

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE QUÍMICA

LUAN COSTA CIAVDAR RUIZ

Comparação de métodos de extração abrangentes
para estudos metabolômicos em tecidos vegetais
empregando folhas de cana-de-açúcar como modelo

Orientador: Prof. Dr. Alberto José Cavaleiro
Coorientadora: Dra. Isabel Duarte Coutinho

ARARAQUARA – SP
2021

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE QUÍMICA

LUAN COSTA CIAVDAR RUIZ

Comparação de métodos de extração abrangentes
para estudos metabolômicos em tecidos vegetais
empregando folhas de cana-de-açúcar como modelo

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

Orientador: Prof. Dr. Alberto José Cavaleiro
Coorientadora: Dra. Isabel Duarte Coutinho

ARARAQUARA – SP
2021

FICHA CATALOGRÁFICA

R934c Ruiz, Luan Costa Ciavdar
 Comparação de métodos de extração abrangentes para
 estudos metabolômicos de tecidos vegetais empregando folhas de
 cana-de-açúcar como modelo / Luan Costa Ciavdar Ruiz. –
 Araraquara : [s.n.], 2021
 66 f. : il.

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

 1. Extração (Química). 2. Preparo de amostras (Química).
 3. Cromatografia líquida de alta eficiência. 4. Cana-de-açúcar.
 5. Metabólitos. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Comparação de métodos de extração abrangentes para estudos metabólicos empregando a cana-de açúcar como modelo

AUTOR: LUAN COSTA CIAVDAR RUIZ

ORIENTADOR: ALBERTO JOSÉ CAVALHEIRO

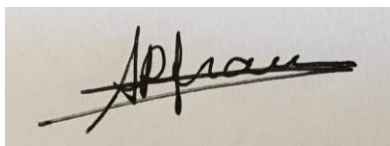
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em QUÍMICA, pela Comissão Examinadora:

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Alberto", with a long horizontal stroke extending to the right.

Prof. Dr. ALBERTO JOSÉ CAVALHEIRO (Participação Virtual)
Departamento de Bioquímica e Química Orgânica / Instituto de Química do Câmpus de Araraquara - UNESP

A handwritten signature in black ink, appearing to read "André", with a large, stylized loop at the beginning.

Prof. Dr. ANDRÉ GONZAGA DOS SANTOS (Participação Virtual)
Departamento de Fármacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Angela", with a large, stylized loop at the beginning.

Prof.ª Dr.ª ANGELA REGINA ARAUJO (Participação Virtual)
Departamento de Bioquímica e Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Araraquara, 27 de julho de 2021

DADOS CURRICULARES

Nome: Luan Costa Ciavdar Ruiz

Nome em citação bibliográficas: CIAVDAR-RUIZ, L.C.

Endereço profissional: Av. Prof. Francisco Degni, 55 - Jardim Quitandinha,
Araraquara - SP, 14800-900

Titulação: Mestre

Participação em eventos científicos:

XXV Congresso de Iniciação Científica da UNESP, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – UNESP

Dedico este trabalho ao meu tio
Ricardo Ciavdar Ruiz, vítima desta pandemia.

.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, ao professor doutor Alberto José Cavalheiro, que me aceitou como seu último mestrando antes de sua aposentaria e me confiou a execução de um trabalho que extraiu muito das minhas competências. Tornou-se, para mim, um amigo e me ensinou coisas que estão além de uma relação orientador-mestrando, as quais levarei para vida.

A minha mãe, Jeane; ao meu pai, Eduardo; ao meu irmão, Ítalo e a minha sobrinha Manuela, os quais sempre me ofereceram amparo emocional e apoiaram-me independente dos percalços que passei. Ao Marcelo Henrique que esteve ao meu lado nos bons e maus momentos dessa jornada.

Agradeço, acima de tudo, ao meu padrinho e tio Ricardo, vítima da COVID-19, pelo imenso apoio dado para ingressar na carreira científica.

Aos meus amigos da UNESP: Karoline, Aline, Iatã, Raquel, Rafael, Wellington, Marcus e Victor, que me ajudaram tanto intelectualmente quanto fraternalmente, dividindo seus ouvidos com minhas dúvidas e angústias nos momentos de pressão.

Ao Diego Pedro que contribuiu com as bases linguísticas deste trabalho, pessoa que sempre soube como traduzir meus pensamentos em palavras.

As minhas irmãs de orientação Lilian, Alene e Isabel, que me instruíram quando cheguei inexperiente no grupo de pesquisa. A elas também devo parte de todo o conhecimento que obtive durante o mestrado.

Aos demais professores doutores que compõem essa família de pesquisa e que sempre estão dispostos a auxiliar qualquer estudante que necessite de instrução: Ângela Regina Araújo, Dulce Helena Siqueira Silva, Ian Castro-Gamboa, Maysa Furlan e Vanderlan da Silva Bolzani.

Aos profissionais que compõem os bastidores de todos os trabalhos produzido pelo núcleo: Alberto Camilo Alécio, João Luiz Bronzel Júnior, Nivaldo Borale, Vilma Aparecida Pestana e Juliana Rodrigues. A equipe competente da secretaria de pós-graduação: Robson Adriano, Ana Paula, Maria Isabel e Wennia.

E, por fim, aos órgãos financiadores de pesquisa CAPES, CNPq (Bolsa: 88887.147723/2017-00 e INCT BioNat), FAPESP (CEPID CIBFar), que apoiam e investem no conhecimento científico.

“Nenhuma grande descoberta
jamais foi feita sem um palpite
ousado”

Isaac Newton

RESUMO

As abordagens ômicas atualmente em destaque, e em desenvolvimento, tem por objetivo final o entendimento global do funcionamento de organismos a partir de uma perspectiva molecular abrangente. O preparo de amostra pode durar dias ou até semanas recorrendo a diversos tipos de técnicas, equipamentos e solventes. Claramente esse procedimento multietapas é fonte significativa de erros, gasto de solventes e tempo e por tempos acreditava-se que a elaboração de extrato era uma etapa crucial para estudos metabolômicos. Durante este processo evita-se alterar os metabólitos de um organismo, mantendo condições brandas da colheita até a análise em cromatografia líquida. Será que artefatos são gerados? Podemos confiar que os metabólitos não se decomponham até o fim das etapas de preparo? A resposta para estes questionamentos deriva de estudos a cerca de uma extração seguida dos processos de separação e detecção: extração em linha (do inglês, *on-line extraction*). Padronizando uma câmara de amostragem barata e de fácil acoplagem a um sistema de cromatografia, permitiu-nos evitar etapas longas de preparo de amostra. Neste método, substâncias discretas passaram a serem identificadas com elevado nível de precisão e reprodutibilidade. Este método, denominado OLE-UHPLC, permite fazer estudos a partir de 1 mg tecido fresco, onde o gradiente utilizado para a separação cromatográfica torna-se a mistura extratora da amostra. Parece uma solução próspera para análises de organismos pequenos ou até mesmo de fragmento tecidual com uma intensidade cromatográfica elevada, quando comparada aos métodos *off-line*. Por isso, comparou-se procedimentos de preparação de amostras para *fingerprinting* metabólico em tecidos vegetais com folhas de cana-de-açúcar como modelo, considerando a abrangência, a eficiência, a reprodutibilidade, a rapidez e a robustez.

Palavras-chave: Extração (Química); Preparo de Amostras, Metabólitos, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, Cana-da-açúcar.

ABSTRACT

The omic approaches currently highlighted, and under development, have as their ultimate goal the global understanding of the functioning of organisms from a comprehensive molecular perspective. Sample preparation can take days or even weeks using different types of techniques, equipment and solvents. Clearly, this multi-step procedure is a significant source of errors, waste of solvents and time, and for some time it was believed that extract elaboration was a crucial step for metabolomic studies. During this process, the alteration of an organism's metabolites is avoided, maintaining mild conditions from harvest to analysis in liquid chromatography. Are artifacts generated? Can we trust the metabolites not to decompose until the end of the preparation steps? The answer to these questions derives from studies about one extraction followed by separation and detection processes: online extraction. Standardizing an inexpensive sampling chamber that is easy to attach to a chromatography system allowed us to avoid long sample preparation steps. In this method, discrete substances started to be identified with a high level of precision and reproducibility. This method, called OLE-UHPLC, allows studies to be carried out from 1 mg of fresh tissue, where the gradient used for chromatographic separation becomes the sample extracting mixture. It seems to be a successful solution for analyzing small organisms or even tissue fragments with a high chromatographic intensity, when compared to off-line methods. Therefore, we compared sample preparation procedures for metabolic fingerprinting in plant tissues with sugarcane leaves as a model, considering the range, efficiency, reproducibility, speed and robustness.

Keywords: Extraction (Chemistry); Sample Preparation, Metabolites, High Performance Liquid Chromatography, Sugarcane.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Produtos diretos e indiretos da cana-de-açúcar

Figura 2. Características botânicas do **A)** colmo, **B)** nó e **C)** copa da cana-de-açúcar. Fonte Thomas, 2016

Figura 3. **A)** surgimento das raízes, **B)** crescimento dos brotos e raízes, **C)** fase inicial do brotação e **D)** desenvolvimento do broto e raízes da cana-de-açúcar. Fonte Thomas, 2016.

Figura 4. Estágios de desenvolvimento da cana-de-açúcar. Fonte Thomas, 2016.

Figura 5. Representação sucinta da fotossíntese do precursor gliceraldeído 3-fosfato pelo ciclo de Calvin

Figura 6. Vias biossintéticas resumida da sacarose e eritrose 4-fosfato

Figura 7. Representação da via do ácido chiquímico

Figura 9. Representação reduzida da via mista (chiquimato e acetato) para formação das flavonas apigenina, luteolina, diosmetina e tricina

Figura 10. Ilustração das etapas para a elaboração de um extrato.

Figura 11. Ilustração das etapas de preparo de amostras dispensáveis (X vermelho) e opcionais (X azul) para o método de extração *on-line*

Figura 12. Fluxograma do protocolo de Paepe, indicando as alterações procedimentais do método original (em vermelho) para o método adaptado (em azul).

Figura 13. Fluxograma do protocolo de Bijttebier, indicando as alterações procedimentais do método original (em vermelho) para o método adaptado (em azul).

Figura 14. Fluxograma do protocolo de Yuliana, indicando as alterações procedimentais do método original (em vermelho) para o método adaptado (em azul).

Figura 15. Diagrama ternário da proporção de água:EtOH:IPA mais eficientes para extrações metabólicas em folhas de cana-de-açúcar. Fonte Leme, 2014.

Figura 16. Fluxograma do protocolo de Leme, indicando as alterações procedimentais do método original (em vermelho) para o método adaptado (em azul).

Figura 17. Esquema de funcionamento do procedimento on-line, indicando a colocação do compartimento de amostra na válvula de seis portas no local da alça (à esquerda). Compartimento de amostra desmontado à direita.

Figura 18. Alteração do gradiente cromatográfico (em vermelho).

Figura 19. Alteração do preenchimento da câmara de amostras: à esquerda, preenchimento da câmara com sílica e material vegetal feita por Ferreira. À direita, apenas o material vegetal realizado com o atual modelo OLE.

Figura 20. Representação ilustrativa da montagem do modelo OLE atual. Em cinza representando o aço inox e em bege representando o PEEK.

Figura 21. **A)** Partes externas: roscas de vedação e compartimento de amostras em aço inox. **B)** Partes internas: câmara de amostra (em PEEK) com filtro de linha embutido, filtro de linha e anel guia (aço inox). **C)** Alinhamento na ordem de encaixe. **D)** OLE montado com os adaptadores para o sistema cromatográfico. **E)** OLE plugado à coluna cromatográfica. **F)** Quantidade de material vegetal necessário e **G)** Caixa de armazenamento da peça.

Figura 22. À esquerda, ilustra-se o sistema cromatográfico em análises off-line padrão. À direita, o sistema empregado para análises on-line utilizando o OLE

Figura 23. Em cima, o fingerprinting cromatográfico com destaque nas regiões selecionadas (à esquerda) e com as bandas enumeradas (à direita). Abaixo à esquerda, a representação da atribuição da escala cromática dos valores relativos às bandas de interesse. À direita, a tabela com valores de tempo de retenção (em mAU) com tempos de retenção (min). No canto inferior direito o mapa de calor com as porcentagens atribuídas.

Figura 24. Fingerprinting em UHPLC-DAD de cada replicata sobrepostas (superior esquerdo) e das médias de cada método sobrepostas (superior direito) para as folhas de *Saccarum officinarum*. Em vermelho, fingerprinting médio correspondente ao protocolo OLE. Em amarelo, fingerprinting médio correspondente ao protocolo Leme. Em verde, fingerprinting médio correspondente ao protocolo Yuliana. Em azul, fingerprinting médio correspondente ao protocolo Paepe. As condições cromatográficas foram em tempos de 0/4,5/55/65/80 min sob fluxo de 1 mL/min de 5/5/50/100/100 % de B. A coluna utilizada foi Kinetex® C18 150 x 4,6 mm, 2,6 µm, 60 Å da Phenomenex.

Figura 25. Imagem aproximada do perfil cromatográfico de cada replicata em uma janela de 14 a 29 min (esquerda) e de 30 a 40 min (direita).

Figura 26. Imagem aproximada do perfil cromatográfico médio para cada protocolo em uma janela de 31 a 34 min (esquerda) e de 17 a 20 min (direita).

Figura 27. Gráfico de escores (PC1) e pesos (PC2) em mA.U. x min, à esquerda. Dados correspondentes aos protocolos (pontos coloridos) conservando a variância máxima dos vetores respostas com 95% de confiança.

Figura 28. À esquerda, o fingerprinting cromatográfico das folhas de cana-de-açúcar nas condições cromatográficas de tempos de 0/4,5/55/65/80 min sob fluxo de 1 mL/min de 5/5/50/100/100 % de B. A coluna utilizada foi Kinetex® C18 150 x 4,6 mm, 2,6 µm, 60 Å da Phenomenex. À direita, estão localizadas as bandas caracterizadas pela razão massa/carga atribuída.

Figura 29. Redes moleculares exibidas no espaço químico de detecção de massas para conjuntos de espectros de moléculas relacionados, à esquerda. Grupos identificados com pelo menos uma molécula alvo contida, à direita.

Figura 30. Nodos em destaque com a identificação das substâncias alvo. As cores vermelho, amarelo, verde e azul representam respectivamente a fração quantitativa extraída pelos protocolos OLE, Leme, Yuliana e Paepe.

Figura 31. Relação de substâncias detectadas pelo GNPS e suas fórmulas moleculares. As cores destacadas representam os radicais cafeoil (azul), glicosil (rosa) e arabinosil (amarelo).

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%A	Porcentagem de solvente utilizados no método cromatográfico
%B	Porcentagem de solvente utilizados no método cromatográfico
(m/m)	Razão adimensional entre massas de dois componentes
(v/v)	Razão adimensional entre volumes de dois componentes
(v/v/v)	Razão adimensional entre volumes de três componentes
4CL	Enzima <i>p</i> -cumaroil-coenzima A-ligase
ADP	Difosfato de adenosina
ASE	Extração acelerada por solvente
ATP	Trifosfato de adenosina
BHT	Hidroxitolueno butilado
C18	Sílica esférica com superfície modificada com octadecilsilano
C3H	Enzima <i>p</i> -cumaroil 3-hidroxilase
C4H	Enzima cinamato 4-hidroxilase
CCR	Enzima cinamoil-coenzima A-redutase
CoA	Coenzima A
COMT	Enzima cafeoil-coenzima A-O-metiltransferase
COVID-19	Doença viral corona datada no ano de 2019
DAD	Detector ultravioleta-visível com arranjo de diodos
ESI	Ionização por eletrospray
F5H	Enzima ferulase 5-hidroxilase
GNPS	<i>Global Natural Products Social Molecular Networking</i>
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
IPA	Isopropanol
MeOH	Metanol
MS	Espectrômetro de massas
mU.A.	Grandeza de absorbância multiplicada por 10 ⁻³
NADP ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato protonado
NuBBE	Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais
OLE	Extração em linha, do inglês <i>On-Line Extraction</i>
PAL	Enzima fenilalanina-amônio-liase

PC1	Componente principal 1, escores relativos às amostras.
PC2	Componente principal 2, pesos relativos às variáveis
PCA	Análise de componentes principais
PEEK	Polímero Poli(éter-éter-cetona)
U.A.	Unidades de absorbância
UHPLC	Cromatografia líquida de ultra-alta performance
UV-Vís	Ultravioleta visível

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	Estudos e aplicações metabolômicas.....	17
1.2	Cana-de-açúcar	19
1.2.1	Histórico e valor econômico.....	19
1.2.2	Aspectos evolutivos e botânicos	21
1.2.3	Fisiologia e metabolismo.....	24
1.3	Preparo de amostras.....	31
1.4	É possível pular as etapas de preparo de amostras?	33
1.5	Métodos de análise estatística	34
1.5.1	Análise através de redes moleculares	34
1.5.2	Análise de Componentes Principais	35
1.6	Objetivos	35
2.	METODOLOGIA	36
2.1	Coleta	36
2.2	Secagem	36
2.3	Moagem	36
2.4	Tamisação	36
2.5	Procedimentos de Extração e Armazenamento	37
2.5.1	Protocolo de Extração de Paepe (2013)	38
2.5.2	Protocolo de Extração de Bijttebier (2016)	39
2.5.3	Protocolo de Extração de Yuliana (2011)	40
2.5.4	Protocolo de Extração de Leme (2014)	41
2.5.5	Protocolo de Extração de Ferreira OLE-LC (2016)	43
2.6	Análise Cromatográfica	44
2.6.1	Equipamento	44
2.6.2	Condições cromatográficas	44
2.6.3	Coluna	44
2.6.4	Gradiente de extração/eluição.....	45
3	RESULTADOS E DISCUSSÕES	46
3.1	Desenvolvimento do Compartimento de Amostras para OLE-LC	46
3.1.1	Projeto Inicial e Adversidades de Elaboração	46
3.1.2	Readaptação da Peça: Retomada do Conceito de Extração.....	47
3.1.3	Materiais	50
3.1.4	Testes do protótipo	50
3.1.5	Acoplamento ao Sistema de Cromatografia [OLE-UHPLC].....	51
3.2	Análise comparativa UV-Vís [OLE-UHPLC-DAD]	52

3.3	Análise de absorbância de UV-Vís [OLE-UHPLC-DAD].....	54
3.4	Análise de Componentes Principais [OLE-UHPLC-DAD]	56
3.5	Identificação de Metabólitos [OLE-UHPLC-DAD-MS].....	57
3.6	Comparação e análise utilizando rede social global molecular de produtos naturais [OLE-UHPLC-DAD-MS]	58
4.	CONCLUSÃO.....	61
5.	REFERÊNCIAS	62

1 INTRODUÇÃO

1.1 Estudos e aplicações metabolômicas

A metabolômica é uma abordagem ômica emergente e promissora que é utilizada para entender as bases moleculares de eventos biológicos. Através da análise metabolômica abrangente (*untarget*), onde organismos em condições fisiológicas diferentes são comparados, é possível associar metabólitos presentes em fluidos, células e tecidos utilizando técnicas analíticas sofisticadas no tratamento de dados por análise estatística a essas condições (CANUTO et al., 2018) possibilitando a elaboração de hipóteses funcionais para esses metabólitos.

As ômicas atualmente em destaque, e em desenvolvimento, tem por objetivo o entendimento global do funcionamento de organismos a partir de uma perspectiva molecular abrangente. Neste sentido, existem outros campos de estudo como a genômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica que são abordagens complementares.

Especificamente na metabolômica trata-se do estudo dos metabólitos de um organismo (metaboloma) que fornecem uma visão dos processos bioquímicos fisiológicos e ecológicos. A diversidade dos metabólitos em um vegetal ainda é algo imensurável para a comunidade científica. São vastas as classes de substâncias já catalogadas com princípios bioativos e com propriedades físicas caracterizadas por diversas técnicas. Estima-se que um organismo pode conter de 5.000 a 30.000 metabólitos diferentes, caracterizados por uma enorme diversidade estrutural, polaridade, tamanho molecular e também concentrações distintas (ERNST, 2014).

Os metabólitos secundários são moléculas orgânicas que não estão envolvidas no crescimento e desenvolvimento de um organismo. Embora os metabólitos primários tenham um papel fundamental na sobrevivência de espécies, desempenhando uma função ativa na fotossíntese e na respiração, a ausência de metabólitos secundários, em longo prazo, compromete a capacidade de sobrevivência do organismo, geralmente desempenhando um papel importante na defesa (AGOSTINI-COSTA et al., 2012)

O crescimento e o ciclo de vida das plantas envolvem sequências complexas de expressão gênica altamente controladas, além de respostas e adaptações ao meio ambiente, incluindo várias situações de estresses bióticos e abióticos que podem modificar essa expressão (CAVALHEIRO, 2012). A análise metabolômica abrangente fornece uma ferramenta única para investigar plantas relativamente desconhecidas, para determinar a presença de estímulos externos, como as estações do ano no perfil químico e na atividade biológica associada (SEHLAKGWE et al., 2019). Desde fatores abióticos como luz ultravioleta e temperatura, a fatores bióticos como parasitismo e ataque patogênico, que influenciam o desenvolvimento de compostos metabólicos complexos em plantas, a análise sem alvo garante que todas as alterações sejam potencialmente observadas e incluídas nos parâmetros de avaliação da qualidade (HARDY e HALL, 2012).

A investigação metabolômica é separada em três fases: inicialmente detectar o maior número de substâncias possíveis; analisar muitos indivíduos da espécie para identificar a variação biológica do sistema; por fim, estudar a influência das condições experimentais de estresse sobre o modelo estabelecido (VERPOORTE et al., 2007), buscando alterações metabólicas. Atualmente uma quarta fase de estudos emerge através da inoculação de microorganismos nos tecidos de plantas.

A primeira fase caracteriza-se pelo processo de separação de substâncias chamada de impressão digital metabólica (*metabolic fingerprinting*). A impressão digital metabólica é uma triagem rápida de alto rendimento de todos os analitos detectáveis em uma amostra sem identificação prévia e pode ser realizada antes do perfil metabólico para guiar um projeto de pesquisa. A preparação e análise das amostras deve ser o mais simples e rápido possível (ERNST et al., 2014).

A aplicabilidade desses estudos é vasta citando, por exemplo, a triagem dos constituintes vegetais para a descoberta de novos medicamentos (SALEM et al., 2020); aumentar os nutrientes de frutas através do melhoramento convencional de cultivo (EMON, 2020); apresenta-se como uma ferramenta emergente para estudos de interação planta-patógeno (CASTRO-MORETTI et al., 2020); contribui na caracterização e diagnóstico de doenças humanas, doenças de plantas e seus agentes etiológicos (ADENIJI et al., 2020), entre outras.

Os estudos ômicos em geral envolvem a exigência de abordagens analíticas de alto desempenho e requerem métodos analíticos avançados como a cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massa de alta resolução ou de ressonância magnética nuclear (LC-MS / LC-RMN) que são as ferramentas analíticas de alta produtividade mais usadas. Especialmente nos últimos dez anos, cromatografia líquida bidimensional com detecção de massa de alta resolução (2D-LC-MS) foi desenvolvida devido à sua vantagem de alta resolução, sensibilidade e precisão (SHI-KAI et al., 2015).

1.2 Cana-de-açúcar

1.2.1 Histórico e valor econômico

A primeira referência à cana-de-açúcar não tem data e sai de uma peça antiga da literatura indiana chamada Vajasaneji-Samhita, escrito durante o período Mantra, que durou de 1.000 a 800 a.C. A natureza doce e melosa da cana-de-açúcar tornou-se conhecida fora da Índia desde muito cedo, através dos relatos e escritos de Nearchus, Plínio, Sêneca, Paulo de Égina, Teofrasto, Heródoto, Hipócrates, Dioscórides e Galeno. A cana-de-açúcar foi introduzida no Brasil após sua descoberta em 1500. No entanto, o transporte de açúcar para Portugal aparentemente não começou até 1526 (NASTARI, 1983).

Entre 1500 e 1822, o Brasil foi colônia de Portugal. Durante da maior parte do período colonial, o domínio português foi caracterizado pelo estabelecimento de ondas sucessivas de empreendimentos extrativos, variando em forma e características institucionais de acordo com os bens exigidos na Europa e a possibilidade de produção oferecidas pela colônia. Essas séries de recursos coloniais envolveram, em diferentes momentos e locais históricos, a produção de várias mercadorias como pau-brasil, cana-de-açúcar, ouro, borracha, tabaco, cacau e algodão, entre outros outras (NARITOMI et al., 2012).

Durante os anos de 1900, apesar do grande grau de incerteza infligido aos retornos líquidos por preços muito instáveis do açúcar no mercado internacional, a produção brasileira de açúcar continuou a crescer, alavancada por fábricas de açúcar mais eficientes que emergiram do processo de

modernização (NASTARI, 1983). Décadas depois, sob a ditadura, o Brasil desenvolveu o primeiro programa nacional de promoção de biocombustíveis, que regulamentou muito o consumo e produção de etanol de cana (COSTA, 2019).

A colheita da cana-de-açúcar é sazonal e ocorre no Brasil no período de março e dezembro na região centro-sul e de setembro a março na região norte-nordeste. Somente a região centro-sul é responsável por mais de 85% da produção total de cana-de-açúcar (HOFSETZ; SILVA, 2012).

Atualmente a cana-de-açúcar é o terceiro maior cultivo brasileiro em área plantada, atrás apenas da soja e do milho. Em 2016, os canaviais ocupavam 10,5 milhões de hectares, ou seja, 13,5% do total nacional de área plantada no País. Estima-se que a cadeia produtiva da cana-de-açúcar tenha gerado, somente no terceiro trimestre de 2016, um produto de R\$ 152,3 bilhões, mais de 1/5 do Produto Interno Bruto - PIB do agronegócio brasileiro, naquele período. Nesse mesmo ano, os derivados da cana-de-açúcar responderam por 5,0% das exportações brasileiras, de acordo com dados do Ministério da Indústria, Comércio Exterior e Serviços (IBGE, 2017).

O debate sobre combustíveis renováveis, seu papel no aquecimento global e os limites ambientais ao crescimento econômico mundial se intensificaram no início dos anos 2000. Como alternativa, o surgimento de grandes investimentos no setor de biocombustíveis no Brasil e no mundo aconteceu. O óleo de palma na Indonésia, o etanol de cana no Brasil e o etanol de milho nos EUA foram logo anunciados como promessas de energia renovável e sustentável (POSTAL et al., 2019).



Figura 1. Produtos diretos e indiretos da cana-de-açúcar.

A cana-de-açúcar tem ampla diversidade de produtos diretos e indiretos provenientes de seu metabolismo. A figura 1 mostra o uso importante da planta para a produção do açúcar, ração animal, fertilizante, cera, assim como o melaço que é diretamente enviado para a exportação e destinado para indústria de fermentação e destilação. O bagaço tem uma significativa importância para produção de energia a partir de sua biomassa, manufatura de produtos fibrosos e seguimentos industriais como xilitol (adoçante natural), alfa- e carboximetilcelulose, plásticos e para afins agropecuários. A sacarose é uma matéria-prima potencial para muitos produtos químicos por meio de reações que envolvem fermentação, síntese ou pirólise. (CHEN et al; 1993).

1.2.2 Aspectos evolutivos e botânicos

A cana-de-açúcar, *Saccharum* spp., é uma planta pertencente à família Poaceae e classe Monocotiledoneas (SANTOS, DIOLA, 2015) que evoluiu na região da Índia-Birmânia, de onde as três espécies *S. spontaneum*, *S. barberi* e *S. sinense* são nativas. À medida que a cana se espalhou para outras áreas, a *S. robustum* apareceu no sudeste da Indonésia. Entre 15.000 e 8.000 a.C., *S. robustum* evoluiu para *S. officinarum* na Nova Guiné. O cultivo precoce da cana-de-açúcar foi dominado por um híbrido natural entre *S. barberi* e *S. officinarum*, que permaneceu sem nome por séculos (NASTARI, 1983).

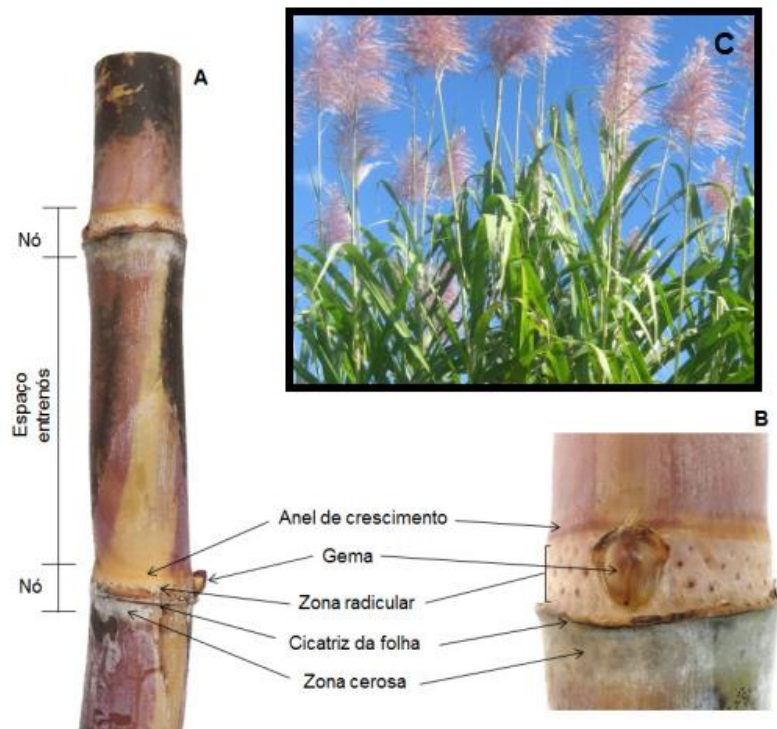


Figura 2. Características botânicas do **A)** colmo, **B)** nó e **C)** copa da cana-de-açúcar. Fonte Thomas, 2016

Milênios de práticas de cultivo concederam-nos estudos aprofundados sobre esse espécime vegetal. Assim, seus aspectos morfológicos e botânicos estão bem determinados. A cana-de-açúcar é basicamente dividida em quatro segmentos: copa, folhas, tolete e raízes. A copa é a parte superior da planta que, em época de reprodução sexuada, surge a inflorescência, onde concentra-se a maior parte das folhas verdes. Em seguida observamos o tolete, subdivididos em

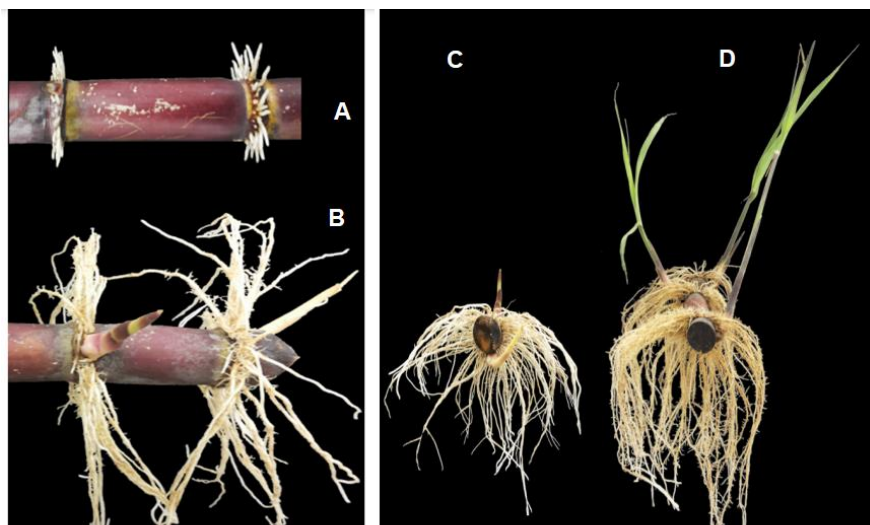


Figura 3. **A)** surgimento das raízes, **B)** crescimento dos brotos e raízes, **C)** fase inicial do brotação e **D)** desenvolvimento do broto e raízes da cana-de-açúcar. Fonte Thomas, 2016.

nós e entrenós. Em especial a região do nódulo possui a zona cerosa, cicatriz da folha, zona radicular, gema e anel de crescimento, vide figura 2.

A brotação assexuada da *Saccharum* é normalmente realizada com o aterramento dos toletes cortados na região dos entrenós. A duração dessa fase é de 7 a 10 dias após o plantio. A partir da gema o broto emerge, cerca de 20 a 30 dias após o plantio (THOMAS, 2016) e as raízes surgem sobre a zona radicular (figura 3)

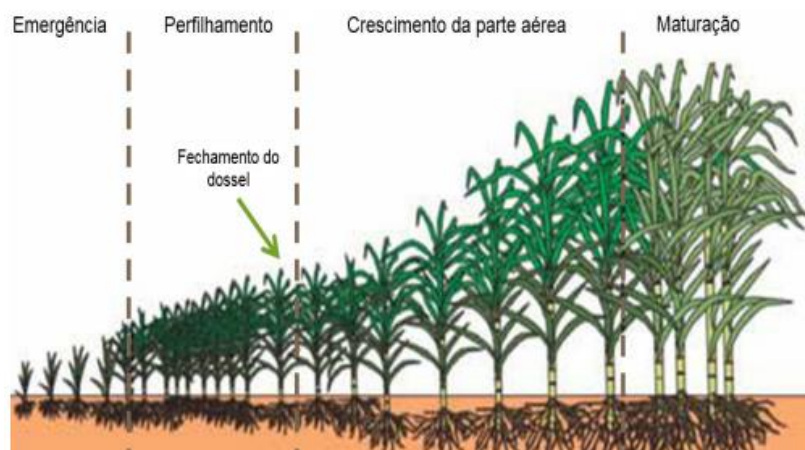


Figura 4. Estágios de desenvolvimento da cana-de-açúcar. Fonte Thomas, 2016.

Em seguida, a cana-de-açúcar cresce até o fechamento do dossel, fase designada como perfilhamento, marcado pelo desenvolvimento do colmo e rizomas que dura cerca de 2 a 3 meses. Neste período há relevante decréscimo na concentração de açúcares redutores e sacarose, mesmo demonstrando alta taxa fotossintética, pois é o momento de alta produção sintética de proteínas. mesmo demonstrando alta taxa fotossintética. O próximo estágio, do 3º ao 6º mês, caracteriza-se pelo crescimento da parte aéreas até sua maturação e elevação dos níveis de sacarose nos colmos (figura 4). O florescimento é um processo natural e indispensável para a sobrevivência da espécie. Entretanto, ele é indesejável em lavouras comerciais, uma vez que o desenvolvimento da inflorescência reduz o teor de sacarose nos colmos (THOMAS, 2016). Sabe-se que a frutose é uma inibidora competitiva da enzima invertase que está relacionada com o teor de sacarose nos tecidos.

1.2.3 Fisiologia e metabolismo

A cana-de-açúcar é uma planta alógama e perene que significa ser preferencialmente reproduzida por polinização cruzada e de crescimento contínuo, respectivamente (JADOSKI, 2010). Importantes conclusões sobre as enzimas invertases em plantas vieram da compreensão do mecanismo de acúmulo de sacarose nos tecidos de armazenagem da cana. A sacarose é formada como um resultado da assimilação fotossintética de CO₂ extremamente eficientes, assim como todas plantas superiores. Esta molécula é a principal forma de translocações de carboidrato no corpo, indicando que esta molécula pode ser sintetizada, ressintetizada e invertida diversas vezes antes de cumprir seu papel fisiológico (SUZUKI, 1982).

A cana-de-açúcar possui alta taxa de fixação de carbono atribuída à atividade enzimática durante o ciclo de Calvin na fotossíntese. Os granum fornecem moléculas de ATP e NADPH responsáveis pela conversão do ácido 3-fosfoglicérico para gliceraldeído 3-fosfato (figura 5).

A conversão do gliceraldeído 3-fosfato em frutose resulta em um dos produtos mais rentáveis economicamente: a sacarose, figura 6. No meio fisiológico é a maneira a qual os açúcares são transportados dentro dos tecidos. A xilose também possui alto interesse industrial e comercial, sua biossíntese vem da forma fosforilada juntamente com a eritrose 4-fosfato. Os processos de biossíntese, transporte e armazenamento envolvem um conjunto de enzimas como sintetases de sacarose, sintetases de sacarose-fosfato, invertases ácidas vacuolar (predominante em tecidos imaturos) e invertases alcalinas vacuolar (predominantes em tecidos maduros). Observa-se que o nível de atividade de invertases vacuolar fornece informações prévias sobre o potencial de armazenamento de carboidratos totais.

Após a estruturação da eritrose 4-fosfato, segue-se a via do ácido chiquímico para a formação da fenilalanina, molécula precursora dos ácidos p-cumárico, cafeico e sinápico, como mostrado na figura 7. A biossíntese dessas moléculas compõe os principais metabólitos fenólicos produzidos pela *saccharum*, juntamente com os polifenólicos da classe dos flavonoides. Esses ácidos acima citados participam da via policetídica e culminam nas flavonas

apigenina, tricina e luteolina, sendo esta última precedente da diosmetina após a ação enzimática da cafeato-*O*-metil-transferase (COMT), vide figura 8.

Os metabólitos da cana-de-açúcar possuem alto potencial terapêutico, em estudos recentes são investigados e demonstram ser eficaz para a diminuição dos sintomas de COVID-19 e redução do tempo de internação (SHIRI, 2021).

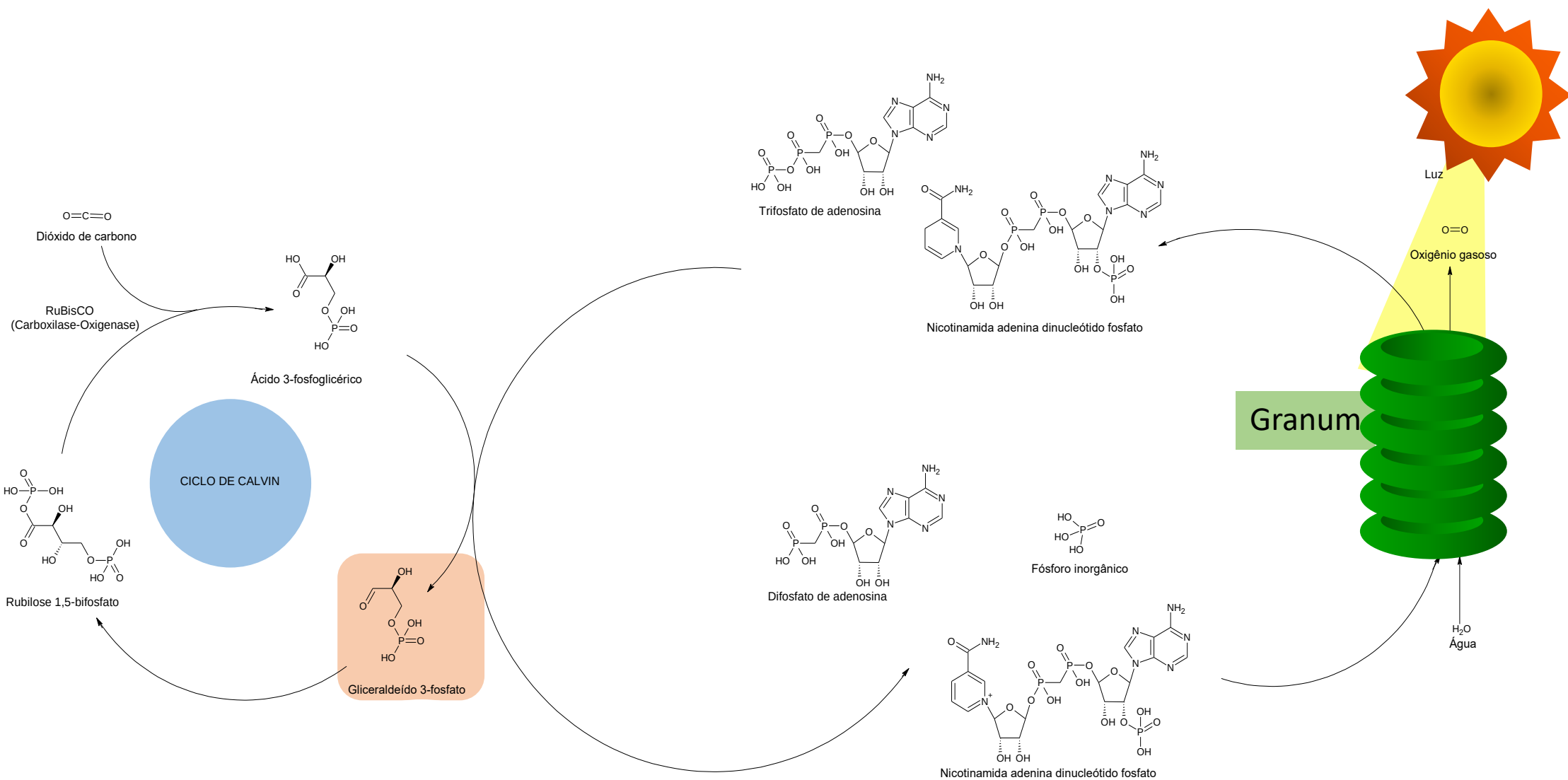


Figura 5. Representação sucinta da fotossíntese do precursor gliceraldeído 3-fosfato pelo ciclo de Calvin

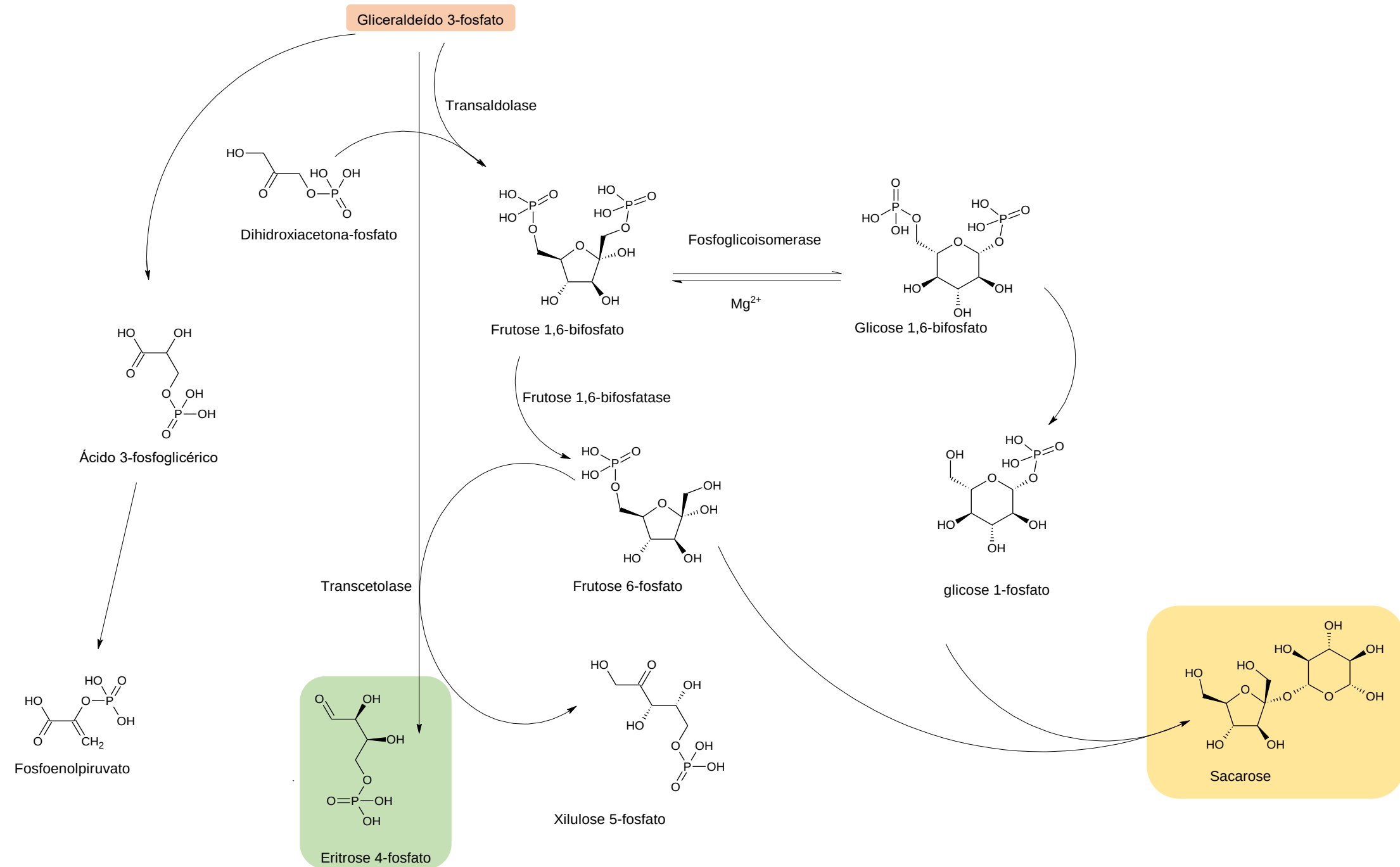


Figura 6. Vias biossintéticas resumida da sacarose e eritrose 4-fosfato

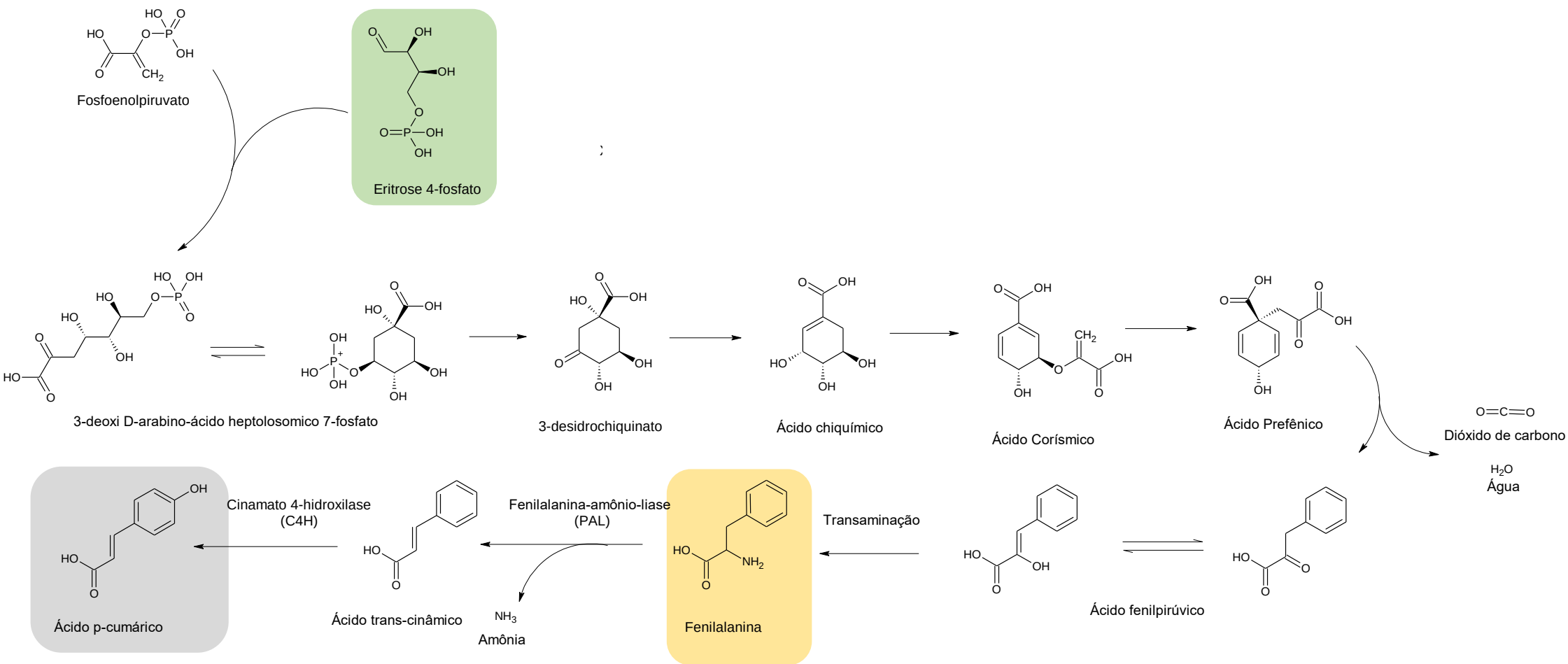


Figura 7. Representação da via do ácido chiquímico

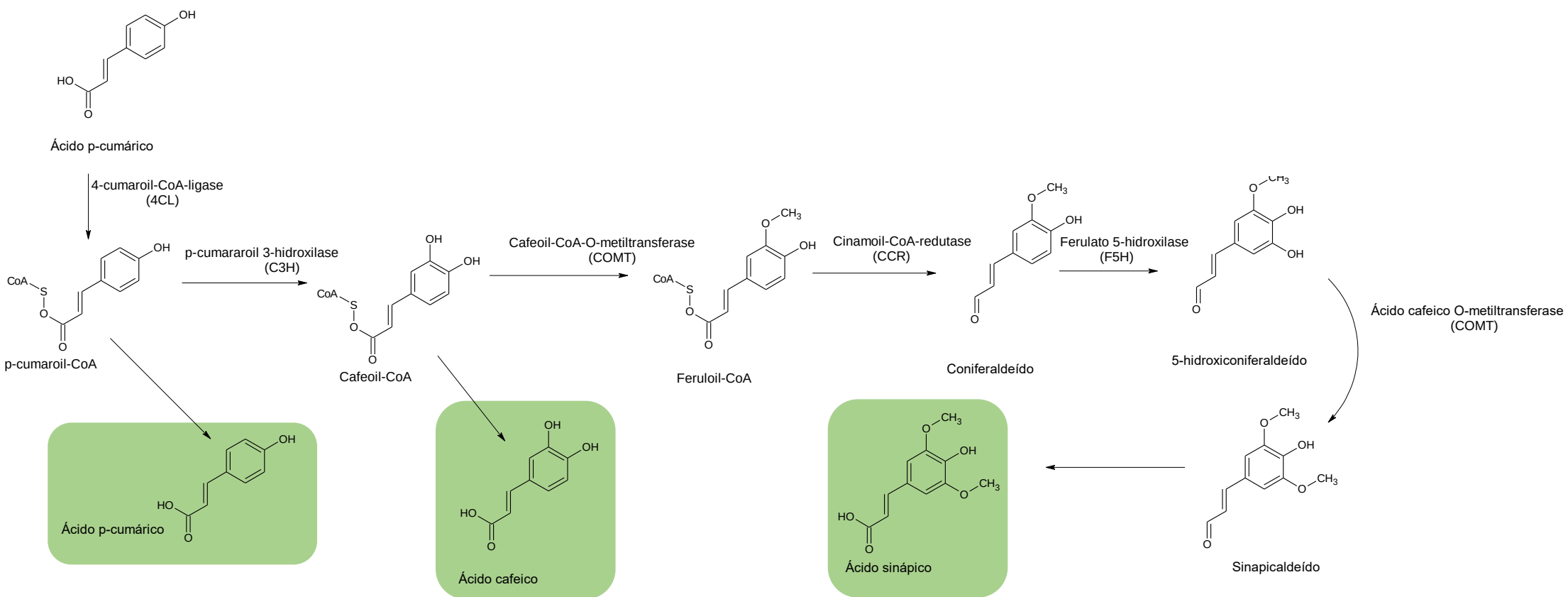


Figura 8. Formação dos ácidos p-cumárico, cafeico e sinápico

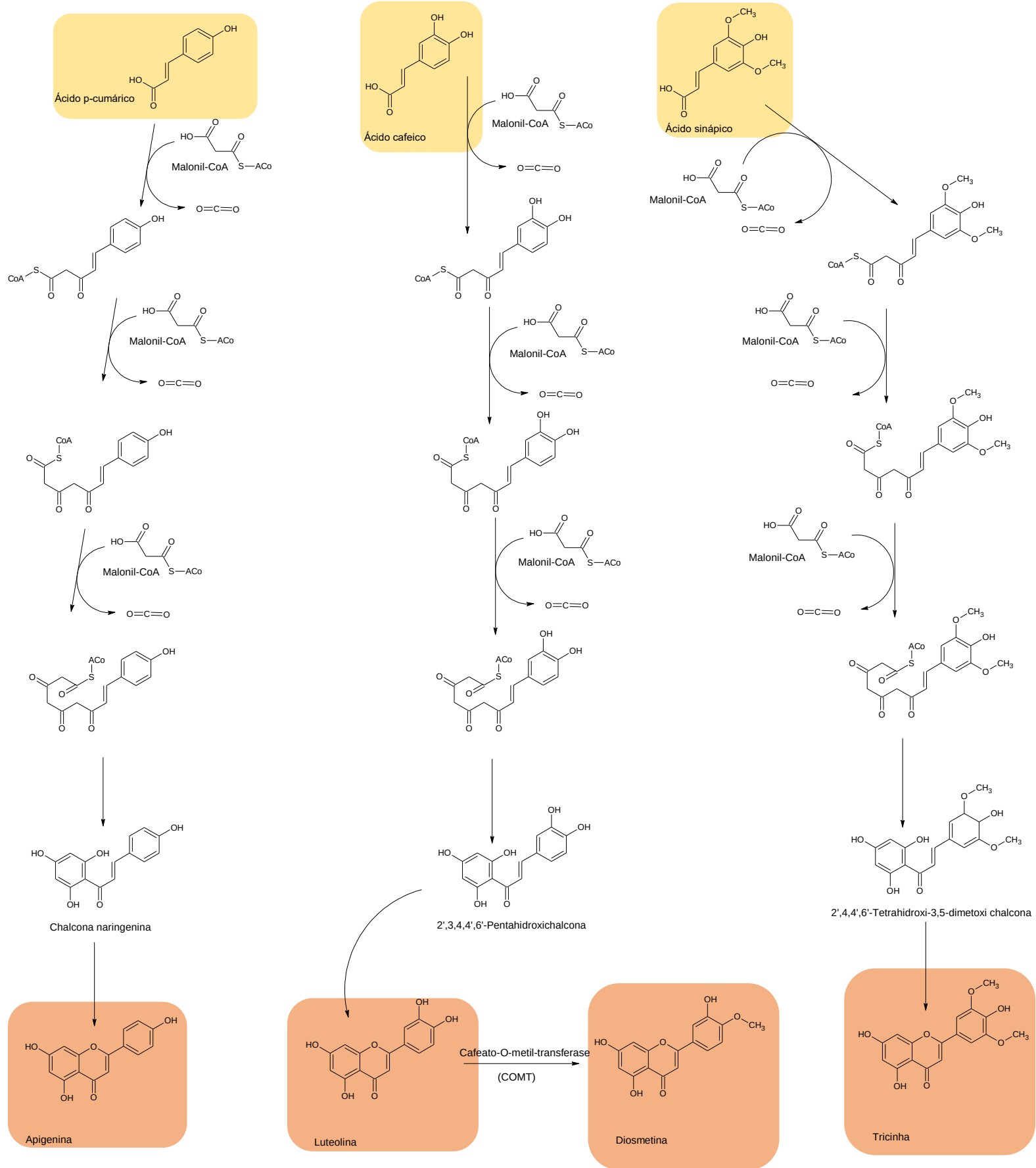


Figura 9. Representação reduzida da via mista (chiquimato e acetato) para formação das flavonas apigenina, luteolina, diosmetina e tricina

1.3 Preparo de amostras

Atualmente, cerca de 25 a 30% de todos os princípios ativos utilizados na terapêutica são extraídos de produtos naturais, na maioria das vezes oriunda de plantas superiores. O Brasil é um dos grandes centros do mundo quando a biodiversidade é considerada, detém 28% do que restam de florestas tropicais do planeta e o maior número de espécies de plantas superiores (VEGGI, 2009).

Durante a **coleta** de uma planta, os espécimes a serem estudados devem ser saudáveis, pois infecções microbianas podem alterar os metabólitos produzidos pela amostra. Nesta etapa acontece a estabilização metabólica, onde os processos enzimáticos cessam-se. O congelamento em nitrogênio líquido do material vegetal é uma opção para manter os compostos preservados, podendo ser considerado um sério fator de erro quando não há prudência na manipulação correta do organismo, assim como a sujeira e impurezas presentes nos arredores do local da coleta.

Na maioria dos casos, a **secagem** do material vegetal é feita em atmosfera antes do processamento. Seco à temperatura ambiente ou na estufa a não mais de 30 °C e mantido longe da luz solar direta porque a radiação ultravioleta pode produzir reações químicas que dão origem a artefatos (BELWAL, 2018). Portanto, locais bem ventilados e a distribuição homogênea do material vegetal devem ser assegurados para evitar infestações por fungos e em temperaturas elevadas por fermentação. Neste ponto há perdas consideráveis de metabólitos lábeis prejudicando

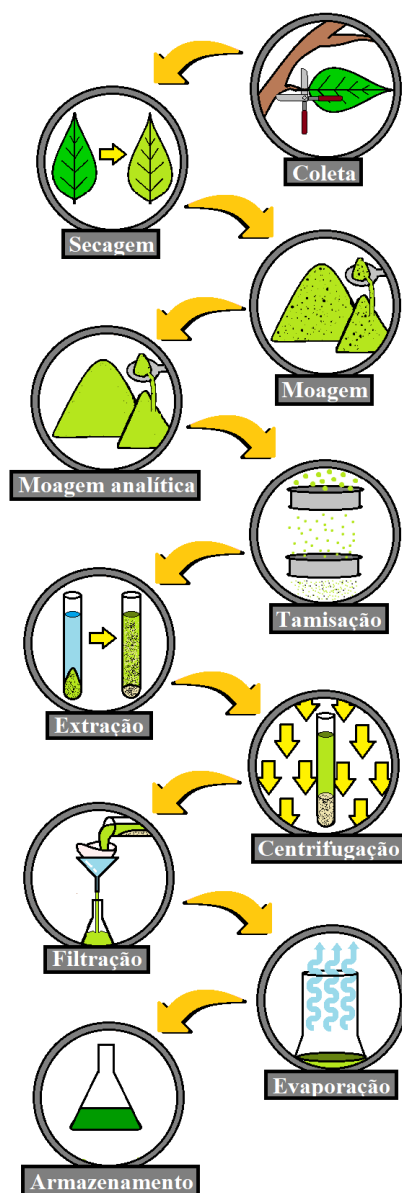


Figura 10. Ilustração das etapas para a elaboração de um extrato.

análises em cromatografia gasosa, por exemplo. A liofilização costuma ser uma técnica muito empregada para a diminuição de erros, pois desidrata o tecido vegetal ainda congelado.

Para a **moagem** do material vegetal, diversos tipos de equipamentos podem ser utilizados, desde sofisticados moinhos a liquidificadores. Verificou-se que quanto menor o tamanho da partícula do material vegetal, mais eficiente é a extração. Nesta etapa também se perdem informações sobre compostos voláteis com a destruição celular dos tecidos.

A **extração** eficaz de um composto vegetal ou de compostos de interesse de uma planta natural fonte, depende muito das considerações de solubilidade, estabilidade e grupo funcional. Os métodos de extração a serem empregados para obter um extrato vegetal bruto devem evitar a decomposição do composto ou rearranjos durante o processo (Martin, 1987).

Os processos de extração convencionais são bastante trabalhosos, demorados e envolvem grandes quantidades de solventes, como hidrocarbonetos, álcoois e cloroalcanos. Acima de tudo, apesar do alto consumo de energia e da grande quantidade de solventes, o rendimento costuma ser muito baixo. Portanto, na última década, técnicas de extração mais seguras e eficientes são baseadas em um compromisso razoável entre os requisitos econômicos, sociais e ambientais. O conceito de química verde foi baseado em princípios que aparecem como diretrizes usadas para projetar produtos químicos e processos que reduzem ou removem completamente a aplicação e criam substâncias nocivas e perigosas. Através do uso de produtos químicos e solventes pouco prejudiciais ou totalmente inofensivos para a saúde humana e o meio ambiente, projeta-se processos mais seguros e eficientes em termos de energia e facilitar o uso de matérias-primas renováveis. Hoje, a química verde já ultrapassou o campo da química e é reconhecida em diversos campos industriais, como tecnologia de alimentos e biotecnologia (BUBALO, 2018).

A **filtração** pode ser fonte de erro muito pouco relatado na literatura. Mas a composição do filtro utilizado pode interferir quimicamente com a amostra ou com o solvente utilizado na extração, adquirindo bandas interferentes no processo cromatográfico.

Cuidados com o **armazenamento** do extrato bruto devem ser tomados para evitar processos de degradação ou surgimento de artefatos na amostra.

Precauções como: 1) armazenar em local escuro evita a degradação por radiação eletromagnética; 2) armazenar sob atmosfera inerte evita oxidação pelo ar; 3) adição de antioxidantes impede também a oxidação, porém pode interferir na resolução cromatográfica e 4) submeter o extrato bruto a temperaturas baixas, evitando alterações dos compostos com o passar do tempo.

A ressolubilização do extrato para a concentração de interesse antes da análise cromatográfica mostra-se questionável. Muitas vezes o extrato arranja-se como uma suspensão coloidal, ao invés do aspecto translúcido do extrato líquido obtido etapas antes.

1.4 É possível pular as etapas de preparo de amostras?

Por tempos acreditava-se que a elaboração de extrato era uma etapa crucial para estudos metabolômicos. O preparo de amostra pode durar dias ou até semanas recorrendo a diversos tipos de técnicas, equipamentos e solventes. Durante este processo evita-se alterar os metabólitos de um organismo, mantendo condições brandas da colheita até a análise em cromatografia líquida.

Será que artefatos são gerados? Podemos confiar que os metabólitos não se decomponham até o fim das etapas de preparo? A resposta para estes questionamentos deriva de estudos a cerca de uma extração seguida dos processos de separação e detecção: extração em linha (do inglês, *on-line extraction*). Esta dissertação busca evidenciar resultados promissores para estudos fitoquímicos, fisiológicos e bioquímicos, buscando remover barreiras antes postas como insuperáveis.

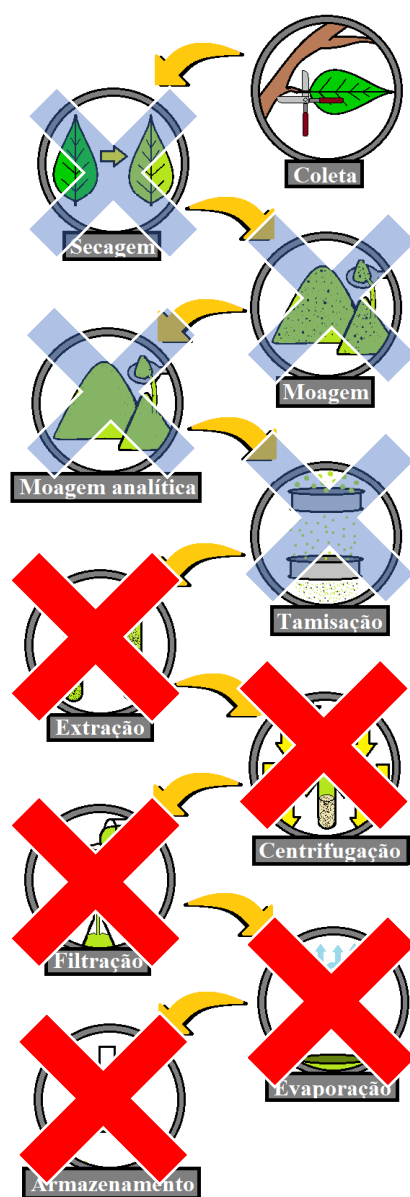


Figura 11. Ilustração das etapas de preparo de amostras dispensáveis (X vermelho) e opcionais (X azul) para o método de extração *on-line*.

Padronizando uma câmara de amostragem barata e de fácil acoplagem a um sistema de cromatografia, permitiu-nos evitar etapas longas de preparo de amostra. Neste método, substâncias discretas passaram a serem identificadas com elevado nível de precisão e reprodutibilidade. Este equipamento, denominado OLE, permite fazer estudos a partir de 1 mg tecido fresco, onde o gradiente utilizado para a separação cromatográfica torna-se a mistura extratora da amostra. Parece uma solução próspera para análises de organismos pequenos ou até mesmo de fragmento tecidual com uma intensidade cromatográfica elevada, quando comparada aos métodos *off-line*.

1.5 Métodos de análise estatística

1.5.1 Análise através de redes moleculares

A procura de moléculas inéditas bioativas impulsionou o desenvolvimento de ferramentas computacionais analíticas, agilizando o processo de comparação individual entre espectros de compostos. Assim, a análise por redes moleculares surge para visualização de um grande conjunto de dados. A *Global Natural Products Social Networking* (GNPS) é uma plataforma online de livre acesso para o cálculo de redes moleculares a partir dos dados de espectrometria de massas. O espectro de determinada substância é representado por um nodo, e os arcos que os conectam, representam os valores de similaridade entre os grupamentos espectrais cujo os valores variam de 0 a 1 (PILON, 2021).

Para aquisição dos dados é utilizado o software Cytoscape analisa e visualiza redes muito grandes, fornecendo maior flexibilidade em termos de importação de dados adicionais e visualização destes em redes. Possui aplicativos que os usuários podem instalar para adicionar mais funcionalidade, sendo uma ferramenta de rede geral, não uma rede banco de dados e, como tal, precisa importar suas redes de outro lugar (DONCHEVA, 2021).

1.5.2 Análise de Componentes Principais

Análise de Componentes Principais (PCA) é um método linear que também é usado para extração de recursos multivariados. Mapeia-se os dados para o espaço de recursos de alta dimensão para adquirir uma variedade linear (GHOJOGH e CROWLEY, 2019). Esta análise pode ser considerada como uma rotação dos eixos do sistema de coordenadas variável original para novos eixos ortogonais (eixos principais) de modo que os novos eixos coincidam com as direções de máxima variação das observações originais.

O PCA encontra os componentes principais em ordem decrescente de variações. O primeiro componente principal é responsável pela máxima quantidade de variações possíveis nos dados, e o segundo componente principal extrai o máximo de variações possíveis nos dados após excluir o que foi descrito pelo primeiro componente. As variáveis originais variam juntas em algum padrão. Além disso, os principais componentes do PCA são estatisticamente independentes um do outro, sendo uma técnica de redução de dados que transforma um grande número de variáveis correlacionadas em um conjunto muito menor de variáveis não correlacionadas chamadas componentes principais (LEE, 2018).

1.6 Objetivos

Modificar a câmara de amostras para padronização da extração on-line e comparar os dois procedimentos de preparação de amostras para *fingerprinting* metabólico em folhas de cana-de-açúcar desenvolvidos no NuBBE com dois procedimentos referência usados nesse tipo de análise metabolômica, considerando a abrangência, eficiência, reprodutibilidade, rapidez e robustez, além dos aspectos de química verde também serão fatores importantes nessa comparação.

2. METODOLOGIA

2.1 Coleta

Manipulou-se durante a coleta apenas uma enxada de cabo largo para a retirada do material vegetal inteiro. Cinco indivíduos foram retirados do canavial com altura média de 5 m, às 14 horas do dia 04 de maio de 2018, nas coordenadas de latitude -21,813500° (21°48'48.6"S) e longitude -48,203900° (48°12'14.0"O). Em seguida, foram levadas para o Instituto de Química da UNESP Araraquara a aproximadamente 1,35 Km do local da coleta.

No mesmo dia, em ambiente coberto, com o auxílio de um facão de aço carbono de 13", particionou-se as canas-de-açúcar em inflorescência, folhas (verdes, secas e intermediárias), nós do colmo (gemas), entre-nós do colmo (casca e cerne) e rizoma (raízes primárias e raízes secundárias).

2.2 Secagem

Imediatamente após a partição, as amostras foram colocadas dentro de sacos de papel pardo e depositadas em um forno ventilado à temperatura constante de 35°C por três dias. As raízes foram previamente lavadas em água corrente filtrada para a retirada da terra.

2.3 Moagem

Utilizou-se um moinho de dez facas com rotação fixa de 1750 RPM para dilacerar as fibras dos tecidos vegetais em fragmentos de 10 a 50 mm. Em seguida, pulverizou as amostras em partículas menores que 400 µm por meio de um moinho analítico de 6000 RPM de rotação.

2.4 Tamisação

Selecionado a dimensão de partícula ideal para as próximas etapas, padronizou-se para cada um dos tecidos vegetais coletados a faixa de tamanho entre 50 e 155 µm utilizando tamises de malha de aço inox. Posteriormente armazenados em sacos plásticos seláveis a temperatura ambiente e no escuro.

2.5 Procedimentos de Extração e Armazenamento

Cada procedimento de extração abrangente proposto na literatura requer técnicas e proporções de solventes particulares. Porém os equipamentos utilizados serão os mesmos para eventuais etapas experimentais em comum. Para os procedimentos envolvendo sonicação, utilizou-se ultrassom Elsonic S60H de frequência 37 kHz com 150 W de potência efetiva, termostatizado e com temporizador. A centrífuga empregada foi a CELM Combate com força máxima de 2000 G e rotação de trabalho de 3400 RPM. A extração acelerada por solvente (ASE, abreviatura em inglês) foi manuseada através do Thermo Analítica™ Dionex™ ASE™ com coletor automático de frações, sob as condições de 1050 psi de pressão e os tempos de pré-aquecimento, aquecimento e modo estático de 0 min, 5 min e 2 min, respectivamente, à 40°C. A filtração empregada pelo sistema automático ASE foi exercida pela areia de diatomito previamente inserida na cela de extração de 1 mL e a filtração convencional em bancada foi realizada em algodão. A solução de estoque consiste em 40 mM de formiato de amônio em água:metanol 60:40 (v/v) para diluir os extratos secos e prepara-los para submetê-los à análise cromatográfica. Os protocolos de extração foram adaptados para 1 g de material vegetal moído e realizados todos em triplicatas.

2.5.1 Protocolo de Extração de Paepe (2013)

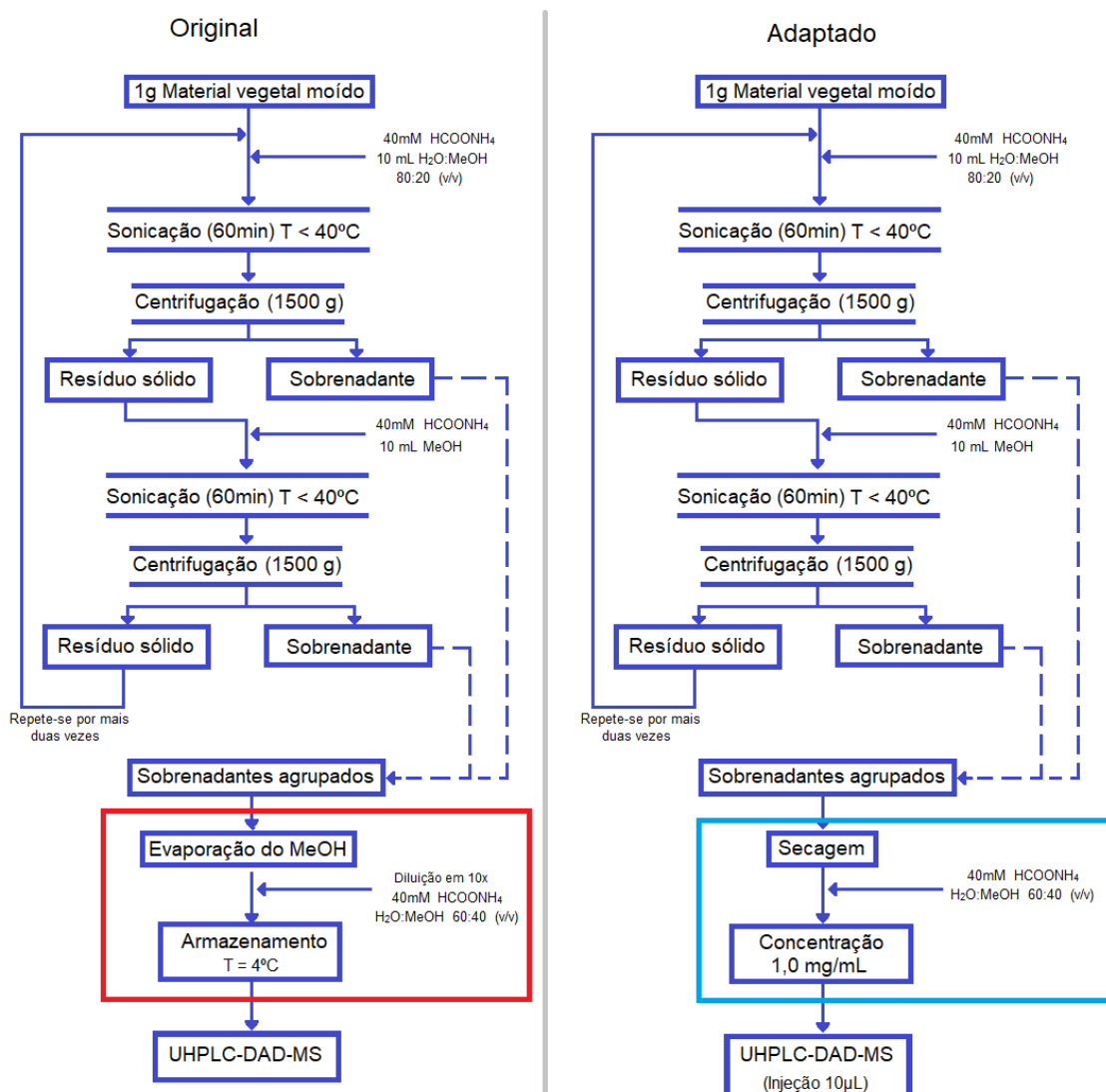


Figura 12. Fluxograma do protocolo de Paepe, indicando as alterações procedimentais do método original (em vermelho) para o método adaptado (em azul).

Focado na extração de metabólitos polares em matrizes vegetais, Paepe propõe na primeira etapa do procedimento uma solução extratora de 40 mM de formiato de amônio em água:metanol 80:20 (v/v). Após a separação de fases, na segunda etapa, a mesma concentração de formiato de amônio é preparada em metanol, concluindo um ciclo de extração. Posteriormente ao terceiro ciclo, armazena-se devidamente o extrato seco até a análise, segundo a figura 10. O rendimento deste protocolo foi de 10,10% (m/m).

A adaptação do método decorreu-se da secagem total do extrato para adquirir seu rendimento e, previamente à análise, foi ajustado na concentração de 1 mg/mL da solução de estoque.

2.5.2 Protocolo de Extração de Bijttebier (2016)

A fim de extrair metabólitos apolares em plantas, Bijttebier sugere três ciclos de extração em ASE com uma solução de acetona:metanol 70:30 (v/v) com 0,1% de hidroxitolueno butilado (BHT) e bicarbonato de sódio misturado com material vegetal na cela extratora, de acordo com a figura 11. Lembrando que a cela do equipamento está devidamente preparada com diatomito. O rendimento deste protocolo foi de 5,63% (m/m).

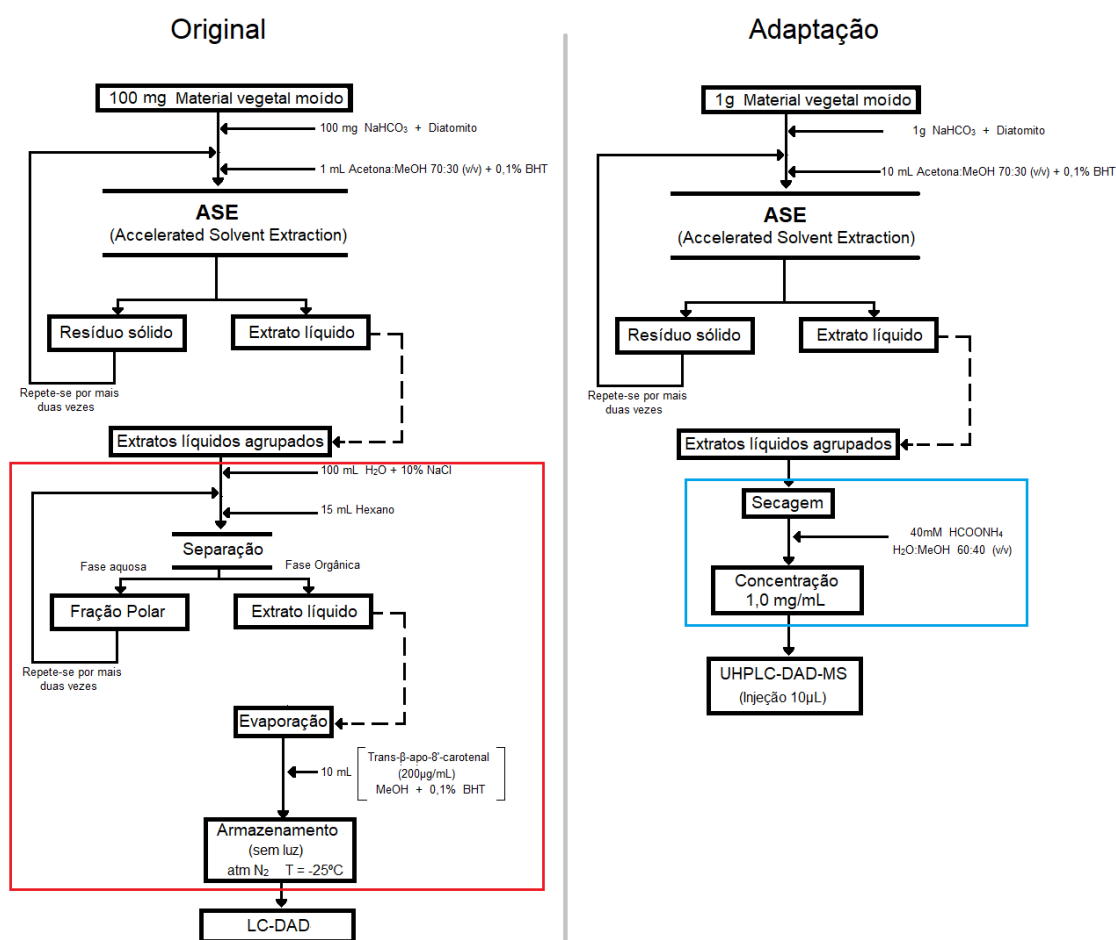


Figura 13. Fluxograma do protocolo de Bijttebier, indicando as alterações procedimentais do método original (em vermelho) para o método adaptado (em azul).

Foi eliminada a etapa de separação líquido-líquido, uma vez que se perderia informações sobre uma análise metabolômica abrangente e, ajustando a etapa de armazenamento, retirou-se do protocolo a adição do padrão de trans-β-apo-8'-carotenal (apocarotenal) e BHT. Para secá-lo posteriormente para obter rendimento e regulação na concentração de 1 mg/mL de solução estoque antes da análise.

2.5.3 Protocolo de Extração de Yuliana (2011)

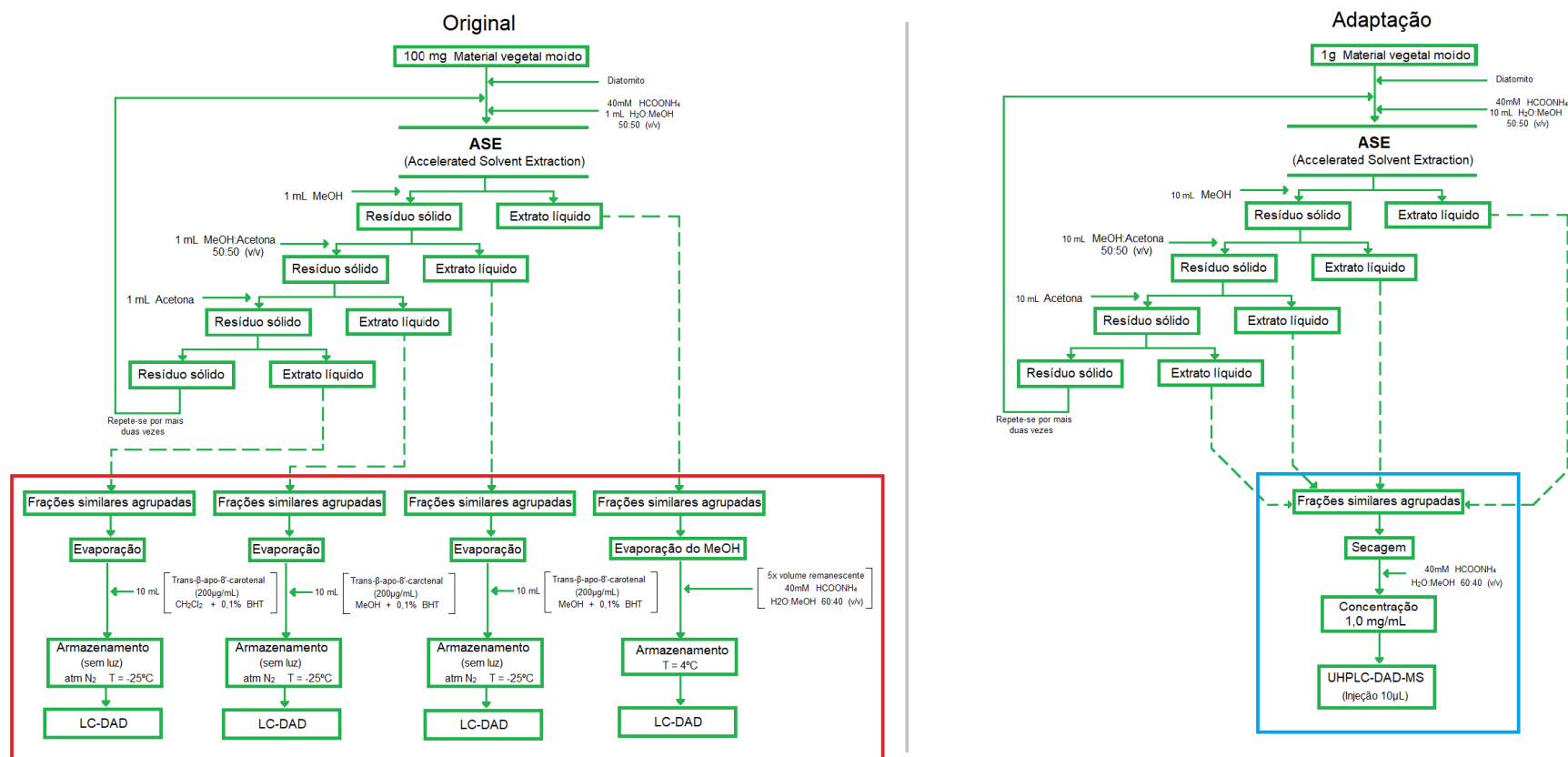


Figura 14. Fluxograma do protocolo de Yuliana, indicando as alterações procedimentais do método original (em vermelho) para o método adaptado (em azul).

Yuliana apresenta um protocolo utilizando ASE para extração de ampla faixa de polaridade de metabólitos em tecidos vegetais. Cada ciclo possui quatro passos: o 1º utilizando como solvente de extração 40 mM de formiato de amônio em água:metanol 50:50 (v/v); o 2º metanol puro; o 3º acetona:metanol 50:50 (v/v) e o 4º apenas acetona pura. O procedimento fora realizado em triplicata, conforme figura 12.

Uniu-se os extratos para sua secagem afim de obter o rendimento. Em seguida houve a ressolubilização das amostras para concentração de 1 mg/mL na solução estoque antes da análise cromatográfica. Excluiu-se a adição dos padrões internos do protocolo original, para que não interferissem na medição do rendimento que foi de 5,85% (m/m) e muito menos na aquisição de dados espectroscópicos.

2.5.4 Protocolo de Extração de Leme (2014)

O método estabelecido no Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais (NuBBE) foi validado por Leme demonstrando ser um método rápido, simples e com princípios da química verde na extração abrangente de metabólitos para folhas de cana-de-açúcar. Uma proporção de água:etanol:isopropanol 30:45:25 (v/v/v) foi empregado como solvente para três ciclos de extração assistida por ultrassom em uma ampla faixa de polaridade (figura 13).

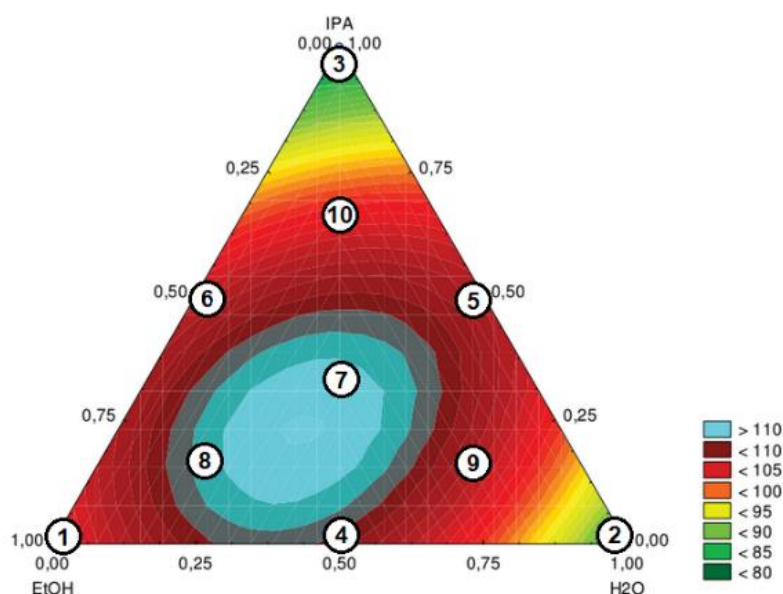


Figura 15. Diagrama ternário da proporção de água:EtOH:IPA mais eficientes para extração metabólica em folhas de cana-de-açúcar. Fonte Leme, 2014.

A adaptação do protocolo foi retirar a etapa da separação em fase sólida com o propósito de não suprimir informações durante a análise cromatográfica devido à retenção de substâncias em C18 (40µm, JT Backer) durante o *clean up*. Então, após a secagem para a obtenção de seu rendimento de 13,28%, o extrato sólido foi ressolubilizado à concentração de 1 mg/mL previamente a análise (figura 14).

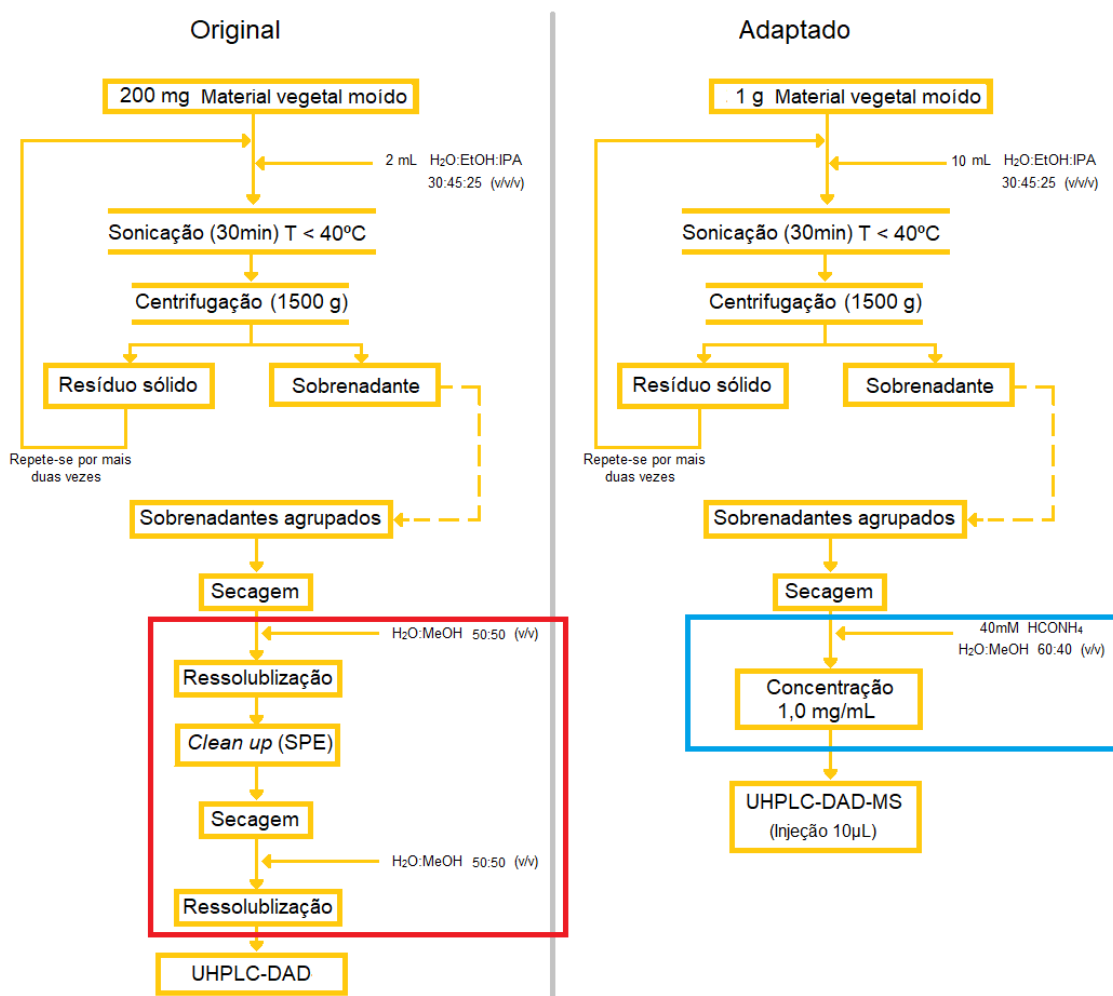


Figura 16. Fluxograma do protocolo de Leme, indicando as alterações procedimentais do método original (em vermelho) para o método adaptado (em azul).

2.5.5 Protocolo de Extração de Ferreira OLE-LC (2016)

Este protocolo criado e validado no NuBBE por Ferreira (2016) e colaboradores reduz drasticamente o número de passos de tratamento de amostras que antecedem a análise cromatográfica. Neste método, após a etapa de tamisação, 1 mg de material vegetal é colocado em uma câmara de amostra, adaptando uma pré-coluna (SecurityGuard Phenomenex) e o volume interno completado com C18 (40µm, JT Backer). Uma membrana de Nylon (0,2 µm de diâmetro de poro, Scheleicher & Schuell) foi posta na entrada e saída do compartimento interno da câmara de amostra com a finalidade de evitar entupimentos na tubulação e coluna por material vegetal particulado. Por fim, a câmara de amostras carregada foi instalada na válvula de seis portas no local alça (loop) de amostras, permitindo que a fase móvel flua através da pré-coluna antes de entrar no sistema cromatográfico, onde a separação é alcançada. Portanto, a extração metabolômica da matriz vegetal foi feita em linha ao sistema de cromatografia líquida (*On-Line Extraction-Liquid Chromatography*, OLE-LC), conforme ilustra a figura 15.

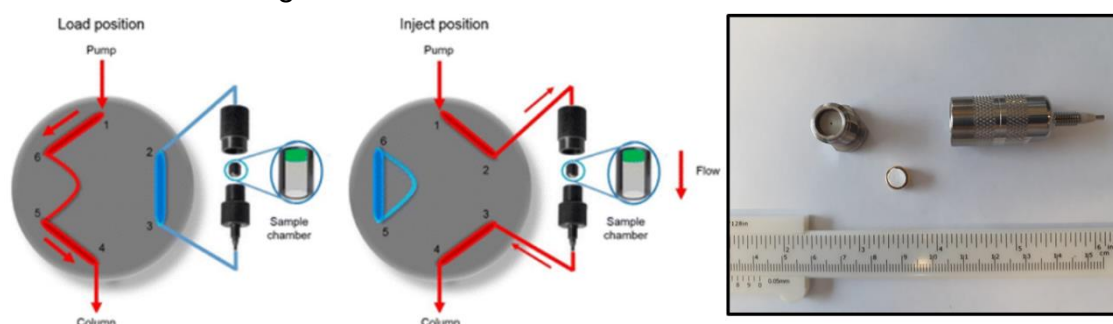


Figura 17. Esquema de funcionamento do procedimento on-line, indicando a colocação do compartimento de amostra na válvula de seis portas no local da alça (à esquerda). Compartimento de amostra desmontado à direita.

A adaptação deste método obteve-se por meio da criação de uma peça compacta específica para este protocolo, simplificando sua montagem e descartando a utilização da sílica C18 e do filtro de Nylon. Sua elaboração será abordada mais a frente deste mesmo trabalho.

2.6 Análise Cromatográfica

2.6.1 Equipamento

O sistema cromatográfico utilizado foi o Ultra-High Performance Liquid Chromatography Dionex™ Ultimate 3000 (Sunnyvale) equipado com uma bomba modelo DGP-3600 RS, um amostrador automático modelo WPS-3000 SL, um forno de coluna modelo TCC-3000 RS, um detector de arranjo de diodos modelo DAD-3000 RS e uma válvula Rheodyne™ de seis portas e duas posições (Oak Harbor). O controle do sistema foi desempenhado pelo software Chromeleon versão 6.80 (Dionex, Sunnyvale). O cromatógrafo estava acoplado a um sistema de espectrometria de massas (MS) Amazon SL Bunker® com fonte de ionização por eletrospray (ESI) e analisador ion trap.

2.6.2 Condições cromatográficas

As condições da separação foram de 1 mL/min de vazão com forno estabilizado na temperatura de 40°C e 10 µL de volume de injeção dos extratos. O detector foi calibrado em 254 nm para o DAD e o MS ajustado para ± 4500 V para o capilar de alta-voltagem e ± 500 V para o deslocamento de fim de placa, dependendo do modo (positivo ou negativo) empregado na análise.

2.6.3 Coluna

Utilizou-se a coluna cromatográfica Kinetex® C18 150 x 4,6 mm, 2,6 µm, 60 Å da Phenomenex. Esta coluna mostrou-se eficiente para uma análise de matrizes complexas, oferecendo maior número e superior resolução de bandas cromatográficas analisadas em cana-de-açúcar em trabalhos anteriores (LEME et al., 2014).

2.6.4 Gradiente de extração/eluição

Os solventes utilizados no método cromatográfico foram água (solvente A) e metanol (solvente B), ambos com 0,1% de ácido fórmico. O gradiente varia de 5/5/50/100/100 %B em 0.0/4.5/55.0/65.0/80 min, vazão de 1,0 mL/min (figura 16)

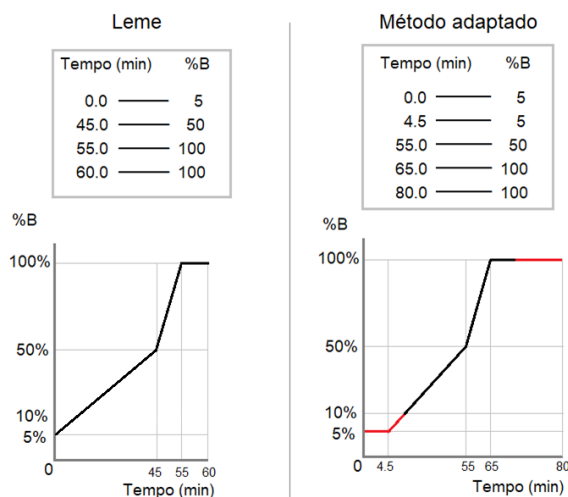


Figura 18. Alteração do gradiente cromatográfico (em vermelho).

A adaptação deste método decorreu-se na inserção de uma etapa inicial isocrática em 5% de B por 4,5 minutos. Assim, procurou-se ampliar a obtenção de bandas na região polar do cromatograma, respeitando a taxa de variação validada pelo autor. Além disso, prolongou-se por mais 10 minutos o momento final isocrático em 100% de B para garantir que todos sinais apolares fossem evidenciados e a limpeza da coluna fosse assegurada.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Desenvolvimento do compartimento de amostras para OLE-LC



Figura 19. Alteração do preenchimento da câmara de amostras: à esquerda, preenchimento da câmara com sílica e material vegetal feita por Ferreira. À direita, apenas o material vegetal realizado com o atual modelo OLE.

Ao decorrer de variadas análises metabolômicas a partir da extração em linha acoplada ao sistema de cromatografia líquida, viu-se a necessidade de executá-las em um modelo com montagem simples e excluindo a sílica para aplicação do sistema (figura 17). Portanto, optou-se por desenvolver uma peça única e facilmente acoplável ao UHPLC, considerando a tecnologia disponível para a sua usinabilidade.

3.1.1 Projeto inicial e adversidades de elaboração

A princípio pensou-se em redefinir as dimensões da pré-coluna para evitar a utilização da sílica C18 na câmara de amostra. O preenchimento do interior da coluna de segurança com a fase estacionária ocasiona problemas de reprodutibilidade.

As dimensões do orifício a serem reproduzidas a partir do modelo de SecurityGuard disponível foram tecnicamente descartadas. O impedimento para realizar esta tarefa constou na falta de tornos mecânicos de alta rotação acessíveis para executar um furo tão pequeno de 0,2 mm. O emprego do corte

a laser também foi preterido por não reproduzir o diâmetro de furo de maneira satisfatória.

Por fim, o encaixe do filtro de aço sinterizado na entrada e saída do compartimento de amostras e a rosca retrátil seriam etapas de difícil execução mecânica para criação de múltiplas peças iguais.

3.1.2 Readaptação da Peça: Retomada do Conceito de Extração

Os desafios mecânicos de elaboração foram decisivos para mudar a ideia do protótipo inicial. Focou-se então no propósito da peça: a permeação de solvente líquido sob alta pressão em uma câmara de amostra contendo material vegetal pulverizado hermeticamente vedado.

Elaborou-se então a câmara de amostras a partir de um material comum em tubulações e vedações em equipamentos de cromatografia líquida de alta pressão, o *PEEK* (**P**oly-**e**ther-**e**ther**k**etone, Poli-éter-éter-cetona). Dimensionada a câmara de amostra ao encaixe de um filtro de aço sinterizado, colocou-se o anel-guia de aço inoxidável acoplado a outro filtro semelhante para vedação do material vegetal na câmara (figura 18).

Dependendo da composição do solvente e das dimensões de partículas empregadas, o desempenho das bombas pode alcançar pressões nas tubulações de até 1000 bar. Para a vedação de todo o sistema sob alta pressão foi desenvolvido o compartimento de amostragem de aço inoxidável e duas roscas de vedação com conexões ao modelo UHPLC utilizado. Acoplou-se PEEK nas extremidades das roscas que ficarão em contato com a câmara de amostra para controle da vazão de entrada e saída durante o processo de extração (figura 19).

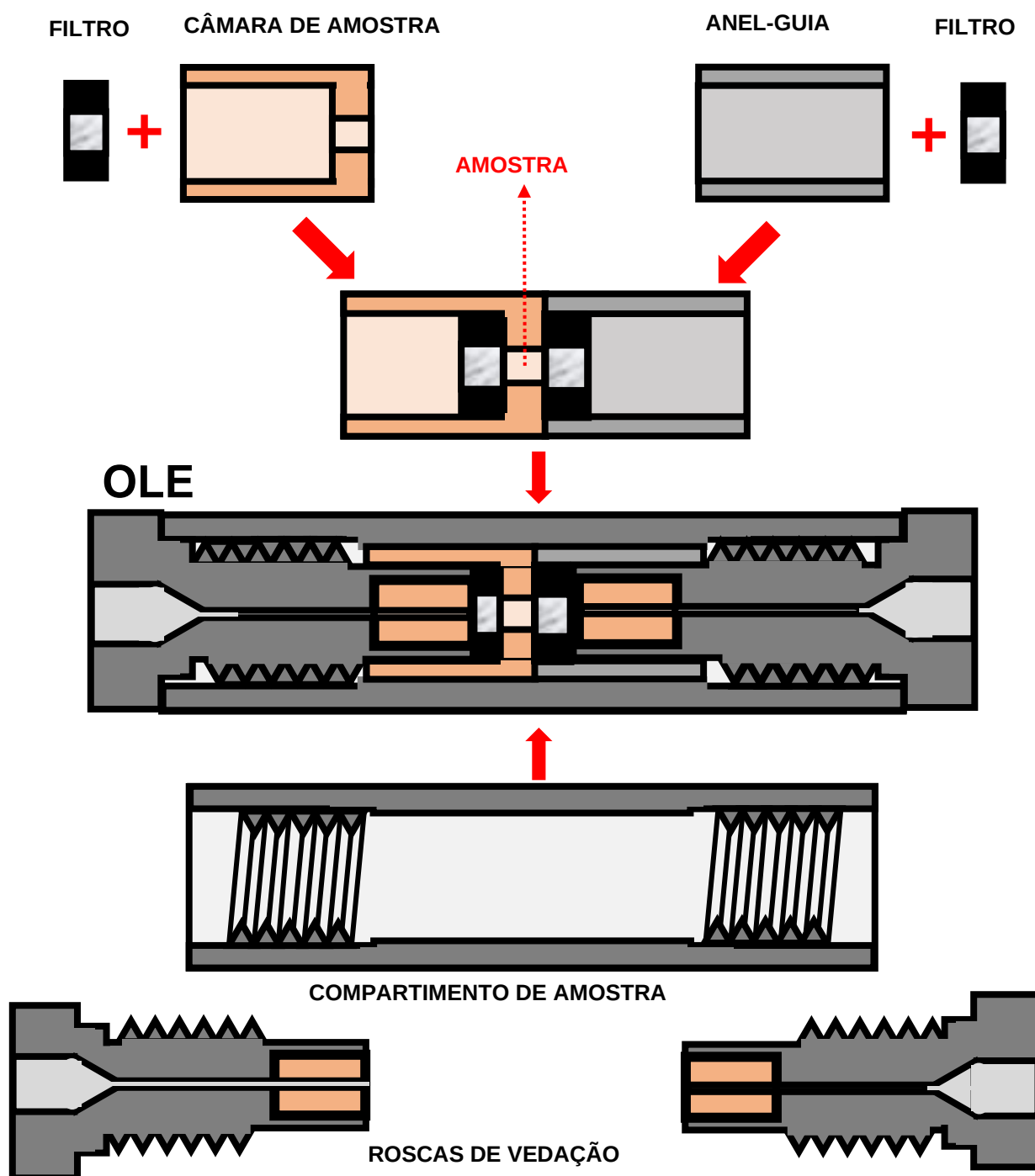


Figura 20. Representação ilustrativa da montagem do modelo OLE atual. Em cinza representando o aço inox e em bege representando o PEEK.



Figura 21. A) Partes externas: roscas de vedação e compartimento de amostras em aço inox. B) Partes internas: câmara de amostra (em PEEK) com filtro de linha embutido, filtro de linha e anel guia (aço inox). C) Alinhamento na ordem de encaixe. D) OLE montado com os adaptadores para o sistema cromatográfico. E) OLE plugado à coluna cromatográfica. F) Quantidade de material vegetal necessário e G) Caixa de armazenamento da peça.

3.1.3 Materiais

Todos os materiais escolhidos para a composição das peças são inertes às interações com o solvente, comumente utilizados em equipamentos cromatográficos modernos.

O poli-éter-éter-cetona (PEEK) é um polímero de engenharia com muitas vantagens, como leveza, alta estabilidade térmica, alta resistência (MOHAMMED, FAREED; 2016). Por isso o empregamos na câmara de amostras e nas terminações das roscas, regiões onde sofrerão fortes pressões mecânicas para vedação do sistema e confinamento da amostra. A boa usinabilidade desse polímero foi fator essencial para replicação das peças.

O filtro de linha de aço sinterizado de tamanho de poro de 5 μm empregados na entrada e saída do lugar de confinamento da amostra. Os filtros tem custo baixo e com padrão de poro garantido pelo fabricante, possibilitando padronizar as dimensões da câmara de amostra, do anel-guia e do diâmetro final das roscas de vedação.

O aço inoxidável é um material com alta resistência mecânica e à corrosão e foi usinada para envolver o sistema de alta pressão para que não ocorra rompimentos ou fratura no compartimento interno.

3.1.4 Testes do protótipo

Antes das análises em UHPLC, o protótipo final foi submetido a testes de vedação e pressão. Para o teste de vedação, foi conectado o compartimento de amostras montado a uma bomba de vácuo e sopro. Em seguida, imergiu-o em um aquário com água para verificar ocorrência de bolhas nas conexões e encaixes. O teste de pressão foi realizado no UHPLC afim de mensurar a pressão adicional que o OLE geraria no sistema. Notou-se uma carga adicional de 60 a 90 bar, dependendo da composição do solvente e vazão de trabalho, que está dentro dos parâmetros de bom-funcionamento das bombas.

3.1.5 Acoplamento ao sistema de cromatografia [OLE-UHPLC]

Cada rosca de vedação possui uma rosca interna feita sob medida para as conexões do UHPLC da marca Dionex™ 3000 e similares. O OLE foi acoplado previamente à coluna cromatográfica, dentro do forno.

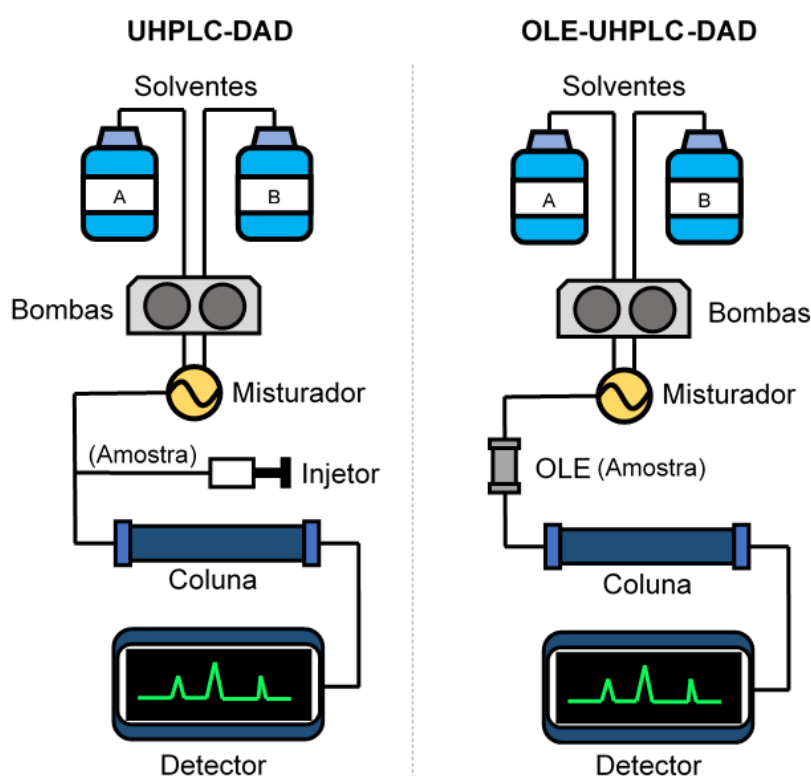


Figura 22. À esquerda, ilustra-se o sistema cromatográfico em análises off-line padrão. À direita, o sistema empregado para análises on-line utilizando o OLE

Esse modelo cromatográfico insere a amostra em linha ao sistema cromatográfico, possibilitando menos etapas entre a extração e separação dos compostos (figura 20). Como esta elaboração é nova, esta técnica pode utilizar o injetor, por exemplo, para adição de padrões ou modificadores durante a análise cromatográfica estudos estes que não estarão em análise para esta dissertação, mas abrem margens para explorar novas perspectivas de investigações metabolômicas. Neste trabalho, os protocolos de OLE-UHPLC foram empregados sem utilização do injetor.

3.2 Análise comparativa UV-Vís [OLE-UHPLC-DAD]

Para comparação inicial, foram selecionadas sete regiões comuns a todos os métodos de extração no perfil cromatográfico, tanto pela semelhança espectroscópica da detecção DAD, quanto pela proximidade de tempo de retenção. As regiões adquiridas foram ordenadas alfabeticamente como mostrado na figura 21.

O protocolo de Bijttebier não estará nos resultados, pois não obteve aquisição de bandas significante para a cana-de-açúcar. Seu método específico para compostos apolares não condiz experimentalmente com a matriz metabólica da *Saccharum*, como discutido anteriormente, já que os metabólitos fenólicos e polifenólicos predominam nos tecidos de forma glicosilada.

Os cromatogramas foram analisados em uma janela de 0 a 55 minutos, sendo que os 4,5 primeiros minutos foram agrupados e denominados grupamento A. Este aglomerado de bandas corresponde a compostos muito polares que não obtiveram uma boa separação. As demais bandas de interesse foram classificadas de B a G que correspondem aos compostos de média e média-baixa polaridade.

Em seguida, enumerou-se as bandas de absorção em UV-Vís e tabelou-se os valores de U.A. para melhor comparação visual entre os protocolos de extração. Utilizou-se um mapa de calor, onde cada conjunto de bandas características recebe valores proporcionais relativos à mesma banda de maior absorção. Os valores resultantes estão em porcentagem como indica a figura 21 e uma escala cromática foi atribuída aos valores estabelecidos.

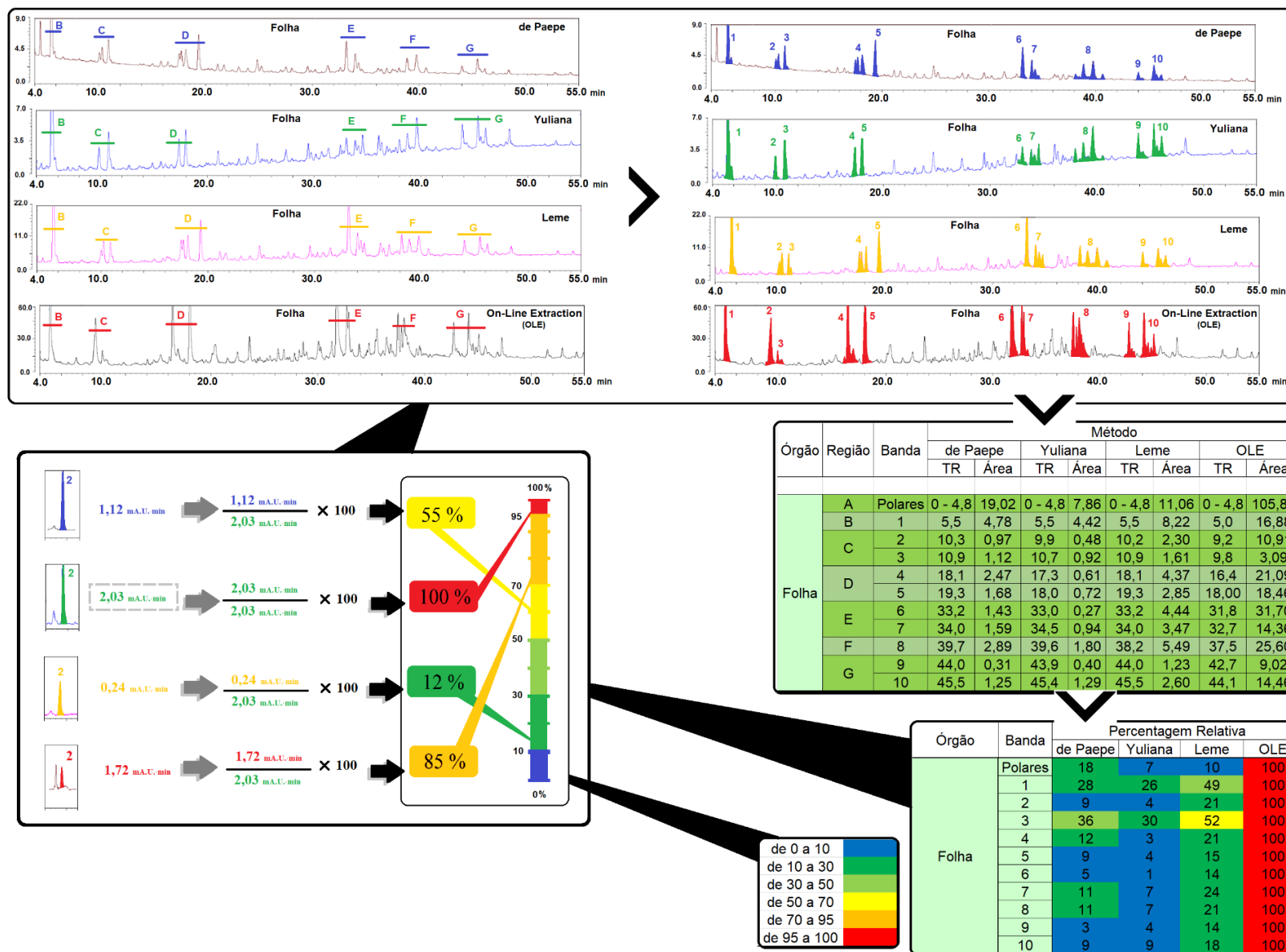


Figura 23. Em cima, o fingerprinting cromatográfico com destaque nas regiões selecionadas (à esquerda) e com as bandas enumeradas (à direita). Abaixo à esquerda, a representação da atribuição da escala cromática dos valores relativos às bandas de interesse. À direita, a tabela com valores de intensidade de absorvância (em mA.U) com tempos de retenção (min). No canto inferior direito o mapa de calor com as porcentagens atribuídas.

Por comparar a absorbância entre moléculas iguais, a proporcionalidade entre suas intensidades evidencia a razão entre as quantidades de compostos extraídos. Sendo assim, em termos globais, a ordem decrescente de desempenho entre os métodos foi OLE > Leme > Paepe > Yuliana. O mapa de calor indica uma performance extremamente eficiente do OLE comparado à intensidade dos outros protocolos. No entanto, esta análise inicial necessita ainda de comprovação estatística, identificação molecular individual e uma análise química holística de seu perfil cromatográfico, antes de qualquer conclusão.

3.3 Análise de absorbância de UV-Vís [OLE-UHPLC-DAD]

Os cromatogramas foram alinhados para o ajuste do tempo de retenção e para cada protocolo foi calculado a média a partir de suas replicatas (figura 22). É evidente que as potencialidades das técnicas de extração se estabeleçam com a comparação entre os *fingerprintings* médios adquiridos.

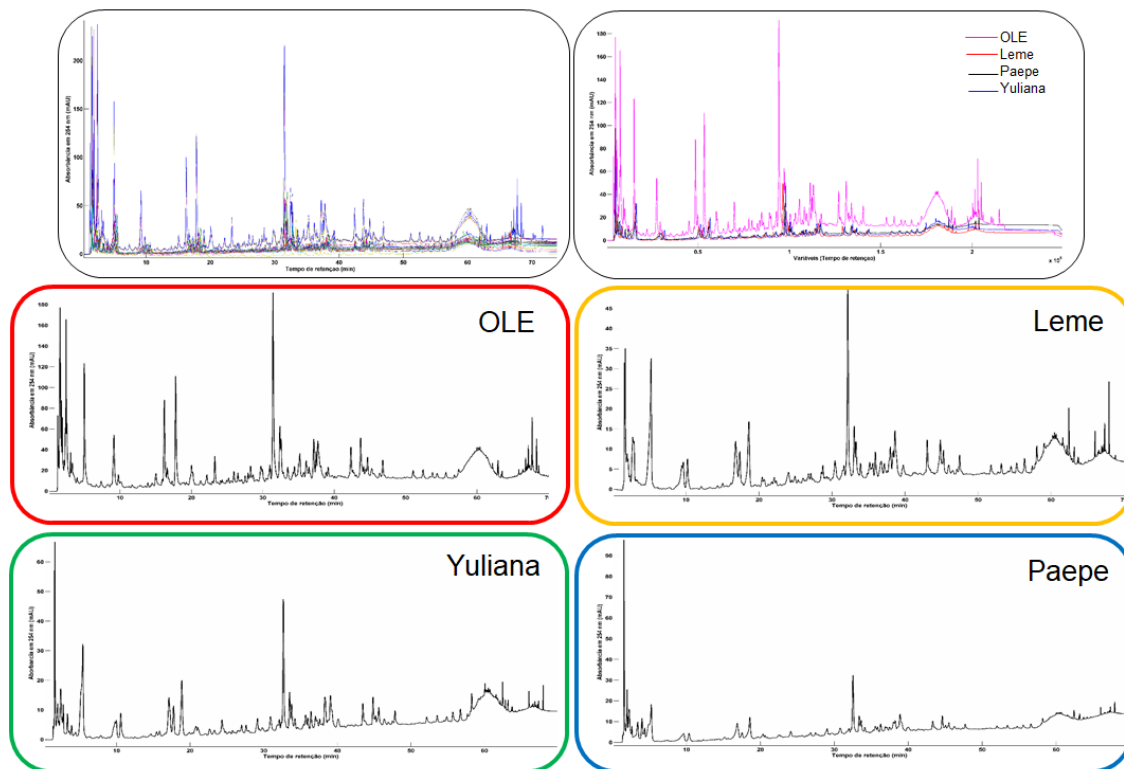


Figura 24. Fingerprinting em UHPLC-DAD de cada replicata sobrepostas (superior esquerdo) e das médias de cada método sobrepostas (superior direito) para as folhas de *Saccharum officinarum*. Em vermelho, fingerprinting médio correspondente ao protocolo OLE. Em amarelo, fingerprinting médio correspondente ao protocolo Leme. Em verde, fingerprinting médio correspondente ao protocolo Yuliana. Em azul, fingerprinting médio correspondente ao protocolo Paepe. As condições cromatográficas foram em tempos de 0/4,5/55/65/80 min sob fluxo de 1 mL/min de 5/5/50/100/100 % de B. A coluna utilizada foi Kinetex® C18 150 x 4,6 mm, 2,6 µm, 60 Å da Phenomenex..

Quando sobrepostos, o cromatograma do OLE em relação aos outros métodos destaca-se com bandas intensas e bem definidas. Individualmente cada protocolo teve sua especificidade. No protocolo de Paepe existem poucas variedades de moléculas extraídas, concentrando sua maior parte na região inicial do cromatograma, onde o caráter dos compostos é polar. Yuliana possui mais diversidade que este último com sinais discretos em todo cromatograma. O protocolo de Leme apresentou o perfil cromatográfico com boas separações e sinais mais intensos comparados aos métodos off-line.

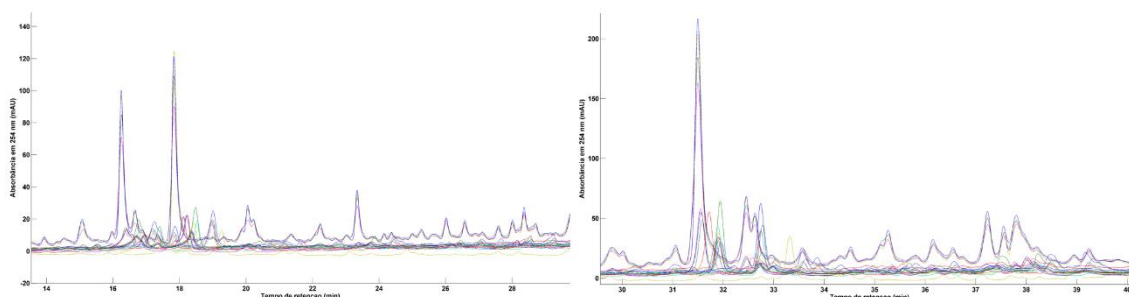


Figura 25. Imagem aproximada do perfil cromatográfico de cada replicata em uma janela de 14 a 29 min (esquerda) e de 30 a 40 min (direita)

Um fator de importante relevância é o destaque que as bandas no método on-line adquirem comparadas ao off-line. Assim, sinais discretos que se confundem com ruídos, ganham significância com o OLE, evidenciando a presença de substâncias antes não aparentes (figura 23).

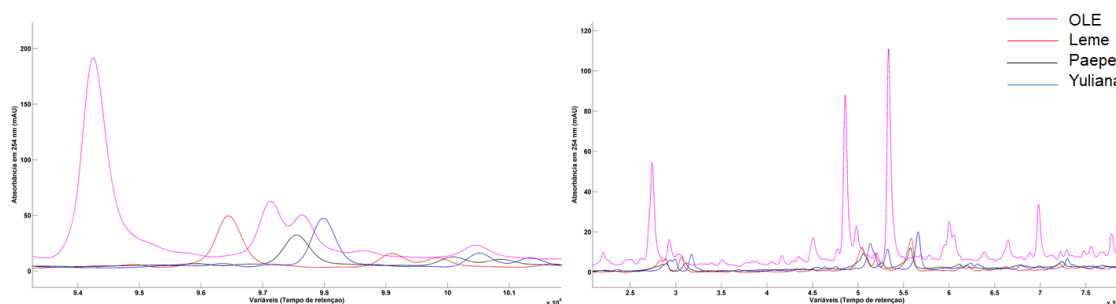


Figura 26. Imagem aproximada do perfil cromatográfico médio para cada protocolo em uma janela de 31 a 34 min (esquerda) e de 17 a 20 min (direita).

Mesmo após o alinhamento entre os cromatogramas um importante elemento a ser apontado são bandas deslocadas entre os métodos on- e off-line (figura 24). Quando se compara os cromatogramas médios, duas hipóteses surgem: 1) artefatos que podem ter ocorrido durante o tratamento de amostras off-line. Estes gerariam compostos de diferentes valores de eluição devido a uma leve mudança de polaridade, causando um deslocamento no tempo de retenção,

ou o 2) volume de encanamento do compartimento on-line. Porém, nesta última os valores de tempo de retenção deveriam ser maiores às bandas equivalentes, sendo que isso não ocorre. Enfim, esse fenômeno não será elucidado nesta dissertação e sem dúvidas merece atenção para análises holísticas futuras.

3.4 Análise de Componentes Principais [OLE-UHPLC-DAD]

A PCA foi aplicada nesta etapa para definir grupos espectrais similares a fim de reduzir o número de variáveis para facilitar a visualização estatística. Dessa forma, a primeira componente principal (PC1) foi carregada com os valores de intensidade e sua componente principal secundária (PC2) carregada com valores de tempo de retenção de 5 a 55 minutos. Obteve-se assim o gráfico de correlação em quadruplicata a um nível de confiança a 95% (figura 25).

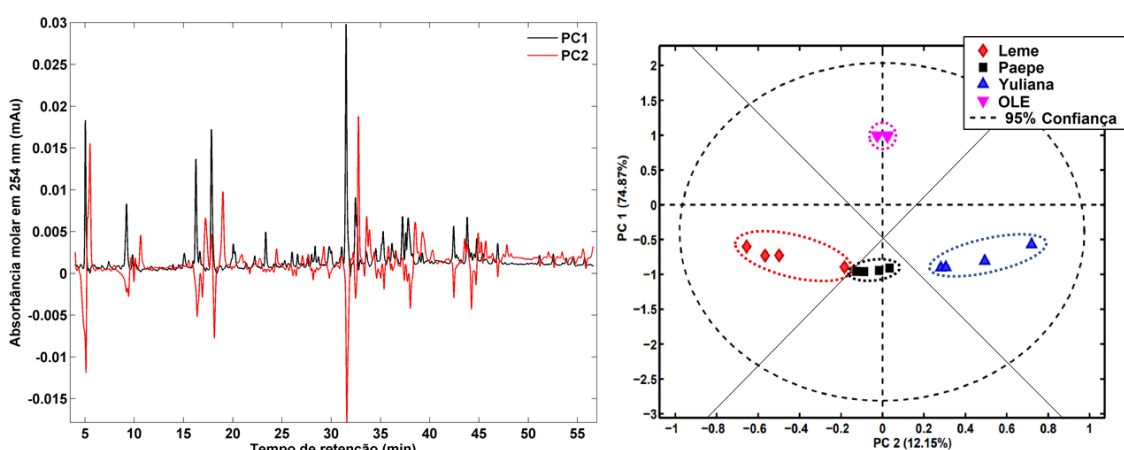


Figura 27. Gráfico de escores (PC1) e pesos (PC2) em mA.U. x min, à esquerda. Dados correspondentes aos protocolos (pontos coloridos) conservando a variância máxima dos vetores respostas com 95% de confiança.

A princípio se observa quatro grupos amostrais distintos correspondentes aos protocolos analisados. Quanto mais próximos os pontos do conjunto, mais preciso e reprodutível o método demonstra ser. Sendo assim, a ordenação decrescente avaliada sob a reprodução precisa de cada extração é OLE > Paepe > Leme $\cong$ Yuliana.

A componente principal 1 (eixo vertical) caracteriza os valores de escores de intensidade da amostra, destacando a extração on-line como o único conjunto de dados na parte positiva. Confirmando as premissas do mapa de calor discutido anteriormente, os sinais de bandas do OLE são elevados comparados aos protocolos off-line. A componente principal 2 (eixo horizontal) representa os

pesos (em inglês *loading*) sobre a variância entre os tempos de retenções amostrais. Mesmo que em distintas intensidades, os tempos de retenção das bandas espectrais do OLE e Paepe estão centralizados, apontando sincronização no processo de separação. O método de Leme possui bandas deslocadas para esquerda no tempo de retenção, assim como o de Yuliana para a direita.

3.5 Identificação de metabólitos [OLE-UHPLC-DAD-MS]

As análises em cromatografia ocorreram de forma hifenada com o detector de massas. Portanto, os métodos de separação off-line (UHPLC-DAD-MS) e on-line (OLE-HPLC-DAD-MS) possuem valores de tempo de retenção maiores comparados ao espectro de UV-vís, por conta do volume de encanamento percorrido entre os detectores DAD-MS. Os compostos identificados são flavonas glicosiladas e ácidos clorogênicos (figura 26).

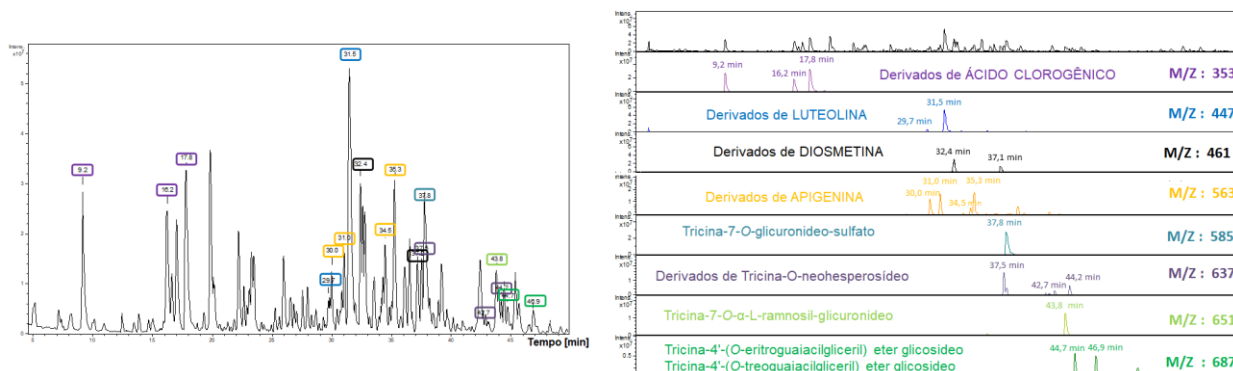


Figura 28. À esquerda, o fingerprinting cromatográfico das folhas de cana-de-açúcar nas condições cromatográficas de tempos de 0/4,5/5/55/65/80 min sob fluxo de 1 mL/min de 5/5/50/100/100 % de B. A coluna utilizada foi Kinetex® C18 150 x 4,6 mm, 2,6 µm, 60 Å da Phenomenex. À direita, estão localizadas as bandas caracterizadas pela razão massa/carga atribuída.

O ácido *trans* 5-cafeoilquínico (em 9,2 min), ácido *trans* 3-cafeoilquínico (em 16,2 min) e ácido *trans* 4-cafeoilquínico (em 17,8 min) pertencem à classe dos ácidos clorogênicos.

A luteolina 8-C-glicosídeo (29,7 min) apresenta sinais ínfimos na cana-de-açúcar. Em compensação, o produto flavonoide de maior ocorrência em toda planta é justamente a luteolina 6-C-glicosídeo (31,5 min). A diosmetina é um produto da ação enzimática na luteolina. Porém, a forma glicosilada

predominante é comum no carobono 8. Assim, as bandas da diosmetina 8-C-glicosídeo (32,4 min) é maior que a diosmetina 6-C-glicosídeo (37,2).

As apigeninas demonstram ser a classe com maior variação de glicosilações que as demais, tanto em posição, quanto ao tipo de açúcar ligado. A apigenina 6-C-arabinosil 8-C-glicosídeo (30,0 min), sua forma isomérica em (34,5 min), apigenina 6-C-glicosil 8-C-arabinosídeo (34,5 min) e apigenina 6-C-glicosídeo (35,3 min) concentram-se no centro do cromatograma.

Na parte final do cromatograma predominam as classes das tricinas nas formas: ticina 7-O-glicuronídeo-sulfato (37,8 min), os isômeros das tricinas O-neohesperosídeos (37,5 min; 42,7min e 44,2 min), tricina 7-O- α -L ramnosil-glicuronídeo (43,8 min), tricina-4'-(O-eritroguaiacilgliceril) eter glicosídeo e tricina-4'-(O-treoguaiacilgliceril) eter glicosídeo (44,7 min e 46,9 min). Estes dois últimos não possuem ordem de eluição definida pela espectrometria de massas, mas se sabe) que ocorrem nos tecidos da cana-de-açúcar.

3.6 Comparação e análise utilizando rede social global molecular de produtos naturais [OLE-UHPLC-DAD-MS]

Através da rede social global molecular de produtos naturais estabeleceu-se grupos, onde cada molécula (nodo) correlaciona-se com dados de massas obtidos no espectro cromatográfico. Um arco ligante entre nódulos indica uma similaridade igual ou acima de 95%, a partir dos padrões de fragmentação.

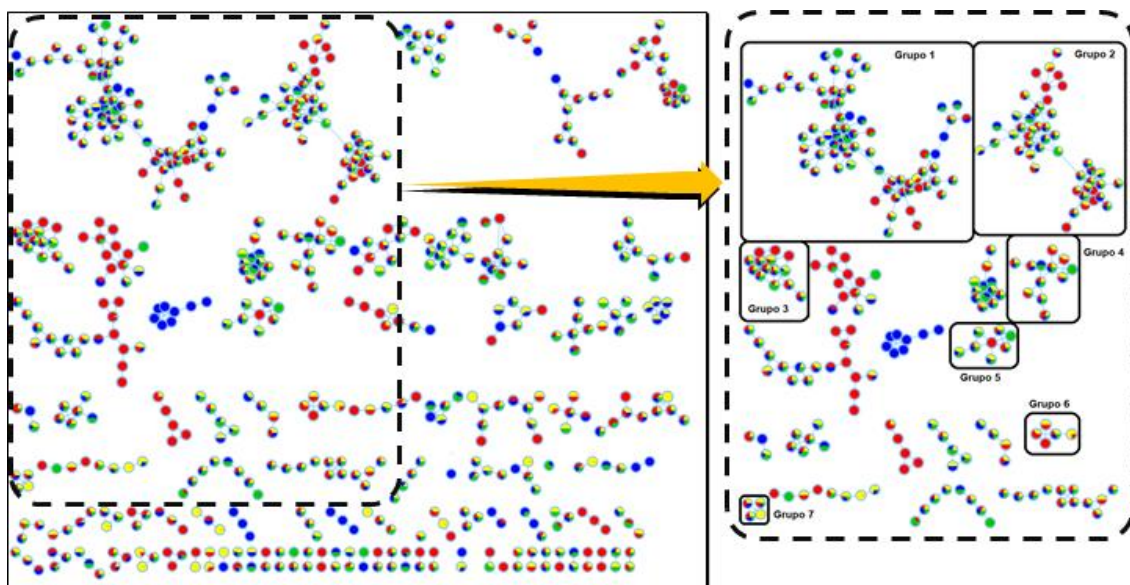


Figura 29. Redes moleculares exibidas no espaço químico de detecção de massas para conjuntos de espectros de moléculas relacionados, à esquerda. Grupos identificados com pelo menos uma molécula alvo contida, à direita.

Os grupos (em inglês *cluster*) de interesse foram definidos ao localizar a razão massa/carga (m/z) respectiva às substâncias identificadas (figura 27). A partir dessa divisão, foi possível avaliar o desempenho de extração de cada molécula alvo.

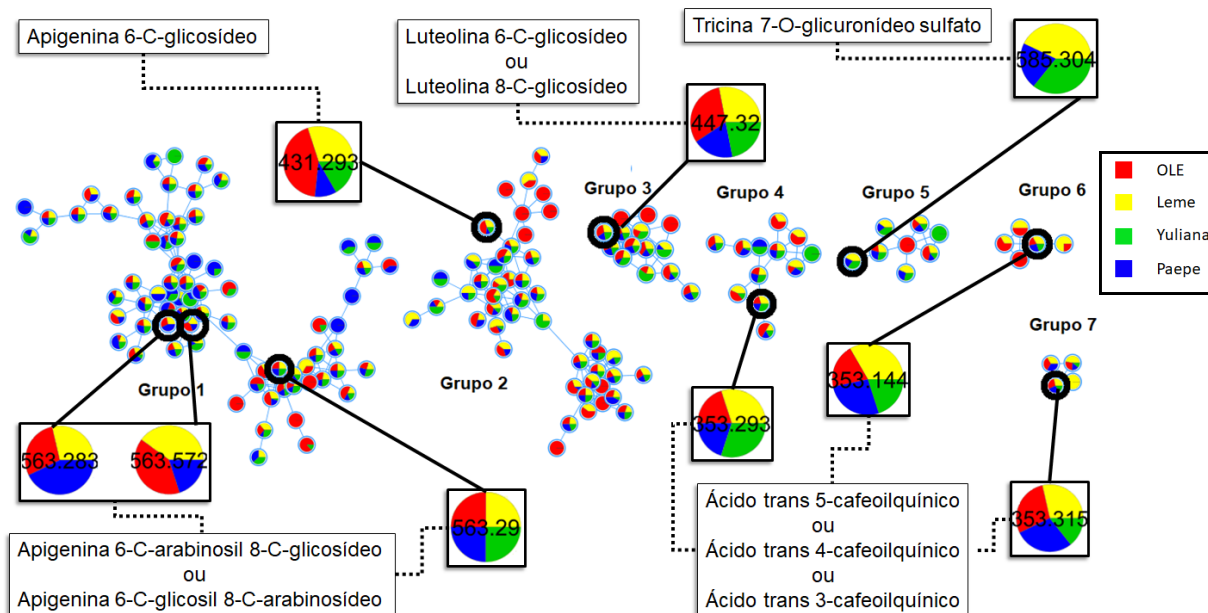


Figura 30. Nodos em destaque com a identificação das substâncias alvo. As cores vermelho, amarelo, verde e azul representam respectivamente a fração quantitativa extraída pelos protocolos OLE, Leme, Yuliana e Paepe.

Cada nóculo possui um gráfico circular, representando a porcentagem de extração obtida por cada um dos protocolos. Vale lembrar que a espectrometria de massas é um método quantitativo, ou seja, a proporção gráfica entre as áreas denota com precisão a razão entre as quantidades de compostos extraídos (figura 28).

Os dois primeiros clusters correspondem à classe das apigeninas C-glicosiladas. Mesmo sendo de mesma classe, o software consegue distinguir um conjunto de apigeninas diglicosiladas (grupo 1) contendo 74 outras substâncias correlacionadas, de um segundo conjunto de apigeninas monoglicosiladas (grupo 2) com 47 substâncias análogas. No cluster 1, observa-se a presença de três compostos com razão massa/carga 563. Apenas uma delas ($m/z = 563.29$) ocorre nos quatro protocolos equimolarmente, enquanto nos outros dois nósculos indica um desempenho equivalente do OLE em comparação ao Leme, com a diferença em que o nodo $m/z = 563.283$ Paepe tem desempenho majoritário e

minoritário para o nodo $m/z = 563.572$. No grupo 2, o composto $m/z = 432.293$ foi melhor extraído por OLE e Leme (OLE > Leme > Yuliana > Paepe).

O grupo 3, com 14 moléculas associadas, pertencente a luteolina C-monoglicosilada ($m/z = 447.32$) teve performance OLE $\cong$ Leme > Yuliana $\cong$ Paepe, em termos de quantidade molecular extraída. Neste grupo há certa imprecisão sobre qual carbono o açúcar possa estar ligado, mas os indícios apontam para a glicosilação no carbono 6, pois é o produto majoritário nas folhas de cana-de-açúcar. A explicação do não aparecimento da forma 8-C glicosilada é a baixa intensidade de bandas no espectro de massas. Da mesma forma ocorre com a diosmetina e as tricinas que se tornaram invisíveis ao software.

Os conjuntos de 12, 8 e 4 nodos correspondem respectivamente aos grupos 4, 5 e 7, de razão $m/z = 353$ associados à classe dos ácidos clorogênicos. O nodo $m/z = 353.293$ teve um desempenho de protocolos quantitativos de tal modo que Leme $\cong$ Yuliana > OLE $\cong$ Paepe, para o nodo $m/z = 353.144$ Leme $\cong$ Paepe > OLE $\cong$ Yuliana e para o nodo $m/z = 353.315$ Paepe > OLE $\cong$ Leme > Yuliana.

Por fim, o único cluster a não obter sinais atribuídos à extração on-line é o grupo 5 de $m/z = 585.304$. Por isso este conjunto de 6 moléculas similares à tricina 7-O-glicuronídeo-sulfato traz questionamento sobre esta molécula ser um possível artefato proveniente de processos durante o tratamento de amostra dos métodos off-line. Esta hipótese corrobora com o fato de que nenhuma outra tricina foi identificada pelo banco de dados, necessitando investigação. O desempenho obtido pelos métodos foi Leme $\cong$ Yuliana > Paepe.

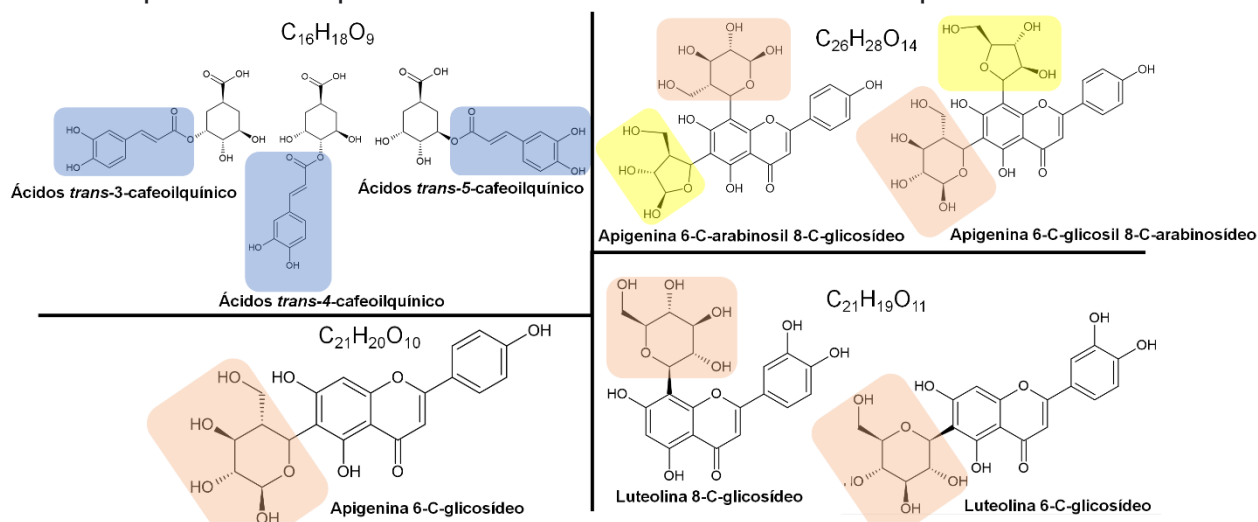


Figura 31. Relação de substâncias detectadas pelo GNPS e suas fórmulas moleculares. As cores destacadas representam os radicais cafeoil (azul), glicosil (rosa) e arabinosil (amarelo).

4. CONCLUSÃO

A construção do novo compartimento de amostras no método de extração on-line facilitou o manuseio do material vegetal com elevada padronização de amostragem. Tal método economiza tempo e solvente ao evitar as etapas de preparo de amostras, o que reduz significativamente a possibilidade de geração de artefatos.

Mesmo com pouco material vegetal (cerca de 1 mg) os sinais obtidos por este protocolo de extração são intensos, capazes de obter significância em bandas atribuídas a ruídos em métodos off-line. Compostos discretos passaram a ser evidenciados com altos valores de reprodutibilidade, precisão e eficiência.

De maneira geral o OLE obteve baixo desempenho para análise com substâncias alvo, demonstrando um método promissor em análises abrangentes (*untargeted analysis*) para estudos metabolômicos em tecidos recém colhidos e para bioprospecção de moléculas bioativas minoritárias.

5. REFERÊNCIAS

ADENIJI, A.A.; BABALOLA, O.O.; LOOTS D.T. Metabolomic applications for understanding complex tripartite plant-microbes interactions: Strategies and Perspectives. **Biotechnology Reports**, p. 1-15, 2020.

AGOSTINI-COSTA, T.S.; VIEIRA R.F.; BIZZO, H.R.; SILVEIRA D.; GIMENES, M.A. Secondary metabolites, Chromatography and its applications. **IntechOpen**, Cap. 8, p. 131-156, 2012.

BELWAL, T.; EZZAT, S.M.; RASTRELLI, L.; BHATT, I.D.; DAGLIA, M.; BALDI, A.; DEVKOTA, H.P.; ORHAM, I.E.; PATRA, J.K.; DAS, G.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C.; GOMEZ-GOMEZ, L.; NABAVI, S.F.; NABAVI, S.M.; ATANASOV, A.G. A critical analysis of extraction techniques used for botanicals: Trends, priorities, industrial uses and optimization strategies. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 100, p 82-102, 2018.

BIJTTEBIER, S.; AUWERA, V.A.; FOUBERT, K; VOORSPOELS, S; PIETERS, L; APERS, S. Bridging the gap between comprehensive extraction protocols in plant metabolites studies and method validation. **Analytica Chimica Acta**, v. 935, p.136-150, 2016.

BUBALO, M.C.; VIDOVIC´, S.; REDOVNIKOVIC´, I.R.; JOKIC´, S. New perspective in extraction of plants biologically active compounds by green solvents. **Food and Bioproducts Processing**, v. 109, p. 52-73, 2018.

CANUTO, G.A.B.; COSTA, J.L.; CRUZ, P.L.R.; SOUZA, A.R.L.; FACCIO, A.T.; KLASSEN, A.; RODRIGUES, K.T.; TAVARES, M.F.M. Metabolômica: definições, estado-da-arte e aplicações representativas, **Química Nova**, v. 41, nº. 1, p.75-91, 2018.

CASTRO-MORETTI, F.R.; GENTZEL, I.N.; MACKEY, D.; ALONSO A.P. Metabolomics as an emerging tool for the study of plant–pathogen interactions. **Metabolites**, p. 1-22, 2020.

CHEN, J.C.P; CHOU, C.C. CaneSugar Handbook: A manual for cane sugar manufacturers and their chemists. **Jhon Wiley & Sons**, v. 12, 1993.

COSTA, J.A.M. From sugarcane to ethanol: the historical process that transformed brazil into a biofuel superpower. **Memorial University of Newfoundland**, p. 10-17, 2019.

COSTA, S.N.O. Prospecção de metabólitos secundários relacionados com a resistência de *Psidium* spp. ao nematoide *Meloidogyne enterolobii*, **Biblioteca Universidade Estadual do Norte Fluminense**, 2021.

CUYCKENS, F.; CLAEYS, M. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. **Journal of mass spectrometry**, v. 39, p. 1-15, 2004.

DONCHEVA, N.T.; MORRIS, J.H.; GORODKIN, J.; JENSEN, L.J. Cytoscape StringApp: Network Analysis and Visualization of Proteomics Data. **Journal of Proteome Research**, v. 18, p. 623-632, 2019.

EMON, J.M.V. Omics in fruits: concepts and application, **Fruits crops: diagnosis and management of nutrient constraints**, Cap. 10, p. 121-128, 2020.

FERREIRA, V.G. et al. Online extraction coupled to liquid chromatography analysis (OLE-LC). Eliminating traditional sample preparation steps in the investigation of solid complex matrices. **Analytical Chemistry**, p. 8421-8427. 2016.

GHOJOGH, B.; CROWLEY, M. **Unsupervised and supervised principal component analysis**: tutorial. Reveja em arXiv:1906.03148v1, 2019.

HOFSETZ K., SILVA M. A. Brazilian sugarcane bagasse: Energy and non-energy consumption, **Biomass & energy**, v. 46, p. 564-573. 2012.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. A geografia da Cana-de-açúcar, **Dinâmica Territorial da Produção Agropecuária**, p. 7-156. 2017.

JADOSKI, C.J.; TOPPA, E.V.B.; JULIANETTI, A.; HULSHOF, T.; ONO, E.O.; RODRIGUES, J.D. Fisiologia do desenvolvimento do estágio vegetativo da cana-de-açúcar (*saccharum officinarum* L.). **Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia**, v. 3, n. 2. 2010.

LEE, B. Varimax Rotation and Thereafter: Tutorial on PCA Using Linear algebra, Visualization, and Python Programming for R and Q analysis. **Elon University**. p. 79-120. 2018.

LEME, G.M.; COUTINHO, I.D.; CRESTE, S.; OSSAMU, H; CARNEIRO, R.L. HPLC-DAD method for metabolic fingerprinting of the phenotyping of sugarcane genotypes, **Analytical Methods**, p. 7781-7788. 2014.

MARTIN, J.M.; NIREL, P.; THOMAS, A.J. Sequential extraction techniques: promises and problems. **Marine Chemistry**. v. 22, p. 313-341. 1987.

MOHAMMED, A.S.; FAREED, M.I. Improving the friction and wear of poly-ether-etherketone (PEEK) by using thin nano-composite coatings, **Wear**, p. 154-162. 2016.

NARITOMI J.; SOARES, R.R.; ASSUNÇÃO, J.J. Institutional Development and ColonialHeritage within Brazil. **The Journal of Economic History**, v. 72, No. 2, p. 393-422. 2012.

NASTARI, P. M. The role of sugar cane in Brazil's history and economy. **Iowa State University**, 1983.

PAEPE, D.; SERVAES, K.; NOTEN, B.; DIELS, L.; LOOSE, M.; DROOGENBROECK, B.V.; VOORPOELS, S. An improved mass spectrometric

method for identification and quantification of phenolic compounds in apple fruits. Analytical Methods, **Food Chemistry**, p. 368-375. 2013.

PILON, A.C.; VIEIRA, N.C.; AMARAL, J.G.; MONTEIRO, A.F.; SILVA, R.R.; SPÍNOLA, L.S.; CASTRO-GAMBOA, I.; LOPES, N.P. Redes moleculares: uma análise sobre anotações e descoberta de novos ativos. **Química Nova**. v. XY, p. 1-12. 2021.

POSTAL, A.M.; KAMALI, F.P.; ASVELD, L; OSSEWEIJER, P.; SILVEIRA, J.M.F.J. The impact of sugarcane expansion in Brazil: Local stakeholders' perceptions. **Journal of Rural Studies**, 2019.

SALEM, M.A.; SOUZA, L.P.; SERAG, A.; FERNIE, A.R.; FARAG, M.A.; EZZAT, S.M.; ALSEEKH, S. Metabolomics in the context of plant natural products research: from sample preparation to metabolite analysis. **Metabolites**, p. 1-30. 2020.

SANTOS, F.; DIOLA V. Physiology, Sugarcane: agricultural production, bioenergy and ethanol. **Academic Press**, Ed. 1, Cap. 2, p. 13-33. 2015.

SEHLAKGWE, P. F.; LALL, N.; PRINSLOO, G. ¹H-NMR metabolomics and LC-MS analysis to determine seasonal variation in a cosmeceutical plant leucosidea *sericea*. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11. 2020.

SHI-KAI, Y.; RUN-HUI, L.; HUI-ZI, J.; XIN-RU, L.; JI, E.; LEI, S.; WEI-DONG, Z. “Omics” in pharmaceutical research: overview, applications, challenges, and future perspectives. **Chinese Journal of Natural Medicines**, p. 3-21. 2015.

SHIRI, A.H.; RAIATDOOST, E.; AFKHAMI, H.; RAVANSHAD, R.; HOSSEINI, S.E.; KALANI, N.; RAOULFI, R. **The herbal combination of Sugarcane, Black Myrobalan, and mastic as a supplementary treatment for COVID-19: a randomized clinical trial.** Reveja em medrxiv.org. doi: <https://doi.org/10.1101/2021.04.27.21256221>, 2021.

SILVA, G.L.; LEE, I.S.; KINGHORN, A.D. Special Problems with the Extraction of Plants. Methods in Biotechnology, **Natural Products Isolation**. v. 4, p. 343-363, 1998.

SUZUKI, J. Biossíntese e acúmulo de sacarose em cana-de-açúcar (*Saccharum* spp): influência do íon potássio durante diferentes estádios de crescimento em solução nutritiva. **Catálogo USP**. <https://doi.org/10.11606/T.11.2019.tde-20191220-125029>, 1982.

THOMAS, A.L. Desenvolvimento da planta cana-de-açúcar, Repositório digital, ufrgs, **LUME**, p. 55-75, 2016.

VEGGI, P.C. Obtenção de extratos vegetais por diferentes métodos de extração: estudo experimental e simulação dos processos. **Repositório UNICAMP**. 2009.

YULIANA, N.D.; KHATIB, A.; VERPOORTE, R.; CHOI, Y.H. Comprehensive Extraction Method Integrated with NMR Metabolomics: A New Bioactivity Screening Method for Plants, Adenosine A1 Receptor Binding Compounds in *Orthosiphon stamineus* Benth. **Analitical Chemistry**, p. 6902-6906, 2011.