

UFAL

INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA

ADILSON RODRIGUES SABINO

**O METABOLOMA DA CANA-DE-AÇÚCAR (*SACCHARUM* SP.) NA RESPOSTA
À HERBIVORIA**

Universidade Federal de Alagoas

**Campus A. C. Simões
Tabuleiro do Martins
57072-970 - Maceió-AL**

ADILSON RODRIGUES SABINO

**O METABOLOMA DA CANA-DE-AÇÚCAR (*SACCHARUM SP.*) NA RESPOSTA
À HERBIVORIA**

Tese de Doutorado apresentada ao programa de Pós Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, como requisito para obtenção do grau de Doutor em ciências, Área de Concentração: Biotecnologia. Subárea: Produtos Naturais -Ecologia Química

Orientador: Prof. Dr. Edson de Souza Bento

Catlogação na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecário Responsável: Valter dos Santos Andrade

S116m Sabino, Adilson Rodrigues.
O metaboloma da cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.) na resposta à herbivoria / Adilson Rodrigues Sabino. – 2017.
140 f. : il. tabs., grafs.

Orientador: Edson de Souza Bento.
Tese (doutorado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Programa de Pós-Graduação Em Química e Biotecnologia. Maceió, 2017.

Bibliografia: f. 129-140.

1. Cana-de-açúcar. 2. *Diatraea saccharalis*. 3. Metabolômica.
4. Ressonância magnética nuclear (RMN). 5. Herbivoria. 6. Ácido clorogênico. I. Título.

CDU: 547-3



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E
BIOTECNOLOGIA



BR 104 Km14, Campus A. C. Simões
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins
57072-970, Maceió-AL, Brasil
Fone: (82) 3214-1144
Email: ppgqb.ufal@gmail.com

FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Defesa de Tese do Doutorando **Adilson Rodrigues Sabino** intitulada: **“O METABOLOMA DA CANA-DE-AÇÚCAR (SACCHARUM SP.) NA RESPOSTA À HERBIVORIA”**, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas no dia 22 de Março de 2017, às 08h30, no Auditório do Severinão da UFAL.

COMISSÃO JULGADORA:

Prof. Dr. Edson de Souza Bento
Orientador
PPGQB/IQB/UFAL

Prof. Dr. Jaim Simões de Oliveira
Centro Universitário Tiradentes/UNIT

Prof. Dr. Luiz Carlos Caetano
IQB/UFAL

Prof. Dr. Ticiano Gomes do Nascimento
ESENFAR/UFAL

Prof. Dr. Thiago Mendonça de Aquino
PPGQB/IQB/UFAL

AGRADECIMENTOS

Aos Professores Dr. Edson de Souza Bento, Dr. Alessandro Riffel, Dr. Antonio Euzébio Goulart Santana, Dr. Geoffrey Hawkes e Dr^a Jia Li pela orientação, paciência, incentivo, oportunidades e ensinamentos imprescindíveis para realização deste trabalho.

Aos amigos Demétrius, Lucas, Lucas Henrique e Jaim pela ajuda no desenvolvimento do trabalho.

Aos colegas do laboratório de Pesquisa em Produtos e Recursos Naturais (LPqRN).

Aos colegas do Núcleo de Análise e Pesquisa em Ressonância Magnética Nuclear (NAPRMN).

A EMBRAPA Tabuleiro Costeiros pelo suporte no cultivo das mudas.

Ao meu irmão Anderson pelo suporte no cultivo das mudas no CECA-UFAL.

A usina Triunfo pelo fornecimento das mudas de cana-de-açúcar e lagartas de *D. Saccharalis*.

Aos técnicos Aldy e Margarida pela atenção, colaboração e amizade.

Aos colegas do Computational System and Medicine group do Imperial College London.

Aos técnicos dos laboratórios de RMN Harolddo Queen Mary College; e Peter e Michael do Imperial College London.

A UFAL, IQB e CAPES pelo suporte para a realização do doutorado.

A minha família e a todos que de alguma forma colaboraram para a realização desse objetivo.

RESUMO

A crescente demanda mundial para a produção de energias renováveis em substituição aos combustíveis fósseis tem dado grande destaque à cultura da cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.). Esta tem sido considerada a cultura mais eficiente para a produção de energia, tendo o Brasil como o maior produtor mundial, com uma produção de 655,6 milhões de toneladas na safra 2015/2016 em uma área de 8,5 milhões de hectares. Um dos grandes entraves à produção de cana-de-açúcar ainda é o ataque de pragas e doenças e estima-se que cerca de 10% das perdas para esta cultura sejam ocasionadas por insetos, sendo a broca da cana-de-açúcar (*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. Muitos trabalhos têm sido desenvolvidos para decifrar os mecanismos de defesa da cana-de-açúcar ao ataque de insetos herbívoros, na tentativa de subsidiar programas de melhoramento genético e a biotecnologia de informação para o desenvolvimento de plantas mais resistentes, porém, muitos destes mecanismos ainda permanecem a ser esclarecidos. Estes trabalhos, em sua maioria, estão restritos ao estudo de genes e proteínas e a estudos globais de análises dos transcritos e do proteoma da planta. O presente trabalho propõe realizar a análise do metaboloma de duas variedades de cana-de-açúcar (RB92579 e SP791011) através dos métodos de extração direto e indireto na resposta a herbivoria por *Diatraea saccharalis*, utilizando espectroscopia de RMN, e processamento e estatística dos dados pelos métodos de análise de componentes principais (PCA) e análise dos mínimos quadrados parciais-análise discriminante (OPLS-DA). A análise metabolômica da cana-de-açúcar da variedade RB92579 foi realizada pelo método de extração direta (folhas) nos 4 tempos de herbivoria (24, 48, 72 e 96 horas), sendo que, apenas após 48, 72 e 96 horas sob herbivoria, foi possível haver diferenças entre os grupos controle e grupo herbivoria, no qual o tempo em que se obteve maior resposta da planta foi no tempo 72 horas, que indicou o aumento dos metabólitos primários asparagina, ácido aspártico, dimetilamina, ácido glutâmico, isoleucina, leucina, ácido málico, tirosina e fenilalanina. Já com relação a variedade de cana-de-açúcar SP 1011, aplicou-se o método de extração indireto das folhas da planta nos tempos 24, 48 e 72 horas sob estresse induzido pelas lagartas de *Diatraea saccharalis* e, coincidentemente, apresentou no tempo 72 horas o maior número de metabólitos de resposta a herbivoria, o que causou numa redução dos níveis de ácido cis e trans aconítico, ácido fórmico, asparagina, alanina e no aumento dos níveis de ácido acético e ácido clorogênico. Apesar de fornecerem perfis metabólicos diferentes em resposta a herbivoria, os metabólitos elucidados sugerem a via metabólica do ácido chiquímico devido ao aumento de tirosina, fenilalanina nas folhas da cana-de-açúcar da variedade RB92579, e aumento do ácido clorogênico nas folhas da cana-de-açúcar da variedade SP791011. Além do ensaio de herbivoria, foi realizado um ensaio biológico com o ácido clorogênico inserido na dieta artificial das lagartas de *Diatraea saccharalis*, que demonstrou uma diminuição do tempo de desenvolvimento das pupas em comparação com as pupas de lagartas controle, que provocou a eclosão das mariposas com deformações em todas as concentrações de ácido clorogênico usadas no bioensaio. Esses resultados podem ajudar no desenvolvimento de variedades de cana-de-açúcar mais resistentes ao ataque da *Diatraea Saccharalis*.

Palavras-chave: Cana-de-açúcar. *Diatraea saccharalis*. Metabolômica. RMN. Herbivoria. Ácido clorogênico.

ABSTRACT

The growing world demand for renewable energy production in substitution of fossil fuels has given great prominence in the culture of sugarcane (*Saccharum* sp.). This has been considered the most efficient crop for energy production, as Brazil being the world's largest producer, with a production of 655.6 million tons in 2015/2016 harvest in an area of 8.5 million hectares. One of the major obstacles to the production of sugarcane is still the attack by pest and estimates that about 10% of the crop losses are caused by insects, being a sugarcane borer (*Diatraea Saccharalis*) the most important pest. The plants, during its evolution, to reduce the damages caused by the attack of pests, they have developed a series of defense mechanisms, among them, physical barriers, proteins and toxic metabolites and volatile metabolic flags. Many works have been developed to decipher the mechanisms of defense of sugarcane to the attack of herbivorous insects, an attempt of genetic breeding programs and information biotechnology for the development of more resistant plants, however, many of the mechanisms still remain to be clarified. These works are mostly restricted to the study of genes and proteins and global studies of transcript and proteome analyzes of the plant. The current work proposes to perform an analysis of the metabolism of two varieties of sugarcane (RB92579 and SP791011) through direct and indirect extraction methods in response to herbivory by *Diatraea saccharalis* using NMR spectroscopy and multivariate statistical analysis from data by principal component analysis (PCA) and least squares analysis of discrimination (OPLS-DA). In the metabolomic analysis of sugarcane of the variety RB92579 was studied using the direct extraction method (leaves) in the 4 herbivory times (24, 48, 72 and 96 hours), only after 48, 72 and 96 hours of stress by herbivory, it was possible to get differences between the control groups and herbivore groups, which the greater timing of response was obtained in 72 hours, that indicated the increase of the primary metabolites asparagine, aspartic acid, dimethylamine, glutamic acid, isoleucine, leucine, malic acid, tyrosine and phenylalanine. The variety of sugarcane SP791011, the method of indirect extraction of the leaves of the plant was applied in times 24, 48 and 72 hours by stress induced by caterpillars of *Diatraea saccharalis* and, coincidentally, showed in the time 72 hours a greater number of herbivory response metabolites, which caused a depletion of aconitic acid, formic acid, asparagine, alanine and elevation of acetic acid and chlorogenic acid. Despite their different metabolic profiles in response to herbivory, the elucidated metabolites suggest the metabolic pathway of shikimic acid to produce phenylpropanoids due to the increase of tyrosine, phenylalanine in the leaves of the sugarcane variety RB92579, and increase of chlorogenic acid in the leaves of the cane. In addition to the herbivory test, it was carried out a biological assay with chlorogenic acid inserted in the artificial diet of *Diatraea saccharalis* caterpillars, which demonstrated a decrease in the development time of the pupae comparing with pupae of Caterpillars Control, which caused an outbreak of moths with deformations at all concentrations of chlorogenic acid used in the bioassay. These results may help in the development of sugarcane varieties more resistant to the attack by *Diatraea Saccharalis*.

Key words: Sugarcane. *Diatraea saccharalis*. Metabolomic. NMR. Herbivory. Chlorogenic acid.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Percentual de área total de cana-de-açúcar por unidade da federação.	19
Figura 2	<i>Diatraea saccharalis</i> no estado larval alimentando-se do colmo da cana-de-açúcar.	22
Figura 3	Aminoácidos aromáticos tirosina (Tyr), fenilalanina (Phe) e triptofano (Trp) precursores de metabólitos secundários.	24
Figura 4	Estruturas dos principais metabólitos secundários envolvidos no mecanismo de defesa das plantas contra herbívoros.	25
Figura 5	Notação de dados para PCA. Observações (N) podem ser espectros de RMN e variáveis (K) podem ser valores de deslocamentos químicos.	32
Figura 6	Notação de dados para OPLS-DA. Observações (N) podem ser espectros de RMN; variáveis (K) podem ser valores de deslocamentos químicos e Y a função resposta.	33
Figura 7	(A) Conjunto de dados pré-processados de RMN- ¹ H com o sinal em 5.408 selecionado para o STOCSY. (B) Espectro de RMN pseudo-2D gerado no STOCSY na identificação da sacarose.	35
Figura 8	Mudas de cana-de-açúcar da variedade SP791011 (no dia do bioensaio) na casa de vegetação.	36
Figura 9	Planta de cana-de-açúcar atacada por lagartas de <i>Diatraea saccharalis</i> .	38
Figura 10	Fluxograma da metodologia geral do trabalho.	41
Figura 11	Região de aminoácidos e ácidos orgânicos (A), açúcares (B) e aromáticos (C) na comparação entre as sequências de pulsos ZGPR, ZGPPR e NOESY1DPR para supressão do sinal da água em uma amostra controle em tampão fosfato pH = 6 em D ₂ O/ CD ₃ OD.	43
Figura 12	Região de aminoácidos e ácidos orgânicos (A), açúcares (B) e aromáticos (C) na comparação entre os espectros de RMN- ¹ H entre as metodologias de extração direta e indireta dos metabólitos da cana-de-açúcar em uma amostra controle em tampão fosfato pH = 6 em D ₂ O/ CD ₃ OD (1:1).	45
Figura 13	Comparação dos espectros de RMN- ¹ H de extrato de folhas de cana-de-açúcar variedade SP791011 controle (preto) e herbivoria (vermelho) com as regiões características de algumas classes de metabólitos.	46
Figura 14	Espectro J-resolvido da amostra controle da cana-de-açúcar variedade SP791011 obtido pelo método de extração indireto.	47
Figura 15	Espectro COSY da amostra controle da cana-de-açúcar da variedade SP791011 obtido pelo método de extração indireto.	47
Figura 16	Espectro HSQC-EDITADO da amostra controle da cana-de-açúcar variedade SP791011 obtido pelo método de extração indireto.	48
Figura 17	Espectro HMBC da amostra controle da cana-de-açúcar variedade SP1011 obtido pelo método de extração indireto.	48
Figura 18	Espectro J-resolvido ¹ H- ¹ H expandido na região de 0.5 a 1.8 ppm obtido pelo método de extração direto (variedade RB92579)	50

Figura 19	Estruturas de alguns aminoácidos identificados destacando-se os principais acoplamentos observados no espectro J-resolvido ^1H - ^1H .	50
Figura 20	Espectro COSY ^1H - ^1H obtido pelo método de extração direto (variedade RB92579). Iso: Isoleucina; Val: Valina; α -ala: Alanina; Tre: Treonina e Lac: Lactato.	51
Figura 21	Figura 23: Espectro J-resolvido ^1H - ^1H expandido na região de 1.8 ppm a 4.10 ppm obtido pelo método de extração indireto (variedade SP791011). Ac: Ácido Acético, A. Suc: Ácido Succínico, A. Asp: Ácido Aspártico, Asg: Asparagina e Col: Colina.	52
Figura 22	(A) Região do espectro HSQC EDITADO ^1H - ^{13}C na confirmação do Ácido Acético. (B) Estrutura do ácido acético.	53
Figura 23	Região do espectro HSQC EDITADO ^1H - ^{13}C obtido pelo método de extração Indireto (variedade SP791011) confirmando o ácido succínico. (B) Estrutura do ácido succínico	54
Figura 24	(A) Região do espectro TOCSY ^1H - ^1H e (B) região do espectro HSQC EDITADO ^1H - ^{13}C mostrando os acoplamentos entre os hidrogênios referentes aos metabólitos asparagina (Asp) e ácido aspártico (A. Asp) obtido pelo método de extração indireto. (C) Estruturas da asparagina e do ácido aspártico.	55
Figura 25	(A) Região do espectro J-resolvido ^1H - ^1H ampliada de 2,5 ppm a 4,5 ppm obtido pelo método de extração indireto (SP791011). (B) região do espectro TOCSY ^1H - ^1H ampliada de 2,0 ppm a 4,5 ppm mostrando os acoplamentos entre os hidrogênios referentes ao ácido málico. (C) Estrutura do ácido málico.	56
Figura 26	(A) Região do espectro TOCSY ^1H - ^1H obtido pelo método de extração direto (RB92579) mostrando o acoplamento entre os hidrogênios metilênicos da colina (Col). (B) Região do espectro HSQC EDITADO ^1H - ^{13}C confirmando a colina. (C) Estrutura da colina.	58
Figura 27	(A) Região do espectro HSQC EDITADO ^1H - ^{13}C mostrando o acoplamento da (B) glicina (Glc).	60
Figura 28	Espectro J-resolvido ^1H - ^1H adquirido pelo método de extração indireto (SP791011) referente aos hidrogênios anoméricos em carboidratos comuns da cana-de-açúcar. (A) Espectro HSQC EDITADO ^1H - ^{13}C adquirido pelo método de extração direto destacando os sinais da sacarose. (B) Estrutura da sacarose.	61
Figura 29	(A) Espectro HSQC EDITADO ^1H - ^{13}C adquirido pelo método de extração indireto (SP791011) destacando os sinais da sacarose. (B) Estrutura da sacarose.	62
Figura 30	(A) Espectro HSQC EDITADO ^1H - ^{13}C adquirido pelo método de extração direto (variedade RB92579) destacando os sinais da α e β - glicose. (B) Estruturas da α e β - glicose.	63
Figura 31	Correlações dos sinais da α e β - glicose (cor vermelha) no STOCSY em 4.5851 ppm.	64
Figura 32	(A) Espectro J-resolvido ^1H - ^1H . (B) Espectro TOCSY ^1H - ^1H destacando o sinais do ácido shiquímico. Espectros adquiridos pelo método de extração direto (variedade SP791011). (C) Estrutura do ácido chiquímico.	65
Figura 33	(A) Região olefínica do espectro J-resolvido ^1H - ^1H mostrando os singletos correspondentes do ácido fumárico e dos ácidos trans e cis – aconítico. (B) STOCSY em 6.241ppm confirmando os ácidos trans e cis – aconítico. (C) Estruturas do ácido fumárico e dos ácidos trans e cis – aconítico. Espectro adquirido pelo método de extração indireto (variedade SP791011).	67

Figura 34	(A) Espectro J-resolvido ^1H - ^1H . (B) Espectro HSQC EDITADO ^1H - ^{13}C e (C) espectro HMBC ^1H - ^{13}C referentes a identificação do ácido gálico pelo método de extração indireto (SP791011). (D) Estrutura do ácido gálico.	69
Figura 35	(A) Espectro J-resolvido ^1H - ^1H . (B) Espectro COSY ^1H - ^1H destacando os sinais da tirosina. Espectros adquiridos pelo método de extração direta (variedade RB92579). (C) STOCSY em 6.85 ppm. (D) Estrutura da tirosina.	71
Figura 36	Espectros (A) J-resolvido e (B) COSY do extrato da cana-de-açúcar (vermelho) e do padrão de ácido clorogênico (preto) sobrepostos confirmando o metabólito. (C) Estrutura do ácido clorogênico.	73
Figura 37	(A) Espectro J-resolvido expandido na região aromática mostrando os sinais aromáticos e olefínicos do ácido 5' feruloíla quínico. Espectro adquirido pelo método de extração indireto de uma amostra de cana-de-açúcar SP791011 após a herbivoria. (B) Estrutura do ácido 5' feruloíla quínico.	75
Figura 38	Região expandida do STOCSY entre (A) 7,9 e 6,3 ppm e (B) 5,6 e 1,5 ppm mostrando alta correlação dos sinais característicos dos fenilpropanóides identificados na cana-de-açúcar de variedade SP791011.	76
Figura 39	(A) Espectro J-resolvido para a identificação do ácido fórmico. (B) Estrutura do ácido fórmico.	77
Figura 40	(A) RMN- ^1H e (B) TOCSY ^1H - ^1H do extrato da folha da cana-de-açúcar controle e (C) STOCSY em 9.14 ppm para a confirmação da (D) trigonelina. Obtido pelo método de extração direto (variedade RB92579).	78
Figura 41	Dados processados para análise multivariada da cana-de-açúcar controle e herbivoria totalizando 158 espectros e 29,984 variáveis.	82
Figura 42	Barras referentes aos valores de R e Q que indicam a variância e o poder preditivo do modelo somando-se duas componentes principais 1 e 2.	83
Figura 43	(A) PCA escores das amostras herbivoria (4 grupos) e controle (4 grupos) da cana-de-açúcar. (B) Trajetória dos escores da PC1 e PC2 das amostras controle (24 horas) e herbivoria (24, 48, 72, 96 horas) da cana-de-açúcar (RB92579).	84
Figura 44	(A) Escores da O-PLS-DA das amostras controle 48 horas e herbivoria 48 horas. (B) Gráfico S-line mostrando os metabólitos discriminantes, sinais com fase positiva referem-se as amostras herbivoria e sinais com fase negativa referem-se as amostras controle.	87
Figura 45	(A) Escores da O-PLS-DA das amostras controle 72 horas e herbivoria 72 horas. (B) Gráfico S-line mostrando os metabólitos discriminantes, sinais com fase positiva referem-se as amostras herbivoria e sinais com fase negativa referem-se as amostras controle.	88
Figura 46	(A) Escores da O-PLS-DA das amostras controle 96 horas e herbivoria 96 horas. (B) Gráfico S-line mostrando os metabólitos discriminantes, sinais com fase positiva referem-se as amostras herbivoria e sinais com fase negativa referem-se as amostras controle.	89
Figura 47	Boxplot das concentrações relativas dos metabólitos discriminantes em resposta da cana-de-açúcar a herbivoria. Comparação entre C = controle e H = herbivoria nos tempos estudados (Teste t – pareado entre controle e herbivoria no tempo estudado, $p < 0,05$).	91
Figura 48	(A) Escores da O-PLS-DA do estudo C24 x C48. (B) Gráfico S-line mostrando os metabólitos discriminantes.	94
Figura 49	(A) Escores da O-PLS-DA do estudo C24 x C72. (B) Gráfico S-line mostrando os metabólitos discriminantes.	95
Figura 50	(A) Escores da O-PLS-DA do estudo C24 x C96. (B) Gráfico S-line mostrando os metabólitos discriminantes.	96

Figura 51	(A) Escores da O-PLS-DA do estudo C48 x C96. (B) Gráfico S-line mostrando os metabólitos discriminantes.	97
Figura 52	(A) Escores da O-PLS-DA do estudo C48 x C72. (B) Gráfico S-line mostrando os metabólitos discriminantes.	98
Figura 53	(A) Escores da O-PLS-DA do estudo H24 x H72. (B) Gráfico S-line mostrando os metabólitos discriminantes.	101
Figura 54	A) Escores da O-PLS-DA do estudo H24 x H96. (B) Gráfico S-line mostrando os metabólitos discriminantes.	102
Figura 55	(A) Escores da O-PLS-DA do estudo H48 x H96. (B) Gráfico S-line mostrando os metabólitos discriminantes.	103
Figura 56	(A) Escores da O-PLS-DA do estudo H72 x H96. (B) Gráfico S-line mostrando os metabólitos discriminantes.	104
Figura 57	(A) Escores da O-PLS-DA do estudo H48 x H72. (B) Gráfico S-line mostrando os metabólitos discriminantes.	105
Figura 58	Dados processados para análise multivariada da cana-de-açúcar controle e herbivoria totalizando 36 espectros e 19,404 variáveis.	106
Figura 59	Barras referentes aos valores de R e Q que indicam a variância e o poder preditivo do modelo somando-se duas componentes principais 1 e 2.	107
Figura 60	Escores da PCA das amostras herbivoria (2 grupos) e controle (2 grupos) de folhas da cana-de-açúcar obtidas pelo método de extração indireto (variedade SP791011).	108
Figura 61	(A) Escores da O-PLS-DA das amostras controle 24 horas e herbivoria 48 horas. (B) Gráfico S-line mostrando os metabólitos discriminantes (numerados – ver tabela anterior), sinais com fase positiva referem-se as amostras herbivoria e sinais com fase negativa referem-se as amostras controle.	111
Figura 62	(A) Escores da O-PLS-DA das amostras controle 24 horas e herbivoria 72 horas. (b) Gráfico S-line mostrando os metabólitos discriminantes (numerados – ver tabela anterior), sinais com fase positiva referem-se as amostras herbivoria e sinais com fase negativa referem-se as amostras controle.	112
Figura 63	(A) Escores da O-PLS-DA das amostras controle 72 horas e herbivoria 72 horas. (b) Gráfico S-line mostrando os metabólitos discriminantes (numerados – ver tabela anterior), sinais com fase positiva referem-se as amostras herbivoria e sinais com fase negativa referem-se as amostras controle.	113
Figura 64	Boxplot das concentrações relativas dos metabólitos discriminantes em resposta da cana-de-açúcar (SP1011) a herbivoria. Comparação entre C = controle e H = herbivoria nos tempos estudados (Teste-t pareado, $p < 0,05$).	114
Figura 65	A) Escores da O-PLS-DA do estudo H48 x H72. (B) Gráfico S-line mostrando os metabólitos discriminantes	117
Figura 66	Via metabólica do ácido chiquimico.	120
Figura 67	Biossíntese do ácido clorogênico a partir da fenilalanina.	123
Figura 68	<i>Diatraea saccharalis</i> na fase adulta com má formação em função das doses do ácido clorogênico.	125

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Metabólitos identificados nas folhas de cana-de-açúcar nas variedades RB 92579 (extração direta) e SP 791011 (extração indireta). Principais sinais de deslocamento químico.	80
Tabela 2	Metabólitos discriminantes em folhas da cana-de-açúcar da variedade RB92579 em resposta a herbivoria por <i>Diatraea saccharalis</i> identificados por S-line plot através de modelos da O-PLS-DA. *Os valores de <i>p</i> resultantes da validação cruzada ANOVA e valores de correlação positiva (<i>r</i>) para os metabólitos referente a herbivoria.	85
Tabela 3	Metabólitos discriminantes nas folhas da cana-de-açúcar de variedade RB92579 das amostras controle durante o curso do bioensaio identificados por S-line plot através de modelos da O-PLS-DA. *Os valores de <i>p</i> resultantes da validação cruzada ANOVA e valores de correlação (<i>r</i>) positiva para os metabólitos referente as plantas com maior tempo de vida.	96
Tabela 4	Metabólitos discriminantes nas folhas da cana-de-açúcar de variedade RB92579 das amostras sob herbivoria durante o curso do bioensaio identificados por S-line plot através de modelos da O-PLS-DA. *Os valores de <i>p</i> resultantes da validação cruzada ANOVA e valores de correlação (<i>r</i>) positiva para os metabólitos referente as plantas com maior tempo sob herbivoria.	100
Tabela 5	Metabólitos discriminantes nas folhas da cana-de-açúcar em resposta a herbivoria com a <i>Diatraea saccharalis</i> identificados por S-line plot através de modelos da O-PLS-DA. *Os valores de <i>p</i> resultantes da validação cruzada ANOVA e valores de correlação (<i>r</i>) positiva para os metabólitos referente as plantas sob herbivoria.	110
Tabela 6	Metabólitos discriminantes nas folhas da cana-de-açúcar em resposta a herbivoria com a <i>Diatraea saccharalis</i> identificados por S-line plot através de modelos da O-PLS-DA. *Os valores de <i>p</i> resultantes da validação cruzada ANOVA e valores de correlação (<i>r</i>) positiva para os metabólitos referente as plantas sob maior tempo de herbivoria.	116

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

δ	Deslocamento Químico
ANOVA	Análise de Variância
PCA	Análise de Componentes Principais
CHCl_3	Clorofórmio
CDCl_3	Clorofórmio Deuterado
PC	Componentes Principais
CV	Validação cruzada
ConA	Concanavalina A
COSY ^1H - ^1H	Correlation spectroscopy
D	Dupleto
Dd	Duplo Dupleto
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
D_2O	Água deuterada
EM	Espectrômetria de Massas
FT	Transformada de Fourier
FID	Decaimento livre de indução
HMBC ^1H - ^{13}C	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HMDB	<i>Human Metabolome Data Base</i>
HSQC ^1H - ^{13}C	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
Hz	Hertz
J	Constante de Acoplamento
MeOH	Metanol
MeOD	Metanol Deuterado

MHz	Megahertz
mL	Mililitros
OPLS-DA	Análise discriminante ortogonal por mínimos quadrados parciais
Ppm	Parte por milhão
RMN	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono Treze
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
S	Sinpleto
STOCSY	Espectroscopia de correlação estatística total
T	Tripleto
TOCSY	<i>Total Correlation Spectroscopy</i>
TSP	Sal de sódio do ácido trimetilsilano propiônico
UV	Única variância
μL	Microlitros

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	18
2.1 Geral	18
2.2 Específicos	18
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1 Cana-de-açúcar	19
3.1.1 Variedade da cana-de-açúcar SP791011 e RB92579.....	20
3.2 Diatraea Saccharalis	21
3.3 Mecanismo de defesa das plantas	22
3.4 Metabolômica	26
3.4.1 Metabolômica em plantas	27
3.4.2 Análise metabolômica no estudo de interação inseto – planta	28
3.5 Ressonância magnética nuclear (RMN) aplicada a metabolômica	29
3.6 Processamentos de dados de RMN para análise multivariada	31
3.6.1 Normalização	31
3.6.2 Alinhamento de dados	31
3.6.3 Métodos de escalonamento	31
3.7 Análise de componentes principais (PCA)	32
3.8 Análise discriminante ortogonal por mínimos quadrados parciais (OPLS-DA)	33
3.9 Espectroscopia de correlação estatística total (STOCSY)	34
4 METODOLOGIA	36
4.1 Mudanças de cana-de-açúcar	36
4.2 Lagartas de Diatraea saccharalis	37
4.3 Bioensaio de herbivoria com Diatraea saccharalis	37
4.4 Extração direta dos metabólitos	38
4.6 Análises de RMN	39
4.7 Análise multivariada	40
5 RESULTADOS	42
5.1 Sequências de pulsos de RMN para as análises das amostras de cana-de-açúcar	42
5.2 Comparação entre as metodologias de extração direta e indireta	44
5.3 Perfil metabólico da cana-de-açúcar	46
5.4 Identificação dos metabólitos nas folhas da cana-de-açúcar das variedades SP791011 e RB92579	49

5.5 Análise multivariada da variedade da cana-de-açúcar (RB 92579) pelo método de extração direto	822
5.5.1 Séries pareadas de análises discriminantes ortogonal por mínimos quadrados parciais (OPLS-DA) das amostras controle e herbivoria.....	85
5.5.2 Séries pareadas de análises discriminantes ortogonal por mínimos quadrados parciais (OPLS-DA) comparando as amostras controles (variedade RB92579)	92
5.5.3 Séries pareadas de análises discriminantes ortogonal por mínimos quadrados parciais (OPLS-DA) comparando as amostras sob herbivoria (variedade RB92579)	99
5.6 Análise multivariada da variedade SP791011 da cana-de-açúcar pelo método de extração indireta	106
5.6.1 Séries pareadas de análises discriminantes ortogonal por mínimos quadrados parciais (OPLS-DA).....	108
5.6.2 Séries pareadas de análises discriminantes ortogonal por mínimos quadrados parciais (OPLS-DA) comparando as amostras controle e as amostras sob herbivoria (variedade SP791011)	115
6 DISCUSSÃO	118
Metabólitos primários	118
Trigonelina	121
Ácido clorogênico	122
Perfil metabólico da cana-de-açúcar RB92579 entre as amostras controle	126
Perfil metabólico da cana-de-açúcar RB92579 entre as amostras sob herbivoria	126
Variedade metabólica da cana-de-açúcar SP791011 entre as amostras sob herbivoria	127
Variedade de cana-de-açúcar SP 791011 vs variedade de cana-de-açúcar RB 92579	127
7 CONCLUSÕES	128
REFERÊNCIAS	129

1. INTRODUÇÃO

Todo organismo, para obter sucesso em sua sobrevivência e reprodução precisa defender-se de seus inimigos naturais. Organismos autotróficos, como as plantas, estão sempre sendo confrontados com a perspectiva de serem consumidos por herbívoros, que por sua vez pode trazer sérias consequências para sua habilidade de sobrevivência e de reprodução. Por outro lado, as plantas desenvolveram ao longo da evolução uma série de mecanismos que auxiliam na resistência a esses herbívoros. As plantas geralmente possuem algumas defesas mecânicas para resistir ao ataque de herbívoros, que podem ser a produção de resina, aumento da concentração de lignina, acúmulo de sílica e cera em sua epiderme, as quais podem alterar a textura de seu tecido, diminuindo sua palatabilidade e digestibilidade para o inseto. Outra estratégia é a de formar barreiras de superfície que restringem o movimento do herbívoro, tais como espinhos e tricomas. Além dessas estratégias de superfície, algumas plantas possuem a capacidade de alterar sua fisiologia, composição química e até mesmo seu desenvolvimento como mecanismo de resistência. Este mecanismo de defesa da planta é conhecido como resposta induzida. O sistema de resposta induzida é um conjunto de respostas fenotípicas dinâmicas que permitem às plantas se defenderem somente quando necessário (Strauss & Agrawal, 1999), haja visto ser um mecanismo com consumo energético para a planta e sua ativação contínua pode comprometer a alocação das fontes necessárias para o crescimento e reprodução. As plantas possuem uma habilidade única de reconhecer o ataque de herbívoros e podem reconfigurar toda a sua resposta para produzir uma grande quantidade de proteínas de defesa, metabólitos secundários e compostos voláteis que podem atrair predadores e repelir os insetos herbívoros que as estão atacando (Voelckel & Baldwin, 2004).

A sinalização química durante o mecanismo de resposta induzida das plantas é em grande parte mediada pelo fitormônio ácido jasmônico (AJ). A herbivoria pode primeiramente elicitar um acúmulo rápido e momentâneo de AJ, geralmente nas folhas. O AJ e seus metabólitos elicitam, após a herbivoria, a expressão de genes relacionados à defesa e promovem grandes alterações no transcriptoma, proteoma

e metaboloma da planta, o que ocorre paralelamente à repressão do desenvolvimento e crescimento da planta (Stork *et al.*, 2009).

O mecanismo de resposta da cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.) à herbivoria foi primeiramente proposto por Falco *et al.* (2001). Através da análise de dados do genoma funcional SUCEST, foram identificados ortólogos a inibidores de tripsina, de cisteína proteinase e de alfa-amilase. Também foram identificados, sendo relacionados à proteínas de defesa, genes com similaridades a lectinas, quitinases e polifenol oxidases, além de uma série de moléculas sinalizadoras anteriormente descritas para outras espécies.

Algumas estratégias para aumentar a defesa das plantas frente aos insetos herbívoros têm sido feitas e vários desses genes candidatos têm sido incorporados a genótipos elite de cana de açúcar. A expressão heteróloga, em cana-de-açúcar, de algumas proteínas relacionadas à defesa, tais como as proteínas cry de *Bacillus turingiensis* (Braga *et al.*, 2003) e inibidores de protease de soja (Falco e Silva-Filho, 2003) tem levado a um aumento da resistência a *Diatraea saccharalis*, o principal inseto-praga para a cultura da cana-de-açúcar no Brasil. Apesar desses resultados, a função de muitos dos genes que apresentam expressão modificada pela herbivoria permanece ainda desconhecida e os mecanismos de resposta a esse estresse biótico ainda continua como um grande desafio à pesquisa. Portanto, a identificação e caracterização de genes, proteínas e metabólitos de defesa bem como seus fatores regulatórios e um melhor entendimento do mecanismo de resposta da planta a herbivoria permanecem ainda a ser elucidados, principalmente para a aplicação em programas de melhoramento genético no desenvolvimento de plantas transgênicas efetivas contra insetos herbívoros. Este trabalho se propõe estudar o metaboloma da cana-de-açúcar na resposta ao ataque do inseto herbívoro *Diatraea saccharalis*.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Identificar os metabólitos e vias metabólicas envolvidas na resposta da cana-de-açúcar à herbivoria.

2.2 Específicos

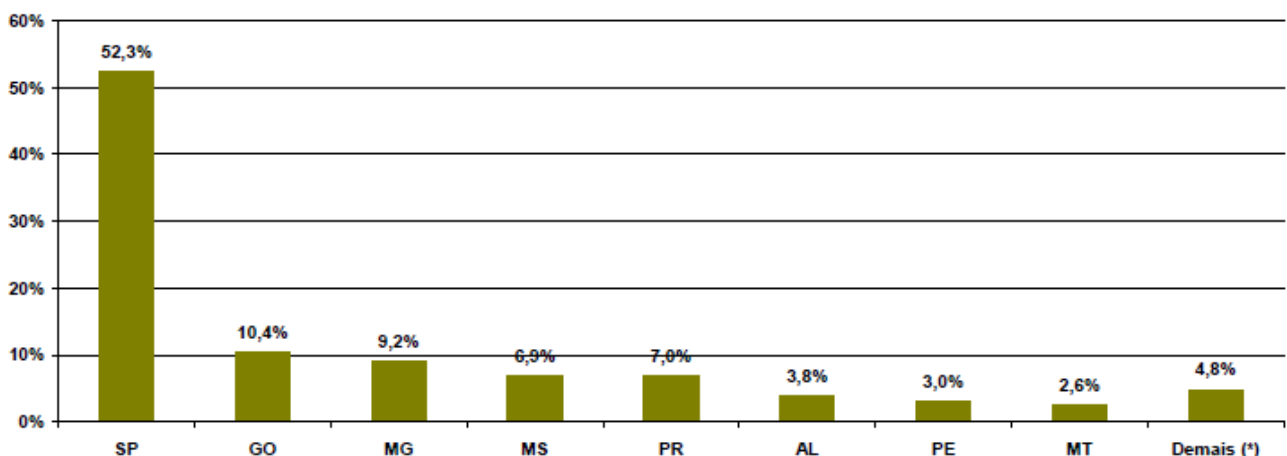
- Identificar os metabólitos da cana-de-açúcar por ressonância magnética nuclear;
- Aplicar métodos estatísticos uni e multivariados na identificação de biomarcadores relacionados com o mecanismo de defesa da cana-de-açúcar em resposta a *Diatraea saccharalis*;
- Identificar vias metabólicas envolvidas na resposta da cana-de-açúcar;
- Identificar metabólitos de folhas de cana-de-açúcar que sejam elucidados pela infestação por *Diatraea saccharalis*.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar tem como centro de origem o Sudeste Asiático e Nova Guiné, sendo mais precisamente originada na Índia e na China há 2000 anos, e vem sendo cultivada por mais de 500 anos desde quando essa cultura foi introduzida ao novo mundo. É uma planta gramínea pertencente à família *Poaceae* e originária principalmente da espécie *Saccharum officinarum* (HENRY; KOLE, 2010, AITKEN et al., 2006). No Brasil a cana-de-açúcar foi introduzida pelos portugueses que iniciaram o cultivo na região nordeste devido as boas condições de clima e de solo. Atualmente a produção desta cultura é uma das maiores do mundo destacando-se em países com clima tropical sendo países como Brasil, Índia e China, respectivamente, os maiores produtores. De acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), a safra 2015/2016 de cana-de-açúcar foi de 665,6 milhões de toneladas havendo um crescimento de 4,9% em comparação com a safra 2014/2015 (CONAB, 2016). A região Sudeste é responsável por 62,2% 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, 2016).

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



Fonte: CONAB 2016.

O açúcar e o etanol são os principais produtos oriundos da cana-de-açúcar que são fabricados pelas usinas que por sua vez utiliza parte da matéria-prima da planta para gerar energia elétrica. O açúcar é amplamente utilizado na indústria mundial alimentícia, enquanto o etanol vem sendo bastante demandado devido o importante papel na economia brasileira, pois é utilizado como combustível nos automóveis flex, ser misturado a gasolina para reduzir a emissão de poluentes e ser utilizado na fabricação de tintas e solventes (DIAS et al., 2015). O desenvolvimento tecnológico vem demonstrando novas aplicações para o etanol de cana-de-açúcar como a produção de polietileno verde que é de origem de fonte renovável como a cana-de-açúcar no qual seu plantio ajuda a reduzir o CO₂ da atmosfera. O polietileno verde (plástico verde) desenvolvido pela BRASKEM, vem sendo usado em estações da NASA para criação de peças no espaço em impressoras 3D (BRASKEM, 2016). Portanto, inovações tecnológicas e o aumento da percentagem de álcool anidro na gasolina aumentaram a demanda na produção da cana-de-açúcar que segundo a CONAB (2016) estima-se que a safra 2016/2017 aumentará 3,7% com a relação a safra anterior.

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*.

3.1.1 Variedade da cana-de-açúcar SP791011 e RB92579

A variedade de cana-de-açúcar SP791011 esteve presente na safra 2008/2009, em cerca de 20% da área colhida na região nordeste, sendo responsável por mais de 25% dos açúcares produzidos. A variedade SP791011 tem como características o mal fechamento na entrelinha, podendo ser derrubada durante ventos fortes, sendo susceptível à ferrugem e à broca-da-cana (SOUZA et al., 2013). Essa variedade se destaca por ser umas das mais estudadas e conter uma ampla base de dados no programa de genoma da cana-de-açúcar (SUCEST). A cana-de-açúcar de variedade RB 92579 é a mais cultivada na região Nordeste, e tem apresentado crescimento na

área plantada na região centro-sul tendo como principais características o ótimo fechamento das entrelinhas apresentar resistência à ferrugem marrom, carvão e ser tolerante à cigarrinha da folha (JÚNIOR, 2008).

3.2 *Diatraea Saccharalis*

Popularmente conhecida como a broca-da-cana, a *Diatraea saccharalis* (Fabricius 1794, Lepidoptera, Crambidae) é a principal praga da cana-de-açúcar. A mariposa põe os ovos na parte dorsal das folhas da planta e, em até 10 dias, os ovos eclodem e as lagartas inicialmente alimentam-se da folha até chegar ao colmo onde abrem galerias no interior da planta e se desenvolvem, passando para a fase de pupa até se tornarem mariposas, saindo pelos orifícios abertos e atacam novas plantas (SANDOVAL; SENÔ, 2010, NAKANO et al. 2002). Durante o período em que estão no colmo as lagartas causam falhas na germinação e perda de massa levando ao tombamento da cultura (dano direto). As galerias abertas servem para a entrada de fungos que causam podridão (dano indireto), diminuindo a pureza e o rendimento na produção de açúcar (FALCO; SILVA-FILHO, 2003). A *Diatraea saccharalis* (Figura 2) possui inimigos naturais e entre os métodos de controle destaca-se o método de controle biológico que pode ser executado com parasitóides de ovos, como *Trichogramma* spp., e com os parasitoides de lagartas, a *Cotesia flavipes* (Cameron, 1891) (Hymenoptera: Braconidae). A *Cotesia flavipes* tem como a principal vantagem agir no interior do entrenó da cana-de-açúcar uma vez que as lagartas estão mais protegidas, o que dificulta o uso de inseticidas (MACEDO; MACEDO, 2004). Além do controle biológico, há também o método de controle cultural que consiste em remover plantas hospedeiras (milho) próximas ao canavial. O controle químico é feito por meio da pulverização de triflumuron no palmito da planta. Apesar dos diversos tipos controle, a *Diatraea saccharalis* ainda provoca prejuízos em cerca de milhões de reais por ano.

Figura 2: *Diatraea saccharalis* no estado larval alimentando-se do colmo da cana-de-açúcar.



Fonte: Autor 2017.

3.3 Mecanismo de defesa das plantas

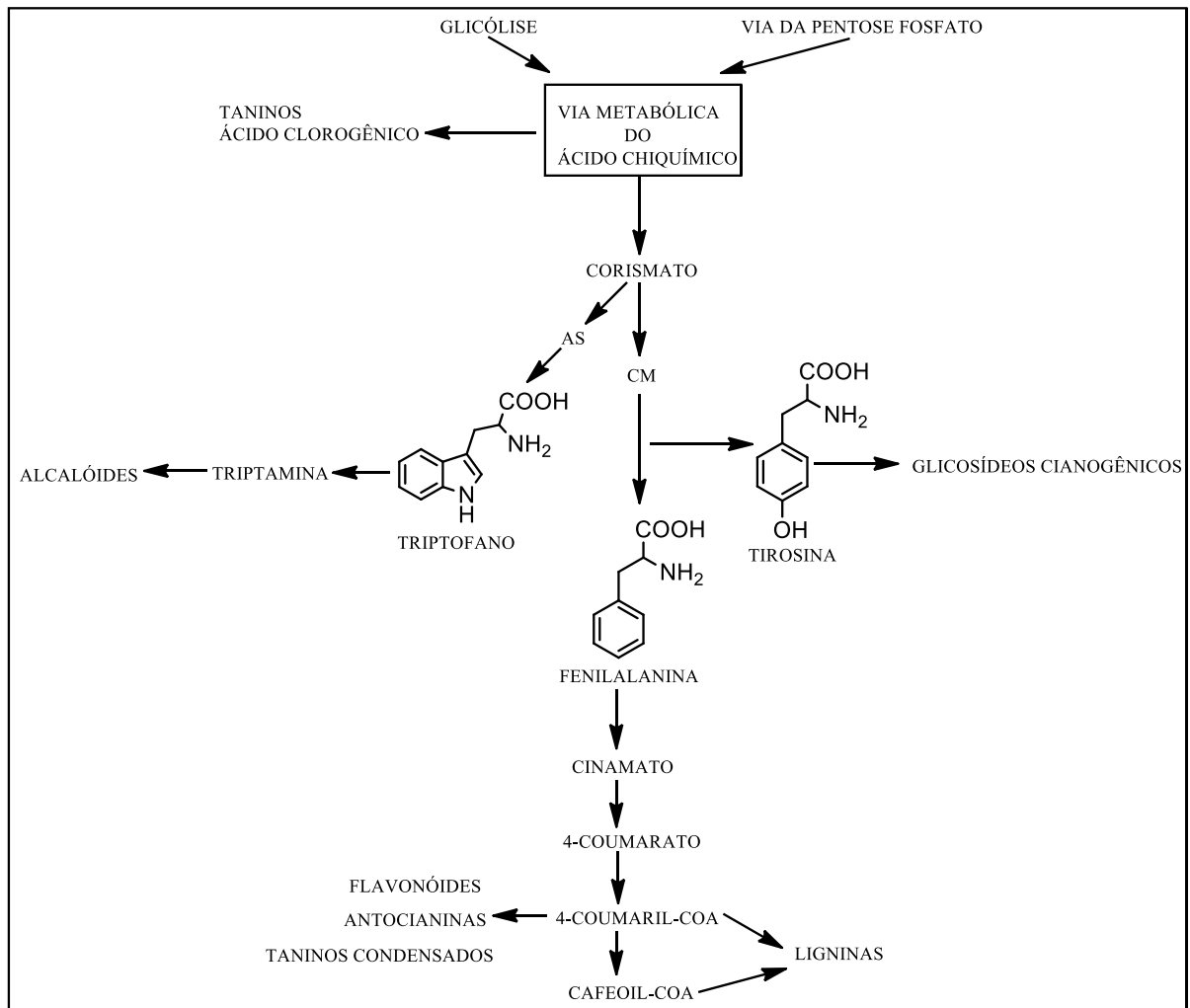
Há milhares de anos plantas e insetos tem interagido e evoluído, desenvolvendo um complexo sistema de defesa. O mecanismo de defesa de plantas ativa o sistema imunológico contra os herbívoros, tendo a habilidade de reconhecer moléculas ou sinais de células danificadas (WAR et al., 2012). Para se proteger contra os herbívoros as plantas possuem em sua estrutura morfológica uma proteção mecânica que consiste de pêlos, 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 parasitóides) dos herbívoros (HARE, 2011; WAR et al., 2012; 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.

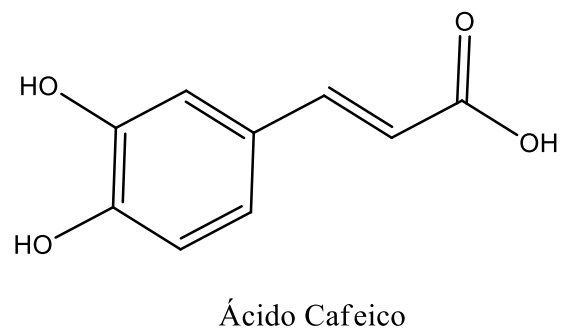
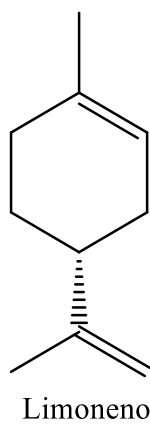
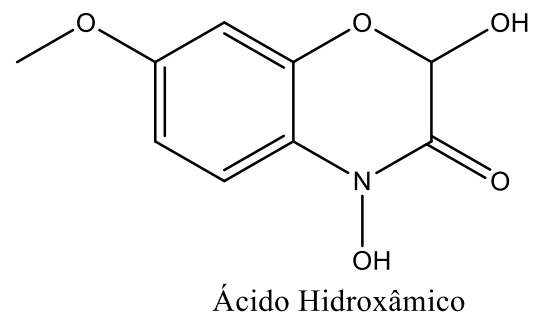
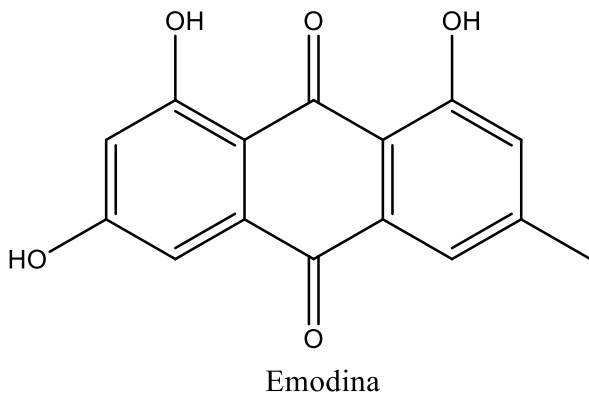
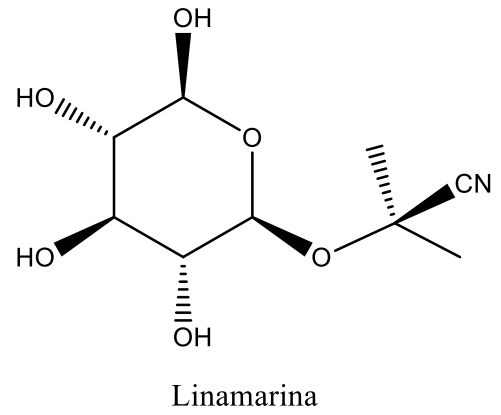
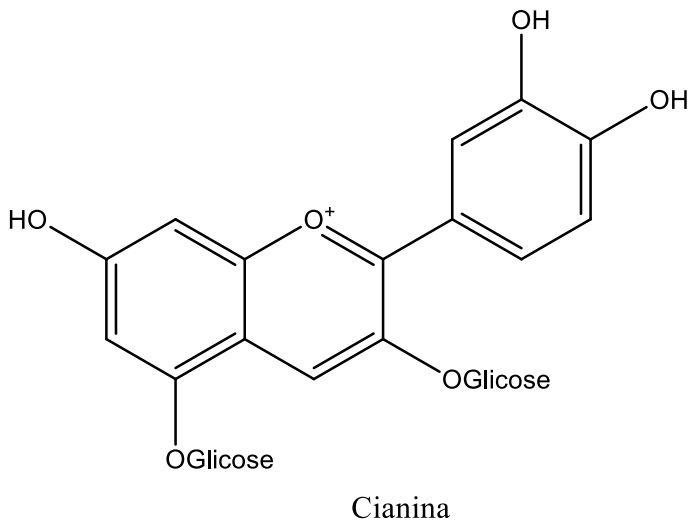
Alguns metabólitos secundários são derivados dos aminoácidos aromáticos. Os alcaloides são derivados do triptofano e da tirosina; metabólitos como cumarinas, flavonóides, antocianinas e fenilpropanóides são derivados da fenilalanina; enquanto que fenilpropanóides e glicosídeos cianogênicos são derivados da tirosina. Por sua vez, os aminoácidos aromáticos são derivados do ácido chiquímico (Figura 3). Na figura 4 são apresentados alguns metabólitos secundários importantes no mecanismo de defesa das plantas contra insetos como antocianinas, monoterpenos, fenilpropanóides, emodina e glicosídeos cianogênicos (NEILSON et al., 2013). Em estudos relacionados à cana-de-açúcar pouco há na literatura sobre a relação dos metabólitos secundários na função de defesa contra herbívoros (estudo interação inseto – planta). Um estudo realizado por Silva (2012), caracterizou os metabólitos secundários não voláteis como fenilpropanóides e flavonóides glicosilados no extrato da cana-de-açúcar. Silva Filho (2014) identificou o β -cariofileno no tecido foliar da cana-de-açúcar como resposta a herbivoria por *Diatraea saccharalis*, sendo que este terpeno atrai o parasitóide *Cotesia flavipes* estabelecendo, dessa forma, uma relação entre a planta o herbívoro e seu inimigo natural.

Figura 3: Aminoácidos aromáticos tirosina, fenilalanina e triptofano precursores de alguns metabólitos secundários. AS: aantranilato sintase; CM: corismato sintase.



Fonte: Maeda e Dudareva (2012), adaptada.

Figura 4: Estruturas dos principais metabólitos secundários envolvidos no mecanismo de defesa das plantas contra herbívoros.



Fonte: Autor 2017.

Por outro lado, muito se tem abordado sobre proteínas e genes envolvidos no mecanismo de defesa da cana-de-açúcar. Estudos com proteínas relacionados com a *Diatraea saccharalis* foram publicados. Pompermayer et al. (2001) testaram o inibidor da proteinase da soja (SPI) como dieta artificial para a broca da cana-de-açúcar (*Diatraea Saccharalis*) e mostrou uma retardada taxa de crescimento e desenvolvimento das lagartas quando comparado com larvas alimentadas com a dieta comum, não havendo efeito significativo na sobrevivência das lagartas. Filho (2003) verificou a expressão de genes que codificam a inibição de proteinase (Inibidor da tripsina de soja Kunitz - SBBI e inibidor da Bowman-Birk da soja - SKTI) no genoma da cana-de-açúcar após alimentar as lagartas de *Diatraea saccharalis* com folhas de plantas não transformadas e transgênicas e foi possível observar uma retardada taxa de crescimento e um aumento ligeiramente maior de mortalidade em lagartas alimentadas a partir da SKTI. Gitahy et al. (2007) desenvolveram um sistema de distribuição de Cry proteínas para controle da broca da cana-de-açúcar, que descreve atividades da estirpe brasileira *bacillus thuringiensis* contra a *Diatraea saccharalis*.

De acordo com Riffel et. al. (2011), 150 proteínas do tecido foliar da cana-de-açúcar foram alteradas após a infestação e danos com secreção oral causados pela *Diatraea saccharalis*. Apesar de haver alguns estudos envolvendo a cana-de-açúcar e a *Diatraea saccharalis*, não há estudos sobre o metabolismo da planta em reposta a herbivoria, sendo a metabolômica um estudo apropriado para identificar vias metabólicas e inseticidas naturais.

3.4 Metabolômica

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 (HALL, 2006; SAITO; DIXON; WILLMITZER, 2006). A metabolômica se destaca pela multidisciplinaridade no seu desenvolvimento, pois envolve ferramentas analíticas e de bioinformática. A

ressonância magnética nuclear e espectrometria de massas são os métodos analíticos mais comuns em estudos de metabolômica, enquanto que em estudos de bioinformática, destacam-se os métodos quimiométricos que englobam o uso de análises estatísticas uni e multivariadas. A metabolômica tem sido aplicada em diversas áreas como medicina, nutrição, farmácia, química, biologia e agricultura.

3.4.1 Metabolômica em plantas

Estima-se que 200.000 ou mais metabólitos estão presentes no reino vegetal, sendo que boa parte destes compostos são benéficos ao seres humanos por possuírem propriedades medicinais, alimentícia e servirem de matéria-prima para a indústria (SAITO; DIXON; WILLMITZER, 2006). Devido a essas características, pesquisas com metabolômica de plantas tem se tornado cada vez mais importantes, tendo diversas aplicações incluindo classificação quimiotaxônomica, determinação de origem geográfica, monitoramento de crescimento e resposta da planta a fatores abióticos e bióticos voltados a agricultura (MAHROUS; FARAG, 2015). As metodologias envolvidas (método analítico e bioinformática) nesta abordagem de perfil metabólico foram demonstradas em um estudo (GAVAGHAN *et al.*, 2011) do estresse salino em milho. Um estudo recente (MY *et al.*, 2015) classificou por quimiotaxonomia oito espécies de fungos (*Streptomyces*) por metabolômica a partir de dados de espectrometria de massas (EM) verificando também a atividade bactericida dos metabólitos identificados.

Rao, Sui e Zhang (2016) investigaram o perfil metabólico (85 metabólitos) de nozes por EM em diferentes estágios de maturação da planta, concluindo que carboidratos e algumas proteínas são marcadores de maturação das nozes.

Em estudos de metabolômica relacionados a cana-de-açúcar, Lira (2010) avaliou o perfil metabólico de variedades transgênicas de cana-de-açúcar por RMN e EM, e concluiu que nas plantas transgênicas houve um aumento dos níveis de açúcares e fenilpropanóides.

3.4.2 Análise metabolômica no estudo de interação inseto – planta

A aplicação da metabolômica em estudos de interação inseto-planta é uma abordagem cada vez mais importante e eficaz para a identificação e quantificação de metabolitos secundários e a sua variabilidade em resposta ao ataque do herbívoro (KIM *et al*, 2010). Os metabolitos secundários constituem numa potencial fonte para a geração de plantas resistentes a pragas e na descoberta de biopesticidas devido a vasta disseminação de pragas agrícolas ao redor do mundo (HONG *et al.*, 2016). Neste contexto, muitos cientistas tem trabalhado no ramo da metabolômica e para colaborar com o manejo de pragas e culturas.

Marti *et al.* (2012) desenvolveram por EM um estudo metabolômico em folhas e raízes de milho em resposta a herbivoria. As mudas de milho foram infestadas com lagartas de *Spodoptera littoralis* e as folhas e raízes foram coletadas após 24 horas e 48 horas de herbivoria, e os resultados mostraram que em ambas as partes da planta houveram um total de 32 metabolitos em resposta ao estresse causado pelo inseto, sendo destaque o metabolito p-coumaroiltramina que foi testado frente as lagartas, mas apenas contribuiu para o crescimento das larvas.

Mirnezhad *et al.* (2010) avaliaram a resistência de variedades de mudas de tomates resistentes e susceptíveis a tripes comparando-se o perfil metabólico de resposta a herbivoria, no qual identificaram acil-açúcares como metabolito de resposta das plantas resistentes. Este estudo concluiu que além da defesa constitutiva, essa variedade também produz acil-açúcares que causam efeitos negativos em insetos. Em outro trabalho com o tomate, Steinbrenner *et al.* (2011) caracterizaram a resposta metabólica do tomate após 24 horas sob herbivoria de duas espécies de lagartas, no qual analisaram por EM amostras de folhas, raízes, caule e o topo das plantas controle e das plantas danificadas, identificando compostos fenólicos (tirosina, fenilalanina e ácido caféico) e aminoácidos precursores de metabolitos de defesa.

A metabolômica também tem sido utilizada para verificar a resposta de plantas selvagens de tabaco à herbivoria por *Manduca sexta*. Neste estudo comparou-se as folhas do tabaco controle com folhas de tabaco atacados pela praga, por EM, que constatou que as vias metabólicas de compostos fenólicos estão associadas a resposta da planta ao estresse (LI; BALDWIN; GAQUEREL, 2015).

3.5 Ressonância magnética nuclear (RMN) aplicada a metabolômica

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 (prótons por exemplo) da amostra de uma só vez obtendo-se um espectro de hidrogênio (RMN- ^1H) em alguns segundos. A RMN é uma poderosa ferramenta para a 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 (sequências de pulsos) para elucidação estrutural. Uma vez que se trabalha com amostras biológicas (fluidos biológicos e extrato de plantas) que são misturas complexas muitos são os experimentos de RMN usados para a identificação dos metabólitos (metaboloma).

Entre os experimentos de RMN-1D utilizados em metabolômica destaca-se o experimento de RMN de hidrogênio (RMN- ^1H), 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- ^1H 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- ^1H pode ser solucionado através da técnica de RMN J-resolvido ^1H - ^1H , 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- ^1H , 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) (KARHAN; ERNST, 1976, LUDWIG; VIANT, 2010, AUE).

Kim et al. (2010) aplicaram o experimento J-resolvido ^1H - ^1H no estudo metabolômico para a classificação quimiotaxonômica de onze espécies do gênero *Ilex*

da América do Sul. Liang et al. (2006) estudou as alterações metabólicas nas folhas da *Brassica rapa* tratadas com metil jasmonato identificando hidroxicinamatos e glicosilatos com espectro J-resolvido ^1H - ^1H .

De maneira geral, os experimentos RMN- ^1H e J-resolvido ^1H - ^1H são ferramentas usadas para a pré-identificação dos metabólitos podendo-se comparar deslocamento químico (δ) e constante de acoplamento (J) em diversas bases de dados na literatura como o Human Metabolome Data Base (HMDB) e o Plant Metabolome Data Base (PMDB).

Geralmente, os espectros de RMN- ^1H e J-resolvido não são suficientes para a elucidação estrutural de compostos em misturas, havendo a necessidade do uso de outros experimentos bidimensionais (RMN-2D). Os experimentos de RMN homonucleares 2D mais utilizados em metabolômica são COSY ^1H - ^1H (correlation spectroscopy) e o TOCSY ^1H - ^1H (total correlation spectroscopy). O experimento COSY ^1H - ^1H é um experimento de RMN-2D que apresenta a correlação direta (J^1) entre os hidrogênios da mesma molécula. O experimento TOCSY ^1H - ^1H mostra os acoplamentos de um sistema de spins de uma mesma molécula. Este experimento é bastante útil para identificação de carboidratos e aminoácidos, pois há muitos espectros TOCSY ^1H - ^1H na maioria das bases de dados disponíveis na literatura (PMDB e HMDB). No entanto, o experimento TOCSY ^1H - ^1H tem como desvantagem o maior número de sinais no espectro comparando-se com o espectro COSY ^1H - ^1H causando sobreposições de sinais, o que dificulta a identificação de metabólitos em misturas complexas, em amostras de extrato bruto ou biofluidos, por exemplo.

Dentre os experimentos de RMN heteronucleares 2D destacam-se o HSQC ^1H - ^{13}C (heteronuclear single quantum coherence spectroscopy) e o HMBC ^1H - ^{13}C (heteronuclear multiple bond correlation). O experimento HSQC ^1H - ^{13}C mostra o acoplamento entre hidrogênio e carbono a uma ligação (J^1) e tem sido usado por Xi et al. (2008) e Kim, Choi e Verpoorte (2011) na identificação de pequenas moléculas no extrato da planta *Arabidopsis thaliana* comparando com o espectro HSQC ^1H - ^{13}C de uma mistura de padrões sintéticos. O experimento HMBC ^1H - ^{13}C apresenta os acoplamentos entre hidrogênio e carbono a longa distância ($J^{2,3}$), sendo esse experimento muito utilizado na identificação de compostos aromáticos como fenilpropanóides (VERPOORTE; CHOI; KIM, 2007). A principal vantagem das técnicas heteronucleares é a região de deslocamento químico do carbono que varia

de 0 a 220 ppm separando melhor os sinais dos metabólitos, e assim, facilitando a identificação dos mesmos.

3.6 Processamentos de dados de RMN para análise multivariada

3.6.1 Normalização

É a etapa que pode ser usada para minimizar os problemas de variação da concentração das amostras, que é efetuado dividindo-se os dados pela área total do espectro de RMN ou pela área do sinal do padrão interno (CRAIG et al., 2006). Esta etapa evita que as amostras com concentração muito alta sejam responsáveis pela maior variância do dados, podendo desta forma causar uma falsa interpretação dos resultados, não sendo possível avaliar o processo biológico em questão para análise metabolômica.

3.6.2 Alinhamento de dados

É um dos procedimentos mais importantes para análise em metabolômica uma vez que há a comparação de dezenas ou centenas de espectros de RMN. Esse processo inicialmente é feito através da calibração dos deslocamentos químicos nos espectros de RMN pelo sinal do solvente ou do padrão interno. No entanto, apesar da calibração prévia é comum haver alguns sinais com variação de deslocamento químico, como ácidos orgânicos por exemplo, sendo necessário o uso de um algoritmo ou programa estatístico específico para esse procedimento (GOODACRE et al., 2007).

3.6.3 Métodos de escalonamento

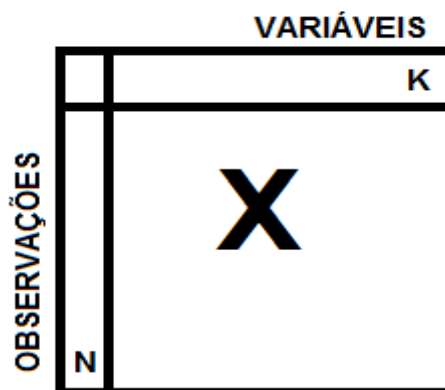
De modo geral, variáveis com grande valores possuem alta variância enquanto variáveis com pequenos valores possuem baixa variância. Os métodos de escalonamento de dados tem a função de minimizar esse tipo de problema que pode ocorrer na base de dados. Um dos métodos de escalonamentos mais comuns aplicados 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; ERIKSSON et al., 2006).

3.7 Análise de componentes principais (PCA)

A PCA é um método não supervisionado que é 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). Os dados para a PCA são formados por N linhas (observações) e K colunas (variáveis) (Figura 5). As observações (N) podem ser amostras analíticas, compostos químicos ou reações enquanto que as variáveis (K) podem ser de origem espectral (RMN, infravermelho), origem cromatográfica (HPLC, GC). As componentes principais (vetores) indicam no espaço dimensional onde está ocorrendo maior variância em um determinado conjunto de dados (WORLEY; POWERS, 2013; ERIKSSON et al., 2006; MINGOTI, 2013). A PCA tem sido usada em estudos envolvendo metabolômica em plantas. Choi et. al (2004) desenvolveram um método por PCA usando RMN que permitiu diferenciar plantas de tabaco selvagens de plantas transgênicas sem a necessidade de etapas de purificação. Georgiev et. al (2011) aplicaram a RMN- ^1H combinado a PCA para a classificação de espécies de *verbascum* (mulleins).

Figura 5: Notação de dados para PCA. Observações (N) podem ser espectros de RMN e variáveis (K) podem ser valores de deslocamentos químicos.

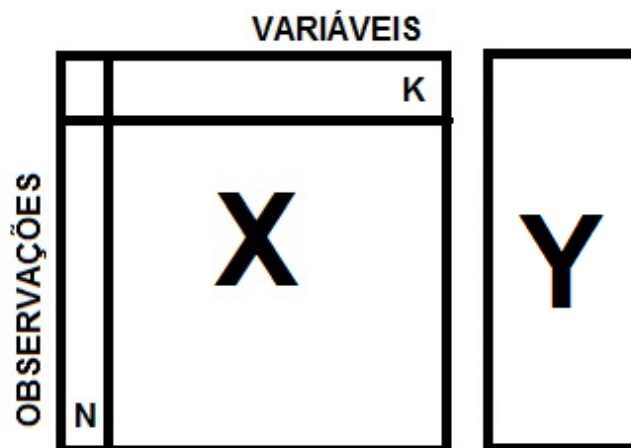


Fonte: Eriksson et al. 2006, adaptada.

3.8 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 diferenças entre grupo controle e grupo infectado). Esse método fornece a máxima separação na matriz X com base na classificação informada na matriz Y (Figura 6) denominada função-resposta (KIM; CHOI; VERPOORTE, 2010, ERIKSSON et al., 2006). A OPLS-DA tem a vantagem sobre a PCA pelo fato de usar um filtro ortogonal incorporado ao algoritmo PLS que rotaciona o plano (projeção PCA) que separa a variação correlacionada da variação não correlacionada em X e Y (UMETRICS, 2013). Na prática a OPLS-DA é usada principalmente para a identificação dos biomarcadores envolvidos no estudo em questão. Leiss et al. (2009) avaliaram a resistência de híbridos da *Senecio jacobaea* e *Senecio aquaticus* frente a trips (*Frankliniella occidentalis*) identificando alta concentração de alcaloides e flavonoides nas plantas que foram atacadas. Baddini, Netto e Teixeira (2014) utilizaram a RMN- ^1H e a PLS-DA para diferenciar duas espécies de algas pardas, *Dictyota ciliolata* e *D. crenulata*.

Figura 6: Notação de dados para OPLS-DA. Observações (N) podem ser espectros de RMN; variáveis (K) podem ser valores de deslocamentos químicos e Y a função resposta.



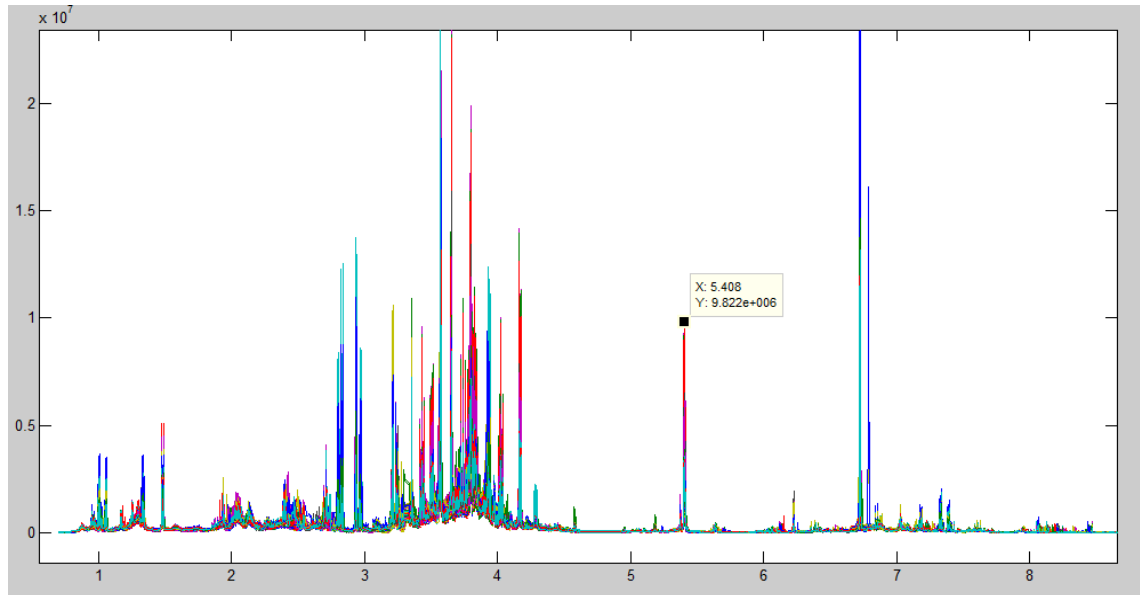
Fonte: Eriksson et al. 2006, adaptada.

3.9 Espectroscopia de correlação estatística total (STOCSY)

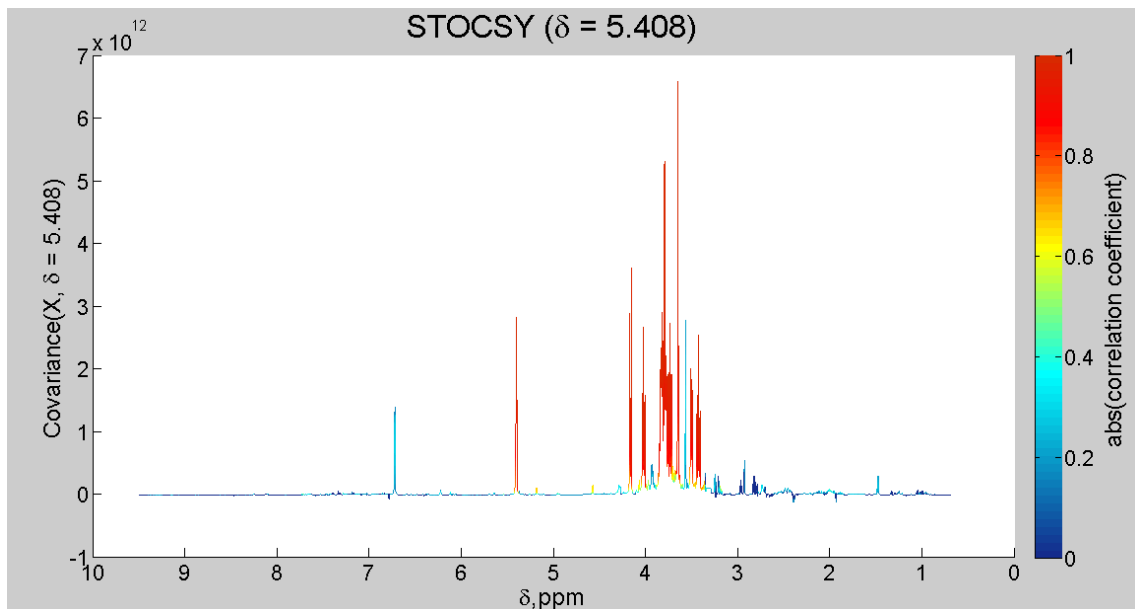
O STOCSY é uma importante ferramenta para a identificação de metabólitos sem a necessidade de uma análise prévia do(s) espectro(s) de RMN uma vez tratando-se de estudos sobre metabolômica que engloba uma grande quantidade de espectros de RMN com diversos deslocamentos químicos tornando-se a análise complexa. 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 7 mostra a aplicação do STOCSY em um conjunto de dados (Figura 7A) do presente trabalho, onde o deslocamento químico escolhido foi 5.44 ppm que resultou na identificação da sacarose apresentando deslocamentos químicos destacados em vermelho (sinais com alta correlação com 5.44 ppm) no espectro pseudo-2D (Figura 7B).

Figura 7 - (A) Conjunto de dados pré-processados de RMN-¹H com o sinal em 5.408 selecionado para o STOCSY. (B) Espectro de RMN pseudo-2D gerado no STOCSY na identificação da sacarose.

(A)



(B)



Fonte: Autor 2017.

4. METODOLOGIA

4.1 Mudanças de cana-de-açúcar

Duas variedades (RB92579 e SP791011) de cana-de-açúcar foram utilizadas neste trabalho. As plantas de variedade RB92579 foram fornecidas pela SBW do Brasil Agrifloricultura SP, estrada 107, km 32, localizada na cidade de Holambra, Estado de São Paulo. As plantas foram entregues prontas para o campo com 30 cm de altura e foram plantadas em vasos de 12 cm de diâmetro contendo substrato de casca de coco para desenvolvimento em 25 dias. As plantas de variedade SP791011 foram fornecidas pela Usina Agroindustrial Triunfo localizada na cidade de Boca da Mata, estado de Alagoas. As sementes foram plantadas em vasos de 12 cm de diâmetro contendo substrato de casca de coco para o crescimento em 40 dias. Todas as plantas foram transferidas para uma casa de vegetação, onde foram controladas fotoperíodo, temperatura e umidade, até que o bioensaio foi iniciado.

Figura 8: Mudanças de cana-de-açúcar da variedade SP791011 (no dia do bioensaio) na casa de vegetação.



Fonte: Autor 2017.

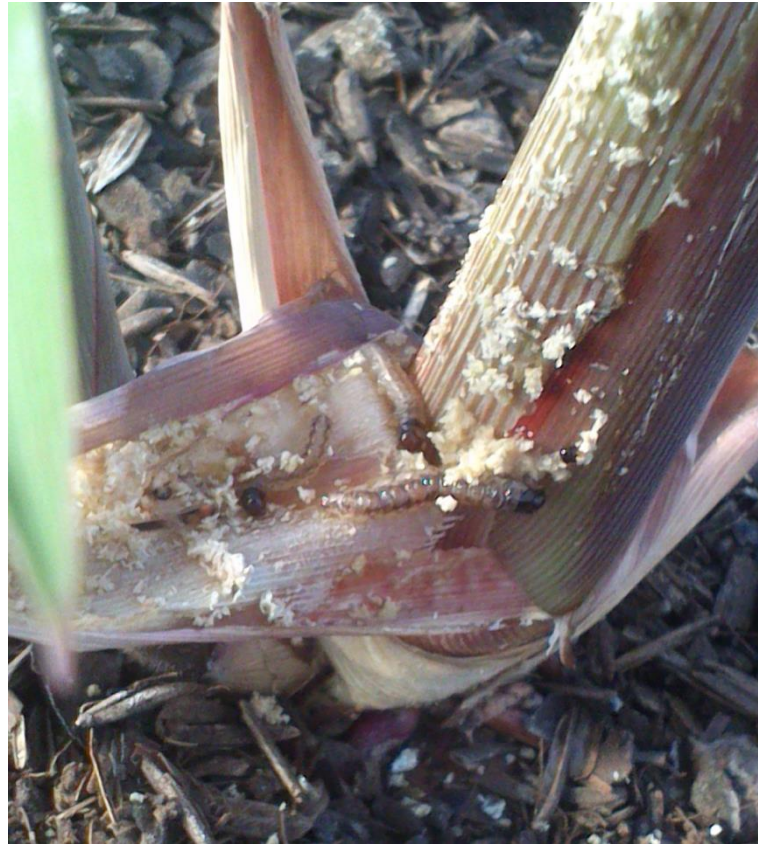
4.2 Lagartas de *Diatraea saccharalis*

As lagartas foram adquiridas junto a Usina Triunfo Agroindustrial LTDA localizada no município de Boca da Mata-AL. Foram utilizadas lagartas de *Diatrea saccharalis* com 12 dias de vida (terceiro instar) para o bioensaio de herbivoria. Inicialmente, as lagartas foram mantidas em dieta artificial e 24 horas antes de serem usadas na infestação das mudas, as lagartas foram mantidas em um frasco plástico com ausência de alimento para garantir que as mesmas brocassem as plantas de cana-de-açúcar durante o bioensaio de herbivoria.

4.3 Bioensaio de herbivoria com *Diatraea saccharalis*

Foram utilizadas 194 plantas para o bioensaio de herbivoria utilizando lagartas de *Diatrea saccharalis*. O bioensaio usando a variedade RB92579 (158 plantas) foi realizado em 4 tempos de estresse sob herbivoria: 24; 48; 72 e 96 horas, utilizando 79 plantas sem infestação (controle) e 79 outras plantas foram infestadas (5 lagartas por planta - herbivoria). Foram usadas 36 plantas da variedade SP791011 para o bioensaio em 2 tempos de estresse sob herbivoria: 48, 72 e 24, 72 horas para plantas controle. O bioensaio para todas as plantas herbivoria foram infestadas por cinco larvas por planta. As folhas foram colhidas de acordo com cada tempo de herbivoria utilizando nitrogênio líquido para estancar o metabolismo da planta no exato momento. Antes de coletar as folhas das plantas infestadas, foi verificado se as plantas tinham sido atacadas pelas lagartas (Figura 9). As folhas recolhidas foram armazenadas num ultrafreezer a -80°C até que fosse realizado os experimentos de extração dos metabólitos.

Figura 9: Planta de cana-de-açúcar atacada por lagartas de *Diatraea saccharalis*.



Fonte: Autor 2017.

4.4 Extração direta dos metabólitos (Variedade RB92579)

As folhas coletadas da cana-de-açúcar de variedade RB92579 foram maceradas com nitrogênio líquido e liofilizadas, sendo, a seguir, liofilizadas e armazenadas em um dessecador até o processo de extração. A extração foi feita de acordo com a metodologia direta desenvolvida por Kim, Choi e Verpoorte (2010) adaptada para este estudo. Transferiu-se 50 mg de folhas liofilizadas para um eppendorf de 2 mL e, em seguida adicionou-se 500 μ L de metanol – d4 e 500 μ L de tampão fosfato em água deuterada pH = 6.0 contendo 0.01% de sal de sódio do ácido trimetilsilil propiônico (TSP). A seguir, este material foi deixado em ultrassom por 20 minutos, sendo, a seguir, centrifugado por 15 minutos a 5000 rpm e o sobrenadante coletado para a análise de ressonância magnética nuclear (RMN). O TSP e os solventes deuterados utilizados foram da *CIL (Cambridge Isotope Laboratories)*.

4.5 Extração indireta dos metabólitos (Variedade SP791011)

A extração foi feita com aproximadamente 1g de folha de cana-de-açúcar da variedade SP791011 liofilizada e desengordurada pela adição de 30 mL de éter etílico, seguido de agitação por 15 minutos a temperatura ambiente e filtração sobre vácuo para remover a gordura. Ao material desengordurado foi adicionado 30 mL de uma mistura contendo 12 partes de clorofórmio P.A. (DINÂMICA), 5 partes de metanol P.A. (DINÂMICA) e 3 partes de água destilada. Esta mistura foi incubada sob ultrassom por 30 minutos e filtrada sob vácuo. Esta última extração foi repetida com mais 30 mL da mistura cloroformio:metanol:água, e o filtrado foi adicionado aos 30 mL do filtrado anterior. O filtrado resultante foi seco em um evaporador rotativo sob agitação e à pressão reduzida em banho de 40°C. Os extratos secos foram armazenados em dessecadores até o momento da análise por RMN. No momento da análise por RMN, 10mg de extrato seco foi dissolvido em 1mL de solução deuterada contendo 500 µL de metanol-d4 e 500 µL de tampão fosfato com o pH = 6 em água deuterada, contendo 0,01% de sal de sódio do ácido trimetilsilil propiônico (TSP). O TSP e os solventes deuterados utilizados foram da *CIL (Cambridge Isotope Laboratories)*.

4.6 Análises de RMN

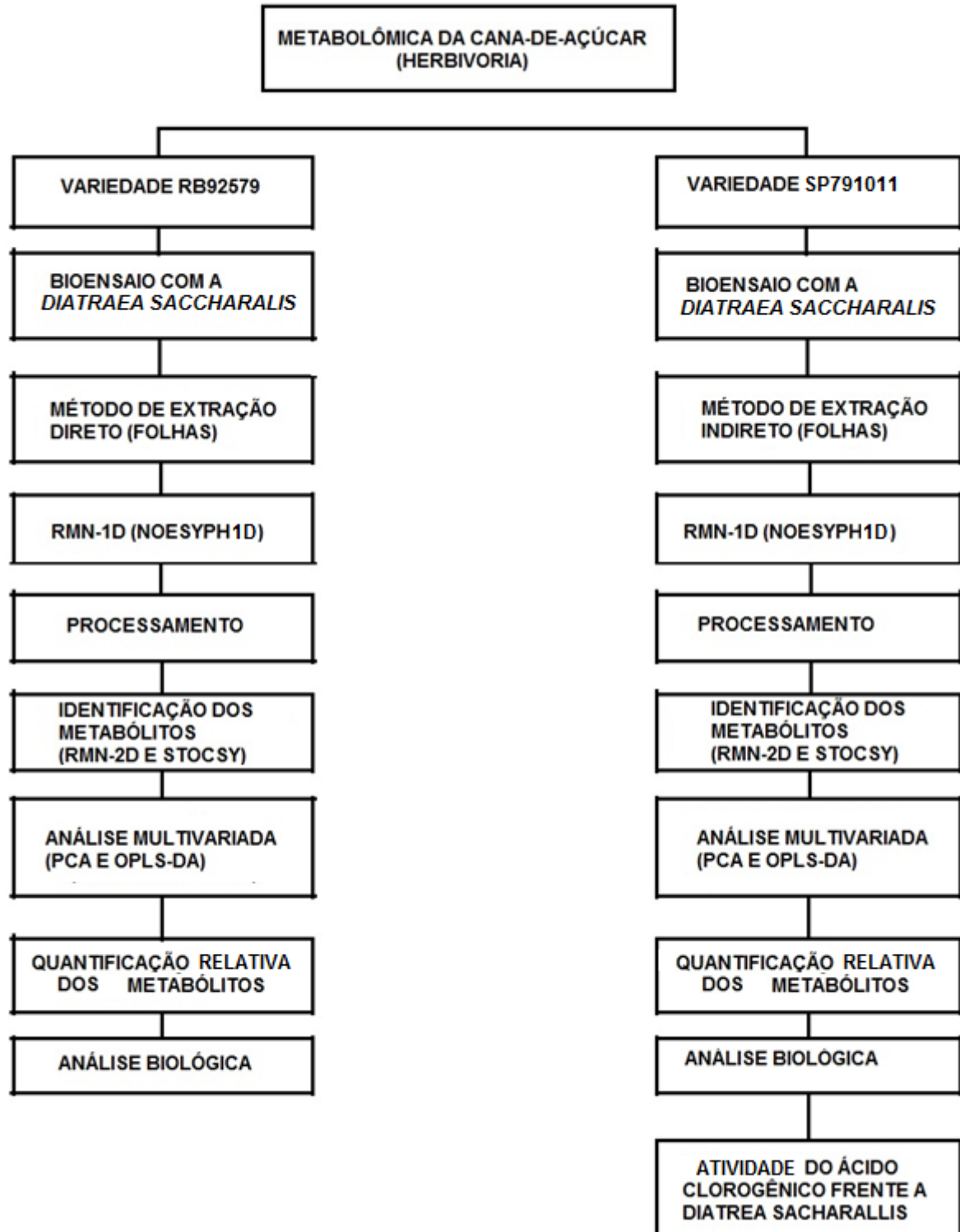
Os espectros de RMN foram analisados a 20 °C em espectrômetro Bruker AVANCE operando a 600 MHz na frequência do hidrogênio. O MeOD-d4 foi usado para o chaveamento do campo magnético ("lock"). As sequências de pulsos de pré-saturação NOESYGPPR, ZGPR e ZGCPPR foram usadas para otimização das análises metabolômica e cada espectro de RMN-¹H foi realizado com 64 pulsos (10 min e 26 s), o tempo de aquisição = 2,72 s, largura espectral = 16 ppm, tamanho do fid = 32K, largura de pulso (P1) de 30° (10,5 µs) e atraso de relaxamento (delay-d1) de 2 s. O experimento J-resolvido foi adquirido com 32 pulsos por 8192 x 128 pontos, largura espectral = 5.208 KHz e 60 Hz acoplamento spin-spin e atraso de relaxamento = 1,5 s. O experimento COSY ¹H-¹H foi realizado com 32 pulsos por 2048 x 512 pontos, largura espectral = 13 ppm em ambas as dimensões com o d1 = 1,5 s. O experimento TOCSY ¹H-¹H foi realizado com 32 pulsos por 2048 x 512 pontos, largura espectral = 13 ppm em ambas as dimensões com o d1 = 1,5 s e tempo de mistura (d8) = 500 ms. Os experimentos HMBC ¹H-¹³C e HSQC EDITADO ¹H-¹³C foram

realizados com 64 pulsos por 4,096 x 512 pontos, largura espectral = 5208 KHz para 22,149 KHz ^1H e do ^{13}C com $d_1 = 1,5$ s. Os espectros foram processados com o emprego do software TopSpin versão 2.1 (Bruker), com uma linha de alargamento (lb) = 0,3 Hz e correção da fase, correção da linha de base e calibração pelo padrão interno (TSP) com sinal em 0,0 ppm. A identificação dos metabólitos foi realizada com o auxílio do programa Chenomx, análise STOCSY (uso-se o programa MATLAB), Plant Metabolome Data Base (PMDB) e o Human Metabolome Data Base (HMDB).

4.7 Análise multivariada

Os espectros de RMN- ^1H otimizados foram reduzidos (δ 0,3-10,0 ppm) e divididos em regiões de largura (bucket = 0,0005 ppm), normalizados e alinhados através do programa MATLAB versão 2014a. As regiões de δ 4,7-5,0 ppm e δ 3,24-3,33 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, Umetrics, Umeå, Suécia) com escalonamento baseado no método de única variância (UV). Análise de variância (ANOVA) e o teste t pareado foram elaborados no programa excel e os boxplots foram realizados através do programa R - studio.

Figura 10: Fluxograma da metodologia geral do trabalho.



Fonte: Autor 2017.

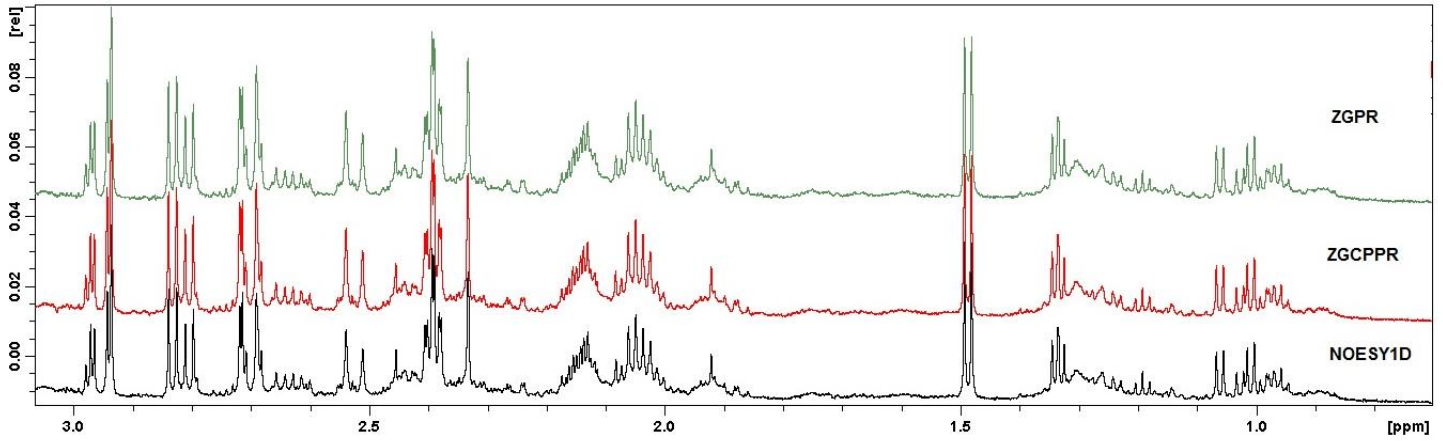
5. RESULTADOS

5.1 Sequências de pulsos de RMN para as análises das amostras de cana-de-açúcar

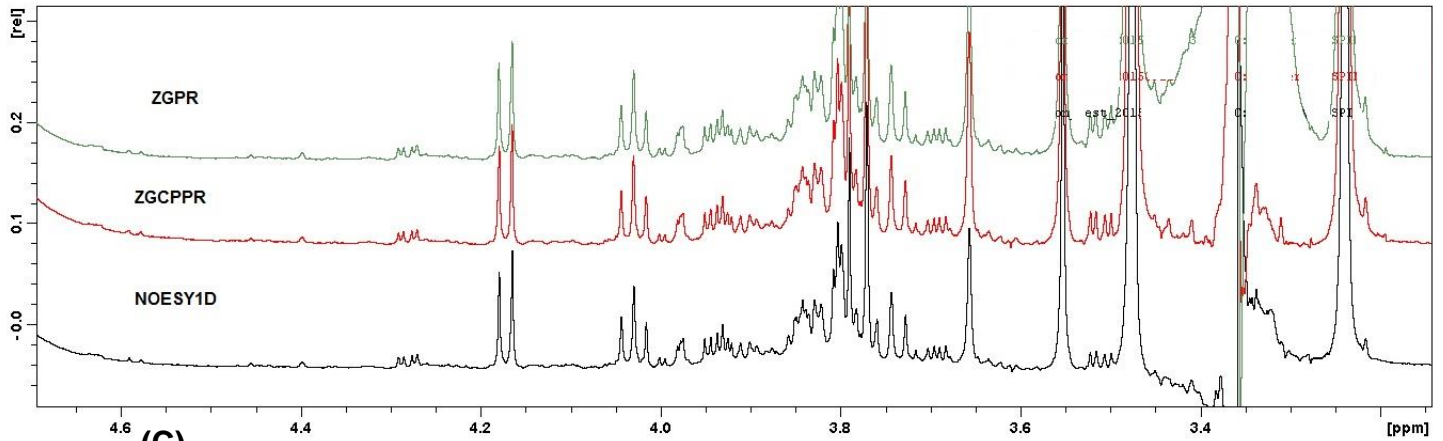
As metodologias aplicadas em metabolômica por RMN utilizam soluções cujos solventes podem ser parcialmente ou totalmente deuterados e que, dependendo do material estudado, deve-se usar técnicas com supressão de sinal onde, na maioria das vezes, suprime-se o sinal residual da água para aumentar a razão sinal/ruído referente aos sinais do analito. O experimento de pré-saturação é comumente aplicado em biofluidos como urina, por exemplo, porém, em plantas existem alguns trabalhos que geralmente emprega-se uma mistura de solventes contendo água, sendo necessário o uso deste tipo de técnica. Para as análises de RMN dos extratos das folhas de cana-de-açúcar decidiu-se fazer um estudo comparativo de sequências de pulsos para a supressão do sinal residual da água (H_2O) presente no solvente deuterado (D_2O). Foram obtidos espectros de RMN de uma amostra de extrato de folhas de cana-de-açúcar controle da variedade RB92579 utilizando as sequências de pulsos NOESYPR1D, ZGPR e ZGCPPR. Foram analisadas 3 regiões do espectro de 0.5 ppm a 3.0 ppm (Figura 11) região de aminoácidos e ácidos orgânicos; de 3.0 a 4.7 ppm região de açúcares; de 5.3 a 8.7 ppm região dos aromáticos. Conforme mostrado nas figuras 11 A, B e C não houveram diferenças nas intensidades e na resolução dos sinais dos espectros, portanto, decidiu-se realizar as análises utilizando a sequência de pulso NOESYPR1D.

Figura 11: Região de aminoácidos e ácidos orgânicos (A), açúcares (B) e aromáticos (C) na comparação entre as sequências de pulsos ZGPR, ZGCPPR e NOESY1DPR para supressão do sinal da água em uma amostra controle em tampão fosfato pH = 6 em D₂O/CD₃OD.

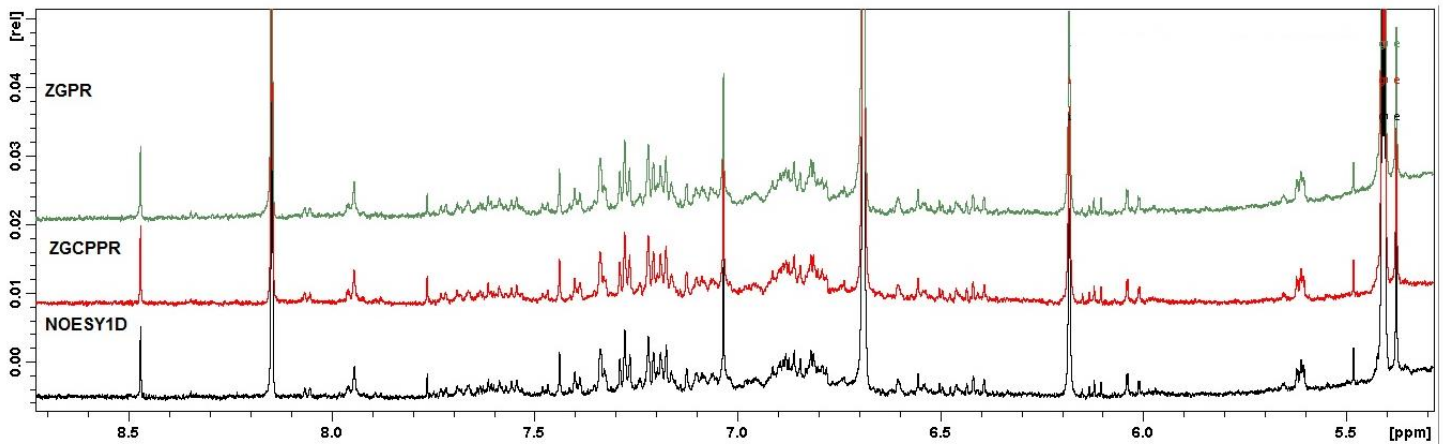
(A)



(B)



(C)



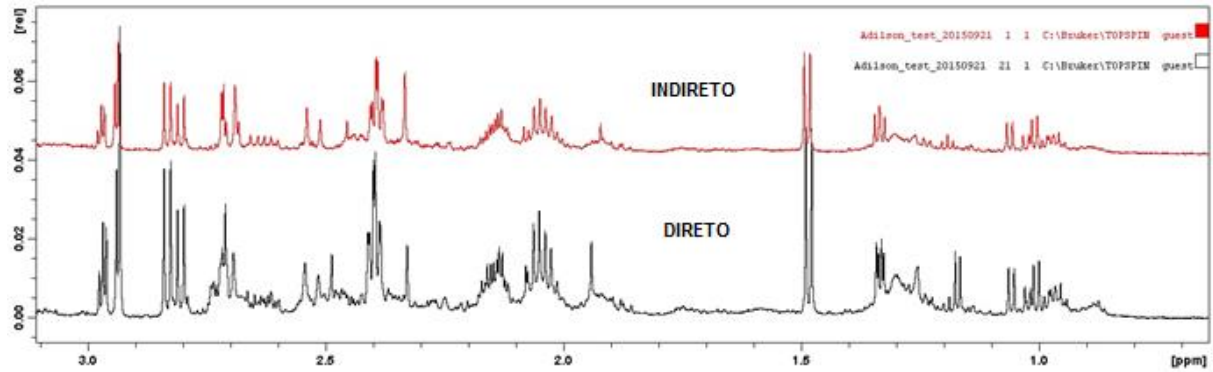
Fonte: Autor 2017.

5.2 Comparação entre as metodologias de extração direta e indireta

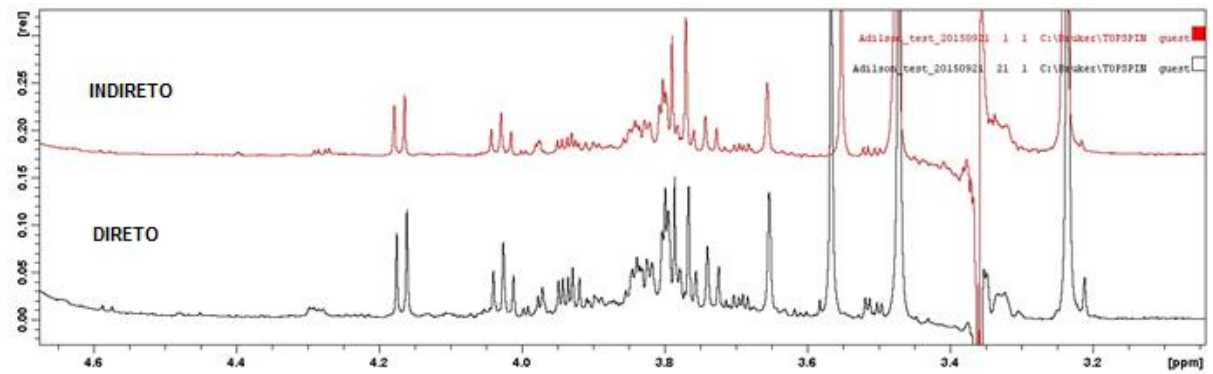
Várias metodologias de extração de metabólitos têm sido utilizadas para diferentes tipos de amostras de plantas para estudos de metabolômica. O método de extração indireta tem como finalidade o uso de solvente de alto grau analítico, que após o seu uso deve ser removido para obter o extrato seco e livre de contaminantes para posterior solubilização em solvente deuterado e análise por RMN. A principal desvantagem do método indireto é o tempo necessário para obter o extrato pronto para análise devido ao número de etapas, que ocasiona em um consumo maior de solventes e uma maior probabilidade de contaminação do extrato, a principal vantagem é obter uma amostra mais concentrada para a análise de RMN, o que pode ser muito útil uma vez que trata-se de uma mistura complexa na qual os metabólitos secundários (principal classe de metabólitos relacionados com o mecanismo de defesa das plantas) estão em baixa concentração em relação aos metabólitos primários. A metodologia de extração direta consiste no uso direto do solvente deuterado para a extração dos metabólitos e posterior análise por RMN, sendo vantajoso por ser simples e prático contendo menor número de etapas durante o processo. A desvantagem deste método é que algumas vezes não se obtém uma uniformidade do material a ser analisado. Neste trabalho foi desenvolvido um estudo preliminar para comparar as duas metodologias de extração dos metabólitos de folhas liofilizadas de cana-de-açúcar da variedade RB92579. As figuras 12 A, B e C mostram a comparação entre os espectros RMN-¹H obtidos nas mesmas condições de análise dos extratos obtidos das metodologias direta e indireta. Os espectros foram divididos nas três regiões (0,5 – 3,0 ppm; 3,0 – 5,0 ppm e 6,0 – 9,0 ppm) e percebe-se uma maior intensidade dos sinais do espectro referente a metodologia direta (cor preta). Não foram observadas diferenças em relação à resolução dos sinais dos metabólitos, concluindo-se que o uso de ambas as metodologias pode ser aplicada para o estudo sobre metabolômica da cana-de-açúcar. A metodologia direta aplicada neste estudo foi adaptada do trabalho desenvolvido por Kim, Choi e Verpoorte (2010), sendo esta metodologia mais adequada para extração de metabólitos de moderada e alta polaridade.

Figura 12: Região de aminoácidos e ácidos orgânicos (A), açúcares (B) e aromáticos (C) na comparação entre os espectros de RMN-¹H entre as metodologias de extração direta e indireta dos metabólitos da cana-de-açúcar em uma amostra controle em tampão fosfato pH = 6 em D₂O/CD₃OD (1:1).

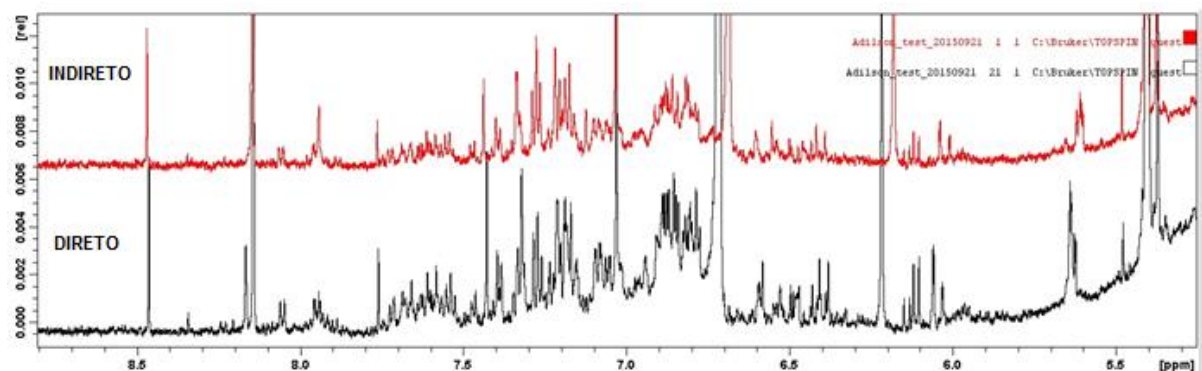
(A)



(B)



(C)

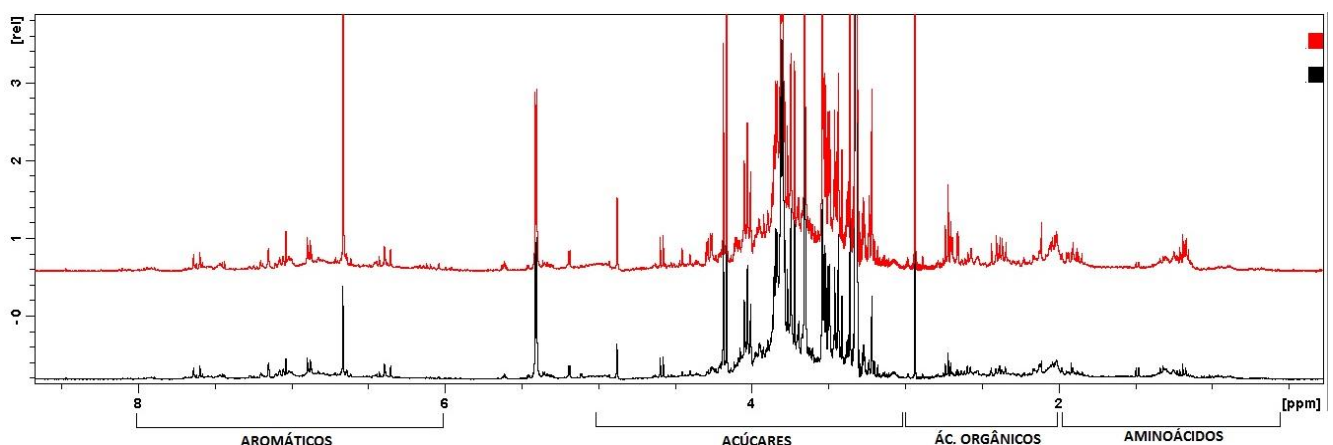


Fonte: Autor 2017.

5.3 Perfil metabólico da cana-de-açúcar

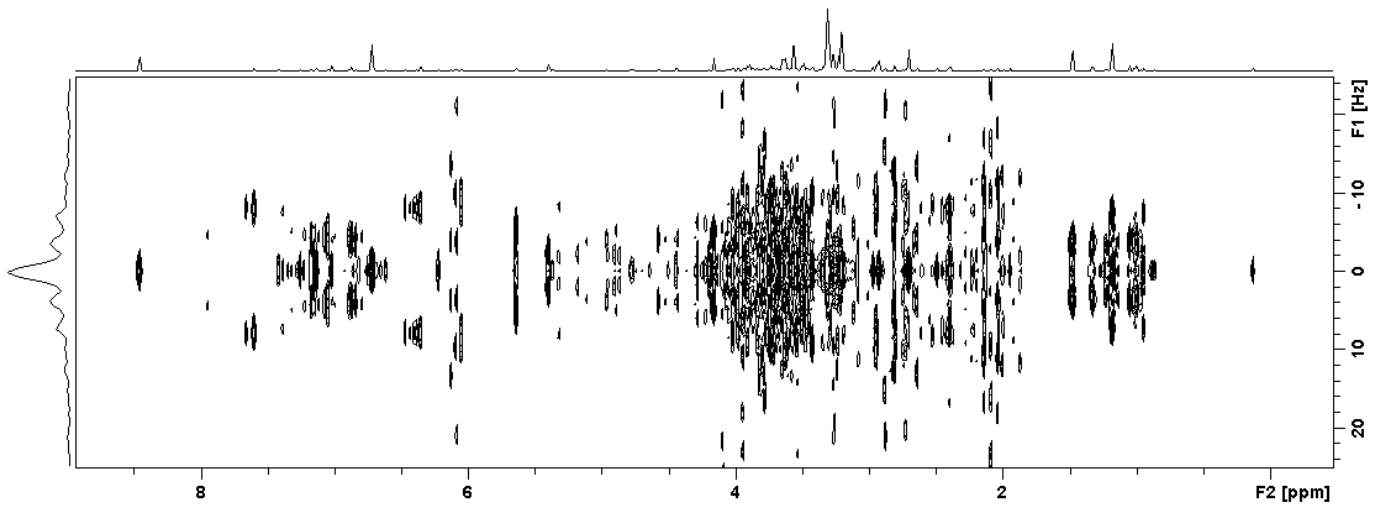
O espectro de RMN-¹H de extrato de plantas geralmente é dividido em 4 regiões características de deslocamentos químicos: aminoácidos (0.5 – 2 ppm), ácidos orgânicos (2 – 3 ppm), açúcares (3 – 5 ppm) e compostos aromáticos (6 – 8 ppm). A figura 13 mostra a comparação entre os espectros de RMN-¹H de planta controle (vermelho) e de plantas sob herbivoria (preto). A análise desses espectros 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. Para a identificação dos metabólitos discriminantes entre as plantas controles e as plantas herbivoria das duas variedades de cana-de-açúcar estudadas, foram executadas análises de dados de ressonância magnética nuclear em duas dimensões (RMN-2D, figuras 14, 15, 16 e 17). A figura 18 apresenta um espectro de HSQC- EDITADO ¹H-¹³C mostrando os sinais correspondentes aos hidrogênios ligados diretamente a átomos de carbono. Este experimento destaca-se pelo fato dos sinais metilênicos estarem com fase contrária (sinais de cor verde), em relação aos demais sinais, assemelhando-se ao experimento DEPT135 facilitando assim a identificação dos metabólitos.

Figura 13: Comparação dos espectros de RMN-¹H de extrato de folhas de cana-de-açúcar variedade SP791011 controle (preto) e herbivoria (vermelho) com as regiões características de algumas classes de metabólitos.



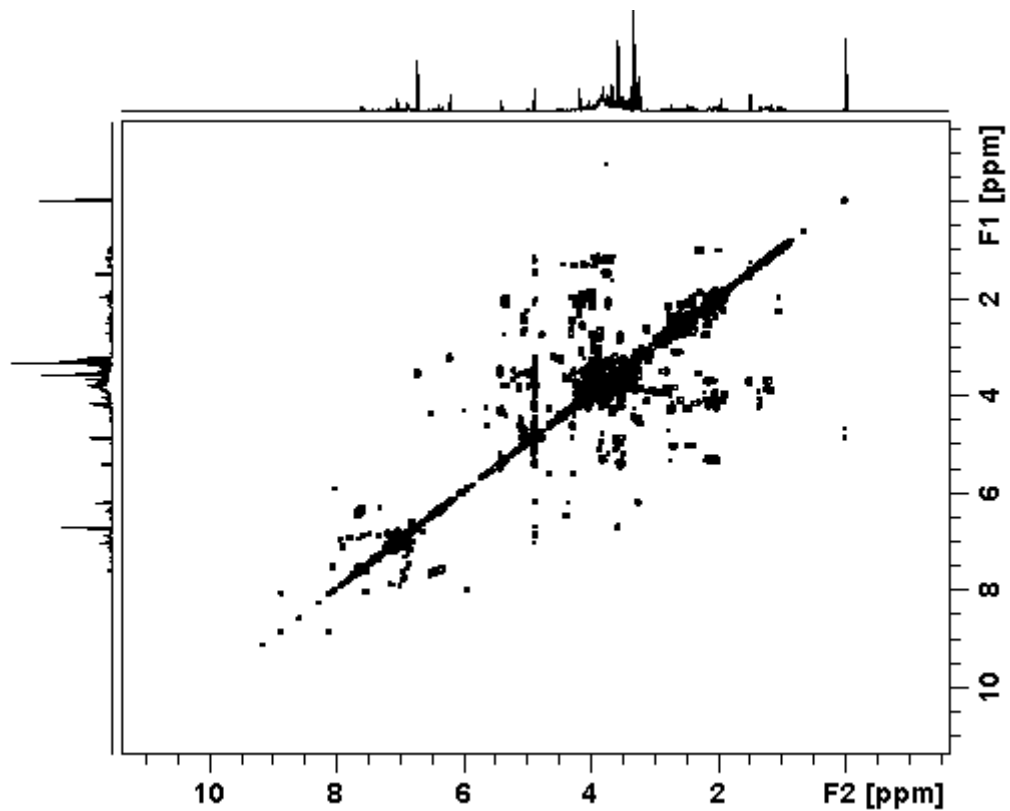
Fonte: Autor 2017.

Figura 14: Espectro J-resolvido da amostra controle da cana-de-açúcar variedade SP791011.



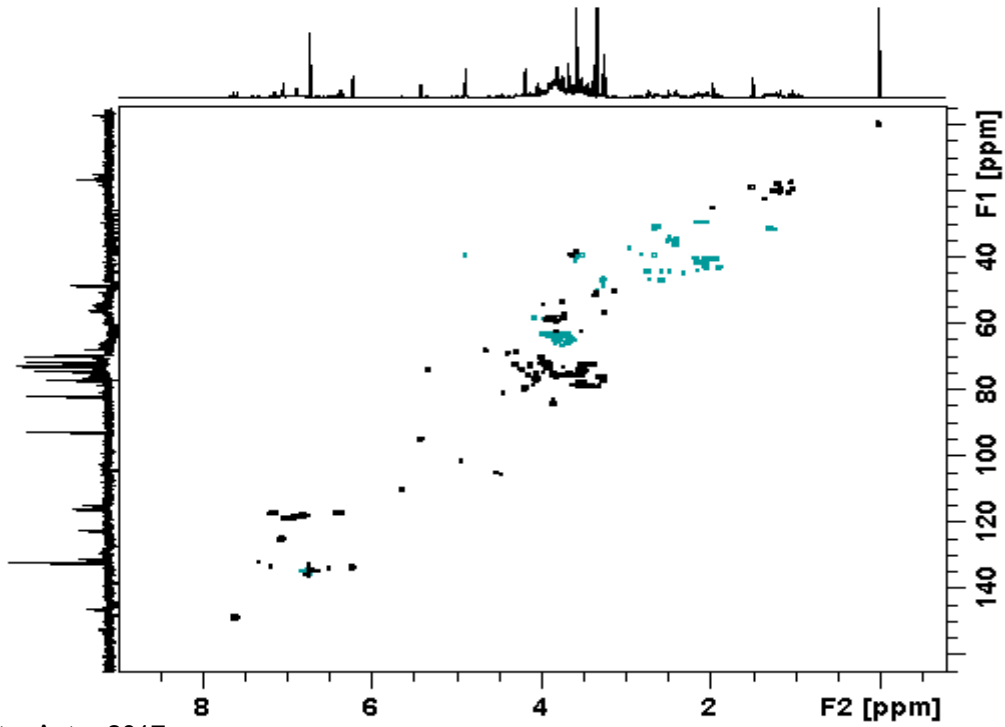
Fonte: Autor 2017.

Figura 15: Espectro COSY da amostra controle da cana-de-açúcar da variedade SP791011 obtido pelo método de extração indireto.



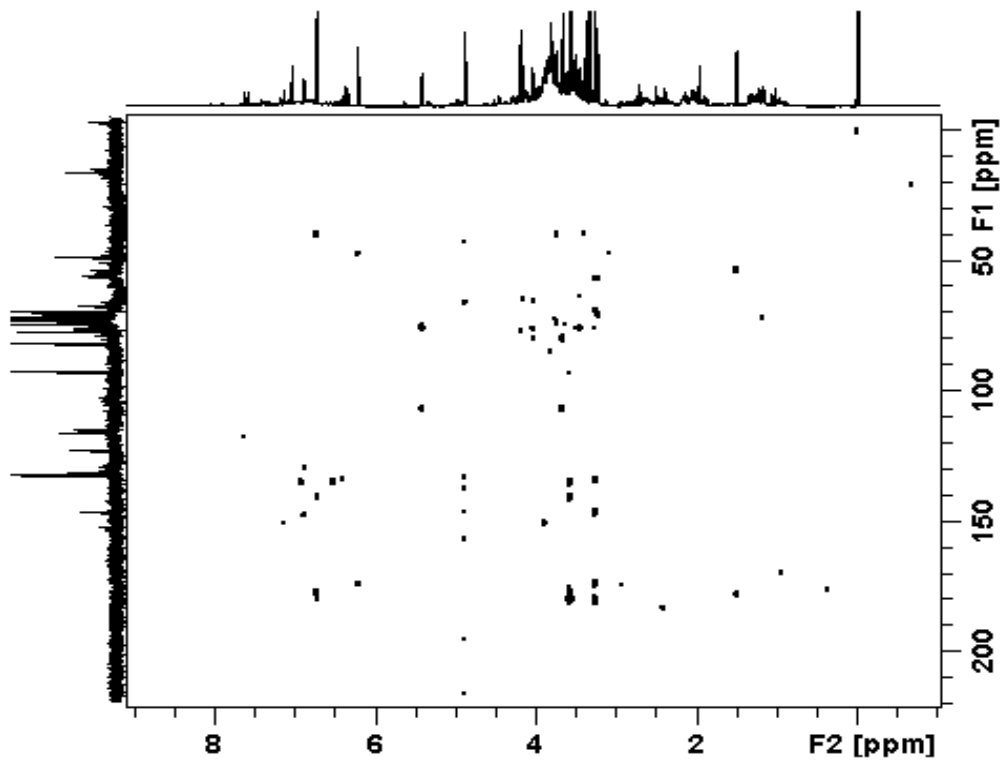
Fonte: Autor 2017.

Figura 16: Espectro HSQC-EDITADO da amostra controle da cana-de-açúcar variedade SP791011 obtido pelo método de extração indireto.



Fonte: Autor 2017.

Figura 17: Espectro HMBC da amostra controle da cana-de-açúcar variedade SP791011 obtido pelo método de extração indireto.

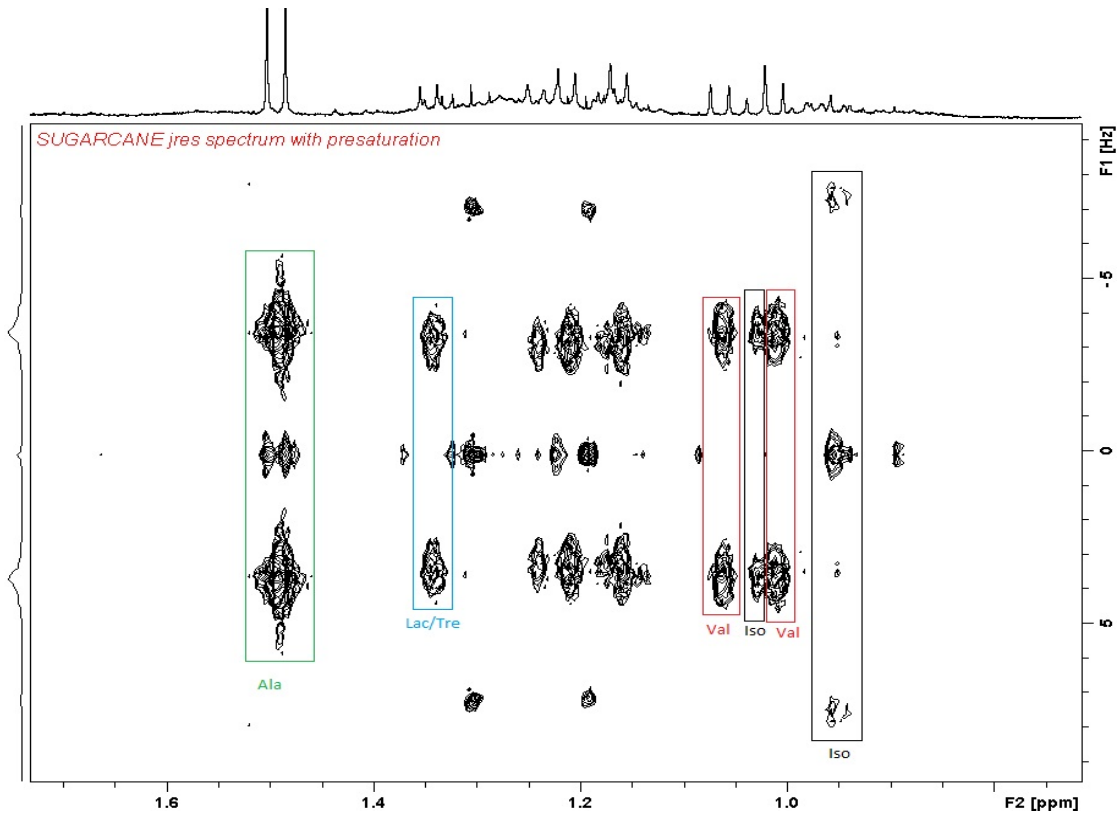


Fonte: Autor 2017.

5.4 Identificação dos metabólitos nas folhas da cana-de-açúcar das variedades SP791011 e RB92579

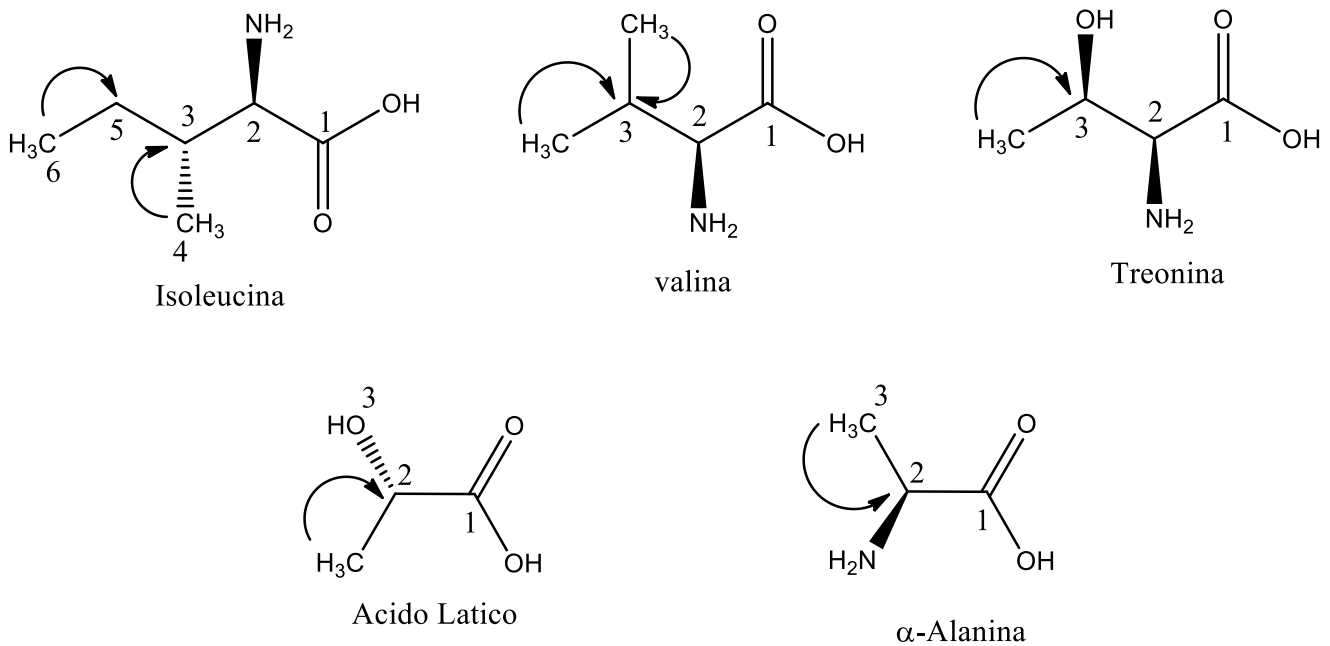
A análise dos dados de RMN foi efetuada com base na inspeção direta dos espectros comparando-se com dados da literatura (HMDB, 2016). Como apresentado na figura 18, na região dos aminoácidos foram observados um tripleto ($J = 7,4$ Hz) em 0,96 ppm e um duplete ($J = 7,34$ Hz) em 1,03 ppm correspondentes aos grupos metilas da isoleucina; dois dupletos em 1,01 ppm ($J = 7$ Hz) e 1,06 ppm ($J = 7$ Hz) referentes aos grupos metilas da valina; dois dupletos sobrepostos em 1,34 ppm ($J = 7$ Hz) sugere as presenças das metilas do ácido láctico e treonina; outro duplete ($J = 7,4$ Hz) em 1,49 ppm refere-se a α -alanina. A confirmação destes metabólitos foi feita por meio dos espectros de COSY ^1H - ^1H (Figura 20) que apresentou o acoplamento da metila em 0,96 ppm com o grupo metínico em 1,03 ppm identificado como pertencente da isoleucina (Iso) (Figura 19). A valina (Val) (Figura 19) foi confirmada através dos acoplamentos das metilas em 1,01 ppm e 1,06 ppm com o hidrogênio metínico do C-3 (Figura 19). O acoplamento entre a metila em 1,32 ppm e o hidrogênio metínico em 4,07 ppm confirma o composto ácido láctico (Lac). O outro duplete em 1,32 ppm refere-se ao grupo metila da treonina (Tre) que está acoplado com o hidrogênio metínico do C-3 em 4,24 ppm. A α -alanina foi identificada através da interação do grupo metila em 1,49 ppm com o hidrogênio do grupo metínico C-2 em 3,72 ppm. Esses metabólitos são comuns em plantas e Lira (2010) os identificou em extratos de folha de cana-de-açúcar em um estudo envolvendo variedades transgênicas.

Figura 18: Espectro J-resolvido ^1H - ^1H expandido na região de 0.5 a 1.8 ppm obtido pelo método de extração direto (variedade RB92579).



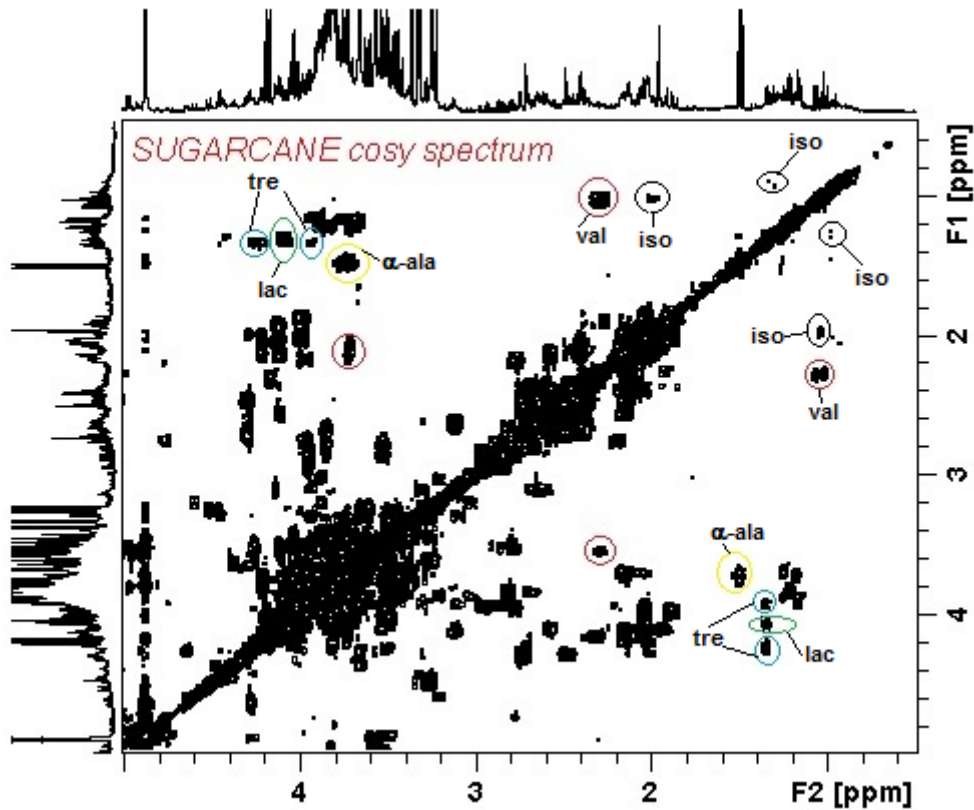
Fonte: Autor 2017.

Figura 19: Estruturas de metabólitos primários destacando-se os principais acoplamentos observados no espectro J-resolvido ^1H - ^1H .



Fonte: Autor 2017.

Figura 20: Espectro COSY ^1H - ^1H obtido pelo método de extração direto (variedade RB92579). Iso: Isoleucina; Val: Valina; α -ala: Alanina; Tre: Treonina e Lac: Lactato.

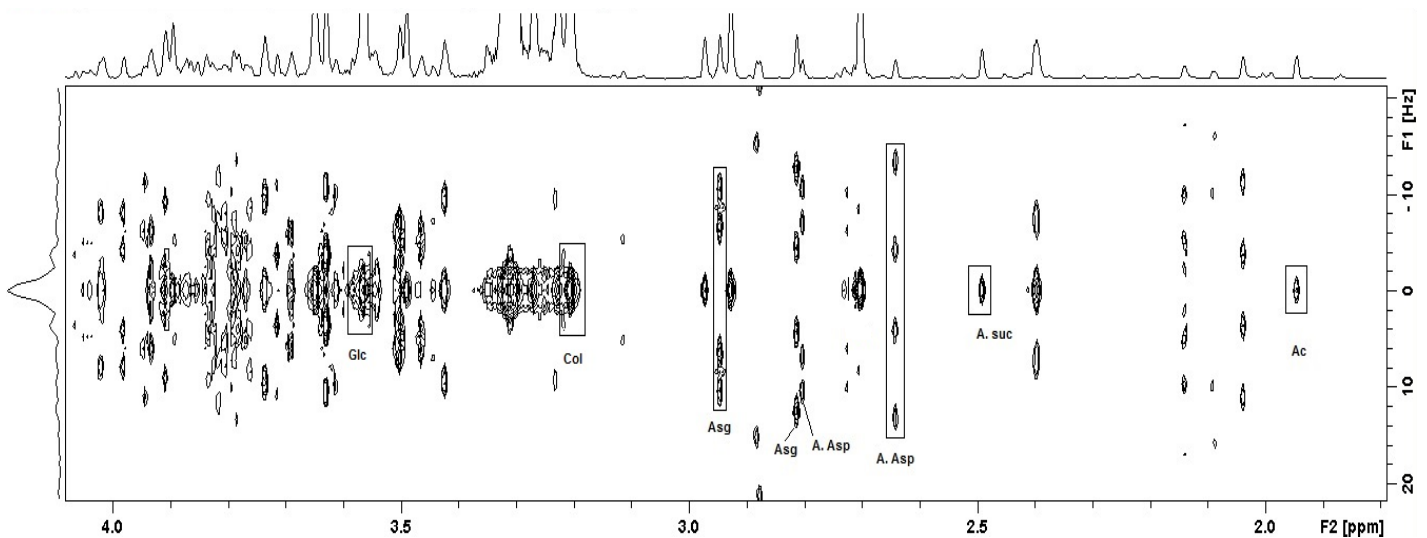


Fonte: Autor 2017.

O sinal do ácido acético (Ac) foi identificado no espectro J-resolvido ^1H - ^1H com um simpleto em 1,96 ppm (Figura 21) e depois foi confirmado com a análise do espectro HSQC EDITADO ^1H - ^{13}C (Figura 22) no qual se observou a correlação direta entre os hidrogênios metílicos δ 1.96 ppm e o carbono (C-2) δ 25,5 ppm (Figura 23). Um simpleto em 2,41 ppm característico dos hidrogênios metilênicos equivalentes do ácido succínico (Figura 21) foi mostrado no J-resolvido ^1H - ^1H e também confirmado no espectro HSQC EDITADO ^1H - ^{13}C (Figura 23) que apresentou o sinal dos carbonos metilênicos (C-2) em 36,5 ppm. O ácido aspártico e asparagina foram detectados no extrato da folha da cana-de-açúcar através do espectro J-resolvido ^1H - ^1H que apresentou dois duplos dubletos δ 2,64 ppm ($J=17,5$ Hz e 8,8 Hz) e δ 2,82 ppm ($J=17,1$ Hz e 3,5 Hz) pertencentes a o ácido aspártico e mais dois duplos dubletos δ 2,84 ppm ($J=17,2$ Hz e 8 Hz) e δ 2,94 ppm ($J=17,1$ Hz e 4 Hz) referentes a asparagina. O ácido aspártico foi confirmado pelo espectro TOCSY ^1H - ^1H (Figura 24A) que apresentou o acoplamento escalar entre os hidrogênios metilênicos H_a

δ 2,64 ppm, H_b 2,82 ppm e o hidrogênio metínico em 3,86 ppm. A correlação dos hidrogênios H_a δ 2,64 ppm e H_b 2,82 ppm com o C-3 em 39,37 ppm, e a correlação do hidrogênio metínico δ 3,86 ppm no C-2 em 55,25 ppm foram observadas no espectro HSQC EDITADO ¹H-¹³C (Figura 24B). O mesmo raciocínio foi usado para confirmar a asparagina que no espectro TOSCY ¹H-¹H (Figura 24A) apresentou o acoplamento escalar entre os hidrogênios metilênicos H_a δ 2,84 ppm, H_b 2,94 ppm e o hidrogênio metínico em 3,93 ppm. No espectro HSQC EDITADO ¹H-¹³C (Figura 24B) observou-se a correlação dos hidrogênios H_a δ 2,84 ppm e H_b 2,94 ppm com o C-3 em 37,46 ppm, e a correlação do hidrogênio metínico em δ 3.86 ppm com o C-2 em 54,34 ppm (HMDB, 2016 e Lira, 2010).

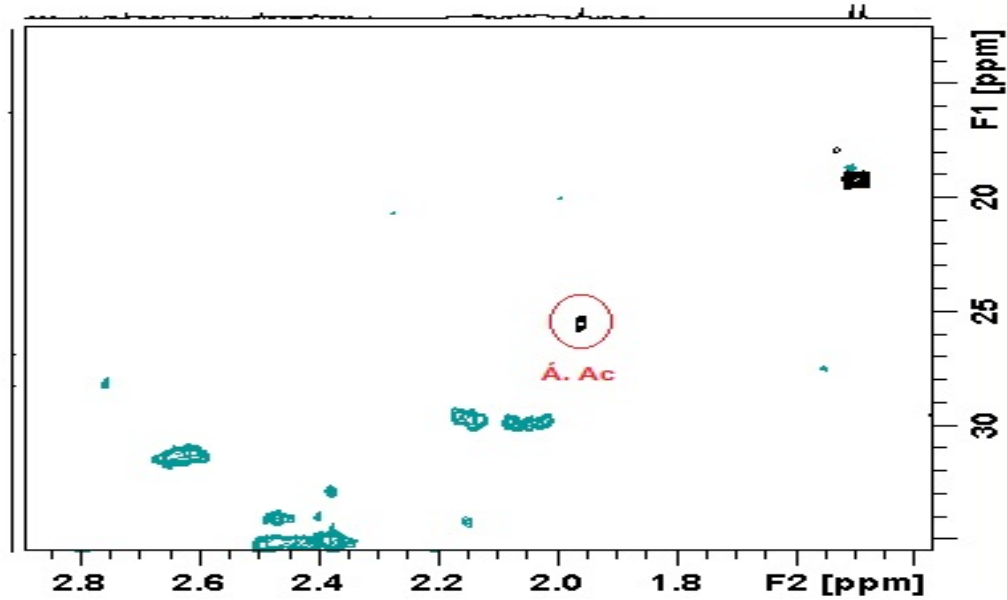
Figura 21: Espectro J-resolvido ¹H-¹H expandido na região de 1.8 ppm a 4.10 ppm obtido pelo método de extração indireto (variedade SP791011). Ac: Ácido Acético, A. Suc: Ácido Succínico, A. Asp: Ácido Aspártico, Asg: Asparagina e Col: Colina.



Fonte: Autor 2017.

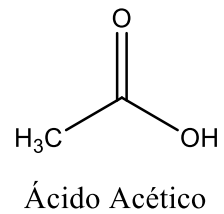
Figura 22: (A) Região do espectro HSQC EDITADO ^1H - ^{13}C na confirmação do Ácido Acético. (B) Estrutura do ácido acético.

(A)



Fonte: Autor 2017.

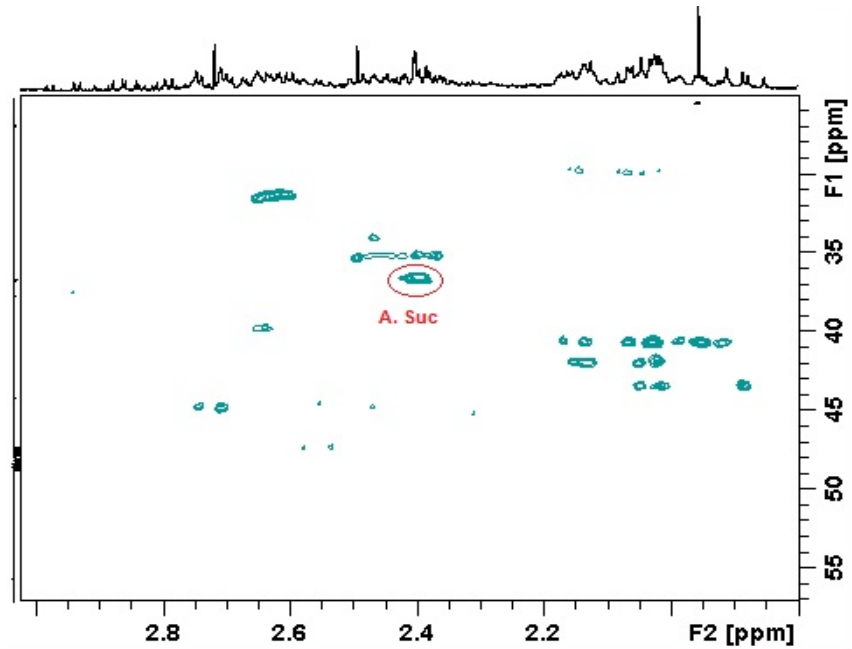
(B)



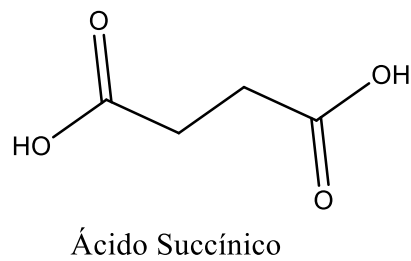
Fonte: Autor 2017.

Figura 23: (A) Região do espectro HSQC EDITADO ^1H - ^{13}C obtido pelo método de extração indireto (variedade SP791011) confirmando o ácido succínico. (B) Estrutura do ácido succínico.

(A)



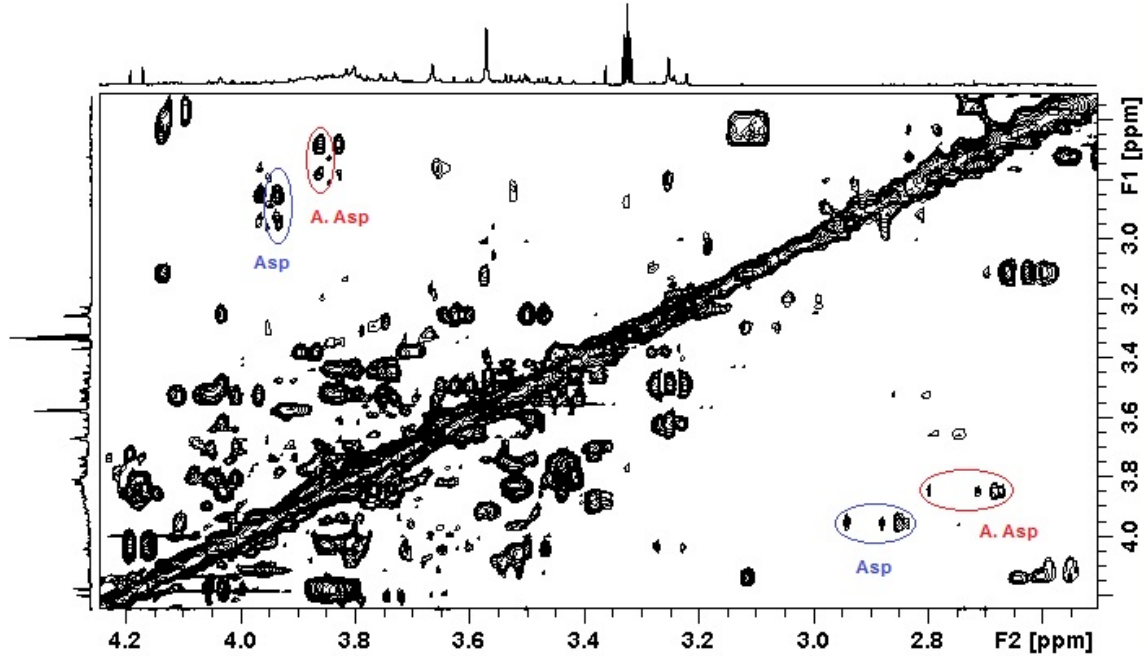
(B)



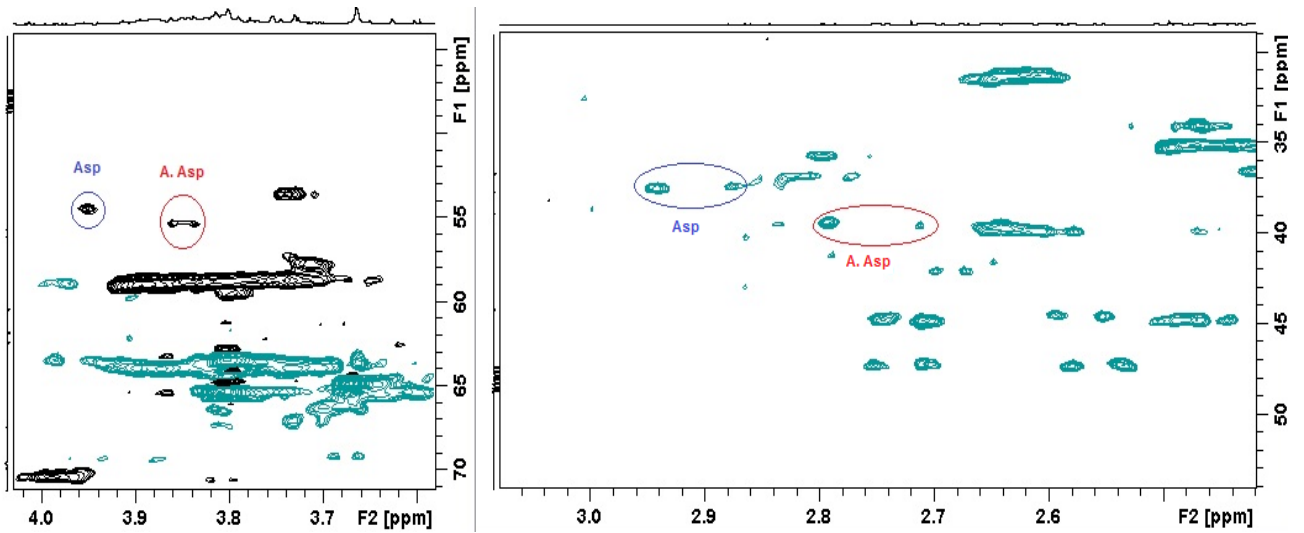
Fonte: Autor 2017.

Figura 24: (A) Região do espectro TOCSY ^1H - ^1H e (B) região do espectro HSQC EDITADO ^1H - ^{13}C mostrando os acoplamentos entre os hidrogênios referentes aos metabólitos asparagina (Asp) e ácido aspártico (A. Asp) obtido pelo método de extração indireto (SP791011). (C) Estruturas da asparagina e do ácido aspártico.

(A)



(B)



(C)

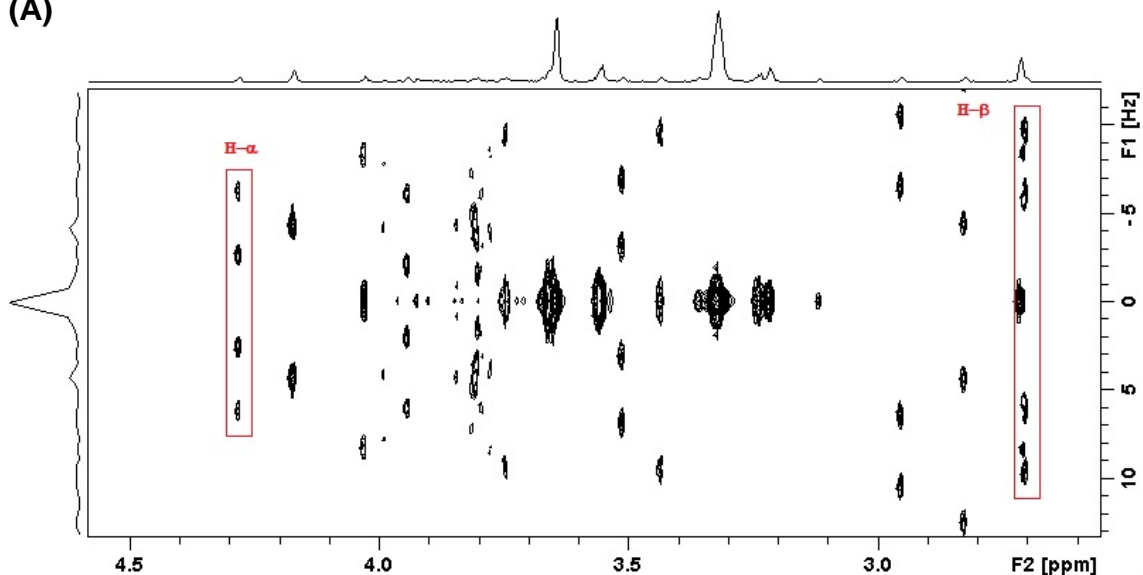


Fonte: Autor 2017.

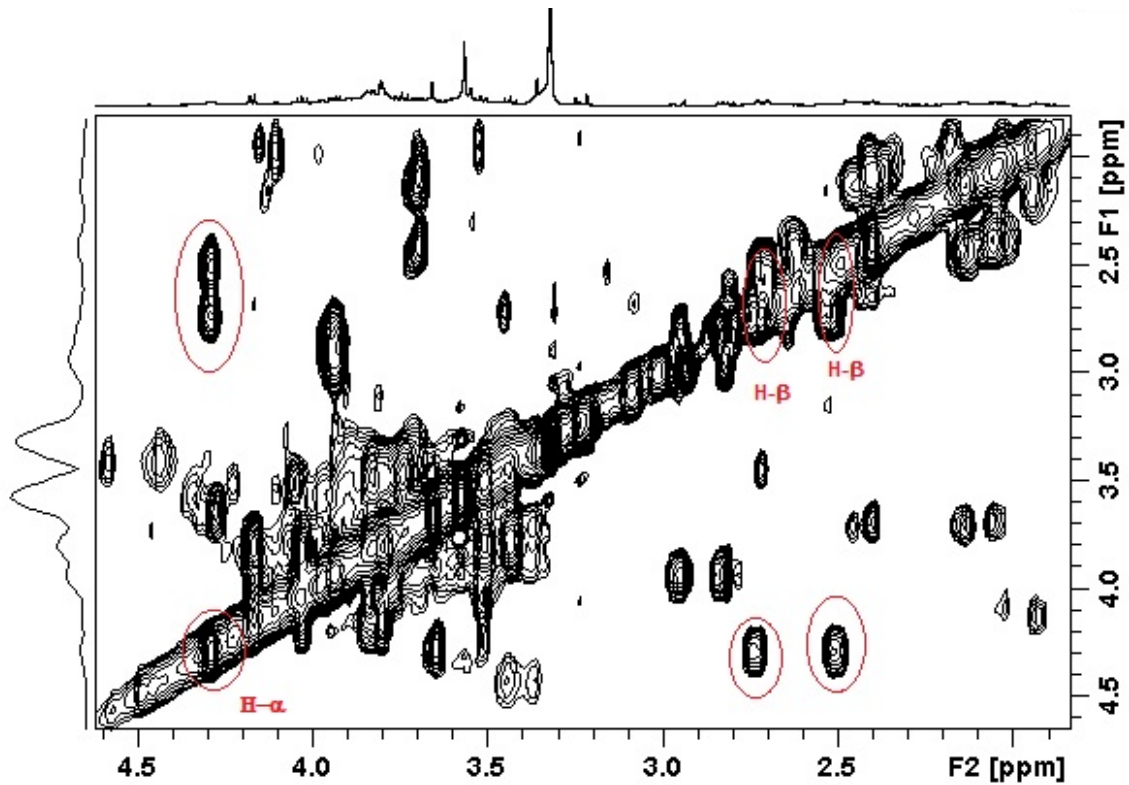
Prótons característicos do ácido málico (Figura 25C) foram identificados no espectro J-resolvido ^1H - ^1H (Figura 25A) que apresentou um duplo dubleto em δ 2,71 ppm (H- β , $J = 3,0$ Hz e 15,5 Hz) e outro duplo dubleto em δ 4,28 ppm (H- α , $J = 3,0$ Hz e 15,5 Hz). O mesmo foi confirmado pelo espectro TOCSY ^1H - ^1H (Figura 25B) que mostrou as correlações entre os prótons δ 4,28 ppm (H- α) com os prótons em δ 2,71 ppm (H- β) e δ 2,46 ppm (H- β).

Figura 25: (A) Região do espectro J-resolvido ^1H - ^1H ampliada de 2,5 ppm a 4,5 ppm obtido pelo método de extração indireto (SP791011). (B) região do espectro TOCSY ^1H - ^1H ampliada de 2,0 ppm a 4,5 ppm mostrando os acoplamentos entre os hidrogênios referentes ao ácido málico. (C) Estrutura do ácido málico.

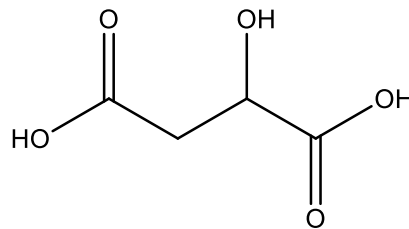
(A)



(B)



(C)



Ácido Málico

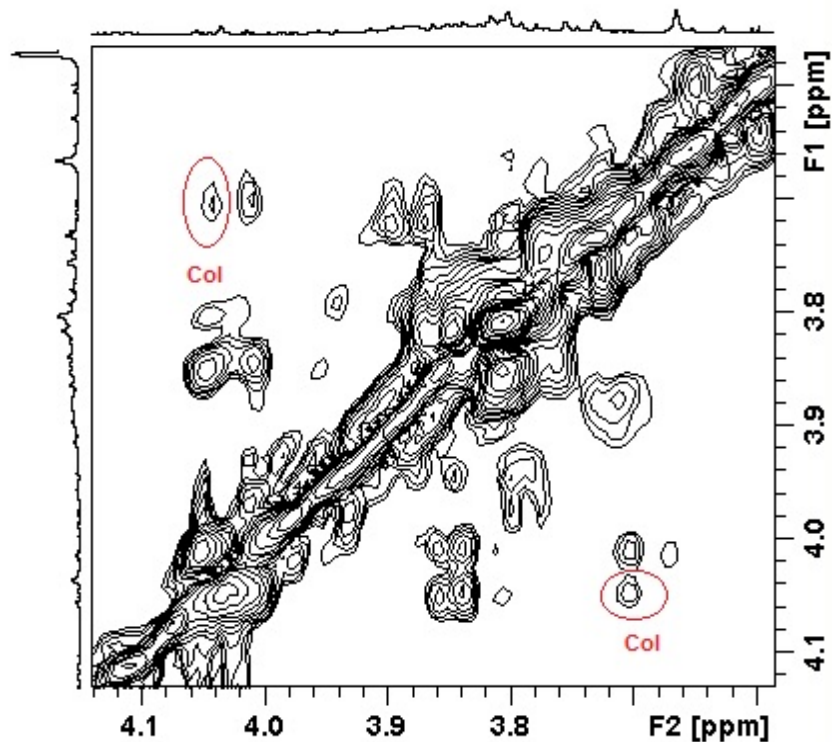
Fonte: Autor 2017.

Na região dos açúcares no espectro J-resolvido $^1\text{H}-^1\text{H}$ (Figura 26 A) foi possível identificar sinais característicos da colina, que apresentou um simpleto em δ 3,21 ppm, referente as 3 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). Entretanto, foi possível identificar as correlações entre o hidrogênio metilênico em 3,73 ppm com o outro hidrogênio metilênico em 4,06 ppm no espectro TOCSY $^1\text{H}-^1\text{H}$ (Figura 26A). Também foi possível observar os acoplamentos dos mesmos grupos metilênicos no

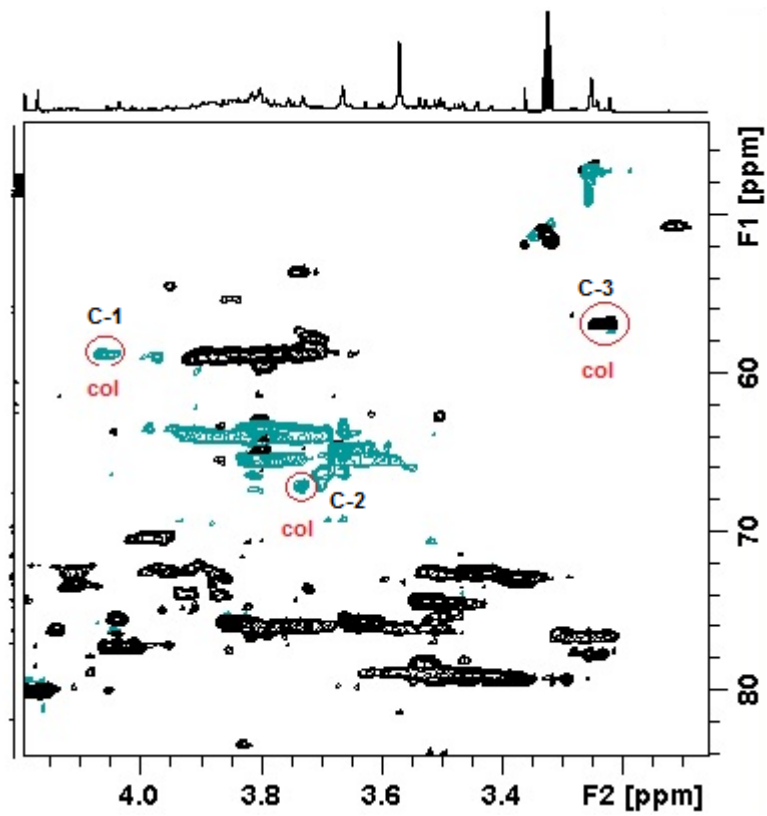
espectro HSQC EDITADO ^1H - ^{13}C (Figura 26B), que apresentou as correlações do carbono 2 em 67,0 ppm com o hidrogênio em 3,73 ppm, do carbono 1 em 58,7 ppm com o hidrogênio em 4,06 ppm e das metilas em 57,0 ppm com o hidrogênio em 3,21 ppm confirmando a presença do metabólito (HMDB, 2016). A glicina foi identificada com um singlete em δ 3,56 ppm no espectro J-resolvido, referente ao grupo metileno, que foi confirmada pelo experimento HSQC EDITADO ^1H - ^{13}C , o qual registrou a correlação entre os hidrogênios metilênicos em 3,56 ppm com o carbono na posição 2 em 39,2 ppm (Figura 27A).

Figura 26: (A) Região do espectro TOCSY ^1H - ^1H obtido pelo método de extração direto (RB92579) mostrando o acoplamento entre os hidrogênios metilênicos da colina (Col). (B) Região do espectro HSQC EDITADO ^1H - ^{13}C confirmando a colina. (C) Estrutura da colina.

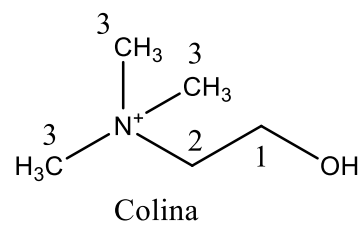
(A)



(B)

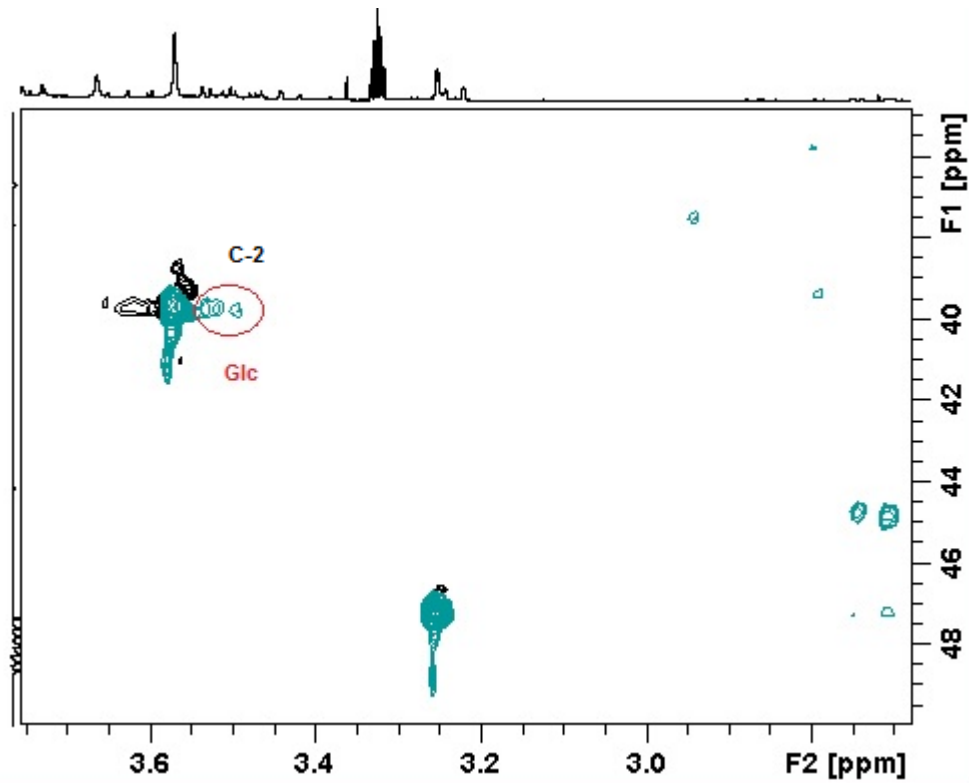


(C)

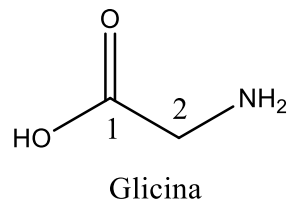


Fonte: Autor 2017.

Figura 27: (A) Região do espectro HSQC EDITADO ^1H - ^{13}C mostrando o acoplamento do carbono 2 da (B) glicina (Glc).



(B)

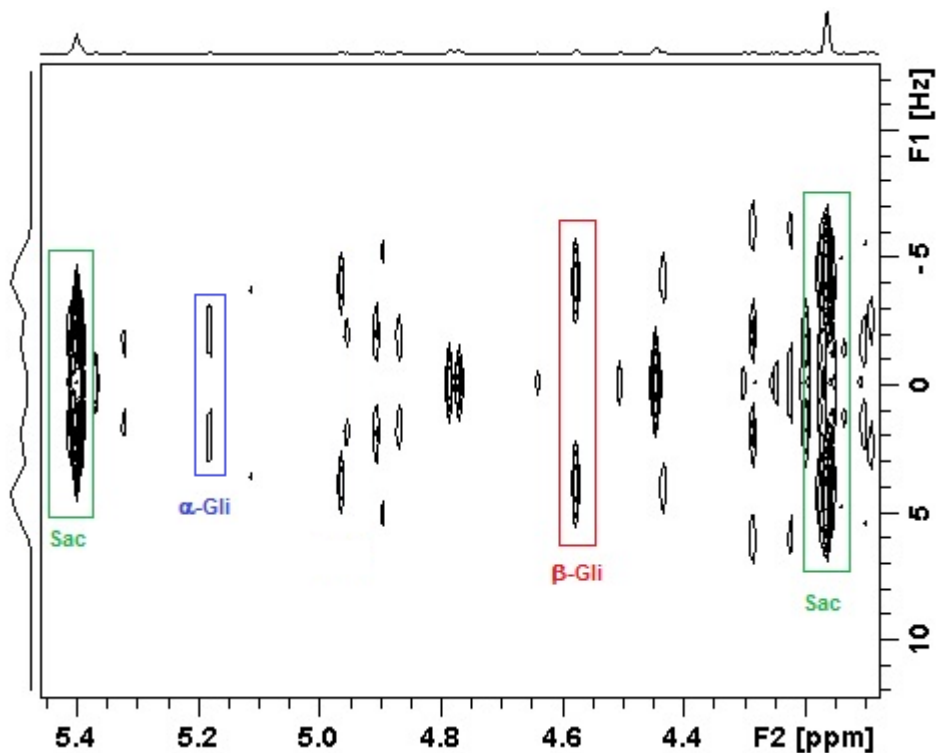


Fonte: Autor 2017.

Os sinais característicos dos açúcares sacarose, α -glicose e β -glicose foram observados entre 3,0 e 5,5 ppm. A análise do espectro J-resolvido ^1H - ^1H (Figura 28) na região de 4,4 a 5,5 ppm permitiu a observação de sinais correspondentes aos hidrogênios da α -glicose, um duplete em δ 5,18 ppm ($J = 4,0$ Hz), da β -glicose, um duplete em δ 4,58 ppm ($J = 7,7$ Hz), e da sacarose, um duplete em δ 5,40 ppm ($J = 4,0$ Hz). Esses carboidratos foram confirmados através da inspeção do espectro HSQC EDITADO ^1H - ^{13}C (Figura 29), que mostrou as correlações entre os hidrogênios anoméricos e seus carbonos, no entanto, devido à alta concentração de sacarose na

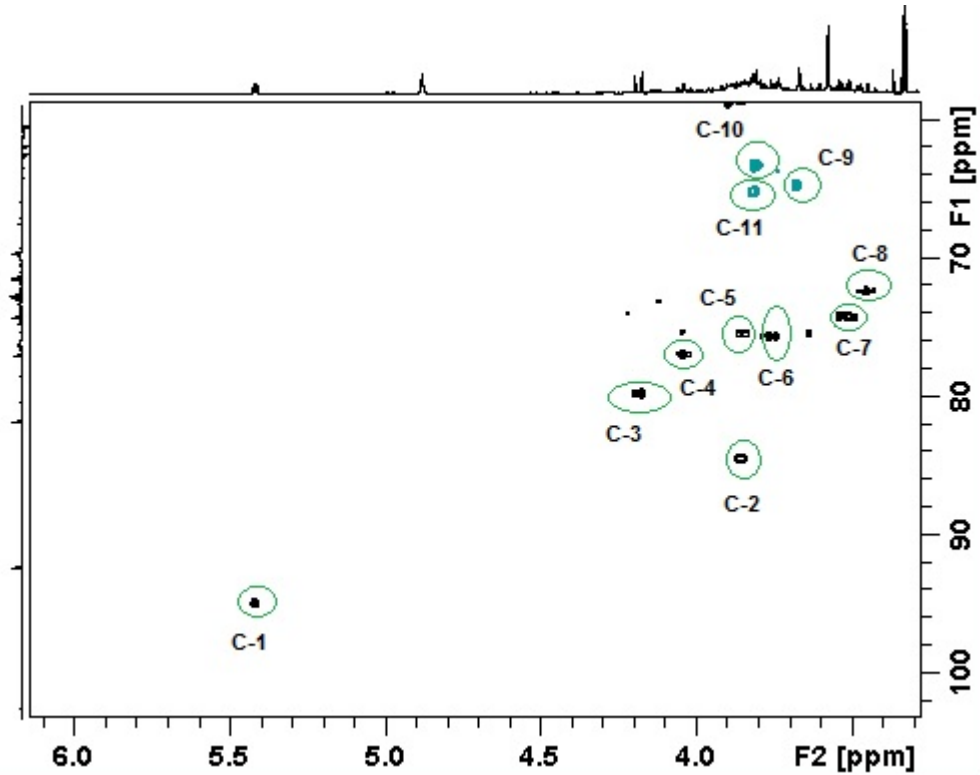
amostra foi possível identificar todas as correlações hidrogênio-carbono apenas para este metabólito, não sendo possível, no entanto, se observa o mesmo resultado para a α -glicose e para a β -glicose, que também foram confirmados pelo espectro HSQC EDITADO ^1H - ^{13}C , que apresentou as correlações dos hidrogênios anoméricos e seus carbonos adjacentes em δ 5,18 ppm e 93,7 ppm para a α -glicose; e δ 4,58 ppm e 97,3 ppm para a β -glicose. Foram observadas correlações entre os sinais de carbonos metilênicos, em δ 63,9 ppm, com seus respectivos hidrogênios em δ 3,90 ppm e δ 3,95 ppm (Figura 30). A espectroscopia de correlação estatística total (STOCSY) foi aplicada em 4,58 ppm e resultou na alta correlação entre os sinais da α -Gli e β -Gli, destacados em vermelho na figura 31, confirmando a presença dos metabólitos.

Figura 28: Espectro J-resolvido ^1H - ^1H adquirido pelo método de extração indireto referente aos hidrogênios anoméricos em carboidratos comuns da cana-de-açúcar.

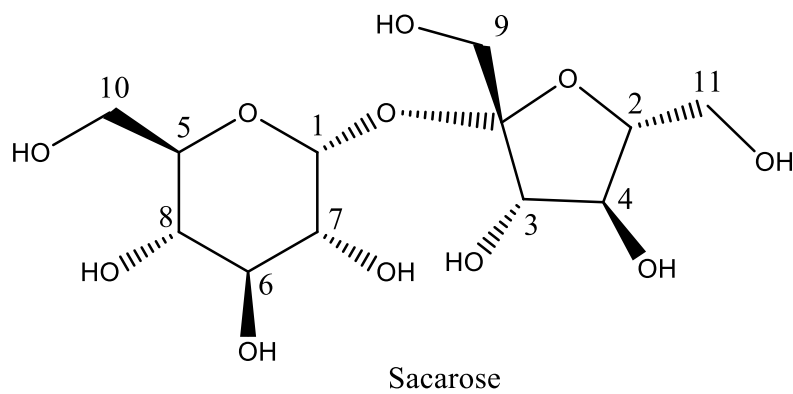


Fonte: Autor 2017.

Figura 29: (A) Espectro HSQC EDITADO ^1H - ^{13}C adquirido pelo método de extração direto destacando os sinais da sacarose. (B) Estrutura da sacarose.

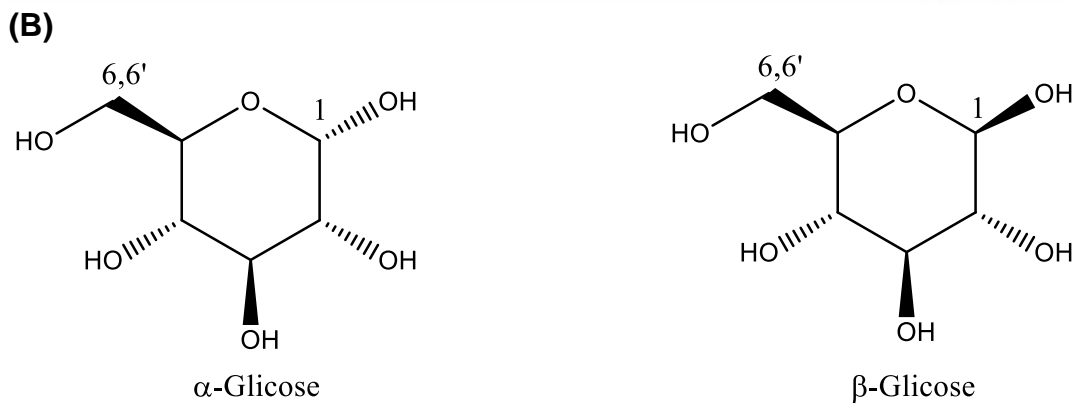
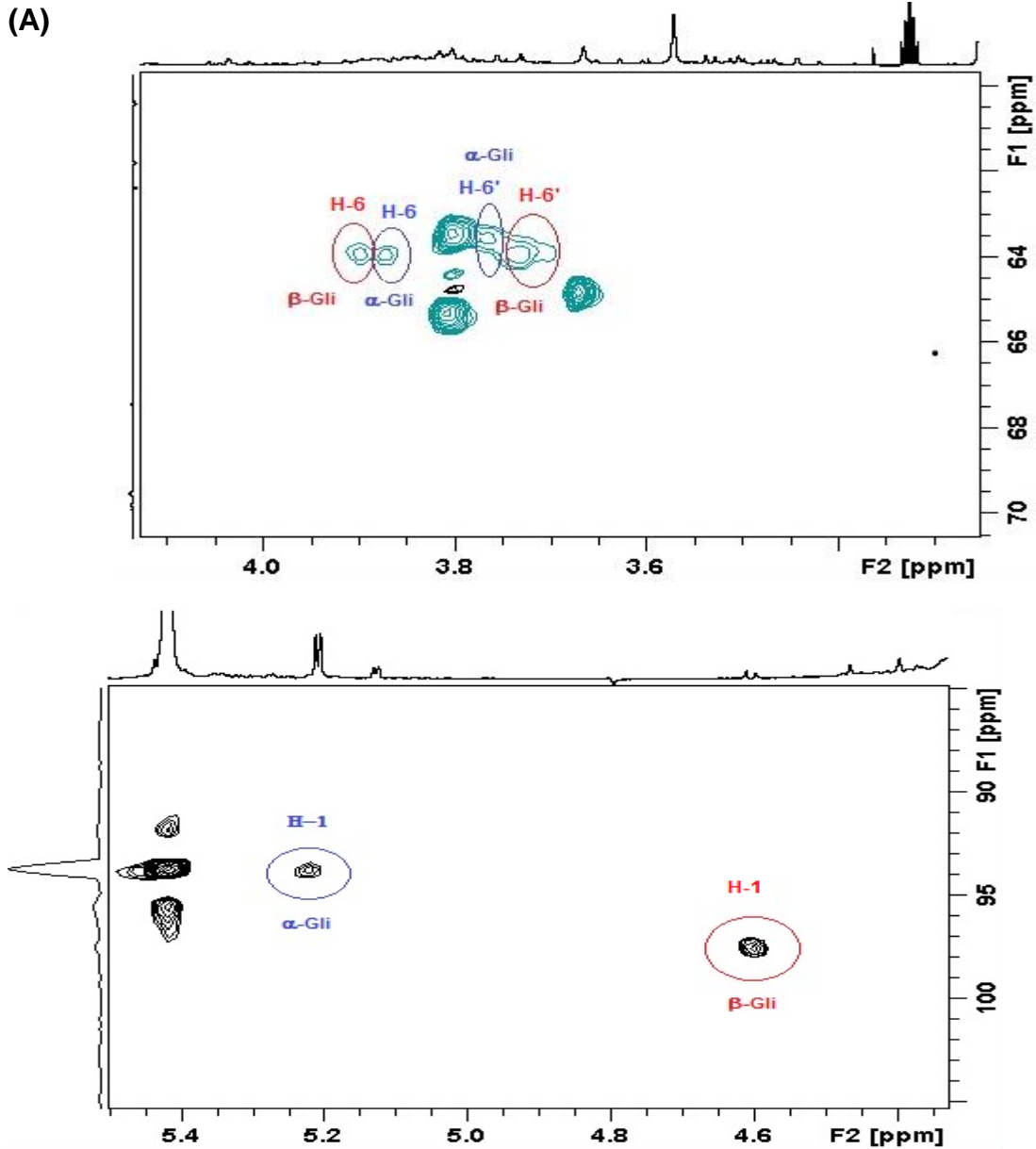


(B)



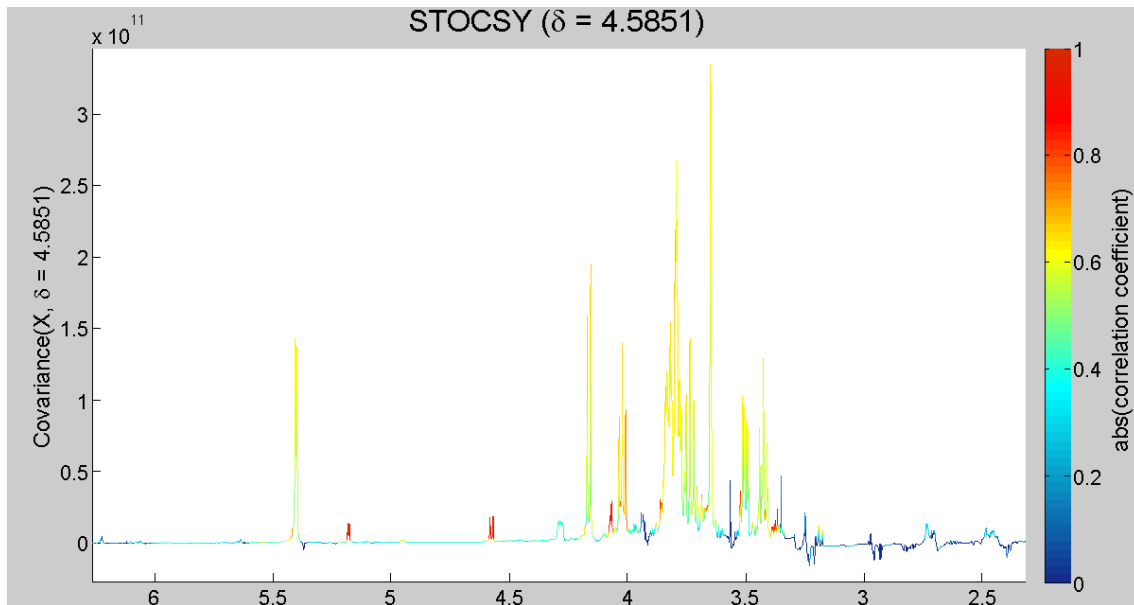
Fonte: Autor 2017.

Figura 30: (A) Espectro HSQC EDITADO ^1H - ^{13}C adquirido pelo método de extração direto (variedade RB92579) destacando os sinais da α e β - glicose. (B) Estruturas da α e β - glicose.



Fonte: Autor 2017.

Figura 31: Correlações dos sinais da α e β - glicose (cor vermelha) no STOCSY em 4.5851 ppm.

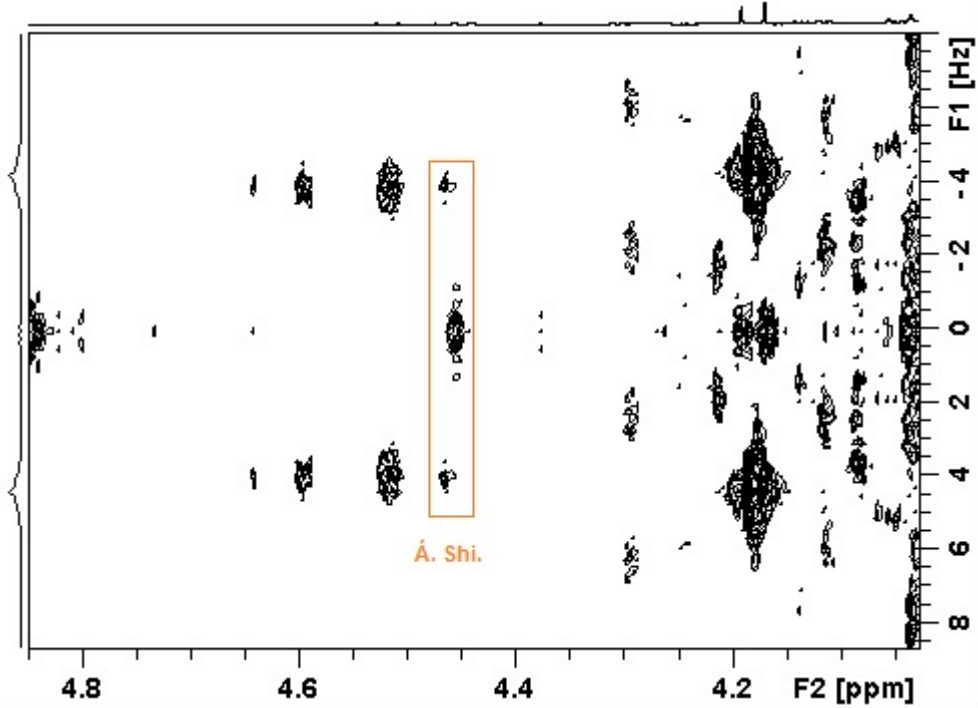


Fonte: Autor 2017.

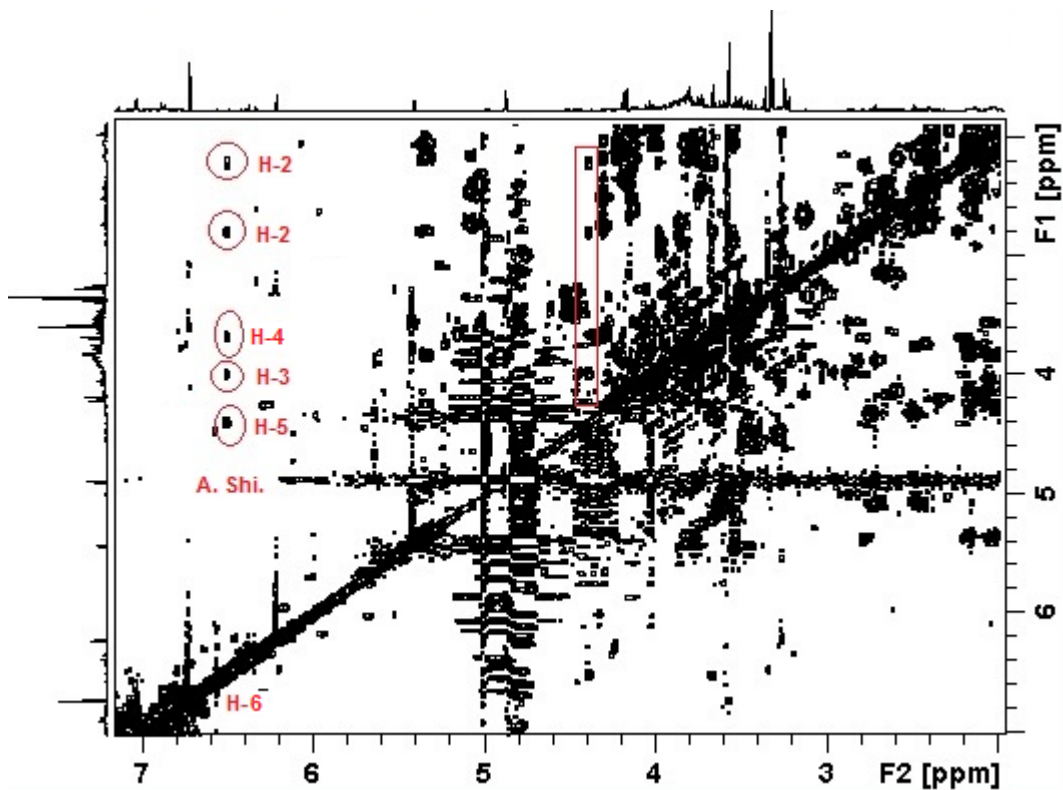
O ácido chiquímico foi identificado em extrato de folha de cana-de-açúcar (Lira, 2010). Verificou-se no espectro J-resolvido ^1H - ^1H um tripleto característico deste ácido em 4,46 ppm ($J = 4,10$ Hz) referente ao H-3 (Figura 32A). Na análise do espectro TOCSY ^1H - ^1H foi observado o acoplamento escalar do hidrogênio olefínico (H-4) com os outros 5 hidrogênios (H-3, H-1, H-2, H-5 e H-'5), evidenciando a presença de um sistema de spins no ácido chiquímico ver figura 32B.

Figura 32: (A) Espectro J-resolvido ^1H - ^1H . (B) Espectro TOCSY ^1H - ^1H destacando o sinais do ácido chiquímico. Espectros adquiridos pelo método de extração indireto (variedade SP791011). (C) Estrutura do ácido chiquímico.

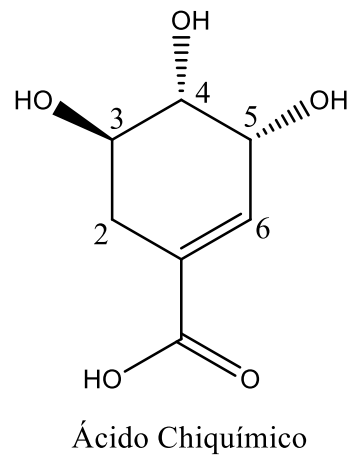
(A)



(B)



(C)

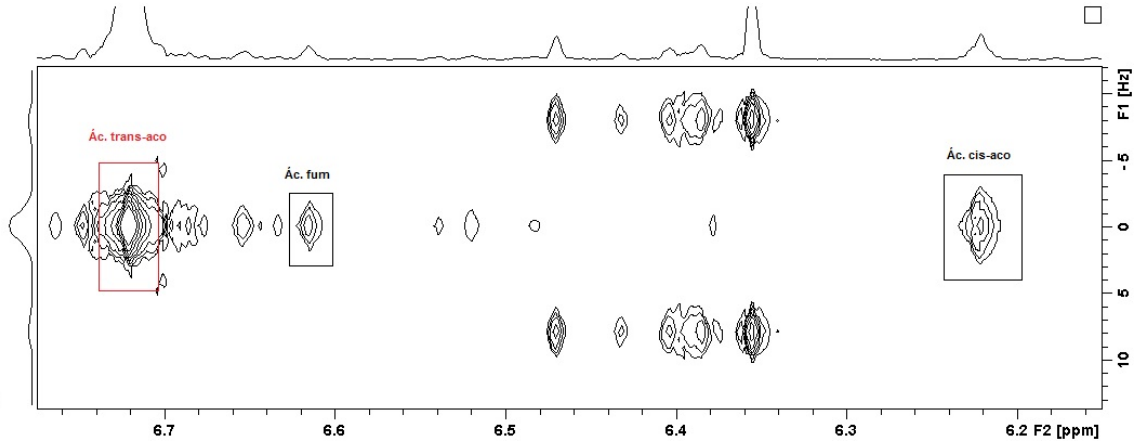


Fonte: Autor 2017.

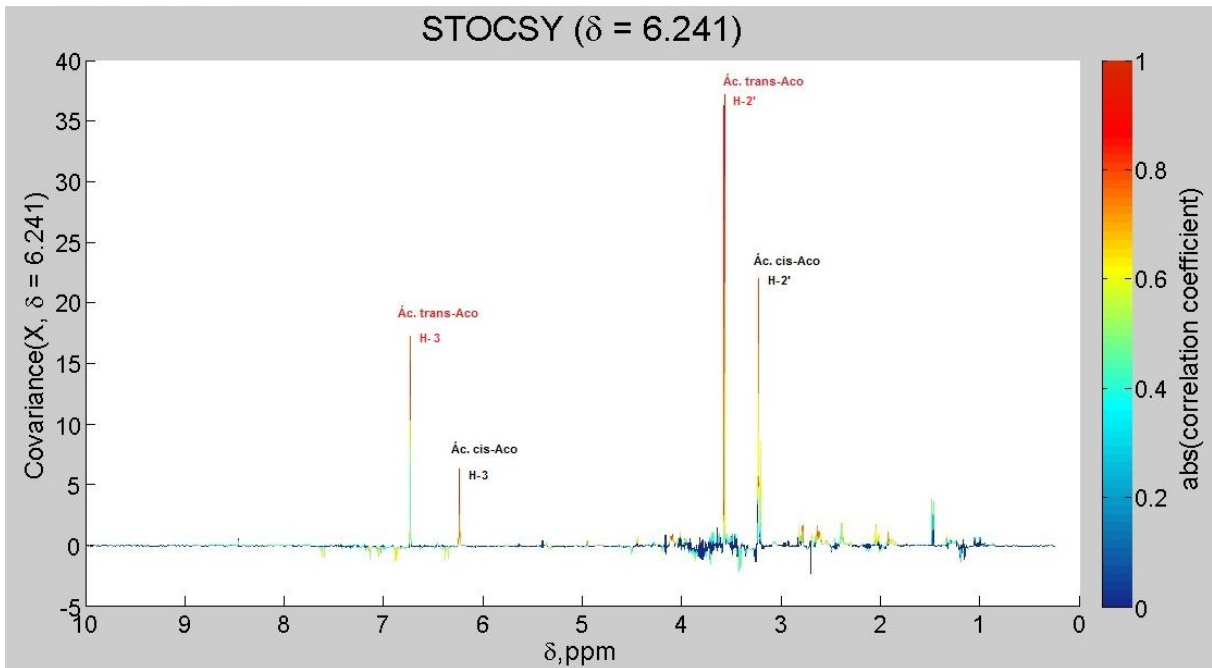
A análise dos sinais na região de compostos olefínicos permitiu a identificação de um simpleto em δ 6,24 ppm no espectro J-resolvido ^1H - ^1H (Figura 33A) e, a partir desta informação foi feito STOCSY para observar o(s) sinais correlacionados em 6,24 ppm. Como está apresentado na figura 33B o STOCSY resultou na correlação majoritária com outros 3 sinais que foram identificados como o hidrogênio metilênico, em δ 3,24 ppm, do ácido cis-aconítico (Ác. Cis-aco) e outros dois sinais, em δ 6,73 ppm e δ 3,57 ppm, os quais foram associados aos hidrogênios olefínico e metilênicos, respectivamente, do isômero ácido trans-aconítico (Ác. Trans-aco) (HMDB, 2016). Na mesma região foi identificado o sinal característico do ácido fumárico em δ 6,61 ppm. A análise do espectro HSQC EDITADO ^1H - ^{13}C permitiu se detectar a correlação do próton em δ 7,04 ppm com o C-4 em δ 113,77 ppm (Figura 36). Estes compostos têm sido identificados em outros trabalhos envolvendo metabolômica de plantas (Choe, 2011).

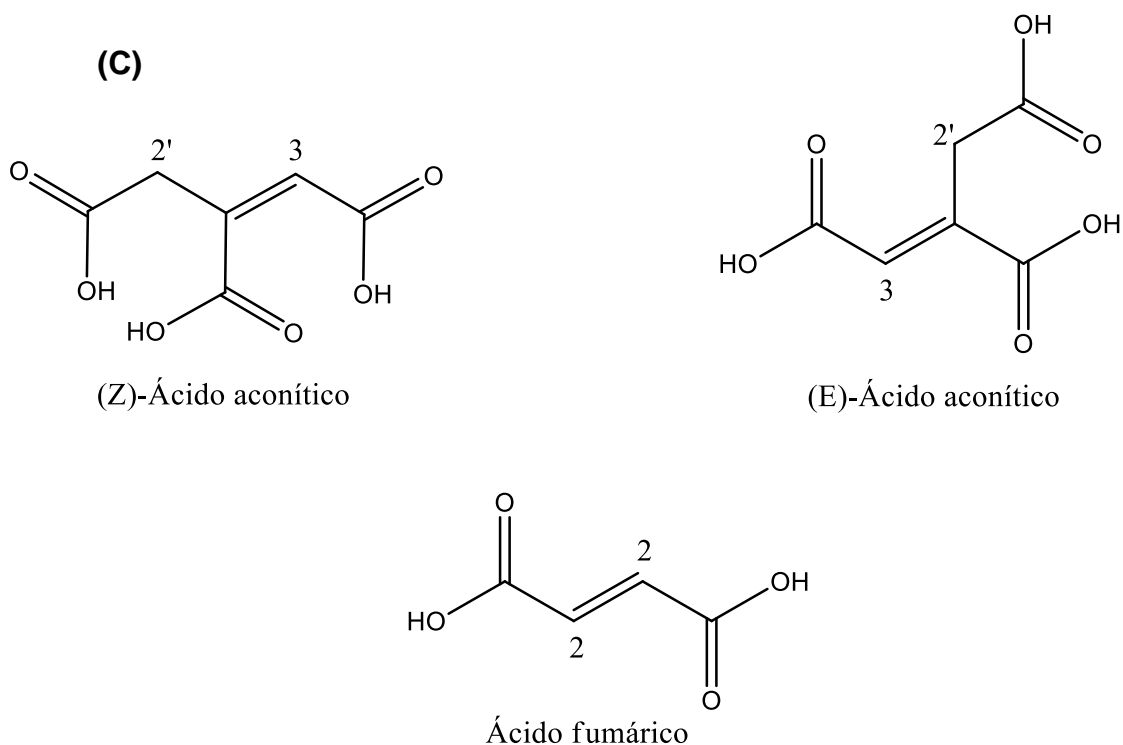
Figura 33: (A) Região olefínica do espectro J-resolvido ^1H - ^1H mostrando os singletos correspondentes do ácido fumárico e dos ácidos trans e cis – aconítico. (B) STOCSY em 6,241ppm confirmando os ácidos trans e cis – aconítico. (C) Estruturas do ácido fumárico e dos ácidos trans e cis – aconítico. Espectro adquirido pelo método de extração indireto (variedade SP791011).

(A)



(B)



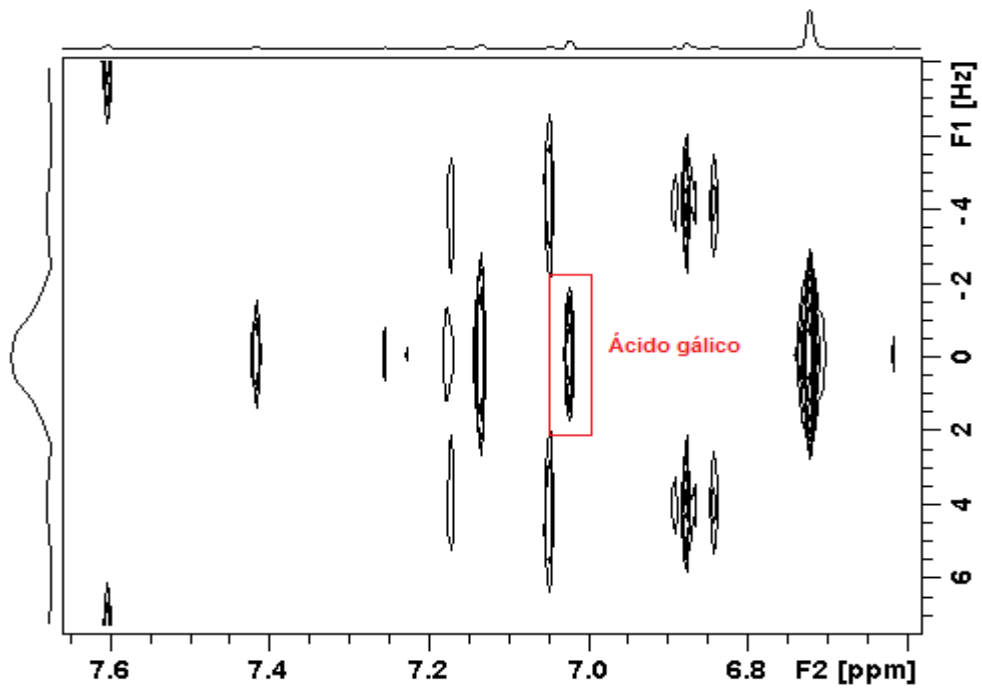


Fonte: Autor 2017.

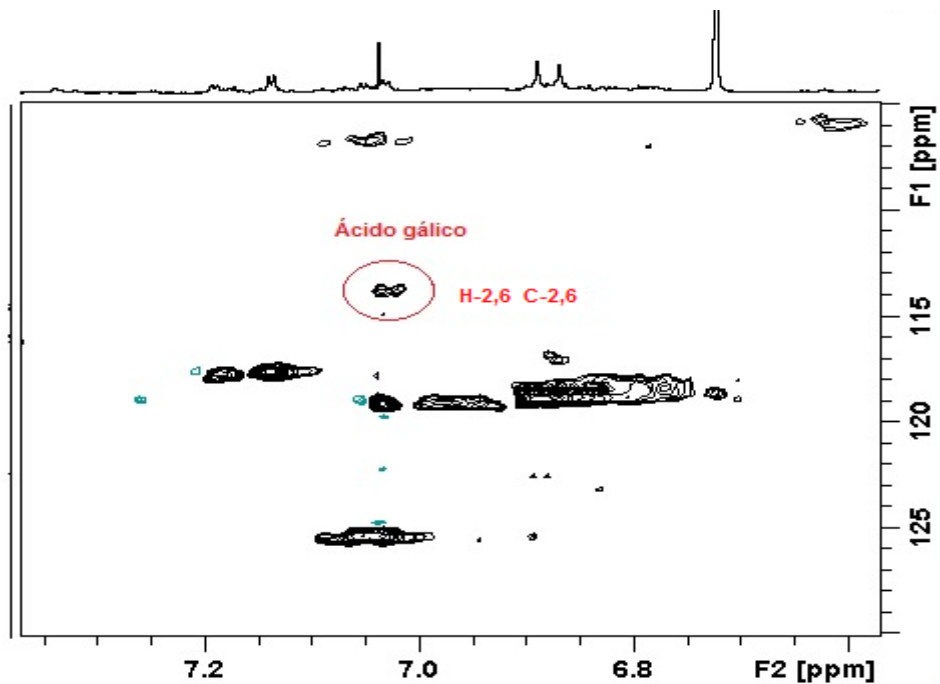
O ácido gálico foi identificado pela observação de um único sinal na forma de simpleto em δ 7,03 ppm no espectro J-resolvido ^1H - ^1H (Figura 34A), referente aos dois hidrogênios aromáticos equivalentes ligados aos carbonos 2 e 6, com deslocamento químico em δ 113 ppm, como mostra o espectro HSQC-EDITADO ^1H - ^{13}C (Figura 34B). Para uma melhor confirmação, tentou-se verificar o acoplamento a longa distância entre os hidrogênios aromáticos e os carbonos por meio do espectro HMBC ^1H - ^{13}C (Figura 34C). No entanto, só foi possível identificar a correlação entre estes hidrogênios (H-2 e H-6) com os carbonos 3 e 5, também equivalentes, com δ 147 ppm. Esse acoplamento foi facilmente observado devido a maior intensidade dos sinais dos átomos equivalentes na molécula.

Figura 34: (A) Espectro J-resolvido ^1H - ^1H . (B) Espectro HSQC EDITADO ^1H - ^{13}C e (C) espectro HMBC ^1H - ^{13}C referentes a identificação do ácido gálico. (D) Estrutura do ácido gálico.

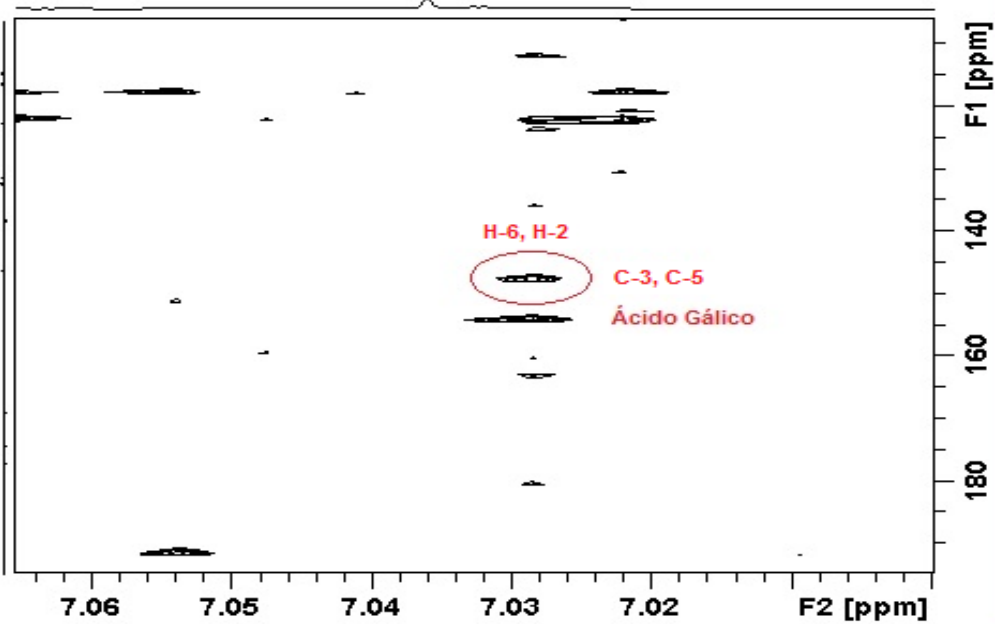
(A)



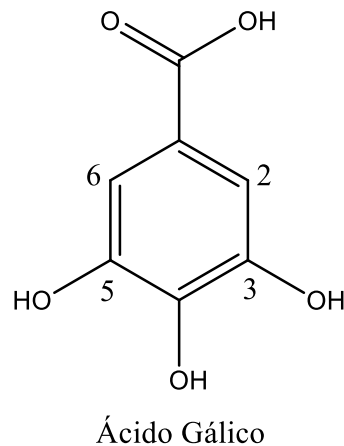
(B)



(C)



(D)

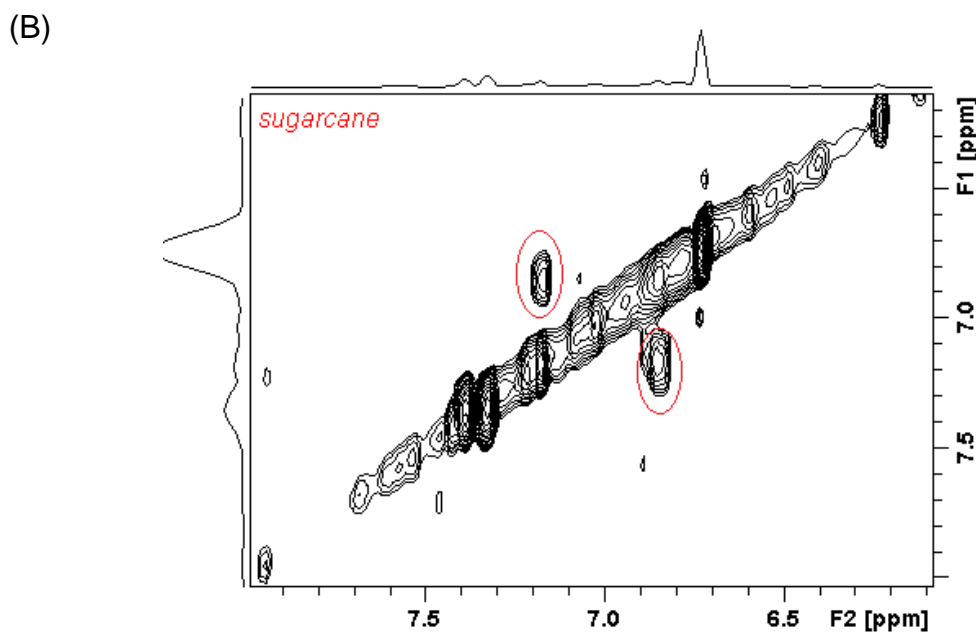
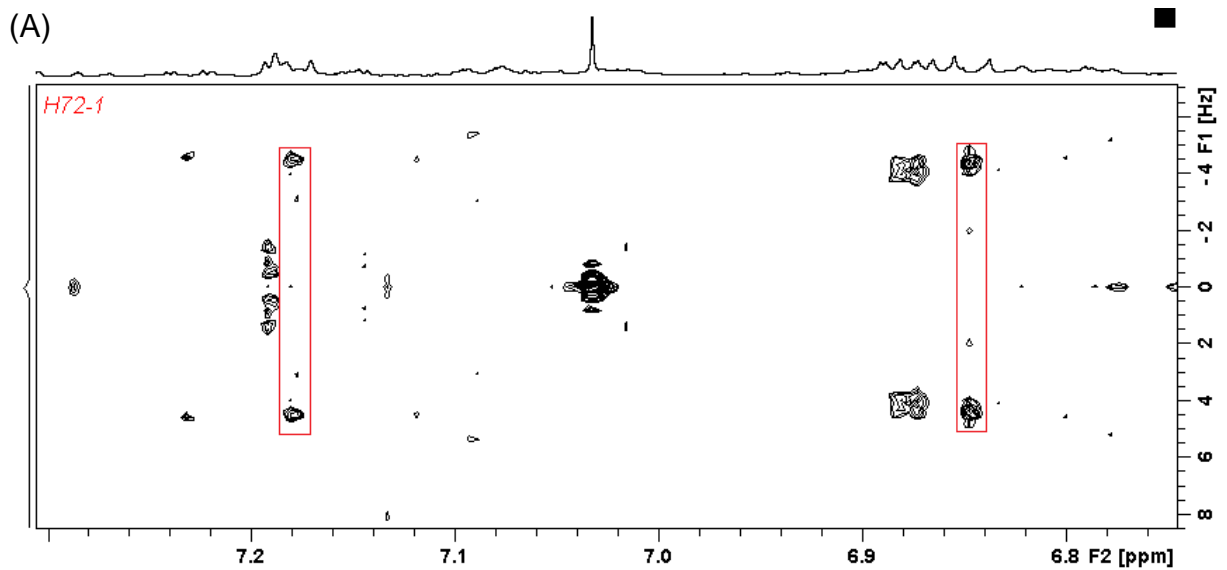


Fonte: Autor 2017.

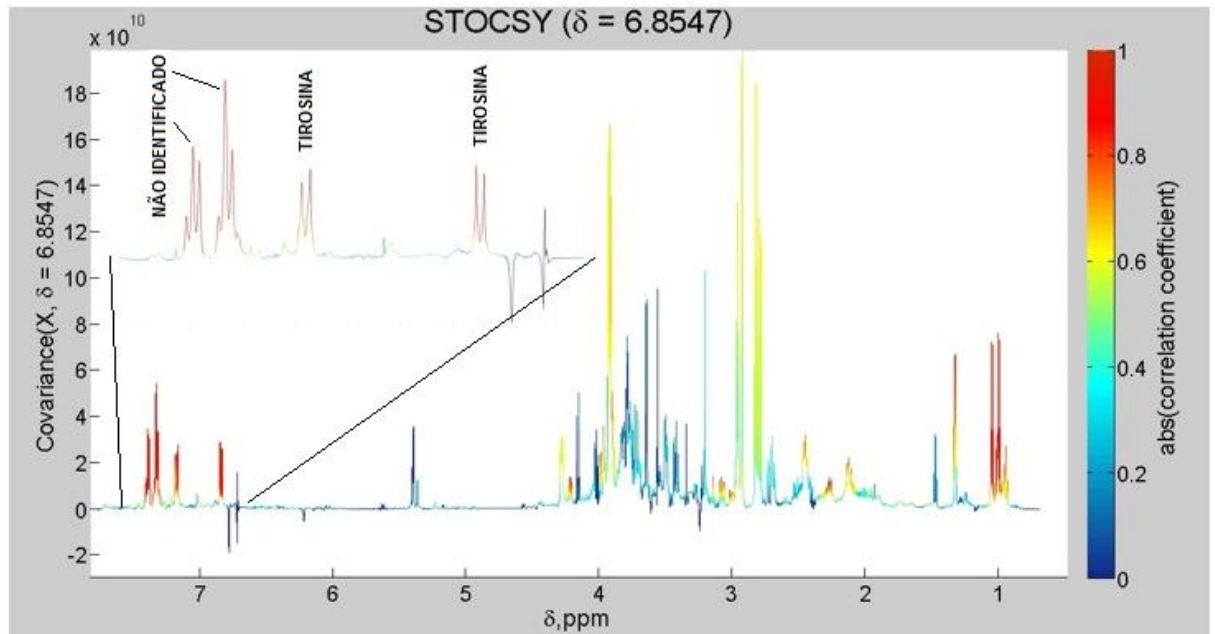
Sinais característicos do metabólito tirosina foram vistos no experimento no espectro J-resolvido ^1H - ^1H (Figura 35A), que contém um duplo dubleto em δ 6,85 ppm ($J = 8,5$ Hz) e δ 7,18 ppm que foi confirmado pelo espectro COSY ^1H - ^1H (Figura 35B). Devido as sobreposições de sinais, não foi possível observar os sinais da unidade alanina da molécula, e, por este motivo tentou-se detectá-los com o espectro HMBC para ver o acoplamento a longa distância entre os hidrogênios metilênicos e o carbono aromático, mas essa tentativa também foi sem êxito devido ao aglomerado de sinais da sacarose entre δ 4,0 e 3,0 ppm. Sendo assim, STOCSY foi realizado em δ 6,85 ppm (Figura 35C) e resultou na forte correlação (cor vermelha) com o sinal em δ 7,18 ppm (dupleto) e outros sinais de outros metabólitos. No entanto, o que chamou a

atenção foi uma alta correlação com multipletos na região de aromáticos δ 7,39 ppm e δ 7,33 ppm, provavelmente de um aminoácido aromático como fenilalanina ou outro metabólito aromático como o fenilactato (Figura 35C). Uma das características do STOCSY é detectar pequenas variações sistemáticas mesmo em baixa concentração do metabólito e, por este motivo, não foi possível verificar os sinais deste metabólito aromático nos experimentos HMBC e HSQC.

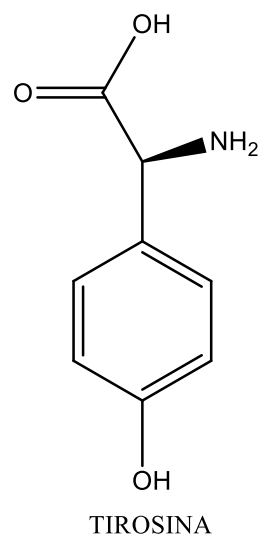
Figura 35: (A) Espectro J-resolvido ^1H - ^1H . (B) Espectro COSY ^1H - ^1H destacando os sinais da tirosina. Espectros adquiridos pelo método de extração direta (variedade RB92579). (C) STOCSY em 6,85 ppm. (D) Estrutura da tirosina.



(C)



(D)



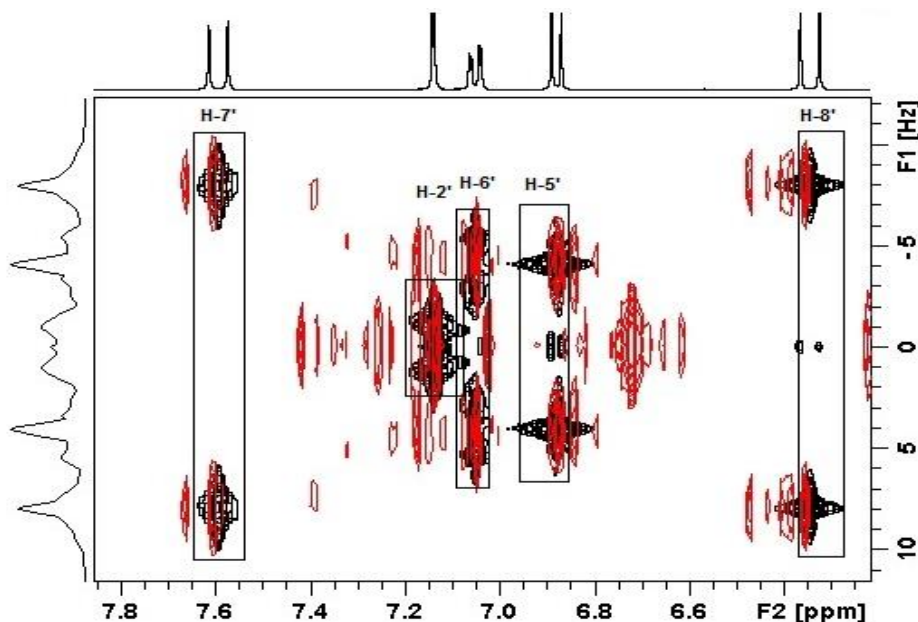
Fonte: Autor 2017.

Na região dos compostos aromáticos, sinais correspondentes aos prótons característicos do ácido clorogênico, foram detectados no espectro J-resolvido ^1H - ^1H (Figura 36A) os seguintes sinais: δ 6,34 ppm (H-8', duplete, $J = 16$ Hz); δ 6,88 ppm (H-5', duplete, $J = 8$ Hz); δ 7,05 ppm (H-6', multiplete); δ 7,14 ppm (H-2', duplete, $J = 2$ Hz) e δ 7,59 ppm (H-7', duplete, $J = 16$ Hz). Nas figuras 36A e 36B estão os espectros J-resolvido ^1H - ^1H e COSY ^1H - ^1H onde estão sobrepostos o espectro do extrato de folha da cana-de-açúcar após herbivoria, obtido na metodologia indireta (cor vermelha) e o espectro do padrão de ácido clorogênico (cor preta) obtido no mesmo

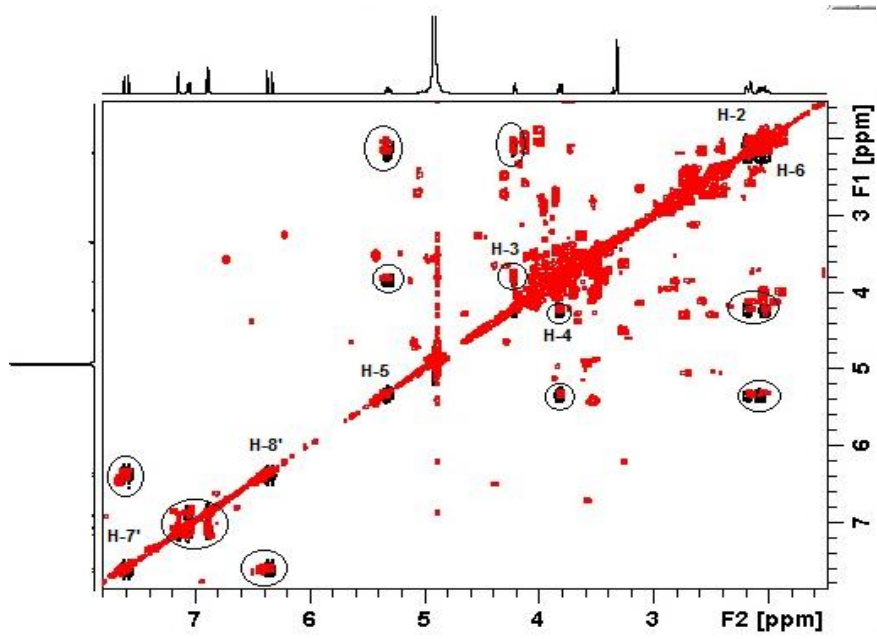
solvente. Foi possível identificar no espectro COSY ^1H - ^1H os acoplamentos dos sinais característicos do radical quínico com correlações do H-5 em δ 5,33 ppm com H-6 (δ 2,03 ppm) e H-4 (δ 3,80 ppm); do H-3 em δ 4,23 ppm com H-4 (δ 3,80 ppm) e H-2 (δ 2,17 ppm) confirmando a presença desta substância. Nesta mesma região aromática foram identificados alguns sinais característicos de derivados do ácido clorogênico, provavelmente o ácido 5'-O-feruloíla quínico, como é mostrado na figura 37A, alguns dubletos em δ 6,47 ppm (H-8', dubleto, $J = 16$ Hz); δ 6,84 ppm (H-5', dubleto, $J = 8$ Hz); δ 7,07 ppm (H-6', multipletto); δ 7,14 ppm (H-2', dupleto, $J = 2$ Hz) e δ 7,66 ppm (H-7', dupleto, $J = 16$ Hz). Na tentativa de melhor elucidar a estrutura do ácido 5'-O-feruloíla quínico foi realizado um STOCSY em δ 7,65 ppm (Figura 38) que mostrou a correlação dos sinais deste ácido com o ácido clorogênico, que possui sinais de maior intensidade, e correlação com alguns sinais provavelmente do ácido cafeoíla quínico, pois esses metabólitos possuem o mesmo radical quínico e conseqüentemente deslocamentos químicos semelhantes, não sendo possível observá-los nos espectros de RMN-2D. Vale salientar que estes fenilpropanóides foram identificados em extratos de plantas, inclusive nas folhas da cana-de-açúcar (LIRA, 2010; VERPOORTE; CHOI; KIM, 2007; LEISS et al., 2009).

Figura 36: Espectros (A) J-resolvido e (B) COSY do extrato da cana-de-açúcar (vermelho) e do padrão de ácido clorogênico (preto) sobrepostos confirmando o metabólito. (C) Estrutura do ácido clorogênico.

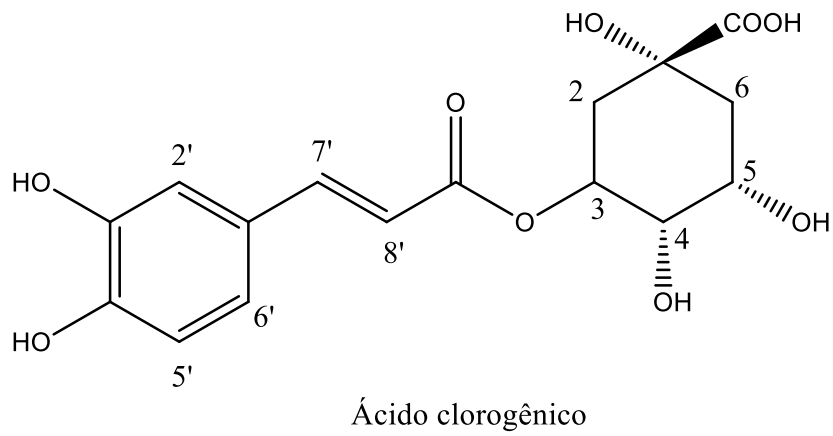
(A)



(B)



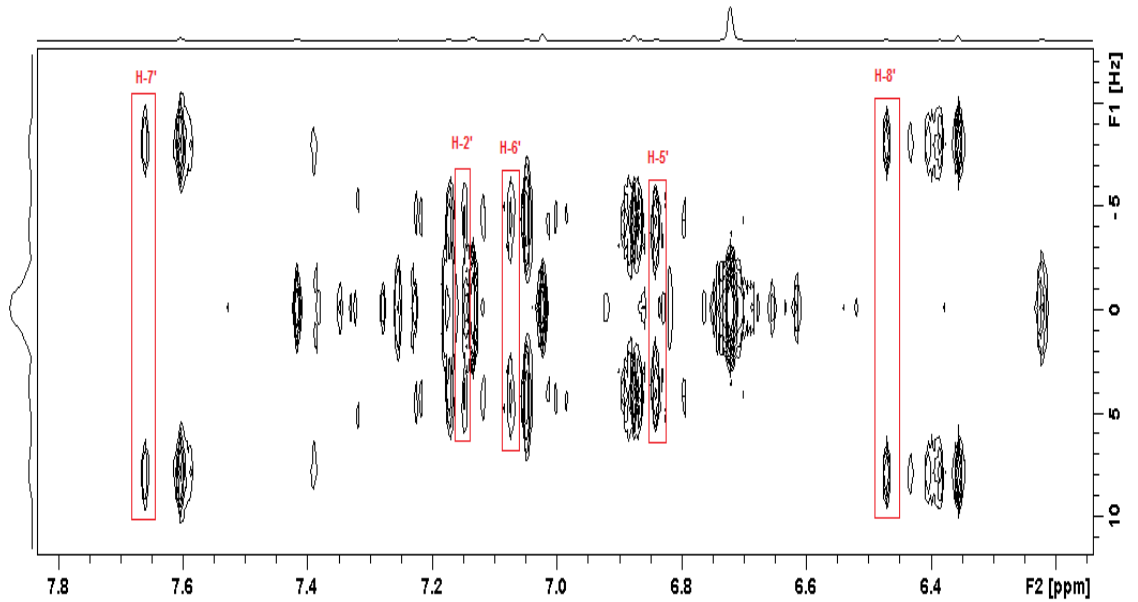
(C)



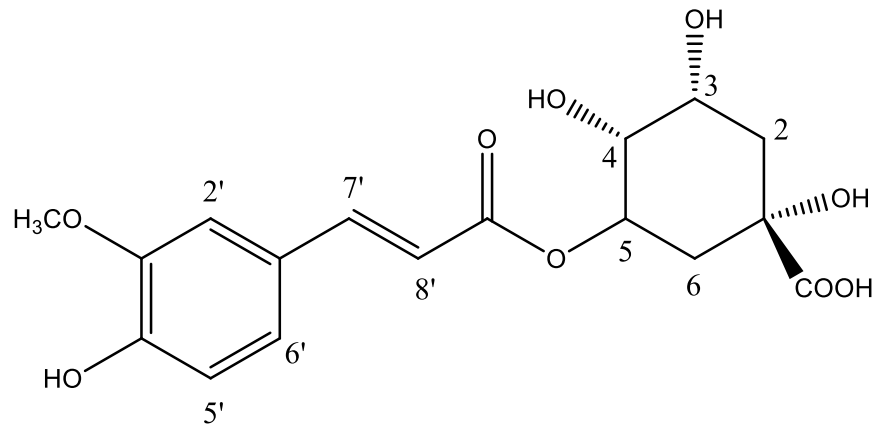
Fonte: Autor 2017.

Figura 37: (A) Espectro J-resolvido expandido na região aromática mostrando os sinais aromáticos e olefínicos do ácido 5' feruloíla quínico. Espectro adquirido pelo método de extração indireto de uma amostra de cana-de-açúcar SP791011 após a herbivoria. (B) Estrutura do ácido 5' feruloíla quínico.

(A)



(B)

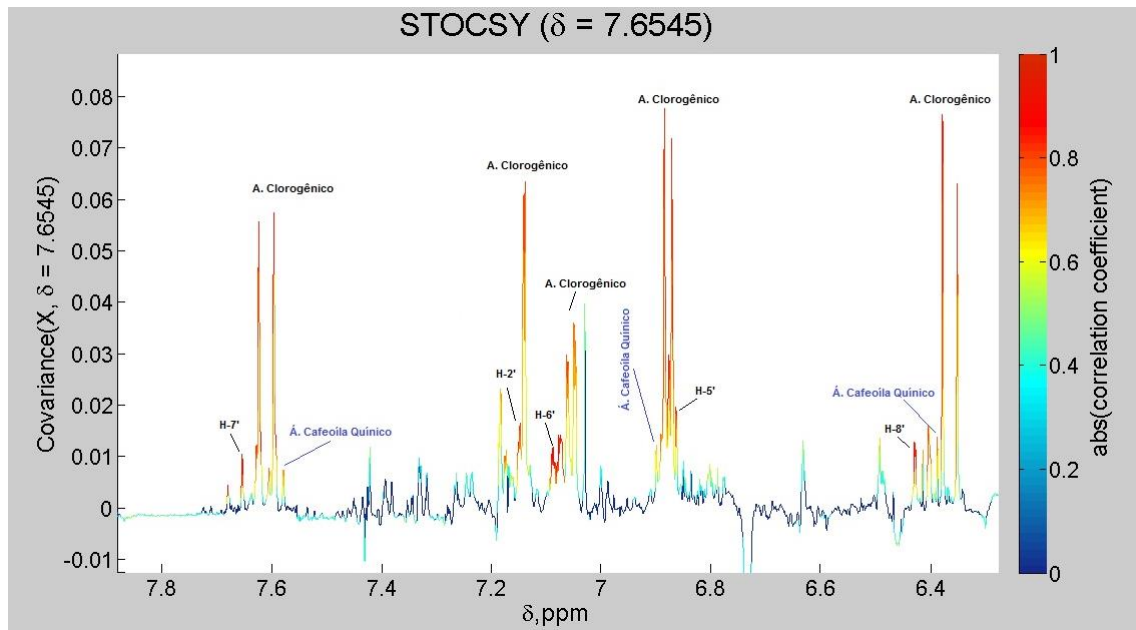


Ácido 5-O-feruloíla quínico

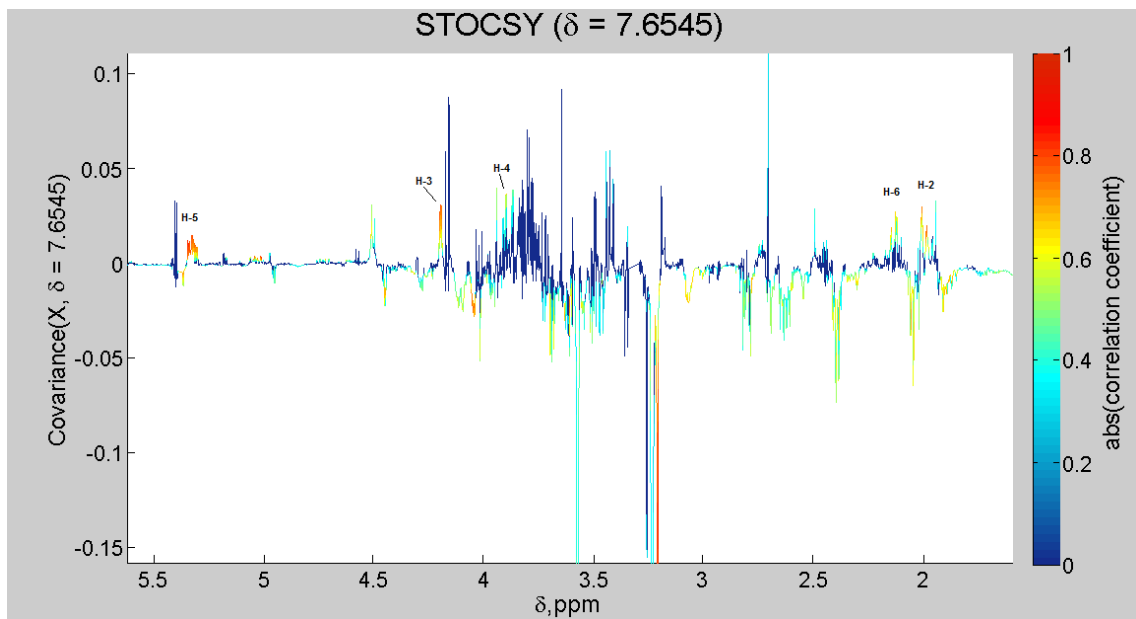
Fonte: Autor 2017.

Figura 38: Região expandida do STOCSY entre (A) 7,9 e 6,3 ppm e (B) 5,6 e 1,5 ppm mostrando alta correlação dos sinais característicos dos fenilpropanóides identificados na cana-de-açúcar de variedade SP791011.

(A)



(B)

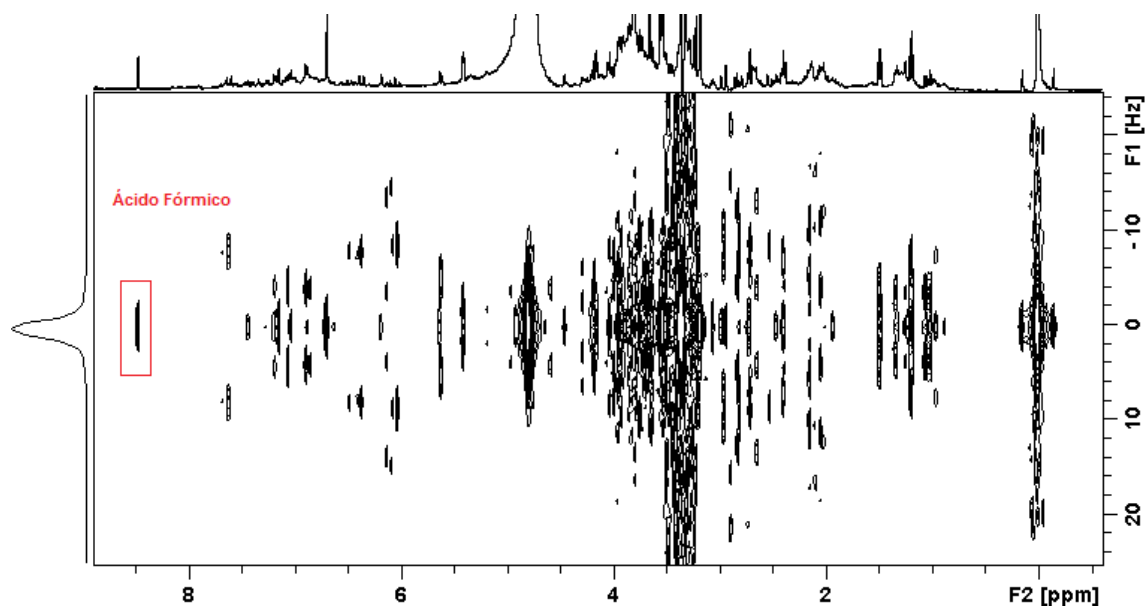


Fonte: Autor 2017.

O deslocamento químico referente ao único hidrogênio do ácido fórmico (simpleto) foi observado em 8,46 ppm no espectro J-resolvido ^1H - ^1H (Figura 39A). Sinais característicos da trigonelina (Figura 40C) foram identificados no extrato da folha da cana-de-açúcar, como mostra o espectro de RMN- ^1H (Figura 40A) contendo deslocamentos químicos em δ 9,14 ppm (H-1), δ 8,86 ppm (H-3 e H-5) e δ 8,09 ppm (H-4). A presença deste metabólito foi confirmada através do experimento 2D TOCSY ^1H - ^1H (Figura 40B) que mostrou o acoplamento escalar dos spins entre o H-1 e os demais H-3, H-4 e H-5, onde esse acoplamento escalar é possível devido ao efeito mesomérico da trigonelina. O sinal da metila em δ 4,45 ppm foi verificado pelo STOCSY em δ 9,14 ppm, como é apresentado na figura 40C, que apresentou uma forte correlação (sinais de cor vermelha) com os sinais do metabólito, confirmando o mesmo.

Figura 39: (A) Espectro J-resolvido para a identificação do ácido fórmico. (B) Estrutura do ácido fórmico.

(A)



(B)

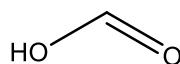
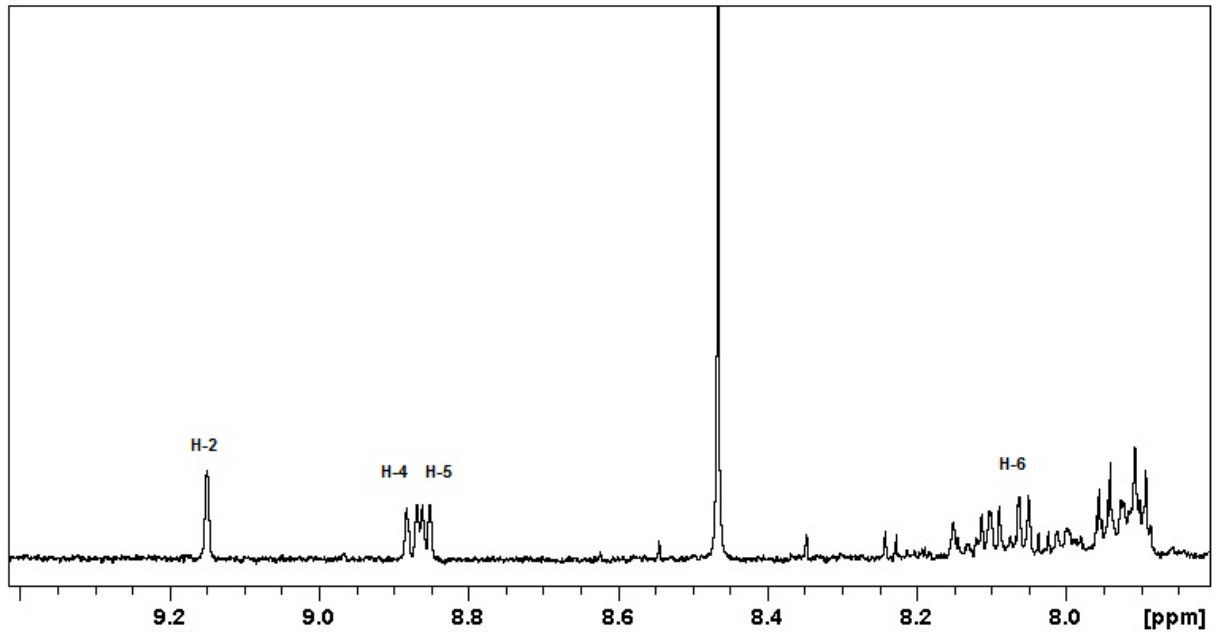
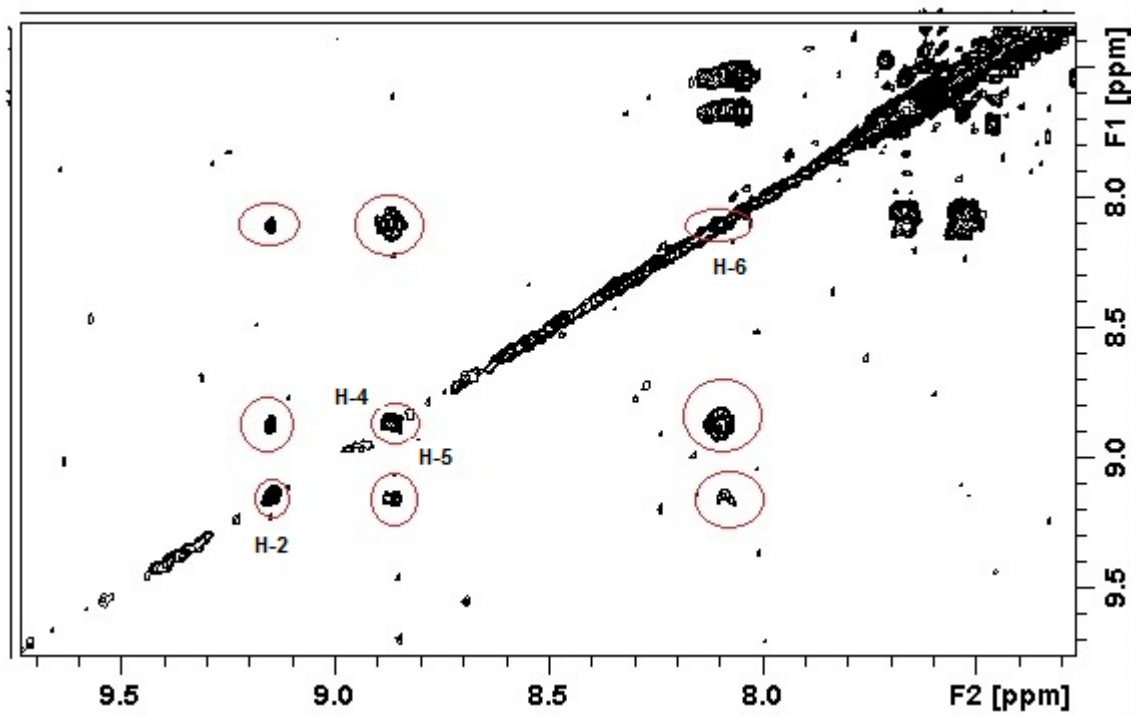


Figura 40: (A) RMN- ^1H e (B) TOCSY ^1H - ^1H do extrato da folha da cana-de-açúcar controle e (C) STOCSY em 9.14 ppm para a confirmação da (D) trigonelina. Obtido pelo método de extração direto.

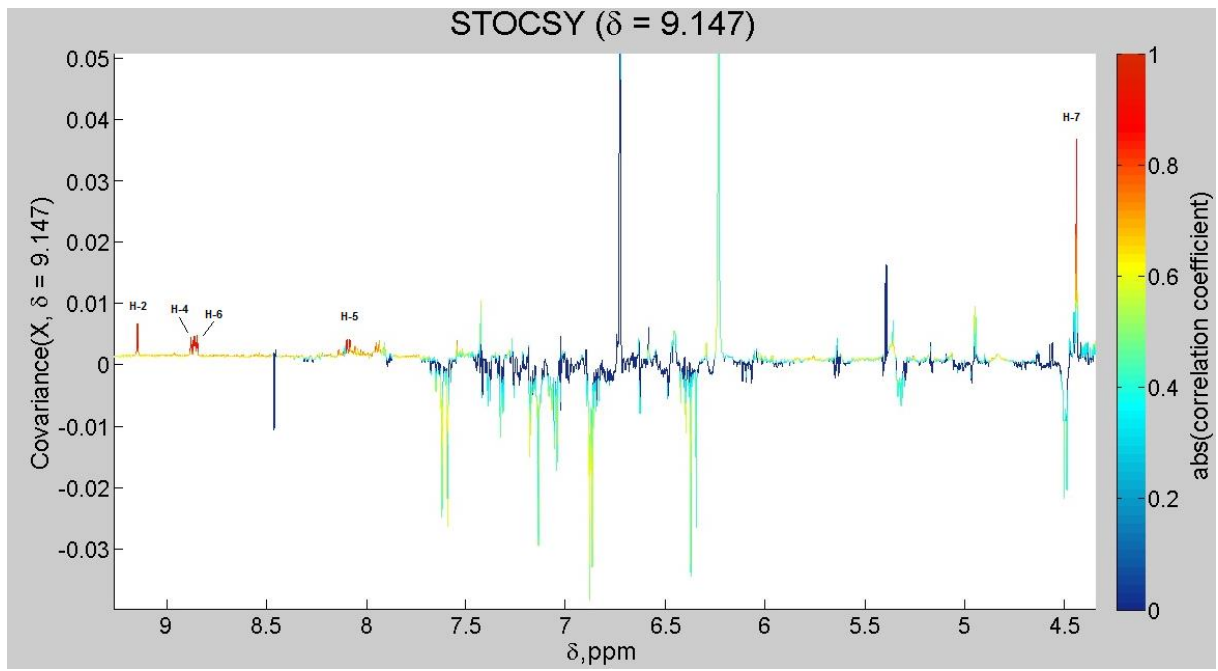
(A)



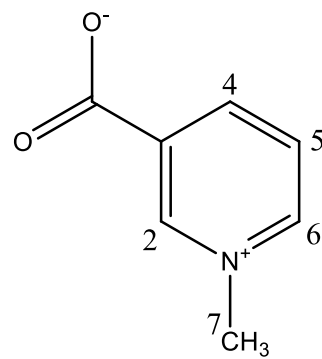
(B)



(C)



(D)



Trigonelina

Fonte: Autor 2017.

De modo geral, os espectros de RMN discutidos apresentam alguns metabólitos identificados nas variedades de cana-de-açúcar SP791011 e RB92579. No entanto, com exceção do ácido shiquímico que foi identificado apenas na amostra SP791011, todos os metabólitos identificados estão presentes nas duas variedades. O que basicamente diferencia uma variedade da outra são as intensidades dos sinais, o que significa que alguns metabólitos estão em maior e/ou menor concentração a depender da variedade. As diferenças entre as intensidades podem estar associadas a outros fatores, como o método de extração e o tratamento herbivoria ou controle. Por exemplo, o ácido clorogênico foi melhor identificado nas folhas da cana-de-açúcar de variedade SP791011 após a herbivoria, pois como será discutido adiante, houve um aumento na concentração deste metabólito facilitando a inspeção dos espectros de RMN.

Foram identificados 24 metabólitos, entre aminoácidos, ácidos orgânicos, açúcares, alcalóides e fenilpropanóides. No espectro J-resolvido, foi possível verificar multiplicidade de sinais e suas constantes de acoplamento de aminoácidos como lisina, ácido valérico, aminobutirato, inositol entre outros metabólitos primários presentes nos tecidos foliares de plantas. Todavia, a quantidade elevada de sacarose em todas as amostras, acabou suprimindo os sinais de deslocamento químico de outros metabólitos nos espectros de RMN-2D, o que dificultou a identificação de alguns metabólitos. Determinados metabólitos só foram confirmados pelo uso do STOCSY, e também, através da análise de padrão químico. Na tabela 1, estão os metabólitos identificados no tecido foliar das variedades SP791011 e RB92579, usando os métodos de extração direto e indireto.

Tabela 1: Metabólitos identificados nas folhas de cana-de-açúcar nas variedades RB 92579 (extração direta) e SP 791011 (extração indireta). Principais sinais de deslocamento químico

Metabólitos	Deslocamento Químico (ppm) - J (Hz) – RMN-¹H
Acetato	1,94(s)
Ácido Chiquímico*	4,46 (H-3, t, J=4,10 Hz)
Acido cis-aconítico	3,56(H-3,s) e 6,24(H-2',s)
Ácido clorogênico	7,59 (H-7', d, J=16 Hz), 6,39 (H-8',d, J=16 Hz), 7,14 (H-2', d, J=2 Hz), 7,05 (H-6',dd), 5,33 (H-5), 2,03 (H-6), 3,80 (H-4) e 4,23 (H-3)
Ácido fórmico	8,46(s)
Ácido fumárico	6,21(s)
Ácido gálico	7,03 (H-3, H-5, s)
Ácido láctico	1,34 (H-3, d, J=7 Hz) e 4,07 (H-2, q, J=7 Hz)
Ácido málico	2,46 (H-β,dd), 2,71 (H-β,dd, J=15,5 e 3,0 Hz), 4,28 (H-α,dd, J=15,5 e 3,0 Hz)
Ácido Succinico	2,49 (H-2, s)
Ácido trans-aconítico	3,57 (H-3,s) e 6,72 (H-2',s)
Asparagina	2,84 (H-α,dd, J=17,2 e 8 Hz), 2,95 (H-β,dd, J=17,1 e 4 Hz), 3,95(dd)
Aspartato	3,90(H-3, dd), 2,80(H-b, dd, J=17,1 e 3,5 Hz), 2,64(H-a, dd, J=17,5 e 8,8 Hz)
Colina	3,215 (H-3, s)
Fenilalanina	7,33 (m), 7,42(m)
Glicina	3,56 (H-2, s)
Glutamato	2.07 (H-3, m), 2.36 (H-4, m)
Isoleucina	0,95 (H-5, t, J=7,6Hz)), 1,02(H-3, d, J=7,7 Hz), 1,25(H-4, m), 1,46 (H-4, m), 1,97(H-3, m) e 3,66(H-2, d)
Sacarose	5,40 (H-1, d, J= 4 Hz) e 4,17 (H-3,d, J=7,7 Hz)
Tirosina	6,85 (H-2, H-6, d, J=8,5 Hz) e 7,18 (H-3, H-5, d, J=8,5 Hz)
Treonina	1,33(H-4, d, J=7Hz), 3,60 (H-2, q) e 4,26 (H-3, m)
Trigonelina	9,14(H-1, s), 8,86 (H-3, H-5, m), 8,07(H-4, m) e 4,45(H-7, s)
Valina	1.01(H-γ,d, J=7 Hz), 1.06(H-γ',d, J=7 Hz), 2.26(H-β,m), 3.60(H-α, d)
α-Alanina	1.48 (H-3,d, J=7,4 Hz), 3.8(H-2, q, J=7,4 Hz)

α -Glicose	5.18(H-1, d)
β -Glicose	4.58 (H-1, d)

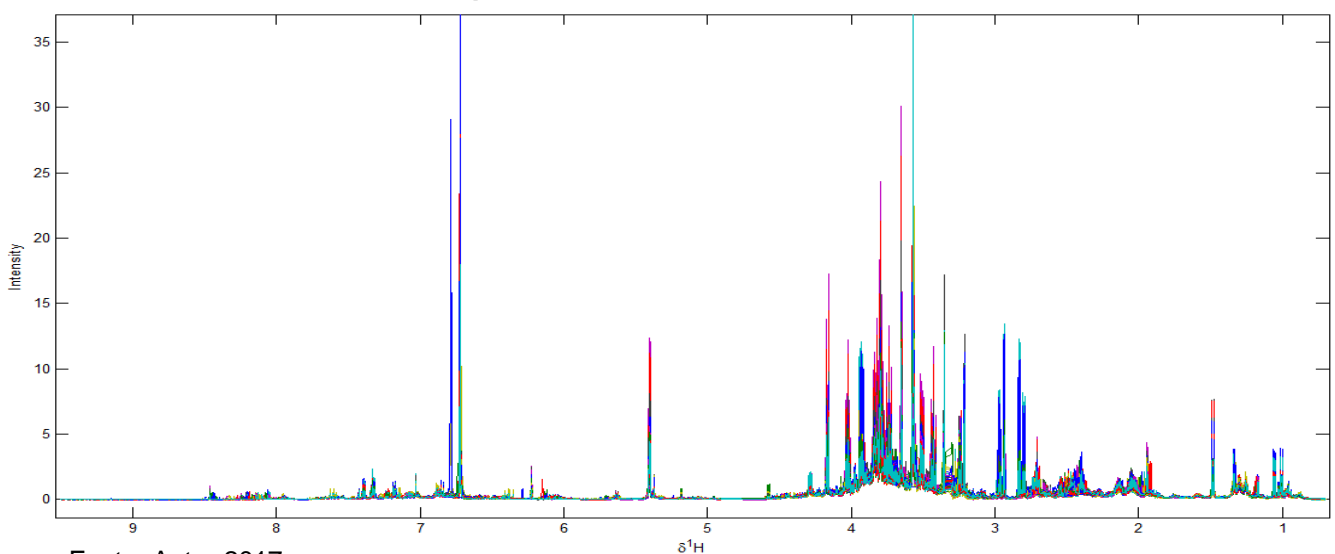
*Identificado apenas na variedade SP791011.

Fonte: Autor 2017.

5.5 Análise multivariada da variedade da cana-de-açúcar (RB 92579) pelo método de extração direto

A análise de componentes principais (PCA) foi realizada para identificação de outliers e tendências de agrupamentos entre os tratamentos. Um total de 158 espectros de RMN de amostras controle e herbivoria foram utilizados para a formação dos dados para PCA. A figura 41 apresenta todos os 158 espectros sobrepostos alinhados e escalonados pelo método de única variância (UV), totalizando 29.984 variáveis. Como a extração foi realizada com as mesmas quantidades de folhas para todas as amostras, não foi necessária a normalização dos dados (comumente utilizada para compensar as grandes diferenças de quantidades de material de partida em outras amostras). Para este estudo foi aplicado a técnica de extração direta e foram utilizadas 158 plantas, sendo 20 plantas controle 24 horas; 20 plantas herbivoria 24 horas; 20 plantas controle 48 horas; 19 plantas herbivoria 48 horas; 20 plantas controle 72 horas; 20 plantas herbivoria 72 horas; 19 plantas controle 96 horas e 20 plantas controle 96 horas.

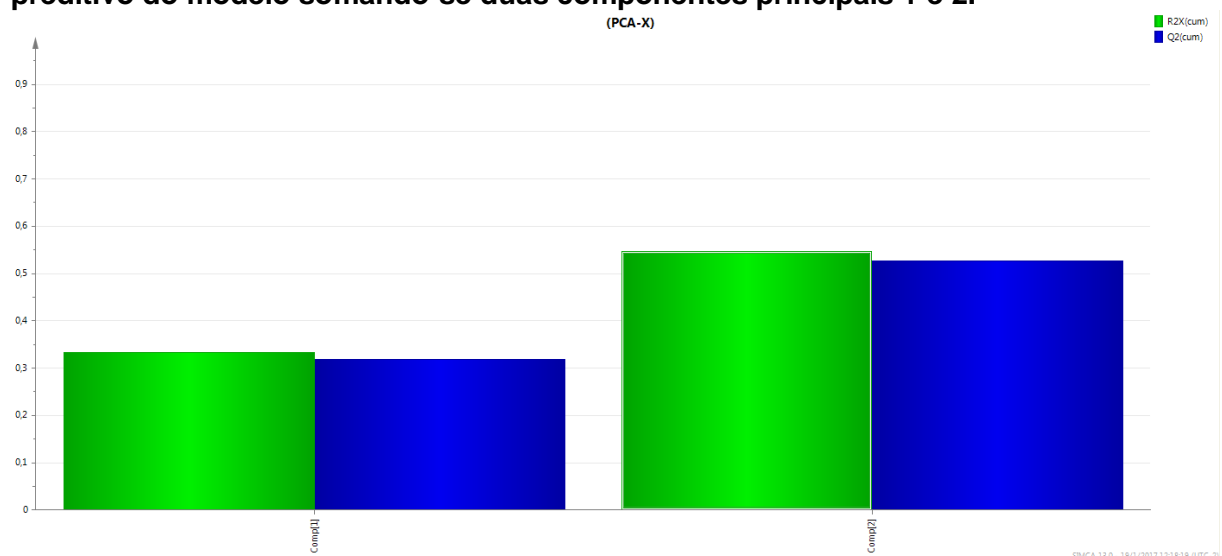
Figura 41 – Dados processados para análise multivariada da cana-de-açúcar controle e herbivoria totalizando 158 espectros e 29,984 variáveis.



Fonte: Autor 2017.

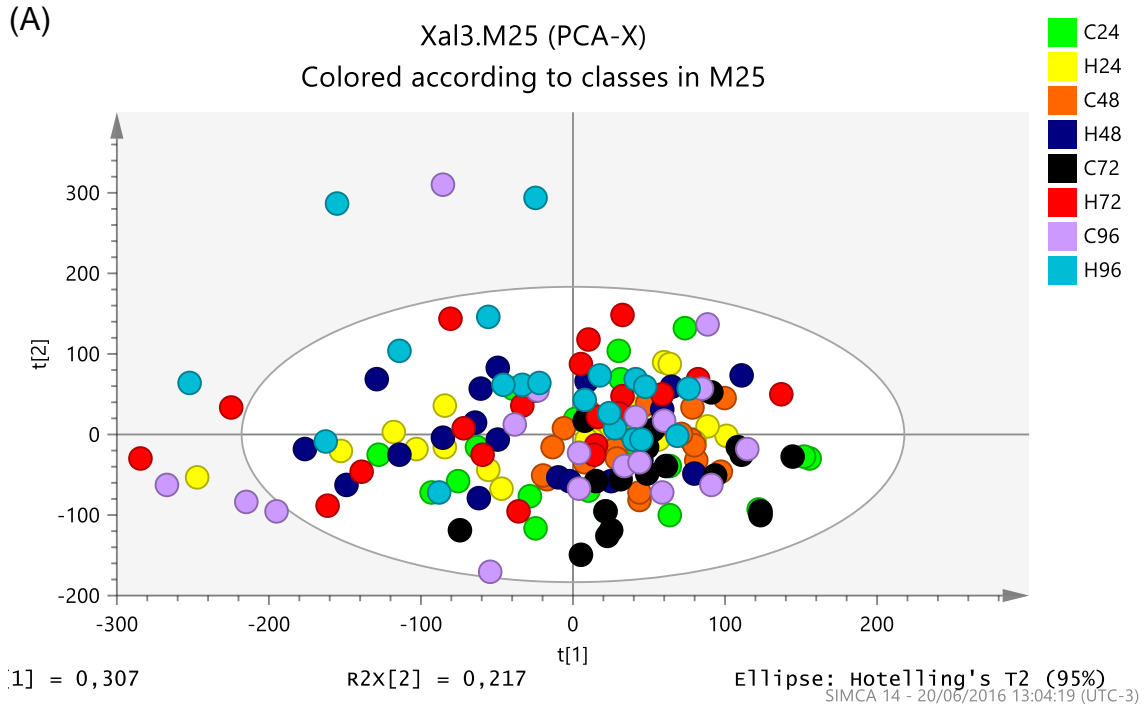
A análise de componentes principais explicou 54,2% da variância total dos dados através das componentes 1 e 2. A figura 42 apresenta os dados estatísticos $R = 0,542$ (barra de cor verde), coeficiente que indica a percentagem da variabilidade dos dados somando-se as duas componentes principais, e $Q = 0,520$ (barra de cor azul) o que indica o poder preditivo do modelo estatístico ($Q > 0.5$ indica um bom poder preditivo). Os escores da PCA (Figura 43A) foram formados por 8 grupos diferentes, sendo 4 grupos em 4 tempos de herbivoria (24, 48, 72 e 96 horas) e mais 4 grupos controle contendo os mesmos tempos. Conforme apresentado nos escores da PCA, os escores dos grupos apresentaram-se de forma aleatória e, como há muitos grupos, ficou difícil uma análise mais precisa dos mesmos. Como se trata de um estudo envolvendo tempos de herbivoria, foi feita a trajetória cronológica (Figura 43B) utilizando as médias dos escores de cada grupo herbivoria (4 tempos) obtidos na PCA contendo apenas a média dos escores do grupo controle 24 horas para uma melhor análise cronológica da variância dos dados. Conforme apresentado na figura 43B, a trajetória das plantas controle 24 horas partiu do quadrante inferior direito e, após 24 e 48 horas de herbivoria, se moveram entre os quadrantes inferior e superior esquerdo; após 72 e 96 horas, movimentaram-se para o quadrante superior esquerdo, indicando uma severa mudança na variabilidade metabólica da cana-de-açúcar com o aumento do tempo de herbivoria.

Figura 42: Barras referentes aos valores de R e Q que indicam a variância e o poder preditivo do modelo somando-se duas componentes principais 1 e 2.

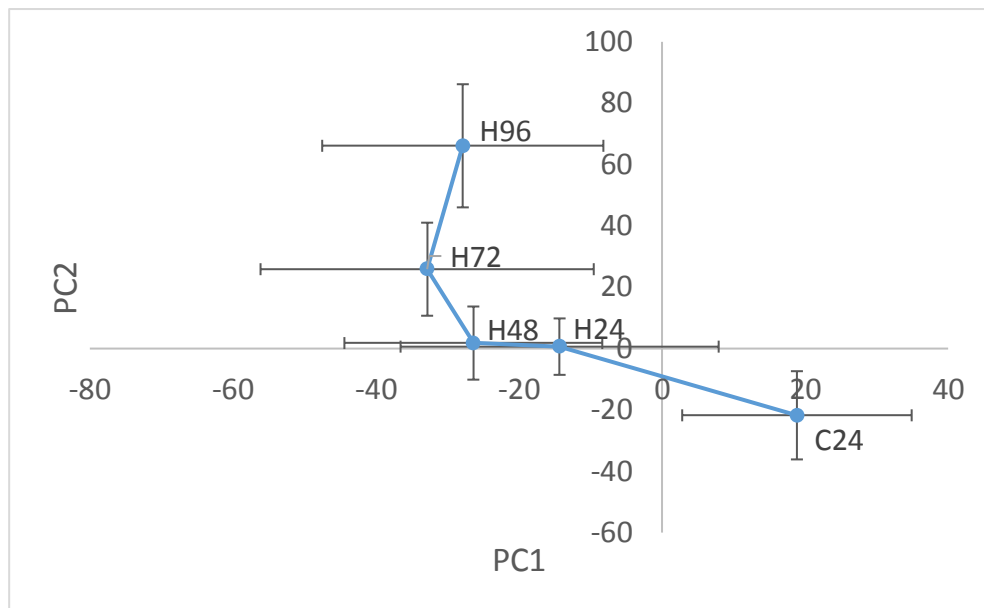


Fonte: Autor 2017.

Figura 43 - (A) PCA escores das amostras herbivoria (4 grupos) e controle (4 grupos) da cana-de-açúcar. (B) Trajetória dos escores da PC1 e PC2 das amostras controle (24 horas) e herbivoria (24, 48, 72, 96 horas) da cana-de-açúcar (RB92579).



(B)



Fonte: Autor 2017.

5.5.1 Séries pareadas de análises discriminantes ortogonal por mínimos quadrados parciais (OPLS-DA) das amostras controle e herbivoria.

A OPLS-DA é um método estatístico supervisionado que tem como objetivo a identificação dos biomarcadores relacionados ao estudo. Neste trabalho, foram feitos modelos de OPLS-DA pareados com o progressivo tempo do bioensaio de herbivoria. A validação do método foi realizada por meio da validação cruzada junto com a análise de variância (CV-ANOVA, $p < 0.05$), e os metabólitos discriminantes foram selecionados com valor de correlação Pearson ($r > |0,576|$). 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). A tabela 2 mostra os metabólitos discriminantes entre os tratamentos controle e herbivoria foram identificados através do S-line (Figuras 44, 45 e 46) gerado no programa SIMCA-P (carregamentos da OPLS-DA), no qual os picos com alta correlação no estudo da resposta da planta a herbivoria possuem cores vermelhas enquanto que os picos com baixa correlação possuem cores azuis. Como pode ser visualizado na tabela 2, os modelos OPLS-DA foram validados nos tempos 48, 72 e 96 horas após o início do ataque da *Diatraea saccharalis*, e não foi possível identificar diferenças após 24 horas de herbivoria ($p > 0,05$). Houve um aumento nas concentrações de isoleucina, valina, malato, tirosina, fenilalanina, treonina após 48, 72 e 96 horas de herbivoria. Os níveis de asparagina foram elevados apenas nos tempos 48 e 72 horas. Os escores da OPLS-DA e seus respectivos gráficos S-line contendo os metabólitos discriminantes para os tempos de herbivoria 48, 72 e 96 horas estão apresentados nas figuras 44, 45 e 46.

Tabela 2 - Metabólitos discriminantes em folhas da cana-de-açúcar da variedade RB92579 em resposta a herbivoria por *Diatraea saccharalis* identificados por S-line plot através de modelos da O-PLS-DA. *Os valores de *p* resultantes da validação cruzada ANOVA e valores de correlação positiva (*r*) para os metabólitos referente a herbivoria.

Metabólitos	Deslocamento Químico	C24xH24/R ² =0.447 and Q ² =-0.0605, p = 1	C48xH48/R ² =0.619 and Q ² =-0.314, p = 0,008	C72xH72/R ² =0.655 and Q ² =-0.514, p = 3,389x10 ⁻⁵	C96xH96/R ² =0.844 and Q ² =-0.723, p = 8x10 ⁻⁹
Asparagina	2.82(dd), 2.95(dd), 3.95(dd)		r = +0.670	r = +0.590	
Ácido aspártico	3.90(m), 2.80(m), 2.64(m)			r = +0.674	
Dimethylamine	2.71(s)			r = +0.585	
Ácido glutâmico	3.70(m), 2.40(m), 2.05(m)			r = +0.885	
Isoleucina	0.95(t), 1.02(d), 1.25(m), 1.45(m), 1.96(m), 3.66(d)		r = +0.762	r = +0.886	r = +0.626
Ácido málico	2.461(dd), 2.72(dd), 4.29(dd)		r = +0.605	r = +0.838	r = +0.726
Fenil-lactato	3.01(dd), 3.08(dd), 4.23(dd), 7.33(m), 7.40(m)		r = +0.766	r = +0.768	r = +0.788
Treonina/Ácido láctico	1.33(d), 3.60(d), 4.26 (m)		r = +0.815	r = +0.679	r = +0.685
Tirosina	3.02(dd), 3.17(dd), 3.92(dd), 6.85(m), 7.18(m)		r = +0.737	r = +0.860	r = +0.725
Valina	1.00(d), 1.05(d), 2.26(m), 3.60(d)		r = +0.728	r = +0.797	r = +0.773

Fonte: Autor 2017.

Figura 44 - (A) Escores da O-PLS-DA das amostras controle 48 horas e herbivoria 48 horas. (B) Gráfico S-line mostrando os metabólitos discriminantes, sinais com fase positiva referem-se as amostras herbivoria e sinais com fase negativa referem-se as amostras controle.

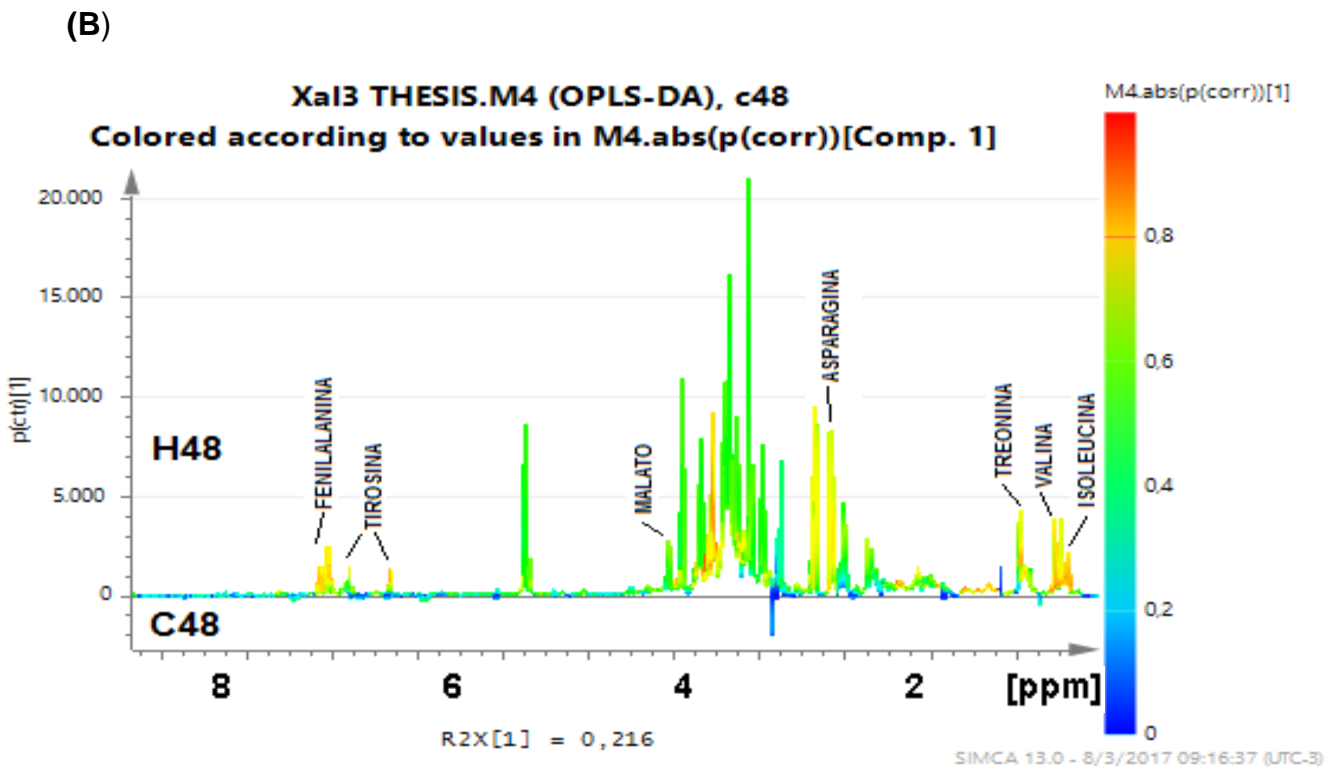
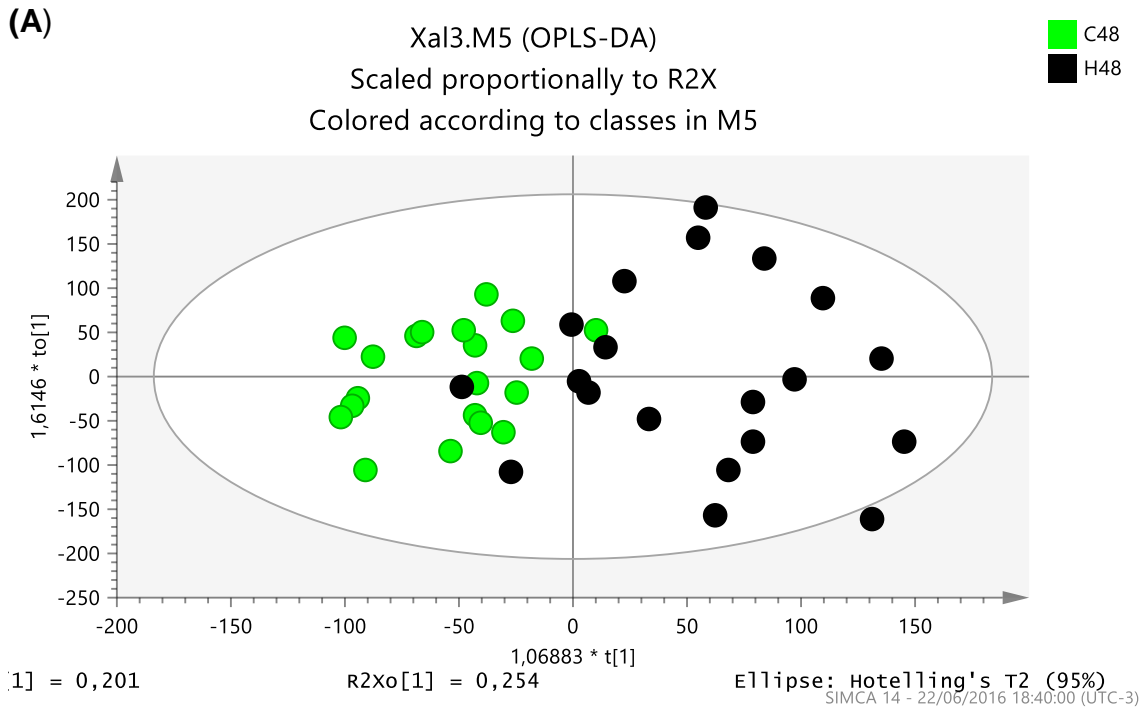


Figura 45 - (A) Escores da O-PLS-DA das amostras controle 72 horas e herbivoria 72 horas. (B) Gráfico S-line mostrando os metabólitos discriminantes, sinais com fase positiva referem-se as amostras herbivoria e sinais com fase negativa referem-se as amostras controle.

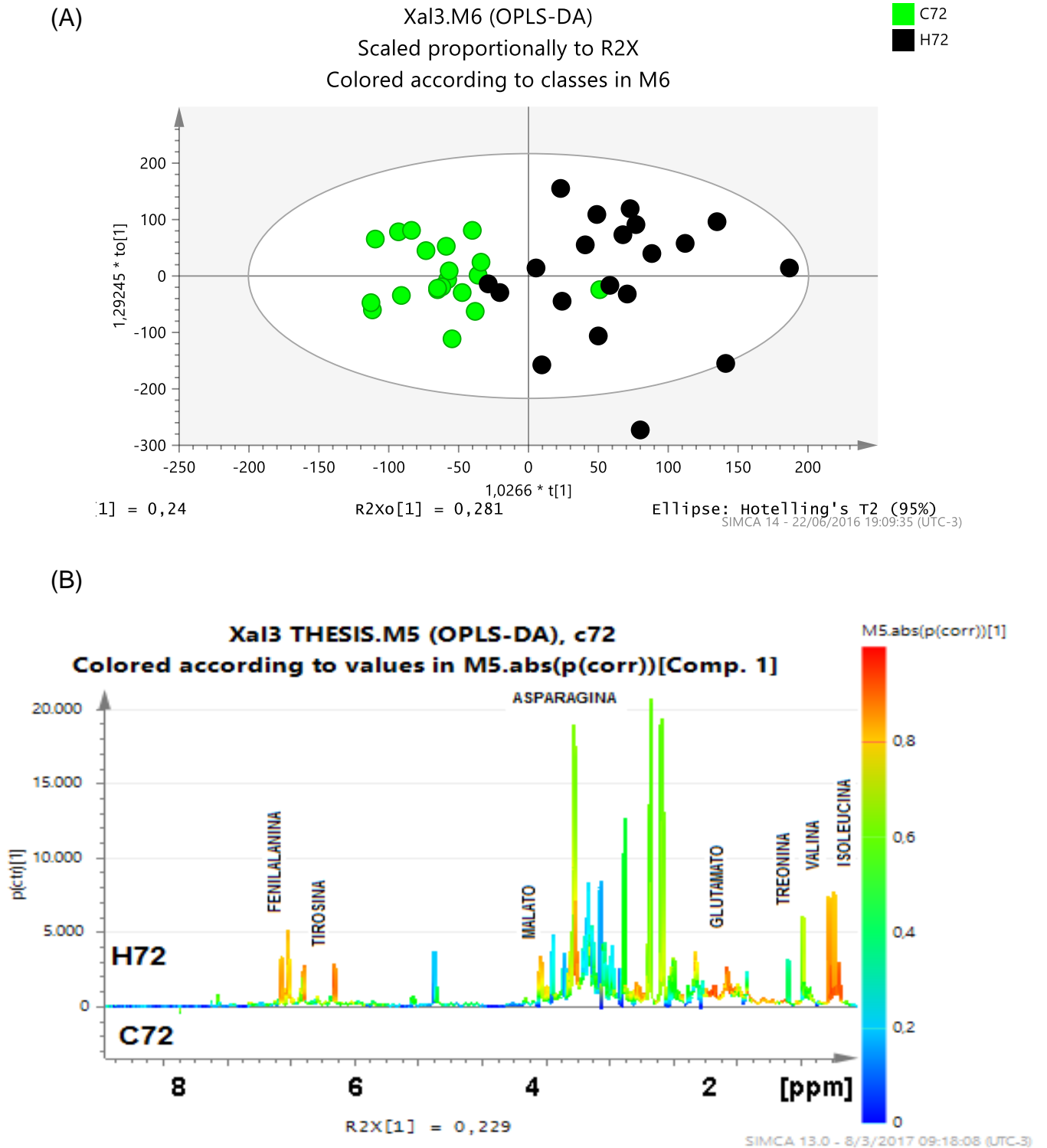
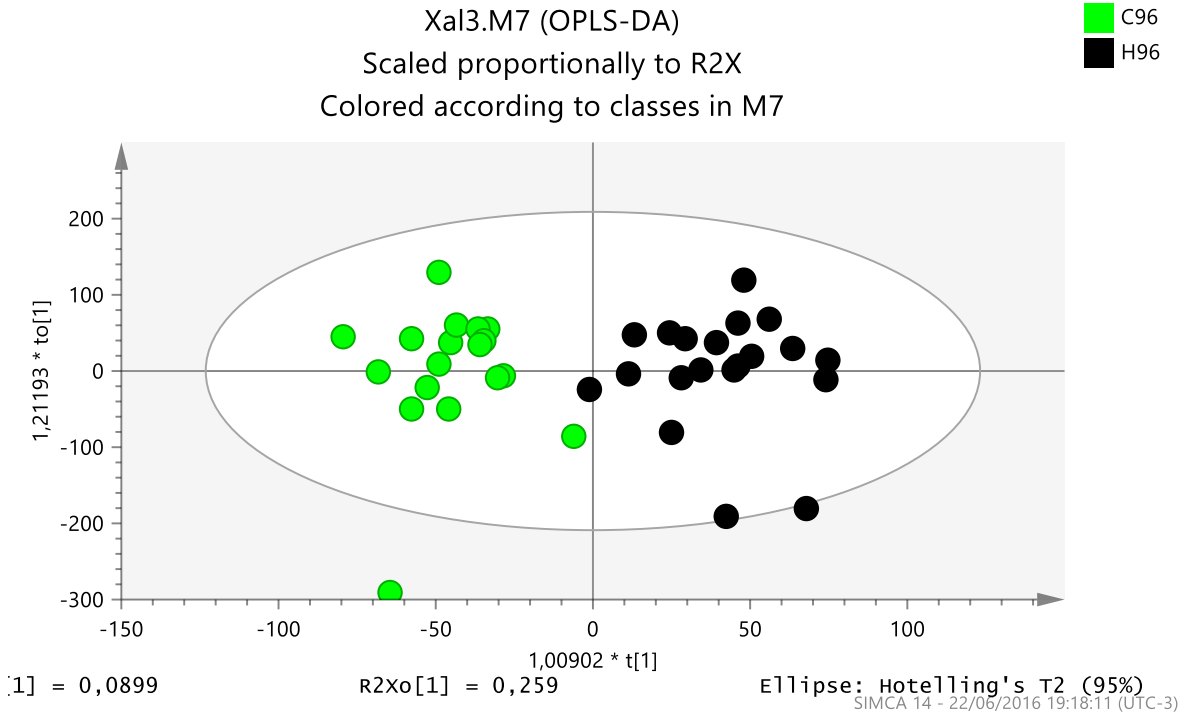
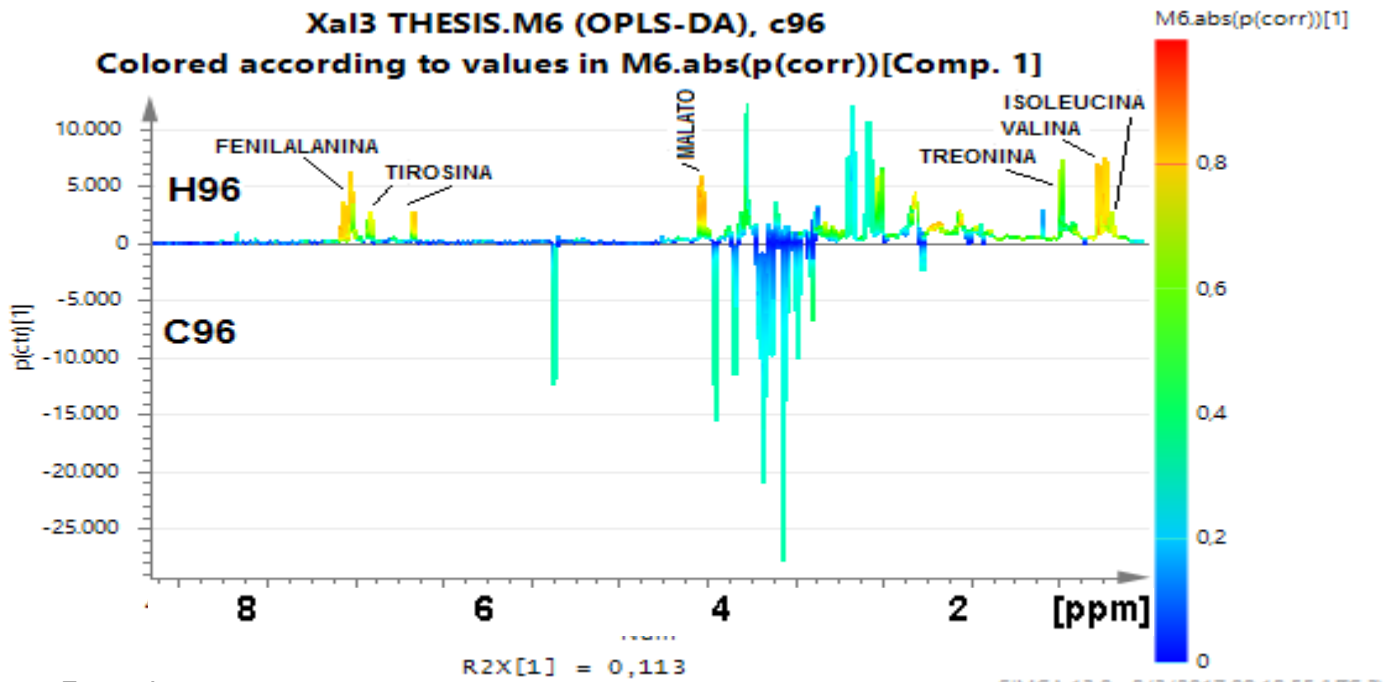


Figura 46 - (A) Os escores da O-PLS-DA das amostras controle 96 horas e herbivoria 96 horas. (B) Gráfico S-line mostrando os metabólitos discriminantes e negativa referem-se as amostras controle.

(A)



(B)

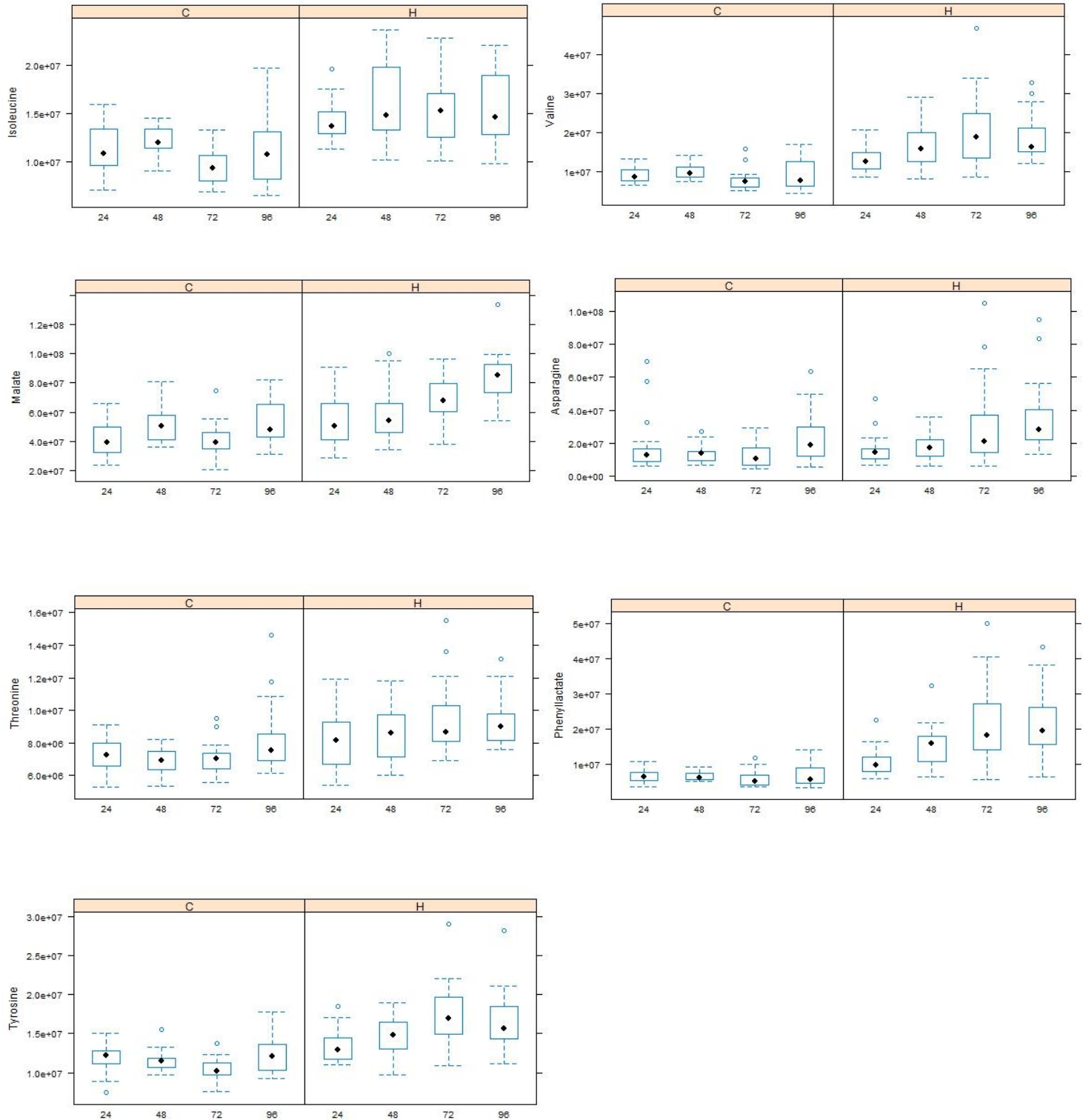


Fonte: Autor 2017.

A figura 47 mostra o comportamento dos níveis dos metabólitos discriminantes da folha da cana-de-açúcar em resposta a herbivoria por meio do gráfico boxplot, que foi construído através das integrais das áreas dos sinais de RMN processados no software Matlab. Estes metabólitos apresentaram variância significativa (ANOVA) com valor de $p < 0,05$. Ao analisar os gráficos boxplots foi observado uma tendência de aumento dos níveis dos metabólitos valina, isoleucina, ácido málico, asparagina, treonina, tirosina e de um metabólito aromático identificado (possivelmente fenilalanina) de 24 horas até 72 horas de herbivoria. No tempo 96 horas houve uma interrupção do aumento dos níveis desses metabólitos com exceção da asparagina e ácido málico, evidenciando uma resposta máxima da planta no tempo 72 horas que confere com resultado do gráfico S-line da OPLS-DA do tempo 72 horas que apresentou um maior número de metabólitos de resposta a herbivoria (ver tabela 2).

No tempo 72 horas há todos os metabólitos discriminantes de resposta da cana-de-açúcar de variedade RB 92579 a *Diatraea saccharalis*, e por este motivo, a discussão se baseará somente neste tempo de herbivoria. De modo geral, houve apenas o aumento na concentração de metabólitos primários (aminoácidos e ácidos orgânicos) nas folhas da cana-de-açúcar dessa variedade após o estresse induzido.

Figura 47 - Boxplot das concentrações relativas dos metabólitos discriminantes em resposta da cana-de-açúcar a herbivoria. Comparação entre C = controle e H = herbivoria nos tempos estudados (Teste t – pareado entre controle e herbivoria no tempo estudado, $p < 0,05$).



Fonte: Autor 2017.

5.5.2 Séries pareadas de análises discriminantes ortogonal por mínimos quadrados parciais (OPLS-DA) comparando as amostras controles (variedade RB92579)

A OPLS-DA foi realizada para verificar as diferenças entre as amostras controle durante o curso do bioensaio. A validação do método foi realizada por meio da validação cruzada junto com a análise de variância (CV-ANOVA, $p < 0.05$), e os metabólitos discriminantes foram selecionados com valor de correlação Pearson ($r > |0,576|$). A tabela 3 mostra os metabólitos discriminantes entre os tratamentos controle que foram identificados através do S-line (Figuras 46, 47 e 48) gerado no programa SIMCA-P (carregamentos da OPLS-DA), no qual os picos com alta correlação no estudo da resposta da planta a herbivoria possuem cores vermelhas enquanto que os picos com baixa correlação possuem cores azuis. Como pode ser visto na tabela 3, os modelos OPLS-DA foram validados nos estudos de comparação entre C24 x C48, C24 x C72, C24 x C96, C48 x C72 e C48 x C96. No estudo C24 x C48 houve um aumento de tirosina, ácido clorogênico e uma redução de ácido aspártico e trigonelina nas amostras C48. No estudo C24 x C72 ocorreu a diminuição dos níveis de ácido aspártico, dimetilamina, ácido glutâmico e acetato nas amostras C72. Houve a redução de ácido aspártico e o aumento de sacarose e ácido gálico nas plantas C96 no estudo C24 x C96. No estudo C48 x C72 houve diminuição dos metabólitos ácido málico, tirosina, ácido aspártico, ácido clorogênico e ácido glutâmico nas amostras C72. Já no estudo C48 x C96 houve elevação dos metabólitos ácido málico, tirosina, asparagina, sacarose, trigonelina e ácido trans-aconítico nas plantas C96. Não houve diferenças no estudo C72 x C96 ($p > 0,05$).

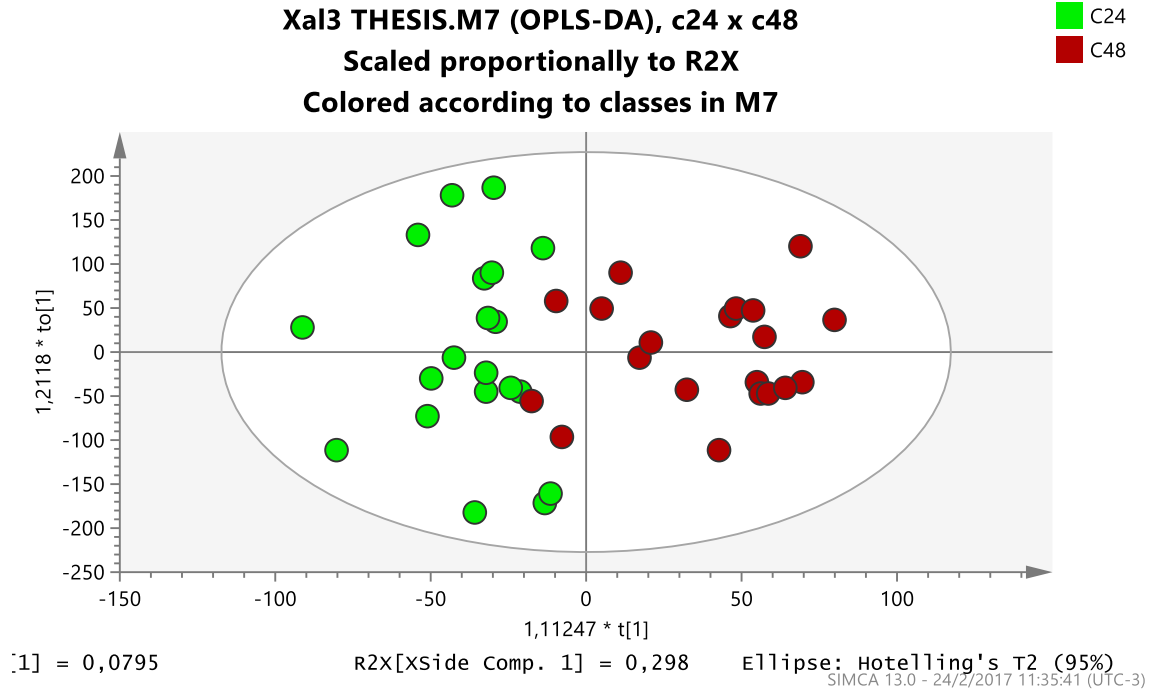
Tabela 3 - Metabólitos discriminantes nas folhas da cana-de-açúcar de variedade RB92579 das amostras controle durante o curso do bioensaio identificados por S-line plot através de modelos da O-PLS-DA. *Os valores de p resultantes da validação cruzada ANOVA e valores de correlação (r) positiva para os metabólitos referente as plantas com maior tempo de vida.

Metabólitos	C24xC48/R ² =0, 698 e Q ² = 0,286, p = 0,016	C24xC72/R ² =0, 678 e Q ² =0,476, p = 0,0001	C24xC96/R ² =0, 726 e Q ² =0,511, p = 7,11x10 ⁻⁵	C48xC96/R ² =0, 621 e Q ² =0,403, p = 0,0015	C48xC72/R ² =0, 740 e Q ² =0,596, p = 1,47x10 ⁻⁶	C72xC96/R ² =0, 524 e Q ² =0,165, p = 0,189
Acetato		-0,666				
Ácido clorogênico	+0,749			-0,662		
Ácido málico				-0,577	+0,798	
Ácido Trans Aconitic					+0,645	
Asparagina					+0,671	
Aspartato	-0,762	-0,834	-0,705	-0,610		
Dimetilamina		-0,641				
Glutamato		-0,637		-0,772		
Sacarose			+0,666		+0,637	
Tirosina	+0,648			-0,661	+0,267	
Trigonelina	-0,646				+0,767	

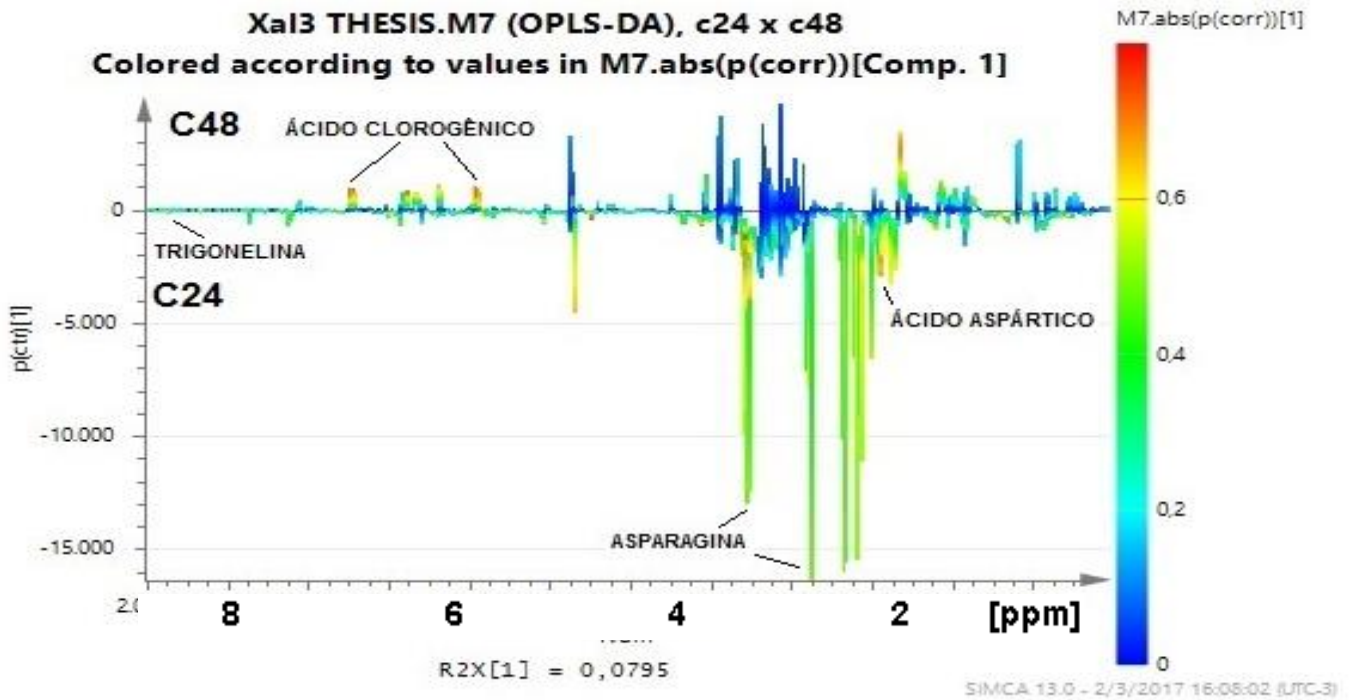
Fonte: Autor 2017.

Figura 48 - (A) Escores da O-PLS-DA do estudo C24 x C48. (B) Gráfico S-line mostrando os metabólitos discriminantes

(A)

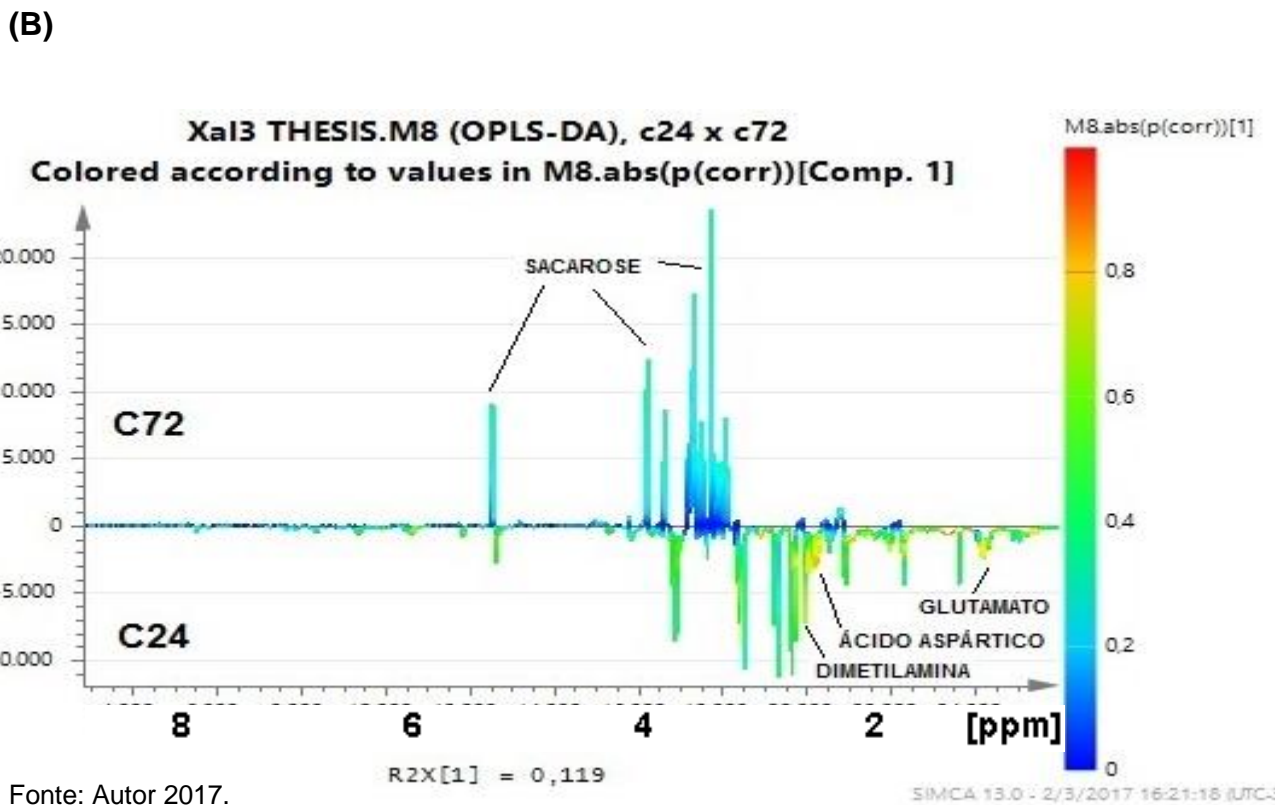
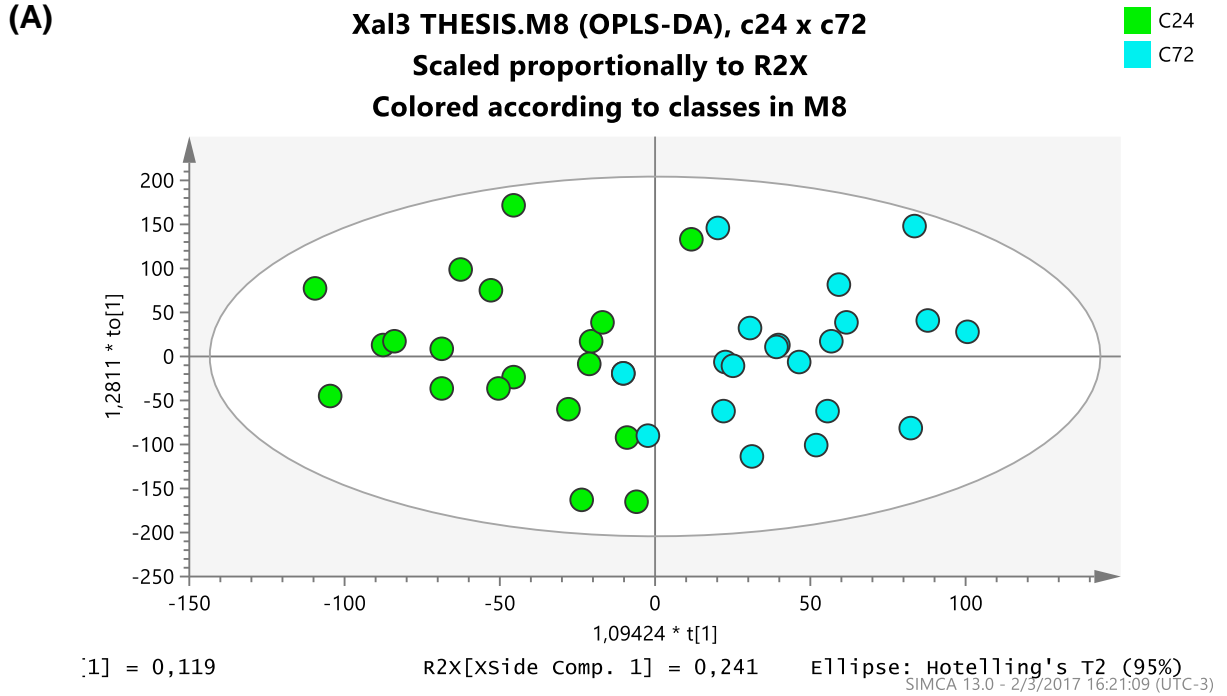


(B)



Fonte: Autor 2017.

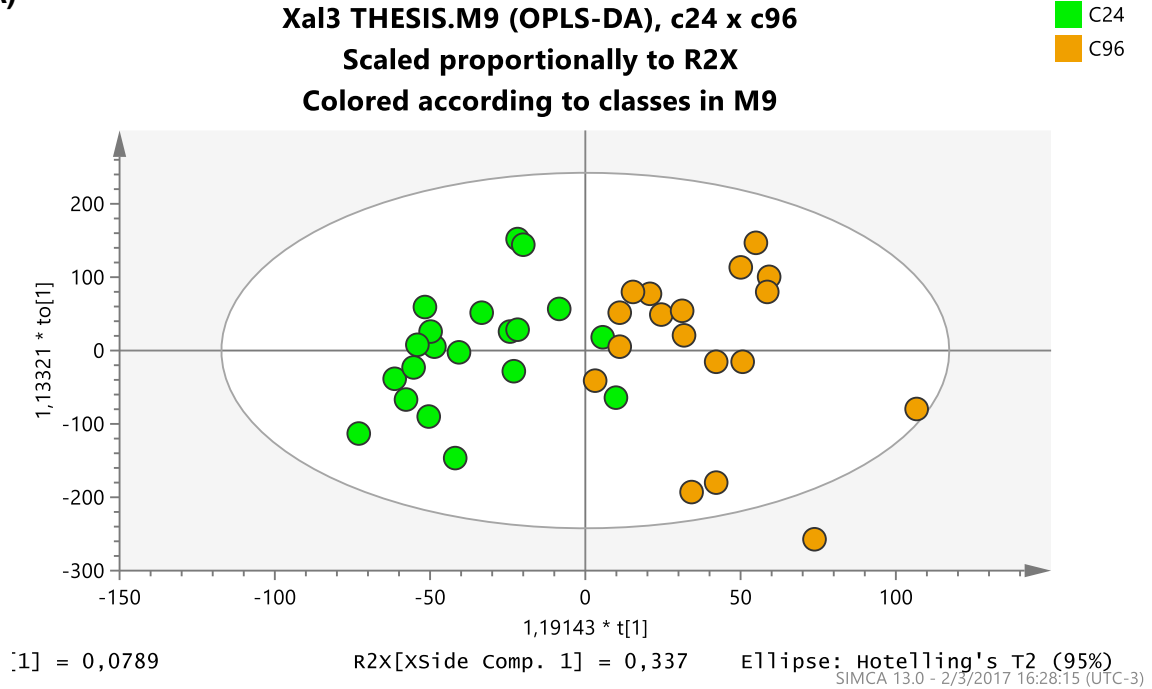
Figura 49 - (A) Escores da O-PLS-DA do estudo C24 x C72. (B) Gráfico S-line mostrando os metabólitos discriminantes.



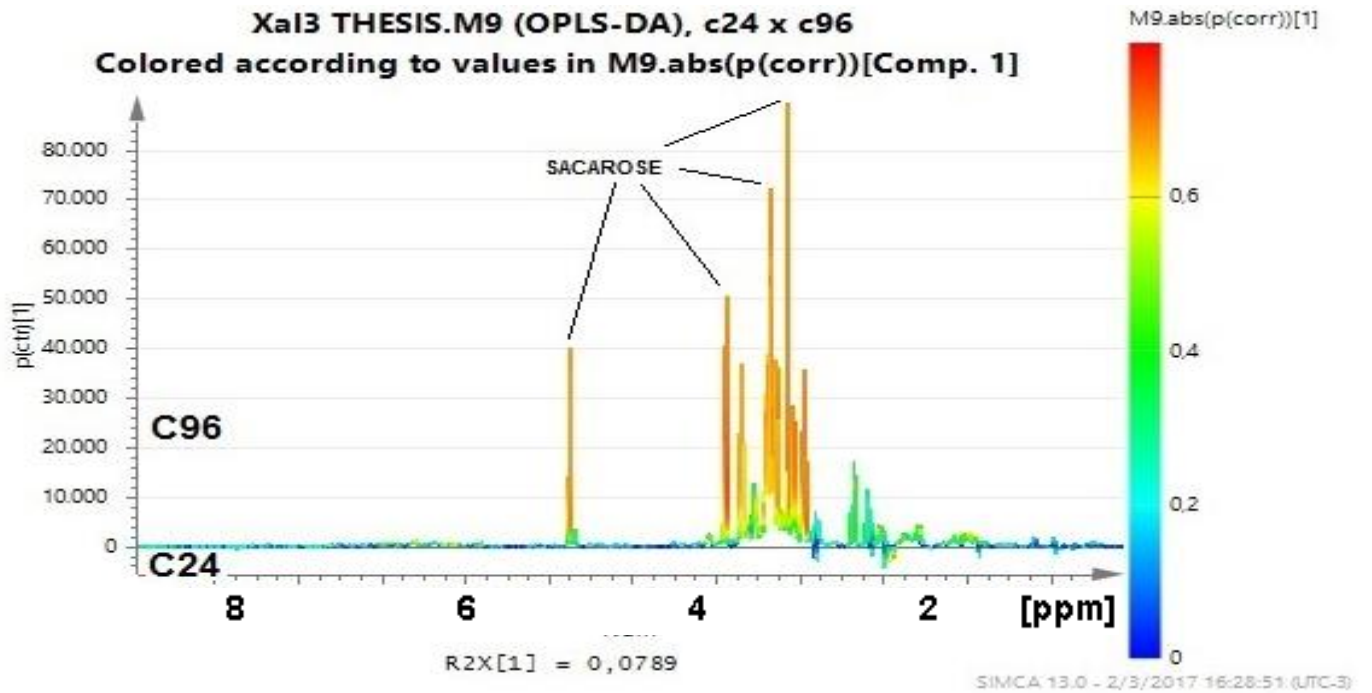
Fonte: Autor 2017.

Figura 50 - (A) Escores da O-PLS-DA do estudo C24 x C96. (B) Gráfico S-line mostrando os metabólitos discriminantes.

(A)



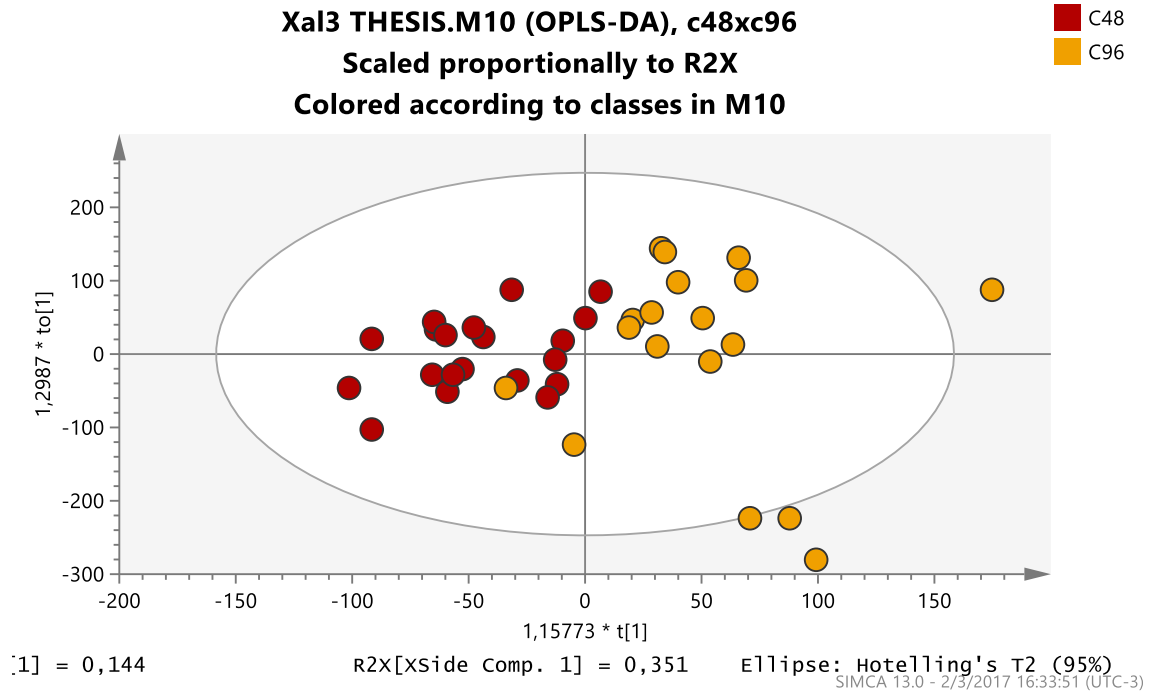
(B)



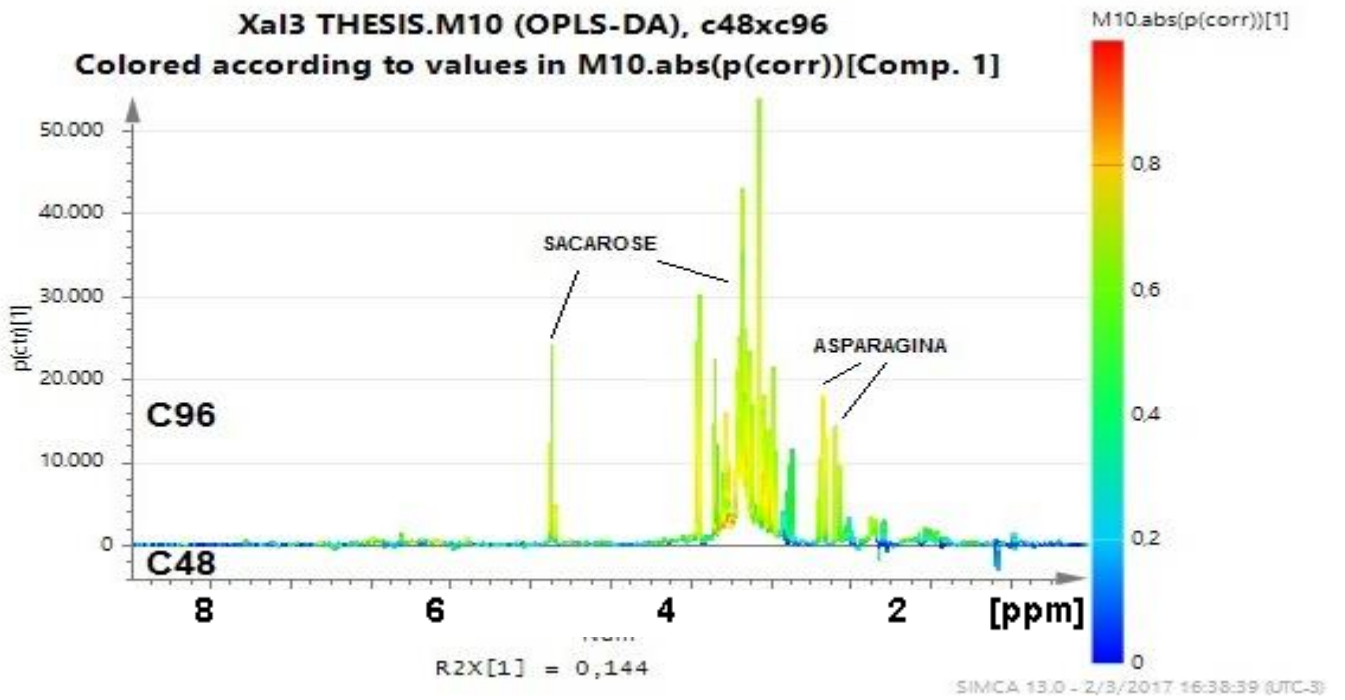
Fonte: Autor 2017.

Figura 51 - (A) Escores da O-PLS-DA do estudo C48 x C96. (B) Gráfico S-line mostrando os metabólitos discriminantes.

(A)



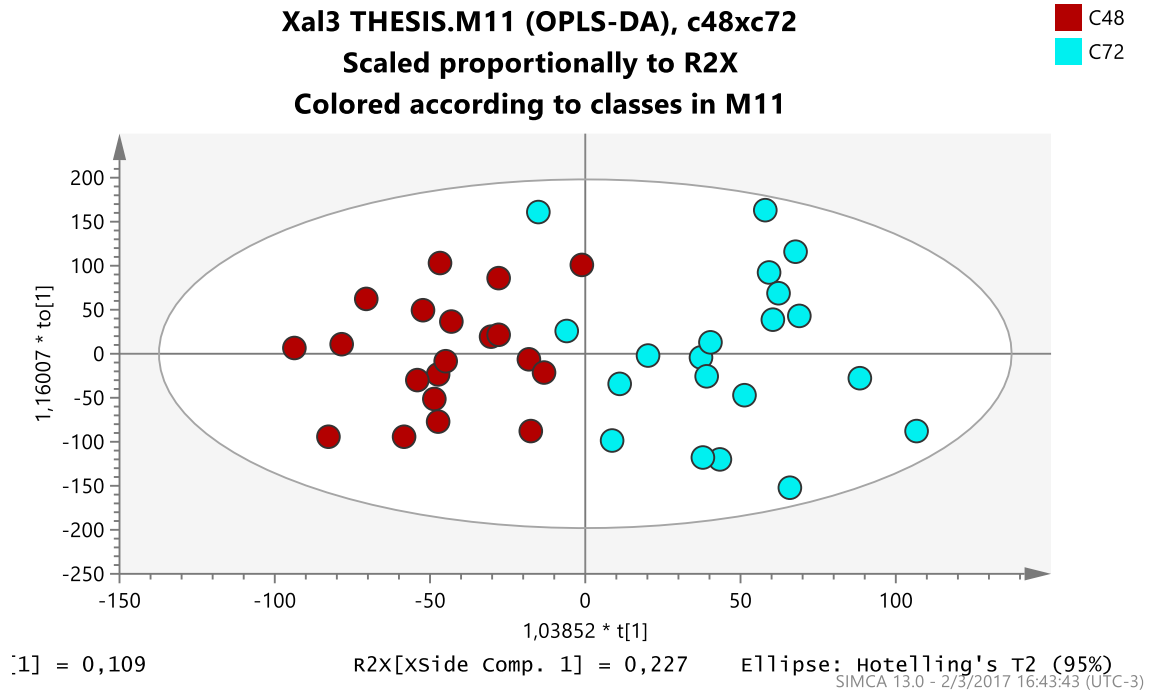
(B)



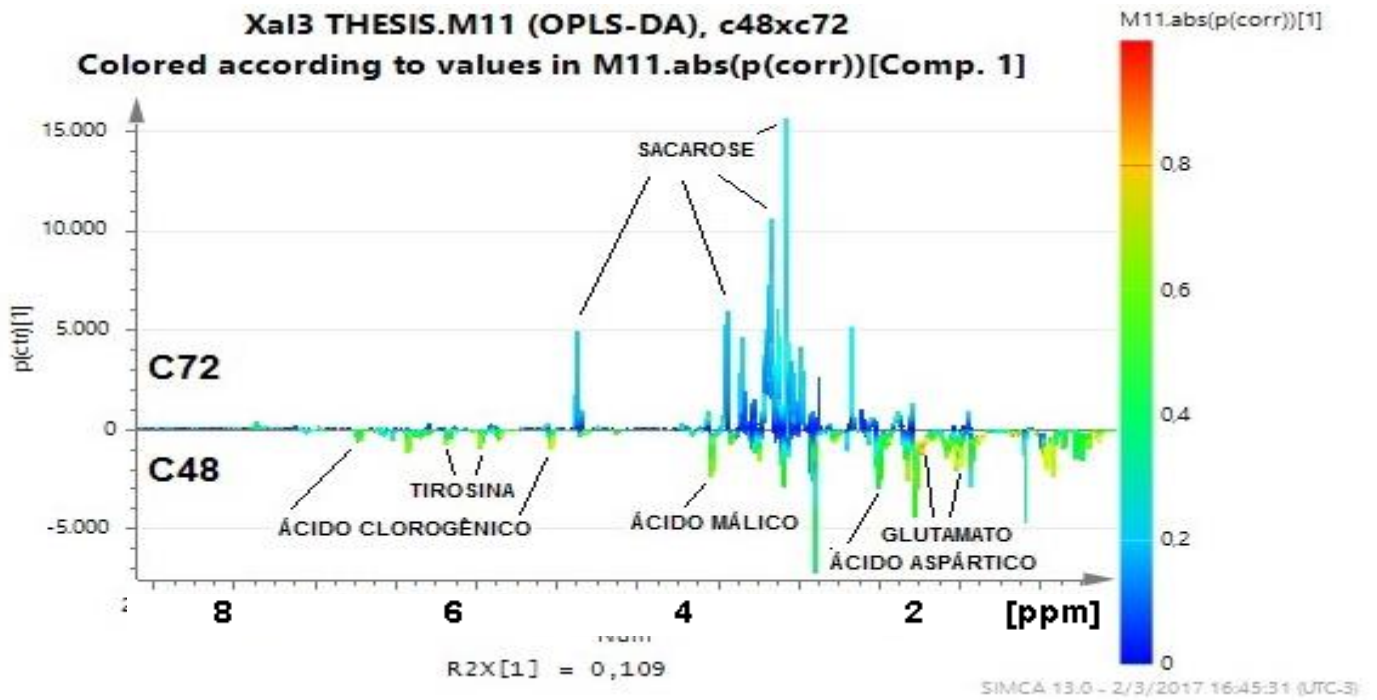
Fonte: Autor 2017.

Figura 52 - (A) Escores da O-PLS-DA do estudo C48 x C72. (B) Gráfico S-line mostrando os metabólitos discriminantes.

(A)



(B)



Fonte: Autor 2017.

5.5.3 Séries pareadas de análises discriminantes ortogonal por mínimos quadrados parciais (OPLS-DA) comparando as amostras sob herbivoria (variedade RB92579)

A OPLS-DA foi realizada para verificar se há diferenças entre as amostras sob herbivoria durante o curso do bioensaio. A validação do método foi realizada por meio da validação cruzada junto com a análise de variância (CV-ANOVA, $p < 0.05$), e os metabólitos discriminantes foram selecionados com valor de correlação Pearson ($r > |0,576|$). A tabela 4 mostra os metabólitos discriminantes entre os cultivares controle que foram identificados através do S-line (Figuras 53, 54, 55, 56 e 57) gerado no programa SIMCA-P (carregamentos da OPLS-DA), no qual os picos com alta correlação no estudo da resposta da planta a herbivoria possuem cores vermelhas enquanto que os picos com baixa correlação possuem cores azuis. Como pode ser visto na tabela 4, os modelos OPLS-DA foram validados nos estudos de comparação entre H24 x H72, H24 x H96, H48 x H72, H48 x H96. No estudo H24 x H72 houve um aumento de isoleucina, valina, ácido málico, tirosina, fenilalanina, ácido aspártico e treonina nas amostras H72. Ao comparar as amostras H24 x H96 ocorreu uma elevação dos metabólitos valina, tirosina, fenilalanina, asparagina e treonina nas plantas H96. Aumento de aminoácidos aromáticos tirosina e fenilalanina foram observados no estudo H48 x H72 nas amostras H72. No estudo H48 x H96 houve elevação de fenilalanina e ácido málico nas plantas H96. Nos estudos H24 x H48 e H72 x H96 não houveram diferenças ($p > 0,05$) conforme mostrado na tabela 4. Os escores da OPLS-DA e seus respectivos gráficos S-line contendo os metabólitos discriminantes na comparação entre as amostras sob herbivoria estão apresentados nas figuras 46, 47 e 48. Nos gráficos S-line, embora a sacarose não tenha sido um metabólito discriminante, foi observado uma maior concentração da mesma nas amostras com maior tempo de vida.

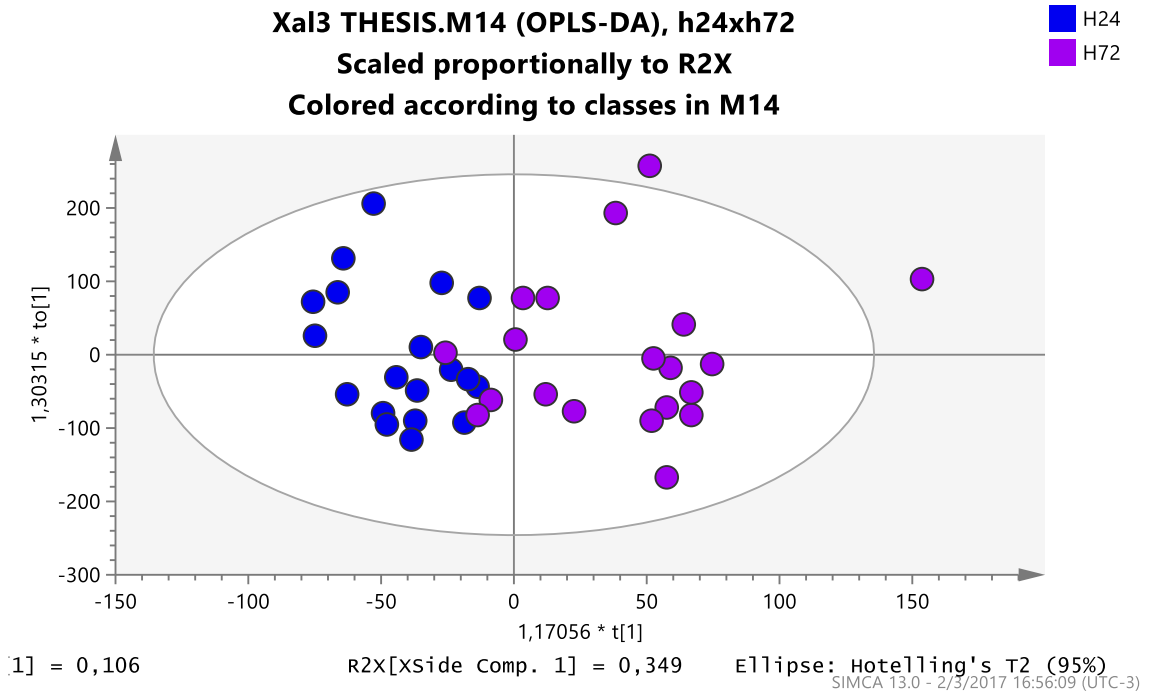
Tabela 4 - Metabólitos discriminantes nas folhas da cana-de-açúcar de variedade RB92579 das amostras sob herbivoria durante o curso do bioensaio identificados por S-line plot através de modelos da O-PLS-DA. *Os valores de p resultantes da validação cruzada ANOVA e valores de correlação (r) positiva para os metabólitos referente as plantas com maior tempo sob herbivoria.

Metabólitos	H24xH48/R ² =0 ,577 e Q ² = - 0,138, p = 1	H24xH72/R ² =0 ,625 e Q ² =0,434, p = 0,0005	H24xH96/R ² =0 ,781 e Q ² =0,461, p = 0,0002	H48xH96/R ² =0 ,736 e Q ² =0,409, p = 0,0008	H48xH72/R ² =0 ,620 e Q ² =0,308, p = 0,0102	H72xH96/R ² =0 ,559 e Q ² =0,294, p = 0,0138
Isoleucina		+0,685				
Valina		+0,759	+0,649			
Ácido málico					+0,608	
Tirosina		+0,802	+0,658	+0,676	+0,687	+0,583
Fenilalanina		+0,797	+0,767	+0,613	+0,668	
Asparagina			+0,631		+0,633	
Glutamato				+0,739		+0,751
Treonina		0,693	0,702			

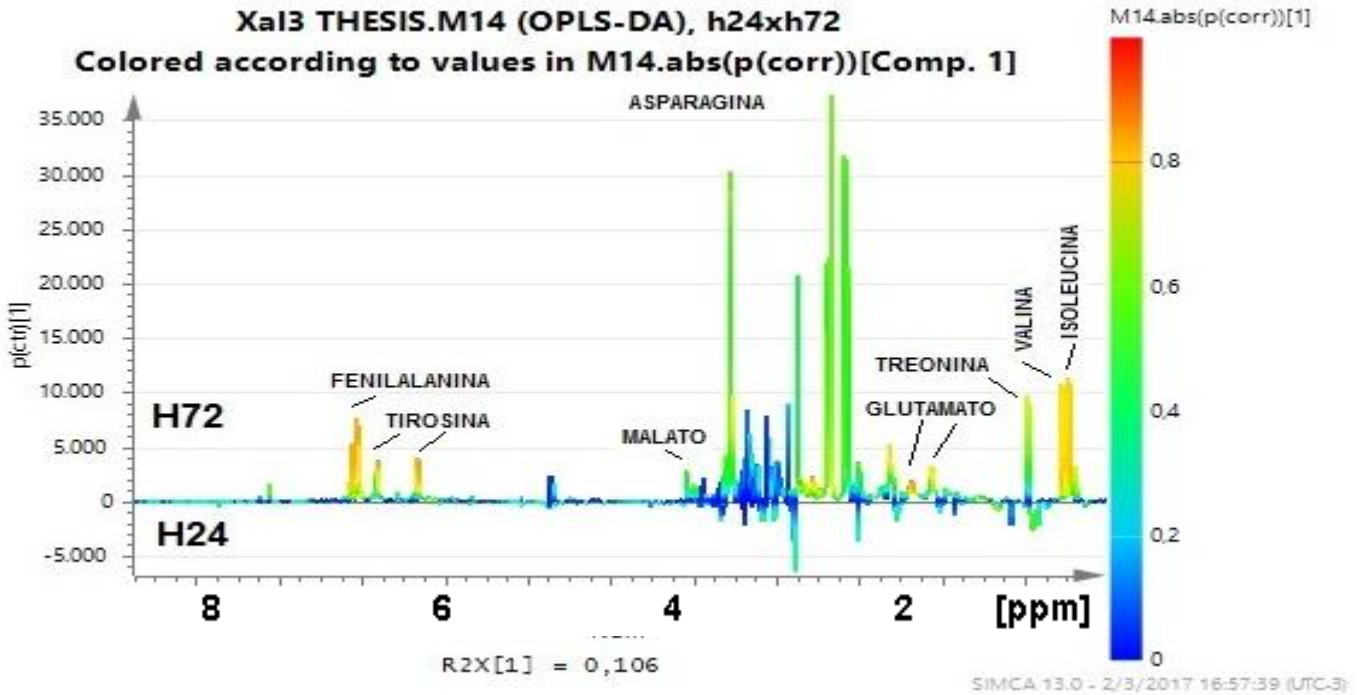
Fonte: Autor 2017.

Figura 53 - (A) Escores da O-PLS-DA do estudo H24 x H72. (B) Gráfico S-line mostrando os metabólitos discriminantes

(A)



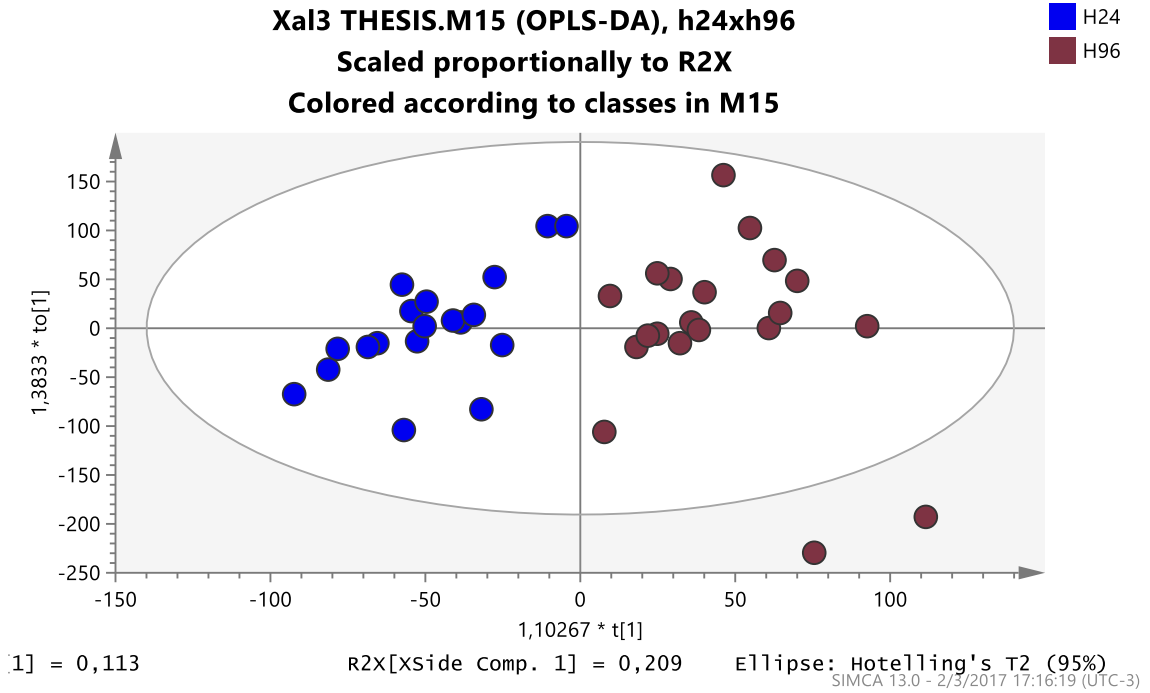
(B)



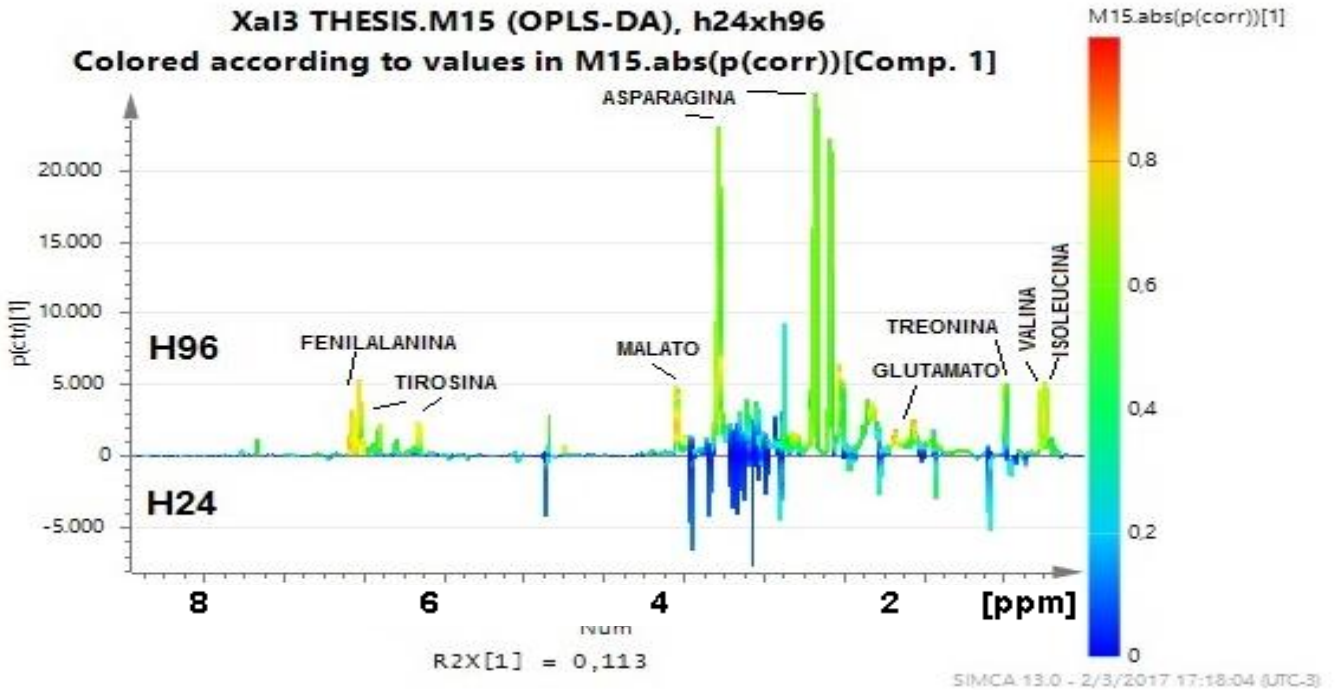
Fonte: Autor 2017.

Figura 54 - (A) Escores da O-PLS-DA do estudo H24 x H96. (B) Gráfico S-line mostrando os metabólitos discriminantes

(A)



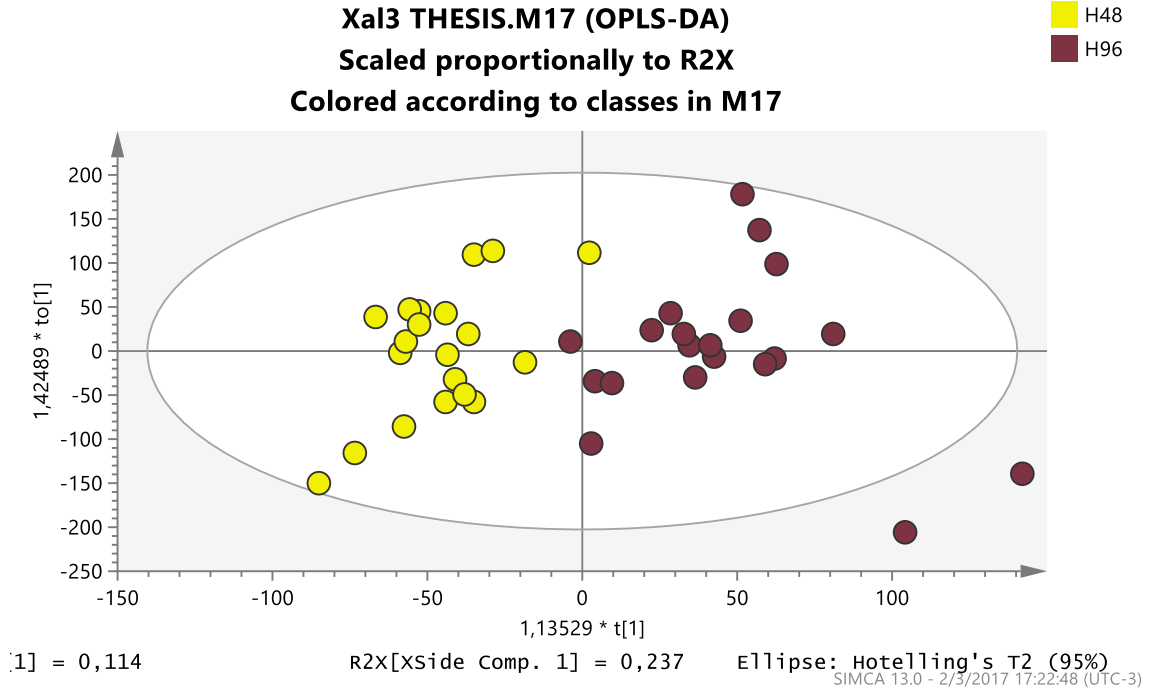
(B)



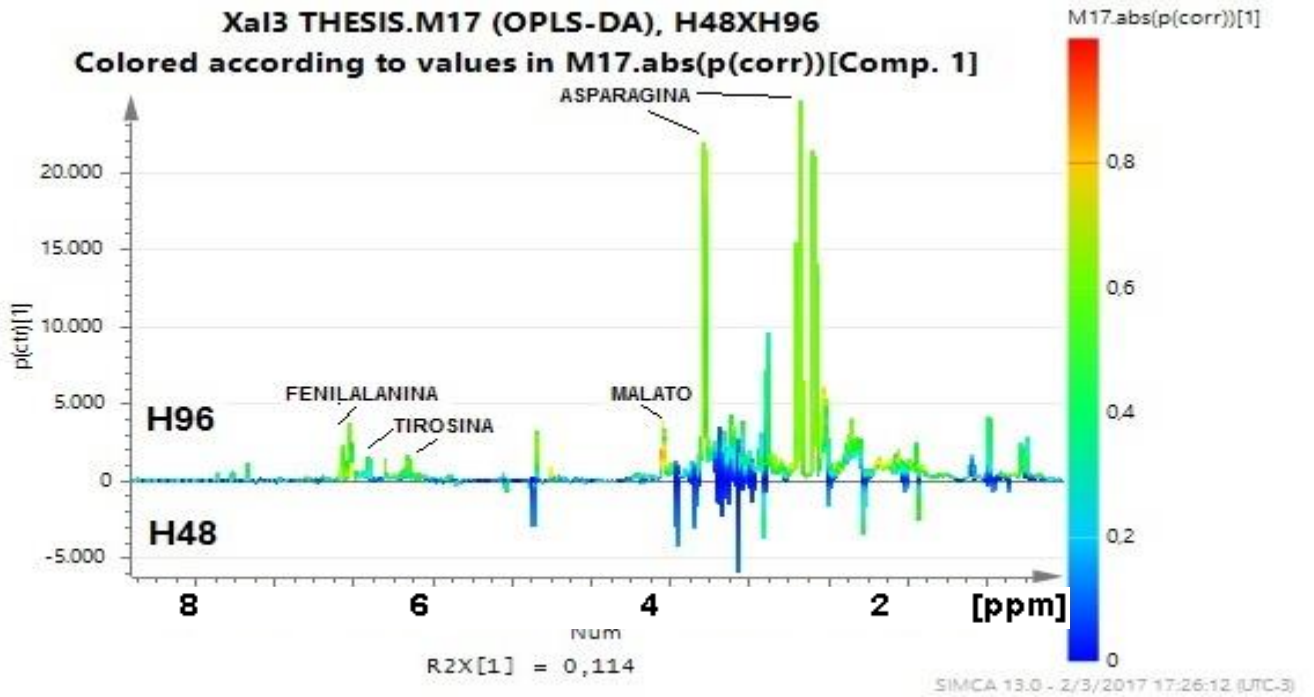
Fonte: Autor 2017.

Figura 55 - (A) Escores da O-PLS-DA do estudo H48 x H96. (B) Gráfico S-line mostrando os metabólitos discriminantes

(A)



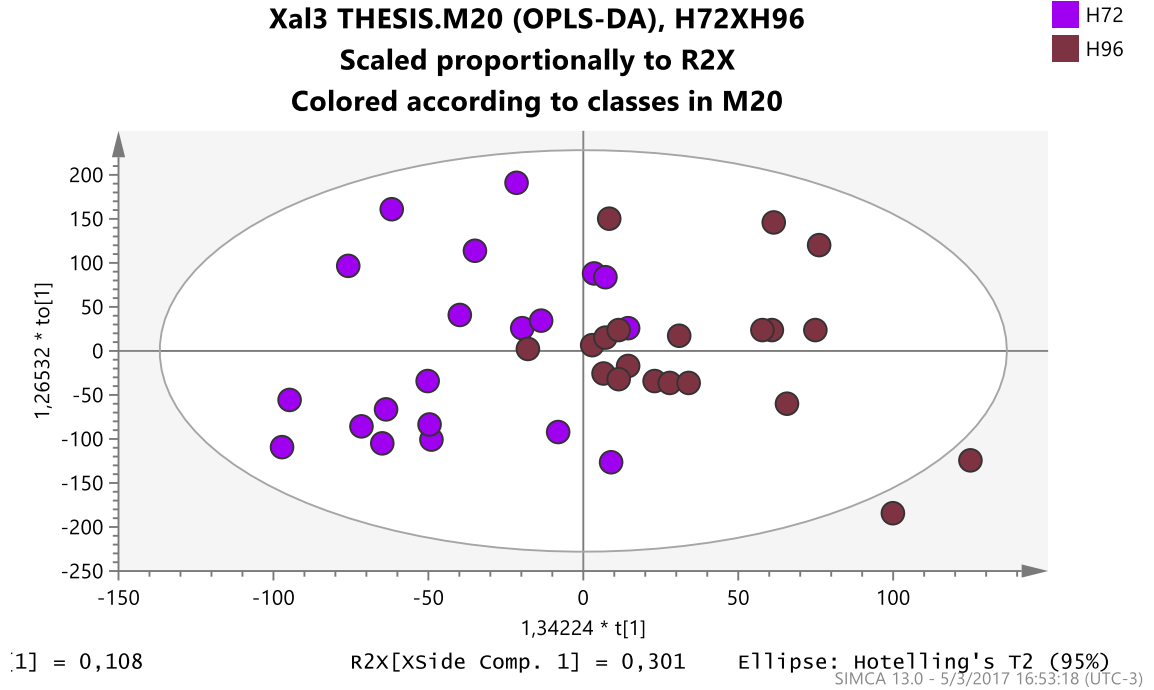
(B)



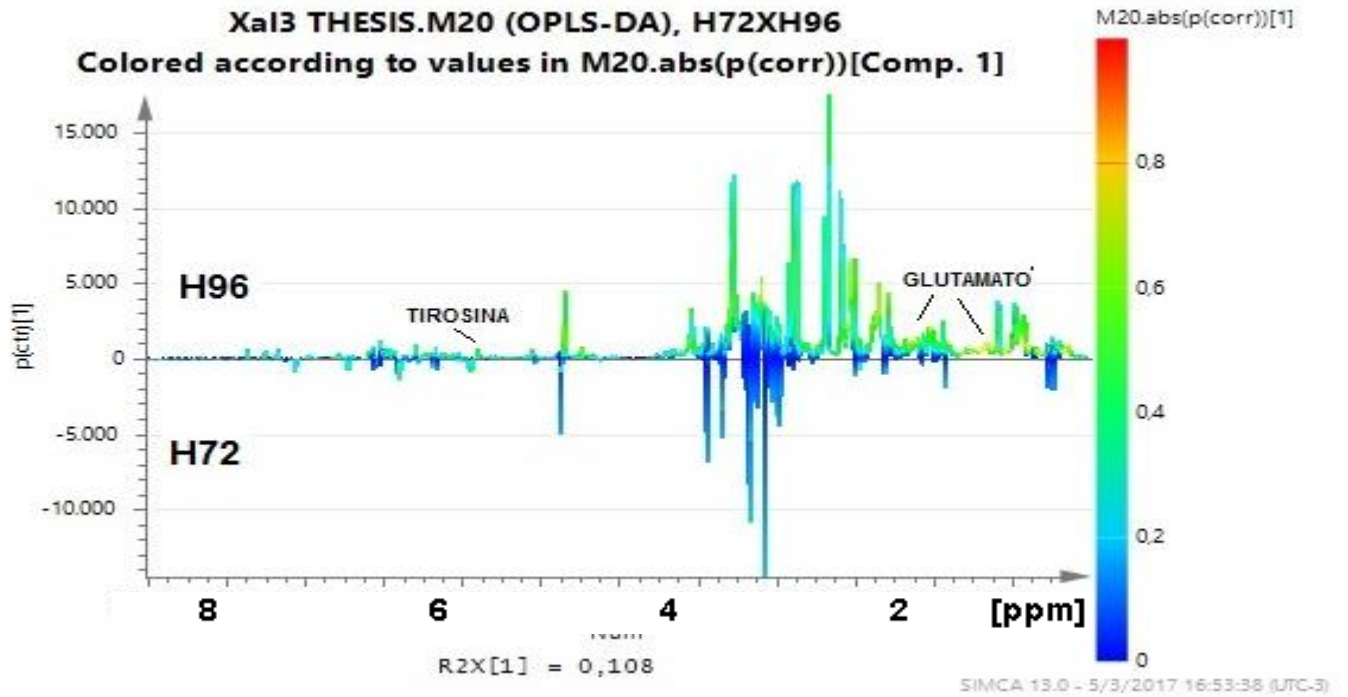
Fonte: Autor 2017.

Figura 56 - (A) Escores da O-PLS-DA do estudo H72 x H96. (B) Gráfico S-line mostrando os metabólitos discriminantes

(A)



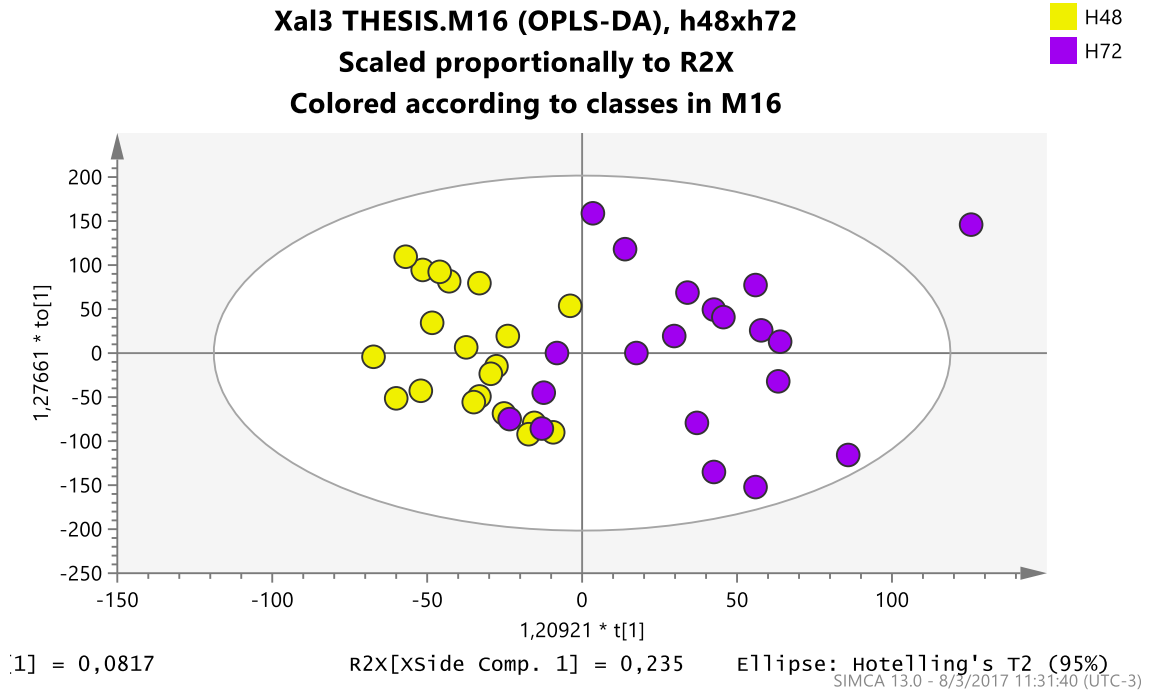
(B)



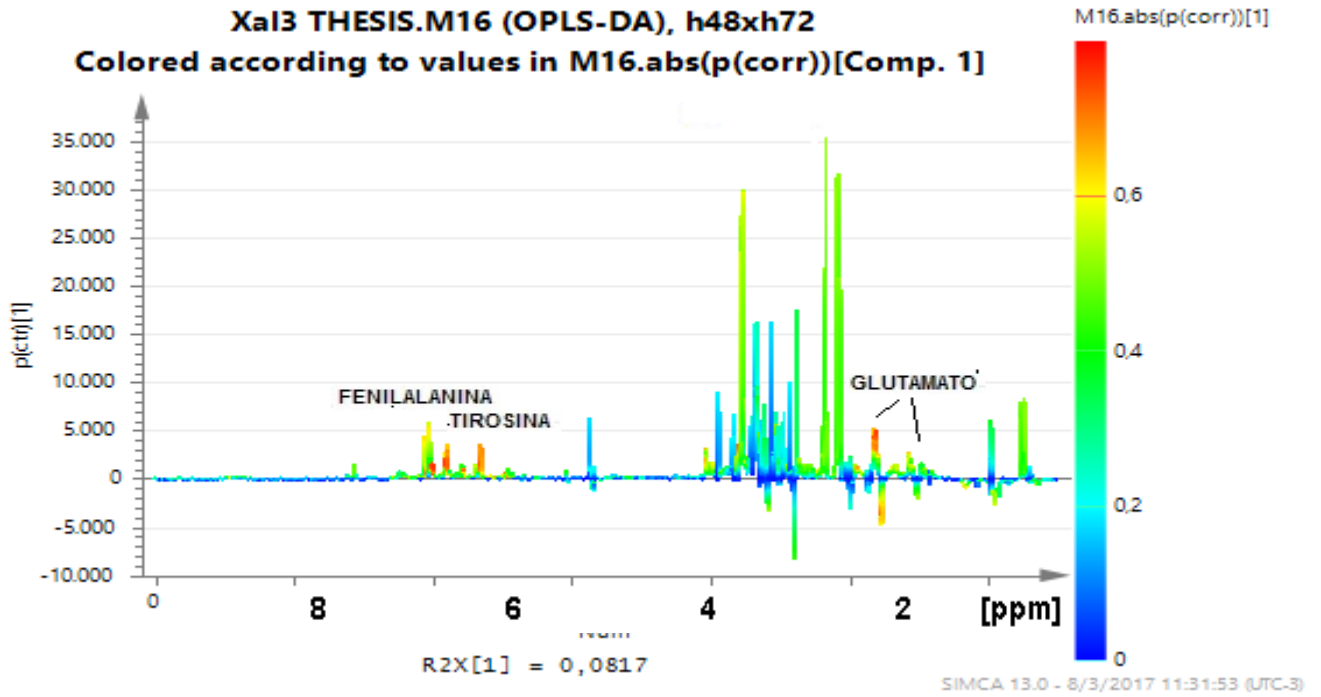
Fonte: Autor 2017.

Figura 57 - (A) Escores da O-PLS-DA do estudo H48 x H72. (B) Gráfico S-line mostrando os metabólitos discriminantes

(A)



(B)

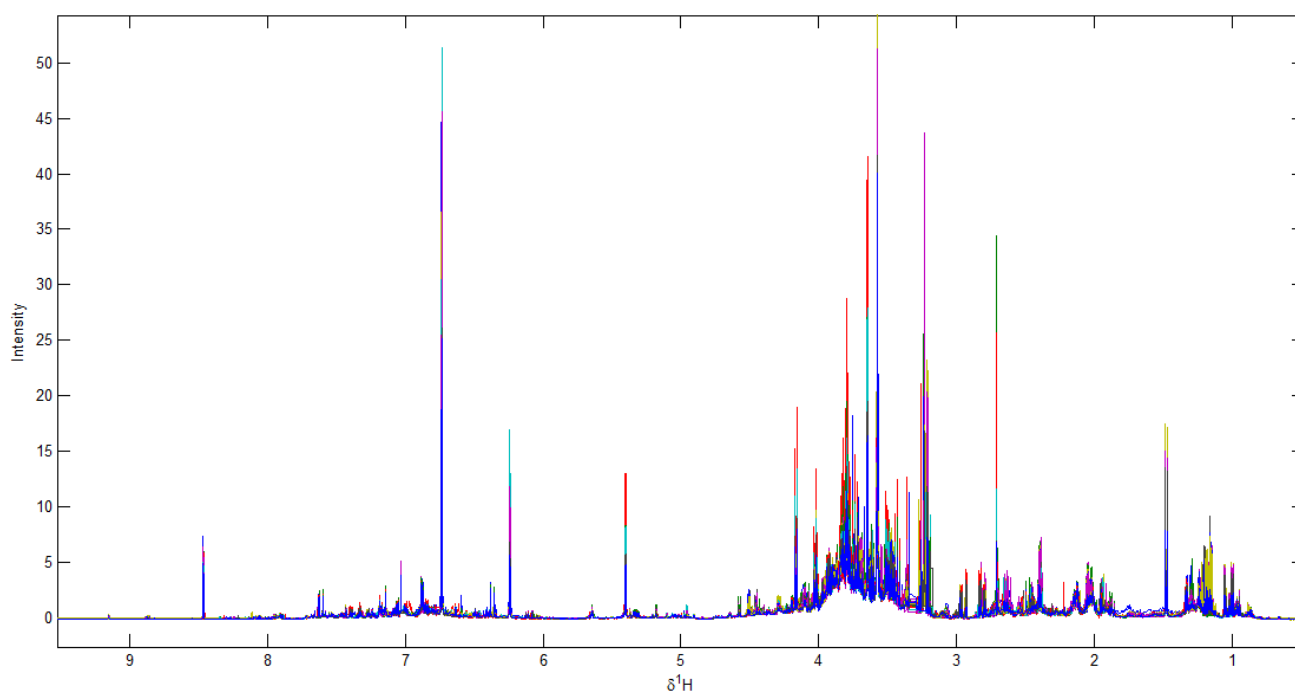


Fonte: Autor 2017.

5.6 Análise multivariada da variedade SP791011 da cana-de-açúcar pelo método de extração indireta

Um total de 36 espectros de RMN de amostras controle e herbivoria foram utilizados para a formação dos dados para PCA. A figura 58 apresenta todos os 158 espectros sobrepostos alinhados e escalonados pelo método de única variância (UV) totalizando 19.404 variáveis. Como a extração foi realizada com as mesmas quantidades de folhas para todas as amostras, não foi necessária a normalização dos dados (comumente utilizada para compensar as grandes diferenças entre as concentrações das amostras). Para este estudo foi aplicado a técnica de extração indireta e foram utilizadas 36 plantas, sendo 9 plantas controle 24 horas; 10 plantas herbivoria 48 horas, 7 plantas herbivoria 72 horas e 10 plantas controles 72 horas.

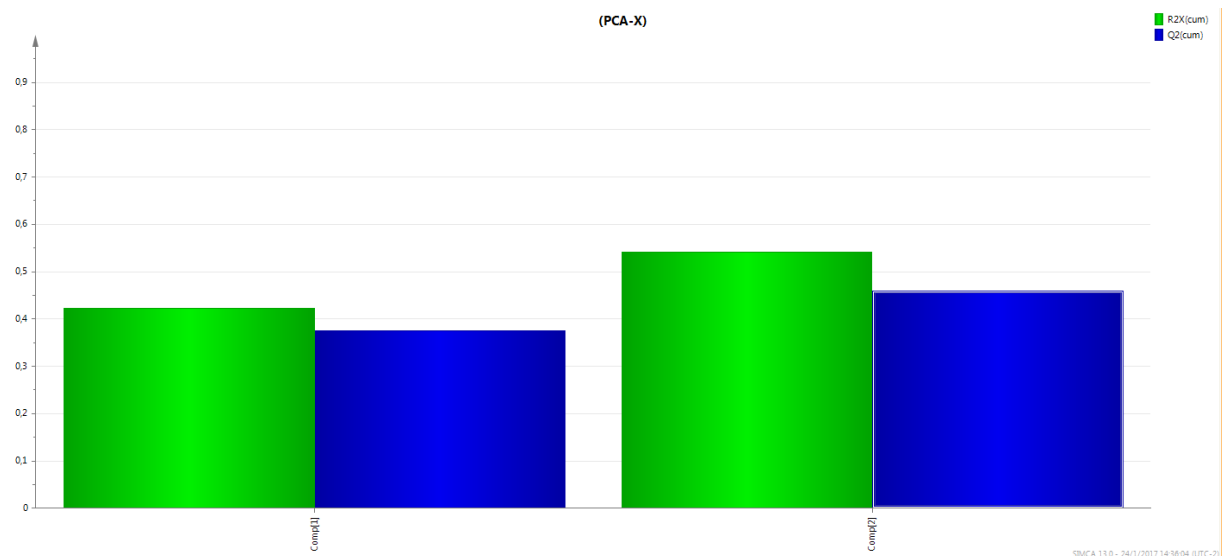
Figura 58 – Dados processados para análise multivariada da cana-de-açúcar controle e herbivoria totalizando 36 espectros e 19,404 variáveis.



Fonte: Autor 2017.

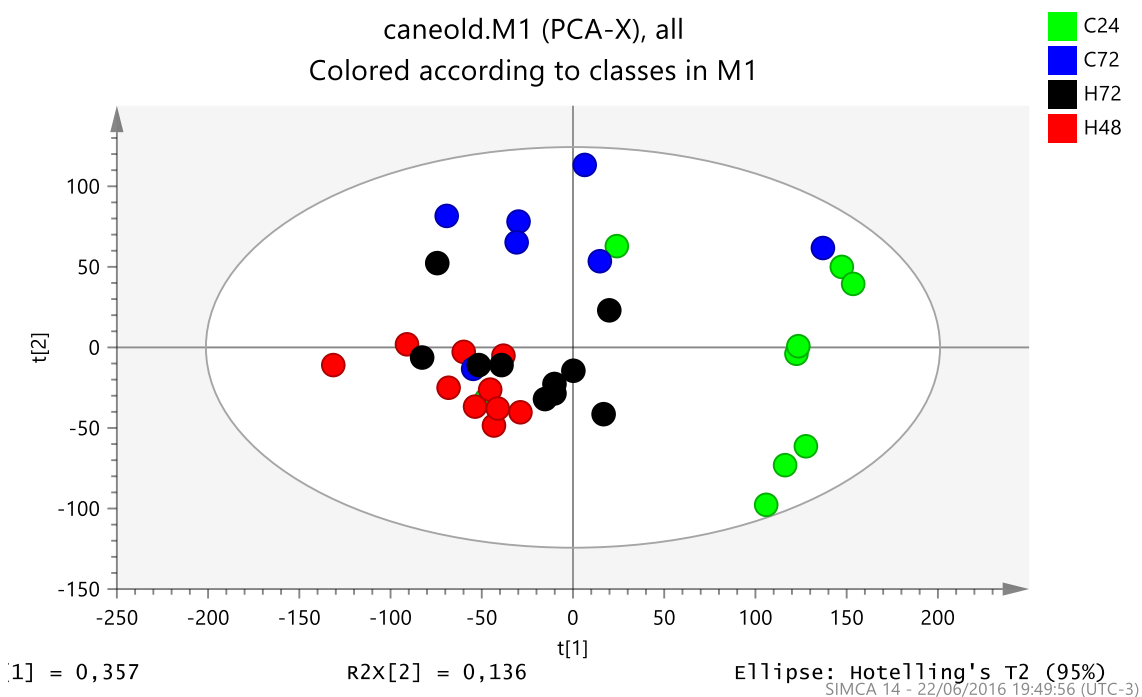
A análise de componentes principais explicou 49,4% da variância total dos dados através das componentes 1 e 2. Como pode ser visto na figura 59, os escores da PCA foram formados por 4 grupos diferentes. Os escores das amostras controle 24 horas geraram valores positivos na PC1, enquanto as amostras controle 72 horas produziram valores positivos e negativos na PC1. Com relação as amostras herbívoras 48 e 72 horas, seus scores tiveram maioria dos valores negativos indicando diferenças em sua variabilidade metabólica quando comparado com as amostras controle.

Figura 59: Barras referentes aos valores de R e Q que indicam a variância e o poder preditivo do modelo somando-se duas componentes principais 1 e 2.



Fonte: Autor 2017.

Figura 60 - Escores da PCA das amostras herbivoria (2 grupos) e controle (2 grupos) de folhas da cana-de-açúcar obtidas pelo método de extração indireto (variedade SP791011).



Fonte: Autor 2017.

5.6.1 Séries pareadas de análises discriminantes ortogonal por mínimos quadrados parciais (OPLS-DA)

Neste trabalho, foram feitos modelos de OPLS-DA pareados com o progressivo tempo do bioensaio de herbivoria. A validação do método foi realizada por meio da validação cruzada junto com a análise de variância (CV-ANOVA, $p < 0.05$), e os metabólitos discriminantes foram selecionados com valor de correlação de Pearson ($r > |0,576|$). A tabela 5 mostra os metabólitos discriminantes entre os cultivares controle e herbivoria, que foram identificados através do gráfico S-line (Figuras 61B, 62B, 63B) gerado no programa SIMCA-P (carregamentos da OPLS-DA), no qual os picos com alta correlação no estudo da resposta da planta a *Diatraea saccharalis* possuem cores vermelhas enquanto que os picos com baixa correlação possuem cores azuis. Como pode ser visto na tabela 5, os 3 modelos OPLS-DA foram

validados. Analisando o pareamento entre as amostras controle 24 horas versus herbivoria 48 horas, se observou um aumento do ácido clorogênico e diminuição de colina e trigonelina. Com relação ao estudo pareado envolvendo plantas controle versus herbivoria 72 horas, foi possível se observar uma elevação nos níveis de ácido clorogênico, ácido fórmico e asparagina, e uma redução dos níveis de colina e trigonelina nas plantas herbivoria. Ao se comparar amostras controle e herbivoria, após 72 horas de estresse com a *Diatraea saccharalis*, observou-se uma maior variabilidade metabólica causando a diminuição de colina, trigonelina, prolina, alanina, ácido cis e trans aconítico havendo uma elevação de acetato, ácido fórmico, ácido málico e ácido clorogênico nas plantas sob herbivoria. Os O-PLS-DA scores plot e seus respectivos S-line plot contendo os metabólitos discriminantes do presente estudo estão apresentados nas figuras 61, 62 e 63. Na figura 64, é mostrado o comportamento dos níveis dos metabólitos discriminantes da folha da cana-de-açúcar em resposta a herbivoria por meio do gráfico boxplot, que foi construído através das integrais das áreas dos sinais de RMN. Estes metabólitos apresentaram variância significativa comparando-os entre amostras controle e herbivoria no tempo estudado, com valor de $p < 0,05$ (teste-t pareado).

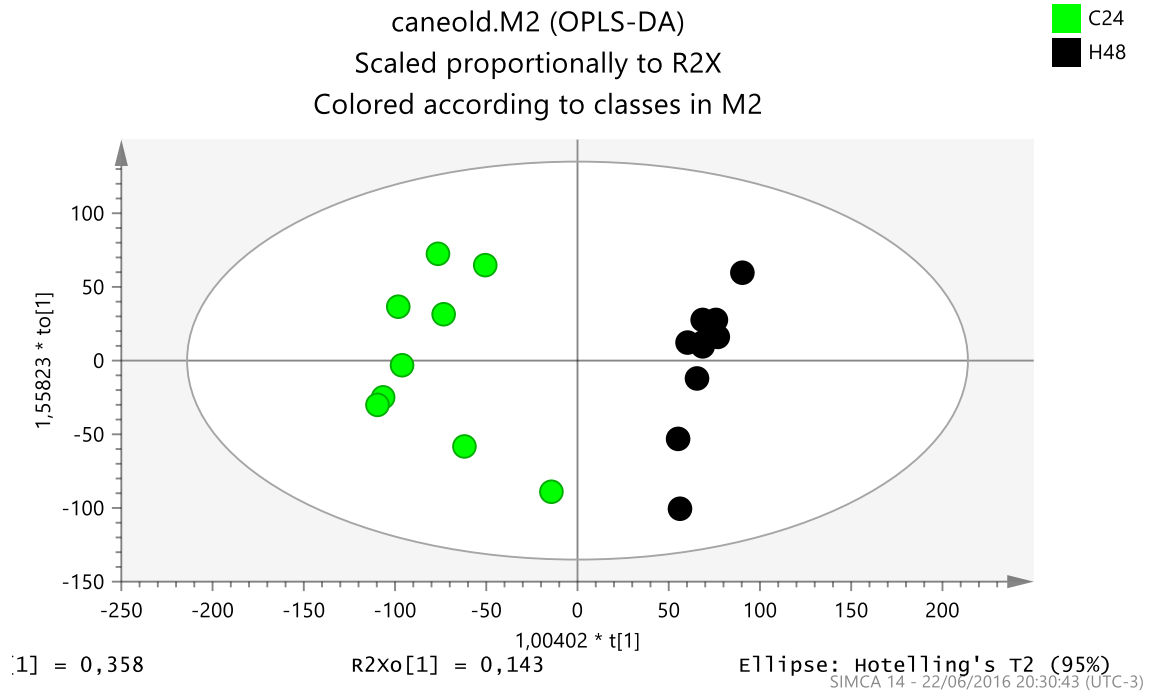
Tabela 5 - Metabólitos discriminantes nas folhas da cana-de-açúcar em resposta a herbivoria com a *Diatraea saccharalis* identificados por S-line plot através de modelos da O-PLS-DA. *Os valores de p resultantes da validação cruzada ANOVA e valores de correlação (r) positiva para os metabólitos referente as plantas sob herbivoria.

Metabolitos	C24xH48/R ² =0,920 and Q ² = 0,762, p = 0,0002	C24xH72/R ² =0,93 4 and Q ² =0,709, p = 0,0001	C72xH72/R ² =0,89 3 and Q ² =0,693, p = 0,004
Acetato			+0,615
Ácido cis-aconítico			-0,766
Ácido clorogênico	+0,781	+0,663	+0,744
Ácido fórmico	+0,785		+0,860
Ácido trans- aconítico			-0,663
Alanina			-0,686
Colina	-0,833	-0,826	-0,846
Asparagina		+0,720	
Malato			+0,838
Prolina			-0,861
Trigonelina	-0,638	-0,791	-0,806

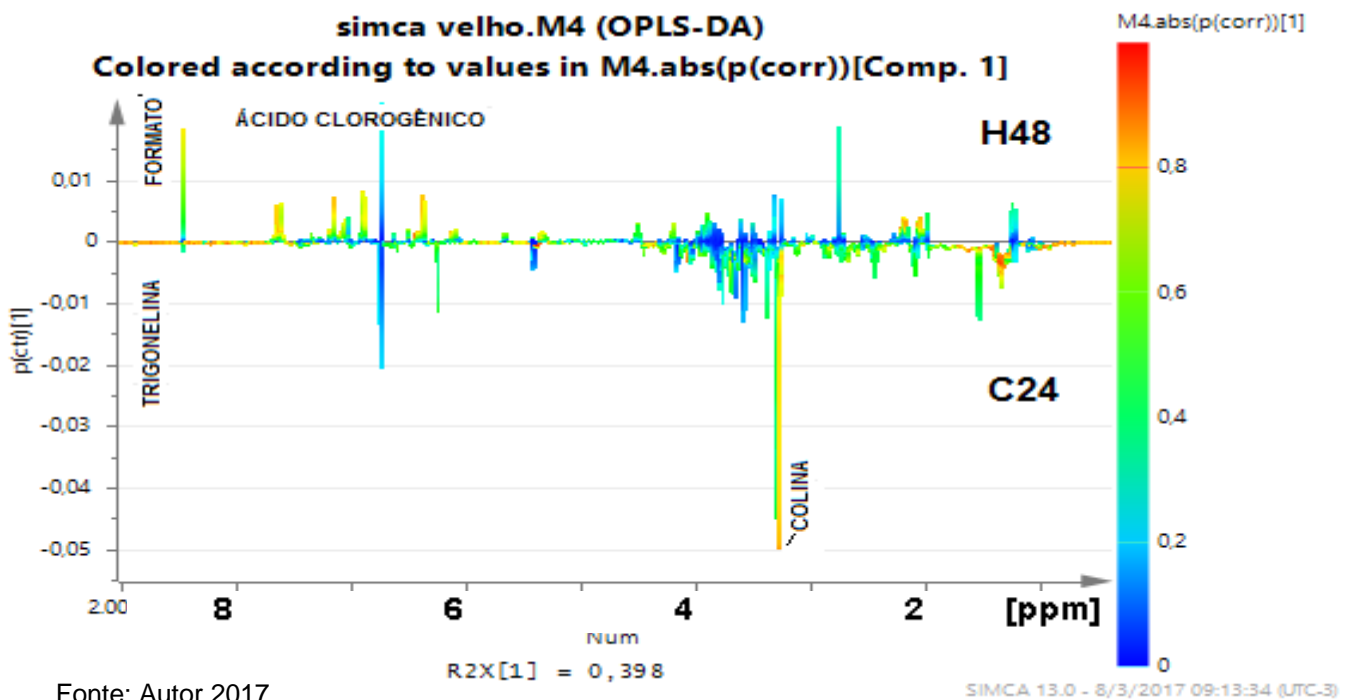
Fonte: Autor 2017.

Figura 61 - (A) Escores da O-PLS-DA das amostras controle 24 horas e herbivoria 48 horas. (B) Gráfico S-line mostrando os metabólitos discriminantes, sinais com fase positiva referem-se as amostras herbivoria e sinais com fase negativa referem-se as amostras controle.

(A)



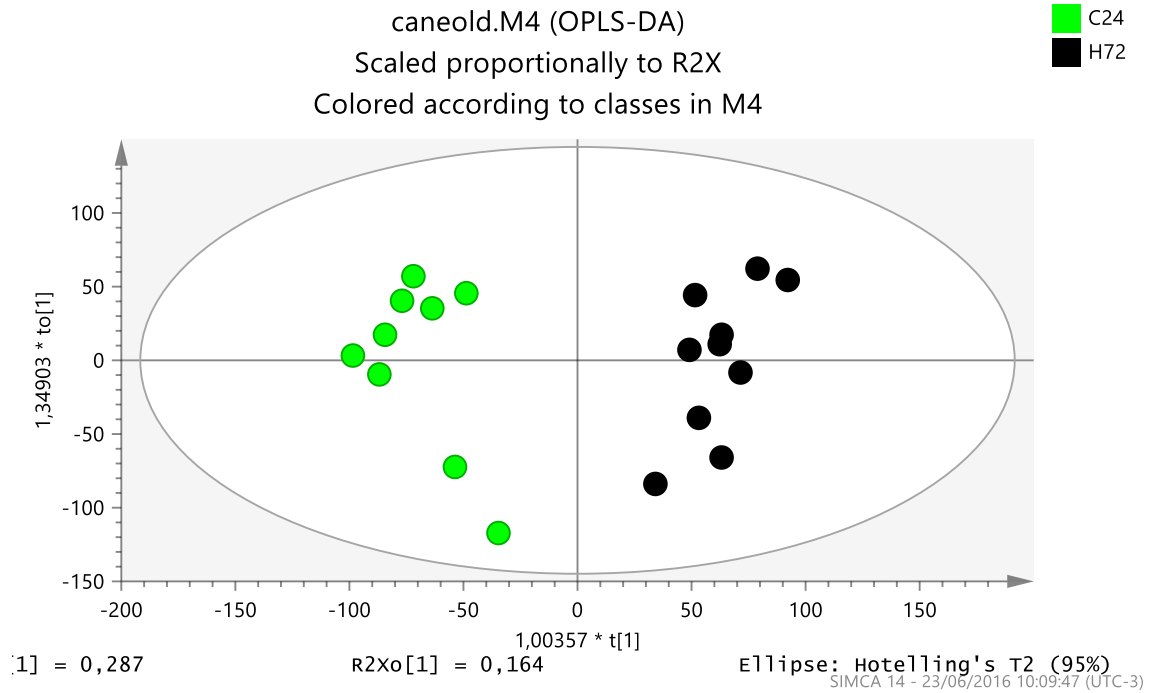
(B)



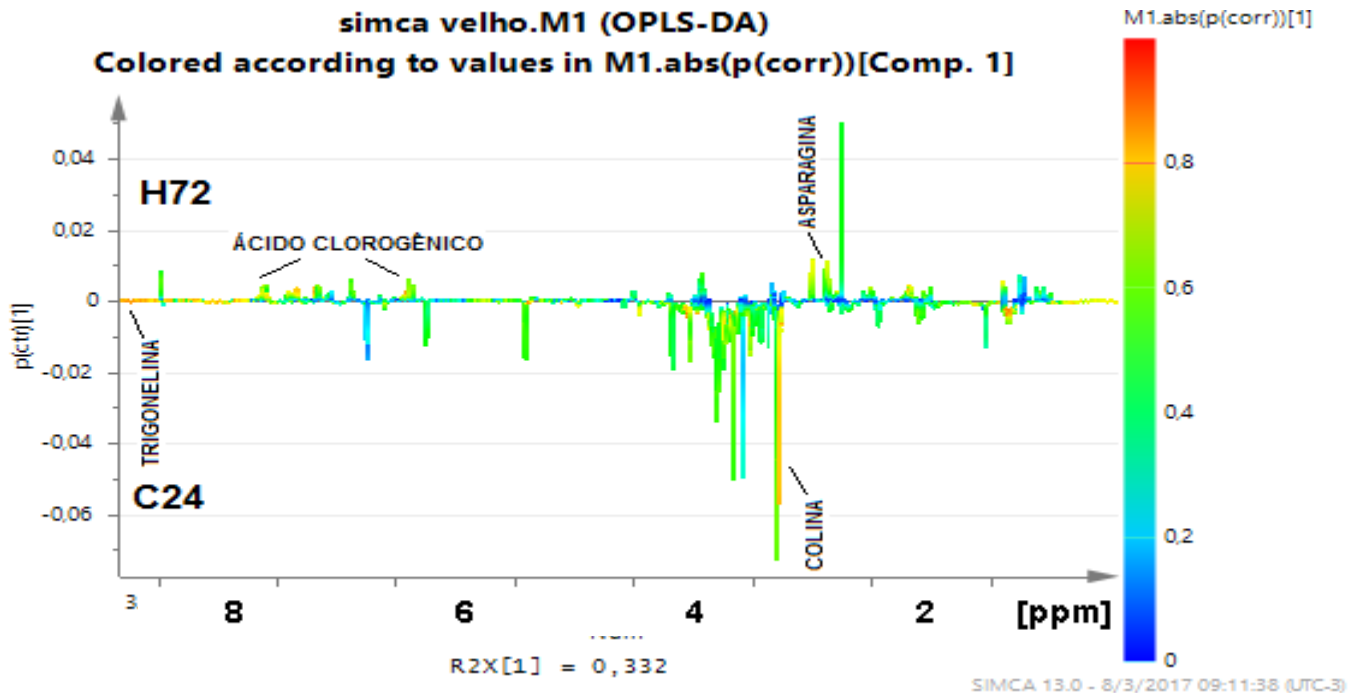
Fonte: Autor 2017.

Figura 62 - (A) Escores da O-PLS-DA das amostras controle 24 horas e herbivoria 72 horas. (B) Gráfico S-line mostrando os metabólitos discriminantes, sinais com fase positiva referem-se as amostras herbivoria e sinais com fase negativa referem-se as amostras controle.

(A)

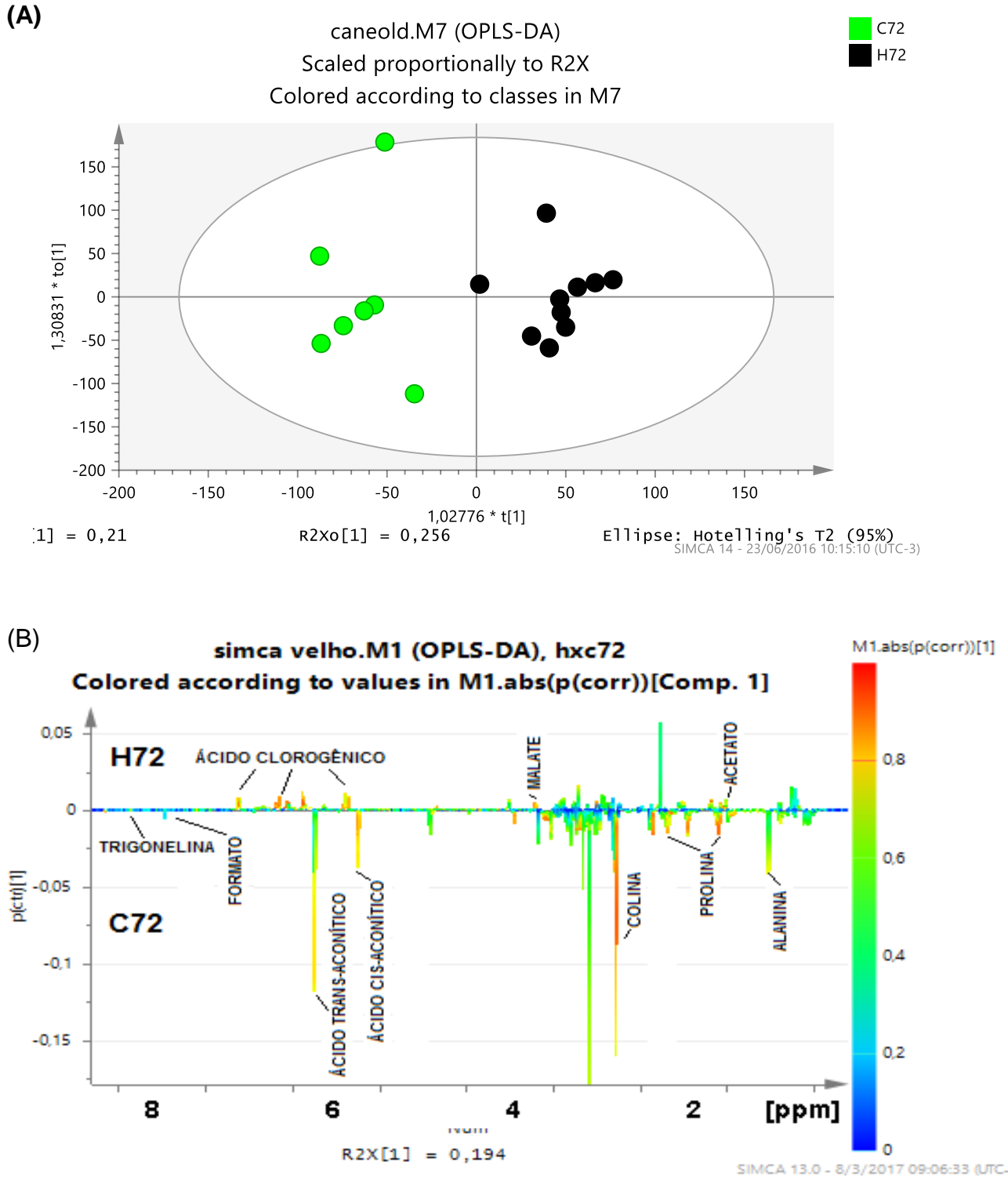


(B)



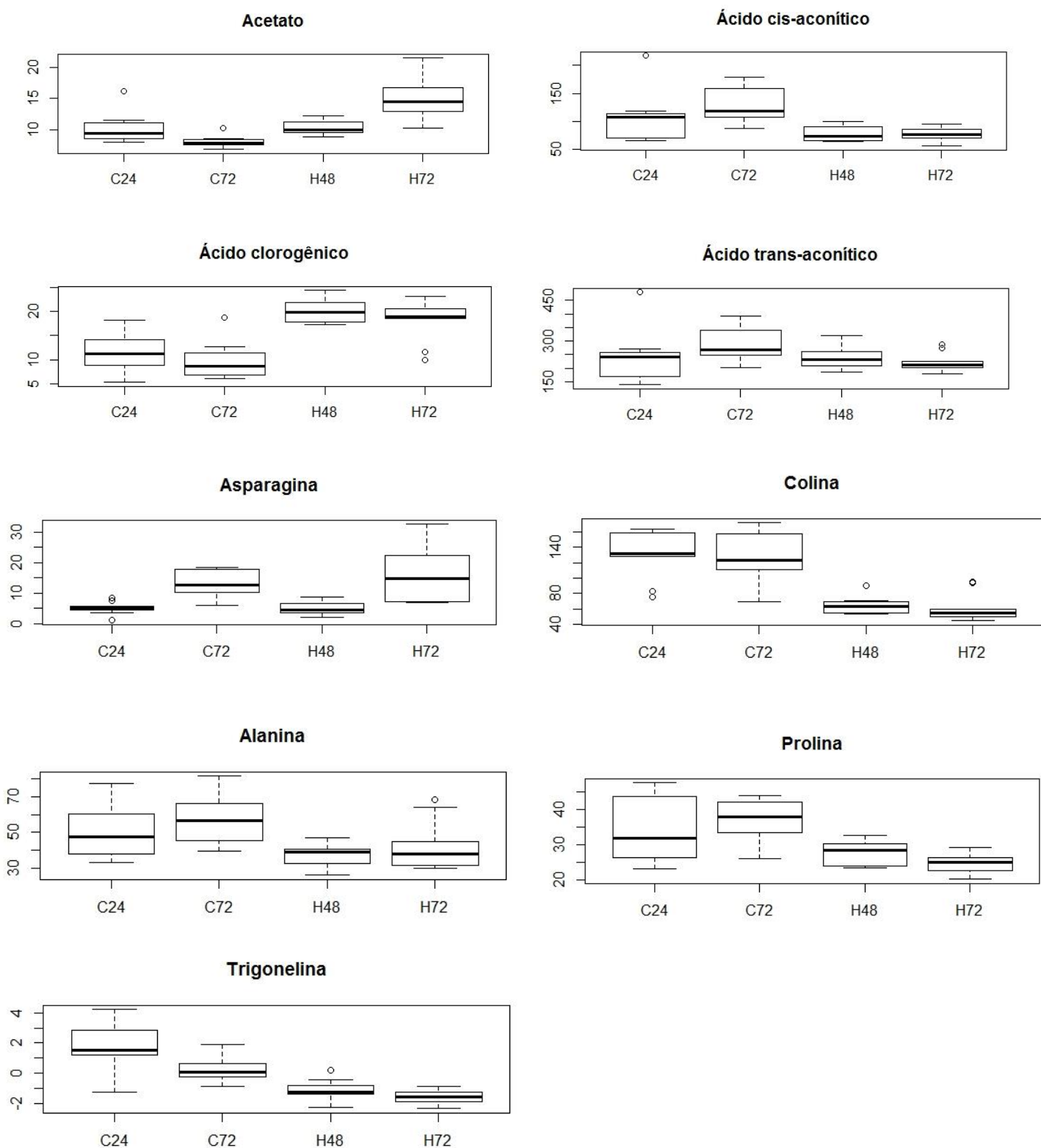
Fonte: Autor 2017.

Figura 63 - (A) Escores da O-PLS-DA das amostras controle 72 horas e herbivoria 72 horas. (B) Gráfico S-line mostrando os metabólitos discriminantes, sinais com fase positiva referem-se as amostras herbivoria e sinais com fase negativa referem-se as amostras controle.



Fonte: Autor 2017.

Figura 64 - Boxplot das concentrações relativas dos metabólitos discriminantes em resposta da cana-de-açúcar (SP791011) a herbivoria. Comparação entre C = controle e H = herbivoria nos tempos estudados (Teste-t pareado, $p < 0,05$).



Fonte: Autor 2017.

5.6.2 Séries pareadas de análises discriminantes ortogonal por mínimos quadrados parciais (OPLS-DA) comparando as amostras controle e as amostras sob herbivoria (variedade SP791011)

A OPLS-DA foi realizada para verificar se há diferenças entre as amostras controle durante o curso do bioensaio. A validação do método foi realizada por meio da validação cruzada junto com a análise de variância (CV-ANOVA, $p < 0.05$), e os metabólitos discriminantes foram selecionados com valor de correlação Pearson ($r > |0,576|$). A tabela 6 mostra os metabólitos discriminantes entre os tratamentos foram identificados através do S-line (Figura 65) gerado no programa SIMCA-P (carregamentos da OPLS-DA), no qual os picos com alta correlação no estudo da resposta da planta a herbivoria possuem cores vermelhas enquanto que os picos com baixa correlação possuem cores azuis. Como pode ser visto na tabela 6, o modelo OPLS-DA não foi validado no estudo de comparação entre C24 x C72 ($p > 0,05$), sendo apenas validado no estudo de comparação H48 x H72 ($p < 0,05$) havendo um aumento de valina, treonina, asparagina, ácido glutâmico, fenilalanina, tirosina e a redução de glicose, sacarose e ácido fórmico. O escore da OPLS-DA e o gráfico S-line contendo os metabólitos discriminantes na comparação entre as amostras sob herbivoria está na figura 65.

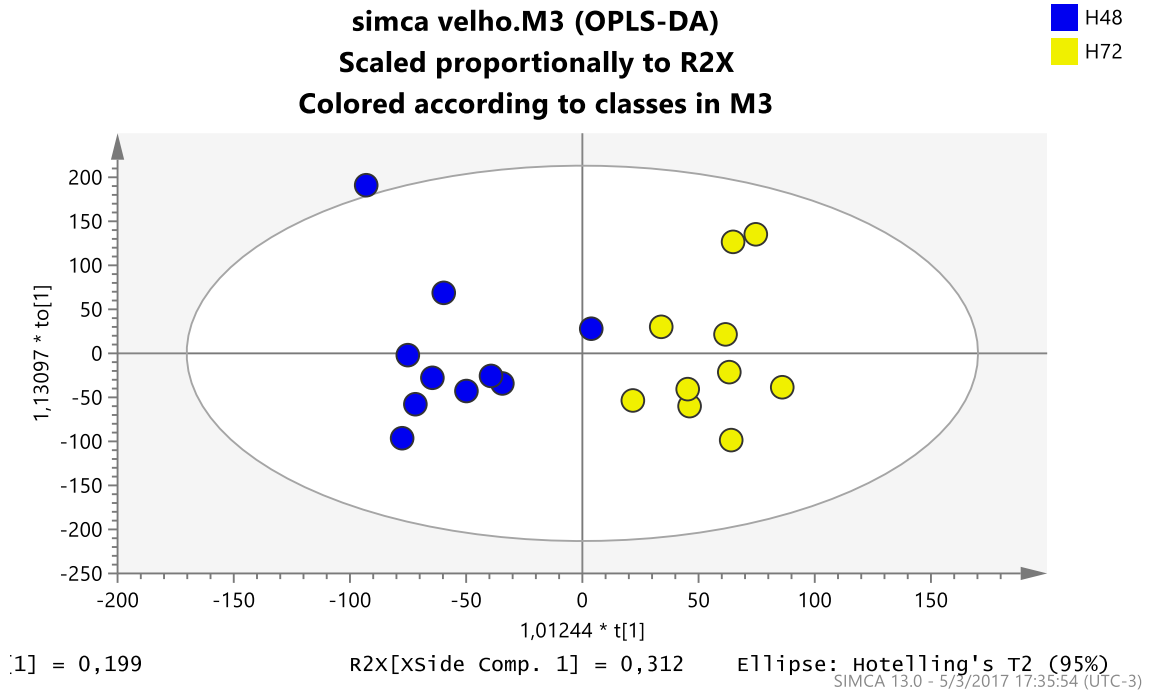
Tabela 6 - Metabólitos discriminantes nas folhas da cana-de-açúcar em resposta a herbivoria com a *Diatraea saccharalis* identificados por S-line plot através de modelos da O-PLS-DA. *Os valores de p resultantes da validação cruzada ANOVA e valores de correlação (r) positiva para os metabólitos referente as plantas sob maior tempo de herbivoria.

Metabolitos	C24xC72/R ² =0,786 and Q ² = 0,434, p = 0,147	H48xH72/R ² =0,860 and Q ² =0,720, p = 0,0004
		+0,723
Asparagina		
Fenilalanina		+0,701
Formato		-0,697
Glutamato		+0,751
Isoleucina		+0,641
Sacarose		-0,604
Tirosina		+0,710
Treonina		+0,875
Trigonelina		-0,649
Valina		+0,705

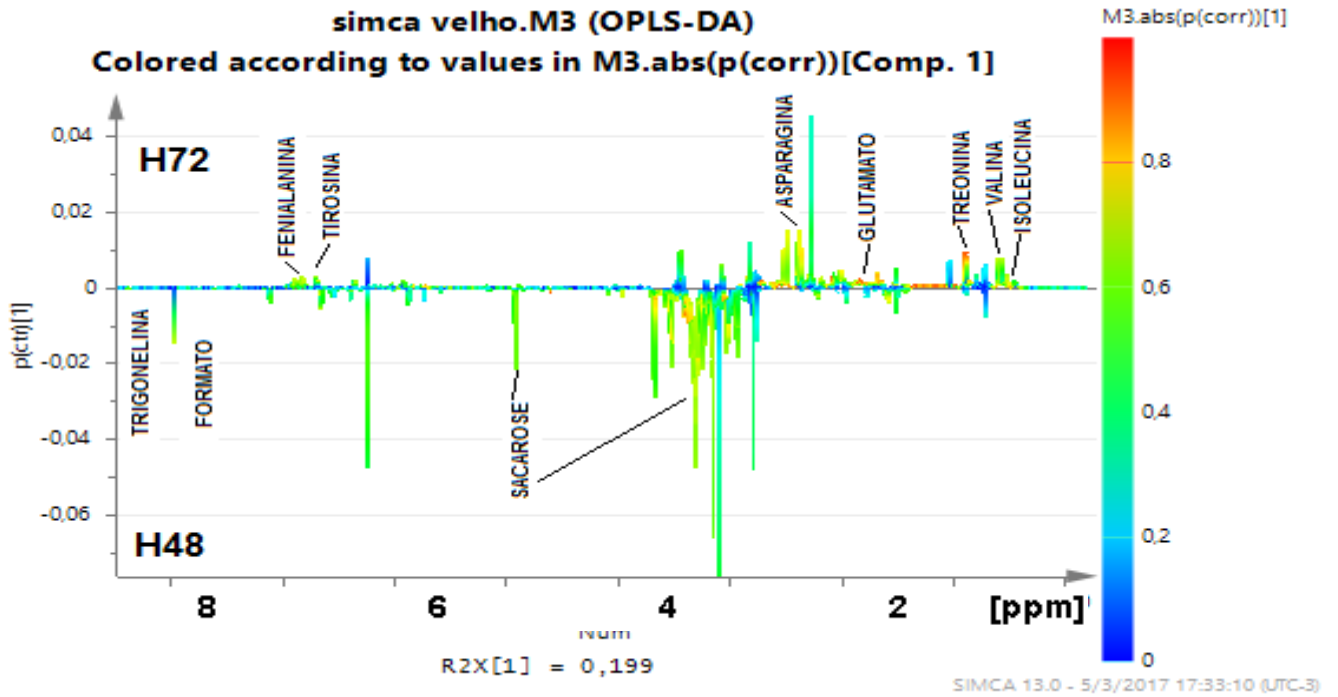
Fonte: Autor 2017.

Figura 65 - (A) Escores da O-PLS-DA do estudo H48 x H72. (B) Gráfico S-line mostrando os metabólitos discriminantes

(A)



(B)



Fonte: Autor 2017.

6. DISCUSSÃO

Metabólitos primários

Os aminoácidos são metabólitos primários que exercem diversas funções em plantas, entre elas, a nutrição, aumentando a eficiência na absorção, transporte e assimilação dos nutrientes. Neste trabalho foram identificados os aminoácidos asparagina, treonina, glutamina, isoleucina, fenilalanina, tirosina e valina como metabólitos discriminantes, apresentando maior concentração na variedade de cana-de-açúcar RB92579 sob herbivoria. Para a variedade SP 1011 houve um aumento de concentração apenas do aminoácido asparagina (corroborando com o resultado da variedade RB 92579) enquanto que alanina e prolina tiveram suas concentrações reduzidas após o processo de herbivoria frente a *Diatraea saccharalis*.

Alguns compostos voláteis incluindo aldeídos, álcool, éster, ácidos e compostos contendo nitrogênio e enxofre são derivados de aminoácidos como alanina, valina, leucina e isoleucina, os quais desempenham um papel importante na defesa da planta (KUTYNIOK, MULLER, 2012). As funções primárias dos voláteis parecem ser de defesa da planta contra herbívoros ou patógenos ou, através da atração de polinizadores e dispersores de semente, proporcionar uma vantagem reprodutiva às plantas (PICHERSKY, GERSHENZON, 2002). Os voláteis emitidos de tecidos vegetativos, como parte do sistema de defesa da planta, podem repelir (KESSLER, BALDWIN, 2001) ou intoxicar (VANCANNEYT et al., 2001) animais e microrganismos diretamente, ou atrair inimigos naturais, que protegerão a planta indiretamente, via interação tritrófica (ARIMURA et al., 2004). Steinbrenner et al. (2011) verificou em raízes de tomate após a herbivoria por lagartas de *Manduca sexta* o aumento de teor de glutamina, ácido glutâmico, ácido aspártico e asparagina, que são metabólitos que tem como principal função o transporte de nitrogênio. Apesar desses aminoácidos terem sido identificados nas raízes, os danos causados pelo herbívoro foram nas folhas da planta.

O aumento do teor de colina em plantas, após estresse induzido por herbívoros, está relacionado a um aumento na síntese de componentes da membrana celular da planta após a lesão na membrana e, pode agir como agente patogênico contra herbívoros (SARDANS et al., 2013). A colina é sintetizada a partir da serina, e a síntese da serina em plantas está relacionada à transaminação a partir da asparagina.

Neste trabalho, houve um aumento dos níveis de asparagina nas variedades de cana-de-açúcar SP791011 e RB92579 após a herbivoria, no entanto, houve uma redução dos teores de colina na variedade SP791011, o que permite especular que este resultado pode ser devido a característica desta variedade, pois a mesma é susceptível a *D. Saccharalis*.

Baixos teores de colina e prolina foram identificados na herbivoria na variedade SP791011. Estes metabólitos são conhecidos por participarem no mecanismo de tolerância aos estresses abióticos, incluindo hídrico, salinidade, congelamento e metais pesados. A oxidação da prolina também pode fornecer energia metabólica para reprodução de plantas (FRAIRE-VELAZQUEZ; EMMANUEL, 2013).

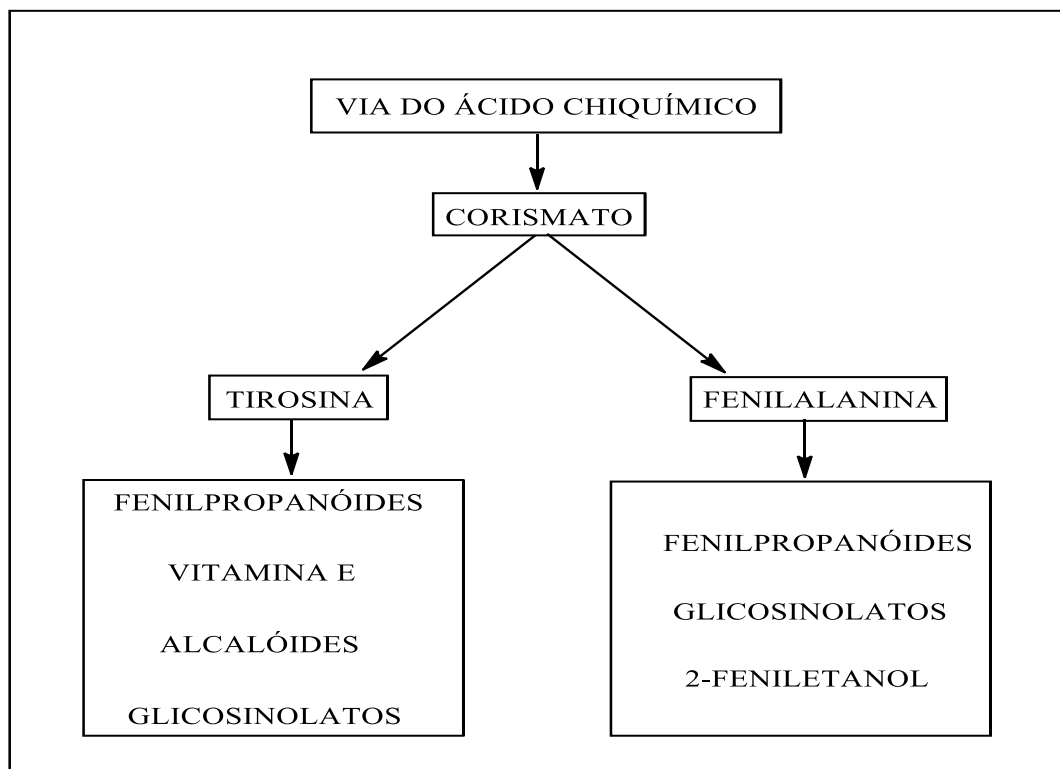
Altos níveis de aminoácidos também foram encontrados em folhas de *Catharanthus roseus* após a infecção com 3 diferentes tipos de fitoplasmas (LEPKA et al., 1999). A herbivoria por afídeos pode induzir alterações na composição de aminoácidos nas plantas hospedeiras quando os afídeos causam mudanças macroscópicas nas plantas (GIORDANENGO et al., 2010).

Baixos níveis dos isômeros do ácido aconítico foram observados nas folhas da cana-de-açúcar de variedade SP791011 após herbivoria. No entanto, pouco há na literatura sobre a relação deste metabólito com o mecanismo de defesa das plantas. Walford (1998) descreveu que a quantidade de ácido cis-aconítico durante o crescimento da cana-de-açúcar é baixa, pois este ácido é usado no ciclo de Krebs, não sendo armazenado na planta, e parte deste ácido é isomerizado para a forma trans que posteriormente será consumido no ciclo de Krebs.

A tirosina é um aminoácido aromático resultante do produto final da via metabólica do ácido chiquímico (MAEDA; DUDAREVA, 2012). Este aminoácido é precursor da síntese de glicosídeos cianogênicos, que são conhecidos pela ação contra insetos (MOLLER, 2010). No entanto, não foi possível identificar glicosídeos cianogênicos nas variedades da cana-de-açúcar SP791011 e RB92579, e isso, pode estar associado as metodologias de extração utilizadas ou pode ser devido a baixa quantidade desses metabólitos nas variedades estudadas. A variedade RB92579 apresentou um metabólito discriminante não identificado, que provavelmente seja a fenilalanina que também é produto da via metabólica do ácido chiquímico, e também precursor na via metabólica de fenilpropanóides que é responsável na síntese de metabólitos secundários que estão envolvidos no mecanismo de defesa das plantas, tais como, ácido clorogênico, flavonóides, ligninas, cumarinas e ácido hidroxâmico

(FRASER, 2011). A variedade SP791011 mostrou um aumento do ácido clorogênico após a herbivoria por *D. saccharalis* no tempo 72 horas quando comparado as amostras controle. Entretanto, a comparação entre as plantas SP791011 sob herbivoria 48 horas e 72 horas (H48 x H72), mostrou um aumento dos mesmos metabólitos aromáticos (tirosina e fenilalanina) detectados na variedade RB92579 (C72 x H72) após 72 horas de herbivoria, e também, foi possível ver uma maior concentração de ácido clorogênico nas amostras sob 48 horas de herbivoria quando comparadas as amostras sob herbivoria 72 horas (SP791011 - H48 x H72). Esse resultado indica que o metabólito aromático não identificado seja mesmo a fenilalanina, que conforme já foi mencionado, está relacionada a via metabólica do ácido chiquímico (Figura 66). Estes resultados corroboram com alguns estudos envolvendo interação inseto-planta. Steinbrenner et al. (2011) observaram aumento de tirosina e fenilalanina ao induzir a resposta da planta de tomate após herbivoria com lagartas de *Helicoverpa zea*. Um estudo recente, Killiny e Hijaz (2016) mostrou uma alta concentração dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano em variedades de citrus resistentes ao *Candidatus Liberibacter asiaticus*.

Figura 66: Via metabólica do ácido chiquímico.



Fonte: TZIN e GALILI, adaptada 2010.

Portanto, os metabólitos primários identificados na resposta da cana-de-açúcar a herbivoria, podem estar associados ao transporte de nitrogênio e na via metabólica de fenilpropanóides na variedade RB92579 estão e via metabólica de fenilpropanóides. Apenas a alanina foi discriminante e detectada em menores concentrações na variedade SP791011 e a redução da mesma pode estar relacionada a síntese de compostos voláteis, pois este aminoácido tem sido relatado como precursor de etil ésteres em morango (PEREZ et al., 1992).

Trigonelina

A trigonelina é um alcalóide, comumente encontrado em sementes do café e em folhas de outras plantas, sintetizado através da metilação do ácido nicotínico utilizando S-adenosil metionina (JOSHI; HANDLER, 1960). Este metabólito foi detectado na cultivar da cana-de-açúcar SP791011 como discriminante após 72 horas de herbivoria, demonstrando uma redução de seus níveis no tecido foliar da planta. De acordo com Minorsky (2002), a trigonelina exerce diversas funções reguladoras nas plantas, entre elas, o ciclo celular e nos estresses oxidativo, salino e radiação ultravioleta.

Um estudo metabolômico por RMN avaliou a resposta de variedades de batatas geneticamente e não-geneticamente modificadas frente ao pulgão (*Myzus persicae*), e constatou que a planta geneticamente modificada teve maiores quantidades de trigonelina nas folhas jovens (6 semanas) comparando-se com as folhas mais velhas (9 semanas), não sendo possível identificar relação deste composto em resposta a herbivoria (PLISCHKE et al., 2012). Por outro lado, alguns pesquisadores têm associado a trigonelina em resposta a estresse induzido por insetos. Sato et. al. (2014) estudaram o perfil metabólico de cepas de cultivares de soja resistentes e susceptíveis ao pulgão, e concluíram que houve uma redução da quantidade de trigonelina nos genótipos de soja resistentes ao herbívoro. A redução de trigonelina também foi confirmada por Mirnezhad et al. (2010), que investigaram o metaboloma em folhas de cultivares de tomates comerciais e selvagens em resposta a herbivoria por tripses. Neste estudo, eles também identificaram redução de trigonelina nos cultivares selvagens que possuem uma maior resistência ao herbívoro.

Apesar de haver alguns estudos envolvendo a trigonelina em resposta a herbivoria, pouco ainda se sabe sobre a principal função deste metabólito no

mecanismo de defesa das plantas, mas a diminuição dos níveis de trigonelina corrobora com outros estudos envolvendo a reposta de plantas a herbivoria.

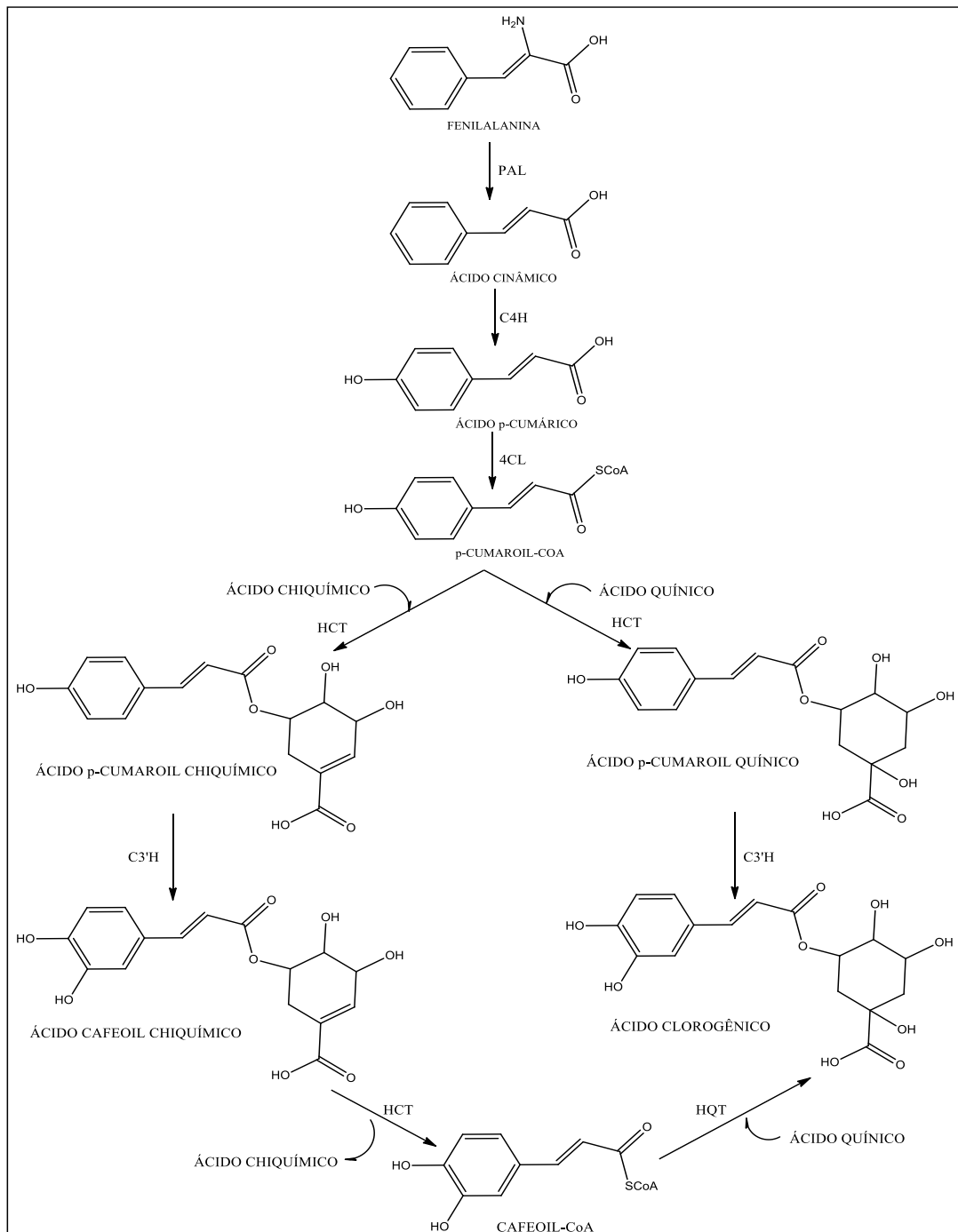
Ácido clorogênico

Comumente encontrado no café, o ácido clorogênico é um éster do ácido caféico e ácido quínico, que é isolado das folhas e frutas de plantas dicotiledôneas. Este metabólito é um dos principais precursores das ligninas, na qual tem a função de conferir rigidez, impermeabilidade e resistência a ataques microbiológicos e mecânicos aos tecidos vegetais (AZADI et al., 2013). A biossíntese do ácido clorogênico, detalhada na figura 67, tem como precursor a fenilalanina, que envolve as seqüências dos seis genes que codificam as enzimas envolvidas nessa via (fenilalanina amônia liase, 4-hidroxilase, C4H; 4-hidroxicinamoil-CoA ligase, 4CL; hidroxicanamoil-coA shilimato / quinato hidroxicinamoil transferase, HCT; éster p-cumarilo éster 3'-hidroxilase, C3'H e hidroxicinamoil CoA quinato hidroxicinamoil transferase, HQT) (GRAMAZIO et al., 2013). Esse metabólito secundário é conhecido por possuir efeito negativo contra herbívoros, pois é oxidado para clorogenoquinona que liga a aminoácidos e proteínas livres, reduzindo a biodisponibilidade de aminoácidos, que diminui a digestão de proteínas dietéticas (FELTON et al., 1989).

Na seção anterior, a análise multivariada do cultivar da cana-de-açúcar SP1011 resultou em um aumento das concentrações de ácido clorogênico no tecido foliar após 48 e 72 horas de herbivoria por *Diatraea saccharalis*. Não foi possível identificar o ácido clorogênico como metabólito discriminante na análise estatística multivariada em resposta a herbivoria na variedade RB92579, mas o aumento dos níveis de fenilalanina, permite especular que a biossíntese do ácido clorogênico (fenilpropanóides) esteja envolvida na resposta desta variedade de cana-de-açúcar em resposta a herbivoria. Este resultado corrobora com a literatura, que apresenta o aumento do ácido clorogênico em diversas plantas após a herbivoria. Choi (2004) analisou o perfil metabólico de folhas da *Catharanthus roseus* em resposta a infecção por fitoplasmas, e identificou o ácido clorogênico entre os metabólitos de resposta, concluindo que o mecanismo de defesa de *Catharanthus roseus* (*Dendranthema grandiflora*) está associado a via metabólica de fenilpropanóides. Altos níveis de ácido clorogênico também foram encontrados em folhas de outra espécie de flor, o

crisântemo, que foi estudado por Leiss et al. (2009). Neste estudo verificou-se, aumento dos fenilpropanóides ácido clorogênico e ácido feruloíla quínico em resposta a herbivoria por tripses. Um estudo recente (LI; BALDWIN; GAQUEREL, 2015) em cultivares de tabaco selvagens mostrou o aumento de ácido clorogênico nas folhas plantas que foram atacadas por lagartas da mariposa *Manduca sexta*.

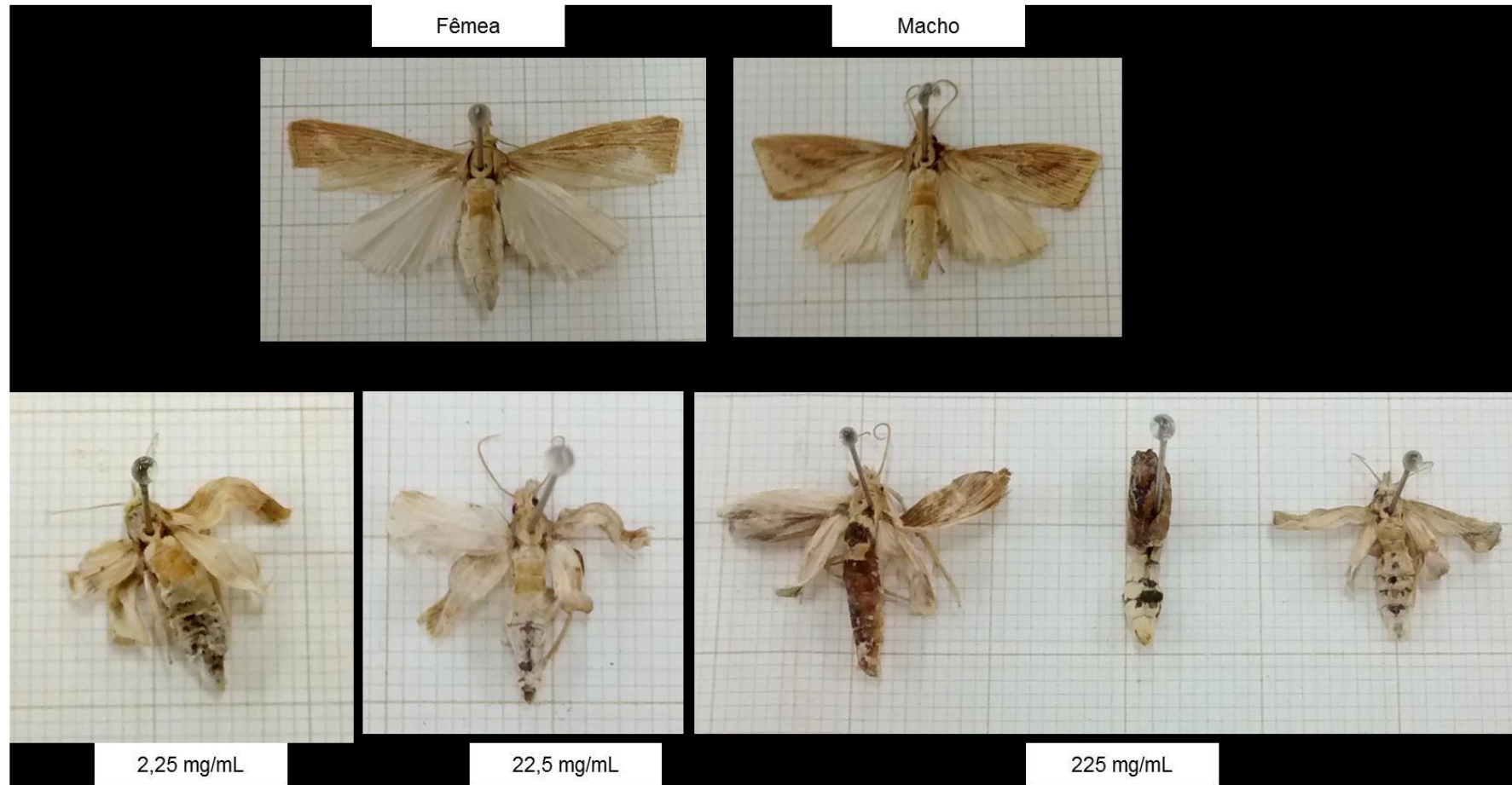
Figura 67: Biossíntese do ácido clorogênico a partir da fenilalanina.



Fonte: GRAMAZIO et al., adaptada 2013.

O ácido clorogênico tem sido testado em dietas artificiais para averiguar seu efeito contra alguns insetos. Um estudo desenvolvido por Pascacio-villafán et al. (2014) testou o ácido clorogênico na dieta das larvas de *Anastrepha ludens* e mostrou que não houve efeito negativo sobre elas. No entanto, quando adicionado o ácido clorogênico e outros compostos fenólicos (catequina e ácido p-cumárico) à dieta das lagartas, houve perda de peso das mesmas e um retardamento no seu desenvolvimento pupal. Um outro trabalho envolvendo o efeito da toxicidade do ácido clorogênico contra insetos foi desenvolvido por Ikonen, Tahvanainen e Roininen (2001). Eles investigaram o efeito do ácido clorogênico frente a 4 espécies comuns de besouros da folha do salgueiro. Os autores concluíram que uma das espécies do besouro reagiu ao ácido clorogênico, reafirmando a importância do ácido clorogênico na defesa do salgueiro. Recentemente, Tavares (2016) identificou por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), altas quantidades de ácido clorogênico nas folhas da cana-de-açúcar como resposta a *D. saccharalis*. Neste mesmo estudo, foi demonstrado, a partir de bioensaios adicionado o ácido clorogênico à dieta, que não houve diferença em ganho de peso para as lagartas alimentadas com diversas doses de ácido clorogênico de ácido clorogênico e o controle. No entanto, ao observar-se o ciclo completo da praga, diferenças no período larval, pupal e longevidade dos adultos (ciclo de vida), bem como altas taxas de deformações nos adultos (Figura 68) foram demonstrados. Este estudo confirma o efeito negativo do ácido clorogênico sobre biologia do inseto e pode ser relacionado como um possível alvo para resistência da cana-de-açúcar frente a *Diatraea saccharalis*.

Figura 68: *Diatraea saccharalis* na fase adulta com má formação em função das doses do ácido clorogênico.



Fonte: TAVARES, adaptada 2016.

Perfil metabólico da cana-de-açúcar RB92579 entre as amostras controle

O estudo pareado das OPLS-DA somente entre as amostras controle, mostrou que ocorreram diferenças de acordo com os tempos estudados. Indicando que mesmo controlando-se fatores como fotoperíodo, temperatura e irrigação, houve variação metabólica entre das plantas. Os metabólitos discriminantes desta análise indicam que essas diferenças devem estar associadas ao desenvolvimento da planta, uma vez que o nível de açúcares (principalmente a sacarose), esteve elevado em plantas no último tempo coletado, ou seja, em plantas mais velhas (por exemplo, C24 x C96 – C96 com maior concentração de sacarose). Por outro lado, o resultado da análise C24 x C48 surpreendeu pelo fato de as amostras controles 48 horas apresentarem um leve aumento em ácido clorogênico, tirosina e uma redução de trigonelina em comparação as amostras C24. Esse resultado assemelha-se com os da resposta das plantas após a herbivoria que leva a via do ácido chiquímico, que também está associada a síntese de ligninas que compõe a parede celular das plantas. Não se sabe ao certo o que pode ter causado essa variação diferenciada deste estudo (C24 x C48), uma vez que ambas são plantas controle e o tempo de vida entre as mudas foram de apenas 24 horas. Vale salientar, na comparação desta mesma amostra (C48) com a amostra após 48 horas de herbivoria (H48), resultou na redução de tirosina um precursor de metabólitos secundários na amostra C48.

Perfil metabólico da cana-de-açúcar RB92579 entre as amostras sob herbivoria

Ao avaliar os metabólitos discriminantes (OPLS-DA) entre as amostras sob herbivoria, observou-se que houve diferenças durante o experimento. Todavia, ocorreu um aumento dos mesmos metabólitos de resposta da planta sob herbivoria nas plantas com maior tempo de estresse em comparação com as outras plantas com o tempo inferior de estresse. A distribuição dos dados nos gráficos boxplots confirmou um perfil de aumento gradativo com o tempo de estresse desses metabólitos, apenas para isoleucina, valina, treonina e tirosina o aumento foi interrompido no tempo 96 horas.

Variedade metabólica da cana-de-açúcar SP791011 entre as amostras sob herbivoria

Nesta variedade de planta não houve diferença entre as amostras controles (C24 x C72). Houve diferenças entre as amostras sob herbivoria (H48 x H72), que apresentou um aumento dos aminoácidos aromáticos tirosina e fenilalanina nas amostras H72 e uma diminuição do ácido clorogênico na mesma amostra conforme foi mostrado no boxplot do ácido clorogênico. Com isso pode-se especular que o ápice de resposta da planta foi após 48 horas de herbivoria.

Variedade de cana-de-açúcar SP 791011 versus variedade de cana-de-açúcar RB 92579

No entanto, ao analisar os metabólitos (tirosina, fenilalanina e ácido clorogênico) discriminantes de resposta a herbivoria por *D. saccharalis*, observou-se que para ambos os casos levam a rota metabólica do ácido chiquímico e síntese de fenilpropanóides. Vale salientar que após 72 horas sob herbivoria, houve uma maior quantidade de metabólitos discriminantes como foi mostrado na quantificação por boxplots das duas variedades estudadas. Outro dado importante, é que os modelos estatísticos multivariados foram positivamente validados, mesmo em diferentes variedades e metodologias de extração, e que, o uso da RMN aliada a métodos estatísticos multivariados mostraram ser uma boa alternativa para o entendimento do mecanismo da cana-de-açúcar frente a *D. saccharalis*.

7. CONCLUSÕES

- Não foram observadas diferenças qualitativas entre as sequências de pulsos utilizadas e também, não se observou diferença qualitativa entre os métodos de extração direta e indireta após a comparação dos espectros de RMN-¹H obtidos de uma amostra controle de cana-de-açúcar da variedade RB92579.
- Não se observou diferença qualitativa entre os métodos de extração direta e indireta após a comparação dos espectros de RMN-¹H obtidos de uma amostra controle de cana-de-açúcar da variedade RB92579.
- Os modelos estatísticos foram validados nos estudos envolvendo as duas variedades de cana-de-açúcar (RB92579 e SP791011), em resposta a herbivoria por *Diatraea Saccharalis*, mesmo usando diferentes métodos de extração dos metabólitos do tecido foliar.
- A análise dos boxplots dos metabólitos discriminantes revelou que, após 72 horas de herbivoria, foi o tempo em que houve um maior número de metabólitos discriminantes em ambas as variedades estudadas.
- Apesar de apresentarem diferentes perfis metabólicos em resposta a herbivoria, os metabólitos elucidados sugerem a via metabólica do ácido chiquímico devido ao aumento de tirosina, fenilalanina nas folhas da cana-de-açúcar de variedade RB92579, e aumento do ácido clorogênico nas folhas da cana-de-açúcar da variedade SP791011.

REFERÊNCIAS

AITKEN, K. S. et al. AFLP analysis of genetic diversity within *Saccharum officinarum* and comparison with sugarcane cultivars. **Australian Journal Of Agricultural Research**, [s.l.], v. 57, n. 11, p.1167-1184, 2006. CSIRO Publishing. <http://dx.doi.org/10.1071/ar05391>.

ALI, Qasim et al. Ameliorating Effects of Exogenously Applied Proline on Seed Composition, Seed Oil Quality and Oil Antioxidant Activity of Maize (*Zea mays* L.) under Drought Stress. **International Journal Of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 14, n. 1, p.818-835, 4 jan. 2013. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms14010818>.

ARIMURA, G.-i.. Herbivore-Induced Defense Response in a Model Legume. Two-Spotted Spider Mites Induce Emission of (E)- α -Ocimene and Transcript Accumulation of (E)- α -Ocimene Synthase in *Lotus japonicus*. **Plant Physiology**, [s.l.], v. 135, n. 4, p.1976-1983, 1 ago. 2004. American Society of Plant Biologists (ASPB). <http://dx.doi.org/10.1104/pp.104.042929>.

ATKINS, Craig A.; PATE, John S.; SHARKEY, Patrick J.. Asparagine Metabolism-Key to the Nitrogen Nutrition of Developing Legume Seeds. **Plant Physiology**, Western Australia, v. 56, n. 1, p.807-812, 3 set. 1975.

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>.

BRAGA DPV, Arrigoni EDB, Silva-Filho MC, Ulian EC Expression of the Cry1Ab protein in genetically modified sugarcane for the control of *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) **Journal of New Seeds**, v. 5, n. 2-3, p. 209–221, 2003.

BRASKEM (Org.). **Astronautas utilizam Plástico Verde da Braskem em Estação Espacial Internacional**. 2016. Disponível em: <<http://www.braskem.com.br/detalhe->

press-releases-mis/astronautas-utilizam-plastico-verde-da-braskem-em-estacao-espacial-internacional>. Acesso em: 03 nov. 2016.

CLOAREC O, *et al.* Statistical total correlation spectroscopy: an exploratory approach for latent biomarker identification from metabolic ¹H NMR data sets. **Analytical Chemistry** v. 77, p. 1282-1289. 2005.

CLOAREC, Olivier et al. Statistical Total Correlation Spectroscopy: An Exploratory Approach for Latent Biomarker Identification from Metabolic ¹H NMR Data Sets. **Analytical Chemistry**, London, v. 77, n. 5, p.1282-1289, mar. 2005. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ac048630x>

CONAB. **Acompanhamento da Safra Brasileira de cana-de-açúcar**. Ministério da Agricultura, Agropecuária e Abastecimento. 2016.

CRAIG, Andrew et al. Scaling and Normalization Effects in NMR Spectroscopic Metabonomic Data Sets. **Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 78, n. 7, p.2262-2267, abr. 2006. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ac0519312>.

CHOI, Y. H.. Metabolic Discrimination of *Catharanthus roseus* Leaves Infected by Phytoplasma Using ¹H-NMR Spectroscopy and Multivariate Data Analysis. **Plant Physiology**, [s.l.], v. 135, n. 4, p.2398-2410, 1 ago. 2004. American Society of Plant Biologists (ASPB). <http://dx.doi.org/10.1104/pp.104.041012>.

DIAS, Marina Oliveira de Souza et al. Sugarcane processing for ethanol and sugar in Brazil. **Environmental Development**, [s.l.], v. 15, p.35-51, jul. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envdev.2015.03.004>.

FALCO, Maria Cristina; SILVA-FILHO, Marcio C.. Expression of soybean proteinase inhibitors in transgenic sugarcane plants: effects on natural defense against *Diatraea saccharalis*. **Plant Physiology And Biochemistry**, [s.l.], v. 41, n. 8, p.761-766, ago. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0981-9428\(03\)00100-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0981-9428(03)00100-1).

FALCO M.C., MARBACH, P.A.S., Pompermayer P, Lopes F.C.C., Silva-Filho M.C.C. Mechanisms of sugarcane response to herbivory. ***Genetics and Molecular Biology***, v. 24, p. 113–122, 2001.

FALCO M.C., Silva-Filho M.C. Expression of soybean proteinase inhibitors in transgenic sugarcane plants: effects on natural defense against *Diatraea saccharalis* ***Plant Physiology and Biochemistry***, v. 41(8), p. 761–766, 2003.

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.

FRAIRE-VELAZQUEZ, Saul; EMMANUEL, Victor. Abiotic Stress in Plants and Metabolic Responses. ***Abiotic Stress - Plant Responses And Applications In Agriculture***, [s.l.], p.25-48, 13 mar. 2013. InTech. <http://dx.doi.org/10.5772/54859>.

FRASER C.M., Chapple C. The phenylpropanoid pathway in Arabidopsis. The Arabidopsis book/Am ***Society Plant Biol*** 2011; 9, e0152; <http://dx.doi.org/10.1093/mp/ssp10610.1199/tab.0152>.

GAVAGHAN C.L, *et al.* Application of NMR-based metabolomics to the investigation of salt stress in maize (*Zea mays*). ***Phytochem Analysis***, v. 22, p. 214-224, 2011.

GIORDANENGO, Philippe *et al.* Compatible plant-aphid interactions: How aphids manipulate plant responses. ***Comptes Rendus Biologies***, [s.l.], v. 333, n. 6-7, p.516-523, jun. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.crv.2010.03.007>.

GOODACRE, Royston *et al.* Proposed minimum reporting standards for data analysis in metabolomics. ***Metabolomics***, [s.l.], v. 3, n. 3, p.231-241, 25 ago. 2007. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s11306-007-0081-3>.

GITAHY, Patrícia de Medeiros et al. BRAZILIAN BACILLUS THURINGIENSIS STRAIN HIGHLY ACTIVE TO SUGARCANE BORER DIATRAEA SACCHARALIS (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE). **Brazilian Journal Of Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 38, n. 38, p.531-537, 29 jul. 2007.

GRAMAZIO, Pietro et al. Breeding for Chlorogenic Acid Content in Eggplant: Interest and Prospects. **Ronotulae Botanicae Horti Agrobotanicicluj-napoca**, Valência, v. 41, n. 1, p.26-35, Fev. 2013.

HALL, Robert D.. Plant metabolomics: from holistic hope, to hype, to hot topic. **New Phytologist**, [s.l.], v. 169, n. 3, p.453-468, 10 jan. 2006. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-8137.2005.01632.x>.

HENRY, Robert; KOLE, Chittaranjan. **Genetics, Genomics and Breeding of Sugarcane**. Enfield: Science Publishers, 2010. 276 p.

HARE J.D. Ecological role of volatiles produced by plants in response to damage by herbivorous insects. **Annu Rev Entomol**; v. 56, p. 161-80; 2011. PMID:21133760; <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-ento-120709-144753>.

HONG, Jun et al. Plant Metabolomics: An Indispensable System Biology Tool for Plant Science. **International Journal Of Molecular And Sciences**, Basel, v. 17, n. 767, p.1-16, 01 jun. 2016.

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

IKONEN, Arsi; TAHVANAINEN, Jorma; ROININEN, Heikki. Chlorogenic acid as an antiherbivore defence of willows against leaf beetles. **Entomologia Experimentalis Et Applicata**, [s.i.], v. 5, n. 99, p.47-54, Jan. 2001.

JOSHI, Jayant G.; HANDLER, Philip. Biosynthesis of Trigonelline. **The Journal Of Biological Chemistry**, [s.i.], v. 235, n. 235, p.2981-2983, abr. 1960.

ARAÚJO JÚNIOR, Josemildo Verçosa. **Avaliação de variedades RB (República do Brasil) em relação ao ataque das principais pragas da cana-de-açúcar em Rio Largo**. 2008. Tese (Doutorado) – Curso de Agronomia, Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo, 2008.

KESSLER, A. Defensive Function of Herbivore-Induced Plant Volatile Emissions in Nature. **Science**, [s.l.], v. 291, n. 5511, p.2141-2144, 16 mar. 2001. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.291.5511.2141>.

KILLINY, Nabil; HIJAZ, Faraj. Amino acids implicated in plant defense are higher in *Candidatus Liberibacter asiaticus*-tolerant citrus varieties. **Plant Signaling & Behavior**, [s.l.], v. 11, n. 4, p.1-10, 2 abr. 2016. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/15592324.2016.1171449>.

KIM, Hye Kyong; CHOI, Young Hae; VERPOORTE, Robert. NMR-based metabolomic analysis of plants. **Nature Protocols**, [s.l.], v. 5, n. 3, p.536-549, 25 fev. 2010. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2009.237>.

KUTYNIOK, M.; MULLER, C. Crosstalk between above- and belowground herbivores is mediated by minute metabolic responses of the host *Arabidopsis thaliana*. **Journal Of Experimental Botany**, [s.l.], v. 63, n. 17, p.6199-6210, 1 out. 2012. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/ers274>.

KIM, Hye Kyong; CHOI, Young Hae; VERPOORTE, Robert. NMR-based plant metabolomics: where do we stand, where do we go?. **Trends In Biotechnology**, [s.l.], v. 29, n. 6, p.267-275, jun. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.02.001>.

LEISS, Kirsten A. et al. NMR Metabolomics of Thrips (*Frankliniella occidentalis*) Resistance in Senecio Hybrids. **Journal Of Chemical Ecology**, [s.l.], 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>.

LEISS, K. A. et al. Identification of Chlorogenic Acid as a Resistance Factor for Thrips in Chrysanthemum. **Plant Physiology**, [s.l.], v. 150, n. 3, p.1567-1575, 15 maio 2009. American Society of Plant Biologists (ASPB). <http://dx.doi.org/10.1104/pp.109.138131>

LEPKA, P et al. Effect of phytoplasmal infection on concentration and translocation of carbohydrates and amino acids in periwinkle and tobacco. **Physiological And Molecular Plant Pathology**, [s.l.], v. 55, n. 1, p.59-68, jul. 1999. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1006/pmpp.1999.0202>.

LI, Dapeng; BALDWIN, Ian T.; GAQUEREL, Emmanuel. Navigating natural variation in herbivory-induced secondary metabolism in coyote tobacco populations using MS/MS structural analysis. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 112, n. 30, p.4147-4155, 13 jul. 2015. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1503106112>.

LIANG YS, CHOI YH, KIM HK, LINTHORST HJ, VERPOORTE R. Metabolomic analysis of methyl jasmonate treated Brassica rapa leaves by 2-dimensional NMR spectroscopy. **Phytochemistry**; v. 67(22), p. 2503–11, 2006.

LIRA, Tatiana Onofre de. **Perfil Metabólico de duas variedades transgênicas de cana-de-açúcar modificadas com os genes inibidores de proteinase Bowman-Birk e Kunitz**. 2010. 207 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Universidade de São Carlos, São Carlos, 2010.

LIU, Ning Qing et al. Metabolomic investigation of the ethnopharmacological use of Artemisia afra with NMR spectroscopy and multivariate data analysis. **Journal Of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 128, n. 1, p.230-235, mar. 2010.

LUDWIG, Christian; VIANT, Mark R.. Two-dimensional J-resolved NMR spectroscopy: review of a key methodology in the metabolomics toolbox. **Phytochem. Anal.**, [s.l.], v. 21, n. 1, p.22-32, jan. 2010. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/pca.1186>.

MACEDO, Newton; MACEDO, Daniella. As pragas de maior incidência nos canaviais e seus controles: PRODUÇÃO VEGETAL. **Visão Agrícola**, Piracicaba - Sp, v. 1, n. 1, p.1-9, jun. 2004.

MAEDA, Hiroshi; DUDAREVA, Natalia. The Shikimate Pathway and Aromatic Amino Acid Biosynthesis in Plants. **Annual Review Of Plant Biology**, [s.l.], v. 63, n. 1, p.73-105, 2 jun. 2012. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105439>.

MAHROUS, Engy A.; FARAG, Mohamed A.. Two dimensional NMR spectroscopic approaches for exploring plant metabolome: A review. **Journal Of Advanced Research**, [s.l.], v. 6, n. 1, p.3-15, jan. 2015. Elsevier BV.

MARTI, Guillaume et al. Metabolomics reveals herbivore-induced metabolites of resistance and susceptibility in maize leaves and roots. **Plant, Cell & Environment**, [s.l.], v. 36, n. 3, p.621-639, 25 set. 2012. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/pce.12002>.

MCNEIL S.D., Nuccio M.L., Ziemak M.J., Hanson A.D. Enhanced synthesis of choline and glycine betaine in transgenic tobacco plants that overexpress phosphoethanolamine N-methyltransferase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, p. 10001–10005, 2001.

MINGOTI, Sueli Aparecida. **ANÁLISE DE DADOS ATRAVÉS DE MÉTODOS DE ESTATÍSTICA MULTIVARIADA: UMA ABORDAGEM APLICADA**. Belo Horizonte: UFMG, 2013. 59 p.

MINORSKY, P. V. Trigonelline: A diverse regulator in plants. **Plant Physiol.** n. 128, p. 7–8, 2002.

MOLLER, B.L. Functional diversifications of cyanogenic glucosides. *Curr. Opin. Plant Biology*. V. 13, p. 338–347, 2010.

MY, Lee et al. Metabolomics-Based Chemotaxonomic Classification of *Streptomyces* spp. and Its Correlation with Antibacterial Activity. *J. Microbiol. Biotechnol*, Republic Of Korea, v. 8, n. 25, p.1265-1274, abr. 2015.

NAKANO, O.; ROMANO, F. C. B.; PESSINI, M. M. O. Broca do rizoma (*Migdolus* spp.) In: NAKANO, O., ROMANO, F. C. B., PESSINI, M. M. O. (Eds.). **Pragas de Solo**. Piracicaba, SP: ESALQ/USP, p.25-35, 2001.

NEILSON, Elizabeth H. et al. Plant chemical defense: at what cost?. **Trends In Plant Science**, [s.l.], v. 18, n. 5, p.250-258, maio 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2013.01.001>.

NELSON D.L., Cox M.M. Lehninger, Principles of Biochemistry, 3rd edition. Worth Publishing, New York, USA, 2000.

PANDURANGAN, S. et al. Relationship between asparagine metabolism and protein concentration in soybean seed. **Journal Of Experimental Botany**, [s.l.], v. 63, n. 8, p.3173-3184, 22 fev. 2012. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/ers039>.

PEREZ, Ana G. et al. Aroma components and free amino acids in strawberry variety Chandler during ripening. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [s.l.], v. 40, n. 11, p.2232-2235, nov. 1992. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jf00023a036>.

PERES, Lázaro Eustáquio Pereira. **Óleos Essenciais: Metabolismo Secundário das Plantas**. 2015. Disponível em: <<http://www.oleosessenciais.org/metabolismo-secundario-das-plantas/>>. Acesso em: 29 dez. 2016.

PASCACIO-VILLAFÁN, Carlos et al. Mixture-Amount Design and Response Surface Modeling to Assess the Effects of Flavonoids and Phenolic Acids on Developmental

Performance of *Anastrepha ludens*. **Journal Of Chemical Ecology**, [s.l.], v. 40, n. 3, p.297-306, mar. 2014. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10886-014-0404-6>.

PICHERSKY, Eran; GERSHENZON, Jonathan. The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. **Current Opinion In Plant Biology**, [s.l.], v. 5, n. 3, p.237-243, Jun. 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1369-5266\(02\)00251-0](http://dx.doi.org/10.1016/s1369-5266(02)00251-0).

PLISCHKE, Andreas et al. Metabolomic Plasticity in GM and Non-GM Potato Leaves in Response to Aphid Herbivory and Virus Infection. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [s.l.], v. 60, n. 6, p.1488-1493, 15 Feb. 2012. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jf204864y>.

POMPERMAYER, Patrícia et al. Effects of soybean proteinase inhibitor on development, survival and reproductive potential of the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis*. **entomologia Experimentalis Et Applicata**, São Paulo, v. 99, n. 99, p.79-85, nov. 2001. CrossRef Test Account. <http://dx.doi.org/10.1023/a:1018979013928>.

RAO, Guodong; SUI, Jinkai; ZHANG, Jianguo. Metabolomics reveals significant variations in metabolites and correlations regarding the maturation of walnuts (*Juglans regia*L). **Biology Open**, [s.l.], v. 5, n. 6, p.829-836, 23 maio 2016. The Company of Biologists.

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

SANDOVAL, Sérgio Santos; SENÔ, Kenji Cláudio Augusto. COMPORTAMENTO E CONTROLE DA *Diatraea saccharalis* NA CULTURA DA CANA-DE-AÇÚCAR. **Nucleus**, [s.l.], v. 7, n. 1, p.243-257, 30 abr. 2010. Fundacao Educational de Ituverava. <http://dx.doi.org/10.3738/1982.2278-311>.

SARDANS, J. et al. Metabolic responses of *Quercus ilex* seedlings to wounding analysed with nuclear magnetic resonance profiling. **Plant Biology**, [s.l.], v. 16, n. 2, p.395-403, 17 abr. 2013. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/plb.12032>.

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

SATO, Dan et al. Comparative metabolite profiling of foxglove aphids (*Aulacorthum solani* Kaltentbach) on leaves of resistant and susceptible soybean strains. **Molecular Biosystems**, [s.l.], v. 10, n. 4, p.909-915, 2014. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c3mb70595a>.

SILVA, Ana Paula Dias da. **CARACTERIZAÇÃO DE METABÓLITOS NÃO VOLÁTEIS DA CANA-DE-AÇÚCAR**. 2012. 132 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Instituto de Química, Universidade Estadual de São Carlos, Araraquara, 2012.

SILVA FILHO, B.F. Análise da resposta ecológica da cana-de-açúcar (*Saccharum sp*) em resposta à herbivoria por *Diatraea saccharalis*. 2014. 101 f. Tese (Doutorado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2014.

SOUZA, Joseane Rodrigues de et al. Divergência genética de cultivares de cana-de-açúcar quanto à resistência a *Diatraea saccharalis*. **Semina: Ciências Agrárias**, [s.l.], v. 34, n. 61, p.3367-3376, 6 dez. 2013. Universidade Estadual de Londrina. <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2013v34n6supl1p3367>.

STORK W, Diezel C, Halitschke R, Galis I, & Baldwin IT. An ecological analysis of the herbivory-elicited JA burst and its metabolism: plant memory processes and predictions of the moving target model. *n.* 4, p. e 4697, 2009.

STEINBRENNER, Adam D. et al. Herbivore-Induced Changes in Tomato (*Solanum lycopersicum*) Primary Metabolism: A Whole Plant Perspective. **Journal Chemical Ecology**, Berkeley, v. 37, n. 37, p.1294-1303, 10 dez. 2011.

STRAUSS SY & Agrawal A.A. The ecology and evolution of plant tolerance to herbivory. **Trends Ecol Evol**, v. 14, p. 179-185, 1999.

TAVARES, Sheila dos Santos. **Ecologia Química da Cana-de-açúcar: Caracterização das respostas de defesa em diferentes cultivares de cana-de-açúcar**. 2016. 123 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2016.

TZIN, Vered; GALILI, Gad. New Insights into the Shikimate and Aromatic Amino Acids Biosynthesis Pathways in Plants. **Molecular Plant**, [s.l.], v. 3, n. 6, p.956-972, nov. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1093/mp/ssq048>.

UMETRICS, Mks. **User Guide to SIMCA**. Malmö: Mks Umetrics Ab, 2013. 661 p.

VERPOORTE, R.; CHOI, Y. H.; KIM, H. K.. NMR-based metabolomics at work in phytochemistry. **Phytochemistry Reviews**, [s.l.], v. 6, n. 1, p.3-14, 27 fev. 2007. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s11101-006-9031-3>.

VOELCKEL C & Baldwin IT. Herbivore-induced plant vaccination. Part II. Array-studies reveal the transience of herbivore-specific transcriptional imprints and a distinct imprint from stress combinations. **Plant J**, n. 38, p. 650-663, 2004.

WAR, Abdul Rashid et al. Mechanisms of plant defense against insect herbivores. **Plant Signaling & Behavior**, [s.l.], v. 7, n. 10, p.1306-1320, out. 2012. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.4161/psb.21663>.

WORLEY, B.; POWERS, R. Multivariate Analysis in Metabolomics. **Current Metabolomics**, v. 1, p. 92–107, 2013.

XI, Yuanxin et al. Improved identification of metabolites in complex mixtures using HSQC NMR spectroscopy. **Analytica Chimica Acta**, [s.l.], v. 614, n. 2, p.127-133, Maio 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2008.03.024>.

YOO, Heejin et al. An alternative pathway contributes to phenylalanine biosynthesis in plants via a cytosolic tyrosine: phenylpyruvate aminotransferase. **Nature Communications**, [s.l.], v. 4, p.1-11, 25 Nov. 2013. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms3833>