

GABRIEL MAZZI LEME

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA
ESTUDO METABOLÔMICO DE CANA-DE-AÇÚCAR**

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Vanderlan da Silva Bolzani

**Araraquara
2011**

GABRIEL MAZZI LEME

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA
ESTUDO METABOLÔMICO DE CANA-DE-AÇÚCAR**

Dissertação apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte dos
requisitos para obtenção do título de Mestre em
Química.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Vanderlan da Silva Bolzani

**Araraquara
2011**

FICHA CATALOGRÁFICA

L551d	Leme, Gabriel Mazzi Desenvolvimento de método analítico para estudo metabolômico de cana-de-açúcar/ Gabriel Mazzi Leme. – Araraquara : [s.n], 2011 124 f. : il. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química Orientador: Vanderlan da Silva Bolzani 1. Química orgânica. 2. Quimiometria . 3. Cana-de-açúcar. 4. Metabolômica. 5. HPLC-DAD. I. Título.
-------	---

Elaboração: Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química de Araraquara
Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

GABRIEL MAZZI LEME

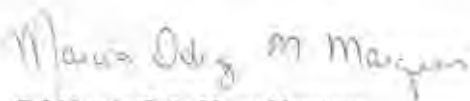
Dissertação apresentada ao Instituto de
Química, Universidade Estadual Paulista,
como parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Química.

Araraquara, 03 de junho de 2011.

BANCA EXAMINADORA



Profª Drª Vanderlan da Silva Bolzani (Orientadora)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Drª Marcia Ortiz Mayo Marques
Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Recursos Genéticos Vegetais – IAC –
Campinas



Prof. Dr. Jan Schripsema
Centro de Ciências Exatas e Tecnologia – UENF – Campos dos Goytacazes

*Aos meus caríssimos: pai, mãe e irmão,
sem os quais a caminhada seria muito mais difícil.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Toninho e Denizi, por todo amor e apoio nessa jornada... Não existem palavras que expressem minha gratidão!

Ao meu irmão, por cada conversa que me faz refletir; pelo apoio; pela paciência; por tudo que me ensina.

À Aline, pela paciência, amor e companheirismo.

À Prof^a. Vanderlan, pela orientação, confiança e ensinamentos.

Ao Prof. Alberto, pelo incentivo e confiança; pela presença e suporte ao trabalho desenvolvido; pela amizade.

Aos atuais e ex-moradores, agregados e vizinhos da República Arapuça.

Aos amigos da turma 44 do Bacharelado, em especial Amir, Fernanda, Leonardo, Germano, Renan, Virgílio...

Ao Paulo, pela amizade e parceria.

A todos os amigos do NuBBE, pela convivência e trocas de experiência.

Ao Prof. Ossamu Hojo pela valiosa colaboração.

Ao Prof. Ian pelas considerações sempre enobrecedoras e estimulantes.

Ao Paulo Henrique Março (PH) e Patrícia Valderrama pelo grande auxílio nas análises quimiométricas.

Ao Prof. Marcos Silveira Buckerige e Amanda Pereira de Souza pelas amostras de cana-de-açúcar cultivadas no Instituto de Botânica da USP São Paulo.

À CAPES pela bolsa concedida, CNPq, FAPESP e Banco Real pelo apoio financeiro.

O anseio é explicitar aqui, todos aqueles que fazem ou fizeram parte da minha vida... como o espaço é curto e a memória é fraca, que fique implícito!

Muito obrigado!!!

*“O mundo vai girando
Cada vez mais veloz
A gente espera do mundo
E o mundo espera de nós
Um pouco mais de paciência...”*

Paciência – Lenine.

RESUMO

A identificação e quantificação de micromoléculas em uma matriz tem vários objetivos, entre eles, conhecer a diversidade química de determinado organismo (metaboloma) visando obter informações biológicas fundamentais ao entendimento destes sistemas biológicos. Isso inclui uma série de estudos químicos e biológicos essenciais para explicar a ecofisiologia de um determinado organismo e, com isso, fazer previsões sobre adaptação e regulação em condições ambientais adversas. Poucos estudos metabolômicos foram desenvolvidos com a cana-de-açúcar, especialmente no Brasil, onde esta espécie é matéria-prima para fabricação de etanol combustível e outros produtos de alto valor agregado. Essa abordagem é, portanto, de suma importância para o desenvolvimento e/ou implantação de métodos analíticos robustos para o estudo de um largo espectro de metabólitos primários e secundários. A partir da interpretação desses dados, será possível obter informações valiosas para se entender, em nível molecular, os processos ecofisiológicos de uma espécie. A presente dissertação de mestrado teve como objetivo o desenvolvimento e validação de métodos de análise por HPLC-DAD, utilizando métodos quimiométricos de planejamento experimental, visando mapear o metabolismo micromolecular de folhas de cana-de-açúcar. Obteve-se um *fingerprint* metabólico, essencial para a análise quali e quantitativa que se deseja determinar posteriormente via HPLC e outras técnicas adicionais como EM e RMN. A partir de métodos quimiométricos de análise multivariada (PCA, SIMCA e PLS-DA), foi possível diferenciar amostras vegetais submetidas a diferentes condições de cultivo.

Palavras-chave: cana-de-açúcar; HPLC-DAD; metabolômica; quimiometria.

ABSTRACT

The identification and quantification of molecules in a matrix has several goals, among them, to know the chemical diversity of a particular organism (metabolome), to get fundamental biological information and to understand the biological systems. It includes a series of chemical and biological studies, which are essential to explain the ecophysiology of an organism and thus, make predictions about the adaptation and regulation at adverse environmental conditions. Only a few metabolomic studies about sugarcane have been developed, specially in Brazil, where this species is a raw material for manufacturing ethanol and other products with high added value. This approach is therefore very important for development and establishment of robust analytical methods for studying a wide range of primary and secondary metabolites. From the interpretation of these data, will be possible to get valuable information to understand at molecular level, the ecophysiological processes of a species. This Master's dissertation aimed the development of analytical HPLC-DAD methods, coupled with Chemometrics methods of experimental design, in order to understand the micromolecular metabolism of sugarcane leaves. It was obtained a metabolic fingerprint, essential for the qualitative and quantitative analysis desired to be done latter by HPLC and other additional technics such as MS and NMR. Based on Chemometrics methods of multivariate analysis (PCA, SIMCA and PLS-DA), it was possible to distinguish samples subjected to different growing conditions.

Keywords: sugarcane; HPLC-DAD; metabolomic; Chemometrics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Região de cultivo de cana-de-açúcar no mundo.	20
Figura 2. Composição e significado do nome do cultivar IACSP94-4004.....	22
Figura 3. Brotação e perfilhamento (VAN DILLEWIJN, 1952).	24
Figura 4. Processo de captação de CO ₂ nas plantas de metabolismo C ₄ . (FERRAZ, s.d., <i>adaptado</i>)	25
Figura 5. Evolução da produção brasileira de cana-de-açúcar. (UNICA, 2010)	27
Figura 6. Evolução da produção brasileira de açúcar e álcool (UNICA, 2010).	28
Figura 7. Evolução da exportação brasileira de açúcar e álcool (UNICA, 2010).	29
Figura 8. Venda de automóveis leves, por tipo de combustível (UNICA, 2010)	29
Figura 9. Ilustração das diferentes estratégias de análise metabolômica, considerando preparação da amostra e análise (DUNN e ELLIS, 2005, <i>adaptado</i>).	33
Figura 10. Superfície de Resposta Planar ou Linear	41
Figura 11. Superfície de Resposta Quadrática.....	41
Figura 12. Exemplo de pré-processamento: a) dados originais, b) dados centrados na média e c) dados autoescalados (MATOS et al, 2003).	44
Figura 13. Decomposição em componentes principais por PCA.....	45
Figura 14. Fluxograma do procedimento preliminar de preparo das amostras.	51
Figura 15. Modelo Simplex-Centróide com três eixos de misturas para avaliar a influência de diferentes proporções de solventes na preparação do extrato. A = EtOH, B = Água e C = IPA	52
Figura 16. Representação gráfica do planejamento fatorial composto central ou planejamento em estrela.	56
Figura 17. Perfis cromatográficos dos extratos obtidos com cada mistura de solvente do planejamento Simplex-Centróide (números referentes a cada ponto do planejamento).	64
Figura 18. Representação gráfica dos resultados obtidos na avaliação do melhor solvente extrator.....	65
Figura 19. Superfície de resposta do número de picos em função das proporções de solventes – modelo cúbico especial.....	66

Figura 20. Avaliação dos efeitos principais para o planejamento experimental (volume de solvente extrator; número de extrações consecutivas; tempo de ultrasonicação).....	68
Figura 21. Cromatogramas dos sete extratos obtidos subsequentemente, para avaliação da eficiência da extração.	70
Figura 22. Relação entre número de extrações consecutivas e área total dos cromatogramas.	71
Figura 23. Relação entre número de extrações consecutivas e massas dos extratos secos.....	71
Figura 24. Gradiente 5 a 100% B em 35min, modo isocrático de 35 a 42min; coluna Luna(2). Extrato obtido com as condições ideais, descritas em 4.1. Em destaque, região de grande sobreposição de picos de compostos hidrofílicos..	73
Figura 25. Cromatogramas gerados pela análise das frações hidrofílica e hidrofóbica do extrato obtido com as condições ideais e submetido à SPE-C18.	73
Figura 26. Cromatograma GC-FID obtido da análise da fração hidrofílica, coletada na etapa de SPE-C18 e derivatisada.	74
Figura 27. Cromatogramas obtidos nas mesmas condições de gradiente para as colunas a) Luna(2), b) Onyx, c) duas colunas Onyx em série e d) Kinetex. Cromatogramas registrados em 360 nm.....	75
Figura 28. Superfícies de resposta: número de picos cromatográficos em função dos experimentos do planejamento em estrela para (a) coluna Luna(2), (b) duas colunas Onyx em série (c) coluna Kinetex.	77
Figura 29. Avaliação dos efeitos principais para o planejamento experimental – coluna Luna(2).	81
Figura 30. Avaliação dos efeitos principais para o planejamento experimental – colunas Onyx em série.....	81
Figura 31. Avaliação dos efeitos principais para o planejamento experimental – coluna Kinetex.....	81
Figura 32. Cromatograma obtido na nova condição de eluição para a coluna Luna(2).....	83
Figura 33. Cromatograma obtido na nova condição de eluição para as colunas Onyx em série.	83
Figura 34. Cromatograma obtido na nova condição de eluição para a coluna Kinetex.	84

Figura 35. Cromatogramas: a) injeção de padrões bezeno / tolueno; b) branco da fase móvel; c) branco da amostra.	85
Figura 36. Sobreposição dos cromatogramas do branco da fase móvel (azul), branco do preparo de amostra (vermelho) e do cultivar RB3280.	86
Figura 37. Perfil cromatográfico do cultivar RB3280.	89
Figura 38. Perfil cromatográfico do cultivar IAC5000.	90
Figura 39. Perfil cromatográfico do cultivar IAC1115.	91
Figura 40. Fluxograma do procedimento de preparo das amostras para identificação preliminar via RMN de ^1H	92
Figura 41. Cromatogramas das amostras obtidas no fracionamento por SPE (Fração A - vermelho, Fração B - azul, Fração C - verde).	93
Figura 42. Espectros de absorção no UV característicos de flavonóides de alguns picos da Fração B.	93
Figura 43. Espectro de RMN de ^1H da fração A. Em destaque, região de sinais de derivados fenólicos.	94
Figura 44. Espectro de RMN de ^1H da fração B. Em destaque, região de sinais de derivados fenólicos.	95
Figura 45. Espectro de RMN de ^1H da Fração C - Em destaque, região de sinais correspondentes a hidrogênios de açúcares na faixa de δ 3,0-4,0 e hidrogênios anoméricos entre δ 5,0-5,25, e de aminoácidos entre δ 2,8-2,0.	95
Figura 46. Cromatogramas da matriz X sobrepostos a) antes do alinhamento b) após alinhamento.	97
Figura 47. Gráficos de autovalores para os três pré-processamentos adotados: a) autoescalado, b) centrado na média, c) sem pré-processamento.	98
Figura 48. Análise PCA da matriz X. Gráfico de <i>scores</i>	99
Figura 49. Análise PCA da matriz X. Gráfico de <i>loadings</i> (pesos) das variáveis em PC1 e PC2.	100
Figura 50. Picos responsáveis pela separação das amostras nas análises por componentes principais.	101
Figura 51. Análise PCA das amostras cultivadas em condições atmosféricas de CO_2 ; a) gráfico de <i>scores</i> , b) gráfico de <i>loadings</i>	102
Figura 52. Análise PCA das amostras cultivadas em elevadas concentrações de CO_2 ; a) gráfico de <i>scores</i> , b) gráfico de <i>loadings</i>	103

Figura 53. <i>Scores</i> do modelo PLS-DA.....	105
Figura 54. <i>Loadings</i> do modelo PLS-DA	105
Figura 55. Valores previstos pelo modelo PLS-DA; ■ amostras de calibração; * amostras de validação.	106
Figura 56. Probabilidade de classificação na classe 1; ■ amostras de calibração; * amostras de validação.	106
Figura 57. Sobreposição do gráfico de <i>loadings</i> e dos cromatogramas alinhados e correlações entre sinais e picos.	107
Figura 58. Cromatograma representativo das amostras; detecção a 254 nm. Principais picos responsáveis pela separação das amostras.	108
Figura 59. Espectros no UV dos picos selecionados no cromatograma.....	109

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação taxonômica da cana-de-açúcar.....	21
Tabela 2. Análise da variância para o ajuste, pelo método dos mínimos quadrados; n = número de observações; m = número de níveis distintos da variável independente; p = número de parâmetros do modelo.....	42
Tabela 3. Nomenclatura das amostras e respectivas condições de cultivo.	50
Tabela 4. Fatores e níveis estudados no planejamento fatorial.....	53
Tabela 5. Condições experimentais geradas através do planejamento fatorial.	54
Tabela 6. Níveis codificados para tempo de análise e proporções de ACN.	57
Tabela 7. Experimentos realizados (x) nas diferentes colunas.	57
Tabela 8. Fatores e níveis avaliados no planejamento fatorial para as diferentes colunas.....	58
Tabela 9. Número de picos dos cromatogramas obtidos para cada condição de solventes gerada pelo modelo Simplex-Centróide (ponto 7 em triplicata).....	64
Tabela 10. Análise de variância para o ajuste, pelo método dos mínimos quadrados, de um modelo <i>cúbico especial</i> , aplicado ao planejamento Simplex-Centróide. .	66
Tabela 11. Valores de área total dos cromatogramas em função das condições experimentais geradas através do planejamento fatorial.	67
Tabela 12. Área total dos cromatogramas obtidos na avaliação da eficiência da extração.	70
Tabela 13. Massas secas extraídas na avaliação da eficiência da extração.	71
Tabela 14. Número de picos em função dos experimentos do planejamento em estrela.	76
Tabela 15. Dados referentes ao ponto central do planejamento em estrela.	76
Tabela 16. Análise de variância para o ajuste, pelo método dos mínimos quadrados, de um modelo <i>quadrático</i> , aplicado ao planejamento em estrela – coluna Luna(2).....	78
Tabela 17. Análise de variância para o ajuste, pelo método dos mínimos quadrados, de um modelo <i>quadrático</i> , aplicado ao planejamento em estrela – colunas Monolíticas.	78

Tabela 18. Análise de variância para o ajuste, pelo método dos mínimos quadrados, de um modelo <i>quadrático</i> , aplicado ao planejamento em estrela – coluna Kinetex.	78
Tabela 19. Condições experimentais geradas através do planejamento fatorial e número de picos obtidos. – coluna Luna(2)	80
Tabela 20. Condições experimentais geradas através do planejamento fatorial e número de picos obtidos. – colunas Onyx em série.....	80
Tabela 21. Condições experimentais geradas através do planejamento fatorial e número de picos obtidos. – coluna Kinetex.....	81
Tabela 22. Valores otimizados, obtidos pela avaliação dos efeitos principais para as colunas avaliadas.....	82
Tabela 23. Condições de eluição de FM.....	83
Tabela 24. Dados de médias, desvios padrão e coeficientes de variação percentual das análises da mistura de padrões benzeno e tolueno.	84
Tabela 25. Avaliação da repetibilidade <i>inter amostra</i>	86
Tabela 26. Avaliação da repetibilidade <i>intradia</i> a partir da média das replicatas das análises.	87
Tabela 27. Avaliação da repetibilidade <i>interdias</i> a partir da média das replicatadas das análises de todas as amostras.	87
Tabela 28. Avaliação da repetibilidade <i>interdias</i> a partir da média das replicatas das análises da amostra 1.	87
Tabela 29. Avaliação da estabilidade das amostras submetidas a diferentes condições de armazenamento.	88

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

°C	grau Celsius
μL	microlitro
μm	micrômetro
ACN	Acetonitrila
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i> (Análise de Variância)
C18	Octadecilsilano
CHS	Chalcona sintase
CV%	Coeficiente de Variação Percentual
d.i.	Diâmetro Interno
DAD	<i>Diode Array Detector</i> (Detector de Arranjo de Diodos)
DIMS	<i>Direct Injection Mass Spectrometry</i> (Espectrometria de Massas por Injeção Direta)
EST	<i>Expressed Sequence Tag</i> ("etiqueta" de genes expressos)
EtOH	Etanol
FE	Fase Estacionária
FID	<i>Flame Ionization Detection</i> (Detecção por Ionização em Chama)
FM	Fase Móvel
FTIR	<i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i> (Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier)
g	grama
GC	<i>Gas Chromatography</i> (Cromatografia Gasosa)
HPLC	<i>High-Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)
IFR	Isoflavona Redutase
IFS	Isoflavona sintase
IPA	Isopropanol

<i>k</i>	Fator de retenção
MeOH	Metanol
min	minuto
mL	mililitro
MS	<i>Mass Spectrometry</i> (Espectrometria de Massas)
N	Número de Pratos Teóricos
nm	nanômetros
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i> (Ressonância Magnética Nuclear)
PCA	<i>Principal Component Analysis</i> (Análise de Componentes Principais)
PLS-DA	<i>Partial Least Square for Discriminat Analysis</i> (Análise Discriminate por Mínimos Quadrados Parciais)
ppm	Partes por milhão
RMN de ¹H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RP	<i>Reversed Phase</i> (Fase Reversa)
RSM	<i>Response Surface Methodology</i> (Metodologia de Superfície de Resposta – MSR)
SC	Sesquiterpeno Ciclase
SD	<i>Standard Deviation</i> (Desvio Padrão)
SIMCA	<i>Soft Independet Modelling of Class Analogy</i>
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i> (Extração em Fase Sólida)
SUCEST	<i>Sugarcane EST Project</i>
u.a.	Unidades Arbitrárias
UV	Ultravioleta
WUE	<i>Water Use Efficiency</i> (eficiência do uso de água)
α	Seletividade

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
1.1.	Cana-de-açúcar	20
1.1.1	Aspectos botânicos e fisiológicos	22
1.1.2	Importância econômica	26
1.1.3	Panorama climático	30
1.2.	Metabolômica	31
1.2.1	Estratégias metodológicas para avaliação metabolômica	33
1.2.2	Por que estudar o metaboloma de cana-de-açúcar?	34
1.3.	Quimiometria	38
1.3.1	Planejamentos e otimização de experimentos	39
1.3.2	Análise exploratória e classificação de dados	43
2	OBJETIVOS.....	47
3	MATERIAIS E MÉTODOS	47
3.1.	Estratégia experimental.....	47
3.2.	Materiais	47
3.3.	Amostra – obtenção e pré-processamento do material vegetal	48
3.3.1	Amostras utilizadas no desenvolvimento e validação do método	48
3.3.2	Amostras submetidas a condições atmosféricas simuladas – alta concentração de CO ₂ atmosférico e concentração ambiente	49
3.4.	Preparo da amostra – procedimento preliminar.....	50
3.5.	Método cromatográfico preliminar	51
3.6.	Desenvolvimento do método de extração	52
3.6.1	Escolha do solvente extrator	52
3.6.2	Avaliação das condições de extração	53
3.7.	Desenvolvimento do método cromatográfico	55
3.7.1	Considerações preliminares	55
3.7.2	Seleção da coluna cromatográfica	55
3.7.3	Seleção das condições cromatográficas – tempo e fase móvel....	56
3.7.4	Seleção das condições cromatográficas – temperatura, volume de injeção e vazão da fase móvel.	58
3.8.	Ajustes no gradiente.....	59
3.9.	Validação do método	59
3.9.1	Precisão do equipamento	59
3.9.2	Análise de brancos	59
3.9.3	Repetibilidade intra e interdias	59
3.10.	Estabilidade da amostra	60
3.11.	Avaliação da aplicabilidade do método a diferentes cultivares	60
3.12.	Avaliação da influência do teor de CO ₂ nas amostras cultivadas sob condições atmosféricas simuladas	60
	<i>Organização e pré-tratamento dos dados.....</i>	<i>61</i>
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	61
4.1.	Desenvolvimento do método de extração	61
4.1.1	Escolha do solvente extrator	61
4.1.2	Avaliação das condições de extração	67
4.2.	Desenvolvimento do método cromatográfico	72

4.2.1	Considerações preliminares	72
4.2.2	Seleção da coluna cromatográfica	74
4.2.3	Seleção das condições cromatográficas – tempo e fase móvel....	75
4.2.4	Seleção das condições cromatográficas – temperatura, volume de injeção e vazão da fase móvel.	79
4.3.	Ajustes no gradiente.....	82
4.4.	Validação do método	84
4.4.1	Precisão do equipamento	84
4.4.2	Análise de brancos	84
4.4.3	Repetibilidade inter amostra.....	86
4.4.4	Repetibilidade intradia	87
4.4.5	Repetibilidade interdias	87
4.5.	Estabilidade da amostra	88
4.6.	Avaliação da aplicabilidade do método a diferentes cultivares	88
4.7.	Avaliação preliminar dos constituintes químicos de folhas de cana-de- açúcar	92
4.8.	Avaliação da influência do teor de CO ₂ nas amostras cultivadas em condições atmosféricas simuladas	95
	<i>Alinhamento dos perfis cromatográficos</i>	95
	<i>Análise de componentes principais – PCA</i>	97
	<i>Modelos de classificação – SIMCA e PLS-DA</i>	103
5	CONCLUSÕES.....	110
6	PERSPECTIVAS PARA O ESTUDO METABOLÔMICO DE CULTIVARES DE CANADE-AÇÚCAR	111
	REFERÊNCIAS.....	113
	ANEXOS	124

1 INTRODUÇÃO

1.1. Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), originária do sudeste asiático é cultivada desde a antiguidade. Por volta do ano 20.000 a.C., os povos das ilhas do Pacífico descobriram as propriedades desta planta, que crescia espontaneamente nas suas terras. Os registros indicam que no ano 500 a.C. os indianos foram pioneiros na utilização do suco da cana para produção de açúcar, mas foram os árabes que expandiram o cultivo da cana-de-açúcar no Mediterrâneo, entre os séculos VI e IX. Atualmente é cultivada em uma extensa área territorial, compreendida entre os paralelos 35º de latitude Norte e Sul. Foi introduzida no Brasil em 1.532, por Martim Afonso de Souza, na antiga Capitania de São Vicente, São Paulo (CLAYTON e DANIELS, 1975).



Figura 1. Região de cultivo de cana-de-açúcar no mundo.

A cana-de-açúcar atualmente cultivada no Brasil e no mundo é na verdade, um híbrido de diferentes espécies. Até 1925 eram plantados no Brasil os genótipos das espécies *S. officinarum* conhecidas como Riscada, Roxa, Cristalina, Manteiga, Caiana e Preta, porém, a alta susceptibilidade da *S. officinarum* a diversas doenças, em especial ao mosaico, levou as nações produtoras de cana a iniciar programas de melhoramento através da hibridação entre as diferentes espécies do gênero

Saccharum, incluindo algumas selvagens. Esses programas tiveram início antes de 1950, com o objetivo de obter variedades com melhores características agrônômicas, incluindo resistência a doenças.

Dessa forma, a *Saccharum officinarum* foi a base dos programas de melhoramento, capaz de acumular altos níveis de sacarose no colmo, mas com pouca resistência a doenças. Admite-se que a espécie *S. officinarum* tenha surgido a partir de hibridações entre *Saccharum spontaneum*, *Miscanthus*, *Erianthus arundinaceus* e *Saccharum robustum* (DANIELS e ROACH, 1987).

A classificação taxonômica completa da cana-de-açúcar é mostrada na Tabela 1:

Tabela 1. Classificação taxonômica da cana-de-açúcar.

Especificação	Cronquist (1981)
Divisão	Magnoliophyta
Classe	Liliopsida
Ordem	Cyperales
Família	Poaceae
Tribo	Andropogoneae
Subtribo	Saccharininae
Gênero	<i>Saccharum</i>
Espécies	<i>Saccharum officinarum</i> <i>Saccharum barberi</i> <i>Saccharum robustum</i> <i>Saccharum spontaneum</i> <i>Saccharum sinensis</i> <i>Saccharum edule</i>

A terminologia taxonômica atual dos cultivares de cana é *Saccharum* spp., já que todos os cultivares comercialmente disponíveis são híbridos, frutos de melhoramento genético. Estes híbridos são desenvolvidos buscando-se aliar a rusticidade e resistência a moléstias de determinadas espécies, com as boas qualidades das variedades nobres de *Saccharum officinarum*, principalmente no que diz respeito ao teor de sacarose.

Como resultado, as variedades disponíveis de cana possuem um genoma interespecífico complexo, aneuplóide com o número de cromossomos variando de 100 a 130 (HOARAU et al., 2001). Esta complexidade genômica da maioria das variedades agrônômicas da cana-de-açúcar, de natureza multialélica e multigênica, torna o seu melhoramento uma tarefa muito difícil, ainda carente de muitos estudos

que completem todas as informações sobre esta gramínea de reconhecido valor econômico (CASU et al., 2004).

Os atuais híbridos recebem uma nomenclatura específica, onde é informada a instituição responsável pelo cruzamento ou seleção, o ano do cruzamento e o número específico do clone.



Figura 2. Composição e significado do nome do cultivar IACSP94-4004.

1.1.1 Aspectos botânicos e fisiológicos

Conhecer o funcionamento interno dos vegetais e suas relações com o ambiente pode proporcionar ao ser humano ferramentas para adequar manejos em lavouras comerciais, desenvolver processos adaptativos, assim como traçar linhas na área de melhoramento genético e biologia molecular, de forma a dar sustentabilidade aos processos de produção vegetal. Os processos fisiológicos variam temporalmente, de acordo com os estágios de desenvolvimento da planta e, na cana-de-açúcar, podem ser classificados como *brotação*, *perfilhamento*, *crescimento*, *maturação* e *florescimento*.

A cana-de-açúcar inclui-se entre as plantas propagadas vegetativamente nos plantios comerciais. A propagação por sementes só se processa após os cruzamentos orientados nos programas de melhoramento, visando à obtenção de novas variedades. Depois disso a propagação é feita assexuadamente, normalmente, por toletes contendo uma ou mais gemas. A gema nada mais é do que um colmo em miniatura contendo nós, entrenós e primórdios de raiz que se desenvolvem para produzir outros colmos que, nas fases iniciais de desenvolvimento, são chamados perfilhos.

Os órgãos da gema e primórdios radiculares permanecem no estado latente e, havendo condições favoráveis, passam para o estado ativo de crescimento e

desenvolvimento (VAN DILLEWIJN, 1952). O processo de brotação é influenciado por diversos fatores como temperatura, tipos e condições do solo, além das características específicas de cada variedade de cana. A principal condição favorável é a disponibilidade de água adequada. Após o momento em que o tolete é coberto com solo, se houver disponibilidade de água, inicia-se o processo de ativação das enzimas e hormônios que controlam a divisão e o crescimento celular, tanto da gema como dos pontos dos primórdios das raízes na zona radicalar.

A brotação, assim como a germinação das sementes, é um processo biológico que consome energia. Essa energia é originária da degradação de substâncias de reserva do tolete, através do processo de respiração. Em um período de aproximadamente 60 dias, essas reservas são fundamentais para a evolução do processo de brotação e essa relação de dependência reduz-se gradativamente à medida que o sistema radicular se desenvolve, aumentando a superfície ativa de absorção de água e nutrientes do solo.

Após a brotação das gemas, começam a se formar os perfilhos. O perfilhamento ocorre na parte subterrânea e, no caso da cana-de-açúcar, é limitado, salvo em algumas variedades das espécies *S. spontaneum*, cujo perfilhamento é ilimitado, como na maioria das gramíneas. Os fatores que podem interferir no processo e no número de perfilhos são a variedade, luminosidade, temperatura, nutrição do solo e umidade, além de plantas daninhas e culturas intercalares, que competem com a cana-de-açúcar em água, luz e nutrientes.

Cada perfilho comporta-se como uma planta independente e autônoma, pois tem órgãos próprios como raízes, folhas e frutos, mas todos aqueles que compõe a touceira continuam tendo ligações entre si e podem eventualmente trocar alguns nutrientes e água (ALEXANDER, 1973).

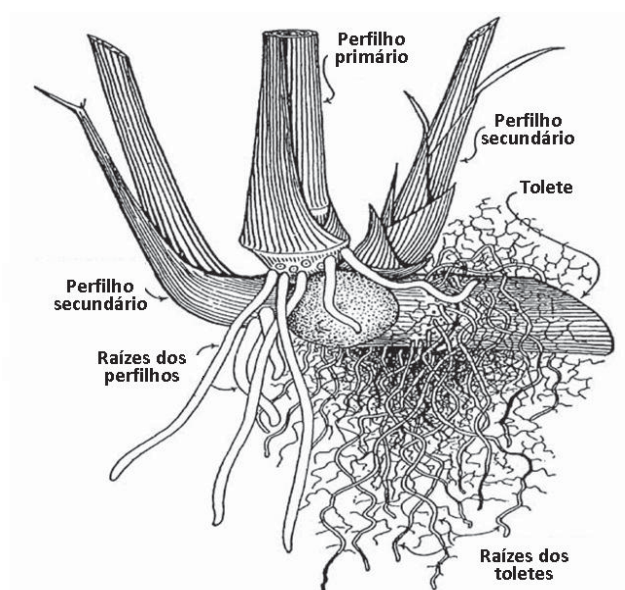


Figura 3. Brotação e perfilamento (VAN DILLEWIJN, 1952).

Ao caracterizar o crescimento da cana-de-açúcar, é importante realçar que ela está enquadrada entre as de maior eficiência fotossintética, isto é, classifica-se entre as plantas de metabolismo C_4 , assim como milho e sorgo. Quantitativamente, isto faz com que estas plantas apresentem, em relação às plantas de metabolismo C_3 , taxa de crescimento e eficiência do uso da água duas a três vezes maior, limite superior de temperatura em torno de 45°C (enquanto que o das C_3 é de 30°C) e ausência de fotorespiração, ou seja, mesmo em situação de estresse hídrico, consegue fazer a fotossíntese eficientemente (LEHNINGER, 2006).

As folhas são responsáveis pela interação da planta com a atmosfera, trocando gases e vapor d'água através dos estômatos; são alternadas, opostas e presas aos colmos e podem ser divididas em parte superior (lâmina) e parte inferior que envolve o colmo (bainha). À medida que a planta se desenvolve, as folhas mais velhas se tornam menos ativas e morrem com o tempo, desprendendo-se do colmo.

O mecanismo de captação do CO_2 pelas folhas das plantas C_4 ocorre de forma distinta das plantas C_3 , devido a uma anatomia distinta entre elas. Nas plantas C_4 , as veias menores são concentricamente envoltas por uma camada de células denominadas células da bainha vascular, as quais, por sua vez, são envoltas por uma camada de células do mesófilo. O ciclo C_4 é representado esquematicamente na Figura 4:

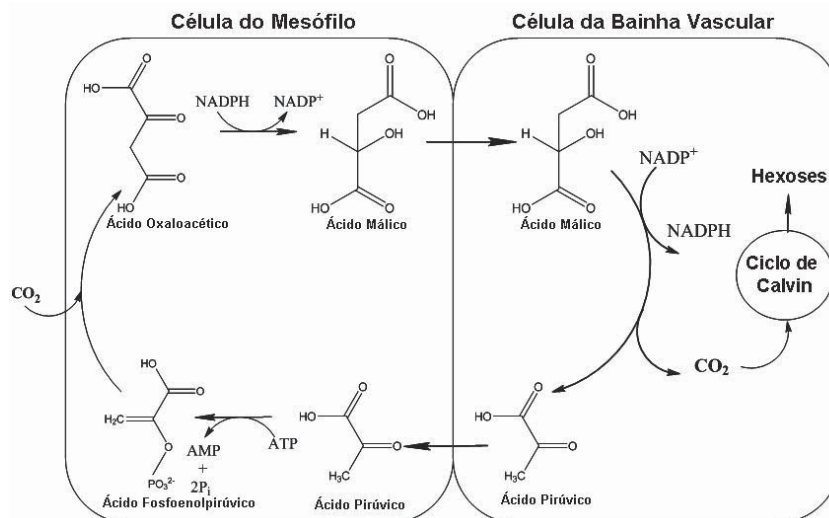


Figura 4. Processo de captação de CO_2 nas plantas de metabolismo C_4 . (FERRAZ, s.d., *adaptado*)

O ciclo inicia-se quando as células do mesófilo absorvem o CO_2 atmosférico, condensando-o com o ácido fosfoenolpirúvico para formar o ácido oxaloacético, em uma reação catalisada pela enzima fosfoenolpiruvato-carboxilase (**PEP-carboxilase**). O ácido oxaloacético é reduzido pelo NADPH ao ácido málico, o qual é transportado até as células da bainha vascular (o nome C_4 refere-se ao ácido oxaloacético, primeiro composto formado no ciclo, com 4 átomos de carbono). Nestas células, o ácido málico é descarboxilado oxidativamente pelo NADP^+ para formar CO_2 , ácido pirúvico e NADPH . O CO_2 concentrado por este processo entra no Ciclo de Calvin, onde, posteriormente dará origem às hexoses. O ácido pirúvico retorna às células do mesófilo, onde é fosforilado para regenerar o ácido fosfoenolpirúvico (LEHNINGER, 2006).

Nas plantas C_3 , esta etapa de “pré-concentração” do CO_2 não existe e o CO_2 é assimilado diretamente pelo Ciclo de Calvin, pela enzima **Rubisco**. O primeiro composto estável formado é um composto de 3 carbonos: o ácido fosfoglicérico (daí o nome C_3). Enquanto a **PEP-Carboxilase** (nas plantas C_4) atua somente como uma carboxilase, a **Rubisco** (no Ciclo de Calvin) pode atuar como carboxilase ou oxigenase. Quando esta atua como oxigenase, participa do processo denominado fotorrespiração. Por isso, a alta concentração de CO_2 e baixa concentração de O_2 nas células da bainha limitam a fotorrespiração, elevando a eficiência do uso da água e da fotossíntese das plantas C_4 em relação às plantas C_3 . Além disso,

qualquer CO₂ liberado pela fotorrespiração, é refixado nas células do mesófilo pela via C₄ (LEHNINGER, 2006).

Os colmos são definidos como a porção acima do solo que sustenta as folhas e a inflorescência. É a parte economicamente mais importante, pois é nela que é armazenado o caldo contendo o açúcar extraído na indústria.

O processo de formação da inflorescência se dá quando a planta atinge uma maturação relativa de desenvolvimento e determinado estímulo faz com que a planta deixe de produzir folhas e colmos, passando a florescer. Um dos principais fatores para esse estímulo é o fotoperíodo (ALEXANDER, 1973).

A inflorescência da cana-de-açúcar é indesejável para o manejo, devido ao consumo de energia com perdas no teor de sacarose e alterações na qualidade da matéria-prima industrial, mas é de interesse aos programas de melhoramento. Assim, ela pode ser induzida ou inibida através de variações nas épocas de plantio e corte, localização das áreas de cultivo, uso de maturadores ou inibidores de florescimento, irrigação, adubação, manejo artificial do fotoperíodo etc.

1.1.2 Importância econômica

Desde a era colonial, a cana-de-açúcar figura entre as espécies exóticas de maior impacto na economia brasileira. Já na segunda metade do século XVI as relações econômicas que vigoravam entre as nações européias baseavam-se no mercantilismo. Este modelo impulsionava os países europeus a expandirem seus limites de comércio internacional e a adoção de políticas econômicas protecionistas. Para Portugal, o Brasil representava muitas vantagens, incluindo o comércio internacional que se beneficiava da exclusividade de colonização, ou monopólio, que foi conhecido como pacto colonial (dependência econômica, onde a colônia fornece bens primários em troca de bens manufaturados). O Brasil oferecia excelentes condições para se enquadrar no pacto colonial de Portugal e assim, um dos objetivos da coroa portuguesa era transformar o Brasil num grande produtor de açúcar para suprir a demanda do mercado internacional e beneficiar-se dos lucros de sua comercialização. Os portugueses tinham larga experiência no cultivo da cana-de-açúcar nas ilhas Madeira, Açores e Cabo Verde e viam no nordeste brasileiro uma região propícia devido as condições do clima e de solo, essenciais ao plantio da cana. Em 1532, Martim Afonso de Souza foi o responsável pelas primeiras mudas de cana-de-açúcar no Brasil, dando início ao cultivo comercial na Capitania

de São Vicente. Em 1542, Duarte Coelho, donatário da próspera capitania de Pernambuco, já havia introduzido a cana-de-açúcar em suas terras (FIGUEIREDO, 2008).

Além da importância histórica dessa *commodity* no processo de desenvolvimento socioeconômico desde o Brasil colônia até os dias atuais, a cana-de-açúcar vem se destacando no cenário nacional e internacional devido suas múltiplas utilizações, sendo hoje responsável pela produção de etanol, açúcar, rapadura, melado e aguardente. A fim de ilustrar a relevância desta espécie no cenário econômico, alguns dados foram selecionados e são apresentados a seguir.

O Brasil é líder na produção canavieira mundial e o setor sucroalcooleiro é parte importante do agronegócio brasileiro, além de ser referência para os demais países produtores. Hoje, quase todos os estados brasileiros produzem cana, sendo que São Paulo é o maior produtor, com cerca de 60% da produção nacional (UNICA, 2010). Atualmente, a principal destinação da cana-de-açúcar cultivada no Brasil é a fabricação de açúcar e álcool. O etanol é hoje importante matriz energética e os EUA são os maiores produtores de etanol do mundo, ficando o Brasil na segunda posição.

O aumento da produção brasileira de cana-de-açúcar nas últimas décadas ilustra o crescente interesse por este vegetal como matéria-prima (Figura 5).

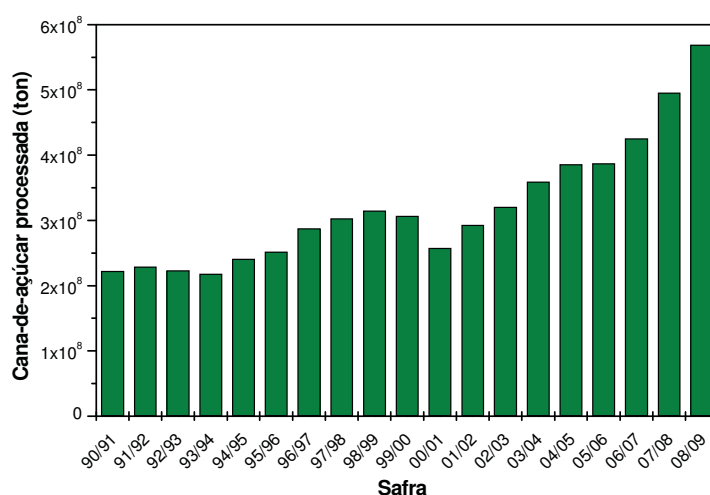


Figura 5. Evolução da produção brasileira de cana-de-açúcar. (UNICA, 2010)

A cana-de-açúcar é a matéria-prima que permite os menores custos de produção de açúcar e álcool, devido à energia consumida no processo ser produzida a partir dos seus próprios resíduos.

O país destaca-se na produção mundial de açúcar, sendo responsável por cerca de 20% da mesma e de 40% de toda a exportação (UNICA, 2010). O crescente aumento da produção e exportação é mostrado nas Figuras 6 e 7.

Quanto ao álcool, entre os obstáculos para a maior atuação brasileira no mercado internacional podem ser citados, por exemplo, os subsídios para o etanol de milho no EUA (maior produtor de etanol do mundo) e a infra-estrutura deficiente de distribuição no Brasil. Não obstante, as perspectivas neste campo são promissoras, devido ao crescente preço e diminuição das reservas de petróleo e pressões sociais e ambientais, o que tem, entre outras implicações, aumentado a demanda pelo álcool nos últimos anos, nos quais o Brasil tem se mantido como um dos maiores produtores de etanol no cenário mundial, sendo responsável em 2006, por cerca de 36% da produção.

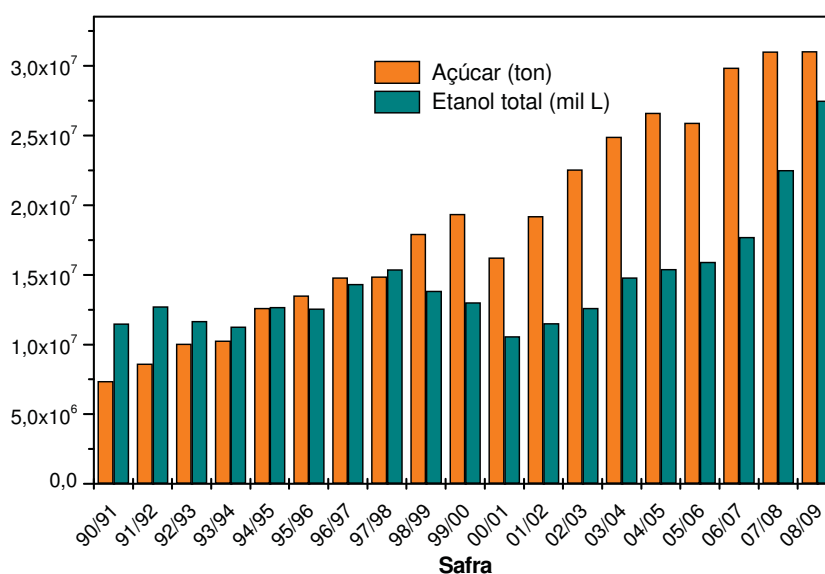


Figura 6. Evolução da produção brasileira de açúcar e álcool (UNICA, 2010).

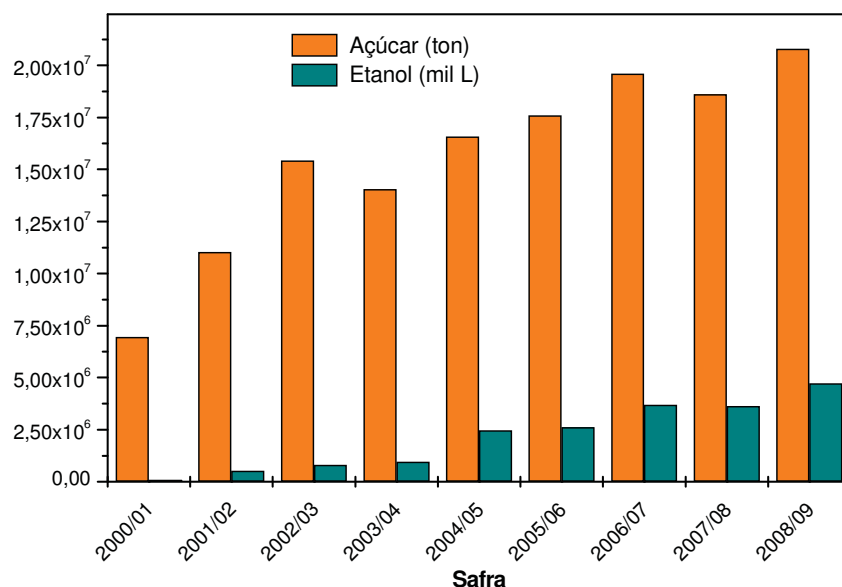


Figura 7. Evolução da exportação brasileira de açúcar e álcool (UNICA, 2010).

O surgimento dos automóveis bicomcombustíveis em 2003 foi responsável por uma nova dinâmica no segmento, provocando o aumento do consumo do etanol no mercado interno.

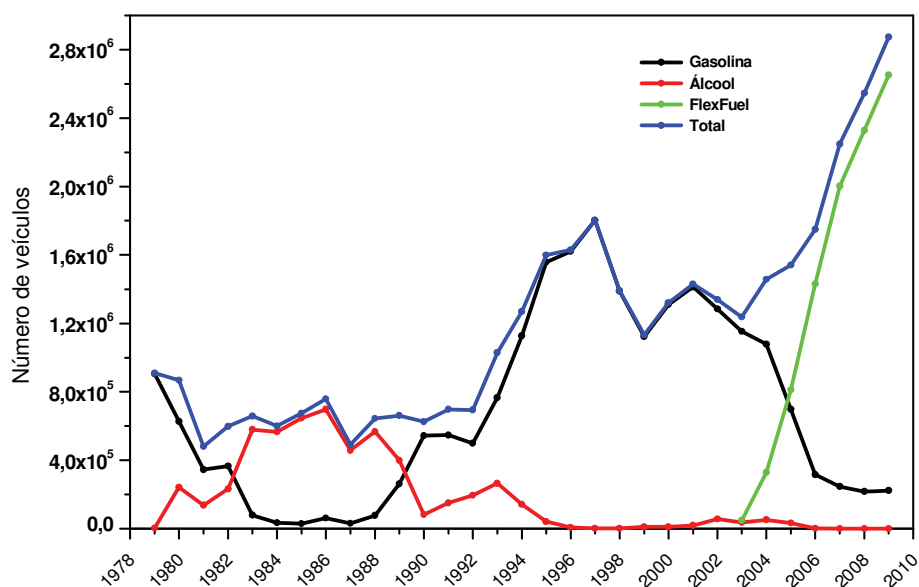


Figura 8. Venda de automóveis leves, por tipo de combustível (UNICA, 2010)

O custo brasileiro de produção do álcool é o menor entre os países produtores: cerca de US\$0,20/L, enquanto que nos EUA, com produção de etanol de

milho, altamente subsidiado, é cerca de US\$0,33/L. Na Europa, o custo pode ser de US\$0,48/L (de trigo) a US\$0,52/L (de beterraba) (MACEDO, 2005).

A cachaça, também produzida a partir da cana-de-açúcar, é a segunda bebida mais vendida no Brasil, perdendo apenas para a cerveja. A produção estimada anual é de 1,5 bilhão de litros e embora a produção nacional seja consumida quase que totalmente no mercado interno, tem-se verificado um crescimento acentuado da sua aceitação no mercado internacional, representando em 2005, o terceiro destilado mais consumido do mundo (ANDRADE, 2006).

No cenário de aumento de preço do petróleo, perspectivas de esgotamento das reservas, pressões sócio-ambientais e riscos geopolíticos decorrentes da dependência do petróleo de países politicamente instáveis, as atenções voltadas ao etanol não estão mais restritas ao etanol combustível, mas o incorporam como fonte de matérias-primas (químicas) utilizadas em diversos setores da indústria de transformação. Destaca-se assim, a alcoolquímica e a possibilidade de obtenção de alguns derivados do petróleo a partir do etanol, como o eteno, matéria-prima para resinas. No futuro, por razões econômicas, a alcoolquímica poderá vir a substituir a petroquímica e o etanol poderá assumir o lugar do petróleo como fonte de matérias-primas.

O desenvolvimento de tecnologias a partir de pesquisas em ciência básica proverá subsídios para se obter matéria-prima adequada ao desenvolvimento sustentável, além de integrar-se à cadeia produtiva, fazendo uso de subprodutos e resíduos da produção agrícola ou agroindustrial.

Desta forma, por conta dos elementos supracitados, pode-se afirmar que o panorama da agroindústria de cana-de-açúcar tem se mostrado favorável e bastante promissor. Neste cenário, a pesquisa científica surge como ferramenta indispensável para a economia nacional, na medida em que agrega valor a uma produção reconhecida historicamente por sua grande relevância social e econômica.

1.1.3 Panorama climático

Diante do panorama atual de alterações climáticas, acredita-se que num futuro próximo, uma das prováveis situações de estresse ambiental que as plantas terão que enfrentar, principalmente se medidas globais de mudanças ambientais não forem adotadas, é a crescente taxa de CO₂ atmosférico causada pelas emissões crescentes desse gás associada à queima de combustíveis fósseis e

desflorestamentos. A concentração de CO₂ atmosférico saltou de cerca de 280 ppm na era pré-industrial para os 379 ppm atuais – um aumento de cerca de 36% nos últimos 250 anos (SOUZA et al., 2008). Mantidas as taxas atuais de crescimento de emissão de CO₂ projeta-se que estes níveis podem atingir 730-1020 ppm até o final do século 21 (SOLOMONS et al., 2007). Todos os estudos químicos, biológicos e ambientais que estão sendo feitos indicam que o aumento na concentração atmosférica de CO₂ provocará efeitos marcantes sobre a fotossíntese e, conseqüentemente metabolismo e desenvolvimento vegetal (NOWAK, ELLSWORTH e SMITH, 2004; AINSWORTH e LONG, 2005).

Devido à importância econômica mundial da cana-de-açúcar e seu emprego como fonte de energia renovável (GOLDEMBERG, 2007), é essencial entender como esta cultura responderá ao aumento progressivo de CO₂ atmosférico. Estudos iniciais realizados por Buckeridge e colaboradores (SOUZA et al., 2008) demonstraram que variedades de cana-de-açúcar cultivadas em condições de elevada concentração de CO₂ (720 ppm) apresentaram taxa fotossintética aumentada em até 35%, condutância estomatal diminuída em cerca de 37%, eficiência do uso da água (*Water Use Efficiency* - WUE) aumentada em 62%, aumento de 17% na biomassa total e teor de sacarose nas folhas 29% maior que em plantas cultivadas em condições atmosféricas normais (380 ppm de CO₂). Comparação da expressão gênica em tecidos de cana-de-açúcar nas duas condições indicou expressão aumentada para genes relacionados com a fotossíntese e metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídeos, mas expressão diminuída para genes relacionados ao metabolismo secundário e ao desenvolvimento do vegetal. Estes dados indicam a necessidade de estudos mais acurados no que se refere aos metabólitos secundários desta matriz vegetal tendo em conta que essas micromoléculas são essenciais na regulação de vias metabólicas importantes à sobrevivência e adaptação vegetal.

1.2. Metabolômica

O termo “metabolômica” refere-se ao estudo global de todas as micromoléculas de um organismo a um determinado instante, sob específicas condições ambientais (COLQUHOUN, 2007). O objetivo final é estabelecer um amplo “retrato” que represente a diversa e vasta composição metabólica (HALL, 2006).

Embora o número exato seja desconhecido, estima-se que um organismo contenha aproximadamente a mesma quantidade de metabólitos quanto de genes. Em plantas, esse número de compostos se aproxima de 30.000 (VERPOORTE et al., 2008). Estes compostos se apresentam em uma grande faixa de concentração e com propriedades químicas muito distintas.

Geralmente, o metaboloma é dividido em dois grupos: metabólitos primários e secundários. Metabólitos primários são definidos como os compostos necessários para execução das funções básicas das células, como respiração e biossíntese de aminoácidos. Basicamente, todos os organismos compartilham os mesmos tipos de metabólitos primários, ainda que hajam grandes diferenças, resultado de diferentes rotas biossintéticas. Ao contrário, metabólitos secundários são específicos e estão envolvidos na interação entre o organismo e o ambiente (VERPOORTE et al., 2007), no sentido de superar os desafios sazonais e lidar com fatores de estresse abióticos (UV, água) e bióticos (parasitismo, patógenos).

Diferentes abordagens são utilizadas para análise de metabólitos: “*fingerprint* metabólico” é definido como a triagem qualitativa da composição metabólica de uma amostra com o objetivo primário de comparação e discriminação, por outro lado, “perfil metabólico” representa a identificação e quantificação dos metabólitos detectados, o que é, por razões práticas, viável para um número limitado de compostos.

É essencial considerar que análises metabolômicas resultam em um “retrato metabólico” específico às condições do momento da coleta e por este motivo, enfatizam-se os cuidados no cultivo e coleta do material analisado.

Estudos metabolômicos podem ser divididos em três fases: inicialmente, detectar o maior número de sinais referentes a substâncias quanto possível, seguido da análise de um grande número de amostras a fim de identificar a variação biológica do sistema em estudo. Finalmente, analisar a influência de diferentes condições experimentais sobre o modelo estudado (por exemplo, doenças ou transgenia em comparação a espécie sadia ou selvagem) (VERPOORTE et al., 2007).

Análises metabolômicas objetivam estabelecer a compreensão e a predição do comportamento de uma rede metabólica complexa, a partir dos efeitos de variações sobre o sistema em estudo. Uma das maiores aplicações em

metabolômica de plantas é a análise de mudanças metabólicas devido à influência de estresses (GUY et al., 2008).

1.2.1 Estratégias metodológicas para avaliação metabolômica

As principais exigências para uma análise metabolômica confiável estão relacionadas às técnicas analíticas, pois elas definem a abrangência de metabólitos analisáveis, confiabilidade dos resultados quali e quantitativos, reprodutibilidade e robustez, além do tempo de análise empregado.

As principais técnicas empregadas em análises metabolômicas atualmente são HPLC-UV, GC-MS, MSⁿ e NMR (VERPOORTE et al., 2008), sendo que Espectrometria de Massas (MS) e Ressonância Nuclear Magnética (NMR) são consideradas principais devido à abordagem mais universal em relação às outras técnicas analíticas (VERPOORTE et al. 2007). Todas as técnicas aplicadas à metabolômica apresentam vantagens e desvantagens e dependem da natureza química das substâncias a serem analisadas e da diversidade destes constituintes na matriz em análise.

Atualmente, nenhuma técnica é capaz de fornecer informações quali e quantitativas sobre todos os metabólitos presentes em um extrato. A Figura 9 ilustra as diferentes estratégias utilizadas atualmente:

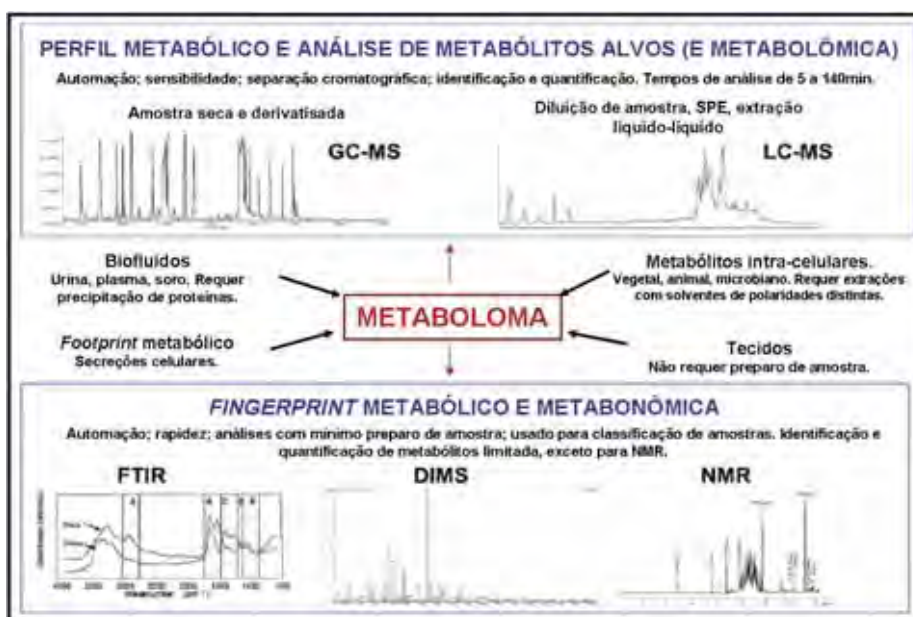


Figura 9. Ilustração das diferentes estratégias de análise metabolômica, considerando preparação da amostra e análise (DUNN e ELLIS, 2005, adaptado).

1.2.2 Por que estudar o metaboloma de cana-de-açúcar?

Aplicação da metabolômica para entender função e regulação das vias metabólicas de espécies de interesse comercial constitui hoje, uma ferramenta poderosa, complementar à genômica, transcriptômica e proteômica devido a necessidade de se determinar a função de cada gene em microorganismos (RAAMSDONK et al., 2001), plantas (ROESSNER et al., 2001) e animais responsáveis pelas interações complexas e pouco conhecidas que permeiam o universo macro/micromolecular de um determinado organismo. Algumas aplicações dessa abordagem incluem:

- Determinação de biomarcadores metabólicos cujas alterações são indicativas da presença de uma doença;
- Determinação de efeitos de estresses bioquímicos ou ambientais sobre plantas ou microorganismos, incluindo plantas geneticamente modificadas.

Embora o uso de cultivares resistentes seja o meio mais eficiente para o controle de diversos tipos de pragas de *Sacharum* spp., esta não é considerada uma estratégia racional uma vez que o desenvolvimento dos sintomas de muitas doenças que atacam a cana-de-açúcar pode ser influenciado pelo estado fisiológico da plantação e também pelas condições ambientais (ROTT et al., 1997). A definição das características bioquímicas relacionadas à resistência vegetal deve ser atualizada e o estudo metabolômico é provavelmente, o último nível da análise pós-genômica. Este conhecimento pode revelar mudanças nos fluxos metabólicos que são controlados por mudanças muito pequenas no nível de expressão gênica, medidas com foco no transcriptoma e/ou analisando o proteoma. Mudanças metabólicas constituem características fundamentais, como resultado de modificações genéticas e também como resultado de interações entre planta e patógenos (pragas) e com o ambiente (ALLWOOD et al., 2008).

O perfil metabolômico, tanto qualitativo quanto quantitativo, pode refletir o processo celular que controla o fenótipo bioquímico da célula, tecido ou do organismo como um todo. Essas condições bioquímicas podem ser utilizadas para monitorar e acessar a função gênica (FIEHN et al., 2000). Por isso, para se ter informações mais precisas sobre a genômica funcional, a metabolômica é uma ferramenta estratégica, por ser mais robusta. Os dados sobre a constituição micromolecular pode auxiliar bastante no entendimento gênico de determinado

organismo e assim auxiliar no entendimento das outras abordagens que usam o transcriptoma e proteoma como suportes bioquímico de análise (GYGI et al., 1999).

O acompanhamento de todo o perfil micromolecular durante o crescimento do vegetal é crucial e estratégico para prever as relações funcionais no desenvolvimento da planta (POORTER, 1988) e será útil no entendimento aprofundado das respostas vegetais a situações de estresse.

França et al. (2001) usaram um conjunto de genes relacionados ao metabolismo secundário da cana-de-açúcar, extraídos das sequências *tag* e determinadas no estudo do genoma da cana (SUCEST) para investigar tanto o padrão de expressão gênica de enzimas chaves, reguladoras das vias do metabolismo secundário, quanto das classes principais desses metabólitos envolvidos na reposta da cana-de-açúcar, expostos aos eventos ambientais, durante o seu desenvolvimento. Os resultados desta pesquisa mostraram dados bastante ilustrativos das vias metabólicas operantes nesta amostragem. Foi diagnosticado que cDNAs de cana-de-açúcar codificam sistemas enzimáticos de vias metabólicas importantes como as sesquiterpeno ciclases (SC) induzida por luz UV; chalcona sintase (CHS), a primeira enzima na ramificação metabólica que leva a flavonóides; isoflavona sintase (IFS), envolvida na defesa da planta e nodulação da raiz; isoflavona redutase (IFR), uma enzima chave na biossíntese de fitoalexinas fenilpropanoídicas; e ácido cafeico-*O*-metiltransferase, enzima chave na biossíntese de ligninas e precursores de parede celular.

Estudo metabolômico implica no conhecimento completo da composição micromolecular de um determinado organismo. As micromoléculas são sintetizadas a partir de intermediários do metabolismo primário do carbono. Desses, clorofilas sintetizadas pela via de Beale (SCHOEFS e BERTRAND, 2005), carotenóides formados pela via isoprenóide e compostos fenólicos formados pela via do chiquimato (BUCHANAN et al., 2000) são os mais estudados no reino vegetal. Considera-se que a biossíntese desses metabólitos, sob condições de estresse, está relacionada com a proteção das estruturas celulares aos danos oxidativos naturais (CHALKER-SCOTT e FUCHIGAMI, 1989; CLOSE e MCARTHOR, 2002; WAHID e GHAZANFAR, 2006). Carotenóides (carotenos e xantofilas) atuam como pigmentos acessórios na captação de luz e também como antioxidantes naturais importantes (HAVAUX, 1998; DE PASCALE et al., 2001) e os compostos fenólicos são antioxidantes poderosos, fundamentais na proteção de tecidos vegetais sob estresse

(DIXON e PAIVA, 1995; SGHERRI et al., 2004). Os mais frequentes nas plantas, incluindo a cana-de-açúcar, são os flavonóides, ligninas e taninos, os quais desempenham uma grande variedade de funções como defesa contra herbívoros e patógenos, suporte mecânico, atração de polinizadores, absorção de luz e ação inibitória sobre plantas competidoras (HARBORNE e WILLIAMS, 2000).

Há evidências de que o papel fisiológico das substâncias fenólicas está mais relacionado aos mecanismos de tolerância ao estresse oxidativo do que na defesa contra herbivoria (CLOSE e MCARTHUR, 2002; WAHID e GHAZANFAR, 2006). Antocianinas são solúveis em água e produzidas sob várias condições de estresse (bioquímico e ambiental), incluindo UV-B (MENDEZ et al., 1999), seca (BALAKUMAR et al., 1993), baixas temperaturas (KROL et al., 1995), deficiência de nutrientes (RAJENDRAN et al., 1992), ozônio (FOOT et al., 1996), e salinidade (WAHID e GHAZANFAR, 2006).

Alguns estudos sobre a química de metabólitos secundários de cana-de-açúcar relatam a ocorrência de C e O-glicosilflavonas (COLOMBO et al., 2006 e 2008), poliamidas (RODRIGUEZ et al., 2000), derivados fenólicos (LEAL et al., 1994), betaínas (COLMER et al., 2000), ácidos carboxílicos de cadeia longa, α -hidroxí ácidos e aminoácidos (KUMAR e NARAYANASWAMY, 2006), além de hidrocarbonetos alifáticos e insaturados de cadeia longa. Recentemente Li et al. (2010) descreveram um método voltado à determinação e comparação de flavonóides e antocianinas.

Entre os metabólitos secundários implicados nas interações planta-patógeno, as poliaminas e os ácidos fenólicos merecem destaque. Fontaniella e Vicente (2003) mostraram a influência dessas substâncias em dois cultivares de cana-de-açúcar, com suscetibilidades diferentes em relação à escaldadura das folhas, uma doença causada pela bactéria *Xanthomonas albilineans*. Os sucos obtidos dos dois cultivares infectados apresentaram níveis significativamente aumentados de atividade de putresceína e ornitina descarboxilase. No entanto, os patógenos induziram mudanças diferentes nos dois cultivares, em etapas metabólicas subsequentes. Enquanto espermidina desapareceu completamente no cultivar C 439-52, altamente susceptível, um aumento no teor dessa substância foi observado no cultivar L 55-5, moderadamente susceptível. O metabolismo de ácidos fenólicos também foi diferente nos dois cultivares. Em resumo, este estudo demonstrou que a

composição de poliaminas e de ácidos fenólicos no suco da cana foi alterada de forma diferenciada pela infecção por *X. albilineans*.

Glassop et al. (2007) observaram mudanças metabólicas durante o desenvolvimento da planta do cultivar Q-117 através de análises por GC-MS. Verificaram que o metabólito com maior correlação (trealose) não tem um mecanismo conhecido para explicar a facilidade de acúmulo de sacarose por esta variedade.

Wahid e Ghazanfar (2006) encontraram fortes evidências para a hipótese de que os metabólitos secundários desempenham papel fisiológico na tolerância à salinidade pela cana-de-açúcar, particularmente em relação aos danos oxidativos.

O aquecimento global é outro fator crítico a ser estudado no desenvolvimento de plantas cultivadas. Para estudar as mudanças no crescimento em intervalos de tempo curtos, vários metabólitos primários e secundários foram monitorados em plantas com até 1 mês de idade, cultivadas em condições sob controle de temperatura (28°C) e estresse térmico (40°C), e com termotolerância. O estresse térmico reduziu significativamente a matéria seca e a área foliar dos brotos. Mudanças nas taxas de crescimento relativo e assimilação líquida foram maiores do que a expansão foliar, indicando efeito inverso do calor na assimilação de nutrientes e de CO₂ na produção de matéria seca. Apesar da redução no potencial hídrico foliar estar relacionada a uma resposta imediata ao calor, este efeito foi compensado pela síntese precoce de prolina, glicina betaína e de açúcares solúveis (metabólitos primários). Entre os metabólitos secundários, a síntese de antocianinas foi similar à de metabólitos primários; enquanto carotenóides e fenólicos solúveis acumularam posteriormente e a clorofila permaneceu inalterada. Em resumo, as alterações nos níveis metabólicos observadas foram distribuídas no tempo e espaço, durante o crescimento do vegetal, e foram cruciais na tolerância ao calor (WAHID, 2007).

A maioria dos estudos voltados para análise de metabólitos secundários é dirigida, sendo necessário analisar um número limitado de substâncias em cada abordagem. Não há na literatura, até o momento, nenhum estudo abrangendo uma ampla gama de metabólitos de cana-de-açúcar, em uma única análise

Visando uma abordagem mais ampla do metabolismo secundário de cana-de-açúcar propôs-se o desenvolvimento de método cromatográfico em HPLC-DAD para a análise de metabólitos secundários dessa importante matriz vegetal, optando-se

por analisar o perfil metabólico, utilizando a sequência: amostragem, resfriamento, extração e análise por HPLC-DAD.

A escolha da cromatografia líquida em fase reversa acoplada a detector UV/Vis com arranjo de diodo (HPLC-DAD) justifica-se pela diversidade de metabólitos não voláteis que podem ser analisados por ela, aliada à robustez e a simplicidade operacional do detector UV-Vis com arranjo de diodos. Dentre as limitações da técnica destaca-se, principalmente, a impossibilidade de detecção de substâncias sem grupos cromóforos.

1.3. Quimiometria

A química analítica oferece um vasto número de exemplos de sistemas multicomponentes, com amostras complexas e frequentemente com muitas espécies a serem analisadas simultaneamente (como é o caso de áreas como genômica, proteômica e metabolômica) ou poucos analitos na presença de muitos interferentes (por exemplo, amostras ambientais). A necessidade de uma instrumentação mais complexa para analisar estes sistemas de forma eficiente exige, da mesma forma, ferramentas computacionais para manipular e interpretar as informações obtidas (JUAN e TAULER, 2006).

A quimiometria pode ser definida como a pesquisa e utilização de métodos matemáticos e estatísticos para o tratamento de dados químicos de forma a extrair uma maior quantidade de informações e melhores resultados analíticos. Os métodos utilizados na quimiometria, a princípio, foram desenvolvidos em outras disciplinas que com a aplicação e pesquisas voltadas para o tratamento de dados químicos acabou dando origem a uma nova área dentro da química analítica. Isso se deu após a segunda metade dos anos 60, com o surgimento de métodos instrumentais computadorizados para a análise química que promoveu a geração de uma grande quantidade de dados. Até este período, os químicos baseavam suas decisões em uma pequena quantidade de dados que, na maioria das vezes, eram obtidos de forma lenta e dispendiosa. A partir dos anos 60, com a grande quantidade de dados de obtenção rápida e com menor esforço, foi preciso analisar todos esses dados e extrair maior quantidade de informações relevantes. Foi então, que teve início a pesquisa e utilização dos métodos matemáticos e estatísticos que acabaram resultando nessa nova área conhecida como quimiometria (OTTO, 1999).

Com o avanço da quimiometria foram desenvolvidas novas ferramentas com aplicações distintas conforme o objetivo do estudo como, por exemplo, a otimização de processos, a classificação de dados, as determinações quantitativas, entre outros. Assim, a quimiometria foi dividida em diversas frentes de pesquisa e aplicação:

- processamento de sinais analíticos;
- planejamento e otimização de experimentos;
- reconhecimento de padrões e classificação de dados;
- calibração multivariada;
- métodos de inteligência artificial (OTTO, 1999).

A denominação “análise multivariada”, geralmente utilizada em quimiometria, corresponde a um grande número de métodos e técnicas que utilizam simultaneamente todas as variáveis na interpretação do conjunto de dados obtidos. Os objetos químicos típicos são amostras analíticas ou compostos químicos de interesse, muitas vezes nomeados como analitos. As variáveis são, muitas vezes, derivadas das quantidades de constituintes químicos nos objetos, por exemplo, concentrações de elementos mais importantes, altura de picos em perfis cromatográficos, comprimentos de onda em perfis espectroscópicos.

Exemplos notáveis do uso dessas ferramentas podem ser mencionados: análise da intensidade de absorção em diversos comprimentos de onda, que é rotineiramente registrada em um único cromatograma; possibilidade de construção de superfícies de respostas com os dados originais, devidamente pré-processados; planejamentos experimentais, diminuindo consideravelmente o tempo e custo dos experimentos, logicamente com o aumento da qualidade e fidelidade dos resultados, entre outros (FERREIRA, et al., 1999; TAQUEDA, COSTA e FARIA, 1998).

1.3.1 Planejamentos e otimização de experimentos

Os métodos de otimização surgiram em função da necessidade de aprimoramentos no desempenho dos mais diversos sistemas que ocorrem no cotidiano. Literalmente, otimização corresponde a tornar algo “tão perfeito, efetivo ou funcional quanto possível”. Desta forma, podemos definir otimização como sendo um processo baseado em instruções que permitam obter o melhor resultado de uma dada situação (BRUNS, SCARMINIO e BARROS NETO, 2001).

Cientificamente estas instruções são frequentemente expressas através de métodos matemáticos que procuram maximizar ou minimizar alguma propriedade específica do sistema em estudo. É na escolha desta propriedade a ser otimizada e das condições de controle que se encontra grande parte das discussões sobre qual a melhor indicação para um desempenho ideal do sistema. Em diversas circunstâncias, esta propriedade a ser otimizada é denominada de função objetivo ou resposta (BANDEIRA, 2004).

A Metodologia de Superfície de Resposta (MSR ou RSM, de *Response Surface Methodology*), é uma técnica de otimização baseada em planejamentos fatoriais. Sua aplicação permite selecionar a combinação de níveis ótimos na obtenção da melhor resposta para uma dada situação (BRUNS, SCARMINIO e BARROS NETO, 2001).

As principais razões para se estudar um sistema com a MSR são:

- Determinar quais são as condições dos fatores ($x_1, x_2, \dots, x_k$) que determinam o melhor valor para a resposta y_i ;
- Necessidade de se conhecer as características da função resposta, que se aproxima das funções reais de operação dos sistemas;
- Identificar a relação existente entre os parâmetros e a respostas.

A função matemática que descreve a superfície é dada pela Equação 1, onde $x_1, x_2, \dots, x_k$ são os fatores experimentais e ϵ o resíduo ou erro experimental, ou seja, é a dispersão dos resultados em torno da função matemática aproximada dos pontos (COCHRAN e COX, 1957).

$$N = f(x_1, x_2, \dots, x_k) + \xi \quad \text{Equação 1}$$

No procedimento de otimização, o primeiro passo é identificar uma função matemática que modele a variação da resposta em função da variação dos fatores avaliados (BRUNS, SCARMINIO e BARROS NETO, 2001; FERREIRA, et al. 1999; TAQUEDA, 1998). Os polinômios algébricos são amplamente utilizados para se aproximar da região da resposta. Geralmente, as funções utilizadas são polinômios de primeira ordem, ou seja, funções lineares, cujas respostas são estimadas pela Equação 2, sendo que y é a resposta, x_1 e x_2 são os fatores experimentais, b_0, b_1 e b_2 são os coeficientes do polinômio e ξ o erro experimental.

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + \xi \quad \text{Equação 2}$$

Neste caso, procura-se verificar se a variação da resposta em função dos fatores é bem modelada por uma superfície planar, conforme a Figura 10.

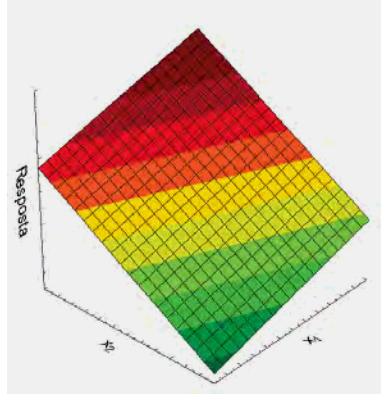


Figura 10. Superfície de Resposta Planar ou Linear

No entanto, a variação da resposta em função dos fatores pode ser modelada por uma superfície não plana. Tais modelos são polinomiais de grau acima de 1. Um exemplo com curvatura da superfície de resposta (modelo quadrático) é mostrado na Figura 11.

A função que melhor descreve estes modelos são os polinômios de segunda ordem, ou seja, funções quadráticas, cujas respostas são estimadas pela Equação 3, onde y é a resposta, x_1 e x_2 são os fatores experimentais, $x_1.x_2$ é a interação entre os fatores, b_0 , b_1 , b_2 , b_{12} , b_{11} e b_{22} são os coeficientes e ξ o erro experimental.

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{12}x_1x_2 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + \xi \quad \text{Equação 3}$$

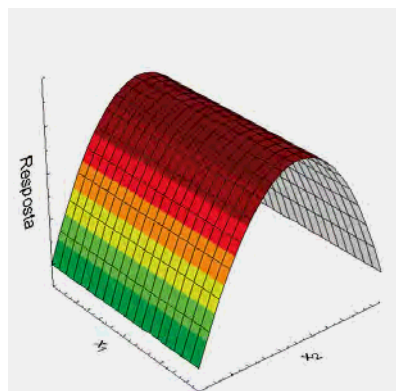


Figura 11. Superfície de Resposta Quadrática.

Finalmente, a última etapa é estudar a superfície de resposta na região de interesse. Essa etapa tem como objetivo determinar os níveis ótimos do sistema investigado através da localização do ponto estacionário (BRUNS, SCARMINIO e BARROS NETO, 2001; FERREIRA et al., 1999; TAQUEDA, 1998). O ponto ótimo será definido pelo conjunto de pontos $(x_1, x_2, \dots, x_k)$ para os quais as derivadas parciais se igualem a zero, conforme a Equação 4, onde $\partial y / \partial x_1$ é a derivada parcial de y em relação a x_1 e $\partial y / \partial x_2$ é a derivada parcial de y em relação a x_2 .

$$\partial y / \partial x_1 = \partial y / \partial x_2 = \dots = \partial y / \partial x_k = 0 \quad \text{Equação 4}$$

Este ponto é denominado ponto estacionário e pode representar um máximo, um mínimo ou um ponto de sela.

A análise de variância (ANOVA) pode ser utilizada para avaliar se o modelo construído foi realmente adequado ao sistema descrito (BRUNS, SCARMINIO e BARROS NETO, 2001).

Tabela 2. Análise da variância para o ajuste, pelo método dos mínimos quadrados; n = número de observações; m = número de níveis distintos da variável independente; p = número de parâmetros do modelo.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Nº. de G.L.	Média Quadrática
Regressão	$SQ_R = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (\hat{y}_i - \bar{y})^2$	$p - 1$	$MQ_R = \frac{SQ_R}{p - 1}$
Resíduos	$SQ_r = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \hat{y}_i)^2$	$n - p$	$MQ_r = \frac{SQ_r}{n - p}$
Falta de Ajuste	$SQ_{faj} = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (\hat{y}_i - \bar{y}_i)^2$	$m - p$	$MQ_{faj} = \frac{SQ_{faj}}{m - p}$
Erro Puro	$SQ_{ep} = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2$	$n - m$	$MQ_{ep} = \frac{SQ_{ep}}{n - m}$
Total	$SQ_T = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \bar{y})^2$	$n - 1$	
% de Variação Explicada	$\frac{SQ_R}{SQ_T}$		
% Máx. de Variação Explicável	$\frac{SQ_r - SQ_{ep}}{SQ_T}$		

Onde y é a resposta observada, $\bar{y}$ é a resposta média global, $\hat{y}$ é a resposta estimada pelo modelo.

Pode-se usar o teste F da razão $\frac{MQ_R}{MQ_r}$ para avaliar se a regressão é estatisticamente significativa e da razão $\frac{MQ_{faj}}{MQ_{ep}}$ para avaliar a falta de ajuste do modelo:

se $\frac{MQ_R}{MQ_r} > F_{V_R, V_r}$, então há uma regressão estatisticamente significativa,

enquanto que valores altos de $\frac{MQ_{faj}}{MQ_{ep}}$ significarão muita falta de ajuste. Os valores de F podem ser encontrados com o auxílio da tabela apresentada em anexo, página 124, ao nível de 95% de confiança, na intersecção da coluna V_1 , com a linha correspondendo a V_2 .

1.3.2 Análise exploratória e classificação de dados

Com o auxílio de análises quimiométricas, pode-se classificar amostras em categorias conforme suas semelhanças ou ainda, pode-se identificar variáveis com propriedades particulares para as amostras de interesse. No presente trabalho foram utilizadas ferramentas quimiométricas a fim de identificar diferenças entre amostras de cana-de-açúcar cultivadas em condições atmosféricas distintas, a partir das informações cromatográficas obtidas.

Antes de qualquer procedimento de análise, é necessária a organização adequada do conjunto de dados em questão. Os dados devem ser organizados na forma de uma matriz de valores numéricos onde cada amostra deve corresponder a uma linha, cujos elementos são os valores das variáveis medidas. Cada coluna corresponde a uma variável independente, ou seja, uma medida realizada para todas as amostras. O resultado é uma matriz $\mathbf{X}(N,K)$, com um total de N linhas e K colunas, cujos valores de x_{ij} são as respostas das variáveis $j = 1, 2, 3, \dots, K$, referentes à amostra i . Assim, os dados são organizados em uma matriz como representado abaixo:

$$\mathbf{X} = \begin{pmatrix} x_{11} & x_{12} & \cdots & \cdots & x_{1K} \\ x_{21} & x_{22} & \cdots & \cdots & x_{2K} \\ \vdots & \vdots & \ddots & & \vdots \\ \vdots & \vdots & & \ddots & \vdots \\ x_{N1} & x_{N2} & \cdots & \cdots & x_{NK} \end{pmatrix}$$

Pré-tratamento e pré-processamento dos dados

A fim de remover, matematicamente, fontes de variação indesejáveis, é necessário efetuar um pré-tratamento dos dados. As variações podem ser *aleatórias*, como por exemplo, ruídos experimentais ou *sistemáticos*, como por exemplo, desvios da linha de base.

Os pré-tratamentos podem ser aplicados às amostras (transformações aplicadas às linhas da matriz **X**), comumente utilizados a fim de minimizar ou eliminar variações aleatórias, como por exemplo, variações de linha de base e alinhamento ou para uniformizar o conjunto de dados; ou às variáveis (pré-processamentos).

Os métodos de pré-processamento mais comuns são a *centragem dos dados na média*, onde a média de cada variável é calculada e posteriormente subtraída dos valores originais e o *autoescalamento*, no qual o valor das novas variáveis são dados pela subtração dos dados originais pela média, dividido pelo valor da variância dos dados. O *autoescalamento* é efetuado quando se deseja atribuir a mesma importância a todas as variáveis.

Na Figura 12 representa-se esquematicamente os tipos de pré-processamento descritos: em **a)** as 6 variáveis (representadas por retângulos) possuem tamanhos distintos, os dados *centrados na média* são representados em **b)** e em **c)** tem-se os dados *autoescalados*, onde o tamanho das variáveis é praticamente o mesmo.

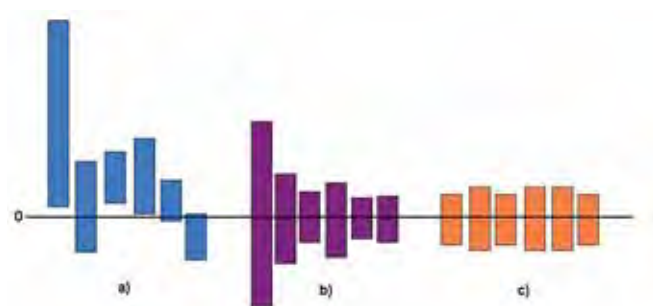


Figura 12. Exemplo de pré-processamento: **a)** dados originais, **b)** dados centrados na média e **c)** dados autoescalados (MATOS et al, 2003).

Em cromatografia, o principal problema encontrado na análise de perfis cromatográficos é a ocorrência do desalinhamento de picos, ocasionado por diversos fatores (LIANG, XIE e CHAN, 2004; NIELSEN, CARSTENSEN e

SMEDSGAARD, 1998), tais como pequenas alterações de composição da fase móvel, perda de desempenho da coluna cromatográfica, alterações instrumentais (oscilações de vazão e pressão) etc.

Há na literatura, diversos trabalhos abordando técnicas de alinhamento: *Dinamic Time Warping* (DTW) (PRAVDOVA, WALCZAK e MASSART, 2002), *Parametric Time Warping* (PTW) (EILERS, 2004), *Correlation Optimized Warping* (COW) (NIELSEN, CARSTENSEN e SMEDSGAARD, 1998), *Target Peak Alignment* (TPA) (XU, et al 2006), dentre outros.

Análise de componentes principais – PCA

A análise de componentes principais (PCA, do inglês, *Principal Component Analysis*) para dados bidimensionais é uma ferramenta quimiométrica bastante difundida e utilizada para diminuir a dimensão dos dados originais (WOLD, ESBENSEN E GELADI, 1987) para um menor conjunto de dimensões, chamadas de Componentes Principais (PCs), a partir da combinação de variáveis, ou *fatores*, que descreve a maior variabilidade nos dados. Desta forma, as principais vantagens desta técnica estão na simplificação, modelamento, detecção de amostras anômalas, classificação e previsão (GELADI E GRAHN, 1996; MALINOWSKI E HOWERY, 1980).

Assim, a matriz **X** (N,K) é decomposta em duas novas matrizes (BRERETON, 2000), uma de *scores* (**T**) e outra de *loadings* (**P**).

As coordenadas de cada amostra no novo sistema de eixos são representadas pelos *scores* enquanto que os *loadings* correspondem à importância (ou pesos) das variáveis.

O número de colunas na matriz dos *scores* (**T**) será igual ao número de linhas dos *loadings* (**P**) e corresponde à quantidade de componentes principais (PCs) necessários para descrever as informações mais relevantes do conjunto de dados. A Figura 13 mostra a decomposição em componentes principais realizadas pelo PCA.

$$\begin{array}{c} m \\ \boxed{X} \\ n \end{array} = \begin{array}{c} l \\ \boxed{t_1} \\ n \end{array} \begin{array}{c} m \\ \boxed{p_1^T} \\ l \end{array} + \begin{array}{c} l \\ \boxed{t_2} \\ n \end{array} \begin{array}{c} m \\ \boxed{p_2^T} \\ l \end{array} + \dots + \begin{array}{c} l \\ \boxed{t_A} \\ n \end{array} \begin{array}{c} m \\ \boxed{p_A^T} \\ l \end{array}$$

Figura 13. Decomposição em componentes principais por PCA.

As primeiras componentes principais explicam a maior variância dos dados e essa variância explicada vai decrescendo com o número de componentes de tal forma que as últimas componentes acabam por modelar apenas ruídos e informações desnecessárias.

Métodos de classificação – SIMCA e PLS-DA

Os métodos quimiométricos de classificação são também conhecidos como métodos de reconhecimento supervisionado de padrões e são utilizados para comparar amostras entre si. Assim, um conjunto de dados de amostras conhecidas (conjunto de calibração) supervisionará a classificação das amostras desconhecidas.

O método SIMCA (MASSART et al, 1988) (*Soft Independent Modelling of Class Analogy*) tem sido bastante empregado como ferramenta de classificação, principalmente porque, para a maioria dos casos, a variabilidade entre os grupos é maior que a variabilidade dentro dos grupos. Neste método, cada classe do conjunto de amostras conhecidas é submetida a uma análise de componentes principais a fim de determinar o número de PCs necessário para descrever cada classe e uma *hipercaixa* é construída envolvendo as amostras de cada classe. O poder de discriminação entre as classes é dado pela distância e pelos resíduos entre elas. Na previsão de uma amostra desconhecida, a atribuição de classe é baseada na projeção dessa amostra no espaço dos *scores* e sua distância em relação às classes modeladas. A amostra testada poderá pertencer a mais de uma classe caso o modelo não tenha poder de discriminação suficiente ou ainda não pertencer a nenhuma classe, caso seja muito diferente do conjunto de calibração.

Outro importante método de classificação é o PLS-DA (*Partial Least Square for Discriminant Analysis*), no qual é feita a decomposição das variáveis independentes (matriz **X**) e das variáveis dependentes (**Y**), que corresponde a atribuição de cada classe, em *scores* e *loadings*. Essa decomposição é idêntica a decomposição realizada no PCA, porém, para buscar uma máxima correlação de **X** com **Y** o eixo dos componentes principais sofre uma leve rotação de modo que perdem a sua ortogonalidade e por isso passam a ser chamados de variáveis latentes. Após a decomposição encontra-se uma relação linear entre os *scores* de **X** e **Y**, através do método de mínimos quadrados parciais. (BRERETON, 2002; BARKER E RAYENS, 2003). Além disso, quando a variabilidade dentro do grupo é maior que a variabilidade entre grupos o método SIMCA não conseguirá distinguir

entre os grupos. Para estes casos o método de análise discriminante com calibração multivariada por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) tem sido uma alternativa.

2 OBJETIVOS

A necessidade de avaliação detalhada da composição de metabólitos primários e secundários em matrizes de cana-de-açúcar visando um melhor entendimento dessa composição metabólica em função do aumento da concentração de CO₂ na atmosfera delineou os seguintes objetivos para esta dissertação de mestrado:

- Desenvolver e validar um método por HPLC-DAD, para a análise qualitativa de micromoléculas (metaboloma) em folhas de cana-de-açúcar;
- Avaliar a interferência de condição atmosférica simulada (teor elevado de CO₂) no metabolismo micromolecular da cana-de-açúcar.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Estratégia experimental

A estratégia experimental constituiu-se das seguintes etapas:

1. Obtenção do material vegetal;
2. Avaliação de fatores relacionados à eficiência de extração;
3. Estabelecimento das condições de extração;
4. Avaliação de fatores relacionados à eficiência cromatográfica;
5. Estabelecimento das condições cromatográficas;
6. Validação do método;
7. Avaliação da interferência da condição atmosférica simulada no metabolismo secundário de cana-de-açúcar.

3.2. Materiais

A pesagem das amostras foi executada em balança analítica Mettler Toledo® modelo AG245, de capacidade máxima de 210 g. Os extratos foram pesados em balança analítica Precisa® modelo XR20SSM-DR, de capacidade máxima de 205 g.

Os solventes utilizados na extração e nas análises cromatográficas foram acetonitrila (ACN), etanol (EtOH), isopropanol (IPA) e metanol (MeOH) grau HPLC,

marca J.T.Baker® e água ultrapura, preparada em purificador Milli-Q – Millipore®. A extração foi auxiliada por equipamento de ultrassom ELMA®, modelo TANSSONIC 700, de frequência de 35 kHz. Micropipeta Labpette, marca Labnet®, de volume variável de 100 a 1000 µL também foi empregada.

Os extratos foram secos em evaporador rotativo Speed Vac, marca Thermo® equipado com refrigerador Thermo® modelo RVT4104 (*Refrigerated Vapor Trap*) e bomba de vácuo.

O pré-tratamento das amostras foi feito utilizando cartuchos SPE Chromabond® C18ec (3 mL/500 mg) e membranas de filtração Chromafil® Xtra RC-20/25, de poros de 0,20 µm.

As análises cromatográficas foram conduzidas em cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC) marca Shimadzu® equipado com duas bombas modelo LC-20AT, detector de arranjo de diodos (DAD) modelo SPD-M20A, amostrador automático modelo 20A e *software* LC Solution versão 1.23 SP1. A frequência de aquisição de dados foi de 1,5625 Hz. As colunas cromatográficas empregadas foram Phenomenex, Luna® C-18 (250 x 4,6 mm, 5 µm), Onyx® Monolítica C-18 (100 x 4,6mm) e Kinetex® C-18(2) (150 x 4,6mm, 2,6 µm).

Um cromatógrafo a Gás Varian® CP-3800 acoplado a um detector de ionização em chama (FID) foi empregado, utilizando coluna cromatográfica Supelco SPB-5 (30 m x 0,25 mm, 0,25 µm).

Os experimentos foram planejados e analisados utilizando-se os *softwares* estatísticos Microcal Origin 5.0, Minitab Solutions 15.1 e Statistica 8.0. As análises quimiométricas foram executadas no *software* MatLab R2010a.

3.3. Amostra – obtenção e pré-processamento do material vegetal

3.3.1 Amostras utilizadas no desenvolvimento e validação do método

Para os ensaios preliminares, folhas de cana-de-açúcar, *Saccharum* spp., cultivar RB3280, foram coletadas próximas a Usina Zanin, na cidade de Araraquara (21°51'50.45" S, 48°10'56.36" O). As amostras foram secas em estufa a 40 °C, moídas em moinho de facas e armazenadas ao abrigo da luz, à temperatura ambiente.

Para as aplicações preliminares do método desenvolvido, foram utilizados dois outros cultivares obtidos no Instituto Agrônômico (IAC) - Setor Cana de Ribeirão Preto: IAC1115 e IAC5000.

3.3.2 Amostras submetidas a condições atmosféricas simuladas – alta concentração de CO₂ atmosférico e concentração ambiente

Para a avaliação da influência do teor de CO₂ atmosférico, foram utilizadas amostras vegetais cultivadas durante os experimentos de mestrado e doutorado de Amanda Pereira de Souza, sob orientação do Prof. Dr. Marcos S. Buckeridge (IB-USP).

As plantas foram obtidas a partir de colmos de cana-de-açúcar do cultivar SP80-3280 coletados no Sítio Vitória, localizado na cidade de Piracicaba, SP, no mês de outubro de 2008. Os colmos foram seccionados e selecionados de acordo com a massa fresca para a homogeneização do conteúdo de reserva para brotação. As secções do colmo (toletes) foram plantadas em bandejas de plástico com substrato Plantmax[®] (lascas de pinus, vermiculita e turfa) e mantidas em casa de vegetação.

Após 10 dias de plantio, as plantas que brotaram foram transferidas para vasos plásticos de 40 L também com substrato Plantmax[®], sendo que em cada vaso foram colocadas 3 plantas. Os vasos foram distribuídos aleatoriamente nas quatro câmaras de topo aberto, sendo duas delas com atmosfera de concentração de CO₂ ambiente (aproximadamente 390 ppm - controle) e as outras duas contendo alta concentração de CO₂ (aproximadamente 750 ppm). Em cada câmara foram colocados 6 vasos. Nas 3 primeiras semanas foram aplicadas doses preventivas de acaricida e fungicida nas plantas. Semanalmente as plantas foram rotacionadas dentro da câmara e a cada 15 dias elas foram trocadas de câmara para evitar a aclimação ao microambiente.

Nas câmaras, foram instalados sensores de umidade e temperatura acoplados a um sistema de monitoramento contínuo (RICS[®] - *Remote Integrated Control System*) que permitiu o registro da umidade relativa do ar e temperatura ao longo de todo o experimento. O monitoramento e controle da concentração de CO₂ dentro das câmaras foram realizados manualmente a cada dois dias, utilizando um sensor de CO₂ (Testo[®], modelo 435). Para o auxílio no controle do conteúdo de água no solo, foram instalados 2 tensiômetros em cada câmara, de modo que a tensão da água do solo nunca ultrapasse 20 kPa. Diariamente, os tensiômetros foram checados e, quando necessário, as plantas foram irrigadas. A adubação foi

realizada com N:P:K (18:00:27) de acordo com especificações do Centro de Tecnologia Canavieira (SOUZA et al. 2008).

Foram coletadas, a partir de 4 plantas distintas, amostras de folhas aos 30, 45, 60 e 75 dias de cultivo, das plantas submetidas às duas diferentes condições de CO₂. A folha amostrada foi a mais desenvolvida do ponto de vista fisiológico, denominada folha +1, de acordo com o sistema Kuijper (VAN DILLEWIJN, 1952). Imediatamente após a coleta, as amostras foram congeladas com N₂ líquido, trituradas e mantidas refrigeradas a -80° C.

Alíquotas dessas amostras foram disponibilizadas para as análises metabolômicas.

Tabela 3. Nomenclatura das amostras e respectivas condições de cultivo.

Amostra	Tempo de coleta (dias)	Condição
1 / 2	30	Controle (390 ppm)
3 / 4	45	
5 / 6	60	
7 / 8	75	
9 / 10	30	Alto CO ₂ (750 ppm)
11 / 12	45	
13 / 14	60	
15 / 16	75	

3.4. Preparo da amostra – procedimento preliminar

As análises preliminares foram feitas adotando-se o procedimento descrito na Figura 14.

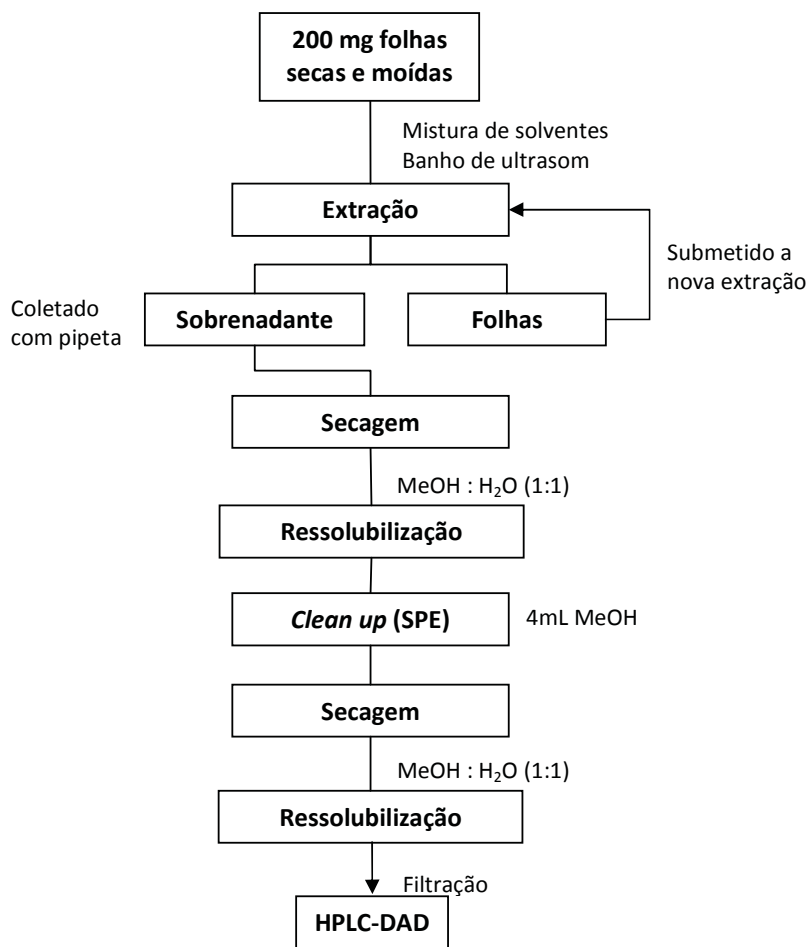


Figura 14. Fluxograma do procedimento preliminar de preparo das amostras.

Diferentes etapas do procedimento descrito foram avaliadas durante o desenvolvimento do método, buscando-se a otimização do mesmo. Dentre elas, a melhor composição do solvente extrator, as melhores condições de extração, o procedimento de *clean up* e as condições cromatográficas.

3.5. Método cromatográfico preliminar

Durante o desenvolvimento do método extrator, as condições cromatográficas utilizadas foram as sugeridas por Snyder, Kirkland e Dolan (2010) (com modificações) para amostras desconhecidas. Utilizou-se como fase móvel H₂O e MeOH acidificados com 0,1% de ácido acético, com eluição no modo gradiente de 5 a 100% de metanol em 45 minutos, com posterior reequilíbrio da coluna em 5% de metanol por 15 min e vazão de 1,5 mL/min. A coluna cromatográfica utilizada foi a coluna Luna(2) (250 x 4,6 mm, 5 µm), mantida a temperatura constante de 40°C. O

volume de injeção utilizado foi de 20 µL. Os dados foram registrados utilizando comprimentos de onda de 200 a 400 nm e as respostas foram avaliadas de acordo com cada etapa do desenvolvimento, considerando-se os cromatogramas obtidos em 254 nm.

Durante o desenvolvimento do método cromatográfico, foram avaliadas diferentes colunas, composições de fase móvel e condições de vazão e temperatura.

3.6. Desenvolvimento do método de extração

3.6.1 Escolha do solvente extrator

Um planejamento Simplex-Centróide (ALMEIDA e SCARMINIO, 2007) de misturas foi utilizado a fim de investigar a influência de diferentes proporções de solventes (Figura 15) na preparação do extrato de folhas de cana, cultivar RB3280. Para o planejamento das misturas, foi utilizado o *software* estatístico Minitab versão 15.1.0.0. Os solventes utilizados foram etanol (A), água (B) e isopropanol (C).

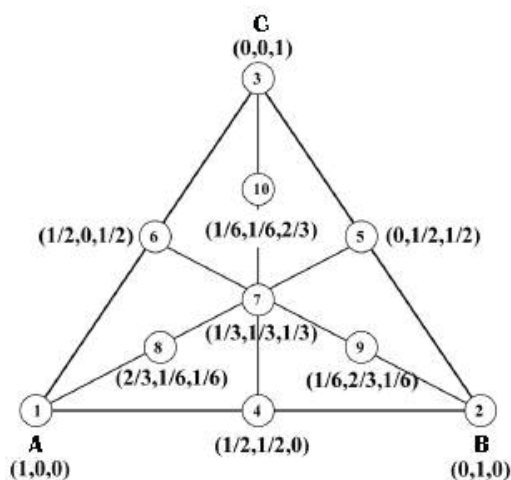


Figura 15. Modelo Simplex-Centróide com três eixos de misturas para avaliar a influência de diferentes proporções de solventes na preparação do extrato. A = EtOH, B = Água e C = IPA

O planejamento (Figura 15) conduziu a 10 diferentes combinações de solventes e a resposta dependente adotada em função destas foi o número de picos observados nos cromatogramas HPLC-DAD, registrados em 254nm, obtidos nas condições indicadas no item 3.5.

As amostras foram preparadas seguindo-se o procedimento descrito em 3.4, sendo que as 10 diferentes combinações entre solventes geradas pelo modelo Simplex-Centróide foram utilizadas para a extração em banho de ultrassom por 15 min..

Utilizando o *software* Minitab foi possível determinar equações matemáticas de regressão do conjunto de experimentos. Além disso, através da tabela *ANOVA*, incluída no *software*, foi possível calcular a validade e a significância do modelo, assim como gerar gráficos de contorno e de superfície a partir das equações de regressão.

3.6.2 Avaliação das condições de extração

Um planejamento fatorial 2^n , onde n é o número de níveis, foi utilizado para otimizar o processo de extração visando um maior rendimento. Este planejamento busca analisar pontos experimentais dispersos em um domínio, reduzindo o número de experimentos.

A influência de três fatores em função da concentração de metabólitos extraídos foi analisada, utilizando-se o planejamento fatorial, a fim de identificar o grau de importância dos parâmetros e as melhores condições para a extração.

Diferentes níveis de condições experimentais foram escolhidas para cada fator (Tabela 4). A razão entre volume de solvente e massa de amostra foi admitida como o parâmetro mais importante (massa de amostra fixa), seguida do número de extrações consecutivas e tempo de ultrasonicação.

Tabela 4. Fatores e níveis estudados no planejamento fatorial.

Fator	Unidades	Níveis codificados		
		Nível (-1)	Nível (0)	Nível (+1)
Volume	mL	2,0	3,0	4,0
Nº. de extrações	-	1	2	3
Tempo US	min	15	30	45

A avaliação dos efeitos principais (*Main Effect Plot*) foi utilizada para estabelecer uma abordagem visual com a finalidade de analisar as informações geradas pelo planejamento experimental (ERIKSSON, 2000).

As amostras foram preparadas seguindo-se o procedimento descrito em 3.4, utilizando-se a mistura de solventes determinada como ideal através do método descrito em 4.4.1. As condições utilizadas de volume de solvente extrator, número de extrações consecutivas e tempo de maceração com ultrasom foram as condições geradas pelo planejamento fatorial, mostradas na Tabela 5.

Tabela 5. Condições experimentais geradas através do planejamento fatorial.

Experimento	Volume (mL)	Nº de extrações	Tempo US (min)
1	2,0	1	15
2	4,0	1	15
3	2,0	3	15
4	4,0	3	15
5	2,0	1	45
6	4,0	1	45
7	2,0	3	45
8	4,0	3	45
9 (000)	3,0	2	30

A resposta avaliada em função da eficiência de extração foi a área total dos picos detectados a 254 nm nos cromatogramas obtidos por HPLC-DAD em condição cromatográfica preliminar (item 3.5).

Maceração a frio versus maceração acelerada por banho de ultrasom

Avaliou-se a eficiência do processo extrator utilizando-se maceração simples e maceração acelerada por sonicação a fim de verificar a possibilidade de degradação de amostra durante o processo de extração.

O procedimento de preparo de amostra foi o mesmo descrito em 3.4, sendo que na etapa de extração, após a adição da mistura de solventes, uma das amostras foi submetida a banho de ultrasom por 15 minutos, e a outra foi mantida em repouso por 5 dias, a temperatura ambiente. Eventualmente o solvente extrator era trocado.

Comparou-se o perfil cromatográfico dos extratos obtidos em condição cromatográfica preliminar.

Avaliação da eficiência da extração

A eficiência da extração foi avaliada a partir de um experimento conduzido com sete extrações consecutivas da mesma amostra vegetal.

As amostras foram preparadas seguindo-se o procedimento descrito em 3.4, utilizando-se a mistura de solventes determinada como ideal em 4.4.1 e as condições determinadas como ideais em 4.4.2. O procedimento foi repetido sete vezes e cada extrato foi coletado em diferentes recipientes previamente pesados para cálculo da massa extraída e posteriormente analisados por HPLC-DAD.

As respostas avaliadas foram as áreas totais dos cromatogramas obtidos por HPLC-DAD, a 254 nm, em condição cromatográfica preliminar e a massa seca de cada extrato.

3.7. Desenvolvimento do método cromatográfico

3.7.1 Considerações preliminares

Avaliou-se a possibilidade de um pré-tratamento da amostra pela separação da porção hidrofílica da porção hidrofóbica utilizando extração em fase sólida em fase reversa (SPE-C18).

O extrato solubilizado foi aplicado no cartucho SPE-C18 e água (4 mL) foi utilizada como fase móvel, a fim de eluir primeiramente os compostos mais polares. Posteriormente, a amostra contida no cartucho SPE foi eluída com metanol. As duas porções foram coletadas separadamente, submetidas às etapas de preparo de amostra e analisadas por HPLC-DAD utilizando as condições cromatográficas preliminares.

Após as análises por HPLC, a porção hidrofílica foi submetida a derivatização com metoxiamina e N-metil-N-[trimetilsilil]-trifluoracetamida (MSTFA) e destinada a análises por GC-FID, a fim de avaliar a possibilidade de estudo dessa fração por esta técnica. Utilizou-se a seguinte rampa de aquecimento: 70°C (5 min), 5°C / min até 145°C, 2°C / min até 200°C, 4°C / min até 290°C (6 min). Volume de injeção de 1 µL, modo *split* 1:25. O gás de arraste utilizando foi nitrogênio, a uma vazão de 1 mL / min. A temperatura do injetor foi ajustada em 230°C e do detector em 290°C. A coluna cromatográfica utilizada foi uma coluna Supelco SPB-5 (30 m x 0,25 mm, 0,25 µm)

3.7.2 Seleção da coluna cromatográfica

O extrato obtido nas condições otimizadas foi analisado em diferentes colunas de fase estacionária C-18, utilizando-se a condição cromatográfica descrita em 3.5, a

fim de verificar qual proporcionaria a melhor separação, isto é, maior número de picos cromatográficos. As colunas utilizadas foram:

- Phenomenex Luna C-18(2). 250 x 4,6 mm, 5 μ m.
- Phenomenex Onyx Monolítica C-18. 100 x 4,6mm.
- Phenomenex Kinetex C-18(2). 150 x 4,6mm, 2,6 μ m.

As colunas utilizadas diferiram quanto às características físicas da FE, sendo a coluna Luna(2) preenchida com partículas esféricas totalmente porosas, a coluna Kinetex preenchida com particuladas esféricas de núcleo sólido e película porosa, enquanto a coluna Onyx possui leito cromatográfico monolítico.

3.7.3 Seleção das condições cromatográficas – tempo e fase móvel

Com o objetivo de melhorar a separação cromatográfica obtida nos experimentos preliminares com as diferentes colunas, inicialmente propôs-se um método para avaliar a influência do tempo e de diferentes proporções entre metanol e acetonitrila na fase orgânica, visando variar a força de eluição e a seletividade da fase móvel.

Um planejamento fatorial composto central ou planejamento em estrela (BRUNS, SCARMINIO e BARROS NETO, 2001c; GALDÁMEZ, 2002) foi utilizado para otimizar as condições cromatográficas de análise (tempo de análise e porcentagem de ACN na fase B). A configuração de um experimento fatorial composto central com dois fatores ($k=2$) pode ser visualizada na Figura 16.

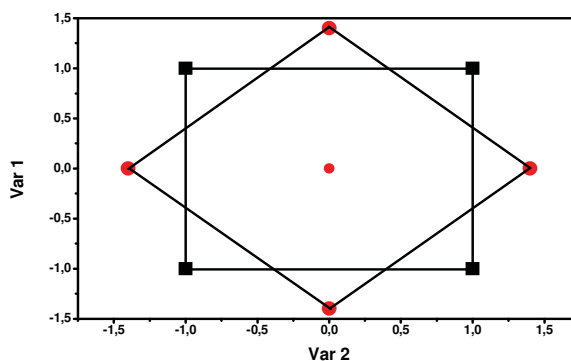


Figura 16. Representação gráfica do planejamento fatorial composto central ou planejamento em estrela.

Os níveis dos fatores (tempo e proporção de ACN) foram codificados pela Equação 3 para facilitar a construção do planejamento experimental, remover as unidades de medidas dos fatores, colocar a origem do eixo das variáveis no valor intermediário e definir uma nova escala (Tabela 6). Variáveis codificadas proporcionam também facilidade computacional, com aumento da exatidão na estimativa dos coeficientes do modelo e facilidade de interpretação destes coeficientes, pois todas as variáveis estão sendo estudadas dentro de um mesmo intervalo (TAQUEDA, COSTA e FARIA, 1998).

$$x = (T - \bar{T}) / (\Delta T / 2) \text{ Equação 3}$$

Sendo que:

x é o valor codificado da variável

T é o valor original da variável a ser codificada

$\bar{T}$ é a média entre os valores do nível alto e do nível baixo da variável original

ΔT é a variação entre os valores do nível alto e do nível baixo da variável original.

A partir do planejamento fatorial composto central foram realizados 11 experimentos (9 pontos experimentais mais duas repetições do ponto central) para cada coluna cromatográfica.

Tabela 6. Níveis codificados para tempo de análise e proporções de ACN.

Fatores	Níveis codificados				
	-1,4	-1	0	1	1,4
Tempo de análise (min)	24	30	45	60	66
% ACN	0	15	50	85	100

Tabela 7. Experimentos realizados (x) nas diferentes colunas.

% ACN	+1,4			X			
	+1,0		X		X		
	0	X		X		X	
	-1,0		X		X		
	-1,4			X			
			-1,4	-1,0	0	1,0	1,4
Tempo de análise							

A coluna cromatográfica foi recondicionada por 15 min após cada análise, sendo que este tempo não foi incluído no planejamento.

Utilizando o *software* Minitab, foi possível determinar equações matemáticas de regressão do conjunto de experimentos. Além disso, através da tabela da ANOVA, incluída no *software*, foi possível calcular a validade e a significância do modelo, assim como gerar gráficos de contorno e de superfície a partir das equações de regressão.

3.7.4 Seleção das condições cromatográficas – temperatura, volume de injeção e vazão da fase móvel.

A fim de avaliar a influência dos parâmetros cromatográficos como temperatura da coluna, volume de injeção e vazão da fase móvel, além de selecionar as condições que propiciassem a melhor separação cromatográfica, utilizou-se um planejamento fatorial 2^n , onde n é o número de níveis.

Uma variação viável de condições experimentais foi escolhida para cada parâmetro para as diferentes colunas (Tabela 8). A temperatura da coluna foi selecionada como o parâmetro mais importante, seguida do volume de amostra a ser injetado e vazão da fase móvel.

Os níveis escolhidos de temperatura e volume de injeção foram os mesmos para as três colunas enquanto que os de vazão da fase móvel foram diferentes devido as diferentes características do recheio de cada uma, o que o influi diretamente nas respectivas curvas de van Deemter e na pressão de operação do equipamento.

Tabela 8. Fatores e níveis avaliados no planejamento fatorial para as diferentes colunas.

Fator	Unidades	Nível (-1)	Nível (0)	Nível (+1)
Temperatura	°C	30	40	50
Volume de Injeção	µL	10	20	30
Vazão	Luna(2)	1,0	1,4	1,8
	Onyx em série	1,5	3,0	4,5
	Kinetex	0,5	1,0	1,5

A avaliação dos componentes principais (*Main Effect Plot*) foi utilizada para estabelecer uma abordagem visual a fim de se analisar as informações geradas pelo planejamento experimental (ERIKSSON, 2000).

3.8. Ajustes no gradiente

Após determinação da melhor condição de solvente B pelo planejamento em estrela e das melhores condições cromatográficas a partir do planejamento fatorial, as concentrações iniciais e finais do gradiente foram ajustadas a partir de um aumento no percentual da fase B inicial e diminuição do percentual de fase B final, favorecendo uma rampa de gradiente mais branda.

3.9. Validação do método

A proposta de validação do método cromatográfico desenvolvido em HPLC-DAD para análise do extrato das folhas de cana-de-açúcar neste trabalho envolveu o estudo da repetibilidade (precisão intradia e interdias), além da análise da precisão do equipamento e de análises dos brancos de preparo de amostra.

3.9.1 Precisão do equipamento

A fim de avaliar a precisão do equipamento utilizado, analisou-se uma mistura de padrões composta por benzeno e tolueno em replicatas e a partir dos cromatogramas obtidos calculou-se os valores médios e desvios padrão dos tempos de retenção e área dos picos. A partir dos valores obtidos, calculou-se o coeficiente de variação percentual (CV%).

3.9.2 Análise de brancos

A fim de avaliar possíveis contaminações externas ao método proposto, foram analisados dois *brancos*:

- *branco da amostra*: preparado seguindo-se todas as etapas de preparação da amostra, de acordo com o método proposto, exceto pela massa de folhas de cana-de-açúcar;

- *branco da fase móvel*: análise cromatográfica sem injeção da amostra no sistema cromatográfico, utilizando o método proposto.

3.9.3 Repetibilidade intra e interdias

Três extratos foram preparados a partir da mesma amostra vegetal e analisados por HPLC-DAD, utilizando os métodos de extração e análise estabelecidos como ideais. Cada amostra foi analisada em replicatas em cinco dias,

sendo que os extratos 1 e 2 foram analisados em triplicata e o extrato 3 em quintuplicata.

Calculou-se o valor médio e desvio padrão para o número de picos cromatográficos e para a área total dos cromatogramas obtidos no sistema cromatográfico estudado. Por meio dos valores obtidos, calculou-se o coeficiente da variação percentual (CV%).

3.10. Estabilidade da amostra

Além das amostras preparadas e analisadas para avaliação da repetibilidade do método, três extratos foram preparados seguindo o método proposto e submetidos a diferentes condições de armazenamento:

- extrato seco armazenado no *freezer* a -18°C ;
- extrato solubilizado nas condições de análise e armazenado no *freezer* a -18°C ;
- extrato solubilizado nas condições de análise e armazenado ao abrigo da luz, à temperatura ambiente.

Os três extratos foram armazenados por cinco dias e posteriormente analisados, sendo que o extrato armazenado seco foi imediatamente ressolubilizado antes da análise.

Calculou-se o valor médio e desvio padrão para o número de picos cromatográficos e para a área total dos cromatogramas obtidos no sistema cromatográfico estudado. Por meio dos valores obtidos, calculou-se o coeficiente da variação percentual (%CV).

3.11. Avaliação da aplicabilidade do método a diferentes cultivares

Dois diferentes cultivares IAC (IAC1115 e IAC5000) foram coletados e processados segundo o método proposto. O preparo das amostras e as análises foram conduzidas conforme as condições ideais selecionadas.

3.12. Avaliação da influência do teor de CO₂ nas amostras cultivadas sob condições atmosféricas simuladas

As amostras de folhas de cana-de-açúcar obtidas nos experimentos de cultivo em diferentes condições de CO₂ atmosférico foram preparadas em duplicata e

analisadas por HPLC-DAD de acordo com o método desenvolvido e otimizado, resultando em 16 análises.

Os dados cromatográficos obtidos foram analisados a partir de métodos quimiométricos a fim de identificar possíveis diferenças entre os dois grupos de amostras, denominados como a) *controle* e b) *alto CO₂* e também entre as amostras de cada grupo.

Organização e pré-tratamento dos dados

Para as análises quimiométricas, os 16 cromatogramas obtidos pelas análises das 8 amostras (em duplicata) foram organizados no formato de uma matriz, na qual as linhas representam as amostras, e as colunas, as variáveis, que em cromatografia representam as intensidades de absorbância medidas a cada instante de aquisição de dados pelo equipamento (neste caso, a cada 640 ms). Dessa forma, a matriz inicial **X** apresentou 16 linhas e 7503 colunas. Esse conjunto de dados foi inicialmente submetido ao processo de alinhamento.

Neste trabalho o alinhamento foi realizado com base em um algoritmo desenvolvido na UNICAMP, o qual é baseado em correlação. Esse algoritmo alinha cromatogramas tão bem quanto os algoritmos atualmente disponíveis, e, em alguns casos, apresenta desempenho superior. Sua principal vantagem, em relação aos algoritmos disponíveis, está no tempo, uma vez que funciona muito mais rápido (SABIN, et al. 2010).

As análises quimiométricas foram realizadas utilizando-se os dados cromatográficos sem pré-processamento, autoescalados e centrados na média.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Desenvolvimento do método de extração

4.1.1 Escolha do solvente extrator

Praticamente todos os constituintes de interesse para análise fitoquímica apresentam alguma solubilidade em misturas hidro-etanólicas ou hidrometanólicas a 80%, de tal modo que estas costumam ser empregadas com frequência. Na escolha de um solvente, além dos fatores relacionados à eficiência do processo extrativo devem ainda ser considerados a toxicidade e/ou os riscos que seu manuseio

representa, a estabilidade das substâncias extraídas, a disponibilidade e o custo do solvente (FALKENBERG, et al. 1999).

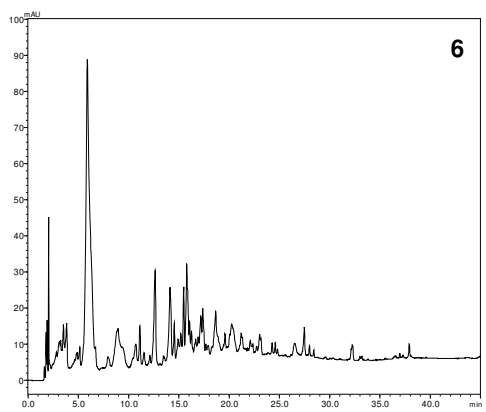
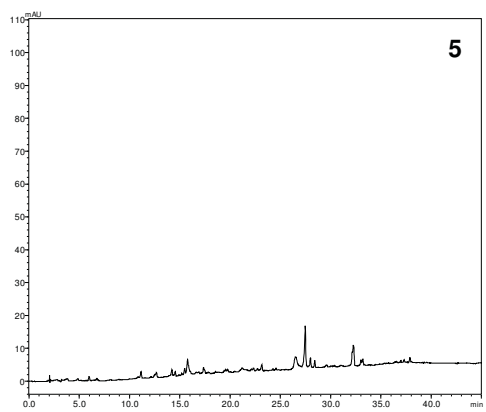
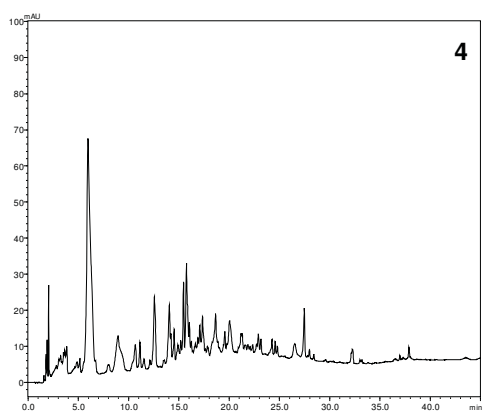
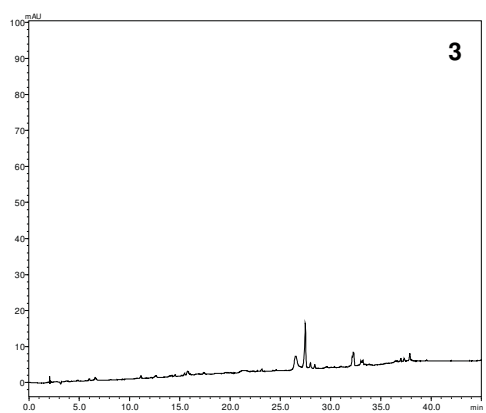
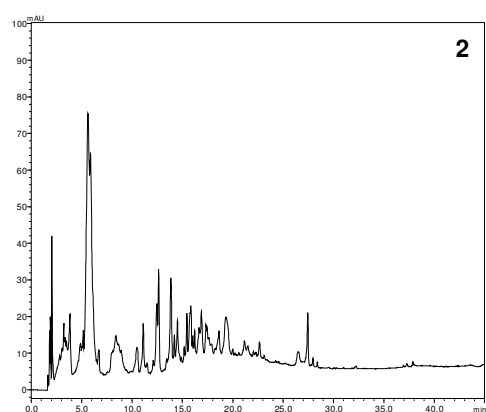
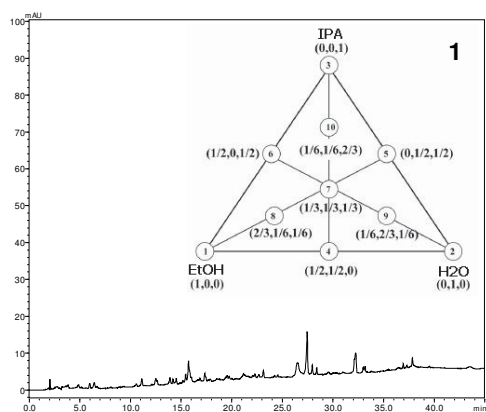
A escolha do etanol ao invés de metanol, normalmente utilizado em procedimentos de extração justifica-se pela semelhança de polaridade e seletividade entre eles e menor toxicidade. O isopropanol foi escolhido por sua miscibilidade com água, menor polaridade e baixa toxicidade. A transmitância no UV também foi uma característica importante na escolha dos três solventes.

Levando-se em consideração os itens acima descritos, os solventes escolhidos para o planejamento do modelo Simplex-Centróide foram água, etanol e isopropanol.

Em um experimento de misturas, os fatores independentes são as proporções dos diferentes componentes. A resposta obtida é dependente somente das proporções relativas dos componentes e não da totalidade da mistura (BRUNS, SCARMINIO e BARROS NETO, 2006).

Uma vez que em um estudo metabolômico, maior quantidade de informação é adquirida quanto maior o número de substâncias monitoradas, as proporções ideais da mistura foram aquelas cuja análise cromatográfica demonstrou maior quantidade de picos cromatográficos.

Os cromatogramas obtidos por HPLC-DAD para cada condição de solvente (Figura 17) foram analisados e o número de picos foi contado. O comprimento de onda de 254 nm foi escolhido para o registro dos cromatogramas uma vez que estes se mostraram mais adequados para a representação dos perfis cromatográficos, apresentando maior número de picos e pequena distorção da linha de base cromatográfica. O experimento descrito pelo ponto central do planejamento foi executado em triplicata. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 9.



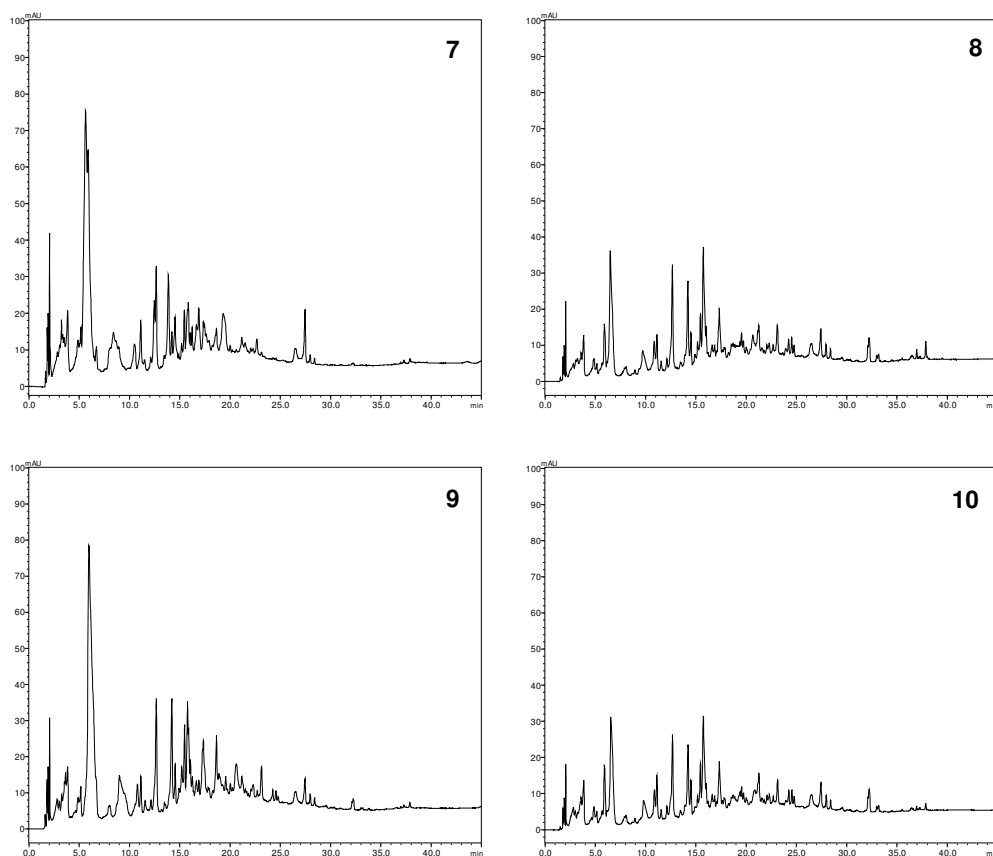


Figura 17. Perfis cromatográficos dos extratos obtidos com cada mistura de solvente do planejamento Simplex-Centróide (números referentes a cada ponto do planejamento).

Tabela 9. Número de picos dos cromatogramas obtidos para cada condição de solventes gerada pelo modelo Simplex-Centróide (ponto 7 em triplicata).

Experimento	Nº de picos
1	102
2	88
3	74
4	110
5	101
6	105
7a	113
8	111
9	98
10	104
7b	110
7c	111

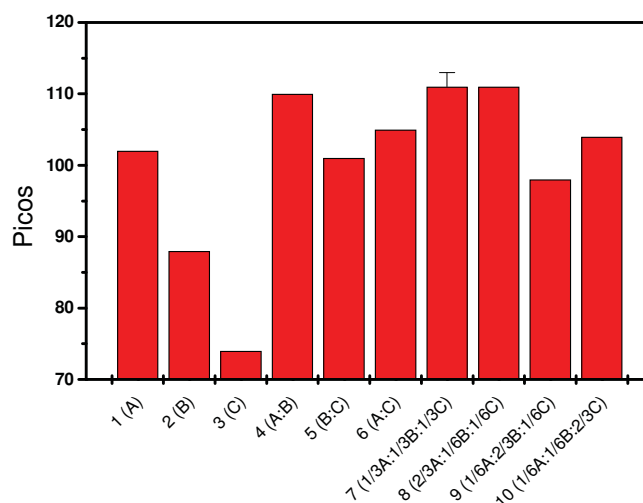


Figura 18. Representação gráfica dos resultados obtidos na avaliação do melhor solvente extrator.

As variações obtidas no experimento devem-se principalmente à grande complexidade da matriz vegetal e possivelmente à utilização do equipamento em dias distintos, o que poderia influenciar na resposta obtida. Devem ser considerados também, os erros intrínsecos ao método e ao equipamento.

A partir dos dados apresentados na Tabela 9, foram geradas equações de regressão para os modelos *linear*, *quadrático*, *cúbico especial* e *cúbico completo*. Dentre eles, o modelo *cúbico especial* foi o que apresentou melhor ajuste dentro do intervalo de confiança de 95%. No entanto, um dos termos da equação foi retirado, pois o valor do erro padrão calculado foi superior ao valor do termo da equação, o que significa que o termo em questão poderia ser 0, ou seja, sem significância.

A equação de regressão para o modelo *cúbico especial* que representa o comportamento do processo de extração é descrita abaixo:

$$\hat{y} = 102,37x_1 + 85,73x_2 + 75,46x_3 + 56,57x_1x_2 + 56,02x_1x_3 + 94,75x_2x_3 \quad \text{Equação 4}$$

$\pm 3,678$ $\pm 3,678$ $\pm 3,678$ $\pm 16,451$ $\pm 16,451$ $\pm 16,451$

sendo que os termos x_1 , x_2 e x_3 representam os solventes etanol, água e isopropanol, respectivamente.

Com os resultados obtidos foi gerada uma superfície de resposta do número de picos em função das proporções de solventes. A superfície de resposta obtida é mostrada na Figura 19.

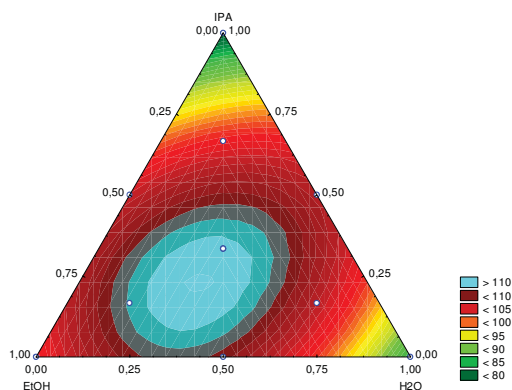


Figura 19. Superfície de resposta do número de picos em função das proporções de solventes – modelo cúbico especial.

Através dos valores calculados pela ANOVA podemos inferir quais os valores significativos dentro de intervalo de confiança de 95% e qual a significância estatística da regressão.

Tabela 10. Análise de variância para o ajuste, pelo método dos mínimos quadrados, de um modelo *cúbico especial*, aplicado ao planejamento Simplex-Centróide.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	No. G.L.	Média Quadrática
Regressão	1345,66	6	224,28
Resíduos	129,83	5	25,97
Falta de Ajuste	125,17	3	41,72
Erro Puro	4,67	2	2,33
Total	1420,25	11	
% variância explicada	94,75%		
% máx. explicável	99,67%		
F (MQ _R /MQ _r)	8,64	F _{6, 5, 95%}	4,95
F (MQ _{faj} /MQ _{ep})	17,88	F _{3, 2, 95%}	19,16

A análise da equação de regressão aplicada aos dados experimentais mostrou que o modelo *cúbico especial* está bem ajustado às observações e pode ser por isso, considerado de alta significância.

De acordo com os resultados obtidos, a melhor condição para uma extração qualitativa é mostrada na Figura 19, em azul claro, e a proporção adotada como ideal foi H₂O/EtOH/IPA 30:45:25 (v/v).

4.1.2 Avaliação das condições de extração

A melhor condição de extração não é obtida pela simples triagem de solventes. Alguns parâmetros experimentais como razão entre a massa de amostra e o volume de solvente e o tempo de extração influenciam na eficiência da mesma. Geralmente a escolha dos parâmetros adequados é dispendiosa e não garante uma condição ótima (SONG et al., 2007).

Os fatores relacionados às condições de extração dizem respeito à agitação, temperatura e ao tempo necessário para executá-los. Levando-se em conta que os processos de extração dependem, em grande parte, de fenômenos de difusão e que a renovação do solvente em contato com as substâncias a dissolver desempenha um papel de grande influência na velocidade da dissolução, pode-se concluir que a agitação pode abreviar consideravelmente a duração de um processo extrativo (FALKEMBERG Simões, et al, 1999).

Após seleção da melhor mistura de solventes extratores, as melhores condições de extração foram verificadas através dos experimentos conduzidos com as condições experimentais geradas no planejamento fatorial, o qual apresenta diversas vantagens (GUO et al., 2006; FANG, 1994), como gerar limites no domínio experimental, ser robusto e permitir a análise de diferentes níveis para cada fator.

As amostras foram extraídas de acordo com as condições descritas na Tabela 11 e os extratos foram analisados por HPLC-DAD. O experimento referente ao ponto central do planejamento foi executado em triplicata. Os resultados são apresentados na Tabela 11.

Tabela 11. Valores de área total dos cromatogramas em função das condições experimentais geradas através do planejamento fatorial.

Experimento	Volume (mL)	Nº de Extrações	Tempo US (min)	Área total (u.a)	Média	SD*	CV(%)**
1	2,0	1	15	6.569.928	-	-	-
2	4,0	1	15	12.749.967			
3	2,0	3	15	24.805.310			
4	4,0	3	15	33.334.177			
5	2,0	1	45	9.122.770			
6	4,0	1	45	18.850.878			
7	2,0	3	45	34.713.061			
8	4,0	3	45	37.215.319			
9 (000)	3,0	2	30	34.175.871	38.565.154	3.955.867	10
				39.664.564			
				41.855.027			

* Desvio padrão

** Coeficiente de variação percentual

Assim como na etapa anterior, as variações obtidas no experimento podem justificar-se pela grande complexidade da matriz vegetal e pelos erros intrínsecos ao método e ao equipamento. Neste caso, a relação entre variáveis contínuas (volume e tempo) e discretas (número de extrações) também pode conferir erros ao experimento.

A avaliação dos efeitos principais (Figura 20) foi aplicada como ferramenta para determinar o grau de importância dos fatores e selecionar a melhor condição. Nessa avaliação, o eixo vertical representa a resposta a um determinado fator, enquanto o eixo horizontal representa os níveis dos fatores investigados. Um fator pode ser considerado importante se conduz a uma modificação significativa da resposta, isto é, uma grande diferença entre duas respostas implica na grande importância de um fator, enquanto que uma pequena diferença indica que o fator é pouco significativo na análise.

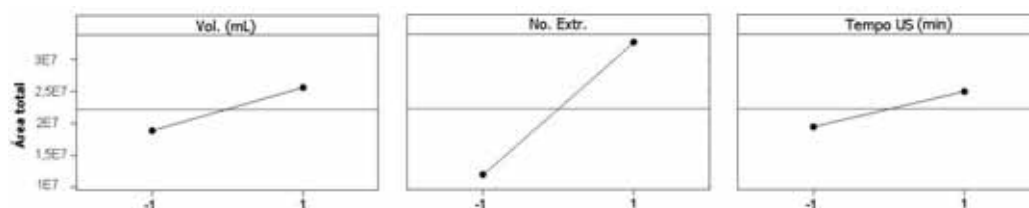


Figura 20. Avaliação dos efeitos principais para o planejamento experimental (volume de solvente extrator; número de extrações consecutivas; tempo de ultrasonicação).

A avaliação dos componentes principais revelou que o número de extrações consecutivas tem efeito significativo na eficiência da extração. A diminuição da relação entre massa de amostra e volume de solvente tem efeito discreto, tendo-se optado pela utilização do menor volume de solvente. Em relação ao tempo de sonicação, verificou-se que a partir de 15 minutos o ganho de área dos cromatogramas em relação ao aumento de tempo foi muito pequeno, optando-se, portanto, por este tempo como sendo o tempo ótimo de extração por maceração com ultrasom.

O grau de importância dos parâmetros analisados mostrou-se diferente do suposto inicialmente, verificando-se que o número de extrações consecutivas é mais importante que o volume de solvente extrator.

Devido a grande influência do número de extrações consecutivas, verificada pela avaliação dos componentes principais, um novo experimento foi idealizado a fim de avaliar a eficiência de cada extração sequencial.

Maceração a frio versus maceração acelerada por banho de ultrassom

A extração com o uso de ultrassom apresenta-se como uma técnica extrativa promissora por promover a extração exaustiva de substâncias presentes em matrizes vegetais com gasto de energia relativamente pequeno, economia de tempo e maior segurança no processo.

As ondas de ultrassom, com frequências acima de 20 kHz são geradas por um transdutor que converte energia elétrica em mecânica (GAMBÁ et al., 2006). Essas ondas propagam-se no meio líquido, originando variações de pressão responsáveis pela cavitação, ou seja, a criação e a implosão de microbolhas de gás no centro de um líquido. Essa alta frequência forma ondas de choque no momento da implosão das bolhas (BARBOZA e SERRA, 1992), e também produz um efeito vibratório na célula vegetal, capaz de levá-la a ruptura e, com isso, à liberação do seu conteúdo (ROCHA et al., 2009).

Os efeitos do ultrassom no processo de extração dependem da frequência e capacidade do equipamento e do tempo empregado no processo. Alguns autores descreveram a ocorrência de transformações químicas nos extratos, resultantes da utilização de longos tempos de extração (OVADIA et al., 1965; SUSS, 1972; VINATORU, 2001; SCHINOR et al., 2004.)

É importante considerar que a escolha do tempo de extração deve ser racional, pois quanto maior o tempo de exposição dos compostos ao ultrassom, maior a possibilidade de ocorrer degradação dos mesmos, além de, ao final de longo período, obter-se resultado semelhante em rendimento ao obtido em períodos mais curtos (LIST e SCHIMIDT, 1989).

A comparação entre os cromatogramas dos extratos obtidos por maceração e maceração acelerada por sonicação não apresentaram diferenças qualitativas, sugerindo a estabilidade do perfil metabólico durante o processo de ultrasonicação.

As diferenças observadas foram de caráter quantitativo, uma vez que o cromatograma do extrato obtido por maceração acelerada por sonicação apresentou valor de área total maior do que o cromatograma do extrato obtido por simples

maceração a frio, demonstrando ainda que a maceração auxiliada por banho de ultrassom é uma técnica mais eficiente.

Avaliação da eficiência da extração

Os sete extratos secos (descritos em 3.6.2 – *Avaliação da eficiência da extração*) foram pesados a fim de determinar a massa extraída em cada etapa e analisados por HPLC-DAD. Os cromatogramas (Figura 21) foram analisados, obtendo-se a área total dos picos. Os dados são apresentados nas Tabelas 12 e 13 e nas Figuras 22 e 23.

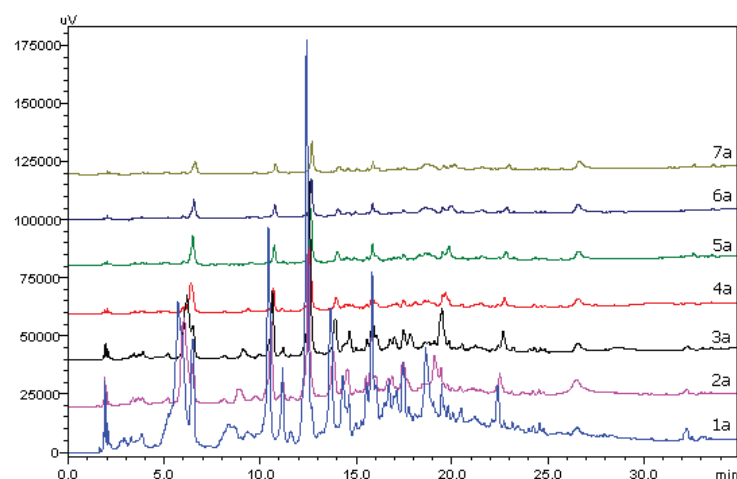


Figura 21. Cromatogramas dos sete extratos obtidos subsequentemente, para avaliação da eficiência da extração.

Tabela 12. Área total dos cromatogramas obtidos na avaliação da eficiência da extração.

Extração N ^o .	Áreas (u.a.)					
	A	B	C	Médias	SD*	CV(%)**
1	19.578.117	18.691.210	19.134.664	19.134.664	443.454	2,3
2	7.835.643	8.648.057	9.460.471	8.648.057	812.414	9,4
3	5.808.470	7.021.037	6.414.754	6.414.754	606.284	9,4
4	2.361.614	2.865.005	2.613.310	2.613.310	251.696	9,6
5	2.095.604	2.520.772	2.308.188	2.308.188	212.584	9,2
6	1.568.659	1.366.720	1.912.397	1.615.925	275.892	17,1
7	1.115.004	1.179.127	1.437.407	1.243.846	170.667	13,7

* Desvio Padrão

** Coeficiente de variação percentual

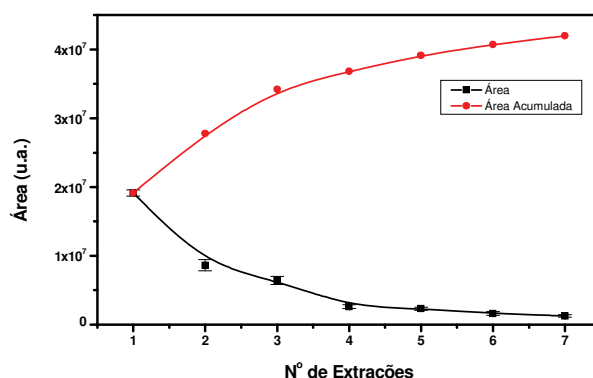


Figura 22. Relação entre número de extrações consecutivas e área total dos cromatogramas.

Considerando as áreas acumuladas e a 7ª extração como limite, têm-se uma eficiência normalizada, acumulada, de extração em relação a área total dos cromatogramas, de aproximadamente 45% para a 1ª, 66% para a 2ª e 81% para a 3ª extração.

Tabela 13. Massas secas extraídas na avaliação da eficiência da extração.

Extração N°.	Massas extraídas (mg) . 10 ⁻²					
	A	B	C	Médias	SD*.10 ⁻²	CV(%)**
1	1,38	1,21	1,16	1,25	0,113	9
2	0,55	0,57	0,52	0,54	0,024	4
3	0,38	0,38	0,38	0,38	0,001	0
4	0,16	0,18	0,17	0,17	0,006	3
5	0,12	0,15	0,19	0,14	0,014	10
6	0,09	0,10	0,10	0,10	0,005	5
7	0,09	0,09	0,10	0,09	0,003	3

* Desvio Padrão

** Coeficiente de variação percentual

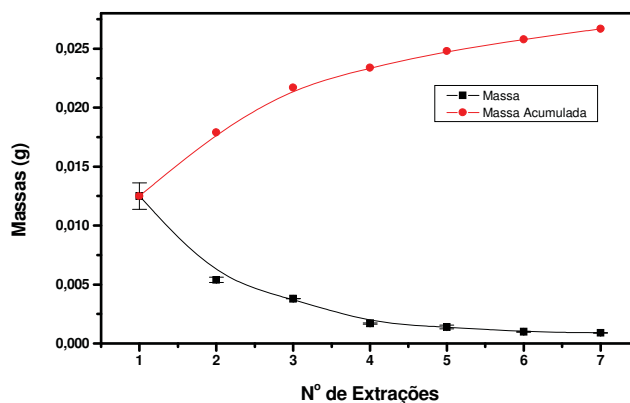


Figura 23. Relação entre número de extrações consecutivas e massas dos extratos secos.

Verifica-se que os valores de massas extraídos seguem a mesma tendência das áreas dos cromatogramas, como esperado. Considerando as massas acumuladas e a 7ª extração como limite, têm-se uma eficiência normalizada, acumulada de extração de aproximadamente 46% para a 1ª, 66% para a 2ª e 80% para a 3ª extração.

A partir dos dados de número de extrações e massas normalizadas, obteve-se a concentração aproximada da amostra analisada no HPLC. Uma vez que foram utilizadas três extrações sequenciais, gerou-se um extrato seco de aproximadamente 2,17 mg que foram posteriormente dissolvidos em 1,0 mL de MeOH:H₂O, gerando uma amostra de concentração aproximadamente igual a 2 mg/mL.

A avaliação da eficiência da extração mostrou que três extrações sequenciais são suficientes para a extração de cerca de 80% da massa de extratíveis e que um número maior de extrações não representa um ganho significativo em quantidade de analitos.

4.2. *Desenvolvimento do método cromatográfico*

4.2.1 Considerações preliminares

Os ensaios preliminares mostraram baixa resolução cromatográfica nos primeiros minutos de análise, devido à presença de muitos compostos hidrofílicos (Figura 24).

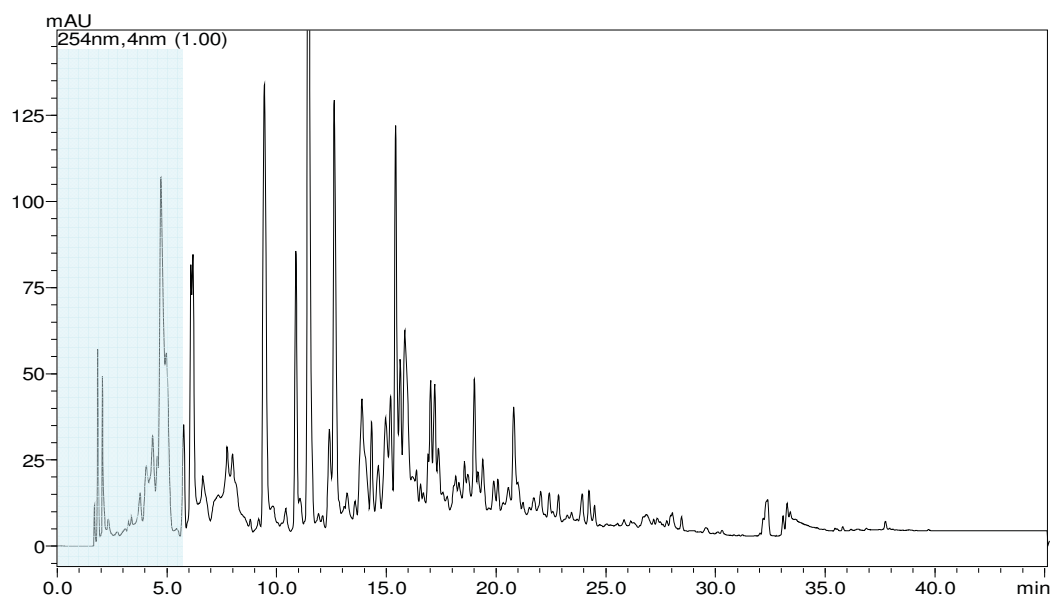


Figura 24. Gradiente 5 a 100% B em 35min, modo isocrático de 35 a 42min; coluna Luna(2). Extrato obtido com as condições ideais, descritas em 4.1. Em destaque, região de grande sobreposição de picos de compostos hidrofílicos.

Uma vez que estes compostos seriam dificilmente analisados por HPLC-C18, verificou-se a possibilidade de analisá-los por cromatografia gasosa. Efetuou-se tratamento do extrato por SPE-C18, separando-se a porção hidrofílica da porção hidrofóbica (Figura 25).

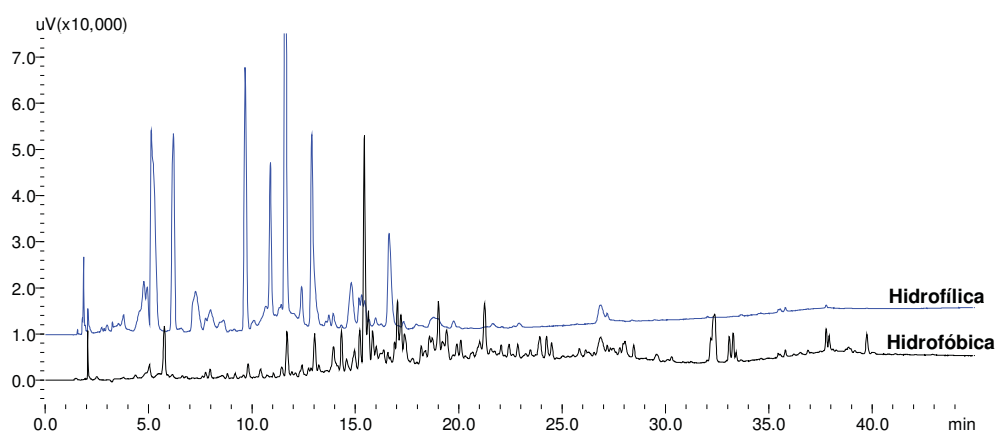


Figura 25. Cromatogramas gerados pela análise das frações hidrofílica e hidrofóbica do extrato obtido com as condições ideais e submetido à SPE-C18.

A porção hidrofílica foi derivatisada e analisada por CG-FID. O cromatograma CG-FID mostrou-se bem resolvido, indicando que essa pode ser uma técnica

eficiente para análise destes compostos (Figura 26). O desenvolvimento do método para análise dos compostos de cana-de-açúcar não analisáveis por HPLC-C18 está sendo desenvolvido por outro aluno também de Mestrado, Paulo Roberto Ussoni Tomaz, e por isso não será detalhado neste trabalho.

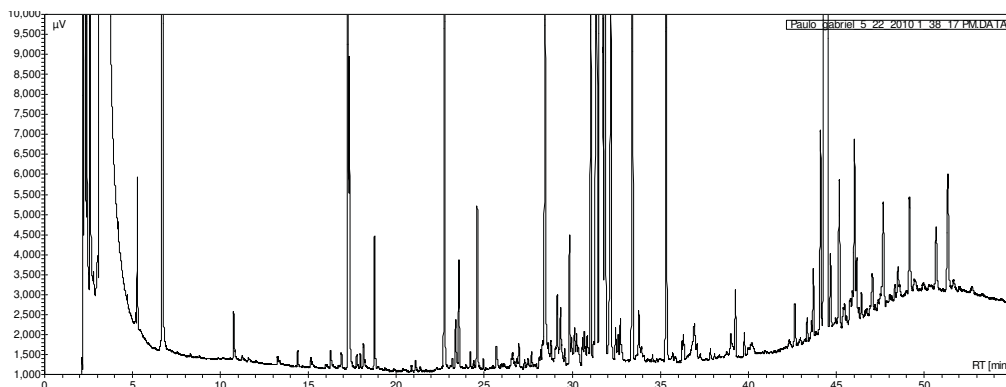


Figura 26. Cromatograma GC-FID obtido da análise da fração hidrofílica, coletada na etapa de SPE-C18 e derivatisada.

Apesar da possibilidade de analisar a fração hidrofílica por cromatografia gasosa a partir de uma simples etapa adicional no preparo de amostra preliminarmente adotado, optou-se por manter o procedimento inicial, como descrito em 2.6, uma vez que alguns compostos eluídos na fase aquosa, apresentavam sinais intensos e significativos nos cromatogramas HPLC-DAD.

4.2.2 Seleção da coluna cromatográfica

Não existe uma “coluna universal” apropriada para qualquer tipo de separação. O sucesso da separação depende em grande parte da estrutura química da fase estacionária, fator determinante de sua seletividade. Outros fatores a serem considerados são o comprimento da coluna (L), diâmetro interno (d.i.), tamanho e forma das partículas em colunas empacotadas. Existem ainda diferentes tipos de colunas, nas quais a fase estacionária é um monólito, denominadas monolíticas, e outras de partículas com núcleo sólido. Em ambos os casos, facilita-se a transferência de massa entre fase estacionária e fase móvel.

Todas as colunas utilizadas são de fase reversa (C18). O uso da cromatografia em fase reversa é a mais utilizada em HPLC (RP-HPLC) e justifica-se

pela capacidade de separação desde substâncias hidrossolúveis e/ou iônicas até substâncias lipofílicas.

Os cromatogramas obtidos pela injeção da amostra nas diferentes colunas são mostrados na Figura 27. O número e a resolução dos picos observados em cada cromatograma foram utilizados como critérios para escolha da melhor coluna. A figura mostra os cromatogramas adquiridos em 360 nm, onde um menor número de picos é observado, facilitando a comparação visual entre eles.

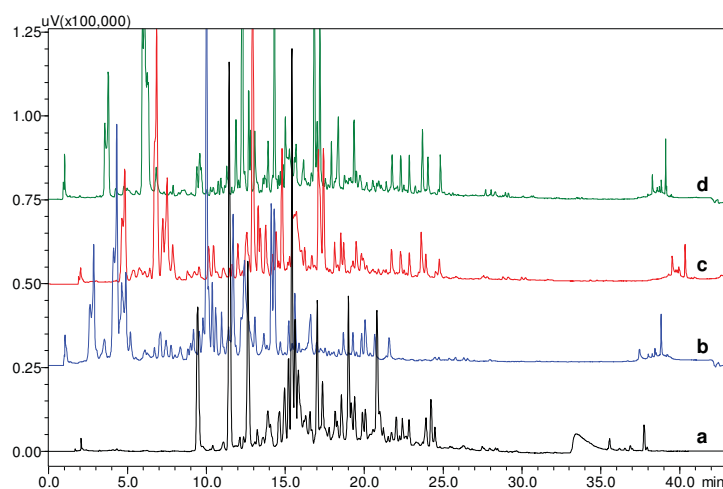


Figura 27. Cromatogramas obtidos nas mesmas condições de gradiente para as colunas a) Luna(2), b) Onyx, c) duas colunas Onyx em série e d) Kinetex. Cromatogramas registrados em 360 nm.

Os cromatogramas obtidos mostram que a melhor eficiência foi obtida com a coluna Kinetex, a qual permitiu maior detectabilidade e separação de maior número de picos.

4.2.3 Seleção das condições cromatográficas – tempo e fase móvel

Os parâmetros fator de retenção (k) e seletividade (α) são determinados pelas condições que afetam a retenção ou o equilíbrio de distribuição da amostra entre a fase móvel e a fase estacionária, isto é, composição da fase móvel, composição da fase estacionária (preenchimento da coluna) e temperatura. Mudanças na fase móvel e estacionária geralmente afetam k e α simultaneamente, mas tem menor efeito sobre o número de pratos teóricos (N). Este depende diretamente do tipo e do comprimento da coluna, da vazão da fase móvel e do tamanho das partículas.

A resolução cromatográfica é influenciada pela retenção da amostra (k). Esta pode ser controlada variando a força do solvente da FM. Quanto maior a força de eluição da FM, menor a retenção do analito (SNYDER, KIRKLAND e DOLAN, 2010).

Um planejamento fatorial composto central ou planejamento em estrela (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001c, GALDÁMEZ, 2002) foi utilizado para otimizar as condições cromatográficas de análise (tempo de análise e porcentagem de ACN na fase B). Este planejamento consistiu de um fatorial 2^k mais $2k$ pontos axiais e n pontos centrais, onde k representa o número de fatores a serem avaliados.

Utilizou-se como resposta do planejamento, o número de picos cromatográficos obtidos para cada experimento. Os resultados obtidos para as diferentes colunas, assim como os valores reais e codificados dos fatores são apresentados na Tabela 14. As replicatas referentes ao ponto central do planejamento em estrela assim como os dados estatísticos são mostrados na Tabela 15.

Tabela 14. Número de picos em função dos experimentos do planejamento em estrela.

Tabela 14: Número de picos em função dos experimentos de planejamento em estrela.												
% ACN	100	+1,4				142 132 173						
	85	+1,0	132 114 151						157 145 187			
	50	0	113 117 147			154* 142* 187*			164 152 217			
	15	-1,0	132 129 169						154 159 220			
	0	-1,4				143 146 198						
		-1,4	-1,0	0	1,0	1,4						
		24	30	45	60	66						
Tempo de análise (min)												

*Ponto central

Luna(2); Monolíticas em série; Kinetex.

Tabela 15. Dados referentes ao ponto central do planejamento em estrela.

Condição (00)	Picos	Média	SD*	CV(%)**
50% ACN / 45 min	152	154	1,73	1
	155	142	3,78	2
	155	187	2,31	1

*Desvio Padrão

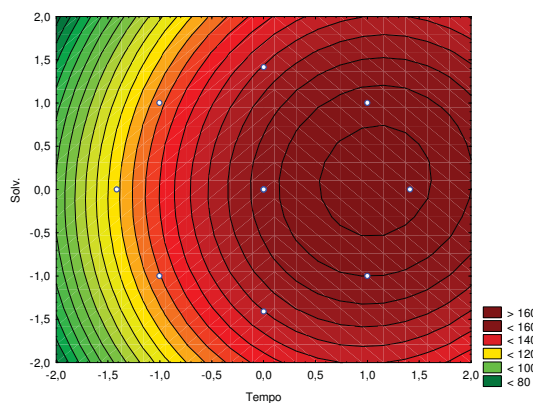
** Coeficiente de variação percentual

Luna(2); Monolíticas em série; Kinetex.

A partir das respostas obtidas nos experimentos do planejamento fatorial, aplicou-se um modelo quadrático de regressão a fim de avaliar o comportamento de diferentes composições de solvente e tempo de análise em função das respostas

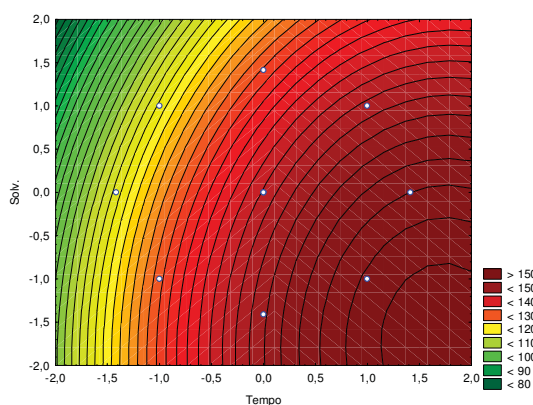
obtidas. As equações de regressão, onde o termo y representa as diferentes proporções do solvente orgânico e o termo x o tempo de análise para cada coluna, e as superfícies de respostas geradas a partir delas são mostradas abaixo:

$$\hat{z} = 153,9993 + 14,8915x + 0,1983y - 6,9382x^2 + 0,75xy - 4,9376y^2$$



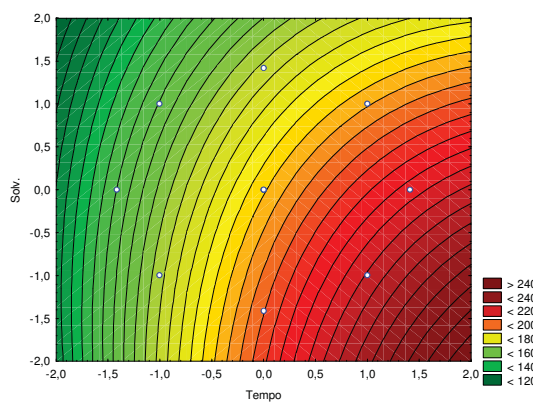
(a)

$$\hat{z} = 142,3333 + 13,8133x - 6,1004y - 3,9174x^2 + 0,25xy - 1,6667y^2$$



(b)

$$\hat{z} = 187,3337 + 23,251x - 10,7954y - 3,1676x^2 - 3,75xy - 1,417y^2$$



(c)

Figura 28. Superfícies de resposta: número de picos cromatográficos em função dos experimentos do planejamento em estrela para (a) coluna Luna(2), (b) duas colunas Onyx em série (c) coluna Kinetex.

As equações de regressão foram avaliadas através da análise de variância, ANOVA e os resultados obtidos para as diferentes colunas podem ser visualizadas nas Tabelas 16 - 18.

Tabela 16. Análise de variância para o ajuste, pelo método dos mínimos quadrados, de um modelo *quadrático*, aplicado ao planejamento em estrela – coluna Luna(2).

Fonte de Variação	Soma Quadrática	No. G.L.	Média Quadrática
Regressão	2099,97	4	524,99
Resíduos	108,57	6	18,09
Falta de Ajuste	102,57	4	25,64
Erro Puro	6	2	3
Total	2208,54	10	
% variância explicada	95,08%		
% máx. explicável	99,73%		
F (MQ _R /MQ _r)	29,01	F _{4,6, 95%}	4,53
F (MQ _{faj} /MQ _{ep})	8,55	F _{4,2, 95%}	19,25

Tabela 17. Análise de variância para o ajuste, pelo método dos mínimos quadrados, de um modelo *quadrático*, aplicado ao planejamento em estrela – colunas Monolíticas.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	No. G.L.	Média Quadrática
Regressão	1912,41	4	478,10
Resíduos	55,75	6	9,29
Falta de Ajuste	27,09	4	6,77
Erro Puro	28,67	2	14,33
Total	1968,18	10	
% variância explicada	97,17%		
% máx. explicável	98,54%		
F (MQ _R /MQ _r)	51,45	F _{4,6, 95%}	4,53
F (MQ _{faj} /MQ _{ep})	0,47	F _{4,2, 95%}	19,25

Tabela 18. Análise de variância para o ajuste, pelo método dos mínimos quadrados, de um modelo *quadrático*, aplicado ao planejamento em estrela – coluna Kinetex.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	No. G.L.	Média Quadrática
Regressão	5199,97	4	1299,99
Resíduos	83,52	6	13,92
Falta de Ajuste	72,85	4	18,21
Erro Puro	10,67	2	5,33
Total	5438	10	
% variância explicada	95,62%		
% máx. explicável	99,80%		
F (MQ _R /MQ _r)	93,39	F _{4,6, 95%}	4,53
F (MQ _{faj} /MQ _{ep})	3,41	F _{4,2, 95%}	19,25

A análise das equações de regressão aplicadas aos dados experimentais mostrou que o *modelo quadrático* foi bem ajustado às observações.

De acordo com as superfícies de resposta geradas a partir do planejamento em estrela, a região onde se observa o maior número de picos cromatográficos corresponde à região de coloração vermelho intenso, relacionada ao maior tempo de análise estudado e de fase móvel contendo como solvente B ACN/MeOH 1:1 para a coluna Luna(2) e 100% de metanol como solvente B para o arranjo de colunas monolíticas e para a coluna Kinetex. Observa-se ainda que o número máximo de picos observáveis para a coluna Kinetex é bastante superior em relação as outras colunas.

Nesta etapa, a análise em uma única coluna Onyx não foi feita uma vez que as duas colunas acopladas apresentaram maior resolução cromatográfica em experimento anterior.

4.2.4 Seleção das condições cromatográficas – temperatura, volume de injeção e vazão da fase móvel.

Além das fases estacionária e móvel, que têm grande influência sobre os valores de fator de retenção (k) e seletividade (α), outros parâmetros podem ser ajustados para melhorar a separação cromatográfica. Dentre eles, temperatura, volume (e concentração) de amostra a ser injetada e vazão da fase móvel.

A temperatura tem influência sobre o equilíbrio entre o soluto e as fases móvel e estacionária, afetando diretamente o fator de retenção (k). Um aumento de 1°C na temperatura da coluna geralmente diminui o fator de retenção de 1 a 2% (SNYDER, KIRKLAND e DOLAN, 2010). Uma mudança em k pode resultar também em uma mudança em α , dessa forma, a temperatura é um parâmetro útil para se obter mudanças no espaçamento entre bandas e melhorar a resolução.

Se mesmo após o ajuste de k e α a resolução ainda necessitar ser melhorada, um aumento em N é uma opção. O aumento do número de pratos teóricos (N) pode ser alcançado aumentando-se o comprimento da coluna ou otimizando a vazão e aumentando o tempo de análise.

Em relação à quantidade de amostra injetada, quando esta é aumentada, eventualmente pode ocorrer um aumento da detectabilidade de substâncias minoritárias, no entanto, picos maiores podem se sobrepor, fazendo com que o número de pratos e os tempos de retenção diminuam, piorando a resolução

cromatográfica. Essa situação é denominada de “*overload*” (“sobrecarga”) da coluna. (SNYDER, KIRKLAND e DOLAN, 2010). Assumiu-se inicialmente que a quantidade de amostra injetada era suficientemente pequena a ponto de não sobrecarregar a coluna, não influenciando na resolução individual dos picos no cromatograma.

Os melhores valores de volume de injeção (concentração de amostra de acordo com a concentração obtida no procedimento de preparo de amostra descrito em 3.4), temperatura da coluna e vazão da fase móvel foram avaliados após seleção da melhor condição cromatográfica, através dos experimentos gerados pelo planejamento fatorial.

O número de picos cromatográficos observáveis foi utilizado como resposta para a análise e os resultados são apresentados nas Tabelas 19 – 21.

Tabela 19. Condições experimentais geradas através do planejamento fatorial e número de picos obtidos. – coluna Luna(2)

Experimento	Temperatura (°C)	Volume (mL)	Vazão (mL/min)	Nº de picos	Média	SD*	CV(%)**
1	30	10	1,0	141	-	-	-
2	50	10	1,0	171			
3	30	30	1,0	147			
4	50	30	1,0	162			
5	30	10	1,8	155			
6	50	10	1,8	155			
7	30	30	1,8	146			
8	50	30	1,8	148			
9 (000)	45	20	1,4	161	164	3,6	2
				168			
				163			

* Desvio padrão

** Coeficiente de variação percentual

Tabela 20. Condições experimentais geradas através do planejamento fatorial e número de picos obtidos. – colunas Onyx em série.

Experimento	Temperatura (°C)	Volume (mL)	Vazão (mL/min)	Nº de picos	Média	SD*	CV(%)**
1	30	10	1,5	166	-	-	-
2	50	10	1,5	164			
3	30	30	1,5	176			
4	50	30	1,5	162			
5	30	10	4,5	151			
6	50	10	4,5	141			
7	30	30	4,5	181			
8	50	30	4,5	138			
9 (000)	45	20	3,0	179	181	2	1
				183			
				181			

* Desvio padrão

** Coeficiente de variação percentual

Tabela 21. Condições experimentais geradas através do planejamento fatorial e número de picos obtidos. – coluna Kinetex.

Experimento	Temperatura (°C)	Volume (mL)	Vazão (mL/min)	Nº de picos	Média	SD*	CV**
1	30	10	0,5	212	-	-	-
2	50	10	0,5	187			
3	30	30	0,5	184			
4	50	30	0,5	190			
5	30	10	1,5	197			
6	50	10	1,5	222			
7	30	30	1,5	203			
8	50	30	1,5	215			
9 (000)	45	20	1,0	219	215	2,89	1
				214			
				214			

* Desvio padrão

** Coeficiente de variação percentual

A avaliação dos componentes principais (Figuras 29 - 31) foi aplicada como ferramenta para determinar o grau de importância dos fatores e selecionar a melhor condição.

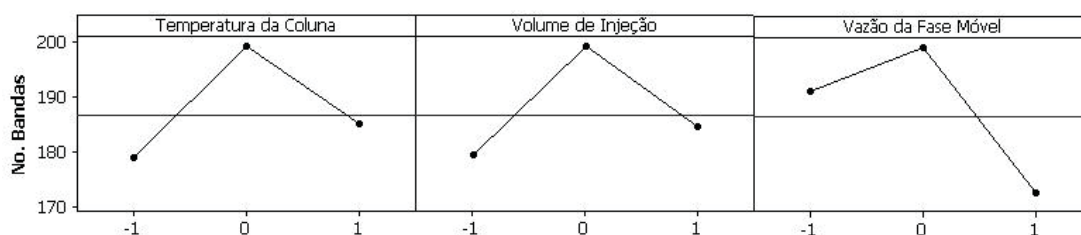


Figura 29. Avaliação dos efeitos principais para o planejamento experimental – coluna Luna(2).

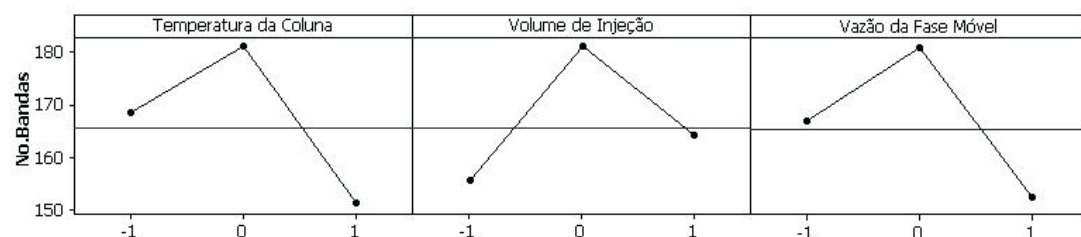


Figura 30. Avaliação dos efeitos principais para o planejamento experimental – colunas Onyx em série.

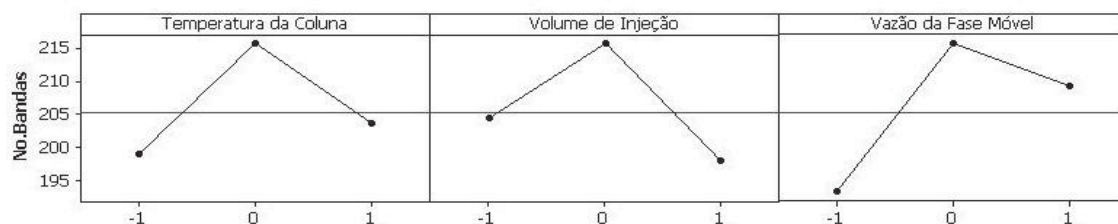


Figura 31. Avaliação dos efeitos principais para o planejamento experimental – coluna Kinetex.

A avaliação dos componentes principais revelou a influência dos fatores na eficiência da separação cromatográfica, demonstrando que todos possuem um valor ótimo onde a resolução é máxima.

Os fatores e níveis avaliados seguem a mesma tendência, demonstrando maior número de bandas observáveis nos níveis médios avaliados.

Os valores otimizados para as colunas utilizadas são mostrados na Tabela 22.

Tabela 22. Valores otimizados, obtidos pela avaliação dos efeitos principais para as colunas avaliadas.

Coluna	Temperatura (°C)	Volume (mL)	Vazão (mL/min)
Luna(2)	40	20	1,4
Onyx em série	40	20	3,0
Kinetex	40	20	1,0

4.3. Ajustes no gradiente

Após determinação das condições cromatográficas ideais a partir do planejamento em estrela e do planejamento fatorial, foram efetuados ajustes na rampa de gradiente a fim de otimizar as condições iniciais e finais do mesmo, uma vez que havia coeluição de muitas substâncias em determinados intervalos de tempo, enquanto outros não apresentavam bandas.

A proporção inicial de solvente orgânico (fase B) foi aumentada de 5 a 10% para todas as colunas, a fim de eluir mais rapidamente as substâncias de alta polaridade que dificilmente seriam separadas e analisadas por RP-HPLC e que demonstravam resolução ruim no início do cromatograma.

Observou-se que a maior parte das bandas era observada em até 25 minutos de análise, e a partir dos gradientes preliminares (5 - 100%B) pôde-se calcular a proporção de fase B nesta região, que correspondia a aproximadamente 50%. Dessa forma, o gradiente foi modificado a fim de abrandar a taxa de aumento de fase B, visando melhorar a separação das substâncias.

Visto que alguns picos ainda eram observados após 45 minutos de análise nos gradientes utilizados inicialmente, optou-se por inserir uma etapa isocrática de 100% de fase B na análise, a fim de eluir as substâncias ainda retidas na coluna. O novo gradiente utilizado é mostrado na Tabela 23 (o tempo de recondicionamento da coluna após a análise foi omitido).

Tabela 23. Condições de eluição de FM.

Tempo (min)	%B
0.01	10
45	50
55	100
60	100
65	10
80	10
80.01	Fim.

Os cromatogramas obtidos com a nova condição de eluição para as diferentes colunas são mostrados nas Figuras 32 - 34.

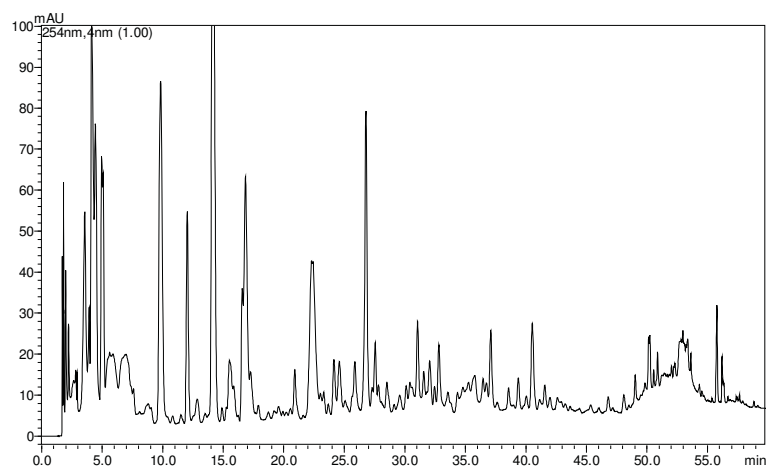


Figura 32. Cromatograma obtido na nova condição de eluição para a coluna Luna(2).

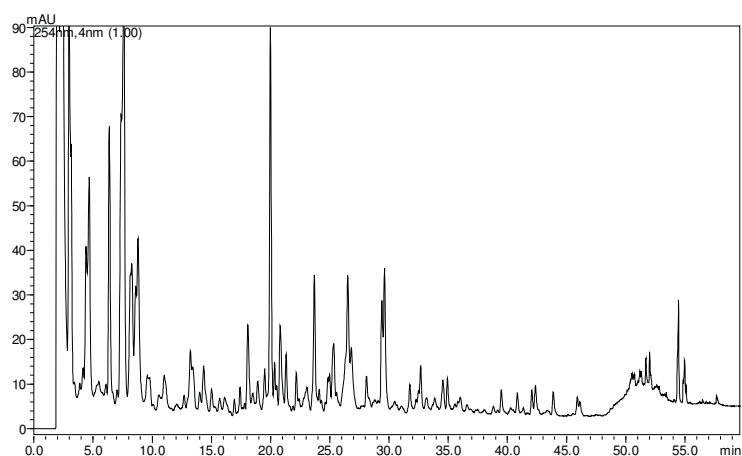


Figura 33. Cromatograma obtido na nova condição de eluição para as colunas Onyx em série.

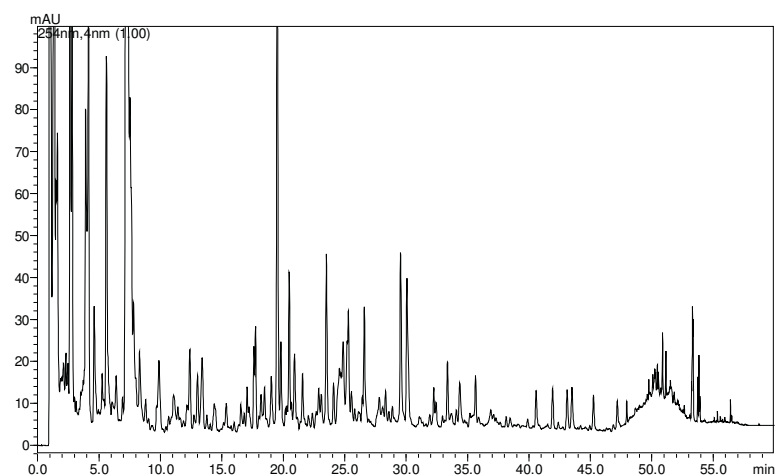


Figura 34. Cromatograma obtido na nova condição de eluição para a coluna Kinetex.

4.4. Validação do método

4.4.1 Precisão do equipamento

A precisão do equipamento foi avaliada analisando-se uma amostra de padrões de benzeno e tolueno de concentração 0,1% (v/v) em triplicata. Os resultados obtidos são mostrados na Tabela 24:

Tabela 24. Dados de médias, desvios padrão e coeficientes de variação percentual das análises da mistura de padrões benzeno e tolueno.

Replicata	Benzeno		Tolueno	
	t_r	Área Rel.(%)	t_r	Área Rel.(%)
1	26,560	23,4	42,842	60,7
2	26,563	23,9	42,836	62,3
3	26,548	23,5	42,829	61,1
Média	26,557	23,6	42,836	61,4
SD	0,008	0,265	0,007	0,833
CV (%)	0,03%	1,12%	0,02%	1,36%

Os resultados indicam baixos valores de coeficientes de variação percentual em relação ao tempo de retenção dos padrões e das áreas relativas de cada um, o que demonstra a boa repetibilidade da análise e precisão do equipamento utilizado.

4.4.2 Análise de brancos

Uma vez que o método proposto é voltado à análise de pequenas quantidades de amostra, com analitos em baixas concentrações e que a análise da

matriz estudada gera como resultados cromatogramas muito complexos, é fundamental discernir entre sinais referentes à amostra e contaminantes (caso estes estejam presentes), e se essas contaminações podem influenciar a análise, mascarando sinais de analitos de interesse. Para isso, avaliou-se a contaminação durante o preparo da amostra através do *branco da amostra* e dos solventes utilizados na cromatografia líquida de alta eficiência através do *branco da fase móvel*.

Os cromatogramas obtidos podem ser observados na Figura 35:

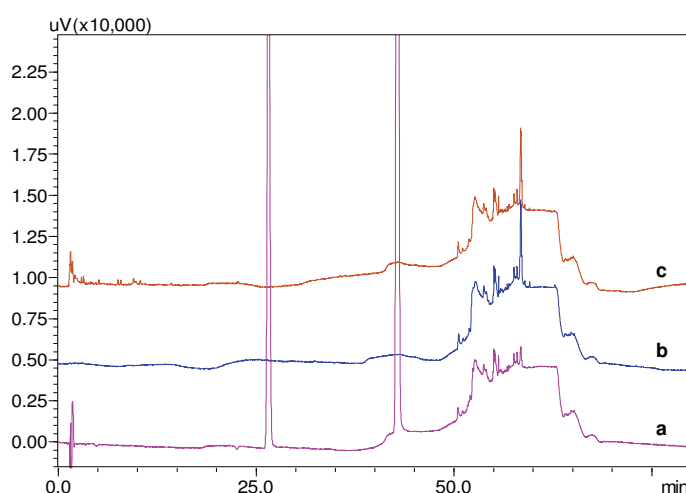


Figura 35. Cromatogramas: a) injeção de padrões bezeno / tolueno; b) branco da fase móvel; c) branco da amostra.

Pode-se observar pela Figura 35 a presença de picos cromatográficos de interferentes no fim da análise do branco da fase móvel e no começo da análise do branco da amostra, porém, todos estes sinais são de intensidade muito baixa, não interferindo na análise da amostra, segundo o método proposto, como é possível observar na Figura 36.

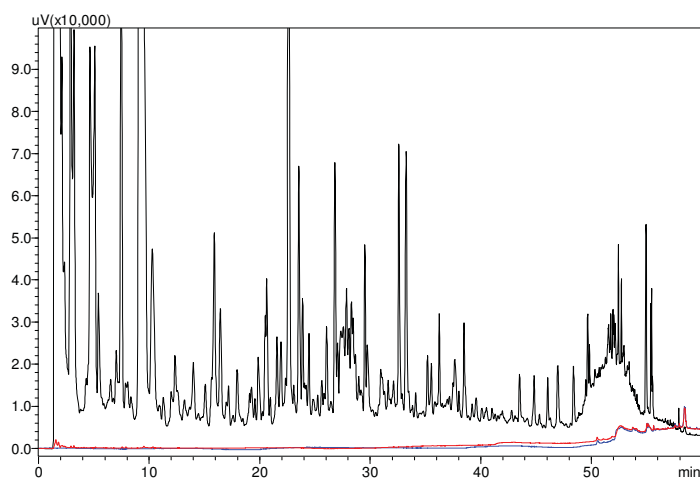


Figura 36. Sobreposição dos cromatogramas do branco da fase móvel (azul), branco do preparo de amostra (vermelho) e do cultivar RB3280.

4.4.3 Repetibilidade inter amostra

Avaliou-se a repetibilidade para as áreas e o número de picos observados nas análises das amostras preparadas em triplicatas, a partir dos valores médios e respectivos valores de desvio padrão e coeficiente de variação percentual.

A partir dos resultados obtidos para as três diferentes amostras preparadas, foi possível avaliar a repetibilidade do procedimento de preparo de amostra.

Tabela 25. Avaliação da repetibilidade *inter amostra*.

Amostra	Picos	Área Total (u.a.)
1	198	67240123
2	200	61840906
3	197	58299241
Média	198	62460090
SD	2	4502487
CV (%)	0,95%	7,21%

A partir dos resultados apresentados na Tabela 25 é possível verificar a boa repetibilidade no número de picos das análises em diferentes amostras preparadas seguindo-se o método proposto. Uma variação maior é observada no coeficiente de variação percentual da área total, o que sugere uma diferença de concentração entre as diferentes amostras preparadas. Tal variação pode estar relacionada às diversas etapas de preparação de amostra e o consequente acúmulo de variações na concentração da amostra durante essas etapas.

4.4.4 Repetibilidade intradia

A partir dos resultados obtidos para as análises em replicatas dentro de um mesmo dia, foi possível avaliar a repetibilidade *intradia* (1º dia de análises), verificando variações decorrentes de variações do equipamento ou condições externas.

Tabela 26. Avaliação da repetibilidade *intradia* a partir da média das replicatas das análises.

	Picos	Área (u.a.)
Média	198	61703572,27
SD	3	3903351,995
CV (%)	1,34%	6,33%

É possível observar, a partir da Tabela 26, a pequena variação entre o número de picos obtidos em todas as análises em um mesmo dia, demonstrando a repetibilidade qualitativa do método proposto. Mais uma vez, a variação apresentada pela análise das replicatas das áreas totais demonstrou-se mais alta, mas ainda consideravelmente aceitável.

4.4.5 Repetibilidade interdias

A partir dos resultados obtidos para as análises em replicatas em dias distintos, foi possível avaliar a repetibilidade *interdias*.

Tabela 27. Avaliação da repetibilidade *interdias* a partir da média das replicatas das análises de todas as amostras.

	Picos	Área (u.a.)
Média	197	62474064,95
SD	3	3814889,258
CV (%)	1,61%	6,11%

Tabela 28. Avaliação da repetibilidade *interdias* a partir da média das replicatas das análises da amostra 1.

	Picos	Área (u.a.)
Média	197	67964602,33
SD	3	985891,9624
CV (%)	1,27%	1,45%

Os resultados obtidos, quando analisados em relação às três diferentes amostras demonstram baixos valores de coeficientes de variação percentual para o número de

picos observados, enquanto que para a área total os valores são mais altos. Quando analisados em relação às replicatas de uma mesma amostra em diferentes dias, mais uma vez observa-se o baixo valor de coeficiente de variação percentual para o número de picos e agora também para a área total, o que sugere que as variações observadas estão diretamente relacionadas com a diferença entre a concentração das amostras.

4.5. Estabilidade da amostra

A estabilidade da amostra e possíveis variações decorrentes do tipo de armazenamento da mesma puderam ser avaliadas pelas análises das amostras armazenadas em diferentes condições.

Tabela 29. Avaliação da estabilidade das amostras submetidas a diferentes condições de armazenamento.

	Extrato Seco Refrigerado		Solução Refrigerada		Solução T _{amb}	
	Picos	Área (u.a.)	Picos	Área (u.a.)	Picos	Área (u.a.)
1º dia	197	62429043	199	59247591	199	67883365
8º dia	194	63118367	195	58701984	194	67753664
Média	196	62773705	197	58974788	196	67818515
SD	2	487425,6748	3	385802,4	4	91712,46
CV (%)	1,09%	0,78%	1,44%	0,65%	1,80%	0,14%

Os resultados apresentados sugerem que o número de picos e a concentração da amostra permaneceram praticamente constantes mesmo sob diferentes condições de armazenamento. Os valores de coeficiente de variação apresentados podem não apresentar obrigatoriamente uma variação da amostra, mas sim uma variação intrínseca à análise, como já observado pela avaliação da incerteza do método.

4.6. Avaliação da aplicabilidade do método a diferentes cultivares

A fim de avaliar a aplicabilidade do método proposto, dois diferentes cultivares (IAC1115 e IAC5000), além do utilizado no desenvolvimento do método foram analisados. Os perfis cromatográficos são apresentados nas Figuras 37 - 39:

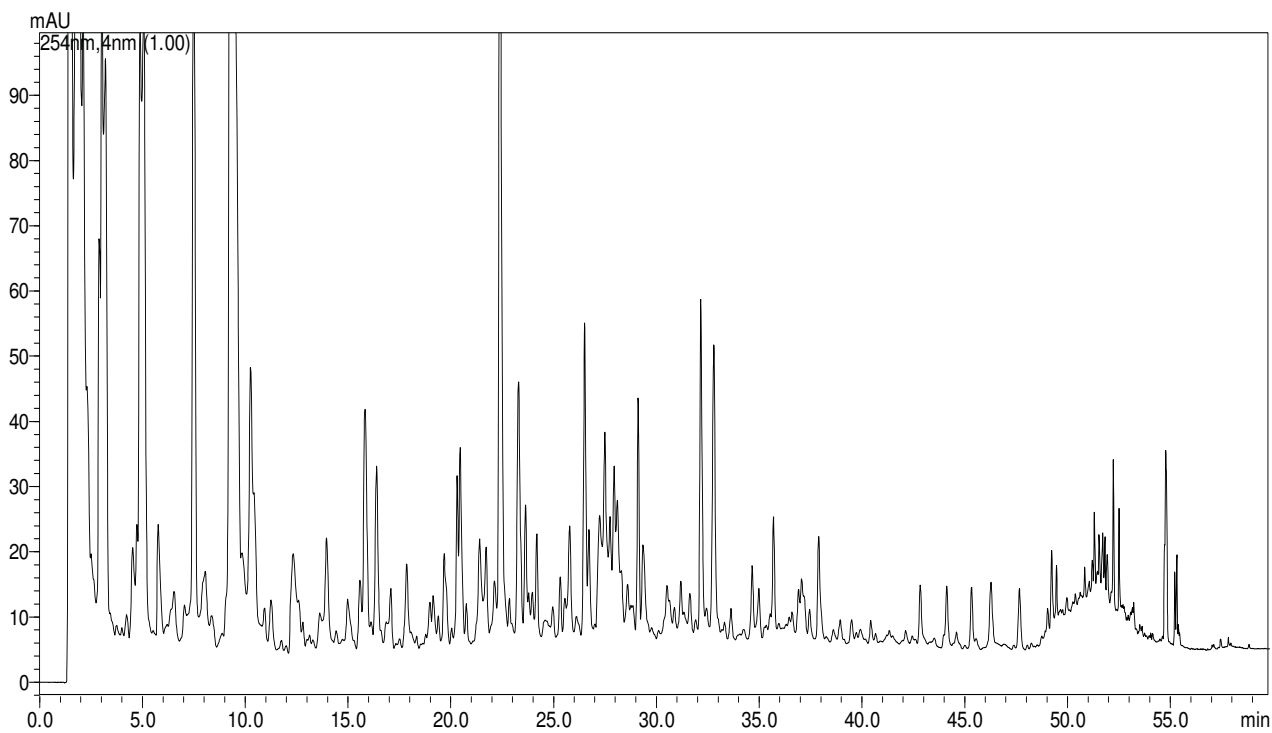


Figura 37. Perfil cromatográfico do cultivar RB3280.

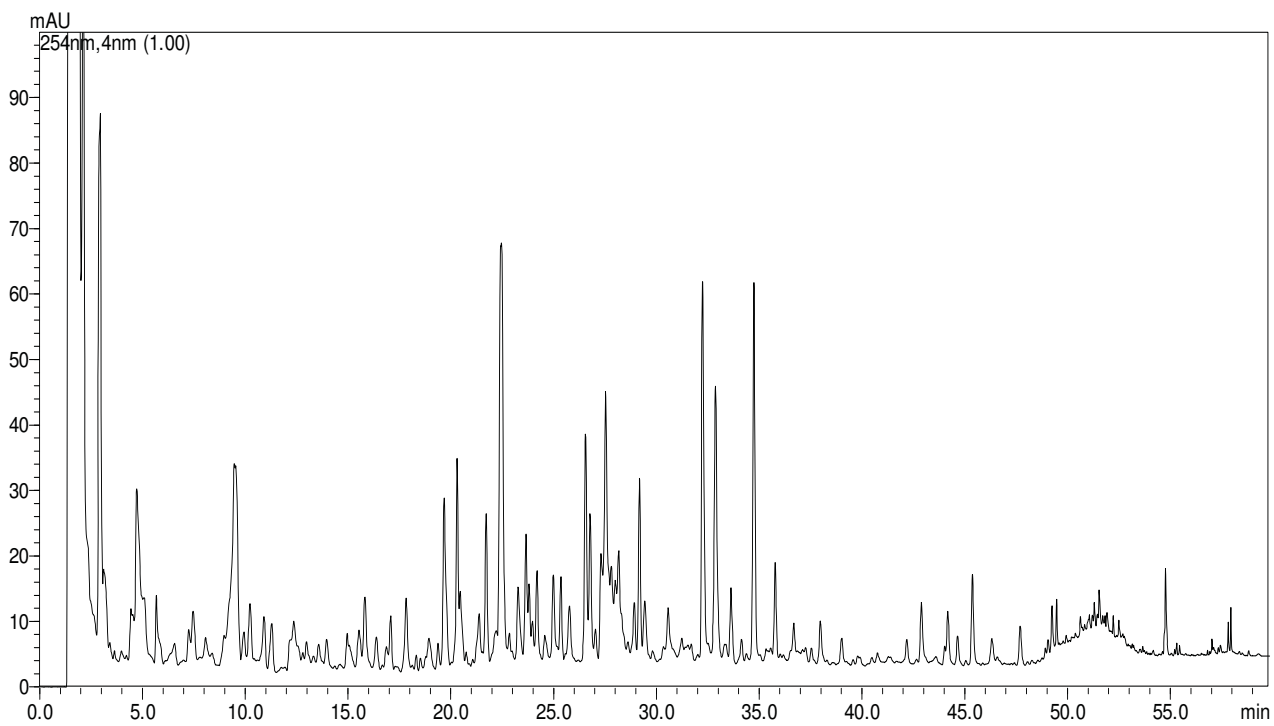


Figura 38. Perfil cromatográfico do cultivar IAC5000.

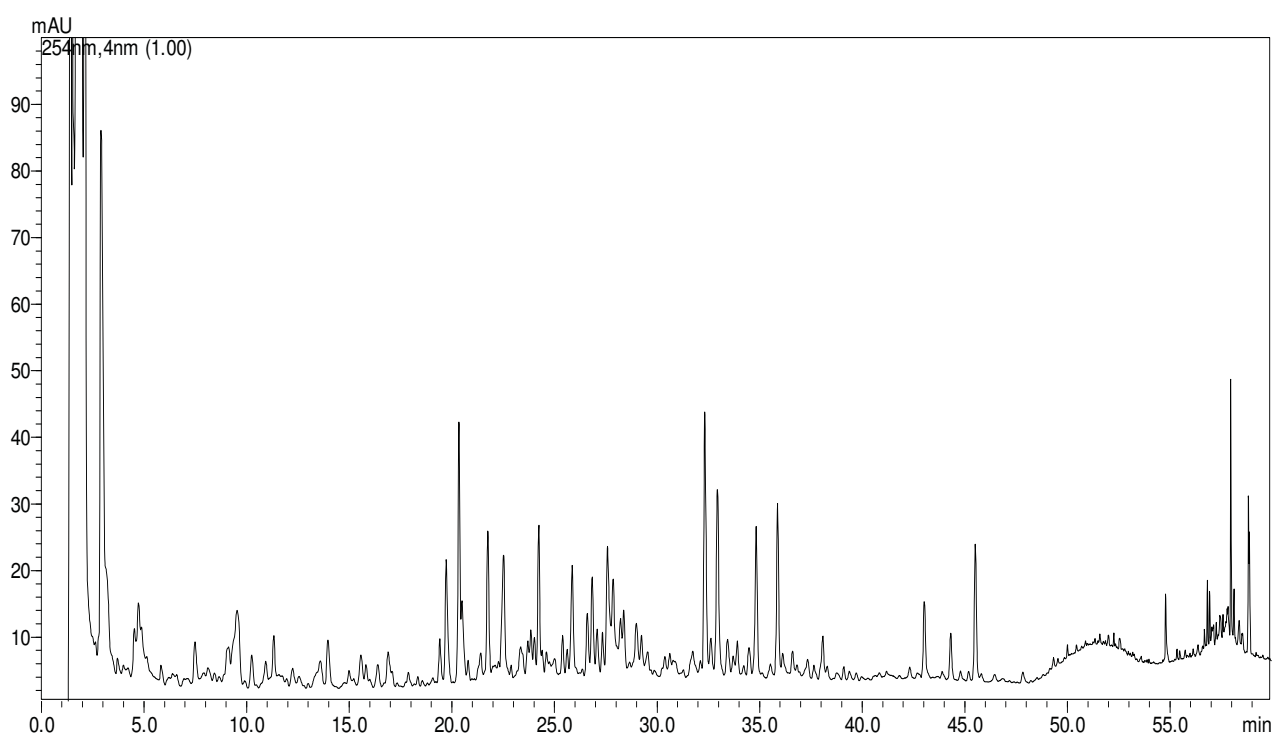


Figura 39. Perfil cromatográfico do cultivar IAC1115.

A análise visual dos cromatogramas obtidos para os diferentes cultivares mostra a grande diferença entre eles.

4.7. Avaliação preliminar dos constituintes químicos de folhas de cana-de-açúcar

A metodologia desenvolvida nesta dissertação, teve como objetivo validar uma ferramenta analítica robusta, que pudesse ser posteriormente utilizada para estudos metabolômicos de uma matriz complexa. Objetivando-se testar o método analítico desenvolvido, a espectrometria de RMN de ^1H foi utilizada na identificação preliminar de alguns constituintes presentes nos extratos de folhas de cana-de-açúcar, cultivar RB3280, obtidos no processo de extração. A partir de um fracionamento por SPE, inserido nas etapas descritas de preparo de amostra, obteve-se três frações do extrato bruto, que foram analisadas por HPLC-DAD e RMN. O procedimento de preparo das amostras é mostrado a seguir:

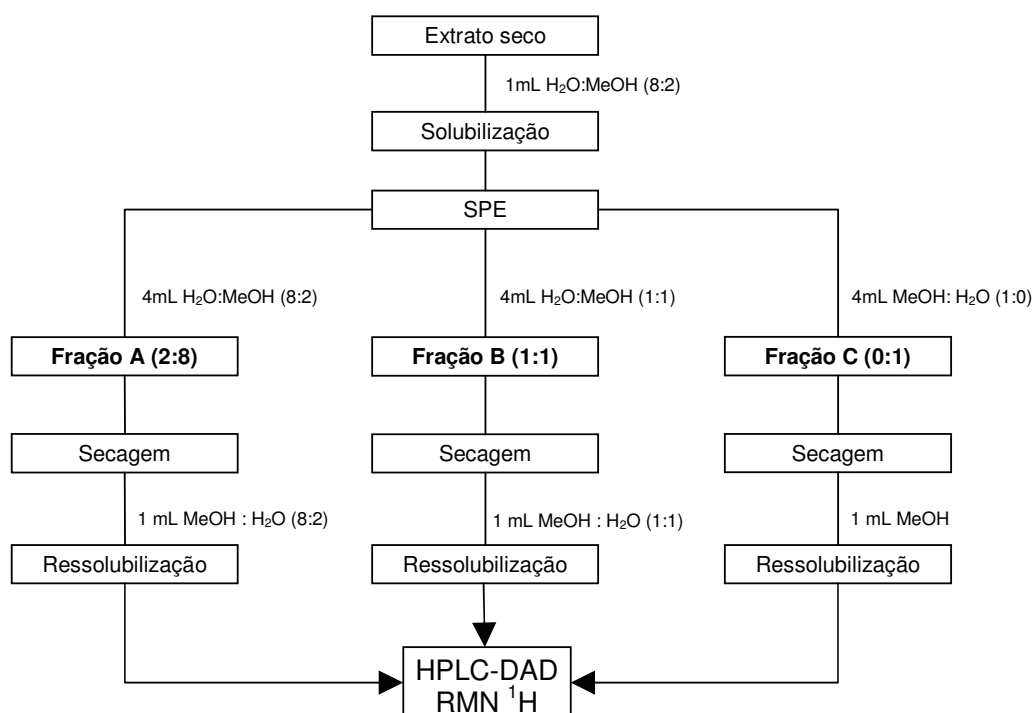


Figura 40. Fluxograma do procedimento de preparo das amostras para identificação preliminar via RMN de ^1H .

Os cromatogramas das frações mostraram que o procedimento adotado foi eficiente, permitindo obter amostras com perfil micromolecular distinto, em função da polaridade, que depende da natureza do solvente de extração, bastante distintas e por conseguinte levando a obtenção de espectros bastantes elucidativos. Adicionalmente, a análise das bandas de absorção no UV forneceram indícios das classes de substâncias presentes em cada fração, sendo que a Fração B contém muitos picos com absorções características de flavonóides, em torno de 270 e 350 nm (Figura 42).

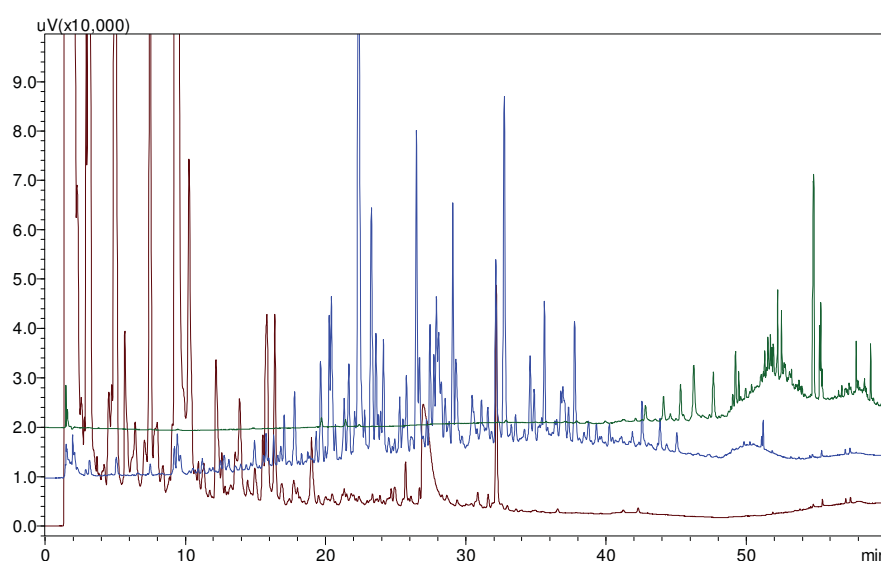


Figura 41. Cromatogramas das amostras obtidas no fracionamento por SPE (Fração A - vermelho, Fração B - azul, Fração C - verde).

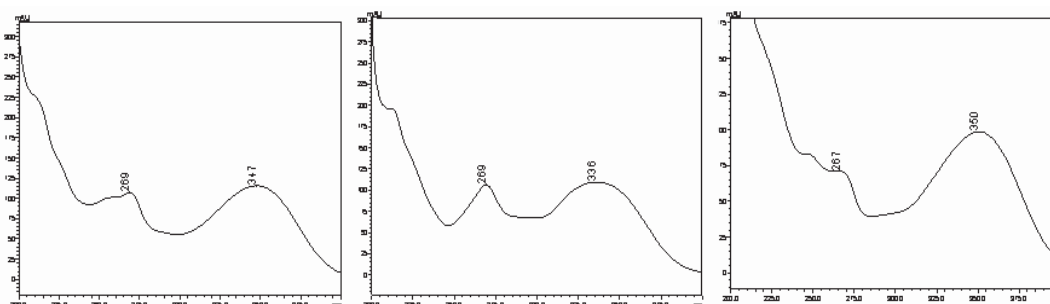


Figura 42. Espectros de absorção no UV característicos de flavonóides de alguns picos da Fração B.

Os espectros de RMN de ^1H da Fração A (Figura 43) indicam claramente a presença de grande quantidade de açúcares, além de derivados fenólicos como cafeoatos, ferulatos e flavonóides, enquanto que na Fração B, a intensidade dos

sinais correspondentes aos hidrogênios de aromáticos das classes mencionadas é significativamente menor (Figura 44). A Fração C não apresenta sinais na região de derivados de açúcares e sinais intensos correspondentes a sinais para hidrogênios típicos de aminoácidos (Figura 45)..

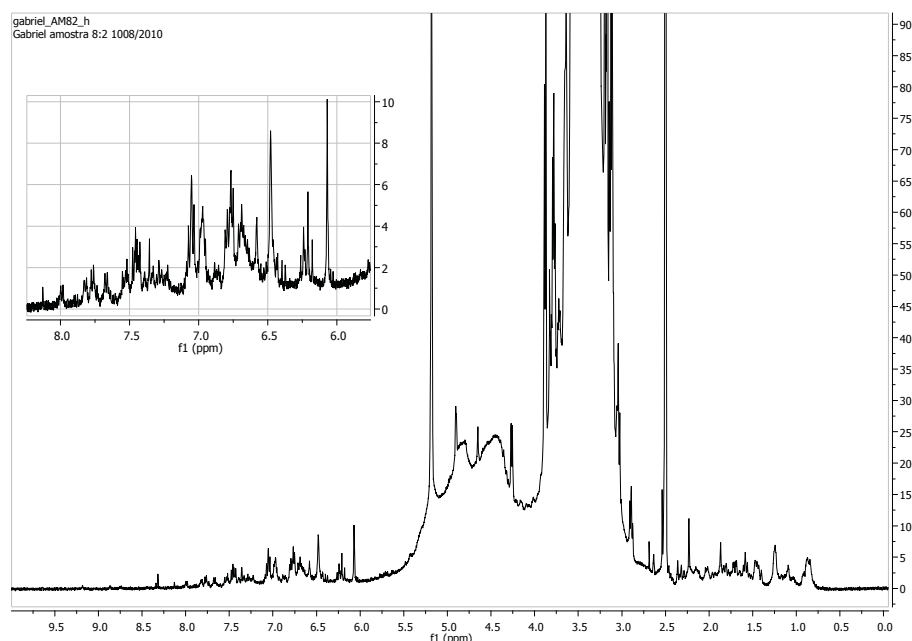


Figura 43. Espectro de RMN de ^1H da fração A. Em destaque, região de sinais de derivados fenólicos.

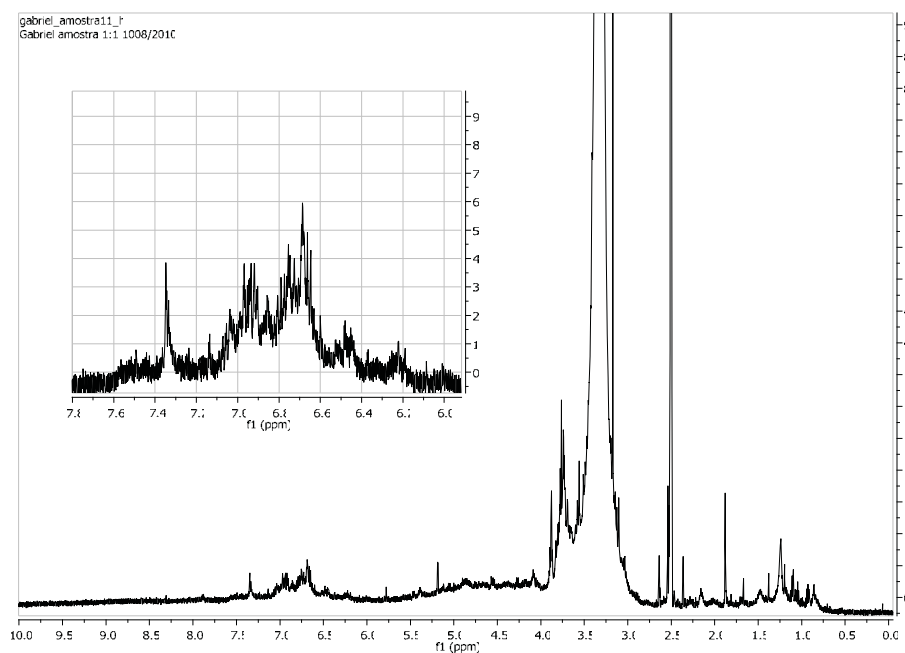


Figura 44. Espectro de RMN de ^1H da fração B. Em destaque, região de sinais de derivados fenólicos.

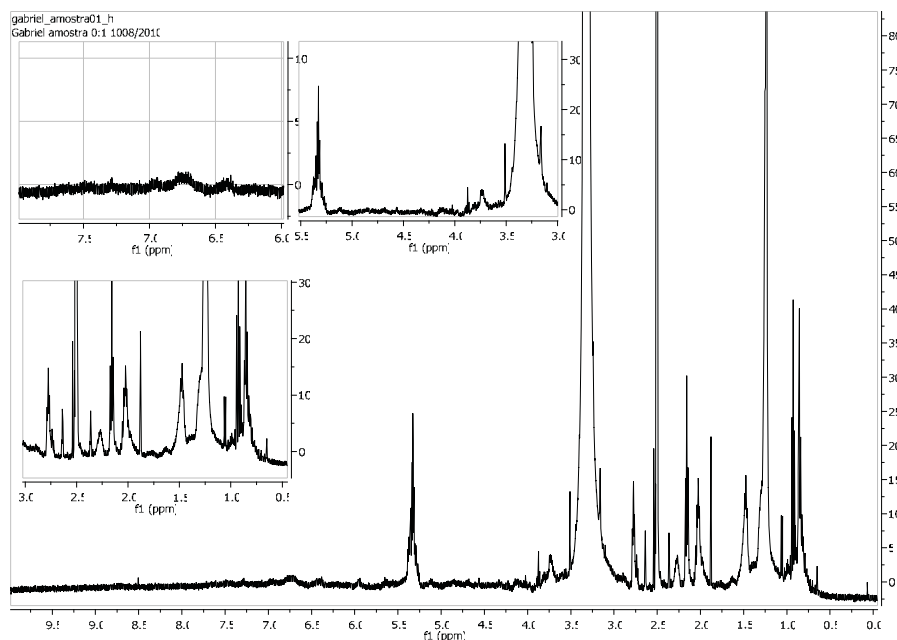


Figura 45. Espectro de RMN de ^1H da Fração C - Em destaque, região de sinais correspondentes a hidrogênios de açúcares na faixa de δ 3,0-4,0 e hidrogênios anoméricos entre δ 5,0-5,25, e de aminoácidos entre δ 2,8-2,0.

A partir destes resultados muito preliminares ainda foi possível diagnosticar a presença de pelo menos três diferentes classes de substâncias, nas frações distintas obtidas na extração. Nossas previsões iniciais são bastante coerentes com dados da literatura sobre metabólitos secundários já descritos para o gênero *Saccharum*. Os dados de RMN de ^1H , mesmo muito preliminares demonstram que esta é uma ferramenta útil para identificar a composição metabolômica de um extrato com uma grande diversificação de metabólitos. A técnica de RMN será utilizada nas análises futuras do estudo metabolômico de cana-de-açúcar.

4.8. Avaliação da influência do teor de CO_2 nas amostras cultivadas em condições atmosféricas simuladas

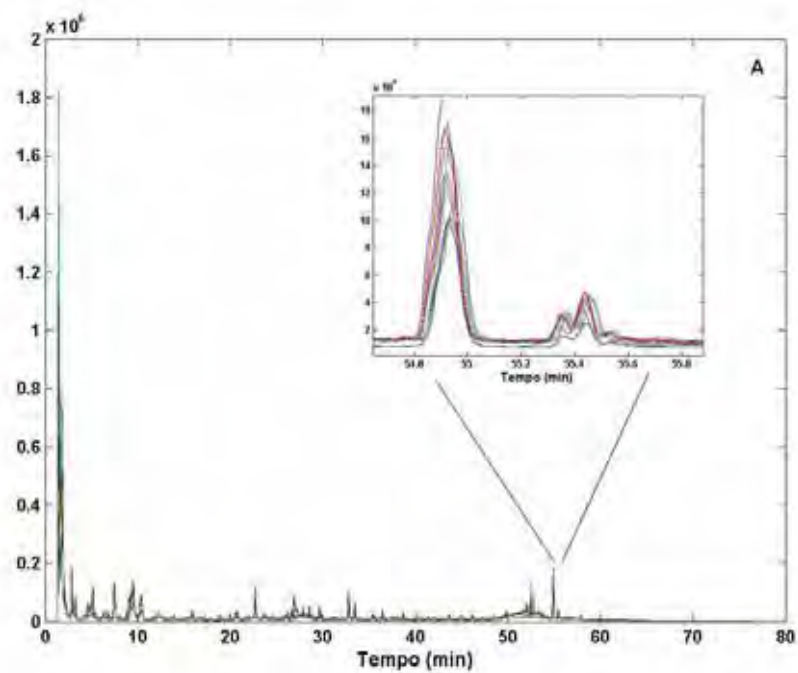
Alinhamento dos perfis cromatográficos

Os cromatogramas da matriz **X** foram submetidos ao alinhamento a partir do pressuposto da existência de uma amostra de referência, a partir da qual as demais

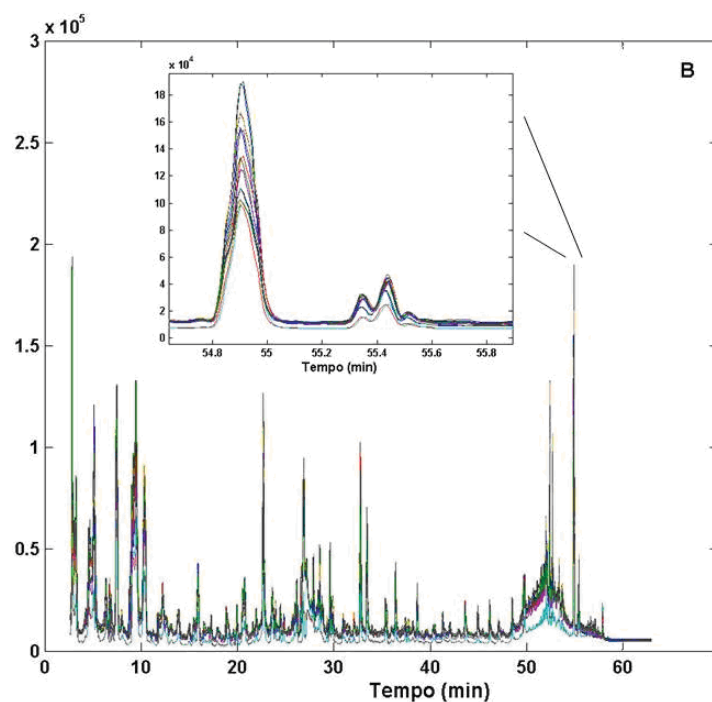
seriam alinhadas, a fim de que o conjunto total de amostras apresente um elevado índice de similaridade.

Em alguns casos, pode ser necessário realizar a redução do número de variáveis, como por exemplo, a subtração de sinais excessivamente intensos e/ou que se saiba que não fazem parte dos sinais desejados, como por exemplo picos de solventes, capazes de influenciar os resultados. Neste trabalho, os pontos referentes ao primeiro pico dos cromatogramas, cuja eluição se deu no tempo morto da coluna (t_M) foram eliminados devido à sua grande intensidade, que poderia acarretar a perda de significância dos picos menos intensos. Assim, o intervalo efetivamente considerado foi de aproximadamente 2,5 min até 60 min.

Dessa forma, os cromatogramas da matriz **X** com as variáveis indesejadas eliminadas foram alinhados. Essa nova matriz **X** passou a ter a dimensão de 16 linhas e 5651 colunas ou variáveis. A Figura 46 apresenta os cromatogramas antes e após o alinhamento.



(a)



(b)

Figura 46. Cromatogramas da matriz X sobrepostos a) antes do alinhamento b) após alinhamento.

Análise de componentes principais – PCA

O número de componentes principais (PCs) necessários para descrever a maior variação do conjunto de dados foi selecionado a partir do gráfico de

autovalores e da percentagem de variância explicada em cada fator. Um critério para a seleção do número de PCs adequado é o valor a partir do qual a variância explicada segue um declínio pouco acentuado.

Na análise PCA da matriz **X** foram selecionados diferentes valores de PCs, de acordo com o pré-tratamento das amostras, como mostrado pela Tabela 24:

Tabela 24. Número de PCs selecionados, de acordo com o tipo de pré-processamento adotado.

Pré-Processamento	Nº. PCs	% Variância Explicada
Autoescalados	4 PCs	93,21 %
Centrado na Média	6 PCs	96,49 %
Sem Pré-processamento	2 PCs	98,70%

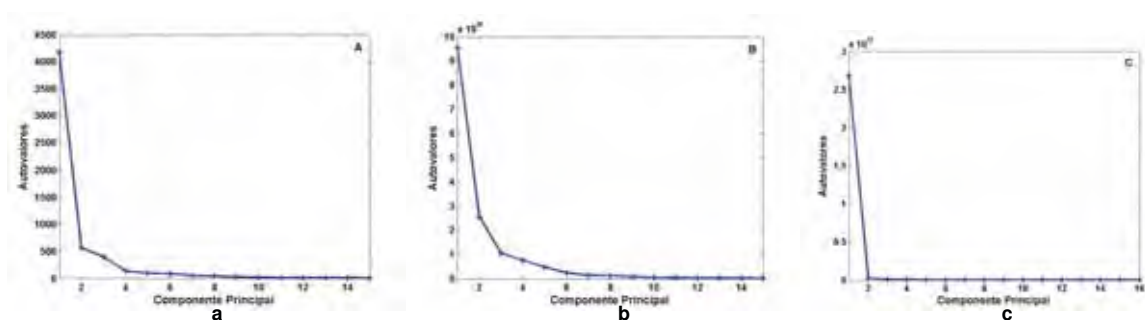


Figura 47. Gráficos de autovalores para os três pré-processamentos adotados: a) autoescalado, b) centrado na média, c) sem pré-processamento.

Através da Figura 47, é possível observar que para os dados autoescalados são necessários 4 PCs, que são responsáveis por 93,21% da variância total explicada, para os dados centrados na média são necessários 6 PCs que explicam 96,49% da variância total e para os dados sem pré-processamento apenas 2 PCs são suficientes e responsáveis por 98,70% da variância total explicada. Normalmente, as últimas PCs explicam ruídos inerentes aos dados e por isso são responsáveis por uma pequena variância explicada.

Observou-se que a análise de componentes principais realizada sem pré-processamento nas variáveis foi a que necessitou de um menor número de PCs e a que explicou uma maior percentagem da variância da matriz. Além disso o gráfico dos *scores* mostrou uma melhor separação das amostras entre os grupos *controle* e *alto CO₂* do que na PCA realizada com os pré-processamentos citados. Portanto, as análises posteriores foram efetuadas a partir destes resultados.

Após a análise de componentes principais, os dados originais da matriz puderam ser interpretados por um número reduzido de dimensões em um sistema menos complexo.

As amostras foram nomeadas de 1-16, sendo que **1-8** são as amostras cultivadas em condições atmosféricas de CO₂ e **9-16** são as amostras cultivadas em altas concentrações de CO₂.

A projeção das amostras no novo sistema de eixos (PCs) é visualizada através do gráfico de *scores* (Figura 48), no qual observa-se a separação das amostras em dois grupos distintos, de acordo com as características de cultivo das mesmas. Isso demonstra que os perfis cromatográficos, embora visualmente bastante semelhantes, apresentam características capazes de distinguir as amostras de acordo com a concentração de CO₂ atmosférica na qual cada uma foi cultivada.

A importância (peso) de cada variável na descrição dos eixos (PCs), é apresentada no gráfico de *loadings* (Figura 49). As variáveis com maior influência na variabilidade dos dados são aquelas que mais se distanciam do zero.

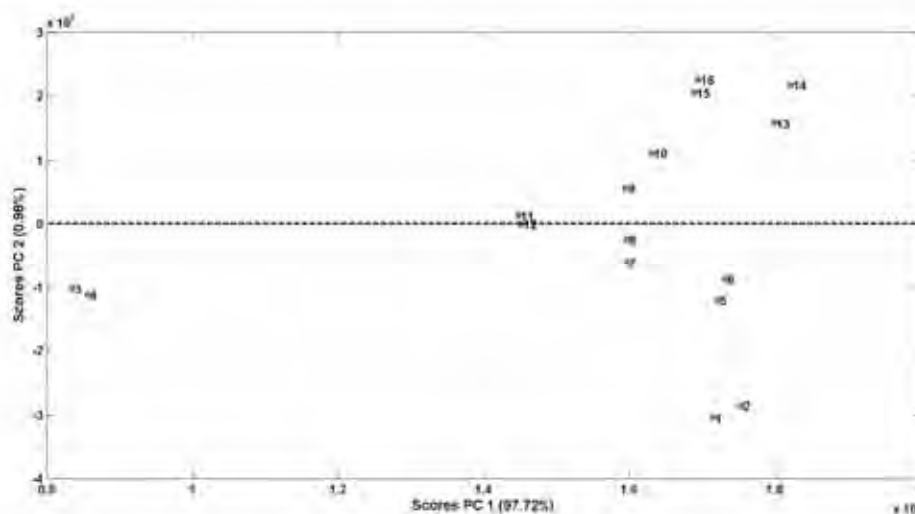


Figura 48. Análise PCA da matriz X. Gráfico de *scores*.

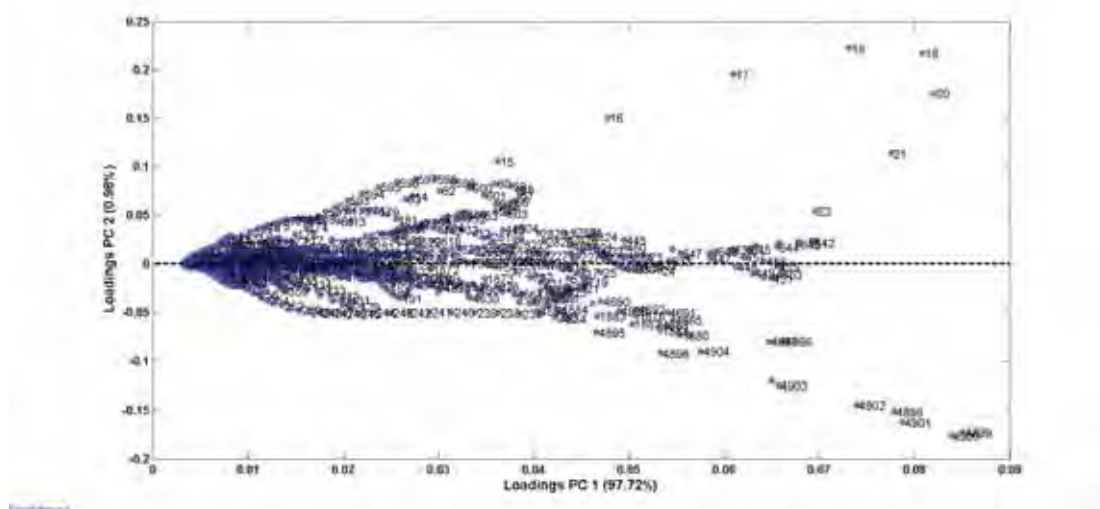


Figura 49. Análise PCA da matriz X. Gráfico de *loadings* (pesos) das variáveis em PC1 e PC2.

No gráfico dos *scores* observa-se claramente a separação das amostras em dois grupos, as cultivadas em concentração atmosférica de CO₂ ambiente e as cultivadas em condições elevadas de CO₂ atmosférico. O gráfico dos *loadings* mostra que as principais variáveis responsáveis por essa separação, no caso das amostras cultivadas em concentração atmosférica de CO₂ ambiente (1-8) são as variáveis de valores entre 4890 e 4900 que correspondem aos tempos de retenção em torno de 54 a 55 minutos. No caso das amostras cultivadas em alta concentração de CO₂ atmosférico (9-16), as principais variáveis responsáveis pela separação são aquelas de valores próximos de 15 a 22 que correspondem aos tempos de retenção em torno de 2,8 a 2,9 minutos. A Figura 50 identifica esses picos nos cromatogramas.

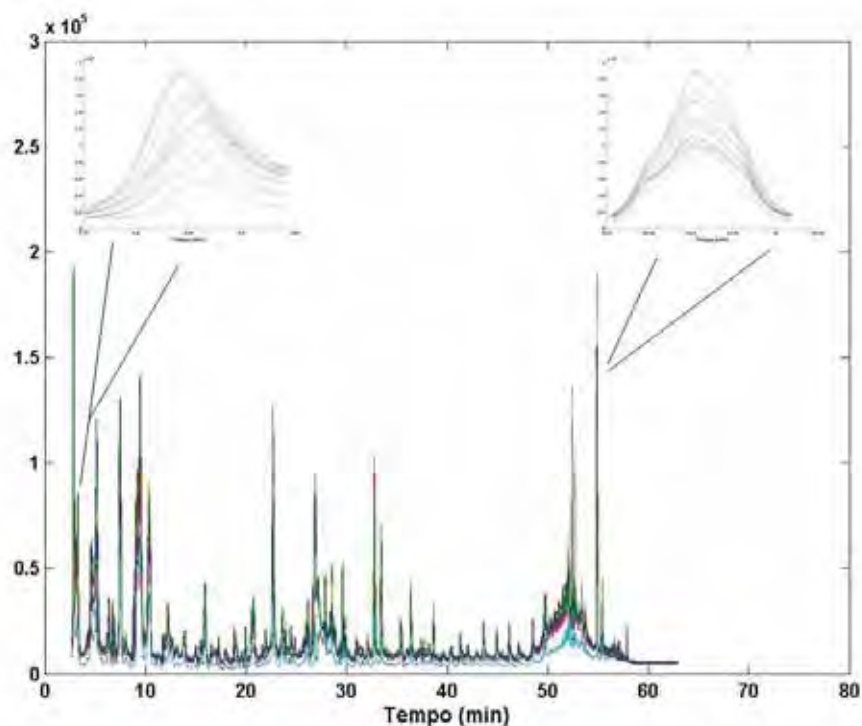


Figura 50. Picos responsáveis pela separação das amostras nas análises por componentes principais.

Verificada a separação entre os grupos, optou-se por verificar também por PCA, a separação das amostras dentro do mesmo grupo, a fim de avaliar se os tempos de colheita (30 (amostras 1 e 2), 45 (amostras 3 e 4), 60 (amostras 5 e 6) e 75 dias (amostras 7 e 8)) seriam responsáveis também pela distinção entre as amostras.

As análises foram realizadas com os dados sem pré-processamento, uma vez que o autoescalamento e a centralização na média não demonstraram separações entre os subgrupos das amostras.

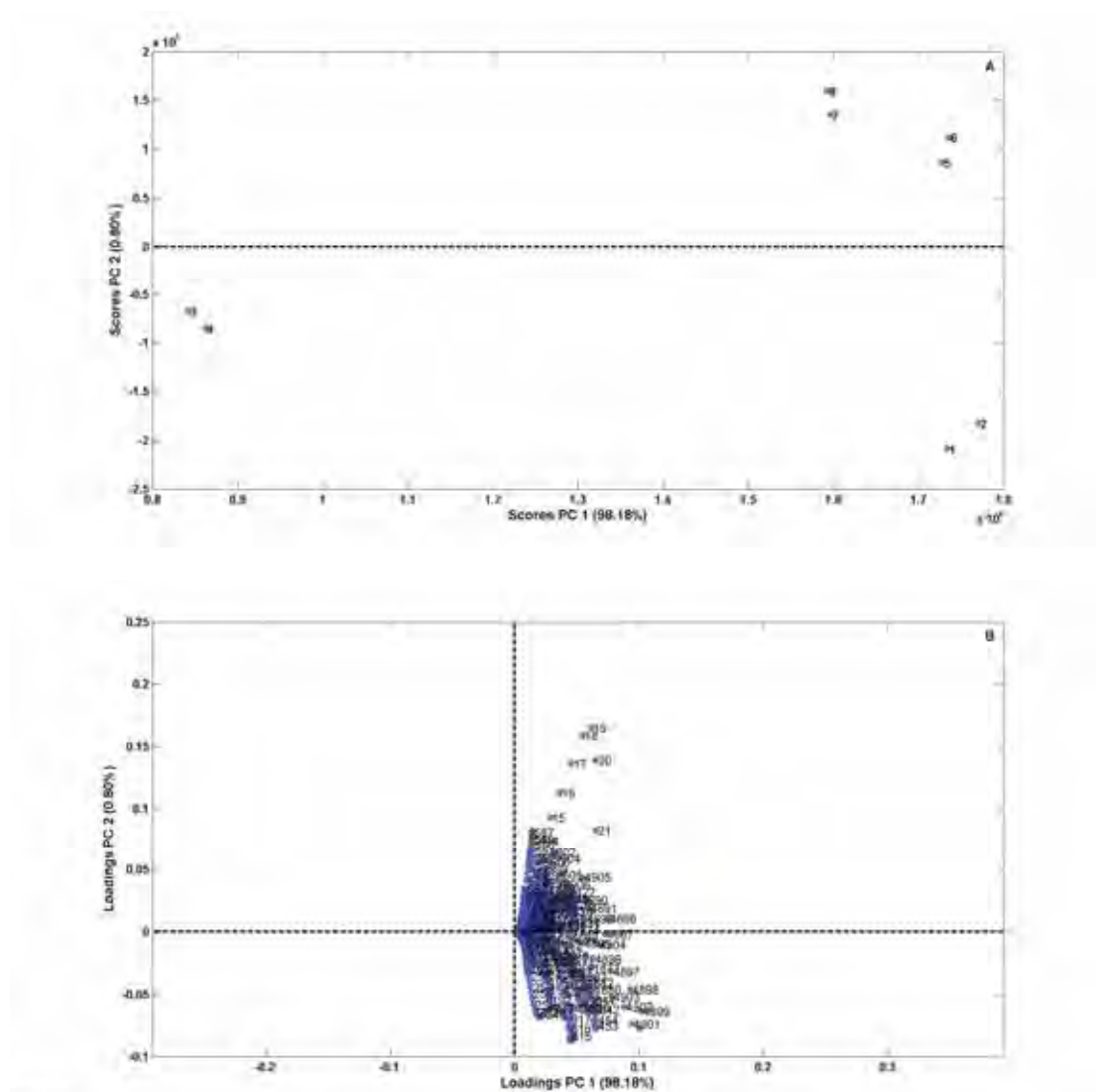


Figura 51. Análise PCA das amostras cultivadas em condições atmosféricas de CO₂; a) gráfico de scores, b) gráfico de loadings.

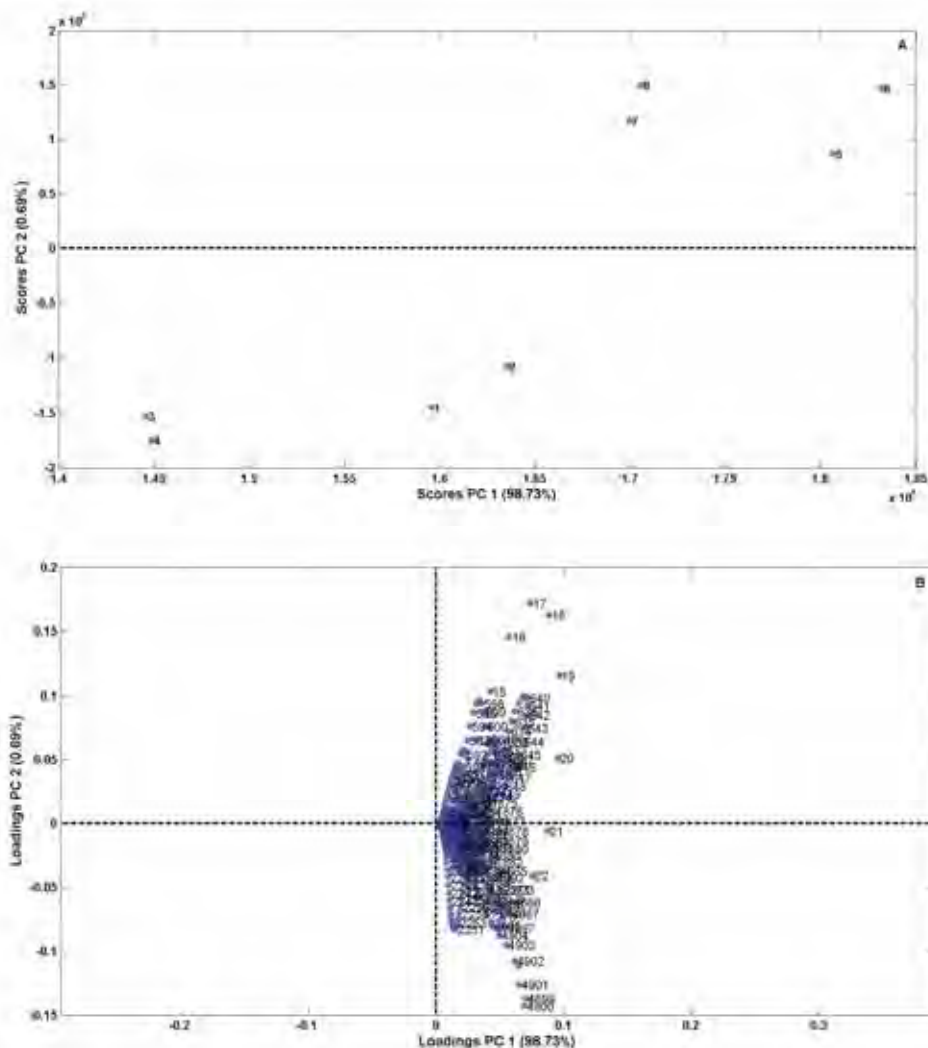


Figura 52. Análise PCA das amostras cultivadas em elevadas concentrações de CO₂; a) gráfico de *scores*, b) gráfico de *loadings*.

O gráfico de *scores* sugere que existe uma diferença entre os cromatogramas do mesmo grupo. Verifica-se pelo gráfico de *loadings* que a separação das amostras com maior exposição ao CO₂ (60 e 75 dias) se deve às mesmas variáveis que são responsáveis pela distinção do grupo cultivado em condições de alta concentração de CO₂ atmosférico, ou seja, as variáveis entre 15 e 22, correspondentes aos tempos de retenção em torno de 2,8 - 2,9 minutos.

Modelos de classificação – SIMCA e PLS-DA

Os modelos de classificação foram elaborados a partir da primeira replicata de cada grupo de amostras, que constituiu o conjunto de calibração. Porém, após a

construção do modelo, foi necessário avaliar o seu desempenho, ou seja, a capacidade de classificar corretamente amostras desconhecidas. Por isso, a replicata das amostras foi utilizada como um conjunto de validação.

A constatação da correta classificação das amostras do conjunto de validação indica que o modelo é adequado e pode ser aplicado a outros conjuntos de amostras.

Nesta etapa, a matriz **X** alinhada foi reorganizada e dividida de modo a obter-se duas submatrizes: uma contendo amostras de calibração e outra de validação. Com esta nova organização, as amostras de 1 a 4 são as amostras do grupo cultivado em condição controle (grupo 1), as amostras 5 a 8 são as amostras cultivadas em condições de alto CO₂ (grupo 2), utilizadas na calibração. Amostras de 9 a 12 são as replicatas do grupo 1 e as amostras de 13 a 16 são as replicatas do grupo 2, utilizadas na validação.

Assim como na análise exploratória, os modelos foram elaborados com os dados sem pré-processamento.

O método SIMCA mostrou uma classificação duvidosa para algumas amostras. O modelo previu que as amostras 1, 2 e 3 pertencem ao grupo 1 enquanto que a amostra 4 foi atribuída aos dois grupos, porém com maior proximidade ao grupo 1. Semelhantemente, as amostras 5 e 6 foram previstas como pertencentes aos dois grupos, porém com maior proximidade ao grupo 2, enquanto que as amostras 7 e 8 foram atribuídas ao grupo 2 de forma correta. Devido às incertezas geradas pelo método SIMCA, e levando-se em consideração a variabilidade que ocorre dentro do mesmo grupo, a qual foi comprovada através da análise por componentes principais, procedeu-se a classificação utilizando o método PLS-DA que parece ser mais apropriado nesses casos.

O gráfico dos *scores* e dos *loadings* apresentados pelo PLS-DA, sem pré-processamento, confirmam os resultados obtidos pelo PCA. O gráfico de *scores* (Figura 53) do modelo PLS mostra a separação dos grupos. Este fato, junto com uma análise dos *loadings* (Figura 54) que apresentaram os maiores valores para as variáveis em torno de 16 a 23 e 4890 a 4900, nos permitem afirmar que estas foram as variáveis responsáveis pela separação dos grupos.

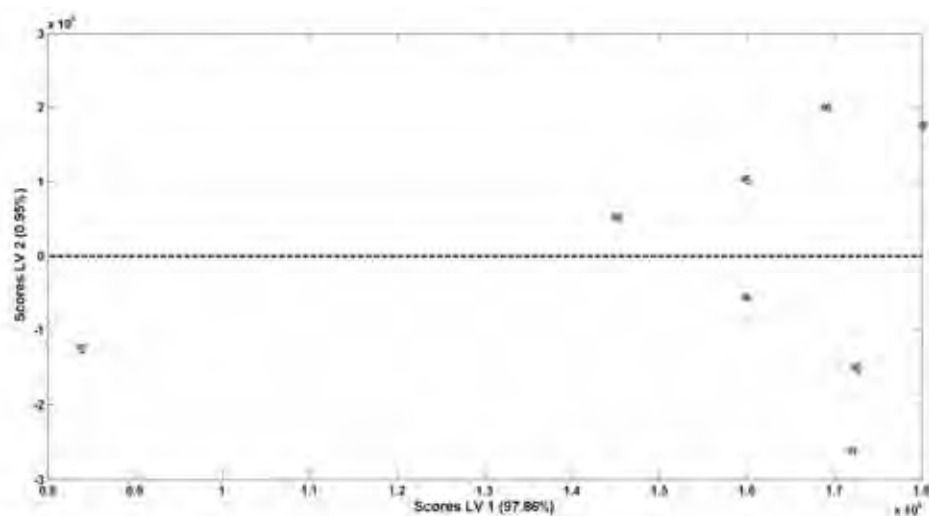


Figura 53. Scores do modelo PLS-DA

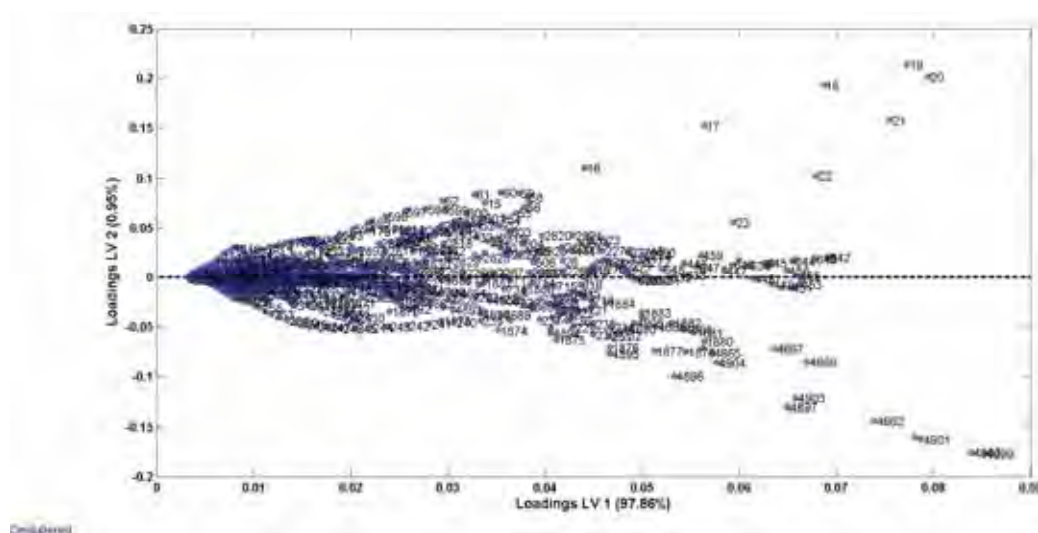


Figura 54. Loadings do modelo PLS-DA

O modelo PLS-DA, criado com as amostras de calibração, mostrou uma capacidade de previsão de 89,27% com duas variáveis latentes. Na etapa de validação, o modelo foi capaz de prever corretamente a origem de todas as amostras de validação (Figura 55 e 56).

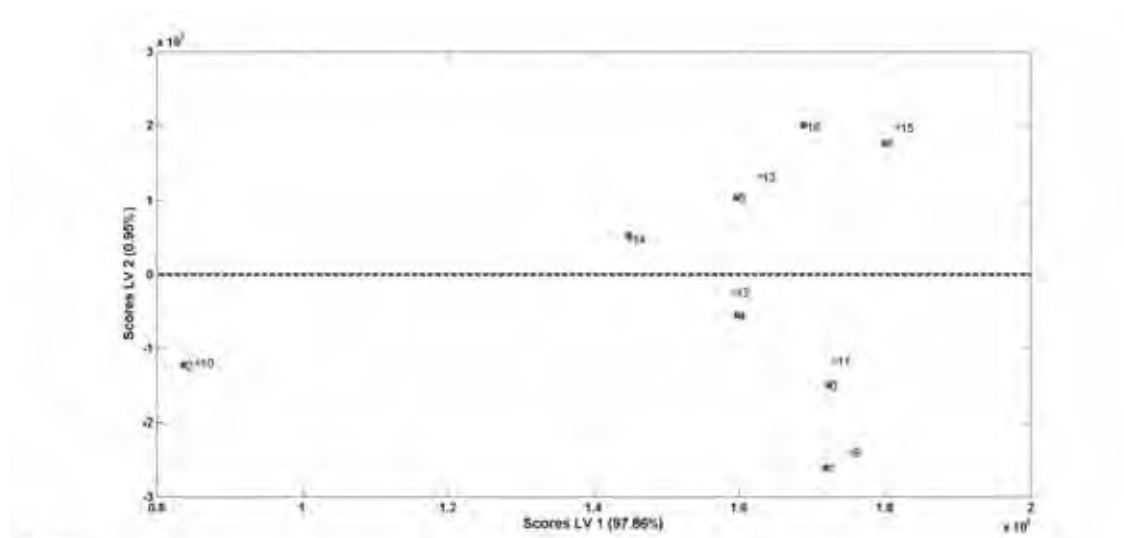


Figura 55. Valores previstos pelo modelo PLS-DA; ■ amostras de calibração; * amostras de validação.

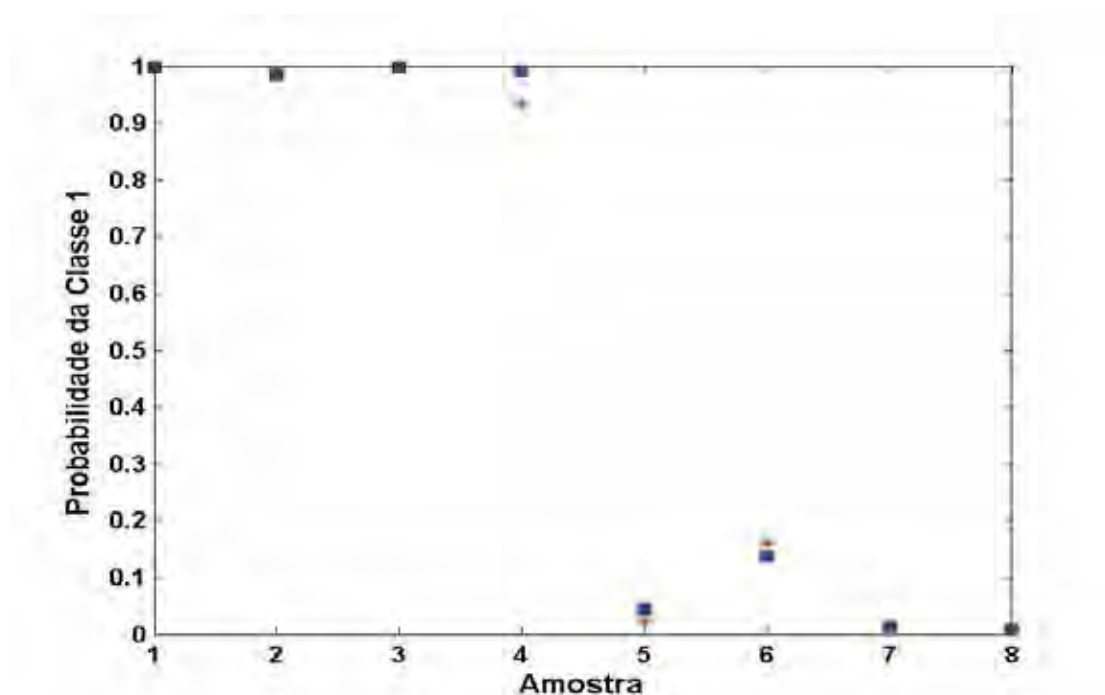


Figura 56. Probabilidade de classificação na classe 1; ■ amostras de calibração; * amostras de validação.

A partir do método PLS-DA foi possível construir modelos de classificação capazes de prever a classe absoluta de todas as amostras utilizadas para validação do método. Uma análise dos *scores* e *loadings* mostrou as principais variáveis responsáveis pela separação dos grupos. O método PLS-DA mostrou-se mais

eficiente que o método SIMCA na classificação de amostras cultivadas em diferentes condições de exposição ao CO₂.

Devido ao grande número de variáveis, a identificação daquelas que apresentam maior influência na separação das amostras torna-se difícil quando se utiliza o gráfico de *loadings* da primeira variável latente *versus* os *loadings* da segunda. Por este motivo, é conveniente a representação dos *loadings versus* variáveis, a qual pode ser diretamente relacionada com os sinais cromatográficos. Nesta representação, a intensidade dos sinais está diretamente relacionada com a influência da variável na separação dos grupos (Figura 57). Algumas variáveis aparentemente mais influentes na separação foram correlacionadas com os picos do cromatograma.

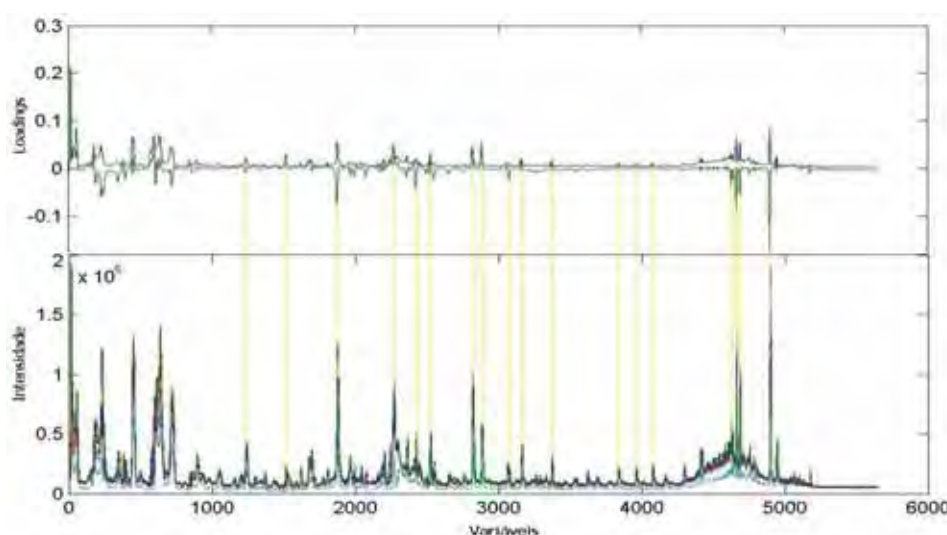


Figura 57. Sobreposição do gráfico de *loadings* X variáveis e dos cromatogramas alinhados e correlações entre sinais e picos.

Após a determinação das principais variáveis responsáveis pela separação entre os grupos, analisou-se os espectros no UV dos picos correspondentes, o que permitiu uma identificação preliminar das classes de substâncias em questão.

Os picos selecionados para análise dos UVs são mostrados na Figura 58 e os respectivos espectros são mostrados na Figura 59. Pode-se afirmar que as substâncias referentes aos picos 4, 5, 7, 8, 9, 10 e 11 apresentam bandas características de flavonóides, com máximos de absorção em torno de 270 e 350 nm.

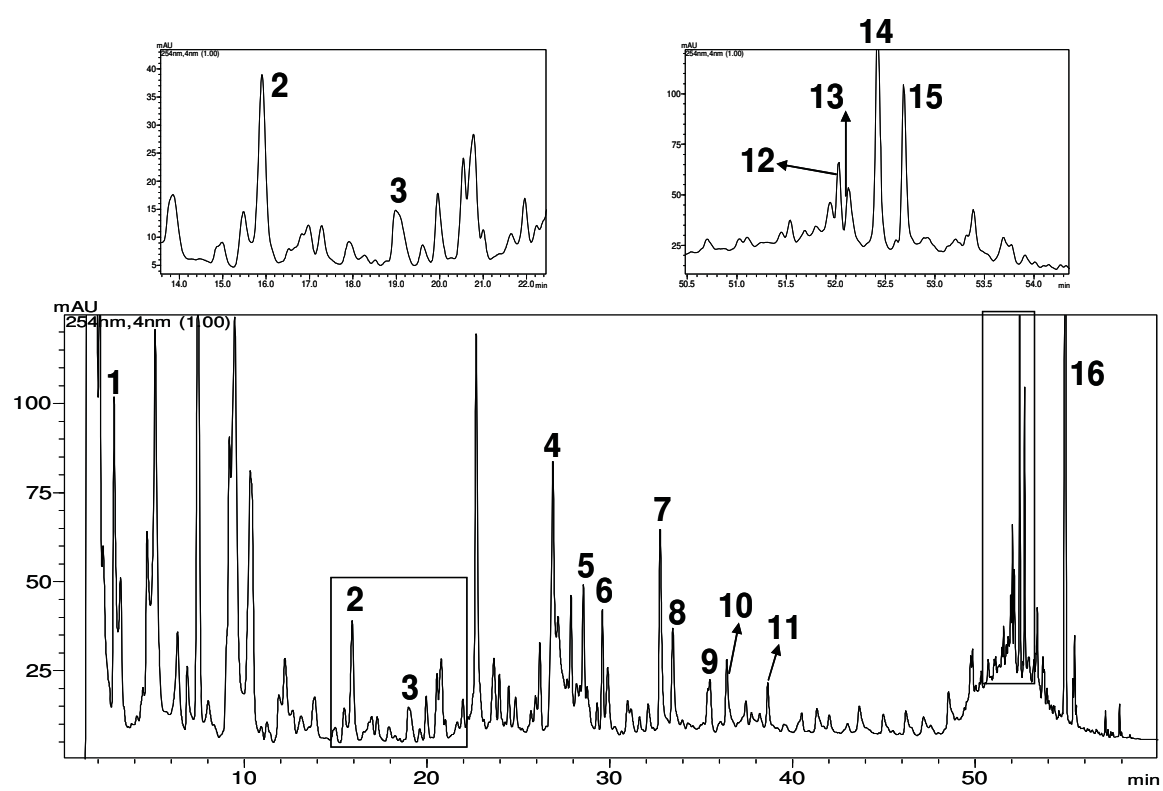


Figura 58. Cromatograma representativo das amostras; detecção a 254 nm. Principais picos responsáveis pela separação das amostras.

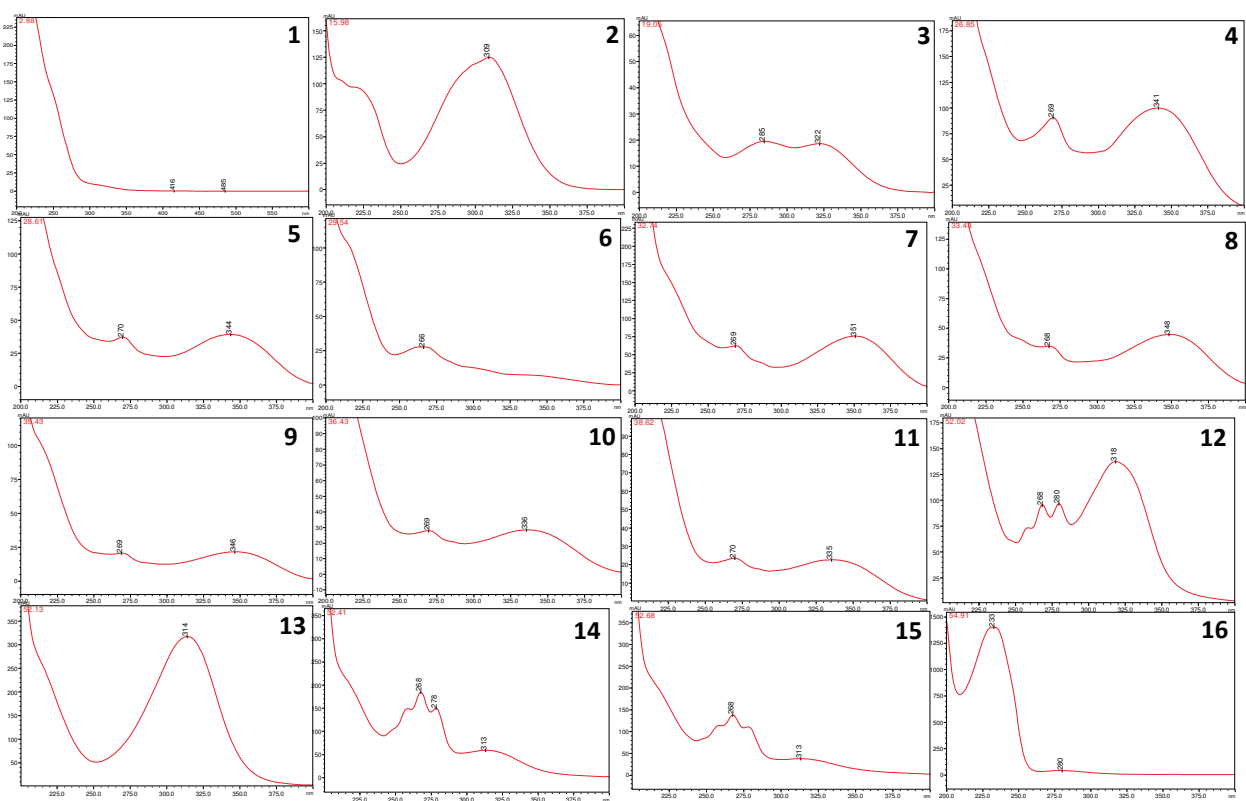


Figura 59. Espectros no UV dos picos selecionados no cromatograma.

5 CONCLUSÕES

O desenvolvimento do método utilizando planejamentos estatísticos mostrou-se eficiente, conduzindo a experimentos mais racionais e assim, reduzindo o número de experimentos. A eficiência do método cromatográfico foi aumentada significativamente a partir dos experimentos preliminares até a obtenção das condições de análise adotadas como ideais.

A coluna Kinetex mostrou-se bastante eficiente na análise de matrizes complexas, oferecendo maior número e melhor resolução de picos entre todas as colunas analisadas.

O método desenvolvido na presente dissertação de mestrado é válido no que diz respeito à repetibilidade no preparo de amostras, nas análises efetuadas no mesmo dia e em dias distintos. Os pequenos coeficientes de variação percentual se devem à complexidade da amostra e à variações intrínsecas ao equipamento.

Os testes preliminares em diferentes cultivares mostraram a aplicabilidade do método em questão e a possibilidade de comparar diferentes cultivares de cana-de-açúcar.

A amostra permaneceu estável durante o período estudado (8 dias) em diferentes condições de armazenagem – seca e resfriada, solubilizada e resfriada, solubilizada à temperatura ambiente, demonstrando que não existe a necessidade de análise imediatamente após o preparo, facilitando a preparação de várias amostras em batelada e subsequente uso de amostradores automáticos para análises cromatográficas.

Os testes preliminares utilizando RMN de ^1H demonstraram a abrangência das classes de metabólitos contemplados pelo processo de extração utilizado, permitindo a identificação de algumas classes de compostos já descritas no gênero *Saccharum*. A técnica de RMN mostrou-se bastante promissora para análises metabolômicas futuras.

A análise das amostras cultivadas sob condições simuladas de concentração de CO_2 atmosférico não apresentou diferenças visualmente significativas, porém, quando métodos multivariados de análise foram aplicados, foi possível verificar a diferença entre os grupos de amostras. Verificou-se também a separação das amostras dentro do mesmo grupo de cultivo (controle ou alto CO_2), de acordo com o tempo de colheita das

amostras, sendo que as amostras mais “velhas” (60 e 75 dias) separaram-se das amostras mais “novas” (30 e 45 dias).

A análise de componentes principais mostrou que as variáveis predominantemente responsáveis pela separação entre os grupos foram dois picos de tempos de retenção aproximadamente iguais a 3 e 54 min.

Os métodos de classificação SIMCA e PLS-DA confirmaram os resultados obtidos pela PCA mostrando previsão adequada para as amostras utilizadas na validação do modelo. Além disso, através dos gráficos de *loadings versus* variáveis, obtido através do PLS-DA, foi possível identificar mais variáveis influenciáveis na separação entre os grupos, relacionando-as diretamente com os picos no cromatograma.

Os espectros de absorção no UV permitiram uma identificação preliminar da classe de algumas substâncias que tiveram seu teor alterado pela elevada concentração de CO₂ atmosférico. Essas substâncias são referentes aos picos 4, 5, 7, 8, 9, 10 e 11, os quais apresentam bandas características de flavonóides, com máximos de absorção em torno de 270 e 350 nm. Outras técnicas serão necessárias para a identificação exata dos compostos.

6 PERSPECTIVAS PARA O ESTUDO METABOLÔMICO DE CULTIVARES DE CANA-DE-AÇÚCAR

O presente trabalho fundamenta-se no estabelecimento de um método analítico por HPLC-DAD para monitorar o perfil metabolômico de folhas de cana-de-açúcar. No mesmo contexto, outros estudos estão em andamento, visando o estabelecimento de métodos analíticos por GC-FID para avaliação dos metabólitos não analisáveis por HPLC (Paulo Roberto Ussoni Tomaz – mestrado e Alexander Alves da Silva – doutorado).

A etapa subsequente ao estabelecimento dos métodos deverá ser a identificação do maior número de picos cromatográficos detectados. Este trabalho está sendo desenvolvido por Ana Paula Dias da Silva – mestrado, a partir do isolamento e identificação de substâncias.

A aplicação dos métodos em diferentes cultivares e cultivares submetidos a diferentes condições de cultivo trará informações relevantes ao entendimento do metabolismo de cana-de-açúcar em função de fatores de

estresse bióticos e abióticos. Neste contexto, um trabalho já se encontra em fase inicial, sendo desenvolvido por Isabel Duarte Coutinho – doutorado.

Vale enfatizar que este trabalho é apenas uma parte de um projeto de pesquisa muito abrangente que objetiva o melhor entendimento do metabolismo micromolecular de cana-de-açúcar.

REFERÊNCIAS

AINSWORTH, E. A.; LONG, S. P. What have we learned from 15 years of free air – CO₂ enrichment (FACE)? A meta-analytic review of the responses of photosynthesis, canopy properties and plant production to risen CO₂. **New Phytologist**, v. 165, p. 351-372, 2005.

ALEXANDER, A. G. **Sugarcane physiology**: a comprehensive study of the *Saccharum* source-to-sink system. Amsterdam: Elsevier, 1973. 752 p.

ALLWOOD, J. W.; ELLIS, D. I.; GOODACRE, R. Metabolomic technologies and their application to the study of plants and plant-host interactions. **Physiologia Plantarum**, v.132, p.117-135, 2008.

ALMEIDA, A. A. de; SCARMINIO, I. S. Statistical mixture design optimization of extraction media and mobile phase compositions for the characterization of green tea. **Journal of Separation Science**, v. 30, p. 414-420, 2007.

ANDRADE, L. A. de B. Cultura da cana-de-açúcar. In: CARDOSO, M. das G. (Ed.). **Produção de aguardente de cana**. 2. ed. Lavras: Ed. UFLA, 2006. p. 25-67.

BALAKUMAR, T.; HANI, V.; VINCENT, B.; PALIWAL, K. On the interaction of UV-B radiation (280-315 nm) with water stress in crop plants. **Physiologia Plantarum**, v. 87, p. 217-22, 1993.

BANDEIRA, K. F. **Otimização e comparação de metodologia de extração de casearinas em *Casearia sylvestris***. 2004. 123 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2004.

BARBOZA, J. C. S.; SERRA, A. A. Ultra-som (I): influência do ultra-som na química. **Química Nova**, v. 15, p. 302-315, 1992.

BARKER, M.; RAYENS, W. Partial least square for discrimination. **Journal of Chemometrics**, v. 17, p.166-173, 2003.

BIDLINGMEYER, B. A. Gradient elution chromatography. In: _____. **Practical HPLC methodology and applications**. New York: Wiley, 1992. p. 284-317.

BRANDEN, K. V.; RUBERT, M. Robust classification in high dimensions based on the SIMCA method. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 79, p. 10-21, 2005.

BRERETON, R. G. Introduction to multivariate calibration in analytical chemistry. **The Analyst**, v. 125, p. 2125-2154, 2000.

BRERETON, R. G. **Chemometrics**: data analysis for the laboratory and chemical plant. Chichester: John Wiley & Sons, 2002. p.183-255.

BRUNS, R. E.; SCARMINIO, I. S.; BARROS NETO, B. **Como fazer experimentos**: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. Campinas: Ed. UNICAMP, 2001. 412 p.

BRUNS, R. E.; SCARMINIO, I. S.; BARROS NETO, B. **Statistical design – chemometrics**. Amsterdam: Elsevier, 2006. p. 313-340.

BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. **Biochemistry and molecular biology of plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologist, 2000. 1367 p.

CASU, R. E.; DIMMOCK, C. M.; CHAPMAN, S. C.; GROF, C. P. L.; McINTYRE, C. L.; BONNET, G. D.; MANNERS, J. M. Identification of differentially expressed transcripts from maturing stem of sugarcane by *in silico* analysis of stem expressed sequence tags and gene expression profiling. **Plant Molecular Biology**, v. 54, p. 503-517, 2004.

CHALKER-SCOT, L.; FUCHIGAMI, L. H. The role of phenolic compounds in plant stress responses. In: LI, P. H. (Ed.). **Low temperature stress physiology in crops**. Boca Raton: CRC Press, 1989. p. 67-79.

CLAYTON, W. D.; DANIELS, C. A geographical historical and cultural aspect of origin of the Indian and the Chinese sugarcane *S. barberi* and *S. sinensis*. **ISSCT Sugarcane Breed**, v. 36, p. 4-23, 1975.

CLOSE, D. C.; McARTHOR, C. Rethinking the role of many plant phenolics: protection from photodamage not herbivores? **OIKOS**, v. 99, p. 166-72, 2002.

COCHRAN, W. G.; COX, G. M. **Experimental designs**. 2nd ed. London: John Willey, 1957. 611 p.

COLMER, T. D.; CORRADINI, F.; CAWTHRAY, G. R.; MARINUS, O. L. Analysis of dimethylsulphoniopropionate (DMSP), betaines and other organic solutes in plant tissue extracts using HPLC. **Phytochemical Analysis**, v. 11, p. 163-168, 2000.

COLOMBO, R.; LANCAS, F. M.; YARIWAKE, J. H. Determination of flavonoids in cultivated sugarcane leaves, bagasse, juice and in transgenic sugarcane by liquid chromatography-UV detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1103, n.1, p. 118-124, 2006.

COLOMBO, R.; YARIWAKE, J. H.; McCULLAGH, M. Study of C- and O-glycosylflavones in sugarcane extracts using liquid chromatography-exact mass measurement mass spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, p. 483-490, 2008.

COLOMBO, R.; YARIWAKE, J. H.; QUEIROZ, E. F.; NDJOKO, K.; HOSTETTMANN, K. On-line identification of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) methoxyflavones by liquid chromatography-UV detection using post-column derivatization and liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1082, n. 1, p.51-59, 2005.

COLOMBO, R.; YARIWAKE, J. H.; QUEIROZ, E. F.; NDJOKO, K.; HOSTETTMANN, K. On-line identification of further flavone C- and O-glycosides from sugarcane (*Saccharum officinarum* L., Gramineae) by HPLC-UV-MS. **Phytochemical Analysis**, v. 17, n. 5, p. 337-343, 2006.

COLQUHOUN, I. J. Use of NMR for metabolic profiling in plant systems. **Journal of Pesticide Science**, v. 32, n. 7, p. 200-212, 2007.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University Press, 1981. 1262 p.

DANIELS, J.; ROACH, B. T. Taxonomy and evolution. In: HEINZ, D. J. (Ed.). **Sugarcane improvement through breeding**. Amsterdam: Elsevier, 1987. p. 7-84.

DE PASCALE, S.; MAGGIO, A.; FOGLIANO, V.; AMBROSINO, P.; RITIENI, A. Irrigation with saline water improves carotenoids content and antioxidant activity of tomato. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, v. 76, p. 447-53, 2001.

DIXON, R. A.; PAIVA, N. L. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. **Plant Cell**, v. 7, p. 1085-1097, 1995.

DOLAN, J. W.; SNYDER, L. R.; SAUNDERS, D. L.; VAN HEUKELEM, L. Simultaneous variation of temperature and gradient steepness for reversed-phase high-performance liquid chromatography method development: II. The use of further changes in conditions. **Journal of Chromatographic A**, v. 802, n. 1-2, p. 33-50, 1998.

DOLAN, J. W.; SNYDER, L. R.; DJORDJEVIC, N. M.; HILL, D. W.; WAEGHE, T. J. Reversed-phase liquid chromatography separation of complex samples by optimizing temperature and gradient time: I. Peak capacity limitations. **Journal of Chromatographic A**, v. 857, n. 1-2, p. 1-20, 1999.

DUARTE-ALMEIDA, J. M.; NEGRI, G.; SALATINO, A.; CARVALHO, J. E. de; LAJOLO, F. M. Antiproliferative and antioxidant activities of a tricin acylated glycoside from sugarcane (*Saccharum officinarum*) juice. **Phytochemistry**, v. 68, n. 8, p. 1165-1171, 2007.

DUARTE-ALMEIDA, J. M.; NOVOA, A. V.; LINARES, A. F.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Antioxidant activity of phenolics compounds from sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) juice. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 61, n. 4, p. 187-192, 2006.

DUNN, W. B.; ELLIS, D. I. Metabolomics: current analytical platforms and methodologies. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, n. 4, p. 285-294, 2005.

EILERS, P. H. C. Parametric time warping. **Analytical Chemistry**, v. 76, n. 2, p. 404-411, 2004.

ERIKSSON, L.; JOHANSSON, E.; KETTANEH-WOLD, N.; WIKSTROM, C.; WOLD, S. **Design of experiments, principles and applications**. Stockholm: Umetrics Academy, 2000. 329 p.

FALKENBERG, M. B.; SANTOS, R. I. dos; SIMÕES, C. M. Introdução à análise fitoquímica. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Ed. UFRGS, 2007. Cap. 10, p. 232-233.

FAN, X. H.; CHENG, Y. Y.; YE, Z. L.; LIN, R. C.; QIAN, Z. Z. Multiple chromatographic fingerprint and its application to the quality control of herbal medicines. **Analytica Chimica Acta**, n. 555, p. 217-224, 2006.

FERREIRA, M. M. C.; ANTUNES, A. M.; MELGO, M. S.; VOLPE, P. L. O. Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. **Química Nova**, v. 22, p. 724-731, 1999.

FIEHN, O.; KOPKA, J.; DORMANN, P.; ALTMANN, T.; TRETHEWEY, R. N.; WILLMITZER, L. Metabolite profiling for plant functional genomics. **Nature Biotechnology**, v. 18, p. 1157-1161, 2000.

FIGUEIREDO, P. Breve história da cana-de-açúcar e do papel do instituto agrônomo no seu estabelecimento no Brasil. In: DINARDO-MIRANDA, L. L.; VASCONCELOS, A. C. M. de; LANDELL, G. de A. (Ed.). **Cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Agrônomo, 2008. Cap. 1. p. 31-44.

FONTANIELLA, B.; VICENTE, C.; LEGAZ, M. E.; DE ARMAS, R.; RODRIGUEZ, C. W.; MARTINEZ, M.; PIÑON, D.; ACEVEDO, R.; SOLAS, M. T. Yellow leaf syndrome modifies the composition of sugarcane juices in polysaccharides, phenols and polyamines. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 41, p. 1027-1036, 2003.

FOOT, J. P.; CAPORN, S. J. M.; LEE, J. A.; ASHENDEN, T. W. The effect of long-term ozone fumigation on the growth, physiology and frost sensitivity of *Calluna vulgaris*. **New Phytologist**, v. 133, p. 503-511, 1996.

FRANCA, S. C.; ROBERTO, P. G.; MARINS, M. A.; PUGA, R. D.; RODRIGUES, A.; PEREIRA, J. O. Biosynthesis of secondary metabolites in sugarcane. **Genetics and Molecular Biology**, v. 24, p. 243-250, 2001.

GALDÁMEZ, E. V. C. **Aplicação das técnicas e planejamento de análise de experimentos na melhoria da qualidade de fabricação de produtos plásticos**. 2002. 133 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção) – Escola de Engenharia, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2002.

GALERA, M. M.; GIL GARCIA, M. D.; CULZONI, M. J.; GOICOECHEA, H. C. Determination of pharmaceuticals in river water by column switching of large sample volumes and liquid chromatography–diode array detection, assisted by chemometrics: an integrated approach to green analytical methodologies. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 13, p. 2042-2049, 2010.

GAMBÁ, H. R.; GERMANO, S.; MINERVI, E. Revisão do uso da fonoforese na absorção de fármacos. **Bio Farma: Revista Técnico Científica de Farmácia, Bioquímica e Análises Clínicas e Toxicológicas**, v. 1, p. 64-69, 2006.

GELADI, P.; GRAHN, H. **Multivariate image analysis**. Chichester: John Wiley & Sons. 1996. 316 p.

GLASSOP, D.; ROESSNER, U.; BACIC, A.; BONNETT, G. D. Changes in the sugarcane metabolome with stem development. Are they related to sucrose accumulation? **Plant and Cell Physiology**, v. 48, n. 4, p. 573-584, 2007.

GOLDEMBERG, J. Ethanol for a sustainable energy future. **Science**, v. 315, p. 808-810, 2007.

GUO, F.; HUANG, L.; ZHOU, H.; JIANG, Q. Extraction optimization of coumarins from radix angelicae pubescentis by HPLC-DAD coupled with uniform design. **Journal of Central South University of Technology**, v. 13, n. 2, p. 156-159, 2006.

GUY, C.; KOPKA, J.; MORITZ, T. Plant metabolomics coming of age. **Physiologia Plantarum**, v. 132, p. 113-116, 2008.

GYGI, S. P.; ROCHON, Y.; FRANZA, B. R.; AEBERSOLD, R. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. **Molecular and Cellular Biology**, v. 19, p. 1720-1730, 1999.

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

HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v. 55, p. 481-504, 2000.

HAVAUX, M. Carotenoids as membrane stabilizers in chloroplasts. **Trend in Plant Science**, v. 3, p. 147-151, 1998.

HOARAU, J. Y.; OFFMANN, B.; D'HONT, A.; RISTERUCCI, A. M.; ROQUES, D.; GLASZMANN, J. C.; GRIVET, L. Genetic dissection of a modern sugarcane cultivar (*Saccharum* spp.). I. Genome mapping with AFLP markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 103, p. 84-97, 2001.

IACOPINI, P.; BALDI, M.; STORCHI, P.; SEBASTIANI, L. Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: content, *in vitro* antioxidant activity and interactions. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, n. 8, p. 589-598, 2008.

JI, Y.-B.; XU, Q.-S.; HU, Y.-Z.; HEYDEN, Y. V. Development, optimization and validation of a fingerprint of Ginkgo biloba extracts by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, n. 1066, n. 1/2, p. 97-104, 2005.

JUAN, A.; TAULER, R. Multivariate curve resolution (MCR) from 2000: progress in concepts and applications. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 36, p. 163-176, 2006.

KIM, H. K.; VEERPORTE, R. Sample preparation for plant metabolomics. **Phytochemical Analysis**, v. 21, p. 4-13, 2009.

KIRKLAND, J. J.; BOYES, B. E.; DESTEFANO, J. J. Changing band spacing in reversed-phase HPLC: a technique for varying column stationary-phase selectivity. **American Laboratory**, v. 26, p. 36-42, 1994.

KROL, M.; GRAY, G. R.; HURRY, V. M.; O'QUIST, G.; MALEK, L.; HUNER, N. P. A. Low-temperature stress and photoperiod affect an increased tolerance to photoinhibition in *Pinus banksiana* seedlings. **Canadian Journal of Botany**, v. 73, p. 1119-1127, 1995.

KUMAR, N.; NARAYANASWAMY, R. Studies of amino acids in redrot disease infected sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) by HPLC. **Asian Journal of Chemistry**, v. 18, p. 1512-1514, 2006.

LEAL, E. R.; RODRÍGUEZ-VÁSQUEZ, R.; GALINDO, T. Separation of phenolic compounds from sugarcane bagasse pith and their determination by HPLC. **Journal of Wood Chemistry and Technology**, v. 14, p. 369-382, 1994.

LEHNINGER, A. L. **Bioquímica**: biossíntese e a utilização da energia das ligações de fosfato. São Paulo: Edgard Blücher, 2006. v. 3, 596 p.

LI, X.; YAO, S.; TU, B.; LI, X.; JIA, C.; SONG, H. Determination and comparison of flavonoids and anthocyanins in Chinese sugarcane tips, stems, roots and leaves. **Journal of Separation Science**, v. 33, n. 9, p. 1216-1223, 2010.

LIANG, Y. Z.; XIE, P.; CHAN, K. Quality control of herbal medicines. **Journal of Chromatography B**, v. 812, n. 1/2, p. 53-70, 2004.

LIST, P. H.; SCHIMIDT, P. C. **Phytopharmaceutical technology**. Boston: CRC Press, 1989. 374 p.

MACEDO, C. I. (Org.). **A energia da cana-de-açúcar**: doze estudos sobre a agroindústria da cana-de-açúcar no Brasil e a sua sustentabilidade. São Paulo: Berlendis & Vertecchia, 2005. 245 p.

MASSART, D. L.; VANDEGINSTE, B. G. M.; DEMING, S. N.; MICHOTTE, Y.; KAUFMAN, L. **Chemometrics**: a textbook. (Data handling in science and technology). Amsterdam: Elsevier Science, 1988. 500 p.

MATOS, G. D.; PEREIRA FILHO, E. R.; POPPI, R. J.; ARRUDA, M. A. Z. Análise exploratória em química analítica com emprego de quimiometria: PCA e PCA de imagens. **Revista Analytica**, v. 6, p. 38-50, 2003.

McGHIE, T. K. Analysis of sugarcane flavonoids by capillary zone electrophoresis. **Journal of Chromatography**, v. 634, n. 1, p. 107-112, 1993.

- MENDEZ, M.; JONES, D. G.; MANETAS, Y. Enhanced UV-B radiation under field conditions increases anthocyanin and reduces the risk of photoinhibition but does not affect growth in the carnivorous plant *Pinguicula vulgaris*. **New Phytologist**, v. 144, p. 275-282, 1999.
- NIELSEN, N. P. V.; CARSTENSEN, J. M.; SMEDSGAARD, J. Aligning of single and multiple wavelength chromatographic profiles for chemometric data analysis using correlation optimized warping. **Journal of Chromatography A**, v. 805, n. 1/2, p. 17-35, 1998.
- NOWAK, R. S.; ELLSWORTH, D. S.; SMITH, S. D. Functional response of plants to elevated atmospheric CO₂ – due photosynthetic and productivity data from FACE experiments support early predictions. **New Phytologist**, v. 162, p. 253-280, 2004.
- OTTO, M. **Chemometrics**: statistics and computer application in analytical chemistry. Weinheim: Wiley, 1999. 343 p.
- POORTER, H. The effect of an elevated atmospheric carbon dioxide concentration on growth, photosynthesis and respiration of *Plantago major*. **Physiologia Plantarum**, v. 73, n. 4, p. 553-559, 1988.
- PRAVDOVA, V.; WALCZAK, B.; MASSART, D. L. A comparison of two algorithms for warping of analytical signals. **Analytica Chimica Acta**, v. 456, p. 77-92, 2002.
- RAAMSDONK, L. M.; TEUSINK, B.; BROADHURST, D.; ZHANG, N. S.; HAYES, A.; WALSH, M. C.; BERDEN, J. A.; BRINDLE, K. M.; KELL, D. B.; ROWLAND, J. J.; WESTERHO, H. V.; VANDAM, K.; OLIVER, S. G. A functional genomics strategy that uses metabolome data to reveal the phenotype of silent mutations. **Nature Biotechnology**, v. 19, p. 45-50, 2001.
- RAJENDRAN, L.; RAVISHANKAR, G. A.; VENKATARAMAN, L. V.; PRATHIBA, K. R. Anthocyanin production in callus cultures of *Daucus carota* as influence by nutrient stress and osmoticum. **Biotechnology Letters**, v. 14, p. 707-712, 1992.
- ROCHA, L. G.; ARAGÃO, C. F. S.; LOIOLA, M. I. B.; BEZERRIL, R. A.; PAIVA, N. R. F.; HOLANDA, C. M. C. X.; BRITO, M. E. F. Evaluation of the leishmanicide action of ethanol extracts of *Crotalaria retusa* L. (Fabaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 51-56, 2009.
- RODRÍGUEZ, C. W.; DE ARMAS, R.; VICENTE, C.; LEGAZ, M. R. Changes in free and conjugated polyamines during starvation of sugarcane juices as analyzed by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 881, p. 531-541, 2000.

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

ROTT, P.; MOHAMED, I. S.; KLETT, P.; SOUPA, D.; SAINT-ALBIM, A.; FELDMANN, P.; LETOURMY, P. Resistance to leaf scald disease is associated with limited colonization of sugarcane and wild relatives by *Xanthomonas albilineans*. **Phytopathology**, v. 87, p. 1202-1213, 1997.

SABIN, G. P.; MARÇO, P. H.; GODOY JUNIOR, L. A. F. de; AUGUSTO, F.; POPPI, R. J. An alternative algorithm for alignment of two-dimensional comprehensive gas chromatography. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON CHEMOMETRICS IN ANALYTICAL CHEMISTRY, 12th, 2010, Antwerpen. **Abstracts...** Antwerpen: [s. n.], 2010. p. 257.

SCHINOR, E. C.; SALVADOR, M. J.; TURATTI, I. C. C.; ZUCCHI, O. L. A. D.; DIAS, D. A. Comparison of classical and ultrasound-assisted extractions of steroids and triterpenoids from three *Chresta* ssp. **Ultrasonic Sonochemistry**, v.11, p. 415-421, 2004.

SCHOEFS, B.; BERTRAND, M. Chlorophyll biosynthesis - a review. In: PESSARAKLI, M. (Ed.). **Handbook of photosynthesis**. 2nd ed. Boca Raton: Taylor and Francis, 2005. 928 p.

SGHERRI, C.; STEVANOVIC, B.; NAVARI-IZZO, F. Role of phenolics in the antioxidative status of the resurrection plant *Ramonda serbica* during dehydration and rehydration. **Physiologia Plantarum**, v. 122, p. 478-488, 2004.

SMITH, P.; PATON, N. H. Sugarcane flavonoids. **Sugar Technology Reviews**, v. 12, n. 2-3, p. 117-142, 1985.

SNYDER, L. R.; DOLAN, J. W. Initial experiments in high-performance liquid chromatography method development. I. Use of a starting gradient run. **Journal of Chromatography A**, v. 721, p. 3-14, 1996.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W. **Introduction to modern liquid chromatography**. 3rd ed. New York: John Wiley & Sons, 2010. 912 p.

SOLOMONS, S.; QIN, D.; MANNING, M.; CHEN, Z.; MARQUIS, M.; AVERYT, K. B.; TIGNOR, M.; MILLER, H. L. (Ed.). Understanding and attributing climate change. In: _____. **Climate change 2007: the physical science bases** contribution of working groups I to the fourth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge: Cambridge University Press, 2007. Cap. 9, p. 665-745.

SONG, J.; LIU, C.; LI, D.; JIN, B. Optimization of cordycepin extraction from cultured *Cordyceps militaris* by HPLC-DAD coupled with uniform design. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 82, n. 12, p. 1122-1126, 2007.

SOUZA, A. P.; GASPAR, M.; SILVA, E. A.; ULIAN, E. C.; WACLAWOVSKY, A. J.; NISHIYAMA, M. Y. Jr.; SANTOS, R. V.; TEIXEIRA, M. M.; SOUZA, G. M.; BUCKERIDGE, M. S. Elevated CO₂ increases photosynthesis, biomass and productivity, and modifies gene expression in sugarcane. **Plant, Cell and Environment**, v. 31, p. 1116-1127, 2008.

TAQUEDA, M. E. S.; COSTA, C. M. L.; FARIA, L. J. G. Planejamento e análise estatística de experimentos aplicados ao beneficiamento de produtos naturais. In: COSTA, C. M. L.; FARIA, L. J. G. **Tópicos especiais em tecnologia de produtos naturais**. Belém: Ed. UFPA, 1998. p. 205-219.

TSAO, R.; YANG, R. Optimization of a new mobile phase to know the complex and real polyphenolic composition: towards a total phenolic index using high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1018, n. 1, p. 29-40, 2003.

UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR. **Dados e cotações**. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/dadosCotacao/estatistica/>>. Acesso em: 10 mar. 2011.

UYSAL, U. D.; ATURKI, Z.; RAGGI, M. A.; FANALI, S. Separation of catechins and methylxanthines in tea samples by capillary electrochromatography. **Journal of Separation Science**, v. 32, n. 7, p. 1002-1010, 2009.

VAN DILLEWIJN, C. **Botany of sugarcane**. Waltham: Mass, 1952. 371 p.

VERPOORTE, R.; CHOI, Y. H.; KIM, H. K. NMR-based metabolomics at work in phytochemistry. **Phytochemistry Reviews**, v. 6, p. 3-14, 2007.

VERPOORTE, R.; CHOI, Y. H.; MUSTAFA, N. R.; KIM, H. K. Metabolomics: back to basics. **Phytochemistry Reviews**, v. 7, n. 3, p. 525-537, 2008.

VINATORU, M. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 8, n. 25, p. 303-313, 2001.

WAHID, A. Physiological implications of metabolite biosynthesis for net assimilation and heat-stress tolerance of sugarcane (*Saccharum officinarum*) sprouts. **Journal of Plant Research**, v. 120, n. 2, p. 219-228, 2007.

WAHID, A.; GHAZANFAR, A. Possible involvement of some secondary metabolites in salt tolerance of sugarcane. **Journal of Plant Physiology**, v. 163, p. 723-730, 2006.

WOLD, S.; ESBENSEN, K.; GELADI, P. Principal component analysis. In: KVALHEIM, O. M. (Ed.). **Proceedings of the multivariate statistical workshop for geologists and geochemists**. Amsterdam: Elsevier, 1987. p. 37-52.

XU, C. J.; LIANG, Y. Z.; CHAU, F. T.; HEYDEN, Y. V. Pretreatments of chromatographic fingerprints for quality control of herbal medicines. **Journal of Chromatography A**, v. 1134, n.1/2, p. 253-259, 2006.

ANEXOS

Anexo 1. Valores de F ao nível de 95% de confiança.

		V1									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
V2	1	161,4	199,5	215,7	224,6	230,2	234	236,8	238,9	240,5	241,9
	2	18,51	19	19,16	19,25	19,3	19,33	19,35	19,37	19,38	19,4
	3	10,13	9,55	9,28	9,12	9,01	8,94	8,89	8,85	8,81	8,79
	4	7,71	6,94	6,59	6,39	6,26	6,16	6,09	6,04	6	5,96
	5	6,61	5,79	5,41	5,19	5,05	4,95	4,88	4,82	4,77	4,74
	6	5,99	5,14	4,76	4,53	4,39	4,28	4,21	4,15	4,1	4,06
	7	5,59	4,74	4,35	4,12	3,97	3,87	3,79	3,73	3,68	3,64
	8	5,32	4,46	4,07	3,84	3,69	3,58	3,5	3,44	3,39	3,35
	9	5,12	4,26	3,86	3,63	3,48	3,37	3,29	3,23	3,18	3,14
	10	4,96	4,1	3,71	3,48	3,33	3,22	3,14	3,07	3,02	2,98