



**ANDRESSA MONTEIRO CASTRO PAIVA**

**ESTUDO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA A  
IDENTIFICAÇÃO DE PRUNASINA EM AMOSTRAS DE  
FOLHAS DE EUCALIPTO ATRAVÉS DE CROMATOGRÁFIA  
LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECTOR DE  
ARRANJO DE DIODOS (CLAE-DAD)**

**LAVRAS - MG  
2023**

**ANDRESSA MONTEIRO CASTRO PAIVA**

**ESTUDO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA A IDENTIFICAÇÃO DE  
PRUNASINA EM AMOSTRAS DE FOLHAS DE EUCALIPTO ATRAVÉS DE  
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECTOR DE  
ARRANJO DE DIODOS (CLAE-DAD)**

Monografia apresentada à  
Universidade Federal de  
Lavras, como parte das  
exigências do Curso de  
Química, para a obtenção  
do título de Bacharel.

Prof. Dr Luciano Vilela Paiva  
Orientador

Me. Fabrício Lelis da Silva  
Co-orientador

**LAVRAS - MG  
2023**

**ANDRESSA MONTEIRO CASTRO PAIVA**

**ESTUDO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA A IDENTIFICAÇÃO DE  
PRUNASINA EM AMOSTRAS DE FOLHAS DE EUCALIPTO ATRAVÉS DE  
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECTOR DE  
ARRANJO DE DIODOS (CLAE-DAD)  
STUDY OF ANALYTICAL METHODS FOR THE IDENTIFICATION OF PRUNASIN  
IN SAMPLES OF EUCALYPTUS LEAVES USING HIGH PERFORMANCE LIQUID  
CHROMATOGRAPHY WITH DIODE ARRANGEMENT DETECTOR (HPLC-DAD)**

Monografia apresentada à  
Universidade Federal de  
Lavras, como parte das  
exigências do Curso de  
Química, para a obtenção  
do título de Bacharel.

APROVADA em 08 de março de 2023.

Dr Luciano Vilela Paiva - UFLA

Dra Elisângela Jaqueline Magalhães - UFLA

Dr Marcelo Braga Bueno Guerra - UFLA

Prof. Dr Luciano Vilela Paiva  
Orientador

Me. Fabrício Lelis da Silva  
Co-orientador

**LAVRAS - MG  
2023**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, pela saúde, força e amparo.

Aos meus pais, Janine e Pedro, responsáveis pela minha formação como ser humano, pelo amor incondicional e apoio desde o início.

À minha irmã, Vitória, por nunca me deixar desistir e me motivar diariamente.

Aos meus demais familiares, amigos e colegas, que direta ou indiretamente fizeram parte dessa jornada e torceram para meu sucesso e crescimento.

À Universidade Federal de Lavras, pela oportunidade de estudo e por me proporcionar anos de vivências incríveis.

Ao Departamento de Química e todos seus docentes, servidores e terceirizados, por todo ensinamento e acolhimento.

Ao Laboratório Central de Biologia Molecular e todos seus integrantes, pelo aprendizado durante esses anos de Iniciação Científica e por todos os momentos especiais que pude presenciar.

Ao Instituto de Ciências Naturais pela colaboração e atenção.

Ao meu orientador, Professor Luciano, por ter me apresentado com este projeto e pelo acompanhamento nessa caminhada com seu vasto conhecimento.

Ao meu co-orientador, Fabrício Lelis da Silva, por toda experiência que me transmitiu, sempre com muita paciência e didática admirável.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo incentivo à pesquisa e pela concessão da bolsa.

Muito obrigada.

## RESUMO

O Eucalipto possui grande importância comercial na economia brasileira, tendo em vista a sua alta produtividade, consequência do seu rápido crescimento e de sua capacidade de adaptação às diversas regiões ecológicas. Estudos mostram que boa parte das espécies dessa planta produzem uma molécula chamada prunasina, que é um glicosídeo cianogênico responsável por um dos mecanismos de defesa própria do vegetal contra herbívoros e patógenos. Existem enzimas específicas, as  $\beta$ -glicosidases, que convertem a prunasina em ácido cianídrico que quando, de alguma forma, o tecido vegetal é rompido, há o contato dessa enzima com o glicosídeo, iniciando a conversão até este ácido. Ao ser absorvido e entrar na circulação sanguínea do predador, o ácido cianídrico é hidrolisado, liberando o íon cianeto, que é tóxico. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi estudar diferentes protocolos de análise, através Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD), para a identificação de prunasina em amostras de folhas de eucalipto, que foram cultivadas *in vitro* da espécie *Eucalyptus occidentalis* e *in vivo* da espécie *Eucalyptus viminalis* e avaliar alguns parâmetros cromatográficos desses métodos. A extração da prunasina nas folhas foi feita com metanol, clorofórmio e água, sob agitação ultrassônica, com a finalidade de aumentar a eficiência da extração dos metabólitos do vegetal. Foram testadas diferentes fases móveis e alguns parâmetros foram alterados, como as proporções entre os solventes, tempos de eluição e as colunas cromatográficas. O melhor resultado deu-se com o uso da fase móvel composta por metanol, numa eluição isocrática (15:85 metanol/água ultrapura) com duração de 25 minutos, coluna C18 Supelco Ascentis® Express 15cm x 2.1mm, 2 $\mu$ m, pressão máxima: 400 bar, temperatura do forno de 35°C, volumes de injeções de 20 $\mu$ L da amostra e 2 $\mu$ L do padrão e comprimento de onda de 214 nm. Esta pesquisa é o ponto de partida para futuros estudos de quantificação de glicosídeos cianogênicos, em especial a prunasina, em folhas de eucalipto de diferentes espécies, visto que é uma substância que pode atuar no controle de pragas.

**Palavras-chave:** Eucalipto, Prunasina, Cromatografia.

## ABSTRACT

Eucalyptus has great commercial importance in the Brazilian economy, in view of its high productivity, a consequence of its rapid growth and its ability to adapt to the different ecological regions. Studies show that most species of this plant produce a molecule called prunasin, which is a cyanogenic glycoside responsible for one of the plant's own defense mechanisms against herbivores and pathogens. There are specific enzymes, the  $\beta$ -glucosidases, which convert prunasin into hydrocyanic acid that, when, in some way, the plant tissue is broken, there is contact of this enzyme with the glycoside, initiating the conversion to this acid. Upon being absorbed and entering the bloodstream of the predator, hydrocyanic acid is hydrolyzed, releasing the cyanide ion, which is toxic. Therefore, the objective of this work was to study different analysis protocols, using High Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detector (HPLC-DAD), for the identification of prunasin in samples of eucalyptus leaves, which were cultivated in vitro from the *Eucalyptus occidentalis* species and in vivo *Eucalyptus viminalis* species and evaluate some chromatographic parameters of these methods. The extraction of prunasin in the leaves was carried out with methanol, chloroform and water, under ultrasonic agitation, with the aim of increasing the efficiency of the extraction of plant metabolites. Different mobile phases were tested and some parameters were changed, such as proportions between solvents, elution times and chromatographic columns. The best result was obtained with the use of the mobile phase composed of methanol, in an isocratic elution (15:85 methanol/ultrapure water) lasting 25 minutes, C18 column Supelco Ascentis® Express 15cm x 2.1mm, 2 $\mu$ m, maximum pressure: 400 bar, oven temperature of 35°C, injection volumes of 20 $\mu$ L of the sample and 2 $\mu$ L of the standard, and a wavelength of 214 nm. This research is the starting point for future studies on the quantification of cyanogenic glycosides, especially prunasin, in eucalyptus leaves of different species, since it is a substance that can act in pest control.

**Keywords:** Eucalyptus, Prunasin, Chromatography.

## LISTA DE SIGLAS

AIA	Ácido indolacético
AIB	Ácido indol-3-butírico
ANA	Ácido Naftalenoacético
ATP	Adenosina tri-fosfato
BAP	Benzilaminopurina
C18	Coluna cromatográfica preparada com octadecilsilano
CaCl <sub>2</sub>	Cloreto de cálcio
CaNO <sub>3</sub>	Nitrato de cálcio
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DAD	Detector de Arranjo de Diodos
E1	Amostras de folhas de eucalipto <i>in vivo</i>
E2	Amostras de folhas de eucalipto <i>in vitro</i>
EC	Condutividade elétrica
HCl	Ácido clorídrico
HCN	Ácido cianídrico
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IAC	Instituto Agronômico de Campinas
IPEF	Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais, Piracicaba - SP
JADS	Meio de cultura formulado por Juan A. R. A.; Antonio N. G.; Diva C. e Silvia C. V. (1989)
k	Fator de retenção
KOH	Hidróxido de potássio
LCBM	Laboratório Central de Biologia Molecular
MS	Meio de cultura de Murashige e Skoog
N	Número de pratos teóricos
PA	Padrão analítico
PA ACS	Padrão analítico American Chemical Society
pH	Potencial hidrogeniônico
Rs	Resolução
UV	Região Ultravioleta do espectro
UV-VIS	Região Ultravioleta-visível do espectro
VIS	Região visível do espectro

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>8</b>
2	<b>REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>10</b>
2.1	Aspectos gerais e origem do eucalipto.....	10
2.2	Importância econômica do eucalipto no Brasil.....	11
2.3	Glicosídeos cianogênicos.....	13
2.3.1	Prunasina.....	15
2.4	Ameaças ao eucalipto.....	16
2.5	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD).....	17
2.6	Parâmetros cromatográficos.....	19
2.6.1	Resolução.....	20
2.6.2	Pratos teóricos (N).....	21
2.6.3	Fator de retenção (k).....	22
2.6.4	Fator de separação ( $\alpha$ ).....	23
3	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>24</b>
3.1	Preparo do material vegetal.....	24
3.2	Método de extração.....	32
3.3	Diluições.....	36
3.4	Sistema cromatográfico.....	36
4	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>38</b>
4.1	Cultivos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> .....	38
4.2	Análises cromatográficas.....	39
4.3	Avaliação dos parâmetros cromatográficos.....	51
4.4	Identificação de prunasina.....	55
5	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>57</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>58</b>



## 1. INTRODUÇÃO

O gênero *Eucalyptus* é originário de regiões adjuntas à Austrália, Tasmânia e outras ilhas da Oceania. São mais de 700 espécies reconhecidas na botânica. Estas espécies têm propriedades físicas e químicas tão diversas que fazem com que os eucaliptos sejam usados para as mais diversas finalidades como, lenha, estacas, moirões, dormentes, carvão vegetal, celulose e papel, chapas de fibras e de partículas, até movelaria, geração de energia, medicamentos, entre outros (EMBRAPA, 2019). É uma planta que tem grande importância na economia brasileira, além de ser uma espécie que permite a proteção da fauna, flora e conservação dos solos.

Estudos mostram que boa parte das espécies de eucalipto apresentam uma substância chamada prunasina, que é um glicosídeo cianogênico. Esses glicosídeos são metabólitos secundários que, ao serem hidrolisados, por enzimas específicas, liberam cianeto. Como afirma MOLLER, 2010, esses compostos estão presentes em muitas plantas e sua capacidade de liberar HCN tóxico oferece uma resposta de defesa química imediata a herbívoros e patógenos que causam danos ao tecido vegetal. No caso da prunasina, as enzimas responsáveis por catalisar o processo de hidrólise são as  $\beta$ -glicosidases, que geralmente, clivam ligações glicosídicas na configuração  $\beta$ .

Diante das informações, o presente trabalho tem como finalidade estudar diferentes protocolos de análise, por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD), para identificar prunasina em amostras de folhas de eucalipto, cultivadas *in vivo* e *in vitro*, das espécies *Eucalyptus viminalis* e *Eucalyptus occidentalis*, respectivamente, ambas nativas da Austrália. Além disso, pretende-se analisar os cromatogramas das análises e, por meio de parâmetros cromatográficos de separação, avaliar os diferentes métodos estudados.

O método analítico escolhido para as análises, a CLAE, é um tipo de cromatografia líquida que emprega colunas, recheadas de materiais especialmente preparados e uma fase móvel que é eluída sob altas pressões. Ela tem a capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma grande quantidade de compostos presentes em vários tipos de amostras, em escala de tempo de poucos minutos, com alta resolução, eficiência e sensibilidade (COLLINS, 1997). É uma pesquisa promissora, visto que trabalha com uma planta de grande relevância, uma substância que tem despertado interesse por sua importância química e toxicológica e uma técnica analítica moderna. A presença de prunasina nas plantas favorece

um futuro estudo em buscar o gene responsável pela síntese dessa molécula nas plantas e, assim, modificar eucaliptos comerciais com o objetivo de deixá-los resistentes a herbívoros, patógenos e pragas.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Aspectos gerais e origem do eucalipto

O nome eucalipto deriva do grego: eu (= bem) e kalipto (= cobrir), remetendo à estrutura globular arredondada de seu fruto, caracterizando a tampa que protege suas sementes. O eucalipto pertence à família das Mirtáceas e é nativo de regiões próximas à Austrália, correspondendo a 90% da área coberta por espécies arbóreas do país, formando densos maciços florestais nativos. Além do elevado número de espécies, existe um número muito grande de variedades híbridas (MARTINI, 2004).

Figura 1 - Fruto do eucalipto.



Fonte: E-paletes Bioenergia.

A principal característica que define a árvore relaciona-se ao seu rápido crescimento, atinge a idade adulta entre 7 e os 12 anos, vantagem natural que permite o desenvolvimento de um circuito econômico florestal que alimenta, atualmente, as mais variadas indústrias (VASCONCELOS, 2021).

Em relação às suas origens, MARTINI, 2004 (apud ANDRADE, 1922) afirma que por volta de 1774 o eucalipto teria sido introduzido na Europa e, em 1788, foi descrito pela primeira vez pelo botânico francês L'Héritier de Brutelle, no Sertum Anglicum, em Paris, com material recolhido em expedições na Austrália. Até a metade do século XIX, o eucalipto era encontrado apenas em coleções de alguns jardins botânicos, sem importância comercial.

Na América do Sul, talvez o Chile tenha sido o primeiro país a introduzir o eucalipto, em 1823, recebendo as sementes de um navio inglês. A Argentina teria introduzido o eucalipto em seu país em 1865, através do Presidente Garcia Moreno. No Uruguai, as primeiras sementes de eucalipto foram recebidas em 1853 (MARTINI, 2004).

Depois de sua introdução em diversos países, o cultivo de eucalipto se desenvolveu e se tornou uma cultura de suma importância, não só para decorações, mas principalmente economicamente.

Figura 2 - Plantação de eucalipto.



Fonte: Potencial Florestal (2020).

## **2.2 Importância econômica do eucalipto no Brasil**

O Brasil é um país tropical, o que possibilita a adaptação de plantas originárias de vários lugares do mundo. Seu território é muito extenso, com climas bastante distintos: regiões frias, úmidas, quentes e secas. Sendo assim, muitas plantas aqui foram introduzidas e se desenvolveram facilmente durante o período de colonização e povoamento (DE VECHI, 2018).

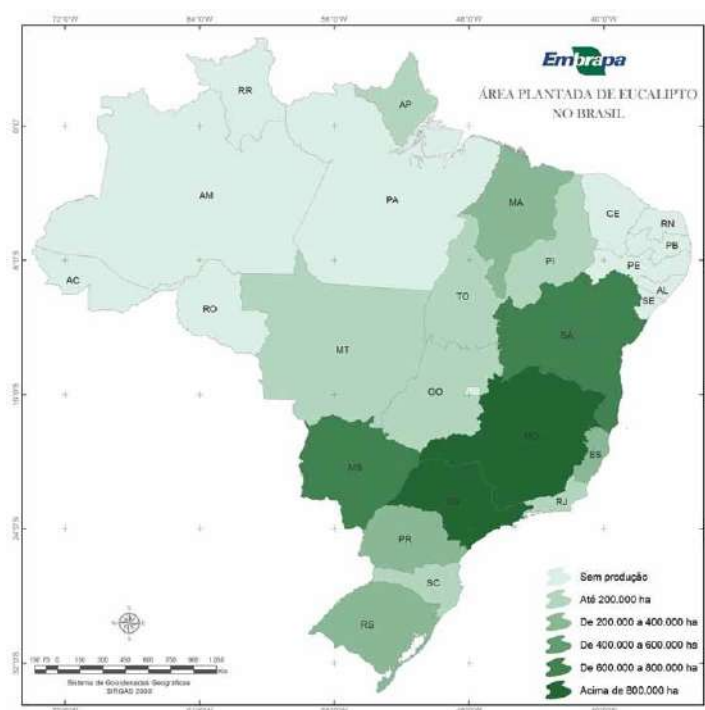
É difícil determinar, com segurança, a data de introdução do eucalipto no Brasil. Até algum tempo atrás, tinha-se como certo que os primeiros plantios aconteceram no Rio Grande do Sul, em 1868, por Frederico de Albuquerque. Tal pioneirismo é questionado, uma vez que, em 1869, chegou a Paris uma correspondência do próprio Frederico, solicitando sementes de eucalipto, dizendo que realizaria tentativas de introdução de eucalipto no Brasil (MARTINI, 2004).

Os primeiros estudos científicos com eucalipto no Brasil foram realizados por Edmundo Navarro de Andrade na Antiga Companhia Paulista de Estradas de Ferro em 1904. O objetivo era atender à demanda de madeira para a construção de ferrovias. Esses trabalhos foram considerados avançados para a época, tanto que Navarro de Andrade encontrou espécies muito promissoras. Os cultivos estavam apresentando baixa produtividade, então, em 1941, ele convidou Carlos Arnaldo Krug do IAC (Campinas) para iniciar um programa de melhoramento genético (DE CARVALHO, 2000). Depois de algum tempo, o crescimento da

área reflorestada no País foi realmente marcante, a partir da promulgação da Lei de Incentivos Fiscais ao Reflorestamento, Lei no 5.106 de 1966 (PENTEADO JÚNIOR, 2014).

O contexto atual no Brasil é resultado de um longo processo histórico de investimentos técnicos, científicos, financeiros e legais, para o desenvolvimento e expansão do cultivo de eucaliptos (FREITAS JUNIOR, 2014), que, depois de sua introdução, alguns estados, como Minas Gerais, São Paulo, Bahia e Mato Grosso do Sul se destacam fortemente no cultivo dessa planta no país, como mostra a Figura 3.

Figura 3 - Distribuição espacial dos cultivos de eucalipto no Brasil.



Fonte: Embrapa (2013).

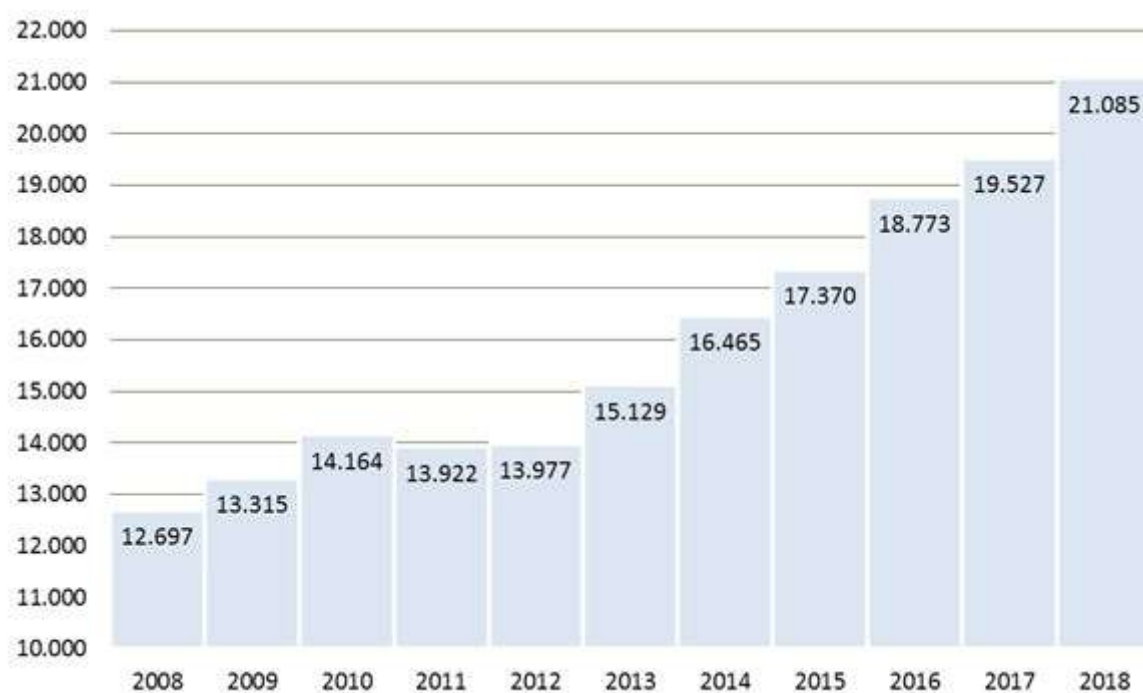
O país passou da condição de importador de papel, na primeira metade do século XX, para grande exportador e possuidor de plantios clonais no final da primeira década do século XXI, com perspectivas de ampliação da área de cultivo até o ano de 2020, para atender à crescente demanda, não apenas no setor de papel e celulose, mas também nos setores de siderurgia, resinas e aromáticos, fármacos, produção de mel, placas, aglomerados, fibras e compensados de madeira, construção civil, e, possivelmente, no setor de energia da biomassa, na forma de *pellets* e briquetes (FREITAS JUNIOR, 2014).

Como afirma DE VECHI, 2018, antes, o eucalipto era apenas uma planta usada para preencher espaços que não serviam para a agricultura, agora seu plantio é feito seguindo critérios de manejo desenvolvidos para se produzir bastante madeira e com qualidade,

respeitando as normas vigentes de preservação do meio ambiente. Ainda cita que, no Brasil, esse mercado tem mostrado grandes avanços, sendo destaque em relação à extração de papel e celulose, apresentando alguns números importantes para a balança comercial brasileira, destacando o crescimento desse segmento nos últimos anos e que o país utiliza 100% da matéria-prima proveniente de reflorestamento.

O Brasil possui mais de 3,5 milhões de hectares de eucalipto, gerando milhões de empregos diretos e indiretos e sua importância é tamanha que o ministério de Ciência e Tecnologia se junta com empresas e Universidades para a realização de projetos de incentivo ao estudo e melhoramento genético dessa cultura como por exemplo o “Genoma do Eucalipto” (DE CARVALHO, 2000).

Figura 4 - Evolução da produção de celulose no Brasil, em toneladas (2020).



Fonte: ABTCP, 2020.

### 2.3 Glicosídeos cianogênicos

O eucalipto é uma planta muito rica, de vasta composição química, como flavonoides, terpenos, cetonas, aldeídos, glicosídeos cianogênicos, entre outros.

Os glicosídeos cianogênicos, foco deste trabalho, são substâncias de defesa própria dos vegetais para agirem contra seus predadores. Estão localizados nos vacúolos da célula vegetal e as enzimas que os degradam a ácido cianídrico, as  $\beta$ -glicosidases, ficam localizadas

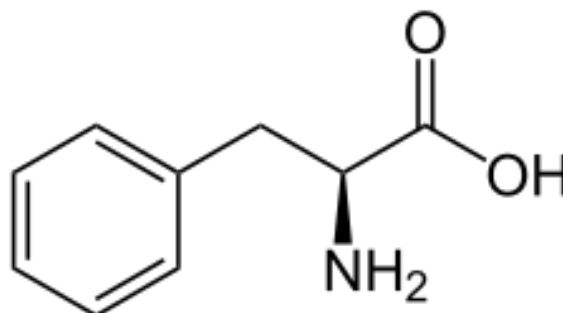
na parede celular. Quando, de alguma forma, o tecido vegetal é rompido, a enzima entra em contato com o glicosídeo, desdobrando-o até ácido cianídrico (NASCIMENTO, 2016).

Nas plantas, os glicosídeos cianogênicos ganharam funcionalidades adicionais como transportadores de nitrogênio e a operação de uma via de renovação endógena pode permitir que as plantas retirem o nitrogênio e a glicose depositados nos glicosídeos cianogênicos para uso no metabolismo primário (MOLLER, 2010).

A concentração dos glicosídeos cianogênicos é variável nas diversas espécies de plantas, e numa mesma espécie varia dependendo do clima e outras condições que influenciam o crescimento da planta como adubação nitrogenada, deficiência de água e idade da planta. (DEUS, 2011 apud LIMA JÚNIOR et al., 2010).

A estrutura básica dos glicosídeos cianogênicos inclui um núcleo de carbono ligado a uma porção CN e dois grupos substituintes (R1 e R2) e ligados a um açúcar, seja um monossacarídeo (glicose) ou um dissacarídeo (gentiobiose) por uma ligação glicosídica. R1 pode ser um grupo metil ou um grupo fenil ou *p* - hidroxifenil. R2 é mais comumente hidrogênio, mas também pode ser um grupo metil ou etil (CRESSEY, 2019).

Figura 5- Exemplo de estrutura de glicosídeo cianogênico, fenilalanina.



Fonte: Planejativo (2013).

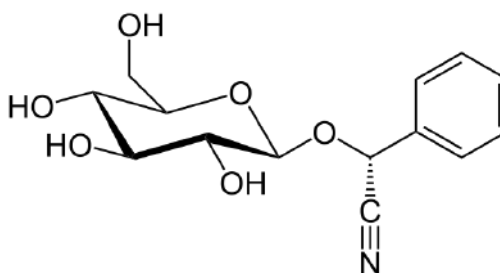
A toxicidade das plantas cianogênicas se deve ao desligamento do HCN da molécula do carboidrato. Durante a mastigação de um vegetal que contenha cianogênicos, por exemplo, esse carboidrato é hidrolisado por enzimas presentes no próprio tecido da planta. O cianeto de hidrogênio é uma molécula pequena e apresenta baixo peso molecular, o que contribui para sua rápida absorção e distribuição para os tecidos através da corrente sanguínea (VARGAS E GRACIOLI, 2013 apud AMORIM et al., 2006). A ingestão dessas plantas por predadores pode acarretar um elevado envenenamento e até levar à morte.

Em geral, os glicosídeos cianogênicos são inibidores de insetos, porém, algumas espécies preferem se alimentar de plantas cianogênicas. Isso se explica pela capacidade que esses insetos adquiriram de metabolizar glicosídeos cianogênicos ou sequestrá-los para uso em sua própria defesa contra predadores (MOLLER, 2010).

### 2.3.1 Prunasina

A prunasina é um glicosídeo cianogênico relacionado à amigdalina. Possui fórmula química bruta:  $C_{14}H_{17}NO_6$  e é encontrada em algumas espécies do gênero *Prunus* como *Prunus japonica* ou *P. maximowiczii* e em amêndoas amargas. Também é encontrada nas folhas e caules de *Olinia ventosa*, *O. radiata*, *O. emarginata*, *O. rochetiana* e *Acacia greggii*. A biossíntese da prunasina começa com a formação do aminoácido fenilalanina comum, que nas plantas é produzido pela via do chiquimato no metabolismo primário e ocorre no tegumento, sendo então transportada para outros tecidos para conversão em amigdalina ou degradada (SEM AUTOR, 2023).

Figura 6 - Estrutura prunasina.

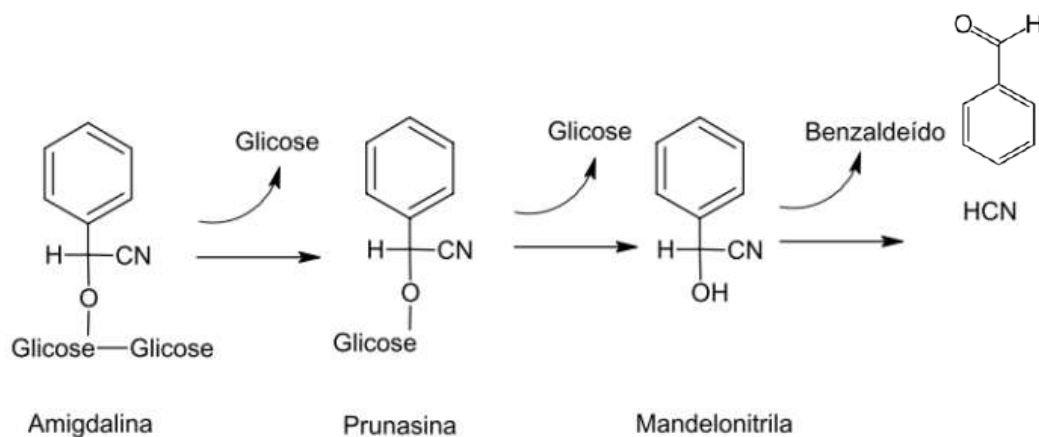


Fonte: Antropocene (2023).

Como dito, as enzimas responsáveis pelas reações com os glicosídeos cianogênicos são as  $\beta$ -glicosidases e ambos encontram-se compartimentados na célula. O processo de cianogênese inicia apenas quando ocorre o rompimento destes compartimentos (PEREIRA, 2012). A produção de cianeto a partir da prunasina ocorre em um processo de duas etapas envolvendo a deglicosilação da prunasina e a quebra da prunasina a uma mandelonitrila, para formar benzaldeído e cianeto. Estas reações são catalisadas por uma prunasina liase e por hidroxinitrila-liase, respectivamente (MATSUURA, 2005 apud JOHNE, 1991).



Figura 7 - Reação enzimática da degradação do glicosídeo cianogênico amigdalina à prunasina, quebra da prunasina em mandelonitrila e a formação de benzaldeído e ácido cianídrico.



Fonte: NASCIMENTO (2016, adaptado).

## 2.4 Ameaças ao eucalipto

Percebe-se que por mais que as plantas possuam mecanismos de defesa próprios, o ataque de pragas é algo preocupante. No ramo da entomologia florestal, as formigas cortadeiras, saúvas e quenquéns, destacam-se como uma das principais pragas que causam danos aos reflorestamentos, especialmente com o gênero *Eucalyptus*. Pelos dados estimados, é notório que os prejuízos causados pelas formigas são representativos, podendo chegar a 100% as perdas, em curto espaço de tempo, dada à progressão geométrica com que se desenvolvem as formigas (MENDES FILHO, 1979).

Sabe-se, porém, que as formigas-cortadeiras são seletivas no seu forrageamento, preferindo cortar algumas plantas e ignorar outras, distinguindo espécies dentro de um mesmo gênero, e até mesmo, entre indivíduos de procedências distintas. Entretanto, pouco se conhece sobre a variação na resistência ao ataque das saúvas, entre distintas, procedentes de uma mesma espécie de eucalipto (SANTANA, 1990).

Figura 8 - Formiga cortadeira.



Fonte: Blog Syngenta (2022).

A importância das formigas cortadeiras levou as empresas florestais a formarem equipes exclusivas para o seu combate. Até o momento, o controle químico é o método mais eficiente e o mais utilizado para reduzir os danos de formigas em plantios florestais. Nenhum método alternativo está atualmente disponível no mercado ou não tem eficiência para o uso em grande escala (BARBOSA, 2021 apud BRITTO et al., 2016).

Aprofundar o estudo sobre os genes responsáveis pela síntese de prunasina e conciliar ao melhoramento genético em eucaliptos, pode ser uma alternativa futura para o bloqueio de pragas, principalmente em culturas de uso comercial, visto que uma das mais prováveis funções biológicas dos glicosídeos em algumas plantas corresponde à sua ação no mecanismo de defesa contra patógenos e insetos (MATSUURA, 2005 apud NAHRSTED, 1985; VETTER, 2000).

Depois que o glicosídeo é convertido em ácido cianídrico, na circulação sanguínea, este libera o íon cianeto, que liga-se fortemente ao ferro III no citocromo oxidase mitocondrial, responsável pelo transporte de elétrons na respiração celular. Assim, a via metabólica da fosforilação oxidativa (acontecendo na crista mitocondrial), onde é gerado o maior aporte de ATP, é então paralisada a respiração celular. Por essa razão, o intoxicado passa por um processo de asfixia celular que, dependendo da quantidade de cianeto no sangue, pode levar à morte (NASCIMENTO, 2016 apud CHASSAGNE et al., 1996).

## **2.5 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD)**

A cromatografia líquida de alta eficiência é uma técnica analítica de separação de componentes de uma matriz, na qual a separação depende da distribuição molecular dos componentes da matriz em duas fases, fase móvel, que neste tipo de cromatografia é um

líquido, e a fase estacionária, que compreende uma coluna de separação de aço inox com um tipo de enchimento poroso. Um sistema de CLAE consiste em 5 componentes principais: sistema de bombas, sistema de injeção da amostra, coluna de separação, detector e um sistema que permite registrar os dados do detector, o qual normalmente é um computador. Todos estes sistemas, com exceção do computador, são conectados por tubos de aço inox resistente a elevadas pressões (DA ROCHA, 2015).

Entre os detectores espectrofotométricos mais adequados estão os equipamentos com detecção por arranjo de diodos (DAD) que permitem analisar todo o espectro de absorção UV-Visível simultaneamente, gerando informações que possibilitam a identificação dos compostos (SKOOG, 2002). Este detector é um avanço nos detectores UV antigos e utiliza um sistema ótico invertido: a célula contendo a amostra é iluminada com luz branca (policromática). A luz emergente da célula chega a uma rede de difração através da qual é dispersada até o elemento fotossensível, que no caso do DAD, é um conjunto de fotodiodos montados sobre um chip de silício (KONZEN, 2015 apud CIENFUEGOS; VAITSMAN, 2000). Isso permite que sejam obtidos espectros de varredura da amostra durante todo o tempo da corrida cromatográfica, possibilitando, por exemplo, avaliar a presença de co-eluição de substâncias ou, o monitoramento de derivados que sejam formados por degradação da molécula de interesse e que apresentam absorção na faixa UV Vis (KONZEN, 2015).

De acordo com SILVA, 2016, os detectores de UV-visível são os detectores mais utilizados em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, pois apresentam baixo custo, aceitam o uso de gradiente e geralmente não são afetados por pequenas mudanças de fluxo e temperatura. O princípio da detecção por UV-vis pode ser definido através da concentração do analito relacionada à fração da luz transmitida pela célula do detector pela lei de Lambert-Beer:

$$A = b.c. \epsilon$$

Onde: A: Absorbância;

$\epsilon$ : Coeficiente de absortividade molar da espécie em estudo;

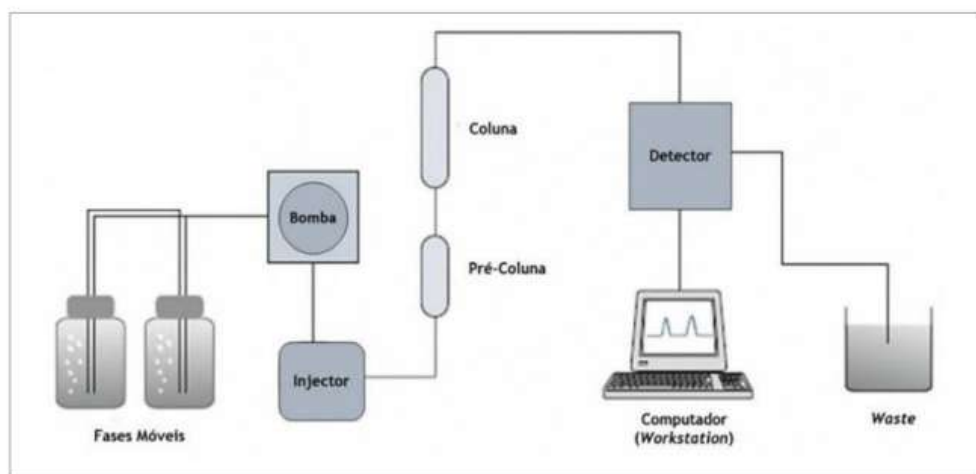
b: Distância percorrida pela radiação através da solução;

c: Concentração molar da espécie em solução.

No método de CLAE-DAD, o rastreamento e detecção de compostos é baseado na informação fornecida pelo espectro UV e tempo de retenção, os quais são comparados com os valores obtidos para os padrões puros de referência. Apesar de ser um método simples e

econômico comparativamente a outras técnicas, o CLAE-DAD tem um limite de aplicabilidade (DA ROCHA, 2015 apud HOU et al., 2006).

Figura 9 - Operação de um sistema HPLC.



Fonte: PORTO (2014).

Como dito, a separação cromatográfica é baseada na distribuição dos componentes entre uma fase estacionária e uma fase móvel. Essa separação resulta das diferenças de velocidade dos componentes arrastados pela fase móvel, devido às diferentes interações com a fase estacionária (ROSA, 2005). O cromatógrafo usado neste trabalho é caracterizado por coluna de fase reversa, onde a fase móvel tem características polares e a fase estacionária, apolares.

## 2.6 Parâmetros cromatográficos

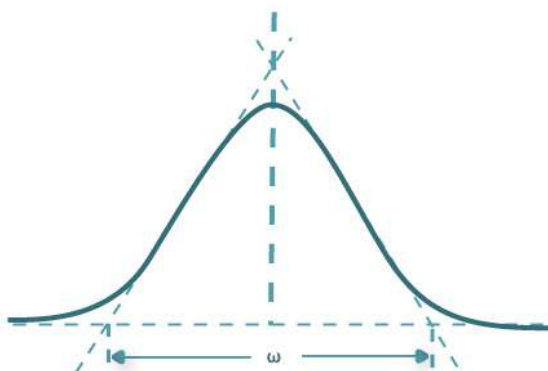
A resposta da análise em cromatografia é um gráfico que interpreta os resultados e possibilita a identificação, chamado de cromatograma. Para que este gráfico seja válido, ele deve apresentar picos bem separados e simétricos, a partir dos sinais analíticos. Parâmetros de separação cromatográfica, como resolução, número de pratos teóricos, fator de separação e fator de retenção são úteis para a avaliação e verificação da eficiência de separação de compostos na coluna cromatográfica (ROSA, 2005 apud Sewell e Clarke, 1987), além disso, são importantes para analisar o comportamento do analito diante das fases móvel e estacionária.

O objetivo principal do resultado cromatográfico é a separação adequada das espécies, o que se chama de resolução. Eficiência e seletividade adequadas resultam numa boa resolução. A eficiência é a capacidade de manter uma espécie, depois de percorrer a coluna, concentrada numa zona estreita (VALENTE, 1969). E a seletividade é a medida de tempo ou distância entre os valores máximos de dois picos, é a proporção nos valores de capacidade (BORTALIEIRO, 2016). Uma boa seletividade evita a coeluição, que é quando duas substâncias ficam com tempos de retenção parecidos e resultam em picos sobrepostos.

### 2.6.1 Resolução (Rs)

O soluto em movimento através de uma coluna cromatográfica tende a se dispersar de acordo com uma distribuição gaussiana.

Figura 10 - Representação de um pico gaussiano.



Fonte: Portal de Engenharia Química (2023).

Quanto mais tempo um soluto demora para passar através de uma coluna, mais larga se torna sua banda. A  $R_s$  traduz a eficiência da fase estacionária, que é calculada a partir da distância que separa os pontos máximos dos picos e da soma das larguras de suas respectivas bases ou largura a meia altura. (HARRIS, 2003). Para valores de  $R_s$  próximos de 1,5 a resolução está praticamente completa.

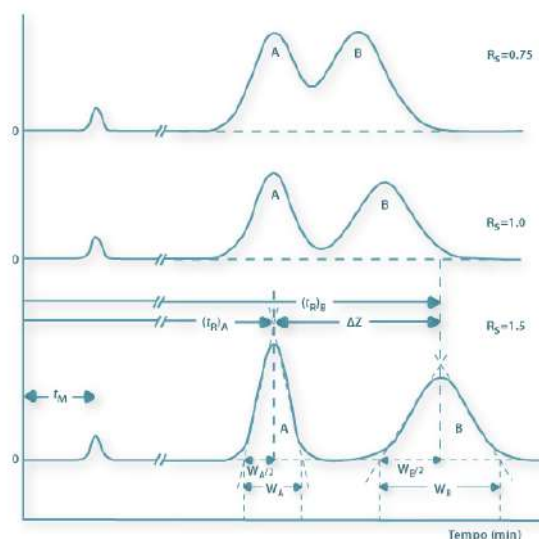
$$R_s = 2 \left( \frac{t_{R2} - t_{R1}}{W_{b1} + W_{b2}} \right)$$

Onde:

$t_{R1}$  e  $t_{R2}$ : tempo de retenção de dois picos adjacentes;

Wb1 e Wb2: largura dos picos na base, em unidades de tempo;  
Wh1 e Wh2: largura dos picos a meia-altura, em unidades de tempo.

Figura 11 - O efeito da resolução na separação de picos cromatográficos.



Fonte: Portal de Engenharia Química (2023).

Outros parâmetros importantes para avaliar a separação cromatográfica são o número de pratos teóricos, fator de retenção e fator de separação.

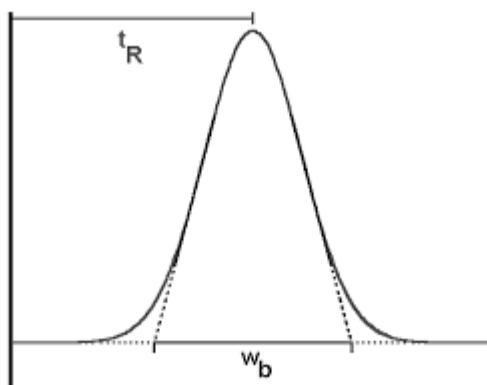
### 2.6.2 Pratos teóricos (N)

Este é o parâmetro relacionado à eficiência de uma coluna cromatográfica, que é usualmente medida pelo número de pratos (N), determinado diretamente do cromatograma por meio da relação entre o tempo de retenção de um composto e a largura de sua base:

$$N = \left( \frac{t_R}{w_b} \right)^2 \times 16$$

Em que N é o número de pratos da coluna, uma medida da eficiência;  $t_r$  é o tempo de retenção do analito empregado na medida e  $w_b$  a largura na base desse mesmo analito (LANÇAS, 2011). O número de pratos teóricos também é equivalente ao valor do quadrado da resolução e, portanto, quanto maior o número de pratos, melhor a resolução (LANÇAS, 2016).

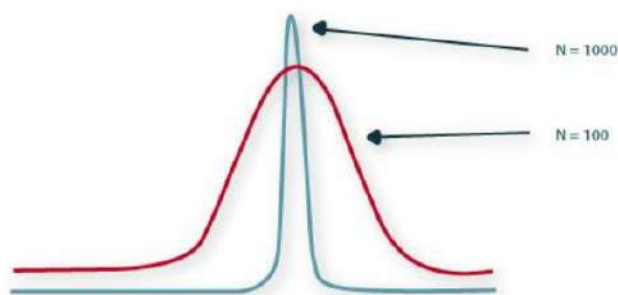
Figura 12 - Cromatograma esquemático.



Fonte: COUTRIM (2016).

Um prato equivale a uma etapa de equilíbrio do soluto entre a fase estacionária e a fase móvel. Quanto maior o número de pratos, mais equilíbrios ocorrerão, aumentando a eficiência e por consequência a separação (ROSA, 2005 apud DANTUS, 2004). O valor de  $N$  mede o alargamento do pico quando o composto em estudo passa pela coluna, quanto mais estreito for o pico, menor será o valor da largura a meia altura do pico ( $w_h$ ) e maior será a eficiência da coluna na separação do soluto (ROSA, 2005).

Figura 13 - O efeito da eficiência (número de pratos teóricos) na separação de picos cromatográficos.



Fonte: COUTRIM (2016).

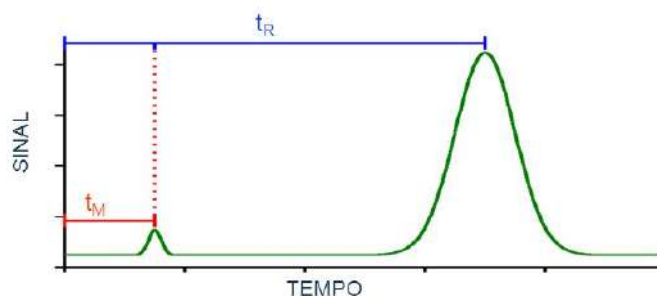
### 2.6.3 Fator de retenção ( $k$ )

O fator de retenção,  $k$ , de um soluto é determinado pela razão das quantidades das suas moléculas que ficam retidas na fase estacionária ou percorrendo a coluna na fase móvel e também é relacionado à razão dos tempos que as moléculas ficam na fase estacionária e na fase móvel (BORGES, 2010).

$$k = \frac{t_r - t_m}{t_m}$$

Onde  $t_r$  é o tempo de retenção do pico de interesse e  $t_m$  é o tempo morto ou tempo de retenção do composto não retido, que é o tempo mínimo para um composto que não interaja com a fase estacionária atravessar a coluna.

Figura 14 - Cromatograma esquemático destacando os tempos de retenção e morto.



Fonte: COUTRIM (2016).

Segundo LANÇAS, 2016, o valor ideal para  $k$  é entre 2 e 6.

#### 2.6.4 Fator de separação ( $\alpha$ )

Segundo ROSA, 2005, o fator de separação avalia a seletividade da separação para dois picos adjacentes. O valor  $\alpha$  é dependente da fase estacionária e/ou fase móvel, podendo assumir valores maiores ou iguais à unidade com temperaturas diferentes. Pode ser definido como uma razão entre os fatores de retenção do composto mais retido ( $k_2$ ) e do menos retido ( $k_1$ ).

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1}$$

O fator de separação mede a seletividade de um sistema cromatográfico. Assim, quanto mais seletiva for a retenção pela fase estacionária para o segundo componente que está sendo determinado, maior será o fator de separação. Se  $\alpha=1$ , os picos não estão separados, se  $\alpha>1$  não há garantia de que os picos estejam totalmente separados, porque eles podem ser largos e estarem sobrepostos. Consequentemente, um valor elevado de  $\alpha$  só implica em boa separação se os picos forem estreitos (CALDAS, 2009 apud COLLINS, 2006; MARTINS, 2004). Para LANÇAS, 2016, o valor ideal de  $\alpha$  é entre 1,05 e 1,20.



### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

Diante dos objetivos propostos, deu-se início à preparação do material vegetal para, posteriormente, serem feitas as análises. Foram cultivadas tanto plantas de eucalipto *in vivo* quanto *in vitro*, das espécies *Eucalyptus viminalis* e *Eucalyptus occidentalis*, respectivamente.

#### 3.1 Preparo do material vegetal

- *In vivo*

O cultivo *in vivo* é aquele em que a planta é colocada no solo e deixada em condições de temperatura e luminosidade favoráveis para seu desenvolvimento. No trabalho em questão, plantas *in vitro* de *Eucalyptus viminalis*, de idade desconhecida, foram transferidas do meio de cultura para um vaso contendo o substrato utilizado no laboratório. Esse plantio foi feito em fevereiro de 2022 e a planta era regada com água ou solução nutritiva a cada 2 ou 3 dias, dependendo da umidade. A coleta do material para extração foi realizada em novembro de 2022, onde a planta apresentava uma quantidade suficiente de folhas para que tal processo fosse feito.

Figura 15 - *Eucalyptus viminalis in vivo*, dia do plantio (fevereiro/2022).



Fonte: Da Autora (2022).

Figura 16 - *Eucalyptus viminalis* in vivo (novembro/2022).



Fonte: Da Autora (2022).

- ***In vitro***

Já a cultura *in vitro* consiste no cultivo de plantas em recipientes praticamente semi-lacrados, que fiquem sob condições favoráveis, como luminosidade, temperatura, umidade e pH controlados. Nesse caso, foi cultivada a espécie *Eucalyptus occidentalis*, que passou por diversas etapas até o momento da extração. Inicialmente (também em fevereiro de 2022), as sementes vindas do Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais (IPEF) foram desinfetadas de acordo com o protocolo de desinfestação do Laboratório Central de Biologia Molecular, com os seguintes procedimentos:

1. Colocou-se as sementes em tubos graduados de 2 mL (até a marca 0,5);
2. Adicionou-se 1 mL de álcool 70% e deixou agir por 1 minuto;
3. Após, o álcool foi retirado e foram adicionados hipoclorito de sódio e detergente comercial (1 gota) até encher o tubo. Deixou agir por 20 minutos, agitando a cada 5 minutos;
4. O enxágue foi realizado em câmara de fluxo laminar, com água destilada autoclavada. (5 vezes);
5. Após, despejou-se as sementes em placas de petri com papel filtro autoclavado.

Durante todo o processo de cultivo foram utilizados meios de germinação, multiplicação e alongamento. Os meios foram MS e JADS, de uso rotineiro do laboratório e que tem suas bases preparadas de acordo com a Tabela 1. O que mudou de um meio para outro, foi a introdução de reguladores vegetais, de acordo com o interesse para com a planta.

Tabela 1 - Composição dos componentes básicos dos meios de cultura.

Componentes		MS (mg/L)	JADS (mg/L)
Macronutrientes	$\text{NH}_4\text{NO}_3$	1650	1650
	$\text{KNO}_3$	1900	809
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370	7395
	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	170	408
Cálcio	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	-	1181
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440	-
Micronutrientes	KI	0,83	-
	$\text{H}_3\text{BO}_3$	6,2	3,1
	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22,3	17
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,6	4,3
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25	0,15
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025	1,25
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,25
Ferro + EDTA	$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	37,2	37,2
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,8	27,8
Vitaminas	Mio-inositol	100	-
	Piridoxina HCl	0,5	0,5
	Tiamina HCl	0,1	5
	Glicina	2	-
	Ácido nicotínico	0,5	0,5
	Pantotenato de cálcio	-	2,4
	Cisteína	-	5
	Arginina	-	7
	Glutanina	-	146
	Inositol	-	100

O primeiro estágio, foi a germinação das sementes de eucalipto. O preparo do meio foi feito num béquer, colocando-se todos os componentes (Tabela 2), com exceção do ágar, onde primeiro foi aferido o pH, para depois introduzi-lo. O pH foi corrigido com soluções diluídas de HCl e/ou KOH até atingir o valor de 5,8. Feito isso, usou-se o ebulidor para aquecer o meio e dissolver o ágar. Colocou-se 40mL de meio de cultura por frasco e estes foram tampados, etiquetados e autoclavados.

Tabela 2 - Composição do meio MS de germinação (1L).

Meio MS (composição)	Quantidade
Macronutrientes	25mL
Micronutrientes	0,5mL
Vitaminas	2,5mL
CaCl <sub>2</sub>	0,5mL
Ferro	5mL
Sacarose	15g
pH	5,8
Ágar	5g

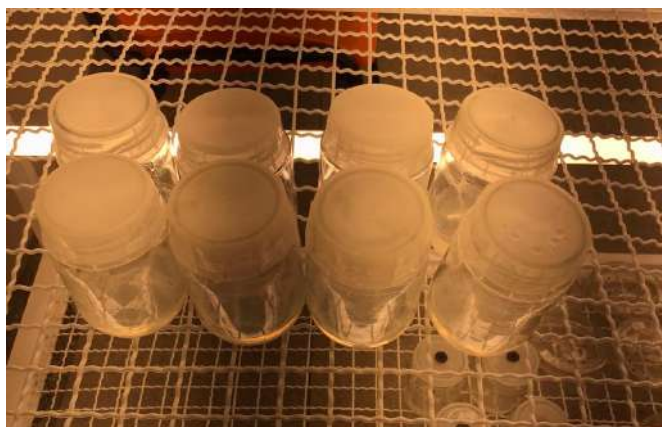
Dessa forma, as sementes limpas (preferencialmente as de cor clara) foram transferidas, com o auxílio de uma pinça de ponta fina, do papel filtro para os vidros contendo os meios MS de germinação, sendo 15 sementes em cada, aproximadamente. Essa transferência foi realizada na câmara de fluxo, em que a luz UV ficou ligada durante 20 minutos antes do processo. Os frascos foram colocados em sala de crescimento com temperatura de aproximadamente 27°C e fotoperíodo.

Figura 17- Sementes de eucalipto desinfetadas.



Fonte: Da Autora (2022).

Figura 18 - Frascos na sala de crescimento.



Fonte: Da Autora (2022).

Em março de 2022, cerca de quarenta dias após a semeadura, as plantas apresentavam o porte adequado para a transferência para o meio de multiplicação (Figura 19), onde iam desenvolver e gerar maior quantidade de material vegetal para a pesquisa. Foi utilizado também o meio MS, porém de multiplicação, de acordo com a Tabela 3.

Figura 19 - Plantas no meio de germinação, prontas para serem transferidas para o meio de multiplicação.



Fonte: Da autora (2022).

Tabela 3 - Composição do meio MS de multiplicação (1L).

Meio MS (composição)	Quantidade
Macronutrientes	50mL
Micronutrientes	1mL
Vitaminas	5mL
CaCl <sub>2</sub>	1mL
Ferro	10mL
Sacarose	30g
BAP (1,5 mg/L)	3,750mL
ANA (0,05 mg/L)	0,125mL
pH	5,8
Ágar	5g

O modo de preparo foi o mesmo do meio de germinação e os componentes básicos também são os mesmos (macronutrientes, micronutrientes, vitaminas e ferro), de acordo com a Tabela 1, porém, no de multiplicação há a adição de reguladores vegetais (BAP e ANA). A transferência das plantas também foi feita em câmara de fluxo e o corte foi realizado nos cotilédones das mesmas e transferidas com uma pinça para o outro meio.

A cada 15-21 dias, as plantas eram transferidas para um novo meio de multiplicação MS, para que pudessem se desenvolver melhor. Porém, notou-se que elas não estavam se desenvolvendo como o esperado, então o meio foi substituído pelo JADS, também de multiplicação e de utilização rotineira no LCBM, que tem composição de acordo com a Tabela 4 e seus componentes são preparados de acordo com a Tabela 1.

Tabela 4 - Composição do meio JADS de multiplicação (1L).

Meio JADS (composição)	Quantidade
Macronutrientes	50mL
Micronutrientes	10mL
Vitaminas	10mL
CaNO <sub>3</sub>	50mL
Ferro	20mL
Sacarose	30g
BAP (0,5 mg/L)	1,250mL
AIA (0,1 mg/L)	0,250mL
pH	5,8
Ágar	5g

Figuras 20 e 21 - Plantas no meio de multiplicação JADS.



Fonte: Da Autora (2022).

Depois que as plantas apresentaram tufo volumosos, decidi transferi-las para o meio de alongamento JADS, para que as plântulas pudessem esticar. A base de componentes foi mantida, mas o hormônio AIA não foi utilizado e os hormônios BAP, AIB e ANA foram introduzidos na composição deste meio de cultura, como mostra a Tabela 5.

Tabela 5 - Composição do meio JADS de alongamento (1L).

Meio JADS (composição)	Quantidade
Macronutrientes	50mL
Micronutrientes	10mL
Vitaminas	10mL
CaNO <sub>3</sub>	50mL
Ferro	20mL
Sacarose	30g
BAP (0,05 mg/L)	0,125mL
AIB (0,2 mg/L)	0,500mL
ANA (0,5 mg/L)	1,250mL
pH	5,8
Ágar	5g



Figuras 22 e 23 - Plantas no meio de alongamento JADS.



Fonte: Da Autora (2022).

### 3.2 Método de extração

Para a extração de prunasina, composto cianogênico de interesse nas amostras de folhas de eucalipto, foram testados os protocolos de NEILSON, 2011 e MADRERA, 2021.

- ***In vivo***

A planta de *Eucalyptus viminalis* cultivada *in vivo* foi retirada da câmara de crescimento, onde seus galhos maiores e com maior volume de folhas foram cortados com uma tesoura. Sendo assim, foram transferidos para envelopes de alumínio e colocados em uma caixa de isopor contendo nitrogênio líquido. Em seguida, esse material vegetal foi guardado e resfriado a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento da maceração.

Para a maceração das folhas, utilizou-se:

- Almofariz e pistilo lavados e autoclavados;
- Nitrogênio líquido;
- Garrafa térmica para armazenamento do nitrogênio;
- Tubo de 10mL;
- Tubos de 1,5mL;
- Espátulas;
- Balança;
- Racks para armazenamento dos tubos;
- Caixas de isopor.

Inicialmente, foi colocado nitrogênio líquido no almofariz para que ele pudesse ser resfriado. Sendo assim, os galhos foram retirados do ultra-freezer e colocados, um a um, no almofariz para serem macerados. Os excessos fibrosos foram retirados, como por exemplo

alguns galhos menores, que dificultavam a maceração. Depois que se tornaram um pó fino, foram transferidos, com a ajuda de uma espátula, para um tubo de centrífuga de 10 mL, que foi colocado numa caixa de isopor contendo nitrogênio líquido. Feito isso, o material vegetal foi pesado e classificado como E1. Foram pesadas quatro amostras, de acordo com a Tabela 6.

Tabela 6 - Massas do material vegetal *in vivo*.

Material	Massa (mg)
E1A	25
E1B	29
E1C	30
E1D	25

- ***In vitro***

Para a extração das plantas *in vitro* (*E. occidentalis*), o frasco foi retirado da sala de crescimento, levado para a câmara de fluxo, onde os tufos foram retirados com uma pinça e colocados num tubo de centrífuga de 10 mL, que estava em nitrogênio líquido, inserido numa caixa de isopor. Logo após, foi feita a maceração do material, que utilizou os seguintes materiais:

- Almofariz e pistilo lavados e autoclavados;
- Nitrogênio líquido;
- Garrafa térmica para armazenamento do nitrogênio;
- Tubos de 1,5mL;
- Tubo de 10mL;
- Espátulas;
- Balança;
- Racks para armazenamento dos tubos;
- Caixas de isopor.

Inicialmente, foi colocado nitrogênio líquido no almofariz para que ele pudesse ser resfriado. Sendo assim, os tufos de plantas foram colocados no almofariz, adicionado mais nitrogênio e, assim, foram macerados até se tornar um pó bem fino. Esse material resultante foi transferido, com a ajuda de uma espátula, para um tubo falcon de 10 mL, que foi colocado

na caixa de isopor contendo nitrogênio líquido. Feito isso, o material vegetal foi pesado e classificado como E2. Foram pesadas quatro amostras, de acordo com a Tabela 7.

Tabela 7 - Massas do material vegetal *in vitro*.

Material	Massa (mg)
E2A	22
E2B	28
E2C	24
E2D	32

Depois de pesadas, as amostras E1 e E2 foram transferidas para tubos de 1,5mL. Dessa forma, foi feita a extração, com os seguintes materiais e reagentes:

- Tubos de 1,5mL e 10mL;
- Vortex;
- Banho ultrassônico Ultra cleaner 800, Unique®;
- Balança analítica;
- Centrífuga;
- Pipeta de 1000 $\mu$ L;
- Ponteiras de 1000 $\mu$ L;
- Solução de metanol 99,8% PA
- Água ultrapura Milli-Q;
- Solução de clorofórmio 99,8% PA.ACS;
- Câmara de fluxo laminar para realização dos procedimentos.

Foi feita uma solução de metanol 80%, pipetando 8mL da solução de metanol 99,8% e 2 mL de água ultrapura para um tubo de 10mL, sendo esta reservada. Em seguida, foi adicionada às amostras a solução mencionada de metanol 80%, seguindo a proporção de 1mL de metanol para cada 25 mg de tecido, como apresentam as Tabelas 8 e 9.

Tabela 8 - Volume de metanol adicionado nas amostras *in vivo*.

Material	Volume MeOH 80% (mL)
E1A	1
E1B	1,16
E1C	1,2
E1D	1

Tabela 9 - Volume de metanol adicionado nas amostras *in vitro*.

Material	Volume MeOH 80% (mL)
E2A	0,88
E2B	1,12
E2C	0,96
E2D	1,28

Os tubos contendo as amostras com metanol 80% foram levadas ao vortex por 15 segundos, banho ultrassônico por 5 minutos e, após, centrífuga por 10 minutos a 5000 g. O próximo passo foi diluir a solução de metanol para 50%, onde foi pipetado 800 $\mu$ L do sobrenadante, transferido para um tubo de 1,5 mL e adicionados 480 $\mu$ L de água. Sendo assim, foi necessário adicionar clorofórmio (1 volume), então pipetou-se 600 $\mu$ L desse extrato bruto transferiu-se para outro tubo de 1,5mL e, imediatamente, adicionou-se 600 $\mu$ L de clorofórmio. Esses materiais foram levados à centrífuga por 2 minutos a 5000 g e, logo após, 200 $\mu$ L da fase polar (fase superior) foram transferidos para tubos de 600 $\mu$ L, que foram levados ao resfriador e deixados a -80°C até o momento da diluição e das análises.

### 3.3 Diluições

Para preparar o material para a injeção, foi feita uma diluição de 1:10 nas amostras, tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Para isso, foram pipetados 60µL do extrato final proveniente da extração, transferidos para tubos de 600µL e adicionados 540µL de água ultrapura em cada uma das amostras. Em seguida, todas as amostras foram filtradas em filtros PVDF de 45µm e colocadas nos *vials* (300µL), para assim serem analisadas no cromatógrafo líquido.

### 3.4 Sistema cromatográfico

As análises foram feitas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), em equipamento HPLC Shimadzu série 20, composto por injetor automático SIL 20A HT, duas bombas LC-20AD, degaseificador DGU-20A3, forno de colunas CTO-20A, Detector de Arranjo de Diodos (DAD) SPD-M20A e sistema de processamento de dados *LC Solutions*. Foram realizados testes com fases móveis diferentes até que chegasse na conclusão do melhor método. Seguem as tentativas:

1. O primeiro teste, proposto no trabalho de NEILSON, 2011, foi realizado com coluna cromatográfica C18 Shimadzu Shim-pack VP-ODS 150 x 4.6 mm, 4.6µm, P<sub>máx</sub>: 183 bar, e fase móvel composta por Acetonitrila Sigma grau HPLC  $\geq 99,9\%$ , que foi sonicada por trinta minutos antes de ser usada. A corrida foi de vinte minutos e realizada em gradiente: 5 minutos com 80% de MeCN e 20% água ultrapura; 5 aos 15 minutos com 20% de MeCN e 80% água ultrapura e, por fim, a partir dos 15 minutos com 80% de MeCN e 20% água ultrapura. O fluxo foi de 1mL/min, volumes de injeções de 20µL da amostra e do padrão, forno de coluna em temperatura de 35°C e comprimento de onda de 214 nm.

Para os outros testes foi usada a coluna C18 Supelco Ascentis® Express 15cm x 2.1mm, 2µm, P<sub>máx</sub>: 400 bar.

1. A segunda tentativa seguiu o protocolo proposto por MADRERA, 2021. Foi preparado 1 litro de fase móvel, composta por 25% Metanol Li Chrosolv®/Supelco grau HPLC  $\geq 99,8\%$  e 75% água ultrapura Milli-Q, que também foi sonicada por trinta minutos antes de ser inserida no equipamento. A corrida foi isocrática, com duração de vinte minutos, fluxo de 0,200 mL/min, temperatura do forno de 35°C, volumes de injeções de 20µL da amostra e também do padrão e comprimento de onda de 214 nm.
2. O terceiro ensaio foi realizado utilizando uma fase móvel de Metanol Li Chrosolv®/Supelco grau HPLC  $\geq 99,8\%$ , com corridas isocráticas e duração de vinte e cinco minutos, onde foi aplicada a proporção 15:85 metanol/água ultrapura. O fluxo

foi de 0,200 mL/min, temperatura do forno de 35°C, volumes de injeções de 20µL da amostra e 2µL do padrão e comprimento de onda de 214 nm.

Todos os testes foram realizados utilizando as duas bombas do equipamento. O branco foi composto por água ultrapura Milli-Q, injetado sempre antes e depois das análises. O padrão usado foi Prunasina SIGMA SMB00173 - 1MG, diluído, inicialmente, em 1000ppm, sendo 1 mg de material para 1 mL de água ultrapura. Para injeção no equipamento, foi feita uma diluição para 25ppm.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Cultivos *in vivo* e *in vitro*

Como dito na metodologia, a espécie *Eucalyptus viminalis* foi cultivada *in vivo*. Desde que foi transferida do meio de cultura para o substrato, a planta apresentou crescimento adequado, disponibilizando boa quantidade de material vegetal para análise. Isso pode ser explicado pela boa adaptação à câmara de crescimento e pela adubação com a solução nutritiva disponível no laboratório. A Tabela 10 apresenta a composição da solução nutritiva utilizada. Essa solução de uso é obtida através da mistura de partes iguais das soluções dos tanques A e B, e posterior diluição até que a quantidade de nutrientes dissolvidos, medida através da condutividade elétrica (EC), esteja entre 1,5 e 2  $\text{Sm}^{-1}$ . Essa condutividade é responsável por determinar a quantidade de íons na solução, que interferem diretamente no metabolismo das plantas.

Tabela 10 - Composição da solução nutritiva.

	Fertilizante	Quantidade para cada 500 litros de água	Unidade
Tanque A	MAP	8	kg
	Cloreto de potássio	20	kg
	Sulfato de magnésio	15	kg
	Ácido bórico	150	g
	Sulfato de manganês	200	g
	Sulfato de cobre	12	g
	Sulfato de zinco	14	g
	Ferrilene	300	g
	Molibdato de sódio	1,4	g
Tanque B	Nitrato de cálcio	18	kg
	Cloreto de cálcio	3,5	kg

Fonte: Laboratório Central de Biologia Molecular, UFLA (2023).

Ao analisar o cultivo do eucalipto *in vitro*, o período de germinação no meio MS foi adequado, porém, no estágio de multiplicação, notou-se que este meio não estava sendo

favorável para o desenvolvimento das plantas, então o meio JADS foi implementado e apresentou melhora significativa. Essa melhoria pode ser justificada por algumas diferenças no meio JADS, como o aumento da quantidade de micronutrientes, vitaminas e ferro.

Além disso, o cloreto de cálcio foi trocado pelo nitrato de cálcio, o que pode ter favorecido a disponibilidade de cálcio para as plantas, que é um dos elementos mais importantes no sistema intracelular, pois permanece na forma iônica quando dentro da célula, atuando no metabolismo secundário de todas as células. Ele desempenha diferentes funções nos tecidos vegetais, como a proteção de membranas e paredes celulares e na sinalização de resposta às condições de estresse biótico ou abióticos (YAMAMOTO, 2011).

Outra mudança é a troca do hormônio ANA pelo AIA. Existem alguns tipos de auxinas naturais produzidas pela própria planta, a principal delas é o AIA (ácido-indolil-acético), que é produzido no ápice caulinar, em folhas jovens e em sementes em desenvolvimento, favorecendo o crescimento do caule e de raízes adventícias (DUTRA, 2020 apud Lopes & Rosso, 2010).

Na etapa da extração desses materiais vegetais (*in vivo* e *in vitro*), foi feito o banho ultrassônico, proposto por MADRERA, 2021, que afirma que a extração assistida por ultrassom (UAE) é uma alternativa verde cada vez mais empregada para a recuperação de biomoléculas em material vegetal. As ondas ultrassônicas geram pressão e cavitação, causando a ruptura das células vegetais, o que facilita a extração das moléculas de interesse, nesse caso, a prunasina.

#### **4.2 Análises cromatográficas**

Após os processos de extração e diluição, como apresentado na metodologia, as amostras estavam adequadas para as análises, que foram feitas em diferentes condições cromatográficas. Para decidir a fase móvel que resultasse nos melhores cromatogramas, todos os testes foram estudados. Em todos os ensaios, a análise do padrão apresentou em seu cromatograma mais de um pico. Como sua pureza é de 90%, considerou-se que o pico de maior intensidade referia-se à prunasina. Além disso, é um padrão analítico muito caro, difícil de ser encontrado com grau de pureza  $\geq 99\%$  e é uma molécula instável.



Figura 24 - Especificação Prunasina SIGMA -SMB00173.

**SMB00173** ▶ Sigma-Aldrich

### Prunasin

★★★★★ (0) Write a review

≥90% (LC/MS-ELSD)

Sinônimo(s):  
D-Mandelonitrile β-D-glucoside

Empirical Formula (Hill Notation):  
C<sub>18</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>6</sub>

Número CAS:	99-18-3	Peso molecular:	295.29	Número EC:	202-738-0
Número MDL:	MFC000049232	ID de substância PubChem:	329824839	NACRES:	NA.25

SKU	Tamanho da embalagem	Disponibilidade	Preço	Quantidade
SMB00173-1MG	1 MG	Normalmente envia em 2 semanas.	R\$ 2.398,00	- + ⓘ

Request a Bulk Order Adicionar ao carrinho

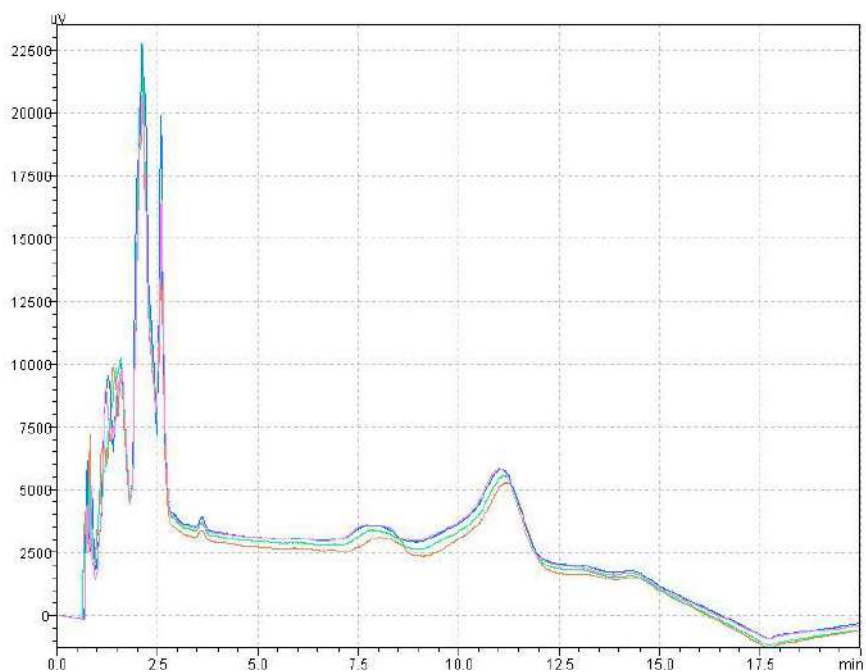
Fonte: Sigma-Aldrich/Merck (2023).

Como dito, o método escolhido para as análises foi a cromatografia líquida de alta eficiência, neste caso com coluna de fase reversa. Sabe-se que nessa técnica a separação das moléculas se dá pela interação de uma fase móvel polar com uma fase estacionária que tenha características apolares. Então, foram usadas colunas apolares (C18) e solventes com características polares e miscíveis em água, como é o caso da acetonitrila e do metanol.

Em relação ao detector, foi utilizado o de Arranjo de Diodos (DAD), que além de detectar extrativos de plantas, tem outras diversas aplicações, como determinação de compostos ativos e contaminantes em medicamentos, alimentos, amostras ambientais, química fina, entre outros.

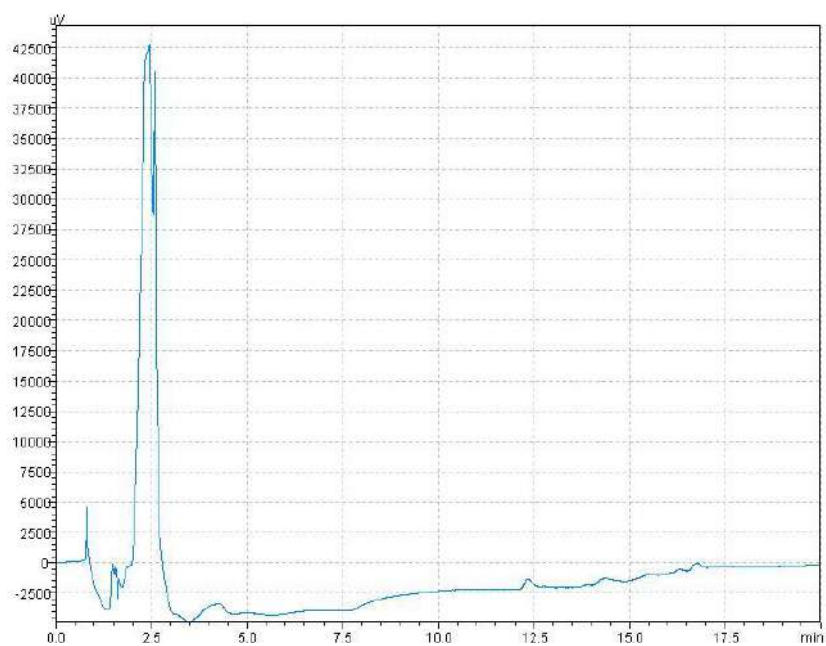
A primeira tentativa (NEILSON, 2011) com fase móvel composta por Acetonitrila 100% foi realizada somente em plantas *in vivo*, pois as cultivadas *in vitro* ainda não apresentavam quantidade suficiente de material foliar para extração. Os cromatogramas não apresentaram bons resultados (Figuras 25 e 26), com resolução ruim, co-eluição e linha de base insatisfatória. As análises apresentaram também ruídos, o que dificulta a determinação de parâmetros como o tempo e fator de retenção. O padrão de prunasina não foi bem separado, mostrando também co-eluição e irregularidade.

Figura 25 - Cromatograma das análises da espécie *Eucalyptus viminalis in vivo* (E1A: laranja; E1B: verde; E1C: azul; E1D: rosa), com fase móvel composta por Acetonitrila, eluição em gradiente, duração de vinte minutos e  $\lambda = 214$  nm.



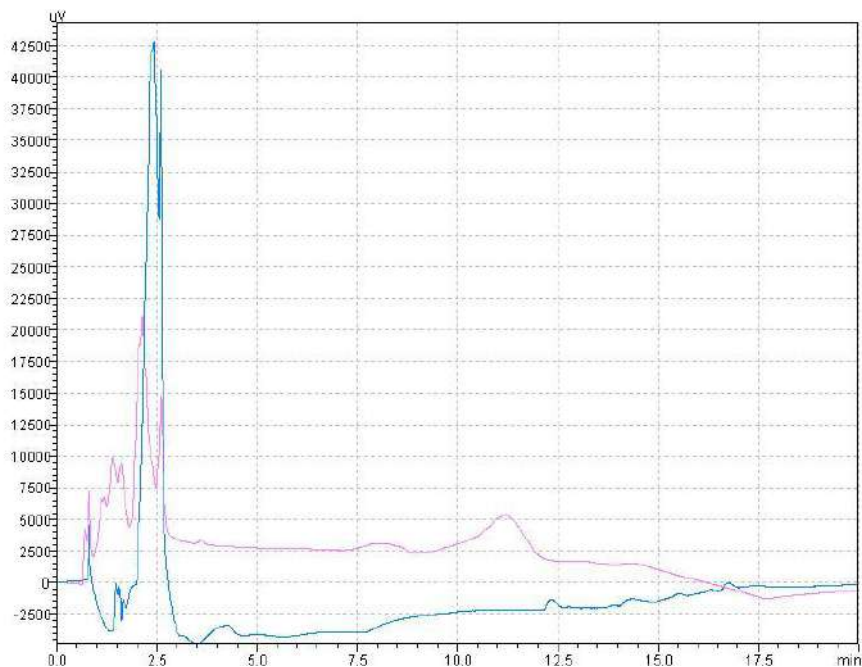
Fonte: Da Autora (2023).

Figura 26 - Cromatograma do padrão Prunasina. Fase móvel composta por Acetonitrila, eluição em gradiente, duração de vinte minutos e  $\lambda = 214$  nm.



Fonte: Da Autora (2023).

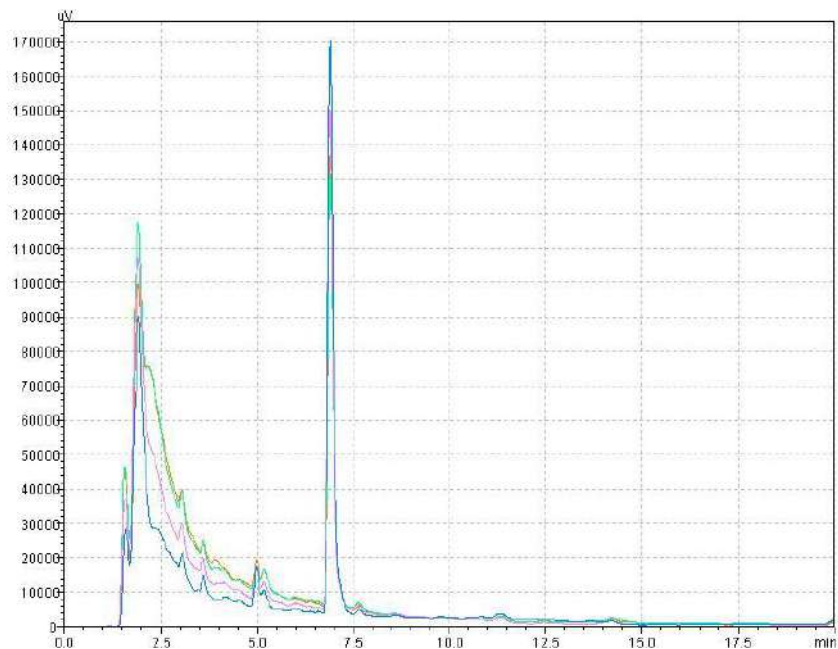
Figura 27 - Sobreposição dos cromatogramas de E1A (rosa) e prunasina 25ppm (azul). Fase móvel composta por Acetonitrila, eluição em gradiente, duração de vinte minutos e  $\lambda = 214$  nm.



Fonte: Da Autora (2023).

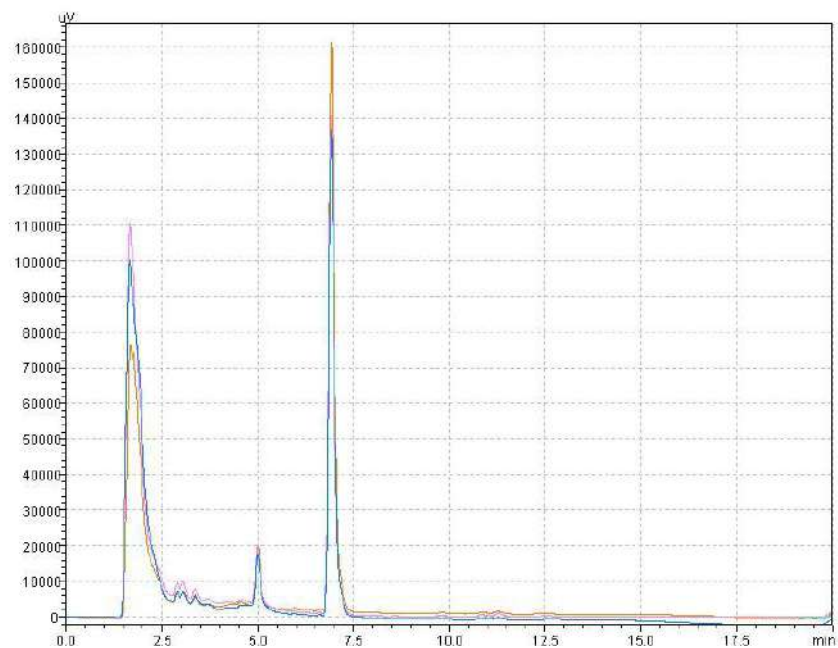
O segundo ensaio, feito com uma solução de fase móvel composta por 25% metanol 75% água ultrapura (MADRERA, 2021), mostrou um resultado melhor que o primeiro (Figuras 28, 29 e 30), porém ainda insatisfatório, apresentando co-eluição, impurezas e ruídos, principalmente no início da corrida das amostras de E1. Em relação ao padrão, o cromatograma também foi mais satisfatório, separando melhor os picos e deixando o da prunasina em maior evidência.

Figura 28 - Cromatograma das análises da espécie *Eucalyptus viminalis in vivo s* (E1A: azul; E1B: rosa; E1C: verde; E1D: laranja). Fase móvel com metanol 25%, eluição isocrática de vinte minutos e  $\lambda = 214$  nm.



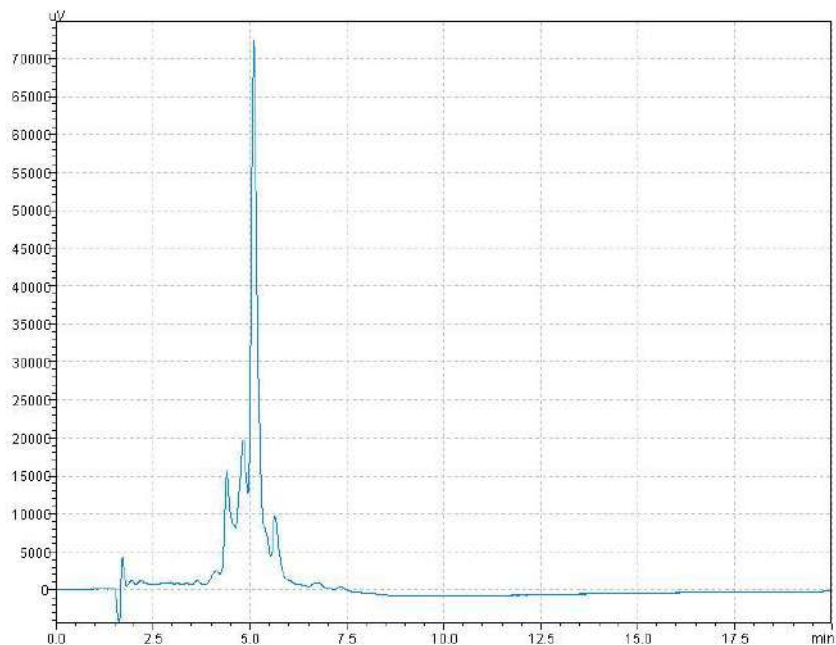
Fonte: Da Autora (2023).

Figura 29 - Cromatograma das análises da espécie *Eucalyptus occidentalis in vitro* (E2A: azul; E2B: rosa; E2C: verde; E2D: laranja). Fase móvel com metanol 25%, eluição isocrática de vinte minutos e  $\lambda = 214$  nm.



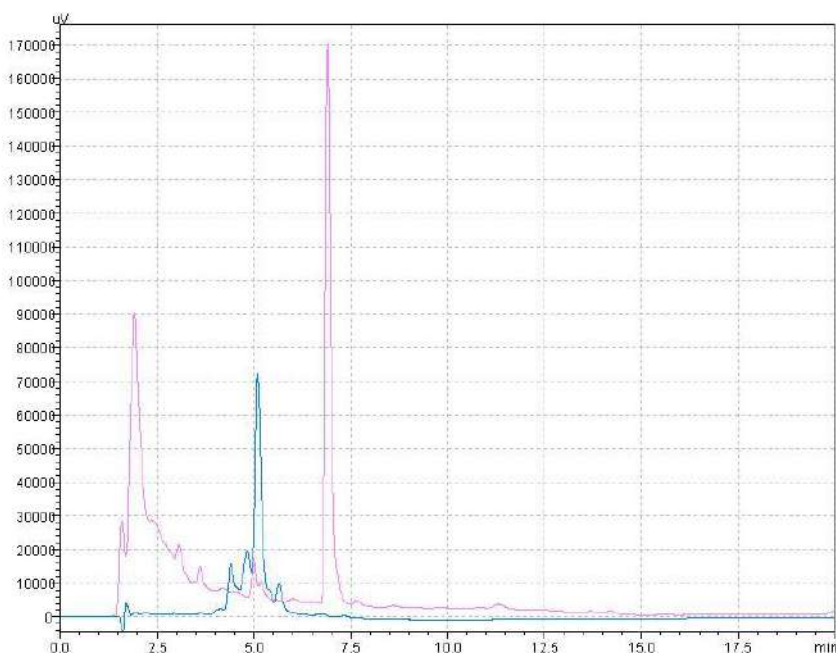
Fonte: Da Autora (2023).

Figura 30 - Cromatograma do padrão Prunasina. Fase móvel com metanol 25%, eluição isocrática de vinte minutos e  $\lambda = 214$  nm.



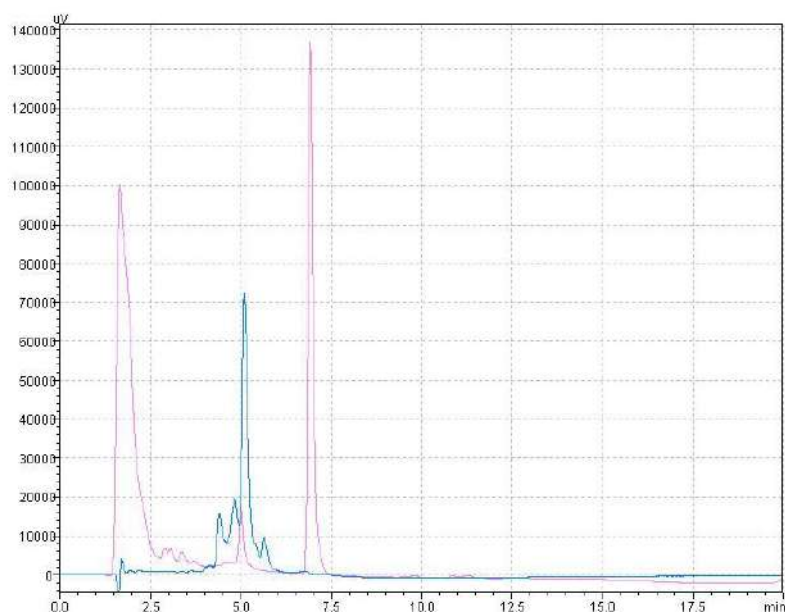
Fonte: Da Autora (2023).

Figura 31 - Sobreposição dos cromatogramas de E1A (rosa) e prunasina 25ppm (azul). Fase móvel com metanol 25%, eluição isocrática de vinte minutos e  $\lambda = 214$  nm.



Fonte: Da Autora (2023)

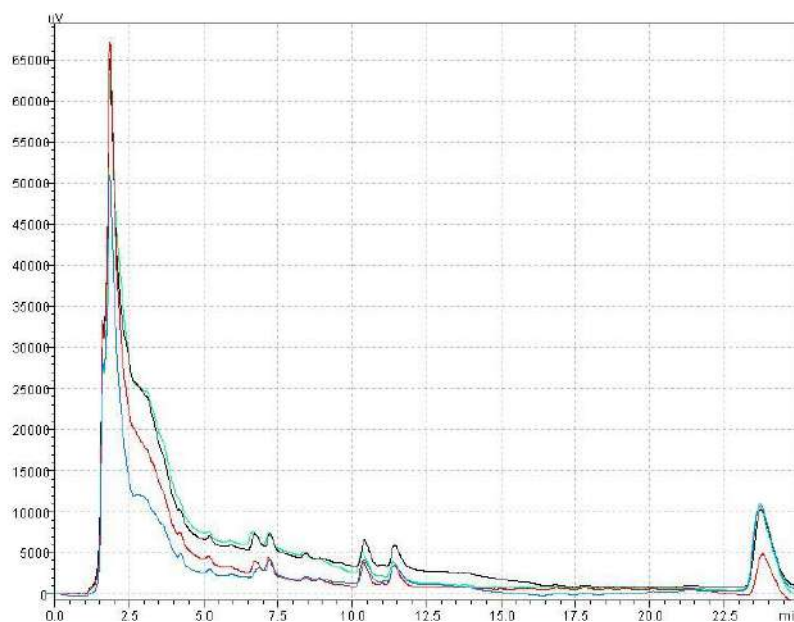
Figura 32 - Sobreposição dos cromatogramas de E2A (rosa) e prunasina 25ppm (azul). Fase móvel com metanol 25%, eluição isocrática de vinte minutos e  $\lambda = 214$  nm.



Fonte: Da Autora (2023).

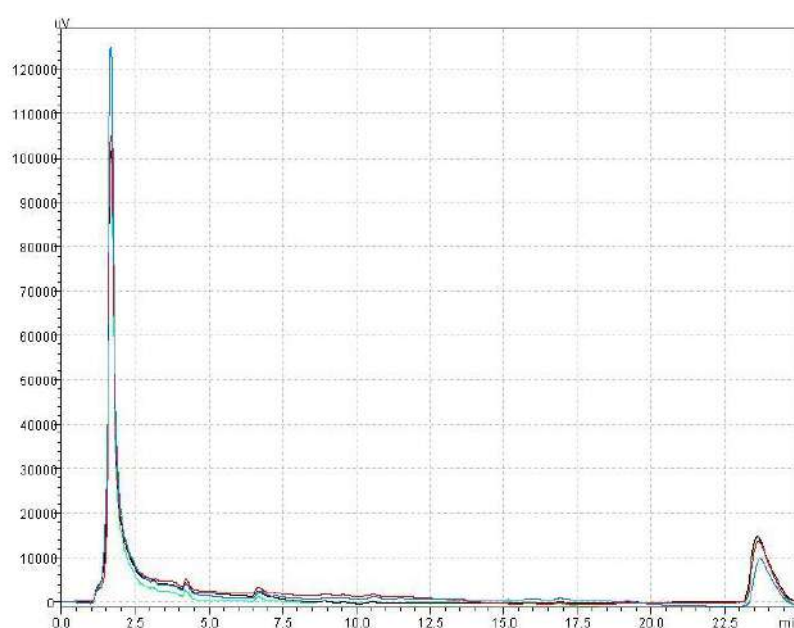
Já o terceiro teste, utilizando a proporção 15:85 Metanol 100%/Água ultrapura, obteve o maior sucesso, com picos mais bem definidos e separados (Figuras 33, 34 e 35). Houve diminuição nos ruídos e na co-eluição, apresentando um cromatograma mais “limpo”. Ao observar os cromatogramas do padrão nos dois primeiros testes, os picos estavam muito intensos, então o volume de injeção foi alterado de 20 $\mu$ L para 2 $\mu$ L para a realização do terceiro ensaio. Apesar dos resultados positivos dessa terceira condição cromatográfica, os cromatogramas das amostras E1 ainda apresentaram alguns ruídos e co-eluição. O pico do padrão apresentou o melhor resultado até então, com pouca co-eluição, contudo, a linha de base ficou desfavorável.

Figura 33 - Cromatograma das análises da espécie *Eucalyptus viminalis in vivo s* (E1A: azul; E1B: laranja; E1C: preto; E1D: rosa). Fase móvel com metanol 15%, eluição isocrática de vinte e cinco minutos e  $\lambda= 214$  nm.



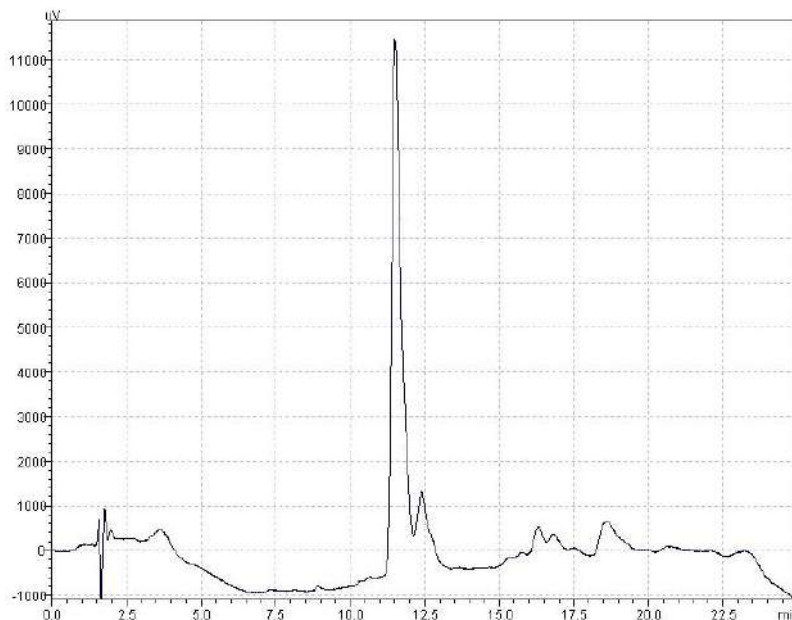
Fonte: Da Autora (2023).

Figura 34 - Cromatograma das análises da espécie *Eucalyptus occidentalis in vitro* (E2A: azul; E2B: rosa; E2C: preto; E2D: verde). Fase móvel com metanol 15%, eluição isocrática de vinte e cinco minutos e  $\lambda= 214$  nm.



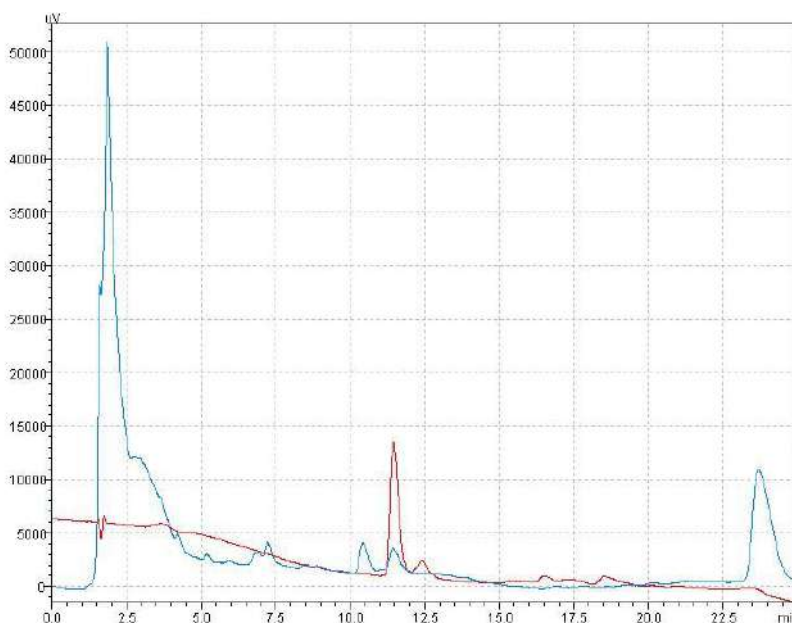
Fonte: Da Autora (2023).

Figura 35 - Figura: Cromatograma do padrão Prunasina. Fase móvel com metanol 15%, eluição isocrática de vinte e cinco minutos e  $\lambda = 214$  nm.



Fonte: Da Autora (2023).

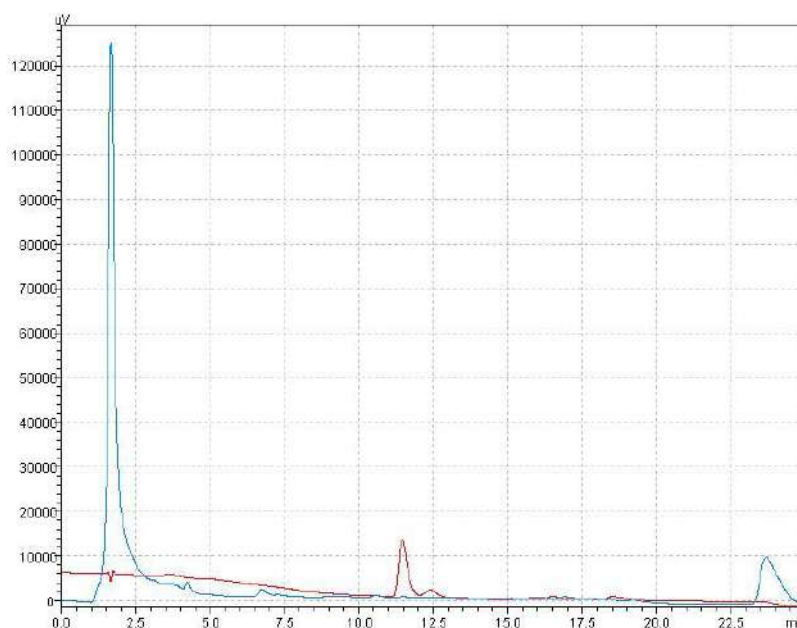
Figura 36 - Sobreposição dos cromatogramas de E1A (azul) e prunasina 25ppm (vermelho). Fase móvel com metanol 15%, eluição isocrática de vinte e cinco minutos e  $\lambda = 214$  nm.



Fonte: Da Autora (2023).



Figura 37 - Sobreposição dos cromatogramas de E2A (azul) e prunasina 25ppm (vermelho). Fase móvel com metanol 15%, eluição isocrática de vinte e cinco minutos e  $\lambda = 214$  nm.



Fonte: Da Autora (2023).

Neste trabalho, foi feito o estudo qualitativo dos diferentes cromatogramas, sob condições cromatográficas distintas, buscando o que apresentasse melhor resolução, analisando se as amostras permaneciam com os mesmos tempos de retenção em diferentes injeções, além de comparar o padrão com a amostra. A identificação de prunasina foi realizada comparando-se os tempos de retenção e os espectros UV-Vis das amostras com os do padrão, ambos em comprimento de onda de 214 nm.

Geralmente, em qualquer tipo de cromatografia líquida de alta eficiência, a fase móvel é de extrema importância, pois participa do processo de separação. Parâmetros importantes, tais como seletividade da separação, tempo de retenção e solubilidade apresentam alta sensibilidade com relação às mudanças de composição da fase móvel. Além da resolução, que também pode ser afetada pela fase móvel (ROSA, 2005).

O tempo de retenção refere-se a todo o tempo em que o analito permanece no sistema cromatográfico, desde a injeção até a saída do ponto máximo do pico. Esse tempo leva em consideração a interação do analito com a fase móvel e com a fase estacionária, bem como a força do solvente de eluição, ou seja, a capacidade do eluente de deslocar os solutos mais retidos na fase fixa para permitir sua detecção (GADELHA, 2014).

Em cromatografia de fase normal, a fase estacionária é polar e a fase móvel apolar, onde os analitos polares ficam retidos mais tempo na coluna enquanto os analitos com menor

polaridade têm mais afinidade pela fase móvel e são eluídos mais rapidamente da coluna cromatográfica. Já em fase reversa, a fase móvel é polar e a fase estacionária, apolar, sendo os compostos menos polares, os mais retidos na coluna (SILVA, 2016). Então, em cromatografia com coluna de fase reversa, como é o caso deste estudo, o solvente fraco é o mais polar e o solvente forte é o menos polar (COLLINS, 2006). Portanto, o solvente fraco possui mais afinidade pelo analito mais polar, desencadeando maior interação, podendo arrastá-lo mais rapidamente durante a corrida; já o solvente forte possui baixa afinidade pelo analito mais polar, demorando mais tempo para arrastá-lo (GADELHA, 2014).

Um dos fatores que determina esse “arraste” do analito pela fase móvel, é a força eluente do solvente. Cada solvente apresenta um fator de eluição que, automaticamente, se relaciona com o tempo de retenção. Analisando a Figura 38 nota-se que a acetonitrila possui uma força eluente de  $0,52\epsilon^\circ$  e o metanol aparece com o valor de  $0,70\epsilon^\circ$ . Considerando a cromatografia em fase normal, o metanol seria o solvente mais forte, porém, como foi em fase reversa, a acetonitrila é um eluente mais forte que o metanol, com alta afinidade pelo analito, que tem caráter polar. Já o metanol é um eluente mais fraco, com baixa afinidade pela prunasina, mostrando que solventes fortes diminuem a retenção e solventes fracos aumentam a retenção.

Figura 38 - Valores de força eluente e corte no UV de solventes em cromatografia de fase normal.

SOLVENTE	FORÇA ELUENTE ( $\epsilon^\circ$ )	CORTE NO UV (nm)
Pentano	0,00	190
Hexano	0,01	195
Heptano	0,01	200
Triclorotrifluoroetano	0,02	231
Tolueno	0,22	284
Clorofórmio	0,26	245
Diclorometano	0,30	233
Éter dietílico	0,43	215
Acetato de etila	0,48	256
Metil t-butil éter	0,48	210
Dioxano	0,51	215
Acetonitrila	0,52	190
Acetona	0,53	330
Tetraidrofurano	0,53	212
2-propanol	0,60	205
Metanol	0,70	205



Fonte: CROMVALLAB (2021).

Esse fato pode ser comprovado observando os cromatogramas do primeiro teste, utilizando a fase móvel de acetonitrila, onde é possível perceber que os picos se concentraram no começo da corrida, com muita coeluição provocando a diminuição do tempo de retenção. Assim, optou-se por continuar as análises utilizando fase móvel contendo metanol, pois os cromatogramas apresentaram picos melhores e com linha de base mais estável.

Ao comparar os dois testes com fases móveis compostas por metanol, notou-se que o aumento de metanol é capaz de reduzir o tempo de retenção, que foi 11.4 minutos em proporção 15:85 metanol/água ultrapura e 5.1 minutos utilizando a fase móvel composta por metanol 25%. Isso justifica-se pelo fato de que quanto maior a disponibilidade de moléculas de metanol na fase móvel, maior é a interação deste eluente com a prunasina, eluindo mais rápido pela coluna.

A água, em cromatografia de fase reversa, possui uma força eluente menor que a do metanol, mostrando que o aumento da quantidade de água na composição da fase móvel, diminui a força eluente, aumentando o tempo de retenção.

Além disso, ao diminuir a quantidade de metanol na composição da fase móvel, os picos se separaram melhor, mostrando que a diminuição da força eluente favorece o aumento do fator de retenção ( $k$ ), permitindo aumentar a resolução entre os picos ( $R_s$ ).

Outro fator importante da melhoria da resolução dos cromatogramas das análises com metanol foi a troca da coluna C18 Shimadzu Shim-pack VP-ODS 150 x 4.6 mm, 4.6 $\mu$ m, usada nas análises com acetonitrila, para a coluna C18 Supelco Ascentis® Express 15cm x 2.1mm, 2 $\mu$ m. A principal diferença está no diâmetro interno e tamanho das partículas que compõem cada uma dessas fases estacionárias, o que tem grande influência na resolução cromatográfica.

Não há dúvida de que a diminuição no tamanho das partículas ocasiona uma melhora na eficiência do sistema (LANÇAS, 2011). Essa diminuição no diâmetro das partículas da fase estacionária tem como consequência o aumento da superfície disponível para contato entre fase estacionária e analito, aumentando o número de pratos teóricos e fornecendo picos mais intensos e estreitos.

Um parâmetro não alterado durante as análises foi a temperatura, o que pode ter sido uma falha do trabalho. De acordo com LANÇAS, 2012, em temperaturas mais elevadas, a viscosidade é reduzida e a velocidade de difusão aumenta, fazendo com que a velocidade de transferência de massa entre a fase estacionária e a fase móvel seja aumentada e com ela a eficiência, tornando possível diminuir substancialmente o tempo de análise.

Porém, ainda de acordo com LANÇAS, 2012, o efeito da temperatura na retenção é pequeno quando comparado com um aumento na força do solvente de eluição, o que foi justificado pela alteração em outros parâmetros, como coluna, fluxo e fases móveis, e não na temperatura.

### 4.3 Avaliação dos parâmetros cromatográficos

Para melhor avaliação dos métodos, foram calculados alguns parâmetros cromatográficos importantes, como a resolução, número de pratos teóricos, fator de retenção e fator de separação. Foram selecionados dois picos mais próximos de cada cromatograma. O tempo morto foi identificado de acordo com as características dos picos de cada cromatograma. Os cálculos obtidos foram os seguintes:

- Resolução (Rs):

$$Rs = 2 \left( \frac{t_{R2} - t_{R1}}{W_{b1} + W_{b2}} \right)$$

- Número de pratos teóricos (N):

$$N = \left( \frac{t_R}{w_b} \right)^2 \times 16$$

- Fator de retenção (k):

$$k = \frac{t_r - t_m}{t_m}$$

- Fator de separação ( $\alpha$ ):

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1}$$

Para o primeiro teste, realizado com fase móvel composta por acetonitrila e somente em amostras de eucalipto cultivadas *in vivo* foram obtidos os seguintes resultados:

$t_{R1}$  = 2,14 minutos

$t_{R2}$  = 2,6 minutos

$w_{b1}$  = 0,66 minutos

$$wb_2 = 0,34 \text{ minutos}$$

$$tm = 0,36 \text{ minutos}$$

$$Rs = 2(2,6 - 2,14) / (0,66 + 0,34) = 2,87$$

$$N = (2,14 / 0,66)^2 \times 16 = 167,9$$

Para calcular o fator de separação, são necessários fatores de separação de dois picos, que assim então, foram calculados:

$$k_1 = tR_1 - tm / tm$$

$$k_2 = tR_2 - tm / tm$$

$$k_1 = 2,14 - 0,65 / 0,65$$

$$k_2 = 2,6 - 0,65 / 0,65$$

$$k_1 = 2,29$$

$$k_2 = 3$$

$$\alpha = k_2 / k_1$$

$$\alpha = 3 / 2,29$$

$$\alpha = 1,31$$

No segundo teste, composto por fase móvel de metanol 25% e realizados em amostras tanto *in vivo* quanto *in vitro*, foram obtidos os seguintes valores:

- Amostras *in vivo*, *Eucalyptus viminalis* (E1)

$$tR_1 = 6,9 \text{ minutos}$$

$$tr_2 = 7,65 \text{ minutos}$$

$$wb_1 = 0,8 \text{ minutos}$$

$$wb_2 = 0,6 \text{ minutos}$$

$$tm = 1 \text{ minuto}$$

$$Rs = 2(7,65 - 6,9) / (0,8 + 0,6) = 1,06$$

$$N = (6,9 / 0,8)^2 \times 16 = 1188,87$$

$$k_1 = tR_1 - tm / tm$$

$$k_2 = tR_2 - tm / tm$$

$$k_1 = 6,9 - 1 / 1$$

$$k_2 = 7,65 - 1 / 1$$

$$k_1 = 5,9$$

$$k_2 = 6,65$$

$$\alpha = k_2 / k_1$$

$$\alpha = 6,65 / 5,9$$

$$\alpha = 1,12$$

- Amostras *in vitro*, *Eucalyptus occidentalis* (E2)

$$tR_1 = 5 \text{ minutos}$$

$$tr_2 = 6,9 \text{ minutos}$$

$$wb_1 = 0,3 \text{ minutos}$$

$$wb_2 = 0,6 \text{ minutos}$$

$$tm = 1 \text{ minuto}$$

$$Rs = 2(6,9 - 5) / (0,3 + 0,6) = 4,1$$

$$N = (5/0,3)^2 \times 16 = 4440,88$$

$$k_1 = tR_1 - tm / tm$$

$$k_2 = tR_2 - tm / tm$$

$$k_1 = 5 - 1/1$$

$$k_2 = 6,9 - 1/1$$

$$k_1 = 4$$

$$k_2 = 5,9$$

$$\alpha = k_2/k_1$$

$$\alpha = 5,9/4$$

$$\alpha = 1,47$$

Por último, seguem os resultados dos parâmetros cromatográficos das análises composta por fase móvel 15:85 metanol/água ultrapura, que também foram realizadas *in vivo* e *in vitro*:

- Amostras *in vivo*, *Eucalyptus viminalis* (E1)

$$tR_1 = 10,42 \text{ minutos}$$

$$tr_2 = 11,45 \text{ minutos}$$

$$wb_1 = 0,7 \text{ minutos}$$

$$wb_2 = 0,75 \text{ minutos}$$

$$tm = 1 \text{ minuto}$$

$$Rs = 2(11,45 - 10,42) / (0,7 + 0,75) = 1,42$$

$$N = (10,42/0,7)^2 \times 16 = 3542,63$$

$$k_1 = tR_1 - tm / tm$$

$$k_2 = tR_2 - tm / tm$$

$$k_1 = 10,42 - 1/1$$

$$k_2 = 11,45 - 1/1$$

$$k_1 = 9,42$$

$$k_2 = 10,45$$

$$\alpha = k_2/k_1$$

$$\alpha = 10,45/9,42$$

$$\alpha = 1,10$$

- Amostras *in vitro*, *Eucalyptus occidentalis* (E2)

$$tR_1 = 6,7 \text{ minutos}$$

$$tr_2 = 7,25 \text{ minutos}$$

$$wb_1 = 0,6 \text{ minutos}$$

$$w_{b2} = 0,3 \text{ minutos}$$

$$t_m = 1 \text{ minuto}$$

$$R_s = 2(7,25 - 6,7) / (0,6 + 0,3) = 1,22$$

$$N = (6,7/0,6)^2 \times 16 = 1992,72$$

$$k_1 = t_{R1} - t_m / t_m$$

$$k_2 = t_{R2} - t_m / t_m$$

$$k_1 = 6,7 - 1/1$$

$$k_2 = 7,25 - 1/1$$

$$k_1 = 5,7$$

$$k_2 = 6,25$$

$$\alpha = k_2/k_1$$

$$\alpha = 6,25/5,7$$

$$\alpha = 1,09$$

Relacionando todos esses valores, obteve-se o seguinte:

Tabela 11 - Valores dos parâmetros cromatográficos das diferentes fases móveis e amostras.

Parâmetros x Fase móvel e amostra	Resolução (Rs)	Pratos teóricos (N)	Fator de retenção (k1)	Fator de retenção (k2)	Fator de separação ( $\alpha$ )
Acetonitrila/E1	2,87	167,9	2,29	3	1,31
Metanol 25%/E1	1,06	1188,87	5,9	6,65	1,12
Metanol 25%/E2	4,1	4440,88	4	5,9	1,47
15:85 Metanol/água/E1	1,42	3542,63	9,42	10,45	1,10
15:85 Metanol/água/E2	1,22	1992,72	5,7	6,25	1,09

Como este trabalho não é a validação de um método, foi feita a análise somente de alguns parâmetros importantes para estudo de protocolos cromatográficos, comparando-os a valores “ideais”. Para a resolução, as referências são valores próximos a 1,5; para o fator de retenção, é indicado estar entre 2 e 6 e para o fator de separação, entre 1,05 e 1,20 (LANÇAS,

2016). Já no número de pratos teóricos, não existe um valor ideal, porém, quanto maior, mais estreito e alto é o pico.

A começar pela resolução, o terceiro teste foi o que apresentou o melhor resultado, com valores próximos a 1,5, confirmando o que foi dito diante das análises dos cromatogramas. A resolução é capaz de determinar o grau de separação entre dois picos adjacentes. Valores não ideais desse parâmetro nas outras análises podem ser notados observando os picos assimétricos em seus cromatogramas, o que comprometeu a resolução e levou a uma baixa reprodutibilidade nos tempos de retenção e nas áreas dos picos (BORGES, 2012).

Já em relação ao número de pratos teóricos, o que apresentou maior valor foi a análise de E2, composta por fase móvel metanol 25% (Figura 29), o que pode ser justificado pelos picos que foram usados como referência, visto que se mostraram bastante estreitos e intensos.

Considerando os dois picos analisados para calcular o fator de retenção, os cálculos mostraram que os únicos cromatogramas que apresentaram valores dentro da faixa ideal foram os analisados com fases móveis de acetonitrila e metanol 25%. Nas análises de E1 com o eluente 15:85 metanol/água, foi notado o maior valor de fator de retenção, justificando a relação diretamente proporcional entre os valores de fator de retenção e tempo de retenção.

Por fim, os valores mais satisfatórios de fator de separação foram as análises feitas com fase móvel composta por metanol/água ultrapura, em proporção 15:85. Esse fato é confirmado pelos cromatogramas, que apresentaram picos bem separados.

#### **4.4 Identificação de prunasina**

Em relação à presença ou não de prunasina nas amostras, não é possível compará-las ou justificar o motivo de apresentarem ou não o glicosídeo cianogênico, visto que foram cultivadas sob condições diferentes, *in vivo* e *in vitro*. No entanto, nas análises com fase móvel composta por acetonitrila e por metanol 25% é impossível afirmar com certeza a presença de prunasina, devido à irregularidade dos picos. Já no cromatograma resultante da análise com fase móvel de 15:85 metanol/água ultrapura, é possível identificar a presença de prunasina em eucalipto da espécie *Eucalyptus viminalis*, cultivado *in vivo* (Figura 36).

Isso pode ter acontecido devido ao fato de que plantas mais “velhas” têm mais tendência à presença de glicosídeos cianogênicos, sabendo-se que a síntese desses extrativos, segundo MADRERA, 2021, uma vez iniciada, sua concentração foliar em cada planta individual aumenta com o tempo.



Segundo o trabalho de NEILSON, 2011, diferenças quantitativas e qualitativas no conteúdo total de glicosídeos cianogênicos foram observadas em diferentes estágios da planta inteira e ontogenia do tecido, bem como dentro de diferentes tipos de tecido. Uma vez iniciada, a concentração total de glicosídeo cianogênico aumentou ao longo da ontogenia da planta com a produção de glicosídeo cianogênico iniciada em mudas e atingindo um máximo em botões florais de árvores adultas. Provavelmente, nas plantas *in vitro*, a síntese de prunasina não tenha iniciado, por serem plantas jovens (aproximadamente 281 dias após a semeadura).

Em paralelo, a pesquisa de (MADRERA, 2021) prova que variações quantitativas e qualitativas na abundância de glicosídeos cianogênicos totais foram observadas ao longo de diferentes estágios ontogenéticos em *Eucalyptus camphora*. Em particular, o início da biossíntese de glicosídeos cianogênicos foi altamente variável com indivíduos “ligando” a biossíntese de prunasina pela primeira vez entre 115 e 339 dias após a semeadura.

## 5. CONCLUSÃO

Levando em consideração os resultados apresentados e discutidos, dos três diferentes protocolos de análises para identificação de prunasina em amostras de folhas de eucalipto, o terceiro teste, composto por uma fase móvel de Metanol Li Chrosolv®/Supelco grau HPLC  $\geq$  99,8%, com corridas isocráticas e duração de vinte e cinco minutos, com uma proporção 15:85 metanol/água ultrapura, foi o que apresentou os melhores cromatogramas e valores dos parâmetros cromatográficos analisados. No entanto, não foi possível afirmar que este está perfeito para uso, pois é necessária a validação do método e cálculo de todos os outros parâmetros.

Foi possível visualizar comportamentos diferentes do padrão e das amostras com a utilização de condições cromatográficas distintas e, apesar de não ser possível justificar a presença ou não de prunasina nas plantas, foi detectado o glicosídeo cianogênico nas amostras *in vivo*. Então, ainda que sejam necessários mais estudos para o aperfeiçoamento do método na identificação de prunasina e serem utilizadas plantas sob as mesmas condições de cultivo para, assim, compará-las, o trabalho foi importante para futuras análises e pesquisas envolvendo glicosídeos cianogênicos, em especial a prunasina. Seu potencial na defesa química de vegetais é comprovado e este pode ter sido este o primeiro passo de um grande avanço químico e econômico.

## REFERÊNCIAS

- BARBOSA, Leonardo Rodrigues et al. **Pragas de eucaliptos**. Brasília, DF: Embrapa, cap. 19., 2021.
- BORGES, Endler Marcel; et al. **O desafio de analisar solutos básicos por cromatografia líquida em modo reverso: algumas alternativas para melhorar as separações**. Química Nova, v. 35, p. 993-1003, 2012.
- BORGES, Endler Marcel; et al. **Possibilidades e limitações no uso da temperatura em cromatografia líquida de fase reversa**. Química Nova, v. 33, p. 945-953, 2010.
- BORTALIEIRO, Claudio. **Fundamentos de cromatografia líquida de alto desempenho: os Avanços e Inovações**. Desenvolvendo uma ciência melhor, Agilent e você. COSIMP, 2016.
- CALDAS, S. S. **Otimização e validação de métodos empregando DLLME, SPE, HPLC-DAD e LC-ESI-MS/MS para determinação de agrotóxicos em água subterrânea**. Tese de Doutorado. FURG, Rio Grande, 2009.
- COLLINS, Carol H. et al. **Fundamentos de cromatografia**. Editora da UNICAMP, 2006.
- COLLINS, Carol H. et al. **Introdução a Métodos Cromatográficos**, 7. ed., 1997.
- COUTRIM, Maurício X. **Cromatografia. Princípios de Cromatografia**. 2016.
- CRESSEY, Peter; REEVE, John. **Metabolism of cyanogenic glycosides: A review**. Food and chemical toxicology, v. 125, 2019.
- DA ROCHA, Tiago André Marinho Caldeira. **Desenvolvimento e validação de um método de HPLC-DAD-FLD para a determinação de inibidores da enzima fosfodiesterase tipo-5 (PDE-5) em suplementos alimentares à base de plantas**. Faculdade de Farmácia. Universidade do porto, 2015.
- DE ABREU GADELHA, Julia et al. **Desenvolvimento de métodos cromatográficos qualitativos para identificação de benzodiazepínicos**. RevInter Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade, v. 7, n. 3, p. 25-49, 2014.
- DE CARVALHO, Agnaldo Donizete Ferreira. **Histórico do melhoramento genético de eucalipto no Brasil**. Programa de Pós-graduação em genética e Melhoramento de Plantas, Piracicaba, 2000.
- DE VECHI, Anderson; JÚNIOR, Carlos Alberto De Oliveira Magalhães. **Aspectos positivos e negativos da cultura do eucalipto e os efeitos ambientais do seu cultivo**. Revista Valore, v. 3, n. 1, p. 495-507, 2018.

DEUS, Gilcileia Inácio de et al. **Efeitos da temperatura de secagem nos teores de compostos cianogênicos totais e fibra alimentar de casca de maracujá.** Tese de mestrado. Universidade Federal de Goiás, 2011.

DUTRA, Maria de Fátima Batista et al. **Multiplicação *in vitro* de Palmas forrageiras *Opuntia stricta* e *Nopalea cochenillifera* para cultivo no semiárido do Rio Grande do Norte.** HOLOS, v. 7, p. 1-19, 2020.

FREITAS JUNIOR, Gerson de. **A história ambiental dos eucaliptos: Austrália, Brasil e Vale do Paraíba Paulista.** Universidade de Taubaté, 2014.

HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa.** 6.ed. Rio de Janeiro: LTC Editora, 876 p., 2003.

KONZEN, Raquel de Almeida. **Validação de parâmetros de mérito para quantificação de microcistina-LR por meio de cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a detector de arranjo de diodos.** Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2015.

LANÇAS, Fernando M. **Aumentando a eficiência das colunas de HPLC por meio da diminuição do diâmetro das partículas da fase estacionária: até onde.** Scientia Chromatographica, v. 3, n. 1, p. 17-23, 2011.

LANÇAS, Fernando M. **Cromatografia Líquida Clássica (coluna e planar).** Análise Instrumental II, 2016.

LANÇAS, Fernando M. **Efeitos de temperatura em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).** Scientia Chromatographica, v. 4, n. 1, p. 13-19, 2012.

MADRERA, Rodríguez Roberto; SUÁREZ VALLES, Belén. **Analysis of cyanogenic compounds derived from mandelonitrile by ultrasound-assisted extraction and high-performance liquid chromatography in *Rosaceae* and *Sambucus* families.** Molecules, v. 26, n. 24, p. 7563, 2021.

MARTINI, Augusto Jeronimo. **O plantador de eucaliptos: a questão da preservação florestal no Brasil e o resgate documental do legado de Edmundo Navarro de Andrade.** Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2004.

MATSUURA, F. C. A. U. **Estudo do albedo de maracujá e de seu aproveitamento em barra de cereais.** Tese de doutorado. Universidade Estadual de Campinas, 2005.

MENDES FILHO, José Maria de A.; SUITER-FILHO, Walter. **Combate à formiga na CAF.** Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais. Circular Técnica N<sup>o</sup>, v. 76, 1979.

MOLLER, Birger Lindberg. **Functional diversifications of cyanogenic glucosides**. Current opinion in plant biology, v. 13, n. 3, 2010.

NASCIMENTO, Elisabete Maria da Graça Costa et al. **Estudo dos Cianogênicos em Casca de Maracujá através de bioensaio e quantificação de amostras por processos térmicos diferentes**. Tese de doutorado. universidade federal Rural do Rio de Janeiro, 2016.

NEILSON, Elizabeth H. et al. **Phenylalanine derived cyanogenic diglucosides from Eucalyptus camphora and their abundances in relation to ontogeny and tissue type**. Phytochemistry, v. 72, n. 18, p. 2325-2334, 2011.

PENTEADO JUNIOR, J. F. et al. **Transferência de tecnologia florestal: cultivo de eucalipto em propriedades rurais: diversificação da produção e renda**. Embrapa Florestas, 2014

PEREIRA, I. S. **Incompatibilidade de enxertia em *Prunus*, alterações fenotípicas, bioquímicas e gênicas**. Tese de Doutorado. (Doutorado em Fruticultura de Clima Temperado) - Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2012.

PORTO, Helena Sofia Morgado. **HPLC versus UPLC: avaliação de aspectos críticos à transferência e validação de métodos analíticos**. Tese de Doutorado. Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, 2014.

ROSA, Paulo César Pires. **Estudo da separação cromatográfica dos enantiômeros do omeprazol em fase estacionária quiral kromasil CHI-TBB (O, O'-BIS [4-TERC-BUTILBENZOIL]-N, N'-DIALIL-L-TARTADIAMIDA)**. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, 2005.

SANTANA, DL de Q.; COUTO, Laércio. **Resistência intra-específica de eucaliptos a formigas-cortadeiras**. Boletim de Pesquisa Florestal, Colombo, n. 20, p. 13-21, 1990.

SEM AUTOR. **Embrapa. O eucalipto**. Embrapa Florestas, 2019. Disponível em <<https://www.embrapa.br/florestas/transferencia-de-tecnologia/eucalipto>> Acesso em Dez/2022.

SEM AUTOR. **Prunasin. Un mondo ecosostenibile dentro i codici della Natura**, 2023. Disponível em: <<https://antropocene.it/en/2023/01/29/prunasin/>>. Acesso em: Fev/2023.

SILVA, Ana Filipa Alves. **Validação de métodos analíticos para controle de qualidade de um medicamento, por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)**. Tese de Mestrado. Faculdade de Ciências e Tecnologia. Universidade Nova de Lisboa, 2016.

SKOOG, D. A.; Holler, F. J. Nieman, T. A.; **Princípios de Análise Instrumental**, Bookman: Porto Alegre, 2002.

VALENTE, A. L. P., et. al. **Conceitos básicos de cromatografia líquida de alta eficiência**. Chim. Ind, v. 27, p. 231, 1969.

VARGAS, Aline Garcias de; GRACIOLI, Bruna. **Síntese de 2-oxazolona a partir da reação dos cianocompostos acetonitrila e benzonitrila com um aminoálcool**. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2013.

VASCONCELOS, Paulo Alexandre Carmo Silva Fonseca. **O eucalipto: Nos debates parlamentares, na legislação, indústria e ecologia (séc. XIX-XX)**. Tese de mestrado. Faculdade de Letras. Universidade do Porto, 2021.

YAMAMOTO, Euriann Lopes Marques et al. **Função do cálcio na degradação da parede celular vegetal de frutos**. Revista verde de agroecologia e desenvolvimento sustentável, v. 6, n. 2, p. 6, 2011.