

PAULO ROBERTO USSONI TOMAZ

**Desenvolvimento e validação de método de análise por
cromatografia gasosa para metabólitos polares de folhas de cana-
de-açúcar e aplicação na avaliação da influência do teor de CO₂
atmosférico na composição de metabólitos polares de cana-de-
açúcar**

Orientador: Prof. Dr. Alberto José Cavaleiro

Araraquara
2011

PAULO ROBERTO USSONI TOMAZ

**Desenvolvimento e validação de método de análise por
cromatografia gasosa para metabólitos polares de folhas de cana-
de-açúcar e aplicação na avaliação da influência do teor de CO₂
atmosférico na composição de metabólitos polares 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

Araraquara
2011

FICHA CATALOGRÁFICA

T655d Tomaz, Paulo Roberto Ussoni
Desenvolvimento e validação de método de análise por cromatografia gasosa para metabólitos polares de folhas de cana-de-açúcar e aplicação na avaliação da influência do teor de CO₂ atmosférico na composição de metabólitos polares de cana-de-açúcar / Paulo Roberto Ussoni Tomaz. – Araraquara : [s.n], 2011
122 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Alberto José Cavalheiro

1. Produtos naturais. 2. Cana-de-açúcar . 3. Metaboloma.
I. Título.

PAULO ROBERTO USSONI TOMAZ

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

Araraquara, 15 de julho de 2011.

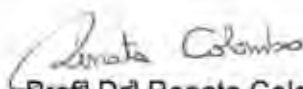
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Alberto José Cavalcheiro (Orientador)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Prof. Dr. Antônio Eduardo Miller Crotti
Universidade de Franca – UNIFRAN, Franca



Prof.ª Dr.ª Renata Colombo
Universidade do Estado de Minas Gerais – UEMG, Frutal

Dedicatória

Dedico esta dissertação aos meus pais PAULO e NATALINA, que com sua simplicidade e amor me educaram para tornar-me a pessoa que sou hoje. Tenho em vocês meu porto seguro e exemplo de vida a ser seguido.

Agradecimentos

- Agradeço primeiramente a Deus, por me dar saúde para vencer mais uma etapa de minha vida;

- Agradeço à minha família (pai, mãe e Laís) por todo amor, carinho, apoio e compreensão em todas as dificuldades. Pelos inúmeros conselhos, tomadas de decisões e por que não, ordens a mim dadas. Agradeço à ultrapassagem de vários obstáculos que vencemos e aprendemos a conviver juntos.

- Agradeço minha namorada Lahys que em todos os momentos esteve ao meu lado como meu porto seguro, minha companheira, amiga, confidente e amor da minha vida.

- Agradeço ao Prof. Dr. Alberto José Cavalheiro, pela orientação, dedicação, incentivo e amizade.

- Agradeço à família Ussoni (tio Luiz, Tia Rose, Mica e Jô) pelo apoio que recebi todos esses anos e principalmente pela estadia de 6 meses (pelo menos oficialmente). Pela família Rezende (tio Adão, tia Tuca, Daiane, Mirtão, Digo e Paula) pelos cuidados, companhia, roupas, pescarias.

- Agradeço a todos os amigos que conquistei nesses quatro anos. São muitos, mas existem alguns que devem aparecer por aqui: Boi, Tina, Dani, Emerson, Lucas, Gabriel.

- Agradeço a todos os membros das repúblicas Vai Venu e Kiquintus que fizeram parte dessa etapa de minha vida.

- Agradeço a todos os membros e professores do NuBBE em especial os que me auxiliaram dentro desse trabalho pelo apoio e ensinamentos. Gabriel, Isabel principalmente.

- Deixo aqui registrado o meu agradecimento à FAPESP pela bolsa concedida para o desenvolvimento do projeto de mestrado (Processo: 2009/04601-3).

Para alcançar conhecimento, adicione coisas todo dia. Para alcançar
sabedoria, elimine coisas todo dia.
Lao Tsé

RESUMO

Metabolômica é uma abordagem promissora para o estudo global dos processos ecofisiológicos, monitorando através de técnicas analíticas de alto desempenho o maior número possível de metabólitos micromoleculares de vários órgãos e tecidos de um organismo. Poucos estudos metabolômicos foram desenvolvidos com cana-de-açúcar (*Saccharum* spp), especialmente no Brasil. Nessa abordagem é de suma importância o desenvolvimento e/ou implantação de métodos analíticos robustos para o estudo de ampla gama de metabólitos de um organismo, tanto primários quanto secundários, e sua aplicação no sentido de contribuir para o entendimento a nível molecular dos processos ecofisiológicos desse vegetal. Neste trabalho foi feita a otimização das condições de extração e cromatográficas por CG-FID para análise de metabólitos polares em folhas. Para tal foi utilizado o cultivar RB3280. Posterior à sua implantação, o método foi utilizado para análise do perfil metabólico de folhas de cana-de-açúcar, durante seu crescimento, em condições climáticas simuladas de alta concentração de CO₂ (720 ppm). O método desenvolvido consiste na extração de folhas de cana-de-açúcar com água contendo ribitol como padrão interno, derivação através de metoximação e trimetilsililação e subsequente análise por GC-FID utilizando coluna DB-05 e programação de temperatura de 70° C a 290° C, a uma taxa de incremento de 5° C.min⁻¹. Nessas condições é possível observar cerca de 200 picos cromatográficos. A identificação dos constituintes da amostra através da comparação de índices de retenção, espectros de massas (GC-MS) e busca em bancos metabolômicos disponíveis *on line*, culminou na identificação de 50 substâncias. No experimento de cultivo sob condição atmosférica controlada foi verificado tendência de aumento de monossacarídeos nas plantas cultivadas sob 750 ppm de CO₂, e diminuição de um constituinte ainda não identificado.

ABSTRACT

Metabolomics is a promising approach to the study of global ecophysiology, monitoring through high-performance analytical techniques as many small molecules for metabolites of various organs and tissues of an organism. Few studies have been developed metabolomics with sugar cane (*Saccharum* spp), especially in Brazil. This approach is of paramount importance to develop and / or deployment of robust analytical methods for studying a wide range of metabolites in an organism, both primary and secondary, and their application in order to contribute to the understanding of the processes at the molecular level of ecophysiological plant. This work was made master of the optimization of extraction and chromatographic conditions for GC-FID for analysis of polar metabolites in leaves. For this was used to cultivate RB3280. After its implementation, the method was used to analyze the metabolic profiles of leaves of sugar cane during its growth in simulated climatic conditions of high CO₂ concentration (720 ppm). The method consists of extracting the leaves of cane sugar with water containing Ribitol as internal standard, and lead through methoximation trimethylsilylation and subsequent analysis by GC-FID using DB-5 column and temperature programming from 70 °C to 290 °C at a rate of 5 °C min⁻¹ increase. Under these conditions it is possible to observe approximately 200 chromatographic peaks. The identification of the sample by comparing retention indices, mass spectra (GC-MS) metabolomics and search available online banks, resulted in the identification of 50 substances. In the experiment of cultivation under controlled atmospheric conditions was observed increasing trend of monosaccharides in plants grown under 750 ppm CO₂, and a decrease of constituent not identified yet.

Índice de Figuras

Figura 1. Artigos científicos publicados entre 1999 e 2009 com o tema envolvendo Metabolômica.	20
Figura 2. Efeito do aumento no nível de luminosidade sobre a fotossíntese líquida de plantas C3 e C4.	26
Figura 3. Aspecto geral das plantas de cana-de-açúcar cultivadas em câmaras de topo aberto com controle do teor de CO ₂ (A); comparação entre as plantas cultivadas sob CO ₂ ambiente (390 ppm) com sob alto teor de CO ₂ (750 ppm) (B); detalhe dos colmos (C) após 75 dias de cultivo (esquerda CO ₂ normal e direita alto CO ₂). 29	
Figura 4. Mecanismo para reação de formação da oxima.....	33
Figura 5. Mecanismo de formação do derivado de TMS. Exemplo de sililação de uma hexose.	34
Figura 6. Planejamento Simplex Centróide para análise da influência da proporção dos solventes na extração.....	35
Figura 7. Sistema de numeração das folhas de cana-de-açúcar estabelecido por Kuijper.....	48
Figura 8. Perfil cromatográfico das diferentes condições de extração geradas a partir do planejamento Simplex Centróide. Amostras: folha de cana-de-açúcar cultivar RB3280.....	51
Figura 9. Cromatograma do extrato de folhas de cana-de-açúcar (cultivar RB3280) obtido com água (condição 2), e que apresentou o maior número de picos cromatográficos dentre as 10 condições de extração testadas. Detalhe do Simplex Centróide.	52
Figura 10. Superfície de resposta do modelo Simplex Centróide com equação quadrática utilizando os seguintes solventes: isopropanol (IPA), etanol (EtOH) e água. Os círculos vazios indicam os pontos experimentais.	52
Figura 11. Avaliação dos efeitos principais para o planejamento experimental	56
Figura 12. Perfil cromatográfico referente às extrações consecutivas das amostras de folha de cana de açúcar. Cromatogramas em preto = primeira extração, vermelho = segunda extração, azul = terceira extração, rosa = quarta extração e verde = quinta extração.....	59

Figura 13. Relação entre o número de extrações consecutivas com a área total de cada cromatograma e a área acumulada dos cromatogramas.....	60
Figura 14. Cromatogramas sobrepostos, referentes às extrações sucessivas. A região em destaque melhora a visualização.....	60
Figura 15. Diferentes condições cromatográficas testadas. (A) = condição inicial, com rampa de 70 a 290° C, a 5° C/min e split 1:25; (B) Condição anterior e split 1:250, (C) = nova rampa de 57,73 minutos (70° C por 5 minutos – 5° C/min – até 185° C – 3° C/min – até 213° C - 5° C/min - até 290° C por 5 minutos e (D) = rampa de 75 minutos (70° C por 5 minutos – 5° C/min – até 145° C – 2° C/min – até 200° C - 4° C/min - até 290° C por 5 minutos).	61
Figura 16. Rampas de temperatura estudadas na otimização das condições cromatográficas. Cromatogramas na fig. 15.	62
Figura 17. Cromatogramas obtidos com diferentes temperaturas iniciais de rampa de aquecimento do GC-FID. 70, 80, 90, 100° C respectivamente. Amostra: apenas reagentes e solventes, sem extrato vegetal.....	63
Figura 18. Rampa de aquecimento IV. 100° C por 5 minutos - 5° C/min – até 145° C – 2° C/min – até 200° C - 4° C/min - até 290° C por 10 minutos.....	63
Figura 19. I- Cromatograma obtido por Gabriel M. Leme em seu trabalho de mestrado por HPLC-DAD para metabólitos secundários, do extrato hidro-alcoólico de folhas de cana-de-açúcar cultivar RB3280; II- Cromatograma obtido por HPLC do extrato aquoso de folhas, sem derivatização; III- Cromatograma obtido por GC-FID do extrato aquoso de folhas, após derivatização, na condição cromatográfica otimizada para metabólitos primários.....	65
Figura 20. Cromatogramas obtidos para análises da incerteza da medição. De cima para baixo: solvente hexano, branco da amostra e branco da amostra com padrão interno (ribitol sililado).	67
Figura 21. Cromatogramas obtidos via GC-MS dos padrões de monossacarídeos. arabinose, frutose, galactose, glicose, manose, ribose e xilose. Todos foram devidamente metoximados e a seguir trimetilsililados.....	72
Figura 22. Cromatogramas obtidos via GC-MS para análise do perfil e do tempo de retenção de cada um dos ácidos orgânicos, injetados separadamente. De cima para baixo, ácido ascórbico, ácido malônico, ácido quínico, ácido málico e ácido cítrico trimetilsililados.	73

Figura 23. Ampliação dos cromatogramas dos padrões de açúcares – (a) xilose, arabinose e ribose; (b) frutose, manose, galactose e glicose. Todos foram devidamente derivados com o trimetilsilil.	73
Figura 24. Cromatograma obtidos via CG-MS do padrão arabinose-1MEOX-4TMS, seu espectro de massas e os espectros obtidos da literatura e o experimental (folha de cana-de-açúcar cultivar RB3280) respectivamente.....	76
Figura 25. Prováveis estruturas das fragmentações correspondentes à arabinose	77
Figura 26. Cromatograma obtidos via CG-MS do padrão ácido quínico 5TMS, seu espectro de massas e os espectros obtidos da literatura e o experimental (folha de cana-de-açúcar cultivar RB3280) respectivamente.	78
Figura 27. Prováveis estruturas das fragmentações correspondentes ao ácido quínico derivado.....	78
Figura 28. Espectros de massas da Isoleucina 2TMS da literatura e o obtido durante os estudos respectivamente.	79
Figura 29. Cromatogramas obtidos via GC-FID 2D. Perfil apresentado em ¹ D.82	
Figura 30. Diagrama tridimensional. Branco, RB3280, Açúcares e Aminoácidos.83	
Figura 31. Diagrama de cores. Zoom da amostra comparativamente com o padrão de açúcar.	83
Figura 32. Diagrama de cores. Zoom da amostra comparativamente com o padrão de aminoácidos.	84
Figura 33. Perfil cromatográficos semelhantes dos cultivares RB3280 e SP80-3280 respectivamente.....	85
Figura 34. Cromatogramas sobrepostos e alinhados nas 8 condições diferentes de cultivo.....	88
Figura 35. Análise de componentes principais (PC1 x PC2) envolvendo as 16 amostras de folhas de cana obtidas em experimento de cultivo com atmosfera controlada, sendo: 1/2,3/4, 5/6 e 7/8 amostras a 390 ppm de CO ₂ , em duplicata, com 30, 45, 60 e 90 dias de idade, respectivamente; 9/10, 11/12/13/14 e 15/16 amostras em 750 ppm de CO ₂ , com 30, 45, 60 e 90 dias de idade, respectivamente.	89
Figura 36. Gráfico de variáveis x loadings para a análise de componentes principais das 16 amostras de folhas de cana.....	89

Figura 37. Gráfico de tendências, demonstrando a variação na área dos principais picos cromatográficas, alguns preliminarmente identificados, em função da idade da planta e do nível de CO₂ atmosférico. Cada ponto é a média das duas replicatas.

..... 92

Índice de Tabelas

Tabela 1 comparação entre os diferentes métodos analíticos baseados usados em análises metabolômicas (Xu et al 2010).	22
Tabela 2. Análise de variância para o ajuste, pelo método dos quadrados mínimos, de um modelo linear nos parâmetros (n_i = número de medições no nível i ; m = número de níveis distintos da variável independente; $n = \sum n_i$ = número total de observações; p = número de parâmetros do modelo). (Luna 2006).	36
Tabela 3. Níveis das variáveis utilizados no planejamento fatorial 2^4 , para otimização final das condições de extração.	37
Tabela 4. Dados para os padrões de açúcares e ácidos orgânicos e seus TMS derivados, obtidos na GOLM METABOLOME DATABASE (Max Planck Institute of Molecular Plant Physiology).	41
Tabela 5. Esquema de injeções no GC-FID para as amostras de folha de cana-de-açúcar.	44
Tabela 6. Codificação das amostras de acordo com as condições de cultivo e idade.	49
Tabela 7. Número de picos obtidos nos cromatogramas de cada uma das condições de extração testadas.	52
Tabela 8. Análise de variância para a superfície de resposta usando o modelo quadrático aplicado ao planejamento simplex-centróide.	53
Tabela 9. Matriz de planejamento 2^4	55
Tabela 10. Resultados (n° de picos e área total das diferentes massas) obtidos no estudo da relação massa/quantidade de reagente.	57
Tabela 11. Resultados (n° de picos e área total) obtidos nas diferentes condições de extração com suas respectivas médias, desvios padrão e C.V.	57
Tabela 12. Resultado (n° de picos e área total dos diferentes números de extração)	58
Tabela 13. Médias, Desvios e Porcentagem de erro.	58
Tabela 14. Área, área normalizada e % de área.	59
Tabela 15. Média, desvio padrão e coeficiente de variação dos tempos de retenção e área do derivado sililado do ribitol ($n=3$).	66

Tabela 16. Número de picos, desvios e coeficiente de variação das injeções em diferentes dias.	68
Tabela 17. Áreas totais, desvios e coeficiente de variação das injeções em diferentes dias.....	69
Tabela 18. Médias totais, desvio padrão, C. V.	69
Tabela 19. Valores de t para as três amostras	70
Tabela 20. Valores de t para os cinco dias diferentes.....	71
Tabela 21. Tempo de retenção e fragmentação das micromoléculas	74
Tabela 22. Metabólitos identificados no extrato aquoso de folhas de cana-de-açúcar, por GC-MS utilizando índices de retenção, espectros de massas e comparação com padrões comerciais.	80

Lista de abreviaturas e símbolos

GC do inglês Gas Chromatograph. Em português Cromatografia Gasosa

FID do inglês Flame Ionization Detection. Em português detecção por ionização em chama.

MS do inglês mass spectrometry. Em português espectrometria de massas.

HPLC Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

RMN Ressonância Magnética Nuclear

°C grau Celsius

m/z relação massa carga

g grama

mL mililitro

min. minuto

µL microlitro

MM massa molecular

MSTFA *N*-metil-*N*-[trimetilsil]-trifluoracetamida

TMS trimetilsilil

PCA Análise de componente principal

PLS Mínimos quadrados parciais

WUE do inglês water-use efficiency. Em português eficiência do uso de água.

IPA Isopropanol

EtOH Etanol

GCxGC/TOFMS cromatografia gasosa bidimensional abrangente acoplada à espectrometria de massas por tempo de voo.

GCxGC-FID cromatografia gasosa bidimensional abrangente com detecção por ionização em chama.

Índice Geral

RESUMO.....	8
1. INTRODUÇÃO.....	19
2. OBJETIVOS.....	29
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
3.1 Materiais.....	29
3.1.1 Reagentes e Solventes.....	29
3.1.2 Soluções.....	30
3.1.3 Equipamentos.....	30
3.2 Métodos.....	31
3.2.1 Desenvolvimento do método de Extração	32
3.2.1.1 Coleta e secagem.....	32
3.2.1.2 Extração do material vegetal	32
3.2.1.3 Reações de derivatização	32
3.2.1.4 Otimização da extração dos metabólitos das folhas utilizando o modelo Simplex Centróide	34
3.2.1.5 Estudo da variação do volume de solvente, tempo, temperatura e número de extrações utilizando Planejamento Fatorial	36
3.2.1.6 Estudo da massa de amostra.....	37
3.2.1.7 Teste de condição de extração dos metabólitos	38
3.2.1.8 Otimização do número de extrações.....	38
3.2.2 Método Cromatográfico.....	38
3.2.2.1 Otimização das condições cromatográficas.....	38
3.2.2.2 Análise do extrato aquoso de folhas de cana-de-açúcar por HPLC-DAD.....	39
3.2.2.3 Análise dos padrões de açúcares e ácidos orgânicos	40
3.2.2.4 Incerteza da medição.....	41
3.2.2.5 Validação do método cromatográfico.....	42
3.2.2.6 Identificação dos metabólitos utilizando os padrões comerciais e o índice de Kovats na amostra de cana-de-açúcar	44
3.2.2.7 Análise dos extratos por cromatografia gasosa bidimensional – GC-2D.....	45
3.2.3 Aplicação do método	47

3.2.3.1	<i>Experimento de Cultivo de cana-de-açúcar sob estresse</i>	47
3.2.3.2	<i>Análise de amostras de folhas de cana-de-açúcar em condição ambiente e estressadas com alto teor de CO₂ atmosférico</i>	49
4.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	50
4.1	Otimização da extração dos metabólitos das folhas de cana-de-açúcar utilizando o modelo Simplex Centróide	50
4.2	Estudo da variação do volume de solvente, tempo, temperatura e número de extrações utilizando Planejamento Fatorial	54
4.3	Estudo da relação massa de amostra/quantidade de reagentes	56
4.4	Teste de condição de extração dos metabólitos	57
4.5	Otimização do número de extrações	57
4.6	Otimização das condições cromatográficas	61
4.7	<i>Análise do extrato aquoso de folhas de cana-de-açúcar por HPLC-DAD</i>	63
4.8	Incerteza da medição	66
4.9	Validação do método cromatográfico	67
4.10	Identificação dos metabólitos utilizando os padrões comerciais e o índice de Kovats na amostra de folhas cana-de-açúcar	71
4.11	Análise dos extratos por cromatografia Bidimensional – GC-2D81	
4.12	Aplicação da metodologia. Experimento de cultivo de cana-de-açúcar em condição de alto CO ₂	85
5.	CONCLUSÕES	93
6.	PERSPECTIVAS DE ESTUDO	94
	REFERÊNCIAS	95
7.	ANEXOS	101
	Tabela A. Valores de F para um intervalo de confiança de 95%	101
	Tabela B. Valores de t para um intervalo de confiança de 95%.	101
	3 Comparação das replicatas (picos principais) – áreas corrigidas pela área do PI (ribitol).	102
	4. – Cromatogramas obtidos do extrato aquoso, por GC-FID, para o experimento de CO ₂ .	106

1. INTRODUÇÃO

A produção de biocombustíveis tem recebido atenção crescente, vislumbrados como fontes biodegradáveis e não poluentes de bioenergia. Ênfase especial tem merecido diversas espécies vegetais, entre elas a produção de etanol a partir de cana-de-açúcar. Como prova disso, o Brasil criou o Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE), que é um centro nacional que visa manter a liderança brasileira na produção sustentável de etanol de cana-de-açúcar. Para isso esse Laboratório investe em pesquisa básica e inovação tecnológica, tanto interna quanto através de parcerias estratégicas.

Mais recentemente, com o advento da biologia de sistemas, que compreende estudos transcriptômicos, proteômicos e metabolômicos em diferentes níveis: célula, tecido, órgão e organismo, tornou-se possível mapear o perfil metabolômico de cada vegetal fonte de bioenergia e assim obter uma extensa visão de seu perfil metabólico e sua rede regulatória. Isso possibilita identificação de fatores que possam ser manipulados visando o aumento de produtividade em compostos energéticos e também na identificação de características moleculares que possibilitem à espécie vegetal maior resistência a situações de estresse. O entendimento das respostas metabólicas permitirá planejamento mais específico e manejo de espécies selecionadas, visando o desenvolvimento de variedades com maior potencial econômico.

Embora o uso de cultivares resistentes seja o meio mais eficiente para o controle de diferentes pragas de *S. officinarum*, esta não é uma estratégia razoável uma vez que o desenvolvimento dos sintomas de muitas doenças no vegetal pode ser influenciado pelo estado fisiológico da planta e também pelas condições ambientais (Rott et al. 1997). A definição das características bioquímicas relacionadas à resistência vegetal devem ser atualizadas (Allwood et al, 2008).

Aplicações da metabolômica têm crescido e vem se tornando uma estratégia de abordagem complementar à genômica, transcriptômica e proteômica, com o objetivo de determinação de função de genes em microorganismos (Raamsdonk et al. 2001), plantas (Roessner et al. 2001) e animais. Algumas aplicações dessa abordagem incluem:

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

O perfil metabolômico, tanto qualitativo quanto quantitativo, reflete o processo celular que controla o fenótipo bioquímico da célula, tecido ou do organismo como um todo. Esse *status* bioquímico pode ser utilizado para monitorar e acessar a função gênica (Fiehn et al. 2000a). Por isso, em genômica funcional a metabolômica se destaca como uma estratégia mais robusta para prever a atividade gênica do que as abordagens que usam transcriptoma e proteoma, atualmente correntes (Gygi et al. 1999).

Um trabalho publicado por Xu et al (2010), fez um levantamento do número de trabalhos publicados entre 1999 e 2009 que envolvem a metabolômica. Os termos usados para esse levantamento foram: “*metabolomics* ou *metabonomics* ou *metabolic profiling*” “NMR”, “GC-MS” e “LC-MS” (Figura 1). Esses resultados mostraram um crescimento contínuo nessa área de pesquisa.

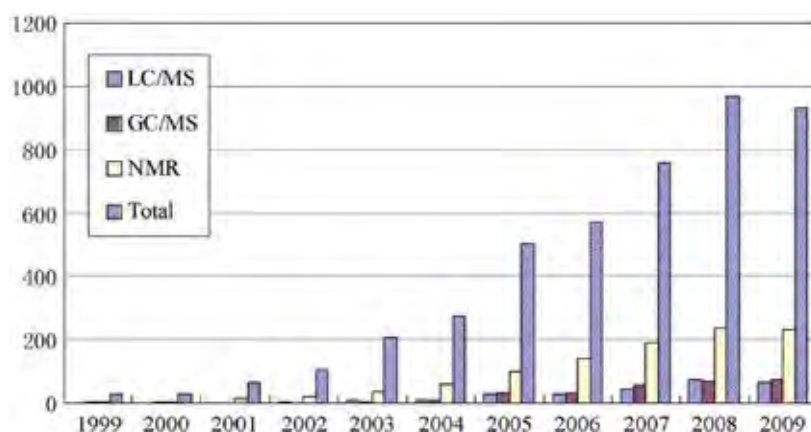


Figura 1. Artigos científicos publicados entre 1999 e 2009 com o tema envolvendo Metabolômica.

Este trabalho faz ainda menção à necessidade de rigor nos métodos analíticos utilizados para os estudos com moléculas derivatizadas e analisadas por GC-MS, uma vez que existe a possibilidade das análises fornecerem informações incorretas provenientes dos picos de degradação dessas moléculas, ou ainda o fornecimento de vários picos oriundos de um mesmo metabólito.

Um protocolo foi desenvolvido por Lalk et al (2010) para o estudo metabolômico intracelular de *Staphylococcus aureus*, um patógeno humano que

causa várias doenças. Para o desenvolvimento dessas análises, foram utilizadas técnicas complementares como a cromatografia gasosa e cromatografia líquida acoplados à espectrometria de massas.

A análise por GC-MS foi conduzida como em muitos outros trabalhos dessa área: primeiro, as moléculas passaram por uma reação de formação de metoximas (MeOX) e, posteriormente, seguiu-se à silanização com *N*-metil-*N*-(trimetilsilil)trifluoroacetamida (MSTFA). Juntamente com as análises por LC-MS foi possível decifrar o metabolôma de *Staphylococcus aureus*, e esses dados obtidos podem ser combinados com a transcriptôma e proteôma de uma forma holística complementando o entendimento desse organismo do ponto de vista da biologia de sistemas.

Rochfort et al (2010) afirmam que não existe uma plataforma analítica ideal para a análise metabolômica e é improvável que isso se defina num futuro próximo. Diferentes metodologias têm vantagens distintas que podem ser exploradas para a investigação de diferentes classes de metabólitos. A informação resultante é então colocada em conjunto para obter uma melhor caracterização do metabolôma. A Tabela 1 apresenta uma comparação entre os diferentes métodos analíticos baseados em RMN, LC-MS e GC-MS.

Tabela 1 comparação entre os diferentes métodos analíticos baseados usados em análises metabolômicas (Xu et al 2010).

Vantagens		Desvantagens	
RMN			
• Não destrutivo • pouca ou nenhuma exigência de preparação da amostra • Baixo custo por amostra • Robusto • Análise de amostra imparcial (^1H, ^{13}C, ^{31}P) • RMN 2-D para a identificação de metabólitos • tecido intacto, órgão inteiro e análise <i>in situ</i>		• Relativa baixa sensibilidade • Relativa baixa seletividade (sobreposição de sinais - overlap) • Cobertura limitada de metabólitos • Caro • Ruim para quantificação	
LC-MS			
• Alta sensibilidade • Alta seletividade • Combinação de várias colunas (RPLC, UPLC, HILIC, CE) • Cobertura ampla de metabólitos • Bom para quantificação e qualificação		• Amostra precisa ser ionizada • Dependência de base de dados e/ou de padrões • Moderada exigência de preparação de amostra • Relativamente mais caro que GC-MS • Matriz EECT	
GC-MS			
• Alta sensibilidade • Alta seletividade • Relativamente barato e reprodutível • Bom para quantificação e qualificação		• VIES de amostragem (voláteis e estabilidade) • Dependência de base de dados e/ou de padrões • Necessidade de derivatização	

Metabólitos secundários são sintetizados a partir de intermediários do metabolismo primário do carbono. Desses, clorofilas sintetizadas pela via de Beale (Schoefs and Bertrand 2005), carotenóides formados pela via dos terpenóides ou isoprenóides e compostos fenólicos formados pela via do chiquimato (Buchanan et al. 2000) são os mais estudados no reino vegetal. Considera-se que a síntese aumentada desses metabólitos sob condições de estresse estão relacionadas com a proteção das estruturas celulares contra danos oxidativos (Chalker-Scott and Fuchigami 1989; Close and McArthur 2002; Winkel-Shirley 2002; Wahid and Ghazanfar 2006). Diminuição no teor de clorofila já foi relacionada com o aumento da ação de clorofilas a e b sob condições de estresse (Majumdar et al. 1991). Carotenoides (carotenos e xantofilas) atuam como pigmentos acessórios na

captação de luz e também como antioxidantes (Havaux 1998; de Pascale et al. 2001). Os compostos fenólicos são antioxidantes poderosos, importantes na proteção de tecidos sob estresse (Dixon and Paiva 1995; Sgherri et al. 2004). Eles são quimicamente heterogêneos, incluindo flavonoides, ligninas e taninos. Desempenham ampla, variedade de funções, incluindo defesa contra herbívoros e patógenos, suporte mecânico, atração de polinizadores, absorção de luz e ação inibitória sobre plantas vizinhas competidoras (Harborne and Williams 2000; Taiz and Zeiger 2002).

Recentemente, o papel dos fenólicos foi revisado devido a evidências de seu maior envolvimento na tolerância ao estresse oxidativo do que na defesa contra herbivoria (Close and McArthur 2002; Wahid and Ghazanfar 2006). Antocianinas são solúveis em água e produzidas sob várias condições de estresse, incluindo UV-B (Mendez et al. 1999), seca (Balakumar et al. 1993), baixa temperaturas (Krol et al. 1995), deficiência de nutrientes (Rajendran et al. 1992), ozônio (Foot et al. 1996) e salinidade (Wahid and Ghazanfar 2006). Seu acúmulo sob condições de estresse merece estudos avançados. Song et al (2010) isolaram e analisaram flavonóides e antocianinas em cana-de-açúcar chinesa (*Saccharum sinensis Roxb*) comparadas com a cana-de-açúcar brasileira (*Saccharum officinarum*) e verificaram uma maior presença de flavonóides nas plantas do país asiático. Além disso, duas antocianinas foram identificadas pela primeira vez: petunidina-3-O-(6''-succinil)-ramnosídeo e cianidina-3-O-glicosídeo.

O acompanhamento do perfil dessas substâncias durante o crescimento do vegetal é uma estratégia funcional para o estudo do desenvolvimento da planta (Poorter 1988) e pode ser útil no entendimento aprofundado das respostas vegetais a situações de estresse. Determinação de alterações metabólicas e suas implicações para melhorar o crescimento de espécies cultivadas sob condições de estresse são áreas prioritárias de pesquisa (Bohnert et al. 2006).

França et al. (2001) usaram um conjunto de genes relacionados ao metabolismo secundário, extraído do banco de seqüências tag expressas pela cana (SUCEST), para investigar o padrão de expressão gênica de enzimas chaves reguladores das principais vias do metabolismo secundário, envolvidos na resposta da cana-de-açúcar a desafios ambientais e durante seu desenvolvimento. Os resultados mostraram que cDNAs de cana-de-açúcar codificam, quando induzido por luz UV, sesquiterpeno ciclastes (SC) 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 lignina e precursores de parede celular.

Estudos fitoquímicos sobre cana-de-açúcar relatam a ocorrência de C- e O-glicosilflavonas (Colombo et al., 2006 e 2008), poliamidas (Rodriguez et al., 2000), fenólicos (Leal et al., 1994), betaínas (Colmer et al., 2000), giberelinas (Koshioka et al., 1984), ácidos carboxílicos, α -hidroxi ácidos e amino ácidos (Kumar and Narayanaswamy, 2006).

Entre os metabolitos implicados em interações planta-patógeno, poliaminas e ácidos fenólicos tem se destacado. Fontaniella & Vicente (2003) avaliaram os níveis dessas substâncias em dois cultivares de cana-de-açúcar com susceptibilidades 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 subseqüentes. Enquanto espermidina desapareceu completamente no cultivar altamente susceptível C 439-52, um aumento no teor dessa substância foi observado no cultivar moderadamente susceptível L 55-5. O metabolismo de ácidos fenólicos também foi diferente nos dois cultivares. Em resumo, este estudo demonstrou que a composição de poliaminas e ácidos fenólicos no suco da cana foi alterada de forma diferenciada pela infecção por *X. albilineans*.

Glassop and Cols (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. O método desenvolvido por eles será empregado para avaliar quais metabólitos podem ser correlacionados com o acúmulo de sacarose em variedades genotipicamente diferentes de cana, e se eles podem ser utilizados para determinar alterações oriundas de engenharia metabólica na cana, visando o aumento na produtividade de sacarose e de novos metabólitos.

Wahid & Ghazanfar (2006) encontram 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, Wahid (2007) monitorou vários metabólitos primários e secundários em plantas com até 1 mês de idade cultivadas em condições controle (28° C) e sob estresse térmico (40° C), e relacionados com a termo tolerância (Wahid 2007). 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 tenha sido 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 compostos fenólicos solúveis acumularam posteriormente e clorofila permaneceu não afetada. 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.

Os resultados apresentados acima apontam para a necessidade de sistematização do conhecimento das alterações metabólicas associadas ao desenvolvimento da cana sob várias condições de estresse, buscando entender em nível molecular os processos ecofisiológicos do vegetal.

Uma das prováveis situações de estresse ambiental a que as plantas serão submetidas em futuro próximo, principalmente se medidas globais não forem adotadas, é a crescente taxa de CO₂ atmosférico causada principalmente pelo aumento das emissões 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 atuais taxas de crescimento de emissão de CO₂, projeta-se que os níveis podem atingir 730-1020 ppm até o final do século 21. É provável que o aumento na concentração atmosférica de CO₂ provoque efeitos importantes sobre a fotossíntese, metabolismo e desenvolvimento vegetal (Nowak, Ellsworth & Smith 2004; Ainsworth & Long 2005).

Devido à importância da cana-de-açúcar como fonte de energia renovável (Goldemberg 2007), é essencial entender como esta cultura responderá ao aumento projetado de CO_2 atmosférico, pois normalmente plantas C4 como cana, milho e sorgo não respondem bem ao aumento desse gás.

A denominação C3 ou C4 refere-se ao número de átomos de carbono presentes no primeiro produto da fixação do CO_2 . A resposta de plantas C3 e C4 ao incremento da luz pode ser verificada na Figura 2. Em plantas C3 algum fator, que não a luz, limita a Fotossíntese Líquida (Fotossíntese Líquida = Fotossíntese Total - Respiração) em altos níveis de luz. De fato, elas são limitadas pelo CO_2 , ou seja, há uma abundância de luz mas a taxa de suprimento de CO_2 ao cloroplasto é muito lenta. As plantas C4 superam esta limitação de CO_2 : elas usam o CO_2 disponível mais eficientemente e, conseqüentemente, têm maiores taxas de produção líquida em altos níveis de luz do que plantas C3, embora a performance das plantas C4 não seja tão boa em locais com baixa luminosidade.

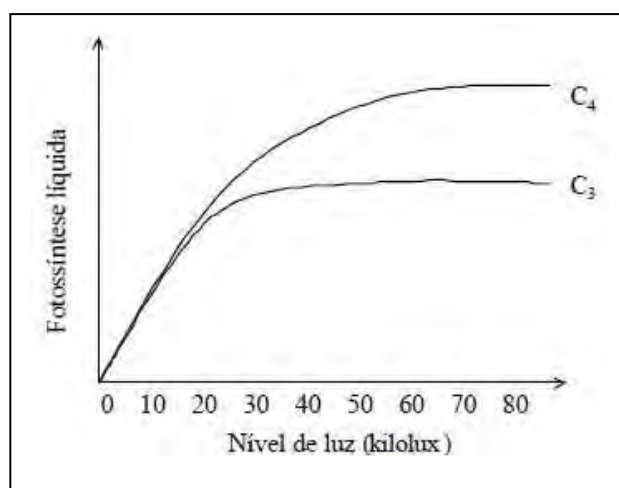


Figura 2. Efeito do aumento no nível de luminosidade sobre a fotossíntese líquida de plantas C3 e C4.

O ciclo do carbono foi primeiro esclarecido por Calvin e colaboradores em 1946 e por isso é conhecido como ciclo de Calvin, podendo ser dividido em quatro fases distintas: fase de carboxilação, fase de redução, fase de regeneração e fase de síntese dos produtos.

O ciclo de Calvin conhecido como a rota C3 de fixação do carbono advém do fato da maioria das plantas verdes formarem como primeiro produto estável da cadeia bioquímica da fotossíntese, o ácido 3-fosfoglicérico (3PGA), uma molécula com três carbonos. De forma bastante simplificada, a fotossíntese C3 envolve a

adição de uma molécula de CO_2 - reação de carboxilação - a uma molécula aceptora constituída de cinco carbonos e dois átomos de fósforo, a ribulose-1,5-difosfato (RUDP). RuBisco (ou seja, ribulose 1,5 difosfato carboxilase-oxigenase) é a enzima responsável pela carboxilação no ciclo de Calvin. A RUDP sofre uma série de mudanças envolvendo gasto de NADPH e ATP - reações de redução - originando no final do processo a glicose. Ao mesmo tempo, através de reações de regeneração, novas moléculas de RUDP são formadas, garantindo a continuidade da fixação do carbono. A fase de síntese de produtos consiste na produção de outros compostos, tais como, polissacarídeos, aminoácidos e ácidos graxos. A síntese desses compostos é influenciada pelas condições fisiológicas

Entretanto, esta não é a única rota de fixação do CO_2 . Na maioria das plantas e gramíneas tropicais, tais como a cana-de-açúcar e a cevada, a fixação do CO_2 resulta em compostos de 4 carbonos como o oxaloacetato, o malato e o aspartato. A fixação ocorre pela carboxilação do fosfoenolpiruvato a oxaloacetato catalisada pela fosfoenolpiruvato carboxilase. Por essa razão, essa rota é chamada de C4.

Existe ainda o metabolismo ácido das crassuláceas (CAM), cujo nome se deve ao fato de ser primeiro encontrado em espécies da família Crassulaceae. Esta rota de fixação do CO_2 também é muito comum em outras famílias de angiospermas: Agavaceae, Bromeliaceae, Cactaceae, etc. Como nas plantas de metabolismo C4, o primeiro metabólito a ser sintetizado na fixação do CO_2 é o oxaloacetato. Este CO_2 é posteriormente liberado pela descarboxilação do malato e refixado no ciclo de Calvin pela RuBisCO. Entretanto os metabolismos CAM e C4 diferem entre si pelo local e tempo de ocorrência. Nos vegetais que apresentam metabolismo C4, a fixação do CO_2 ocorre nas células fotossintéticas presentes no mesófilo da folha. O carbono fixado na forma de malato migra para as células envoltentes da bainha onde ocorre então a liberação e refixação do CO_2 através do ciclo de Calvin.

Nas plantas do metabolismo CAM o período de fixação via fosfoenolpiruvato carboxilase e RuBisCO estão separados pelo tempo. Nessas plantas, a fixação ocorre durante a noite quando os estômatos estão abertos via carboxilação do fosfoenolpiruvato e acúmulo do malato, assim formado, nos vacúolos. Durante o dia, os estômatos se fecham para minimizar a perda de água, e o malato é transportado para o citossol onde é descarboxilado e o CO_2 é refixado pela RuBisCO.

Estudos iniciais realizados por Buckeridge e colaboradores (Souza et al 2008) demonstraram que plantas de cana-de-açúcar cultivadas em condições de elevada

concentração de CO_2 (720 ppm) apresentam taxa fotossintética aumentada em até 35 %, condutância estomatal diminuída em cerca de 37 %, WUE (eficiência do uso de água) 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 CO_2). A Figura 3 ilustra as instalações utilizadas para esse experimento e o resultado visual dos crescimentos observados nas duas condições de cultivo.

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.

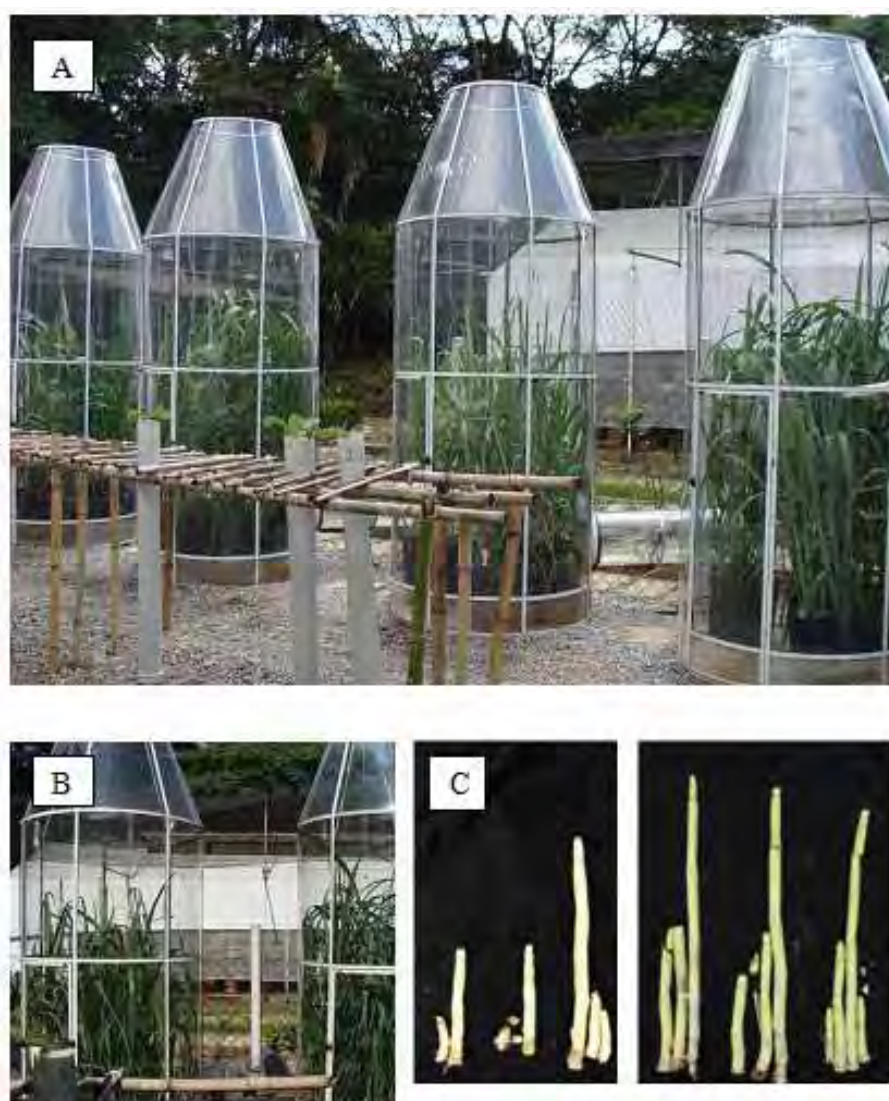


Figura 3. Aspecto geral das plantas de cana-de-açúcar cultivadas em câmaras de topo aberto com controle do teor de CO₂ (A); comparação entre as plantas cultivadas sob CO₂ ambiente (390 ppm) com sob alto teor de CO₂ (750 ppm) (B); detalhe dos colmos (C) após 75 dias de cultivo (esquerda CO₂ normal e direita alto CO₂).

2. OBJETIVOS

1. Desenvolver e validar condições de extração e de análise cromatográfica usando GC-FID;
2. Implantar e adequar metodologia usando GC-MS para identificação dos metabólitos presentes.
3. Promover análise multivariada, para análise de metabólitos primários de cana de açúcar e identificação alguns marcadores.
4. Avaliar a interferência de condição atmosférica simulada (teor elevado de CO₂) no metabolismo micromolecular da folha da cana-de-açúcar durante seu crescimento.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Reagentes e Solventes

Foram empregados os seguintes reagentes: cloridrato de metoxiamina (Sigma), reagente silanizante MSTFA (N-metil-N-[trimetilsil]-trifluoroacetamida) (Sigma), ribitol (Sigma), piridina (Sigma), etanol (Tédia), isopropanol (J.T. Baker), metanol (Tédia), todos com grau HPLC, kit de monossacarídeos e ácidos orgânicos (Sigma), kit de aminoácidos (Perbio) Tabela 2. Etanol, isopropanol e água purificada de qualidade Milli-Q foram utilizados como solventes extratores.

Tabela 2. Lista dos monossacarídeos, ácidos orgânicos e aminoácidos analisados.

Monossacarídeos	Ácidos Orgânicos	Aminoácidos
Frutose	Ác. Quínico	L-alanina
Ribose	Ác Malônico	L-arginina
Arabinose	Ác Málico	L-cistina
Manose	Ác Tartárico	L-histidina
Glicose	Ác Lático	L-isoleucina
Xilose	Ác Ascóbico	L-leucina
Galactose	Ác Cítrico	L-lisina
	Ác Adípico	L-metionina
	Ác. Benzóico	L-fenilalanina
		L-prolina
		L-tirosina
		L-serina
		L-valina

3.1.2 Soluções

A solução de ribitol 2 mg mL^{-1} (padrão interno) foi preparado em água ultrapura purificada em equipamento Milli-Q (Millipore, Bedford, Estado Unidos). A solução de cloridrato de metoxiamina 20 mg mL^{-1} foi prepara em piridina. As soluções estoque dos monossacarídeos foram preparadas separadamente em água purificada, na concentração de 1 mg mL^{-1} cada um. Os ácidos orgânicos também foram preparados individualmente (1 mg mL^{-1}) em água/metanol 8:2. O kit de aminoácidos foi preparado a partir de uma solução estoque 1 mg mL^{-1} . Uma alíquota de $60 \text{ }\mu\text{L}$ foi utilizada para preparação da solução de trabalho dos padrões de aminoácidos, a uma concentração final de 1 mg mL^{-1} .

3.1.3 Equipamentos

Folhas secas e picadas de cana-de-açúcar foram pesadas em balança analítica marca Mettler Toledo modelo AG245 (máx. 210 g ; $d = 0,1 \text{ mg}$). Pré-tratamento das amostras: membranas de filtração Chromafil® Xtra RC-20/25 $0,20$

µm. Estufa de secagem de material de laboratório: Marconi® modelo MA 033/3. Micropipeta Labpette, marca Labnet®, volume variável de 100 a 1000 µL.

As primeiras extrações foram feitas utilizando-se Ultrassom: ELMA®, modelo TRANSSONIC 700, frequência de 35 kHz. Para eliminar os solventes extratores foi utilizado evaporador rotativo Speed Vac®, marca Thermo® equipado com refrigerador Thermo® modelo RVT4104 (Refrigerated Vapor Trap) e bomba de vácuo.

Cromatógrafos. Após a metoximação seguida de silanização das amostras, os cromatogramas foram obtidos em cromatógrafo a gás Varian CP3800 acoplado a um detector FID. As condições cromatográficas foram: injeção de 1 µL da amostra na razão split 1:25 para o FID. Foi utilizada uma coluna Supelco DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). Temperatura do injetor foi 230°C. Temperatura do detector 310°C. N₂ foi usado como gás de arraste na vazão de 1 mL.min⁻¹. Nas primeiras análises o forno foi aquecido a 70°C por 5 min, e aumento de 5°C.min⁻¹ até 290°C e mantido nessa temperatura por 6 min. Software utilizado foi o *Galaxie Chromatography Data System Version 1.9.302.53*. Após otimização das condições de extração e cromatográficas as amostras e padrões foram injetados no cromatografo a gás Varian GC 3800 acoplado ao detector Saturn MS/MS 2000 – ionização eletrônica e analisador Ion Trap, com Autosampler CombiPal. Ressalta-se que o modo de ionização foi positivo operando a 70 eV e a faixa da massas de aquisição foi *m/z* 30-600. Software utilizado foi o *Varian MS Workstation Version 6.9.2*

Para os teste sem as reações de derivatização foi utilizado um 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. Coluna Phenomenex Luna C-18. 250 x 4,6 mm, 5 µm.

3.2 Métodos

3.2.1 Desenvolvimento do método de Extração

3.2.1.1 Coleta e secagem

As folhas da cana de açúcar adultas *Saccharum* spp., cultivar RB3280, foram coletadas em campo aberto próximo a Usina Zanin, na região de Araraquara (21°51'50.45" S, 48°10'56.36" O; Google Earth®), secas em estufa (40° C), trituradas em moinho de facas e estocadas em frascos fechados até a extração.

3.2.1.2 Extração do material vegetal

Após a coleta e secagem, no primeiro momento, pesou-se 30 porções de 200 mg de folhas trituradas, adicionou-se a seguir um volume final de 4 mL de solvente extrator em cada tubo, adicionados de 100 µL de solução de ribitol (padrão interno) a 2 mg mL⁻¹ em água. As extrações foram realizadas por aquecimento (70 °C por 15 min.) obedecendo as proporções de solventes estabelecidas a partir do modelo Simplex Centróide (Almeida et al 2007), descrito no item 3.2.1.4.

3.2.1.3 Reações de derivatização

3.2.1.3.1 METOXIMAÇÃO

Para as reações de derivação, após a extração, alíquotas de 1 mL foram secas em Speed Vac, ressolubilizadas com 80 µL de solução de cloridrato de metoxiamina 20 mg.mL⁻¹ em piridina, e mantidas a 30° C por 90 minutos para formação das oximas (Figura 4).

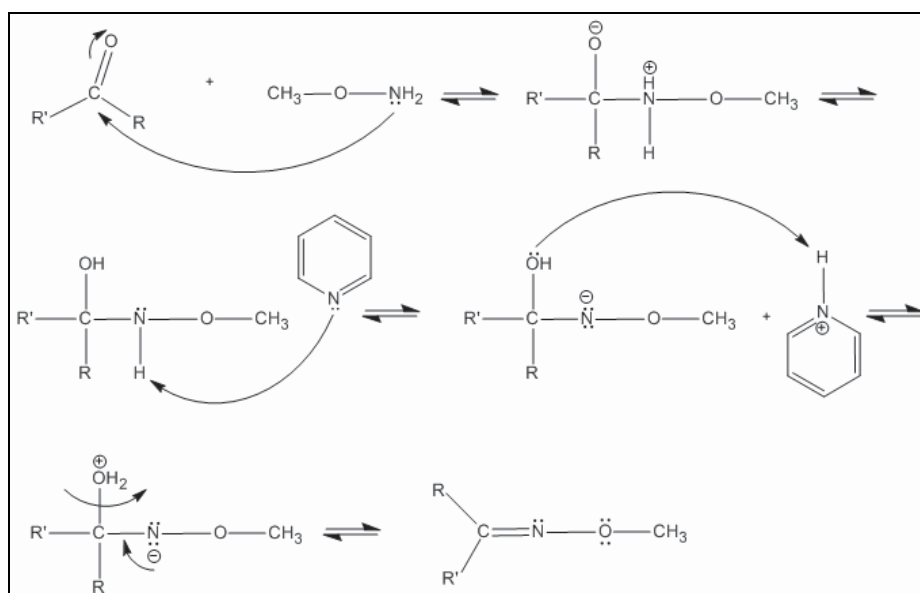
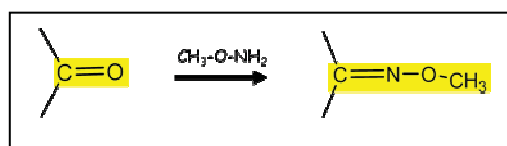


Figura 4. Mecanismo para reação de formação da oxima.

As reações de formação de oximas são necessárias antes da sililação para bloquear a interconversão entre as estruturas cíclica e acíclica de açúcares redutores. A conversão do aldeído e cetonas em oximas usando metoxiamina antes de formar os éteres de TMS, acaba com essas diversas formas cíclicas e acíclicas limitadas pela ligação C=N , resultando apenas na formação de formas *syn* e *anti* e ainda protege a molécula da descarboxilação (Gullberg et al 2004).

3.2.1.3.2 SILILAÇÃO

A seguir, as amostras foram sililadas [30 min. a 37°C com 80 μL de MSTFA]. Após 24 hora de repouso as amostras estavam prontas para análise por cromatografia gasosa segundo método proposto por Roessner et al, (2000) para análise metabolômica, voltada principalmente para a análise de metabólitos primários (Figura 5).

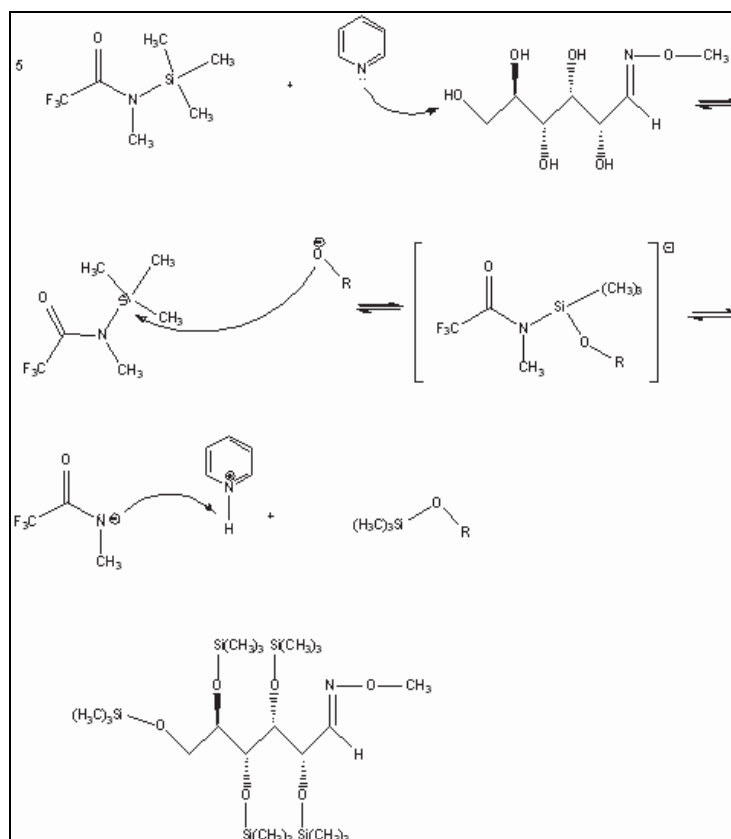
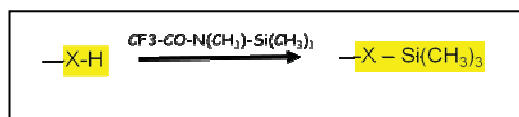


Figura 5. Mecanismo de formação do derivado de TMS. Exemplo de silição de uma hexose.

3.2.1.4 Otimização da extração dos metabólitos das folhas utilizando o modelo Simplex Centróide

Um planejamento de misturas do tipo Simplex-Centróide foi utilizado para estudar o efeito dos solventes etanol, isopropanol e água, puros ou em mistura, na eficiência da extração (Figura 6), de substâncias polares analisáveis por cromatografia gasosa, após derivatização. A Figura 6 mostra as dez condições diferentes geradas pelo planejamento de acordo com as proporções de solventes.

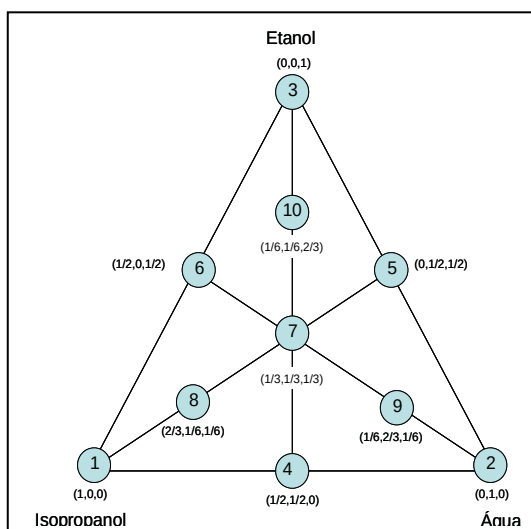


Figura 6. Planejamento Simplex Centróide para análise da influência da proporção dos solventes na extração.

Para validação do modelo Simplex Centróide buscou-se a partir do software Minitab™ Statistical Software versão 15.1.0.0. o melhor ajuste em relação aos resultados, utilizando como variável dependente o número de picos, uma vez que o objetivo destes experimentos foi encontrar uma mistura solvente capaz de extrair o maior números de metabólitos possíveis, capazes de serem analisados por cromatografia gasosa. Para isso, a análise dos resíduos é fundamental para que se avaliar a qualidade do ajuste de qualquer modelo. Em primeiro lugar, os resíduos devem ser pequenos, pois, se um determinado modelo deixa resíduos consideráveis, provavelmente é um modelo ruim.

O método mais usado para se avaliar numericamente a qualidade do ajuste de um modelo é a análise de variância. O objetivo da análise de variância é avaliar se as diferenças observadas entre as médias das amostras são estatisticamente significantes. Dessa forma o método pode ser inserido na Tabela de Análise de Variância (ANOVA). (Tabela 2).

Tabela 2. Análise de variância para o ajuste, pelo método dos quadrados mínimos, de um modelo linear nos parâmetros (n_i = número de medições no nível i ; m = número de níveis distintos da variável independente; $n = \sum n_i$ = número total de observações; p = número de parâmetros do modelo). (Luna 2006).

Fonte de variação	Soma Quadrática	Número de graus de liberdade	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	$SQ_T = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \bar{y})^2$	$n - 1$	

Além disso, 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, isto é, se $\frac{MQ_R}{MQ_r} > F_{V_R, V_r}$ há uma regressão estatisticamente significativa, enquanto que valores altos de $\frac{MQ_{faj}}{MQ_{ep}}$ significarão muita falta de ajuste.

Os valores do teste F para comparação com os valores calculados podem ser verificados na Tabela A em anexo, utilizando para isso um intervalo de confiança de 95%.

3.2.1.5 Estudo da variação do volume de solvente, tempo, temperatura e número de extrações utilizando Planejamento Fatorial

Nesta etapa, aplicou-se técnica quimiométrica por meio do planejamento fatorial do tipo 2^4 . Em um planejamento fatorial são investigadas as influências de todas as variáveis experimentais de interesse e os efeitos de interação nas

respostas. Se a combinação de k fatores é investigada em dois níveis, um planejamento fatorial consistirá de 2^k experimentos.

Efetuu-se um planejamento fatorial 2^4 para otimização do volume de solvente, tempo, temperatura e número de extrações. A Tabela 3 apresenta os níveis alto e baixo aplicados para tais variáveis. A quantidade de amostra vegetal utilizada em cada experimento foi fixada em 200 mg.

Tabela 3. Níveis das variáveis utilizados no planejamento fatorial 2^4 , para otimização final das condições de extração.

Variável	Nível alto	Nível baixo
Volume (mL)	2,0	4,0
Nº de extrações	3	1
Tempo (min)	45	15
Temperatura (°C)	70	30

A partir dessas considerações, foi possível obter a matriz de planejamento por meio do programa computacional Minitab™ Statistical Software versão 15.1.0.0., com todas as combinações possíveis dos níveis selecionados.

Somente o ponto central do planejamento fatorial foi realizado em triplicata e deste obteve-se os dados referentes à média, desvio padrão e coeficiente de variação, os quais podem ser comparativamente atribuídos a todos os experimentos do planejamento.

3.2.1.6 Estudo da massa de amostra

A redução da massa de amostra foi feita para ajustar a sua concentração final, diminuir o consumo de solvente e também para ser possível realizar a análise metabolômica em quantidades mínimas de material vegetal.

3.2.1.7 Teste de condição de extração dos metabólitos

Também foi testada a extração por sonicação e com agitação (shaker), em comparação com o método normal utilizado até o momento (maceração com aquecimento). Assim as três condições diferentes de extração seguiram o mesmo procedimento de derivação e os cromatogramas adquiridos foram comparados em termos de área total e número de picos. O quadro mostra as três condições diferentes analisadas:

N – (maceração a 30° C, 15 min) + 100 µL de piridina na reação
U -, Ultrassom 10 min, 3x, 2mL + piridina
S – Maceração com agitação, 15 min, 3x, 2 mL 30°C + piridina

3.2.1.8 Otimização do número de extrações

Com algumas alterações nos parâmetros e na sequência das etapas, foi possível efetuar um estudo do número de extrações necessárias para esgotar os metabólitos da folha de cana-de-açúcar. Foram feitas cinco extrações consecutivas em triplicata e todas analisadas por GC-FID. O experimento foi efetuado com a massa definida no estudo do item 3.2.1.6 e com adição de piridina durante a metoximação.

3.2.2 Método Cromatográfico

3.2.2.1 Otimização das condições cromatográficas.

Com o método de extração definido, otimizou-se as condições cromatográficas visando melhorar a resolução cromatográfica global, uma vez que a matriz é muito complexa e por esse motivo existe uma grande sobreposição dos metabólitos analisáveis, observada quando foram utilizadas as condições cromatográficas propostas por Abu-Nada et al (2007) que monitorou o perfil metabólico de batatas infectadas.

Algumas condições foram alteradas das condições originais descritas no item 4.1.3. como a razão de split para 250, a rampa de aquecimento e consequentemente o tempo de análise, sempre focando no maior número de picos detectados. Ainda para o sistema GC-FID, fez-se alguns testes variando-se a temperatura inicial da coluna (70, 80, 90 e 100° C), visando diminuir o tempo de eluição dos picos referentes aos solventes, mas sempre priorizando a resolução dos picos cromatográficos.

3.2.2.2 Análise do extrato aquoso de folhas de cana-de-açúcar por HPLC-DAD

Para avaliar a sobreposição do método de análise de metabólitos por GC com outro método complementar, por HPLC-DAD, também em desenvolvimento por nosso grupo de pesquisa, realizou-se a análise do extrato aquoso de folhas de cana-de-açúcar em HPLC-C18, sem derivatização.

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. A coluna cromatográfica empregadas foram Phenomenex, Luna® C-18 (250 x 4,6 mm, 5 µm)

Condições de eluição	
Tempo (min.)	%B (MeOH)
0,01	5
5	70
60	100
70	100
70,01	fim

Foi utilizada como fase móvel água + 0,1% de ácido acético (solvente A) e metanol + 0,1% de ácido acético (solvente B). O volume de injeção de 20 uL com vazão de fase móvel de 1,5 mL.min⁻¹ e temperatura da coluna em 40°C.

3.2.2.3 *Análise dos padrões de açúcares e ácidos orgânicos*

Para verificar se as reações de formação das oximas e sililação estavam ocorrendo de forma efetiva, foram feitas análises por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas dos kits de padrões de monossacarídeos e ácidos orgânicos, ambos da Sigma(Tabela 4), seguindo a mesma preparação definida para as amostras vegetais (item 3.2.1.3.1).

Tabela 4. Dados para os padrões de açúcares e ácidos orgânicos e seus TMS derivados, obtidos na GOLM METABOLOME DATABASE (Max Planck Institute of Molecular Plant Physiology).

METABÓLITO	formula molecular	MM	formula molecular (TMS)	MM (TMS)	NOME DERIVATIZADO
Frutose	C ₆ H ₁₂ O ₆	180,16	C ₂₂ H ₅₅ NO ₆ Si ₅	570.103	Frutose (1MEOX) (5TMS)
D-(-)Ribose	C ₅ H ₁₀ O ₅	150,13	C ₁₈ H ₄₅ NO ₅ Si ₄	467.896	Ribose (1MEOX) (4TMS)
D-(-)Arabinose	C ₅ H ₁₀ O ₅	150,13	C ₁₈ H ₄₅ NO ₅ Si ₄	467.896	Arabinose (1MEOX) (4TMS)
D-(+)Xilose	C ₅ H ₁₀ O ₅	150,13	C ₁₈ H ₄₅ NO ₅ Si ₄	467.896	xilose (1MEOX) (4TMS)
D-(+)Manose	C ₆ H ₁₂ O ₆	180,16	C ₂₂ H ₅₅ NO ₆ Si ₅	570.103	Manose (1MEOX) (5TMS)
D-(+)Galactose	C ₆ H ₁₂ O ₆	180,16	C ₂₂ H ₅₅ NO ₆ Si ₅	570.103	Galactose (1MEOX) (5TMS)
D-(+)Glicose	C ₆ H ₁₂ O ₆	180,16	C ₂₂ H ₅₅ NO ₆ Si ₅	570.103	Glicose (1MEOX) (5TMS)
L-acido ascorbico	C ₆ H ₈ O ₆	176,12	C ₁₈ H ₄₀ O ₆ Si ₄	464.849	acido ascórbico (4TMS)
Ácido malônico	CH ₂ (COOH) ₂	104,06	C ₉ H ₂₀ O ₄ Si ₂	248.424	acido malônico (2TMS)
(-)ácido quinico	C ₇ H ₁₂ O ₆	192,17	C ₂₂ H ₅₂ O ₆ Si ₅	553.073	acid Quinico (5TMS)
D-(+)-ácido málico	HO ₂ CCH ₂ CH(OH)CO ₂ H	134,09	C ₁₃ H ₃₀ O ₅ Si ₃	350.631	acido malico. (3TMS)
Acido Cítrico	HOC(COOH)(CH ₂ COOH) ₂	192,12	C ₁₈ H ₄₀ O ₇ Si ₄	480.848	acido citrico (4TMS)

3.2.2.4 Incerteza da medição

Segundo o texto de Gallas et al, quando se relata o resultado de medição de uma grandeza física, é obrigatório fornecer indicação quantitativa da qualidade do resultado, de forma tal que aqueles que o utilizam possam avaliar sua confiabilidade. Sem essa indicação, resultados de medição não podem ser comparados, seja entre eles mesmos ou com valores de referência fornecidos numa especificação ou numa norma. É, portanto, necessário que haja um procedimento prontamente implementado, facilmente compreendido e de aceitação geral para caracterizar a qualidade de um resultado de uma medição, isto é, para avaliar e expressar sua incerteza.

Em geral, uma medição tem imperfeições que dão origem a um erro no resultado da medição. Há diversos tipos de erros possíveis, mas podemos englobá-los basicamente em duas categorias: aleatórios e sistemáticos. Aqui já estamos eliminando erros grosseiros que podem decorrer, por exemplo, da má leitura das escalas, de ajustes imperfeitos do instrumento, ou seja, basicamente da imperícia ou desatenção da pessoa que está medindo. Os erros aleatórios decorrem de fatores não controlados na realização de medidas e seu efeito consiste em produzir ao

acaso acréscimos e decréscimos no valor obtido. Estes efeitos aleatórios são a causa de variações em observações repetidas do mensurando. Embora não seja possível compensar o erro aleatório de um resultado de medição, ele pode geralmente ser reduzido aumentando-se o número de observações; seu valor esperado é zero. Os erros sistemáticos também não podem ser eliminados, porém podem ser reduzidos.

Dessa forma, para se calcular a incerteza da medição do Cromatógrafo a Gás acoplado ao detector por ionização de chama (FID), foram feitas injeções em triplicata de solvente hexano, adicionado de todos os reagentes menos o extrato aquoso de folha de cana-de-açúcar (branco) e por fim um padrão de ribitol sililado para analisar a resposta em termos de tempo de retenção e área do pico. Para tal fato, utilizou-se sempre a mesma condição cromatográfica definida pelo item 3.2.2.1.

3.2.2.5 Validação do método cromatográfico

É essencial que os estudos de validação sejam representativos e conduzidos de modo que a variação da faixa de concentração e os tipos de amostras sejam adequados. Um método para um composto majoritário requer um critério de aceitação e uma abordagem diferente de um método desenvolvido para análise de traços. A frequência com que o método será utilizado (muitas vezes em um dia, uma vez em um dia para um estudo rápido, uma vez em um mês, etc.) também influencia o tipo de estudo de validação que é necessário. Os parâmetros analíticos devem ser baseados na intenção do uso do método. Por exemplo, se um método será usado para análise qualitativa em nível de traços, não há necessidade de testar e validar a linearidade do método sobre toda a faixa linear dinâmica do equipamento. O objetivo do método pode incluir também os diferentes tipos de equipamentos e os lugares em que o método será utilizado, ou seja, se o método é desenvolvido para ser utilizado em instrumento e laboratório específicos, não há necessidade de usar instrumentos de outras marcas ou incluir outros laboratórios nos experimentos de validação. Desta forma, os experimentos podem ser limitados para o que realmente é necessário (Bottoli et al 2004).

A repetitividade (“repeatability”) representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de medição, chamadas condições de repetitividade: mesmo procedimento; mesmo analista; mesmo instrumento usado sob as mesmas condições; mesmo local; repetições em um curto intervalo de tempo e com a mesma amostra. O termo repetitividade é adotado pelo Vocabulário Internacional de Metrologia, sendo utilizado pelo INMETRO. Por outro lado, a ANVISA utiliza o mesmo conceito para o termo repetibilidade.

A repetitividade envolve várias medições da mesma amostra, em diferentes preparações e é, algumas vezes, denominada precisão intraensaio ou intra-corrida e pode ser expressa através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD).

Para este trabalho, existia a necessidade de se avaliar o método cromatográfico desenvolvido perante a repetitividade das injeções no cromatógrafo, uma vez que as amostras possuíam uma matriz muito complexa e as diferenças verificadas deveriam aparecer apenas em amostras que possuíam metabolitos diferentes ou com intensidades muito diferentes.

Assim, as amostras de cana-de-açúcar foram submetidas a várias injeções no cromatógrafo para validação do método desenvolvido. Para isso foram preparadas três amostras nas mesmas condições, sendo elas: 50 mg de folha de cana-de-açúcar moídas em moinho criogênico, 2 mL de solvente extrator (água 100%), 2 extrações consecutivas nas mesmas condições definidas. Usou-se como parâmetro de validação o teste t-student para os resultados de número de picos e área total do cromatograma, sempre utilizando 95% de intervalo de confiança. Foi analisada a repetibilidade das respostas inter-amostra e intra-amostras em dias diferentes.

Para os cálculos do teste t-student fez-se os cálculos utilizando a Equação 1, que possui como parâmetros $\bar{x}$ médio, média de cada grupo, μ , média total ou populacional, n, número de graus de liberdade e S, o desvio padrão.

$$t = (\bar{x} - \mu) \sqrt{\frac{n}{S}}$$

Equação 1

A Tabela 5 apresenta o esquema das amostras utilizadas para análises em dias diferentes.

Tabela 5. Esquema de injeções no GC-FID para as amostras de folha de cana-de-açúcar.

		1º dia	2º dia	3º dia	6º dia	7º dia
Amostra I	A	x	x			
	B	x	x			
	C	x	x			
Amostra II	A	x	x	x	x	x
	B	x	x	x	x	x
	C	x	x	x	x	x
Amostra III	A	x	x			
	B	x	x			
	C	x	x			
	D	x	x			
	E	x	x			

Os testes foram conduzidos dessa maneira para avaliação da repetibilidade do método desenvolvido, inter-amostra, representado pelas amostras I, II e III, avaliados em dois dias. A amostra III foi analisada em quintuplicata para se verificar a variação intra-amostra e por fim, a amostra II foi analisada em vários dias para se verificar a variação dos resultados quanto à estabilidade das reações realizadas (inter-dia).

3.2.2.6 Identificação dos metabólitos utilizando os padrões comerciais e o índice de Kovats na amostra de cana-de-açúcar

Para a identificação dos metabólitos da amostra de folha de cana-de-açúcar cultivar RB3280, foram utilizados alguns padrões de metabólitos primários comerciais, índice de retenção de Kovats, calculados a partir dos tempos de retenção corridos de séries homólogas de *n*-alcanos C₈-C₂₀ e C₂₁-C₄₀, bem como a comparação dos espectros de massas obtidos por ionização por elétrons (GC-MS) com espectros disponíveis na biblioteca GOLM. As soluções estoque dos *n*-alcanos a 40 ppm foram misturadas e diluídas para 10 ppm e então injetadas no GC-MS. As

soluções dos padrões de açúcares e ácidos orgânicos também foram injetadas como descrito no item 3.2.3.

A identificação dos metabólitos derivatizados foi efetuada através da comparação dos seus espectros de massas com o banco de dados da Golm Metabolome Database (Max Planck Institute) e pela comparação dos índices de retenção de Kovats obtidos experimentalmente com valores tabelados. Visto que foram utilizados apenas alguns padrões para a confirmação positiva da identidade dos compostos, estes foram considerados tentativamente identificados (Lanças et al 2000). Para o cálculo do índice de Kovats (I_x) foi utilizada a equação de Van den Dool e Kratz (Equação 2),

$$I_x = 100 n + 100 \left(\frac{t_x - t_n}{t_{n+1} - t_n} \right)$$

Equação 2

onde n é número de carbonos do n -alcano anterior ao metabólito, t_x é o tempo de retenção do metabólito de interesse, t_n é o tempo de retenção do n -alcano eluído imediatamente antes do metabólito e t_{n+1} é o tempo de retenção do n -alcano eluído imediatamente depois do metabólito.

3.2.2.7 Análise dos extratos por cromatografia gasosa bidimensional – GC-2D

A cromatografia bidimensional consiste em cromatógrafos a gás comerciais convencionais modificados, com uso de duas colunas capilares conectadas em série através de um modulador e, em alguns casos, de um forno secundário (situados dentro do forno do cromatógrafo, porém com controle independente de temperatura). Reservatórios e/ou dutos para abastecimento do fluido criogênico tornam-se necessários (para o caso de sistemas criogênicos). O controle de válvulas que liberam o fluido criogênico ou de outros sistemas mecânicos, a transformação do sinal adquirido em diagramas tridimensionais e obtenção de valores como tempo de retenção, área ou volume de pico e outros parâmetros cromatográficos normalmente

não é feita com softwares convencionais. A complexidade final do sistema GC x GC e do software empregado depende do tipo de detector empregado, sendo que detecção por MS torna o sistema mais complexo que com outros detectores (Augusto et al 2008).

O conjunto de colunas típico para GC × GC é constituído de uma coluna capilar convencional – com até 30 m de comprimento e diâmetro internos de 0,25 a 0,32 mm – conectada por conectores de baixo volume a um pedaço curto (≤ 2 m) de uma coluna fina, do tipo empregado para Fast GC ($d_c \leq 0,1$ mm). A segunda coluna deve ser curta o suficiente para que o material coletado e posteriormente reinjetado seja completamente eluído antes que a próxima fração seja nela introduzida.

Uma avaliação preliminar da aplicabilidade da técnica GC-2D na análise metabolômica de cana-de-açúcar foi realizada em equipamentos localizados no Laboratório de Química Analítica Ambiental e Oleoquímica, do Instituto de Química da UFRGS, gentilmente disponibilizados pelas Profas. Dra. Elina Bastos Caramão e Dra. Claudia Alcaraz Zini.

Foram usados dois cromatógrafos a gás da marca Leco: GCxGC-FID com injetor convencional split/splitless, amostrador automático HP 6873 (Agilent Technologies, Burwood, Austrália), controle pelo software Chemstation (Agilent Technologies, Burwood, Austrália) e detector FID com taxa de aquisição de sinal de até 200Hz.

Colunas DB 5625 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m) e DB 17 (1,0m x 0,18 mm x 0,18 μ m 30m); GC-2D-MSTOF com injetor convencional split/splitless, amostrador automático HP 6873 (Agilent Technologies, Burwood, Austrália), controle pelo software ChromaTOFII, e detector TOFMS Pegasus III (LECO Corporation, St. Joseph, MI, USA)

As condições cromatográficas utilizadas foram as mesmas definidas durante a otimização (item 3.2.2.1). Injeção de 1 μ L da amostra na razão split 1:25, O injetor foi aquecido até 230°C. He foi usado como gás de arrast e na vazão de 1 mL.min⁻¹. (100°C por 5 minutos – 5°C/min – até 145°C – 2°C /min – até 200°C - 4°C/min - até 290°C por 5 minutos)

Amostras analisadas: extrato aquoso de folhas de cana-de-açúcar cultivar RB3280 e mistura de padrões de aminoácidos e de açúcares monossacarídeos.

3.2.3 Aplicação do método

3.2.3.1 Experimento de Cultivo de cana-de-açúcar sob estresse

Obtenção e cultivo das plantas

As plantas foram obtidas a partir de colmos de cana-de-açúcar da variedade SP80-3280 coletados no Sítio Vitória, localizado na cidade de Piracicaba, SP, no mês de outubro de 2008. A aluna de Doutorado Amanda Souza orientada pelo Prof. Dr. Marcos Buckeridge, do Instituto de Biociências - USP, foi quem executou todo o trabalho de cultivo e forneceu o material para esse trabalho. 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® e 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) 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 (de Souza et al. 2008).

Desenvolvimento das plantas

O desenvolvimento das plantas foi avaliado a partir de medidas de altura e produção de biomassa de folhas e colmo após 30, 45, 60 e 75 dias de cultivo. As medidas de altura foram realizadas da base do tolete até a ponta da folha mais jovem em todas as plantas do experimento. Da mesma forma que o cultivo, o desenvolvimento e a coleta das plantas foi executado por Amanda Souza, aluna de doutorado do IB-USP. A coleta foi executada levando-se em consideração o sistema de numeração de folhas estabelecido por Kuijper, onde apenas as folhas +1 foram utilizadas. Esse sistema consiste em numerar as folhas da seguinte forma: a partir do primeiro colarinho visível considera-se a folha +1; as folhas acima da +1 decrescem uma unidade cada (0, -1...); e as folhas abaixo da +1 aumentam uma a uma (+2, +3, +4...). A Figura 7 apresenta o sistema de Kuijper.

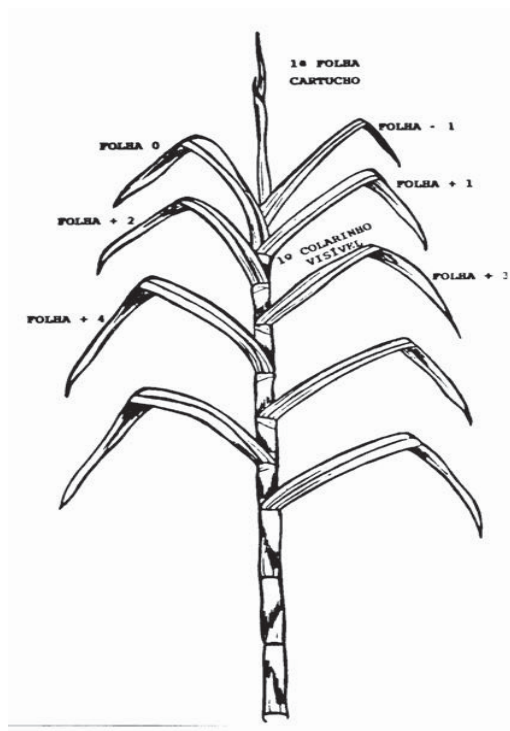


Figura 7. Sistema de numeração das folhas de cana-de-açúcar estabelecido por Kuijper.

A produção de biomassa foi determinada após coletas destrutivas de 4 plantas por tratamento. Para as folhas, o material vegetal foi seco em estufa a 60°C até peso constante e posterior pesagem. Para o colmo, foi realizada pesagem do material fresco e a biomassa seca foi estimada a partir do conteúdo de água presente neste órgão determinada em experimento anterior (Souza 2007).

3.2.3.2 Análise de amostras de folhas de cana-de-açúcar em condição ambiente e estressadas com alto teor de CO₂ atmosférico

O método desenvolvido e otimizado foi aplicado às amostras de folhas de cana-de-açúcar cultivadas em diferentes condições atmosféricas de CO₂: concentração ambiente e alta concentração. Para isso utilizou-se a variedade SP80-3280 em quatro idades diferentes, cultivadas nessas duas condições. As amostras foram analisadas por GC-FID em duplicata. A Tabela 6 apresenta as diferentes amostras.

Devido à complexidade da matriz orgânica, há necessidade de efetuar uma análise que proporcione a comparação de todos os picos dos cromatogramas e se verifique as semelhanças e diferenças entre eles. Uma das alternativas para se tratar esses dados é o uso da Análise de Componente Principal (PCA).

Tabela 6. Codificação das amostras de acordo com as condições de cultivo e idade.

Número da amostra	Tratamento	Idade (dias)
1 e 2	Ambiente	30
3 e 4	Ambiente	45
5 e 6	Ambiente	60
7 e 8	Ambiente	75
9 e 10	CO ₂	30
11 e 12	CO ₂	45
13 e 14	CO ₂	60
15 e 16	CO ₂	75

O PCA é uma ferramenta quimiométrica que, a partir de um determinado conjunto de dados, é capaz de condensar as informações mais relevantes em um número reduzido de novas variáveis. Esse método está baseado na transformação das variáveis originais de uma matriz dados, onde as linhas representam as amostras e as colunas as variáveis, em novas variáveis não correlacionadas, chamadas componentes principais (PC, do inglês Principal Components), que são combinações lineares das variáveis originais. Quando o número de PC é significativamente menor que o número de variáveis inicial obtém-se uma redução substancial de informação, proporcionando uma melhor visualização do conjunto de dados através das PCs. Sendo assim este método pode ser utilizado na redução de informações, para reconhecimento de padrões, na seleção de amostras, na construção de modelos para calibração multivariada, entre diversas outras aplicações.

A maneira mais comum de se representar graficamente o resultado da decomposição em PCA é representar os *scores* e pesos das componentes principais escolhidas, relacionadas entre si, na maioria das vezes criando um gráfico bi ou tridimensional que permite observar com uma maior clareza a disposição das amostras e a participação das variáveis naquele padrão observado e identificação dos possíveis agrupamentos presentes nos dados. Em outras palavras, fica visível no gráfico, a similaridade ou discrepância entre as amostras.

Os dados foram organizados na forma de uma matriz, onde as linhas representam as amostras e as colunas, as variáveis, que no caso de dados cromatográficos, representam as intensidades dos sinais adquiridos pelo equipamento.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Otimização da extração dos metabólitos das folhas de cana-de-açúcar utilizando o modelo Simplex Centróide

Após toda preparação das amostras descritas no item 3.2.1, as 10 amostras obtidas segundo as condições geradas no planejamento Simplex Centróide foram

analisadas no cromatógrafo a gás Varian CP3800 acoplado a um detector FID. Foram obtidos os cromatogramas abaixo, sendo que aquele em destaque representa o melhor resultado obtido nesta etapa. Nesse momento, utilizou-se como melhor condição o cromatograma que fornecesse o maior número de picos (Figura 8 e 9).

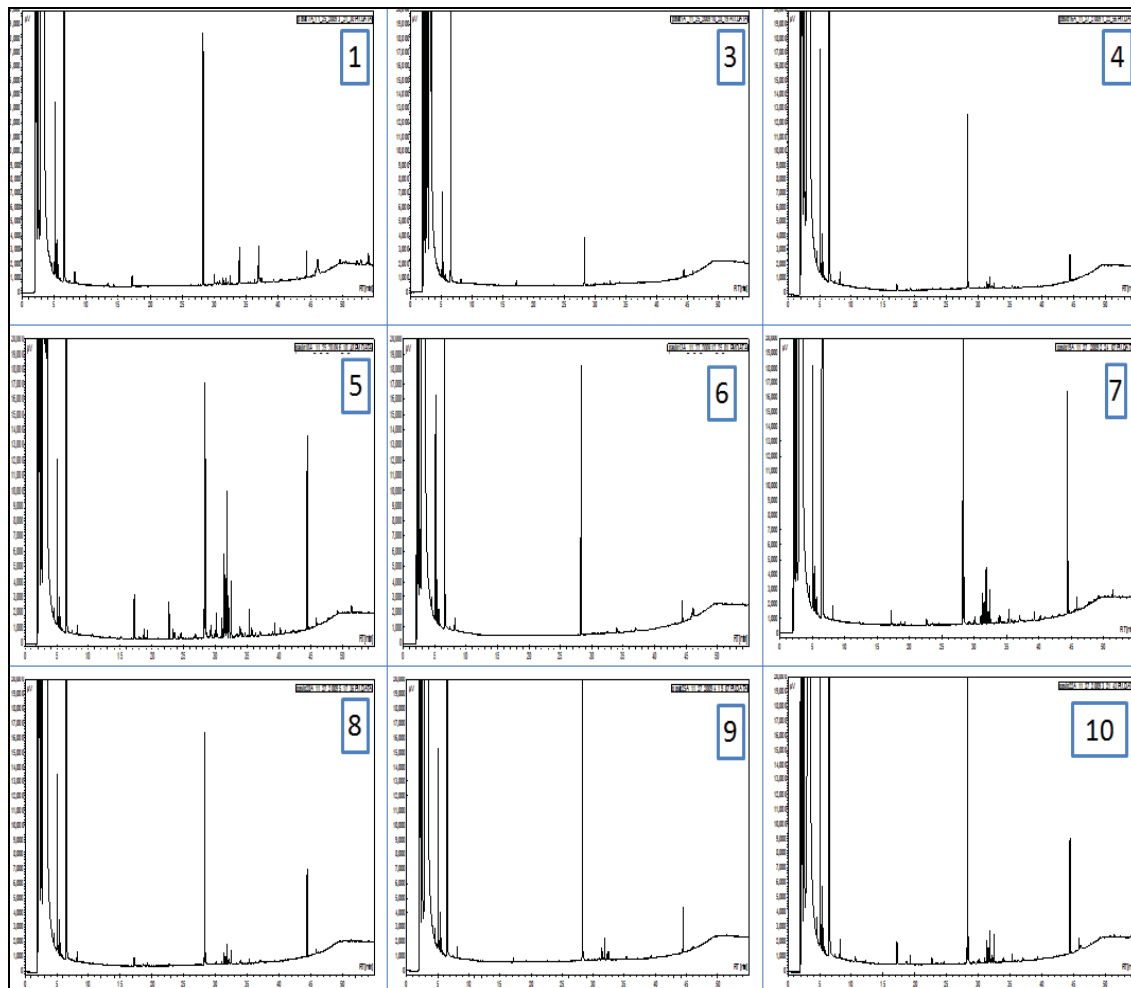


Figura 8. Perfil cromatográfico das diferentes condições de extração geradas a partir do planejamento Simplex Centróide. Amostras: folha de cana-de-açúcar cultivar RB3280.

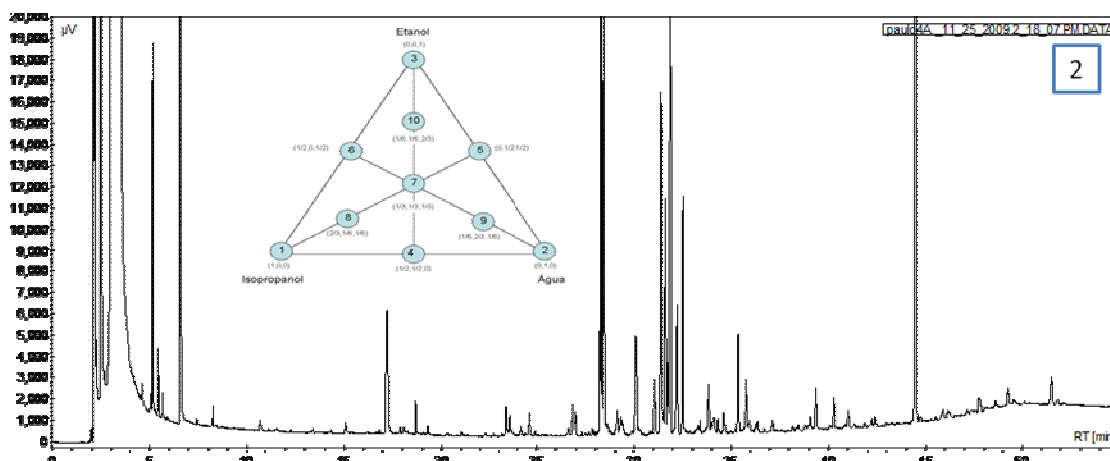


Figura 9. Cromatograma do extrato de folhas de cana-de-açúcar (cultivar RB3280) obtido com água (condição 2), e que apresentou o maior quantidade número de picos cromatográficos dentre as 10 condições de extração testadas. Detalhe do Simplex Centróide.

Tabela 7. Número de picos obtidos nos cromatogramas de cada umas das condições de extração testadas.

Experimento	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Nº de picos	13	84	32	23	59	14	45	27	27	39

Com a análise da superfície de resposta utilizando número de picos como variável dependente definiu-se que a melhor condição de extração dos metabólitos das folhas corresponde a 100% de água como solvente extrator (Figura 10).

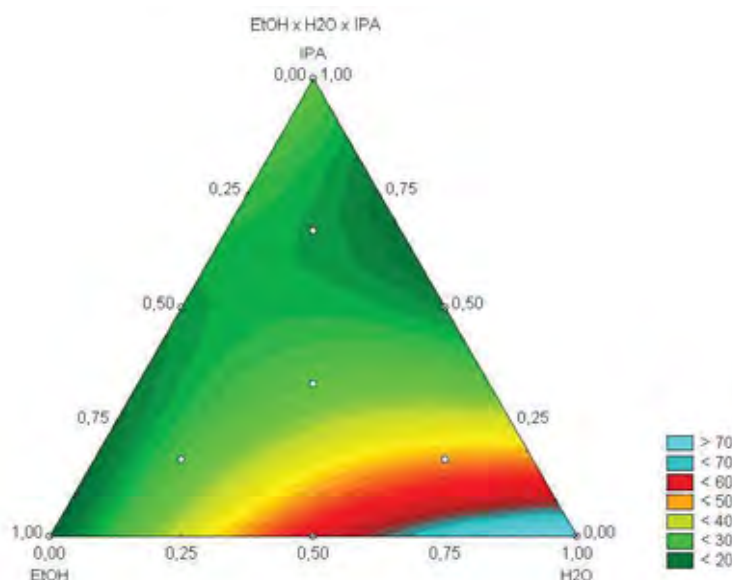


Figura 10. Superfície de resposta do modelo Simplex Centróide com equação quadrática utilizando os seguintes solventes: isopropanol (IPA), etanol (EtOH) e água. Os círculos vazios indicam os pontos experimentais.

Para verificação da validade dos resultados da Tabela 7, aplicou-se a ANOVA para alguns modelos de regressão para ver qual explicava melhor os dados obtidos. Os modelos testados foram linear, quadrático, cúbico especial e cúbico completo, e o que melhor se adequou aos resultados experimentais foi o quadrático, de acordo com os resultados obtidos pela ANOVA. A Tabela 8 mostra todos os valores calculados utilizando o software Minitab™ Statistical Software versão 15.1.0.0 para

geração da superfície de resposta. A planilha foi desenvolvida no programa Excel da Microsoft para os cálculos da ANOVA.

Tabela 8. Análise de variância para a superfície de resposta usando o modelo quadrático aplicado ao planejamento simplex-centróide.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	No. Grau de Liberdade.	Média Quadrática
Regressão	4025,19	6	670,86
Resíduos	503,90	5	100,78
Falta de Ajuste	284,91	3	94,97
Erro Puro	12,66	2	6,33
Total	4369,66	11	
% de variação explicada	92,12%		
% máx. Explicável	99,71%		
F (MQR/MQr)	6,66	F6,5,95%	4,95
F (MQfaj/MQep)	15,00	F3,2,95%	19,16

Dos resultados obtidos da ANOVA, a soma quadrática residual deixada pelo modelo pode ser decomposta em duas partes: uma causada pelos erros aleatórios que é chamado de soma quadrática devida ao erro puro (SQ_{ep}), e a outra, ao contrário, depende do modelo, e será tanto maior quanto mais as estimativas para um dado nível do modelo se desviarem da resposta da média correspondente. Esse termo fornece uma medida da falta de ajuste do modelo às respostas observadas, sendo chamado por isso de soma quadrática devida a falta de ajuste (SQ_{faj})

Quando se dividem as somas quadráticas pelos seus respectivos números de graus de liberdade, tem-se médias quadráticas cujos valores são usados pra avaliar a falta de ajuste. O valor p corresponde ao número de parâmetros do modelo, n o número de repetições no nível i e m números de níveis distintos da variável independente (Bruns et al 2001).

Dentre os valores encontrados na Tabela da ANOVA, a porcentagem de variação explicada significa que os dados se enquadram nesse modelo em 92,12% e a % máxima explicável diz quanto o modelo proposto consegue explicar os dados.

Além dos valores da ANOVA a Tabela 8, apresenta os valores dos testes F calculados juntamente com os valores de F tabelados com 95% de confiança. Neste trabalho, o que é importante frisar é o seguinte: Quando se compara o valor calculado para F(MQR/MQr) com o valor tabela de $F_{6,5}$ (que pode ser lido na Tabela A em anexo, na interseção da coluna $v_1 = 6$ com a linha correspondente a $v_2 = 5$) o valor de F(MQR/MQr) deve ser maior que $F_{6,5}$ para que a regressão seja estatisticamente significativa. Já para o calculo de F (MQfaj/MQep) comparado com o valor de $F_{3,2}$ (que também pode ser verificado na Tabela A em anexo, com $v_1 = 3$ e $v_2 = 2$) o primeiro deve ter um valor menor que o segundo. Para os cálculos para o modelo quadrático, essas duas condições são obedecidas.

A equação gerada a partir do modelo de regressão quadrático do modelo Simplex Centróide é mostrada abaixo, sendo que x_1 , x_2 e x_3 representam isopropanol, água e etanol respectivamente.

$$\hat{y} = 11,6x_1 + 80,02x_2 + 32,9x_3 - 91,4x_1x_2 + 166,1x_1x_3 - 160,7x_2x_3$$

$\pm 9,018 \quad \pm 9,018 \quad \pm 9,018 \quad \pm 41,563 \quad \pm 41,563 \quad \pm 41,563$

4.2 Estudo da variação do volume de solvente, tempo, temperatura e número de extrações utilizando Planejamento Fatorial

Definida a melhor condição de solvente extrator, utilizou-se a mesma para os experimentos subsequentes. O planejamento fatorial é classificado como um método simultâneo, no qual as variáveis de interesse que realmente apresentam influências significativas na resposta são avaliadas ao mesmo tempo. A Tabela 9 apresenta as combinações de experimentos para este planejamento fatorial e o número de pico obtido para cada condição. O número total de picos detectados nos cromatogramas obtidos por CG-FID em uma condição de gradiente de temperatura específica foi considerada como resposta para a eficiência da extração.

Tabela 9. Matriz de planejamento 2⁴.

Experimento	Volume (mL)	Nº de extrações	Tempo	Temperatura (°C)	Número de picos
1	2	1	15'	30	49
2	4	1	15'	30	92
3	2	3	15'	30	147
4	4	3	15'	30	98
5	2	1	45'	30	101
6	4	1	45'	30	84
7	2	3	45'	30	105
8	4	3	45'	30	107
9	2	1	15'	70	90
10	4	1	15'	70	102
11	2	3	15'	70	85
12	4	3	15'	70	107
13	2	1	45'	70	91
14	4	1	45'	70	34
15	2	3	45'	70	81
16	4	3	45'	70	60
17	3	2	30'	50	104
17'	3	2	30'	50	119
17''	3	2	30'	50	87

O ponto central que corresponde aos experimentos 17, 17' e 17'' apresentou uma média de 103 picos com desvio padrão 16,01 e um coeficiente de variação de 15%. 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, tempo e temperatura) e discretas (número de extrações) também pode conferir erros ao experimento.

Com os resultados da Tabela 9 foi também possível determinar a influência dos níveis alto e baixo de cada variável. As retas apresentadas na Figura 11 expressam a tendência em termos de números de picos quando se altera o parâmetro do nível baixo para o alto.

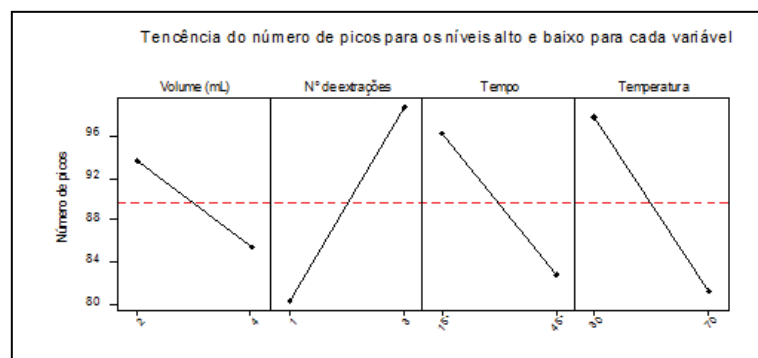


Figura 11. Avaliação dos efeitos principais para o planejamento experimental

A variável número de extrações, por exemplo, tende a resultar em maior número de picos quando se usa 3 extrações. Quanto mais inclinada for a reta, maior a influência do parâmetro sobre o sistema. O número de picos tende a aumentar quando a folha é extraída mais vezes, enquanto o volume, temperatura e tempo menores apresentaram maior números de picos.

Deste modo, os experimentos quimiométricos realizados indicaram as seguintes condições ótimas de extração para os metabólitos primários de folhas de cana-de-açúcar: massa de amostra de 200 mg, solvente extrator água (2 mL) adicionados de 100 μL de solução aquosa de ribitol (2 mg.mL^{-1}), extrair 3 vezes por 15 min. a 30°C . Utilizando estas condições de extração foi possível observar 147 picos nas condições cromatográficas utilizadas mostrando, portanto, provavelmente pelo menos 147 metabólitos diferentes.

4.3 Estudo da relação massa de amostra/quantidade de reagentes

Foram avaliadas as seguintes proporções: 30, 90 e 150 mg de material vegetal seco/80 μL de solução de metoximação e 80 μL de reagente de sililação.

A Tabela 10 permite concluir que realmente a massa do material seco estava muito alta e dentre os resultados apresentados o que mostrou-se mais reprodutível foi a massa de 90 mg.

Tabela 10. Resultados (nº de picos e área total das diferentes massas) obtidos no estudo da relação massa/quantidade de reagente.

Massa	30mg		90mg		150mg	
amostra	No. de picos	Área total	No. de picos	Área total	No. de picos	Área total
A	79	1268121	106	5677204	130	8579613
B	53	349627	109	8258741	108	13063456
C	64	1120000	127	8526531	129	8092134

4.4 Teste de condição de extração dos metabólitos

A Tabela 11 fornece os valores da área total dos cromatogramas obtidos por GC-FID nas condições já descritas anteriormente. As amostras Nx correspondem às condições normais (maceração a 30° C), amostras Ux referem-se ao uso do ultrassom e amostras Sx referem-se ao uso do shaker para extração por maceração com agitação. As análises foram feitas em triplicata.

Tabela 11. Resultados (nº de picos e área total) obtidos nas diferentes condições de extração com suas respectivas médias, desvios padrão e C.V.

amostras	picos	média	Desv. Pad	C. V	área	média	Desv Pad.	C.V.
N1	127				5471131			
N2	126	127	1	0,8	4384454	5061551	590670	11,7
N3	128				5329069			
U1	109				3522379			
U2	114	114,7	6,0	5,3	5233699	4847780	1180730	24,4
U3	121				5787262			
S1	116				4151027			
S2	127	126	9,5	7,6	4741853	4382502	315489	7,2
S3	135				4254626			

Os resultados mostram que agitação ou sonicação não melhoram os resultados em termos de número de picos ou área total dos cromatogramas. Assim manteve-se a extração como antes, apenas com temperatura de 30°C.

4.5 Otimização do número de extrações

Utilizando as condições estabelecidas até aqui, fez-se um teste do número de extrações consecutivas necessárias para extrair completamente os metabólitos do

material vegetal seco com um limite de cinco extrações. Assim, a sequência de etapas foi a seguinte: 90 mg de amostras, 2 mL de solvente extrator (100% água), 30° C. Durante a reação de formação da oxima, além dos 80 µL de cloridrato de metoxiamina 20 mg.mL⁻¹ em piridina usados desde o começo, adicionou-se mais 100 µL de piridina para auxiliar na solubilização do extrato seco. O restante das etapas foi repetido como anteriormente. Os experimentos foram feitos em triplicata e os resultados da área total e o número de picos obtidos por GC-FID são apresentados na Tabela 12:

Tabela 12. Resultado (nº de picos e área total dos diferentes números de extração)

extrações	1		2		3		4		5	
amostras	No. de picos	Área total	No. de picos	Área total	No. de picos	Área total	No. de picos	Área total	No. de picos	Área total
A	104	2865622	39	460438	29	316084	15	61216	3	19089
B	110	3085775	39	512796	36	278337	22	147447	3	16764
C	106	2729011	30	258077	28	285327	14	53674	*	

*queda de energia

Dessa vez, como os resultados se mostraram mais regulares, foi possível realizar um tratamento estatístico dos dados em relação ao numero de picos e a área total dos cromatogramas levando-se em consideração a média, o desvio padrão (SD) e a porcentagem de erro (CV) de cada parâmetro. A Tabela 13 mostra esses resultados.

Tabela 13. Médias, Desvios e Porcentagem de erro.

extrações	1		2		3		4		5	
amostras	No. de picos	Área total	No. de picos	Área total	No. de picos	Área total	No. de picos	Área total	No. de picos	Área total
MEDIA	106,7	2893469,3	36,0	410437,0	31,0	293249,3	17,0	87445,7	3,0	17926,5
SD	3,1	180004,8	5,2	134519,6	4,4	20081,8	4,4	52099,3	0,0	1644,0
CV (%)	2,9	5,2	12,4	32,8	14,1	6,8	25,6	59,6	0	9,1
Valores ruins!!!										

A Figura 12 apresenta o perfil cromatográfico por CG-FID, na mesma escala, de cada uma das extrações realizadas. De acordo com a figura, verifica-se uma diminuição relativamente grande entre cada uma das extrações subseqüentes

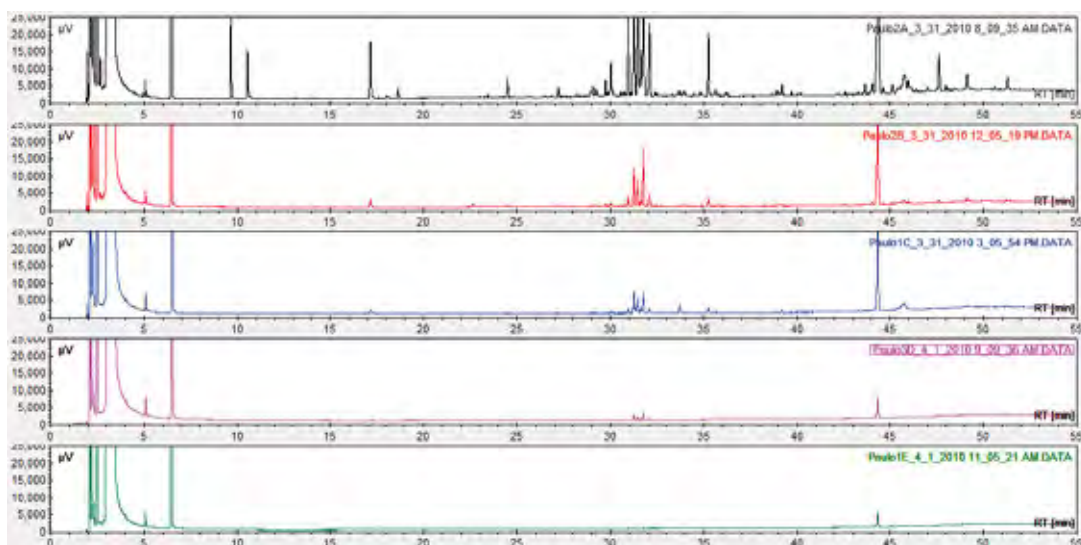


Figura 12. Perfil cromatográfico referente às extrações consecutivas das amostras de folha de cana de açúcar. Cromatogramas em preto = primeira extração, vermelho = segunda extração, azul = terceira extração, rosa = quarta extração e verde = quinta extração.

Pelos dados fornecidos na Tabela 14 e o perfil apresentado no gráfico da Figura 13, pode-se dizer que uma extração eficiente a qual extrai uma quantidade de metabólitos representativa para análise por cromatografia gasosa é aquela onde se utiliza duas extrações consecutivas, que somadas correspondem a mais de 89% material total extraído, considerando a área total dos picos.

Tabela 14. Área, área normalizada e % de área

extração	área acum	área	% de área extraída
1	2893469.3	2893469.3	78,15
2	3303906.3	410437.0	11,08
3	3597155.7	293249.3	7,92
4	3684601.3	87445.7	2,36
5	3702527.8	17926.5	0,48

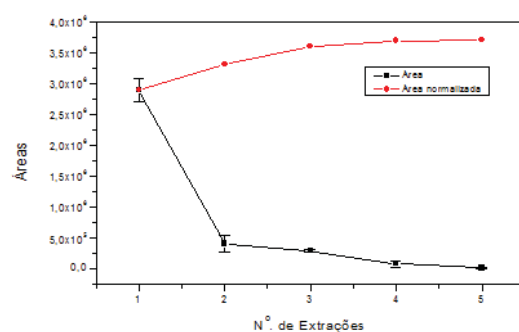


Figura 13. Relação entre o número de extrações consecutivas com a área total de cada cromatograma e a área acumulada dos cromatogramas.

A Figura 14 apresenta os mesmos cromatogramas apresentados na figura 12, porém agora sobrepostos. A região em destaque mostra que logo a partir da segunda extração não há diferença entre os metabólitos analisados, uma vez que, não é detectado nenhum pico a mais em relação à primeira extração.

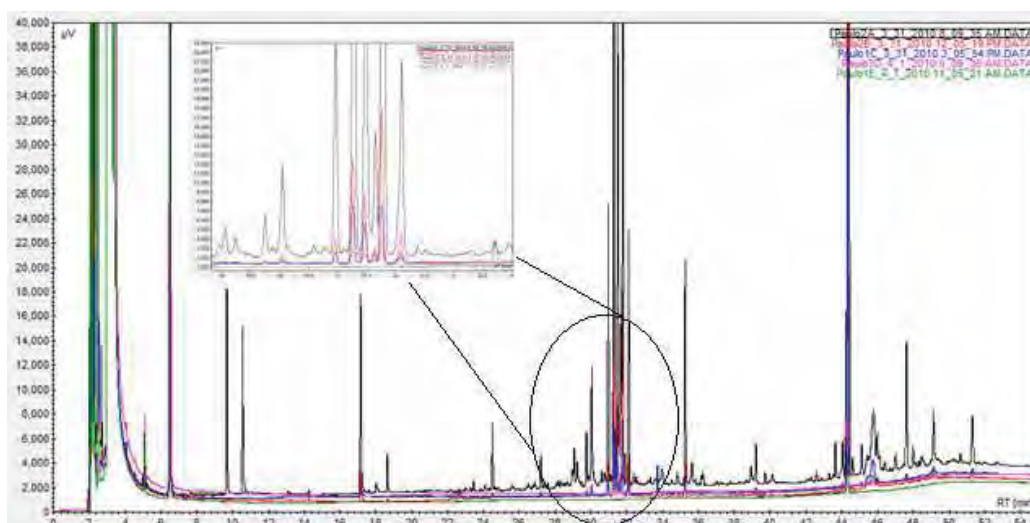


Figura 14. Cromatogramas sobrepostos, referentes às extrações sucessivas. A região em destaque melhora a visualização.

4.6 Otimização das condições cromatográficas

Até então, a rampa de aquecimento para as análises cromatográficas se dava a partir das condições utilizadas por Abu-Nada et al (2007): aquecimento de 70° C por 5 minutos – 5° C/min até 290° C.

Dentre as condições cromatográficas que foram possíveis variar, pode-se dizer que a mudança da razão de split de 1:25 para 1:250 piorou a resposta cromatográfica, uma vez que houve o desaparecimento e a diminuição dos picos (Figura 15). Tentou-se usar esse parâmetro para resolver a sobreposição dos picos principalmente no região do cromatograma compreendida entre 30 e 35 minutos, onde eluem os picos mais intensos.

A segunda condição variada foi a rampa de aquecimento que passou para 57,73 minutos de corrida (70° C por 5 minutos – 5° C /min – até 185° C – 3° C/min – até 213° C - 5° C/min - até 290° C por 5 minutos).

Nesse caso, como mostrado no cromatograma em azul, houve uma pequena melhora na resolução, porém ainda com sobreposição de vários picos, principalmente na região entre 30 a 35 minutos.

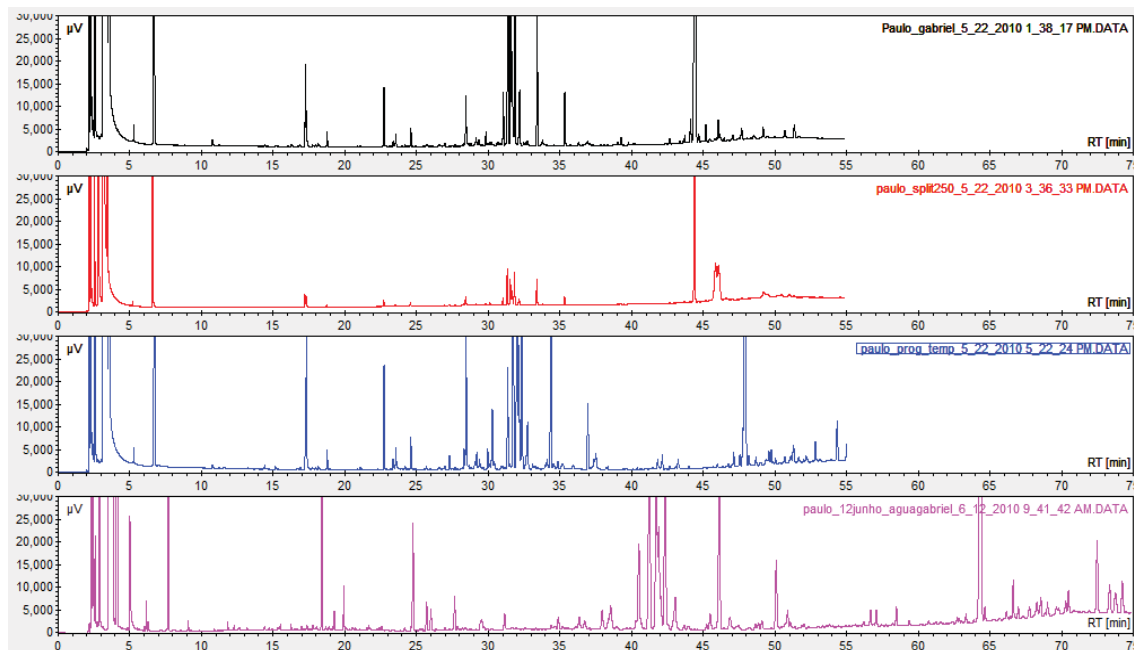


Figura 15. Diferentes condições cromatográficas testadas. (A) = condição inicial, com rampa de 70 a 290° C, a 5° C/min e split 1:25; (B) Condição anterior e split 1:250, (C) = nova rampa de 57,73 minutos (70° C por 5 minutos – 5° C/min – até 185° C – 3° C/min – até 213° C - 5° C/min - até 290° C por 5 minutos e (D) = rampa de 75 minutos (70° C por 5 minutos – 5° C/min – até 145° C – 2° C/min – até 200° C - 4° C/min - até 290° C por 5 minutos).

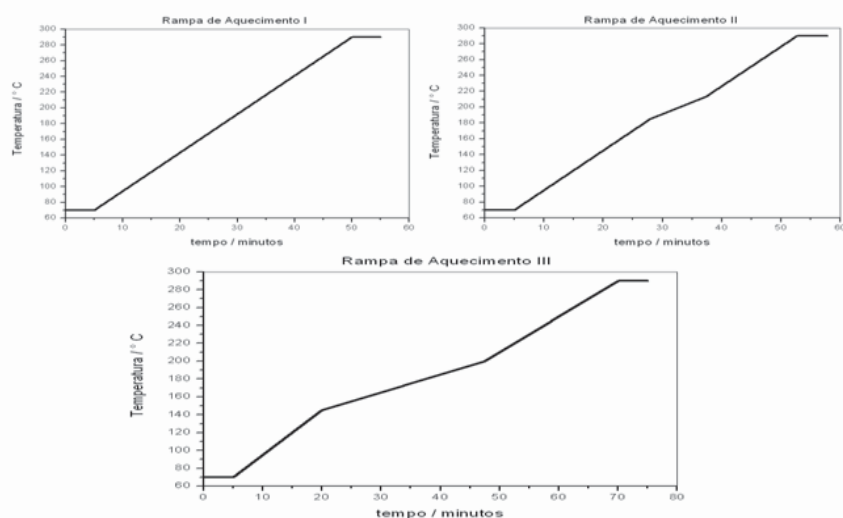


Figura 16. Rampas de temperatura estudadas na otimização das condições cromatográficas. Cromatogramas na fig. 15.

Assim, fez-se necessário utilizar uma rampa de temperatura mais suave e fragmentada, aumentando o tempo de corrida para 75 minutos, ficando assim definida a programação de temperatura: (70°C por 5 minutos – 5° C/min – até 145° C – 2° C/min – até 200° C - 4° C/min - até 290° C por 5 minutos). Com essa condição foi possível verificar uma melhora na resolução dos picos e consequentemente surgiram novos picos a serem analisados. A Figura 16 apresenta as rampas de aquecimento estudadas.

Essa última condição foi ainda modificada para diminuir o tempo de eluição do solvente. Assim foram testadas algumas temperaturas iniciais de análise: além de 70° C, testou-se 80, 90 e 100° C. A partir da figura 17 é possível concluir que a temperatura de 100° C foi a melhor entre as analisadas, não prejudicando a resolução dos picos dos metabólitos da amostra. Com esse ultimo estudo das condições cromatográficas, a Rampa de aquecimento III sofreu algumas alterações. (Figura 18).

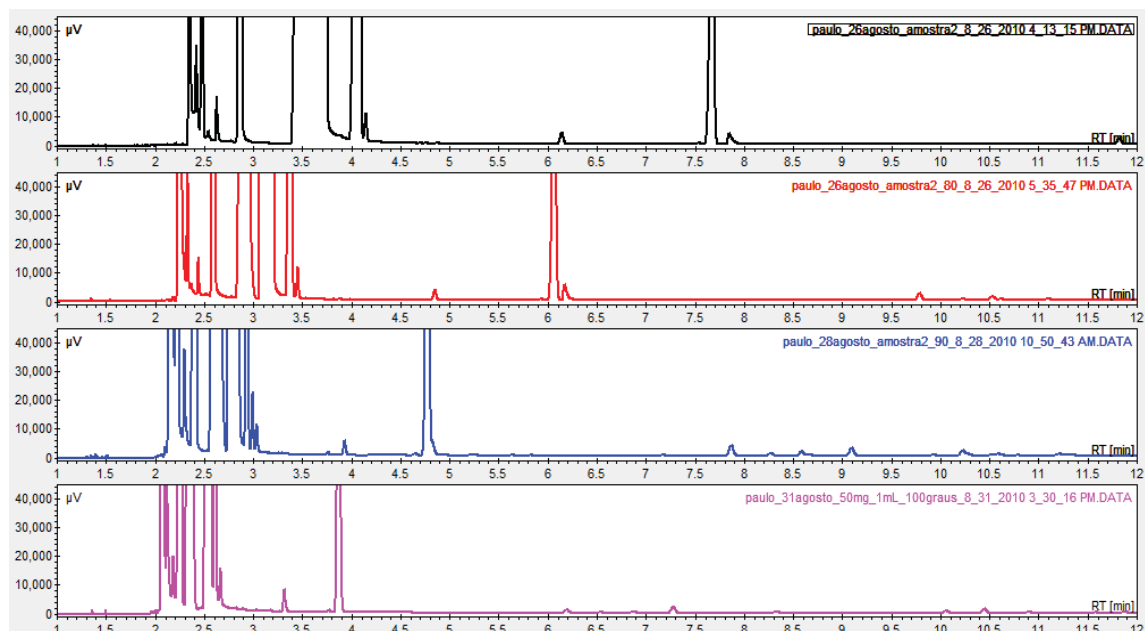


Figura 17. Cromatogramas obtidos com diferentes temperaturas iniciais de rampa de aquecimento do GC-FID. 70, 80, 90, 100° C respectivamente. Amostra: apenas reagentes e solventes, sem extrato vegetal.

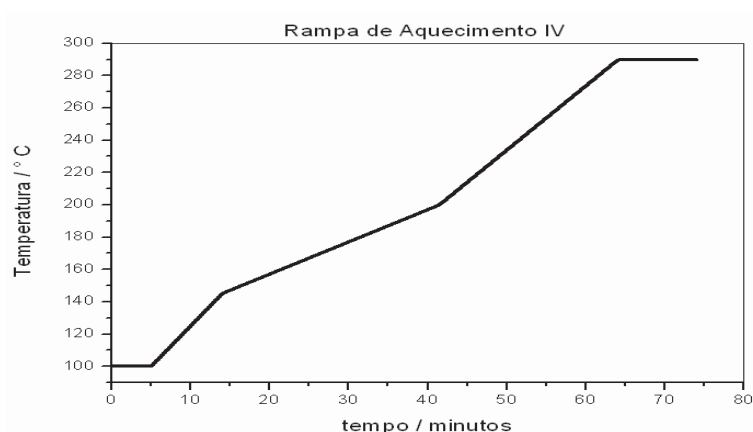


Figura 18. Rampa de aquecimento IV. 100° C por 5 minutos - 5° C/min – até 145° C – 2° C/min – até 200° C - 4° C/min - até 290° C por 10 minutos.

Como pode ser observado na figura 18, até o tempo de retenção de 4 minutos eluem os diversos solventes e reagentes utilizados na preparação das amostras. Portanto nas análises subsequentes serão suprimidos dos cromatogramas os picos eluídos antes de 4 minutos.

4.7 Análise do extrato aquoso de folhas de cana-de-açúcar por HPLC-DAD

Para avaliar eventual sobreposição entre os métodos cromatográficos em desenvolvimento no grupo para estudos metabólicos em cana-de-açúcar, o

extrato aquoso de folhas de cana-de-açúcar do cultivar RB3280, preparado segundo método descrito acima, foi analisado por HPLC-DAD, sem derivatização, utilizando as condições cromatográficas desenvolvidas por Gabriel M. Leme (item 4.2.2.2).

Os resultados mostraram uma grande quantidade de metabólitos que muitas vezes seriam difíceis de serem separados por cromatografia líquida devido a uma menor sensibilidade quando comparado com a cromatografia gasosa. Como o extrato é aquoso, os metabólitos eluíram no início da análise por HPLC em fase reversa. Já no tempo posterior a 40 minutos, não foi registrados picos significantes pertencentes a metabólitos extraídos das folhas da cana-de-açúcar.

A comparação dos cromatogramas obtidos para o extrato aquoso (condições desenvolvidas neste trabalho) e para o extrato hidro-alcoólico (preparado segundo as condições desenvolvidas por Gabriel M. Leme) demonstra sobreposição de picos cromatográficos entre 2 – 25 minutos, embora os perfis sejam diferentes (Figura 19). Este resultado revela a complementaridade dos métodos propostos.

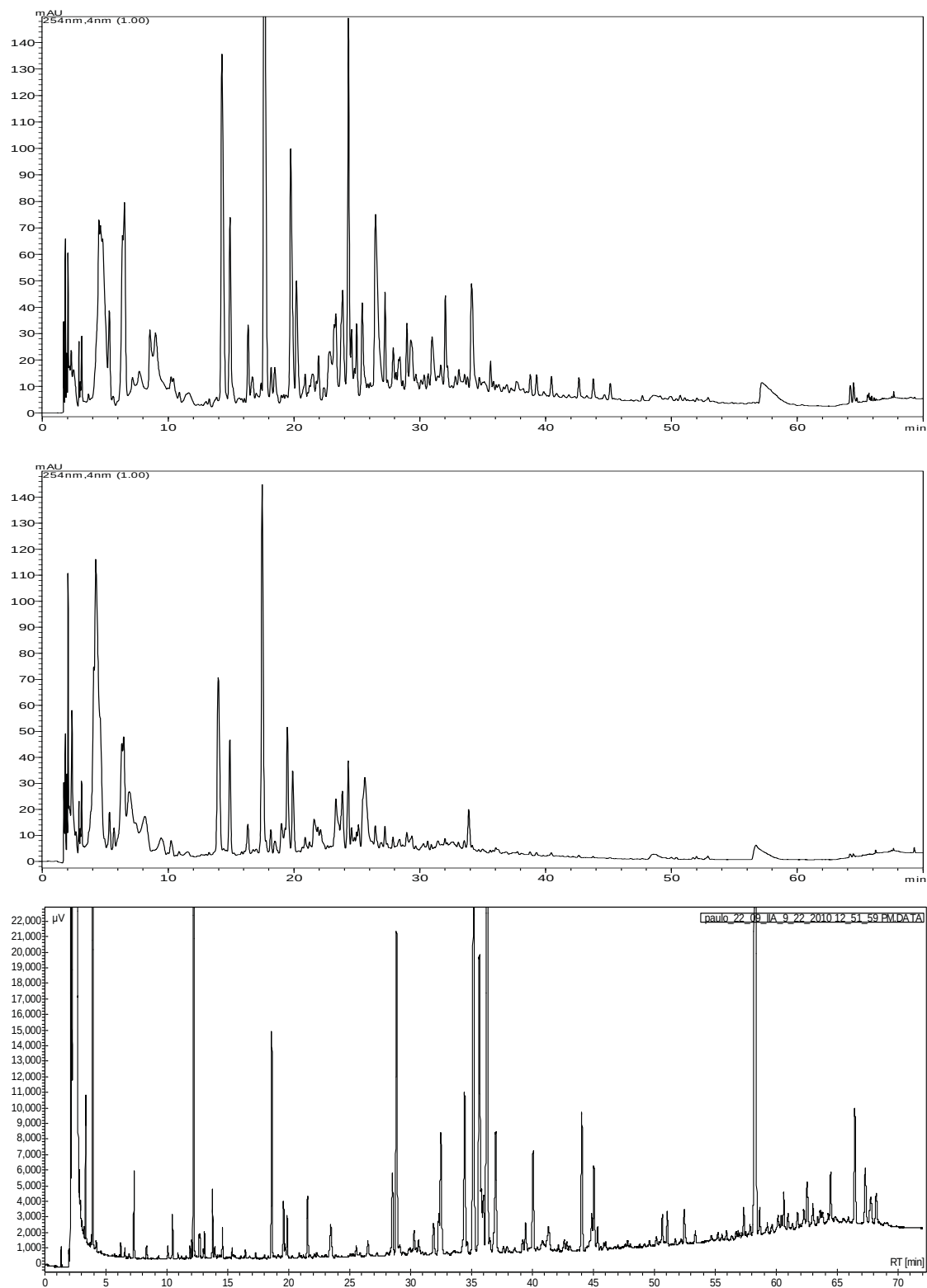


Figura 19. I- Cromatograma obtido por Gabriel M. Leme em seu trabalho de mestrado por HPLC-DAD para metabólitos secundários, do extrato hidro-alcoólico de folhas de cana-de-açúcar cultivar RB3280; II- Cromatograma obtido por HPLC do extrato aquoso de folhas, sem derivatização; III- Cromatograma obtido por GC-FID do extrato aquoso de folhas, após derivatização, na condição cromatográfica otimizada para metabólitos primários.

4.8 Incerteza da medição

A partir das análises realizadas com a injeção de solvente hexano, do branco da amostra e de um padrão de ribitol sililado, foi possível calcular a incerteza da medição do cromatógrafo e a partir daí, inferir que o sistema não apresentava erros que iriam influenciar nas análises. Assim, fez-se todas as injeções em triplicata e o tempo de retenção e a área do pico do padrão de ribitol foram usados como parâmetros para os cálculos da incerteza da medição. A Tabela 15 apresenta respectivamente os dados das médias, desvios e os coeficientes de variação do tempo de retenção e área do pico.

Tabela 15. Média, desvio padrão e coeficiente de variação dos tempos de retenção e área do derivado sililado do ribitol (n=3).

	Média	Desvio padrão (DP)	Coefic. de Variação (CV) (%)
tR (min.)	28,25	0,02	0,06
Área	42588,67	1516,75	3,56

Dessa forma, com esses resultados pode-se dizer que o erro apresentado para o sistema não se mostrou significativo tanto para o tempo de retenção com 0,06% de CV e o tempo de retenção com 3,56% de erro. Assim, os erros subsequentes não serão provenientes de fontes sistêmicas. A Figura 20 vem confirmar a autenticidade dos dados, uma vez que o cromatograma preto que representa a injeção do solvente, seguido do cromatograma vermelho referente ao branco da amostra não apresentam picos além daqueles do início da corrida atribuídos aos solventes e reagentes. E por fim, o cromatograma azul mostra apenas o pico referente ao ribitol sililado no tempo de retenção de 28,25 minutos.

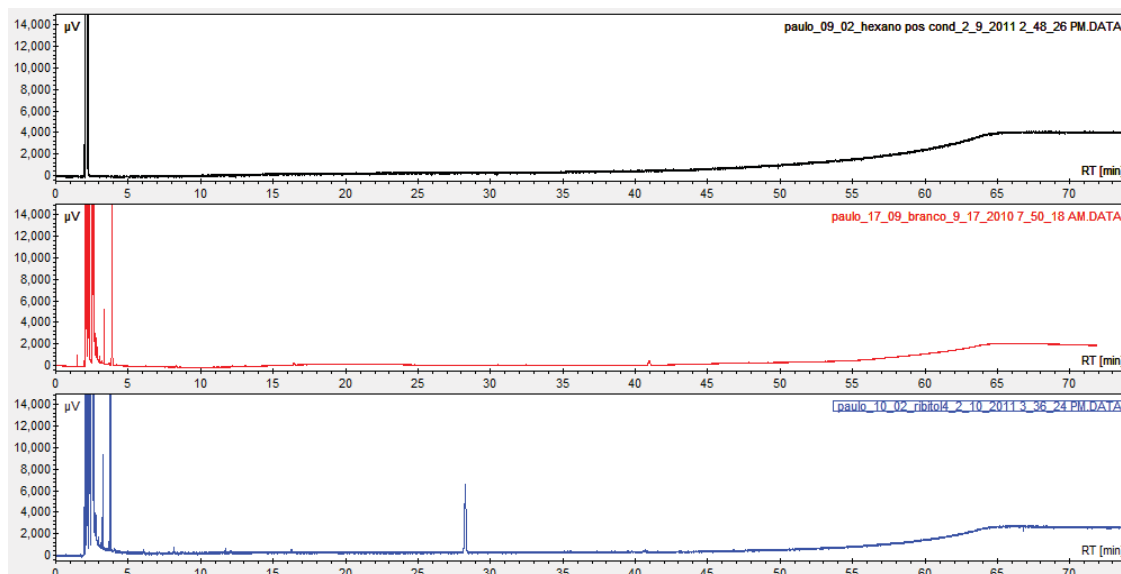


Figura 20. Cromatogramas obtidos para análises da incerteza da medição. De cima para baixo: solvente hexano, branco da amostra e branco da amostra com padrão interno (ribitol sililado).

4.9 Validação do método cromatográfico

As análises foram conduzidas por injeções sucessivas em cinco dias diferentes. Entre cada uma das injeções das amostras de folha de cana-de-açúcar no GC-FID era injetado inicialmente apenas solvente (hexano) para verificação da estabilidade do equipamento e ausência de contaminantes na coluna. Assim, como cada corrida cromatográfica possuía um tempo de 74 minutos, as injeções se iniciavam pela manhã de cada dia e eram finalizadas no período noturno.

Pela Tabela 16, verificou-se que o valor do coeficiente de variação percentual (CV) para o número de picos foi de até 2,6% para todos os dias. Segundo a legislação brasileira (ANVISA) não é aceitável valores superiores a 5%.

Tabela 16. Número de picos, desvios e coeficiente de variação das injeções em diferentes dias.

	1º dia	2º dia	3º dia	6º dia	7º dia
Média I	166,3	167,3			
Desv. Pad.	1,5	2,5			
C. V.	0,9	1,5			
Média II	167	165,7	165	166	165,7
Desv. Pad.	2,6	1,2	4,2	2,0	3,1
C. V.	1,6	0,7	2,6	1,2	1,8
Média III	167	167			
Desv. Pad.	1,0	2,4			
C. V.	0,6	1,5			

Já para as áreas totais dos cromatogramas o CV, para muitos casos, apresentou resultados muito altos, inviabilizando análises quantitativas nestas condições experimentais. Isso se deve provavelmente à falta de homogeneidade da amostra, temperatura do ambiente de trabalho e/ou a instabilidade das reações de derivação. A Tabela 17 apresenta as médias dessas áreas totais, os desvios e os coeficientes de variação percentual. Com esses resultados não foi possível efetuar os cálculos para o teste t-student, uma vez que os desvios se apresentaram muito altos.

Tabela 17. Áreas totais, desvios e coeficiente de variação das injeções em diferentes dias.

	1º dia	2º dia	3º dia	6º dia	7º dia
Média I	1913417,9	1099162,3			
Desv. Pad.	437360,5	133643,1			
C. V.	22,9	12,2			
Média II	2030032,2	2003024,7	2248594,4	1837516	1894211,2
Desv. Pad.	778474,2	446191,0	128124,6	704794,2	1113440,6
C. V.	38,3	22,3	5,7	38,4	58,8
Média III	1657266,18	2749165,9			
Desv. Pad.	586524,3	189240,9			
C. V.	35,4	6,9			

Para um melhor controle dos dados do número de picos, foram efetuados cálculos das médias totais de cada dia, levando-se em consideração todas as injeções da amostra I, II, III e por fim, fez-se o tratamento levando-se em consideração o teste t-student para um intervalo de confiança de 95%. A Tabela 2 em anexo apresenta os valores de t para esse intervalo de confiança.

4. 9. 1. Inter-amostra I, II e III

Para os cálculos da repetibilidade inter-amostra, foi calculado as médias totais, os desvios e os coeficiente de variação percentual dos dois primeiro dias de análise e os valores foram os seguintes:

Tabela 18. Médias totais, desvio padrão, C. V.

	1º dia	2º dia
Média total	166,8	166,7
Desv. Pad.	1,4	2,2
C. V.	0,8	1,3

Após a realização dos cálculos utilizando a Equação 1, foi possível verificar que todos os valores de t são menores que o da Tabela B, em anexo e assim os valores estão estatisticamente corretos. A Tabela 19 mostra os valores de t calculados para as três amostras.

Tabela 19. Valores de t para as três amostras

	1º dia	2º dia
Média I	0,68	0,66
Média II	0,19	1,71
Média III	0,41	0,39

4. 9. 2. Intra-amostra III

A amostra III foi injetada no cromatógrafo a gás em quintuplicata para verificação da repetibilidade intra-amostra. Assim, analisando as injeções apenas da amostra III e efetuando-se cálculos para o teste t-student é possível verificar também pela Tabela 21 que os valores estão aceitáveis quando se analisa as injeções sucessivas de uma mesma amostra.

4. 9. 2. Intra-dia II

Ainda para a validação da repetibilidade das injeções no GC-FID, foi analisada uma mesma amostra nos cinco dias diferentes. Quando apenas a amostra II é considerada, com suas médias diárias em relação a média total dos dias, tem-se a análise intra-dia das amostras. A Tabela 18 do item 5.9. apresenta os resultados das médias com do desvios e os coeficientes de variação percentual de cada dia em separado e o valor calculado para a média total da amostra II com o desvio padrão e o coeficiente de variação percentual são respectivamente 165,9, 2,3 e 1,4. Os cálculos para o teste t-student para cada um dos dias são apresentados na Tabela 20 usando para o calculo novamente a Equação 2.

Tabela 20. Valores de t para os cinco dias diferentes.

	1º dia	2º dia	3º dia	6º dia	7º dia
Amostra II	1,14	0,42	1,01	0,11	0,34

Da mesma maneira que os cálculos anteriores, quando se faz a análise intra-amostra por até 7 dias, o sistema se mostra estatisticamente estável em termos de número de picos, uma vez que os valores de t calculados são sempre menores que o tabelado.

4.10 Identificação dos metabólitos utilizando os padrões comerciais e o índice de Kovats na amostra de folhas cana-de-açúcar

Para as análises dos padrões de açúcares e ácidos orgânicos foi utilizado um cromatógrafo a gás Varian GC 3800 acoplado ao detetor Saturn MS/MS 2000 - Impacto eletrônico - analisador tipo Ion Trap com Autosampler CombiPal. Todos os metabólitos descritos na Tabela 3 foram analisados separadamente no GC-MS e a Figura 21 mostra os cromatogramas dos monossacarídeos derivatizados para verificação dos tempos de retenção e perfil desses metabólitos. Alguns desses padrões de açúcares apresentam dois picos cromatográficos, como é o caso da frutose e galactose, por exemplo. Isso ocorre pois há a formação dos estereoisômeros *syn* e *anti* dos derivados metoximados. Os espectros de massas obtidos são iguais para os dois picos cromatográficos.

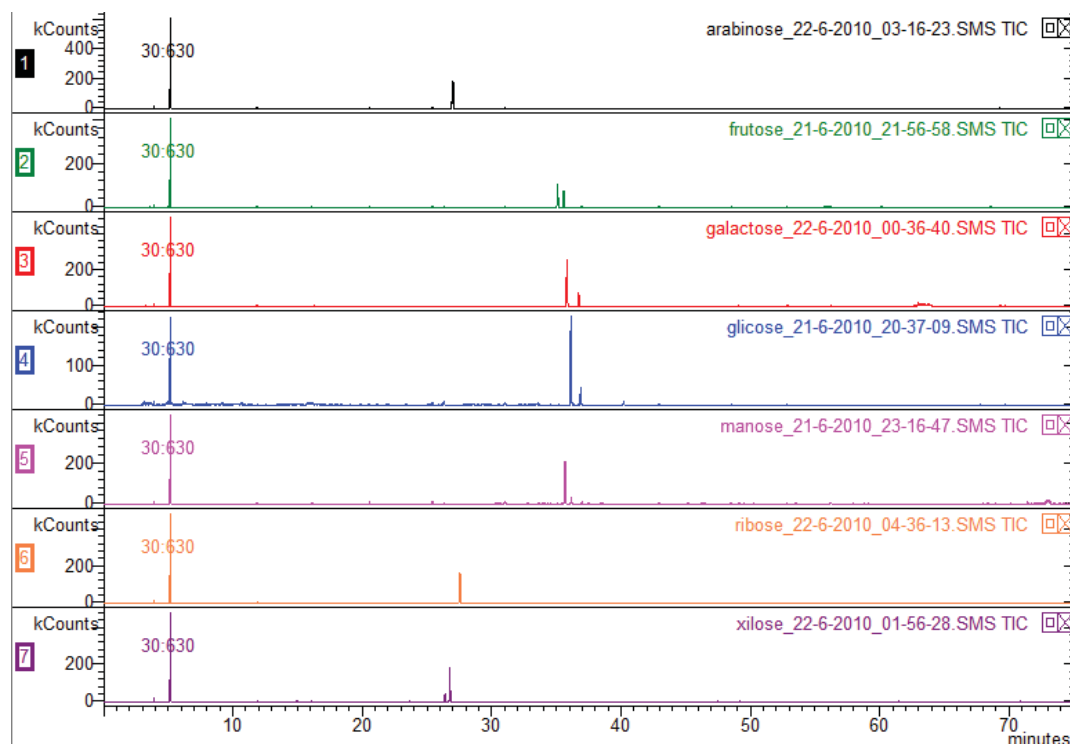


Figura 21. Cromatogramas obtidos via GC-MS dos padrões de monossacarídeos. arabinose, frutose, galactose, glicose, manose, ribose e xilose. Todos foram devidamente metoximados e a seguir trimetilsililados.

Para os ácidos orgânicos, o critério de análise foi exatamente o mesmo usado para as amostras e para os monossacarídeos. Todos os ácidos listados na Figura 22 foram analisados por GC-MS em separado para verificação dos seus tempos de retenção e espectros de massas.

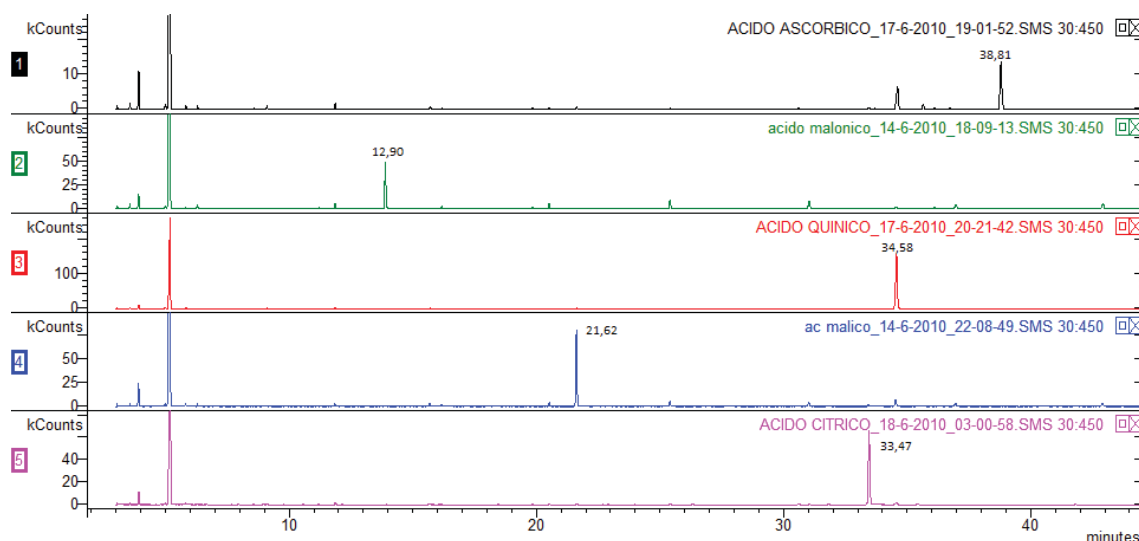


Figura 22. Cromatogramas obtidos via GC-MS para análise do perfil e do tempo de retenção de cada um dos ácidos orgânicos, injetados separadamente. De cima para baixo, ácido ascórbico, ácido malônico, ácido quínico, ácido málico e ácido cítrico trimetilsililados.

As figuras 23a e 23b mostram os cromatogramas sobrepostos e ampliados, permitindo melhor visualização do pico cromatográfico de cada um dos açúcares analisados. É possível verificar uma sobreposição de picos principalmente da manose-1 MOEX-5TMS e galactose-1 MOEX-5TMS que, por serem diastereoisômeros, acabam tendo tempos de retenção muito próximos.

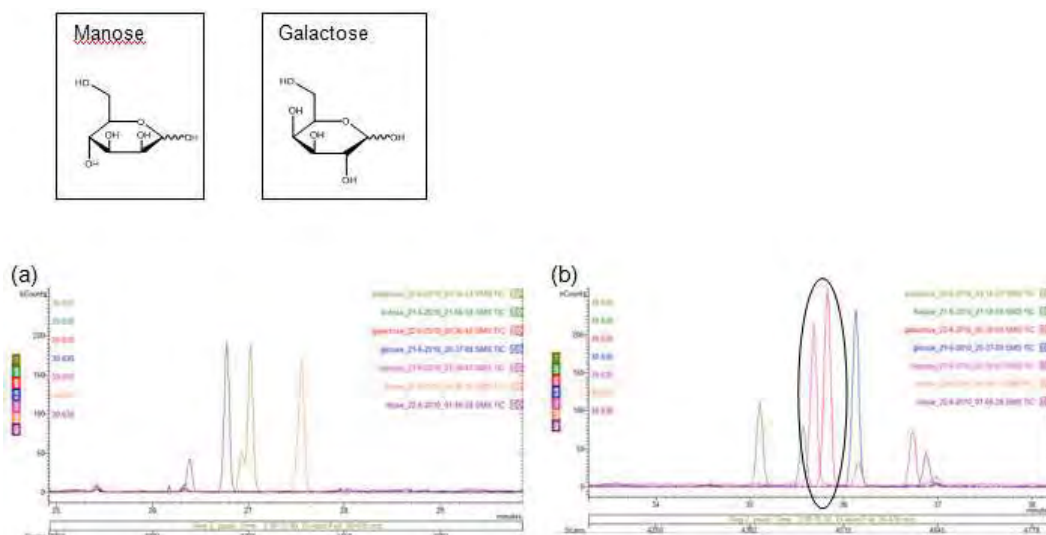


Figura 23. Ampliação dos cromatogramas dos padrões de açúcares – (a) xilose, arabinose e ribose; (b) frutose, manose, galactose e glicose. Todos foram devidamente derivados com o trimetilsilil.

A Tabela 21 apresenta o tempo de retenção de cada uma das micromoléculas analisadas e seus fragmentos principais.

Tabela 21. Tempo de retenção e fragmentação das micromoléculas

Micromolécula	Tempo de retenção (min.)	Fragmentação
Arabinose (1MEOX) (4TMS)	27,02	217*, 277, 307
Frutose (1MEOX) (5TMS)	35,11 - 35,56	217*, 307, 364
Galactose (1MEOX) (5TMS)	35,83 - 36,73	147, 217, 319*
Glicose (1MEOX) (5TMS)	36,12 – 36,88	147, 217, 319*
Manose (1MEOX) (5TMS)	35,68 – 36,16	147, 217, 319*
Ribose (1MEOX) (4TMS)	27,56	147, 217*, 307
Xilose (1MEOX) (4TMS)	26,39 – 26,78	217, 307*, 277
Acido ascórbico(4TMS)	38,81	147, 332*, 445
Acido malônico (2TMS)	12,90	147*, 332, 395
Acido quínico(5TMS)	34,58	255, 346*, 419
Acido málico	21,62	233*, 423
Ácido cítrico(4TMS)	33,47	146, 273*

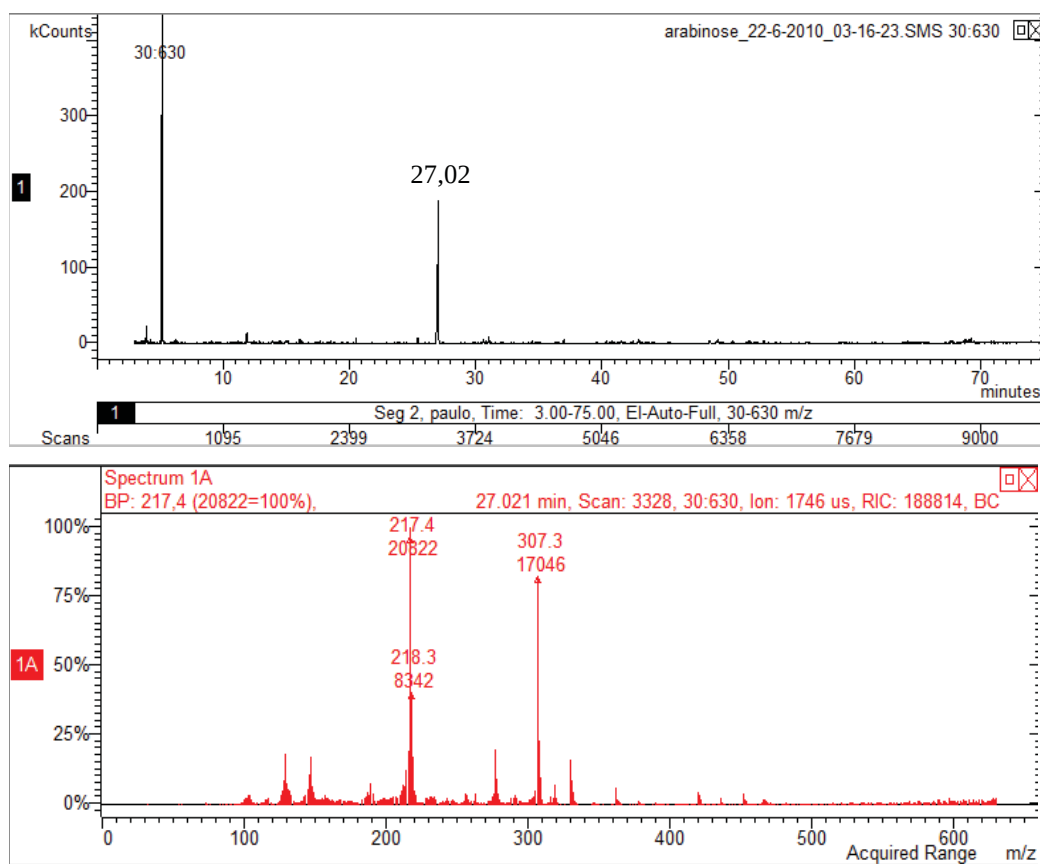
*íon principal

Para a identificação desses metabólitos foi utilizada a seguinte sequência de etapas (ou estratégia):

1. Cálculo do índice de Kovats para todos os picos observados nos cromatogramas GC-MS obtidos pra o extrato aquoso de folhas;
2. Busca na literatura de metabólitos identificados por GC-MS em estudos metabolômicos (Roessner et al 2000, Glassop et al 2007, Abu-Nada et al 2007, Xu et al 2010);
3. Busca na base de dados da GOLM METABOLOME DATABASE (Max Planck Institute of Molecular Plant Physiology – indicar site) dos metabólitos já descritos em estudos metabolômicos com seus respectivos índices de Kovats e espectros de massas;
4. Comparação dos dados obtidos na literatura e base GOLM co aqueles obtidos durante os estudos.
5. Identificação foi considerada positiva quando dados de retenção e espectro de massas foram concordantes.

A fragmentação de cada um dos padrões de açúcares foi analisada e comparada com a literatura. Como exemplo, segue a fragmentação da arabinose-

1MEOX 4TMS que elui no tempo de retenção de 27,02 minutos (Figura 24). A Figura 24 mostra o cromatograma do padrão, espectro do padrão e os espectros obtidos da literatura e o experimental (folha de cana-de-açúcar cultivar RB3280) respectivamente. Além dos valores do índice de Kovats serem próximos, os espectros de massas também são muito similares. Por esse motivos pode-se dizer que houve a identificação desse metabólito. Isso se deu para todos os outros compostos identificados, sendo que só era confirmada a identificação quando ambos parâmetros eram coincidentes com o da literatura, o índice de Kovats e o espectro de massas.



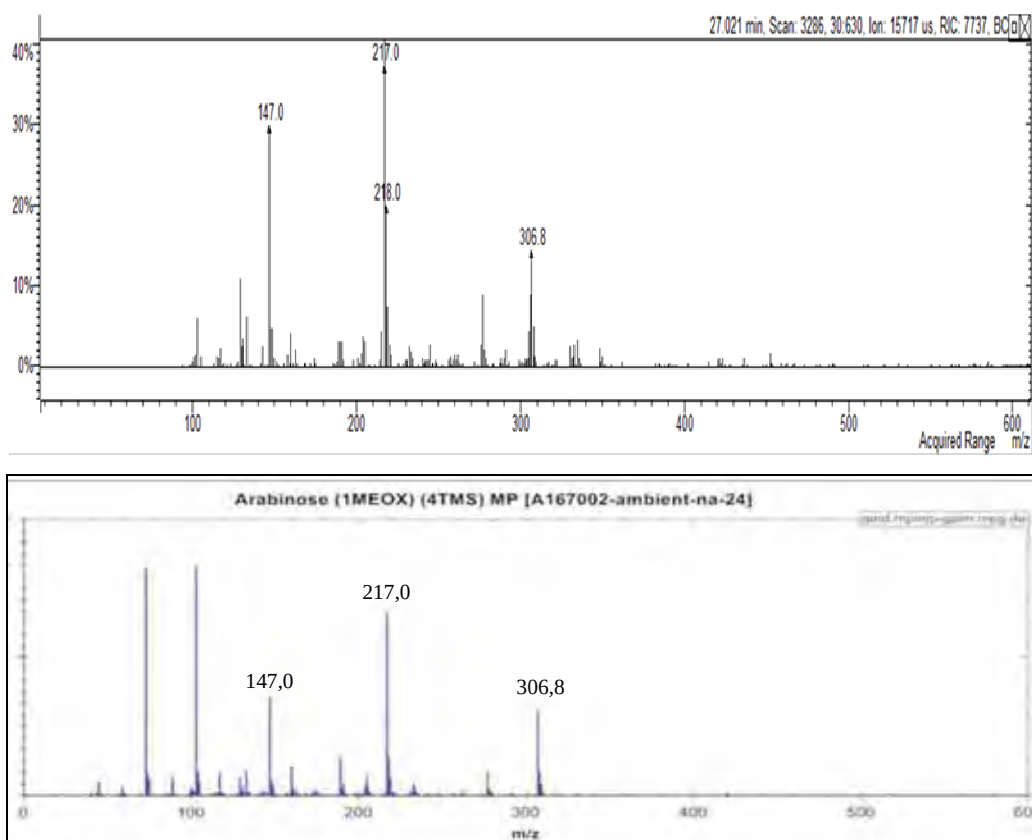


Figura 24. Cromatograma obtidos via CG-MS do padrão arabinose-1MEOX-4TMS, seu espectro de massas e os espectros obtidos da literatura e o experimental (folha de cana-de-açúcar cultivar RB3280) respectivamente.

Como descrito na Tabela 3, a massa molecular da arabinose-1MEOX-4TMS é 467,24 que corresponde a molécula de arabinose com quatro hidroxilas trimetilsililadas e uma carbonila metoximada. Existe a presença do pico do íon molecular no fragmentograma, porém esse se encontra pouco intenso. Na Figura 25 é apresentada a fragmentação desse composto, levando ao pico referente a m/z 307,3 e a seguir ao pico m/z 217,4. Esse dois valores de massa obtidos na fragmentação da arabinose também foram encontrados nas outras pentoses como ribose e xilose. Isso acontece, pois esses monossacarídeos são todos isômeros e, portanto acabam tendo vias de fragmentações muito similares, justificando sua diferenciação através dos tempos de retenção cromatográficos.

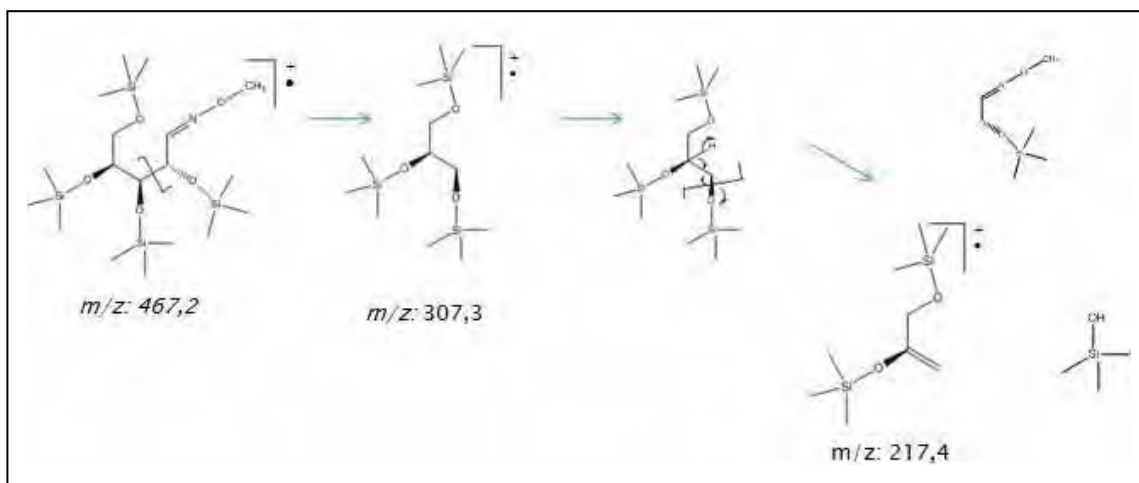
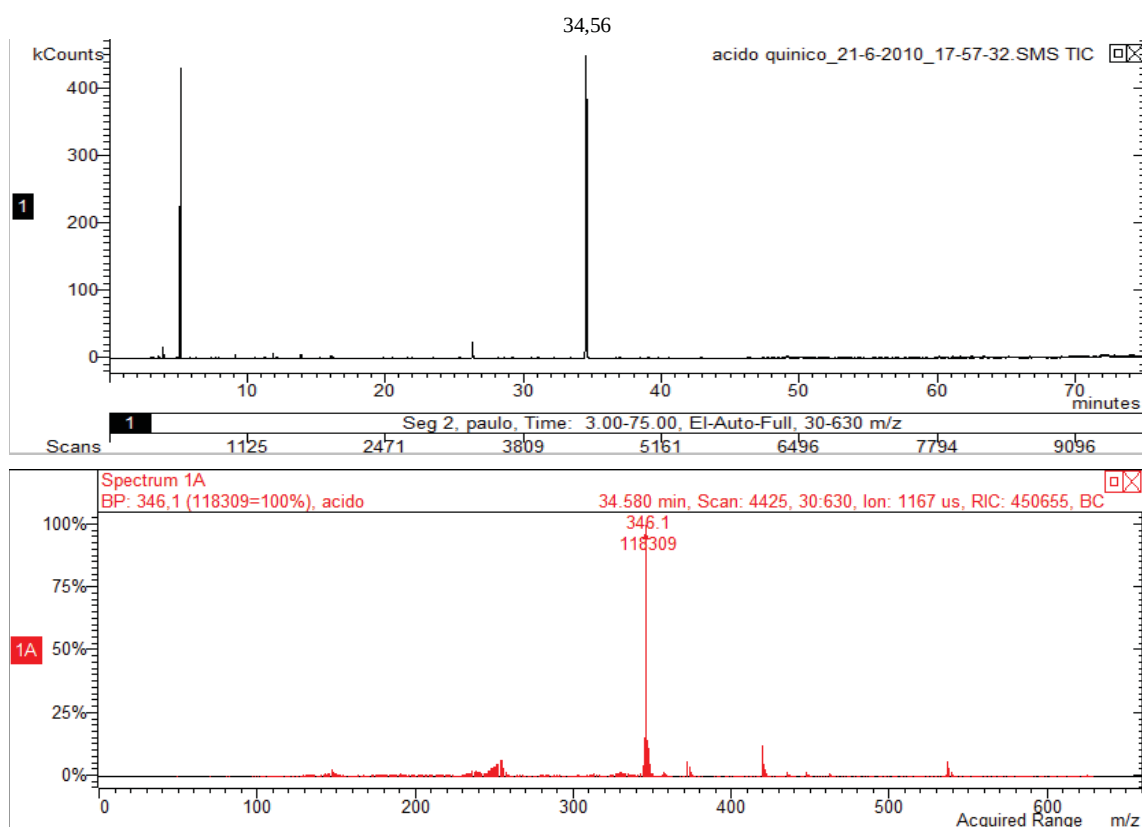


Figura 25. Prováveis estruturas das fragmentações correspondentes à arabinose

Ainda para ilustrar a identificação deste trabalho, tem-se um exemplo para os ácidos orgânicos: Ácido quínico 5TMS que mais uma vez teve os valores de índice de Kovats próximo e espectros parecidos com o da literatura. Assim, foi utilizado o mesmo tratamento com esse metabólito que elui no tempo de retenção de 34,56 minutos (Figura 26).



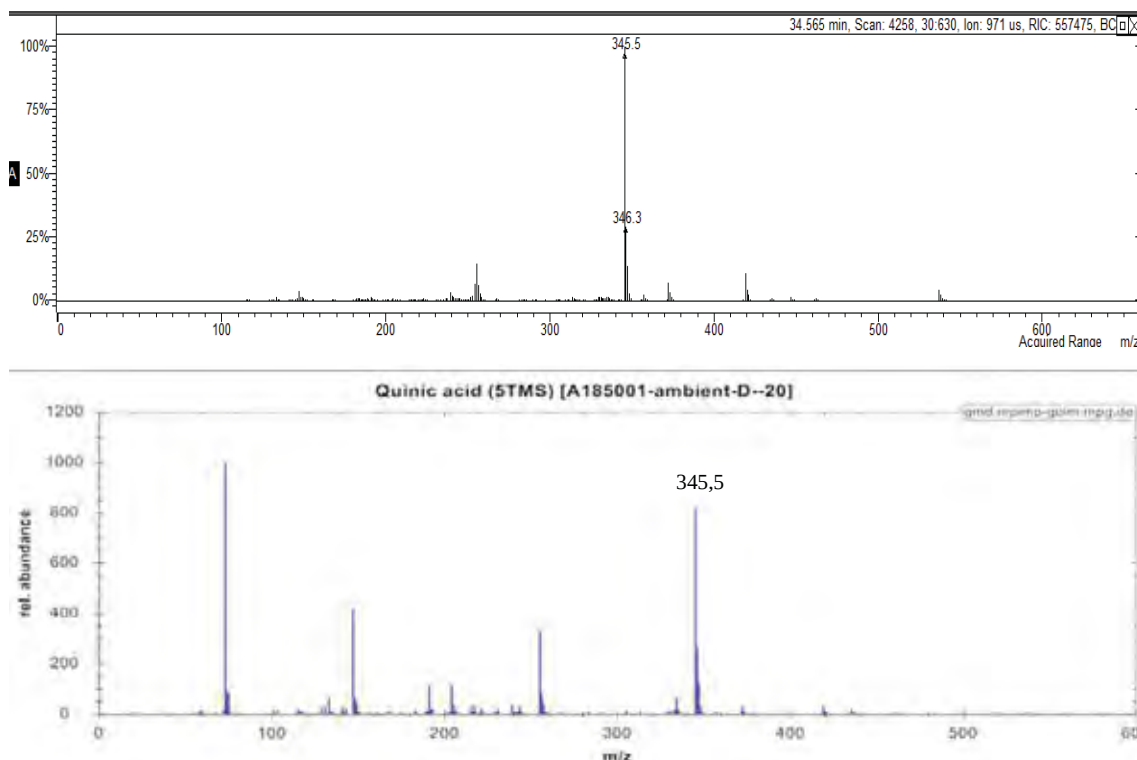


Figura 26. Cromatograma obtidos via CG-MS do padrão ácido quínico 5TMS, seu espectro de massas e os espectros obtidos da literatura e o experimental (folha de cana-de-açúcar cultivar RB3280) respectivamente.

De acordo com o espectro obtido, pode-se se dizer que o ácido quínico-5TMS não apresentou o pico do íon molecular correspondente a m/z 552,1. A única fragmentação apresentada corresponde à molécula de ácido quínico subtraída de $\text{COOSi}(\text{CH}_3)_3$ mais a subtração de algum dos quatro grupos $-\text{OSi}(\text{CH}_3)_3$. A Figura 26 apresenta essa proposta. Pode ocorrer a perda de qualquer um desses grupos silanoxi para a massa chegar a 346,1.

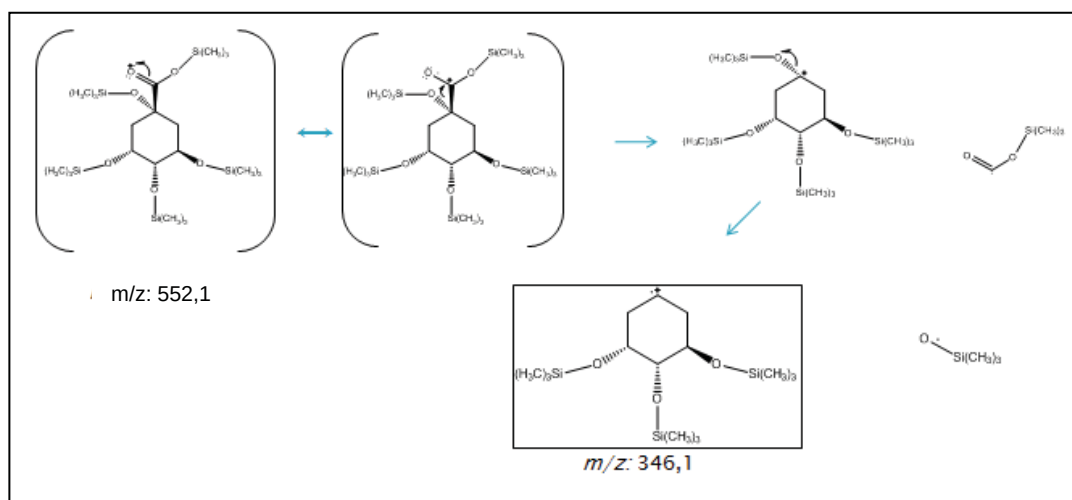


Figura 27. Prováveis estruturas das fragmentações correspondentes ao ácido quínico derivado.

Para os aminoácidos o mesmo procedimento foi feito e como exemplo tem-se a isoleucina que depois de derivatizada ficou isoleucina 2 TMS. A Figura 28 apresenta os espectros de massas da literatura e o obtido respectivamente. Assim como para a xilose, a isoleucina apresentou resultados próximos tanto para o valor do índice de Kovats como para os espectros de massa.

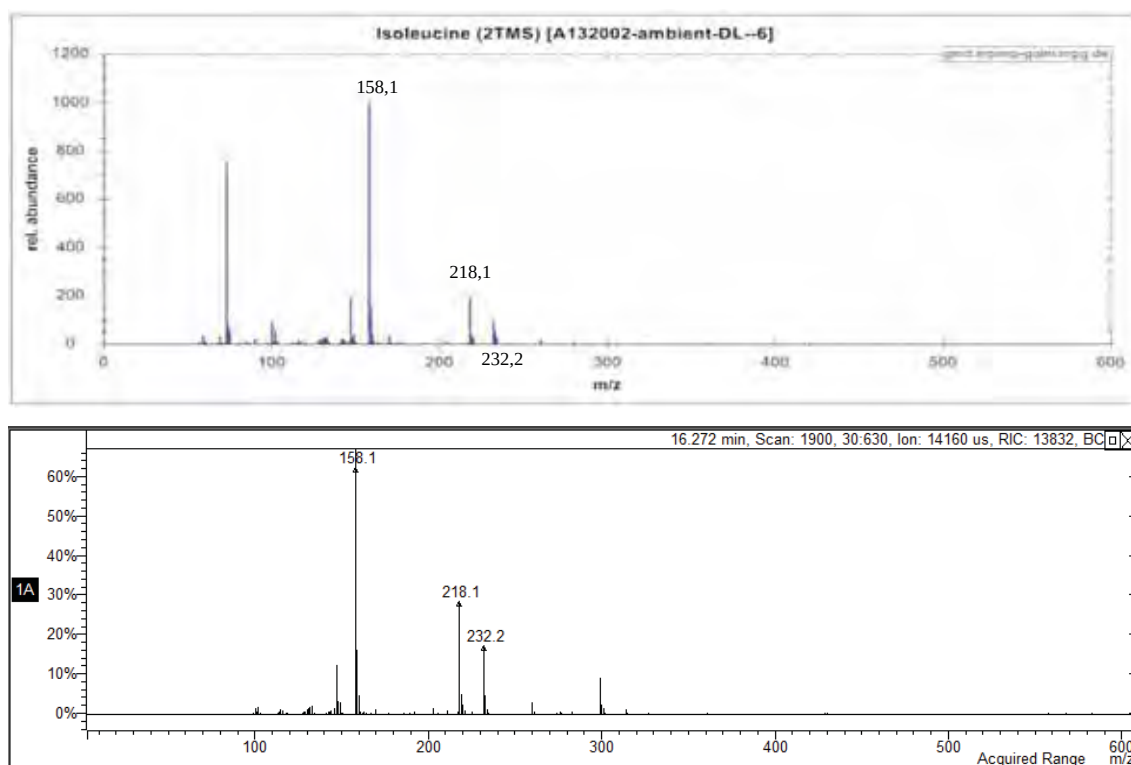


Figura 28. Espectros de massas da Isoleucina 2TMS da literatura e o obtido durante os estudos respectivamente.

Dos 154 picos detectados na análise cromatográfica acoplada ao espectrômetro de massas, foram identificados 47 metabólitos derivatizados utilizando alguns padrões de açúcar e ácidos orgânicos comerciais, conjuntamente com os dados cromatográficos de retenção (índices de Kovats) e espectros de massas.

A Tabela 22 apresenta os metabólitos identificados juntamente com os índices calculados, os índices da literatura (Golm Metabolome Database) e os íons principais provenientes da fragmentação.

Tabela 22. Metabólitos identificados no extrato aquoso de folhas de cana-de-açúcar, por GC-MS utilizando índices de retenção, espectros de massas e comparação com padrões comerciais.

Metabólito	I _{lit}	I _{cal}	Picos principais m/z	tR (min.)
Ácido malônico 2TMS *	1207	1193	147, 232, 131, 173	13,91
Serina 2TMS	1255	1252	147, 189, 131, 115	15,34
Glicerol 3TMS	1267	1264	147, 205, 218, 129	15,66
Isoleucina 2TMS	1287	1288	158, 218, 147, 102	16,27
Prolina 2TMS	1297	1294	142, 216, 147, 299	16,47
Glicina 3TMS	1298	1304	174, 248, 147, 276	16,59
Alanina 2TMS	1360	1350	188, 262, 147, 100	18,02
Homoserina 2TMS	1354	1355	147, 116, 130, 100	18,11
Treonina 3TMS	1377	1379	218, 291, 147, 117	18,74
Ácido glutárico 2 TMS	1403	1401	147, 157, 184, 260	19,45
Ácido aspártico 2TMS	1418	1421	217, 134, 147, 143	19,86
Eritrose 1MEOX 3TMS	1436	1440	117, 232, 147, 349	20,37
Homoserina 3TMS	1440	1443	218, 128, 147, 292	20,47
Oxaloacetato1MEOX 2TMS	1461	1465	232, 147, 262, 162	21,05
Ácido málico 3TMS *	1483	1478	133, 147, 233, 265	21,64
Eritritol 4TMS	1491	1494	147, 217, 117, 205	21,88
Putrecina 3TMS	1505	1509	179, 147, 131, 306	22,28
Metionina 2TMS	1515	1515	218, 188, 292, 147	22,59
L-hidroxiprolina 3TMS	1519	1519	232, 147, 188, 306	22,73
Asparagina 3TMS	1525	1525	156, 230, 147, 258	22,91
Cisteina 3 TMS	1556	1551	147, 117, 221, 133	23,92
Ácido glutâmico 3TMS	1616	1617	246, 230, 128, 147	25,93
Asparagina 4TMS	1623	1622	218, 192, 147, 258	26,19
Ácido 4hidroxibenzóico 2TMS	1630	1632	267, 223,193, 282	26,45
Xilose 1MEOX 4 TMS *	1639	1645	147, 217, 128, 246	26,77
Arabinose 1MEOX 4 TMS *	1646	1654	147, 217, 306, 128	27,00
Ribose 1MEOX 4 TMS *	1660	1668	217, 147, 307, 129	27,54
Ribitol 5TMS **	1698	1702	217, 147, 277, 319	28,92
Xilitol 5TMS	1715	1696	217, 319, 147, 129	29,07
Ácido 2 aminoadipico 3TMS	1711	1711	259, 147, 217, 333	29,46
Glutamine 4TMS	1717	1724	216, 147, 205, 174	29,68
Ácido ribônico 5TMS	1742	1752	292, 333, 217, 147	30,70
Ácido cítrico 4TMS *	1810	1806	375, 347, 147	33,47
Ácido quinico 5TMS *	1836	1845	345, 255, 419, 147	34,56

Frutose 1MEOX 5 TMS *	1850	1857	217, 307, 277, 364	35,13
Manose 1MEOX 5 TMS*	1870	1861	217, 307, 364, 147	35,58
Galactose 1MEOX 5 TMS *	1866	1876	319, 147, 217, 129	35,83
Glicose 1MEOX 5TMS *	1874	1883	319, 217, 147, 129	36,15
Manitol 6TMS	1911	1916	147, 217, 319, 205	37,74
Tirosina 3TMS	1933	1934	218, 280, 354, 147	38,68
Ácido ascórbico 4TMS *	1946	1939	293, 249, 308, 333	39,22
Ácido galactônico 6TMS	1986	1985	305, 319, 147, 292	40,92
ácido glucônico 6TMS	1987	1990	317, 147, 292, 137	40,99
Inositol 6TMS	2017	2010	204, 319, 217, 147	42,31
Ribose 5-fosfato 1MEOX 5TMS	2095	2100	319, 147, 129, 217	45,84
Histidina 4TMS	2141	2145	191, 396, 249, 147	47,47
Ácido glicoheptanoico 7TMS	2254	2252	129, 147, 290, 319	51,55
Frutose 6-fosfato 1MEOX 6TMS	2294	2294	204, 217, 191, 147	52,81
Glicose 6-fosfato 1MEOX 6TMS	2316	2309	331, 217, 147, 191	53,45

*além do índice de Kovats, esses padrões foram identificados por comparação com padrões comerciais. ** padrão interno; MEOX, metoxima. TMS, trimetilsilil.

4.11 Análise dos extratos por cromatografia Bidimensional – GC-2D

O método desenvolvido foi transferido para as análises bidimensionais sem nenhuma alteração em termos de preparo de amostra e condições cromatográficas da primeira dimensão (D1). Essas análises foram realizadas com o intuito de complementar esse trabalho que tinha como foco principal desenvolver um método de extração abrangente com condições cromatográficas apropriadas para o monitoramento do maior número de metabólitos possíveis. Assim os perfis do extrato do cultivar RB3280 derivatizado, do mix de açúcares e do mix de aminoácidos foram traçados por GC-FID utilizando as condições definidas. A Figura 29 apresenta os cromatogramas em ¹D, sendo que o perfil do cultivar RB3280 derivatizado é muito próximo do que era obtido em análises no GC-FID convencional.

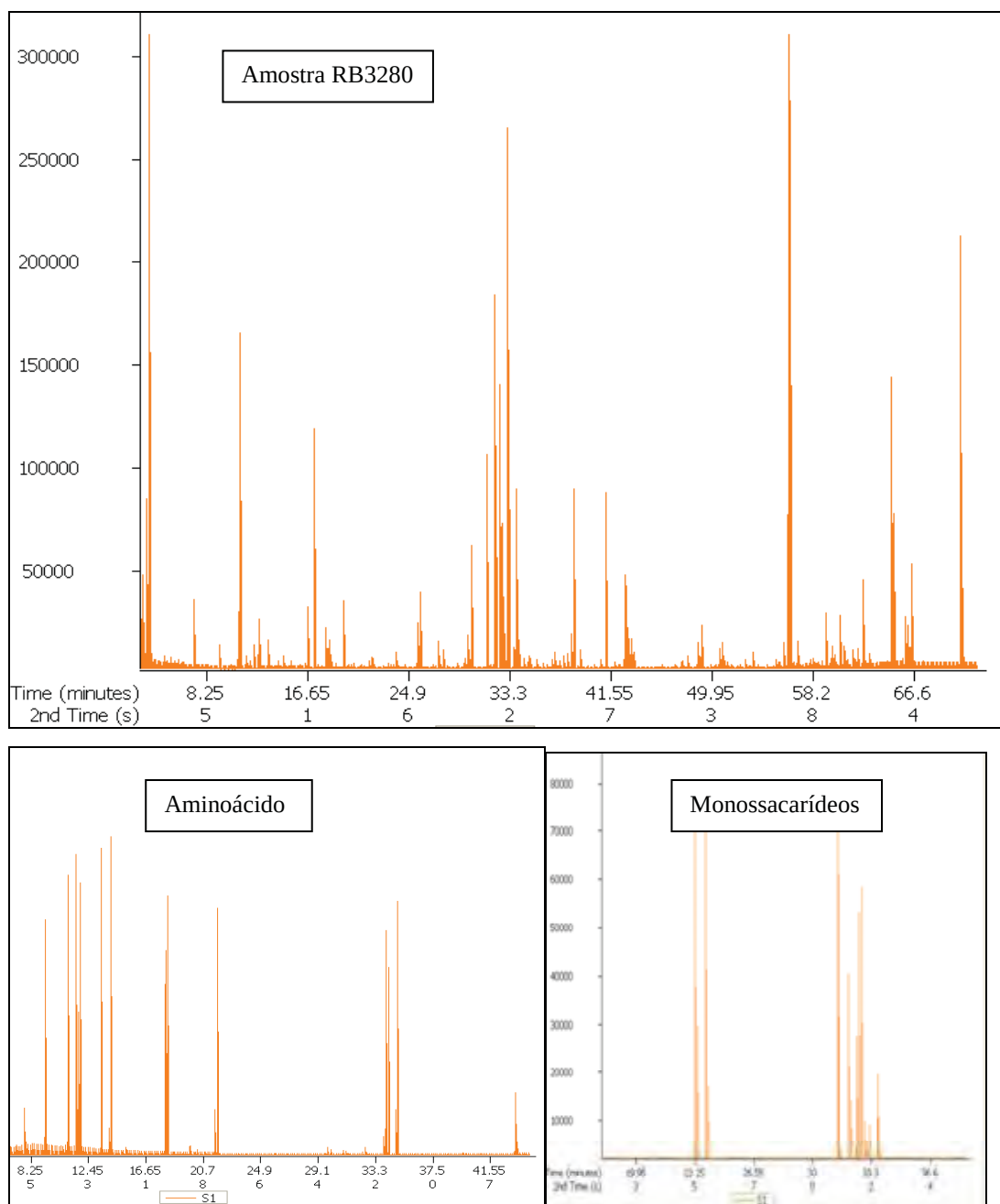


Figura 29. Cromatogramas obtidos via GC-FID 2D. Perfil apresentado em ¹D.

Quando se analisa as amostras nas duas dimensões, é gerado um diagrama tridimensional no com maior capacidade de picos, permitindo maior resolução dos componetes de misturas com grande complexidade (Figura 30). Na cromatografia convencional (GC-FID) muitos desses picos são coeluidos, o que torna as identificações muito complicadas.

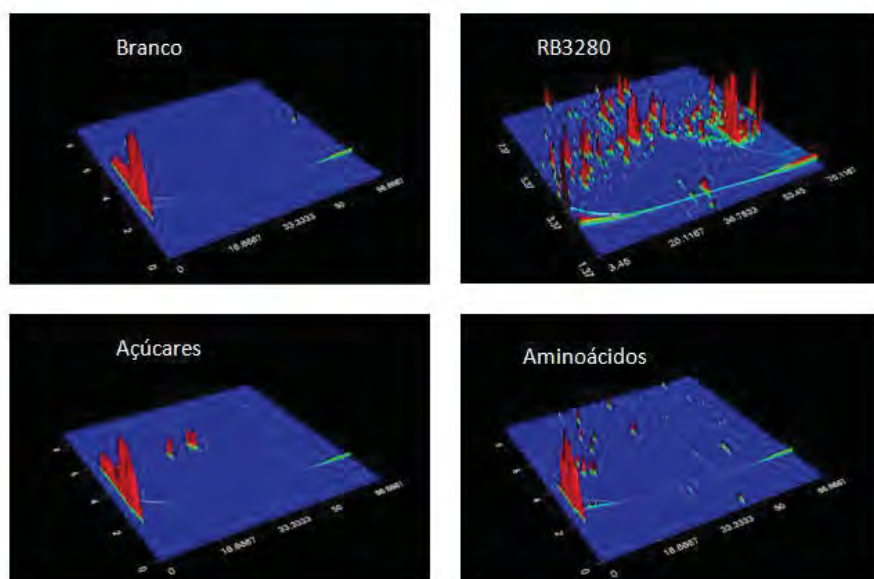


Figura 30. Diagrama tridimensional. Branco, RB3280, Açúcares e Aminoácidos.

Analisando o perfil do padrão de açúcares comparativamente com a amostra, é possível confirmar a presença de vários açúcares derivatizados na amostra do cultivar RB3280 uma vez que, as “manchas” no diagrama de cores coincidem (Figura 31).

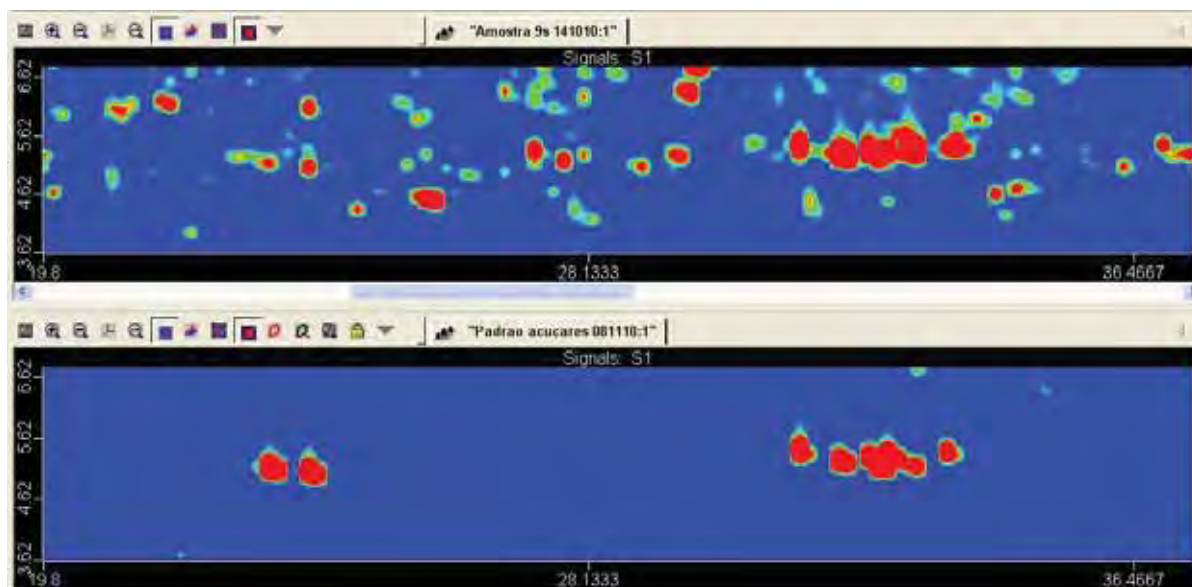


Figura 31. Diagrama de cores. Zoom da amostra comparativamente com o padrão de açúcar.

O mesmo procedimento foi efetuado com o kit de padrões de aminoácidos. O diagrama de cores foi analisado com o RB3280 e também, assim como os açúcares, da para afirmar que há a presença de aminoácidos na amostra (Figura 32).

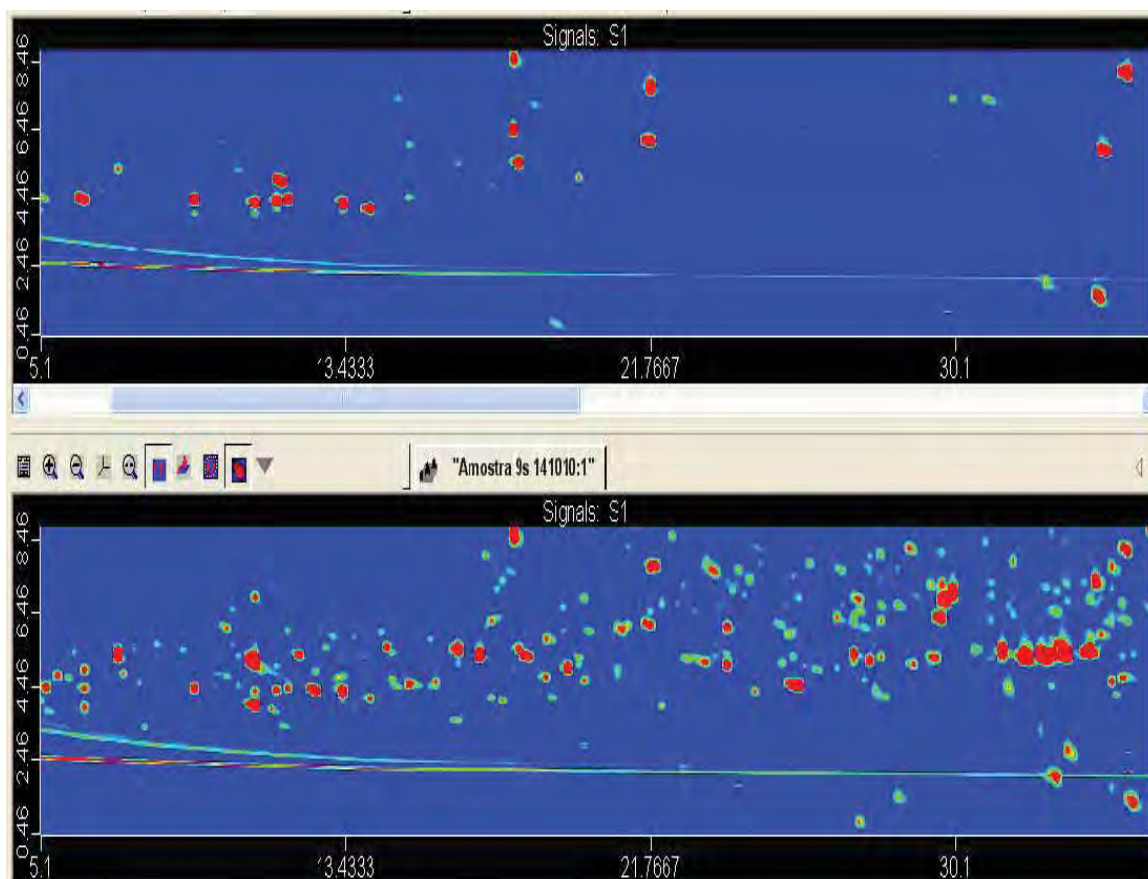


Figura 32. Diagrama de cores. Zoom da amostra comparativamente com o padrão de aminoácidos.

Além disso, a amostra de folha de cana, cultivar RB3280, foi analisado por GC-TOF-MS-2D o que forneceu uma grande quantidade de informações importante mas que não serão mostradas aqui. O cromatograma que na cromatografia convencional apresentou cerca de 200 picos, apresentou nessas condições com duas colunas um número superior a 2000 picos. Obviamente que muitos desses picos são duplicados devido à modulação, mas através de uma *Workstation* dedicada para essas análises, uma vez que o tamanho dos arquivos gerados com os espectros de massas são muito extensos e uma bases de dados completa será possível identificar uma maior quantidade de metabólitos.

4.12 Aplicação da metodologia. Experimento de cultivo de cana-de-açúcar em condição de alto CO₂.

Os experimentos de cultivo em condições controle, isto é, níveis atuais de CO₂ (390 ppm) e condição de alto CO₂, simulando uma condição futura (750 ppm) foram conduzidas no IB-USP, pela doutoranda Amanda Pereira de Souza. Nesse experimento foi utilizado o cultivar SP80-3280. A primeira análise realizada envolveu comparação dos perfis cromatográficos dos cultivares RB3280, utilizado no desenvolvimento do método cromatográfico, e SP80-3280. Como pode ser observado na Figura 33, o perfil cromatográfico de ambos os cultivares é qualitativamente semelhante, com variações expressivas nas intensidades de alguns constituintes, indicando que o método desenvolvido pode ser aplicado também a estes dois cultivares. Vale lembrar que esta comparação não é indicativa de diferenças absolutas entre os dois cultivares, uma vez que tal comparação foi feita com apenas uma amostra de cada tipo.

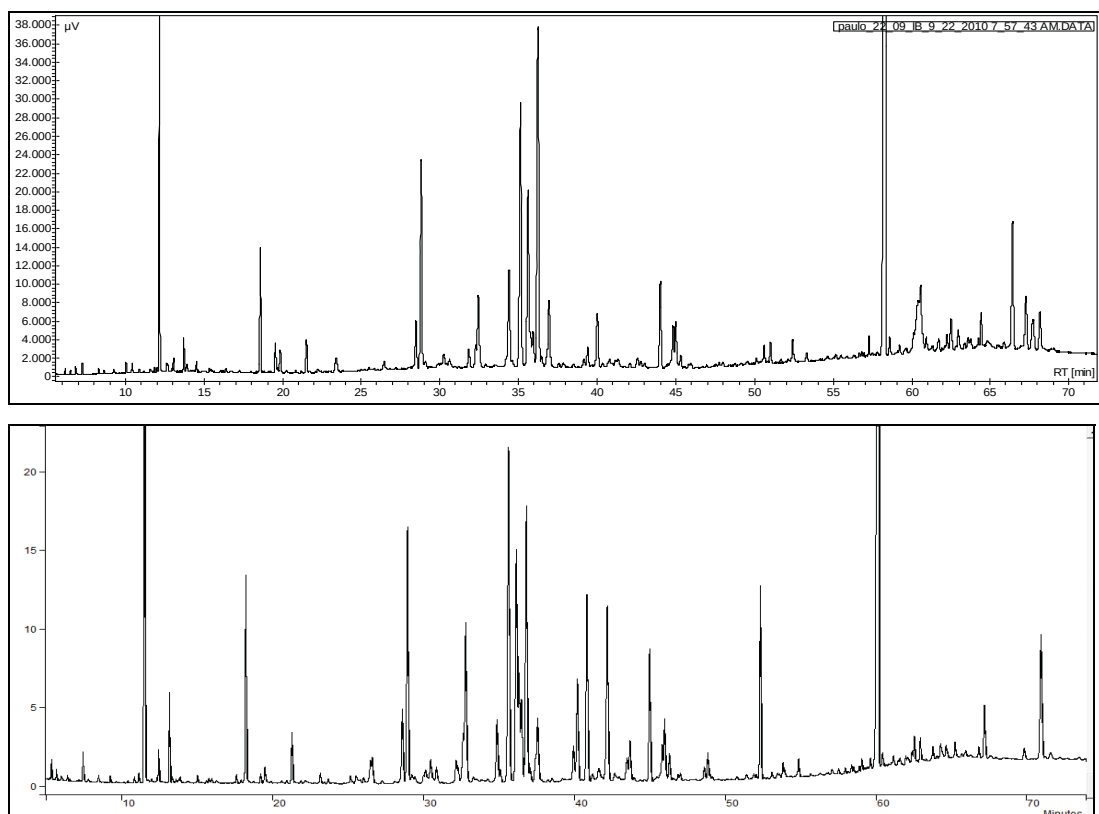


Figura 33. Perfil cromatográficos semelhantes dos cultivares RB3280 e SP80-3280 respectivamente.

Assim, as amostras obtidas de folhas de cana-de-açúcar nos experimento de cultivo com atmosfera controlada, com 390 e 750 ppm de CO₂, foram analisadas por GC-FID, nas condições cromatográficas estabelecidas.

Os métodos quimiométricos são especialmente indicados para a comparação de cromatogramas de matrizes complexas, envolvendo centenas de compostos, da mesma forma que outros sinais instrumentais (Ferreira 2010). A vantagem em se usar os perfís cromatográficos diretamente, isto é, os pontos de leitura do detetor, ao invés dos tempos de retenção e áreas dos picos, é a possibilidade da extração de informações adicionais que não são computadas quando apenas as áreas de picos são consideradas. Em cromatogramas complexos como os obtidos nestes experimentos, não há resolução completa da maioria dos picos cromatográficos, dificultando muito a obtenção dos valores de áreas. Entretanto, para a aplicação das técnicas quimiométricas, os cromatogramas devem ser adequadamente pré-tratados.

Um aspecto importante a ser considerado quando se analisa diretamente os cromatogramas (como perfis) é o deslocamento de picos que ocorre com frequência, em decorrência de variações na temperatura, idade da coluna, pequenas variações na vazão da fase móvel e diferentes maneiras de injeção da amostra. O pré-tratamento aplicado a fim de corrigir esses deslocamentos é o alinhamento dos picos dos cromatogramas.

Os 16 cromatogramas, obtidos pela análise em duplicata de amostras de folhas de cana-de-açúcar cultivadas em duas condições de CO₂ (ambiente com 390 ppm e alto teor de CO₂ com 750 ppm) e amostradas com 4 idades distintas (30, 45, 60 e 70 dias) foram alinhados utilizando software MATHLAB (Figura 34). Esse alinhamento foi baseado na existência de um cromatograma de referência, a partir do qual os outros foram alinhados. No alinhamento foram considerados os dados contidos no intervalo entre 5 e 75 min, eliminando-se os picos iniciais atribuídos a solventes e resíduo de reagentes. Todos os 16 cromatogramas obtidos neste experimento estão apresentados no anexo 3.

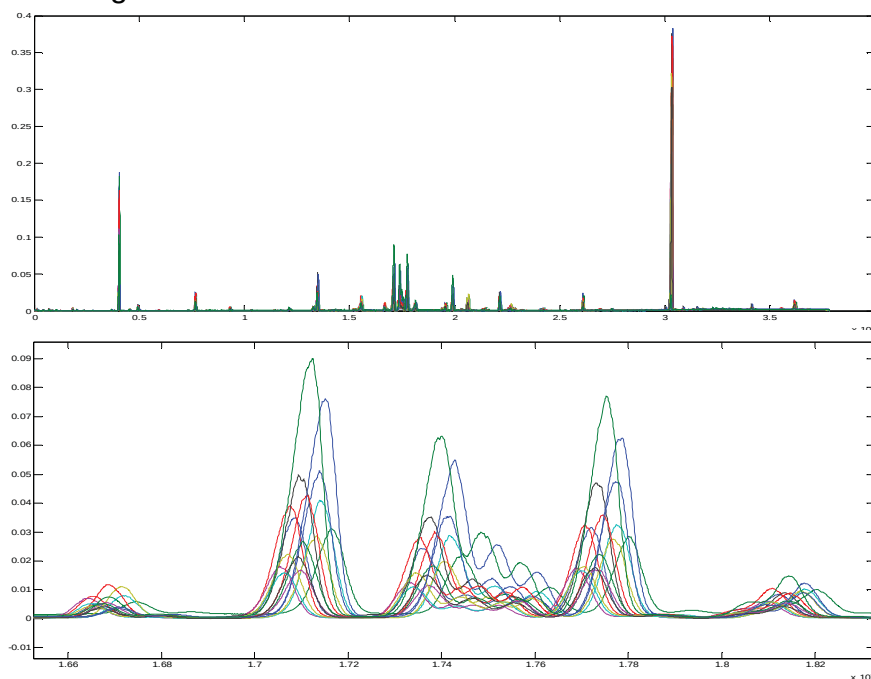
Os dados cromatográficos obtidos foram organizados na forma de matrizes X ($I \times J$), onde I são as linhas (amostras) e J colunas (variáveis). As variáveis foram as intensidades (em mV), a cada 50 ms de corrida cromatográfica. O processamento dos dados foi realizado empregando o *software Mathlab 7.10.0* (The Math Works, Co., Natick, MA, USA) e o pacote computacional *PLS-Toolbox* (Eigenvector

Research, Inc.). A Análise de componentes principais (PCA – Principal Component Analysis) foi utilizada como método exploratório (Ferreira *et al* 1999) (Figura 34).

Os dados cromatográficos foram submetidos as etapas de pré- tratamento e processamento. A etapa de pré- tratamento consistiu no alinhamento dos cromatogramas empregando o algoritmo COW – Correlation optimized warning (Nielsen, Cartensen & Smedsgaard, 1998; Tomasi, Berg & Andersson, 2004) disponível na página <http://www.models.kvl.dk/users/rasmus/>. O algoritmo COW alinha um cromatograma desalinhado (xd) a partir de outro de referência (xr). O alinhamento torna-se necessário, devido ao deslocamento de picos, devido principalmente as variações de temperatura, composição e vazão da fase móvel e idade da coluna, inerentes ao sistema cromatográfico.

A qualidade do alinhamento foi construída a partir da união dos parâmetros m (comprimento do segmento) e s (slack-parâmetro de distorção), os quais foram obtidos através da análise multivariada empregando a decomposição dos valores singulares (SVD). Os parâmetros selecionados foram 50 para o comprimento do segmento e 4 para o slack. A matriz original (17 x 40001) foi reduzida para (17 x 37837).

Cromatogramas desalinhados.



Cromatogramas alinhados.

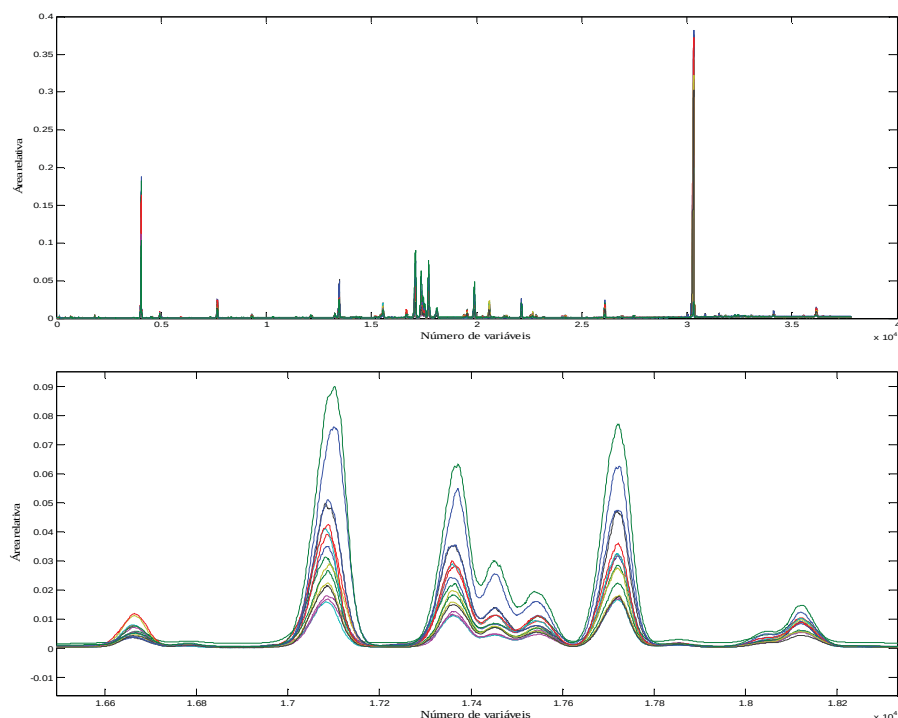


Figura 34. Cromatogramas sobrepostos e alinhados nas 8 condições diferentes de cultivo.

Para a análise exploratória de componentes principais (PCA), também através do software MATHLAB, foram utilizados como variáveis cada ponto de aquisição (cerca de 40.000), e não as áreas dos picos. Primeiramente os picos dos solventes foram excluídos da análise. Desta forma, foram utilizados na análise comparativa as informações contidas entre 5 e 75 minutos de cada cromatograma.

Na primeira análise de componentes principais foram utilizadas as 16 amostras obtidas, sem pré-tratamento de suas variáveis. O gráfico de scores (PC1 x PC2) indica nítida separação das amostras 15 e 16, replicadas da condição 750 ppm de CO₂ – 75 dias. Também é possível observar que as amostras 6 e 10 estão distantes das respectivas replicatas, amostras 5 e 9, indicando algum problema com a precisão nessas análises. O restante das amostras pertencem a um mesmo grupo (Figura 35).

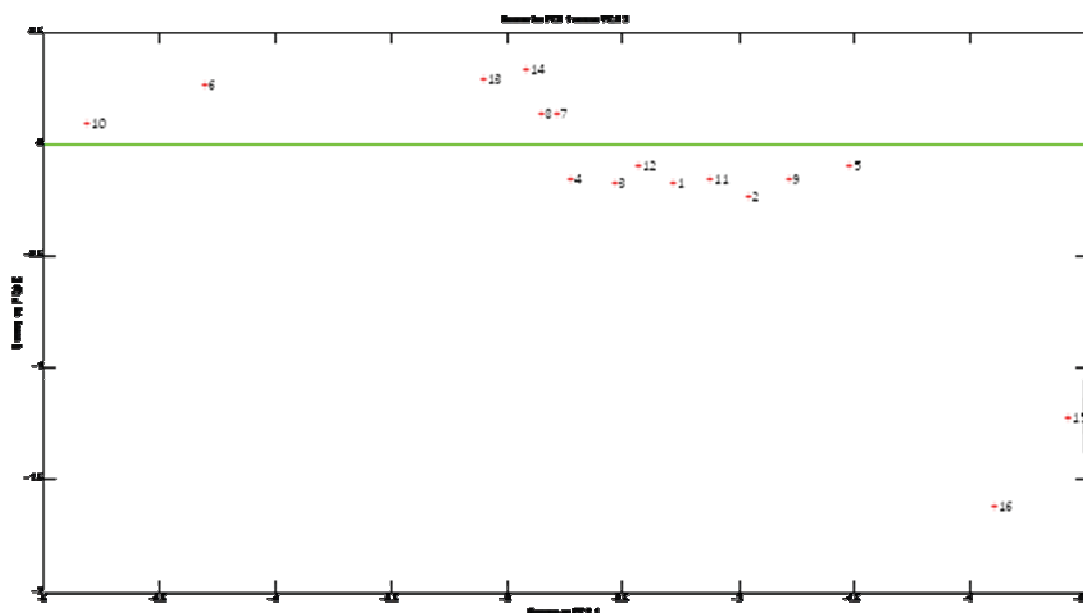


Figura 35. Análise de componentes principais (PC1 x PC2) envolvendo as 16 amostras de folhas de cana obtidas em experimento de cultivo com atmosfera controlada, sendo: 1/2,3/4, 5/6 e 7/8 amostras a 390 ppm de CO₂, em duplicada, com 30, 45, 60 e 90 dias de idade, respectivamente; 9/10, 11/12,13/14 e 15/16 amostras em 750 ppm de CO₂, com 30, 45, 60 e 90 dias de idade, respectivamente.

Pode ser também observado no gráfico de *scores* que há um tendência a separação dos indivíduos em função da idade, principalmente entre aqueles cultivados a 390 ppm de CO₂ (amostras 1 a 8).

O gráfico de *variáveis x loadings* (Figura 36), indica que as variáveis (picos) diretamente relacionados com a classificação obtida na análise de componentes principais.

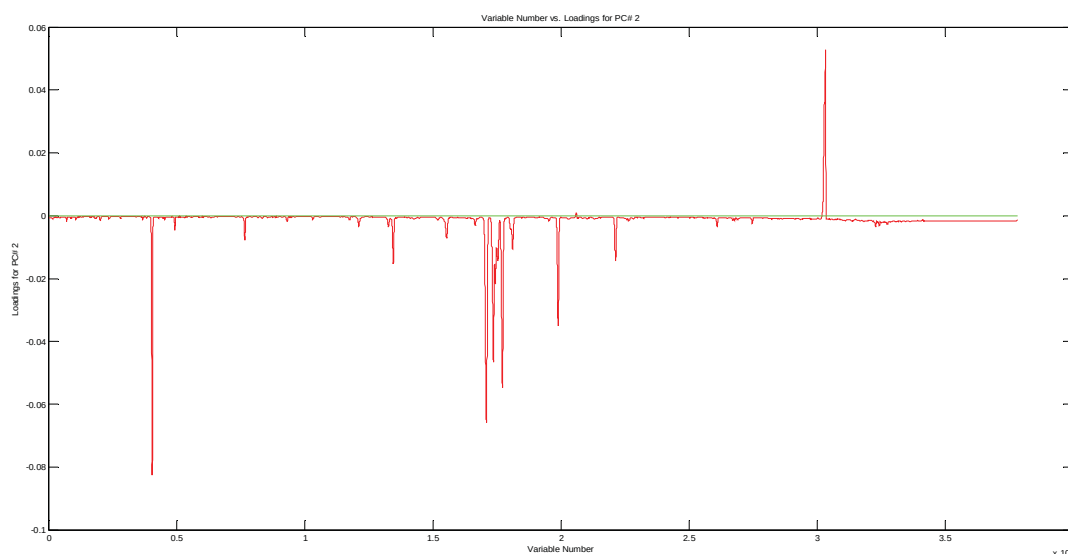
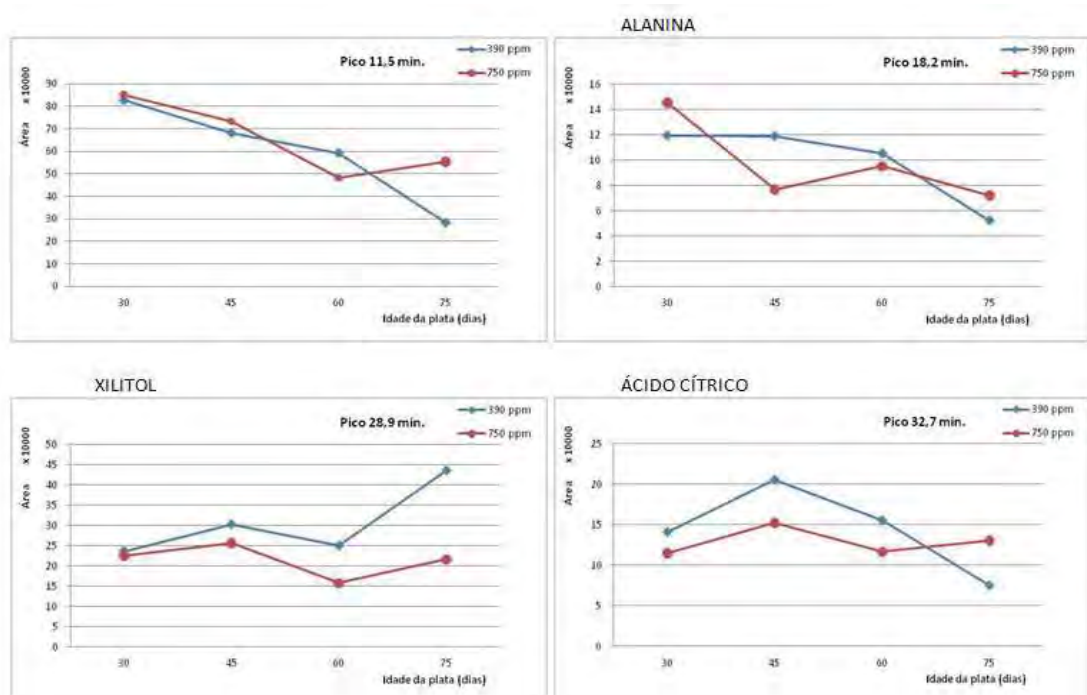
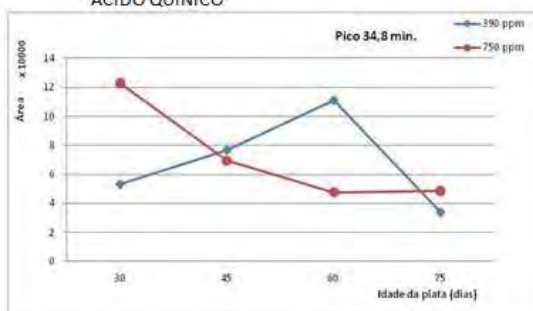


Figura 36. Gráfico de variáveis x loadings para a análise de componentes principais das 16 amostras de folhas de cana.

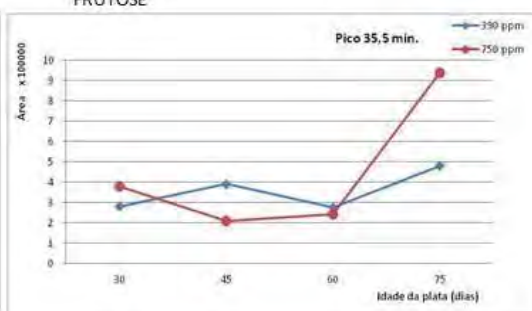
Outra análise realizada teve por objetivo avaliar o comportamento das principais variáveis, agora consideradas como picos cromatográficos, na dimensão idade da planta e na dimensão teor de CO₂ atmosférico. Após correção das áreas em função de variações na área do padrão interno (ribitol, tR = 28,5 min), foi calculada a área média das duplicatas para cada pico cromatográfico destacado na análise de variáveis x loadings (Figura 36). Os gráficos obtidos estão ilustrados na figura 37,



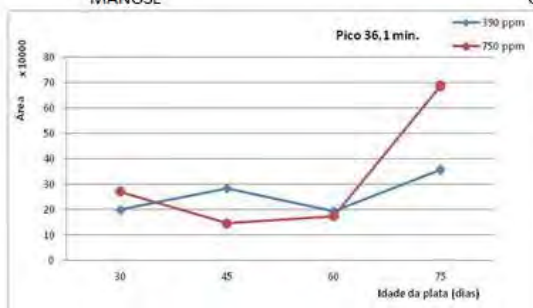
ÁCIDO QUÍNICO



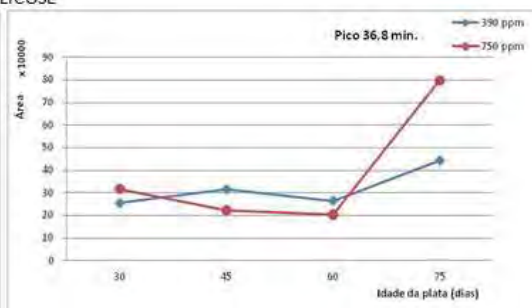
FRUTOSE



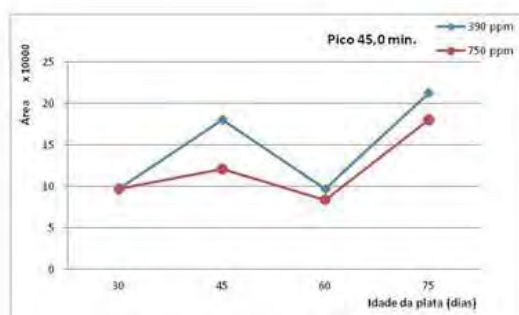
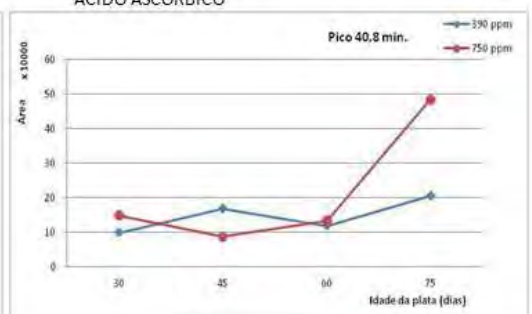
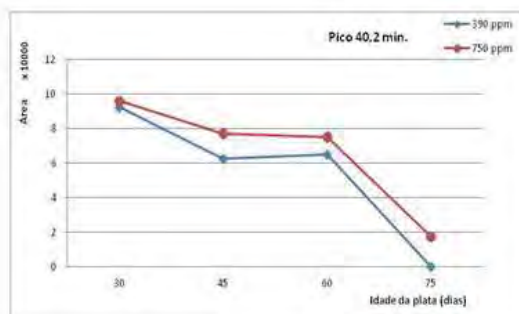
MANOSE



GLICOSE



ÁCIDO ASCÓRBICO



RIBOSE-5P

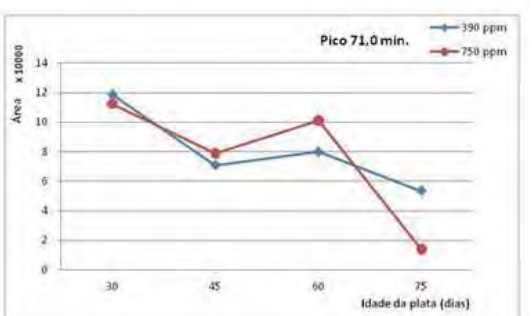
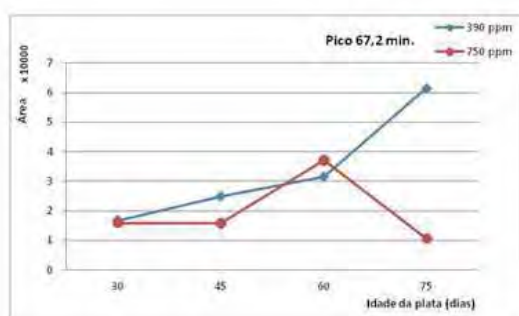
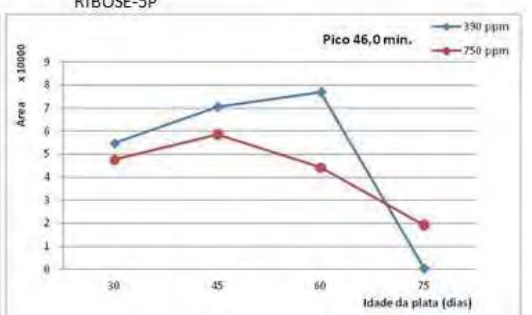


Figura 37. Gráfico de tendências, demonstrando a variação na área dos principais picos cromatográficos, alguns preliminarmente identificados, em função da idade da planta e do nível de CO₂ atmosférico. Cada ponto é a média das duas replicatas.

Nesta análise observa-se um grupo de picos cromatográficos com tendência a diminuição de área (e consequentemente de teor da substância correspondente na folha) com a idade da planta, independentemente da condição de CO₂ utilizada. Entre estes se destacam os picos em 11,5 (ni), 18,2 (alanina), 34,8 (ácido quínico), 40,2 (ni), 46,0 (ribose-5-P), 52,3 (frutose-6-P) e 71,0 (ni) minutos. Outro grupo de picos apresenta tendência inversa, isto é, aumento da área com a idade do vegetal – estão incluídos neste grupo os picos em 28,9 (xilitol), 35,5 (frutose), 36,1 (manose), 36,8 (glicose) e 40,8 (ácido ascórbico) e 45,0 (ni) minutos, nos quais essa tendência de aumento do teor com a idade da planta é mais pronunciada nos indivíduos cultivados em 790 ppm de CO₂. O pico em 45,0 minutos (ni) apresenta ligeira tendência de aumento com a idade, mas de forma similar nas duas condições do experimento de cultivo. Há ainda dois picos (tr = 60,1 e 67,2 minutos) que apresentam tendências opostas entre as condições experimentais de CO₂ atmosférico, principalmente nas plantas mais velhas, diminuindo drasticamente de intensidade nas amostras 15 e 16 (790 ppm de CO₂ – 70 dias), quando comparados a amostras de mesma idade (8 e 9) cultivadas em 390 ppm de CO₂.

5. CONCLUSÕES

O estudo das condições de extração de metabólitos micromoleculares polares de folhas de cana-de-açúcar, utilizando planejamento multivariado e superfície de resposta, permitiu selecionar água como melhor solvente extrator, além de ajustes nas demais condições de extração, que incluíram proporção material vegetal/solvente, tempo e temperatura de extração, modo de extração (maceração simples, sonicação e maceração com aquecimento).

Para a análise desse extrato polar por GC-MS, devidamente derivatizado (metoximado e sililado) de acordo com procedimento descrito por Roessner et al, (2000) foram otimizadas as condições cromatográficas incluindo programação de temperatura do forno, razão de split. Sob essas condições otimizadas foi possível observar cerca de 200 picos, refletindo a complexidade da amostra. No entanto, nos testes de validação do método proposto a excelente reprodutibilidade obtida para número de picos e para os tempos de retenção não se manteve quando foram comparados as áreas dos picos, indicando que o processamento dos cromatogramas e a utilização de várias replicatas deve ser mandatório nesse tipo de análise.

A identificação de vários constituintes do extrato foi realizada a partir da utilização de índices de retenção, espectros de massas e comparação com padrões comerciais de monossacarídeos, aminoácidos e ácidos carboxílicos. Foram identificados 49 metabólitos. Testes iniciais foram realizados com o uso de GC bidimensional abrangente, onde verificou-se excelente perspectiva de ampliação do número de analitos que podem ser monitorados.

Para um teste mais completo do método proposto, foram analisadas 8 amostras, obtidas em duplicata, de folhas de cana-de-açúcar cultivadas em duas concentrações atmosféricas de CO₂ (390 e 750 ppm). Análise desses cromatogramas demandou o uso de técnicas quimiométricas, que incluíram alinhamento de picos e análise de componentes principais. Os resultados dessas análises indicaram nítida diferenciação das amostras cultivadas sob 750 ppm de CO₂, após 75 dias de exposição a esta condições. Essa diferenciação foi justificada principalmente pela diminuição significativa do pico em $t_r = 60,1$ minutos, ainda não identificado.

A análise das intensidades dos principais picos cromatográficos observados nos cromatogramas do extrato aquoso desse experimento de cultivo indicam variação ontogenética para vários metabólitos, durante o desenvolvimento da planta. A maioria dessas variações foi similar nas suas condições de cultivo. Destaca-se que os monossacarídeos mostraram tendência de aumento de teor mais expressivo nas amostras cultivadas sob 750 ppm de CO₂. De modo contrário, o pico mais intenso observado nos cromatogramas de plantas mais jovens apresenta valores muito diminuídos em amostras de folhas de indivíduos mais velhos cultivados em alto CO₂.

6. PERSPECTIVAS DE ESTUDO

Este estudo foi mais revelador das dificuldades de implantação de método cromatográfico para análise de matrizes complexas, como extratos vegetais, do que conclusivo. Como perspectivas ficam a necessidade de aprimoramento e talvez simplificação dos procedimentos de preparação das amostras, aumento no número de replicatas e de amostras para os experimentos de cultivo. Há também a necessidade de identificação do maior número possível de constituintes dos extratos polares de cana-de-açúcar. A criação de um banco de dados contento tempos e índices de retenção em pelo menos duas colunas, espectros de massas e a utilização de GC bidimensional são passos que devem ser dados a seguir.

Além disso, maior exploração das possibilidades de tratamento de dados e análises quimiométricas deve ser realizada.

Contornado esses problemas, esse método poderia, em princípio, ser aplicado a estudos de ecofisiologia, não só de cana-de-açúcar, mas também estendível a outras espécies vegetais.

REFERÊNCIAS

- AIDAR, M. P. M.; MARTINEZ, C. A.; COSTA, A. C.; COSTA, P. M. F.; DIETRICH, S. M. C.; BUCKERIDGE, M. S. **Effect of atmospheric CO₂ enrichment on the establishment of seedlings of jatobá, *Hymenaea courbaril* L. (Leguminosae, Caesalpinioideae) biota neotropica. 2(1).** 2002. Disponível em: <<http://www.biotaneotropica.org.br/v2n1/en/abstract?article+BN01602012002>>. Acesso em: 22 ago. 2009.
- 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.
- ABU-NADA, Y.; KUSHALAPPA, A. C.; MARSHALL, W. D.; AL-MUGHRABI, K.; MURPHY, A. Temporal dynamics of pathogenesis-related metabolites and their plausible pathways of induction in potato leaves following inoculation with *Phytophthora infestans*. **Europe Journal Plant Pathology**, v. 118, p. 375-391, 2007.
- ALMEIDA, A. A.; 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.
- AUGUSTO, F.; PEDROSO, M. P.; GODOY, L. A. F.; FIDÉLIS, C. H. V.; FERREIRA, E. C.; POPPI, R. J. Cromatografia gasosa bidimensional abrangente (GC x GC). **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 421-430, 2008.
- 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. 217-222, 1993.
- BOHNERT, H. J.; GONG, Q.; LI, P.; MA, S. Unraveling abiotic stress tolerance mechanisms - getting genomics going. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 9, p. 180-188, 2006.
- BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.
- 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.
- BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. (Ed.). **Biochemistry and molecular biology of plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000. 136 7p.

CHALKER-SCOTT, 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.

CLOSE, D. C.; McARTHUR, C. Rethinking the role of many plant phenolics: protection from photodamage not herbivores? **OIKOS**, v. 9, p. 166-172, 2002.

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.; 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, H. 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, p. 337-343, 2006.

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. 447-453, 2001.

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

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Agroecologia da cana-de-açúcar**. Disponível em : <<http://www.cana.cnpm.embrapa.br/agroeco.html>>. Acesso em: 13 dez. 2009.

FERREIRA, M. M. C.; RIBEIRO, J. S.; SALVA, T. J. G. Uso de perfis cromatográficos de voláteis de cafés arábicas torrados para a diferenciação das amostras segundo o sabor, o aroma e a qualidade global da bebida. **Química Nova**, v. 33, n. 9, p. 1897-1904, 2010.

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.

FONTANIELLA, B.; VICENTE, C.; LEGAZ, M. E.; DE ARMAS, R.; RODRÍGUEZ, C. W.; MARTÍNEZ, M.; PIÑÓN, 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.

FRANÇA, 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.

FUNDAÇÃO PARA PESQUISA NO ESTADO DE SÃO PAULO. **Biota neotropica**. Disponível em: <<http://www.biotaneotropica.org.br/v2n1/en/abstract?article+BN01602012002>>. Acesso em: 08 out. 2009.

GALLAS, M. R. **Incerteza da medição**. Disponível em: <<http://pt.scribd.com/doc/54424719/incertesa-medidas>>. Acesso em: 12 ago. 2010.

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, p. 573-584, 2007.

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

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

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.

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.

KLUGE, R. A. **Aspecto fisiológico e ecológico da fotossíntese**. Disponível em: <<http://www.ebah.com.br/aspectos-fisiologicos-e-ecologicos-da-fotossintese-doc-a37792.html>>. Acesso em: 03 nov. 2009.

LANÇAS, F. M.; JANZANNTI, N. S.; FRANCO, M. R. B. Identificação de compostos voláteis de maçãs (*malus domestica*) cultivar fuji, por cromatografia gasosa-espectrometria de massas. **Ciência Tecnologia Alimentos**, v. 20, p. 164-171, 2000.

LUNA, A. S.; COSTA, T. M. S.; OLIVEIRA, R. S. Utilização de planilha eletrônica para calibração instrumental, análise da variância e testes de significância de um método espectrométrico. **Revista Analytica**, v. 21, p. 46-51, 2006.

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.

MAJUMDAR, S.; GHOSH, S.; GLICK, B. R.; DUMBROFF, E. B. Activities of chlorophyllase, phosphoenolpyruvate carboxylase and ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in the primary leaves of soybean during senescence and drought. **Physiologia Plantarum**, v. 81, p. 473-480, 1991.

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.

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.

POORTER, H. The effect of an elevated atmospheric carbon dioxide concentration on growth, photosynthesis and respiration of *Plantago major*. **Physiologia Plantarum**, v. 75, p. 237-244, 1988.

RAAMSDONK, L. M. B.; TEUSINK, D.; BROADHURST, N. S.; ZHANG, A.; HAYES, M. C.; WALSH, J. A.; BERDEN, K. M.; BRINDLE, D. B.; KELL, J. J.; ROWLAND, H. V.; WESTERHOFF, K.; VAN DAM, S. G.; OLIVER, 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. 37-54, 1992.

ROCHFORT, S. J.; TRENERRY, C. Natural products research and metabolomics. In: MANDER, L. (Ed.). **Modern methods for the investigation of natural products**. Werrabee: Elsevier, 2010. v. 9, cap. 16, p. 596-628.

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.; WAGNER, C.; KOPKA, J.; TRETHEWEY, R. N.; WILLMITZER, L. Simultaneous analysis of metabolites in potato tuber by gas chromatography-mass spectrometry. **The Plant Journal**, v. 23, p. 131-142, 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.

SCHOEFS, B.; BERTRAND, M. Chlorophyll biosynthesis: a review. In: PESSARAKLI, M. (Ed.). **Handbook of photosynthesis**. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 2005.

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.

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

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J. **Introduction to modern liquid chromatography**. New York: John Wiley and Sons, 1979. p. 261-265.

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.

TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 338-350, 2006.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. 3rd ed. Sunderland: Sinauer Publishers, 2002.

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, p. 219-228, 2007.

XU, F.; ZOU, L.; ONG, C. N. Experiment-originated variations, and multi-peak and multi-origination phenomena in derivatization-based GC-MS metabolomics. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, p. 269-280, 2010.

7. ANEXOS

Tabela A. Valores de F para um intervalo de confiança de 95%

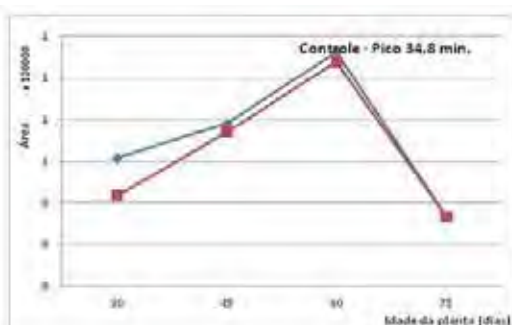
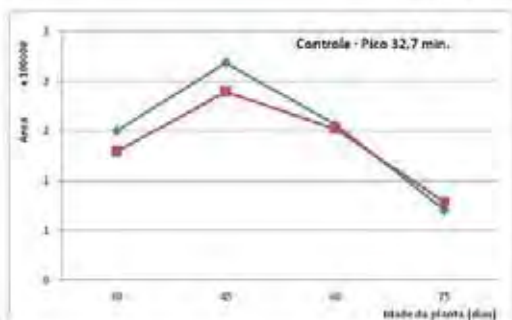
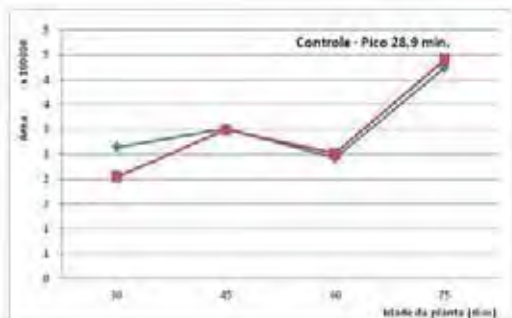
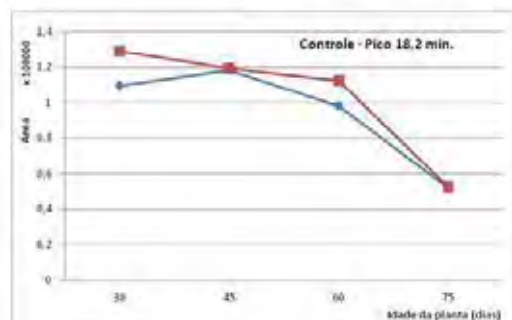
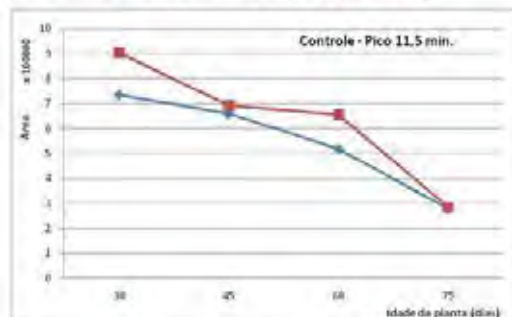
	v1	1	2	3	4	5	6	7...
v2	α							
1	0.100	39.864	49.500	53.593	55.833	57.240	58.204	58.906
	0.050	161.446	199.499	215.707	224.583	230.160	233.988	236.767
	0.025	647.793	799.482	864.151	899.599	921.835	937.114	948.203
	0.010	4052	4999	5404	5624	5764	5859	5928
2	0.100	8.526	9.000	9.162	9.243	9.293	9.326	9.349
	0.050	18.513	19.000	19.164	19.247	19.296	19.329	19.353
	0.025	38.506	39.000	39.166	39.248	39.298	39.331	39.356
	0.010	98.502	99.000	99.164	99.251	99.302	99.331	99.357
3	0.100	5.538	5.462	5.391	5.343	5.309	5.285	5.266
	0.050	10.128	9.552	9.277	9.117	9.013	8.941	8.887
	0.025	17.443	16.044	15.439	15.101	14.885	14.735	14.624
	0.010	34.116	30.816	29.457	28.710	28.237	27.911	27.671
4	0.100	4.545	4.325	4.191	4.107	4.051	4.010	3.979
	0.050	7.709	6.944	6.591	6.388	6.256	6.163	6.094
	0.025	12.218	10.649	9.979	9.604	9.364	9.197	9.074
	0.010	21.198	18.000	16.694	15.977	15.522	15.207	14.976
5...	0.100	4.060	3.780	3.619	3.520	3.453	3.405	3.368
	0.050	6.608	5.786	5.409	5.192	5.050	4.950	4.876
	0.025	10.007	8.434	7.764	7.388	7.146	6.978	6.853
	0.010	16.258	13.274	12.060	11.392	10.967	10.672	10.456

Tabela B. Valores de t para um intervalo de confiança de 95%.

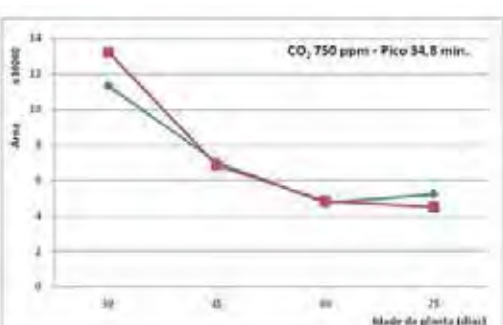
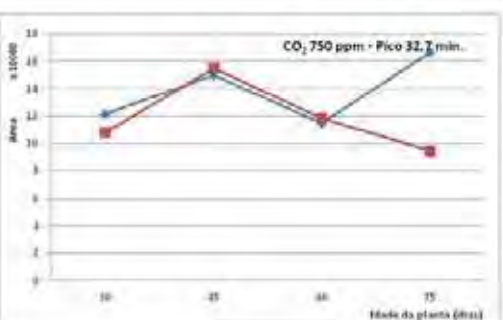
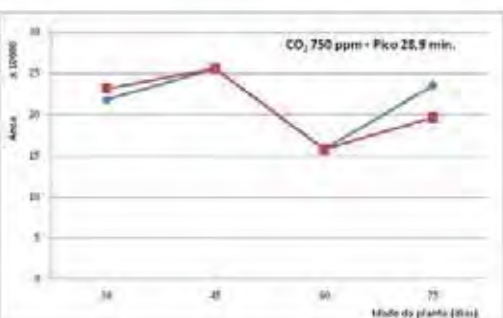
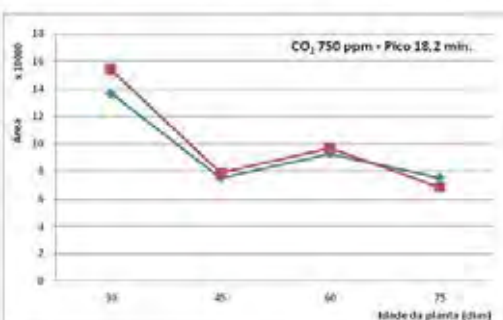
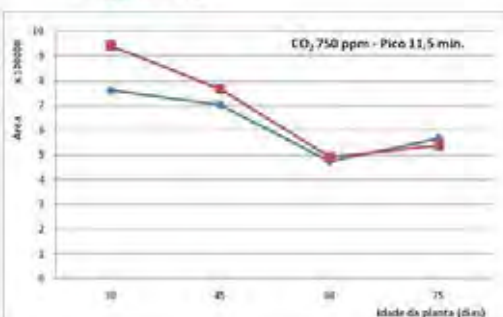
graus de liberdade	90%	95%	98%	99%
1	6,31	12,71	31,82	63,66
2	2,92	4,30	6,96	9,92
3	2,35	3,18	4,54	5,84
4	2,13	2,78	3,75	4,60
5	2,02	2,57	3,36	4,03
6	1,94	2,45	3,14	3,71
7	1,89	2,36	3,00	3,50
8	1,86	2,31	2,90	3,36
9...	1,83	2,26	2,82	3,25

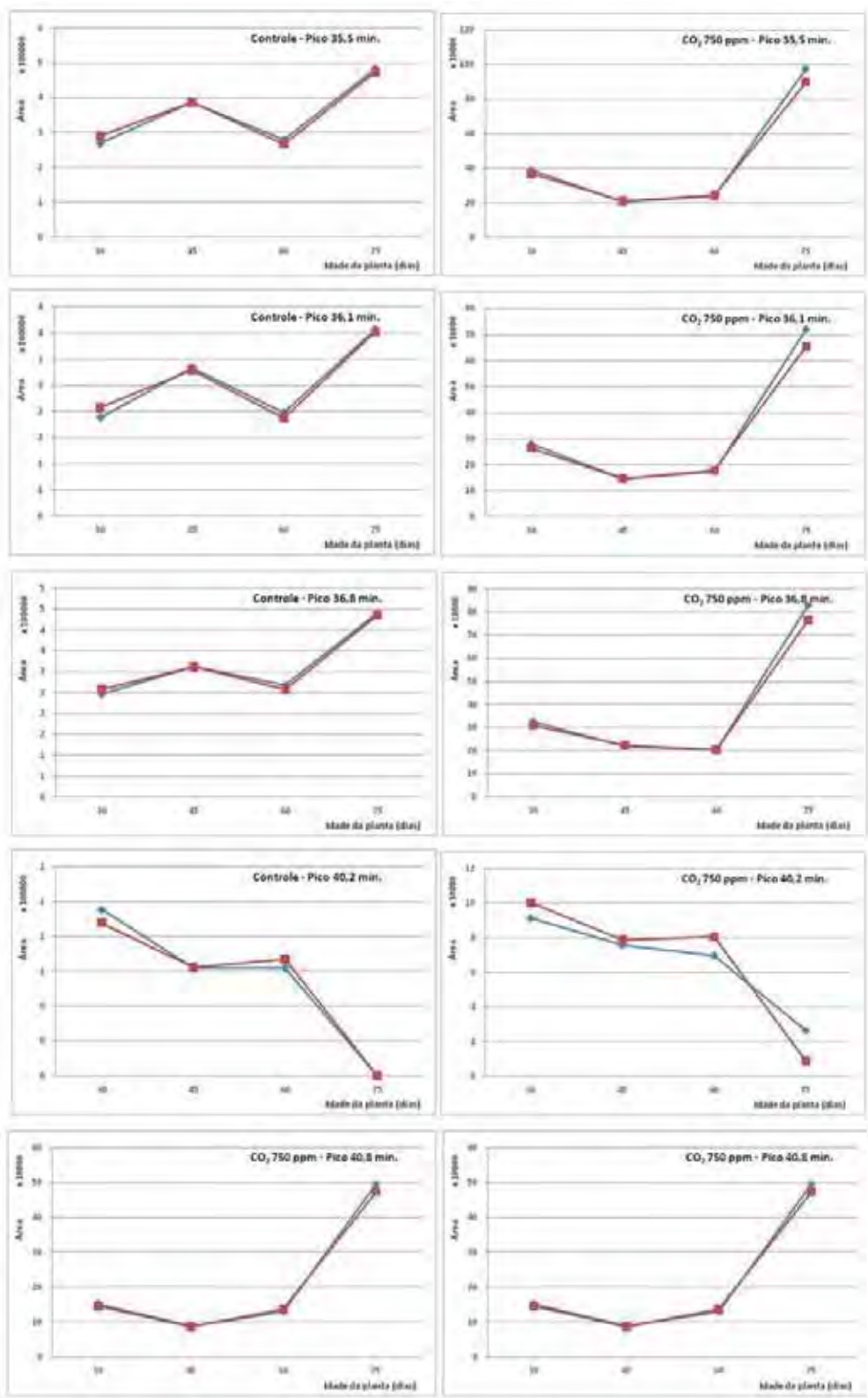
3 Comparação das replicatas (picos principais) – áreas corrigidas pela área do PI (ribitol).

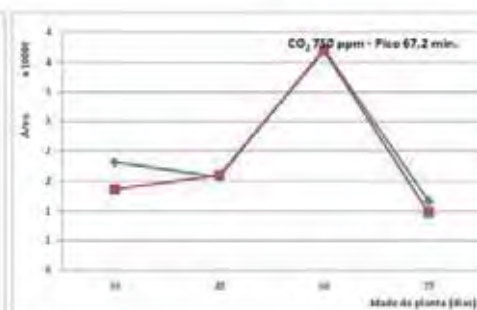
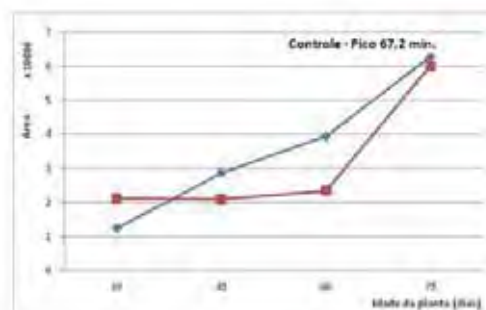
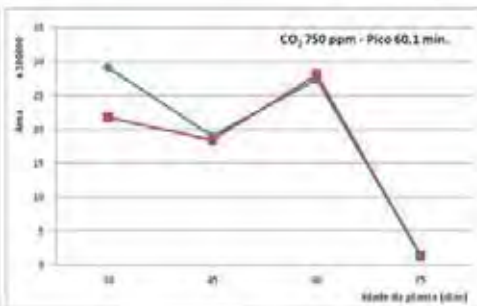
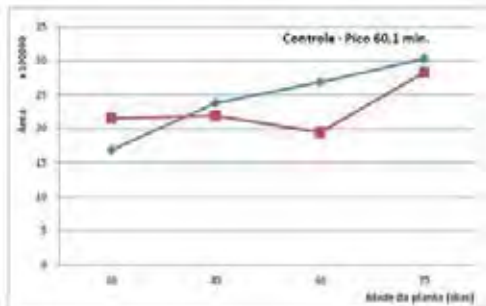
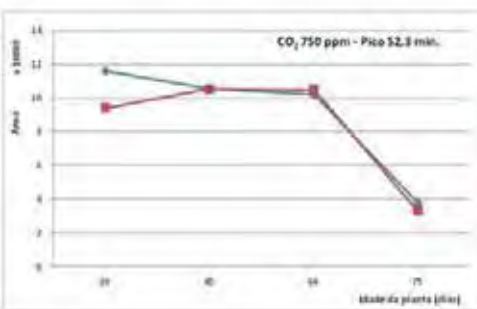
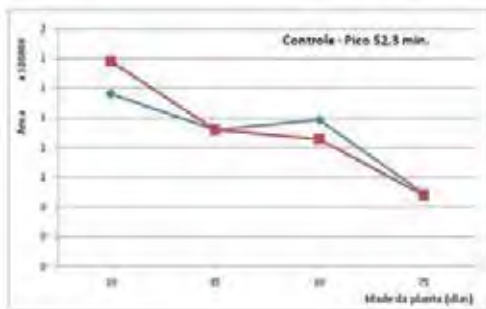
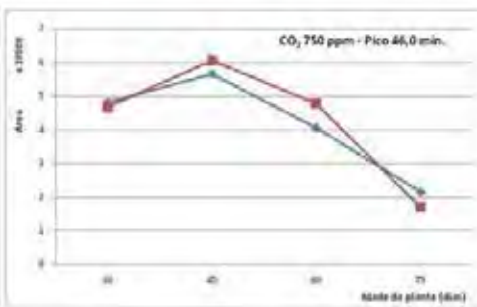
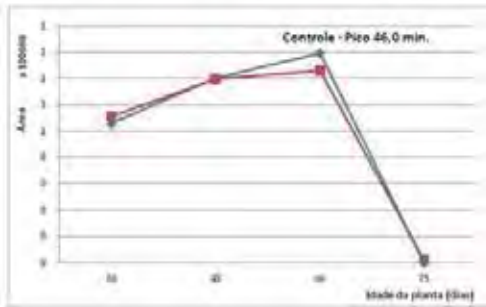
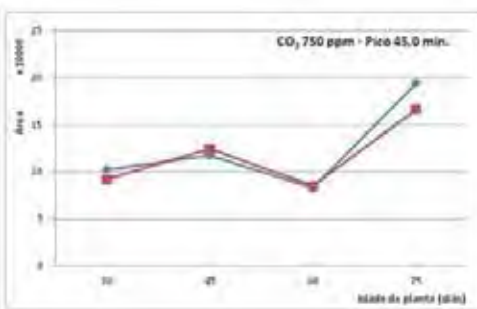
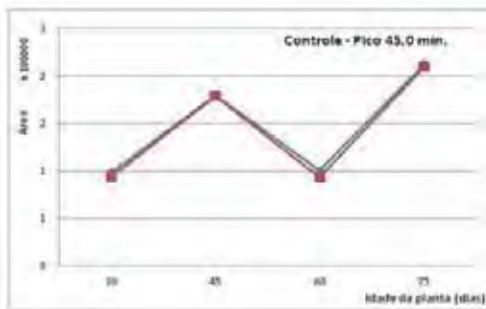
EXPERIMENTO CONTROLE (390 ppm CO₂)

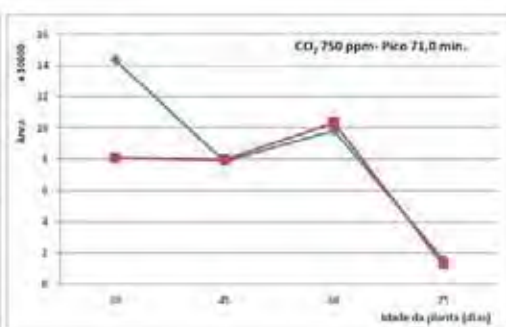
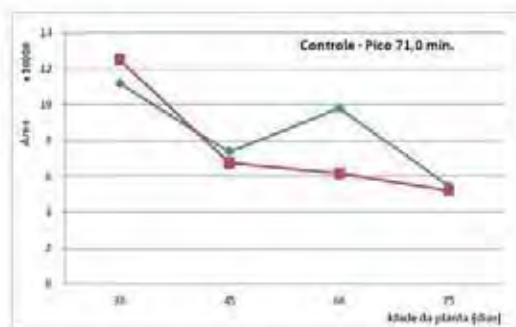


750 ppm CO₂









4. – Cromatogramas obtidos do extrato aquoso, por GC-FID, para o experimento de CO₂.

