

VALDIR PERES

CROMATOGRAFIA DE FASE GASOSA E ESPECTROMETRIA DE MASSA PARA
ANALISE DE METABÓLITOS SECUNDARIOS EM FOLHAS DE CAFEIRO

Tese Apresentada à Universidade
Federal de Vicosa, como Parte das
Exigências do Curso de Agroquímica,
para Obtenção do Título de
"Magister Scientiae".

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
AGOSTO - 1990

A minha adorada esposa Cecília,
Aos meus filhos Luís Fernando, Cristiane e Flávia,
Ao meu pai Almério.

AGRADECIMENTOS

h Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Química, pela oportunidade oferecida para a realização deste Curso.

h Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

A Financiadora de Estudos e Projetos - FINEP, pelo financiamento dos equipamentos utilizados nas análises cromatográficas e espectrométricas.

h Secretaria de Estado da Educação de Minas Gerais, pela autorização concedida para a efetivação deste Curso.

Ao Professor João Sabino de Oliveira, pela orientação, pelo estímulo e pela amizade demonstrada em todos os momentos.

Aos Professores Gulab Newandram Jhan e Reginaldo da Silva

Romeiro, pelas valiosas críticas e sugestões.

Ao Ricardo Magela de Souza, pela colaboração, especialmente na realização dos bioensaios constantes deste trabalho.

Aos colegas do Curso de Agroquímica, pelo encorajamento, pela amizade e pelo agradável convívio, especialmente ao Agostinho Lelis Teixeira, Oscar Marino Mosquera Martínez e Vera Lúcia Gonçalves Lopes, companheiros da área de Produtos Naturais.

Aos funcionários do Laboratório de Cromatografia Gasosa e Espectrometria de Massa, Hamilton Oliveira Reis, Jorge Luis Martins Rezende e Mirtes Vieira, pela cooperação e constante disponibilidade durante as análises cromatográficas e espectrométricas, bem como pelas primeiras lições para o uso dos computadores.

Aos demais professores e funcionários do Departamento de Química e a todos que, de alguma maneira, contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

VALDIR PERES, filho de Almério Gonçalves Peres e Jovelina de Sousa Rosa. nasceu em Patos de Minas, Estado de Minas Gerais. no dia 24 de outubro de 1941.

Em marco de 1966, iniciou sua carreira no magistério público estadual. depois de ter sido aprovado em Concurso Público de Provas e Títulos para o Colégio Estadual de Patos de Minas, onde lecionou Química para as três séries do segundo grau.

Em dezembro de 1973, licenciou-se em Ciências Biológicas pela Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Patos de Minas, Instituição onde principiou suas atividades como Professor Universitário, lecionando Química Geral e Química Orgânica.

Em julho de 1976, concluiu o Curso de Especialização em Química pela Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais.

Em agosto de 1986, iniciou o Curso de Mestrado em Agroquímica na Universidade Federal de Vicosa, na linha de pesquisa de Produtos Naturais.

CONTEÚDO

	Página
LISTA DE QUADROS	ix
LISTA DE FIGURAS	xi
EXTRATO	xiv
INTRODUÇÃO GERAL	i
CAPITULO i	3
CROMATOGRAFIA DE FASE GASOSA DOS COMPONENTES DOS EXTRATOS METANÓLICOS DE FOLHAS DE CAFEEIRO	3
i. INTRODUÇÃO	3
2. MATERIAL E MÉTODOS	7
2.1. Obtenção dos Extratos de Folhas Novas e Velhas de Cafeeiro	7
2.2. Avaliação da Atividade Antimicrobiana dos Extratos.....	8
2.3. Cromatografia de Camada Fina (TLC) dos Extratos	9
2.4. Cromatografia de Fase Gasosa dos Extratos.....	10

	Página
2.5. Formação dos Derivados dos Extratos	11
2.6. Preparação dos Padrões Analíticos	12
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	14
3.1. Atividade Antimicrobiana dos Extratos	14
3.2. Cromatografia em Fase Gasosa	16
4. RESUMO E CONCLUSÕES	30
CAPÍTULO 2	32
IDENTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDARIOS EM FOLHAS DE CAFEIRO POR GC/MS	32
1. INTRODUÇÃO	32
2. MATERIAL E MÉTODOS	36
2.1. Análises por GC/MS	36
2.2. Preparação dos Padrões para Análise por GC/MS ..	37
2.3. Preparação dos Extratos de Folhas de Cafeeiro para Análise por GC/MS	38
2.4. Interpretação dos Espectros de Massa	38
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
3.1. Escolha dos Padrões	40
3.1.1. Espectrometria de Massa dos Padrões ...	41
3.1.2. Espectrometria de Massa dos Padrões De- rivatizados	45
3.2. Espectrometria de Massa dos Extratos de Folhas Novas e Velhas de Cafeeiro	47
3.3. Relação Extratos/Resistência	51

3.4. Determinação de Estruturas com Apoio do Sistema de Dados do Espectrômetro de Massa	56
3.5. Flavonóides e Cumarinas Fenólicas Derivatizadas	57
4. RESUMO E CONCLUSÕES	61
BIBLIOGRAFIA	64
APÊNDICES	73
APÊNDICE A	74
APÊNDICE B	80

LISTA DE QUADROS

		Página
CAPITULO 1		
1	Comparação dos Tempos de Retenção dos Cromatogramas dos TIC dos Extratos Derivatizados de Folhas Novas e Velhas de Cafeeiro.....	28
 CAPITULO 2		
+		
1	Tempos de Retenção , Ions [M]. e Padrão de Fragmentação de Fenóis, Obtidos em Coluna A.....	43
2	Espectros de Massa de 28 Compostos Fenólicos Derivatizados , Cromatografados em Coluna B	46
3	Espectros de Massa do Extrato Derivatizado de Folhas Novas de Cafeeiro.....	52
4	Espectros de Massa do Extrato Derivatizado de Folhas Velhas de Cafeeiro.....	53
5	Espectros de Massa dos Picos nos Tempos de Retenção de 37.21. min e 37,51 min, do Extrato de Folhas Velhas de Cafeeiro	54
6	Comparação do Pico de 37.21 min com Dados dos Quadros 2A, 3A e 4A.....	54

7	Comparação do Pico de 37,51 min com Dados dos Quadros 2A, 3A e 4A.....	55
8	Comparação dos Picos de 37,21 e 37.51 min com o Sistema de Dados do Espectrômetro de Massa.....	57

APÊNDICE A

1A	Padrões de Fenóis, Ordenados Segundo o Tempo de Retenção em Coluna Analítica de OV 17, 1%.....	75
2A	Dados de Espectros de Massa de Hidrocarbonetos....	76
3A	Dados de Espectros de Massa de Cetonas, Ésteres e Epóxidos.....	76
4A	Dados de Espectros de Massa de Aldeídos	77

LISTA DE FIGURAS

Página

CAPITULO 1

1	Bioautografia com Imielavioptis paradoxo em Cromatograma, Onde Foram Resolvidos os Extratos de Folhas Novas (N) e Velhas (V) de Cafeeiro.....	15
2	Cromatograma do Extrato Metanólico de Folhas Novas de Cafeeiro Derivatizado com BSA, Obtido em Coluna Analítica.....	17
3	Cromatograma do Extrato Metanólico de Folhas Velhas de Cafeeiro Derivatizado com BSA, Obtido em Coluna Analítica.....	18
4	Cromatograma de Mistura de Padrões de Fenóis Derivatizados com BSA, Obtido em Coluna Analítica....	19
5	Comparação do Cromatograma do Extrato de Folhas Novas com o Cromatograma da Mistura de Padrões de Fenóis.....	21
6	Comparação do Cromatograma do Extrato de Folhas Velhas com o Cromatograma da Mistura de Padrões de Fenóis.....	22
7	Comparação dos Cromatogramas do Extrato de Folhas Novas e Velhas de Cafeeiro	23

8	Cromatogramas Totais de Ions (TIC) do Extrato de Folhas Novas (A) e Velhas (B), Derivatizados com BSA.....	24
9	Cromatograma Total de Ions (TIC) da Mistura de Padrões Derivatizados com BSA.....	25
10	Comparação do TIC do Extrato de Folhas Novas de Cafeeiro com o TIC da Mistura de Padrões Derivatizados com BSA.....	26
11	Comparação do TIC do Extrato de Folhas Velhas de Cafeeiro com o TIC da Mistura de Padrões Derivatizados com BSA	27

CAPÍTULO 2

1	Espectros de Massa de Três Ácidos Fenólicos Isômeros, Cromatografados em Coluna A	44
2	Espectros de Massa de Fenóis Derivatizados, Cromatografados em Coluna B	48
3	Comparação dos Espectros de Massa dos Fenóis Não-Derivatizados com os Derivatizados, Cromatografados em Colunas A e B, Respektivamente.....	49
4	Cromatograma Total de Ions do Extrato Derivatizado de Folhas Novas de Cafeeiro.	50
5	(A) Cromatograma Total de Ions do Extrato Derivatizado de Folhas Velhas de Cafeeiro: (B) "Zoom" do Pico a 37.21 min	50
6	Espectros de Massa dos Compostos Referentes aos Tempos de Retenção de 37,21 e 37,51 min	53
7	Comparação entre Espectros Obtidos de Extratos de Folhas Novas e Velhas com o Sistema de Dados do Espectrômetro de Massa.....	58
8	Espectros de Possíveis Compostos Flavonóides e Cumarinas Fenólicas Derivatizadas, Obtidos do Extrato de Folhas Novas.....	59
9	Espectros de Possíveis Compostos Flavonóides e Cumarinas Fenólicas Derivatizadas, Obtidos do Extrato de Folhas Velhas	60

APÊNDICE A

1A	Esquema da Derivatização com N,O-bis (Trimetil - silyl)Acetamida (BSA).....	78
2A	Modelo de Fragmentação de um Composto Fenólico Derivatizado.....	78
3A	Rearranjo de McLafferty na Fragmentação de uma Olefina.....	81

APÊNDICE B

1B	Estruturas Orgânicas Menos Comuns Presentes em Folhas E Grãos de Café.....	84
----	---	----

EXTRATO

PERES, Valdir. M.S., Universidade Federal de Vicosa, agosto de 1990. Cromatografia de Fase Gasosa e Espectrometria de Massa para Análise de Metabólitos Secundários em Folhas de Cafeeiro. Professor Orientador: João Sabino de Oliveira. Professores Conselheiros: Reginaldo da Silva Romeiro e Nilton Carnieri.

Em face dos poucos conhecimentos existentes a respeito da identidade dos metabólitos secundários em folhas de cafeeiro, procurou-se estudar o assunto neste trabalho, com os objetivos de separar e identificar compostos fenólicos presentes, possivelmente, em extratos metanólicos de folhas novas e velhas de *Coffea arabica* L., considerando sua provável participação na resistência natural e diferenciada desses órgãos a fitopatógenos.

Verificou-se, por intermédio da cromatografia em fase gasosa, que as folhas possuem 15 substâncias comuns às duas idades, quando se fez a análise de seu extrato metanólico derivatizado com N,O-bis(trimetilsilil) Acetamida. Observou-se, ainda, que as folhas novas apresentam 13 compostos exclusivos e

as folhas velhas. apenas seis.

Verificou-se que a substância presente, com picos mais intensos, em extrato de folhas velhas não é encontrada em folhas novas. Quando submetida à análise por espectrometria de massa, essa substância apresenta características de terpenos. Os resultados sugerem que, possivelmente, compostos terpenóides possam participar do mecanismo de resistência natural da folha velha a fitopatógenos compatíveis com folhas novas.

Usando o sistema de acoplamento Cromatografia Gasosa / Espectrometria de Massa, observou-se, em folhas novas, a existência de cinco substâncias com espectros característicos de flavonóides, enquanto em folhas velhas apenas dois compostos dessa classe puderam ser observados. Tal fato, associado às demais observações realizadas no presente trabalho, confirma a ocorrência de alteração significativa na composição química das folhas à medida que elas envelhecem.

INTRODUÇÃO GERAL

Dentre os vários patógenos que podem atacar o cafeeiro destacam-se os fungos, as bactérias e os nematóides. Das doenças de natureza bacteriana, uma das mais comuns é a "mancha-aureolada", causada por *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*.

A mancha-aureolada do cafeeiro ocorre nas áreas produtoras de café de Minas Gerais, São Paulo e Paraná (ROBBS et alii, 1981). A suscetibilidade do cafeeiro a *P. syringae* pv. *garcae* parece estar relacionada com a idade da folha (OLIVEIRA, 1988), pois a bactéria infecta preferencialmente folhas novas.

Muitos estudos têm sido desenvolvidos no sentido de relacionar os metabólitos secundários, produzidos pelas folhas de cafeeiro, com a resistência natural da planta a fitopatógenos ou com a formação de produtos de natureza pós-infeccional, as fitoalexinas. Tais análises têm sido desenvolvidas, fundamentalmente, com a utilização da cromatografia de camada fina (TLC),

sem a preocupação com a identidade estrutural das substâncias. Mais recentemente, surgiram trabalhos de separação e identificação de compostos orgânicos constituintes de folhas, flores, frutos e sementes de plantas. com o uso do sistema de acoplamento Cromatografia Gasosa/Espectrometria de Massa (GC/MS) (NORDBY e NAGY, 1981; GREENAWAY et alii, 1988; KEMP et alii, 1988). Um problema que tem sido enfrentado pelos estudiosos da matéria é a baixa volatilidade de alguns componentes da rota biossintética, principalmente fenis, entre eles cumarinas fenoicas e flavonoides.

Em virtude do elevado ponto de ebulição dos metabólitos secundários de plantas. o emprego do sistema GC/MS nas análises espectrométricas tem sido feito com a técnica de derivatização.

Em face dos poucos conhecimentos existentes acerca da identidade dos metabólitos secundários presentes em folhas de cafeeiro, procurou-se estudar o assunto, com os seguintes objetivos:

- Separar compostos fenoicos, presumivelmente presentes em estratos de folhas novas e velhas de *Coffea arabica* L., considerando sua possível associação com a resistencia natural da planta a fitopatógenos.
- Utilizar a cromatografia em fase gasosa como método alternativo mais eficiente que a cromatografia de camada fina na análise de metabólitos secundários em folhas de *Coffea arabica* L.
- Identificar metabólitos secundários presentes em folhas de cafeeiro com o uso do sistema de acoplamento Cromatografia Gasosa/ Espectrometria de Massa.

CAPITULO 1

CROMATOGRAFIA DE FASE GASOSA DOS COMPONENTES DOS EXTRATOS METANÓLICOS DE FOLHAS DE CAFEIRO

1. INTRODUÇÃO

O estudo da química do cafeeiro tem sido desenvolvido com maior intensidade para o esclarecimento da constituição do café como bebida.

Os grãos verdes de café contem quantidades consideráveis de ácidos clorogénicos (IWAHASHI et alii, 1985; MORISHITA et alii, 1986a; MORISHITA et alii, 1986 b) e grande número de outros compostos fenólicos, os quais estão envolvidos diretamente na indicação da qualidade da bebida e da cor da infusão do café torrado.

A separação dos referidos compostos fenólicos, presentes em extratos de grãos de café, tem sido feita por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC), com colunas analíticas e preparativas, no sistema de fase reversa (BANWART et alii, 1985). A identificação tem sido realizada através de métodos espectrométricos, destacando-se a ressonância magnética nuclear protônica (NMRH) e de carbono 13 (NMRC), o infravermelho (IR) (MORISHITA et alii, 1984) e a espectrometria de massa (MS).

Depois de torrado, os compostos dos grãos crus de café sofrem sensíveis modificações (AMORIM et alii, 1974; AMORIM e SILVA, 1968; SANINT e VALENCIA, 1972), as quais são responsáveis pelo sabor e aroma da bebida (STOFFELSMA et alii, 1968).

Em grãos e folhas de cafeeiro, encontraram-se compostos terpenóides e pirazinas (FRIEDEL et alii, 1971; VITZTHUM e WERKHOFF, 1975), enquanto PARLIMENT et alii (1973) identificaram o aldeído E-2-nonenal como o principal responsável pelo cheiro característico do café.

Mais recentemente, PETTITT Jr. (1987) e NAGASAMPAGI et alii (1971) identificaram novos compostos em cafeeiro. No entanto, experiências indicam que as substâncias identificadas não são exclusivas desta planta (BONDAROVICH et alii, 1967; MALMBERG e THEANDER, 1985).

Com relação às folhas do cafeeiro, os estudos da composição química vêm sendo dirigidos no sentido de relacioná-la com a resistência natural da planta a fitopatógenos (ECHANDI e FERNANDEZ, 1962; CARELLI et alii, 1974) ou com as formações de produtos pós-infeccionais, as fitoalexinas (RODRIGUES Jr. et

alii 1975; GUEDES et alii, 1982; GUEDES, 1983; MARTINS et alii, 1986; SOUZA. 1988).

A inoculação de folhas com uma raça incompatível de *Hemileia vastatrix* levou à produção de substâncias que inibiram o crescimento de esporos da raça compatível do mesmo fungo, nos bioensaios efetuados com os extratos das folhas inoculadas (RODRIGUES Jr. et alii, 1975). Observou-se ainda, que os níveis de fendis totais e ácido clorogênico, de peroxidase e polifenoloxidase, se elevaram consideravelmente após a inoculação, sugerindo uma correlação desses compostos com a resistência à ferrugem do café (NACCACHE e DIETRICH, 1985).

O aumento do conteúdo total de polifendis foi também observado em folhas de cafeeiro resistentes a *Ceratocystis fimbriata* (ZULUAGA et alii, 1971ab), mediante a utilização de cromatografia bidimensional em papel.

A análise da cutina de folhas novas e velhas de cafeeiro permitiu a identificação, por meio de métodos cromatográficos e de espectrometria de massa, de ácidos dihidroxidecânicos como componentes predominantes. Com relação à cutina, não se encontraram diferenças qualitativas desses componentes em folhas novas e velhas de cafeeiro (HOLLOWAY et alii, 1972).

O estudo cromatográfico dos fendis totais tem sido usado na quimiotaxonomia do cafeeiro e outras plantas. Para isso, tem-se aplicado, fundamentalmente, a cromatografia de camada fina (TLC) com os cromatogramas revelados sob luz ultravioleta e luz ultravioleta com vapores de amônia (CASTANO e DAVILA. 1974). sem a preocupação com a identidade estrutural desses fendis.

Usando cromatografia de camada fina bidimensional, AMORIM et alii (1978) analisaram os compostos fenólicos em folhas de cafeeiro resistentes e suscetíveis a *Hemileia vastatrix*. Essas substâncias foram identificadas como fenóis em geral, flavonóides e flavonóides com núcleo floroglucinol, ácidos clorogênicos e neoclorogênicos.

OLIVEIRA (1988) analisou a relação entre compostos fenólicos e resistência de folhas novas do cafeeiro a *Pseudomonas cichorii* e de folhas velhas a *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*. Por intermédio de bioensaios por difusão em ágar, observou-se que o extrato metanólico de folhas velhas inibiu o crescimento de *E. syringae* pv. *garcae*, mas não o de *P. cichorii*, enquanto o extrato de folhas novas não o fez em ambos os patógenos. Disso, concluiu-se que compostos fenólicos são possíveis componentes do mecanismo da resistência de folhas velhas ao patógeno, enquanto em folhas novas outros mecanismos de resistência devem estar envolvidos.

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de separar compostos fenólicos possivelmente presentes em extratos de folhas novas e velhas do cafeeiro, por meio de cromatografia de fase gasosa.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção dos Extratos de Folhas Novas e Velhas de Cafeeiro

Coletaram-se folhas sadias de mudas de cafeeiro (*Coffea arabica* L.), variedade "Mundo Novo", contendo entre cinco e 10 pares de folhas, mantidas em casa de vegetação do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Vicosa. Para efeito de distinção, os dois primeiros pares de folhas da planta foram considerados de folhas novas e o terceiro, quarto e quinto Pares, de folhas velhas. O material fresco foi lavado, enxuto e, depois de retiradas as nervuras principais, pesado.

Procedeu-se à extração das folhas em metanol 80%, em extrator Soxhlet, por um período de oito horas. Adicionou-se ao extrato solução de bissulfito de sódio (NaHSO_3) (1:1 v/v) 1%

(LOOMIS e BATTAILE, 1966), concentrando-o em rotavapor até a remoção completa do metanol. O concentrado foi centrifugado a 10.240 g x 15 min, à temperatura de 5-10°C, em centrífuga refrigerada (SORVALL RC5B). O sobrenadante foi filtrado a vácuo, em papel-filtro Whatman nº 1, e fracionado conforme o método empregado por KEEN (1978), para a extração de fitoalexinas de folhas de plantas. Usou-se igual volume de acetato de etila saturado com bissulfito de sódio, em funil de separação. Secou-se a fração orgânica com sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄), na proporção de 50g.l⁻¹. O sal desidratante foi removido por filtração e o solvente, evaporado totalmente em rotavapor, a 45°C. O resíduo foi ressuscitado em metanol, na proporção de 0.10 ml.g⁻¹ de tecido fresco. Acondicionaram-se os extratos em frascos de 5 ml, com tampa rosqueável, e os armazenaram em congelador.

2.2. Avaliação da Atividade Antimicrobiana dos Extratos

A atividade antimicrobiana dos extratos de folhas novas e velhas do cafeeiro foi avaliada por meio de bioautografia (KEEN, 1978) contra *Phytophthora parasitica*. Utilizaram-se placas preparadas com sílica gel 60 GF 254 - 7730 (MERCK), dotada de indicador de fluorescência. Essas placas foram ativadas em estufa a 70°C, por duas horas, e submetidas a uma pré-corrída no sistema de solventes n-hexano-éter etílico-metanol (40:40:20 v/v), para a remoção de impurezas porventura presentes na área da corrída cromatográfica. Amostras de 2.5 e 5.0 µl dos extratos

ressuspendidos em metanol foram aplicadas em pontos espaçados de 4 cm e a uma distância de 1,5 cm da extremidade inferior da placa.

Na corrida cromatográfica, utilizaram-se cubas de vidro de 8 x 24 x 24 cm, empregando o mesmo sistema de solventes da pré-corrida. A corrida foi realizada até percorrer 15 cm, a partir dos pontos de aplicação das amostras. Depois da corrida cromatográfica, secaram-se os cromatogramas ao ar, até a evaporação total dos solventes. Posteriormente, as placas foram atomizadas com 10 ml de meio semi-sólido (0,4% de ágar) fundente, ao qual se incorporou, previamente, 0.5 ml da suspensão de esporos de *Trichelaviopsis paradoxa*. Esta suspensão foi obtida, adicionando-se 9.0 ml de solução salina (0,85%) estéril a tubos de cultura que tinham sido incubados por cinco a seis dias, a 28^o C. As placas, submetidas à bioautografia, foram colocadas em bandejas plásticas, forradas com papel-filtro umedecido e envolvidas em saco de polietileno, para formar câmara úmida, e incubadas por 48-72 horas (SOUZA, 1988; OLIVEIRA, 1988).

2.3. Cromatografia de Camada Fina (ILC) dos Extratos

Foram preparadas placas de vidro de 20 x 20 cm, pesando-se 300 mg de amido puro, dissolvidos em 60 ml de água, com aquecimento e agitação, para evitar aglomerados. Ao amido dissolvido, juntaram-se 20 g de sílica gel 60 GF 254-7730 (MERCK), com agitação, até a homogeneização total. Colocou-se a

mistura em espessador de camadas devidamente regulado para 0.5 nm. Depois de preparadas, as placas foram secas ao ar e finalmente ativadas em estufa, a 70 ° C, por duas horas. Aplicaram-se amostras de 20 µl do extrato de folhas novas em pontos espaçados de 4 cm e a uma distância de 1,5 cm da extremidade inferior da placa, promovendo a corrida cromatográfica, com o uso do mesmo sistema de solventes do item 2.2. Adotou-se o mesmo procedimento para o extrato de folhas velhas, e os cromatogramas, depois de secos ao ar até a evaporação total dos solventes, foram revelados em câmara de luz ultravioleta.

2.4. Cromatografia de Fase Gasosa dos Extratos

As análises foram feitas inicialmente em um Cromatógrafo a Gás Instrumentos Científicos, modelo CG 37, equipado com programador de temperaturas e detetor de ionização de chama (FID), acoplado a um integrador processador CG 100. Utilizou-se uma coluna analítica de vidro de 2,0 m x 2 mm (d.i.), empacotada com OU-17 1%. Temperatura do Injetor, 300 ° C; Detetor, 320 ° C; Coluna: temperatura inicial de 75 ° C, isotérmica por cinco minutos e, então, programada na razão de 6 ° C.min⁻¹ até o máximo de 300 ° C, permanecendo isotérmica por um minuto: atenuação de 16 x 10⁻¹⁰ A.mV⁻¹. Velocidades dos fluxos de hidrogênio, ar sintético e nitrogênio, de 30, 300 e 30 ml.min⁻¹, respectivamente. O volume injetado para cada corrida cromatográfica foi de 1 µl, medido em microseringa cromatográfica de 10 µl, marca HAMILTON

(Company Reno, Nevada).

Outra análise dos extratos de folhas novas e velhas do cafeeiro foi feita no sistema de acoplamento da cromatografia de fase gasosa-espectrometria de massa (GC/MS), conduzida por impacto de elétrons (EI) a 70 eV, em um equipamento HP-5996A, acoplado a um computador HP-1000E. A coluna utilizada foi uma capilar BP-1, espessura do filme de 0.5 μ , "bonded phase" (equivalente a SE-30 e OV-101) tipo WCOT (Wall Coated Open Tubular) de 25 m x 0.33 mm (d.i.), de sílica fundida. Utilizaram-se: gás de arraste, He, 1.0 ml.min⁻¹; "splitter" na razão de 1:30; temperatura da coluna de 150 C isotérmica por um minuto e, então, programada na razão de 2 C.min⁻¹ até a temperatura máxima de 300 C, permanecendo isotérmica por um minuto: temperatura do Injetor: 300 C; Fonte Ionizadora: 280 C; Analisador: 280 C; e Linha de Transferência: 280 C. Injetou-se um volume padrão de 1 μ l, medido em microsseringa cromatográfica de 10 μ l HAMILTON (M.R.) e injeção do tipo "on column". Os cromatogramas em Corrente Total de Ions (TIC) foram armazenados em computador para análises posteriores.

2.5. Formação dos Derivados dos Extratos

O derivatizante utilizado foi a N,O-bis (trimetilsíliil)-Acetamida -BSA- (SIGMA). Para a formação dos derivados, tomaram-se 100 μ l do extrato metanólico, os quais foram aplicados em "spots" de 20 μ l em TLC preparativa. Após a corrida

cromatográfica, revelou-se o cromatograma sob luz ultravioleta, e as manchas que demonstraram atividade contra *Ibielaxiopsis paradoxa* foram extraídas com o mesmo sistema de solventes (n-hexano-éter etílico-metanol = 40 : 40 : 20 v/v). Deste extrato, tomaram-se 2 ml, dos quais se evaporaram totalmente os solventes em corrente de nitrogênio seco. O resíduo foi, então, misturado com 100 µl de BSA, em frasco de vidro com fundo cônico, e aquecido a 75 °C, durante 15 minutos, sendo em seguida, resfriado até a temperatura ambiente. Adotou-se o mesmo procedimento com relação aos extratos de folhas novas e velhas. A interpretação dos cromatogramas foi feita mediante a comparação dos tempos de retenção dos extratos com os de padrões analíticos derivatizados de acordo com a mesma técnica.

2.6. Preparação dos Padrões Analíticos

Pesou-se 1,0 mg de cada fenol (SIGMA), escolhido como padrão (Quadro 1A), e o transferiu para um frasco de fundo cônico, com tampa rosqueável. Acrescentaram-se à mistura 100 µl de BSA (SIGMA), fazendo o aquecimento a 75 °C, durante 15 minutos (MORITA, 1974; CASTEELE et alii, 1976).

Preparou-se a mistura de padrões, pesando 10 mg de cada fenol, os quais foram misturados em tubo de ensaio e dissolvidos totalmente com metanol bidestilado. Desta solução, retirou-se uma alíquota de 2 ml, da qual se evaporou o solvente, em corrente de nitrogênio seco. Acrescentaram-se ao resíduo 200 µl de BSA, fazendo o aquecimento a 75 °C, por 15 minutos. Depois de resfriada

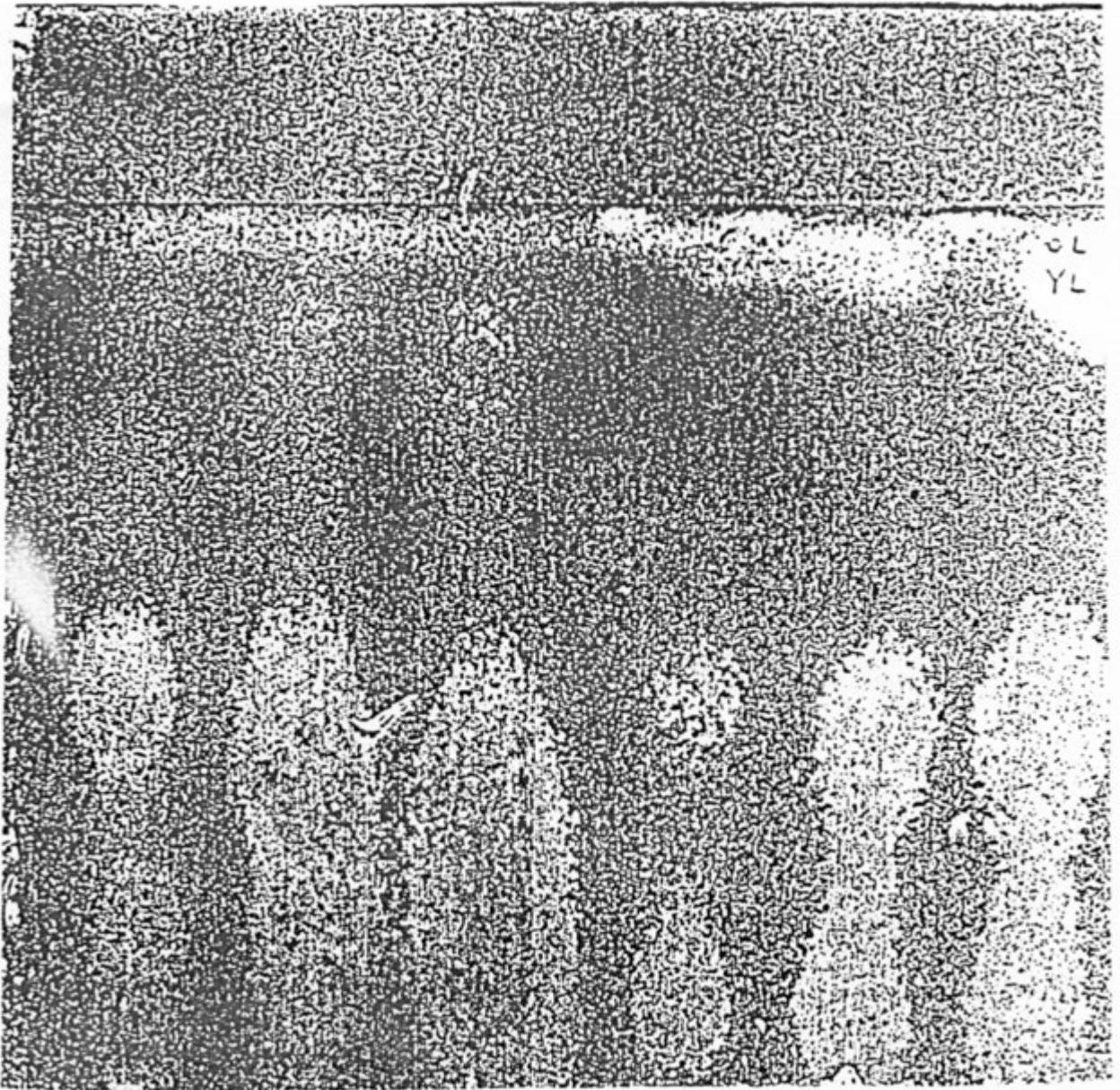
à temperatura ambiente, a mistura foi cromatografada, inicialmente, em coluna analítica com injeção de 2 μ l, para o ordenamento dos padrões pelo tempo de retenção.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Atividade Antimicrobiana dos Extratos

A presença de fendis em extratos metanólicos de folhas novas e velhas de cafeeiro foi detectada por OLIVEIRA (1988), quando, então, esses compostos foram quantificados, em termos de fendis totais, pelo método de GANGOPADHYAY e WILLIE (1973). Por meio do bioensaio por difusão em ágar, observou-se que o extrato de folhas velhas inibiu o crescimento de *Pseudomonas syringae* pv. *gaccae*, o que não aconteceu com o extrato de folhas novas. Isso pode indicar que compostos fendólicos constituem possíveis participantes do mecanismo de resistência da planta a *E. syringae* pv. *gaccae* (OLIVEIRA. id. *ibid.*).

Bioautografias realizadas com *Thielaviopsis paradoxa*, em cromatogramas que receberam amostras dos extratos metanólicos de



N 1

N 2

N 3

v 1

v 2

v 3

FIGURA i. Bioautografia com *Ibidelavioopsis paradoxa* em Cromatograma, Onde Foram Resolvidos os Extratos de Folhas Novas (N) e Velhas (V) de Cafeeiro.

folhas novas e velhas do cafeeiro. revelaram a presença de diferentes halos de inibição do crescimento do fungo (Figura 1). Essas bioautografias tiveram como objetivos verificar possíveis diferenças entre os dois extratos e se estes eram biologicamente ativos. Os resultados permitiram verificar que os referidos extratos possuem atividade antifúngica quando testados contra *I. paradoxa*.

3.2. Cromatografia em Fase Gasosa

A cromatografia de fase gasosa é limitada a amostras voláteis (CASTEELE et alii, 1976). A análise cromatográfica direta dos fênóis, provavelmente presentes em extratos de folhas novas e velhas de cafeeiro, teve de ser feita com o emprego de derivatizante, devido à instabilidade térmica desses compostos e à sua baixa volatilidade.

A análise inicial, feita em coluna analítica, mostrou cromatogramas com vários picos, tanto para o extrato de folhas novas (Figura 2) quanto para o de folhas velhas (Figura 3). Na Figura 4, mostra-se o cromatograma de padrões de fênóis derivatizados.

A comparação entre o cromatograma do extrato de folhas novas com o da mistura dos padrões de fênóis (Figura 5) sugere uma semelhança de comportamento. perante a cromatografia de fase gasosa em coluna analítica, entre as substâncias correspondentes aos picos nos tempos de retenção de 15,50 e 17,00 min e o padrão que eluiu a 16,50 min, no caso o ácido p-hidroxibenzóico.

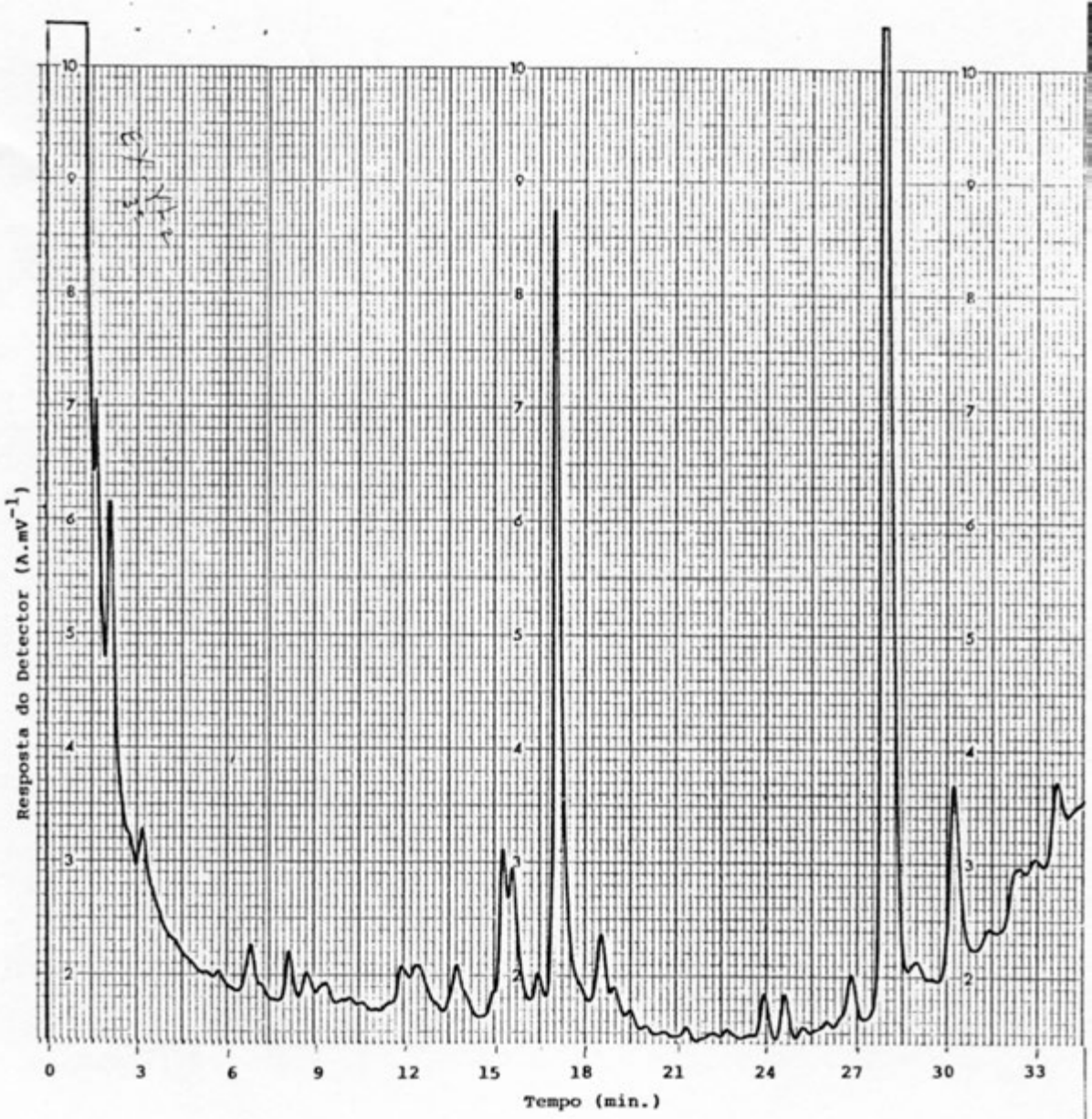


FIGURA 2. Cromatograma do Extrato Metanólico de Folhas Novas de Cafeeiro Derivatizado com BSA, Obtido em Coluna de OU-i7 1%.

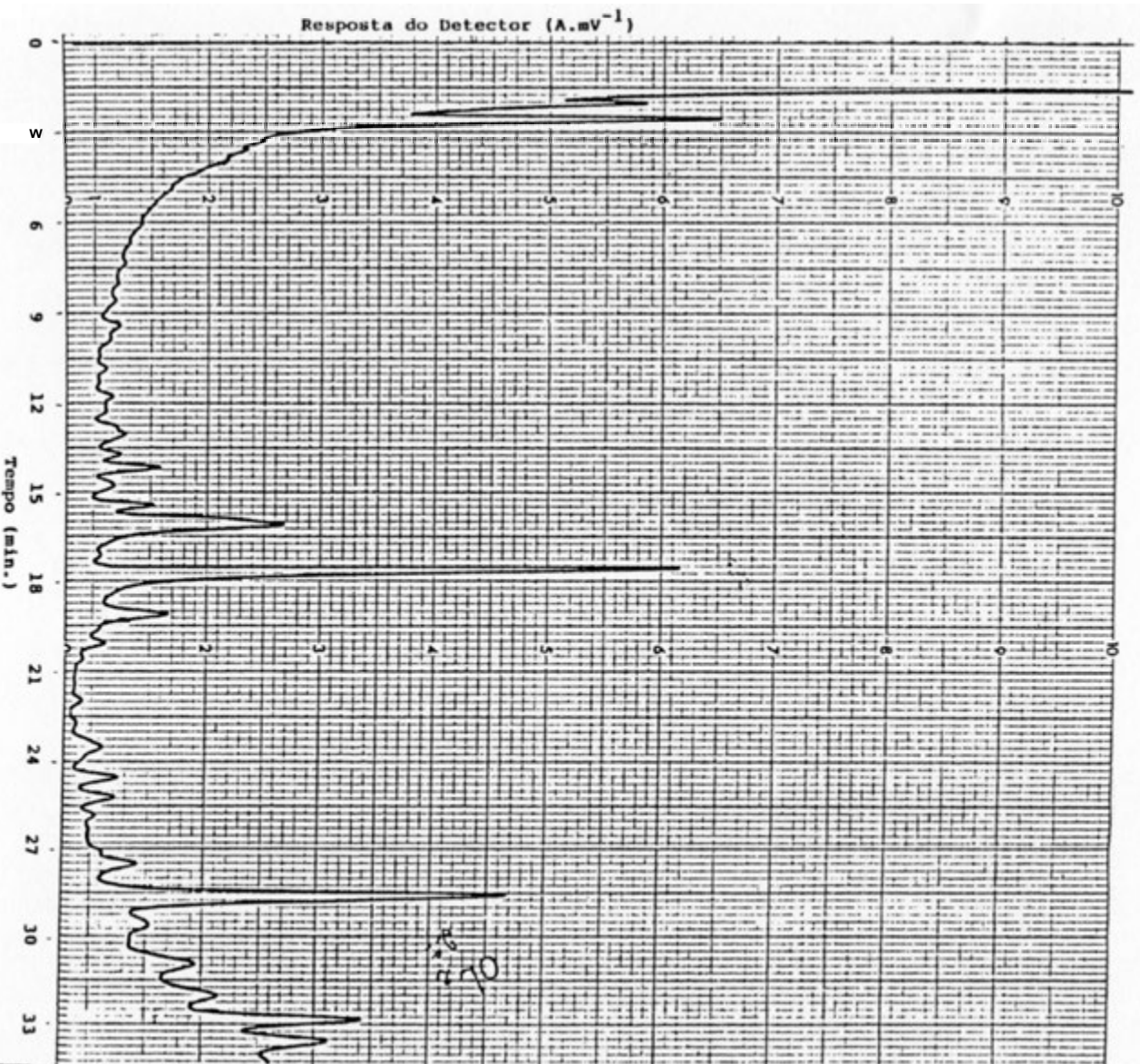


FIGURA 3. Cromatograma do Extrato Metanólico de Folhas Velhas de Cafeeiro Derivatizado com BSA, Obtido em Coluna de 0V-17 1%.

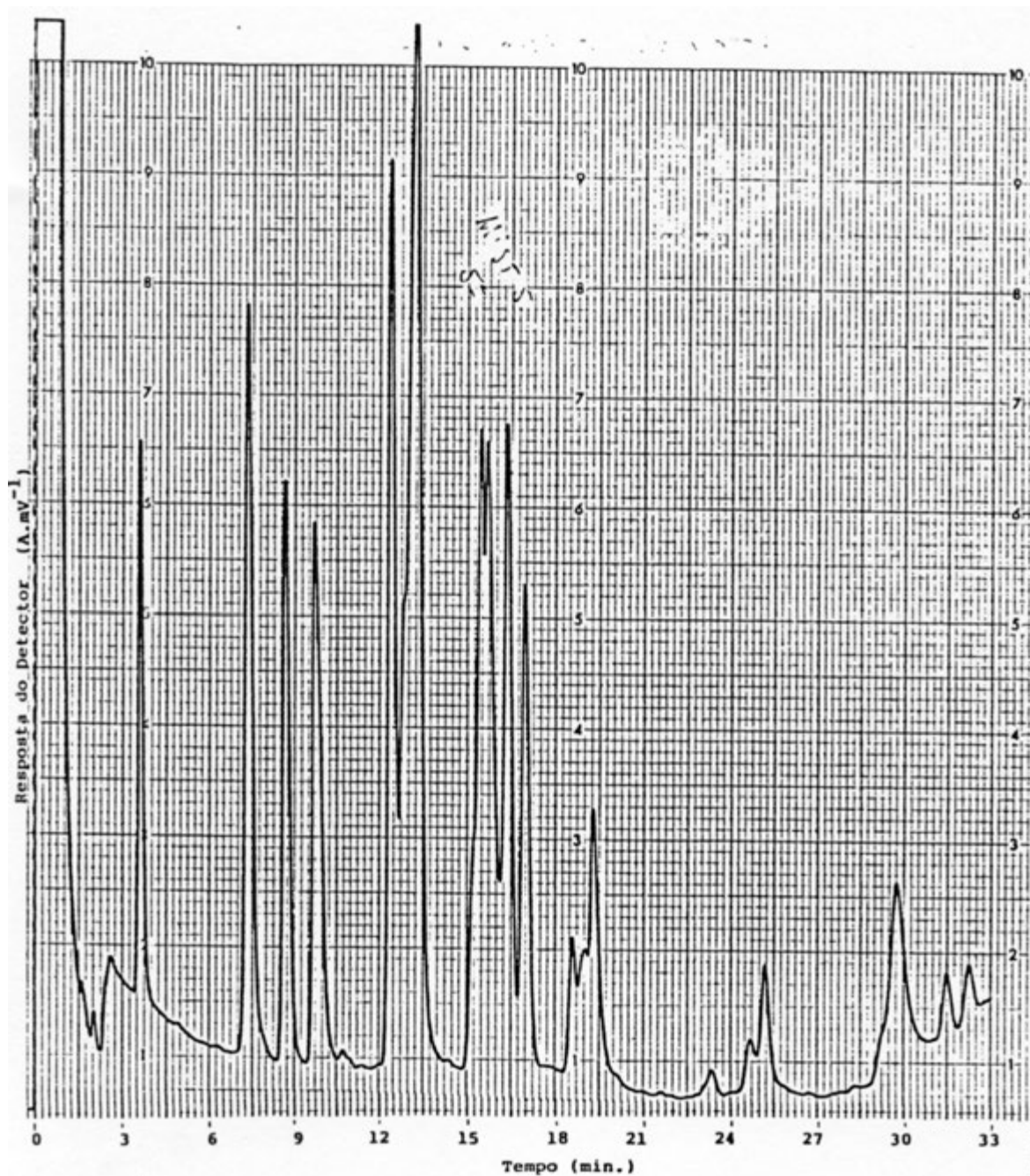


FIGURA 4. Cromatograma da Mistura de Padrões de Fenóis Derivatizados com BSA, Obtido em Coluna de OU-I7 i%.

Comparação semelhante pode ser feita com relação ao pico correspondente ao tempo de retenção de 28,00 min e ao padrão que eluiu a 29,50 min, a 1,8-diidroxiantraquinona.

A comparação entre o cromatograma do extrato de folhas velhas com o da mistura de padrões de fendis (Figura 6) apresentou o mesmo resultado para o pico correspondente ao tempo de retenção de 17,50 min e ao ácido p-hidroxibenzóico, bem como para o padrão de 1,8-diidroxiantraquinona.

Considerando os dois extratos e a mistura de padrões, nota-se que os primeiros apresentam pelo menos dois picos com tempo de retenção acima de 28,00 min, comportamento semelhante ao dos fendis dotados de mais de um núcleo (cumarinas e flavonóides).

Na Figura 7, são comparados os cromatogramas do extrato de folhas novas e o de folhas Velhas de Cafeeiro. Nota-se que no extrato de folhas novas, dos dois picos de maior intensidade, a substância que elui em temperatura mais elevada apresenta-se com área percentual maior que a do composto de menor tempo de retenção. No cromatograma do extrato de folhas velhas, observa-se que esta situação se inverte, o que sugere modificação na concentração de algumas substâncias, à medida que as folhas envelhecem. Observa-se, ainda, que a cromatografia de fase gasosa, em coluna analítica, mostrou-se pouco eficiente para a separação dos componentes derivatizados dos extratos metandlicos de folhas novas e velhas de Cafeeiro, em virtude dos cromatogramas relativamente pouco resolvidos.

Partindo dessa observação, procedeu-se à cromatografia de fase gasosa com coluna capilar, dos mesmos extratos. no sistema

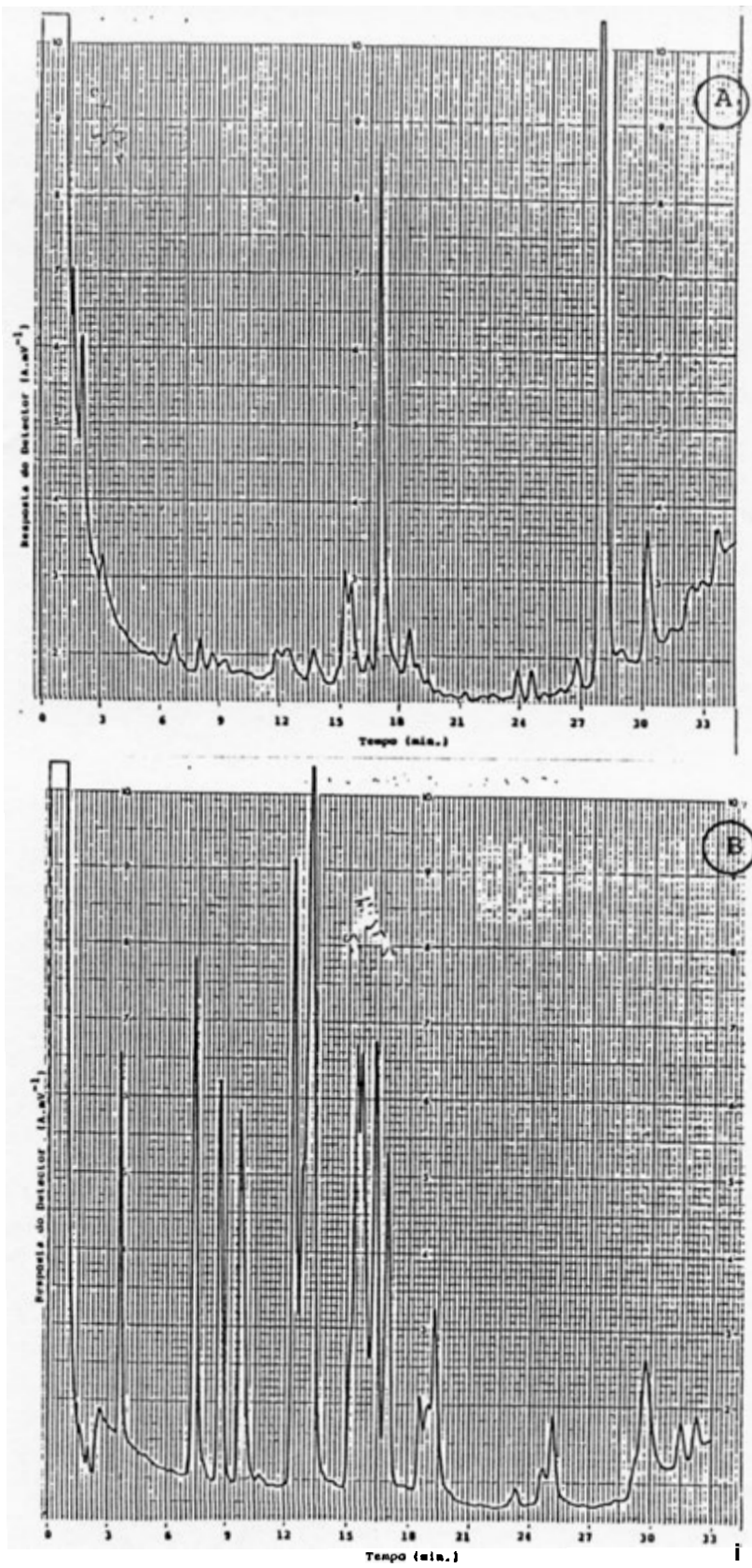


FIGURA 51. Comparação do Cromatograma do Extrato de Folhas Novas com o Cromatograma da Mistura de Padrões de Fênolis.

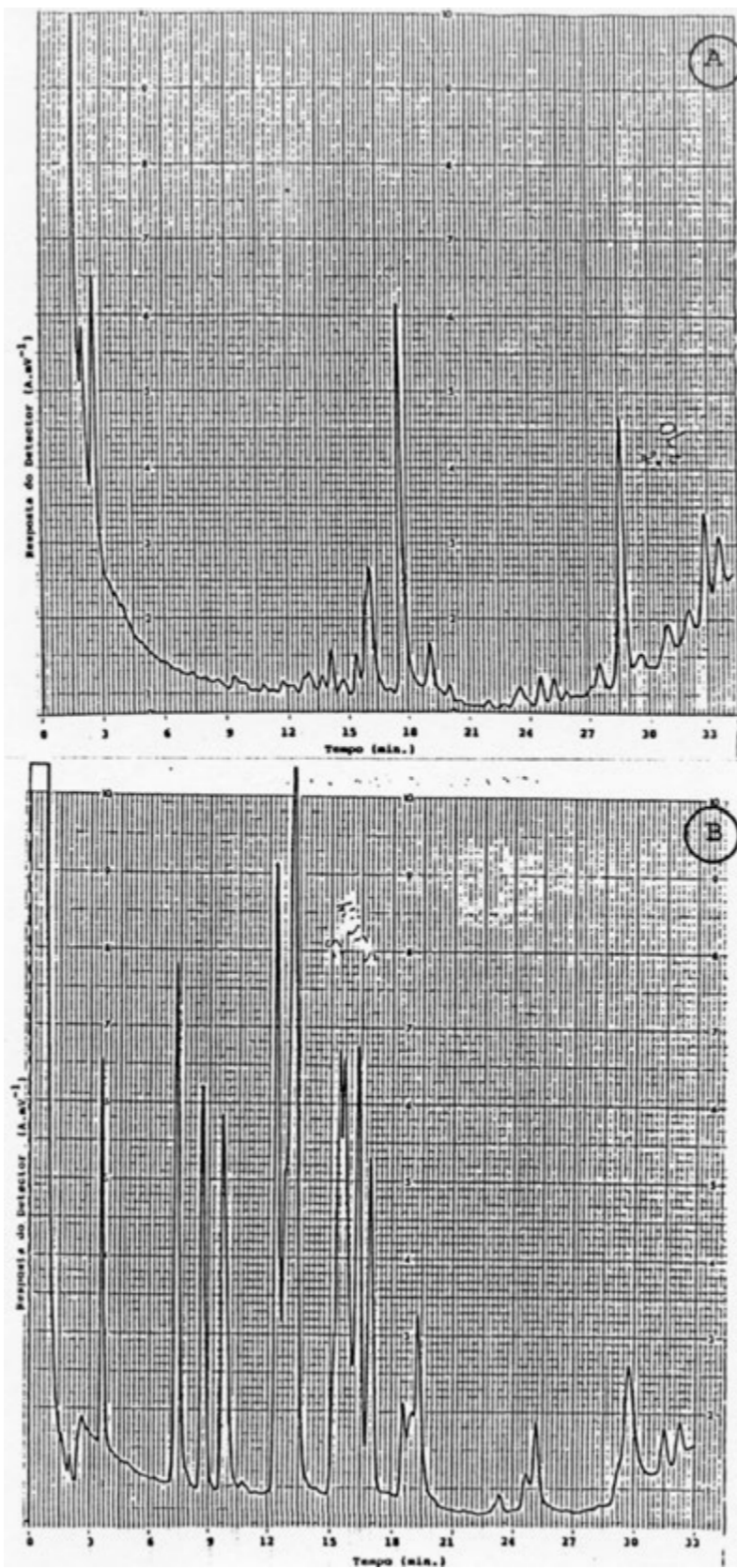


FIGURA 6. Comparação do Cromatograma do Extrato de Folhas Velhas com o Cromatograma da Mistura de Padrões de Fendis.

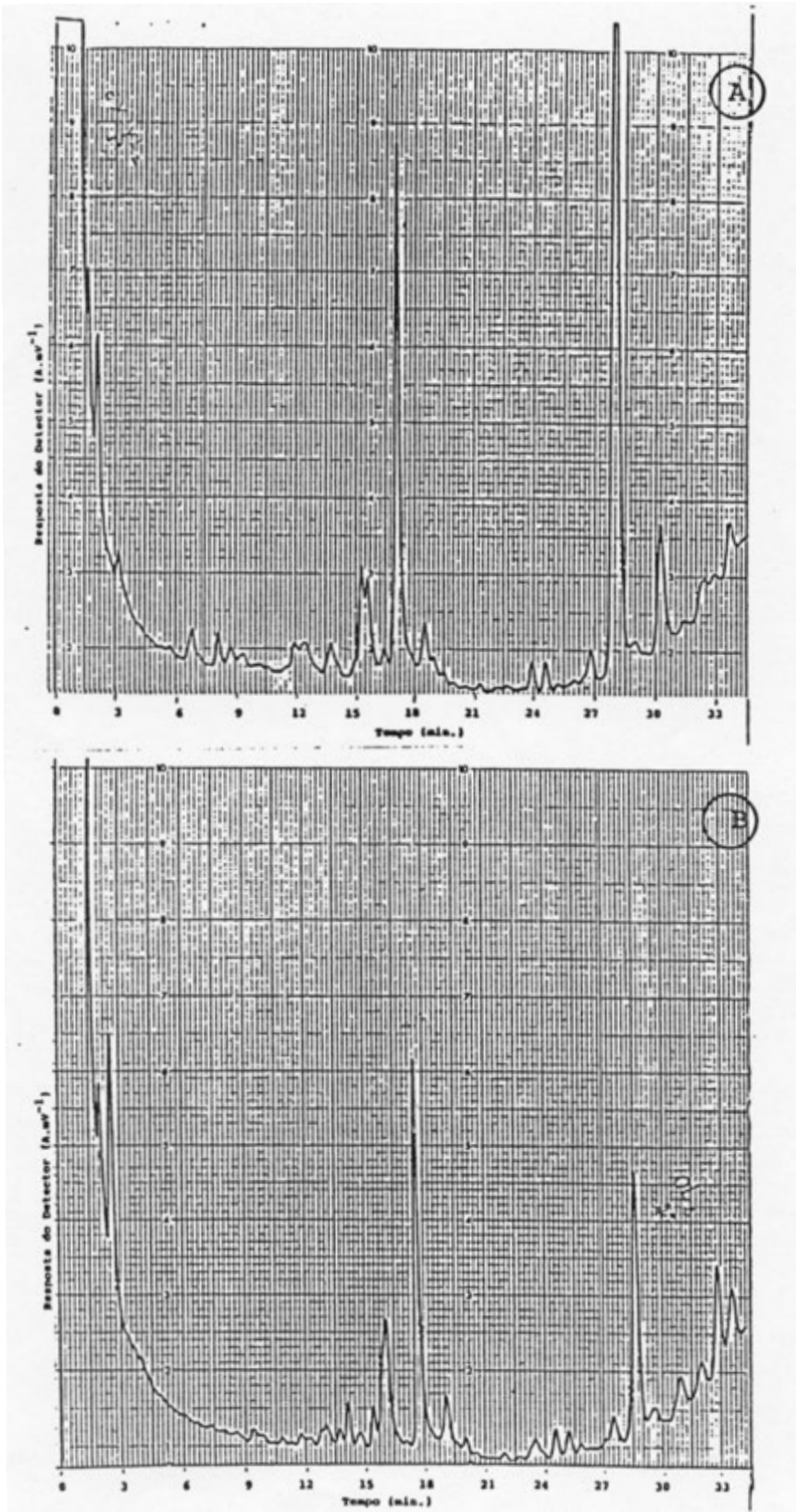


FIGURA 7. Comparação dos Cromatogramas do Extrato de Folhas Novas e Velhas de Cafeeiro.

GC/MS (KORNREICH e ISSENBERG, 1972; HUANG et alii, 1986). A escolha da coluna cromatográfica para a referida análise realizou-se de acordo com testes prévios para a utilização com derivados de BSA (KLEBE et alii, 1966; BUDZIKIEWICZ et alii, 1967; KATAGI et alii, 1973; TIITTO, 1985; KATO et alii, 1985; MELHUISE Jr. et alii, 1986).

A análise em coluna capilar apresentou um número maior de picos, melhor resolvidos, para o extrato de folhas novas e de folhas velhas (Figura 8). A interpretação, neste caso, foi feita a partir da Corrente Total de Ions (TIC), que permite a reprodução dos cromatogramas após a aquisição do espectro de

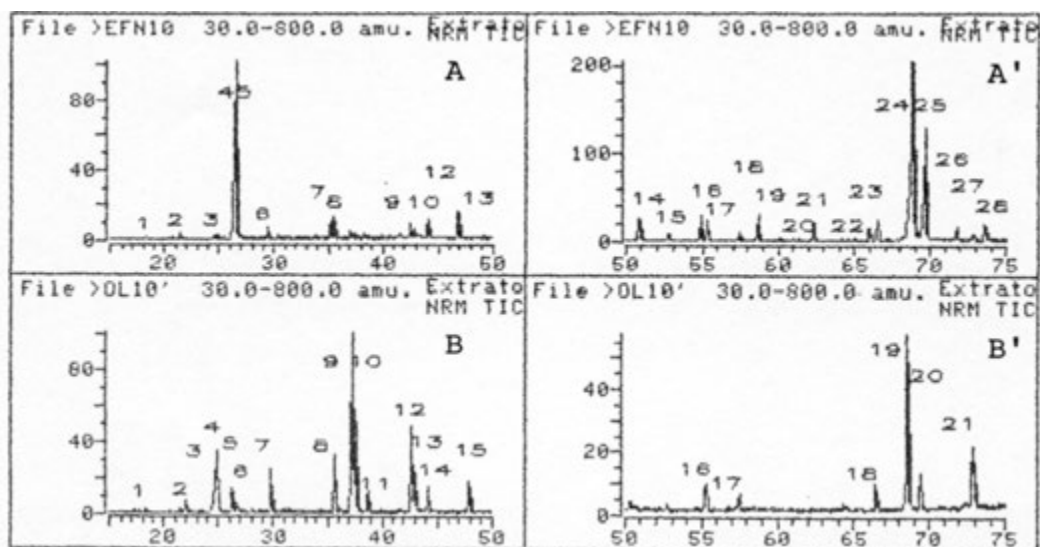


FIGURA 8. Cromatogramas Totais do Ions (TIC) do Extrato de Folhas Novas (A) e Velhas (B), Derivatizados com BSA.

massa de cada componente separado (MARTINEZ. 1988).

O cromatograma total de íons da Figura 8 (A) mostra um total de 28 picos correspondentes, possivelmente, a 28 compostos presentes no extrato de folhas novas do cafeeiro. Na análise do TIC da Figura 8 (B), observam-se apenas 21 picos, o que sugere uma diferença de sete componentes presentes a mais no extrato de folhas novas.

Na Figura 9, apresenta-se o Cromatograma Total de Ions (TIC) da mistura de padrões derivatizados com BSA, nas mesmas condições da análise dos extratos metanólicos das folhas de cafeeiro.

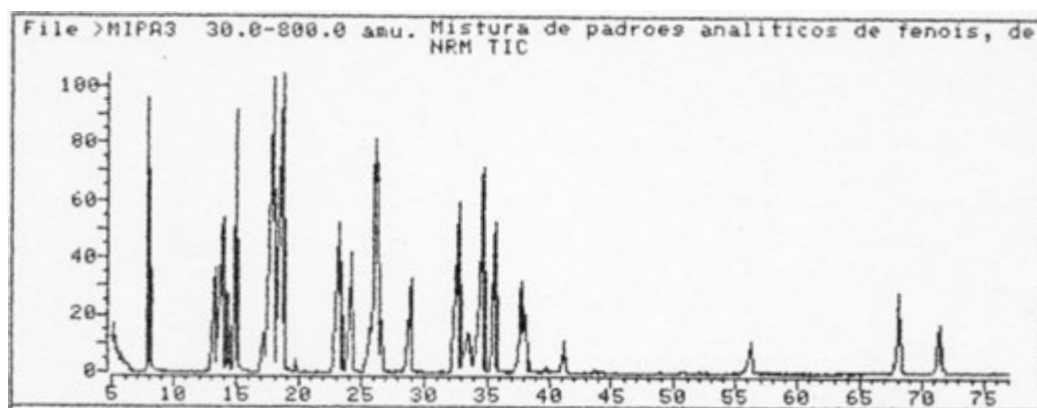


FIGURA 9. Cromatograma Total de Ions (TIC) da Mistura de Padrões Derivatizados com BSA.

A comparação dos tempos de retenção do cromatograma total de íons do extraio de folhas novas com o TIC da mistura de padrões (Figura 10) evidenciou comportamentos semelhantes para os componentes que eluíram nos tempos de retenção de 26,39, 35,50 e 71,71 min para o extrato e 26,25, 35,61 e 71,42 min para os

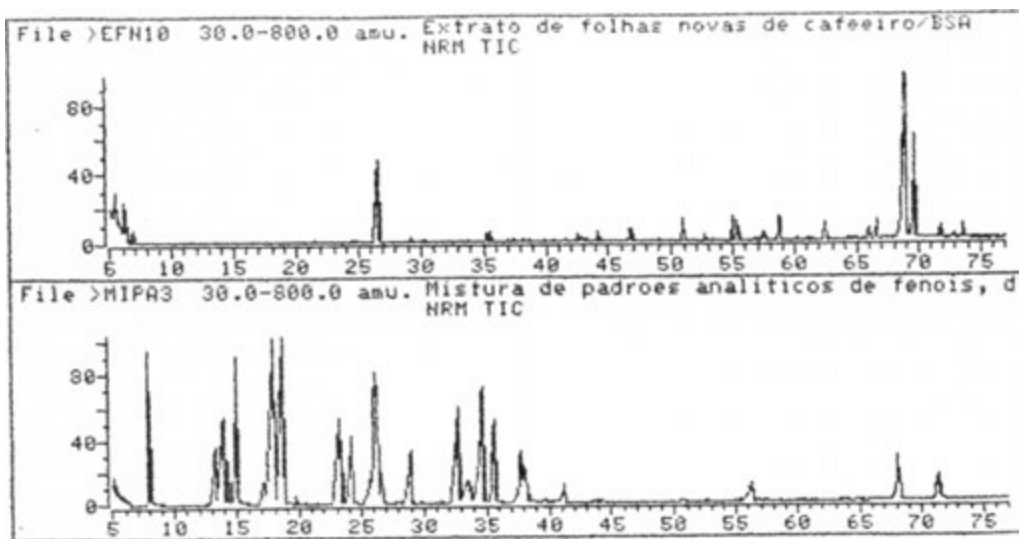


FIGURA 10. Comparação do TIC do Extrato de Folhas Novas de Cafeeiro com o TIC da Mistura de Padrões Derivatizados com BSA.

padrões. Estes últimos correspondem, respectivamente, aos fenóis ácido 3,4-dihidroxibenzoico, galato de propila e morina. A eluição da morina no tempo de retenção de 71.42 min está de acordo com o relatado na literatura para compostos flavonóides e outros (SABIR et alii, 1974; WALKER, 1975; WOODWARD, 1982). Estes dados sugerem a possível presença de compostos flavonóides nos extratos de folhas novas de cafeeiro.

A comparação dos tempos de retenção do TIC do extrato de folhas velhas com o TIC da mistura de padrões (Figura 11) permite inferir comportamento semelhante para os compostos com tempos de retenção de 26.32, 35.57 e 37.51 min para o extrato e 26.25, 35.61 e 37.75 min para os padrões. Estes últimos correspondem aos compostos ácido 3,4-dihidroxibenzoico, galato de

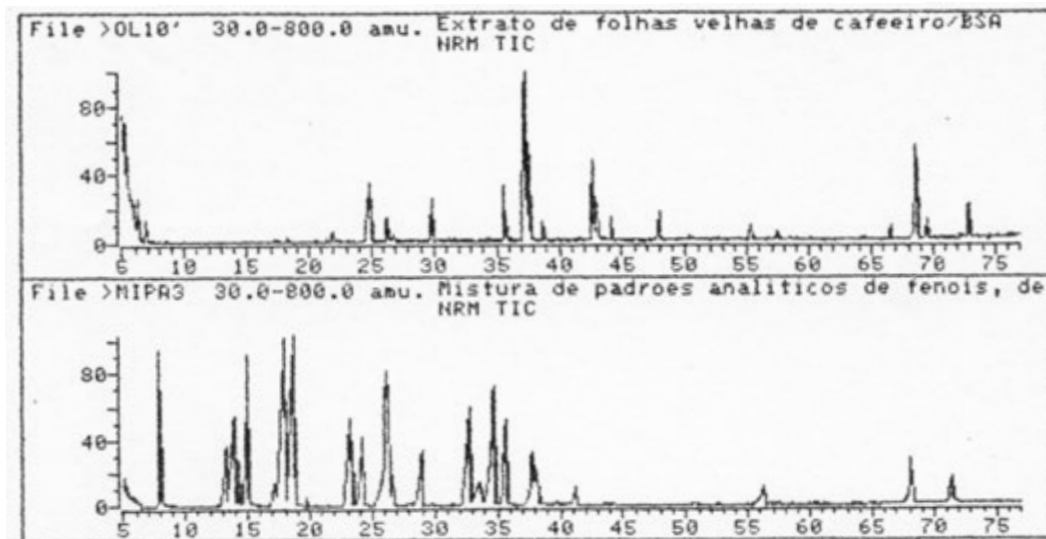


FIGURA 11. Comparação do TIC do Extrato de Folhas Velhas de Cafeeiro com o TIC da Mistura de Padrões Derivatizados com **BSA**.

propila e ácido ferúlico, o que está de acordo com o citado por **HARTLEY e JONES (1975)** e **HOLLER e HERRMANN (1982)**.

A possível existência de ácido ferúlico em extrato de folhas de cafeeiro, no entanto, não é exclusiva desta planta. **SOSULSKI et alii (1982)** identificaram esse mesmo composto em cereais e fécula de batata.

A comparação dos tempos da retenção nos TIC dos extratos derivatizados de folhas novas e velhas de cafeeiro (Quadro 1) permite observar a presença de 15 compostos comuns aos dois tipos de folhas, 13 exclusivos para folhas novas, ao lado de apenas seis substâncias com exclusividade para folhas velhas.

Quando se comparam os cromatogramas totais de íons do extra-

QUADRO 1 - Comparação dos Tempos de Retenção dos Cromatogramas dos TIC dos Extratos Derivatizados de Folhas Novas e Velhas de Cafeeiro

EXTRATO DE FOLHAS NOVAS			EXTRATO DE FOLHAS VELHAS		
NÚMERO	TEMPO DE RETENÇÃO	SCAN	NÚMERO	TEMPO DE RETENÇÃO	SCAN
01	18,15	8527	01	18,18	0524
02	21,40	0624	02	21,40	0618
--	----	---	83	21,80	8632
03	24,55	0718	a4	24,58	0722
e4	24,81	8726	--	----	----
05	26,39	8776	05	26,32	0767
--	----	----	06	26,69	8778
96	29,34	0861	07	29,77	0870
97	35,20	1036	--	----	---
08	35,50	1045	08	35,57	1843
--	----	----	09	37,21	1092
--	----	----	10	37,51	1101
--	----	----	11	38,65	1135
e9	41,49	1224	--	----	----
10	42,50	1254	12	42,67	1255
11	42,87	1265	13	42,93	1263
12	44,11	1302	14	44,11	1298
13	46,75	1381	--	----	---
--	----	----	15	47,82	1489
14	50,81	1502	--	----	---
15	52,65	1557	--	----	----
16	54,83	1622	--	----	----
17	55,33	1637	16	55,23	1630
18	57,44	1700	17	57,50	1698
19	58,68	1737	--	----	----
20	60,12	1780	--	----	---
21	62,36	1845	--	----	----
22	65,95	1954	--	----	----
23	66,52	1971	18	66,45	1965
24	68,80	2039	19	68,56	2028
25	69,54	2061	20	69,40	2053
26	71,71	2126	--	----	----
27	72,79	2158	21	72,91	2155
28	73,59	2182	--	----	---

to de folhas novas e do extrato de folhas velhas (Figura 8), nota-se apenas neste último um pico bastante intenso. no tempo de retenção de 37.21 min. Isto sugere, mais uma vez, alteração

qualitativa dos compostos químicos nas folhas velhas em relação às folhas novas do cafeeiro. o que pode também ser evidenciado para outras substâncias presentes com exclusividade em folhas novas e em folhas velhas. como se vê no Quadro i.

A análise dos TIC dos extratos de folhas novas e velhas de cafeeiro, bem como suas comparações com o TIC da mistura de padrões de fendis. mostra que a técnica de derivatização C eficiente para o estudo da possível presença de compostos fendlicos nessa planta.

4. RESUMO E CONCLUSÕES

O presente trabalho, que trata da separação de compostos fenólicos dos extratos metanólicos de folhas novas e velhas de cafeeiro, foi desenvolvido em duas etapas.

Na primeira, promoveu-se a cromatografia em fase gasosa, em coluna analítica, dos extratos derivatizados com N,O-bis(trimetilsilil)-Acetamida - BSA. Os resultados indicaram que a técnica de derivatização com BSA permite volatilizar compostos fenólicos de elevados pontos de ebulição e de difícil análise por cromatografia em fase gasosa. Esta cromatografia em coluna analítica mostrou-se eficiente para a separação e evidenciação dos componentes que apresentaram picos mais intensos nos cromatogramas das amostras, porém pouco eficiente em relação às outras substâncias dos mesmos extratos.

Póde-se verificar que os dois compostos, presentes em maior

intensidade nos cromatogramas dos extratos, sofrem considerável modificação à medida que a folha envelhece. Dos dois picos de maior intensidade, no cromatograma do extrato de folhas novas a substância que elui em temperatura mais elevada apresenta-se com área percentual maior que a do composto de menor tempo de retenção. No cromatograma do extrato de folhas velhas, esta situação inverte-se, e tal modificação pode estar relacionada com a resistência natural diferenciada dos dois tipos de folhas a fitopatógenos.

Na segunda etapa, a análise desenvolveu-se por cromatografia de fase gasosa em coluna capilar. A técnica mostrou-se bem mais eficiente. E, por meio dela, pôde-se concluir que existem compostos comuns aos dois tipos de folhas e outros, cuja presença se limita a apenas um dos extratos de folhas de cafeeiro.

A evidência de um pico mais intenso apenas no TIC do extrato de folhas velhas, no tempo de retenção de 37,21 min, permite concluir que a substância correspondente a ele caracteriza uma variação da composição química à medida que a folha envelhece. Sugere-se a identificação desta substância, bem como bioensaios, no sentido de relacioná-la com a resistência das folhas velhas do cafeeiro a fitopatógenos que sejam compatíveis com as folhas novas desta planta.

CAPITULO 2

IDENTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDARIOS EM FOLHAS DE CAFEIRO POR GC/MS

1. INTRODUÇÃO

O estudo da química do cafeeiro tem-se restringido praticamente às folhas e aos frutos. Estes últimos, por estarem diretamente envolvidos nos hábitos alimentares de muitos povos, têm atraído mais a atenção dos pesquisadores da área, preocupados em identificar as substâncias químicas responsáveis pela qualidade da bebida. Nesse sentido, a literatura é abundante em trabalhos relacionados com grãos armazenados, torrados e moídos, bem assim com o resultado da infusão do pó obtido.

Nos frutos do cafeeiro, já se identificaram hidrocarbonetos,

álcoois, cetonas, lactonas, fendis, piridinas e pirróis (STOFFELSMA et alii, 1968), bem como terpenóides e pirazinas (FRIEDEL et alii, 1971), esteróis (NAGASAMPAGI et alii, 1971) e E,2-nonenal (PARLIMENT et alii, 1973). entre outros compostos orgânicos.

POUCO se sabe a respeito das substâncias existentes em folhas de cafeeiro. Os trabalhos existentes restringem-se a compostos fendólicos, isolados por Cromatografia de Camada Fina (TLC), usando reveladores químicos ou, então, luz ultravioleta, com e sem vapores de amônia (AMORIM et alii, 1978).

HOLLOWAY et alii (1972) analisaram a cutina de folhas jovens e adultas do cafeeiro, mediante o uso de métodos espectrométricos, encontrando, como componentes predominantes, ácidos dihidroxidecânicos em várias estruturas isômeras. No entanto, esses pesquisadores não detectaram diferenças qualitativas na composição das duas idades de folhas.

Por intermédio de cromatografia de camada fina bidimensional, isolaram-se 41 compostos fendólicos, dos quais 32 eram comuns a folhas jovens e adultas do cafeeiro (AMORIM et alii, 1978). No entanto, essas análises relacionaram-se basicamente com uma possível associação entre compostos fendólicos e a resistência da planta a fitopatógenos.

Mais recentemente, OLIVEIRA (1988) concluiu que compostos fendólicos são prováveis participantes do mecanismo da resistência de folhas velhas a *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*, enquanto em folhas novas outros mecanismos de resistência devem estar envolvidos.

AMORIM *et alii* (1978) e OLIVEIRA (1988) não objetivaram a determinação das estruturas químicas dos compostos fendlicos envolvidos na resistencia das folhas a fitopatógenos, limitando-se a caracterizar o seu grupo funcional.

O uso de métodos espectrométricos tem facilitado a identificação de substâncias orgânicas. LAM e DRAKE (1973) identificaram seis poliacetilenos em raízes de *Senecio jacobaea*. MAZZA (1985), trabalhando com o sistema de acoplamento Cromatografia de Fase Gasosa/Espectrometria de Massa (GC/MS), isolou e identificou 154 compostos entre os constituintes voláteis do óleo essencial de rizomas de *Acorus calamus* L., dos quais 91 eram terpenos ou compostos terpenóides. Na batata-doce, identificaram-se 27 compostos responsáveis pelo aroma da raiz (TIU *et alii*, 1985).

Em folhas, é comum a presença de terpenos e compostos terpenóides. Analisando o óleo essencial de orégano, SENDRA e CUNAT (1980) identificaram 13 monoterpenos, 10 sesquiterpenos e 36 terpenóides oxigenados. O estudo do aroma do chá-preto indicou a presença de 287 compostos, dos quais 16 eram terpenos e 37 terpenóides (MICK e SCHREIER, 1984).

Também, em flores e frutos é comum a existencia de terpenos e terpenóides. Nas flores da malvácea *Hibiscus rosa-sinensis*, identificaram-se 18 desses compostos (NAKATANI *et alii*, 1986). enquanto em flores da cucurbitácea *Cucurbita maxima* Duchesne foram encontrados 31 deles (ANDERSEN, 1987). IDSTEIN e SCHREIER (1985a) identificaram 136 compostos nos voláteis da manga *Mangifera indica*, dos quais 32 eram terpenos. Por outro lado, 20

sesquiterpenos foram isolados e identificados no "flavor" do abacaxi (BERGER et alii, 1983).

FRIEDEL et alii (1971) postulam que compostos terpênicos e terpenóides são comuns a todos os órgãos de plantas, especialmente em seus óleos essenciais e "flavors". enquanto DIECKMANN e PALAMAND (1974) discutem a função do mirceno como precursor na formação desses compostos. Diante dessas evidências, é provável que também em folhas de cafeeiro estejam presentes tais substâncias, além daquelas já isoladas por AMORIM et alii (1978) e OLIVEIRA (1988).

O presente trabalho objetivou a identificação dos compostos orgânicos presentes nos extratos metanólicos de folhas novas e velhas de cafeeiro (*Coffea arabica* L.), usando dados cromatográficos e espectrométricos.

2. MATERIAL E METODOS

2.1. Análises por GC/MS

As análises dos padrões relacionados no Quadro 1A, bem como dos extratos metanólicos de folhas novas e velhas do cafeeiro, foram feitas em cromatógrafo de fase gasosa, acoplado a um espectrômetro de massa, quadrupolar Hewlett-Packard, modelo 5996A, equipado com um sistema de processamento de dados RTE-VIUM e um minicomputador Hewlett-Packard 1000 E. A fragmentação dos espectros de massa foi obtida por impacto de elétrons (IE), a 70 eV.

Usaram-se colunas capilares. A e B, nas seguintes condições operacionais:

Coluna A: BP-20, espessura do filme = 0,25 μ , "bonded phase" tipo WCOT (Wall Coated Open Tubular) de 25 m \times 0,32 mm (d.i.), de sílica fundida. Gás de arraste He, 1 ml. min⁻¹ "splitter", na

razão de 1:30. Temperaturas do injetor, fonte iônica, analisador e linha de transferência de 280 °C. Coluna: 170 °C isotérmica por um minuto e então programada na razão de 4 °C . min⁻¹ até 210 °C, permanecendo isotérmica por 10 minutos. Injeção do tipo "on column". com seringas cromatográficas marca HAMILTON Co. (USA). de 10 µl. O Volume injetado foi padronizado em 1 µl.

Coluna B: BP-1, espessura do filme = 0,5µ, "bonded phase" tipo WCOT, de 25 m x 0.33 mm (d.i.), de sílica fundida. Gás de arraste e "splitter", nas mesmas condições anteriores. Temperatura do injetor: 300 °C: fonte iônica, analisador e linha de transferência de 280 °C. Coluna: 150 °C, isotérmica por um minuto e então programada na razão de 2 °C . min⁻¹ até 300 °C, permanecendo isotérmica por um minuto. Volumes injetados de um µl, com seringas cromatográficas HAMILTON Co. (USA) de 10 µl.

2.2. Preparação dos Padrões para Análise POL GC/MS

Pesaram-se 10 mg de cada fenol, escolhido como padrão, fazendo a dissolução em metanol bidestilado até um volume de 0,5 ml. Obteve-se, assim, uma solução de concentração de 20 µg . ml⁻¹, que foi cromatografada em Coluna A.

Para os padrões derivatizados, pesaram-se 4 mg de cada fenol, sendo essa massa transferida para um frasco de fundo cônico, dotado de tampa rosqueável. Acrescentaram-se a essa massa 100 µl de BSA (SIGMA). sendo a mistura aquecida a 75 °C, durante 15 minutos. e depois resfriada à temperatura ambiente. para análises em Coluna B (CASTEELE et alii, 1976).

2.3. Preparação dos Extratos de Folhas de Cafeeiro para Análise por GC/MS

O extrato metanólico (80%), de folhas novas e velhas, foi inicialmente cromatografado em placa de TLC, usando-se o sistema de solventes n-hexano-éter etílico - metanol (40 : 40 : 20 v/v). Após a corrida cromatográfica, as placas foram reveladas em câmara de luz ultravioleta e as manchas, extraídas com o mesmo sistema de solventes. Evaporaram-se os solventes em corrente de nitrogênio seco, e o resíduo foi ressuscendido em metanol bidestilado, para posterior análise em Coluna A. Parte desse resíduo obtido foi derivatizado com 100 µl de BSA (SIGMA), para posterior análise em Coluna B.

2.4. Interpretação dos Espectros de Massa

A interpretação dos espectros de massa, dos compostos separados dos extratos metanólicos de folhas novas e velhas de cafeeiro, foi feita do seguinte modo:

- a) Exame das características gerais de cada espectro;
- b) determinação da massa molecular;
- c) determinação da fórmula molecular, com apoio do sistema de dados do espectrômetro de massa;
- d) análise mecanística e comparação com os espectros dos padrões escolhidos; e
- e) comparação dos picos de maior intensidade dos espectros de massa obtidos dos extratos, com os picos mais abundantes de

hidrocarbonetos (Quadro 2A), cetonas, ésteres e epóxidos (Quadro 3A) e aldeídos (Quadro 4A), todos com fragmentação semelhante.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Escolha dos Padrões

Os principais compostos presentes nos extratos metandlicos de folhas novas e velhas de cafeeiro podem ser fendis (AMORIM et alii. 1978; OLIVEIRA, 1988). Por essa razão, escolheram-se vários tipos representativos dessas substâncias como padrões.

A escolha foi feita tomando por base o número de funções fenólicas, distinguindo-se, sempre que possível, os diferentes isômeros estruturais. Levou-se, também, em consideração seu número de núcleos aromáticos e não-aromáticos, com a inclusão de alguns flavonóides. Finalmente, escolheram-se fendis com pontos de fusão próximos e distantes. Para uma comparação mais exata, principalmente em relação à eluição dos compostos em coluna cromatográfica capilar. No Quadro 1A, relacionam-se os 28 padrões escolhidos, com base nos critérios mencionados anteriormente, incluindo seus tempos de retenção, pesos moleculares e pontos de

fusão.

3.1.1. Espectrometria de Massa dos Padrões

O espectro de massa dos fenóis apresenta um íon molecular $[M]^+$ bastante intenso e com perda de hidrogênio ($M-1$), estando a fragmentação mais importante associada à perda de 28 unidades de massa, correspondentes à eliminação de monóxido de carbono. No fenol, a perda de CO ocorre a partir de uma cicloexadienona, formada intermediariamente para dar o íon $M-28$. O fragmento $H-28$ costuma ser acompanhado de uma espécie de reduzida abundância ($M-29$), correspondente à perda de $[CHO]^+$. O resultante final é o cátion ciclopentadienila, m/z 65 (BUDZIKIEWICS et alii, 1967).

Os fenóis metilados apresentam, também, picos $M-1$ bastante intensos, devido à formação do íon hidroxitropílico. No entanto, a intensidade da espécie $M-1$ é baixa nos espectros de dimetilfenóis, em virtude do pico $M-CH_3$. Assim, a importância dos íons $M-28$ e $M-29$ é reduzida nos fenóis metilados e naqueles com maior cadeia alquílica, onde a perda do fragmento alquílico ocorre mais rapidamente que o hidrogênio alfa (SILVERSTEIN et alii, 1981; DORING et alii, 1985).

Os espectros de massa dos flavonóides apresentam características peculiares para cada grupo, em virtude de suas estruturas diferenciadas. BALZA et alii (1988), trabalhando com diidroflavonóis e depois de promoverem a deuteração dos grupos hidroxila fenólicos, encontraram como fragmento típico o íon

+
 [M - 57] . Esta espécie foi derivada do íon molecular, depois da migração de um radical hidrogênio do HO-C-3 para C-2 e da perda de [O=C=C-OH] . Por outro lado, o fragmento [M - 433]⁺ mostrou-se característico de flavanonas, devido à perda de ceteno e radical hidrogênio.

Ao se promover a primeira análise espectrométrica dos 28 padrões escolhidos, somente 10 deles eluíram para o espectrômetro de massa quando se utilizou a coluna A. Como esta coluna é adequada para análises cromatográficas de substâncias polares e os compostos fenólicos analisados eram dotados de polaridade relativamente grande, pôde-se deduzir que outros fatores, além da polaridade, estavam influenciando nos resultados.

Gabe-se que o ponto de ebulição dos compostos fenólicos é relativamente elevado. As condições do instrumento, adequadas à Coluna A, não permitiam a elevação da temperatura do injetor acima de 280 °C e a da coluna além de 220 °C. Estes fatores podem ter influído na não-eluição dos padrões restantes.

A análise desses resultados conduziu a uma derivatização dos padrões, com o objetivo de obter a eluição de todos eles e facilitar as comparações com os extratos de folhas novas e velhas.

No Quadro 1, mostram-se os tempos de retenção, os íons [M]⁺ e o padrão de fragmentação dos fendis que eluíram em Coluna A. Uma primeira análise desse quadro pode ser feita pela observação dos picos mais abundantes dos ácidos fenólicos, isômeros estruturais, 2,4-diidroxibenzóico (beta-resorcílico), 3,4-diidroxibenzóico (protocatequínico) e 2,5-diidroxibenzóico (gentísico). Para

c

QUADRO i - Tempos de Retenção, Ions [M]. e Padrão de Fragmentação de Fendis. Obtidos em Coluna A

NÚMERO	PADRÕES	RT*	+ [M].	PADRÃO DE FRAGMENTAÇÃO					
				m/z (ABUNDÂNCIA RELATIVA) (%)					
01	2,6-diterbutil-4-metilfenol (BHT)	03,96	228	205 (100)	57 (38)	41 (30)	220 (22)	145 (16)	
e2	4-hidroximetil-2,6-di-t-butilfenol	06,34	236	45 (100)	41 (50)	32 (41)	57 (25)	31 (26)	
e3	R. 4-hidroxi-3-metoxicinâmico (Ác. ferúlico)	07,97	194	77 (100)	135 (100)	107(86)	150 (71)	39 (59)	
04	2,3-diterbutil-4-metoxifenol (BHA)	11,66	236	165 (100)	137 (83)	100 (44)	39 (22)	77 (22)	
05	4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído (Vanilina)	13,23	152	151 (100)	81 (98)	152 (89)	53 (77)	51 (72)	
96	Ác. 3,4-diidroxibenzóico (Ác. protocatequínico)	16,24	154	110 (100)	45 (100)	64 (89)	63 (59)	53 (49)	
e7	1,2-diidroxibenzeno (catecol)	20,51	116	110 (100)	64 (49)	63 (28)	53 (21)	81 (19)	
08	4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzaldeído (siringaldeído)	25,37	182	39 (100)	182 (68)	51 (65)	45 (61)	53 (58)	
09	R. 2,5-diidroxibenzóico (Ác. gentísico)	27,80	154	110 (100)	45 (86)	53 (74)	39 (62)	55 (57)	
16	R. 2,4-diidroxibenzóico (Ác. B-resorcílico)	32,16	154	110 (100)	39 (54)	82 (48)	53 (46)	81 (39)	

RT* = Tempo de retenção.

+

[M]. = Ion molecular.

estes compostos. o pico base é representado pelo fragmento m/z 110. como os três compostos têm o mesmo ion molecular, m/z 154, percebe-se que não são relevantes e nem aparecem nos espectros as espécies H - i dos três ácidos. Além disso. o pico m/z 110, de abundância relativa 100% nos três compostos (Figura 1), corresponde à perda de 44 unidades de massa. o que sugere uma eliminação de CO₂.

Já o espectro do siringaldeído (4-hidroxi-3,5-dimeto-

xibenzaldeído) apresenta padrão de fragmentação bastante diferente. O pico-base, neste caso, corresponde ao íon fragmento m/z 39, sendo também abundante o pico m/z 182 [M]. Isto sugere

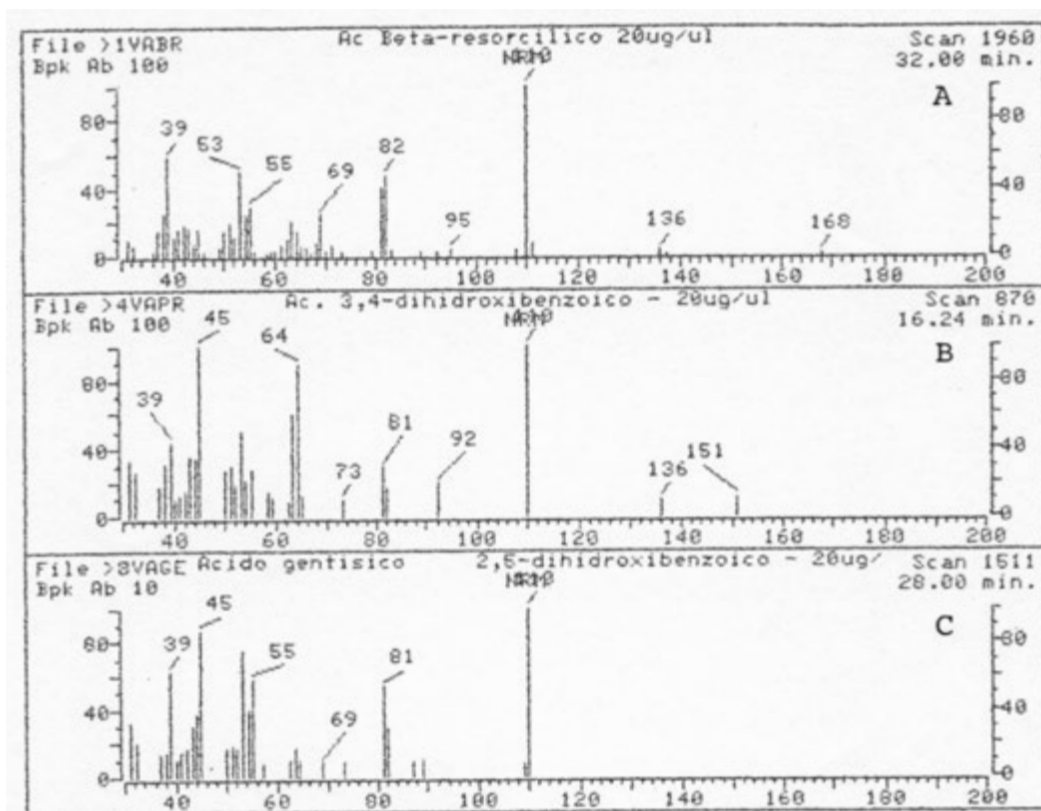


FIGURA 1. Espectros de Massa de Três Ácidos Fenólicos Isômeros, Cromatografados em Coluna A. (A) Ácido B-Resorcílico, (B) Ácido Protocatequínico e (C) Ácido Gentísico.

que a simples presença do grupo hidroxila no anel aromático não padroniza a fragmentação nos espectros de massa dos compostos fenólicos. Além disso, pela comparação dos espectros do siringaldeído e da vanilina, pode-se deduzir que nos aldeídos fenólicos o íon molecular está sempre presente, o mesmo acontecendo com a espécie $M-1$.

3.1.2. Espectrometria de Massa dos Padrões Derivatizados

A derivatização com BSA é uma técnica que permite transformar as substâncias não-voláteis e as termicamente instáveis em éteres trimetilsilanizados, os quais apresentam polaridade e pontos de ebulição mais baixos que os respectivos compostos originais. Com a derivatização, podem ser analisados no sistema de acoplamento GC/MS os compostos flavonóides fenólicos, os quais passam a apresentar, após a reação, volatilidades bastante acentuadas e coerentes com as temperaturas alcançadas pelos injetores e colunas cromatográficas capilares (CASTEELE et alii, 1976).

O reagente BSA comprovou sua eficiência satisfatória para a derivatização dos fendis escolhidos como padrões, em decorrência do reduzido tempo de reação e da baixa temperatura exigida. Com esta técnica, pôde-se obter o espectro de massa de 27, dos 28 padrões escolhidos, apresentados no Quadro 1A.

No Quadro 2, apresentam-se os picos mais intensos, em ordem decrescente da porcentagem de abundância relativa, dos espectros de massa, obtidos em Coluna B. Esta coluna mostrou-se bastante adequada à análise, permitindo a eluição de 27 dos 28 compostos fendílicos escolhidos como padrões. Uma análise individual desses fendis mostra um acréscimo de 73 u.m.a. para cada grupo hidroxila derivatizado, o que corresponde exatamente a um grupo $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$. A reação geral de derivatização dos fendis mostrada no Quadro 2 pode ser vista também na Figura 1A.

QUADRO 2 - Espectros de Massa de 28 Compostos Fenólicos Derivati-
zados, Cromatografados em Coluna B

COMPOSTOS	RT*	ION + [M].	PADRÃO DE FRAGMENTAÇÃO				
			m/z (ABUNDANCIA RELATIVA) (%)				
Catecol	08,49	254	73 (100)	45 (26)	254 (9)	74 (8)	151 (6)
B.H.T.	14,50	292	205 (100)	57 (50)	41 (34)	220 (22)	145 (17)
B.H.A.	14,51	252	73 (100)	237 (48)	45 (27)	252 (26)	41 (9)
Vanilina	14,81	224	194 (100)	193 (48)	209 (40)	73 (28)	45 (28)
Pirogalol	15,00	342	73 (100)	239 (54)	45 (32)	342 (17)	133 (12)
t-butilidroquinona	17,98	310	73 (100)	295 (41)	310 (35)	45 (30)	207 (13)
Ác. p-hidroxibenzóico	17,99	282	73 (100)	267 (65)	223 (63)	193 (49)	45 (34)
Floroglucinol	18,99	342	73 (100)	327 (46)	342 (43)	45 (29)	343 (14)
Siringaldeído	28,88	254	224 (100)	73 (76)	45 (56)	59 (42)	239 (32)
Ác. vanílico	23,01	312	73 (100)	45 (38)	126 (23)	223 (22)	267 (21)
Ác. gentísico	23,99	376	73 (100)	355 (58)	45 (31)	356 (18)	357 (9)
Ác. 3,4-diidroxiben- zóico	24,81	370	73 (100)	45 (33)	193 (29)	74 (9)	137 (6)
Ác. 3-(p-hidroxifenil) propiónico	24,02	310	179 (100)	73 (86)	192 (77)	75 (36)	45 (31)
Ác. B-resorcílico	26,00	370	73 (100)	355 (36)	45 (29)	356 (11)	74 (8)
Ác. A-resorcílico	26,50	370	73 (100)	45 (26)	370 (24)	355 (24)	147 (14)
Umbeliferona	27,00	234	219 (100)	163 (99)	73 (82)	234 (73)	45 (55)
Ác. siríngico	29,01	342	73 (100)	45 (33)	327 (33)	312 (31)	297 (27)
4-hidroximetil-2,6-di- terbutilfenol	32,49	380	73 (100)	203 (28)	75 (19)	45 (18)	57 (15)
Ác. gálico	33,50	458	73 (100)	281 (71)	458 (35)	45 (27)	282 (17)
T.H.B.P.	34,22	412	73 (100)	45 (28)	397 (22)	43 (11)	398 (8)
Ác.E-3,4-dimetoxici- nâmico	34,99	280	191 (100)	73 (44)	280 (43)	75 (39)	265 (38)
Galato de propila	36,68	428	73 (100)	281 (42)	428 (27)	45 (24)	239 (21)
Ác. ferúlico	37,64	338	73 (100)	45 (36)	75 (29)	338 (19)	59 (17)
Esculetina	40,00	322	73 (100)	45 (31)	322 (18)	307 (15)	74 (8)
1,8-diidroxiantra- quinona	56,50	384	369 (100)	73 (72)	45 (34)	370 (31)	371 (12)
Naringenina	69,00	488	73 (100)	545 (50)	546 (24)	45 (17)	547 (12)
Morina	72,00	662	73 (100)	647 (53)	648 (30)	649 (17)	45 (15)
Curcumina	-----	512	não eluiu no GC/MS				

RT* = Tempo de retenção.

Na Figura 2, mostram-se os espectros de massa de seis, dos 28 fendis derivatizados, com o pico-base m/z 73. Observa-se, ainda, que o íon molecular aparece em abundância apreciável, o que sugere uma alteração considerável no padrão de fragmentação do composto original, em relação ao seu derivado. Esta alteração torna-se mais visível ao comparar espectros de fendis; não-derivatizados com outros, dos mesmos padrões, após a derivatização (Figura 3).

3.2. Espectrometria de Massa dos Extratos de Folhas Novas e Velhas de Cafeeiro

Quando promoveu a análise espectrométrica dos extratos metanólicos de folhas novas e velhas, no sistema de acoplamento GC/MS em Coluna A, não se obteve um cromatograma total de íons possível de ser analisado. Isto sugere uma provável incompatibilidade entre os compostos presentes nos extratos, com a fase polar da coluna, ou uma não-otimização física do sistema com os extratos. Tal resultado também está em desacordo com os dados obtidos por AMORIM et alii (1978), em que estes autores prevêm a existência de uma série de compostos polares, entre eles fendis e flavonóides, nos extratos de folhas de cafeeiro.

Uma outra dedução que pode ser tirada do comportamento da amostra perante a Coluna A é que os componentes do extrato são de substâncias dotadas de elevados pontos de ebulição. Desse modo, são difíceis de serem volatilizadas na temperatura alcançada pelo injetor do instrumento.

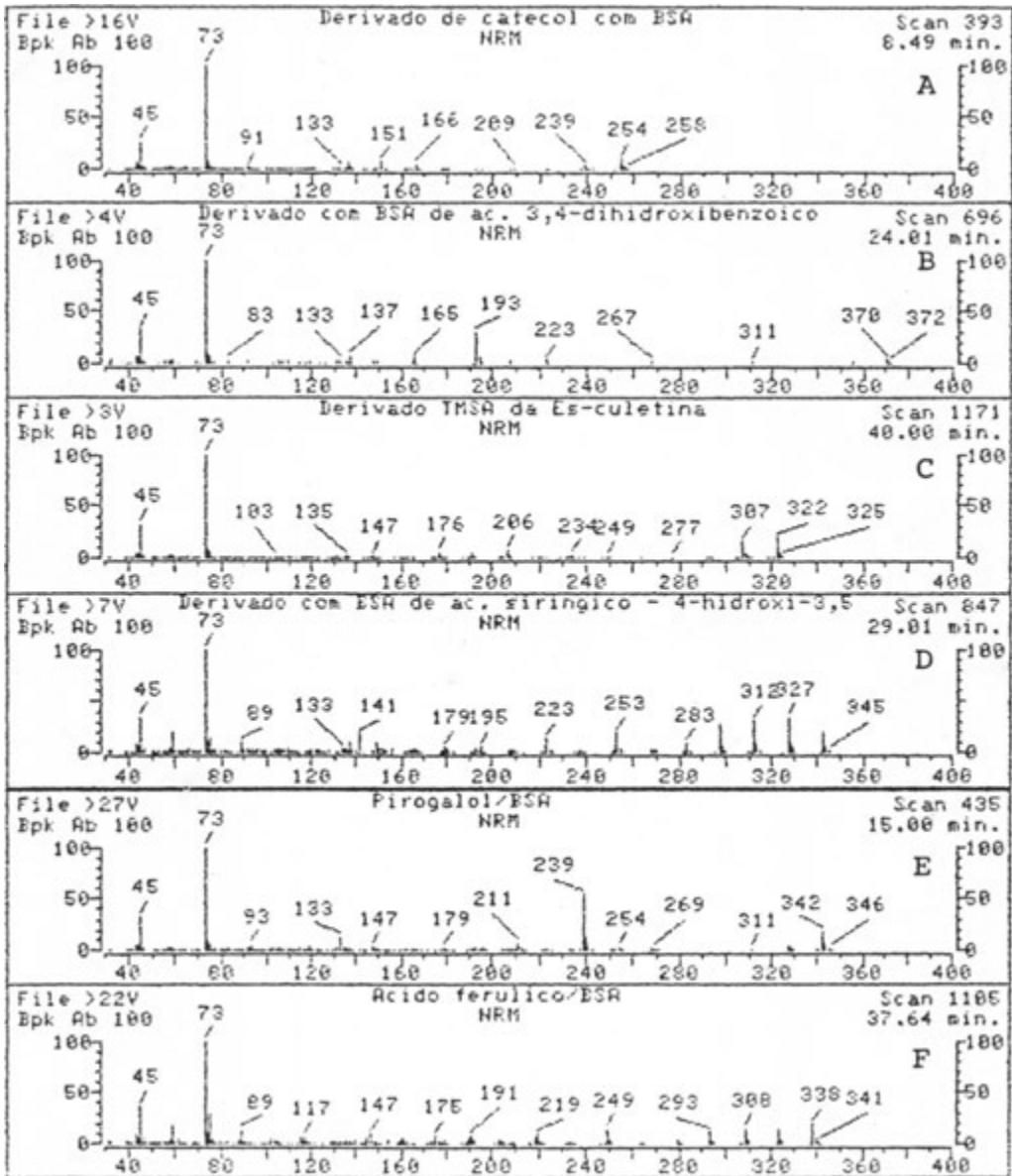


FIGURA 2 - Espectros de Massa de Fendis Derivatizados, Cromatografados em Coluna B. (A) Catecol, (B) Ác. Protocatequínico, (C) Esculetina, (D) Ác. Sirfínico, (E) Pirogalol F (F) Ác. Ferúlico.

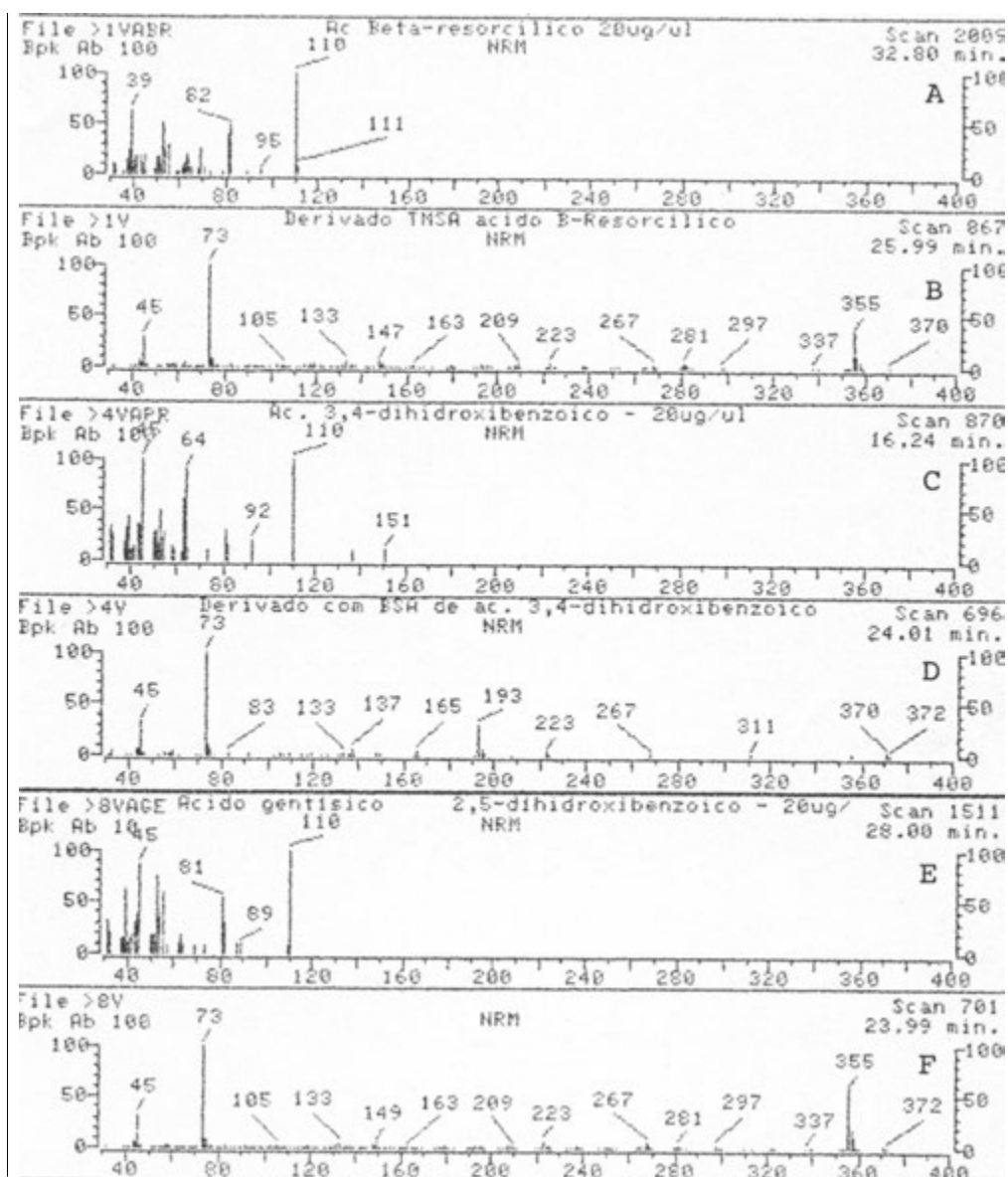


FIGURA 3 - Comparação dos Espectros de Massa dos Fendis Não - Derivatizados com os Derivatizados, Cromatografados em Colunas A e B, Respectivamente.

(A) Ac. B-Resorçílico, (B) Derivado BSA de (A),
 (C) Ac. Protocatequínico, (D) Derivado BSA de
 (C), (E) Ac. Gentísico e (F) Derivado BSA de (E).

Quando se utilizou a coluna B, os extratos de folhas novas e velhas do cafeeiro foram derivatizados. Obtiveram-se assim os respectivos cromatogramas totais de íons dos extratos derivatizados (Figuras 4 e 5).

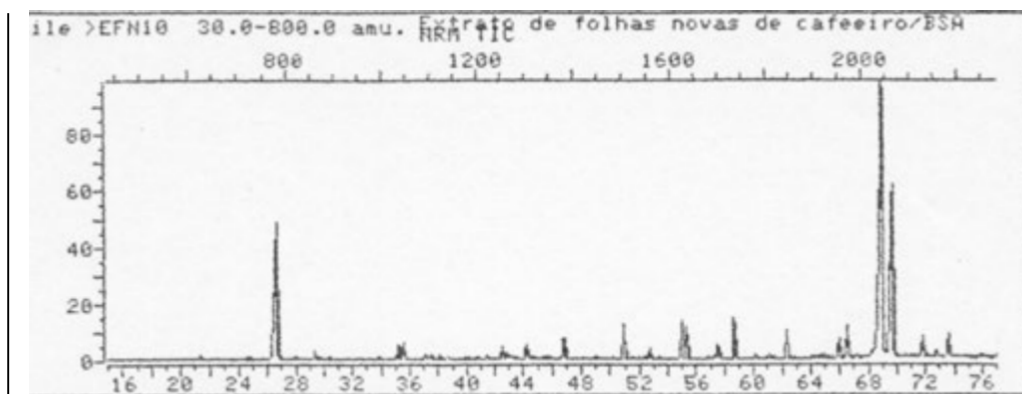


FIGURA 4 - Cromatograma Total de Íons do Extrato Derivatizado de Folhas Novas de Cafeeiro.

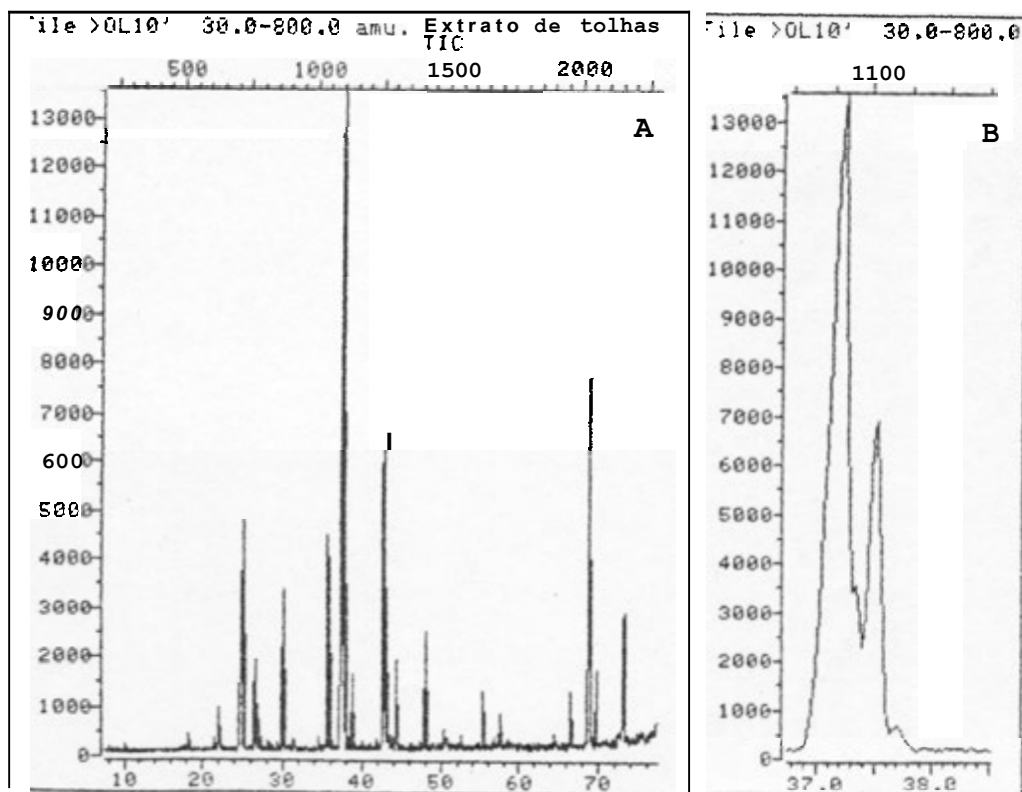


FIGURA 5 - (A) Cromatograma Total de Íons do Extrato Derivatizado de Folhas Velhas de Cafeeiro e (B) "Zoom" do Pico a 37.21 min.

OS espectros de massa, obtidos dos compostos presentes nos TIC dos extratos de folhas novas e velhas, são apresentados nos Quadros 3 e 4, com os picos mais intensos em ordem decrescente de abundância relativa.

Uma primeira vista do Quadro 3 permite inferir que apenas 12 componentes do extrato de folhas novas de cafeeiro podem corresponder a compostos hidroxilados (álcoois ou fendis), uma vez que em somente 12 espectros aparece o pico m/z 73 característico do fragmento $[\text{Si}(\text{CH}_3)_3]^+$ (SHARKEY Jr et alii, 1957). Já o extrato de folhas velhas mostra a presença de 10 compostos com fragmento m/z 73. Na Figura 2A, apresenta-se um modelo de fragmentação de trimetilsililéter.

3.3. Relação Extratos/Resistência

Tanto os extratos de folhas novas quanto os de folhas velhas foram analisados por cromatografia de fase gasosa após a extração em TLC preparativa. Para esta última operação, determinaram-se previamente, as R_f s a partir da atividade antimicrobiana testada contra *Trichlaviopsis paradoxa*, por intermédio de bioautografia.

A comparação dos cromatogramas totais de ions do extrato de folhas velhas e novas mostra que o pico no tempo de retenção de 37.21 min não tem correspondente em folhas novas (Figuras 4 e 5). Quando promove o "Zoom" do Cromatograma da Figura 5 (A), verifica-se que o pico a 37.21 min corresponde a dois componentes, eluindo o segundo a 37.51 min, como se observa na Figura 5 (B).

QUADRO 3 – Espectros de Massa do Extrato Derivatizado de Folhas Novas de Cafeeiro

COMPOSTO	TEMPO DE RETENÇÃO	PADRÃO DE FRAGMENTAÇÃO					
		m/z (ABUNDANCIA RELATIVA) (%)					
01	18.15	32 (100)	73 (33)	43 (20)	40 (20)	207 (17)	57 (16)
02	21,40	32 (100)	41 (32)	57 (31)	43 (30)	97 (21)	55 (15)
03	24.55	32 (100)	67 (29)	55 (25)	40 (16)	42 (16)	82 (14)
04	24.81	32 (100)	43 (44)	41 (39)	57 (30)	71 (18)	55 (16)
05	26.42	149 (100)	57 (72)	41 (67)	56 (21)	76 (20)	39 (19)
06	29,34	58 (100)	32 (57)	43 (19)	41 (16)	57 (12)	55 (9)
07	35.20	43 (100)	149 (45)	71 (44)	41 (42)	32 (38)	55 (27)
08	35,50	73 (100)	43 (86)	75 (75)	41 (61)	32 (53)	55 (43)
09	41.49	32 (100)	41 (53)	57 (43)	43 (41)	149 (29)	55 (27)
10	42.58	43 (100)	57 (77)	41 (56)	32 (47)	55 (35)	71 (30)
11	42,83	32 (100)	41 (63)	73 (51)	55 (51)	43 (50)	75 (46)
12	44.11	73 (100)	43 (97)	75 (75)	32 (73)	41 (67)	55 (50)
13	46,72	43 (100)	57 (75)	41 (50)	71 (36)	55 (28)	32 (26)
14	50,81	43 (100)	57 (79)	41 (47)	71 (36)	55 (26)	32 (23)
15	52,62	32 (100)	43 (76)	73 (58)	146 (40)	41 (49)	57 (34)
16	54,83	43 (100)	57 (82)	41 (41)	71 (37)	55 (28)	85 (19)
17	55,30	41 (100)	43 (98)	57 (97)	149 (84)	55 (45)	71 (44)
18	57.44	73 (100)	57 (32)	32 (23)	41 (12)	45 (12)	75 (9)
19	58,65	43 (100)	57 (79)	41 (42)	71 (37)	55 (25)	85 (20)
20	60,15	32 (100)	43 (36)	44 (28)	73 (24)	41 (24)	146 (17)
21	62,36	43 (100)	57 (77)	71 (35)	41 (35)	55 (25)	32 (19)
22	65,95	43 (100)	57 (82)	41 (40)	71 (35)	32 (34)	55 (29)
23	66,52	69 (100)	41 (59)	81 (35)	32 (17)	68 (15)	67 (12)
24	68,80	73 (100)	368 (18)	355 (8)	179 (8)	74 (8)	45 (8)
25	69.54	73 (100)	368 (22)	43 (8)	74 (8)	355 (8)	45 (8)
26	71.71	73 (100)	283 (13)	45 (13)	32 (12)	74 (8)	75 (8)
27	72.79	43 (100)	57 (76)	32 (70)	41 (49)	44 (43)	73 (41)
28	73.59	73 (100)	45 (13)	283 (11)	32 (11)	74 (9)	44 (8)

Os espectros obtidos dos dois picos (Figura 6) mostraram que os compostos correspondentes a eles não são fenóis, nem álcoois, uma vez que não se encontrou o pico m/z 73, característico da derivatização com BSA (Quadro 5).

QUADRO 4 - Espectros de Massa do Extrato Derivatiado de Folhas Velhas de Cafeeiro

COMPOSTO	TEMPO DE RETENÇÃO	PADRÃO DE FRAGMENTAÇÃO					
		m/z (ABUNDANCIA RELATIVA) (%)					
01	18,18	32 (100)	73 (45)	41 (38)	75 (35)	43 (28)	57 (17)
82	21,40	32 (100)	41 (42)	57 (35)	43 (31)	97 (25)	55 (25)
83	21,80	32 (100)	43 (82)	41 (77)	55 (60)	56 (59)	57 (49)
84	24,58	67 (100)	55 (77)	42 (55)	109 (53)	82 (46)	40 (31)
05	26,32	43 (100)	32 (92)	41 (75)	57 (60)	149 (49)	58 (35)
86	26,69	32 (100)	73 (80)	43 (69)	75 (61)	41 (52)	55 (29)
07	29,77	74 (100)	43 (87)	41 (69)	87 (50)	55 (46)	32 (26)
08	35,57	73 (100)	43 (83)	75 (81)	41 (69)	117 (46)	55 (43)
89	37,21	41 (100)	67 (81)	55 (76)	81 (47)	54 (41)	43 (36)
10	37,51	41 (100)	55 (87)	43 (69)	69 (39)	74 (37)	54 (26)
11	38,65	74 (100)	43 (98)	32 (87)	41 (85)	55 (57)	87 (56)
12	42,67	75 (100)	73 (97)	41 (88)	67 (72)	55 (66)	32 (40)
13	42,93	73 (100)	41 (98)	75 (95)	55 (86)	43 (73)	32 (56)
14	44,11	73 (100)	43 (94)	75 (72)	41 (63)	32 (62)	55 (42)
15	47,82	43 (100)	99 (58)	41 (49)	55 (44)	32 (36)	57 (36)
16	55,23	57 (100)	43 (96)	41 (88)	32 (77)	149 (59)	55 (44)
17	57,44	73 (100)	32 (54)	57 (31)	45 (17)	41 (17)	44 (15)
18	66,45	69 (100)	41 (58)	32 (45)	81 (30)	68 (16)	44 (15)
19	68,56	73 (100)	368 (9)	45 (9)	74 (8)	75 (6)	179 (5)
20	69,40	73 (100)	32 (19)	368 (16)	44 (12)	45 (11)	74 (9)
21	72,91	43 (100)	73 (93)	57 (41)	41 (38)	55 (31)	223 (15)

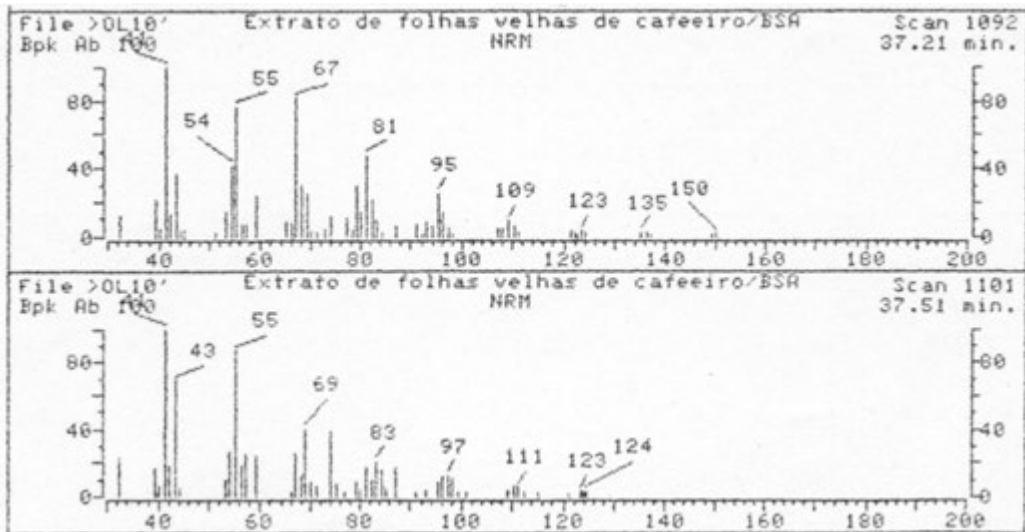


FIGURA 6. Espectros de Massa dos Compostos Referentes aos Tempos de Retenção de 37,21 e 37,51 min.

QUADRO 5 - Espectros de **Massa** dos **Picos**. nos Tempos de **Retenção** de 37,21 e 37.51 min , do Extrato de **Folhas Velhas** de Cafeeiro

TEMPO DE RETENÇÃO	PADRÃO DE FRAGMENTAÇÃO				
	m/z (ABUNDÂNCIA RELATIVA) (%)				
37,21	41 (100)	67 (81)	55 (76)	81 (47)	54 (41)
	43 (36)	79 (29)	75 (25)	69 (24)	
37,51	41 (100)	55 (87)	43 (69)	69 (39)	74 (37)
	54 (26)	57 (25)	59 (24)	67 (24)	32 (23)

A comparação do pico de 37.21 min do Quadro 5 com os dados dos Quadros. 2.4, 3.4 e 4.4 **sugere** a presença de **um** terpeno. em decorrência da existência do pico-base m/z 41, característico de **um** rearranjo de McLafferty (Figura 3.4). **com** a formação da espécie $C_{10}H_{16}$ (Quadro 6).

QUADRO 6 - Comparação do Pico de 37.21 min com os Dados dos Quadros 2A, 3A e 4A

COMPOSTO	PADRÃO DE FRAGMENTAÇÃO				
	m/z (ABUNDÂNCIA RELATIVA) (%)				
37,21	41 (100)	67 (81)	55 (76)	81 (47)	54 (41)
Octadecatrieno	41 (100)	55 (68)	43 (63)	67 (61)	81 (44)
Nonadecatetraeno	41 (100)	55 (69)	43 (57)	67 (34)	79 (26)
A-Selineno	41 (100)	55 (68)	93 (63)	81 (61)	67 (44)
Epóxido de limoneno	41 (100)	67 (82)	55 (55)	81 (42)	94 (42)
B-Selineno	41 (100)	93 (52)	55 (38)	67 (38)	79 (36)

Outros fatores que sugerem a presença de um terpeno são: presença dos picos m/z 55 e 67, abundância de picos com intervalos de 14 unidades de massa e m molecular pouco distinto (SILVERSTEIN et alii, 1981).

A semelhança do pico de 37.21 min com o espectro do epóxido de limoneno (Quadro 6) indica, também, a possibilidade de esse composto estar presente em folhas velhas. muito embora o padrão de fragmentação apresentado não coincida com o proposto por BUDZIKIEWICZ et alii (1967).

Comparando os dados espectrais do pico de 37.51 min com os dos Quadros 2A, 3A e 4A, pode-se inferir a possível existência de um hidrocarboneto ou um composto carbonílico, presumivelmente um aldeído ou uma cetona, em função do padrão de fragmentação apresentado (Quadro 7).

QUADRO 7 - Comparação do Pico de 37.51 min com os Dados dos Quadros 2A, 3A e 4A

COMPOSTO	PADRÃO DE FRAGMENTAÇÃO				
	m/z (ABUNDÂNCIA RELATIVA (%))				
37.51	41 (100)	55 (87)	43 (69)	69 (39)	74 (37)
Octadecadieno	41 (100)	55 (98)	43 (84)	69 (34)	83 (18)
(E)-3-Hexenal	41 (100)	55 (71)	69 (53)	39 (52)	83 (36)
2-Etilciclobutanona	41 (100)	55 (96)	42 (78)	70 (72)	56 (52)
(E)-2-Undecenal	41 (100)	70 (94)	57 (89)	43 (82)	55 (80)
(E)-3-Hexenoato de butila	41 (100)	57 (43)	69 (28)	68 (24)	55 (21)

O pico m/z 43, com abundância relativamente grande, é característico da fragmentação de aldeídos, em clivagem beta, sem transferência de hidrogênio, em que a carga permanece com um fragmento alquílico de fórmula geral $C_n H_{2n+1}$ (BUDZIKIEWICZ et alii, 1967).

Esse pico m/z 43 é também característico da fragmentação de cetonas e metilcetonas, em clivagem alfa, originado do fragmento $[CH_2=C=O]^+$ (SILVERSTEIN et alii, 1981).

3.4. Determinação de Estruturas com Apoio do Sistema de Dados do Espectrômetro de Massa

O sistema de dados do espectrômetro de massa compara espectros contidos em sua biblioteca com os obtidos para cada componente do Extrato separado.

No extrato de folhas novas, bem como no de folhas velhas de cafeeiro, como se pode depreender da análise dos Quadros 3 e 4, os compostos não são, em sua maioria, constituídos de derivatizados, em razão da ausência do pico m/z 73. Além disso, inúmeras substâncias são comuns aos dois tipos de folhas. Na Figura 7, mostra-se um desses casos, bem como a comparação com o espectro da biblioteca do instrumento. Como se pode ver, são coincidentes os picos m/z 194 (M⁺), 67 (100), 55 (77), 42 (55), 109 (53), 82 (46) e 40 (31), para folhas velhas e novas. A análise comparativa desses espectros com os da biblioteca permite sugerir tratar-se de mesmas substâncias, com grande probabilidade de ser

a cafeína, substância descrita até agora como presente apenas nos grãos. em café.

Quanto aos picos de 37.21 e 37.51 min, a comparação de seus espectros (Figura 6) com os da biblioteca (Quadro 8) permite sugerir a presença de um éster ou aldeído correspondente ao pico de 37,21 min e de um hidrocarboneto para o pico de 37,51 min.

QUADRO 8 - Comparação dos Picos de 37.21 e 37,51 min com o Sistema de Dados do Espectrômetro de Massa

COMPOSTOS	* PROBABILIDADE (%)	PADRÃO DE FRAGMENTAÇÃO m/z (ABUNDÂNCIA RELATIVA) (%)					
37,21		41 (100)	67 (81)	55 (76)	81 (47)	54 (41)	43 (36)
Z,Z-9,12-Octadecadienoato de metila	83	41 (100)	67 (100)	81 (73)	79 (41)	54 (40)	95 (38)
9,12-Octadecadienal	76	41 (100)	67 (70)	81 (38)	54 (37)	68 (23)	79 (22)
E,E-9,12-Octadecadienoato de metila	66	41 (100)	67 (82)	79 (35)	54 (27)	59 (27)	95 (27)
37,51		41 (100)	55 (87)	43 (69)	69 (39)	74 (37)	54 (26)
5-Metil-1-hexeno	60	56 (100)	41 (69)	55 (50)	57 (41)	43 (30)	70 (22)
7-Metil-3,4-octadieno	48	67 (100)	81 (57)	39 (45)	53 (36)	82 (34)	68 (77)
3,4-Dimetil-1-penteno	37	56 (100)	55 (75)	70 (62)	43 (61)	41 (52)	83 (15)

* Biblioteca Wiley do Sistema HP - 1000E RTE - 6 VM.

3.5. Flavonóides e Cumarinas Fenólicas Derivatizadas

A comparação dos Quadros 3 e 4 com o Quadro 2 sugere a existência de flavonóides e, provavelmente, cumarinas fenólicas

nos extratos de folhas novas, em virtude da fragmentação dos picos nos tempos de retenção de 57,44, 68,80, 69.54, 71.71, e 73,59 min (Figura 8), e nos de folhas velhas, nos tempos de 68.56 e 72.91 min (Figura 9). No extrato de folhas novas, aparecem mais compostos flavonóides e cumarinas fenólicas, o que sugere uma alteração na composição química das folhas, à medida que elas envelhecem.

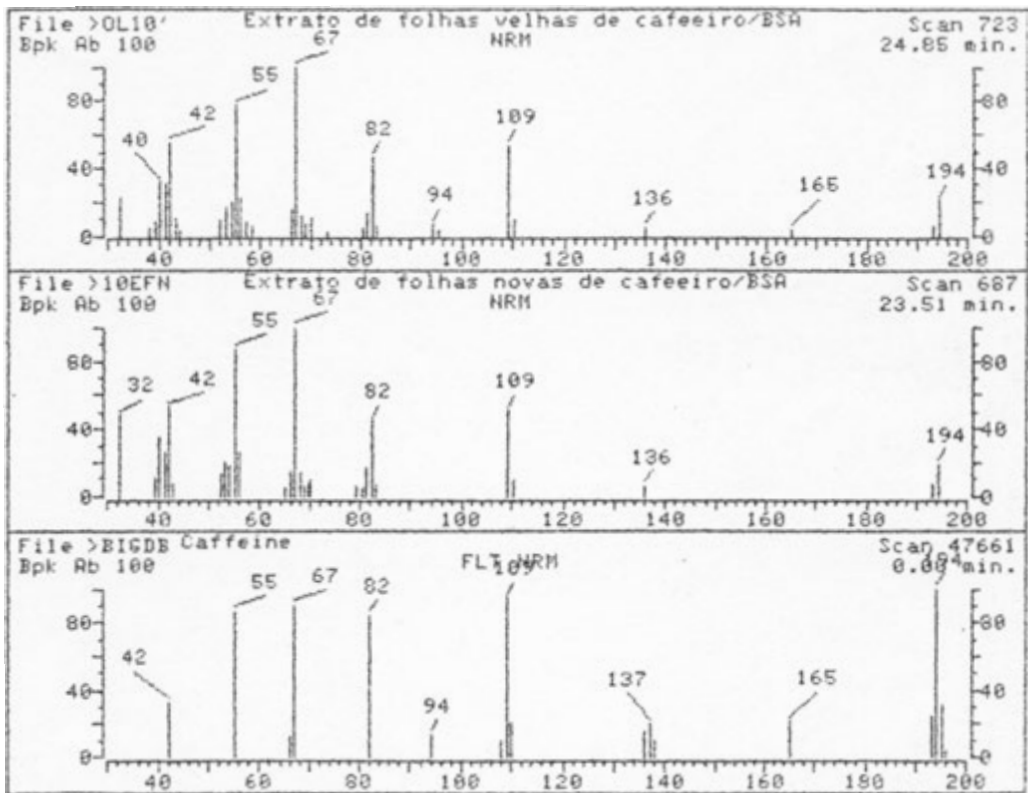


FIGURA 7. Comparação entre Espectros Obtidos de Extratos de Folhas Novas e Velhas com o Sistema de Dados do Espectrômetro de Massa.

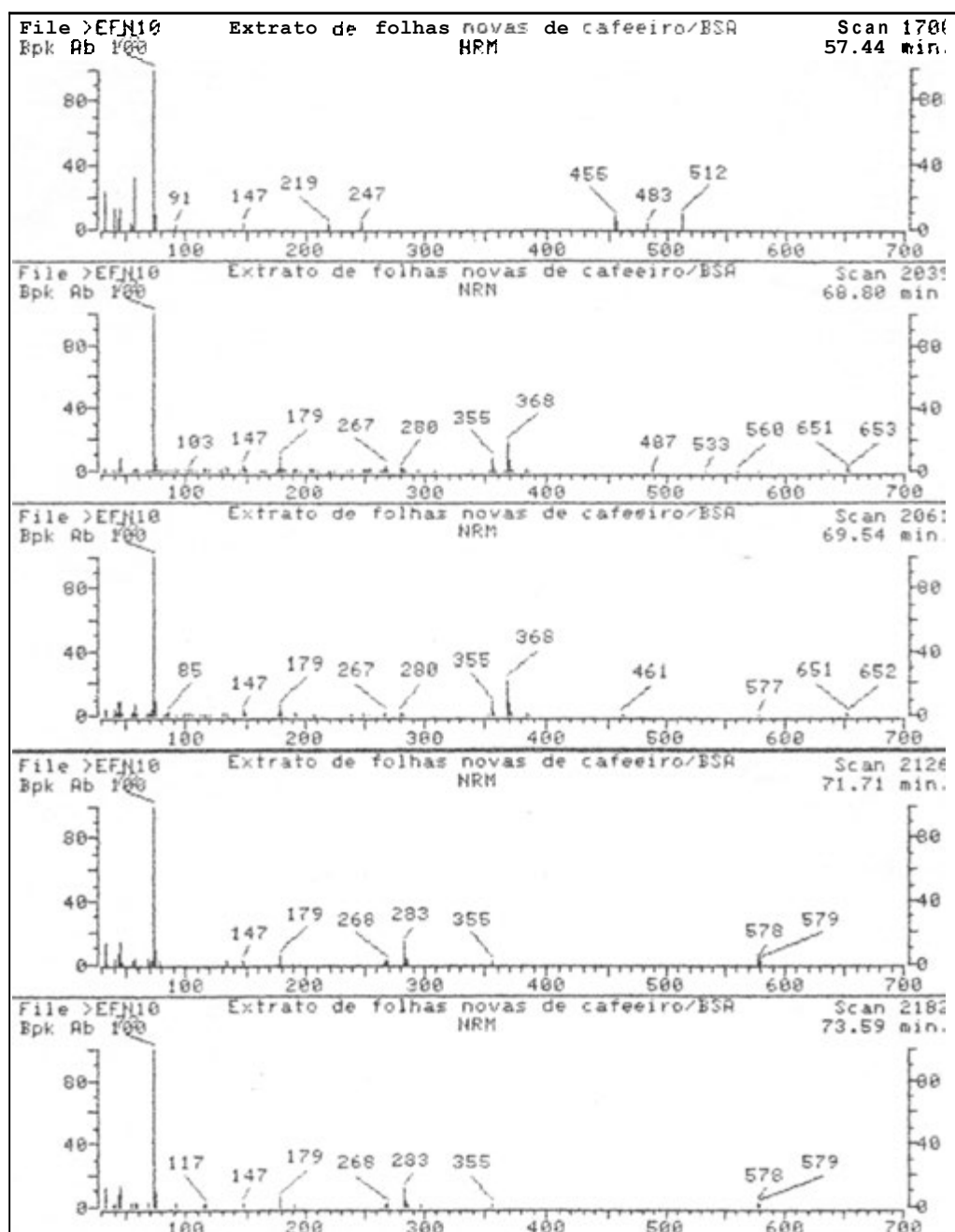


FIGURA 8. Espectros de Possíveis Compostos Flavonóides e Cumarinas Fenólicas Derivatizadas, Obtidos do Extrato de Folhas Novas.

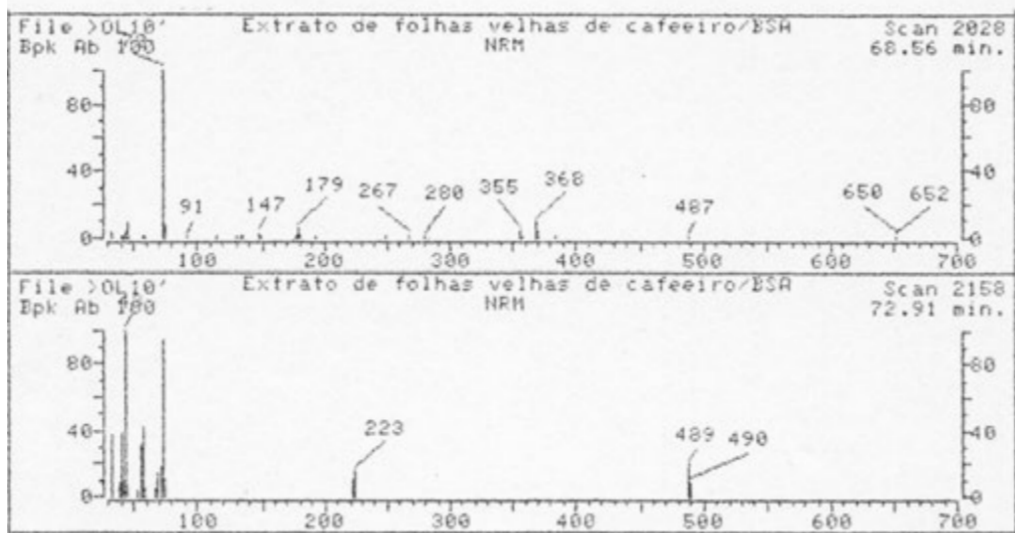


FIGURA 9. Espectros de Possíveis Compostos Flavonóides e Cumarinas Fenólicas Derivatizadas, Obtidos do Extrato de Folhas Velhas.

4. RESUMO E CONCLUSÕES

Procedeu-se à análise espectrométrica de padrões analíticos de fendis, usando duas colunas capilares no sistema GC/MS. Pelo exame dos espectros de fendis não-derivatizados (cromatografados em coluna A), confirmou-se que a simples presença de um ou mais grupos hidroxila, ligados ao anel aromático, não é o fator determinante do padrão de fragmentação. Por outro lado, a derivatização com BSA pôde ser utilizada como o meio mais eficiente para a espectrometria de massa no sistema GC/MS, de compostos pouco voláteis e dotados de elevados pontos de ebulição. Apesar disso, a reação provocou profunda alteração no padrão de fragmentação do composto analisado.

O presente estudo, para a aplicação do sistema GC/MS na identificação de metabólitos secundários em folhas de cafeeiro, foi feito a partir de substâncias com atividade antimicrobiana testadas contra *Thielaviopsis paradoxa*. Determinou-se que as

folhas novas e velhas são ambas providas de compostos de diferentes polaridades. alguns deles possuindo pontos de ebulição muito elevados, volatilizando-se, portanto, com grande dificuldade.

A semelhança de comportamento dos dois extratos foi verificada, utilizando-se as técnicas de cromatografia em fase gasosa. com colunas capilares BP-20 (Coluna A) e BP-1 (Coluna B) acopladas ao espectrômetro de massa (GC/MS), que permitem a detecção de compostos em baixas concentrações, como é o caso das substâncias com atividade antimicrobiana extraídas de placas de cromatografia em camada fina.

Encontraram-se nos extratos de folhas novas de cafeeiro, analisados em coluna B, 28 compostos ativos contra *I. paradoxa*, dos quais apenas 12 apresentaram o pico m/z 73, característico de substâncias derivatizadas. Destes últimos, cinco mostraram-se semelhantes a compostos flavonóides, em decorrência do padrão de fragmentação apresentado.

Em extratos de folhas velhas foram detectados 21 compostos, usando-se a mesma técnica. Destes, 10 assemelharam-se a substâncias derivatizadas, das quais duas apresentaram um padrão de fragmentação de flavonóides.

A análise comparativa dos TIC dos extratos permitiu a conclusão de que, em folhas velhas, existem dois picos de grande intensidade que não encontram correspondentes em folhas novas. Isto pode estar associado à resistência de folhas velhas a determinados fitopatógenos, normalmente compatíveis com folhas novas, como acontece com *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*. A

análise espectrométrica destes dois picos permitiu deduzir uma semelhança com aldeídos, ésteres, hidrocarbonetos, terpenos e compostos terpenóides. A comparação deles com os Quadros 2A, 3A e 4A permitiu concluir que o pico de 37.21 min tem grande probabilidade de ser o terpenóide epóxido de limoneno ou o hidrocarboneto octadecatrieno. Já o pico 37.51, com o mesmo procedimento comparativo, apresenta probabilidades de ser o hidrocarboneto octadecadieno ou o aldeído (E)-2-undecenal.

A comparação do espectro correspondente ao pico de 37.21 min com o sistema de dados do espectrômetro de massa permite deduzir que ele tem 83% de probabilidade de ser o éster metílico do ácido Z,Z-9,12-octadecadienóico e 76% de ser o aldeído 9,12-octadecadienal. Quanto ao pico de 37,51 min, há 60% de probabilidade de ser o hidrocarboneto 5-metil-1-hexeno.

Para concluir, sugerem-se a separação e o isolamento das substâncias correspondentes aos dois picos para análises no infravermelho e outros métodos espectrométricos, com vistas à determinação efetiva das estruturas dessas substâncias.

BIBLIOGRAFIA



BIBLIOGRAFIA

1. AMORIM, H.V., ALVARES, M.L.M., LOPES, C.R. et al. Análise de compostos fenólicos em folhas de cafeeiros resistentes e susceptíveis a *Hemileia vastatrix*. *Iurrialba*, v. 28, n.1, p. 57-68, 1978.
2. AMORIM, H.V., SILVA, D. M. Relationship between the polyphenol oxidase activity of coffee beans and the quality of the beverage. *Nature*, n. 219, p. 381-382, 1968.
3. AMORIM, H.V., TEIXEIRA, A. A., GUERCIO, M. A. et al. Chemistry of Brazilian green coffee and the quality of the beverage. II. Phenolic compounds. *Iurrialba*, v. 24, n. 2, p. 217-221, 1974.
4. ANDERSEN, J. F. Composition of the Floral Odor of *Cucurbita maxima* Duchesne (Cucurbitaceae). *J. Baric, Food Chem.*, n. 35, p. 60-62, 1987.
5. BALZA, F., CRINS, W. J., BOHM, B. A. et al. Mass spectrometry in the differentiation of flavanones and dihydroflavonols. *Phytochemistry*, v. 27, n. 8, p. 2715-2717, 1988.
6. BANWART, W. L., PORTER, P. M., GRANATO, T. C. et al. HPLC separation and wavelength area ratios of more than 50 phenolic acids and flavonoids. *Journal of Chemical Ecology* v. 11, n. 3, p. 383-395, 1985.
7. BERGER, R. G., DRAWERT, F., NITZ, S. Sesquiterpene Hydrocarbons in Pineapple Fruit. *J. Baric, Food Chem.*, n. 31, p. 1237-1239, 1983.

8. BONDAROVICH, H. A., FRIEDEL, P., KRAMPL, V. et al. Volatile Constituents of Coffee. Pyrazines and Other Compounds. *J. Agric. Food Chem.*, v. 15, n. 6, p. 1093-1099, 1967.
9. BUDZIKIEWICZ, H., DJERASSI, C., WILLIAMS, D. H. **Mass Spectrometry of Organic Compounds.** San Francisco : Holden-day, 1967. 690 p.
10. BUTTERY, R.G., KAMM, J.A., LING, L.C. Volatile Components of Red Clover Leaves, Flowers, and Seed Pods: Possible Insect Attractants. *J. Agric. Food Chem.*, n. 32, p. 254-256, 1984a.
11. BUTTERY, R. G., LING, L. C. Corn Leaf Volatiles - Identification Using Tenax Trapping for Possible Insect Attractants. *J. Agric. Food Chem.*, n. 32, p. 1104-1106, 1984b.
12. BUTTERY, R. G., LING, L. C., LIGHT, D. M. Tomato Leaf Volatile Aroma Components. *J. Agric. Food Chem.*, n. 35, p. 1039-1042, 1987.
13. BUTTERY, R. G., MADDOX, D. M., LIGHT, D.M. et al. Volatile Components of Yellow Starthistle. *J. Agric. Food Chem.*, n. 34, p. 786-788, 1986.
14. BUTTERY, R. G., PARKER, F. D., TERANISHI, R. et al. Volatile Components of Alfalfa Leaf-Cutter Bee Cells. *J. Agric. Food Chem.*, n. 29, p. 955-958, 1981.
15. CARELLI, M. L. C., LOPES, C. R., MONACO, L. C. Chlorogenic Acid content in species of *Coffea* and selections of *C. arabica*. *Iurcialba*, v. 2.4, n. 4, p. 398-401, 1974.
16. CASTANO, F. J. O. , DAVILA, C. C. Estudio cromatografico de un hibrido interespecifico en cafe. *Cenicafe*, v. 25, n. 3, p. 65-77, 1974.
17. CASTEELE, K. V., DE POOTER, H. VAN SUMERE, C. F. Gas chromatographic separation and analysis of trimethylsilyl derivatives of some naturally occurring non-volatile phenolic compounds and related substances. *Journal of Chromatography*, n. 121, p. 49-63, 1976.
18. DIECKMANN, R. H. PALAMAND, S. R. Autoxidation of Some Constituents of Hops. ■ The **Monoterpene** Hydrocarbon, Myrcene. *J. Agric. Food Chem.*, v. 22, n. 3, p. 498-503, 1974.
19. DORING, C. E., ESTEL, D., PEHLE, W. Analysis of tert-butylated cresol mixtures by capillary gas chromatography and capillary gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography*, n. 348, p. 430-436, 1985.

20. ECHANDI, E. , FERNANDEZ, C. E. Relación entre el contenido de ácido clorogénico y la resistencia a la llaga macana, o cáncer de los cafetos causado por *Ceratocystis fimbriata*. *Iurrialba*, n. 12, p. 87-90, 1962.
21. EKUNDAYO, O., LAAKSO, J. - ADEGBOLA, R. M. et al. Essential Oil Constituents of Ashanti Pepper (*Piper guineense*) Fruits (Berries). *J. Agric. Food Chem.*, n. 36, p. 880-882, 1988.
22. FRIEDEL, P. , KRAMPL, V., RADFORD, T. et al. Some Constituents of the Aroma Complex of Coffee. *J. Agr. Food Chem.*, v. 19, n. 3. p. 530-532, 1971.
23. FRÖHLICH, O., DUQUE, C. , SCHREIER, P. Volatile Constituents of Curuba (*Passiflora mollissima*) Fruit. *J. Agric. Food Chem.*, n. 37. p. 421-425, 1989.
24. GANGOPADHYAY, S. , WILLIE, T. D. Biochemical comparison of nine soybean varieties in relation to their susceptibility to *Macrophomina phaseolina*. *Indian Journal of Mycology & Plant Pathology*, v. 3, n. 2, p. 131-140, 1973.
25. GREENAWAY, W., SCAYSBROOK, T., WHATLEY, F. R. Phenolic analysis of bud exudate of *Populus lasiocarpa* by GC/MS. *Phytochemistry*, v. 27. n. 11, p. 3513-3515, 1988.
26. GUEDES, M.E.M. Formação de fitoalexinas em interações incompatíveis *Coffea arabica* - *Hemileia vastatrix*. In : SIMPÓSIO SOBRE FERRUGEM DO CAFEEIRO. 1983, Oeiras. Anais... Oeiras, Portugal : s.n., 1983. p. 207-216.
27. GUEDES, M.E.M., MORAIS, M.L., MARTINS, J.M.S. Production of stress metabolites in coffee leaves infiltrated with *Pseudomonas syringae*. *Garcia de Orta, Série Est. Agron.* n. 9, p. 243-248, 1982.
28. HANNY, B. W., THOMPSON, A. C., GUELDNER, R. C. An Investigation of the Essential Oil of *Hibiscus syriacus* L. *J. Agric. Food Chem.*, v. 21, n. 6, p. 1001-1004, 1973.
29. HARTLEY, R. D. , JONES, E. C. Effect of ultraviolet light on substituted cinnamic acids and the estimation of their cis and trans isomers by gas chromatography. *Journal of Chromatography*, n. 107, p. 213-218, 1975.
30. HOLLOWAY, P. J., DEAS, A. H. B., KABAARA, A. M. Composition of cutin from coffee leaves. *Phytochemistry*, n. 11, p. 1443-1447, 1972.
31. HUANG, H. M., JOHANNING, G. L., O'ELL, B. L. Phenolic Acid Content of Food Plants and Possible Nutritional Implications. *J. Agric. Food Chem.*, n. 34, p. 48-51. 1986.

32. IDSTEIN, H. , SCHREIER, P. Volatile constituents of Alphonso mango (*Mangifera indica*). *Phytochemistry*, v. 24, n. 10, p. 2313-2316, 1985a.
33. IDSTEIN, H. , SCHREIER, P. Volatile Constituents from Guava (*Psidium guajava*, L.) Fruit. *J. Agric. Food Chem.*, n. 33, p. 138-143, 1985b.
34. IWAHASHI, H. MORISHITA, H. OSAKA, N. et al. 3,0-Feruloyl-4,0-caffeoylquinic acid from coffee beans. *Phytochemistry*, v. 24. n. 3. p. 630-632, 1985.
35. KATAGI, T., HORII, A., OOMURA, Y. et al. Gas chromatography of flavonoids. *Journal of Chromatography*, n. 79. p. 45-56, 1973.
36. KATO, S. , YAMAMOTO, K. Gas chromatographic separation of monomethyl ethers of dihydroxycoumarin isomers. *Journal of Chromatography*, n. 333, p. 175-177, 1985.
37. KEEN. N. T. Phytoalexins : Efficient Extraction from Leaves by a Facilitated Diffusion Technique. *Phytopathology*, n. 68, p. 1237-1239, 1978.
38. KEMP, T.R.H., ANDERSEN, R.A., RODRIGUEZ, J. G. et al. Strawberry Foliage Headspace Vapor Components at Periods of Susceptibility and Resistance to *Tetranychus urticae* Koch. *Journal of Chemical Ecology*. v. 14, n. 3, p. 789-796, 1988.
39. KEMP, T. R. , KNAVEL, D. E., STOLTZ, L. P. **Cis-6-Nonenal** : a Flavor Component of Muskmelon Fruit. *Phytochemistry*, n. 11, 3321-3322, 1972.
40. KINLIN, T.E., MURALIDHARA, R., PITTET, A. O. et al. Volatile Components of Roasted Filberts. *J. Agric. Food Chem.*, v. 28, n. 5, p. 1021-1028, 1972.
41. KLEBE, J. F., FINKBEINER, H. WHITE, D. M. Silylations with **Bis(trimethylsilyl)acetamide**, a Highly Reactive Silyl Donor. *Journal of the American Chemical Society*, v. 88, n. 14, p. 3390-3395, 1966.
42. KORNREICH, M. R. , ISSENBERG, P. Determination of Phenolic Wood Smoke Components as Trimethylsilyl Ethers. *J. Agr. Food Chem.*, v. 20, n. 6, p. 1109-1113, 1972.
43. LAM, J., DRAKE, D. Polyacetylenes of *Senecio Jacobaea*. *Phytochemistry*, n. 12, p. 149-151, 1973.
44. LEE, P. L. , SWORDS. G., HUNTER. G. L. K. Volatile Constituents of Tamarind (*Tamarindus indica* L.). *J. Agric. Food Chem.*, v. 23. n. 6, p. 1195-1199, 1975.

45. LOOMIS, W.D., BATTAILE, J. Plant phenolic compounds and the isolation of plant enzymes. *Phytochemistry*, n. 5, p. 423-438, 1966.
46. MACLEOD, A. J., PIERIS, N. M. Analysis of the Volatile Essential Oils of *Murraya koenigii* and *Pandanus latifolius*. *Phytochemistry*, v. 21, n. 7, p. 1653-1657, 1982.
47. MALMBERG, A. G., THEANDER, O. Determination of Chlorogenic Acid in Potato Tubers. *J. Agric. Food Chem.*, n. 33, p. 549-551, 1985.
48. MARTINEZ, O. M. M. Identificação de Ecorômions de Icilba de Eormigas Cortadeiras (Eormicidae i Attini). Viçosa : Universidade Federal de Viçosa, Imprensa Universitária, 1988. 74 p. (Tese M. S.).
49. MARTINS, E.M.F., ROVERATTI, D.S., MORAES, W.B.C. Eliciation of stress metabolites in coffee leaves by a non-pathogen. *Eitopatologia Brasileira*, n. 11, p. 683-695, 1986.
50. MAZZA, G. Gas chromatographic and mass spectrometric studies of the constituents of the rhizome of calamus. *Journal of Chromatography*, n. 328. p. 179-194, 1985.
51. MELHUISE JR, J.H., WILLIS, R. B., WRIGHT, C.S. Separation and identification of phenolic acids and related compounds by gas chromatography and Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Journal of Chemical Ecology*, v. 13, n. 2, p. 317-323, 1986.
52. MICK, W., SCHREIER, P. Additional Volatiles of Black Tea Aroma. *J. Agric. Food Chem.*, n. 32, p. 924-929, 1984.
53. MOLLER, B., HERRMANN, K. Analysis of quinic acid esters of hydroxycinnamic acids in plant material by capillary gas chromatography and high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, n. 241. p. 371-379, 1982.
54. MORISHITA, H., IWAHASHI, H., KIDO, R. 4,0-Feruloylquinic acid from green coffee beans. *Phytochemistry*, v. 25, n. 6. p. 1496-1497, 1986a.
55. MORISHITA, H., IWAHASHI, H., KIDO, R. 3,0-Caffeoyl-4,0-feruloylquinic acid from green robusta coffee bean!. *Phytochemistry*, v. 25, n. 11, p. 2679-2680, 1986b.
56. MORISHITA, H., IWAHASHI, H., OSAKA, N. et al. Chromatographic separation and identification of naturally occurring chlorogenic acids by H Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy and Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography*, n. 315, p. 253-260, 1984.

57. MORITA, H. Persilylation of phenolic ketones. **Journal of Chromatography**, n. 101. p. 189-192, 1974.
58. NACCACHE, V. M., DIETRICH, S. M. C. Changes in phenols and oxidative enzymes in resistant and susceptible *Coffea arabica* inoculated with *Hemileia vastatrix* (coffee rust). **R. brasil. Bot.**, n. 8, p. 185-190, 1985.
59. NAGASAMPAGI, B. A., ROWE, J. W., SIMPSONS, R. et al. Sterols of coffee. **Phytochemistry**, n. 10, p. 1101-1107, 1971.
60. NAKATANI, M., FUKUNAGA, Y., HASE, T. Aliphatic compounds from *Hibiscus rosa-sinensis*. **Phytochemistry**, v. 25, n. 2, p. 449-452, 1986.
61. NORDBY, H. E., NAGY, S. Chemotaxonomic study of neutral coumarins in roots of *Citrus* and *Rauvolfia* by thin-layer, gas-liquid and high-performance liquid chromatographic analyses. **Journal of Chromatography**, n. 207, p. 21-28. 1981.
62. OLIVEIRA, J.R. Idade da Eplba e Susceptibilidade do Cafeeiro a *Pseudomonas cichorii* e a *Pseudomonas syringae pv. garcae*. Viçosa : Universidade Federal de Viçosa, Imprensa Universitária, 1988. 77 p. (Tese M.S.).
63. PARLIMENT, T. H., CLINTON, W., SCARPELLINO, R. Trans-2-nonenal : Coffee Compound with Novel Organoleptic Properties. **J. Agr. Food Chem.**, v. 21, n. 3, p. 485-487, 1973.
64. PETTITT JR, B. C. Identification of Diterpene Esters in Arabica and Canephora Coffees. **J. Baric- Food Chem.**, n. 35, p. 549-551, 1987.
65. ROBBS, C. F., RODRIGUES NETO, J., RIBEIRO, R. L. D. et al. A commented list of bacterial plant pathogens occurring in Brazil. In : INTERNATIONAL CONFERENCE OF PLANT PATHOGENIC BACTERIA, 5, 1981, Cali, Colombia. **Proceedings...**, Cali : s.n., 1981. P. 601-613.
66. RODRIGUES JR, C. J., MEDEIROS, E. F., LEWIS, B. G. Relationship between a phytoalexin-like response in coffee leaves (*Coffea arabica* L.) and compatibility with *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. **Physiological Plant Pathology**, n. 6, p. 35-41, 1975.
67. SABIR, M. A., SOSULSKI, F. W., KERNAN, J. A. Phenolic Constituents in Sunflower Flour. **J. Agr. Food Chem.**, v. 22, n. 4. p. 572-574, 1974.

68. SANINT, O. B., VALENCIA, A. G. Actividad enzimática en el grano de café en relación con la calidad de la bebida. **I.** duración de la fermentación. *Cenicafe*, n. 23, p. 59-71, 1972.
69. SCHREIER, P., DRAWERT, F., JUNKER, A. Identification of Volatile Constituents from Grapes. *J. Agric. Food Chem.*, v. 24, n. 2, p. 331-336, 1976.
70. SCHREYEN, L., DIRINCK, P., VAN WASSENHOVE, F. et al. Volatile Flavor Components of Leek. *J. Agric. Food Chem.*, v. 24, n. 2, p. 336-341, 1976a.
71. SCHREYEN, L., DIRINCK, P., VAN WASSENHOVE, F. et al. Analysis of Leek Volatiles by Headspace Condensation. *J. Agric. Food Chem.*, v. 24, n. 6, p. 1147-1152, 1976b.
72. SCHMIDT, E.M.G., SCHREIER, P. Volatile Constituents of *Valerianella locusta*. *Phytochemistry*, v. 27, n. 3, p. 845-848, 1988.
73. SCHMIDT, E. M. G., SCHREIER, P. Neutral Volatiles from Endive (*Cichorium endivia*, L.). *J. Agric. Food Chem.*, n. 34, p. 212-215, 1986.
74. SENDRA, J. M., CUNAT, P. Volatile constituents of spanish origanum (*Coridothymus capitatus*) essential oil. *Phytochemistry*, n. 19, p. 89-92. 1980.
75. SHARKEY JR, A.G., FRIEDEL, R. A., LANGER, S. H. Mas5 Spectra of Trimethylsilyl Derivatives. *Analytical Chemistry*, v. 29, n. 5, p. 770-776, 1957.
76. SILVERSTEIN, R. M., BASSLER, G. C., MORRILL, T. C. *Spectrometric Identification of Organic Compounds*; 4. ed. New York : John Wiley R Sons, 1981, 442 p.
77. SOSULSKI, F., KRYGIER, K., HOGGE, L. Free, Esterified, and Insoluble-Bound Phenolic Acids. 3. Composition of Phenolic Acids in Cereal and Potato Flours. *J. Agric. Food Chem.*, n. 30, p. 337-340, 1982.
78. SOUZA, R. M. *Eliciação de uma Eitoalexina em Cafeeiro (Coffea arabica)*. Vicosia : Universidade Federal de Vicosia, Imprensa Universitária, 1988. 54 p. (Tese M.S.).
79. STOFFELSMA, J., SIPMA, G., KETTENES, D. K., et al. New Volatile Components of Roasted Coffee. *J. Agric. Food Chem.*, v. 16, n. 6, p. 1000-1004, 1968.
80. TIITTO, R. J. Phenolic Constituents in the Leaves of Northern Willows : Methods for the Analysis of Certain Phenolics. *J. Agric. Food Chem.*, n. 33, p. 213-217, 1985.

81. TIU, C. S., PURCELL, A. E., COLLINS, W. Contribution of Some Volatile Compounds to Sweet Potato Aroma. *J. Agric. Food Chem.*, n. 33, p. 223-226, 1985.
82. VITZTHUM, O. G., WERKHÖFF, P. Cycloalkapyrazines in Coffee Aroma. *J. Agric. Food Chem.*, v. 23, n. 3, p. 510-516, 1975.
83. WALKER, J. R. L. *The Biology of Plant Phenolics*. London : Arnold. 1975. 57 p.
84. WOODWARD, M. D. Gas chromatography/ Mass spectroscopy of isoflavanones and related compounds. *Phytochemistry*, v. 21, n. 6, p. 1403-1407, 1982.
85. ZULUAGA, J. V., VALENCIA, G. A., GONZALEZ, J. Contribucion al Estudio de la Naturaleza de la Resistencia del Cafeto a *Ceratocystis fimbriata* (Ell. Halst.) Hunt. *Cenicafe*, v. 22, n. 2, p. 43-68, 1971a.
86. ZULUAGA, J. V., VALENCIA, G. A., GONZALEZ, J. Contribucion al Estudio de la Naturaleza de la Resistencia del Cafeto a *Ceratocystis fimbriata* (Ell. Halst.) Hunt. 11. *Cenicafe*, v. 22, n. 4, p. 109-125, 1971b.

APÉNDICES

APÉNDICE A

QUADRO 1A - Padrões de Fendis Ordenados Segundo o Tempo de Retenção, em Coluna Analítica de OV 17, 1%

FENÓIS	* RT	** PM	*** PF
81. 1,2-diidroxibenzeno (Catecol)	02,16	110	104
82. 2,3-di-t-butil-4-metoxifenol (BHA)	05,00	236	#
83. 2,6-di-t-butil-4-metilfenol (BHT)	05,62	221)	70
84. t-butilidroquinona	05,69	166	R
05. 4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído (Vanilina)	06,34	152	81
06. 1,3,5-triidroxibenzeno (Floroglucinol)	06,45	126	218
87. 1,2,3-triidroxibenzeno (Pirogalol)	06,45	i	133
08. Ác. 3(p-hidroxifenil) propiônico	07,37	166	129
89. Ác. p-hidroxibenzóico	07,70	138	215
10. Ác. 4-hidroxi-3-metoxibenzóico (Ác. Vanílico)	08,48	168	210
11. 4-hidroximetil-2,6-diterbutilfenol	08,64	236	#
12. Ác. 2,5-diidroxibenzóico (Ác. Gentsílico)	08,80	154	205
13. Ác. 3,4-diidroxibenzóico (Ác. Protocatequínico)	09,00	154	288
14. 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzaldeído (Siringaldeído)	09,07	182	110
15. Ác. 3,5-diidroxibenzóico (Ác. A-Resorçílico)	09,29	154	236
16. Ác. 2,4-diidroxibenzóico (Ác. B-Resorçílico)	09,80	154	225
17. Ác. 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzóico (Ác. Siringílico)	10,45	198	203
18. 2,4,5-triidroxibutirofenona (THBP)	10,83	214	#
19. Ác. 3,4,5-triidroxibenzóico (Ác. Gálico)	11,13	178	258
20. 3,4,5-triidroxibenzenocarboxilato de propila (Galato de propila)	11,50	212	#
21. 7-hidroxicumarina (Umbeliferona)	12,09	162	226
22. Ác. 4-hidroxi-3-metoxicinâmico (Ác. Ferúlico)	12,66	194	168
23. 6,7-diidroxicumarina (Esculetina)	13,17	178	271
24. Ác. E-3,4-dimetoxicinâmico (Ác. E-3,4-dimetoxicaféico)	14,00	208	181
25. 1,8-diidroxiantraquinona	19,67	240	191
26. 2',3',4',5',7-pentaidroxiflavona (Morina)	19,90	302	299
27. 4',5',7-triidroxiflavanona (Haringenina)	28,28	272	247
28. 1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona (Curcumina)	-----	368	#

* Tempo de retenção, em minutos.

** Peso molecular arredondado.

*** Ponto de fusão aproximado.

Dado não-disponível.

QUADRO 2A - Dados de Espectros de Massa de Hidrocarbonetos

COMPOSTO	PM	PADRÃO DE FRAGMENTAÇÃO					REFERÊNCIA
		m/z (ABUNDÂNCIA RELATIVA) (%)					
Octadecatrieno	248	41 (100)	55 (68)	43 (63)	67 (61)	81 (44)	HANNY et alii (1973)
Octadecadieno	250	41 (100)	55 (98)	43 (84)	69 (34)	83 (18)	HANNY et alii (1973)
Nonadecatetraeno	260	41 (100)	55 (69)	43 (57)	67 (34)	79 (26)	HANNY et alii (1973)
B-gurjuneno	204	41 (100)	93 (81)	79 (44)	55 (40)	77 (38)	MACLEOD e PIERIS (1982)
B-selineno	284	41 (100)	93 (52)	55 (38)	67 (38)	79 (36)	MACLEOD e PIERIS (1982)
A-selineno	204	41 (100)	55 (68)	93 (63)	81 (61)	67 (44)	MACLEOD e PIERIS (1982)
Longifoleno	204	41 (100)	91 (53)	55 (43)	105 (43)	79 (42)	BUTTERY et alii (1984ab)
B-mirceno	136	41 (100)	93 (98)	69 (84)	39 (34)	79 (15)	IDSTEIN e SCHREIER (1985)
A-cariofileno	284	41 (100)	133 (99)	93 (98)	69 (69)	79 (58)	BUTTERY et alii (1986)
B-cariofileno	284	41 (100)	69 (69)	79 (58)	91 (63)	93 (44)	EKUNDAYO et alii (1988)
(E)-B-farneseno	204	41 (100)	69 (95)	93 (90)	79 (47)	55 (45)	EKUNDAYO et alii (1988)
B-bisaboleno	284	41 (100)	69 (95)	93 (73)	81 (45)	55 (43)	EKUNDAYO et alii (1988)
A-mirceno	136	41 (100)	69 (98)	93 (84)	53 (34)	39 (27)	EKUNDAYO et alii (1988)
(E)-A-bergamoteno	204	41 (100)	93 (69)	119 (57)	69 (34)	91 (26)	EKUNDAYO et alii (1988)
Cânfora	152	41 (100)	95 (91)	81 (83)	55 (61)	69 (49)	SCHMIDT e SCHREIER (1988)
1-dodeceno	168	41 (100)	43 (84)	55 (68)	56 (60)	69 (54)	FROHLICH et alii (1989)

QUADRO 3A - Dados de Espectros de Massa de Cetonas, Ésteres e Epóxidos

COMPOSTO	PM	PADRÃO DE FRAGMENTAÇÃO					REFERÊNCIA
		m/z (ABUNDÂNCIA RELATIVA) (%)					
2-etil-ciclobutano	98	41 (100)	55 (96)	42 (78)	7% (72)	56 (52)	HANNY et alii (1973)
3-metil-3-buten-2-ona	84	41 (100)	43 (95)	39 (43)	84 (39)	39 (39)	SCHREIER et alii (1976)
(E)-3-penten-2-ona	84	41 (100)	69 (87)	43 (68)	39 (53)	27 (14)	SCHMIDT e SCHREIER (1986)
(Z)-3-hexenoato de metila	128	41 (100)	59 (54)	69 (49)	68 (48)	74 (45)	IDSTEIN e SCHREIER (1985a)
(E)-3-hexenoato de butila	170	41 (100)	57 (43)	69 (28)	68 (24)	55 (21)	FROHLICH et alii (1989)
3-metilbutanoato de metila	158	41 (100)	57 (77)	85 (76)	56 (62)	43 (55)	SCHMIDT et alii (1988)
Epóxido de limoneno	150	41 (100)	67 (82)	55 (55)	81 (42)	94 (42)	BUTTERY et alii (1987)
Epóxido de cariofileno	218	41 (100)	79 (75)	93 (67)	69 (53)	55 (37)	BUTTERY et alii (1987)

QUADRO 4A - Dados de Espectros de Massa de Aldeídos

COMPOSTO	PM	PADRÃO DE FRAGMENTAÇÃO						REFERENCIA
		m/z (ABUNDÂNCIA RELATIVA)						
		(%)						
(E)-2-decenal	154	41 (100)	43 (99)	55 (71)	70 (55)	29 (53)	KINLIN et alii (1972)	
(E)-2-undecenal	168	41 (100)	70 (94)	57 (89)	43 (82)	55 (80)	KINLIN et alii (1972)	
(Z)-6-nonenal	140	41 (100)	55 (62)	54 (46)	67 (43)	81 (37)	KEMP et alii (1972)	
2,4-nonadienal	138	41 (100)	81 (42)	27 (33)	39 (27)	67 (17)	HANNY et alii (1973)	
(E)-2-hexenal	98	41 (100)	69 (62)	83 (48)	55 (48)	98 (33)	LEE et alii (1975)	
(E)-3-hexenal	98	41 (100)	55 (71)	69 (53)	39 (52)	83 (36)	IDSTEIN et alii (1985)	
(E)-2-heptenal	112	41 (100)	55 (70)	70 (61)	57 (47)	56 (45)	SCHREIER et alii (1976)	
2-metil-2-pentenal	98	41 (100)	98 (53)	39 (41)	69 (38)	55 (25)	SCHREYEN et alii (1976ab)	
(E)-2-octenal	126	41 (100)	55 (89)	70 (53)	83 (48)	57 (38)	BUTTERY et alii (1981)	
(E)-2-nonenal	140	41 (100)	27 (88)	43 (87)	29 (81)	55 (71)	BUTTERY et alii (1981)	
(E)-2-butenal	70	41 (100)	70 (77)	39 (68)	69 (36)	43 (17)	IDSTEIN e SCHREIER (1985a)	
2-metil-4-pentenal	98	41 (100)	39 (30)	56 (27)	69 (25)	43 (23)	IDSTEIN e SCHREIER (1985b)	
(E,Z)-2,6-nonadienal	138	41 (100)	70 (44)	69 (41)	39 (24)	67 (9)	SCHMIDT e SCHREIER (1986)	
Decanal	156	41 (100)	43 (99)	57 (82)	29 (81)	55 (65)	SCHMIDT e SCHREIER (1988)	
2-butenal	70	41 (100)	39 (90)	70 (83)	69 (40)	28 (34)	SCHMIDT e SCHREIER (1988)	

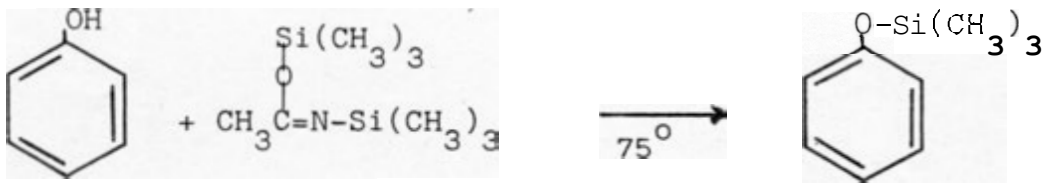


FIGURA 1A. Esquema da Derivatização com N,O-bis (Trimetilsilil)-Acetamida (BSA) (KLEBE et alii. 1966).

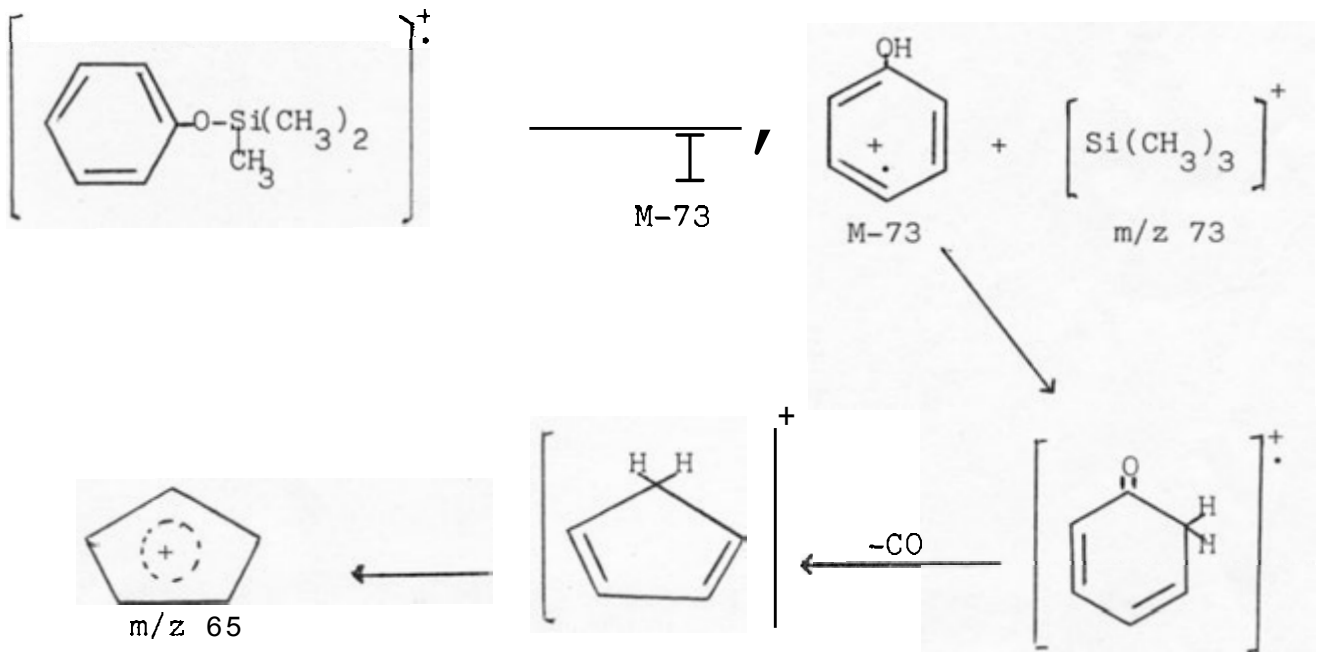


FIGURA 2A. Modelo de Fragmentação de Um Composto Fenólico Derivatizado (SILVERSTEIN et alii, 1981).

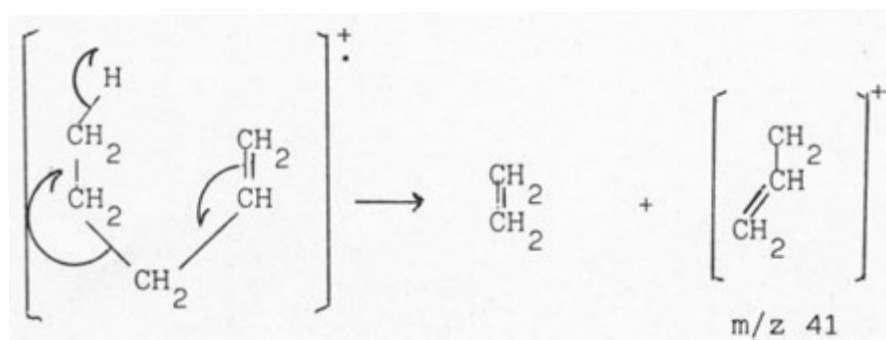


FIGURA 3A. Rearranjo de McLafferty na Fragmentação de Uma Olefina (BUDZIKIEWICZ et alii, 1967).

APPENDICE B

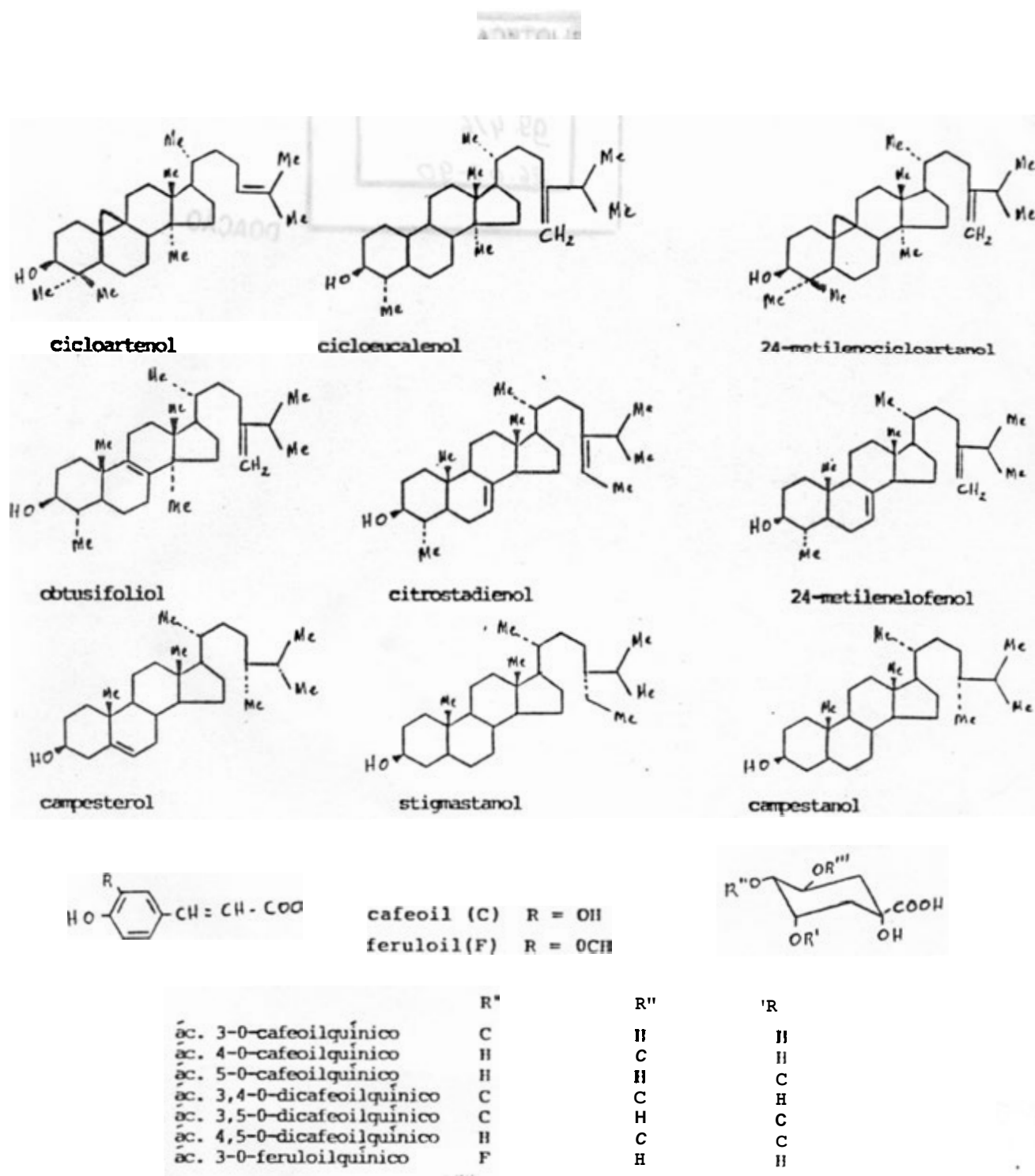


FIGURA 1B. Estruturas de Substâncias Orgânicas Menos Comuns, Presentes em Folhas e Grãos de Café.