0,279	±0,116	0,516	±0,080	TMS (2)	45,73, 100, 147, 192, 218	309
20	Ácido piro-glutâmico	1530,75	0,192	±0,094	0,064	±0,002	TMS (2)	73, 147, 156, 230	273
21	Ácido cinâmico	1610,13	0,064	±0,046	-	-	TMS (1)	73, 131,161, 205, 220	220
24	Xilose	1659,09	0,027	±0,008	-	-	Oxima (1) TMS (4)	117, 147, 173, 205, 263	467
26	L-asparagina	1679,77	0,094	±0,020	-	-	TMS (3)	73, 147,188, 204, 307	348
28	Ribose	1694,67	0,057	±0,024	-	-	Oxima (1) TMS (4)	73,103,147, 217, 307	467
37	Ácido ribônico	1762,73	0,048	±0,012	0,0652	±0,015	TMS (5)	73,103, 47, 217, 292	526
38	Ácido pentanóico	1766,94	0,211	±0,050	-	-	TMS (1)	73, 75, 117, 159	174
39	Frutose	1769,63	-	-	0,075	±0,024	Oxima (1) TMS (4)	73, 103, 147, 217	497
40	Alose	1775,12	0,148	±0,047	0,235	±0,046	Oxima (1) TMS (5)	73, 147, 217, 319	569
43	Ácido glucônico	1813,74	0,038	±0,013	0,093	±0,020	TMS (6)	73,147, 292, 305, 333	642
44	Ácido isocítrico	1819,71	0,987	±0,271	0,719	±0,151	TMS (4)	45, 73, 147, 273	480
45	Ácido cítrico	1831,98	0,175	±0,032	0,029	±0,008	TMS (4)	45, 73, 147, 273	480
46	Pinitol	1838,84	0,063	±0,010	0,071	±0,024	TMS (5)	73,147, 217, 305	554
49	Ácido ascórbico	1856,15	6,733	±0,731	5,623	±0,608	TMS (3)	73, 117, 147, 205, 274	464
51	Frutose	1872,39	6,679	±0,504	7,852	±0,794	Oxima (1) TMS (5)	73, 103, 147, 217, 307	569
53	Frutose	1882,71	5,234	±0,521	5,863	±0,831	Oxima (1) TMS (5)	73, 147, 204, 217, 319	569
55	Glicose	1894,64	-	-	8,806	±1,131	Oxima (1) TMS (5)	73, 103, 205, 217, 319	569
56	Glicose	1911,41	9,338	±0,448	1,304	±0,243	Oxima (1) TMS (5)	73, 147, 189, 205, 319	569
60	Sorbitol	1937,36	0,075	±0,012	0,087	±0,006	TMS (6)	73, 147, 204, 319	614
61	Tirosina	1942,32	0,029	±0,014	-	-	TMS (2)	45, 73, 179, 208, 219	365
62	Ononitol	1949,07	11,435	±0,975	0,122	±0,033	TMS (6)	73, 147, 204, 319	614
64	Ácido gálico	1957,03	0,361	±0,084	0,201	±0,039	TMS (4)	73, 281, 443, 458	458
68	scilo-Inositol	2023,99	10,090	±0,273	2,126	±0,125	TMS (6)	73, 147, 204, 217, 318	612
72	mio-Inositol	2080,64	6,6663	±0,184	14,9363	0,6893	TMS (6)	73, 147, 204, 217, 318	612
103	Sacarose	2634,58	28,980	±2,377	45,2116	±3,605	TMS (8)	73, 169, 217, 361, 437	918
104	Ácido Docosanóico	2644,37	0,084	±0,048	0,129	±0,010	TMS (1)	73, 75, 146, 395, 427	412

(Conclusão)

ID ^a	Composto	IK ^b	Area Relativa (%)				Grupos adicionais	Fragmentos característicos (m/z)	MM ^c
			Jovem		Adulto				
108	Lactose	2687,21	0,094	± 0,043	0,043	± 0,013	Oxima (1) TMS (8)	73, 147, 205, 361, 451	947
110	Maltose	2724,23	-	-	0,043	± 0,002	Oxima (1) TMS (8)	73, 103, 147, 217, 361	947
114	Maltose	2766,50	0,098	± 0,060	0,051	± 0,004	Oxima (1) TMS (8)	73, 103, 147, 217, 361	947

Nota: a) Identificação; b) índice de Kovats; c) massa molar.

Fonte: O autor.

5.3 CARBOIDRATOS NA DISTINÇÃO ENTRE IDADES DE FOLHAS

A análise de PCA permite identificar substâncias químicas mais relevantes nas amostras estudadas (HOFFMAN et al., 2010; LUEDEMANN et al., 2008; DUNN, ELLIS, 2005; GOODAGRE, 2005, VILLAS-BÔAS et al., 2005; FIEHN, 2002; FIEHN et al., 2000a). Desta maneira, a contribuição de cada metabólito para um determinado conjunto de amostra é refletido pelo valor de carga derivado da análise de componentes principais (PCA). Na análise de PCA os metabólitos com maiores valores de carga são indicados com maior influência sobre as respectivas características de um dos componentes (SUMMER et al., 2007; DIBROSSES, KOPKA, UDVAR, 2005; JEONG et al., 2004; SUMMER et al., 2004). O método identifica e classifica as principais fontes de variação dentro de conjuntos de dados e permite o agrupamento devido às características de uma amostra, identificando semelhanças e diferenças (DIBROSSES, KOPKA, UDVAR, 2005).

No caso, o PCA identifica os elementos (metabólitos) que mais contribuem para cada conjunto de folhas jovens e adultas (Figura 10 A) (ROESSNER et al. , 2001a , 2001b). A contribuição de cada metabólito a um componente específico é refletido pelo valor de carga derivado da análise de PCA. Esses metabólitos com maiores valores de carga são indicados como tendo a mais forte influência sobre as respectivas características de um grupo (Figura 10 B).

Para as análises estatísticas foram utilizados os dados considerando a distribuição relativa dos metabólitos identificados nas duas idades. Na Figura 10 B, para o *Eucalyptus grandis*, revela que os açúcares redutores apresentam maior influência no tecido foliar jovem 40 (alose) e 55 (glicose), e o açúcar não redutor sacarose (103) foi encontrado em maior abundância no tecido foliar adulto. Essa diferença fica mais evidente ao se analisar o histograma comparativo entre as duas idades (Figura 11), onde verifica-se que os açúcares alose, glicose e sacarose apresentam diferença significativa ($p > 0,01$) entre as distintas idades de tecido foliar.

Como nos açúcares redutores ocorre isomeria geométrica ocasionada pela oximação, optou-se para tratamento dos dados a escolha de apenas um dos isômeros, onde os dados originais foram transformados para log.

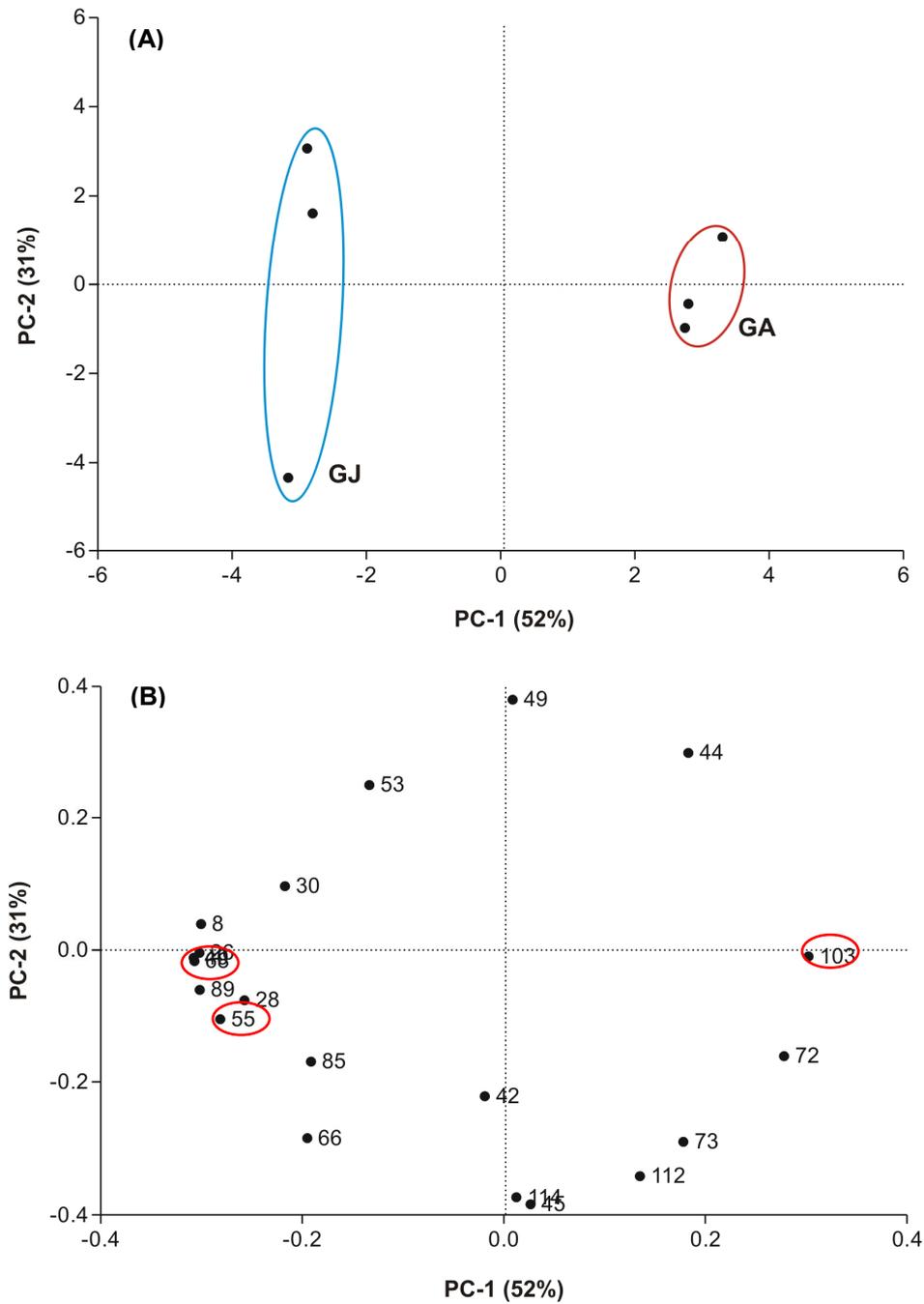


Figura 10. (A) Scores do conjunto de folhas jovens (GJ) e adultas (GA) de *E. grandis*. (B) Loadings dos dados destacando os açúcares redutores (55, 40) em tecido foliar jovem e de sacarose (103) para tecido adulto. A identificação dos compostos pode ser visualizada na Tabela 3.

Fonte: O autor.

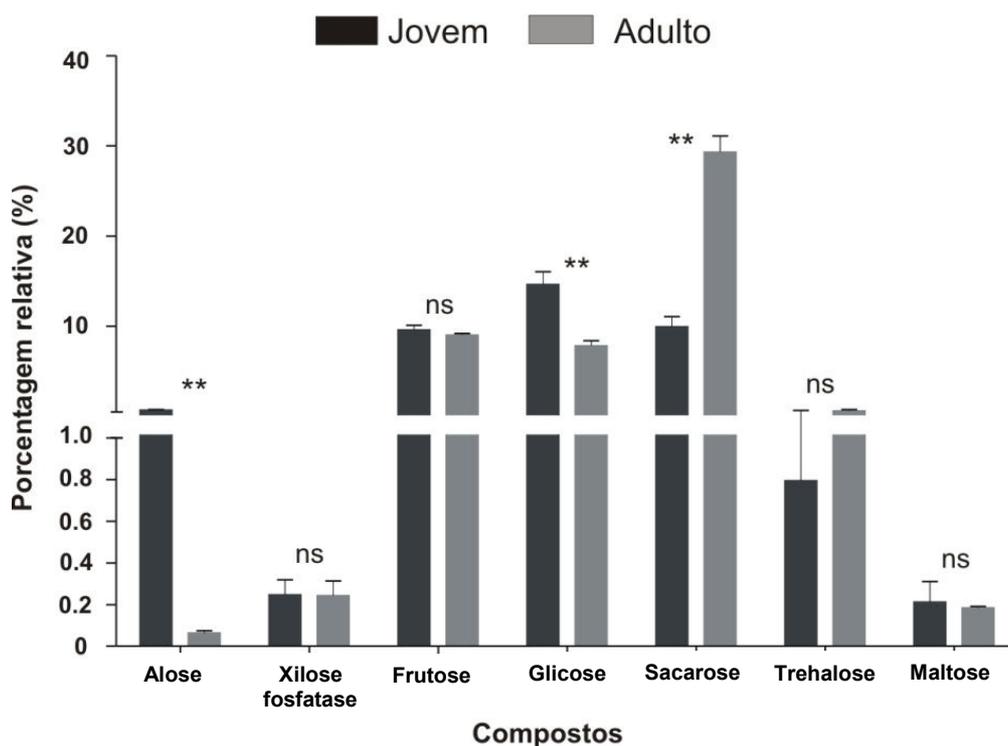


Figura 11. Histograma comparativo dos carboidratos identificados em extrato de tecido foliar jovem e adulto de *Eucalyptus grandis*. Onde **, $p < 0,01$ e ns, $p > 0,05$.
Fonte: O autor.

As mesmas análises estatísticas foram realizadas com o *Eucalyptus benthamii*, como pode ser observado nas Figuras 12 e 13, que demonstraram que os açúcares redutores 54 (frutose), 56 (glicose), 114 (maltose) apresentaram maior influência no tecido foliar jovem e, a sacarose (103), açúcar não redutor, apresentou maior influência em tecido adulto, bem como os açúcares redutores (53) galactose e (40) alose. Entretanto somente a glicose e sacarose apresentaram diferença significativa ($p > 0,01$) entre as distintas idades de tecido foliar.

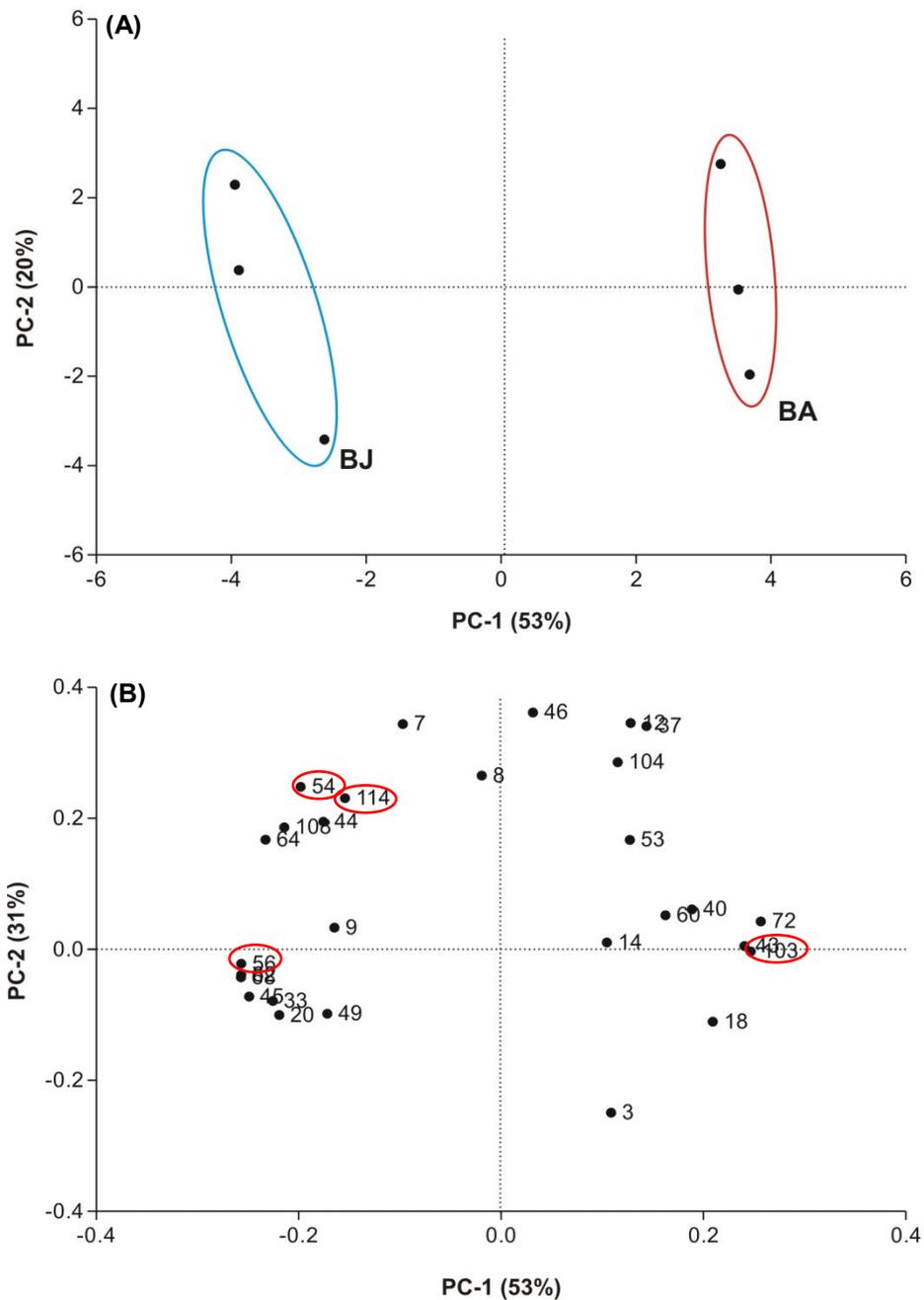


Figura 12. (A) Scores do conjunto de folhas jovens (BJ) e adultas (BA) de *E. benthamii*. (B) Loadings dos dados destacando os açúcares redutores (54, 56, 114) em tecido foliar jovem e de sacarose (103) para tecido adulto. A identificação dos compostos pode ser visualizada na Tabela 4.

Fonte: O autor.

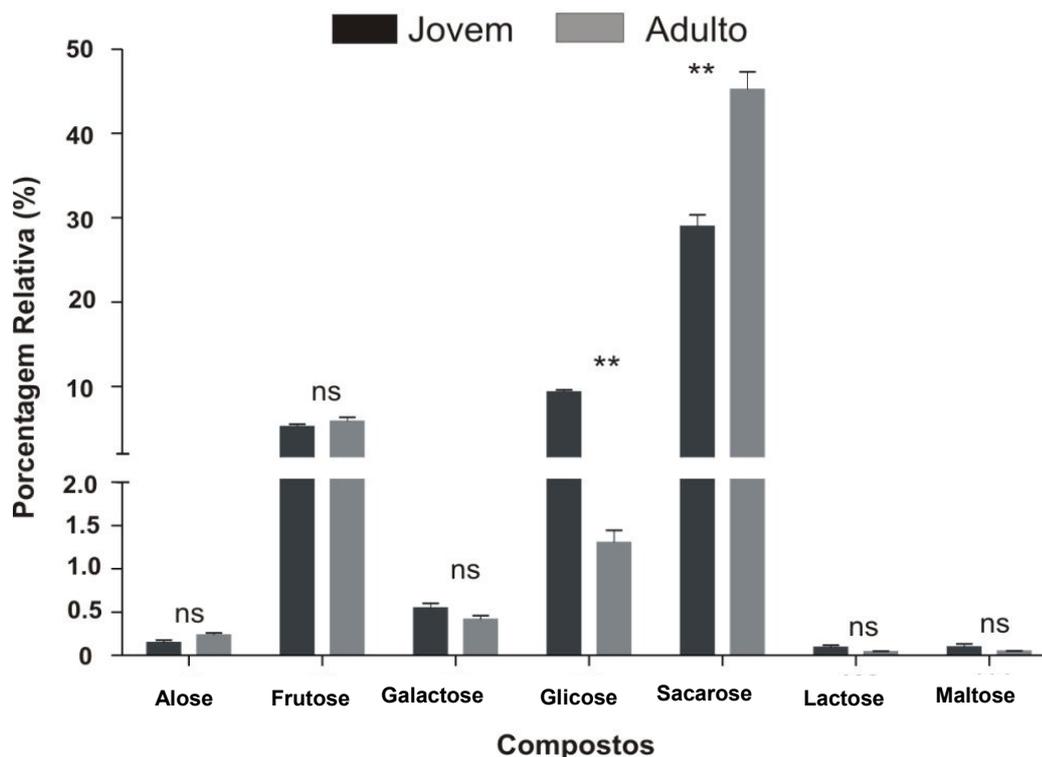


Figura 13. Histograma comparativo dos carboidratos identificados em tecido foliar jovem e adulto de *Eucalyptus benthamii*. Onde **, $p < 0,01$ e ns, $p > 0,05$.
Fonte: O autor.

Ao analisar os histogramas das Figuras 11 e 13, observa-se que a sacarose foi o açúcar encontrado em maior abundância, sendo predominante no tecido adulto. Esse resultado corrobora com a literatura, uma vez que a sacarose é um “foto-metabólito”, sua produção é massiva durante o foto período sendo, então, metabolizada a outros compostos à noite (HOFMAN et al., 2010; BERTAMINI; NEDUNCHEZHIAN, 2002; MAGEL, EINIG, HAMPP, 2000; DAVIS, LOESCHER, 1991). Assim, o horário de coleta influenciou no aparecimento deste e de outros açúcares. Durante o processo de fotossíntese a seiva de carboidratos translocados é de açúcares não redutores porque eles são menos reativos do que as suas contrapartes redutoras, sendo a sacarose o açúcar mais comumente translocado (TAIZ, ZEIGER; 2002; KOZLOWSKI, 1992). A concentração de sacarose tende a ser maior em folhas adultas por possuírem maior capacidade de metabolizar este carboidrato e outros açúcares não redutores como a trehalose, que foi detectada em tecido adulto em *E. grandis* (WAGNER, SEFKOW, KOPKA, 2002; TAIZ, ZEIGER; 2002; MAGEL, EINIG, HAMPP, 2000; DAVIS, LOESCHER, 1991).

Além disso, em folhas adultas o metabolismo de açúcares não redutores é mais eficiente, pois nesta idade os cloroplastos e outras organelas utilizadas para a metabolização já estão totalmente formadas, além de possuírem maior quantidade de clorofila, aumentando a atividade fotossintética (BERTAMINI; NEDUNCHEZHIAN, 2002). Os açúcares não redutores sofrem hidrólise e geram açúcares redutores como glicose e frutose. Os açúcares, de modo geral, são responsáveis pela estrutura e proteção da planta, e como armazenadores de energia, e são produzidos durante o processo de fotossíntese (ROESSNER et al., 2000; MAING, 2000; MAGEL, EINIG, HAMPP, 2000; KOZLOWSKI, 1992, DAVIS, LOESCHER, 1991). A glicose é o açúcar presente na parede celular de tecidos vegetais, sendo utilizado para produção de celulose, que promove a sustentação e proteção na planta. Entretanto, a glicose está associada, também com processos metabólicos de crescimento e maturação de alguns órgãos. Fato que explica sua maior relevância em tecido jovem, que está ainda em fase de crescimento e, utilizará este carboidrato para desenvolvimento e maturação de suas estruturas (BERTAMINI; NEDUNCHEZHIAN, 2002; KOZLOWSKI, 1992).

Outros compostos como açúcares álcoois, ácidos e aminoácidos também ocasionam diferenciação no PCA (Figuras 10 e 12), sendo o composto 72 (mio-inositol) predominante em tecido adulto. Os açúcares álcoois desempenham um papel fundamental no metabolismo de algumas plantas, já que são produtos primários do processo de fotossíntese e estão envolvidos na resposta ao stress biótico. Esses compostos são utilizados como defesa, proteção e para manutenção positiva da transpiração, podendo ser transportado pelo floema para toda a planta, sendo acumulados como fonte secundária de energia durante o período de luz da fotossíntese e transportado no escuro. Isto pode justificar a maior predominância destes compostos em tecido jovem, pois estes, devido sua posição no galho, são mais atingidos pelos raios de sol, estando mais sujeitos a perda osmótica de água (STOOP, WILLIANSO, PHARR, 1996; MAIG, 2000).

5.4 ANÁLISE FENOTÍPICA DE *E. grandis* e *E. benthamii* ATRAVÉS DE PERFIL DE METABÓLITOS POLARES

As espécies de *Eucalyptus spp* estudadas apresentam características de interesse comercial distintas. O *E. grandis* e suas espécies hibridizadas são utilizadas normalmente para a fabricação de papel, e apresentam rápido crescimento em comparação ao *E. benthamii*; enquanto este último tem mostrado resistência a geadas, sendo utilizado normalmente, para fins energéticos através de combustão (HIGA; PEREIRA, 2003; TRUGILHO et al., 2003; POKE et al., 2005; SILVA et al., 2005; PALUDZYSZYN FILHO; SANTOS; FERREIRA, 2006; ALVES et al., 2011).

Desta maneira, a fim de estabelecer as diferenças fenotípicas de interesse comercial armazenadas no perfil de metabólitos, foi feita a comparação entre as diferentes espécies na idade adulta, uma vez que nesta fase a folha apresenta suas estruturas já desenvolvidas e, segundo as Tabela 3 e 4, é a fase em que se encontram a maioria dos compostos com menor variação na resposta relativa dos metabólitos. Este fato está relacionado com o processo produtor-consumidor (“*sick-to-source*”), onde todas as folhas de uma planta sofrem transição de um consumidor (importador de carbono) a uma fonte (exportador de carbono) durante o seu desenvolvimento. O crescimento de uma folha é suportado pelos carboidratos importados de outras fontes na planta, que serão biotransformados em outros metabólitos, estas fontes são geralmente folhas adultas ou outras partes fotossintetizadoras na planta. Quando a folha amadurece os níveis de fotossíntese aumentam até o ponto em que no tecido foliar a quantidade de carbono acumulado na fotossíntese é maior do que o requisitado de respiração e crescimento, nesta fase a folha torna-se um exportador de carbono (TURGEON, 1989; JEONG et al., 2004)

A Tabela 5 apresenta o resultado da análise qualitativa com os 51 compostos detectados em folhas adultas de *E. grandis* e *E. benthamii*. Os compostos ácido piroglutâmico (16), xilose (24), ribose (25,28), asparagina (26), xilitol (30), xilose fosfatase (42) manitol (59), ácido galactônico (66), ácido úrico (73), espermidina (82), frutose-6-fostase (85), galactose-6-fosfatase (86) e thehalose (112), foram encontrados exclusivamente em tecido adulto de *E. grandis*. Já os compostos glicina (4), leucina (7), alanina (12), fenilalanina (18), ácido propanóico (3), ácido heptanóico

(5), ácido succínico (9), ácido málico (14), ácido treônico (20), ácido ribônico (37), ácido pentanóico (38), ácido glucárico (43) e pinitol (46) foram encontrados somente em tecido foliar adulto de *E. benthamii*.

Tabela 5. Compostos derivatizados identificados nos extratos de folhas adultas de *Eucalyptus grandis* (GA) e *E. benthamii* (BA).

ID	IK	Composto	GA	BA	ID	IK	Composto	GA	BA
3	1060,8	Ácido propanóico	-	+	46	1838,8	Pinitol	-	+
4	1141,4	Glicina	-	+	49	1856,2	Ácido ascórbico	+	+
5	1169,6	Ácido heptanóico	-	+	51	1867,5	(E) Frutose	+	+
7	1272,9	Leucina	-	+	53	1877,7	(Z) Frutose	+	+
8	1276,8	Glicerol	+	+	54	1883,0	Galactose	+	+
9	1315,4	Ácido succínico	-	+	55	1889,7	(E) Glicose	+	+
12	1369,4	Alanina	-	+	56	1906,1	(Z) Glicose	+	+
14	1490,5	Ácido málico	-	+	59	1929,3	Manitol	+	-
16	1530,7	Ácido piroglutâmico	+	-	60	1937,4	Sorbitol	+	+
18	1564,8	Fenilalanina	-	+	62	1949,1	Ononitol	+	+
20	1576,6	Ácido treônico	-	+	64	1957,0	Ácido trihidroxibenzóico	+	+
24	1659,1	Xilose	+	-	66	1997,3	Ácido galactonico	+	-
25	1665,9	(E) Ribose	+	-	68	2024,0	Scilo-Inositol	+	+
26	1679,8	Asparagina	+	-	72	2080,6	Mio-inositol	+	+
28	1694,7	Ribose	+	-	73	2100,0	Ácido úrico	+	-
30	1720,7	Xilitol	+	-	82	2199,0	Espermidina	+	-
37	1762,7	Ácido ribônico	-	+	85	2314,8	Frutose-6-fosfatase	+	-
38	1766,9	Ácido pentanóico	-	+	86	2348,8	Galactose-6-fosfatase	+	-
¹ 39	1769,6	Frutose	+	+	101	2616,5	Turanose	+	-
40	1775,1	(E) Alose	+	+	103	2634,6	Sacarose	+	+
41	1796,5	(Z) Alose	+	-	104	2644,4	Ácido docasanóico	+	+
42	1801,8	Xilose fosfatase	+	-	108	2687,2	Lactose	+	+
43	1813,7	Ácido glucárico	-	+	110	2724,2	(E) Maltose	+	+
44	1819,7	Ácido isocítrico	+	+	112	2746,5	Trehalose	+	-
45	1832,0	Ácido cítrico	+	+	114	2766,5	(Z) Maltose	+	+

Nota: (+) composto encontrado em todas as replicatas no tecido; (-) composto não encontrado em todas as replicatas. ¹Frutose 4 TMS.

Fonte: O autor.

A Figura 14 apresenta o PCA dos compostos presentes nas folhas das distintas espécies. Para as análises estatísticas foram utilizados os dados da distribuição relativa dos metabólitos presentes nas duas espécies. Assim, a análise da Figura 14, revela que os compostos sacarose (103), glicerol (8), mio-inositol (72), alose (40), maltose (114), galactose (54) e ácido ascórbico (49) apresentam maior influência no tecido de *E. benthamii*. Os compostos glicose (55), sorbitol (60) e ácido decasanóico (104) não foram relevantes para distinção. Essa diferença fica mais evidente ao se analisar os histogramas comparativos entre as duas espécies (Figura 15). Os compostos não identificados com diferenças significativas apresentam fragmentos característicos de açúcares (Figura 15 D, Apêndice B).

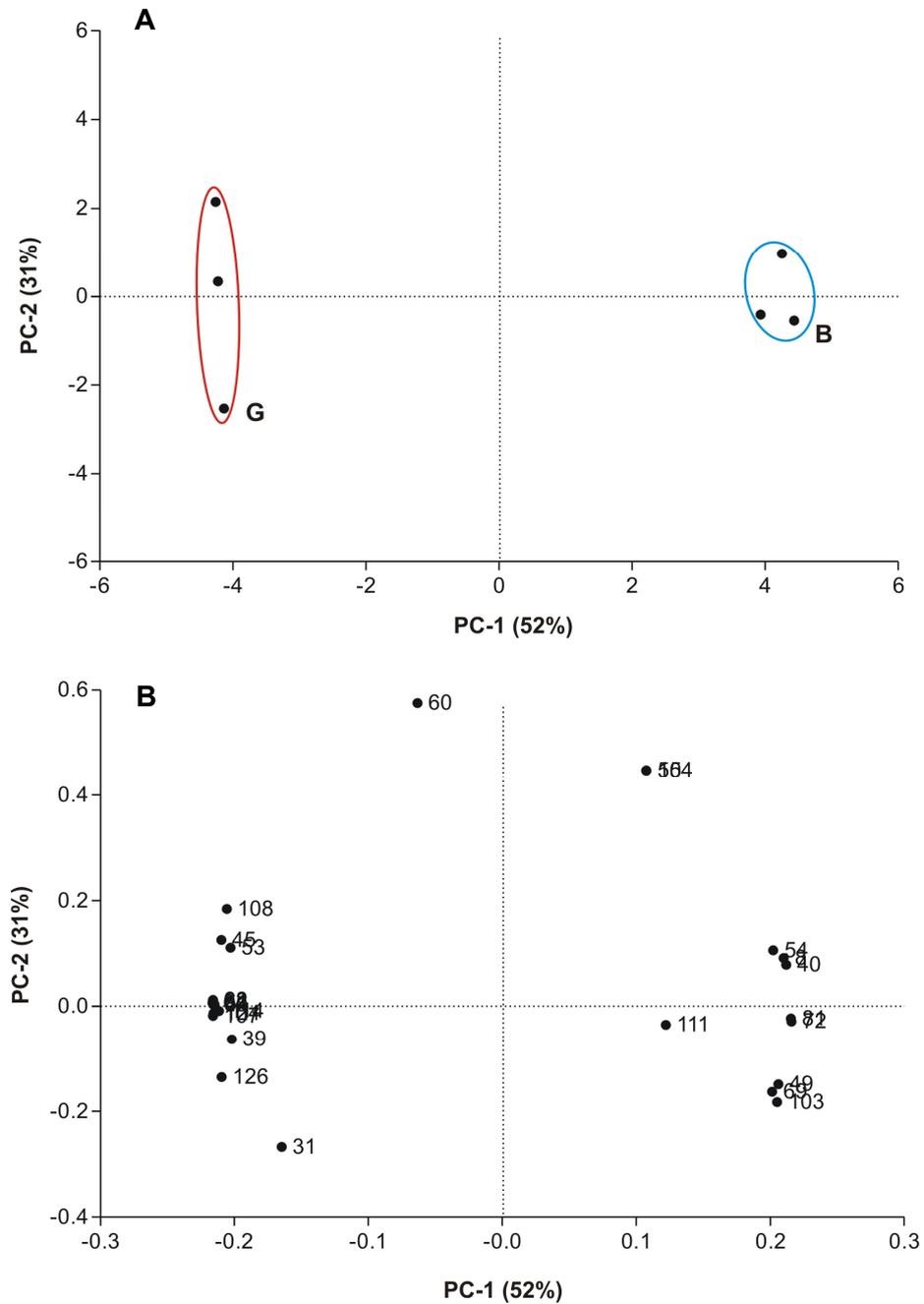


Figura 14. (A) Scores do conjunto de compostos nos extratos de folhas adultas de *E. grandis* (GA) e *E. benthamii* (BA). (B) Loadings dos dados para as distintas espécies. A identificação dos compostos pode ser visualizada na Tabela 5.

Fonte: O autor.

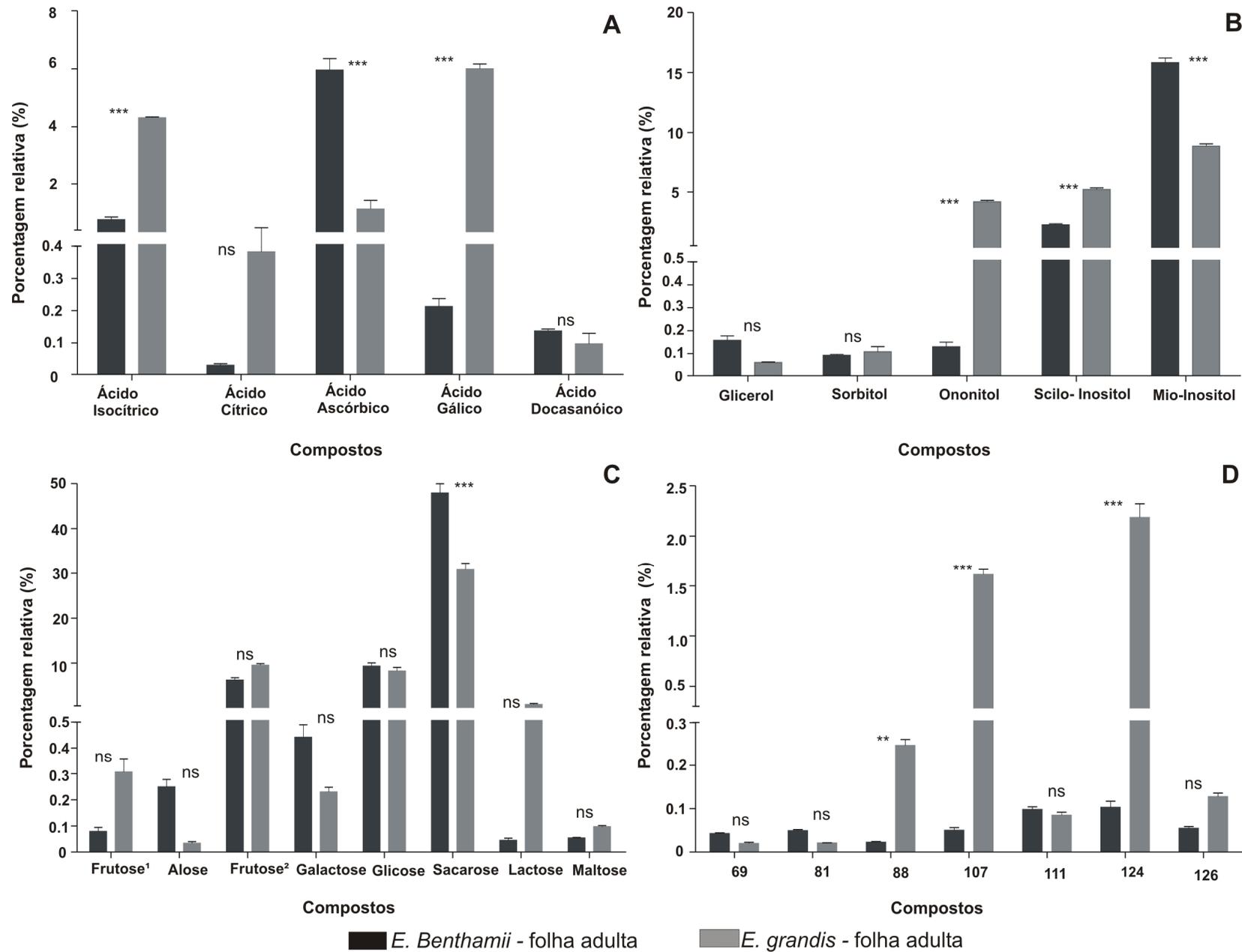


Figura 15. Histogramas comparativos entre as classes dos compostos de (A) ácidos, (B) açúcares álcoois, (C) açúcares e (D) não identificados, extrato detectado adulto de *Eucalyptus grandis* e *E. benthamii*. Identificação Tabela 5 e apêndice A. Onde ***, $p < 0,001$; **, $p < 0,01$ e ns, $p > 0,05$. Fonte: O autor.

Além do que foi anteriormente descrito, vale salientar que a presença de fenilalanina (18) exclusivamente em tecido adulto de *E. benthamii* (Tabela 5), pode indicar o fato desta espécie ser utilizada na obtenção de energia, já que este aminoácido está relacionado com a biossíntese de lignina, via ácido xiquímico (Figura 16). A lignina é uma molécula fenólica, amorfa e complexa sendo a segunda em abundância depois da celulose representando cerca de 30 % de carbono orgânico na biomassa (BOUDET, 2000).

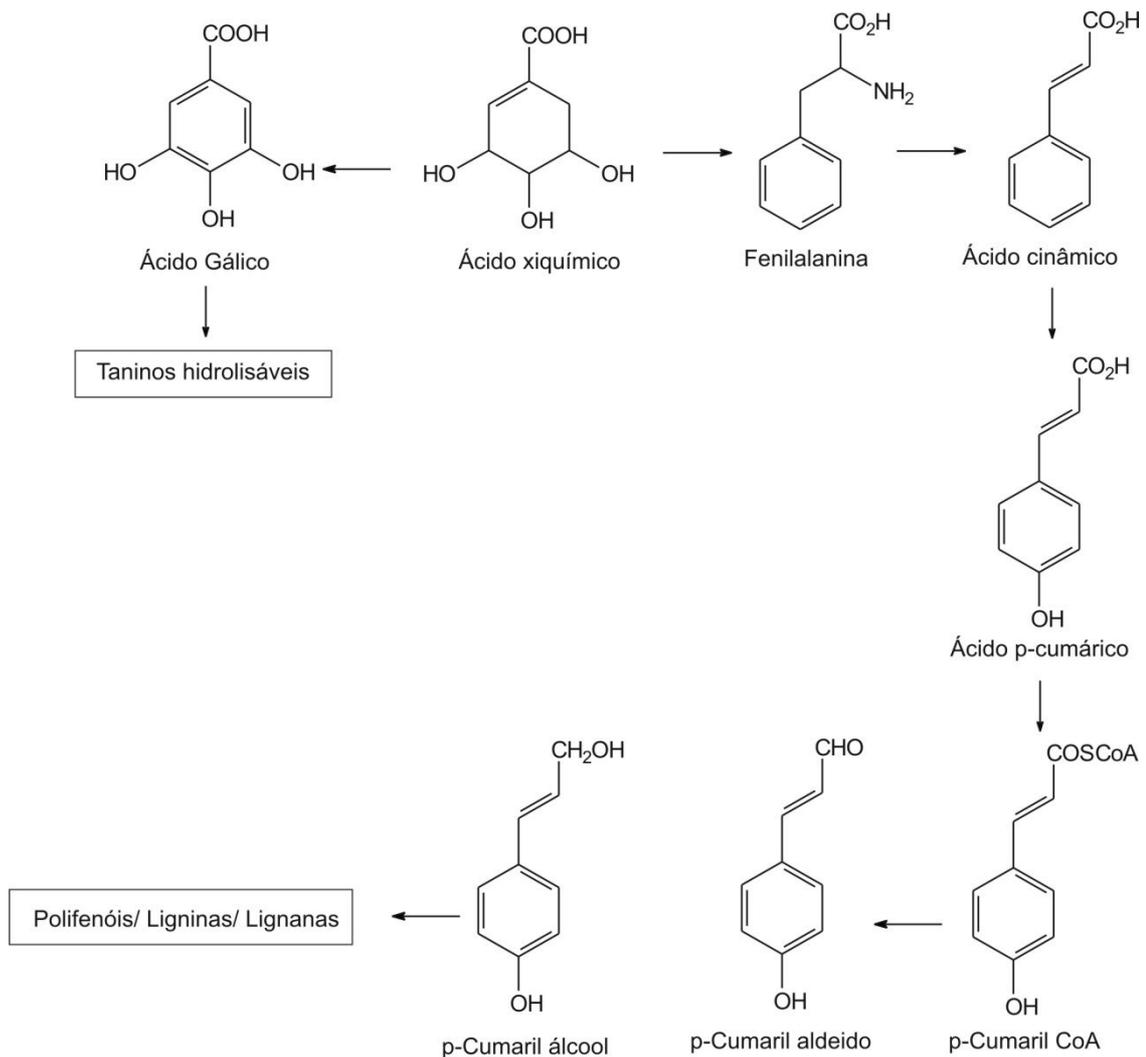


Figura 16. Biossíntese de lignina e outros compostos aromáticos via ácido xiquímico.
 Fonte: Adaptado de Davin et al. (2008); Taiz e Zeiger (2002).

A explicação mais plausível para a biossíntese de fenilalanina tem sua origem no carbono fixo (CO_2) produzido pela planta através da fotossíntese, que pode ser reutilizado por uma variedade de compostos orgânicos como os metabólitos e materiais poliméricos que serão utilizados como parte da estrutura vascular, promovendo crescimento e desenvolvimento do organismo. Uma quantidade

significativa desse carbono assimilado é dirigido para a via do ácido xiquímico, que conduz à produção de fenilalanina, tirosina e triptofano (BENTLEY, 1990 ; BONNER; JENSEN, 1998; COREA et al.; 2012). A fenilalanina origina grande parte dos fenilpropanóides e seus derivados, que podem representar até 60% do peso seco total de algumas espécies florestais, e são representados por compostos como as ligninas, lignanas, flavonóides e cumarinas. Além de ser um precursor de fenilpropanóides, a fenilalanina é um dos 20 aminoácidos que constituem as proteínas vegetais. Isto levanta a possibilidade de que a sua biossíntese é diferencialmente regulada para manter os níveis constitutivos necessários à síntese proteica, e para permitir aumentos maciços no fluxo de carbono, quando há um aumento da demanda por derivados fenilpropanóides, que possuem características interessantes para combustão da madeira (COREA et al.; 2012). Entretanto, vale salientar que o não aparecimento deste composto em *E. grandis* dentro do limite de detecção do método (Tabela 5), pode estar relacionado com a ativação enzimática da fenilalanina e sua conversão em auxinas, o que pode representar o seu maior crescimento em relação ao *E. benthamii*.

O ácido trihidroxibenzóico (64), também conhecido como ácido gálico, foi encontrado em maior quantidade em tecido foliar de *E. grandis* (Figura 15 A). Este composto também é produzido na via do ácido xiquímico (Figura 16), sendo um precursor para formação de taninos hidrolisáveis, que apresentam certa toxicidade ao crescimento e sobrevivência de muitos herbívoros quando adicionado em suas dietas, agindo também como repelentes para uma grande diversidade de insetos (TAIZ, ZEIGER; 2002; BARBEHENN; CONSTABEL, 2011). A menor concentração de ácido gálico em tecido de *E. benthamii*, justifica a utilização desta espécie para fins energéticos, uma vez o ácido xiquímico pode dar origem tanto a fenilalanina (que é um dos precursores da lignina), quanto ao ácido gálico, podendo, então, a síntese destes compostos estar sendo translocada no sentido da produção de lignina para o *E. benthamii*, e para a produção de taninos em *E. grandis*. Como estudos relacionados a *E. benthamii* são deficientes, não há parâmetros científicos que indiquem a preferência do ataque de insetos e herbívoros para a espécie em relação ao *E. grandis*.

O ácido isocítrico (44) aparece significativamente em maior quantidade em *E. grandis* (Figura 15 A), estando envolvido no ciclo de Krebs, onde ocorre o consumo de oxigênio O₂ e a liberação de CO₂, que produzem energia necessária para o

metabolismo celular, onde a ação conjunta da enzima carboxilase PEP (fosfofenil piruvato) e piruvato quinase converte o PEP glicolítico para 2-oxoglutarato, que é usado para assimilação de nitrogênio (N_2). O fato do ácido isocítrico (44) ser predominante em tecido de *E. grandis* indica que o ciclo de Krebs está mais ativo nesta espécie em relação ao *E. benthamii*, que apresenta exclusivamente o ácido málico (14) (Tabela 5), que pode deslocar o ciclo no sentido oposto da assimilação (Figura 17) e isto pode explicar a grande capacidade de crescimento de *E. grandis*, uma vez que o N_2 é um regulador de crescimento, sendo assimilado na forma de NH_4^+ (amônio) e incorporado via biossínteses promovidas por enzimas específicas aos aminoácidos que poderão dar origem a hormônios, inclusive os ligados ao crescimento (CRAWFORD, 1995; TAIZ, ZEIGER; 2002).

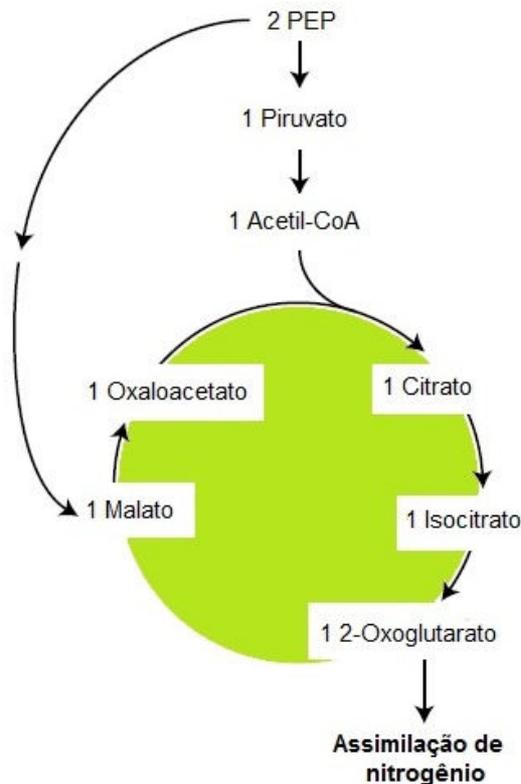


Figura 17. Etapa de assimilação de N_2 do Ciclo de Krebs simplificado.
 Fonte: Adaptado de TAIZ e ZEIGER (2002, 235p.)

O maior crescimento de *E. grandis* é também justificado pela presença de scilo-inositol (68) e mio-inositol (72) em tecido foliar da espécie (Figura 15 B). Os isômeros de inositol, entre outras funções, estão ligados com o controle hormonal da auxina AIA (ácido-3-indol acético) em tecido vegetal (BANDURSKI, 1979; LOEWUS; MURTHY, 2000). O AIA é uma substância endógena natural, pertencente a um grupo de hormônios vegetais, representadas pelas auxinas, que estão envolvidas na

regulação de vários processos de instalação, crescimento e desenvolvimento das plantas, incluindo o crescimento de raízes (MÜLLER et al., 2002; PAIVA et al., 2006). A causa da maior presença de um ou outro isômero de inositol em tecido vegetal ainda é desconhecida.

A característica fenotípica do *E. benthamii* com relação a resistência ao frio, pode estar relacionada aos açúcares álcoois, como demonstrado na Figura 15 B, onde o mio-inositol (72) pode desempenhar um papel importante na resistência ao frio, já que este composto está relacionado com a proteção térmica de proteínas evitando a desidratação frente às baixas temperaturas (MOING, 2000). Essa condição fenotípica é suportada pela maior predominância de sacarose (Figura 15 C), em tecido foliar de *E. benthamii*. O acúmulo de sacarose em espécies que suportam o frio é feito para que durante períodos de geada a planta não sofra com a desidratação, e consiga armazenar energia na forma de amido, para que não aja comprometimento das suas funções metabólicas, principalmente as relacionadas com o transporte de nutrientes e energia, protegendo o protoplasma e membranas do frio, e assim processo de congelamento das folhas (ALBERDI et al., 1989; MAGEL; EINIG; HAMP, 2000; RAPAZ; PLAZEK; NIEMCZYK, 2000).

O composto ononitol (62) foi encontrado em maior quantidade em tecido adulto de *E. grandis* (Figura 15 B) e está relacionado com déficit hídrico e aumento da salinidade (STREETER; LOHNES; FIORITTO, 2001; SHEVELEVA et al., 1997). O ononitol é bastante instável, e, portanto, é rapidamente convertido em pinitol, por meio da ação de uma enzima chamada ononitol epimerase. O pinitol pode acumular-se nos cloroplastos, onde existe uma correlação positiva entre o acúmulo dos ciclitóis e a assimilação de CO₂ sob condições de déficit hídrico (SHEVELEVA et al., 1997), o que pode explicar o aparecimento de pinitol apenas em tecido de *E. benthamii* (Tabela 5), já que em temperaturas mais amenas e com presença de geadas é normal a diminuição da aquisição de água pela planta para evitar o congelamento das folhas.

Essa característica fenotípica de resistência a geadas, ainda é suportada pelo maior aparecimento de ácido ascórbico (49) em *E. benthamii*. Este ácido é um antioxidante que está relacionado com o sistema fotossintético de tecidos vegetais, sendo seu sítio de ação nos cloroplastos, em que atua com um cofactor de enzimas de enzimas que evitam a morte do tecido vegetal devido ao estresse causado pelo congelamento (TSANG et al., 1991; TAIZ, ZEIGER; 2002).

Na Figura 15 C, observa-se que não há diferenças significativas entre os açúcares redutores frutose (53), galactose (54) glicose (55) e maltose (114). Os compostos galactose e glicose são produzidos através da hidrólise de açúcares não redutores e serão utilizados para a formação de celulose e hemicelulose. Esperava-se que quanto maior o teor destes compostos, maior seria o teor de celulose e hemicelulose o geraria um maior rendimento durante o processo de polpação pela indústria papelreira. Todavia, entre os metabólitos relacionados não há diferenças entre as espécies estudadas, e conseqüentemente não favorecendo o *E. grandis* ao *E. benthamii* com relação a produção de papel. O uso do *E. benthamii* para o produção de polpa tem sido sugerido em literatura, o que vem de acordo com o anunciado no perfil dos metabólitos (NISGOSKI; MUÑIZ; KLOCK, 1998; HIGA; PEREIRA, 2003).

6 CONCLUSÃO

Os dados obtidos nos padrões demonstraram que a técnica estudada é menos sensível para aminoácidos e compostos nitrogenados.

A técnica utilizada pela primeira vez em extratos de tecido foliar de eucalipto, demonstrou ser eficaz para obtenção de perfil dos metabólitos polares. Algumas limitações como a formação de picos múltiplos correspondentes a um mesmo composto não afetou de maneira significativa a identificação e quantificação relativa dos compostos.

Através da metodologia empregada, pôde-se constatar predominância de carboidratos em tecido foliar das espécies estudadas.

As análises de PCA, amparadas por teste estatístico, demonstraram que existem metabólitos que contribuem mais significativamente para distinção entre as idades do tecido vegetal, sendo que os açúcares redutores são mais relevantes em tecido jovem e a sacarose em tecido adulto.

A característica fenotípica de rápido crescimento da espécie de *E. grandis* é amparada pela maior predominância de ácido isocítrico que está relacionados com o ciclo de Krebs e a absorção de nitrogênio.

A característica de *E. benthamii* de resistência a geadas, é amparadas pela relevância dos metabólitos encontrados em seu tecido foliar, principalmente no que se diz respeito ao aparecimento de sacarose.

Não existem evidências, dentro dos perfis de metabólitos, que desabone a utilização de *E. benthamii* para polpação de celulose.

Cinquenta e seis compostos não foram identificados. A dificuldade na identificação está relacionada a falta de estudos para espécies florestais e deficiência no banco de dados cromatográficos.

7 PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS

Estudos correlacionando fenótipos e perfil de metabólitos ainda são escassos, principalmente no que se refere a plantas de ecossistemas florestais como o *Eucalyptus spp.* em condição de campo. Análise de metabólitos primários e sua correlação com as demais “ômicas” são escassos e merecem atenção.

Assim sugere-se como temas a serem abordados:

- Obtenção de metaboloma e genoma na identificação de genes ativos na incorporação de biomassa para técnicas de melhoramento genético de híbridos empregados em alta escala no Brasil (e.g. *E. urograndis*);
- Estudos relacionando perfil metabólico de *E. benthamii* e parâmetros físico-químicos do uso da madeira para polpação de papel, afim de averiguar se a espécie pode ser utilizada para obtenção de pasta de celulose e qual seria o processo de polpação mais eficiente para esse fim;
- Comparação entre metabólitos e proteínas enzimaticamente ativas em *Eucalyptus sp.*, afim de identificar quais as enzimas e as sínteses proteicas envolvidas nos processos bioquímicos relacionados principalmente a síntese de hormônios vegetais de regulação de crescimento e sustentação.

REFERÊNCIAS

ALBERDI, M.; MEZA-BASSO, L.; FERNANDEZ, J.; RROS, D.; ROMEO, M. Seasonal Changes In Carbohydrate Content And Frost Resistance Of Leaves Of *Nothofagus* Species. **Phytochemistry**. v. 28, n. 3, pp. 159-163, 1989.

ALFENAS, A. C.; ZAUZA, E. A. V.; MAFIA, R.G.; ASSIS, T. F. **Clonagem e doenças do eucalipto**. Viçosa: Editora UFV, 442 p. 2004.

AUGENSTEIN, M. W. Applied gas chromatography coupled to isotope ratio mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**. v. 842, pp.351–371.1999.

ALLWOOD, J. W.; ERBAN, A.; KONING, S.; DUNN, W. B.; LUEDEMANN, A.; LOMMEN, A.; KAY, L.; LÖSCHER, R.; KOPKA, J.; GOODACRE, R. Inter-laboratory reproducibility of fast gas chromatography–electron impact–time of flight mass spectrometry (GC–EI–TOF/MS) based plant metabolomics. **Metabolomics**, v.5, pp.479-496, 2009.

ALVES, I. C. N.; GROMIDE, J. L.; GOLODETTE, J. L.; SILVA, H. D. Caracterização fenológica da madeira de *Eucalyptus benthamii* para produção de celulose kraft. **Ciência Florestal**. Santa Maria. v.21, n.1, pp. 167-174. 2011.

ALVES, E. C. S. C.; XAVIER, A.; OTONI, W. C. Organogênese in vitro a partir de explante caulinar na regeneração de clones de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden x *E. urophylla* S. T. Blake. **Revista Árvore**, v.28, n.5, pp.643-653, 2004.

BANDURSKI, R.S. Chemistry and physiology of myo-inositol esters of indole 3-acetic acid. In: Wells W.W., Eisenberg, F. Jr . **Cyclitols and Phosphoinositides**. Academic Press, pp.35-54. 1979.

ASSIS, T. F.; MAFIA, R. G. Hibridação e clonagem. In: BORÉM, A. (Ed.). **Biotecnologia florestal**, Viçosa: Suprema Gráfica e Editora. 93-121p. 2007.

BARBEHENN, R. B.; CONSTABEL, C.P. Tannins in plant–herbivore interactions. **Phytochemistry**. v 72.,n 13., 1551 – 1565 pp. 2011.

BARSCH, A.; PATSCHKOWSKI, T.; NIEHAUS, K. Comprehensive metabolite profiling of *Sinorhizobium meliloti* using gas chromatography-mass spectrometry. **Funct. Integr. Genomics**, v.4, pp.219-230, 2004.

BEDAIR, M.; SUMMER, L. W. Current and emerging mass spectrometry technologies for metabolomics. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v.27, pp. 238-250, 2008.

BERTAMINI, M. NEDUNCHEZHIAN, N. Leaf age effects on chlorophyll, Rubisco, photosynthetic electron transport activities and thylakoid membrane protein in field grown grapevine leaves. **J. Plant Physiol.** v 159. pp.799–803. 2002.

BOLAND, D. J.; BROOKER, M. I.; CHIPPENDALE, G.M.; HALL, N.; HYLAND, B.P.M.; JOHNSTON, R.D.; KLEINIG, D.A.; TURNER, J.D. **Forest trees of Australia**, Melbourne: Nelson-CSIRO, 687 p. 1984.

BOUDET, A. M. Lignins and lignification: Selected issues. **Plant Physiol. Biochem.**, v. 38, pp. 81–96, 2000.

BRACELPA. Associação Brasileira de Papel e Celulose. Relatório: Dados do setor. Março-2013. Disponível em: <<http://www.bracelpa.org.br/bra2/sites/default/files/estatisticas/booklet.pdf>>. Acesso em: 27 mar. 2013.

BUTCHER, P. A.; SKINNER, A. K.; GARDINER, C. A. Increased inbreeding and inter-species gene flow in remnant populations of the rare *Eucalyptus benthamii*. **Conservation Genetics**, v. 6, n. 2, pp. 213-226, 2005.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Introdução a métodos cromatográficos**. 5ª ed. Campinas: Editora da Unicamp, 1993.

COREA, O. R. A.; BEDGAR, D. L.; DAVIN, L. B.; LEWIS, N. G. The arogenate dehydratase gene family: Towards understanding differential regulation of carbon flux through phenylalanine into primary versus secondary metabolic pathways. **Phytochemistry**.v 82. pp. 22–37., 2012.

CRAWFORD, N. M. Nitrate: nutrient and signal for plant growth. **The Plant Cell, Rockville**, v.7, pp.859-868, 1995.

CUNHA, A. C. M. **Relações do estado nutricional de minicepas e condições meteorológicas com o número e o enraizamento de miniestacas de eucalipto**. 2006. 115f. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) – Centro de Ciência: Agrárias , Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2006.

DAVIN, L. B.; JOURDES, M.; PATTEN, A. M.; KIM, K. W., VASSÃO, D.; LEWIS, N. G. Dissection of lignin macromolecular configuration and assembly: Comparison to related biochemical processes in allyl/propenyl phenol and lignin biosynthesis. **Nat. Prod. Rep.**, v 25., pp. 1015–1090. 2008.

DAVIS, J. M. LOESCHER, W. H. Diurnal Pattern of Carbohydrates in Celery Leaves of Various Ages. **Hort Science**. n.26. v.11. pp.1404-1406. 1991.

DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P.C. Cromatografia um breve ensaio. **REV Química Nova na Escola**, Cromatografia. v.7, pp.21-25, 1998.

DESBROSSES, G. G.; KOPKA, J.; UDVARDI, M. K. Lotus japonicus Metabolic Profiling. Development of Gas Chromatography-Mass Spectrometry Resources for the Study of Plant-Microbe Interactions . **Plant Physiology**, v.. 137, pp.1302–1318. 2005.

DIXON, R. A. Natural products and plant disease resistance. **Nature London**, v. 411, pp.843-847, 2011.

DOUGHTY, R. W. The Eucalyptus: a Natural and Commercial History of the Gum Tree . Review Article. **Journal of Historical Geography**, v.28, pp.290-29, 2002.

DUNN, W. B., ELLIS, D I. Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies . **Trends in Analytical Chemistry**, v.24, n.4, pp.285-294, 2005.
FIEHN, O.; KOPKA, J.; DORMANN, P.; ALTMANN, T.; TRETHERWEY, R. N.; WILLMITZER, L. Metabolite profiling for plant functional genomics. **Nature Biotechnology**, New York, v. 18, pp.1157-1161, 2000 a.

FALES, M. H. LUKKAINEN, T. O-Methyloximes as Carbonyl Derivatives in Gas Chromatography, Mass Spectrometry, and Nuclear Magnetic Resonance. **Anal. Chem.** v.37, n.7, pp. 955–957., 1965.

FIEHN, O.; KOPKA, J.; TRETHERWEY, R. N.; WILLMITZER, L. Identification of uncommon plant metabolites based on calculation of elemental compositions using gas chromatography and quadrupole mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v 72, n.15, pp.3573-3580, 2000 b.

FIEHN, O. Metabolomics – the link between genotypes and phenotypes. **Plant Molecular Biology**, v 48, pp.155-171, 2002.

FIEHN, O. Extending the breadth of metabolite profiling by gas chromatography coupled to mass spectrometry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. **Metabolomics**, v 27. 261-269 pp. 2008,

FU-ZFA, Z. F.; KATONA, Z. F.; KOVAÄ C.S. E.; R-PERL, I. M. Simultaneous Identification and Quantification of the Sugar, Sugar Alcohol, and Carboxylic Acid Contents of Sour Cherry, Apple, and Ber Fruits, as Their Trimethylsilyl Derivatives, by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. **J. Agric. Food Chem.**, v. 52, n. 25, pp. 7444 – 7452, 2004.

GARDINER, C. Genetic research for conservation of camden white gum. **Australian Tree Resources News**, n. 7, Jun. 2002.

GAUFICHON, L.; REISDORF-CREN, M.; ROTHSTEIN, S. J.; CHRADON, F.; SUZUKI, A. Biological functions of asparagine synthetase in plants. **Plant Science**, v.179., pp. 141–153, 2010.

GOODAGRE, R. Making sense of metabolome using evolutionary computation: seeing the wood with the trees. **Journal Experimental Botany**, Oxford, v 56., n.410, pp.245-254, 2005.

GRAÇA, M. E.; SHIMIZU, J. Y.; TAVARES, F. R. Capacidade de rebrota e de enraizamento de *Eucalyptus benthamii*. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 39, pp.135-138, 1999.

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

GOULART, P. B. **Influência do acondicionamento**, antioxidantes,auxinas e seus cofatores no enraizamento de miniestacas de clones de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. 2006. 99f. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) - Agrárias, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2006.

HALL, R. D. Plant metabolomics: from holistic hope, to hype, to hot topic. **New Phytologist**, Cambridge, v. 169, pp.453-468, 2006.

HIGA, R. C. V.; MORA, A. L.; HIGA, A. R. Plantio de eucalipto na pequena propriedade rural. **Embrapa Florestas. Documentos**, **54**. Colombo: Embrapa Florestas, 2000. 31 p.

HIGA, R. C. V.; PEREIRA, J. C. D. Usos potenciais do *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cabbage. Embrapa Florestas. **Comunicado técnico**, **100**. Colombo: Embrapa Florestas. 4 p., 2003.

HOFFMAN, D. E. ; JONSSON, P.; BYLESJÖ, M.; TRYGG, J.; ANTTI, H.; ERIKSSON, M. E.; MORITZ, T. Changes in diurnal patterns within the *Populus* transcriptome and metabolome in response to photoperiod variation. **Plant, Cell and Environment** . v. 33, pp. 1298–1313, 2010.

JAHNS, M. T. **Avaliação gênica diferencial entre folhas e tecidos vasculares de *Eucalyptus grandis***. 2008. 110 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, 2008.

JEONG, L. M.; JIANG, H.; CHEN, H. S., TSAI, C.J.; HARDING, S. A. Metabolic profiling of the sink-to-source transition in developing leaves of quaking aspen. **Plant Physiology**, v.136, pp.3364-3375, 2004.

KIRCH, R. P.; SCHWAMBACH, J.; BASTOLLA, F. M.; PAZZINI, F.; PIZZOLI, G.; ROESLER, G. A.; MIRANDA, R. P.; CARAZZOLLE, M. F.; BRONDANI, R. V.; COELHO, A. S. G.; GRATTAPAGLIA, D.; BROMMONSCHENKEL, S. H.; PAPPAS JÚNIOR, G. J.; PEREIRA, G. A. G.; FETT-NETO, A. G.; CASCARDO, J. C. M.; PASQUALI, G. **Projeto Genolyptus: seqüenciamento e análise de transcritos de plântulas de *Eucalyptus grandis* submetidos a diferentes estímulos**. Congresso Brasileiro e Genética, 51. A era da genômica: da bioestatística à bioinformática: anais, Águas de Lindóia, SP Ribeirão Preto, SP: Sociedade Brasileira de Genética, p. 528, 2005.

KOPKA, J. Current challenges and developments in GC–MS based metabolite profiling technology. **Journal of Biotechnology**, v.124, pp.312-322, 2006.

KOZLOWSKI, T. T. Carbohydrate sources and sinks in woody plants. **The Botanical Review**. v 58. pp. 107-222, 1992.

KRISHNAN, P.; KRUGER, N.J.; RATCLIFFE, R.G. Metabolite fingerprinting and profiling in plants using NMR. **Journal of Experimental Botany**, v.56, n.410, pp. 255-265, 2005.

LAINE, R. A.; SWEELEY C. C.. Analysis of trimethylsilyl O-methyloximes of carbohydrates by combined gas-liquid chromatography-mass spectrometry. **Anal. Biochem.** v 43. pp.533-538, 1971.

LATSAGUE, M.; ACEVEDO, H.; FERNANDEZ, J.; ROMERO, M.; CRISTI, R.; ALBERDI, M. Frost-Resistance And Lipid Composition Of Cold-Hardened Needles of Chilean Conifers. **Phytochemistry**, v. 31,n. 10,pp. 34193-4261, 1992.

LEÃO R, M. **A floresta e o homem**, São Paulo-BR. IPEF, 428 p. 2000.

LOEWUS, F. A MURTHY, P.P.N. Myo-Inositol metabolism in plants. Review Article. **Plant Science**,v. 150, n 1, pp.1-19. 2000.

LUEDEMANN, A.; STRASSBURG,K.; ERBAN, A.; KOPKA, J. Tag Finder for the quantitative analysis of gas chromatography –mass spectrometry (GC-MS)-based metabolite profiling experiments. **Bioinformatics**, v. 24.,n.5, pp.732-737, 2008.

MA, W. T.; FU, K.K; ZONGWEI, A.; JIANG B, G.B. Gas chromatography/mass spectrometry applied for the analysis of triazine herbicides in environmental waters. **Chemosphere**, v. 52, pp.1627-1632, 2003.

MAGEL E.; EINIG W.; HAMPP, R. Carbohydrates in trees. **Developments in Crop Science**. v 26, pp. 317–336, 2000.

MEDEIROS, P. M.; SIMONEIT, B.R.T. Analysis of sugars in environmental samples by gas chromatography–mass spectrometry.**Journal of Chromatography A**, v. 1141. pp. 271–278, 2007.

MERCHANT, A. ; RICHTER, A.; POP, M.; ADAMS, M. Targeted metabolite profiling provides a functional link among eucalypt taxonomy, physiology and evolution. **Phytochemistry**, v.67, pp.402-408, 2006.

MOING. A. Sugar alcohols as carbohydrate reserves in some higher plants. **Developments in Crop Science**.v 26, 337–358 pp. 2000.

MSRI. Web-based platform from GC–MS metabolite profiles. Disponível em: <www.csbdb.mpimp-golm.mpg.de/gmd.html>. Acesso em: 07 ago, 2012.

MÜLLER, A.; DÜCHTING, P.; WEILER, E. W. A multiplex GC-MS /MS technique for the sensitive and quantitative single-run analysis of acidic phytohormones and related compounds, and its application to *Arabidopsis thaliana*. **REV. Springer-Verlag**. n. 216, p.44-46, 2002.

NISGOSKI, S.; MUÑIZ, G. B.; KLOCK, H. **Características anatômicas da madeira de *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cambage e sua influência na qualidade do papel**. Curitiba: UFPR, 8 p. Não publicado. 1998.

PALUDZYSZYN FILHO, E.; SANTOS, P. E. T. dos; FERREIRA, C. A. **Eucaliptos indicados para plantio no Estado do Paraná**. (Documentos, 129). Colombo: Embrapa Florestas - CNPF, 2006. 45 p.

PEREIRA, J. C. D.; STURION, J. A.; HIGA, A. R.; HIGA, R. C. V.; SHIMIZU, J. Y.; Características da madeira de algumas espécies de eucalipto plantadas no Brasil. **Embrapa Florestas. Documentos, 38**. Colombo: Embrapa Florestas, 2000. 113 p

POKE, F. S.; VAILLANCOURT, R. E.; POTTS, B. M; REID, J. B. Genomic research in *Eucalyptus*. **Genetica**, v. 125, pp. 79-101, 2005.

PRYOR, L. D. **Biology of eucalypts**. London: Camelot Press, Edward Arnold, 82 p. 1976.

RAPACZ, M.; PLAZ, A.; NIEMCZYK, E. Frost De-acclimation of Barley (*Hordeum vulgare* L.) and Meadow Fescue (*Festuca pratensis* Huds.). Relationship between Soluble Carbohydrate Content and Resistance to Frost and the Fungal Pathogen *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoem. **Annals of Botany**. v. 86., pp. 539 - 545, 2000.

ROBETERSON, D. G. Metabolomics in Toxicology a review. **Toxicological sciences**, v.85, pp.809-822, 2005.

ROCHA, T. L.; COSTA, P. H. A.; MAGALHÃES, J. C. C.; EVARISTO, R. G. S.; VASCONCELOS, E. A. R; COUTINHO, M. V.; PAES, N.S; SILVA, M. C. M; GROSSI-DE-SÁ, M. F. **Eletroforese bidimensional e análise de proteomas**. Brasília:/ Embrapa Recursos Energéticos e Biotecnologia, 12 p. 2005. (Embrapa Recursos Energéticos e Biotecnologia, Comunicado Técnico 136). 2005.

ROSA, L. S.; WENDLING, I.; GROSSI, F.; REISSMANN, C. B. Efeito da dose de nitrogênio e de formulações de substratos na miniestaquia de *Eucalyptus dunnii* maiden. **REV. Árvore**, v.33, n.6, pp.1025-1035. 2009.

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

ROESSNER, U.; WILLMITZER, L.; FERNIE, A. R. High-resolution metabolic phenotyping of genetically and environmentally diverse potato tuber systems. Identification of phenocopies. **Plant Physiol**, v.127. pp. 749–764, 2001b.

RUIZ-MATUTEA, A. I.; HERNANDEZ-HERNANDEZ, O.; RODRIGUEZ-SANCHEZ, S.; SANZ, M. L.; MARTINEZ-CASTRO, I. Derivatization of carbohydrates for GC and GC–MS analyses. **Journal of Chromatography B**, v. 879. pp. 1226–1240, 2011.

SBS. SOCIEDADE BRASILEIRA DE SILVICULTURA. **Fatos e Números do Brasil Florestal**. 2008. Disponível em: <<http://www.sbs.org.br/FatoseNumerosdoBrasilFlorestal.pdf>>. Acesso em: 24 abr. 2013.

SCHAUER, N.; STEINHAUSER, D.; STRELKOV, S.; SCHOMBURGB, D.; ALLISON, G.; MORITZ, T.; LUNDGREN, K.; ROESSNER-TUNALIE, U.; FORBESE, M. G.; WILLMITZER, L.; FERNIE, A. R.; KOPKA, J. GC–MS Libraries for the rapid identification of metabolites in complex biological samples. **Ferbs Letters**, v.579, pp.1332-1337, 2005.

SCHAUER, N.; FERNIE, R. A. Plant metabolomics: towards biological function and mechanism. **Trends in Plant Science**, v.11, n.10, pp. 508-516, 2006.

SILVA, J. C.; TOMAZELLO FILHO, M.; OLIVEIRA, J. T. S.; CASTRO, V. R. Influência de idade e da posição radial nas dimensões das fibras e dos vasos da madeira de *Eucalyptus grandis* Hill ex. Maiden. **Revista Árvore**, Viçosa, v.31, n. 6, pp.1081-1090, 2007.

SHEVELEVA, E.; CHMARA, W.; BOHNERT, H.J.; JENSEN, R.G. Increased salt and drought tolerance by D-ononitol production in transgenic *Nicotiana tabacum* L. **Plant Physiology**, v.115, pp. 1211-1219, 1997.

STEANE, D. A.; NICOLLE, D.; SANSALONID, C. P.; PETROLID, C. D.; CARLINF, J.; KILIANF, A.; MYBURGG, A. A.; GRATTAPAGLIAD, D.; VAILLANCOURTA, R. E. Population genetic analysis and phylogeny reconstruction in *Eucalyptus* (Myrtaceae) using high-throughput, genome-wide genotyping. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 59, pp. 206-224, 2011.

STREHMEL N., HUMMEL J., ERBAN A., STRASSBURG K., KOPKA J. Retention Index Thresholds for Compound Matching in GC-MS Metabolite Profiling. **Journal of Chromatography**. v. 871, pp.182-190, 2008.

STREETER, J. G.; LOHNES, D. G.; FIORITTO, R. J. Pattern of pinitol accumulation in soybean plants and relationships to drought tolerance. **Plant Cell Environmental**, v.24, pp. 429-438, 2001.

STROZ, R. J. Gas-liquid chromatographic assay of D-ribose and its per(trimethylsilyl)ated oxime. **Carbohydrate Research**. v 72, 207–214 pp. 1979.

SUMNER, L. W.; MENDES, P.; DIXON, R. A. Plant metabolomics: large scale phytochemistry in the functional genomics era. **Phytochemistry**, v. 62, 817-836 p., 2003.

SUMNER, L. W. et al. Proposed minimum reporting standards for chemical analysis. Chemical Analysis Working Group (CAWG) Metabolomics Standards Initiative (MSI). **Metabolomics**. v 3. 211–221p., 2007.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. University of California, Los Angeles. 3 ed. 2002.

THOMPSON, M.; ELLISON, S .L .R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis. **Pure & Appl. Chem.**, v. 74, pp. 835-855, 2002.

TRUGILHO, P.F.; BIANCHI, M.L.; GOMIDE, J.L.; SCHUCHARDT, U. Classificação de clones de Eucalyptus sp visando à produção de polpa celulósica. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 28, n. 6, pp. 895-899, 2004.

TSANG, E. W. T.; BOWLER, C.; HEROUART, D.; CHAM, V. W.; VILLARROEL, R.; MONTAGU, M.V.; INZÉ, D. Differential regulations of superoxide dismutases in plants exposed to environmental stress. **Plant Cell**, v. 3, p. 783-792, 1991.

TURGEON, R. The Sink-Source Transition in Leaves. **Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol**, v. 40., pp. 119-138, 1989.

TURNBULL, J.W. Eucalypt plantations. **New Forests**, v.17, pp. 37-52, 1999.

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P. D. J. A. Generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography**, v.11, pp.463-71, 1963.

VILLAS-BÔAS, S. G.; MAS, S.; AKESSON, M. SMEDSGAARD, J. NIELSEN, J. Mass spectrometry in metabolome analysis. **Mass Spectrometry reviews**. v. 24, pp. 613-646, 2005.

VILLAS-BÔAS, S. G.; GOMBERT, A. K. Análise do metaboloma. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. Ano IX. n. 36, pp. 58-69, 2006.

XAVIER, A.; SANTOS, G. A.; WENDLING, I; OLIVEIRA, M. L. Propagação vegetativa de cedro rosa por miniestaquia. **REV Árvore**, v. 27, n.2, pp. 139-143, 2003.

WAGNER, C.; SEFKOWB, M.; KOPKAA, J. Construction and application of a mass spectral and retention time index database generated from plant GC/EI-TOF-MS metabolite profiles. **Phytochemistry**, v.62, pp. 887-900 .2003.

WONG, W. S.; GUO, D.; WANG, X. L.; YIN, Z. Q.; XIA, B.; LI, N. Study of *cis*-cinnamic acid in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology and Biochemistry**. v.43, pp. 929–937, 2005.

APÊNDICE A - Detalhes dos compostos não identificados em folhas jovens e adultas das espécies estudadas.

(Continua)

ID ^a	IK ^b	Porcentagem Relativa (%)								m/z característicos
		<i>E. grandis</i>				<i>E. benthamii</i>				
		Jovem		Adulto		Jovem		Adulto		
01	958,7	-	-	-	-	0,021	± 0,004	0,036	± 0,005	73, 100, 130, 147, 171, 189, 191
06	1264,1	-	-	-	-	-	-	0,054	± 0,002	73, 86, 100, 133, 147, 149, 174
10	1331,8	-	-	-	-	-	-	0,248	± 0,079	73, 101, 133, 147, 189, 205, 217, 292, 307
13	1483,7	-	-	-	-	0,191	± 0,058	0,266	± 0,066	73, 103, 144, 147, 173, 191, 244, 262, 365
17	1531,8	-	-	-	-	-	-	0,033	± 0,009	73, 103, 129, 147, 189, 217, 277, 307, 379, 409
23	1651,0	-	-	-	-	-	-	0,026	± 0,007	73, 133, 147, 163, 205, 217, 245, 333, 423, 409
27	1689,6	0,103	± 0,091	0,029	± 0,007	-	-	-	-	73, 129, 133, 143, 147, 189, 204, 231, 281, 306
33	1734,0	3,099	± 1,311	1,515	± 0,212	3,616	± 1,316	1,184	± 0,154	73, 129, 147, 190, 204, 217, 291, 306, 347, 392
35	1748,8	-	-	-	-	0,028	± 0,003	0,039	± 0,008	73, 91, 103, 147, 217, 277, 292, 307, 333
36	1758,6	-	-	0,060	± 0,015	-	-	-	-	73, 75, 89, 147, 149, 207, 217, 244, 359, 392
47	1844,7	0,032	± 0,009	0,044	± 0,010	-	-	-	-	73, 75, 117, 128, 147, 191, 217, 306, 319, 435
52	1872,6	-	-	-	-	-	-	0,264	± 0,038	73, 75, 91, 103, 147, 204, 217, 307, 361
58	1924,3	-	-	0,021	± 0,001	1,600	± 0,187	-	-	73, 75, 129, 147, 157, 205, 217, 319, 421, 567
63	1952,8	10,504	± 5,157	-	-	-	-	-	-	73, 147, 179, 239, 281, 309, 355, 321, 389, 458
65	1981,2	0,347	± 0,282	0,110	± 0,070	-	-	-	-	73, 149, 217, 239, 281, 319, 355, 370, 443, 458
67	2005,0	0,056	± 0,009	0,024	± 0,008	-	-	-	-	73, 149, 217, 239, 281, 319, 355, 443, 458, 517
69	2035,0	-	-	0,019	± 0,004	-	-	0,040	± 0,003	73, 149, 179, 209, 239, 281, 318, 355, 370, 443
70	2062,6	0,707	± 0,361	0,137	± 0,022	-	-	-	-	73, 149, 217, 281, 309, 381, 397, 439, 517
71	2072,8	-	-	0,114	± 0,024	-	-	-	-	73, 149, 217, 281, 309, 397, 439, 458, 559
74	2103,4	-	-	-	-	0,115	± 0,035	0,237	± 0,008	73, 129, 157, 205, 217, 281, 305, 319, 355, 458
75	2113,7	-	-	0,027	± 0,003	-	-	-	-	73, 103, 119, 147, 189, 204, 217, 281, 319, 458
77	2123,9	-	-	0,025	± 0,001	-	-	-	-	73, 129, 147, 157, 205, 217, 281, 319, 355, 443, 458
78	2128,7	-	-	0,028	± 0,002	-	-	-	-	73, 129, 149, 157, 205, 217, 281, 319, 370, 443, 458
79	2134,1	-	-	0,014	± 0,001	-	-	-	-	73, 117, 129, 147, 149, 219, 281, 319, 355, 396, 458
81	2187,3	-	-	0,020	± 0,001	-	-	0,047	± 0,004	73, 147, 204, 281, 361, 443, 450, 458
83	2267,8	0,097	± 0,062	0,048	± 0,004	-	-	-	-	73, 97, 149, 189, 204, 281, 361, 443, 450, 458

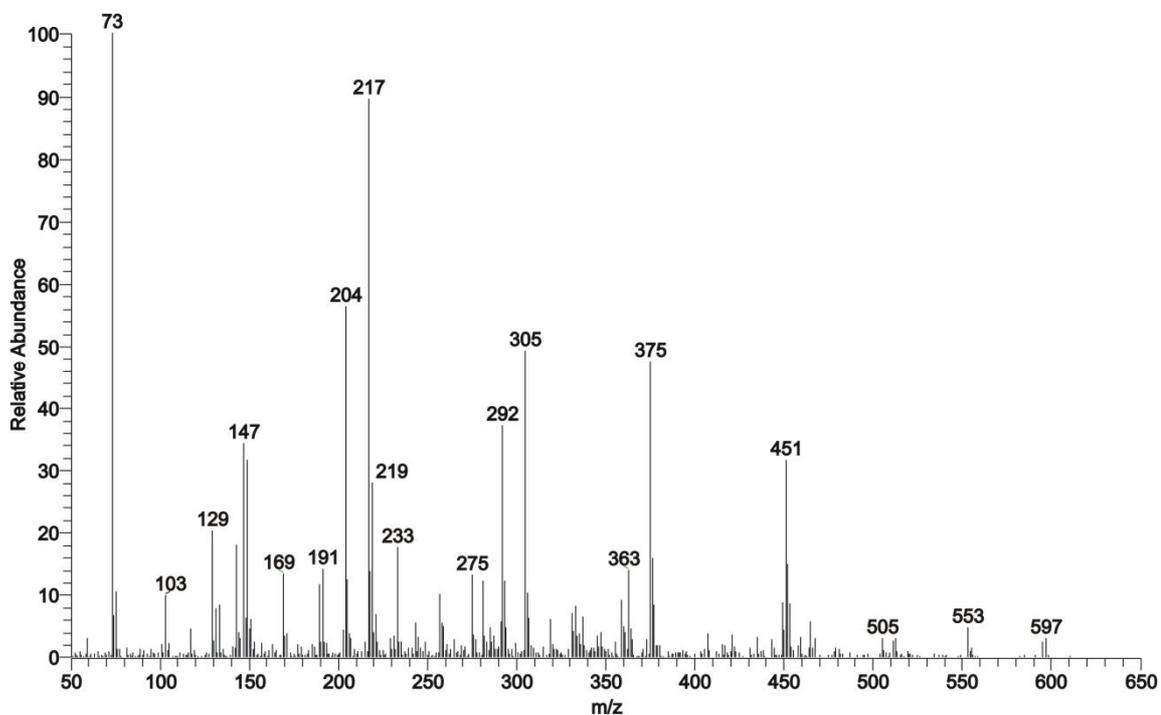
(Conclusão)

ID ^a	IK ^b	Porcentagem Relativa (%)								m/z característicos
		<i>E. grandis</i>				<i>E. benthamii</i>				
		Jovem		Adulto		Jovem		Adulto		
84	2298,3	-	-	0,017	± 0,001	-	-	-	-	73, 103, 129, 149, 191, 204, 217, 271, 305, 361, 443
87	2376,2	-	-	-	-	-	-	0,036	± 0,003	73, 129, 147, 189, 204, 217, 281, 305, 337, 351, 467
88	2385,1	0,301	± 0,148	0,234	± 0,015	-	-	0,021	± 0,003	73, 91, 129, 147, 169, 189, 204, 217, 331, 458
89	2474,1	0,287	± 0,141	0,016	± 0,007	-	-	-	-	73, 91, 129, 147, 204, 217, 291, 361, 458
90	2480,4	-	-	0,124	± 0,004	-	-	-	-	67, 73, 107, 135, 153, 169, 204, 217, 217, 243, 283, 361
91	2491,9	-	-	0,032	± 0,002	-	-	-	-	73, 93, 107, 135, 153, 169, 204, 217, 283, 331, 361
92	2500,4	-	-	0,018	± 0,002	-	-	-	-	73, 107, 135, 153, 169, 204, 217, 281, 331, 361, 458
94	2509,9	-	-	0,230	± 0,104	-	-	0,037	± 0,005	73, 133, 147, 191, 204, 217, 281, 305, 321, 361, 449, 539
95	2546,2	-	-	-	-	-	-	0,045	± 0,003	73, 121, 147, 191, 204, 217, 273, 281, 305, 361, 409
96	2553,6	-	-	-	-	-	-	0,028	± 0,003	73, 117, 129, 147, 204, 217, 243, 271, 303, 348, 361
97	2559,9	-	-	-	-	0,084	± 0,029	0,033	± 0,003	73, 117, 147, 204, 219, 271, 327, 335, 361, 417, 538
100	2595,8	-	-	0,106	± 0,007	-	-	-	-	73, 117, 147, 191, 204, 219, 281, 333, 361, 458, 535
105	2657,4	-	-	0,029	± 0,011	-	-	-	-	73, 129, 147, 169, 217, 271, 347, 361, 437
107	2676,4	5,666	± 0,956	1,531	± 0,039	0,382	± 0,102	0,047	± 0,010	73, 129, 147, 191, 217, 230, 259, 305, 318, 361, 433
109	2703,0	-	-	-	-	-	-	0,050	± 0,010	73, 129, 149, 169, 204, 217, 243, 271, 319, 361, 437
111	2733,9	-	-	0,081	± 0,011	-	-	0,093	± 0,011	73, 103, 129, 147, 169, 191, 204, 217, 271, 319, 361
115	2657,4	-	-	0,071	± 0,034	-	-	-	-	73, 75, 129, 149, 169, 204, 217, 281, 305, 361, 397, 443
116	2817,5	-	-	-	-	0,669	± 0,411	0,092	± 0,011	73, 103, 129, 147, 169, 204, 217, 243, 271, 287, 361, 443
117	2824,9	0,201	± 0,150	-	-	-	-	0,060	± 0,021	59, 73, 147, 191, 217, 281, 361, 433, 458, 603
118	2845,0	-	-	0,164	± 0,048	-	-	-	-	73, 149, 217, 281, 361, 369, 458, 517, 605
119	2847,8	-	-	-	-	0,347	± 0,216	0,325	± 0,018	73, 147, 191, 219, 255, 309, 345, 419, 447
120	2860,6	0,076	± 0,063	-	-	-	-	-	-	73, 129, 147, 169, 191, 204, 217, 281, 361, 458, 480
121	2880,4	-	-	-	-	0,363	± 0,100	0,125	± 0,030	73, 129, 147, 149, 204, 217, 239, 267, 281, 355, 383
122	2888,1	-	-	0,087	± 0,009	-	-	-	-	73, 129, 147, 169, 204, 217, 281, 297, 361, 417, 433
123	2895,7	0,230	± 0,169	0,015	± 0,002	-	-	-	-	73, 149, 169, 204, 217, 281, 297, 361, 412, 433, 458
124	2908,2	0,184	± 0,120	2,071	± 0,181	1,307	± 0,576	0,097	± 0,023	73, 103, 129, 147, 191, 204, 217, 243, 291, 305, 343, 361
125	2930,4	-	-	0,078	± 0,026	-	-	-	-	73, 129, 147, 191, 204, 217, 271, 281, 305, 318, 361, 433
126	2939,8	-	-	0,121	± 0,016	-	-	0,052	± 0,006	73, 129, 149, 204, 217, 270, 281, 361, 369, 433, 458
127	2949,9	-	-	-	-	-	-	0,080	± 0,006	73, 129, 147, 191, 207, 217, 281, 297, 361, 429, 539
128	2969,1	-	-	-	-	0,976	± 0,347	-	-	73, 129, 147, 191, 204, 217, 305, 343, 361, 433, 523, 641

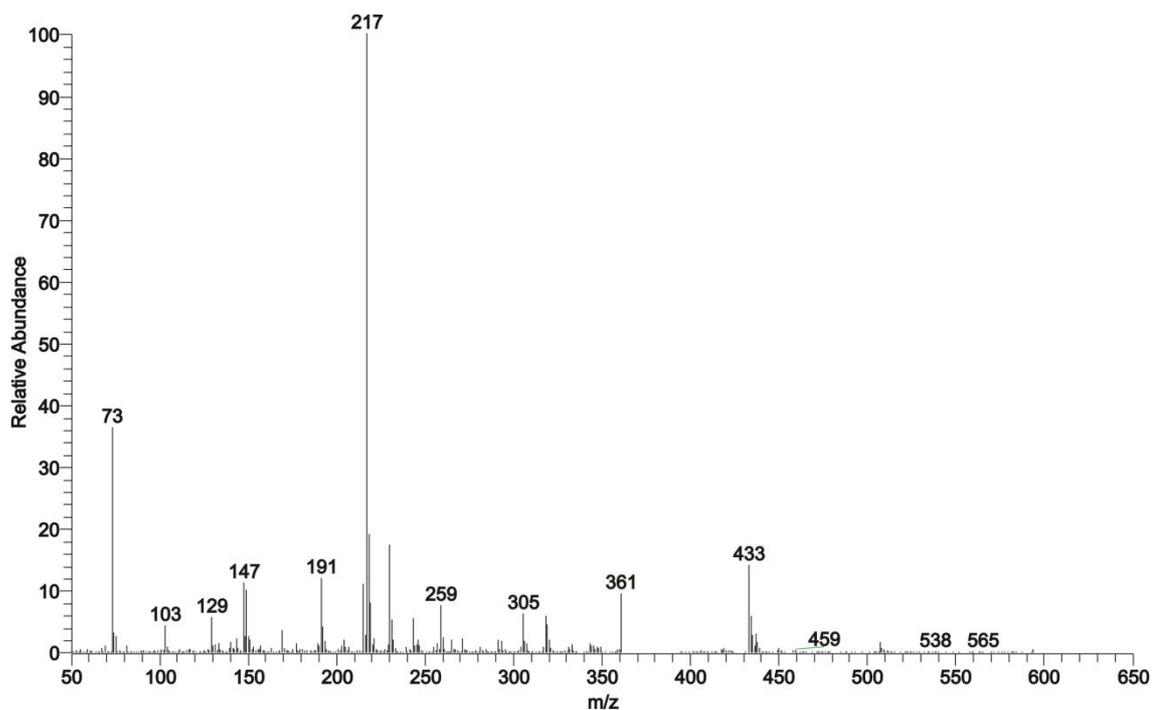
Nota: a) Identificação; b) índice de Kovats

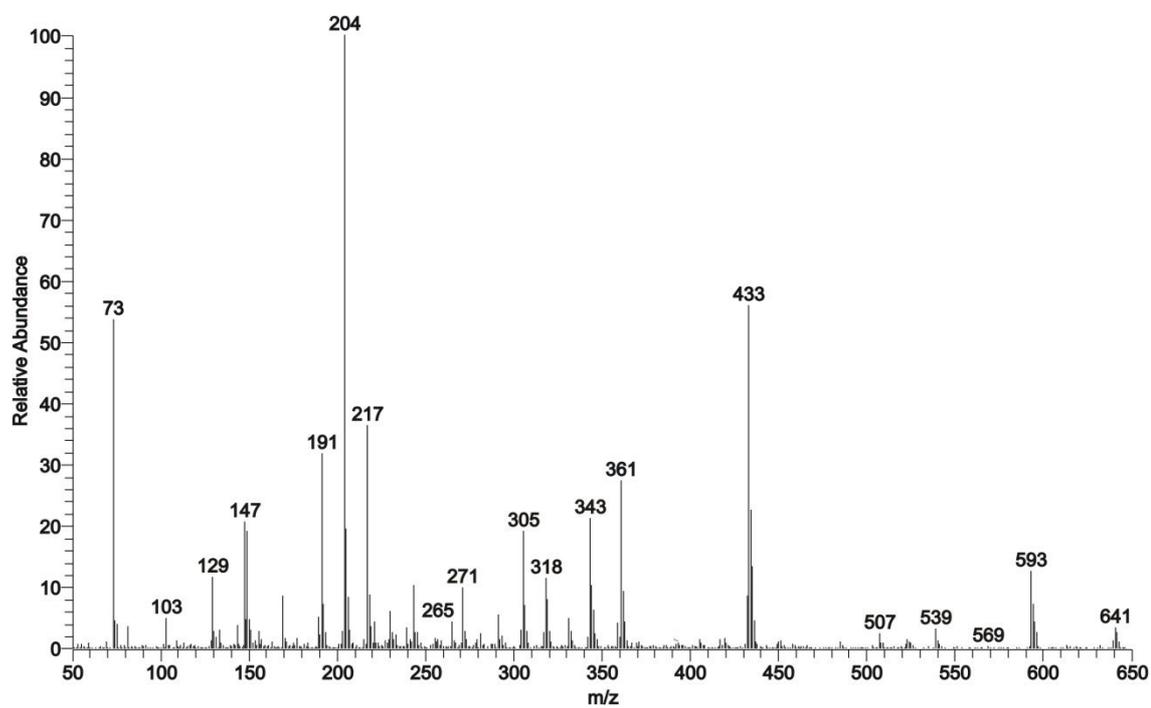
APÊNDICE B – Fragmentogramas dos compostos não identificados com diferença estatística

Espectro de massas do composto 88.



Espectro de massas do composto 107.



Espectro de massas do composto 124.

APÊNDICE C – Cromatogramas da corrente total de íons das substâncias presentes no extrato de tecido foliar.

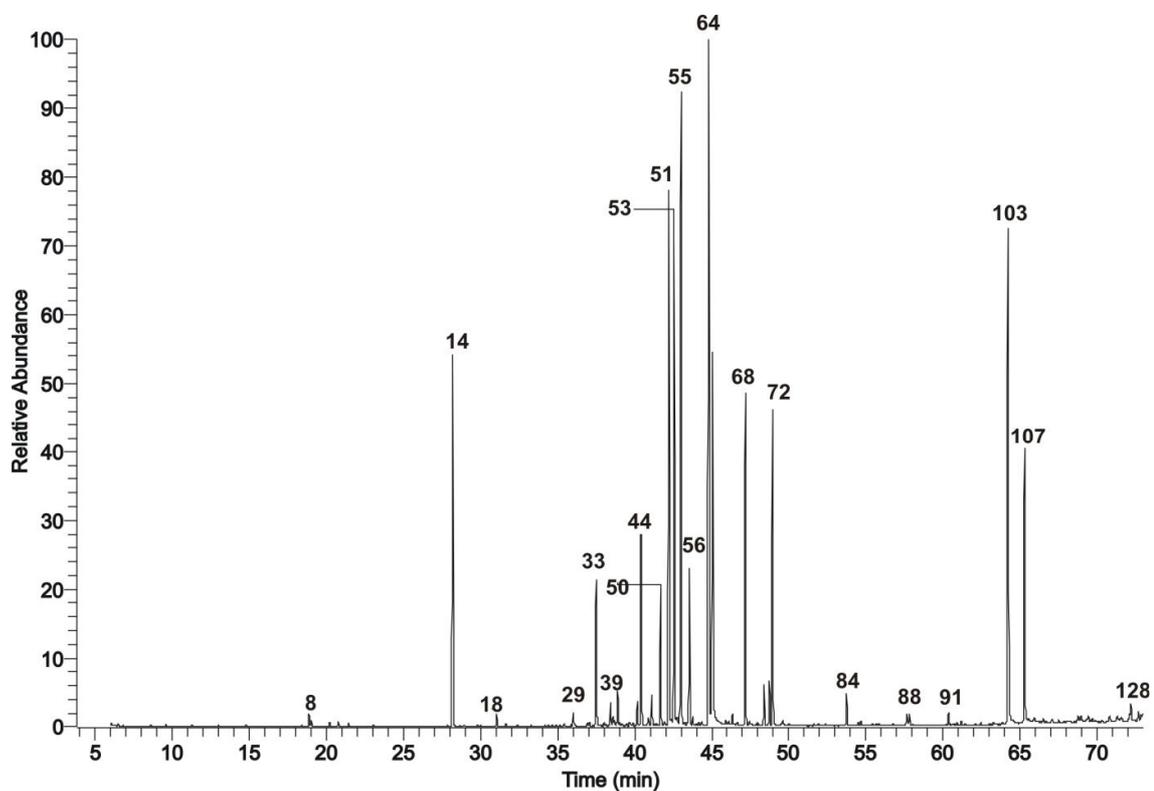


Figura A. Cromatograma da corrente total de íons de extrato de folha jovem de *Eucalyptus grandis*. A identificação dos compostos é apresentada na Tabela 3 (Dissertação pg.38). O composto 18 não foi encontrado em todas as replicadas, os compostos 33, 84, 88, 91 e 128 não foram identificados.

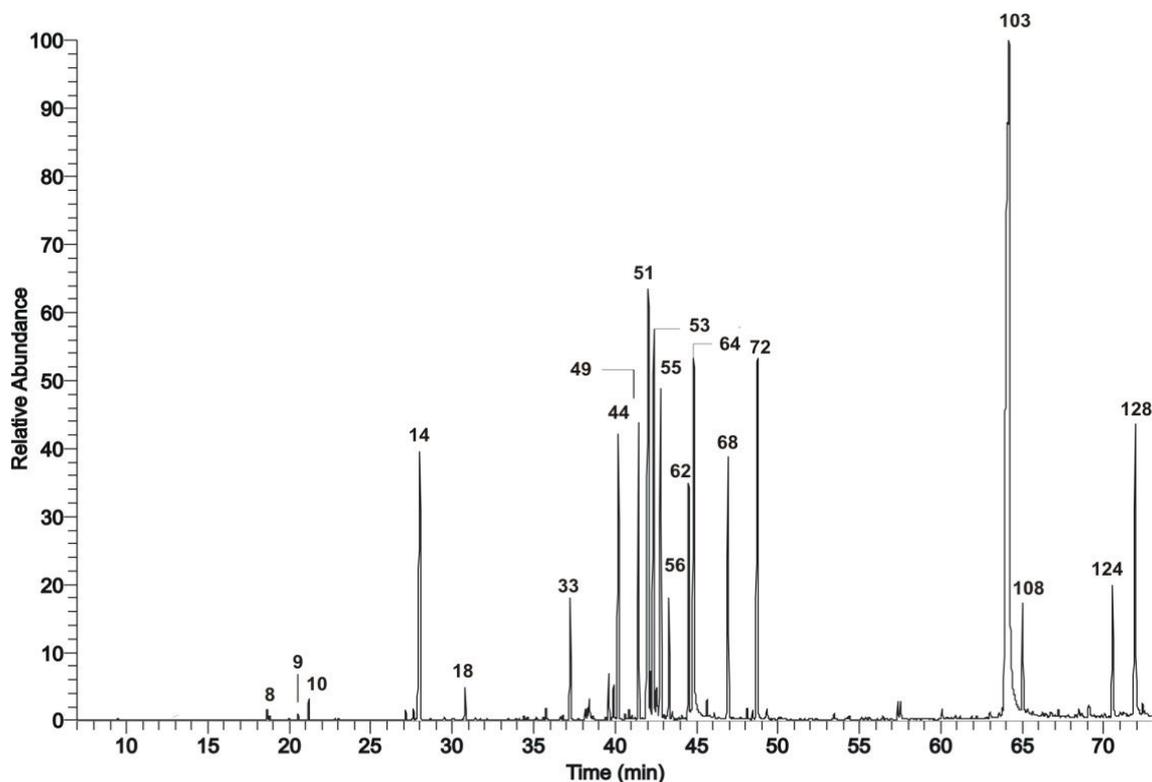


Figura B. Cromatograma da corrente total de íons de uma folha adulta de *Eucalyptus grandis*. A identificação dos compostos é apresentada na Tabela 3 (Dissertação pg.38). Os compostos 14 e 18 não foram encontrados em todas as replicadas, e os compostos 33, 124 e 128 não foram identificados.

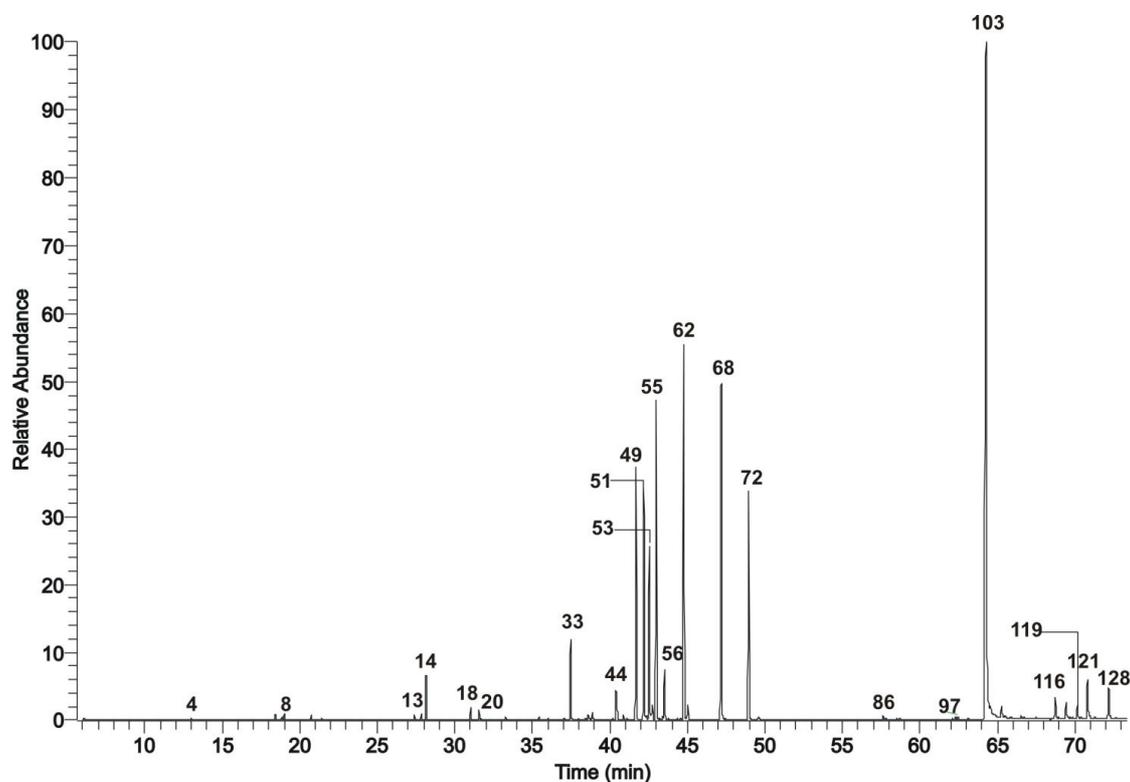


Figura C. Cromatograma da corrente total de íons de extrato de folha jovem de *Eucalyptus benthamii*. A identificação dos compostos é apresentada na Tabela 4 (Dissertação, pg. 40). Os compostos 33, 86, 97, 116, 119, 121, 124 e 128 não foram identificados.

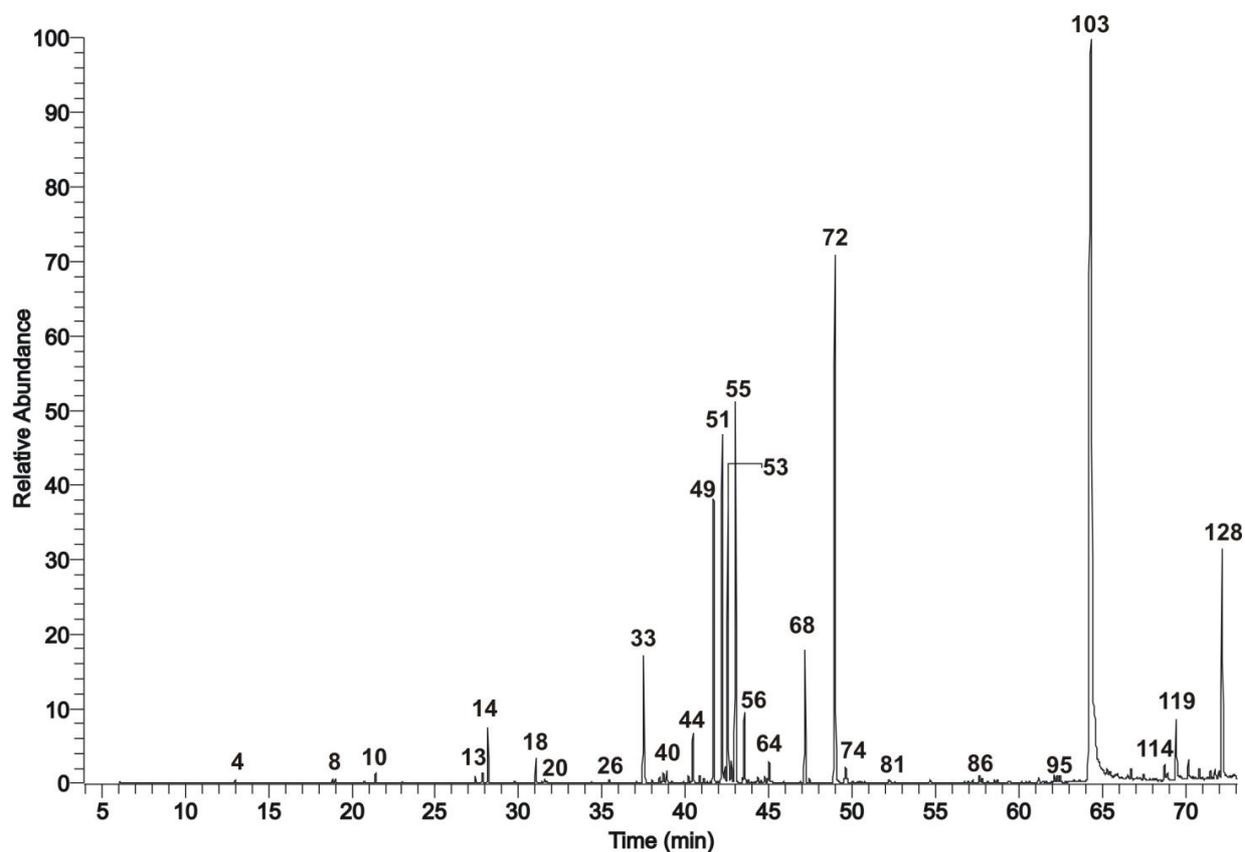


Figura D. Cromatograma da corrente total de íons de uma folha adulta de *Eucalyptus benthamii*. A identificação dos compostos é apresentada na Tabela 4 (Dissertação, pg. 40). Os compostos 33, 81, 86, 119, 124 e 128 não foram identificados.