



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS – UFAL**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA – IQB**  
**QUÍMICA TECNOLÓGICA E INDUSTRIAL**



**ISAIANE FERREIRA LIMA DE OLIVEIRA**

**ESTUDO DO METABOLOMA DO COLMO DA CANA-DE-AÇÚCAR SOB  
HERBIVORIA.**

**Maceió, AL**

**2018**

**ISAIANE FERREIRA LIMA DE OLIVEIRA**

**ESTUDO DO METABOLOMA DO COLMO DA CANA-DE-AÇÚCAR SOB  
HERBIVORIA.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Química Tecnológica e Industrial.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Caetano

**Maceió, AL**

**2018**

**ISAIANE FERREIRA LIMA DE OLIVEIRA**

**ESTUDO DO METABOLOMA DE DIFERENTES PARTES DA CANA-DE-AÇÚCAR  
EM DIFERENTES ESTÁGIOS DA HERBIVORIA, E IDENTIFICAÇÃO DE  
METABÓLITOS ENVOLVIDOS NA DEFESA DA PLANTA.**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Instituto de Química e  
Biotecnologia da Universidade Federal de  
Alagoas como parte dos requisitos para  
obtenção do título de Bacharel em Química  
Tecnológica e Industrial.

Banca Examinadora

---

Prof. Dr. Luiz Carlos Caetano  
Universidade Federal de Alagoas – IQB/UFAL

---

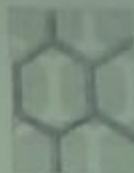
Dr. Adilson Rodrigues Sabino  
Universidade Federal de Alagoas – IQB/UFAL

---

Doutorando Alexandre Carmo Crispim  
Universidade Federal de Alagoas – IQB/UFAL

**Maceió, AL**

**2018**



## ATA DE APRESENTAÇÃO E DEFESA DE TCC - IQB

1. Data da apresentação do TCC: 29/11/2019
2. Aluno / matrícula: ISAIANE FERREIRA LIMA DE OLIVEIRA / 14112778
3. Orientadores / Unidade Acadêmica: LUIZ CARLOS CAETANO (IQB)
4. Banca Examinadora (nome / Unidade Acadêmica):
- |                                  |                |       |      |
|----------------------------------|----------------|-------|------|
| LUIZ CARLOS CAETANO (IQB)        | (Presidente)   | Nota: | 10,0 |
| ALESSANDRE CARMO OLIVEIRA (PPQB) | (1º avaliador) | Nota: | 10,0 |
| ADILSON RODRIGUES SABINO (IQB)   | (2º avaliador) | Nota: | 10,0 |
|                                  | (3º avaliador) | Nota: |      |
5. Título do Trabalho: ESTUDO DO METABOLISMO DO COLMO DA CANA-DE-AÇÚCAR SOB HERBIVORIA.
6. Local: SALA 203 BLOCO IQB
7. Apresentação: Horário início: 9:10 Horário final: 9:28  
 Arguição: Horário início: 9:30 Horário final: 10:20
8. Nota final: 10,0 (DEZ VÍRGULA ZERO)

Em sessão pública, após exposição do seu trabalho de TCC por cerca de \_\_\_\_\_ minutos, o candidato foi arguido oralmente pelos membros da banca por \_\_\_\_\_ minutos, tendo como resultado:

- APROVADO ALTERAÇÃO DO TÍTULO
- APROVADO COM RESTRIÇÕES – mediante modificações no trabalho que foram sugeridas pela banca como condicional para aprovação
- NÃO APROVADO.

Na forma regulamentar foi lavrada a presente ata que é abaixo assinada pelos membros da banca, na ordem acima determinada, e pelo candidato.

Maceió, 29 de novembro de 2019.

Presidente: Luiz Carlos Caetano  
 1º Avaliador: Alexandre Carmo  
 2º Avaliador: Adilson Rodrigues Sabino  
 3º Avaliador:  
 Candidato: Isaiane Ferreira Lima de Oliveira

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus, porque não sou merecedora de tantas vitórias e mesmo assim Ele tem me concedido.

A minha família que sempre me proporcionou toda a estrutura e apoio para que eu pudesse crescer.

Aos professores Dr. Edson de Souza Bento e Dr. Luiz Carlos Caetano pelas orientações, incentivos, oportunidades e ensinamentos imprescindíveis para conclusão deste trabalho.

Ao técnico de laboratório Dr. Adilson Rodrigues Sabino e amigo Demétrius pela paciência, prestatividade, colaboração e suporte no desenvolvimento deste trabalho.

A UFAL e IQB pelo suporte para a realização deste trabalho.

E a todos os amigos que sempre acreditaram na minha competência e ajudaram direta e indiretamente para realização desse objetivo.

## RESUMO

Atualmente o Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar. O seu cultivo ocupa cerca de 10 milhões de hectares e apresenta duas safras anuais, o que garante a produção de açúcar e etanol para os mercados interno e externo, sendo assim uma cultura de grande interesse econômico para o país. Um dos grandes entraves à produção de cana-de-açúcar ainda é o ataque de pragas e doenças e estima-se que cerca de 20% das perdas para esta cultura sejam ocasionadas por insetos, sendo a broca da cana-de-açúcar – a *Diatraea saccharalis*, a praga mais importante. As plantas, durante a evolução, para reduzir os danos causados pelo ataque de pragas, têm desenvolvido uma série de mecanismos de defesa, dentre eles: barreiras físicas, proteínas, metabólitos tóxicos e metabólitos voláteis sinalizadores. Baseando-se na necessidade de uma avaliação sistemática do metabolismo primário e secundário da cana-de-açúcar, visando a obtenção de um perfil metabólico, a construção de um banco de dados metabólicos desta espécie e o possível melhoramento genético, este trabalho tem como objetivo principal caracterizar os metabólitos presentes nas amostras de extratos de cana-de-açúcar da variedade SP1011, ou seja sua Metabolômica, utilizando a técnica de Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), processamento e análise estatística dos dados pelos métodos de componentes principais (PCA) e dos mínimos quadrados parciais-análise discriminante (OPLS-DA). Com a aplicação destas técnicas foi possível determinar alterações no metabolismo do colmo da cana-de-açúcar sob herbivoria, e identificação de metabólitos envolvidos na defesa da planta. Foram feitos dois tipos de tratamento nas plantas de cana-de-açúcar: Controle e inoculação por meio da *Diatraea saccharalis*, e a partir da integração dos espectros de RMN para a análise estatística multivariada, pode-se observar as diferenças no metabolismo de cada tratamento, identificando os metabólitos discriminantes.

**Palavras-chave:** RMN, Cana-de-Açúcar, Herbivoria, Análise Multivariada

## **ABSTRACT**

Currently Brazil is the world's largest producer of sugarcane. Its cultivation occupies about 10 million hectares and presents two annual crops, which guarantees the production of sugar and ethanol for the domestic and foreign markets, being a culture of great economic interest for the country. One of the major obstacles to the production of sugarcane is still the attack of pests and diseases and it is estimated that about 20% of the losses for this crop are caused by insects, being the sugarcane borer - the *Diatraea saccharalis*, the most important pest. The plants, during evolution, to reduce the damage caused by the attack of pests, have developed a series of defense mechanisms, among them: physical barriers, proteins, toxic metabolites and volatile signaling metabolites. Based on the need for a systematic evaluation of the primary and secondary metabolism of sugarcane, aiming at obtaining a metabolic profile, the construction of a metabolic database of this species and the possible genetic improvement, this work has as objective main characterize the metabolites present in the samples of sugarcane extracts of the variety SP1011, that is to say its Metabolomics, using the technique of Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR), processing and statistical analysis of the data by the principal components ) and the least squares partial-discriminant analysis (OPLS-DA). With the application of these techniques it was possible to determine changes in sugarcane stem metabolism under herbivory, and to identify metabolites involved in plant defense. Two types of treatment were applied in sugarcane plants: Control and inoculation by means of *Diatraea saccharalis*, and from the integration of the NMR spectra for the multivariate statistical analysis, one can observe the differences in the metabolism of each treatment, identifying the discriminating metabolites.

**Keywords:** NMR, Sugarcane, Herbivory, Multivariate Analysis

## Lista de Figuras

<b>Figura 1:</b> Percentual de área total de cana-de-açúcar por unidade de federação.....	11
<b>Figura 2:</b> Dano causado pela <i>Diatraea saccharalis</i> no colmo da cana-de-açúcar....	12
<b>Figura 3:</b> Modelo de PCA com duas componentes principais .....	17
<b>Figura 4:</b> Modelo de Scores OPLS-DA.....	18
<b>Figura 5:</b> (A) Conjunto de dados pré-processados de RMN-1H com o sinal em 2.498 ppm selecionado para o STOCSY. (B) Espectro de RMN pseudo-2D gerado no STOCSY na identificação do succinato.....	19
<b>Figura 6:</b> Mudanças de cana-de-açúcar na casa de vegetação.....	21
<b>Figura 7:</b> Inoculação da lagarta <i>Diatraea saccharalis</i> (teste sem chance de escolha).....	21
<b>Figura 8:</b> Banho de ultrassom .....	22
<b>Figura 9:</b> Laboratório de RMN, mostrando o equipamento de RMN 400 MHz .....	23
<b>Figura 10:</b> RMN-1H do extrato da Planta controle.....	24
<b>Figura 11:</b> RMN-1H do extrato da Planta com herbivoria.....	25
<b>Figura 12:</b> Gráfico PCA-X. C – Plantas controle (n=9*) e H – Plantas com herbivoria (n=10).....	26
<b>Figura 13:</b> Gráfico de Escores OPLS-DA – C x H .....	28
<b>Figura 14:</b> Gráfico S-Line OPLS-DA – C x H.....	29
<b>Figura 15:</b> Identificação do etanol .....	31
<b>Figura 16:</b> Identificação da alanina.....	32
<b>Figura 17:</b> Identificação do acetato .....	33
<b>Figura 18:</b> Identificação do succinato .....	33
<b>Figura 19:</b> Identificação do ácido siríngico .....	34
<b>Figura 20:</b> Identificação da sacarose.....	34
<b>Figura 21:</b> Identificação do ácido p-hidroxibenzoico.....	35
<b>Figura 22:</b> Identificação da colina.....	36

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1:</b> Valores dos parâmetros R <sup>2</sup> , Q <sup>2</sup> e p.....	30
<b>Tabela 1:</b> Identificação dos metabólitos discriminantes na cana-de-açúcar .....	31

## Lista de abreviaturas

$\delta$	Deslocamento Químico
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
HMDB	Human Metabolome Data Base
IQB	Instituto de Química e Biotecnologia
MeOD	Metanol Deuterado
MHz	Mega Hertz
mL	Mililitros
OPLS-DA	Análise Discriminante Ortogonal por Mínimos Quadrados Parciais
PPM	Partes por milhão
PCA	Análise de Componentes Principais
PC	Componentes Principais
PMDB	Plant Metabolome Data Base
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN-1H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RPM	Rotação por minuto
STOCSY	Espectroscopia de Correlação Estatística Total
TSP	Ácido TrimetilSiliilPropiônico
UFAL	Universidade Federal de Alagoas
UNICA	Universidade Federal de Alagoas
UV	Única Variância
$\mu$ L	Microlitros

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	10
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	11
2.1 Cana-de-açúcar	11
2.2 <i>Diatraea saccharalis</i>	12
2.3 Mecanismo de defesa das plantas	13
2.4 Metabolômica	14
2.5 Ressonância Magnética Nuclear (RMN) aplicada a metabolômica	14
2.6 Processamento de dados de RMN para análise multivariada	15
2.6.1 Normalização	16
2.6.2 Alinhamento de dados	16
2.6.3 Métodos de escalonamento	16
2.7 Análise de Componentes Principais (PCA)	16
2.8 Análise discriminante ortogonal por mínimos quadrados parciais (OPLS-DA)	17
2.9 Espectroscopia de correlação estatística total (STOCSY)	18
<b>3. OBJETIVOS</b>	21
3.1 Objetivo Geral	20
3.2 Objetivos Específicos	20
<b>4. METODOLOGIA</b>	21
4.1 Material Vegetal	21
4.2 Bioensaio de Herbivoria com <i>Diatraea saccharalis</i>	21
4.3 Extração de Metabólitos	22
4.4 Análises de RMN	22
4.5 Análise Multivariada	23
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÕES</b>	24
5.1 Perfil Metabólico da cana-de-açúcar	24
5.2 Análise Multivariada da cana-de-açúcar	25
5.3 Identificação dos Metabólitos Discriminantes da cana-de-açúcar	31
<b>6. CONCLUSÃO</b>	37
<b>7. REFERÊNCIAS</b>	38

## 1. INTRODUÇÃO

Na agricultura atual é essencial a ação conjunta de uma série de estratégias que auxiliem na melhoria da execução de práticas de manejo, cause baixa degradação ambiental, diminuam a entrada de fertilizantes exógenos e melhorem a fertilidade do solo. Nesse sentido, o aumento da utilização de medidas que auxiliem no controle de pragas e doenças e promova o crescimento de plantas é uma importante ferramenta (G. RAMOS et al., 2001; SAIKIA & JAIN, 2007; PEDRAZA, 2008).

A interação entre as plantas e os microrganismos pode acontecer de tal forma que a planta manipula o microrganismo a fim de potencializar os efeitos benéficos que podem ser trazidos através dessa associação (TIKHONOVICH & PROVOROV, 2009). Assim, o uso de fertilizantes inorgânicos, água, herbicidas e pesticidas poderia ser diminuído com utilização de microrganismos na agricultura.

A metabolômica é uma área de estudos que analisa o conjunto de metabólitos produzidos e/ou modificados por um organismo visando à compreensão das redes metabólicas. As análises metabolômicas permitem, então, obter uma extensa visão do perfil metabólico do vegetal e sua rede regulatória, possibilitando a identificação de fatores que possam ser manipulados para 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.

A análise metabolômica, utilizada neste projeto, tem o intuito de mapear todos os metabólitos em organismos sob determinadas condições. O mapeamento pode ser de cunho qualitativo como também quantitativo. Como o uso da RMN na análise metabolômica é bastante difundido; LEISS et al 2009 mostrou, por exemplo, o emprego da metabolômica com base em dados de RMN para a identificação de metabólitos em plantas resistentes e susceptíveis ao ataque de tripés *Haplothrips senecionis*, indicando seus três diferentes metabólitos como potenciais candidatos para a resistência.

Sendo assim, o entendimento dessas respostas metabólicas permite um planejamento mais específico e manejo de características selecionadas, visando o desenvolvimento de variedades com maior potencial econômico.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

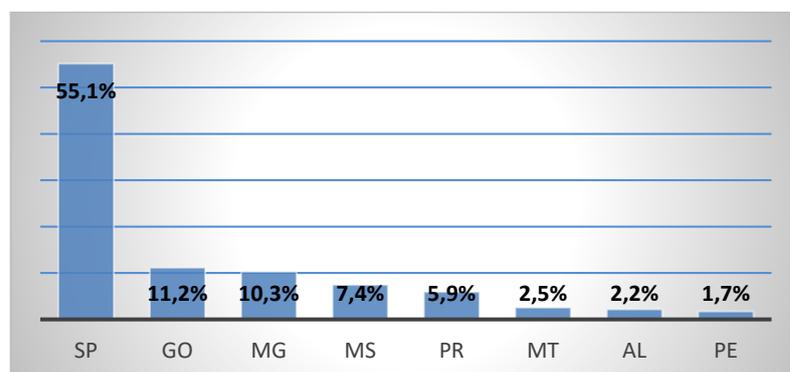
### 2.1. Cana-de-açúcar

Atualmente, a cana-de-açúcar é considerada uma das grandes alternativas para o setor de biocombustíveis devido ao grande potencial na produção de etanol e aos respectivos subprodutos. Além da produção de etanol e açúcar, as unidades de produção têm buscado operar com maior eficiência, além disso, com geração de energia elétrica, auxiliando na redução dos custos e contribuindo para a sustentabilidade da atividade.

No Brasil, maior produtor mundial de cana-de-açúcar, o cultivo concentra-se na região sudeste, principalmente no interior paulista. A cana ocupa cerca de 10 milhões de hectares e apresenta duas safras anuais, o que garante a produção de açúcar e etanol para os mercados interno e externo, sendo assim uma cultura de grande interesse econômico para o país. (UNICA, 2017)

De acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), a safra 2017/2018 de cana-de-açúcar foi de 633,3 milhões de toneladas havendo uma redução de 3,6% em comparação com a safra anterior, em que a intensidade na redução de área em praticamente todos os estados produtores tem relação direta com a queda de produção (CONAB, 2018). A região Sudeste é responsável por 65,9% da produção da cana-de-açúcar sendo o estado de São Paulo o maior produtor do país. O estado de Alagoas continua sendo o maior produtor de cana-de-açúcar na região Nordeste, o gráfico abaixo (Figura 1) ilustra os principais estados brasileiros produtores de cana-de-açúcar. (CONAB, 2018)

Figura 1: Percentual de área total de cana-de-açúcar por Unidade da Federação.



FONTE: CONAB 2018.

Um dos grandes desafios na produção da cana-de-açúcar é evitar ou reduzir as perdas na produção, os fatores climáticos e perdas por pragas são os principais agentes causadores de redução na produção da cana-de-açúcar. De acordo com Santiago e Rosseto (2007) as perdas por pragas chegam a 20% na produção mundial causando prejuízo econômico aos produtores, diminuindo o rendimento na produção da indústria sucroalcooleira. A cana-de-açúcar pode ser atacada por diversos insetos, entre os quais, destaca-se a *Diatraea saccharalis*.

## 2.2. *Diatraea saccharalis*

A broca é a principal praga da cana-de-açúcar. A lagarta jovem alimenta-se, inicialmente, das folhas para depois penetrar pelas partes mais moles do colmo (bainha). Ela abre galerias de baixo para cima, que podem ser longitudinais - maioria das vezes - ou transversais.

Figura 2. Dano causado pela *Diatraea saccharalis* no colmo da cana-de-açúcar



FONTE: Agrolink – Broca do colmo

Devido às galerias formadas pelas lagartas, pode haver falhas na germinação e perda de peso. Quando essas galerias são circulares, pode acarretar em tombamento da cultura. A seca dos ponteiros, conhecida também como "coração morto", pode ocorrer na lavoura, principalmente nas plantas mais novas. As galerias abertas pelas

lagartas também servem de entrada para inúmeros fungos que causam podridão, diminuindo a pureza e o rendimento do açúcar. (Agrolink, Broca do colmo)

A broca da cana-de-açúcar pode ser controlada por meio de:

- Plantio de variedades resistentes ou tolerantes;
- Corte de cana sem desponte;
- Moagem rápida após o corte;
- Eliminação de plantas hospedeiras próximas ao canavial (milho).

### **2.3. Mecanismo de Defesa das Plantas**

Para se proteger contra os herbívoros as plantas possuem em sua estrutura morfológica uma proteção mecânica que consiste de pelos, tricomas, espinhos e folhas mais espessas que dificulta o acesso do herbívoro. Além da proteção mecânica as plantas produzem compostos químicos (metabólitos primários e secundários) e proteínas, que podem repelir, eliminar ou retardar o desenvolvimento do inseto, sendo essas características de defesa direta das plantas. Indiretamente as plantas se defendem por meio da emissão de compostos voláteis para sinalizar para outras plantas vizinhas o possível ataque herbívoro e para atrair os inimigos naturais (predadores e parasitoides) dos herbívoros. (HOWE; JANDER, 2008)

As plantas quando são submetidas a estresses causados por fatores bióticos (artrópodes) ou fatores abióticos (estresse hídrico, temperatura) podem se defender de forma constitutiva, característico da morfologia da planta, e de forma induzida, geralmente ativada em resposta ao dano ou estresse causado por herbívoros. Estresses induzidos por ataque de herbívoros (pragas) tem sido o principal problema para o desenvolvimento e manejo de diversas culturas de plantas, sendo que estudos relacionados ao entendimento do mecanismo de defesa das plantas em resposta ao ataque de pragas tem se tornado destaque na ciência atual, e, neste contexto, os metabólitos secundários exercem um papel importante nas defesas de vegetais durante a herbivoria, podendo agir como repelentes ou até mesmo como inseticidas naturais. (SABINO; ADILSON, 2017)

## **2.4. Metabolômica**

Em semelhança com as outras ciências “ômicas”, a metabolômica necessita de um auxílio da bioinformática para sistematização e avaliação dos dados pois baseia-se numa grande quantidade de informação do indivíduo analisado.

Metabolômica é o estudo que visa analisar qualitativamente e quantitativamente o conjunto de metabólitos que podem ser produzidos ou modificados por um determinado organismo. O metaboloma é um dos termos base da metabolômica, que é definido como a identificação parcial ou completa de pequenas moléculas presentes em um organismo, sendo essas moléculas pertencentes as classes de metabólitos primários e secundários que podem ser biomarcadores de uma determinada característica do organismo envolvido no estudo. (SAITO; DIXON; WILLMITZER, 2006)

Uma das vantagens da metabolômica é a análise simultânea de várias substâncias ativas da matriz de uma planta em pouco tempo, sendo que, a identificação e quantificação desses metabólitos é feita por métodos cromatográficos, espectrometria de massa e RMN.

Estima-se que 200.000 ou mais metabólitos estão presentes no reino vegetal, sendo que boa parte destes compostos são benéficos aos seres humanos por possuírem propriedades medicinais, alimentícia e servirem de matéria-prima para a indústria (SAITO; DIXON; WILLMITZER, 2006). E por conta dessas características, as pesquisas com metabolômica de plantas vem crescendo e se tornando cada vez mais importantes, trazendo inúmeras aplicações na indústria, como por exemplo a identificação de substâncias que auxiliam na defesa das plantas contra fatores bióticos e abióticos.

## **2.5. Ressonância Magnética Nuclear (RMN) aplicada a metabolômica**

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear é de fundamental importância na área de produtos naturais, e atualmente vem sendo aplicada não apenas para a elucidação estrutural de uma substância pura, como também para o estudo metabolômico de misturas complexas.

A RMN é um método espectroscópico que analisa spins nucleares numa radiofrequência específica. Os espectrômetros mais comuns são os que empregam

transformada de Fourier, que têm como vantagem o uso de pulsos de radiofrequência que excitam todos os núcleos da amostra de uma só vez se obtendo um espectro de hidrogênio (RMN- $^1\text{H}$ ), se for o caso, em alguns segundos. A RMN é uma poderosa ferramenta para estudos de metabolômica por ser um detector universal para todos os tipos de moléculas, requerendo o mínimo de preparo de amostra, possuindo uma boa capacidade de reproduzir os dados mesmo em espectrômetros com diferentes frequências e ser muito versátil por dispor de diversos tipos de experimentos 1D, 2D e pseudo-2D (seqüências de pulsos) para elucidação estrutural.

Entre os experimentos de RMN-1D utilizados em metabolômica destaca-se o experimento de RMN de hidrogênio (RMN- $^1\text{H}$ ), que, devido a facilidade (abundância natural do próton de 98%) de aquisição dos dados que duram em média 10 – 15 minutos por aquisição (em função do número de pulsos aplicados - 64, 128 e 256) e pela facilidade de digitalização dos dados para aplicação dos métodos quimiométricos (LEISS et al., 2010). Tipicamente, este espectro de RMN- $^1\text{H}$  apresenta uma enorme quantidade de metabólitos (50 – 100 metabólitos) que ocasiona sobreposição de sinais dificultando a identificação dos mesmos. O problema da sobreposição dos sinais no espectro de RMN- $^1\text{H}$  pode ser solucionado através da técnica de RMN J-resolvido  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ , onde na dimensão horizontal tem-se o deslocamento químico do hidrogênio e na outra dimensão vertical tem-se a constante de acoplamento (J) em Hz. Este experimento é muito útil, pois soluciona os problemas de sobreposição de sinais encontrados no RMN- $^1\text{H}$ , visto que todos os sinais passam a ser “singletos” tornando-se possível assinalar os deslocamentos químico e se obter as constantes de acoplamento, J, em Hertz (Hz). (AUE et al., 1976, LUDWIG; VIANT, 2010)

Geralmente, os experimentos RMN- $^1\text{H}$  e J-resolvido  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  são ferramentas usadas para a pré-identificação dos metabólitos podendo-se comparar deslocamento químico ( $\delta$ ) e constante de acoplamento (J) em diversas bases de dados na literatura como o Human Metabolome Data Base (HMDB), o Plant Metabolome Data Base (PMDB) e a base de dados do programa Chenomx.

## **2.6. Processamento de dados de RMN para análise multivariada**

A investigação científica é um processo interativo, que pode envolver a coleta e análise de um grande conjunto de dados para explicar o fenômeno de interesse, porém devido à complexidade destes fenômenos, o pesquisador adiciona ou suprime

variáveis em seus estudos por causa de problemas ou complexidades ocasionadas pela simultaneidade de múltiplas variáveis. Portanto, essas medições simultâneas de múltiplas variáveis é uma metodologia chamada de Análise Multivariada.

### 2.6.1. Normalização

O propósito desta etapa é minimizar os problemas oriundos do uso de unidades e dispersões distintas entre as variáveis, como por exemplo minimizar os problemas de variação da concentração das amostras por meio da divisão dos dados pela área total do espectro de RMN ou pela área do sinal do padrão interno. Assim, essa etapa evita que as amostras de concentração alta sejam responsáveis pela maior variância dos dados, que poderia ocasionar uma falsa interpretação dos resultados.

### 2.6.2. Alinhamento de dados

Apesar de ser feito a calibração dos deslocamentos químicos nos espectros de RMN pelo sinal do solvente ou do padrão interno, é comum ainda se observar alguns sinais com alguma variação de deslocamento químico, sendo então necessário o uso de um algoritmo ou programa estatístico específico para este procedimento.

### 2.6.3. Métodos de escalonamento

De modo geral, variáveis com grandes valores possuem alta variância enquanto variáveis com pequenos valores possuem baixa variância. Os métodos de escalonamento de dados têm a função de minimizar esse tipo de problema que pode ocorrer na base de dados. Um dos métodos de escalonamentos mais comuns aplicados em metabolômica é o de única variância (UV), no qual cada variável (coluna de dados) é dividida pelo desvio padrão, fazendo com que cada variável tenha uma mesma variância. (WORLEY; POWERS, 2013)

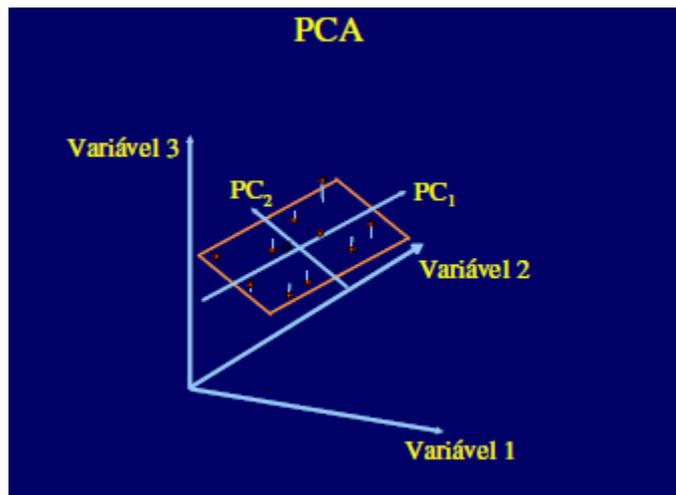
## **2.7. Análise de Componentes Principais (PCA)**

O principal objetivo da análise de componentes principais é o de reduzir a dimensionalidade da matriz original de dados. Esta técnica quimiométrica está

fundamentada na correlação entre as variáveis medidas experimentalmente. (HALOUSKA, 2006)

É um método não supervisionado comumente aplicado em metabolômica para o reconhecimento de padrões e redução da complexidade dos dados que expressa diferenças e similaridades em um determinado conjunto de dados, cujo o objetivo é projetar por meio das componentes uma variação sistemática da matriz de dados X (deslocamento químico por exemplo) (SABINO, ADILSON, 2017). Em que a primeira componente principal (PC1) representa a direção de máxima variância (máxima informação) no espaço multidimensional em que o conjunto de dados está representado, a segunda componente (PC2) é ortogonal a primeira e descreve o máximo de informação ainda não descrita por PC1, e assim por diante (Figura 3).

Figura 3. Modelo de PCA com duas componentes principais.



FONTE: PASQUINI 2011

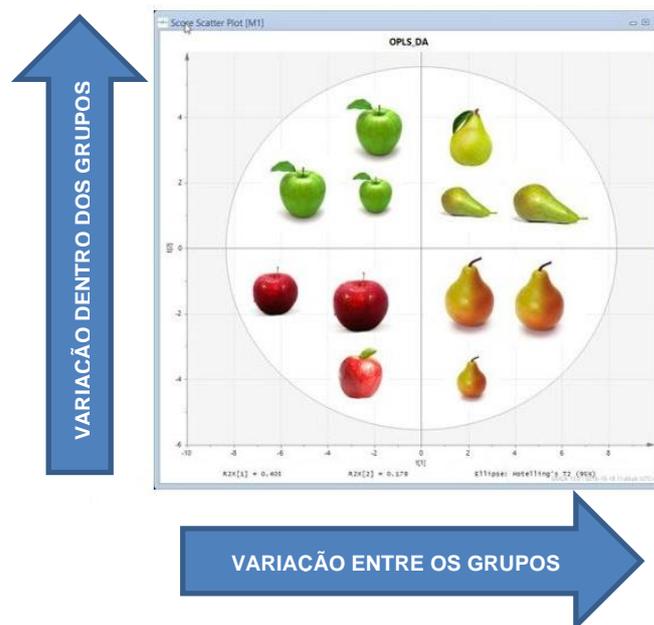
## 2.8. Análise discriminante ortogonal por mínimos quadrados parciais (OPLS-DA)

A OPLS-DA é um método supervisionado que discrimina grupos de amostras que são pré-definidas pelo analista (ver as diferenças entre grupo controle e grupo infectado).

Com a análise discriminante, você está fazendo esta pergunta: Qual é a diferença? Aqui você está direcionando as variáveis. Quais variáveis estão direcionando a separação entre os dois grupos? E se você tiver um problema de dois grupos, o modelo discriminante de OPLS resultante será muito fácil de interpretar, porque você terá apenas um componente preditivo para interpretar. Este componente

é renderizado como o eixo x no gráfico de dispersão de pontuação resultante do modelo OPLS-DA. Assim, a direção horizontal do gráfico de dispersão do escore capturará a variação entre os grupos. Quais são as diferenças sistemáticas entre o grupo para a esquerda e o grupo para a direita? E então a dimensão vertical e qualquer componente superior do chamado tipo ortogonal capturarão a variação dentro dos grupos.

Figura 4. Modelo de Score OPLS-DA



FONTE: Umetrics Suite Blog 2017

De modo geral, a OPLS-DA é usada principalmente para a identificação dos biomarcadores envolvidos no estudo em questão.

## 2.9. Espectroscopia de correlação estatística total (STOCSY)

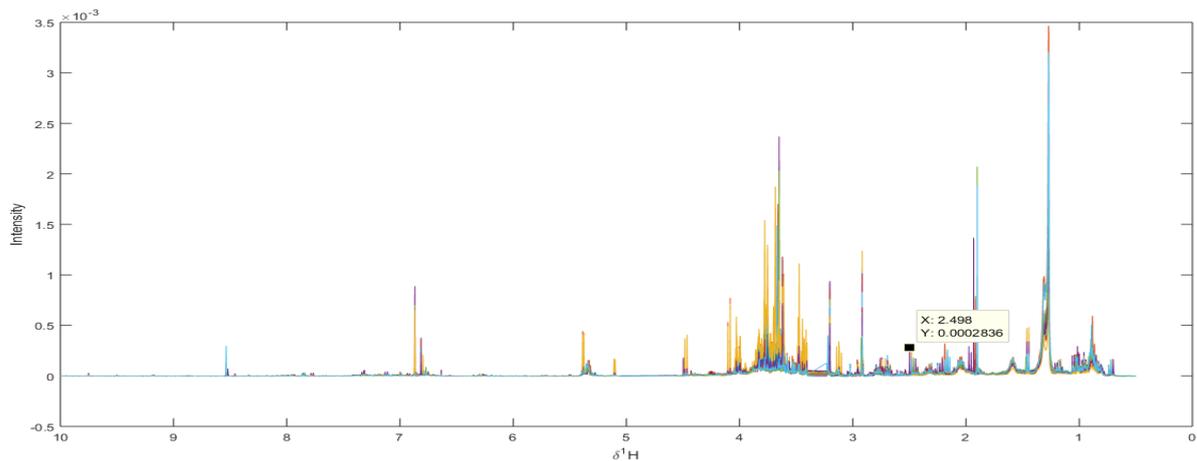
O STOCSY é uma importante ferramenta para a identificação de metabólitos sem a necessidade de uma análise prévia do(s) espectro(s) de RMN uma vez tratando-se de estudos sobre metabolômica que engloba uma grande quantidade de espectros de RMN com diversos deslocamentos químicos tornando-se a análise complexa. Esta ferramenta tem como principal vantagem a multicolineariedade das variáveis de um conjunto de espectros (RMN) para gerar um espectro de RMN pseudo-2D que mostra a correlação entre as intensidades dos vários deslocamentos

químicos em todo o conjunto de dados. Este método se destaca pelo fato de não se limitar apenas a correlações de deslocamentos químicos de uma única molécula, mas também pode apresentar correlações entre duas ou mais moléculas que estão envolvidas numa mesma via metabólica. (CLOAREC et al., 2005)

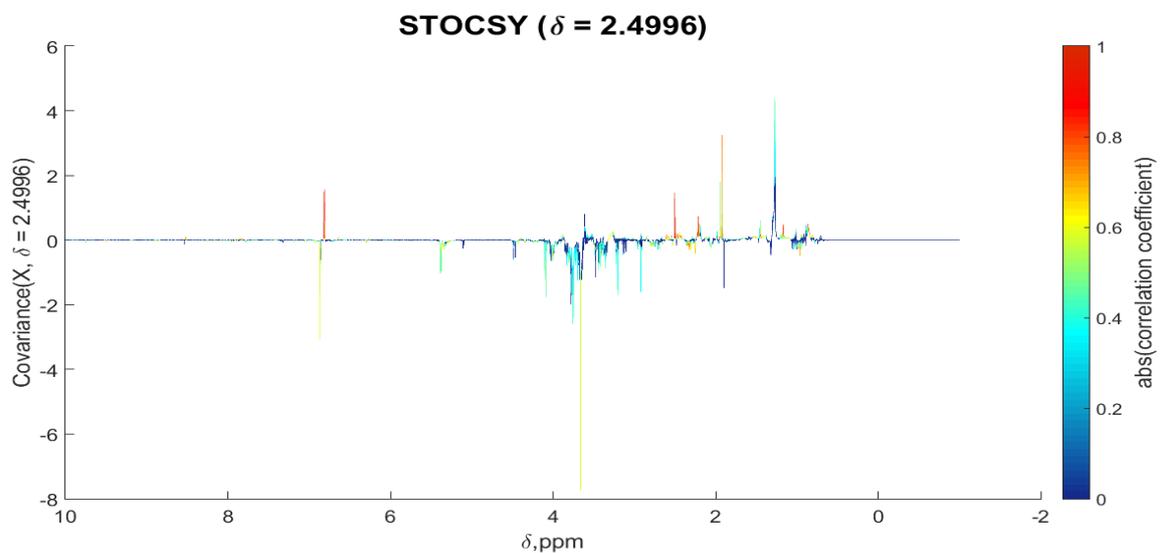
A figura 5 mostra a aplicação do STOCSY em um conjunto de dados (Figura 5A) do presente trabalho, onde o deslocamento químico escolhido foi 2.498 ppm que resultou na identificação do succinato apresentando deslocamentos químicos destacados em vermelho (sinais com alta correlação com 2.498 ppm) no espectro pseudo-2D (Figura 5B).

Figura 5. (A) Conjunto de dados pré-processados de RMN-<sup>1</sup>H com o sinal em 2.498 selecionado para o STOCSY. (B) Espectro de RMN pseudo-2D gerado no STOCSY na identificação do succinato.

(A)



(B)



FONTE: Autor 2018

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo Geral**

- Aplicação da técnica de espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear na identificação de substâncias presentes em misturas.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

- Otimizar a preparação dos extratos de cana-de-açúcar de forma a permitir a obtenção de espectros de RMN com alta resolução;

- Caracterização do metaboloma de extratos de cana-de-açúcar em condições de não estresse e de estresses bióticos;

- Analisar dados de RMN com o uso de métodos estatísticos multivariados e a análise por STOCSY.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1. Material Vegetal

Em todos os experimentos foi utilizada a cultivar **SP1011** de cana-de-açúcar. Para o plantio os colmos foram cortados em rebolos contendo uma gema. Todos os rebolos foram plantados em tubetos e aclimatizados em uma casa de vegetação, onde permaneceu durante 48 dias, até que o bioensaio foi iniciado.

Figura 6. Mudas de cana-de-açúcar na casa de vegetação.



FONTE: Autor 2018.

### 4.2. Bioensaio de Herbivoria com *Diatraea saccharalis*

Foram utilizadas 20 plantas de cana-de-açúcar para o bioensaio de herbivoria com lagartas de *Diatraea saccharalis* e de dano mecânico. Sendo, 10 plantas sem infestação (controle), 10 plantas infestadas com 3 larvas por planta (herbivoria).

Figura 7. Inoculação da lagarta *Diatraea saccharalis* (teste sem chance de escolha)



FONTE: Autor 2018

O corte do colmo foi feito com tesoura higienizada com álcool 70%. A higienização foi feita antes do corte das amostras de cada tratamento. Após o corte cada amostra foi colocada em papel alumínio e congelada em nitrogênio líquido. Após esse procedimento as amostras foram armazenadas num ultrafreezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  até que fosse feito os experimentos de extração dos metabólitos.

### 4.3. Extração dos Metabólitos

Os colmos coletados das plantas de cana-de-açúcar foram macerados com nitrogênio líquido e liofilizados, sendo, a seguir armazenados em dessecador até o processo de extração. Transferiu-se 50 mg de colmos liofilizados para um eppendorf de 2 mL, e, em seguida adicionou-se 950  $\mu\text{L}$  de metanol- $d_4$  e 50  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato em água deuterada  $\text{pH} = 6.0$  contendo 0.01% de sal de sódio do ácido trimetilsililpropiónico (TSP). Este material foi deixado em ultrassom por 15 minutos (Figura 1), sendo a seguir centrifugado por 15 minutos a 12000 rpm. O sobrenadante foi coletado para as análises de ressonância magnética nuclear (RMN).

Figura 8. Banho de ultrassom



FONTE: Autor 2018.

### 4.4. Análises de RMN

Os experimentos de RMN foram executados a  $20^{\circ}\text{C}$  em espectrômetro Bruker AVANCE operando na frequência de 400 MHz para hidrogênio (figura 2). O  $\text{MeOD-}d_4$  foi usado para o chaveamento do campo magnético ("lock"). Cada espectro de RMN-

$^1\text{H}$  foi realizado com 128 pulsos (10 min e 26 s), o tempo de aquisição = 2,72 s, largura espectral = 16 ppm, resolução do fid = 32K, largura de pulso (P1) de  $30^\circ$  (10,5  $\mu\text{s}$ ) e atraso de relaxamento (delay-d1) de 2 s. Os espectros foram processados com o emprego do programa TopSpin, versão 3.5, da empresa Bruker, com o emprego de processos de correção de fase, correção de linha de base e calibração do espectro, este último com a utilização do composto Ácido Trimetilsililpropiónico (TSP), como referência para deslocamento químico, atribuindo o valor de 0,0 ppm, para seu sinal de ressonância.

Figura 9: Laboratório de RMN, mostrando o equipamento de RMN 400 MHz



FONTE: Autor 2018.

A identificação dos metabólitos foi realizada com o auxílio do programa Chenomx, análise STOCYSY (através do programa MATLAB), Plant Metabolome Data Base (PMDB) e o Human Metabolome Data Base (HMDB).

#### 4.5. Análise Multivariada

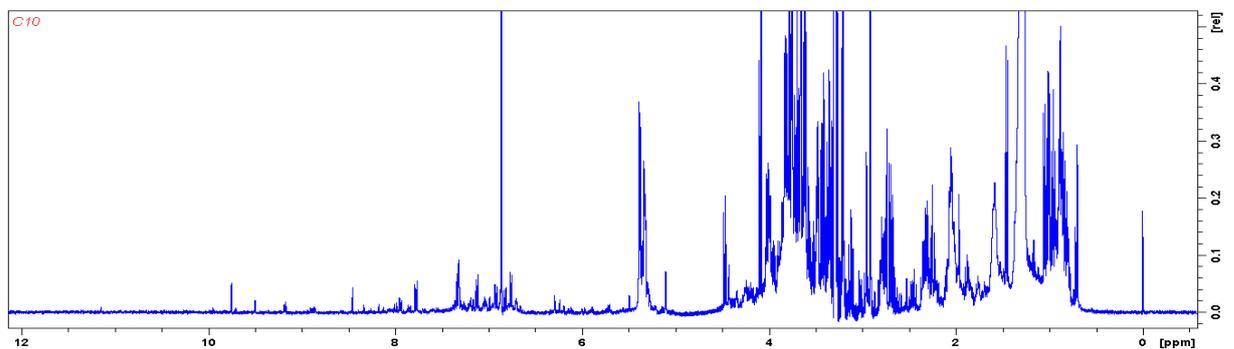
Os espectros de RMN- $^1\text{H}$  otimizados foram, normalizados e alinhados através do programa MATLAB versão 2014a. As regiões de  $\delta$  4,7-5,0 ppm e  $\delta$  3,24-3,30 ppm foram excluídas da análise por causa dos sinais residuais de água e do metanol. As análises de componentes principais (PCA) e análises discriminantes ortogonal por mínimos quadrados parciais (OPLS-DA) foram realizadas com o emprego do software SIMCA-P (versão 14.0) com escalonamento baseado no método de única variância (UV).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1. Perfil metabólico da cana-de-açúcar

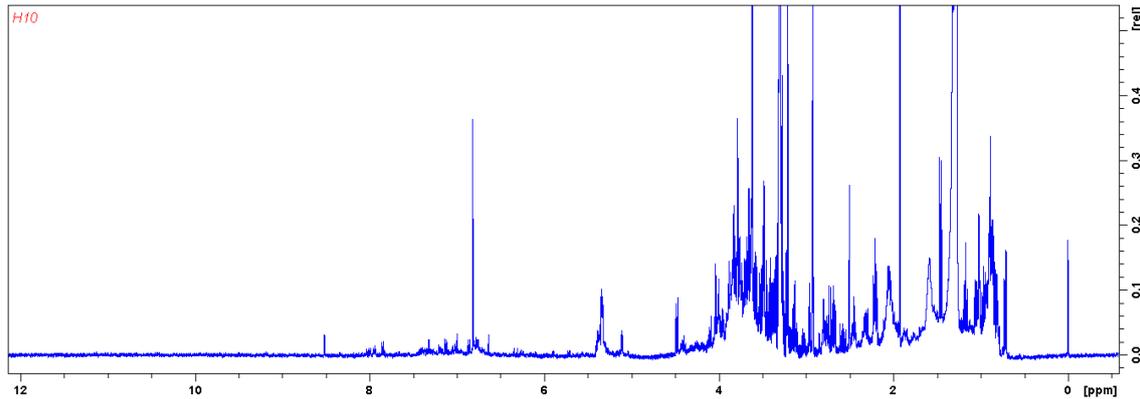
O espectro de RMN-<sup>1</sup>H de extrato de plantas geralmente é dividido em 4 regiões características de deslocamentos químicos: aminoácidos (0.5 – 2 ppm), ácidos orgânicos (2 – 3 ppm), açúcares (3 – 5 ppm) e compostos aromáticos (6 – 8 ppm). A análise dos espectros abaixo utilizando somente o experimento de hidrogênio unidimensional é muito complexa devido à sobreposição de sinais de dezenas de metabólitos, sendo difícil a identificação dos mesmos. Mas já pode-se observar que, ao compararmos os espectros de hidrogênio dos dois tratamentos, na planta controle há compostos na região aromática e açúcares mais intensos, enquanto que na planta com dano da herbivoria já não há mais a tanta intensidade de compostos na região aromática e os açúcares são ainda menos intensos.

Figura 10. RMN-1H do extrato da Planta Controle



FONTE: Autor 2018.

Figura 11. RMN-1H do extrato da Planta com Herbivoria



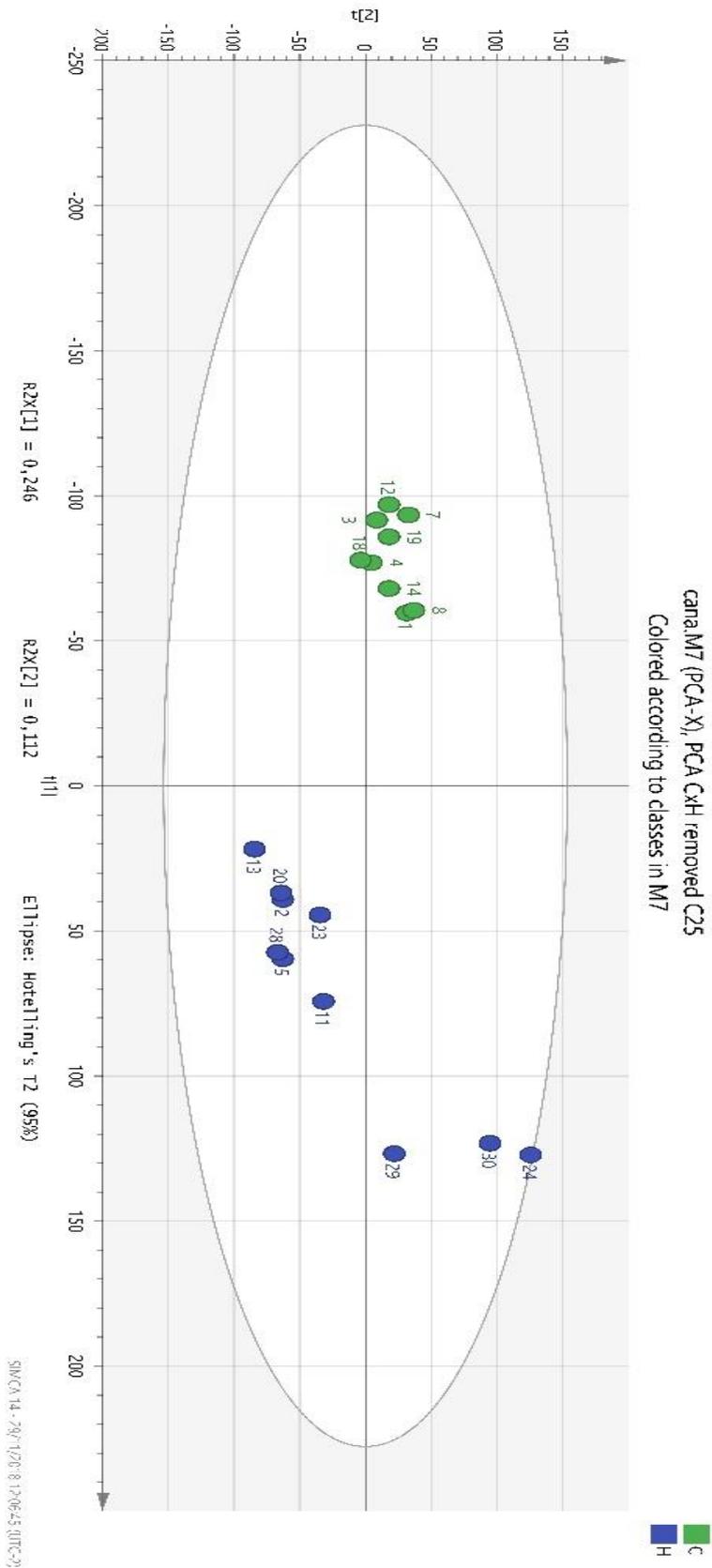
FONTE: Autor 2018.

## 5.2. Análise Multivariada da cana-de-açúcar

Foram feitas análises preliminares de estatística multivariada com o programa SIMCA para constatar se o material amostral possui validade e robustez.

O gráfico de escores de um modelo PCA (Análise de Componentes Principais) montado a partir de dados de RMN unidimensional dos extratos das plantas *controle* x plantas com *Herbivoria* (Figura 15) é utilizado com o objetivo de visualizar a estrutura dos dados, encontrar similaridades entre amostras, detectar amostras anômalas (outliers) e reduzir a dimensionalidade do conjunto de dados. Esta análise revelou a separação entre o grupo formado pelas plantas controle e herbivoria, sugerindo que o sistema metabólico destas plantas é afetado pelas condições realizadas nos tratamentos com herbivoria.

Figura 12. Gráfico PCA-X. C – Plantas Controle (n=9\*), H – Plantas com Herbivoria (n=10)

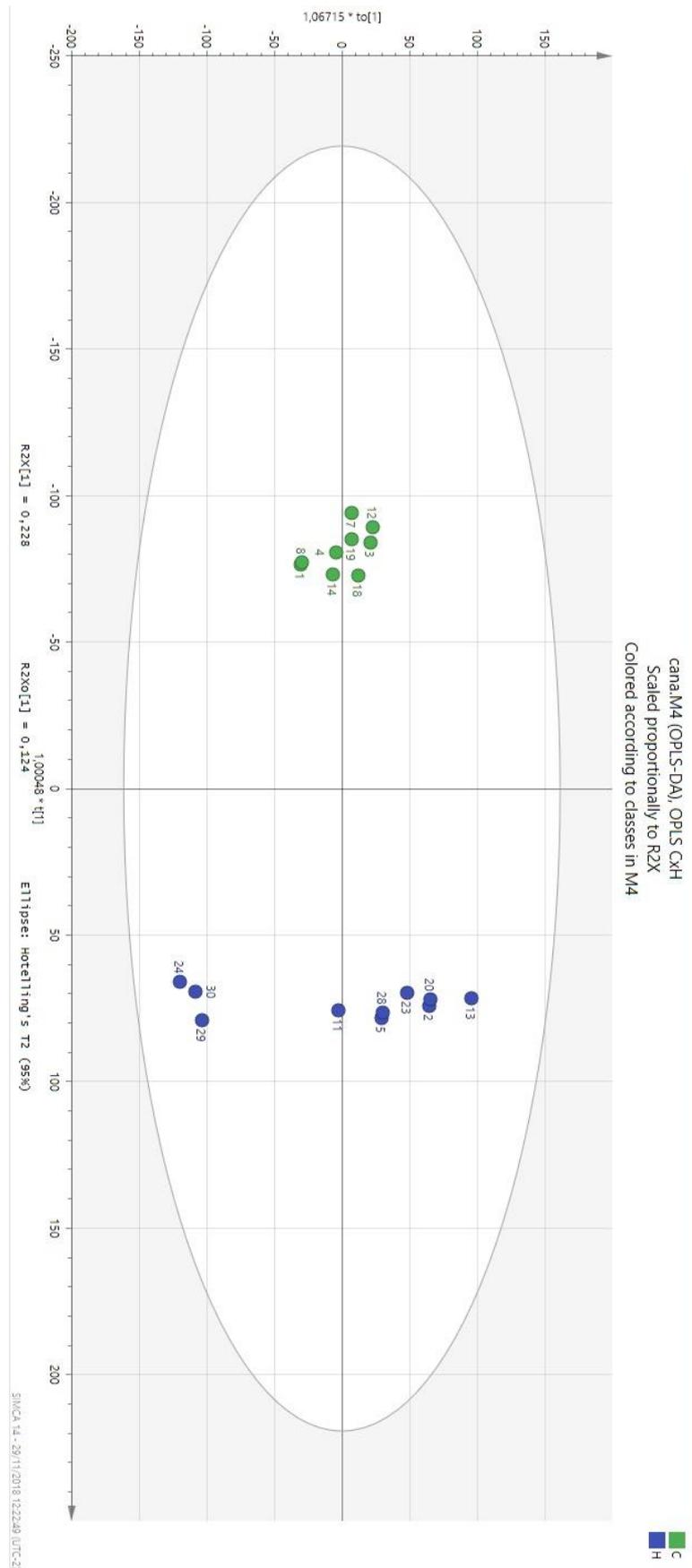


FONTE: Autor 2018.

\* Foi detectado que a planta controle C25 é uma amostra anômala (outlier), então ela foi removida da análise para que o modelo seja mais consistente.

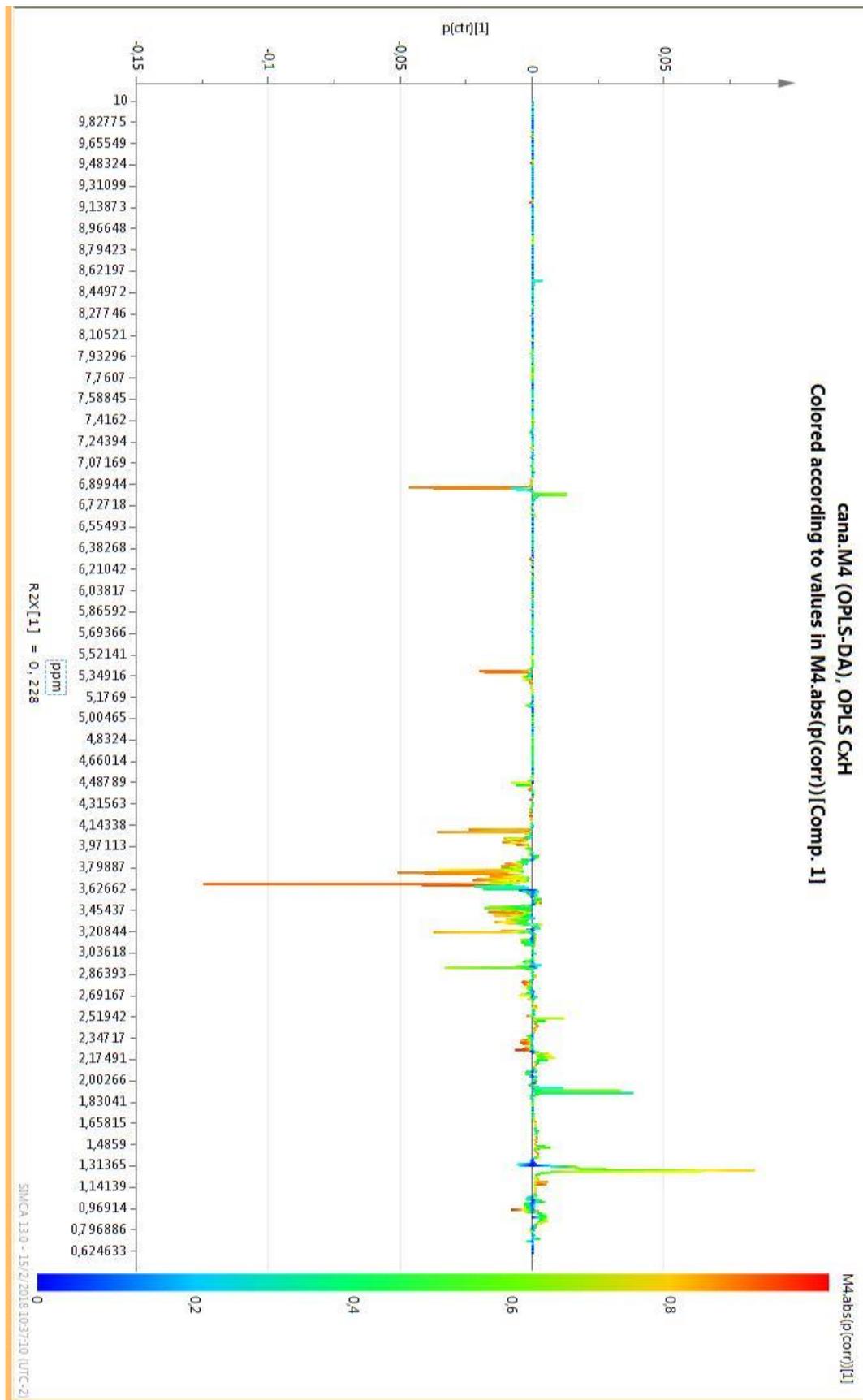
Os gráficos de escores dos modelos de OPLS-DA (Análise Discriminante de Mínimos Quadrados Parciais Ortogonais) montado com os dados dos extratos das plantas *controle* x plantas com *herbivoria* (Figura 16) ortogonaliza os dados, enfatizando as diferenças existentes entre duas classes, o que nos dá uma maior interpretabilidade quando fazemos a comparação dos espectros entre dois tratamentos. Além de possibilitar a identificação dos sinais discriminantes em cada tratamento, no qual utilizou-se o valor de correlação Pearson ( $r > |0,6|$ ). A correlação de Pearson é uma medida da variância compartilhada entre duas variáveis onde o aumento ou decréscimo de uma unidade da variável X gera o mesmo impacto em Y (FIGUEIREDO FILHO; JÚNIOR, 2009).

Figura 13. Gráfico de Escores OPLS-DA da comparação entre Controle x Herbivoria



FONTE: Autor 2018.

Figura 14. Gráfico S-Line OPLS-DA – C x H



FONTE: Autor 2018.

Em seguida, a validação dos modelos (Tabela 01) foi feita analisando a variância R2 (quanto mais próximo de 1 maior a reprodutibilidade do modelo) e a análise de validação cruzada Q2 (quanto maior que 0,5 maior sua previsibilidade) e o parâmetro P que é definido como a probabilidade de se observar um valor da estatística de teste maior ou igual ao encontrado. Tradicionalmente, o valor de  $p < 0,05$  significa que estamos assumindo uma probabilidade de apenas 5% de que a diferença encontrada na análise metabolômica não seja verdadeira, assim quanto menor o valor de p, menor será a probabilidade de isso acontecer.

Tabela 01. Valores de R2, Q2 e p

Controle x Herbivoria		
R2	Q2	p
0,835	0,936	$3,39592 \times 10^{-8}$

FONTE: Autor 2018.

### 5.3. Identificação dos metabólitos discriminantes da cana-de-açúcar

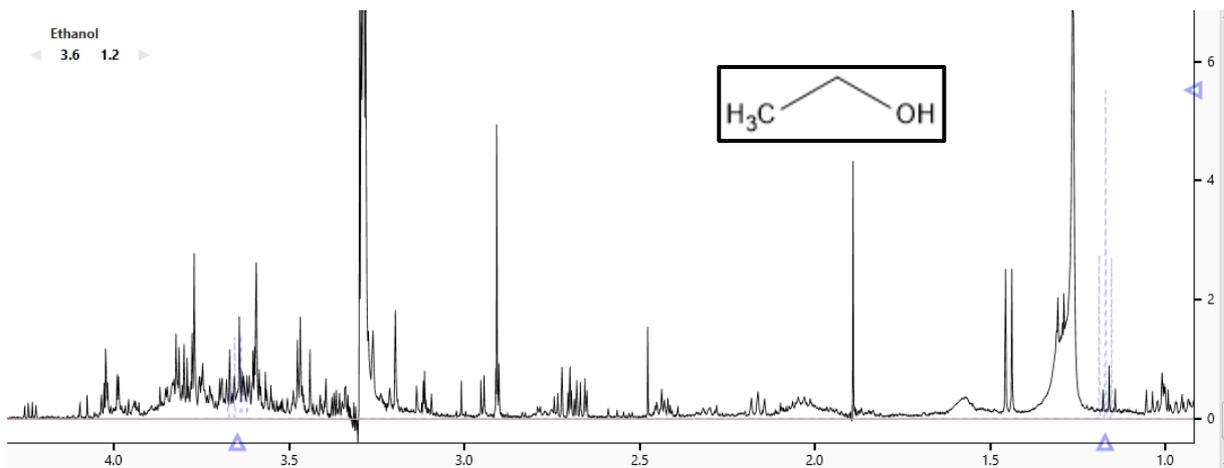
A Identificação de alguns metabólitos (Tabela 2) foi realizada com o auxílio do programa ChemDraw e Chenomx, da análise STOCSY (usando o programa MATLAB), os espectros de RMN e o banco de dados HMDB (Human Metabolome Data Base).

Tabela 02. Metabólitos discriminantes em cana de açúcar sob herbivoria

Metabólitos	Deslocamento químico (ppm)	Correlação	Inoculada	Controle
Etanol	1,16	0,779	+	-
Alanina	1,5; 3,8	0,544	-	+
Acetato	1,918	0,63	+	-
Succinato	2,5	0,685	+	-
Colina	3,2	0,834	-	+
Ácido Siríngico	3,66; 6,86	0,78	-	+
Sacarose	5,38	0,883	-	+
Ácido p-hidroxibenzoico	6,88; 7,78	0,871	-	+

FONTE: Autor 2018.

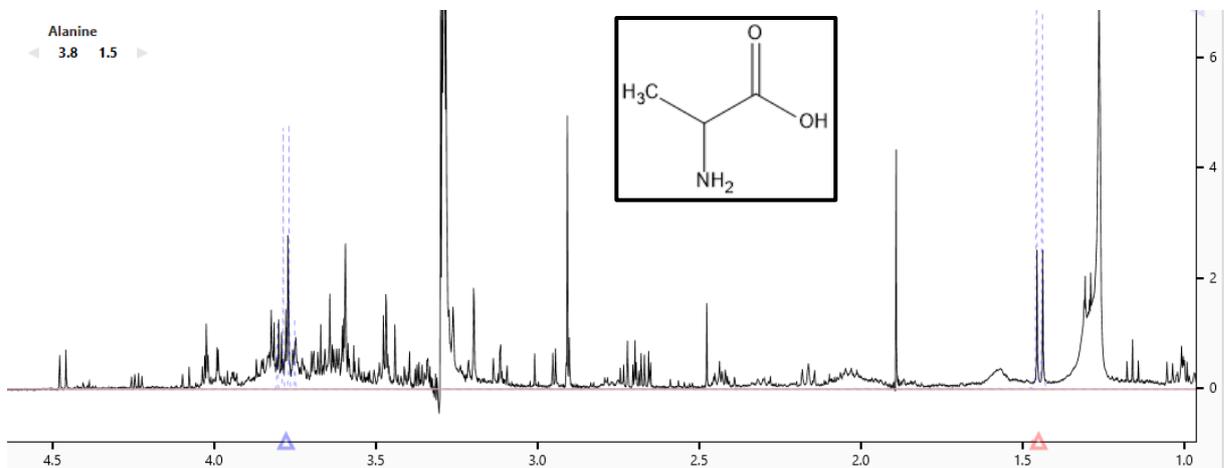
Figura 15. Identificação do Etanol



FONTE: Autor 2018.

Na região entre 1.00 e 4.00 do espectro de hidrogênio foi possível identificar os dois picos característicos do etanol: um tripleto referente ao hidrogênio da metila e um quarteto referente ao hidrogênio metilênico. O tripleto da metila encontra-se próximo a 1.2 ppm, pois em alcanos alifáticos todas as absorções de hidrogênio CH são tipicamente encontradas na região entre 0.7 e 1.7 ppm, portanto são hidrogênios com o próton mais blindado (valores de deslocamento químico mais baixos). Já o sinal metilênico encontra-se próximo a 3.60 ppm por causa do efeito de desblindagem que o grupo hidroxila lhe causa.

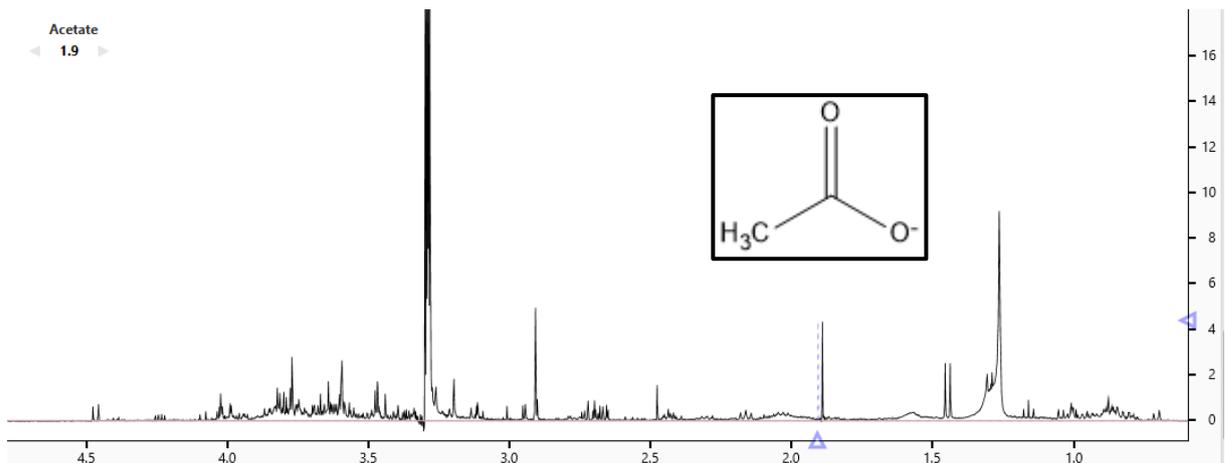
Figura 16. Identificação da Alanina



FONTE: Autor 2018

O composto Alanina apresenta dois sinais característicos: um sinal próximo a 1.50 ppm e outro em 3.80 ppm. O sinal próximo a 1.50 ppm é um duplete referente a metila que acopla com apenas um hidrogênio do CH e seu deslocamento químico é baixo porque é um próton mais blindado (não há nenhum substituinte eletronegativo que desproteja o próton). Já o sinal em 3.80 ppm é um quarteto referente ao hidrogênio metínico que acopla com três hidrogênios da metila e seu sinal possui maior deslocamento químico por causa da desblindagem que sofre do grupo carboxílico.

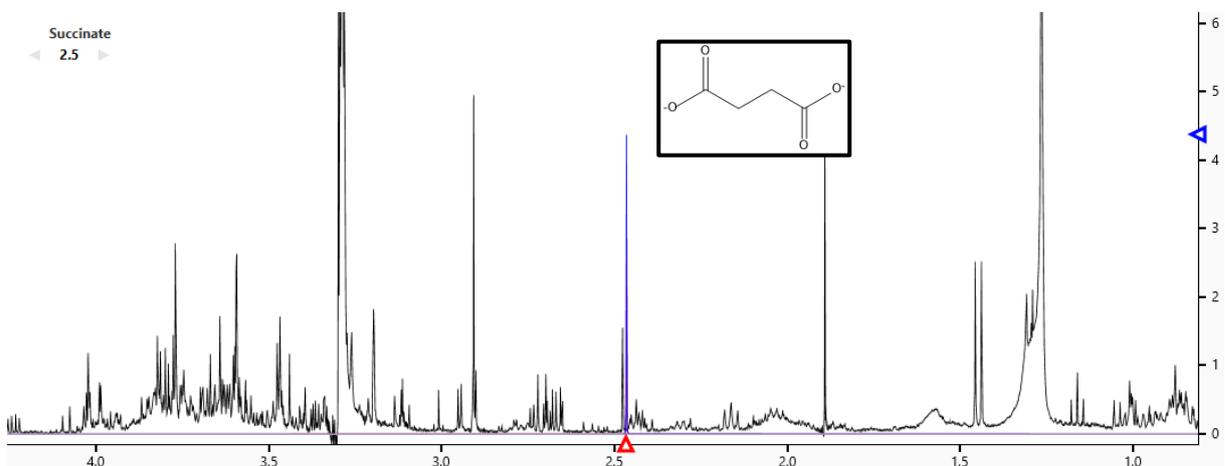
Figura 17. Identificação do Acetato



FONTE: Autor 2018

O acetato possui apenas um sinal característico em 1.90 ppm que é um simpleto, pois não acopla com nenhum hidrogênio, referente a sua metila.

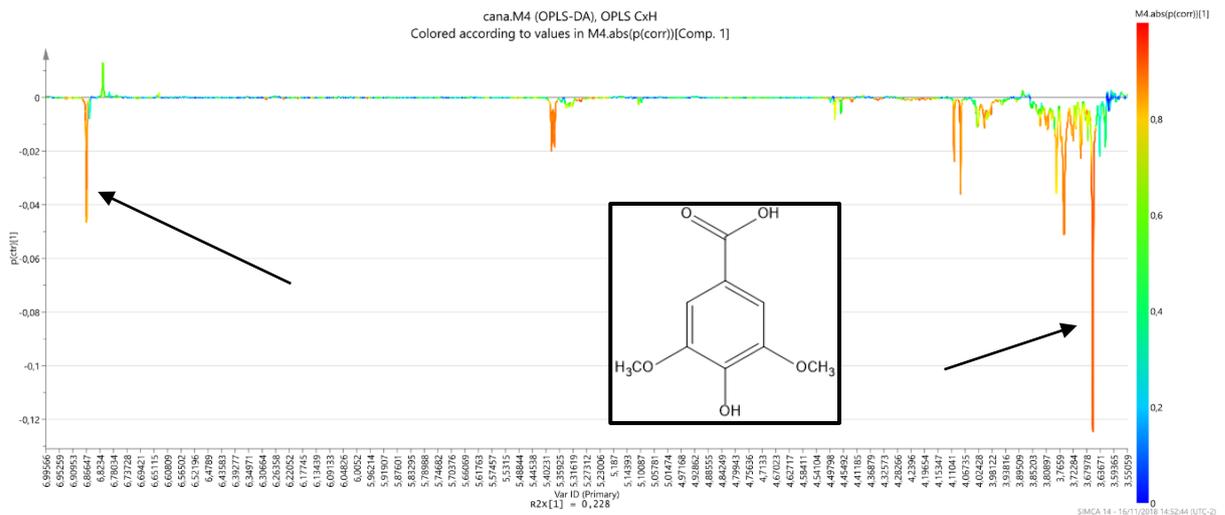
Figura 18. Identificação do Succinato



FONTE: Autor 2018

O composto succinato também possui apenas um sinal característico, embora possua dois grupos metilênicos ( $\text{CH}_2$ ). No entanto, esse composto é uma molécula simétrica o que nos resulta em apenas um sinal (simpleto) que por serem hidrogênios adjacentes ao grupo carbonila possuem uma leve desblindagem, podendo ser identificados numa região entre 2.10 e 2.50 ppm.

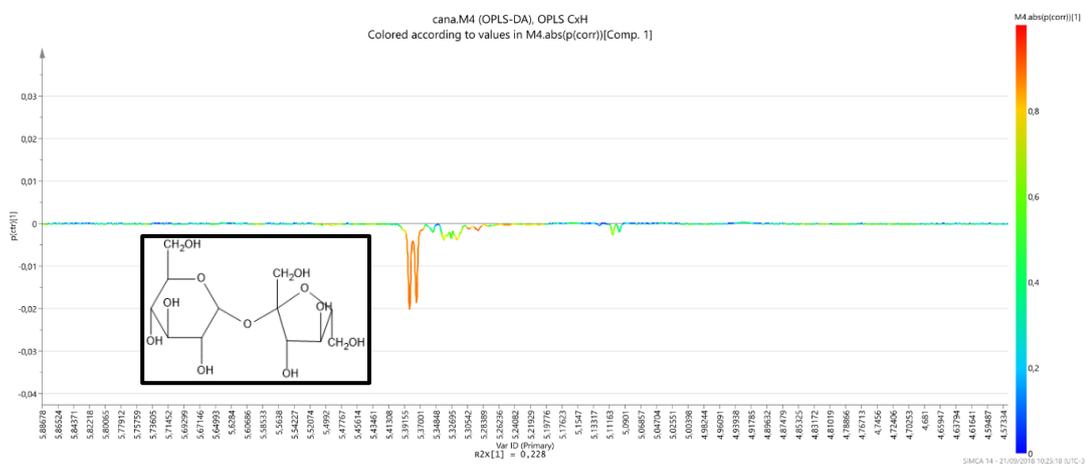
Figura 19. Identificação do Ácido Siríngico



FONTE: Autor 2018

O ácido Siríngico apresenta dois sinais característicos, apesar de possuir quatro grupos de hidrogênios, porém essa molécula também é simétrica e observa-se apenas dois sinais: um sinal em 3.66 ppm e outro em 6.86 ppm. Os dois sinais são singletos, pois não acoplam com nenhum hidrogênio vizinho. O sinal 3.66 ppm refere-se a metila ligada ao oxigênio (metoxila) que sofre uma desblindagem por causa da eletronegatividade do oxigênio, podendo aparecer numa região entre 3.2 e 3.8 ppm. E o sinal 6.86 ppm refere-se ao hidrogênio ligado ao anel aromático (benzenoide) que possui um deslocamento químico grande por causa da desblindagem do grande campo anisotrópico gerado pelos elétrons do sistema  $\pi$  do anel, podendo ser encontrado na região entre 6.50 e 8.00 ppm.

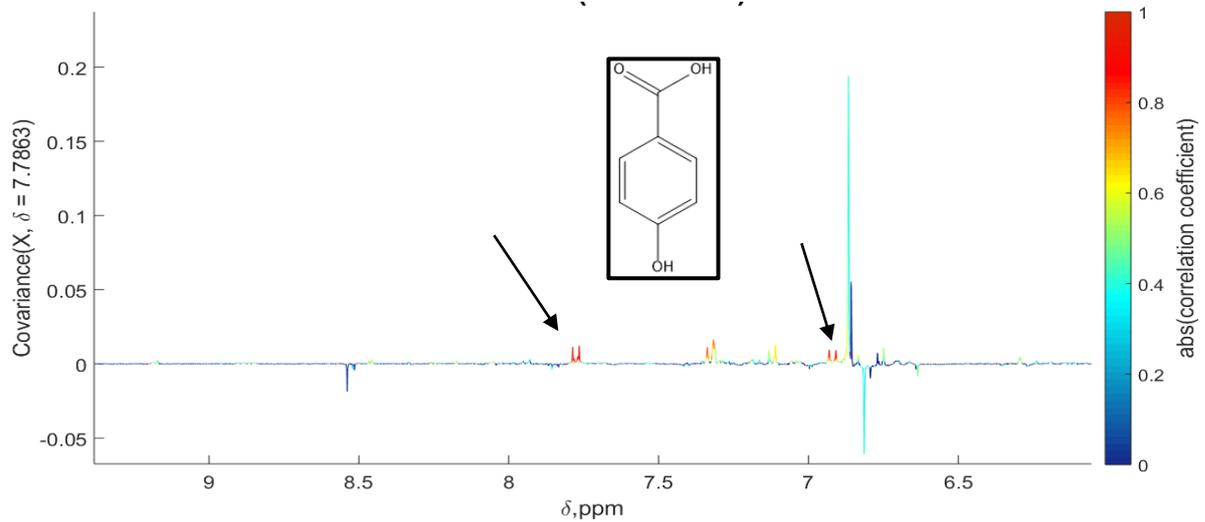
Figura 20. Identificação da Sacarose



FONTE: Autor 2018

O composto sacarose foi possível identificar com o sinal característico em 5.38 ppm, é um duplete referente ao hidrogênio metilênico que acopla com o CH vizinho do anel do grupo hexose.

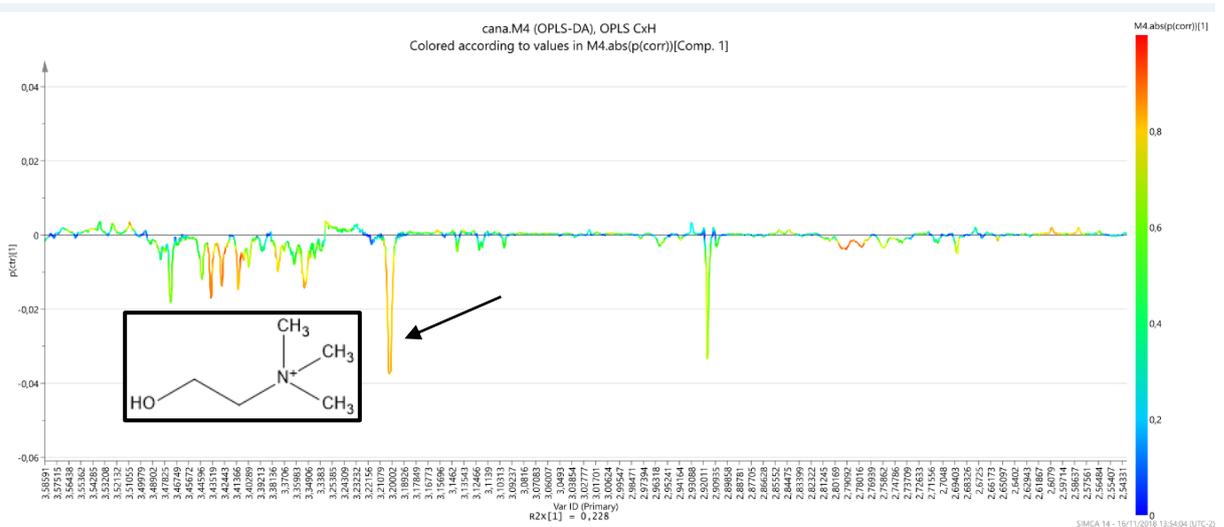
Figura 21. Identificação do Ácido p-hidroxibenzoico



FONTE: Autor 2018

O ácido p-hidroxibenzoico possui dois sinais característicos: um na região entre 6.80 e 6.90 ppm e outro na região entre 7.70 e 7.80 ppm. Ambos os sinais são duplete, embora a molécula possua quatro grupos de hidrogênios observa-se apenas dois sinais por causa da simetria da molécula. O duplete entre 6.80 e 6.90 ppm é referente ao hidrogênio metínico (CH) próximo a hidroxila (OH) e o duplete entre 7.70 e 7.80 ppm é referente ao hidrogênio metínico próximo a carbonila. E a partir da técnica de STOCSY foi possível observar a forte correlação entre seus picos característicos.

Figura 22. Identificação da Colina



FONTE: Autor 2018.

O sinal característico da colina é um singlete em 3.20 ppm referente as três metilas da amina quaternária, não sendo possível observar os multipletos referentes aos hidrogênios metilênicos, devido à baixa intensidade dos sinais e da sobreposição dos sinais dos açúcares (sacarose e glicose).

## 6. CONCLUSÃO

A partir do espectro de RMN-<sup>1</sup>H, se detectou as presenças dos seguintes grupos de compostos nos extratos: aminoácidos, ácidos orgânicos, açúcares e aromáticos. Foram executadas comparações iniciais entre os extratos da amostra controle e herbivoria, identificando um aumento na intensidade de alguns sinais em cada uma das regiões características destes grupos de compostos nas amostras da herbivoria, quando comparada com as amostras de controle.

A validação do modelo feita por meio dos valores obtidos de R<sup>2</sup>, Q<sup>2</sup> e p constatou um modelo bom e viável para continuar as análises.

Mesmo sendo um método não supervisionado, o método PCA possibilitou a extração de informações, a partir de dados multivariados complexos, detectando padrões de amostras (agrupamentos) e a presença de “outliers” (amostras fora do padrão, espúrios).

Já com o método supervisionado OPLS-DA foi possível identificar biomarcadores (discriminantes) em cada tratamento da cana-de-açúcar, possibilitando a identificação de aumento ou diminuição da concentração de certos compostos, ou ainda o surgimento de um novo composto antes não presente na planta.

Com a ferramenta STOCYSY (Espectroscopia de correlação estatística total) obteve-se a vantagem de mostrar a correlação entre as intensidades dos vários deslocamentos químicos em todo o conjunto de dados, não se limitando apenas as correlações de uma única molécula, mas de duas ou mais moléculas que estão envolvidas numa mesma via metabólica.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AUE, W. P.; KARHAN, J.; ERNST, R. R.. Homonuclear broad band decoupling and two-dimensional J-resolved NMR spectroscopy. **The Journal Of Chemical Physics**, [s.l.], v. 64, n. 10, p.4226-4227, 15 maio 1976. AIP Publishing. <http://dx.doi.org/10.1063/1.431994>.

AGROLINK. **Agricultura, Broca do colmo**. Disponível em: [https://www.agrolink.com.br/problemas/broca-do-colmo\\_375.html](https://www.agrolink.com.br/problemas/broca-do-colmo_375.html). Acesso em: 13 nov. 2018.

CONAB. **Acompanhamento da Safra Brasileira de cana-de-açúcar**. Ministério da Agricultura, Agropecuária e Abastecimento. 2018.

FIGUEIREDO FILHO, Dalson Britto; SILVA JÚNIOR, José Alexandre da. Desvendando os Mistérios do Coeficiente de Correlação de Pearson (r). *Revista Política Hoje*, Vol. 18, N. 1, 2009, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), v. 18, n. 1, p.1-35, 2009.

G. RAMOS et al. Quantification of the contribution of biological nitrogen fixation to tropical green manure crops and the residual benefit to a subsequent maize crop using <sup>15</sup>N-isotopetechniques. **Journal of Biotechnology**. v.91, 2001.

HALOUSKA, S.; POWERS, R. Negative impact of noise on the principal component analysis of NMR data. **Journal of Magnetic Resonance**, v.178, p.88-95, 2006.

HOWE GA, Jander G. Plant immunity to insect herbivores. **Annu Rev Plant Biol** 2008;59:41-66;PMID:18031220;  
<http://dx.doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092825>.

KIM, H.K.; CHOI, Y.H.; VERPOORTE, R. NMR-based metabolomic analysis of plants. *Nature Protocols*, v. 5, 2010.

LEISS, Kirsten A. et al. NMR Metabolomics of Thrips (*Frankliniella occidentalis*) Resistance in Senecio Hybrids. **Journal of Chemical Ecology**, v.35, n.2, p.219-229, 24 jan.2009. Springer nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10886-008-9586-0>.

LEISS, Kirsten A. et al. An overview of NMR-based metabolomics to identify secondary plant compounds involved in host plant resistance. **Phytochemistry Reviews**, [s.l.], v. 10, n. 2, p.205-216, 3 abr. 2010. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s11101-010-9175-z>.

PASQUINI, CELIO. Métodos de Análise e Regressão Multivariada: Teoria e Prática. **Espectroscopia no Infravermelho – Módulo II**. Unicamp, julho de 2011.

PEDRAZA. Recent advances in nitrogen-fixing acetic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**. v. 125, 2008.

ROSSETTO, R.; SANTIAGO, A. D. **Adubação**: resíduos alternativos. Brasília, DF: **EMBRAPA**, 2007.

SABINO, ADILSON RODRIGUES. O metaboloma da cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.) na resposta à herbivoria. Repositório UFAL, p.23, 22 mar.2017. <http://www.repositorio.ufal.br/handle/riufal/1909>.

SAIKIA, S. P.; JAIN, V. Biological nitrogen fixation with non-legumes: An achievable target or a dogma? **Current Science**. v. 92, n. 3, 2007.

SAITO, Kazuki; DIXON, Richard A.; WILLMITZER, Lothar. **Biotechnology in Agriculture and Forestry**: Plant Metabolomics. 57. ed. Hamburg: Spring, 2006. 351p.

TIKHONOVICH & PROVOROV. From plant-microbe interactions to symbiogenetics: a universal paradigm for the interspecies genetic integration. **Ann Appl Biol**. v. 154, 2009.

UMETRICS SUITE BLOG. **OPLS vs PCA**: Explaining differences or grouping data? Disponível em: <http://blog.umetrics.com/explaining-differences-or-grouping-data-ops-da-vs-pca-data-analysis>. Acesso em: 14 nov. 2018.

UNIAO DA INDUSTRIA DE CANA-DE-ACUCAR - UNICA. **Unicadata**: Produção, Área cultivada com cana-de-açúcar. Disponível em: <http://www.unicadata.com.br/historico-de-area-ibge.php?idMn=33&tipoHistorico=5&acao=visualizar&idTabela=2058&produto=%C3%81rea+Plantada&anoIni=2017&anoFim=2017&estado=RS%2CSC%2CPR%2CSP%2CRJ%2CMG%2CES%2CMS%2CMT%2CGO%2CDF%2CBA%2CSE%2CAL%2CPE%2CPB%2CRN%2CCE%2CPI%2CMA%2CTO%2CPA%2CAP%2CRO%2CAM%2CAC%2CRR>. Acesso em: 13 nov. 2018.