



Universidade de São Paulo
Instituto de Química de São Carlos

Tatiana Onofre de Lira

**Perfil Metabólico de duas variedades transgênicas de cana-de-
açúcar modificadas com os genes inibidores de proteinase
Bowman-Birk e Kunitz**

São Carlos

2010

TATIANA ONOFRE DE LIRA

Perfil Metabólico de duas variedades transgênicas de cana-de-açúcar modificadas com os genes inibidores de proteinase Bowman-Birk e Kunitz

Tese apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Química.

Área de Concentração:
Química Analítica

Orientadora: Profa. Dra.
Janete H. Yariwake

São Carlos

2010

Nome: LIRA, Tatiana Onofre de

Título: Perfil Metabólico de duas variedades transgênicas de cana-de-açúcar modificadas com os genes inibidores de proteinase Bowman-Birk e Kunitz

Tese apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Química Analítica

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

À minha mãe, com amor, admiração e gratidão por sua compreensão, carinho, presença e incansável apoio ao longo do período de elaboração deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Janete H. Yariwake pela orientação, que nos anos de convivência, muito me ensinou, contribuindo para meu crescimento científico, intelectual e pessoal, sem a qual esta obra não seria possível.

Ao Prof. Dr. Robert Verpoorte (Leiden University), pela colaboração, atenção e apoio durante o processo de definição e co-orientação.

Ao Prof. Dr. Jean Luc-Angenot (Liege University) e Prof. Dr. Norberto P. Lopes (USP-RP), pela oportunidade de realização das análises de espectrometria de massas.

À prof.a Marcia Miguel Castro Ferreira (Unicamp) e Dr. Juliano Ribeiro (Unicamp), pela colaboração e ensinamentos com os experimentos quimiométricos.

Ao prof. Dr. Marcio de castro Silva-Filho (ESALQ), Dra. Maria Cristina Falco Centro de Tecnologia Canvieira- Piracicaba, SP), pelo fornecimento das plantas analisadas neste trabalho.

Aos colegas de laboratório Dra Maria Luiza Zeraik (IQSC) e Benedito dos Santos (IQSC) pela preciosa ajuda com os problemas cotidianos de laboratório e pela amizade.

À agência CAPES, pela concessão da bolsa doutorado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa no exterior.

À minha família e amigos pela compreensão, amor e carinho durante a elaboração deste trabalho.

*“Há homens que lutam um dia e são bons.
Há outros que lutam um ano e são melhores.
Há os que lutam muitos anos e são muito bons.
Porém, há os que lutam toda a vida.
Esses são os imprescindíveis.”*

Bertold Brecht

Resumo

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.** Tese (Doutorado) – Instituto de Química de São Paulo, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

A demanda comercial de produtos derivados da cana-de-açúcar é a grande motivadora do aprimoramento genético com a finalidade de proporcionar a planta aumento no acúmulo de sucrose e/ou de resistência a ataques de herbívoros. Assim sendo, este trabalho abrange o estudo metabolômico de duas variedades transgênicas da cana-de-açúcar (Bowman-Birk-SBBI e Kunitz- SKTI) e seus respectivos controles através de duas metodologias distintas: a análise quimiométrica do perfil cromatográfico dos polifenóis existentes nas variedades transgênicas e o estudo metabolômico por ressonância magnética nuclear a fim de identificar possíveis diferenças entre as plantas transgênicas em relação aos seus respectivos controles. Nas amostras de folhas foram encontradas nove regiões cromatográficas representativas para a discriminação das variedades SBBI e SKTI. Análises de HPLC-MS/MS foram empregadas para a identificação parcial dos biomarcadores selecionados pelo método OPS, dentre eles: ácido cafeoilaquínico, ácido feruloilaquínico, shaftosídeo ou isoshaftosídeo, além de quatro substâncias parcialmente identificadas: um derivado de apigenina, um glicosídeo da tricina—O-(metoxicinamato), um derivado de flavonóide metoxilado e um derivado de catequina. Através do estudo metabolômico obteve-se uma visão geral sobre os metabólitos produzidos pelas variedades transgênicas e controles e através das análises dos espectros de RMN ^1H , J-resolved, COSY ^1H - ^1H , HMBC ^{13}C - ^1H foi possível identificar a presença de ácidos orgânicos, amino-ácidos, açúcares, flavonóides e fenilpropanóides. Adicionalmente, a análise quimiométrica dos espectros de RMN ^1H mostrou não haver diferença significativa entre folhas SBBI e controles e SKTI e controles. Como conclusão pôde-se sugerir que a inserção dos genes inibidores de protease na cana-de-açúcar não afeta as rotas biosintéticas da planta, mas apenas confere maior resistência contra a broca da cana-de-açúcar (*Diatrea saccharilis*). Entretanto diferenças significativas entre as variedades transgênicas foram encontradas: a variedade SBBI apresenta teor de açúcares e fenilpropanóides mais elevados que a variedade SKTI. Conclui-se também que as alterações metabólicas encontradas neste trabalho não são provenientes dos genes inseridos na planta, mas por outro tipo de efeito sofrido nos controles das duas variedades, como por exemplo, variação somaclonal que antecede a modificação genética.

Palavras chave: cana-de-açúcar, metaboloma, OPS, HPLC-MS/MS, PCA, RMN

Abstract

LIRA, Tatiana Onofre de. **Metabolic profile of two transgenic varieties of sugarcane Sodified with protease inhibitors genes Bowman-Birk and Kunitz, 2010.** Thesis (Doctoral) – Instituto de Química de São Paulo, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Comercial demanding of industrial products from sugarcane plants are responsible for researches on genetic improvements with the aim to increase sucrose plant accumulation and/or provide resistance against herbivores. Thus, the present work covers metabolomic study of two transgenics varieties of sugarcane (Bowman-Birk-SBBI e Kunitz- SKTI) and their respective wild (control) plants through two distinct methodologies: chemometrics analysis of polyphenols chromatography profile found into the transgenics varieties and the metabolomic study by nuclear magnetic resonance for identification of possible metabolic alterations comparing transgenics plants and their respective controls. Nine discriminants chromatography regions were detected on SBBI and SKTI leaves samples. HPLC-MS/MS analyses were performed for biomarkers identification selected by OPS method, among then: caffeoylquinic acid, feruloyl quinic acid, shaftoside or isoshaftoside, apigenin derivatives, triclin-O-(methoxycynamate)-glicosilated, methoxylated flavone and catechine derivative. A general vision about metabolites produced for transgenics and control plants could be achieved through metabolomic study. Identification of organic acids, amino acids, sugars, phenylpropanoids and flavonoids were possible through ^1H NMR, J-resolved, COSY ^1H - ^1H , HMBC ^{13}C - ^1H . Moreover, chemometrics analysis of the ^1H NMR spectra had shown no significant differences between SBBI with wild plant and SKTI with control plants. These results suggest that the biosyntheses pathways are not affected by protease inhibitors genes introduced on sugarcane, but these genes just provides resistance against *Diatrea saccharilis*. However, metabolic alterations were found between the transgenic plants (SBBI and SKTI). Specially, the variety SBBI presents high levels of sugars and phenylpropanoids compared with SKTI variety. In conclusion, the metabolic variation found in the present are not due to genes introduction, but are originated by other type of effect on wild plants, such as, somaclonal variation before genetical modification.

Keywords: sugarcane, metabolome, OPS, PCA, HPLC-MS/MS, NMR

Lista de figuras

<i>Figura 1.1. Foto da planta cana-de-açúcar (Saccharum officinarum).....</i>	<i>32</i>
<i>Figura 1.2. Estrutura básica dos flavonóides: esqueleto básico (C₆-C₃-C₆) e numeração para as classes de flavonóides presentes na cana-de-açúcar.....</i>	<i>34</i>
<i>Figura 1.3. Estrutura da peonidina 3- monogalactose.....</i>	<i>35</i>
<i>Figura 1.4. Estrutura básica dos derivados de flavonóis encontrados na cana-de-açúcar.....</i>	<i>35</i>
<i>Figura 1.5. Estrutura básica de flavonas nos extratos de cana-de-açúcar</i>	<i>36</i>
<i>Figura 1.6. Mecanismo de ativação dos genes inibidores de proteinase.....</i>	<i>40</i>
<i>Figura 1.7. Esquema representativo de um sistema de HPLC.....</i>	<i>43</i>
<i>Figura 1.7. Esquema representativo de um detector de arranjo de fotodiodos.....</i>	<i>45</i>
<i>Figura 1.8. Esquema representativo do mecanismo de ionização ESI.....</i>	<i>47</i>
<i>Figura 1.9. Esquema da interface ESI- Z-spray Lockspray® (Micromass).....</i>	<i>47</i>
<i>Figura 1.10. Esquema de um analisador quadrupolar.....</i>	<i>48</i>
<i>Figura 1.11. Esquema de um analisador triplo quadrupolo.....</i>	<i>49</i>
<i>Figura 1.12. Representação dos níveis de energia para o hidrogênio sob ação de um campo magnético B.....</i>	<i>50</i>
<i>Figura 1.13. Movimento de precessão de um núcleo de hidrogênio.....</i>	<i>52</i>
<i>Figura 1.14. Equipamento de ressonância magnética nuclear.....</i>	<i>53</i>
<i>Figura 2.1. Representação esquemática da teoria do alinhamento COW.....</i>	<i>65</i>
<i>Figura 2.2. Representação do alisamento convolutivo (Savitzky-Golay) para uma janela de 13 pontos.....</i>	<i>67</i>
<i>Figura 2.3.: Representação de um dendograma de HCA.....</i>	<i>70</i>

<i>Figura 2.4.: Componente Principal traçada para duas variáveis.....</i>	<i>72</i>
<i>Figura 2.5. Esquema de extração e clean up para as amostras de folhas e garapa da cana-de-açúcar transgênica Bowman-Birk e Kunitz.....</i>	<i>76</i>
<i>Figura 2.6. Perfil cromatográfico representativo (HPLC-PAD, $\lambda = 330$ nm) das amostras de folhas e garapa das variedades Bowman-Birk (BB) e Kunitz (K) da cana-de-açúcar.....</i>	<i>78</i>
<i>Figura 2.7. Espectros típicos UV-PDA de flavonóides presentes nas amostras de cana-de-açúcar.....</i>	<i>79</i>
<i>Figura 2.8. Espectro UV-PDA de possível polifenol presente nas amostras de folhas e garapas das duas variedade transgênicas da cana-de-açúcar.....</i>	<i>80</i>
<i>Figura 2.9. Cromatogramas (HLPC-PDA, $\lambda = 330$ nm) dos perfis das duas variedades de folhas de cana-de-açúcar: (a) dados originais; (b) dados transformados com alisamento (janela =5 e primeira derivada) e normalização (normalizado para unidade de área ou norma-1).....</i>	<i>81</i>
<i>Figura 2.10. Dendograma das amostras de folhas das duas variedades de cana-de-açúcar (“Bowman-Birk e “Kunitz”)......</i>	<i>82</i>
<i>Figura 2.11. Alinhamento COW: (a) cromatogramas desalinhados; (b) cromatogramas alinhados.....</i>	<i>83</i>
<i>Figura 2.12. Expansão das regiões entre 7 a 10 minutos dos cromatogramas das variedades da cana-de-açúcar (“Bowman-Birk” e “Kunitz”): (a) região desalinhada; (b) região alinhada pelo método COW.....</i>	<i>84</i>
<i>Figura 2.12. Picos selecionados pelo algoritmo OPS para discriminação das amostras de folhas das variedades “Bowman-Birk e “Kunitz”.....</i>	<i>85</i>
<i>Figura 2.13. Gráfico de escores para as amostras de folhas das variedades de cana-de-açúcar “Bowman-Birk” e “Kunitz”.....</i>	<i>87</i>
<i>Figura 2.14. Gráfico de pesos para as amostras de folhas das variedades de cana-de-açúcar “Bowman-Birk” (BB) e “Kunitz” (K), picos conforme o cromatograma da</i>	

figura 2.12: pico 1, tr = 6,45, pico 2, tr = 7,50, pico 3, tr = 13,1, pico 4, tr = 17,9, pico 5, tr = 20,1, pico 6, tr = 23,8 min, pico 7, tr = 25,9, pico 8, tr = 28,5, pico 9, tr = 47,3 min.....88

Figura 2.15. Espectros de UV-PDA dos 9 picos cromatográficos, conforme cromatograma da figura 2.12, selecionados pelo algoritmo OPS para as amostras das duas variedades de folhas de cana-de-açúcar: pico 1, tr = 6,45, pico 2, tr = 7,50, pico 3, tr = 13,1, pico 4, tr = 17,9, pico 5, tr = 20,1, pico 6, tr = 23,8 min, pico 7, tr = 25,9, pico 8, tr = 28,5, pico 9, tr = 47,3 min.....91

Figura 2.16. Dendograma das amostras de garapa das duas variedades de cana-de-açúcar (“Bowman-Birk e “Kunitz”)......93

Figura 2.17. Alinhamento COW: (a) cromatogramas desalinhados; (b) cromatogramas alinhados.....94

Figura 2.18. Picos selecionados pelo algoritmo OPS para discriminação das amostras de garapa das variedades “Bowman-Birk e “Kunitz”: pico 1, tr = 5,32 , pico 2, tr = 8,2, pico 3, tr = 9,75, pico 4, tr = 13,5, pico 5, tr = 15,4, pico 6, tr = 17,6, pico 7, tr = 18,7, pico 8, tr = 20,5, pico 9, tr = 22,5, pico 10, tr = 26,3, pico 11, tr = 27,9, pico 12, tr = 32,9 minutos.....96

Figura 2.19. Gráfico de escores para as amostras de garapa das variedades de cana-de-açúcar “Bowman-Birk” (BB) e “Kunitz” (K)......97

Figura 2.20. Gráfico de pesos para a primeira componente principal (PC1) das amostras de garapa das duas variedades transgênicas “Bowman-Birk” e “Kunitz”, picos conforme o cromatograma da figura 2.18: pico 1, tr = 5,32 , pico 2, tr = 8,2, pico 3, tr = 9,75, pico 4, tr = 13,5, pico 5, tr = 15,4, pico 6, tr = 17,6, pico 7, tr = 18,7, pico 8, tr = 20,5, pico 9, tr = 22,5, pico 10, tr = 26,3, pico 11, tr = 27,9, pico 12, tr = 32,9 minutos.....98

Figura 2.21. Espectros de UV-PDA dos 12 picos cromatográficos, conforme figura 2.18, selecionados pelo algoritmo OPS para as amostras das duas variedades de garapa de cana-de-açúcar: pico 1, tr = 5,32 , pico 2, tr = 8,2, pico 3, tr = 9,75, pico 4,

<i>tr = 13,5, pico 5, tr = 15,4, pico 6, tr = 17,6, pico 7, tr = 18,7, pico 8, tr = 20,5, pico 9, tr = 22,5, pico 10, tr = 26,3, pico 11, tr = 27,9, pico 12, tr = 32,9 minutos.....</i>	<i>101</i>
<i>Figura 3.1. Nomenclatura de fragmentação proposta por Domon e Costello.....</i>	<i>112</i>
<i>Figura 3.2. (a) Cromatograma do íon total (TIC); (b) Cromatograma de massas do ácido clorogênico, íon [M-H]⁻ 353, modo negativo.....</i>	<i>115</i>
<i>Figura 3.3. (a) Espectro de massas (MS1); (b) espectro de massas MS2 do ácido clorogênico, íon [M-H]⁻ 353, modo negativo.....</i>	<i>115</i>
<i>Figura 3.4. (a) Cromatograma do íon total (TIC); (b) Cromatograma de massas do ácido 1,5- dicafeoilquínico, [M-H]⁻ 515, modo negativo.....</i>	<i>116</i>
<i>Figura 3.5. (a) Espectro de massas (MS1); (b) espectro de massas MS2 do ácido 1',5'-O-dicafeoil quínico, [M-H]⁻ 515, modo negativo.....</i>	<i>117</i>
<i>Figura 3.6. (a) Cromatograma de massas da apigenina-8-C-glucosídeo (vitexina), [M-H]⁻ 431, modo negativo.....</i>	<i>118</i>
<i>Figura 3.7. (a) Espectro de massas (MS); (b) espectro de massas MS2 da apigenina-8-C-glucosídeo (vitexina), [M-H]⁻ 431, modo negativo.....</i>	<i>118</i>
<i>Figura 3.8. (a) Cromatograma TIC para a variedade de folhas da cana-de-açúcar Bowman-Birk; (b) cromatograma TIC para a variedade de folhas da cana-de-açúcar Kunitz.....</i>	<i>119</i>
<i>Figura 3.9. Estrutura do ácido clorogênico.....</i>	<i>121</i>
<i>Figura 3.10. (a) Cromatograma BPI para o pico cromatográfico 1, selecionado pelo método OPS; (b) Espectro de massas (MS1) [M-H]⁻ 353; (c) espectro de massas MS2 do íon quase-molecular [M-H]⁻ 353 das amostras de folhas da variedade de cana-de-açúcar Bowman-Birk; (d) espectro de massas MS2 do íon quase-molecular [M-H]⁻ 353 para as amostras de folhas da variedade de cana-de-açúcar Kunitz.....</i>	<i>122</i>
<i>Figura 3.11. Possível fragmentação para o ácido cafeoil quínico.....</i>	<i>123</i>
<i>Figura 3.12. Espectros de massas MS2 para o pico cromatográfico 1, t_r = 7,8 min, [M+H]⁺ 355 contido nas amostras de folhas das duas variedades transgênicas.....</i>	<i>123</i>

<i>Figura 3.13. (a) Cromatograma TIC para o pico cromatográfico 2 selecionado pelo método OPS; (b) Espectro de massas MS1 [M-H]⁻ 367; (c) espectro de massas MS2 do íon quasi-molecular [M-H]⁻ 367 para folhas da variedade Bowman-Birk; (d) espectro de massas MS2 do íon quase-molecular [M-H]⁻ 367.....</i>	<i>125</i>
<i>Figura 3.14. Estrutura do ácido 5-feruloilquínico.....</i>	<i>126</i>
<i>Figura 3.15. Possível fragmentação sofrida pelo ácido feruloilquínico.....</i>	<i>126</i>
<i>Figura 3.16. Espectro de massas MS2, modo positivo, para o íon quase-molecular [M+H]⁺ 369, referente ao ácido feruloilquínico.....</i>	<i>127</i>
<i>Figura 3.17. (a) Cromatograma TIC para o pico cromatográfico 3 selecionado pelo método OPS; (b) Espectro de massas MS1, [M-H]⁻ 678; (c) espectro de massas MS2 do íon quasi-molecular em [M-H]⁻ 678 nas amostras de folhas das duas variedades transgênicas; (d) expansão do espectro de massas MS2, [M-H]⁻ 678.....</i>	<i>128</i>
<i>Figura 3.18. Espectro de massas MS2, modo positivo, para [M+H]⁺ 680.....</i>	<i>129</i>
<i>Figura 3.19. Estruturas de sub-unidades pertencentes a substância referente ao pico cromatográfico 3.....</i>	<i>129</i>
<i>Figura 3.20. (a) Cromatograma de massas (MS); (b) Espectro de massas MS1, [M-H]⁻ 563, do pico cromatográfico 4, t_r = 16,3 minutos; (c) Espectro de massas MS2, [M-H]⁻ 563, do pico cromatográfico 4 para as amostras de folhas Bowman-Birk; (c) Espectro de massas MS2, [M-H]⁻ 563, do pico cromatográfico 4 para as amostras de folhas Kunitz.....</i>	<i>131</i>
<i>Figura 3.21. Esquema de fragmentação proposto para o shaftosídeo e isoshaftosídeo, seguindo a nomenclatura proposta por Domon e Costello.....</i>	<i>131</i>
<i>Figura 3.22. (a) Cromatograma de massas (MS); (b) Espectro de massas MS1, [M-H]⁻ 431, do pico cromatográfico 5, t_r = 17,8 minutos; (c) Espectro de massas MS2, [M-H]⁻ 431, do para as amostras de folhas Bowman-Birk; (d) Espectro de massas MS2, [M-H]⁻ 431, para as amostras de folhas Kunitz.....</i>	<i>133</i>
<i>Figura 3.23. Estrutura sugerida para uma das substâncias presentes na terceira região cromatográfica pelo algoritmo OPS.....</i>	<i>133</i>

Figura 3.24. (a) Cromatograma de massas (MS); (b) Espectro de massas MS1, $[M-H]^-$ 515, do pico cromatográfico 6 em $t_r = 24,4$ minutos; (c) Espectro de massas MS2, $[M-H]^-$ 515, do pico cromatográfico 6, para as amostras de folhas Bowman-Birk; (c) Espectro de massas MS2, $[M-H]^-$ 515, do pico cromatográfico 6 para as amostras de folhas Kunitz.....135

Figura 3.25. Possível estrutura representativa para a substância referente à sétima região cromatográfica selecionada pelo algoritmo OPS.....135

Figura 3.26. (a) Cromatograma de massas (MS); (b) Espectro de massas MS2, $[M-H]^-$ 579, do pico cromatográfico 7, $t_r = 26,9$ minutos, para as amostras de folhas Bowman-Birk; (c) Espectro de massas MS2, $[M-H]^-$ 579, do pico cromatográfico 7, $t_r = 26,9$ minutos, para as amostras de folhas Kunitz.....136

Figure 3.27. Espectro de massas MS2 $[M+H]^+$, modo positivo, do pico cromatográfico 7, $t_r = 26,9$ minutos.....137

Figure 3.28. Substituinte da estrutura referente ao pico cromatográfico 7.....137

Figura 3.29. (a) Cromatograma de massas (MS); (b) Espectro de massas MS1, $[M-H]^-$ 651;(c) Espectro de massas MS2 $[M-H]^-$ 651 do pico cromatográfico 8, $t_r = 29,5$ minutos, para as amostras de folhas Kunitz; (c) Espectro de massas MS2 $[M-H]^-$ 651, do pico cromatográfico 8.....138

Figura 3.30. Fragmentos encontrados para a substância tricina-7-O-(6'-p-metoxicinamato)-glicosilado.....139

Figura 3.31. (a) Cromatograma de massas (MS); (b) Espectro de massas MS1 do pico cromatográfico 9, $t_r = 44,5$ minutos (c) Espectro de massas MS2 do pico 9, para as amostras de folhas Bowman-Birk; (c) Espectro de massas MS2, do pico cromatográfico 8, para as amostras de folhas Kunitz.....140

Figura 3.32. Fragmentos encontrados para a substância referente ao pico cromatográfico 9.....141

Figura 4.1. Representação da correlação entre fenótipo com o genótipo e condições ambientais.....147

<i>Figura 4.2. Método direto de extração para as amostras de folhas das variedades de cana-de-açúcar.....</i>	<i>151</i>
<i>Figura 4.3. Método indireto de extração utilizado para as amostras de folhas das variedades de cana-de-açúcar.....</i>	<i>152</i>
<i>Figura 4.4. Espectro de RMN ¹H (500,13 MHz) em CD₃OD-KH₂PO₄ e D₂O (1:1) da amostra de folha do controle da variedade transgênica Bowman-Birk (WTB), referente à extração direta (item 4.2.3), para ilustrar as regiões contendo os sinais de prótons característicos para aminoácidos, carboidratos e polifenóis.....</i>	<i>155</i>
<i>Figura 4.5. Espectro de J-resolved, em CD₃OD-KH₂PO₄ e D₂O (1:1) da amostra de folha do controle da variedade transgênica Bowman-Birk (WTB), obtida por extração direta (item 4.2.3).....</i>	<i>156</i>
<i>Figura 4.6. Espectro de COSY ¹H-¹H, em CD₃OD-KH₂PO₄ e D₂O (1:1) da amostra de folha do controle da variedade transgênica Bowman-Birk (WTB), obtida por extração direta (item 4.2.3).....</i>	<i>157</i>
<i>Figura 4.7. Espectro de HMBC ¹H-¹³C, em CD₃OD-KH₂PO₄ e D₂O (8:2) da amostra de folha do controle da variedade transgênica Bowman-Birk (WTB), obtida por extração indireta (item 4.2.3).....</i>	<i>158</i>
<i>Figura 4.8. Estrutura da α-alanina e β-alanina.....</i>	<i>159</i>
<i>Figura 4.9. Espectro de ¹H RMN (500,13 MHz), expandido para a região de δ 0,9-3,3 ppm, para extrato de folha: (a) utilizando extração direta com CD₃OD-KH₂PO₄ e D₂O (1:1); (b) utilizando extração indireta com CD₃OD-KH₂PO₄ e D₂O (8:2).....</i>	<i>160</i>
<i>Figura 4.10. Espectro J-resolved expandido para a região em δ 0,50-2,00 ppm, para extrato de folha: (a) utilizando extração direta com CD₃OD-KH₂PO₄ e D₂O (1:1); (b) utilizando extração indireta com CD₃OD-KH₂PO₄ e D₂O (8:2).....</i>	<i>161</i>
<i>Figura 4.11. Expansão do espectro J-Resolved na região de δ 2,00 – 3,00 ppm, obtido para a extração direta CD₃OD-KH₂PO₄ e D₂O (1:1): β-alanina (δ 2,53 ppm, tripleto, J = 6,50 Hz).....</i>	<i>162</i>

<i>Figura 4.12. Expansão do espectro J-Resolved na região de δ 3,00-4,00 ppm, obtido para a extração direta $CD_3OD-KH_2PO_4$ e D_2O (1:1): β-alanina (δ 3,16 ppm, tripleto, $J = 6,50$ Hz).....</i>	<i>163</i>
<i>Figura 4.13. Espectro de COSY $^1H-^1H$ para extrato de folha: (a) utilizando extração direta com $CD_3OD-KH_2PO_4$ e D_2O (1:1); (b) utilizando extração indireta com $CD_3OD-KH_2PO_4$ e D_2O (8:2).....</i>	<i>164</i>
<i>Figura 4.14. Expansão do espectro de HMBC $^1H-^{13}C$ em $CD_3OD-KH_2PO_4$ e D_2O (8:2) na região de δ 0,3-3,1 ppm, para as amostras de folhas das variedades transgênicas da cana-de-açúcar e seus controles obtido utilizando extração indireta.....</i>	<i>165</i>
<i>Figura 4.15. Estruturas da valina, isoleucina e treonina</i>	<i>166</i>
<i>Figura 4.16. Estrutura da asparagina e ácido aspártico.....</i>	<i>166</i>
<i>Figura 4.17. Espectro de RMN 1H (500,13 MHz), expandido para a região de δ 1,8-3,2 ppm, para extrato de folha: (a) utilizando extração direta com $CD_3OD-KH_2PO_4$ e D_2O (1:1); (b) utilizando extração indireta com $CD_3OD-KH_2PO_4$ e D_2O (8:2).....</i>	<i>167</i>
<i>Figura 4.18. Espectro J-resolved expandido para a região em δ 1,80-3,00 ppm, para extrato de folha: (a) utilizando extração direta com $CD_3OD-KH_2PO_4$ e D_2O (1:1); (b) utilizando extração indireta com $CD_3OD-KH_2PO_4$ e D_2O (8:2).....</i>	<i>168</i>
<i>Figura 4.19. Expansão do espectro de COSY $^1H-^1H$ na região de δ 0,50 - 6,0 ppm, para extrato de folha utilizando extração direta com $CD_3OD-KH_2PO_4$ e D_2O (1:1).....</i>	<i>168</i>
<i>Figura 4.20. Estrutura do ácido 4-aminobutírico.....</i>	<i>169</i>
<i>Figura 4.21. Estrutura dos ácidos succínico e maleico.....</i>	<i>169</i>
<i>Figura 4.22. Estrutura da colina.....</i>	<i>170</i>

<i>Figura 4.24. Espectro J-resolved expandido para a região em δ 3,00-3,50 ppm, para extrato de folha: (a) utilizando extração direta com $CD_3OD-KH_2PO_4$ e D_2O (1:1); (b) utilizando extração indireta com $CD_3OD-KH_2PO_4$ e D_2O (8:2).....</i>	<i>171</i>
<i>Figura 4.25. Expansão do espectro de HMBC $^1H-^{13}C$ em $CD_3OD-KH_2PO_4$ e D_2O (8:2) na região do 1H em δ 3,10 - 5,00 ppm, para as amostras de folhas das variedades transgênicas da cana-de-açúcar</i>	<i>171</i>
<i>Figura 4.26. Estruturas do inositol e glicina.....</i>	<i>172</i>
<i>Figura 4.27. Expansão do espectro de J-resolved, utilizando extração direta com $CD_3OD-KH_2PO_4$ e D_2O (1:1), na região em δ 3,50-5,00 ppm.....</i>	<i>172</i>
<i>Figura 4.28. Estrutura do ácido shiquímico.....</i>	<i>173</i>
<i>Figura 4.29. Espectro J-resolved expandido para a região em δ 3,50-5,00 ppm, para extrato de folha, utilizando extração direta com $CD_3OD-KH_2PO_4$ e D_2O (1:1).....</i>	<i>174</i>
<i>Figura 4.30. Espectro J-resolved expandido para a região em δ 4,00-5,60 ppm, para extrato de folha, utilizando extração indireta com $CD_3OD-KH_2PO_4$ e D_2O (8:2).....</i>	<i>174</i>
<i>Figura 4.31. Espectro completo (δ 0,3-9,5 ppm) de $^1H-^{13}C$ HMBC em $CD_3OD-KH_2PO_4$ e D_2O (8:2), para as amostras de folhas das variedades transgênicas da cana-de-açúcar e seus controles obtido utilizando extração indireta.....</i>	<i>175</i>
<i>Figura 4.32. Estruturas dos açúcares: sacarose, α-,β-glucose.....</i>	<i>175</i>
<i>Figura 4.33. Espectro de RMN 1H (500,13 MHz), expandido para a região de δ 6,00-8,20 ppm para extrato de folha em $CD_3OD-KH_2PO_4$ e D_2O (8:2).....</i>	<i>176</i>
<i>Figura 4.34. Estruturas dos ácidos orgânicos: fumárico e trans-aconítico.....</i>	<i>176</i>
<i>Figura 4.35. Espectro J-resolved expandido para a região em δ 6,00-7,00 ppm, para extrato de folha, utilizando extração direta com $CD_3OD-KH_2PO_4$ e D_2O (1:1).....</i>	<i>177</i>
<i>Figura 4.36. Espectro de COSY $^1H-^1H$, para extrato de folha utilizando extração direta com $CD_3OD-KH_2PO_4$ e D_2O (1:1).....</i>	<i>178</i>

<i>Figura 4.37. Espectro J-resolved expandido para a região em δ 5,8-8,5 ppm, para extrato de folha, utilizando extração indireta com $CD_3OD-KH_2PO_4$ e D_2O (8:2): H-8 e H-7, d, $J=16$ Hz; H-6, dd, $J = 8$ e 2 Hz; H-5, d, $J = 8$ Hz; H-2, d, $J= 2$ Hz.....</i>	<i>179</i>
<i>Figura 4.38. Espectro de COSY $^1H-^1H$ em $CD_3OD-KH_2PO_4$ e D_2O (8:2) para extrato de folha de cana-de-açúcar.....</i>	<i>179</i>
<i>Figura 4.39. Espectro de HMBC $^1H-^{13}C$ em $CD_3OD-KH_2PO_4$ e D_2O (8:2) expandido para a região do próton em δ 5,00-8,00 ppm: H-8 e H-7, d, $J=16$ Hz; H-6, dd, $J = 8$ e 2 Hz; H-5, d, $J = 8$ Hz; H-2, d, $J= 2$ Hz.....</i>	<i>180</i>
<i>Figura 4.40. Estruturas dos fenilpropanóides identificados nos extratos de folhas de cana-de-açúcar por RMN em $CD_3OD-KH_2PO_4$ e D_2O (8:2).....</i>	<i>181</i>
<i>Figura 4.41. Espectro J-resolved expandido para a região em δ 6,40-9,60 ppm, para extrato de folha, utilizando extração indireta com $CD_3OD-KH_2PO_4$ e D_2O (8:2): H-8 (d, $J = 16$ Hz); H-7 (d, $J = 16$ Hz).....</i>	<i>181</i>
<i>Figura 4.42. Espectro J-resolved expandido para a região em δ 4,30-6,00 ppm, para extrato de folha, utilizando extração indireta com $CD_3OD-KH_2PO_4$ e D_2O (8:2).....</i>	<i>182</i>
<i>Figura 4.43. Espectro de J-resolved expandido na região de ressonância de próton em δ 6,50-7,50 ppm do extrato de folhas de cana-de-açúcar (extração indireta) em solvente $CD_3OD-KH_2PO_4$ e D_2O (8:2).....</i>	<i>183</i>
<i>Figura 4.44. Espectro de HMBC $^1H-^{13}C$ expandido na região de ressonância de ^{13}C em δ 105-210 ppm do extrato de folhas de cana-de-açúcar (extração indireta) em solvente $CD_3OD-KH_2PO_4$ e D_2O (8:2).....</i>	<i>183</i>
<i>Figura 4.45. Estrutura do ácido siríngico.....</i>	<i>184</i>
<i>Figura 4.46. Espectro J-resolved expandido na região do próton em δ 5,50-6,50 ppm do extrato de folhas de cana-de-açúcar (extração indireta) em solvente $CD_3OD-KH_2PO_4$ e D_2O (8:2): δ 6,30-6,48 ppm região com sobreposição de sinais de ressonância de H-8 de fenilpropanóides (d, $J = 16$ Hz) e sinais de H-3 de flavonas e/ou H-6 de flavonas 8-C-acetiladas (s).....</i>	<i>185</i>

<i>Figura 4.47. Flavonas com padrão de oxigenação C-5 e C-7.....</i>	<i>185</i>
<i>Figura 4.48. Flavonas C-6 e ou C-8 glicosiladas identificadas nos extratos de folhas de cana-de-açúcar por HPLC-MS.....</i>	<i>186</i>
<i>Figura 4.49. Espectro J-resolved expandido na região do próton em δ 6,50-7,50 ppm do extrato de folhas de cana-de-açúcar (extração indireta) em solvente $CD_3OD-KH_2PO_4$ e D_2O (8:2).....</i>	<i>187</i>
<i>Figura 4.50. Espectro de HMBC $^1H-^{13}C$ expandido na região de ressonância de ^{13}C em δ 105-210 ppm do extrato de folhas de cana-de-açúcar (extração indireta) em solvente $CD_3OD-KH_2PO_4$ e D_2O (8:2).....</i>	<i>187</i>
<i>Figura 4.51. Estrutura geral das isoflavonas.....</i>	<i>190</i>
<i>Figura 4.52. Espectros de RMN 1H integrados em regiões de δ 0,04 ppm (“bucket”) das 42 amostras de folhas das variedades de cana-de-açúcar.....</i>	<i>191</i>
<i>Figura 4.53. Gráfico de escores da matriz de dados $X_{42 \times 243}$ composta por regiões integradas dos espectros de RMN 1H (500 MHz) dos extratos de folhas de cana-de-açúcar obtidos pelo método direto de extração.....</i>	<i>192</i>
<i>Figura 4.54. Gráfico de resíduo gerado pela análise de PCA em relação ao comportamento das amostras de folhas das variedades da cana-de-açúcar.....</i>	<i>193</i>
<i>Figura 4.55. Gráfico de pesos da matriz de dados $X_{42 \times 243}$ composta por regiões integradas dos espectros de RMN 1H (500 MHz) dos extratos de folhas de cana-de-açúcar obtidos pelo método direto de extração.....</i>	<i>194</i>
<i>Figura 4.56. Espectros de RMN 1H dos extratos de folhas (método direto de extração) das variedades transgênicas e seus respectivos controles de cana-de-açúcar: (a) controle Kunitz; (b) transgênico Kunitz; (c) controle Bowman-Birk; (d) transgênico Bowman-Birk.....</i>	<i>195</i>

Figura 4.57. Gráfico de escores da matriz de dados $X_{42 \times 243}$ composta por regiões integradas dos espectros de RMN 1H (500 MHz) dos extratos de folhas de cana obtidos pelo método indireto de extração.....195

Figura 5.1. Rota Biosintética dos flavonóide.....203

Lista de tabelas

Tabela 1.1. Derivados de flavonóis identificados na cana-de-açúcar.....36

Tabela 2.1. Programação gradiente utilizada na obtenção de fingerprinting das folhas e garapa das variedades transgênicas.....37

Tabela 2.2. Área dos picos cromatográficos responsáveis pela discriminação das folhas das variedades de cana-de-açúcar “Bowman-Birk” e “Kunitz”.....89

Tabela 2.3. Área dos picos cromatográficos responsáveis pela discriminação das amostras de garapas das variedades de cana-de-açúcar.....99

Tabela 3.1. Picos cromatográficos selecionados pelo algoritmo OPS e seus respectivos íons quasi-molecular $[M-H]$120

Tabela 4.1. Deslocamento químico e constante de acoplamento característico de substâncias comumente encontradas em plantas $[CD_3OD-KH_2PO_4$ e D_2O , pH 6].....188

Lista de abreviaturas e siglas

Glc	glucose
Rha	raminose
Ara	arabinose
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazila
AI	amilase inhibitor
PI	proteínase inhibitor
ABA	ácido abisícico
SBBI	soybean Bowman-Birk protease inhibitor
SKTI	soybean Kunitz trypsin inhibitor
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
LC	Liquid Chromatography
UV	Ultravioleta
RP18	Reverse Phase octadecylsilane
PDA	Photo Diode Array
MS	Mass Spectrometry
API	Atmospheric Pressure Ionization
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization
ESI	Electron Spray Ionization
CID	Collision Induced Dissociation
Rf	radio frequência
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
FID	Free Induction Decay
1D	uma dimensão
2D	duas dimensões

PCA	Principal Component Analysis
PLS	Partial Least Square
HCA	Hierarchical Cluster Analysis
LDA	Linear Discriminante Analysis
DTW	Dynamic Time Warping
COW	Correlation Optimized Warping
PAGA	Peak Alignment by Genetic Algorithem
PTW	Parametric Time Warping
FW	Fuzzy Warping
OPS	Ordered Predictor Selector
RMSECV	Root Mean Square Error of Cross Validation
r_{cv}	Coeficiente de validação cruzada
PC	Componente principal –Principal Component
MS1	Espectro de varredura de massas
MS2 selecionado	Espectro de fragmentação de massas de um determinado íon
HCA _s	ácidos hidroxicinâmico - Hydroxycinnamic acids
TPS	ácido trimetilsilano propiônico
CD ₃ OD	metanol deuterado
KH ₂ PO ₄	fosfato dihidrogenado de potássio
PW	Pulse width
RD	Relaxation Delay
COSY ¹ H- ¹ H	Correlation spectroscopy
HMQC ¹ H- ¹³ C	Hetero Multiple bounds Quantum Correlation

Lista de símbolos

α	alfa
λ	comprimento de onda
m/z	razão massa sobre carga
I	número de spin
μ	momento magnético nuclear
γ	razão giromagnética
h	constante de Planck
ΔE	energia de transição
δ	deslocamento químico
t_r	tempo de retenção
N	número de secções
s	slack ou ajuste
A	cromatograma alvo
R	cromatograma referência
m	comprimento de cada secção N
L_A	comprimento do cromatograma alvo
X_{ij}	representação matemática de matriz
d_{\max}	distância máxima
$[M-H]^-$	íon quasi-molecular no modo negativo
$[M-H]^+$	íon quasi-molecular no modo negativo

Sumário

Apresentação.....	29
Capítulo 1. Introdução Geral	
1.1. Cana-de-Açúcar.....	31
1.2. Polifenóis e a Cana-de-açúcar.....	32
1.3. Biotecnologia e a Cana-de-açúcar.....	39
1.4. Cromatografia líquida de alta resolução (HPLC- High Performance Liquid Chromatography).....	42
1.5. Cromatografia líquida de alta resolução acoplada à detector de arranjo de fotodiodos (HPLC-PDA).....	44
1.6. Cromatografia líquida de alta resolução acoplada à detector de espectrometria de massas.....	45
1.7. Ressonância magnética nuclear para análise de extratos vegetais.....	50
1.8. Objetivos Gerais.....	54
1.9. Referências Bibliográficas.....	55
Capítulo 2. Análise Quimiométrica dos Perfis Cromatográficos das duas Variedades de Cana-de-açúcar Modificadas com os Inibidores de Proteinase Bowman-Birk e Kunitz	
2.1. Introdução.....	63
2.1.1. Alinhamento dos perfis cromatográficos.....	64
2.1.2. Técnica de alisamento: Savitzky-Golay.....	66
2.1.3. Técnica de normalização.....	67
2.1.4. Análise de agrupamentos hierárquicos (Hierarchical Clusters Analysis- HCA).....	68
2.1.5. Análise de componentes principais (Principal Component Analysis- PCA).....	70

2.1.6. Seleção de Variáveis – algoritmo OPS (Ordered Predictor Selector).....	73
2.2. Parte Experimental.....	74
2.2.1. Materiais e Reagentes.....	74
2.2.2. Material Vegetal.....	74
2.2.3. Extração e clean up do material vegetal.....	75
2.2.4. Condições cromatográficas para obtenção dos perfis (fingerprinting) por HPLC-PAD.....	76
2.2.5. Tratamento quimiométrico.....	77
2.3. Resultados e Discussão.....	78
2.3.1. Análise quimiométrica dos perfis cromatográficos para as amostras de folhas das variedades “Kunitz” e “Bowman-Birk”	80
2.3.1.1 Transformação dos dados originais das amostras de folhas.....	80
2.3.1.2. Seleção de variáveis pelo algoritmo OPS – Ordered Predictor Selection para as amostras de folhas das variedades transgênicas.....	84
2.3.1.3. Análise de componentes principais (PCA) para as amostras de folhas das variedades de cana-de-açúcar “Bowman-Birk” e “Kunitz”.....	86
2.3.2. Análise quimiométrica dos perfis cromatográficos para as amostras de garapa das variedades “Kunitz” e “Bowman-Birk”	92
2.3.2.1. Transformação dos dados originais das amostras de garapa.....	92
2.3.2.2. Seleção de variáveis pelo algoritmo OPS para as amostras de garapa das variedades transgênicas.....	95
2.3.2.3. Análise de componentes principais (PCA) para as amostras de garapa das variedades de cana-de-açúcar “Bowman-Birk” e “Kunitz”.....	96

2.4. Conclusões Parciais.....	102
2.5. Referências Bibliográficas.....	103

Capítulo 3. Caracterização das substâncias referentes aos picos cromatográficos selecionados pela análise quimiométrica das duas variedades transgênicas de cana-de-açúcar (“Bowman-Birk” e “Kunitz”) por HPLC-MS

3.1. Introdução.....	110
3.2.1. Materiais e Reagentes.....	113
3.2.2. Condições de análise por HPLC-MS/MS.....	113
3.3. Resultado e Discussão.....	114
3.3.1. Análise por HPLC-MS dos padrões de polifenóis.....	114
3.3.2. Interpretação dos espectros de massas para os 9 picos cromatográficos selecionados pelo método OPS para as duas variedades transgênicas de folhas.....	119
3.4. Conclusão Parcial.....	141
3.5. Referências Bibliográficas.....	142

Capítulo 4. Estudo preliminar do metaboloma das variedades transgênicas e seus respectivos controles da cana-de-açúcar

4.1. Introdução.....	147
4.2. Parte Experimental.....	149
4.2.1. Materiais e Reagente.....	149
4.2.2. Material Vegetal.....	150
4.2.3. Método para extração do material vegetal.....	151
4.2.4. Parâmetros para análise no espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	152
4.2.5. Tratamento Quimiométrico.....	153

4.3. Resultado e Discussão.....	154
4.3.1. Análise geral dos metabólicos das amostras de folhas das variedades transgênicas Bowman-Birk e Kunitz e seus respectivos controles por RMN em 1D e 2D.....	154
4.3.2. Identificação dos metabólitos das amostras de folhas das variedades transgênicas Bowman-Birk e Kunitz e seus respectivos controles por RMN em 1D e 2D.....	158
4.3.3. Análise quimiométrica do perfil metabólico das variedades transgênicas de folhas, Bowman-Birk e Kunitz e seus respectivos controles.	189
4.4. Conclusão Parcial.....	195
4.5. Referências Bibliográficas.....	196
Capítulo 5. Discussão e conclusão geral	
5.1 Conclusão geral.....	202
5.2 Referências Bibliográficas.....	207

Apresentação

Apresentação

A realização deste trabalho foi motivada pela necessidade de avaliar diferenças em termos de metabólitos em variedades transgênicas de cana-de-açúcar resistentes a pragas comuns às lavouras de cana-de-açúcar. Este trabalho faz parte de um projeto já em andamento no Grupo de Análise Fitoquímica sobre o aproveitamento dos resíduos provenientes de canaviais brasileiros (folhas), além de avaliar a garapa como possível alimento funcional devido à presença de flavonóides.

Com base em metodologia, previamente desenvolvida, para quantificação por cromatografia líquida dos flavonóides totais presentes nas folhas e garapa da cana-de-açúcar, procurou-se identificar diferenças nos perfis cromatográficos das variedades Bowman-Birk e Kunitz. Adicionalmente, iniciou-se o estudo metabolômico das mesmas variedades transgênicas e seus respectivos controles, para melhor compreensão dos metabólitos presentes nas plantas, bem como na compreensão do processo bioquímico dos metabólitos primários e secundários.

Desta forma, esse trabalho foi dividido em 4 capítulos:

Capítulo 1: Introdução geral, na qual são apresentadas as plantas estudadas e as técnicas analíticas empregadas.

Capítulo 2: Análise quimiométrica dos perfis cromatográficos das duas variedades de cana-de-açúcar modificadas com os inibidores de proteinase Bowman-Birk e Kunitz

Capítulo 3: Caracterização das substâncias correspondentes aos picos cromatográficos obtidos por HPLC-MS e selecionados pela análise quimiométrica das duas variedades transgênicas de cana-de-açúcar (“Bowman-Birk” e “Kunitz”).

Capítulo 4: Estudo preliminar do metaboloma das variedades transgênicas e seus respectivos controles empregando ressonância magnética nuclear

Capítulo 5: Discussão e conclusão geral.

O trabalho experimental referente ao Capítulo 2 foi realizado no Laboratório de Análise Fitoquímica do IQSC-USP. Já os resultados do Capítulo 3 foram obtidos no Laboratoire de Pharmacognosie, Institut de Pharmacie, Faculté de Médecine da Universidade de Liège – Bélgica. Por fim, os resultados apresentados no Capítulo 4 foram obtidos na Division of Pharmacognosy, Section Metabolomics, Institute of Biology, na Universidade de Leiden – Países Baixos, sob supervisão do prof. Dr. Robert Verpoorte.

Capítulo 1

Capítulo 1. *Introdução Geral*

1.1. Cana-de-Açúcar

A cana-de-açúcar pertence à classe das monocotiledôneas, família Poaceae, representada pelo milho, arroz e outras gramíneas. As principais características dessa família são a forma da inflorescência (espiga), o crescimento do caule em colmos, e as folhas com lâminas de sílica em suas bordas e bainha aberta. A cana-de-açúcar pertence ao gênero *Saccharum* L. e normalmente apresenta aproximadamente 3 metros de altura, sendo composta por caule do tipo colmo, com nós aparente, casca lisa e cerosa. As folhas nascem a partir dos nós que possuem bainha com pelos duros e nervura central distinta medindo de 0.9 – 1.5 m de comprimento e 4 -6 cm de largura (figura 1.1) [1].



Figura 1.1. Foto da planta cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*).

A cana-de-açúcar possui diversas variedades, sendo que seis espécies são reconhecidas pelos botânicos: *Saccharum officinarum*, *S. spontaneum*, *S. sinense*, *S. barbari*, *S. robustum*, *S. edule*. A mais utilizada comercialmente no Brasil é da espécie *S. officinarum*, devido à alta concentração de sacarose e baixo conteúdo de fibras [1].

As espécies de cana-de-açúcar são provenientes do Sudeste Asiático. A planta é a principal matéria-prima para a fabricação do açúcar e álcool (etanol). É uma das culturas agrícolas mais importantes de países tropicais, gerando centenas de milhares de empregos diretos e indiretos; por isso, é uma importante fonte de renda e desenvolvimento econômico.

O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de cana-de-açúcar, excedendo a 375 milhões de toneladas anualmente, sendo que a maior parte da produção é destinada à fabricação de álcool. Além disso, esta planta também é utilizada como matéria-prima para a produção de açúcar, aguardente, rapadura e garapa [2]. Entretanto, na maioria das plantações de cana-de-açúcar no Brasil, a colheita da planta é feita através da queima das folhas, gerando um grande desperdício de biomassa vegetal e animal, além de ocasionar inúmeros problemas ambientais (poluição atmosférica) e sociais (problemas de saúde pública) [3].

Desta forma, o Grupo de Análise Fitoquímica do Instituto de Química de São Carlos, vem desenvolvendo estudos a fim de identificar substâncias presentes nas folhas, no bagaço e na garapa de cana-de-açúcar de interesse para indústrias farmacêuticas ou alimentícias, provendo assim o aproveitamento dos resíduos e incentivando a colheita mecanizada [4].

1.2. Polifenóis e a Cana-de-açúcar

Polifenóis são substâncias pertencentes ao metabolismo secundário das plantas e estão diretamente relacionadas com a interação entre a planta e o meio ambiente, como por exemplo, na atração de polinizadores, nos mecanismos de defesa contra predadores e parasitas e no crescimento vegetativo [5-6]. Os polifenóis contém, em sua estrutura básica, pelo menos um anel aromático com um ou mais grupos hidroxila como substituinte e podem ser classificados em 15 classes de acordo com a estrutura química [5].

Dentre os polifenóis encontram-se os ácidos fenólicos com estrutura básica C₆-C₁, os derivados do ácido hidroxicinâmico, coumarinas e fenilpropenos com estrutura do tipo C₆-C₃, flavonóides e fenilpropanóides com estrutura básica C₆-C₃-C₆, entre outros [7]. A literatura descreve 5 classes de flavonóides presentes na cana-de-açúcar: antocianinas, catequinas, chalconas, flavonóis e flavonas [8]. Cada um dos tipos de flavonóides distinguem-se através dos diferentes estados de oxidação da cadeia C₃ (figura 1.2).

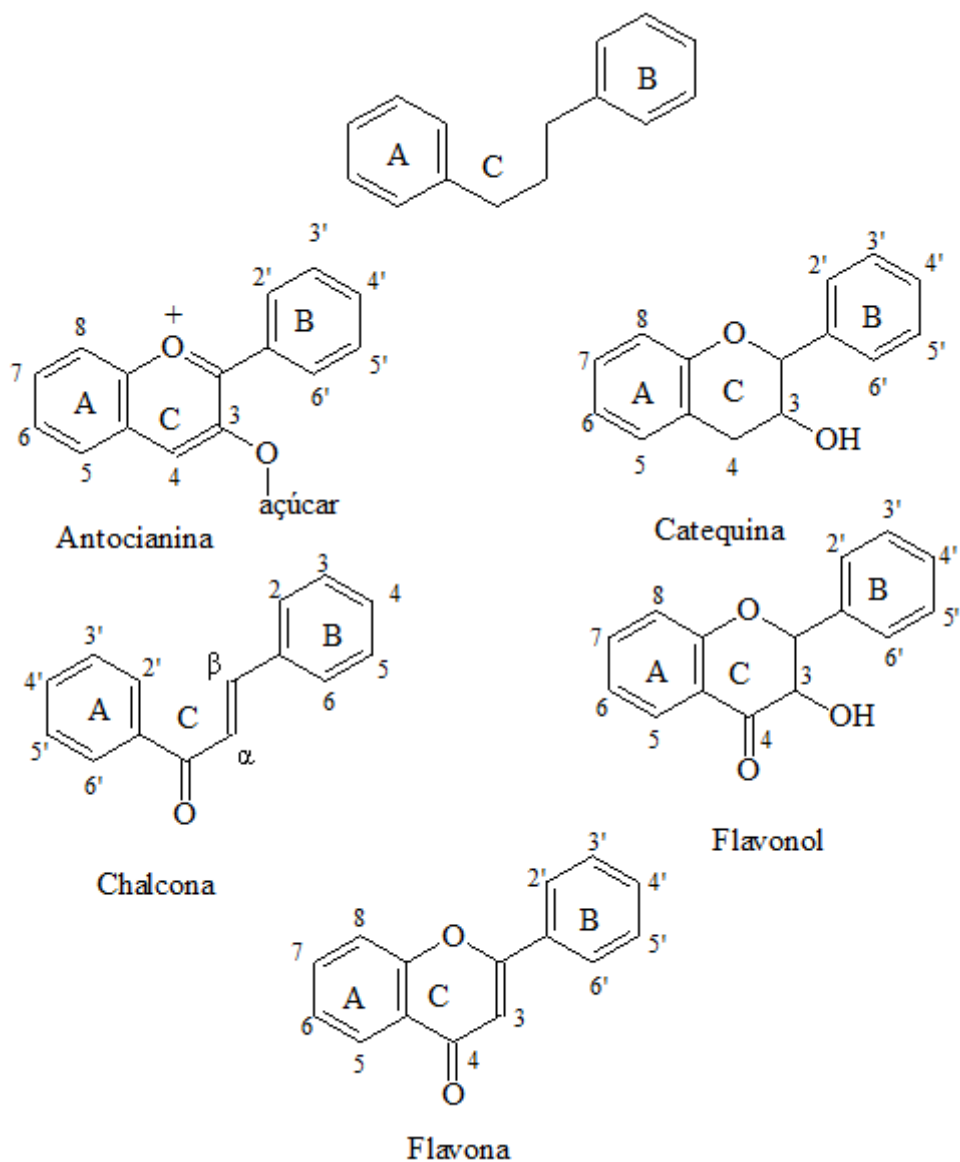


Figura 1.2. Estrutura básica dos flavonóides: esqueleto básico (C₆-C₃-C₆) e numeração para as classes de flavonóides presentes na cana-de-açúcar.

As antocianinas são sais de flavilium com unidade/s de açúcar ligadas à molécula e são uma das classes de substâncias responsáveis pela pigmentação em plantas. Misra e colaboradores identificaram a antocianina peonidina 3- monogalactose (figura 1.3) na cana-de-açúcar [9].

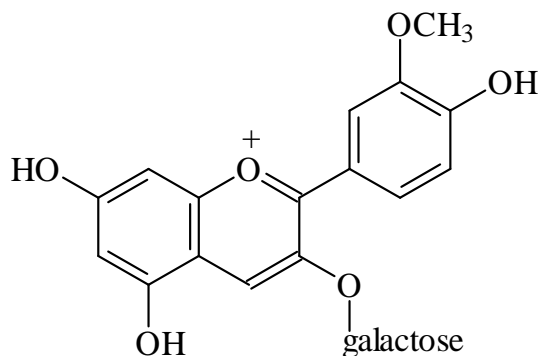


Figura 1.3. Estrutura da peonidina 3- monogalactose.

Farber e colaboradores constataram a presença de três derivados de flavonóis em materiais processados da cana-de-açúcar (figura 1.4, tabela 1.1) [10]. Através de análises espectrais, Misra e colaboradores identificaram, em flores de cana-de-açúcar, o flavonol 3,6-dimetil éter quercetagina (figura 1.4, tabela 1.1.) [11].

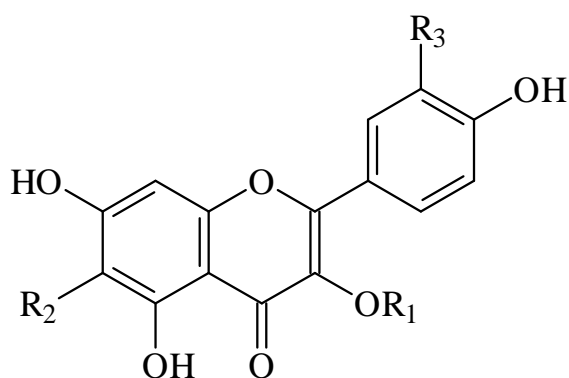


Figura 1.4. Estrutura básica dos derivados de flavonóis encontrados na cana-de-açúcar.

Tabela 1.1. Derivados de flavonóis identificados na cana-de-açúcar [11]

Substância	R ₁	R ₂	R ₃
Quercetina	H	H	OH
Rutina	rutinose	H	OH
Kamferol	H	H	H
3,6- dimetil éter quercetagina	CH ₃	OCH ₃	OH

Em estudos recentes sobre a cana-de-açúcar realizados pelo Grupo de Análise Fitoquímica do Instituto de Química de São Carlos, identificou-se através das técnicas de cromatografia líquida acoplada a detector de massas (HPLC-MS/MS) e de cromatografia líquida com adição pós-coluna de reagentes de deslocamento com detecção de fotodiodos (HPLC-PDA) a presença de flavonas *C*- e *O*- glicosiladas, derivadas da apigenina, luteolina, diosmetina e tricina em extratos de folhas e garapa de variedades de cana-de-açúcar, dentre elas duas variedades transgênicas modificadas com inibidores de proteinase (figura 1.5, tabela 1.2) [12-13].

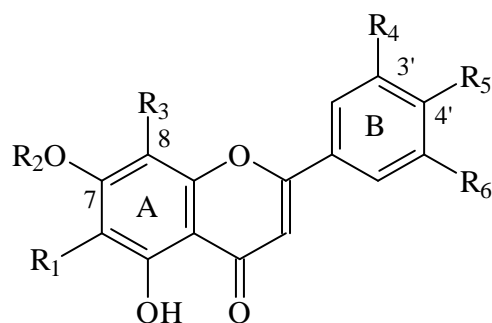


Figura 1.5. Estrutura básica de flavonas encontradas nos extratos de cana-de-açúcar.

Tabela 1.2. Flavonas identificadas por HPLC-MS/MS em extratos da cana-de-açúcar [12-13]

Substância	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
Tricina-7-O-neohesperosídeo	H	Glc-Rha	H	OCH ₃	OH	OCH ₃
Luteolina-8-C-(raminosilglucosídeo)	H	H	Glc-Rha	OH	OH	H
Vitexina	H	H	Glc	H	OH	H
Orientina	H	H	Glc	OH	OH	H
Tricina-7-O-glicosídeo	H	Glc	H	OCH ₃	OH	OCH ₃
Schaftosídeo	Glc	H	Ara	H	OH	H
Isochaftosídeo	Ara	H	Glc	H	OH	H
4',5'-Dimetiluteolina-8-C-glicosídeo	H	H	Glc	OH	OCH ₃	OCH ₃
Diosmetina-8-C-glicosídeo	H	H	Glc	OH	OCH ₃	H

* Glc = Glucose; Rha = Ramnose; Ara = Arabinose

Os flavonóides são substâncias utilizadas como marcadores quimiotaxonômico [14]. A flavona tricina, por exemplo, é a substância característica de plantas pertencentes à família Gramineae. As espécies de cana-de-açúcar *S. officinarum* e *S. robustum*, podem ser diferenciadas da *S. spontaneum* através de uma flavona sulfatada derivada da tricina descoberta por Willian e colaboradores (1974) [15]. Este flavonóide encontra-se ausente na espécie *S. spontaneum*.

Os polifenóis, em geral, agem como antioxidantes capturando radicais livres, e/ou agindo como agentes redutores e como agentes de complexação de metais e macromoléculas [16-18]. Em geral, antioxidante pode ser definido como “qualquer substância que, presente em baixas concentrações quando comparada ao substrato oxidável, atrasa ou inibe a oxidação deste de maneira eficaz (Sies, 1995) [19]. O chá verde, chá preto e vinho tinto são alguns exemplos de alimentos que possuem alto teor de polifenóis, principalmente catequinas, resveratrol e quercetina, e por isso são considerados alimentos nutracêuticos [20-21].

A garapa, um alimento altamente energético, é tradicionalmente consumida pela população da América e Ásia. Apesar de conter um alto teor de açúcar (30-60% de sucrose), a garapa também apresenta substâncias fenólicas que são responsáveis pela coloração amarelada do suco da cana-de-açúcar [22]. Os flavonóides majoritários presentes na cana-de-açúcar pertencem à classe das flavonas, como por exemplo, agliconas e derivados glicosilados de tricina, apigenina e luteolina [23-24]. Os flavonóides, em particular, são substâncias muito conhecidas por seus efeitos benéficos à saúde: proteção às células dos processos degenerativos e redução do desenvolvimento de doenças como câncer e doenças cardiovasculares [25]. O flavonóide tricina possui atividade contra células carcinogênicas gastrointestinais e por isto, esta substância vêm sendo clinicamente estudada como um possível agente quimiopreventivo [23]. Além disso, análises por bioensaio revelaram a tricina como potente antihistamínico [24]. A luteolina exibe atividade antibacteriana e antineoplásica [25], enquanto que a apigenina apresentou atividade anti-inflamatória e ansiolítica [26-27].

A capacidade de seqüestro de radical livre dos flavonóides e outros fenóis presentes em extratos de garapa também foi avaliada através do método de seqüestro do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH), resultando em um potencial antioxidante baixo comparado com o padrão de rutina [28].

1.3. Biotecnologia e a Cana-de-açúcar

O desenvolvimento de modificações genéticas em plantas vêm se tornando uma importante ferramenta no controle de pragas ocorrentes em plantações, além de proporcionar a compreensão de processos químicos do metabolismo vegetal [29]. Genes de diferentes espécies podem ser introduzidos em plantas de interesse econômico diminuindo sua susceptibilidade frente ao predador e/ou parasita. Os inibidores de α -amilase (α AI) e proteinase (PI) apresentam grande potencial para serem utilizados no aprimoramento genético. O mecanismo de ação destes inibidores ocorre no sistema digestivo do predador herbívoro, funcionando como substratos específicos das proteínas digestivas do inseto [30]. Desta forma, os inibidores causam uma deficiência de resíduos de aminoácidos, influenciando no crescimento e desenvolvimento do inseto, podendo causar a sua morte devido à inibição das enzimas digestivas ou devido a produção maciça destas mesmas enzimas, reduzindo a disponibilidade de resíduos de aminoácidos essenciais para a síntese de outras proteínas [31-32].

Estudos a respeito do complexo mecanismo bioquímico da interação planta-predador realizados por Koiwa e colaboradores (2007), mostraram que a expressão dos inibidores de proteinase (PI- Proteinase Inhibitor) têm início com elicitores (oligosacarídeos e volicitina ou N-H- hidroxilinoíla-L-glutamina) presentes nas secreções dos insetos, sinal de moléculas sistêmicas (ácido oligogalacturônico, quitosana, ácido abscísico -ABA, cisteamina e sinais físicos) e por receptores da membrana plasmática [33]. Os elicitores são transduzidos por uma lípase ainda não identificada, que facilita a saída do ácido linoleico da membrana lipídica estimulada pelo ABA. O ácido linoleico é então convertido a ácido jasmônico através da rota biosintética dos octadecanóides. Inibidores de lipoxigenases (SHAM e ZK139817) e ácido salicílico bloqueiam esta conversão e eliminam um sinal para indução da expressão dos inibidores de proteinase. O gene *Def1* regula a conversão do ácido-13-(S)- hidroperoxil-linoleico (HPOTrE) à ácido 12-oxofitodienóico (12-oxo-PDA). O ácido-dietilditiocarbamato (DIECA) diminui a conversão do ácido-13-(S)- hidroperoxil-linoleico (HPOTrE) para ácido-13- hidroxil-linoleico (HOTrE), diminuindo a síntese do ácido jasmônico. Inibidores da ação do etileno (norbornadieno- NBD e prata) e o ácido

salicílico, com a estimulação da produção de ácido jasmônico, induzem a expressão dos PIs. O ácido ocaídico também induz a expressão dos PIs, inibindo a formação de jasmonato. O inibidor da proteína quinase (estaurosporina), por um lado, inibe a expressão dos PIs pela via do ABA, mas não através da rota do jasmonato. A figura 1.6, ilustra o mecanismo descrito acima.

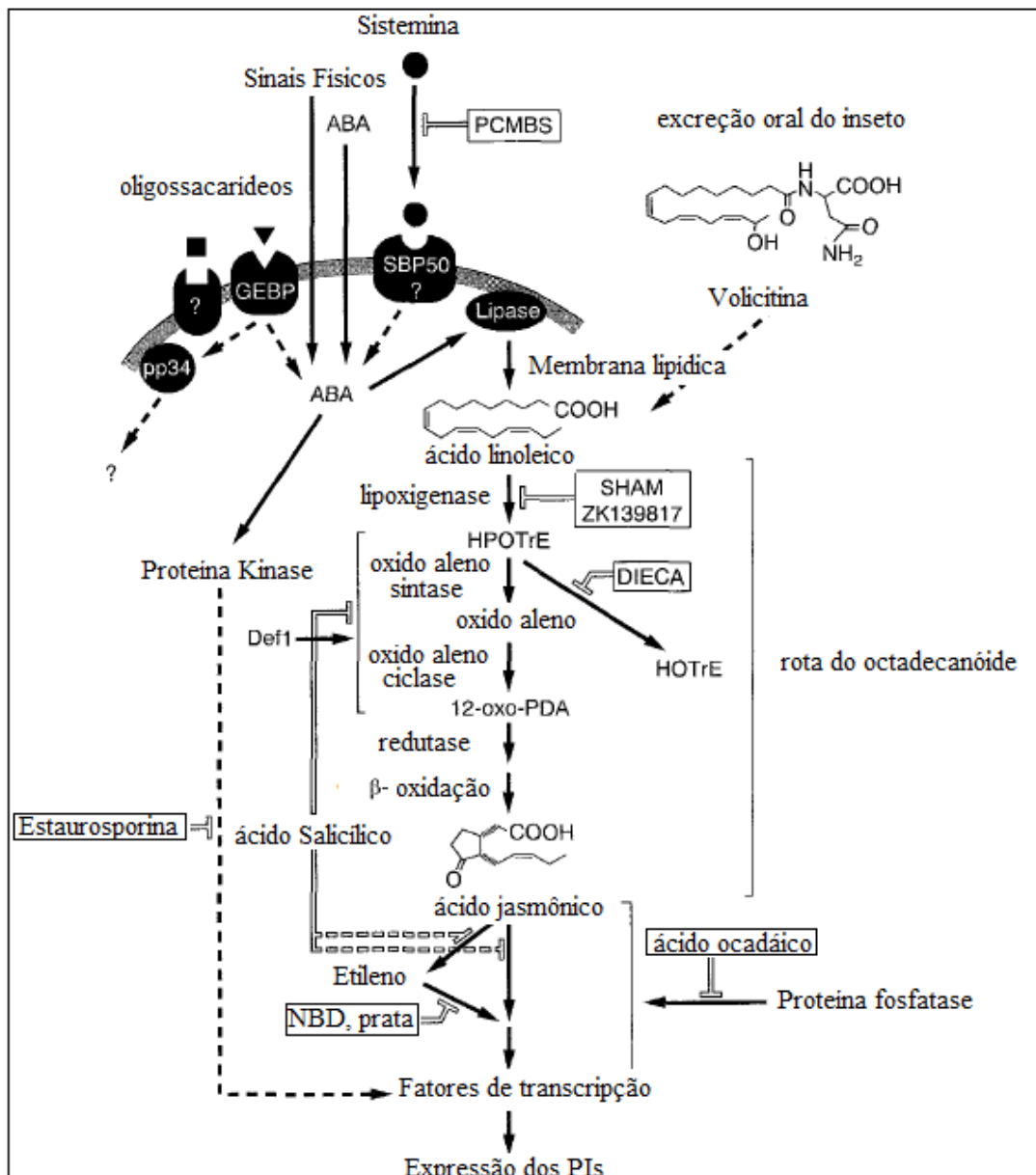


Figura 1.6. Mecanismo de ativação dos genes inibidores de proteínase [33].

No caso da cana-de-açúcar, o inseto *Diatrea saccharilis* (popularmente conhecido como broca-da-cana) é uma das maiores pragas em plantações no Brasil e outros países da América do Sul.

Visando minimizar as perdas nas safras de cana-de-açúcar, o Laboratório de Biologia Molecular de Plantas do Departamento de Genética da ESALQ-USP desenvolveu duas variedades transgênicas contendo, individualmente, inibidores de proteinase provenientes da soja Bowman-Birk (SBBI) e Kunitz (SKTI) [34]. A transferência dos genes foi mediada por microprojétil (método biolístico) em calus de duas variedades de cana-de-açúcar. Estes dois inibidores, introduzidos na cana-de-açúcar, pertencem à classe dos inibidores de protease serínicos e atuam bloqueando diretamente o acesso do substrato ao centro catalítico das proteinases [34]. Para insetos da ordem Lepidoptera, como é o caso da *Diatrea saccharilis*, que possuem grande quantidade de protease serínica em seu trato digestivo (principalmente tripsina e quimiotripsina), Falco e colaboradores (2003) desenvolveram estudos *in vitro* e *in vivo*, submetendo as larvas da broca-da-cana a uma dieta com cana-de-açúcar contendo os inibidores de proteinase SBBI e SKTI. O resultado deste estudo mostrou uma queda no crescimento e desenvolvimento dos insetos [32 e 35]. Assim, com a introdução e expressão dos genes codificadores dos inibidores de proteinase (SBBI e SKTI) dentro do genoma da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.), pôde-se conferir resistência parcial à planta contra a larva do inseto *Diatrea saccharilis*.

A composição de metabólitos secundários é significativamente alterada com as modificações genéticas em plantas [36-38]. Deste modo, este trabalho tem grande interesse em avaliar, por técnicas quimiométricas, possíveis alterações referentes à presença de polifenóis e outras substâncias do metabolismo secundário e primário nas variedades transgênicas da cana-de-açúcar SBBI e SKTI, nos perfis obtidos por diferentes técnicas analíticas.

O uso de perfis (“fingerprint”) para comparação de diferentes tipos de amostras é um método no qual informações relevantes como, por exemplo, a presença ou ausência de determinadas substâncias e/ou até mesmo pequenas diferenças podem ser detectadas [39]. Em muitos casos, a avaliação de perfis consiste em uma análise visual direta, através da comparação de um perfil proveniente de uma amostra referência (padrão) com o da amostra alvo. Atualmente, com o desenvolvimento de técnicas quimiométricas, as análises dos perfis são realizadas através de tratamento matemático e estatístico, simplificando a visualização e interpretação dos resultados de amostras complexas. O capítulo 2 descreverá as técnicas quimiométricas para análises de perfis.

Diversas técnicas analíticas são aplicadas para a obtenção dos perfis, dentre elas destacam-se a cromatografia gasosa, eletroforese, cromatografia líquida de alta eficiência, espectroscopia no infravermelho e ultravioleta, ressonância magnética nuclear, etc [39-44]. Neste trabalho, enfatizaremos as técnicas de cromatografia líquida com detecção de fotodiodos e de massas e espectroscopia de ressonância magnética nuclear, que foram utilizadas para identificar possíveis diferenças entre folhas e garapas das variedades transgênicas SBBI e SKTI e seus respectivos controles.

1.4. Cromatografia líquida de alta resolução (HPLC- High Performance Liquid Chromatography)

O princípio de separação em cromatografia está fundamentado na migração diferencial dos componentes de uma mistura através das diferentes interações entre a fase móvel e a fase estacionária [45]. A HPLC surgiu como aplicação na cromatografia líquida (LC) da teoria e instrumentação desenvolvida para a cromatografia gasosa. Assim, a principal diferença entre a cromatografia líquida convencional e a HPLC é a utilização de fases estacionárias de micro ou até nano partículas. Por este motivo emprega-se em HPLC, sistemas de bombas para a eluição da fase móvel [46].

Um sistema de HPLC é constituído basicamente de: bomba de alta pressão, injetor, coluna cromatográfica, detector e sistema de aquisição de dados (figura 1.7). Os tipos de detectores acoplados a HPLC são: detector de UV (comprimento de onda fixo ou variável), índice de refração, fluorescência, condutividade elétrica, eletroquímico, espectrometria de massas, dicroísmo circular e espectroscopia no infra-vermelho e ressonância magnética nuclear [47-48]. Neste trabalho serão abordados os detectores de UV e massas nos itens 1.5 e 1.6. deste capítulo.

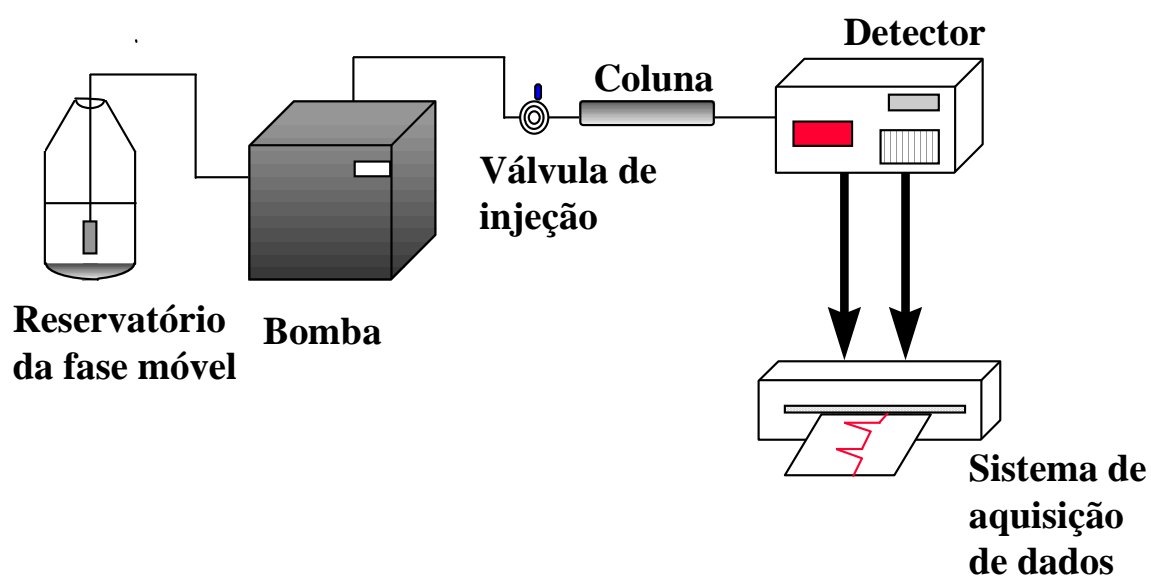


Figura 1.7. Esquema representativo de um sistema de HPLC.

Atualmente, a HPLC vem sendo muito empregada para obtenção de perfil cromatográfico característico de plantas medicinais (“fingerprint”) e quantificação de substâncias alvo. Isto se deve à versatilidade da técnica, pois através da HPLC substâncias de baixa volatilidade ou estabilidade podem ser analisadas, o que não ocorre em cromatografia gasosa (GC) [47].

A maioria das análises de amostras ricas em flavonóides descritas na literatura são realizadas em fase estacionária contendo grupos octadecil (RP18). Desta forma, flavonóides glicosilados são eluídos primeiramente em relação às agliconas. A mistura de solventes comumente utilizada é composta por acetonitrila ou metanol e solução ácida de baixa concentração (ácido fórmico, acético ou fosfórico), que faz com que a separação cromatográfica melhore consideravelmente [49].

1.5. Cromatografia líquida de alta resolução acoplada à detector de arranjo de fotodiodos (HPLC-PDA)

Os detectores de fotodiodos são seletivos para substâncias que possuam pelo menos um sistema de cromóforo. Um cromóforo pode ser definido como substâncias que possuem elétrons desemparelhados, e/ou substâncias orgânicas que possuam insaturações conjugadas, como por exemplo, um anel aromático em sua estrutura [50]. Os polifenóis possuem sistemas de cromóforos e absorvem na região do ultravioleta (UV- visível) de 254-390 nm [51].

O detector de comprimento de onda variável com arranjo de fotodiodos, que foi utilizado neste trabalho, utiliza lâmpada de deutério como fonte, cobrindo a faixa de comprimento de onda de 200 a 650 nm. As vantagens deste detector em relação ao detector de onda fixo é a de permitir obter espectro de absorbância de cada componente em separado [52]. Com uma única análise cromatográfica é possível registrar espectros em diferentes comprimentos de onda. Além de ser seletivo, uma vez que determinado comprimento de onda é escolhido, os interferentes da análise são eliminados. Este tipo de detector é composto por: fonte (lâmpada de deutério), cela de amostragem, grade de refração e arranjo de fotodiodos (figura 1.8).

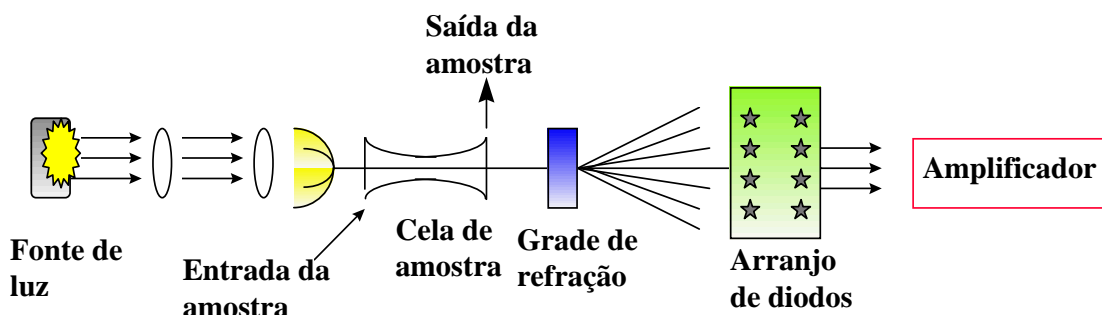


Figura 1.7. Esquema representativo de um detector de arranjo de fotodiodos.

O arranjo de fotodiodos é formado por fotodiodos de silício, sendo que cada elemento possui dimensões típicas de 2,5 por 0,025 mm. A luz incidente nestes elementos cria cargas que se acumulam na região dos fotodiodos. A corrente de cargas resultantes é integrada pelo amplificador, que produz uma voltagem proporcional à intensidade radiante [52].

Os eluentes utilizados na HPLC devem absorver pouco na região de $\lambda = 210\text{-}380$ nm, para que não interfiram na absorção do analito. Metanol e acetonitrila absorvem em comprimentos de onda abaixo de 210 nm, por isso são os eluentes mais apropriados para análise cromatográfica em fase reversa com detecção no UV-visível.

1.6. Cromatografia líquida de alta resolução acoplada à detector de espectrometria de massas

A espectrometria de massas (mass spectrometry – MS) é um método físico-químico importante na determinação estrutural de compostos orgânicos. Esta técnica é altamente sensível e versátil, pois provê possibilidades de hifenação com técnicas cromatográficas, sendo muito aplicada na área de produtos naturais.

A principal característica da espectrometria de massas é a separação de íons baseada na razão de suas massas e cargas (m/z). Um espectrômetro de massas é constituído de fonte de íons, analisador, detector e um sistema de coleta de dados [53].

Em cromatografia líquida (HPLC), a amostra está em solução sob pressão atmosférica, enquanto que o analisador de massas dos íons está sob vácuo. Desta forma, a primeira etapa a ser realizada pela interface HPLC-MS consiste em nebulizar e vaporizar o eluato e posteriormente ionizar o analito e remover o excesso de solvente, à pressão atmosférica (atmospheric pressure ionization- API), para a introdução dos íons no analisador sob vácuo [53-54]. As interfaces API disponíveis comercialmente são: ionização química à pressão atmosférica (APCI) e ionização eletrospray (ESI) [55]. Neste trabalho a fonte de ionização utilizada foi a ESI, que será abordada neste item.

O esquema da figura 1.8 representa o mecanismo de ionização em eletrospray. Primeiramente ocorre a dispersão do eluato em forma de um aerosol eletricamente carregado. O capilar por onde passa a solução, é submetido a uma diferença de potencial gerada por eletrodos específicos, resultando em uma névoa eletricamente carregada. Uma vez que as gotículas carregadas, com polaridade definida (negativa ou positiva) ocorre a evaporação do solvente. Com o aumento do campo elétrico na superfície das gotículas seu tamanho diminui, ocasionando uma instabilidade eletro-hidrodinâmica induzida levando à explosão de Coulomb. A explosão de Coulomb pode ser definida como o estágio no qual o campo elétrico na superfície do líquido é tão alto que os íons do soluto escapam da fase líquida para a fase gasosa [55].

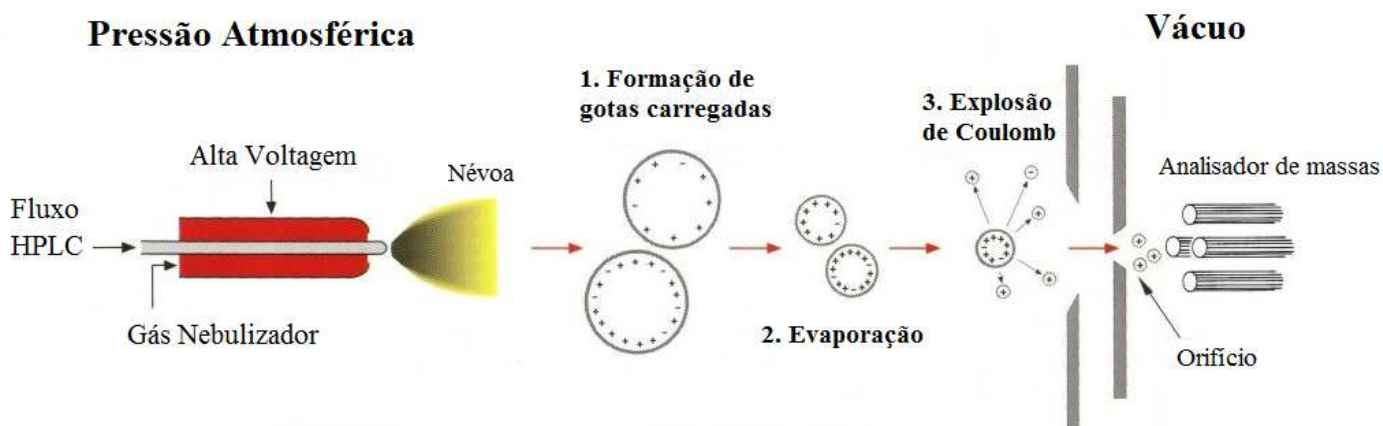


Figura 1.8. Esquema representativo do mecanismo de ionização ESI.

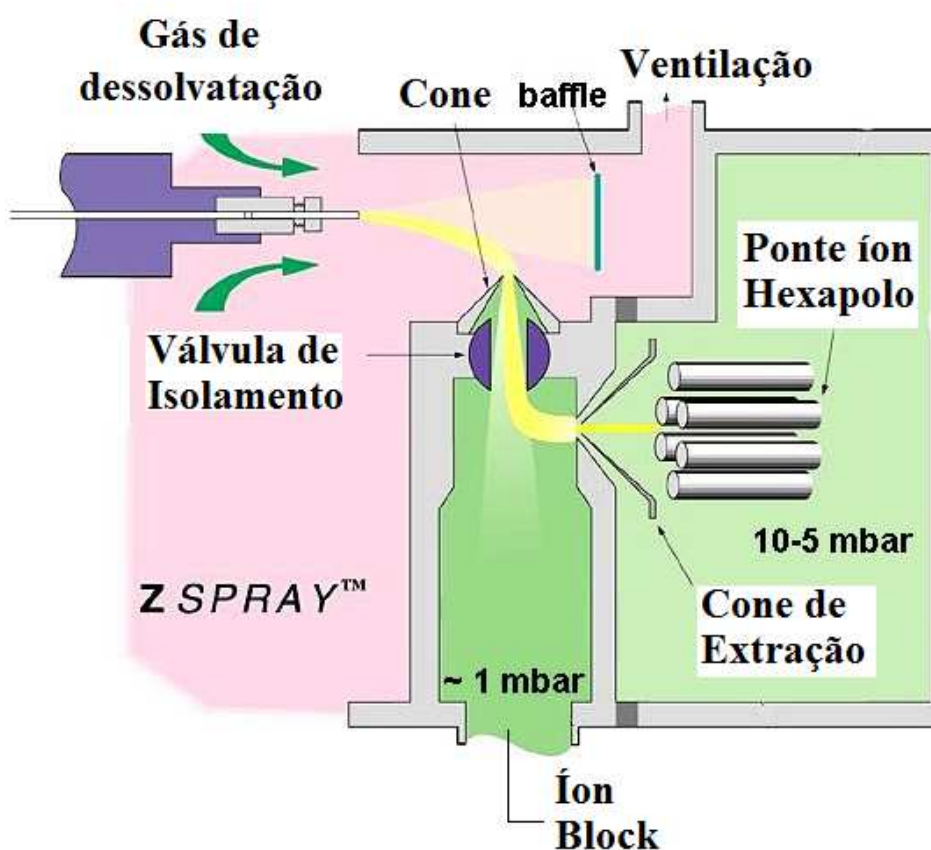


Figura 1.9. Esquema da interface ESI- Z-spray Lockspray® (Micromass)

Os equipamentos ESI com geometria em Z, possuem o cone de amostragem em um ângulo de 90° em relação a ponta do capilar, dois cones de amostragem e hexapolo. O hexapolo atrai os íons para dentro do analisador de massas (figura 1.9). Esta geometria faz com que uma maior quantidade de íons sejam atraídos para o analisador.

Existe no mercado uma variedade de analisadores para espectrômetros de massas como: quadrupolo, tempo de voo (time of light), captura de íons (íon trap), etc. Neste trabalho, foi utilizado um espectrômetro de massa seqüencial (MS/MS) triplo quadrupolo. Este tipo de analisador é composto por três quadrupolos em série. Cada quadrupolo possui quatro hastes cilíndricas paralelas que servem de eletrodos. Os pares opostos das hastes estão conectados eletricamente e uma voltagem com radiofrequência de 180° fora de fase é aplicada entre eles. Em um valor específico de voltagem, íons de uma determinada razão m/z atravessam o quadrupolo descrevendo uma trajetória estável, sendo detectado [56]. O esquema de um analisador quadrupolar está representado na figura 2.0.

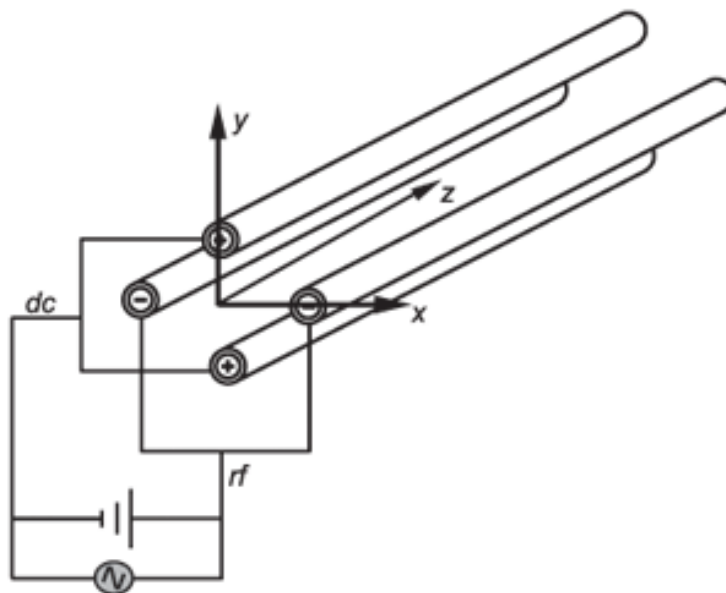


Figura 2.0. Esquema de um analisador quadrupolar.

Em um analisador triplo quadrupolo, o primeiro e o terceiro quadrupolo têm como função separar íons de mesma razão m/z , enquanto que o segundo quadrupolo é utilizado como cela de colisão, na qual ocorre a fragmentação dos íons selecionados no primeiro quadrupolo através de dissociação induzida por colisão com um gás inerte (Collision Induced Dissociation – CID), e também como direcionador dos íons produzidos para o terceiro quadrupolo [57].

Na dissociação induzida por colisão, o íon precursor, proveniente do primeiro quadrupolo, é acelerado por um potencial elétrico para uma região de alto vácuo no interior do segundo quadrupolo, onde sofre colisões com um gás inerte (geralmente, argônio, nitrogênio ou hélio), ocasionando um aumento na energia potencial deste íon até sofrer fragmentação, conduzindo a formação de íons filhos. A detecção de fragmentos (íons filhos) é de fundamental importância na determinação estrutural da molécula do analito, pois fornece informações sobre grupos funcionais presentes na molécula.

Todos os quadrupolos são controlados para transmitir íons de uma única razão m/z ou de um intervalo de razões m/z para gerar informação analítica. A figura 2.1 apresenta o esquema de um analisador triplo quadrupolo [57].

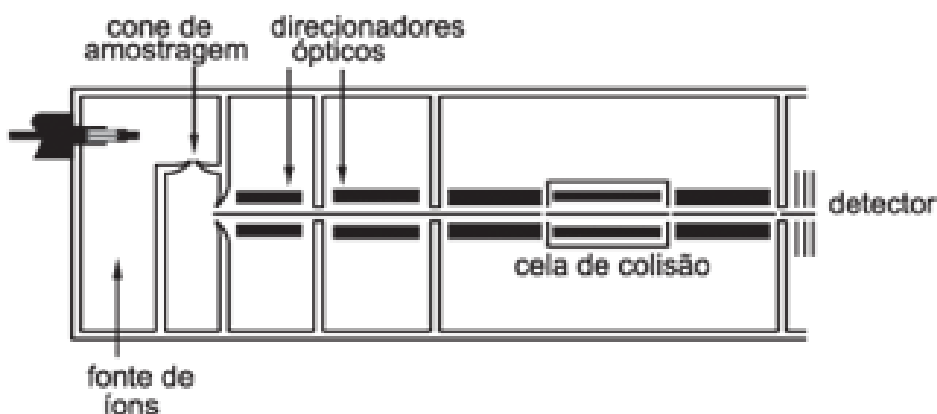


Figura 2.1. Esquema de um analisador triplo quadrupolo.

1.7. Ressonância magnética nuclear para análise de extratos vegetais

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear é de fundamental importância na área de produtos naturais, e atualmente vêm sendo aplicada não apenas para elucidação estrutural de substâncias puras como também para estudo metabolômico em fluidos biológicos complexos, que será detalhado no capítulo 4 [58].

A teoria da ressonância magnética nuclear envolve a absorção de radiação eletromagnética na região da radio frequência (rf), em uma frequência governada pelas características da amostra. Os núcleos de determinados elementos e isótopos podem absorver uma determinada energia num processo denominado ressonância magnética, como é o caso do ^1H e ^{13}C . O núcleo atômico possui propriedades magnéticas como: número de spin (I) e momento magnético nuclear (μ). Núcleos que possuem número de spin $\frac{1}{2}$, apresentam uma distribuição de carga esférica e uniforme que quando submetidos a um campo magnético podem assumir duas orientações possíveis ($2I + 1$, efeito Zeeman) [58], figura 2.2.

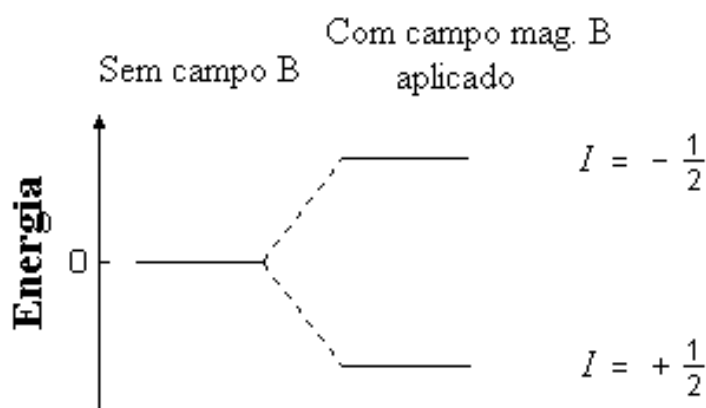


Figura 2.2. Representação dos níveis de energia para o hidrogênio sob ação de um campo magnético B.

O núcleo possui um baixo campo magnético, devido a presença de cargas em movimento. Assim, o momento magnético, μ é proporcional ao seu spin, como descreve a equação 1.1 [59].

$$\mu = \frac{\gamma I h}{2 \pi} \quad (\text{eq. 1.1})$$

A constante fundamental nuclear γ , é chamada de razão giromagnética e h é a constante de Planck. A diferença de energia (energia de transição, ΔE) é dada pela equação 1.2 [59].

$$\Delta E = \frac{\gamma h B}{2\pi} \quad (\text{eq. 1.2})$$

Sem a presença de um campo magnético o núcleo gira em torno do próprio eixo. Com a introdução do campo magnético o núcleo passa a ter um movimento de precessão em torno do eixo z (figura 2.3). A frequência de precessão é chamada de frequência de Lamor, que é idêntica à de transição. A energia potencial de precessão do núcleo é dada pela equação 1.3

$$E = -\mu B \cos \theta \quad (\text{eq. 1.3})$$

Onde θ é o ângulo formado entre a direção do campo magnético (B) e o eixo de rotação nuclear. Quando a energia é absorvida, o ângulo de precessão varia. Após a absorção da energia pelo núcleo, ocorre o processo de relaxação (retorno ao estado fundamental). A relaxação ocorre de dois modos: (1) relaxação longitudinal, que envolve transferência de energia do núcleo no estado de maior energia para as

moléculas mais próximas e (2) relaxação transversal, que envolve a transferência de energia de um núcleo para outro [59].

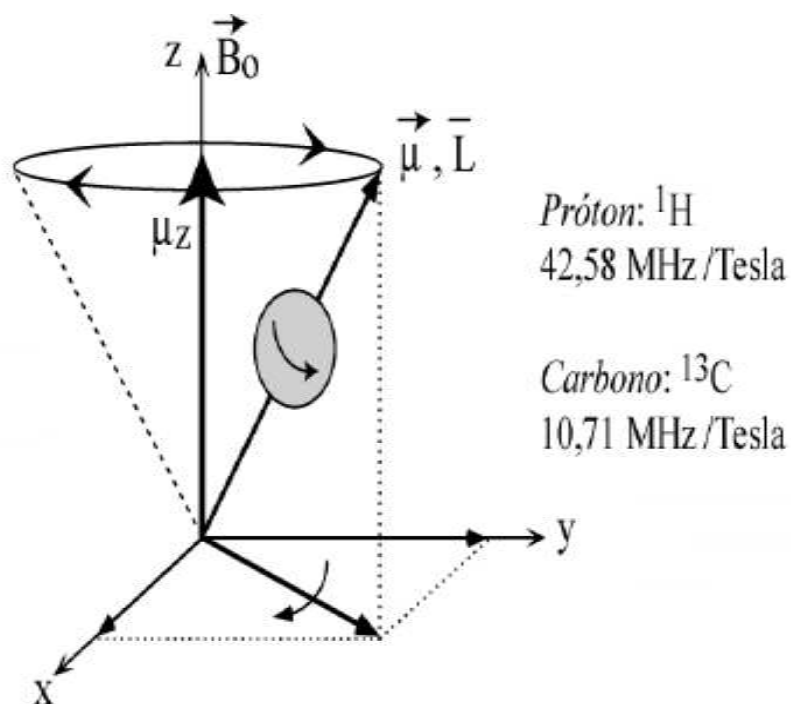


Figura 2.3. Movimento de precessão de um núcleo de hidrogênio.

A frequência de ressonância de um núcleo em particular será diferente quando este núcleo estiver em ambiente químico diferente. Isto se deve ao efeito de blindagem causado por elétrons σ , que geram um campo induzido oposto ao campo magnético externo. Este efeito faz com que prótons em uma mesma molécula possuam deslocamentos químicos (δ) diferentes. Além disso, outro efeito pode ser observado devido à influência magnética dos núcleos vizinhos, e é chamado de desdobramento do sinal de ressonância ou acoplamento spin-spin [59].

Como resultado, obtém-se através da espectroscopia de RMN, um gráfico das frequências dos picos de absorção contra suas intensidades.

Equipamentos modernos de RMN utilizam ímãs supercondutores com campos magnéticos muito intensos e os núcleos são submetidos periodicamente a pulsos muito curtos de radiação de radiofrequência intensa. Durante o intervalo de pulsos, um sinal de radiofrequência, chamado de decaimento livre de indução (FID – Free Induction Decay) é emitido pelos núcleos à medida que eles relaxam. O FID é detectado por uma bobina de receptor de rádio perpendicular ao campo magnético estático. Geralmente, uma única bobina é usada tanto para emitir o pulso quanto para detectar o sinal do FID [60].

Os sinais de FID são somados para melhorar a razão sinal/ruído, digitalizados e armazenados em um computador. Os dados somados são convertidos a um sinal de domínio de frequência por uma transformação de Fourier. Os espectros obtidos neste trabalho foram originados por um equipamento de alta resolução, neste caso 500 MHz na frequência do próton (figura 2.4).



Figura 2.4. Equipamento de ressonância magnética nuclear.

1.8. Objetivos Gerais

Este trabalho enfatizou o estudo comparativo das folhas e garapa das variedades transgênicas da cana-de-açúcar SBBI (Bowman-Birk) e SKTI (Kunitz).

Os objetivos gerais do trabalho foram:

- (1) A partir de um método desenvolvido para extração e análise quantitativa dos flavonóides da cana-de-açúcar, obter os perfis cromatográficos das duas variedades e reconhecer padrões, através de técnicas quimiométricas (seleção de variável e análise de componentes principais), que possam diferenciar os dois tipos de planta.

- (2) Identificar por HPLC-MS/MS as possíveis substâncias responsáveis pela discriminação das duas variedades.

- (3) Realizar um estudo preliminar do metaboloma, utilizando a espectroscopia de ressonância nuclear magnética (1D e 2D) das duas variedades e compará-las com seus respectivos controles através da análise de componentes principais.

1.9. Referências Bibliográficas

- [1] CHEN, J.C.P, Sugarcane handbook: manual for sugarcane manufactores and their chemists. 11 ed. New York, John Wiley, 1985. P.20-85.
- [2] Agrinual. 2006. FNP consultoria & agroinformativos. São Paulo, 227-228.
- [3] GOULART, M.P. Queimada da palha de cana-de-açúcar. Net, São Paulo, Abril. 2003. Disponível em:<<http://www.mp.sp.gov.br/caouma/Doutrina/Amb/Teses/Goulart.htm>>
- Acesso em: 11 Setembro 2009
- [4] COLOMBO, Renata. Extração e análise cromatográfica (CLAE/EM) dos flavonóides da cana-de-açúcar. São Carlos, 2003. **Tese/doutorado** – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- [5] DEY, P.M.; HARBORNE, J.B. **Plant Phenolics**. In *Methods in plant Biochemistry*, 1v, London, Academic Press Limited, 1989, p.3.
- [6] BENNEK, A. Interaction of plant polyphenolics with salivary proteins. *Critical Reviews in Oral & Biological Medicine*, v. 13, p.184-196, 2002.
- [7] HARBORNE, J.B. **The Flavonoids**: Advances in Research, Chapman and Hall, London, 1986.
- [8] SMITH, P.; PATON, N.H. Sugarcane Flavonoids. **Sugar Technology Reviews**, v. 12, p. 117-142, 1985.
- [9] MISRA, K.; DUBEY, R.C. Anthocyanins in sugarcane. **Current Science**, v. 43, p.544-549, 1974.
- [10] FARBER, L.; CARPENTER, F.G. Plant pigments as colorants in cane sugars. *Technology Sess. Cane Sugar Refining Res.*, p.23-31, 1975.
- [11] MISRA, K.; MISHRA, C.S. Flavonoids of *Saccharum officinarum* flowers. *Indian Journal Chemistry*, v. 188, p.88-94, 1979.

-
- [12] COLOMBO, R. YARIWAKE, J.H.; QUEIROZ, E.F.; NDJOKO, K.; HOSTETTMANN, K. On-line identification of further flavones C- and O- glycosides from sugarcane (*Saccharum officinarum* L. Gramineae) by HPLC-UV-MS. **Phytochemical Analysis**, v.17, p.337-343, 2006
- [13] COLOMBO, R.; LANÇAS, F.M.; YARIWAKE, J. H. Determination of flavonoids in cultivated sugarcane leaves, bagasse, juice and in transgenic sugarcane by liquid chromatography- UV detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1103, p. 118-124. 2006.
- [14] HARBORNE, J.B., HALL, E. The occurrence of tricetin and other glycoflavones in grass. **Phytochemistry**, v. 3, p.421-428, 1964.
- [15] WILLIAMS, C.A.; HARBORNE, J.B. SMITH, P. Taxonomic significance of leaf flavonoids in *Saccharum* and related genera. **Phytochemistry**, v. 13, p.1141-1149, 1974.
- [16] BLOCK, G. A role for antioxidants in reducing cancer risk. **Nutrition Review**, v. 50, p. 207-213, 1992.
- [17] HOLLMAN, P.C.H. Evidence for health benefits of plant phenol: local or systemic effects? **Journal of Science Food and Agricultural**, v. 81, p. 842-852, 2001.
- [18] RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; PAGANGA, F. Structure- antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 20, p. 933-956, 1996.
- [19] SIES, H.; STAHAL, W. Vitamins E and C, β -carotene, and other carotenoids as antioxidant. **Journal of Clinical Nutrition**, v.62, p.1315-1321, 1995.
- [20] GADOW, A.V.; JOUBERT, E.; HANSMANN, C.F. Comparison of the antioxidant activity of rooibos tea with green, oolong and black tea. **Food Chemistry**, v. 60, p.73-77, 1997.
- [21] SANCHÉZ-MORENO, S.; LARRAURI, J.A.; SAURA-CALIXTO, F. Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grape juices and related polyphenolic constituents. **Food Research International**, v.32, p.407-412, 1999.

-
- [22] DUARTE-ALMEIDA, J.M.; NEGRI, G.; SALTINO, A.; CARVALHO, J.E.; LAJOLO, F.M. Antiproliferative and antioxidant activity of tricetin acylated glycoside from sugarcane (*Saccharum officinarum*) juice. **Phytochemistry**, v. 68, p. 1165-1171, 2007.
- [23] VERSCHOYLE, R.E.; GREAVES, P.; CAI, H.; ARNDT, B.; BROGGINI, M.; DÍNICALCI, M.; RICCIO, E.; DOPPALAPEED, R.; KAPETANOVI, I.M.; STEWAND, W.P.; GESCHER, A.J. Preliminary safety evaluation of the putative cancer chemopreventive agent tricetin, a naturally occurring flavone. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 57, p.1-6, 2006.
- [24] KUWABARA, H.; MOURI, K.; OTSUKA, H.; KASAI, R.; YAMASAKI, K.; Tricetin from *Malagasy connaraceous* plant with potent antihistaminic activity. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 1273-1275, 2003.
- [25] LI, Y.C.; HUNG, C.F.; YEH, F.T.; LIN J.P.; CHUNG, J.G. Luteolin-inhibited arylamine n-acetyltransferase activity and DNA-2-aminofluorene adduct in human and mouse leukemia cells. **Food and Chemical Toxicology**, v.39, p.664-674, 2001.
- [26] POLYA, G.M. **Biochemical targets of plants bioactivity compounds: a pharmacological reference guide to sites of action and biological effects**. Florida, CRC Press, 2003. p. 29.
- [27] KUMAR, S.; MADAAN, R.; SHARMA, A. Pharmacological evaluation of bioactive principles of *Turnera aphrodisiaca*. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences** Disponível em: http://www.ijpsonline.com/temp/IndianJPharmSci706740-4298652_115626.pdf
- [28] VILA, F.C, COLOMBO, R.; DE LIRA, T.O.; YARIWAKE, J.H. HPLC microfractionation of flavones and antioxidant (radical scavenging) activity of *Saccharum officinarum* L. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v.19, p.903-908, 2008.

-
- [29] SAWAHEL, W.A. Production of herbicide-resistant transgenic maize plants using electroporation of seed derived embryos. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.20, p.303a-303h, 2002.
- [30] TIFFIN, P.; GAUT, B.S. Molecular evolution of the wound-induced serine protease inhibitor *Wip1* in *Zea* and related genera. **Molecular Biology Evolution**, v. 18, p.2092-2101, 2001.
- [31] JONGSMA, M.A.; BOLTER, C. The adaptation of insects to plant protease inhibitor. **Journal of Insect Physiology**, v.43, p.885-895, 1997.
- [32] POMPERMAYER, P.; LOPES, A.R.; TERRA, W.R.; PARRA, J.R.P.; FALCO, M.C.; SILVA-FILHO, M.C. Effects of soybean proteinase inhibitor reproductive of sugarcane borer *Diatrea saccharilis*, **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 99, p.79-85, 2001.
- [33] KOIWA, H.; BRESSAN, R.A.; HASEGAWA, P.M. Regulation of protease inhibitor and plant defense. **Trends in Plant Science Review**, v. 2, p.379-384, 1997.
- [34] FALCO, M. C. ; Tulmann Neto, A. ; Mendes, B.M.J. ; Zapata, F.J. . Isolation and cultivation of sugarcane protoplasts. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, Brasil, v. 8, n. 3, p. 175-179, 1996.
- [35] LASKOWSKY, M.; KATO, I. Protein inhibitor of proteinase. *Annual Review of Biochemistry*, v.49, p.593-626, 1980.
- [36] FALCO, M.F.; SILVA-FILHO, M.C. Expression of soybean proteinase inhibitors in transgenic sugarcane plants: effects on natural defense against *Diatrea saccharilis*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 41, p.761-766, 2003.
- [37] RAWEL, H.M.; CZAJKA, D.; ROHN, S.; KROLL, J. Interactions of different phenolic acids and flavonoids with soy proteins. **International Journal Biological Macromolecules**, v.30, p.137-150, 2002.
- [38] VERHOEYEN, M.E.; BOVY, A.; COLLINS, G.; MUIR, S.; ROBINSON, S. COLLIVER, S. Increasing antioxidant levels in tomatoes through modification of the flavonoid biosynthetic pathway. **Journal of Experimental Botanic**, v.53, p.2099-2106, 2002.

-
- [39] BRADLEY, J.M.; DAVIES, K.M.; DEROLES, S.C.; BLOOR, S.J.; LEWIS, D.H. The maize Lc regulatory gene up-regulates the flavonoid biosynthetic pathway of *Petunia*. **The Plant Journal**, v. 13, p.381-392, 1998.
- [40] MERKEN, H.M.; BEECHER, G.R. Measurement of food flavonoids by high performance liquid chromatography: a review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, n.3, p.557-599, 2000.
- [41] LIANG, Y.Z.; PEISHAN, X.; CHAN, K. Quality control of herbal medicines: a review. **Journal of Chromatography B**, v. 812, p. 53-70, 2004.
- [42]XIE, L.; YING, Y.; YING, T.; YU, H.; FU, X. Discrimination of transgenic tomatoes based on visible/near infrared spectra. **Analytica Quimica Acta**, v. 584, p.379-384, 2007.
- [43] GAN, F.; YE, R. New approach on similarity analysis of chromatographic fingerprint of herbal medicine. **Journal of Chromatography A**, v. 1104, p. 100-105, 2006.
- [44] WATSON, D.G.; PEYFOON, E.; ZHENG, L.; LU, D.; SEIDEL, V.; JOHNSTON, B.; PARKINSON, J.A.; FEARNLEY, J. Application of principal components analysis to 1H-NMR data obtained from propolis samples of different geographical origin. **Phytochemical Analysis**, in press.
- [45] CASS, Q.B.; DEGANI, A.L.G. **Desenvolvimento de métodos por HPLC: fundamentos, estratégias e validação**. São Carlos, UFSCar, 2001. p.5
- [46] SNYDER, L.R. KIRKLAND, J.J. **Introduction to Modern Liquid Chromatography**. 2. Ed. New York, John Wiley and Sons. 1979. p.15-120
- [47] MEYER, V.D. **Practical high-performance liquid chromatography**. 2.ed. Chichester, John Wiley & Sons, 1993. p.354
- [48] COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Introdução a métodos cromatográficos**. 4.ed. Campinas, Ed. Unicamp, 1990. p. 279.

-
- [49] DEY, P.M.; HARBORNE, J.B. **Methods in plant biochemistry**, v.1, Academic Press, London, 1989, p.209.
- [50] SOLOMONS, T.W. **Química Orgânica**, v.1, 6 ed., Jonh Wiley & Sons, 1996, p.557.
- [51] MABRY, T.J.; MARKHAN, K.R.; THOMAS, M.B. **The systematic Identification of Flavonoids**. Springer, New York, 1970, p. 35.
- [52] SCOTT, R.P.W. **Liquid Chromatography Detectors**. 2 ed. Amsterdam, Elsevier, 1986. p.217.
- [53] SKOOG, D.A., HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A. **Princípio de Análise Instrumental**. 5 ed., Porto Alegre, Bookman, 2002, p.457.
- [54] NIESSEN, W.M.A.; VAN DER GREEF, J. **Liquid Chromatography- Mass Spectrometry: Principles and Applications**. New York, Marcel Dekker, 1992, p.479.
- [55] BRUINS, A.P. Atmospheric-pressure-ionization mass spectrometry. I Instrumentation and ionization thecniques. **Trends in Analytical Chemistry**, v.13, p.37-43, 1994.
- [56] CHIARADIA, M.C.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, v.31, p.623-636, 2008.
- [57] <http://www.chm.bris.ac.uk/ms/theory/cid-fragmentation.html>, acessada em 2009.
- [58] CREWS, P.; RODRIGUEZ, J.; JASPARS, M. **Organic Structure Analysis**, New York, Oxford University Press, 1998, p.30.
- [59] SILVERSTAIN, R.M.; BASSLER, G.C. MORRIL, T.C. **Identificação espectrométrica de compostos Orgânicos**. Rio de Janeiro, Guanabara KooGan S.A., 1994, p. 156

[60] SKOOG, D.A., HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A. **Princípio de Análise Instrumental**. 5 ed., Porto Alegre, Bookman, 2002, p.405.

Capítulo 2

Capítulo 2. *Análise Quimiométrica dos Perfis Cromatográficos das duas Variedades de Cana-de-açúcar Modificadas com os Inibidores de Proteinase Bowman-Birk e Kunitz*

2.1. Introdução

Vandeginste [1] (1987) define quimiometria “como uma disciplina química que emprega modelos matemáticos e estatísticos para selecionar experimentos de forma otimizada e para fornecer o máximo de informação química através da análise dos resultados obtidos”. Em outras palavras, a quimiometria relaciona as médias experimentais obtidas por um processo químico ao estado do sistema utilizando métodos matemáticos e/ou estatísticos. Desta forma, o emprego de análise multivariada tem como objetivo encontrar possíveis correlações entre resultados obtidos por análise química e fatores externos, como por exemplo, variedades entre espécies ou cultivares [2-4]. Por este motivo, inúmeros trabalhos encontrados na literatura utilizam técnicas quimiométricas para melhor interpretação de resultados e dentre elas são utilizadas: Análise de Componentes Principais (PCA) [5-6], Análise Hierárquica de Cluster (HCA) [7], Regressão por Mínimos Quadrados (PLS) [8-9], Análise Discriminante (DA – Discriminant Analysis) [10], Análise Discriminante Linear (LDA – Linear Discriminant Analysis) [11], entre outras.

Para a investigação dos perfis cromatográficos das variedades transgênicas da cana-de-açúcar (Bowman-Birk e Kunitz) as técnicas de reconhecimento de padrão exploratória tais como análise de componentes principais e análise de agrupamentos hierárquicos foram utilizadas neste trabalho [12-13]. Ambos os métodos serão discutidos posteriormente nos itens 2.1.4 e 2.1.5.

Técnicas quimiométricas para analisar perfis cromatográficos vêm sendo amplamente utilizadas pela comunidade científica, principalmente como estratégia para o controle de qualidade de plantas medicinais [14-18]. Entretanto, antes de iniciar a análise quimiométrica é essencial eliminar e/ou diminuir o ruído experimental do conjunto de dados a ser analisado [19]. Para isso, é recomendável visualizar todo o conjunto de dados a fim de identificar possíveis erros sistemáticos e /ou aleatórios e consequentemente, optar pelo tipo/s de tratamento adequado a ser empregado.

Neste trabalho foram utilizadas como tratamento do conjunto de dados as técnicas de alinhamento, alisamento e normalização que serão discutidas a seguir.

2.1.1. Alinhamento dos perfis cromatográficos

Em análise de perfis ou “fingerprinting”, pequenas diferenças entre cromatogramas complexos podem ser detectadas através de métodos de reconhecimento de padrão (PCA, HCA, PLS-DA, DA entre outras). Especialmente em perfis cromatográficos é comum a presença de variações entre uma injeção e outra que não estão relacionadas com a composição da amostra e que por sua vez estão somatizadas com a matriz de dados, resultando em equívocos na interpretação do modelo quimiométrico. Em cromatografia, a fonte destas variações é a própria curva exponencial Gaussiana dos picos e um dos procedimentos mais utilizado para compensar as diferenças provocadas por este parâmetro essencial em cromatografia é o alinhamento [20-21]. Assim, através do alinhamento, problemas no deslocamento do tempo de retenção e/ou variações na área do pico e variações de linha de base (causados não pela diferença na composição das amostras e sim por fatores intrínsecos a separação cromatográfica como por exemplo, pela idade da coluna durante as análises, pequenas diferenças na composição da fase móvel, interações diferenciadas entre os analitos da amostra, entre outros problemas), podem ser minimizados ou até mesmo eliminados [22].

A literatura descreve diversos métodos de alinhamentos, dentre eles: Dynamic Time Warping (DTW) [23], Correlation Optimized Warping (COW) [24], Peak Alignment by Genetic Algorithm (PAGA) [25], Parametric Time Warping (PTW) [26], Fuzzy Warping (FW) [27]. A escolha do tipo de método a ser utilizado dependerá do modo de extração dos cromatogramas. Neste trabalho, todo o cromatograma, obtido por HPLC, foi extraído para a análise quimiométrica, evitando assim a detecção e integração de picos. Desta forma, o alinhamento COW proposto por Nielsen e colaboradores foi utilizado [24]. A teoria do método COW está baseada na interpolação linear de regiões dos cromatogramas através de estiramento e compressão, aplicados na direção do eixo X do cromatograma (tempo de retenção, t_r). Neste método, dois parâmetros devem ser otimizados: o número de secções em que o cromatograma a ser alinhado deve ser dividido (N) e o ajuste ou “slack”(s), que indica a magnitude da interpolação e é representado por um valor inteiro de 0 a s .

Assim, considerando dois cromatogramas a serem alinhados, a primeira etapa do método COW consiste em escolher qual deles será o cromatograma alvo (A) ou perfil a ser alinhado e o cromatograma referência (R). O cromatograma alvo (A) será dividido em secções de comprimento m , como apresenta a Figura 2.1. O número de secções (N) é dado pela equação (2.1).

$$N = \frac{L_A}{m} \quad \text{eq. (2.1)}$$

Onde, N = número de secções, L_A = comprimento do cromatograma alvo e m = comprimento de cada secção.

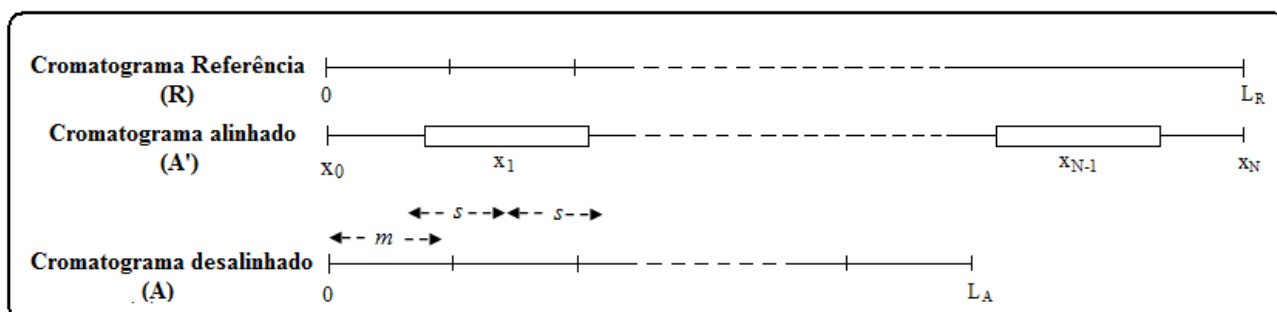


Figura 2.1. Representação esquemática da teoria do alinhamento COW.

Cada secção m será ajustada para um comprimento de maior (expansão) ou menor (compressão) magnitude através do ajuste (s). O resultado é um novo vetor de comprimento x_N igual ao comprimento do cromatograma de referência (L_R). A qualidade do alinhamento é determinada através do cálculo do coeficiente de correlação entre cada secção, individualmente, após a interpolação e o correspondente segmento no cromatograma de referência.

Existem diferentes critérios para a seleção do cromatograma de referência (R) [28]: cromatograma do meio da sequência de injeção [29]; cromatograma que contém o maior número de constituintes químicos [30]. Neste trabalho, foi adotado o critério da similaridade, ou seja, o cromatograma selecionado como modelo para o alinhamento é aquele que possui maior similaridade com os outros cromatogramas do conjunto de dados. O cálculo de similaridade foi realizado através da análise de agrupamentos hierárquicos (HCA), que será discutido no item 2.1.4.

2.1.2. Técnica de alisamento: Savitzky-Golay

Em geral, as técnicas de alisamento visam aumentar a razão sinal-ruído do conjunto de dados. Existem diversos métodos de alisamento como por exemplo: alisamento pela média, alisamento pela média móvel, alisamento com filtros de Fourier, alisamento convolutivo (Savitzky-Golay) entre outros [13].

Savitzky e Golay (1964) [31] propuseram um método simplificado para o cálculo do alisamento e de diferencial baseado na teoria dos mínimos quadrados. Resumidamente, o método Savitzky-Golay calcula os novos pontos de uma janela previamente determinada através de um polinômio de baixa ordem [31]. A Figura 2.2, representa a curva polinomial utilizada para calcular o valor alisado no meio da janela representado por X [13]. Neste método, a janela é reduzida pela metade, implicando em eliminação de pontos. Para evitar a eliminação de pontos do conjunto de dados, Gorry (1990) adaptou o método Savitzky-Golay de tal maneira que o número de variáveis originais são preservadas [32].

A escolha do tamanho da janela e do grau do polinômio são de fundamental importância para um alisamento adequado sem que haja eliminação de informações relevantes. Quanto maior o tamanho da janela mais o ruído será reduzido do conjunto de dados, porém, seleção de janelas muito grandes ocasiona distorção no formato de picos. Em relação ao grau do polinômio, geralmente, são utilizados polinômios de segunda e terceira ordem.

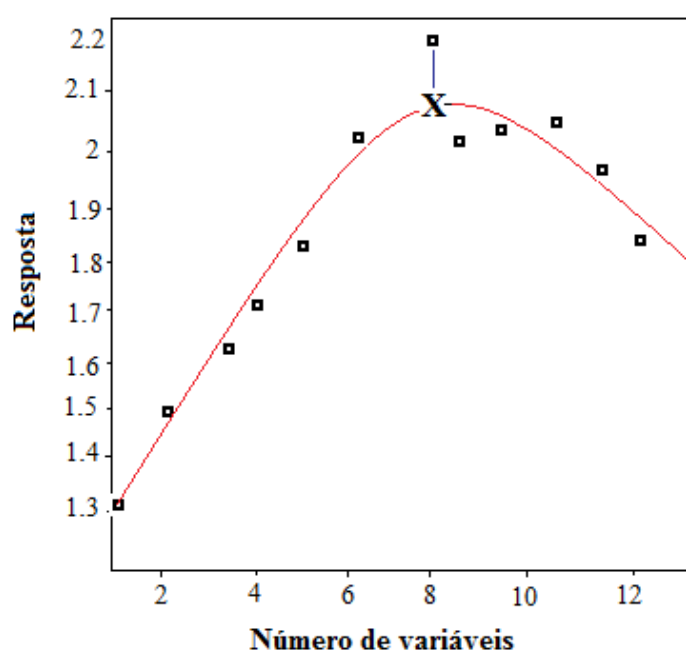


Figura 2.2. Representação do alisamento convolutivo (Savitzky-Golay) para uma janela de 13 pontos. O valor alisado é dado por X.

2.1.3. Técnica de normalização

Em geral, métodos de normalização consistem em dividir cada variável de uma amostra ou vetor por uma constante, representada por $\|x_j\|$. Assim, dada uma matriz X_{ij} , onde i consiste no número de linhas (amostras) e j no número de colunas (variáveis), o valor normalizado é calculado segundo a equação 2.2 [13 e 33]. O resultado é que todas as amostras estarão em uma mesma escala.

$$x_{ij(\text{norm})} = \frac{x_{ij}}{\|x_j\|} \quad , \quad j = 0,1,2,3,\dots,J \quad \text{eq. (2.2)}$$

Há vários métodos para o cálculo desta constante sendo que as mais utilizadas são: norma sup, norma-1 ou normalização à unidade de área e norma-2 ou norma euclidiana [13 e 33]. Em caso de dados cromatográficos é comum utilizar a norma-1 para reduzir variações no volume de injeção das amostras. A norma-1 é calculada através da equação 2.3.

$$\|x_j\| = \sum_{j=1}^J |x_{ij}| \quad \text{eq. (2.3)}$$

2.1.4. Análise de agrupamentos hierárquicos (Hierarchical Clusters Analysis- HCA)

As técnicas de agrupamentos são utilizadas com o objetivo de investigar as relações existentes dentre um conjunto de dados em que, *a priori*, nenhuma classificação é conhecida.

A análise de agrupamentos hierárquicos (HCA) é uma técnica aglomerativa não supervisionada que examina as distâncias interpontuais dentre todas as amostras contidas no conjunto de dados e esta informação é representada por um gráfico bidimensional denominado dendograma [34] Através deste gráfico pode-se visualizar agrupamentos e similaridade entre amostras e/ou variáveis.

O método HCA calcula a distância entre todas as amostras do conjunto, em pares, definindo assim uma matriz de similaridade. Os elementos desta matriz são denominados de índice de similaridade e eles variam de zero a um. Índice de similaridade alto indica alta similaridade, ou seja, uma distância pequena entre dois agrupamentos. O cálculo da similaridade é dado pela equação 2.4 [34].

$$s_{ij} = 1 - \frac{d_{ij}}{d_{max}} \quad \text{eq. (2.4)}$$

onde: s_{ij} é a similaridade entre duas amostras ou agrupamentos; d_{ij} é a distância euclidiana entre as duas amostras; d_{max} é a distância encontrada entre todas as amostras presentes na matriz de dados X_{ij} .

A escolha do método de conexão entre os agrupamentos pode ser feito basicamente por três métodos: o vizinho mais próximo, o vizinho mais distante ou pela média. Este último método pode ser calculado por diversas maneiras. Assim como para o cálculo da proximidade, a distância também pode ser calculada por diferentes métodos: distância Euclidiana, distância de Manhattan, distância Euclidiana quadrática, entre outras [34].

Neste trabalho, foi utilizado o método do vizinho mais próximo (baseado na menor distância entre dois grupos) e para o cálculo da similaridade a distância Euclidiana, que consiste na distância geométrica em um espaço multidimensional e pode ser calculada através da equação 2.5, considerando dois objetos a e b .

$$d_{ab} = \{\sum (x_a - x_b)^2\}^{1/2} \quad \text{eq. (2.5)}$$

A Figura 2.3 representa um dendograma típico das análises de HCA. As amostras são listadas ao lado esquerdo do gráfico e os ramos indicam quais amostras pertencem a um mesmo agrupamento. O eixo horizontal é a medida da distância inter-agrupamentos e a posição das linhas verticais indica as distâncias entre dois destes pontos, ou seja, a similaridade [13].

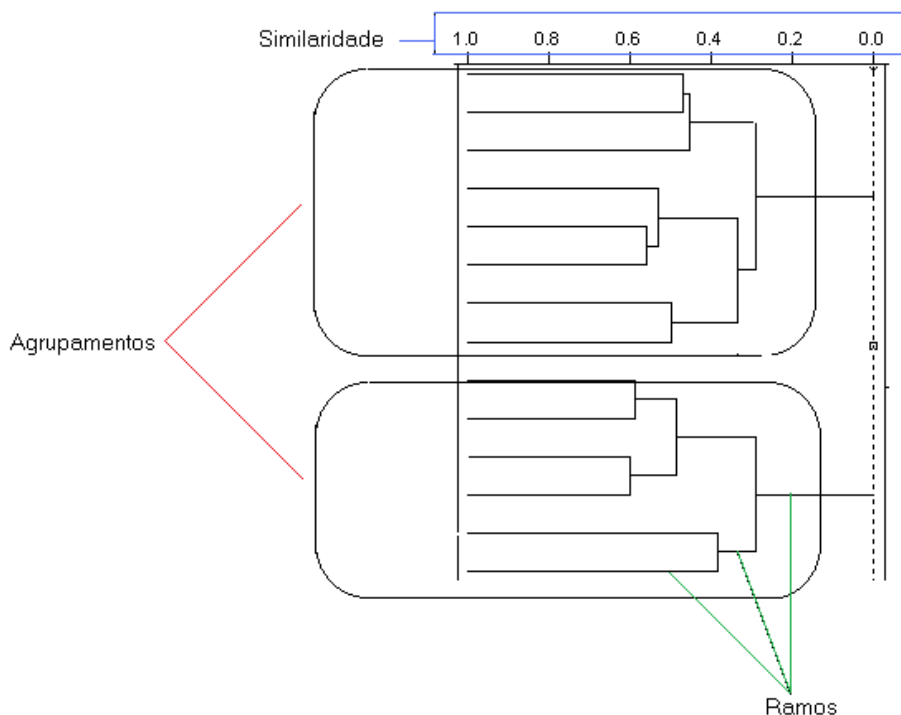


Figura 2.3.: Representação de um dendrograma de HCA.

2.1.5. Análise de componentes principais (Principal Component Analysis- PCA)

O principal objetivo da análise de componentes principais é o de reduzir a dimensionalidade da matriz original de dados. Esta técnica quimiométrica está fundamentada na correlação entre as variáveis medidas experimentalmente [13]. Em um conjunto de dados contendo variáveis correlacionadas (alta colinearidade) é possível obter novas bases que melhor representam as informações contidas na matriz de dados, tornando as informações mais óbvias. Para a construção dos novos vetores de base cria-se um conjunto de novas variáveis linearmente independentes para descrever os dados originais. Cada vetor base é expresso como uma combinação linear das variáveis originais. Os novos eixos são representados pelas componentes principais, são ortogonais entre si e ordenados em termos da quantidade de variância explicada pelos dados, sendo que a primeira componente contém a maior variância [35].

Uma das maneiras de realizar a projeção do conjunto de dados em uma base ortogonal (novos eixo-PCs) é através do método de decomposição de valores singulares (Singular Value Decomposition - SVD) [35-36]. A matriz de dados originais (**X**) é decomposta em outras três novas matrizes, duas delas ortonormais (**T** e **P**) e outra diagonal (**S**), conforme indicado na equação 2.6 [37].

$$X = TSP', \quad \begin{bmatrix} \mathbf{X} \\ I \times J \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \mathbf{T} \\ I \times I \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \mathbf{S} \\ I \times J \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \mathbf{P}' \\ J \times J \end{bmatrix} \quad \text{eq. (2.6)}$$

As matrizes **T** e **P'** são quadradas ($I \times I$ e $J \times J$, respectivamente) e ortonormais, ou seja as colunas de **T** e **P'** são ortogonais entre si e normalizadas. A matriz **S** é retangular diagonal com elementos na diagonal não negativos e arranjados em ordem decrescente, enquanto que os outros elementos da matriz possuem valor iguais a zero.

Os quadrados da matriz **X'X** medem a importância de cada componente principal individualmente, ou seja, a porcentagem de variância explicada por cada PC (Principal Component) [36]. O posto químico é definido através da exclusão dos autovalores pouco ou nada significativos. Após a seleção do posto químico, têm-se como resultado a matriz **X** representada pelo produto das matrizes **T**, **S** e **P'** acrescida de uma matriz de erros que representa os desvios ou resíduos dos dados originais.

As colunas de **P'** são autovetores da matriz **X'X**, abrangendo o espaço vetorial das colunas da matriz **X**, enquanto que as linhas da mesma matriz correspondem a matriz **T**, formada pelos autovetores de **XX'**. O produto **TP** corresponde a matriz de escores que está relacionada com a posição em que as amostras ocupam nas novas coordenadas (PCs- Principal Components). A matriz **P'** corresponde aos pesos, ou seja, informa o quanto cada variável original contribui para a formação dos novos eixos. Em suma, a matriz **P'** apresenta as relações entre as variáveis originais.

A Figura 2.4 representa graficamente o conceito de escores e pesos. Assim, considerando apenas duas variáveis, a componente principal é o eixo que melhor representa o conjunto de dados originais. Os elementos p_1 e p_2 são os cossenos diretores, ou projeção do vetor unitário ao longo da componente principal. Os vetores dos escores denominados de t_1 e t_2 são vetores colunas e seus elementos são coordenadas dos respectivos pontos na componente principal [38].

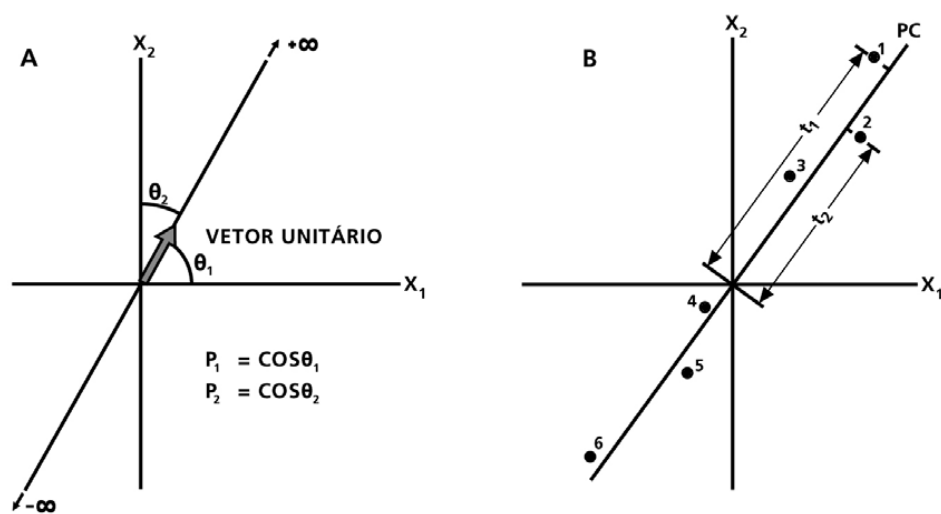


Figura 2.4.: Componente Principal traçada para duas variáveis: (A) pesos; (B) escores

Uma outra maneira de calcular os valores dos pesos e dos escores é através do método NIPALS [39]. Neste caso, os vetores de pesos e escores são calculados iterativamente, ou seja, um de cada vez. Primeiramente, os escores são estimados, geralmente a primeira estimativa é a coluna de \mathbf{X} que possui maior variância. Com os valores destes escores, calcula-se o autovalor da componente principal. Com os valores dos escores estimados, calculam-se os pesos que são usados para estimar novos valores de escores e o processo continua até a convergência dos autovalores.

O pré-processamento dos dados originais foi realizado através do método de auto-escalamento, que consiste pela centralização dos dados na média e posterior escalamento pela variância como mostra a equação 2.7 [13 e 40].

$$X_{ij} \text{ (auto-escaled)} = \frac{x_{ij} - \bar{x}_j}{s_j} \quad \text{eq. (2.7)}$$

Onde x_{ij} são os elementos da coluna da matriz \mathbf{X} ; s_j é a variância e \bar{x}_j a média da j -ésima coluna dos dados.

Este pré-processamento é utilizado quando pretende atribuir o mesmo peso para as variáveis medidas, uma vez que a PCA é um método de mínimos quadrados fazendo com que variáveis de alta variância possuam altos pesos.

2.1.6. Seleção de Variáveis – algoritmo OPS (Ordered Predictor Selector)

Em caso de análise de perfis baseado em técnicas de reconhecimento de padrão, por exemplo a PCA, é muito comum aplicar métodos de seleção de variáveis, uma vez que a maioria das variáveis ou dados químicos não contém informações discriminatória [41].

No presente trabalho um novo algoritmo proposto por Teófilo et. al. (2006) denominado Ordered Predictor Selection (OPS) foi aplicado nas análises dos perfis cromatográficos a fim de realizar a seleção dos picos realmente responsáveis pela distinção das duas variedades transgênicas da cana-de-açúcar (“Bowman-Birk” e “Kunitz”) [42-43]. O método OPS foi baseado no modelo de classificação de análise discriminante de mínimos quadrados parciais (Partial least Square - Discriminant Analysis- PLS-DA), no qual utiliza além da matriz original de dados X uma outra matriz, a de classificação [44]. A matriz de classificação é construída atribuindo-se o valor 0 ou 1 para cada objeto ou amostra contida na matriz original. Através da combinação dos vetores de regressão e correlação origina-se um novo vetor que ordena as variáveis independentes (as informações químicas) de acordo com a importância de cada uma delas para o modelo. Por fim, as variáveis ordenadas são testadas através de incrementos sobre uma janela previamente definida. O erro médio quadrático de validação cruzada (RMSECV- Root Mean Square Error of Cross Validation) e o

coeficiente de validação cruzada (r_{cv}) são armazenados para cada janela analisada e o conjunto de variáveis que indicar o menor RMSECV e maior r_{cv} é selecionado.

2.2. Parte Experimental

2.2.1. Materiais e Reagentes

- ✓ Materiais e vidrarias usuais de laboratório;
- ✓ Solventes: metanol e acetonitrila (grau HPLC- Tedia), ácido fórmico grau p.a (Synth), água purificado por sistema Milli-Q[®] da Millipore;
- ✓ Padrões de flavonóides: diosmina (Sigma), orientina (Sigma), quercetina (Sigma) e rutina (Sigma).
- ✓ Adsorventes: cartuchos de extração OASIS HLB[®], (Waters);
- ✓ Membranas para filtração em PTFE hidrofóbica, 0.45 μm (Millipore);
- ✓ Coluna cromatográfica SymmetryShield[®] (Waters) RP- 18, dimensões: 250 mm x 4,6 mm x 5 μm .
- ✓ Pré-coluna SymmetryShield[®] (Waters) RP- 18, dimensões: 12,5 mm x 4,6 mm x 5 μm .

2.2.2. Material Vegetal

As plantas transgênicas foram concedidas pelo prof. Dr. Marcio de Castro Silva Filho da Escola de Agricultura Luiz de Queiroz- ESALQ-USP. O material vegetal foi coletado em dezembro/2005 no Centro de Tecnologia Canavieira (CTC), Piracicaba-SP. Cada planta foi cultivada em vasos individuais sob condições de temperatura e umidade controlados em casa de plantio. Ao todo, foram coletados 12 plantas, sendo que 7 vasos continham plantas modificadas com o gene da soja inibidor de proteinase Bowman-Birk e os outros 5 vasos plantas modificada com o inibidor Kunitz.

Após a coleta, as folhas foram secas em estufa à temperatura de 40° C, trituradas, peneiradas em peneira comum e passadas por tamis de 35 mesh para obter o

material com 0,5 a 1,0 cm. Já os caules das plantas foram passados em um moedor pra extrair a garapa e em seguida as amostras foram imediatamente congeladas.

Todas as etapas de manuseio do material coletado até sua inativação (secagem e extração) foram realizadas na ESALQ - Piracicaba.

2.2.3. Extração e clean up do material vegetal

O procedimento de extração e clean-up foi otimizado em trabalho anterior pelo Grupo de Análise Fitoquímica [45]. Um grama de folhas secas da cana-de-açúcar transgênicas (Bowman-Birk e Kunitz) foi extraído com 20 mL de metanol/água (1:1) e submetida a banho de ultrassom por 1,5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida o extrato foi filtrado por gravidade e concentrado até um volume de 3,0 mL em rota-evaporador. Após a redução de volume, o extrato foi submetido a extração em fase sólida, utilizando cartucho HLBOasis® previamente condicionado com 3,0 mL de metanol e 3,0 mL de água. A eluição do cartucho foi realizada com 3,0 mL de água e 3,0 mL de metanol, sendo que apenas a fração metanólica foi coletada para posterior análise em HPLC-PAD.

O extrato de garapa da cana-de-açúcar transgênica (Bowman-Birk e Kunitz) foi preparado a partir de 10 mL de garapa com 10 mL de metanol em banho de ultrassom por 1,5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida o extrato foi filtrado por gravidade e concentrado até um volume de 3,0 mL em rota-evaporador.

Após a redução de volume, o extrato foi submetido a extração em fase sólida, utilizando cartucho HLB-Oasis previamente condicionado com 3,0 mL de metanol e 3,0 mL de água. A eluição do cartucho foi realizada com 3,0 mL de água e 3,0 mL de metanol, sendo que apenas a fração metanólica foi coletada para posterior análise em HPLC-PAD (High Performance Liquid Chromatography- Photodiode Array Detector) [45]. A Figura 2.5, apresenta o esquema analítico utilizado para extração e clean up das amostras de folhas e garapa das variedades de cana-de-açúcar transgênica.

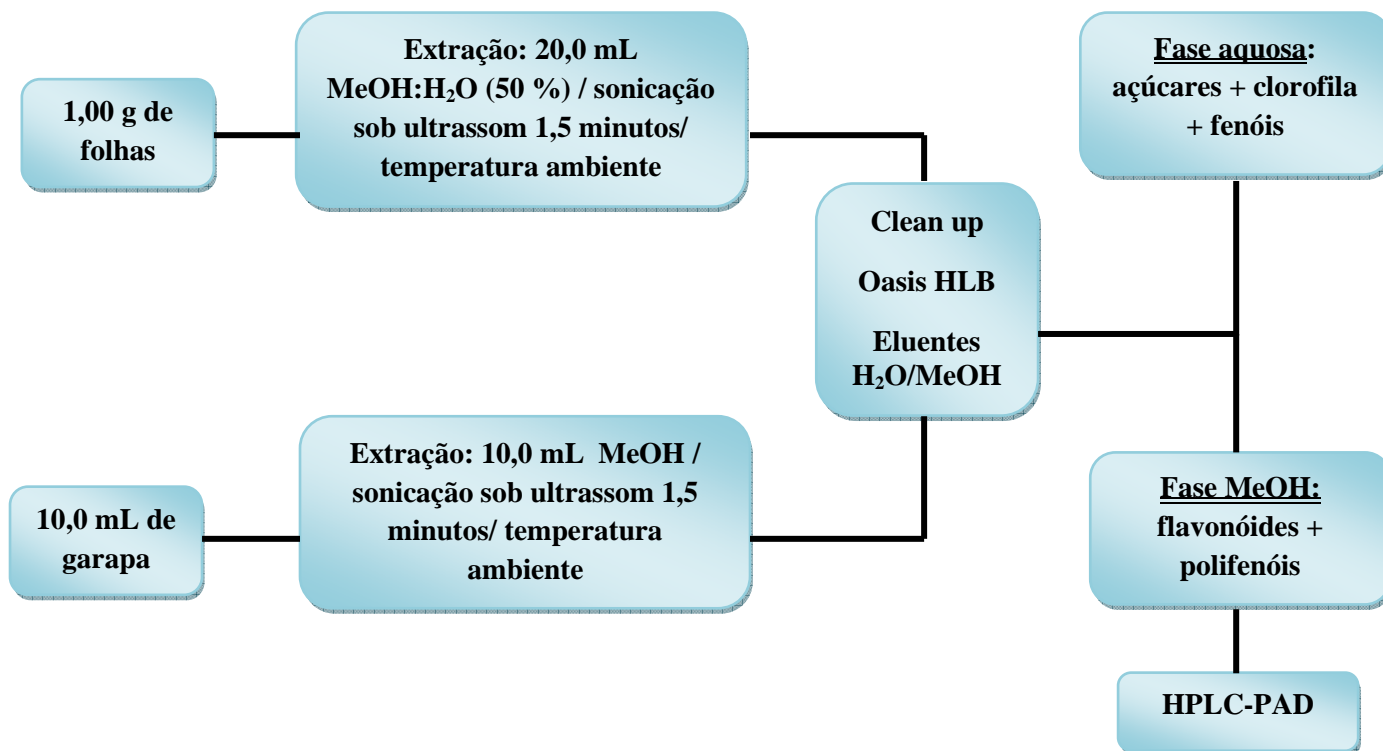


Figura 2.5. Esquema de extração e clean up para as amostras de folhas e garapa da cana-de-açúcar transgênica Bowman-Birk e Kunitz [45].

2.2.4. Condições cromatográficas para obtenção dos perfis (fingerprinting) por HPLC-PAD

Após a extração e clean up das amostras de folhas e garapa das variedades de cana-de-açúcar transgênicas, foi realizada análise HPLC-PAD em triplicata, seguindo a condição cromatográfica (Tabela 2.1) desenvolvida e validada para análise de flavonóides da cana-de-açúcar por Colombo (2003) [45]. Para esta análise foi utilizado coluna cromatográfica RP-18 (SymmetryShield[®] – Waters) e coluna guarda RP-18 (SymmetryShield[®] – Waters), com temperatura de forno de 40 °C, eluição gradiente

com fase móvel composta por acetonitrila (B) e solução de 0,2% ácido fórmico em água (A) utilizando fluxo de 1,2 mL / min.

Tabela 2.1. Programação gradiente utilizada na obtenção de fingerprinting das folhas e garapa das variedades transgênicas

Condição	Gradiente*
1	0-8 min: 10-13% B
2	8-25 min: 13-20% B
3	25-40 min: 20-40% B
4	40-45 min: 40-60% B
5	45-50 min: 60-10% B
6	50-60 min: 10% B

*Solventes : (A) ácido fórmico 0,2%, (B) acetonitrila

Para selecionar o melhor comprimento de onda foram levados em consideração os espectros de UV de padrões de flavonóides glicosilados e agliconas. Assim, os compostos presentes nas duas variedades transgênicas foram monitorados no comprimento de onda de 330 nm.

2.2.5. Tratamento quimiométrico

- ✓ Software MATLAB versão 6.5 (The Mathwork, Natick, USA) juntamente com o pacote computacional PLS_Toolbox (Eingvector Research, Inc. – PLS_Toolbox versão 3.02).
- ✓ Algoritmo COW (Correlation Optimized Warping) obtido através do site WWW.models.klv.dk/source/.
- ✓ Algoritmo OPS (Ordered Predictor Selection).

2.3. Resultados e Discussão

A Figura 2.6 apresenta os perfis cromatográficos para as folhas e garapas das variedades de cana-de-açúcar “Bowman-Birk” e “Kunitz”.

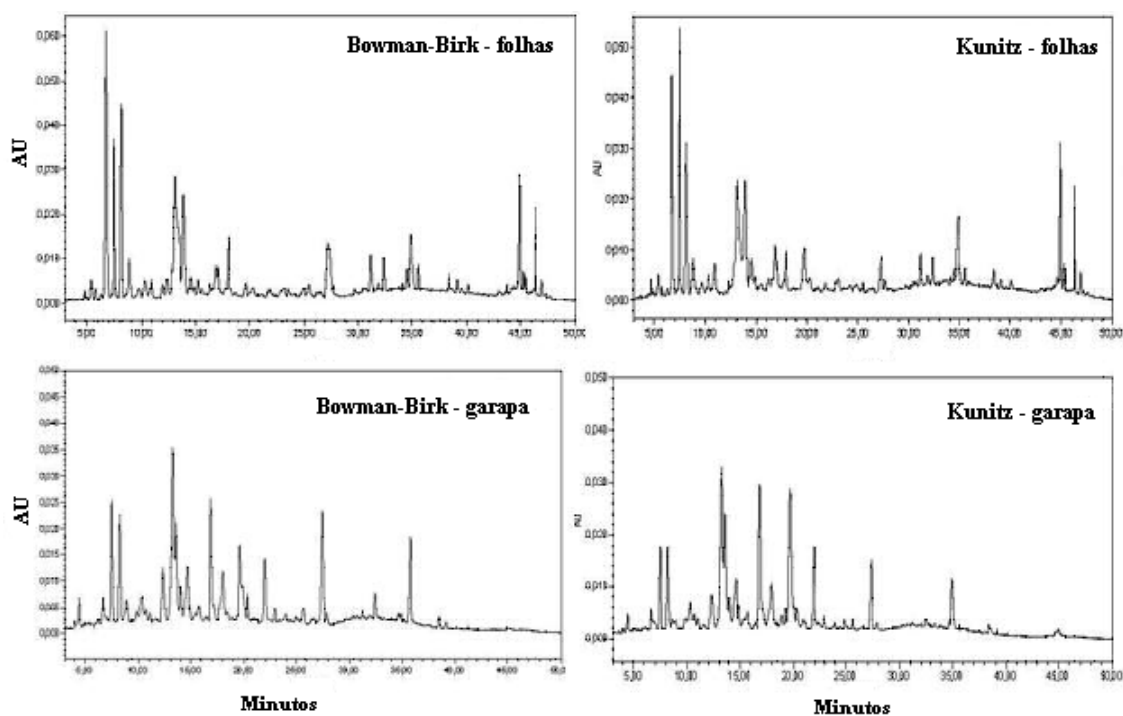


Figura 2.6. Perfil cromatográfico representativo (HPLC-PAD, $\lambda = 330$ nm) das amostras de folhas e garapa das variedades Bowman-Birk (BB) e Kunitz (K) da cana-de-açúcar.

Flavonas e flavanóis em metanol possuem espectros no ultravioleta com duas bandas de absorção bem características: uma com máximo de absorção entre 240-280 nm, referente ao anel B do sistema cinamoila (banda II) e outra entre 300-380 nm referente ao anel A do sistema benzoila (banda I). Dependendo das características dos substituintes presentes no anel A e B podem ocorrer deslocamento (batocrômico ou hipsocrômico) no máximo de absorção [46]. Alguns espectros de UV-PAD típicos de flavonóides obtidos para as amostras de folhas e garapas são apresentados na Figura 2.7.

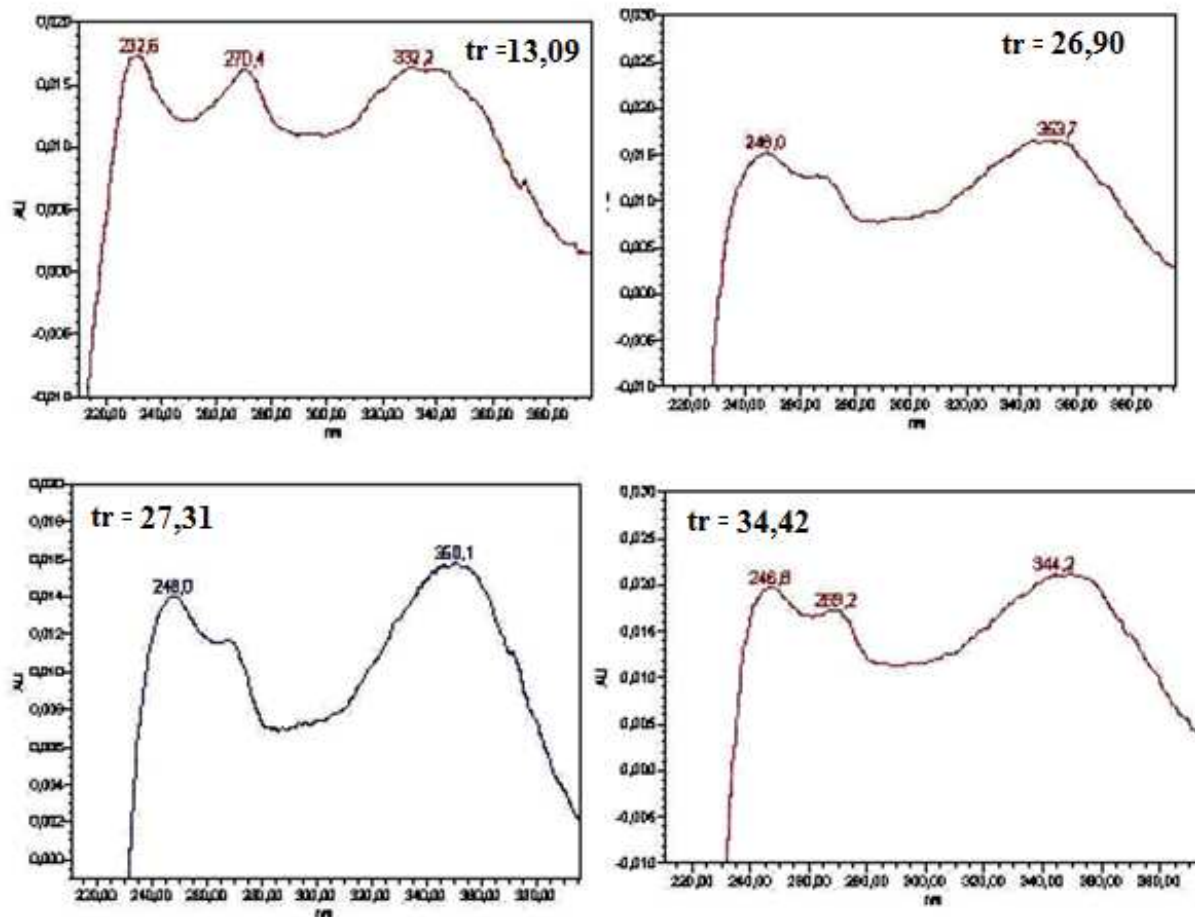


Figura 2.7. Espectros típicos UV-PDA de flavonóides presentes nas amostras de cana-de-açúcar.

Além dos espectros característicos de flavonas e flavonóis também observou-se espectros característicos de compostos fenólicos (polifenóis), Figura 2.8. Estas substâncias são encontradas principalmente no início e no fim dos cromatogramas da Figura 2.6.

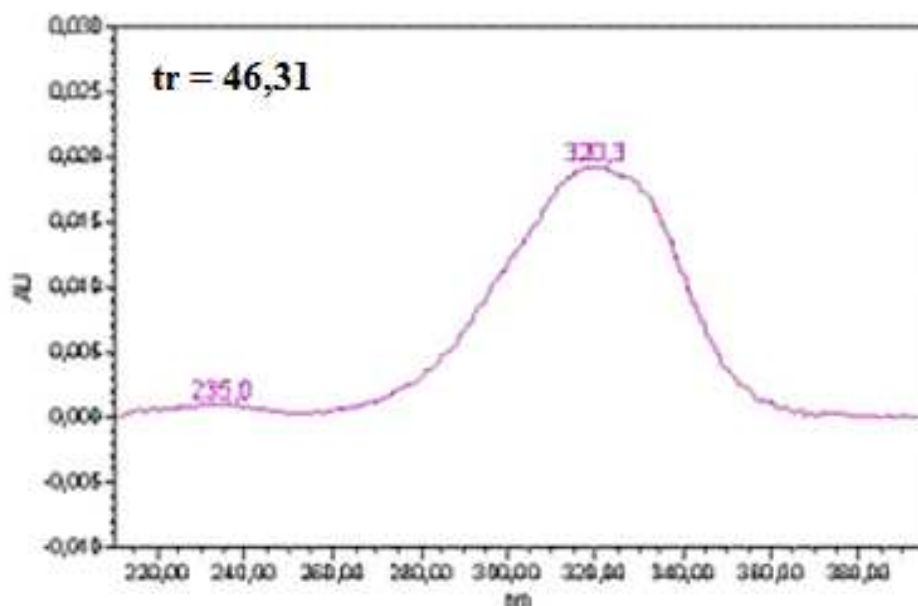


Figura 2.8. Espectro UV-PDA de possível polifenol presente nas amostras de folhas e garapas das duas variedade transgênicas da cana-de-açúcar.

Após a coleta de dados experimentais relacionados ao perfil cromatográfico das substâncias presentes nas amostras de folhas e garapa das variedades de cana-de-açúcar (“Kunitz”, grupo **K** e “Bowman-Birk”, grupo **BB**), foram construídas duas planilhas distintas contendo o total de 36 amostras e 3598 variáveis ($X_{36 \times 3598}$) para tratamento quimiométrico.

2.3.1. Análise quimiométrica dos perfis cromatográficos para as amostras de folhas das variedades “Kunitz” e “Bowman-Birk”

2.3.1.1 Transformação dos dados originais das amostras de folhas

Como já discutido anteriormente (itens 2.1.1-2.1.3), o tratamento de dados é a etapa crucial da análise quimiométrica, pois através deles informações indesejadas como as

variações aleatórias (ruído experimental) e sistemáticas (alteração na linha de base e tempo de retenção) serão eliminadas do sinal químico.

Iniciou-se com o alisamento (método Savitzky-Golay, 2.1.2), utilizando janela 5 e a primeira derivada. Em seguida os dados foram normalizados (2.1.3), através da norma-1. Os resultados destas transformações podem ser visualizados na figura 2.9.

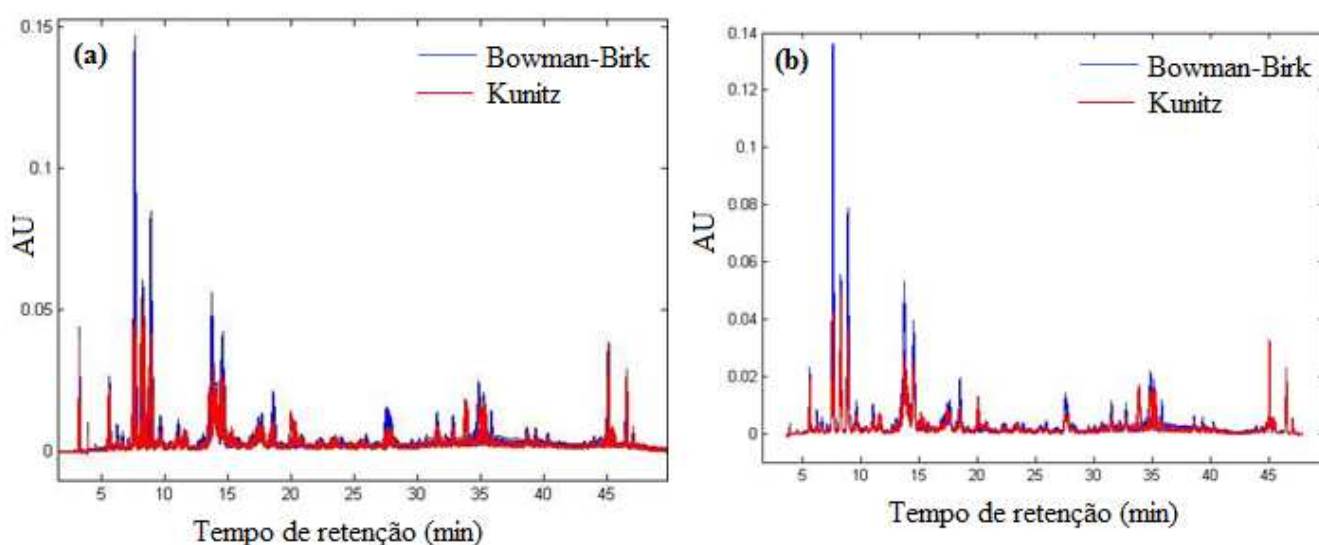


Figura 2.9. Cromatogramas (HLPC-PDA, $\lambda = 330$ nm) dos perfis das duas variedades de folhas de cana-de-açúcar: (a) dados originais; (b) dados transformados com alisamento (janela =5 e primeira derivada) e normalização (normalizado para unidade de área ou norma-1).

Para a transformação dos dados com o alinhamento dos picos cromatográficos utilizando o método COW, descrito no item 2.1.1. O primeiro passo foi de selecionar dentre todas as amostras de folhas das duas variedades transgênicas o perfil de referência, ou seja, aquele que foi utilizado como modelo para que os cromatogramas das outras amostras sejam alinhados. A seleção do perfil de referência foi realizada através da análise de HCA descrita no item 2.1.4.

Para a análise de agrupamentos (HCA) foi selecionada a conexão do vizinho mais próximo e a distância euclidiana. O resultado é apresentado no dendograma da figura 2.10.

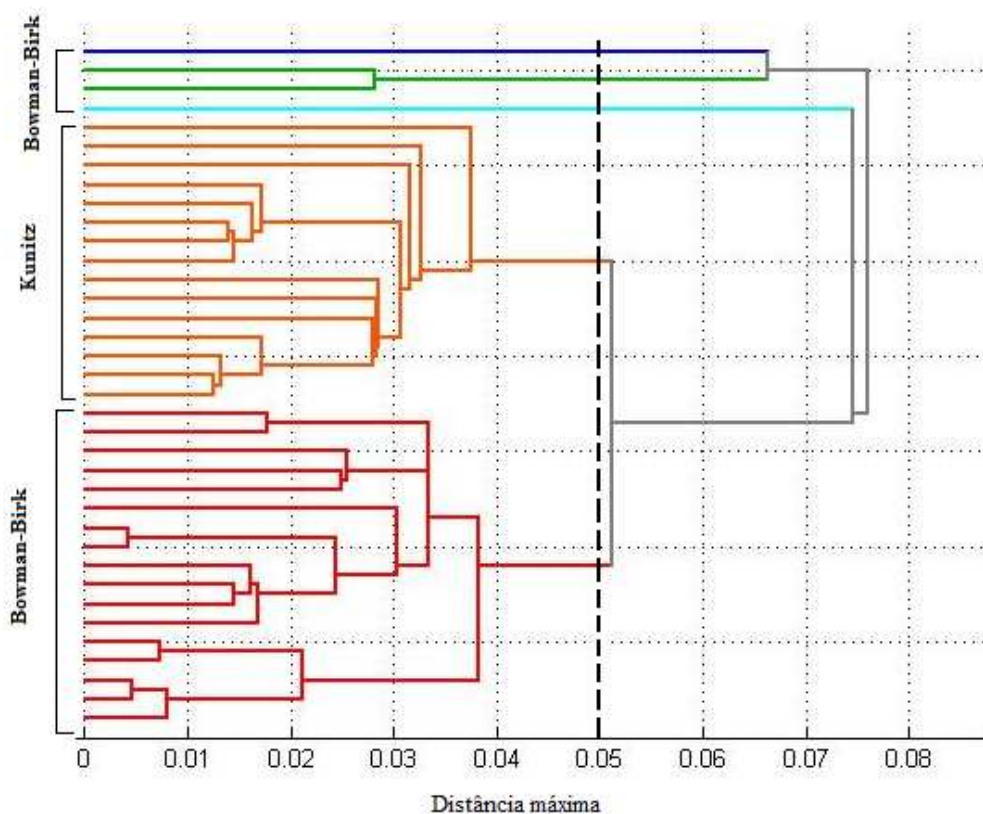


Figura 2.10. Dendograma das amostras de folhas das duas variedades de cana-de-açúcar (“Bowman-Birk e “Kunitz”).

O dendrograma apresenta no eixo horizontal a distância máxima entre as amostras, neste caso 0,08, o que implica em dizer que, com este nível de similaridade, os objetos (amostras) estão muito distantes entre si e portanto possuem baixa similaridade. Para a escolha da amostra referência foi considerado a amostra com distância máxima entre os agrupamentos de aproximadamente 0,05. Entretanto, com este nível de distância máxima existem dois agrupamentos tanto de amostras pertencentes à variedade “Bowman-Birk” quanto à “Kunitz”. Assim, um segundo

critério foi adotado: o cromatograma com a maior composição química. Sendo assim, uma das amostras pertencentes à variedade “Kunitz”, à uma distância de aproximadamente 0,05, foi escolhida como amostra referência.

Todos os cromatogramas foram divididos em 8 partes e cada uma foi ajustada individualmente com diferentes valores de N (número do segmento) e s (ajuste). O resultado final do alinhamento pode ser observado pelas figuras 2.11 e 2.12.

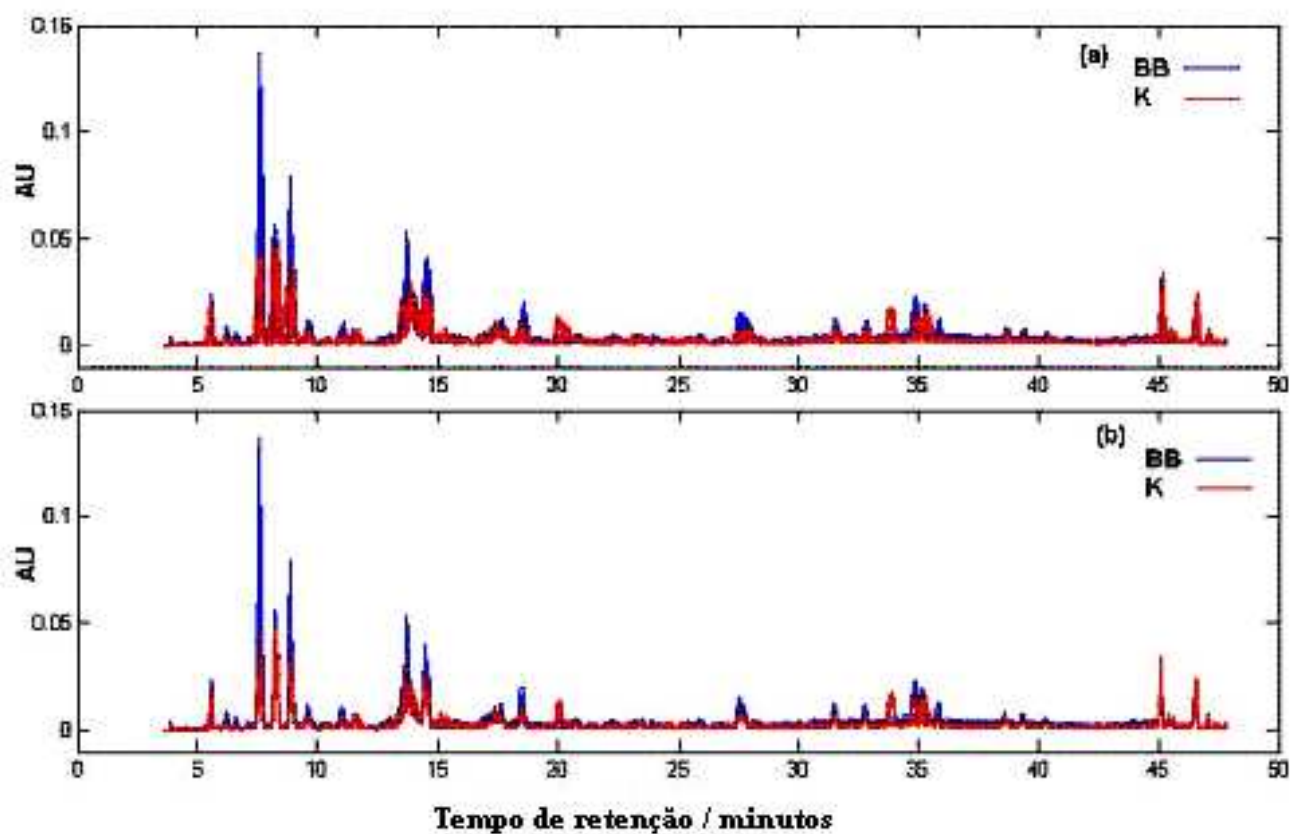


Figura 2.11. Alinhamento COW: (a) cromatogramas desalinhados; (b) cromatogramas alinhados.

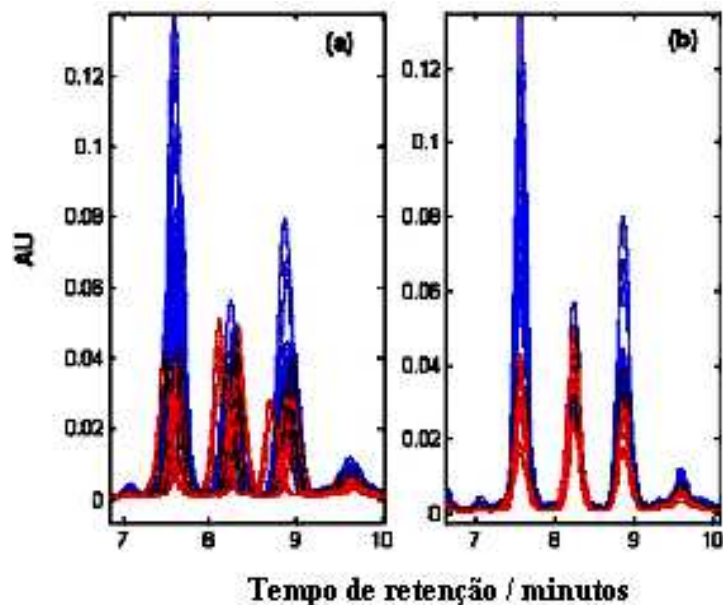


Figura 2.12. Expansão das regiões entre 7 a 10 minutos dos cromatogramas das variedades da cana-de-açúcar (“Bowman-Birk” e “Kunitz”): (a) região desalinhada; (b) região alinhada pelo método COW.

Com as transformações realizadas pelas técnicas de alisamento, normalização e alinhamento dos picos cromatográficos iniciaram-se a etapa de seleção de variáveis que será discutida a seguir.

2.3.1.2. Seleção de variáveis pelo algoritmo OPS – Ordered Predictor Selection para as amostras de folhas das variedades transgênicas

A matriz de dados transformada (36 x 3598) foi submetida a análise pela técnica OPS para selecionar os principais picos cromatográficos que possuam informações discriminatórias entre as amostras de folhas de cana-de-açúcar das variedades “Bowman-Birk” e “Kunitz”, como anteriormente discutido no item 2.1.6.

Para a matriz de classificação, atribuiu-se os valores 0 e 1 para as amostras de folhas “Bowman-Birk” e 1 e 0 para as folhas da variedade “Kunitz”. Aleatoriamente, construiu-se o modelo de calibração que consistiu em 70 % das amostras e os outros 30% para teste.

Uma variável latente, explicando 95,4% do bloco Y e 51,0% do bloco X indicou o menor erro médio quadrático de validação cruzada (RMSECV = 0,015) e o maior coeficiente de correlação ($r_{cv} = 0,972$) resultando na seleção de 90 variáveis. Desta forma, a matriz de dados originalmente composta por 3598 variáveis ($X_{36 \times 3598}$) foi reduzida para 90 variáveis ($X_{36 \times 90}$) ou 9 picos cromatográficos, como ilustra a figura 2.12.

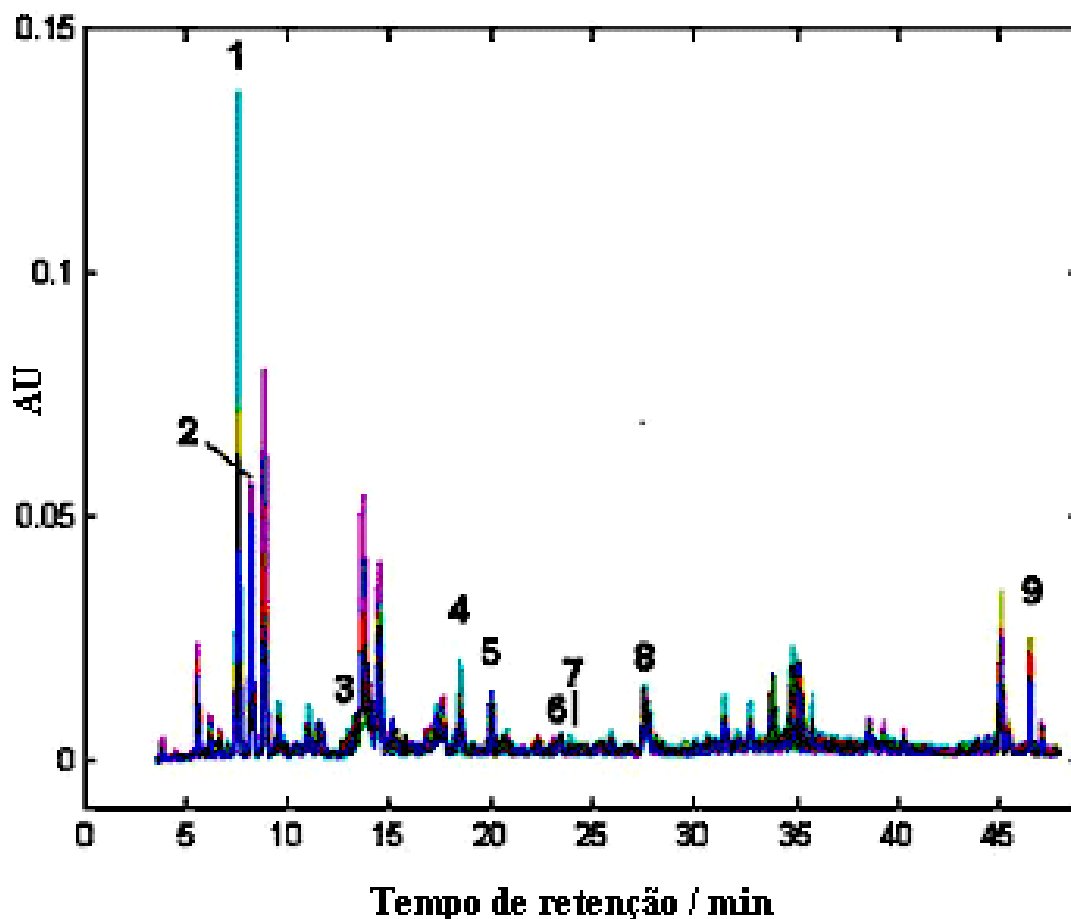


Figura 2.12. Picos selecionados pelo algoritmo OPS para discriminação das amostras de folhas das variedades “Bowman-Birk e “Kunitz”.

Os picos selecionados pelo método OPS possuem os seguintes tempos de retenção: pico 1 = 6,45, pico 2 = 7,50, pico 3 = 13,1, pico 4 = 17,9, pico 5 = 20,1, pico 6 = 23,8 min, pico 7 = 25,9, pico 8 = 28,5, pico 9 = 47,3 min. Consequentemente, apenas os picos cromatográficos indicados foram utilizados para a análise de componentes principais das amostras de folhas de cana-de-açúcar das duas variedades transgênicas que será discutida a seguir.

2.3.1.3. Análise de componentes principais (PCA) para as amostras de folhas das variedades de cana-de-açúcar “Bowman-Birk” e “Kunitz”

A partir da nova matriz de dados $X_{36 \times 90}$, foi realizada a análise de componentes principais. Primeiramente, os dados foram auto-escalados, a fim de evitar que picos majoritários tenham maior representação (peso) que os minoritários, como discutido no item 2.1.5. Este tipo de pré-processamento é aplicado preferencialmente para dados que contenham informações de concentração, como no caso da HPLC.

Com apenas as duas primeiras componentes principais (PC1 e PC2) explicando 64,8% da variância total, obteve-se a discriminação dos extratos de folhas das duas variedades de cana-de-açúcar, como mostra o gráfico da figura 2.13.

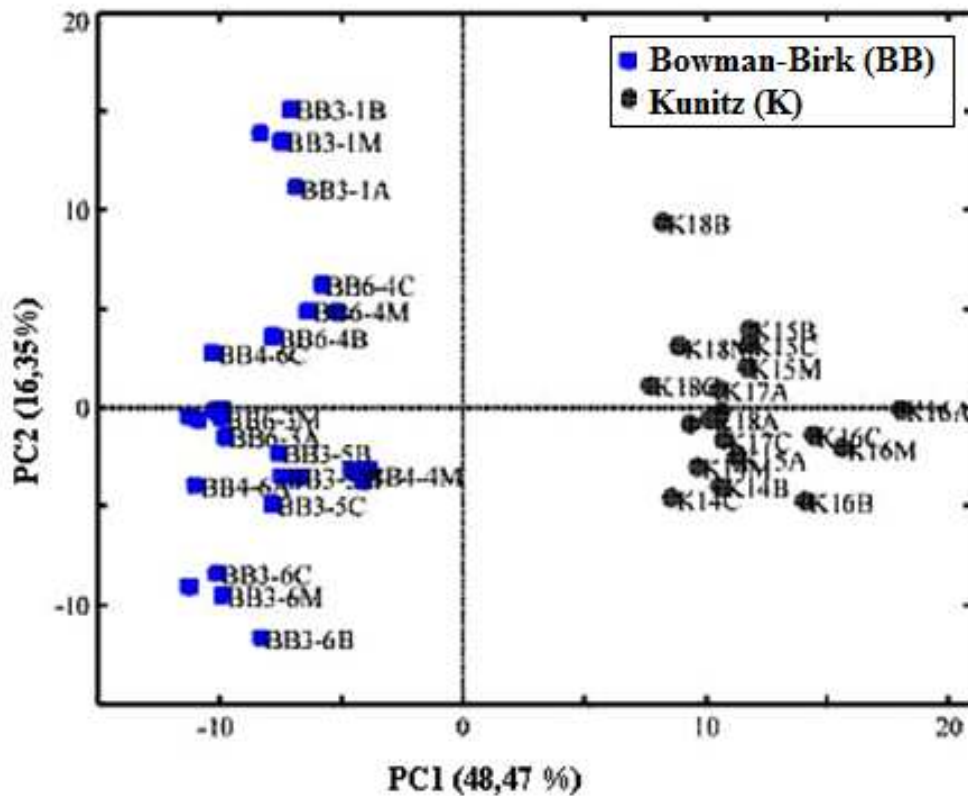


Figura 2.13. Gráfico de escores para as amostras de folhas das variedades de cana-de-açúcar “Bowman-Birk” e “Kunitz”.

No gráfico de escores (Figura 2.13) está representada a distribuição das amostras no novo espaço gerado pelas componentes principais PC1 e PC2. Com a seleção de variáveis, a separação entre os dois grupos foi otimizada e, portanto, apenas na primeira componente principal com 48,5% de variância (PC1), as amostras de folhas da variedade “Bowman-Birk” foram discriminadas das folhas pertencentes à variedade “Kunitz”. Em outras palavras, existe uma forte tendência de separação entre as duas variedades utilizando apenas 9 picos cromatográficos. À direita do gráfico de escores (valores positivos na PC1, Figura 2.13) estão distribuídas as folhas pertencentes à variedade “Kunitz” e à esquerda (valores negativos na PC1) as amostras de folhas “Bowman-Birk”.

Além disso, uma outra informação pode ser obtida pelo gráfico da figura 2.13 em relação aos dois grupos de folhas: há diferenças intra-variedades, pois tanto as folhas da variedade “Bowman-Birk” quanto as folhas da variedade “Kunitz” estão distribuídas ao longo da segunda componente principal (PC2), sendo que esta observação é mais pronunciada para as amostras “Bowman-Birk”. O motivo das diferenças intra-classe ainda é desconhecido, mas provavelmente está associado a própria modificação genética

O gráfico de pesos (Figura 2.14) representa a distribuição das variáveis previamente selecionadas na primeira componente principal (PC1), que é a responsável em apresentar a tendência de separação entre as folhas de cana-de-açúcar “Bowman-Birk” das “Kunitz”.

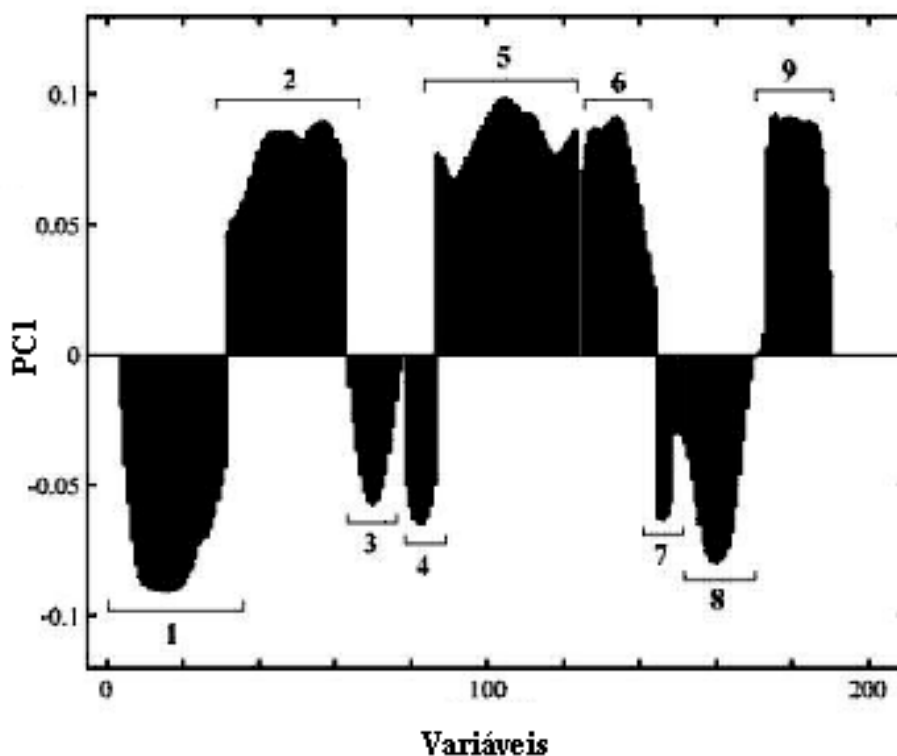


Figura 2.14. Gráfico de pesos para as amostras de folhas das variedades de cana-de-açúcar “Bowman-Birk” (BB) e “Kunitz” (K), picos conforme o cromatograma da figura 2.12: pico 1, $t_r = 6,45$, pico 2, $t_r = 7,50$, pico 3, $t_r = 13,1$, pico 4, $t_r = 17,9$, pico 5, $t_r = 20,1$, pico 6, $t_r = 23,8$ min, pico 7, $t_r = 25,9$, pico 8, $t_r = 28,5$, pico 9, $t_r = 47,3$ min.

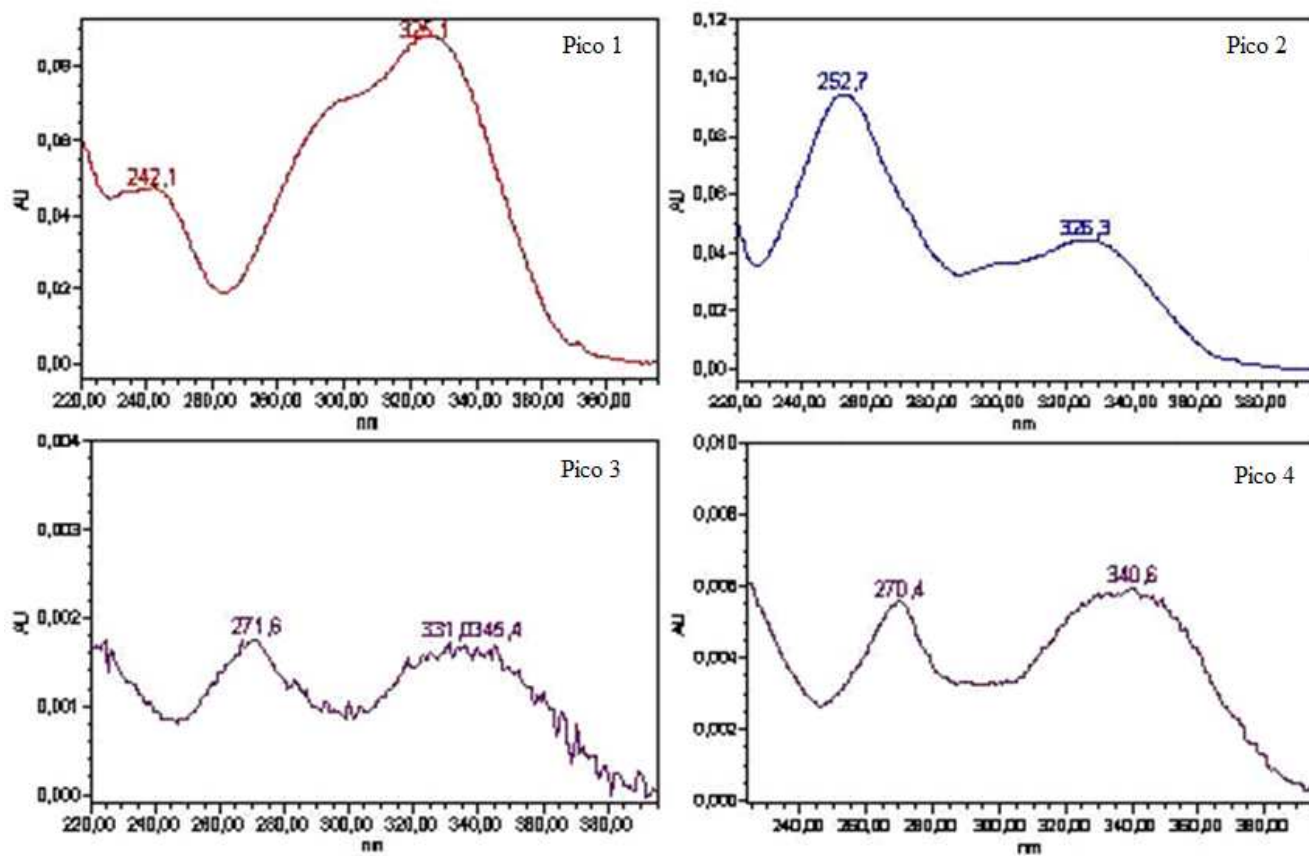
A análise conjunta dos gráficos de escores (Figura 2.13) e de pesos (Figura 2.14) mostra a correlação entre as amostras e os dados químicos (picos cromatográficos). Para os valores negativos da PC1 no gráfico de pesos (Figura 2.14), mesma região onde encontra-se as amostras “Bowman-Birk” no gráfico de escores (Figura 2.13), têm-se os picos cromatográficos 1, 3, 4, 7 e 8, indicando que as mesmas variáveis aparecem em abundância nas amostras de folhas da variedade “Bowman-Birk” quando comparadas com as folhas da variedade “Kunitz”. Por outro lado, para valores positivos na PC1 do gráfico de pesos (Figura 2.14), região na qual as amostras de folhas “Kunitz” estão distribuídas no gráfico de escores (Figura 2.13), os picos cromatográficos 2, 5, 6 e 9 discrimina as folhas de cana-de-açúcar da variedade “Kunitz” das “Bowman-Birk”. Os dados presentes na Tabela 2.2 reforçam o resultado apresentado pela PCA.

Tabela 2.2. Área dos picos cromatográficos responsáveis pela discriminação das folhas das variedades de cana-de-açúcar “Bowman-Birk” e “Kunitz”

Identificação do pico	Folha Bowman-Birk	Folha Kunitz
	<i>Área*</i>	<i>Área*</i>
1	699235	379666
2	376182	394608
3	52633	14954
4	63489	56486
5	26438	207195
6	24933	68583
7	35256	3554
8	204623	146641
9	17178	128220

* Cálculo da área para triplicata de uma amostra representativa BB e outra K;

A análise dos espectros de UV-PDA, figura 2.15, sugere que as diferenças entre as duas variedades de folhas está relacionada com a abundância dos picos cromatográficos, apresentados pela tabela 2.2. A interpretação dos dados espectrais das substâncias correspondentes aos 9 picos selecionados é discutida no capítulo 3.



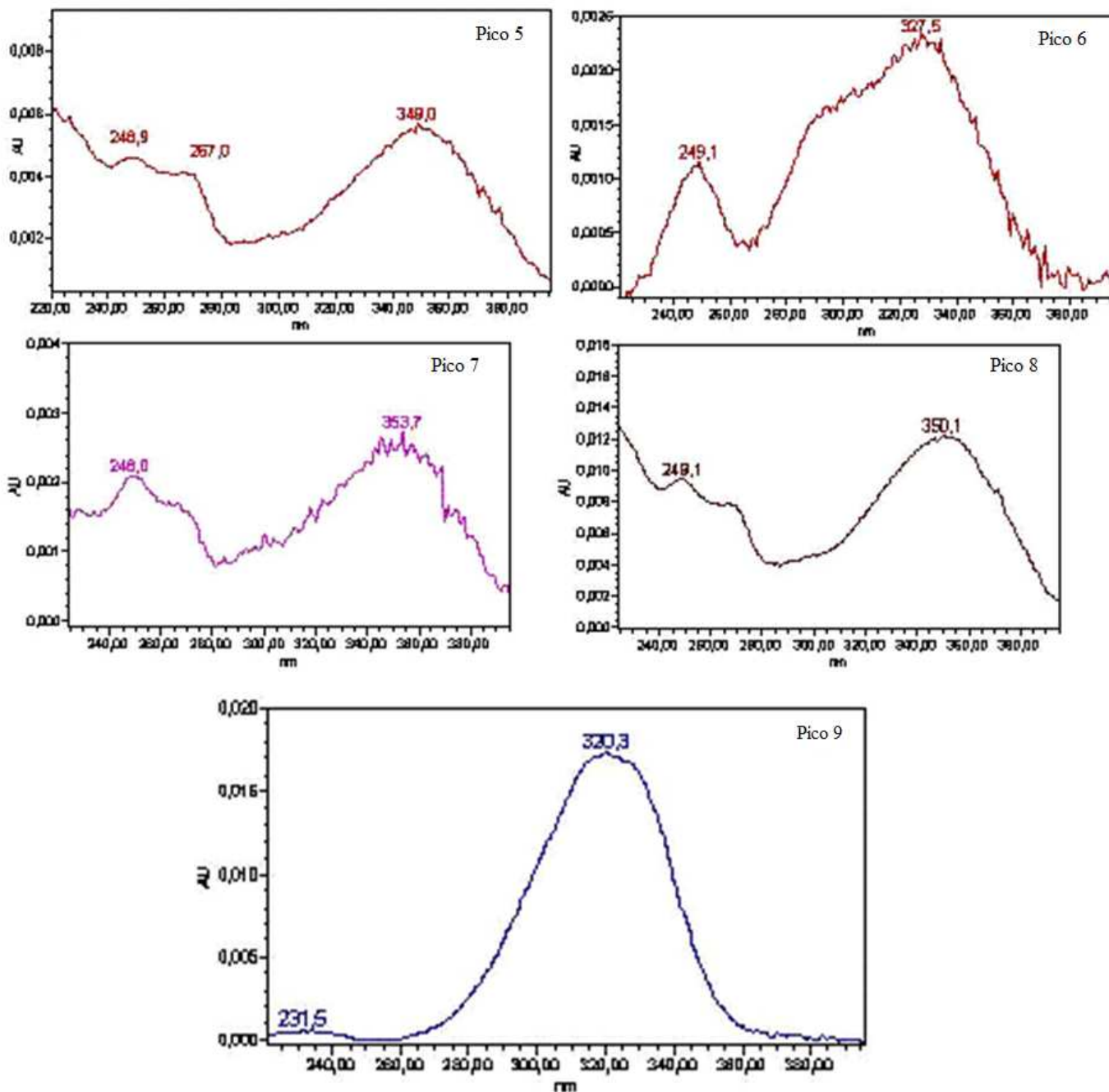


Figura 2.15. Espectros de UV-PDA dos 9 picos cromatográficos, conforme cromatograma da figura 2.12, selecionados pelo algoritmo OPS para as amostras das duas variedades de folhas de cana-de-açúcar: pico 1, tr = 6,45, pico 2, tr = 7,50, pico 3, tr = 13,1, pico 4, tr = 17,9, pico 5, tr = 20,1, pico 6, tr = 23,8 min, pico 7, tr = 25,9, pico 8, tr = 28,5, pico 9, tr = 47,3 min.

2.3.2. Análise quimiométrica dos perfis cromatográficos para as amostras de garapa das variedades “Kunitz” e “Bowman-Birk”

2.3.2.1. Transformação dos dados originais das amostras de garapa

Os cromatogramas das amostras de garapa das duas variedades de cana-de-açúcar apresentaram uma maior complexidade em termos de constituintes químicos e de variações na linha de base do que os respectivos cromatogramas das amostras de folhas. As técnicas de transformação de dados discutidas nos itens 2.1.1-2.1.3 foram utilizadas (alisamento, normalização e alinhamento). O tamanho da janela selecionado foi de 10, a norma-1 foi a função para a normalização. Em seguida, foi utilizada a análise de agrupamentos (HCA) a fim de selecionar o cromatograma referência (modelo) para posterior alinhamento dos cromatogramas utilizando a técnica COW (Correlation optimized Warping). O cálculo da distância e o tipo de conexão utilizados foram a distância euclidiana e conexão pelo vizinho mais próximo, como descrito no item 2.1.4.

O dendograma da figura 2.16 apresenta os agrupamentos formados com as amostras de garapa das duas variedades transgênicas da cana-de-açúcar. Selecionou-se um dos cromatogramas com distância máxima de aproximadamente 0,115: observa-se através da figura 2.16, que a esta distância há um agrupamento constituído de amostras de garapa de ambas as variedades (“Bowman-Birk” e “Kunitz”). Do mesmo modo que para a seleção do cromatograma modelo das amostras de folhas, foi adotado o critério do cromatograma com a maior composição química. Assim, uma das amostras pertencentes à variedade “Kunitz” à distância de 0,115, foi escolhida como amostra de referência.

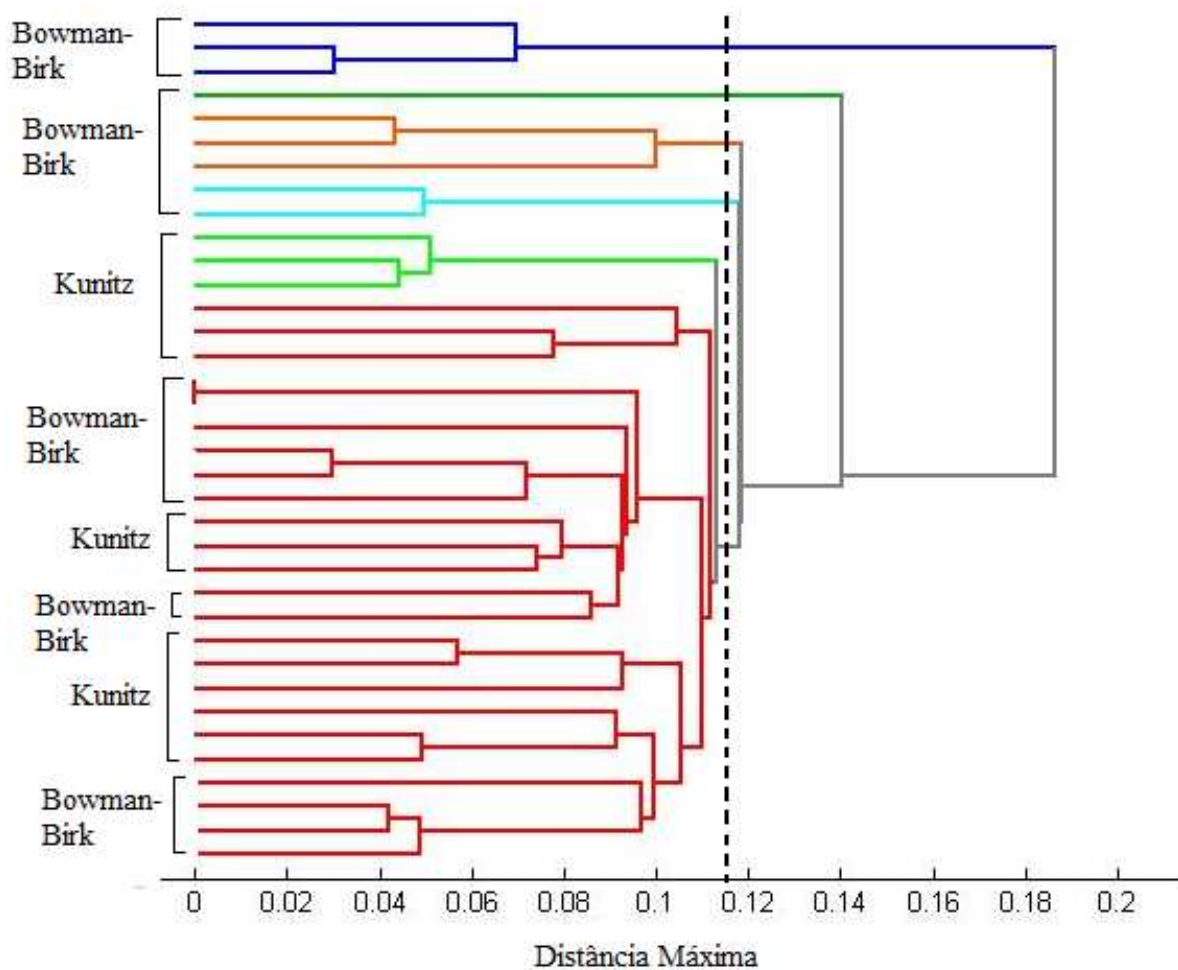


Figura 2.16. Dendrograma das amostras de garapa das duas variedades de cana-de-açúcar (“Bowman-Birk e “Kunitz”).

Todos os cromatogramas foram divididos em 12 partes e cada uma foi ajustada individualmente com diferentes valores de N (número do segmento) e s (ajuste). O resultado final do alinhamento pode ser observado pelas figuras 2.17.

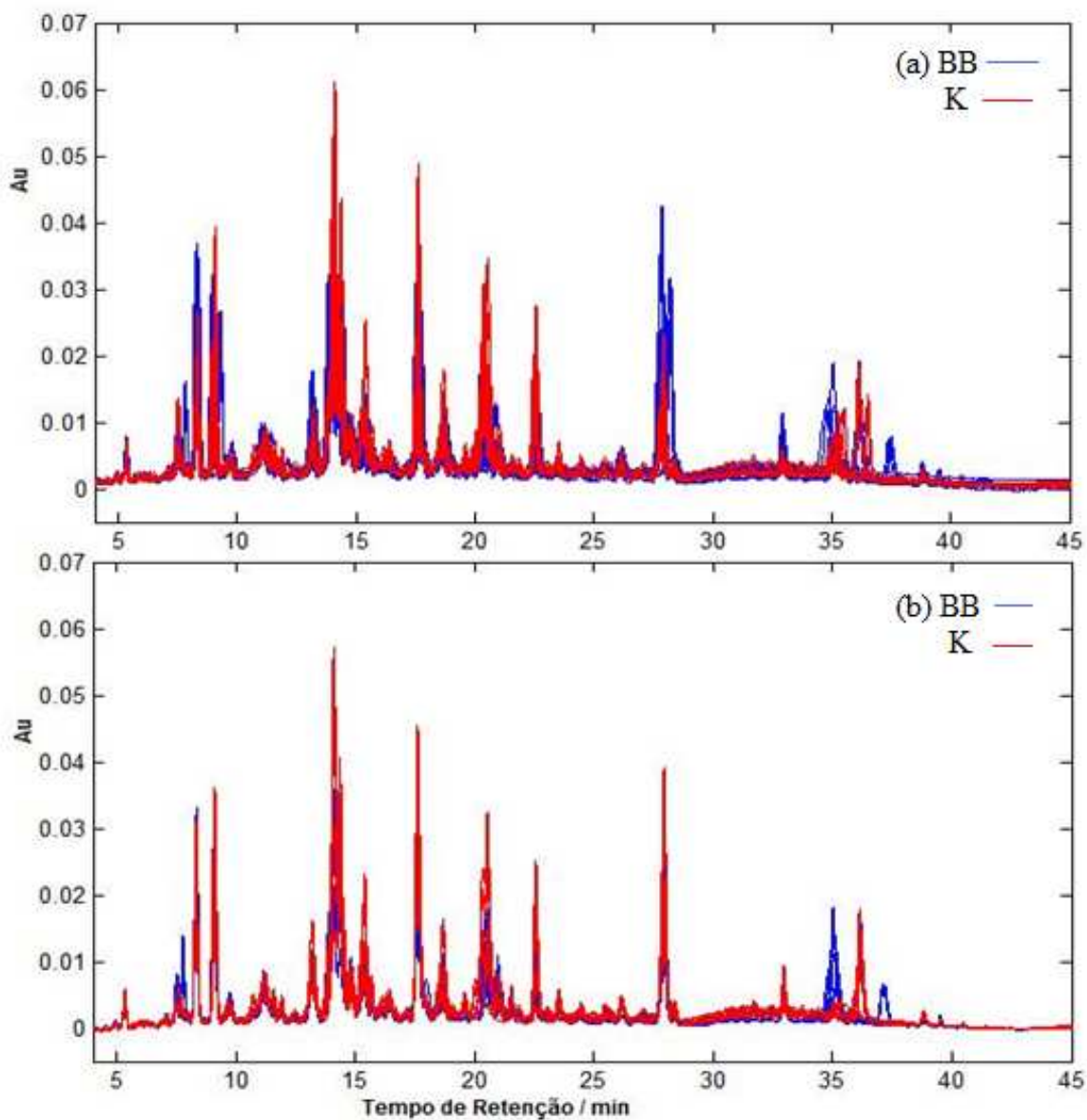


Figura 2.17. Alinhamento COW: (a) cromatogramas desalinhados; (b) cromatogramas alinhados.

Com os cromatogramas das amostras de garapa devidamente alinhados, foi iniciada a seleção de variáveis pelo método OPS (Ordered Predictor Selection) que será discutida a seguir.

2.3.2.2. Seleção de variáveis pelo algoritmo OPS para as amostras de garapa das variedades transgênicas

A matriz de dados transformada (36 x 3598) foi submetida a análise pela técnica OPS para selecionar os principais picos cromatográficos que fornecem informações discriminatórias entre as amostras de garapa da cana-de-açúcar das variedades “Bowman-Birk” e “Kunitz”, como anteriormente discutido no item 2.1.6.

Assim como realizado para as amostras de folhas, construiu-se a matriz de classificação atribuindo-se os valores 0 e 1 para as amostras de garapa “Bowman-Birk” e 1 e 0 para as garapas da variedade “Kunitz”. Aleatoriamente, construiu-se o modelo de calibração que consistiu em 70 % das amostras e os outros 30 % para teste, utilizando validação cruzada.

Uma variável latente, explicando 49,8% do bloco X e 89,7% do bloco Y, indicou o menor erro médio quadrático de validação cruzada ($RMSECV = 0,0158$) e o maior coeficiente de correlação ($r_{cv} = 0,938$), resultando na seleção de 170 variáveis. Desta forma, a matriz de dados originalmente composta por 3598 variáveis ($X_{36 \times 3598}$) foi reduzida para 170 variáveis ($X_{36 \times 170}$) ou 12 picos cromatográficos como ilustra a figura 2.18.

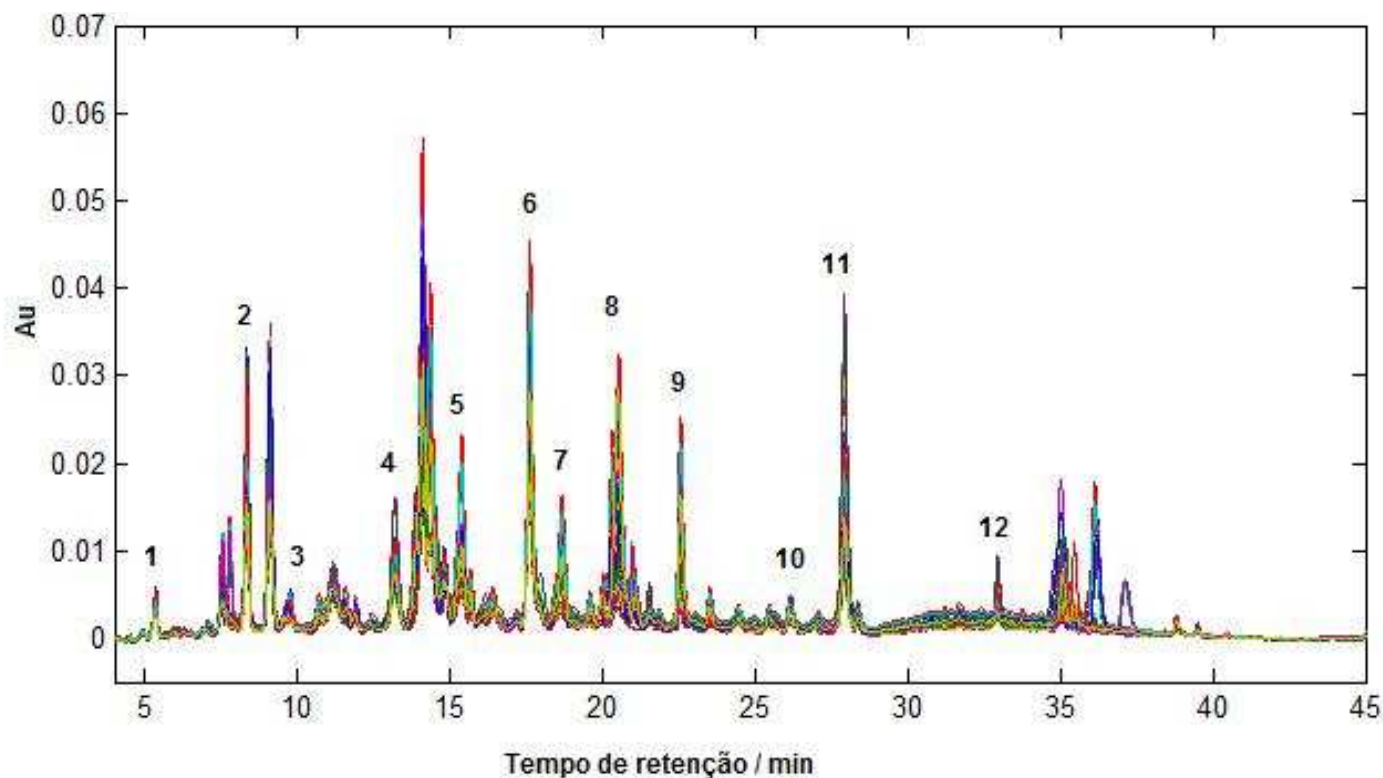


Figura 2.18. Picos selecionados pelo algoritmo OPS para discriminação das amostras de garapa das variedades “Bowman-Birk e “Kunitz”: pico 1, tr = 5,32 , pico 2, tr = 8,2, pico 3, tr = 9,75, pico 4, tr = 13,5, pico 5, tr = 15,4, pico 6, tr = 17,6, pico 7, tr = 18,7, pico 8, tr = 20,5, pico 9, tr = 22,5, pico 10, tr = 26,3, pico 11, tr = 27,9, pico 12, tr = 32,9 minutos.

Desta forma, apenas os picos cromatográficos indicados pela figura 2.18 foram utilizados para a análise de componentes principais das amostras de garapa de cana-de-açúcar das duas variedades transgênicas, que será discutida a seguir.

2.3.2.3. Análise de componentes principais (PCA) para as amostras de garapa das variedades de cana-de-açúcar “Bowman-Birk” e “Kunitz”

A análise de componentes principais (PCA) foi realizada a partir da nova matriz de dados $X_{36 \times 170}$. A matriz de dados foi auto-escalada, a fim de evitar que picos majoritários tenham maior representação (peso) que os minoritários, como discutido no item 2.1.5.

Assim como no caso da análise das folhas, usando apenas as duas primeiras componentes principais (PC1 e PC2) explicando 62,6% da variância total, obteve-se a discriminação dos extratos de garapa das duas variedades de cana-de-açúcar, como apresenta o gráfico da figura 2.19.

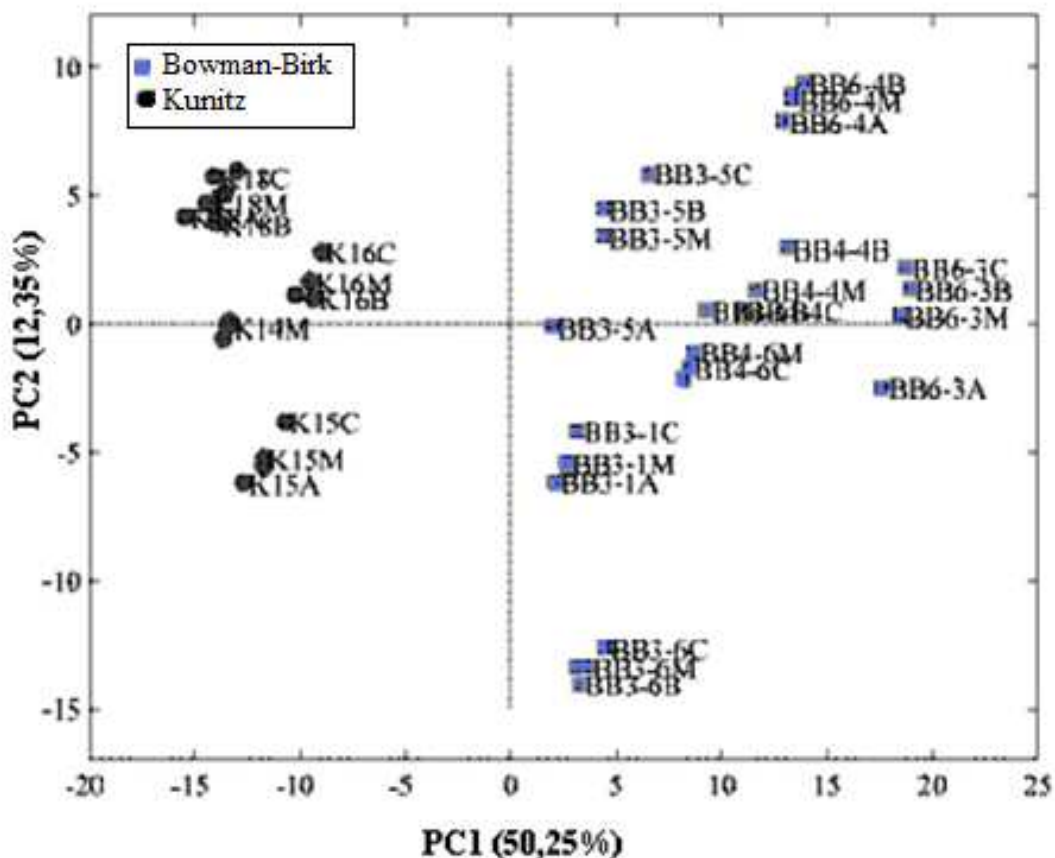


Figura 2.19. Gráfico de escores para as amostras de garapa das variedades de cana-de-açúcar “Bowman-Birk” (BB) e “Kunitz” (K).

Em valores negativos da primeira componente principal (PC1) encontram-se as amostras de garapa pertencentes à variedade “Kunitz”, e para valores positivos da PC1 encontram-se as amostras “Bowman-Birk”. Além do mais, observa-se, bem mais pronunciadamente que para o conjunto de dados das folhas, separação intra-variedades. e pode-se concluir que apesar das amostras pertencerem a mesma variedade existe uma diferença muito provavelmente ocasionada pelo posicionamento e expressão dos genes

inibidores de proteinase (“Bowman-Birk” e “Kunitz”) em diferentes partes do DNA da planta, provocando uma alteração no fenótipo.

Correlacionando as informações contidas na figura 2.19 com o gráfico de pesos da PC1 apresentado na figura 2.20, foi possível classificar os picos presentes em maior abundância nas amostras de garapa “Bowman-Birk” e “Kunitz”. Para valores positivos na PC1, observa-se os picos mais abundantes nas amostras de garapa da variedade “Bowman-Birk” (picos 1, 2, 3, 4, 6, 10, 11, 12), enquanto que os pesos de valores negativos caracterizam as amostras de garapa “Kunitz” (picos 5, 7, 8 e 9).

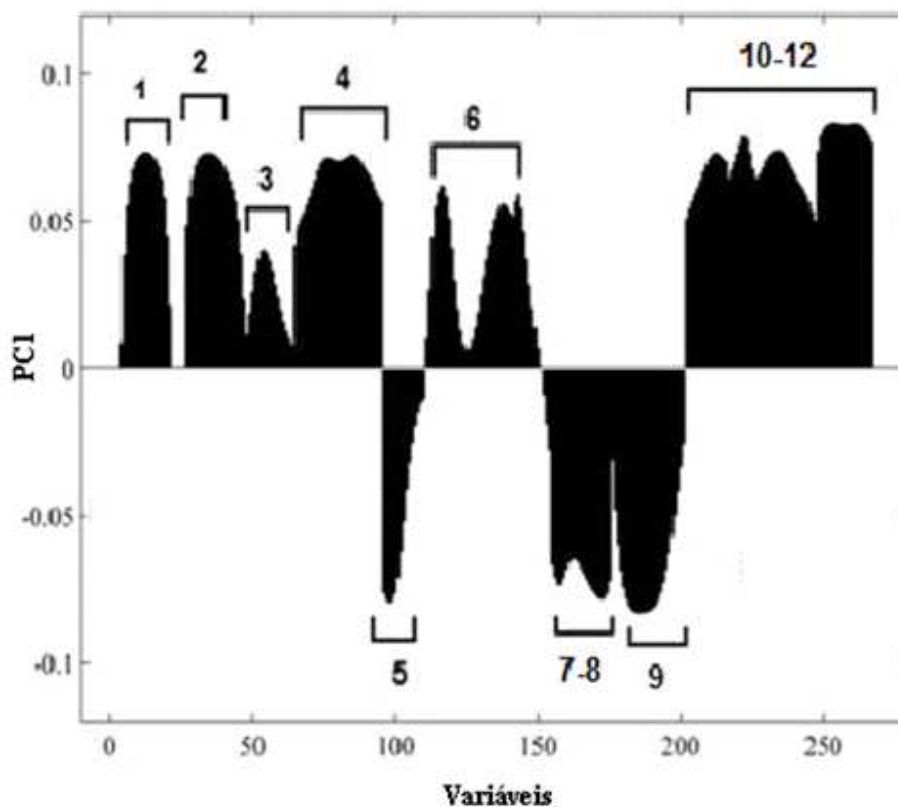


Figura 2.20. Gráfico de pesos para a primeira componente principal (PC1) das amostras de garapa das duas variedades transgênicas “Bowman-Birk” e “Kunitz”, picos conforme o cromatograma da figura 2.18: pico 1, tr = 5,32 , pico 2, tr = 8,2, pico 3, tr = 9,75, pico 4, tr = 13,5, pico 5, tr = 15,4, pico 6, tr = 17,6, pico 7, tr = 18,7, pico 8, tr = 20,5, pico 9, tr = 22,5, pico 10, tr = 26,3, pico 11, tr = 27,9, pico 12, tr = 32,9 minutos.

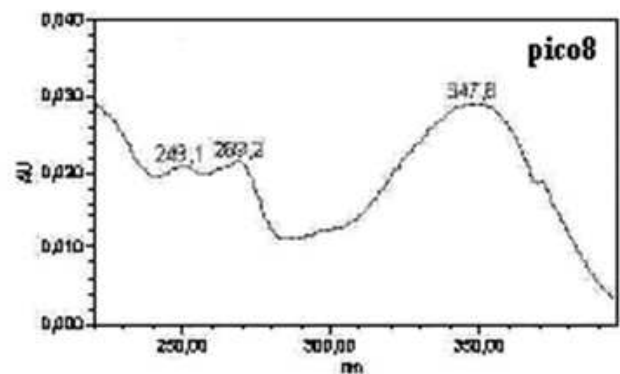
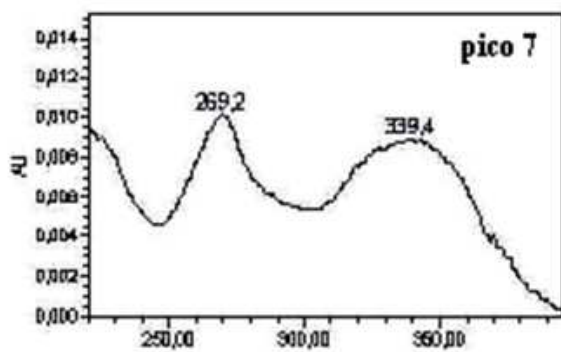
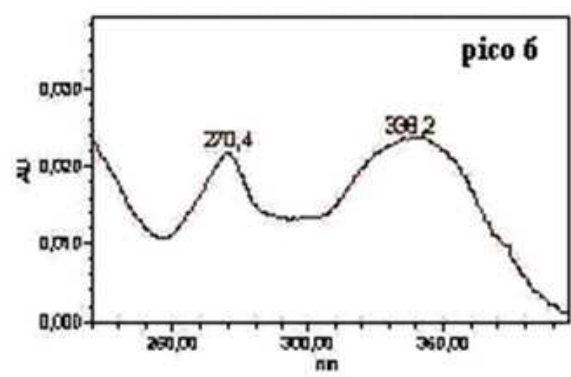
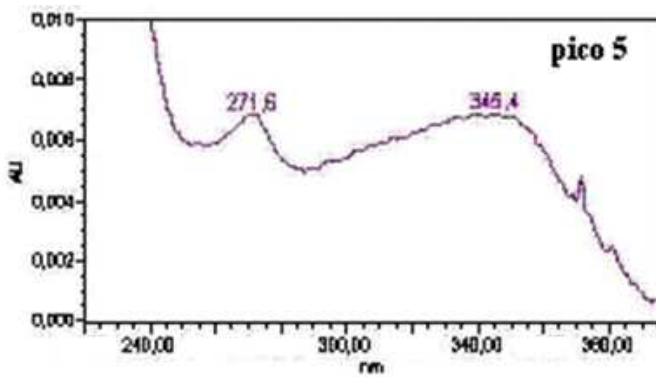
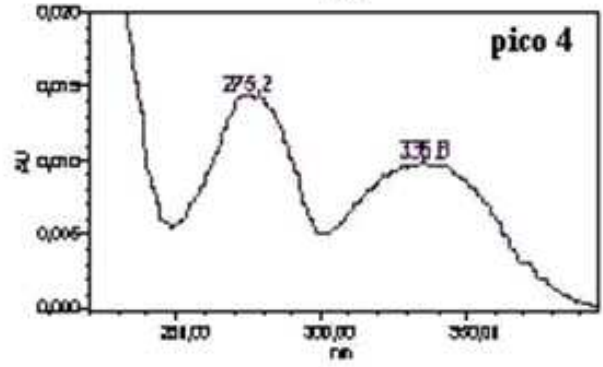
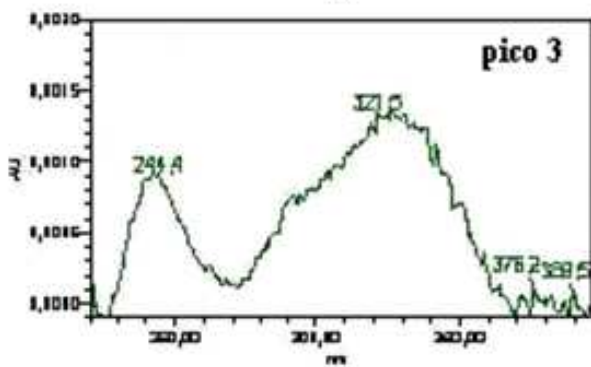
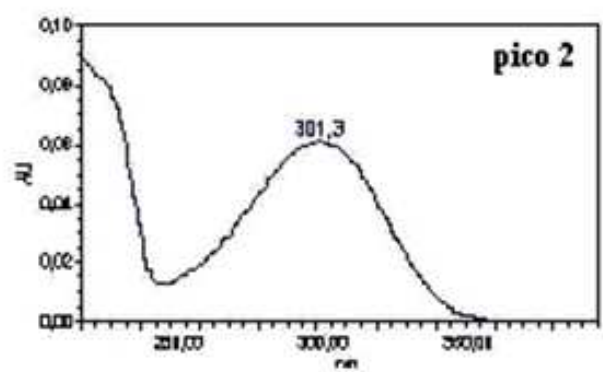
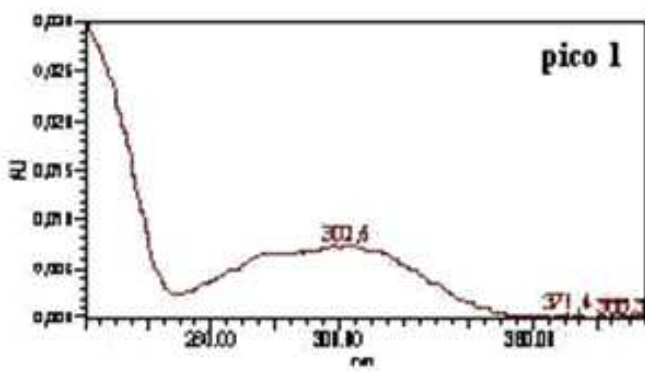
A tabela 2.3 apresenta informações sobre a abundância dos 12 picos selecionados para distinção de garapa obtida da variedade “Bowman-Birk” da “Kunitz”. A análise dos espectros de UV-PDA, figura 2.21, sugere que as diferenças entre as duas variedades de garapa também está relacionada com a abundância dos picos cromatográficos, apresentados pela tabela 2.3. No capítulo 3 será discutida a identificação das substâncias correspondentes aos 12 picos responsáveis pela discriminação entre as variedades de cana-de-açúcar.

Tabela 2.3. Área dos picos cromatográficos responsáveis pela discriminação das amostras de garapas das variedades de cana-de-açúcar “Bowman-Birk” e “Kunitz”

Identificação do pico	Garapa Bowman-Birk	Garapa Kunitz
	<i>Área*</i>	<i>Área*</i>
1	40110	30594
2	500442	110512
3	50388	42306
4	194472	50707
5	50322	117957
6	402737	397854
7	102400	135126
8	160359	344242
9	64822	114901
10	20537	10620
11	615675	72432
12	74442	13430

* Cálculo da área para triplicata de uma amostra representativa BB e outra K;

* % do desvio padrão > 1,00 %



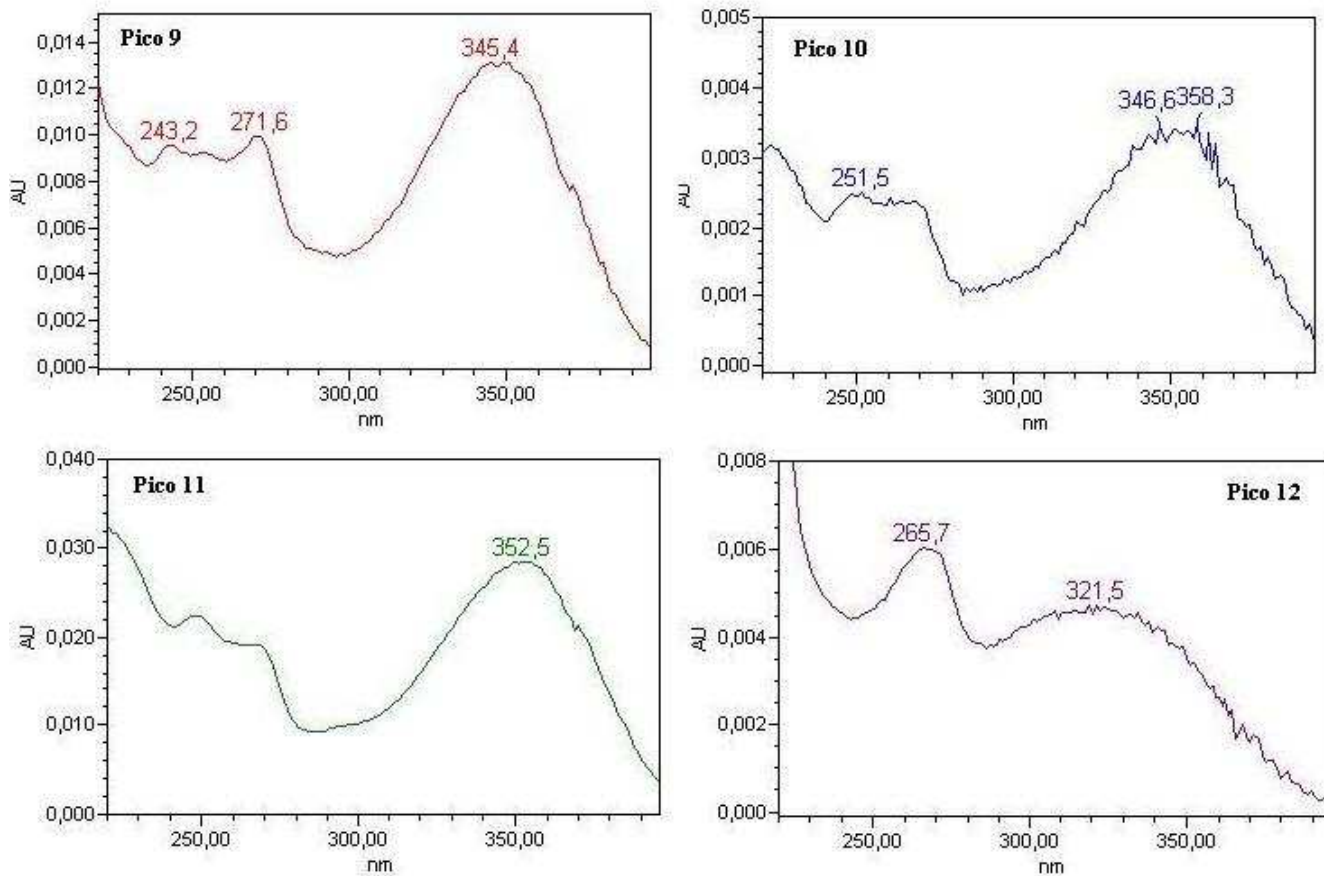


Figura 2.21. Espectros de UV-PDA dos 12 picos cromatográficos, conforme figura 2.18, selecionados pelo algoritmo OPS para as amostras das duas variedades de garapa de cana-de-açúcar: pico 1, $t_r = 5,32$, pico 2, $t_r = 8,2$, pico 3, $t_r = 9,75$, pico 4, $t_r = 13,5$, pico 5, $t_r = 15,4$, pico 6, $t_r = 17,6$, pico 7, $t_r = 18,7$, pico 8, $t_r = 20,5$, pico 9, $t_r = 22,5$, pico 10, $t_r = 26,3$, pico 11, $t_r = 27,9$, pico 12, $t_r = 32,9$ minutos.

2.4. Conclusões Parciais

A aplicação de técnicas quimiométricas com finalidade de redução de variáveis e discriminação das variedades transgênicas na análise de perfis cromatográficos foi essencial para identificar e/ou reconhecer padrões ou regiões nos cromatogramas que realmente apresentam diferenças. A técnica de seleção de variáveis usada neste trabalho (método OPS) aperfeiçoou a tendência na separação das duas variedades transgênicas da cana-de-açúcar, facilitando a interpretação da relação entre o modelo e a composição das amostras estudadas. No caso de conjuntos de dados compostos por muitas variáveis, como por exemplo, no caso de cromatografia, espectrometria de massas, infravermelho, ressonância magnética nuclear, entre outras, a seleção de variáveis facilita muito na interpretação do modelo de classificação.

As amostras de folhas das duas variedades transgênicas foram discriminadas com apenas 9 picos, enquanto que para as amostras de garapas foram necessários 12 picos cromatográficos. Além disso, pela análise de componentes principais, pode ser observado que as plantas estudadas apresentam diferenças intra-variedades, causadas possivelmente pela manipulação genética, uma vez que todas as plantas foram tratadas em condições controladas de temperatura, nutrientes e umidade.

Por fim, com a análise dos espectros de UV-PDA, pode-se perceber que as diferenças das cana-de-açúcar “Bowman-Birk” e “Kunitz” nos dois tipos de matrizes estudadas (folhas e garapa) está associada com a abundância e não com a ausência e/ou presença de substâncias. Isto significa que a quantidade (concentração) das substâncias presentes em cada perfil cromatográfico é o fator de classificação das amostras, evidenciando alteração na rota biosintética de fenilpropanóides e por consequência flavonóides.

2.5. Referências Bibliográficas

[1] VANDEGINSTE, B. G. M.; Chemometrics – general introduction and historical development. **Topics in Current Chemistry**, v. 141, p.1-42, 1987.

[2] ETIÉVANT, P.; SCHILICH, P.. Varietal and geographic classification of french red wines in terms of major acids. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.46, p.421-438, 1989.

[3] HÉBERBER, K.; CSOMÓS, E.; SIMON-SARKADI, L. Principal component and linear discriminant analyses of free amino acids and biogenic amines in Hungarian wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p. 8085-8060, 2003.

[4] HERNANDEZ-ORTE, P.; CACHO, J.F. Relationship between varietal amino acid profile of grapes and wine aromatic composition. Experiments with model solutions and chemometric study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 2891-2899, 2002.

[5] LIU, X.; ESPEN, P.V.; ADAMS, F. Classification of Chinese tea samples according to origin and quality by principal component techniques. **Analytica. Chimica Acta**, v. 200, p. 421-430, 1987.

[6] SAXBERG, B.E.H.; DUEWER, D.L.; BOOKER, J.L.; KOWALSKI, B.R. Pattern recognition and blind assay techniques applied to forensic separation of whiskies. **Analytica Chimica Acta**, v. 103, p. 201-212, 1978.

[7] MARSHALL, R.J.; TUNER, R.; Yu, H.; COOPER, E.H. Cluster analysis of chromatographic profiles of urine proteins. **Journal of Chromatography**, v. 297, p. 235–244, 1984.

-
- [8] CADET, F.; BERTRAND, D.; ROBERT, P.; MAILLOT, J.; DIEUDONNE, J.; ROUCH, C. Quantitative determination of sugar cane sucrose by multidimensional statistical analysis of their mid-infrared attenuated total reflectance spectra. **Applied Spectroscopy**, v. 45, p. 166-170, 1990.
- [9] LINDBERG, W.; OEHMAN, J.; WOLD, S.; MARTENS, H. Determination of the proteins in mixtures of meat, soymeal and rind from their chromatographic amino-acid pattern by the partial least-squares method. **Analytica Chimica Acta**, v. 171, p. 1-11, 1985.
- [10] DOWNEY, G.; ROBERT, P.; BERTRAND, D.; KELLY, P.M. Classification of commercial skim milk powders according to heat treatment using factorial discriminant analysis of near-infrared reflectance spectra. **Applied Spectroscopy**, v. 44, p. 150-155, 1990.
- [11] KWAN, W.O.; KOWALSKI, B.R. Classification of wines by applying pattern recognition to chemical composition data. **Journal of Food Science**, v. 43, p. 1320-1323, 1978.
- [12] BRUNS, R.E.; FAIGLE, J.F.G. Quimiometria. **Química Nova**, v.8, p.84-99, 1985.
- [13] BEEBE, K.R.; PELL, R.J.; SEASHOLTZ, M.B. In **Chemometrics a practical guide**, New York, John-Wiley & Sons, Inc, 1998, 56 p.
- [14] GAN, F.; YE, R. New approach on similarity analysis of chromatographic fingerprint of herbal medicine. **Journal of Chromatography A**, v. 1104, p. 100-115, 2006.
- [15] PURCELL, D.E.; LEONARD, G.J.; O'SHEA, M.G.; KOKOT, S. A chemometrics investigation of sugarcane plant properties based on the molecular composition of epicuticular wax. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 76, p. 135-147, 2005.

-
- [16] XIE, L.; YING, Y.; YING, T.; YU, H.; FU, X. Discrimination of transgenic tomatoes based on visible/near infrared spectra. **Analytica Chimica Acta**, v. 584, p.379-384, 2007.
- [17] MISPELAAR, V.G.; JANSSEN, H.G.; TAS, A.C.; SCHOENMARKERS, P.J. Novel system for classifying chromatographic applications exemplified by comprehensive two-dimensional gas chromatography and multivariate analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1071, p. 229-237, 2005.
- [18] WILSON, I.D.; PLUMB, R.; GRANGER, J.; MAJOR, H.; WILLIAMS, R.; LENZ, E.M. HPLC-MS-based methods for the study of metabonomics. **Journal of Chromatography B**, v.817, p. 67-76, 2005.
- [19] JOHANSSON, E.; WOLD, S.; SJODIN, K.; Minimizing Effects of Closure on Analytical Data. **Analytical Chemistry**, v. 56, p. 1685-1688, 1984.
- [20] WANG, Y. and KOWALSKI, B.R.; Multivariate instrument standardization. **Analytical Chemistry**, v.63, p.2750-2756, 1991.
- [21] DASZYKOWSKI, M.; WALCZAK, B. Use and abuse of chemometrics in chromatography. **Trends in Analytical Chemistry**, v.25, p.1081-1096, 2006.
- [22] MALMQUIST, G.; DANIELSSON, R. Alignment of chromatographic profiles for principal component analysis: a prerequisite for fingerprinting methods. **Journal of Chromatography A**, v.687, p.71-88, 1994.
- [23] TOMASI, G.; VAN DEN BERG, F.; ANDERSSON, C. Correlation optimized warping and dynamic time warping as preprocessing methods for chromatographic data. **Journal of Chemometrics**, v. 18, p.231-241, 2004.

-
- [24] NIELSEN, N.P.V.; CARSTENSEN, J.; SMEDSGAARD, J. Alignment of single and multiple wavelength chromatographic profiles for chemometric data analysis using correlation optimized warping. **Journal of Chromatography A**, v.805, p.17-35, 1998.
- [25] ANDERSSON, F.O.; KAISER, R.; JACOBSSON, S.P. Data preprocessing by wavelets and genetic algorithms for enhanced multivariate analysis of LC peptide mapping. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 34, p. 531-541, 2004.
- [26] VAN NEDERKASSEL, A.M.; DASZYKOWSKI, M.; EILERS, P.H.C.; VANDER HEYDEN, Y. **Journal of Chromatography A**, v.1118, p.199-210, 2006.
- [27] WALCZAK, B.; WU, W. Fuzzy warping of chromatograms. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 77, p. 173-180, 2005.
- [28] SKOV, T.; VAN DEN BERG, F.; BRO, R. Automated alignment of chromatographic data. **Analytica Chimica Acta**, v. 456, p.77-92, 2002.
- [29] BYLUND, D.; DANIELSSON, R.; MALQUIST, G.; MARKIDES, K.E. Chromatographic alignment warping and dynamic programming as a pre-processing tool for PARAFAC modeling of liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.961, p.237-244, 2002.
- [30] PRADOVA, V.; WALCZAK, B.; MASSART, D.L. A comparison of two algorithms for warping of analytical signals. **Analytica Chimica Acta**, v. 456, p. 77-92, 2002.
- [31] SAVITZKY, A.; GOLAY, M.J.E. Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures. **Analytical Chemistry**, v.36, p.1627-1639,1964.

-
- [32] GORRY, P.A.; General Least-Squares Smoothing and Differentiation by the Convolution (Savitzky-Golay) Method. **Analytical Chemistry**, v. 62, p.570-573, 1990.
- [33] “Pirouette”, InfoMetrix, Inc., versão 2.02, Woodinville, Washington, 1990-1996.
- [34] BRATCHELL, N. Cluster Analysis. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v.6, p.105-125, 1989.
- [35] WOLD, S. Principal Component Analysis., **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v.2, p.37-52, 1987.
- [36] HENRISON, R. N-way principal component analysis – Theory, algorithms and Applications. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v.25, p.1-23, 1994.
- [37] REIS, M. M.; C. FERREIRA, M.M.C. Separação de espectros simulados e de luminescência total através do método generalizado de anulação do posto (GRAM), **Química Nova**, v. 22, p.11-17, 1999.
- [38] GELADI, P.; KOWALSKI, B.R. Partial Least-Squares regression: a tutorial, **Analytica Chimica Acta**, v.185, p. 1-17, 1986.
- [39] MIYASHITA, Y.; ITOZAWA, T.; KATSUMI, H.; SAASAKI, S. Short Communication Comments on the Nipals Algorithm. **Journal of Chemometrics**, v. 4, p. 97-100, 1990.
- [40] WANG, Y.; KOWASKI, B.R. Multivariate instrument standardization. **Analytical Chemistry**, v. 63, p.: 2750-2756, 1991.

[41] VAN DER MAATEN, L.J.P.; POSTMA, E.O.; VAN DEN HERIK, H.J.

Dimensionality reduction: a comparative review.

[42] TEÓFILO, R. F.; MARTINS, J. P. A.; FERREIRA, M. M. C., Ordered predictors selection: an intuitive method to find the most relevant variables in multivariate calibration, **10th International Conference on Chemometrics in Analytical Chemistry**, Águas de Lindóia, Brasil, P066 (2006).

[43] LIRA, T.O.; RIBEIRO, J., COLOMBO, R.; FERREIRA, M.M.C.; YARIWAKE, J.H. Chemometrics treatment of two varieties of transgenic sugarcane leaves by HPLC fingerprinting, **1st Brazilian Conference on Natural Products**, São Pedro, Brasil, BOSC-1 (2007).

[44] MELLINGER, M. Multivariate data analysis: its methods. **Chemometrics and intelligent laboratory systems**, v. 2, p. 29-36, 1987.

[45] COLOMBO, Renata. Extração e análise cromatográfica (CLAE/EM) dos flavonóides da cana-de-açúcar. São Carlos, 2003. **Tese/doutorado** – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo.

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

[47] MABRY, T.J; MARKHAN, K.R.; THOMAS, M.B. **The Systematic Identification of Flavonoids**. New York, Ed. Springer-Verlag, 1970. p.3-35.

Capítulo 3

Capítulo 3. Caracterização das substâncias referentes aos picos cromatográficos selecionados pela análise quimiométrica das duas variedades transgênicas de cana-de-açúcar (“Bowman-Birk” e “Kunitz”) por HPLC-MS

3.1. Introdução

O capítulo 3 aborda a identificação parcial das substâncias correspondentes aos picos selecionados pelo método OPS, descrito no capítulo 2, através de análise de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (HPLC-MS). O desenvolvimento técnico no acoplamento entre cromatografia e espectrometria de massas tornou possível a separação e identificação simultânea de muitas classes de substâncias de diferentes polaridades em misturas complexas nos extratos de plantas [1]. As técnicas de ionização branda, FAB (Fast Atom Bombardment), APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionization) e ESI (Electrospray Ionization), por exemplo, produzem íons quasi-molecular $[M-H]^-$ ou $[M+H]^+$, nos modos negativo ou positivo, respectivamente. Aplicações da MS (Mass Spectrometry) tem aumentado com o desenvolvimento de técnicas de ionização branda (soft ionization), especificamente para substâncias pertencentes à classe dos polifenóis como, por exemplo, flavonóides glicosilados, pois com esta técnica informações sobre a presença de substituintes como açúcares e grupos acila podem ser obtidas [2].

Para caracterização estrutural, análises de HPLC-MS/MS e/ou MS/MS fornecem informações adicionais à massa molecular e por isso estas técnicas são frequentemente empregadas para identificar substâncias já descritas na literatura, minimizando o tempo de análise em comparação com os métodos clássicos de isolamento e caracterização [3]. Utilizando apenas análises por HPLC-MS/MS, obtêm-se as seguintes informações em relação aos flavonóides glicosilados [4]:

-
- 1) Massa molecular;
 - 2) Estrutura da aglicona;
 - 3) Informação sobre acilações dos grupos hidroxila dos açúcares, possíveis metilações e sulfonação da aglicona hidroxilada;
 - 4) Número de unidades de açúcares presentes e em alguns casos a localização das ligações glicosídicas;

Empregando a espectrometria de massas, é possível determinar o número e o tipo de monossacarídeos ligados a aglicona. Desta forma, os flavonóides mono, di, tri ou poliglicosilado podem ser identificados (pentose, hexose e/ou deoxihexose), bem como o tipo de ligação do glicosídeo com a aglicona (*O*-, *C*-, ou *N*-glicosídica) [5-6].

Através da análise das vias de fragmentação, tanto para análises realizadas no modo positivo quanto no modo negativo, é possível facilmente identificar ligações *O*-glicosídicas ou *C*-glicosídicas. No caso de flavonóides *O*-glicosilados, a via de fragmentação inicia-se com a quebra das ligações glicosídicas e posterior eliminação das unidades de açúcares, com retenção da carga na aglicona ou nos fragmentos de açúcares. Por outro lado, no caso dos flavonóides *C*-glicosilados, a fragmentação ocorre nas unidades de açúcar e não é observado o íon referente a aglicona protonada [1, 7].

A via de fragmentação dos flavonóides, em geral, difere nos modos positivos e negativos. Espectros obtidos no modo negativo fornecem maior sensibilidade resultando em um número menor de fragmentação que no modo positivo [1]. Além disso, fragmentações do anel C dos flavonóides através de mecanismo retro-Diels Alder, providencia informações sobre o número e o tipo de substituintes. Também é muito comum observar perda de metila (-15 Da), CO (-28 Da), CO₂ (-34 Da), C₂H₂O (-42 Da) no modo negativo. Por outro lado, a clivagem de substituintes prenilados não é observada no modo negativo, dificultando a identificação de flavonóides prenilados. Por esta razão muitos autores preferem realizar as análises de MS/MS nos dois modos, obtendo assim informações complementares para a identificação da substância [8].

A nomenclatura das vias de fragmentação adotada neste capítulo está de acordo com a proposta de Domon e Costello (1988) [9]. Os íons contendo a aglicona são denominados $^{k,l}X_j$, Y_j , Z_j , onde j refere-se ao número da ligação glicosídica quebrada a partir da aglicona, k e l indica a clivagem dentro do anel do carboidrato. Neste sistema adota-se a ligação entre o glicosídeo e a aglicona como sendo a de número zero. O fragmento é designado $^{k,l}A_i$ e B_i , onde i representa o número de ligações glicosídicas quebradas, quando a carga fica retida no carboidrato, como indicado na figura 3.1.

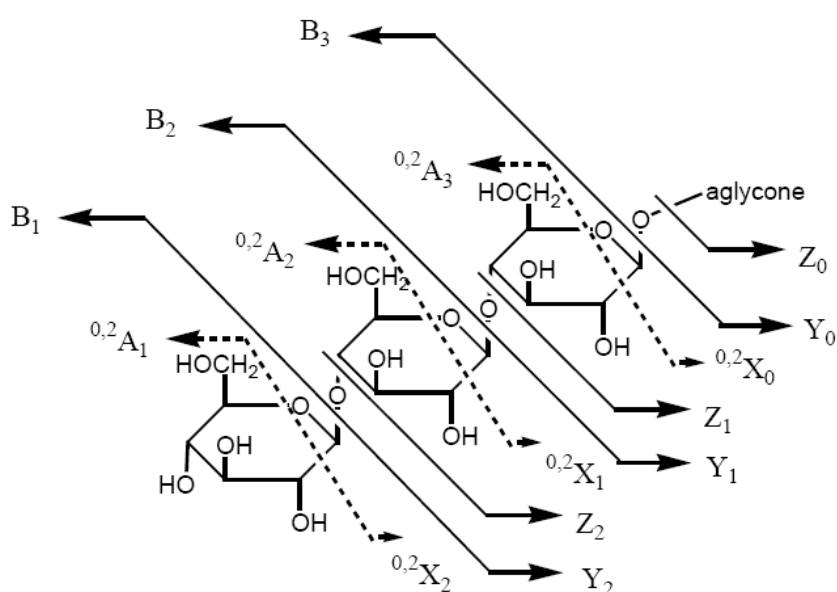


Figura 3.1. Nomenclatura de fragmentação proposta por Domon e Costello.

Em trabalho anterior, Colombo e colaboradores (2005), utilizando a técnica de HPLC-MS com interface APCI (modo positivo), constataram a presença de flavonóides *C*- e *O*- glicosilados em extratos de cana-de-açúcar [10-14]. Neste trabalho, os dois modos de ionização (negativo e positivo) foram utilizados para auxiliar na identificação total e/ou parcial das substâncias correspondentes as regiões cromatográficas selecionadas pelo método de seleção de variáveis, descrito no capítulo 2.

3.2. Parte Experimental

3.2.1. Materiais e Reagentes

- ✓ Materiais e vidrarias usuais de laboratório;
- ✓ Solventes: metanol e acetonitrila (grau HPLC- Tedia), ácido fórmico grau p.a (Synth), água purificado por sistema Milli-Q[®] da Millipore;
- ✓ Padrões: ácido 5'- cafeoíla quínico (Sigma), vitexina (Sigma) e 1',5'- dicafeoíla quínico (Sigma).
- ✓ Adsorventes: cartuchos de extração OASIS HLB[®], (Waters);
- ✓ Membranas para filtração em PTFE hidrofóbica, 0.45 µm (Millipore);
- ✓ Coluna cromatográfica SymmetryShield[®] (Waters) RP- 18, dimensões: 250 mm x 4,6 mm x 5µm.
- ✓ Pré-coluna SymmetryShield[®] (Waters) RP- 18, dimensões: 12,5 mm x 4,6 mm x 5µm.

A coleta do material vegetal, o método de extração e as condições cromatográficas de eluição estão descritas nos itens 2.2.2 – 2.2.4 do capítulo 2.

3.2.2. Condições de análise por HPLC-MS/MS

Esta etapa do trabalho foi realizada em parceria com o Service de Pharmacognosie, da Universidade de Liège (Université de Liège - Bélgica) sob supervisão do Professor Dr. Luc Angenot.

A separação cromatográfica foi realizada em um equipamento HPLC – Agilent, nas mesmas condições descritas no capítulo 2, item 2.2.4. Os espectros de massas foram adquiridos em um equipamento triplo quadrupolo - Waters Micromass Quattro Ultima Platinum equipado com interface eletrospray (ESI) com geometria em Z. No modo negativo, o instrumento foi operado com pulverizadores de amostra e referência ambos a 3,2 KV (voltagem do capilar). As temperaturas da fonte e de desolvatação foram de 125°C e 250°C. O fluxo do gás de desolvatação foi de 464 L.h⁻¹ e do gás nebulizador

(nitrogênio) de 23 L.h⁻¹. A energia do cone de amostragem utilizada para aquisição dos íon filhos foi de -15 V. Todos os espectros foram registrados pelo software MassLynx (v.3.5). No modo positivo, a energia do capilar aplicada foi de 3 KV e os parâmetros de temperaturas da fonte e de desolvatação, fluxo do gás de desolvatação e nebulização e a energia de colisão para gerar os íons filhos foram de +15 V.

O cromatograma do íon total (TIC) foi obtido para intervalo de massas de 100 até 800 Da.

3.3. Resultado e Discussão

3.3.1. Análise por HPLC-MS dos padrões de polifenóis

Não foi possível otimizar a energia de colisão devido à pouca disponibilidade de tempo no equipamento de HPLC-MS. Por isso, foi utilizado a energia de colisão padrão de ± 15 V para todas as análises das amostras. Além disso, os espectros de massas dos padrões foram adquiridos apenas no modo negativo.

Os cromatogramas do íon total (TIC) e os cromatogramas do pico base (BPI-peak base íon) foram obtidos para os três padrões analisados (ácido clorogênico, cinarina e vitexina). O BPI representa a maior intensidade de cada varredura proporcionando assim alta sensibilidade, por esta razão é utilizado em análises de quantificação, enquanto que o TIC representa a soma do sinal ruído de cada varredura.

As figuras 3.2 e 3.3 apresentam os cromatogramas e os espectros de massas para o padrão do ácido clorogênico ou ácido 5'-*O*-cafeoilá quínico. Na condição de eluição empregada o ácido clorogênico apresentou tempo de retenção (t_r) de 7,53 minutos.

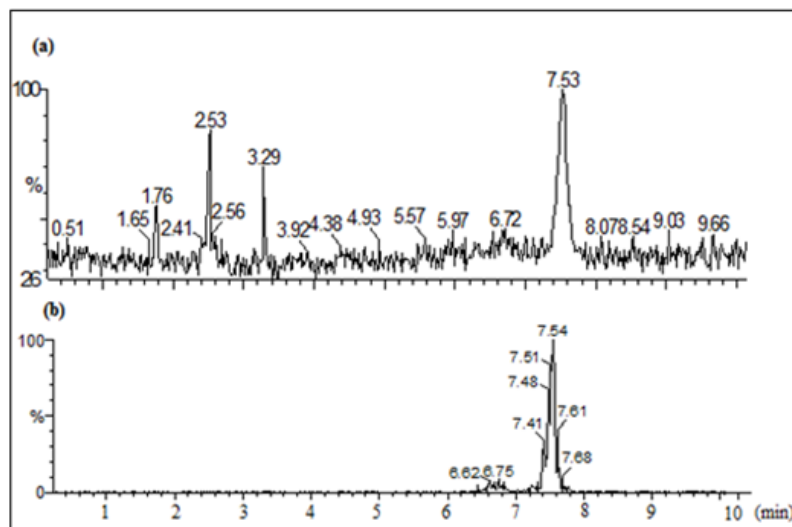


Figura 3.2. (a) Cromatograma do íon total (TIC); (b) Cromatograma de massas do ácido clorogênico, íon $[M-H]^-$ 353, modo negativo.

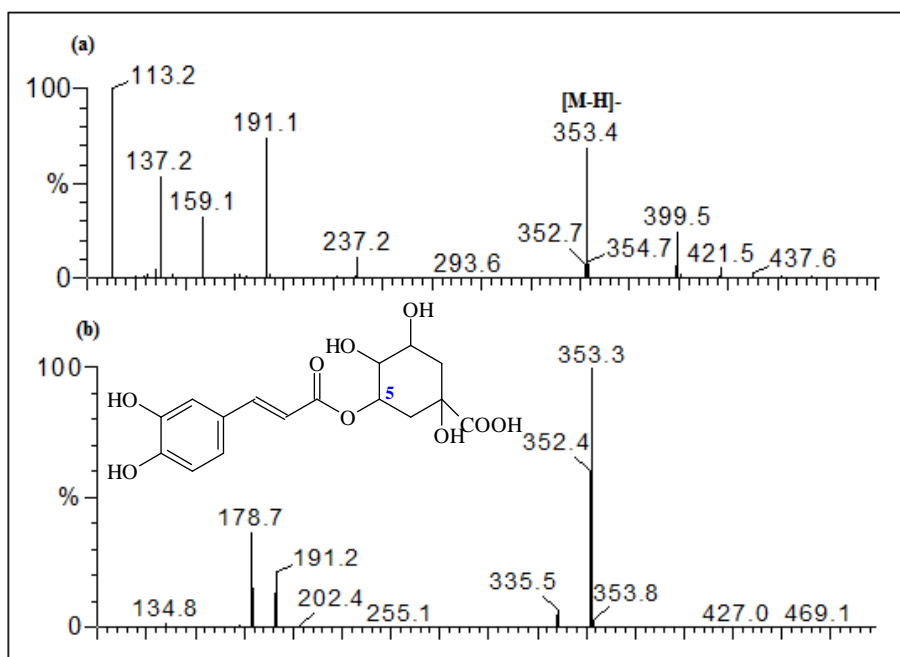


Figura 3.3. (a) Espectro de massas (MS1); (b) espectro de massas MS2 do ácido clorogênico, íon $[M-H]^-$ 353, modo negativo.

O espectro MS2 do padrão de ácido clorogênico, ou ácido 5-cafeoilquínico, $[M-H]^-$ 353 Da, apresenta dois fragmentos importantes: m/z 191,2 (22%) característico de resíduo de ácido quínico e m/z 178,7 (38 %) do resíduo característico de cafeoila [15-16].

Tanto o ácido clorogênico quanto o ácido 1',5'-*O*- dicafeoilquínico (cinarina) são substâncias encontradas frequentemente em plantas. Estes fenilpropanóides estão relacionados na biossíntese de flavonóides e lignanas, e possuem funções relacionadas às condições de estresse da planta, causado por condições hormonais, nutricionais e ambientais [17].

As figuras 3.4 e 3.5 apresentam os cromatogramas e os espectros de massas para o padrão do ácido 1',5'-*O*- dicafeoilquínico (cinarina), que apresentou tempo de retenção de (t_r) 12,43 minutos.

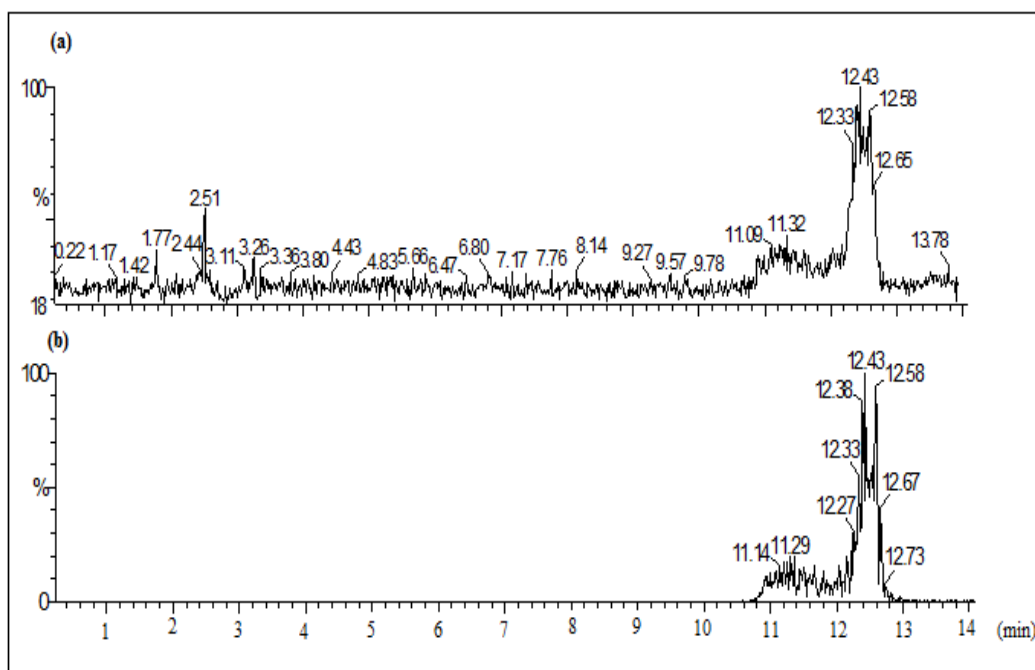


Figura 3.4. (a) Cromatograma do íon total (TIC); (b) Cromatograma de massas do ácido 1,5- dicafeoilquínico, $[M-H]^-$ 515, modo negativo.

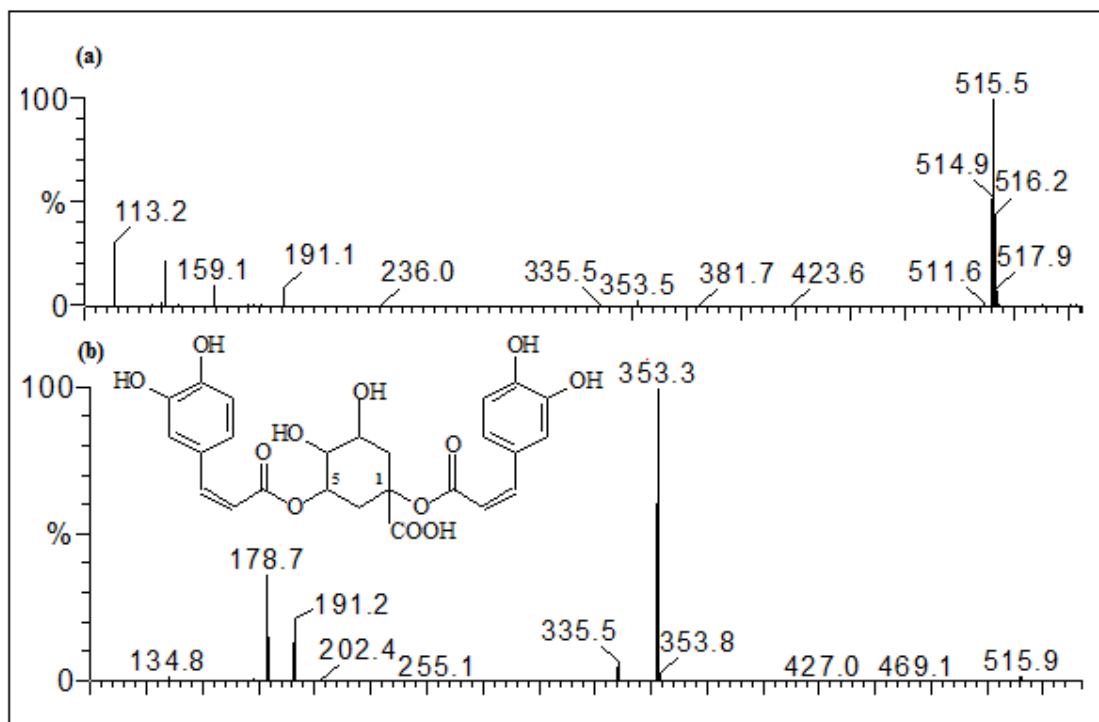


Figura 3.5. (a) Espectro de massas (MS1); (b) espectro de massas MS2 do ácido 1',5'-*O*-dicafeoila quínico, $[M-H]^-$ 515, modo negativo.

Através do espectro de massas MS2 (figura 3.3 – b) observa-se a presença dos íons m/z 353 (100%) característico do ácido monocateoila quínico, m/z 178,7 (39%) identificando o resíduo cafeoila e por fim m/z 191 (25%), característico do resíduo de ácido quínico. Ligações oxigênio-carbono (O-C) são facilmente rompidas devido à diferença na eletronegatividade entre o átomo carbono e o oxigênio. Também pôde ser observado m/z 335 (7%) referente à perda de uma molécula de água ($-H_2O$) do íon m/z 353 (-18 Da).

Por fim, as figuras 3.6 e 3.7 apresentam o cromatograma e o espectro de massas MS2 da vitexina, o terceiro e último padrão analisado. A vitexina ou apigenina-8-*C*-glucosídeo, pertence à classe das flavonas *C*-glicosiladas e foi uma das substâncias identificadas nas variedades de cana-de-açúcar “Bowman-Birk” e “Kunitz” em trabalho anterior [18]. A vitexina foi eluída no tempo de retenção de 19,10 minutos, como observado na figura 3.6.

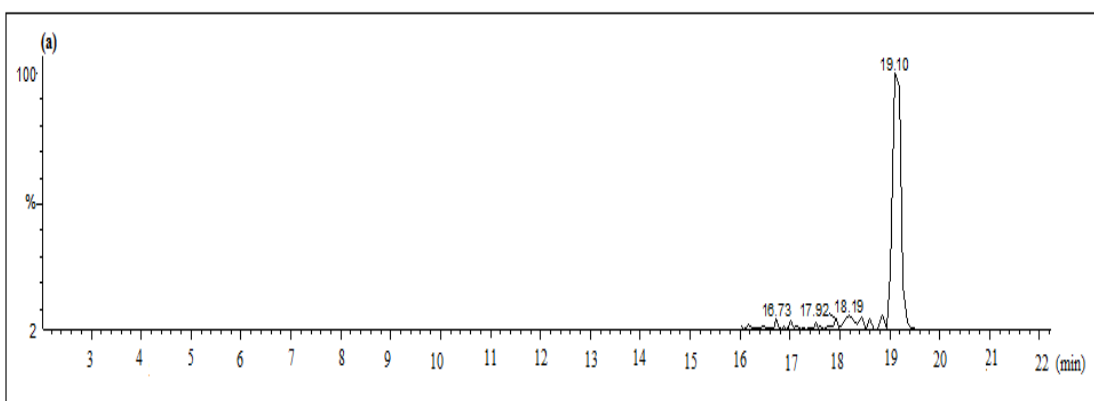


Figura 3.6. (a) Cromatograma de massas da apigenina-8-*C*-glucosídeo (vitexina), $[M-H]^-$ 431, modo negativo.

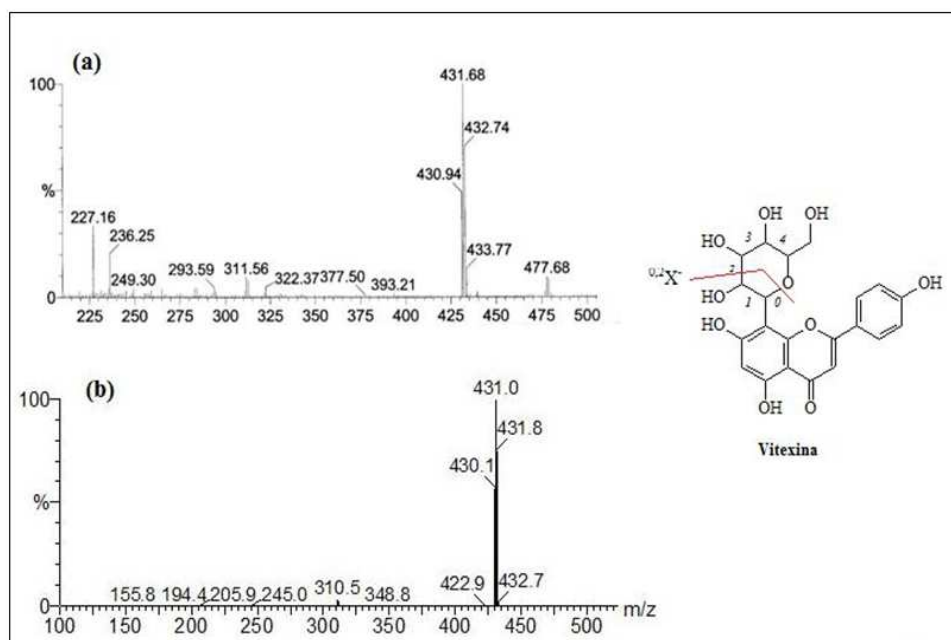


Figura 3.7. (a) Espectro de massas (MS); (b) espectro de massas MS2 da apigenina-8-*C*-glucosídeo (vitexina), $[M-H]^-$ 431.

No modo negativo, o fragmento $[M-H-120]^-$ é típico de flavonóides *C*-glicosilados e corresponde à quebra da unidade de glicose ligada ao C-8 da aglicona. No espectro MS2 da vitexina, observa-se o fragmento $^{0,2}X^-$ em m/z 310,5, indicando a quebra das ligações 0 e 2 da glicose, como representada na figura 3.7 (nomenclatura de acordo com Domon e Costello) [9, 19].

3.3.2. Interpretação dos espectros de massas para os 9 picos cromatográficos selecionados pelo método OPS para as duas variedades transgênicas de folhas

A figura 3.8 apresenta o cromatograma TIC para as variedades de cana-de-açúcar Bowman-Birk e Kunitz das amostras de folhas. Diferenças no deslocamento no tempo de retenção dos nos cromatogramas adquiridos pelo equipamento Waters – Alliance 2695 (dados quimiométricos- capítulo 2) e o equipamento Agilent (dados de massas), foram observadas, mas a ordem de eluição foi preservada.

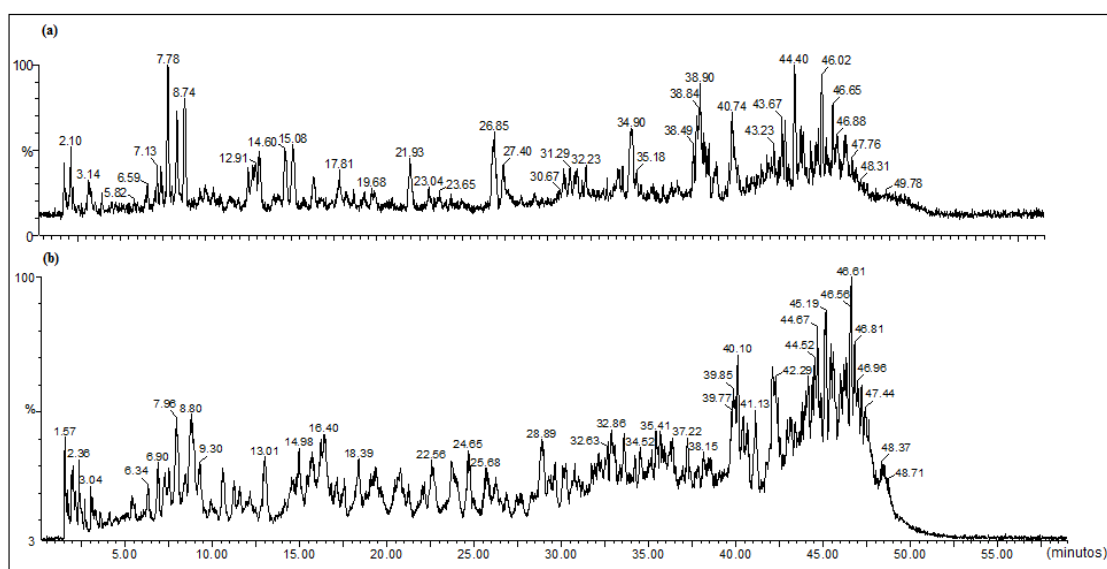


Figura 3.8. (a) Cromatograma TIC para a variedade de folhas da cana-de-açúcar Bowman-Birk; (b) cromatograma TIC para a variedade de folhas da cana-de-açúcar Kunitz.

A tabela 3.1, apresenta, resumidamente, os íons moleculares nas regiões dos cromatogramas selecionadas no capítulo 2, para as amostras de folhas das variedades de cana-de-açúcar. Cada espectro de massas será discutido separadamente neste item:

Tabela 3.1. Picos cromatográficos selecionados pelo algoritmo OPS e seus respectivos íons quasi-molecular [M-H]⁻

Pico Cromatográfico	t_r (min)	[M-H]⁻	UV (nm)	Substância Proposta
1	7,78	353	242, 290 (sh) e 325	Ácido clorogênico ou isômero
2	8,69	367	252 e 326	Isômero do ácido feruloilquínico
3	13,3	678	271 e 331	Flavonóide derivado de apigenina
4	16,3	563	270 e 340	Shaftosídeo ou Isoshaftosídeo
5	17,8	431	249, 267 (sh) e 349	N.I
6	24,4	515	249 e 327	N.I.
7	26,9	579	248, 267(sh) e 354	N.I.
8	29,5	651	249, 270(sh) e 350	Tricina-7-O-(6''—p-metoxicinamato)-glicosilado
9	44,5	307	320	N.I

* N.I. – substância não identificada

(A) Pico cromatográfico 1: ácido clorogênico ou isômero

O primeiro pico cromatográfico selecionado pelo método de seleção de variáveis encontra-se no tempo de retenção t_r de 7,78 minutos, figura 3.3.(a). A substância referente ao pico cromatográfico 1 aparece como majoritária nas amostras de folhas pertencentes a variedade Bowman-Birk, capítulo 2. A varredura do espectro de ultravioleta (HPLC-DAD) indicou a ausência de co-eluição referente ao pico cromatográfico em $t_r = 7,78$ minutos.

A figura 3.10 apresenta os espectros de massas MS1 (varredura para detecção do íon molecular) e MS2 (fragmentação do íon molecular). Pode-se observar a presença do íon quase-molecular m/z 353,4 $[M-H]^-$, e do dímero m/z 707,8 $[2M-H]^-$. A presença de dímero em espectros de massas no modo negativo é comum para substâncias presentes em alta concentração. O extrato de folhas apresentou o íon $[M-H]^-$ 353 para diferentes picos cromatográficos com tempos de retenção distintos, o que indica a presença de mais de um isômero do ácido clorogênico nas amostras de folhas. O capítulo 4, descreve a identificação dos isômeros do ácido clorogênico (figura 3.9) através de análise dos espectros de RMN dos extratos de folhas das variedades da cana-de-açúcar.

A figura 3.7-b, apresenta o espectro MS2 no qual foi possível identificar fragmentos em m/z 190,5 $[M-H-163]^-$, característico do resíduo de ácido quínico, m/z 179,2 $[M-H-174,4]^-$, característico do resíduo de cafeoíla e por fim m/z 172,5 $[M-H-180]^-$, característico do resíduo de ácido quínico [15-16]. O esquema proposto na figura 3.11, apresenta os fragmentos formados para o ácido cafeoíla quínico. Adicionalmente, o espectro de massas do ácido clorogênico da amostra (figura 3.10), foi comparado com o espectro do padrão (figura 3.3), confirmando de que a estrutura da substância do pico 1 se trata de outro isômero do ácido clorogênico, devido à presença do fragmento m/z 172,5 (pico base, 100%), que não foi observado no espectro do padrão.

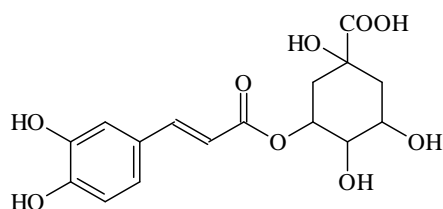


Figura 3.9. Estrutura do ácido clorogênico.

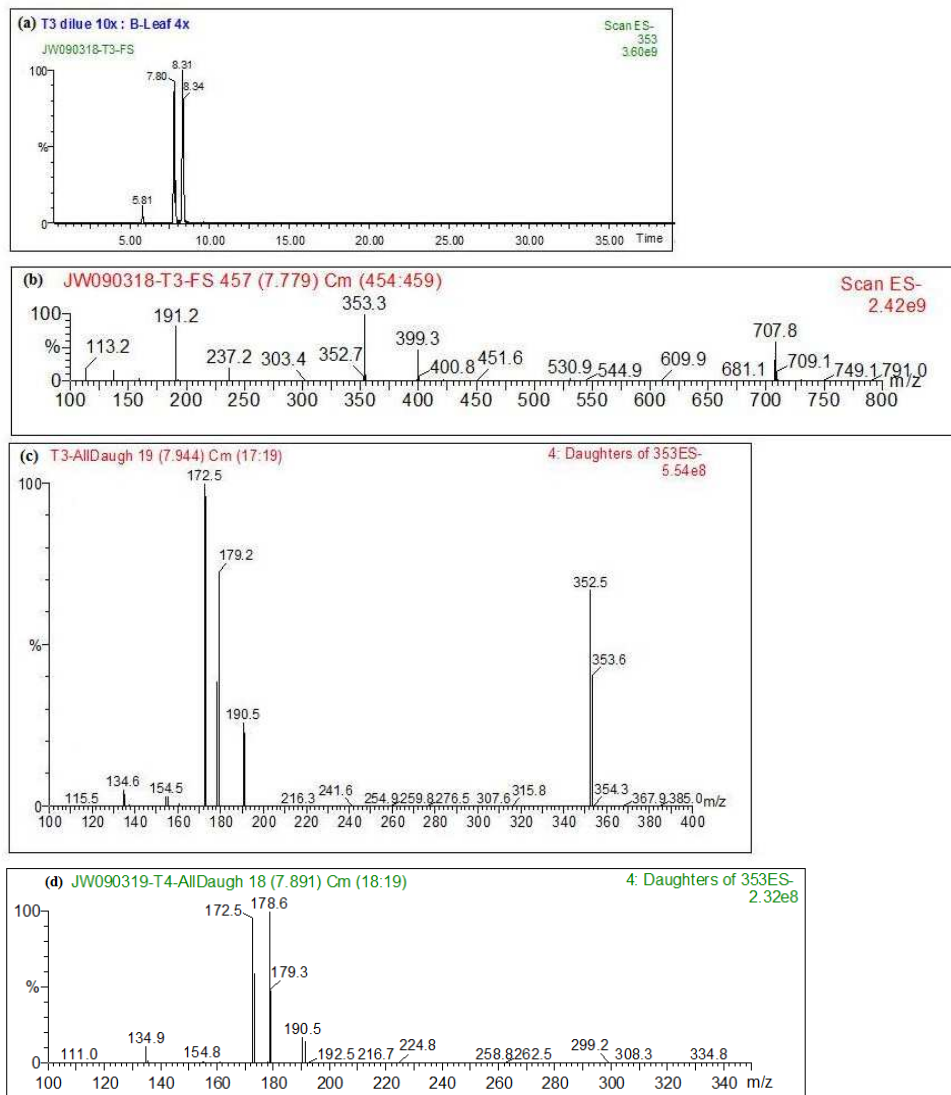


Figura 3.10. (a) Cromatograma BPI para o pico cromatográfico 1, selecionado pelo método OPS; (b) Espectro de massas (MS1) $[M-H]^-$ 353; (c) espectro de massas MS2 do íon quase-molecular $[M-H]^-$ 353 das amostras de folhas da variedade de cana-de-açúcar Bowman-Birk; (d) espectro de massas MS2 do íon quase-molecular $[M-H]^-$ 353 para as amostras de folhas da variedade de cana-de-açúcar Kunitz.

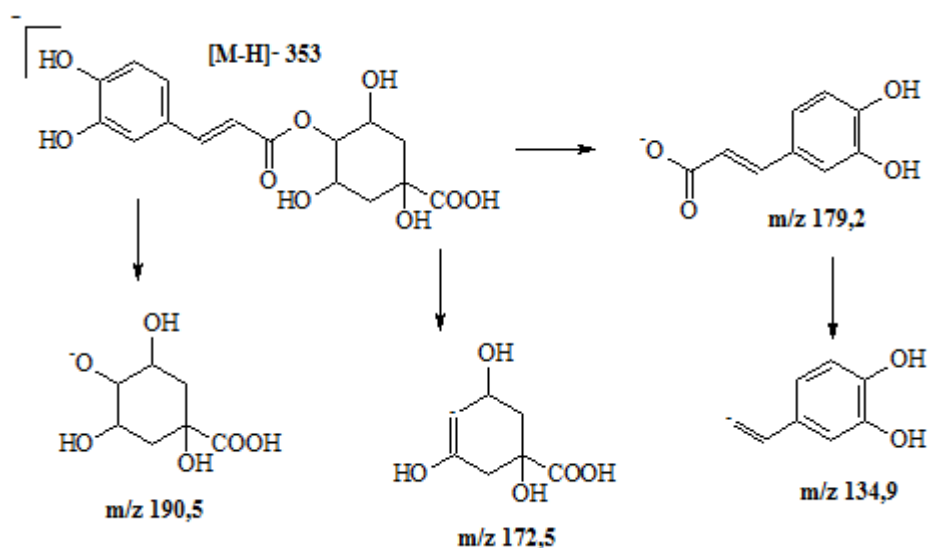


Figura 3.11. Possível fragmentação para o ácido cafeoila quínico.

O espectro MS2 para o ácido cafeoila quínico foi obtido também no modo positivo $[M+H]^+$ 355,5 (figura 3.9). O fragmento de maior intensidade, $[M+H-192]^+$ = 163,0 refere-se à perda do ácido quínico, como mostra a figura 3.12, confirmando a proposta de identificação do isômero do ácido clorogênico.

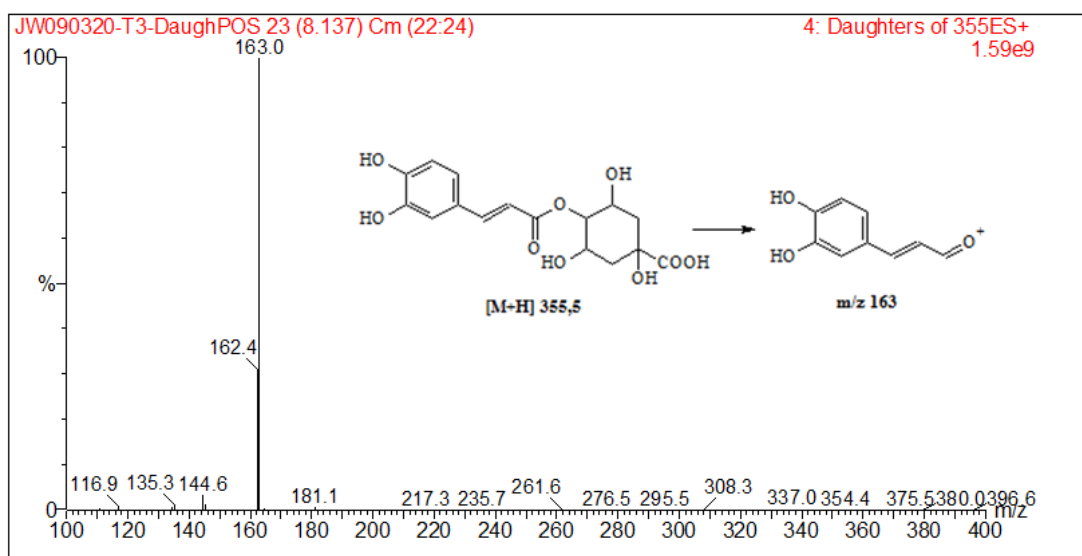


Figura 3.12. Espectros de massas MS2 para o pico cromatográfico 1, $t_r = 7,8$ min, $[M+H]$ 355 contido nas amostras de folhas das duas variedades transgênicas.

(B) Pico cromatográfico 2: isômero do ácido feruloilquínico

O segundo pico cromatográfico selecionado para discriminação das folhas de cana-de-açúcar da variedade Bowman-Birk em relação à variedade Kunitz, apresentou tempo de retenção em $t_r = 8,69$ minutos na figura 3.10 (a). Através da varredura do espectro de ultravioleta, obtido pela análise de HPLC-DAD, verificou-se a pureza do pico em $t_r = 8,69$ minutos.

Pelo espectro de massas (MS1, figura 3.13-b) obtido no modo negativo, a substância referente ao pico 2, apresentou $[M-H]^- = 367,5$, característico do íon quase-molecular de um dos isômeros do ácido feruloilquínico, que é diferenciado do ácido clorogênico pela presença de uma metila na posição do C-3 do derivado do ácido cinâmico (figura 3.14). A substância pode ser confirmada como sendo um outro derivado do ácido cinâmico, através do espectro de massas MS2 (figura 3.13-c), devido à presença do fragmento $[M-H-173]^-$, m/z 193 (100%) referente ao rompimento da ligação éster do ácido quínico com o substituinte feruloíla. O fragmento $[M-H-193]^-$, m/z 173 caracteriza a perda de uma unidade do ácido quínico [15-16]. A figura 3.15 apresenta uma possível via de fragmentação da substância referente ao pico cromatográfico 2. Assim como para o isômero do ácido clorogênico, não foi possível estabelecer a posição da ligação éster entre o resíduo feruloíla com o ácido quínico devido à falta de disponibilidade de padrões de isômeros do ácido feruloilquínico [20]. No capítulo 4, foi identificado a presença do ácido feruloilquínico nos extratos de folhas, através de análise de espectroscopia de ressonância magnética, corroborando com o resultado de análise dos espectros de massas.

Pelo TIC (figura 3.13), pode-se observar a presença de isômeros do ácido feruloilquínico no tempo de retenção de 13,14 minutos. O pico cromatográfico 2, selecionado pelos métodos quimiométricos, está presente em maior abundância nas folhas pertencentes à variedade Kunitz (vide capítulo 2).

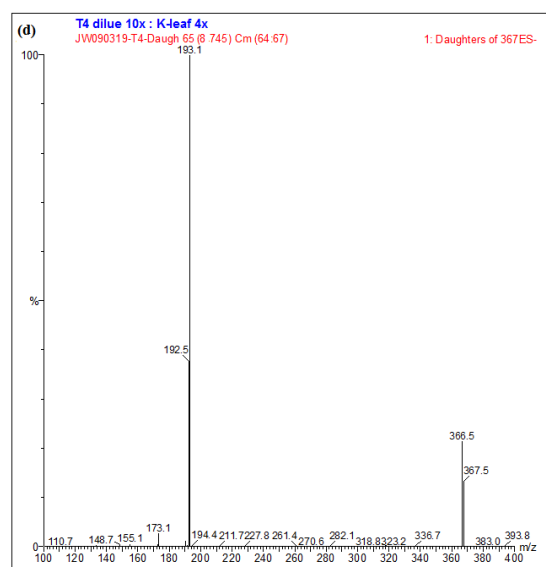
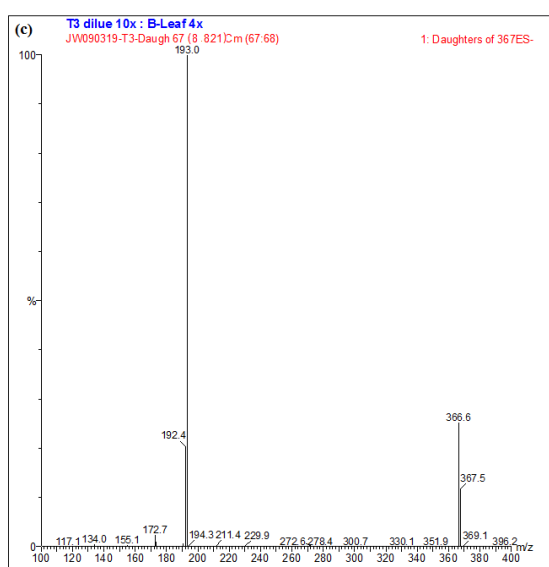
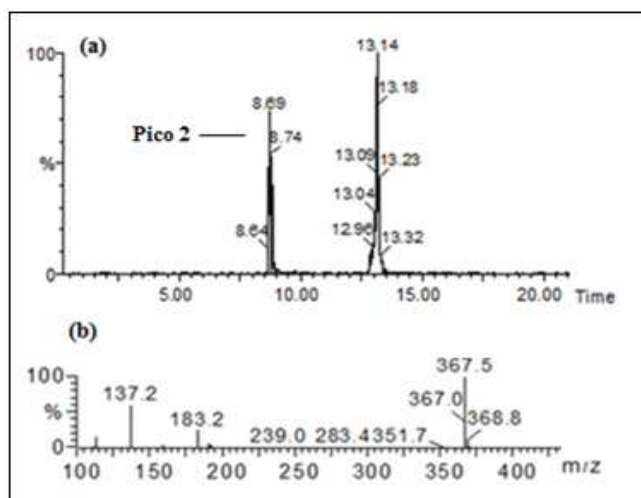


Figura 3.13. (a) Cromatograma TIC para o pico cromatográfico 2 selecionado pelo método OPS; (b) Espectro de massas MS1 $[M-H]^-$ 367; (c) espectro de massas MS2 do íon quasi-molecular $[M-H]^-$ 367 para folhas da variedade Bowman-Birk; (d) espectro de massas MS2 do íon quasi-molecular $[M-H]^-$ 367 para folhas da variedade Kunitz.

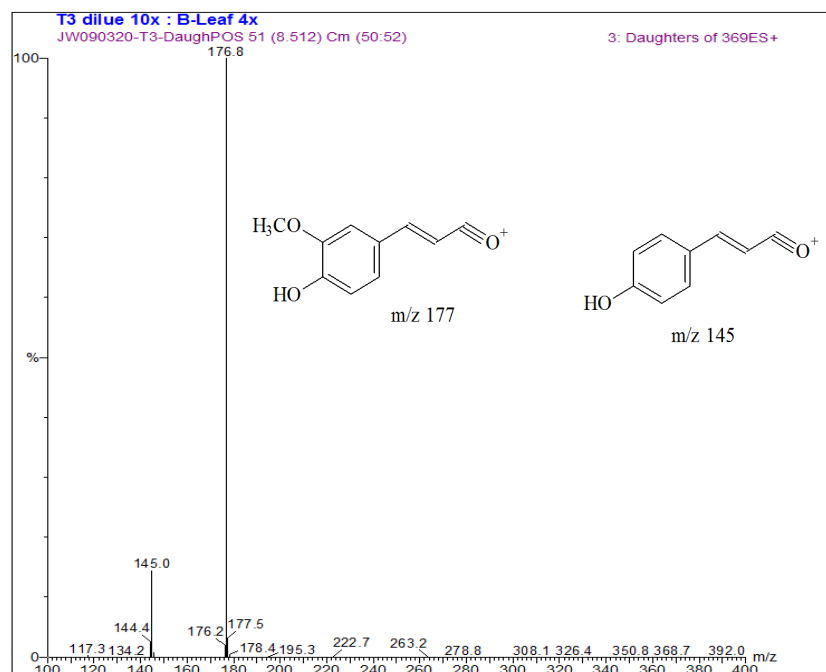


Figura 3.16. Espectro de massas MS2, modo positivo, para o íon quase-molecular $[M+H]^+$ 369, referente ao ácido feruloilquínico.

(C) Pico cromatográfico 3: derivado de apigenina

A substância referente ao pico 3, selecionado pelo método quimiométrico, é uma das substâncias minoritárias presentes nos extratos das folhas de cana-de-açúcar. No cromatograma de massas, encontra-se o pico 3 eluído em $t_r = 13,3$ minutos (figura 3.17-a). O cromatograma obtido pela análise de HPLC-DAD não apresenta boa resolução, entretanto através da varredura do pico em $t_r = 13,3$ minutos (região selecionada pelo método OPS) revelou-se apenas um perfil de espectro na região do cromatograma selecionado pelo algoritmo OPS (capítulo 2, figura 2.15).

O espectro de massas MS1 (figura 3.17-b), apresentou íon quasi-molecular $[M-H]^-$ em m/z 678 Da. Na figura 3.17-d, a expansão do espectro de massas MS2 mostra fragmentos em: m/z 659,6, indicando a perda de uma unidade de água $[M-H-18]^-$ em m/z 630,6 com a perda de 47,4 Da, referente à saída de metila e duas unidades de água ($[M-H-47]^-$), confirmando a presença de metila e hidroxila como substituintes da aglicona; m/z 529 e m/z 571 referem-se a perda de 149 e 107 Da, respectivamente.

Unidade de ácido coumárico ($[M-H-164]^-$) pôde ser observada em m/z 514 (pico base). Por fim, observou-se também a presença de fragmento característico de resíduo de ácido quínico em m/z 191,5 Da, sugerindo presença de derivados de ácido trihidroxicinâmicos. Em plantas é comum a presença deste tipo de fenilpropanóide (ácido di-cafeoilá mono-coumaroilá quínico, M.M 678 g mol^{-1}). Entretanto estas substâncias possuem espectro na região do ultravioleta bem característico com duas bandas de absorção em λ_{max} 240 300 (sh) e 330 nm [21]. No caso da substância referente ao pico 3, o espectro de ultravioleta (capítulo 2, item 2.3.1, figura 2.15), λ_{max} 271 nm e 331 nm, sugere presença de flavona [22]. Desta forma, técnicas de isolamento serão necessárias para identificar as possíveis estruturas.

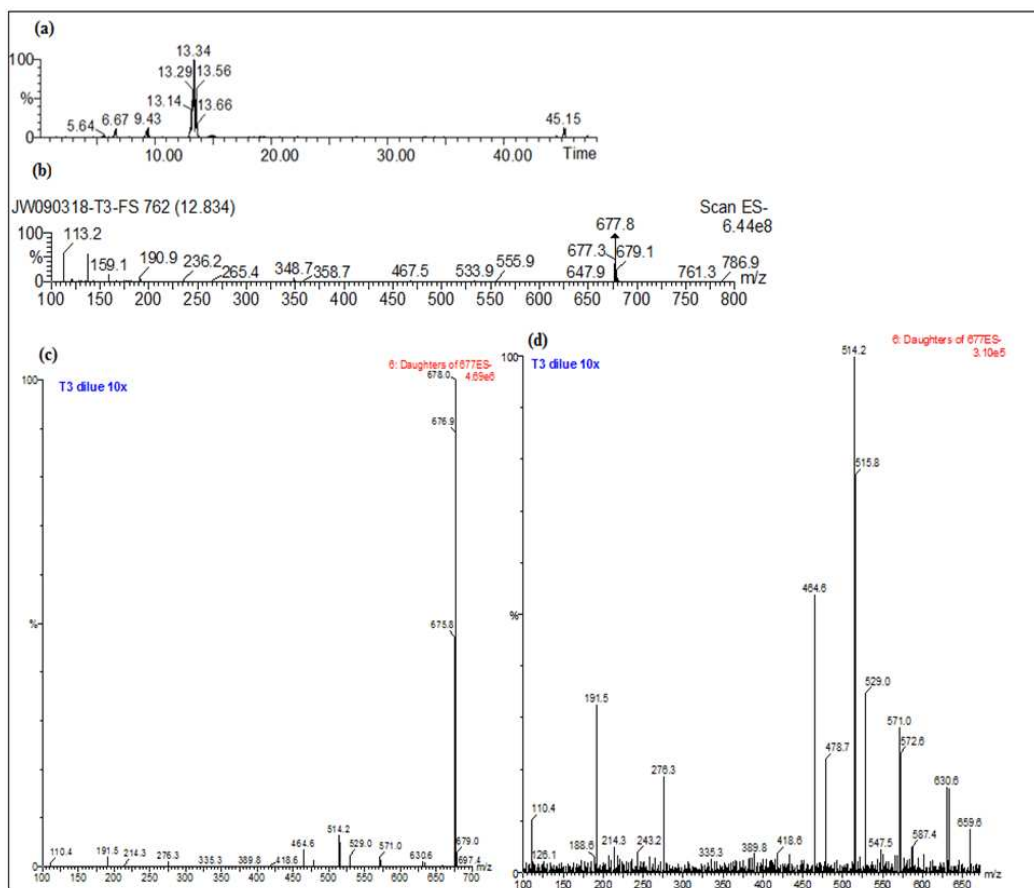


Figura 3.17. (a) Cromatograma TIC para o pico cromatográfico 3 selecionado pelo método OPS; (b) Espectro de massas MS1, $[M-H]^-$ 678; (c) espectro de massas MS2 do íon quasi-molecular em $[M-H]^-$ 678 nas amostras de folhas das duas variedades transgênicas; (d) expansão do espectro de massas MS2, $[M-H]^-$ 678.

A fim de identificar informações adicionais que corroborem com a identificação da estrutura da aglicona da substância referente ao pico 3, foi obtido o espectro de MS2, $[M+H]^+$ 680, no modo positivo (figura 3.18). A perda de duas moléculas de água pode ser observado no fragmento em m/z 644, $[M-H-36]^+$, indicando presença de hidroxila no anel B da aglicona. O pico base m/z 581,8 (100%) apresenta a saída de 98 Da ($[M-H-44 +54]$, indicando a saída de CO_2 e três H_2O , respectivamente. O fragmento m/z 410 sugere perda de 269,6 Da, evidenciando a presença da aglicona apigenina.

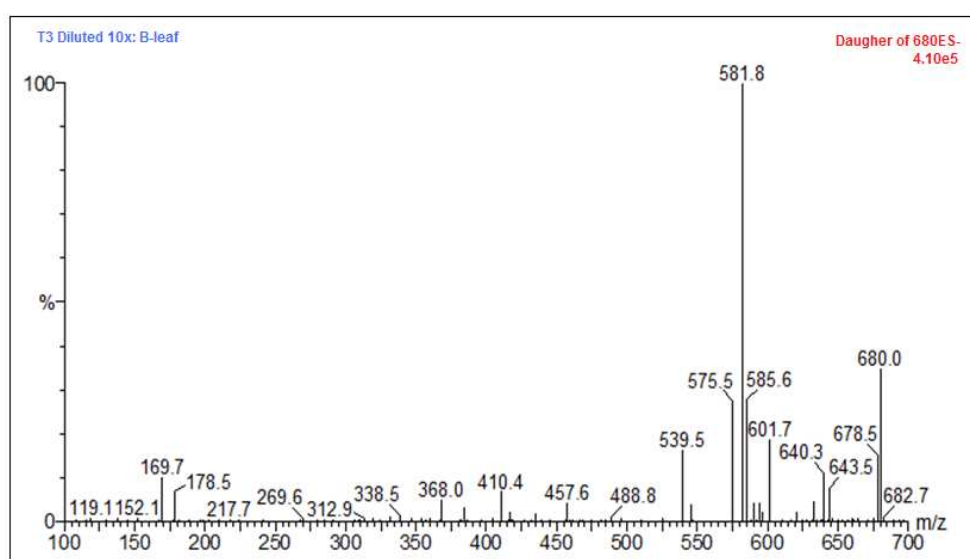


Figura 3.18. Espectro de massas MS2, modo positivo, para $[M+H]^+$ 680.

A figura 3.19 apresenta as sub-unidades, apresentadas pelo espectro de massas MS2.

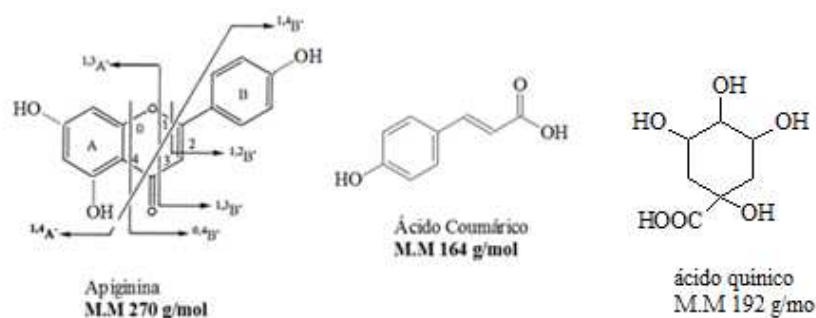


Figura 3.19. Estruturas de sub-unidades pertencentes à substância referente ao pico cromatográfico 3.

Através dos espectros MS2 no modo positivo e através da análise do espectro UV-DAD, pode-se concluir que uma das substâncias referente ao pico 3 é um derivado de apigenina.

(D) Pico cromatográfico 4: shaftosídeo/isoshaftosídeo

O quarto pico cromatográfico selecionado para discriminação das folhas de cana-de-açúcar da variedade Bowman-Birk em relação à variedade Kunitz, apresentou tempo de retenção em $t_r = 16,3$ minutos, figura 3.14 (a). Pelo espectro de massas (MS1, figura 3.20-b) obtido no modo negativo, a substância referente ao pico 4 apresentou $[M-H]^- = 563,5$, característico do íon quasi-molecular do flavonóide shaftosídeo ou de seu isômero, isoshaftosídeo, identificados em extratos de garapa em trabalho anterior, pelo grupo de Análise Fitoquímica [11-12]. O espectro de massas MS2, figura 3.20-c e d, apresentaram fragmentos característicos da quebra do substituinte glucopiranosil, $[M-H-120]^- = 443$ ($^{0,2}X^-$), do substituinte arabinopiranosil, pico base em $[M-H-150]^- = 413$ ($^{0,5}X^-$), e por fim da quebra simultânea dos dois açúcares em $[M-H-270]^- = 293$ ($^{0,1}X^-$ e $^{0,5}X^-$). A figura 3.21, apresenta a proposta de fragmentação para o shaftosídeo e seu isômero. Infelizmente não foi possível estabelecer a identidade do isômero presente no tempo de retenção de 16,32 min, devido a falta dos padrões.

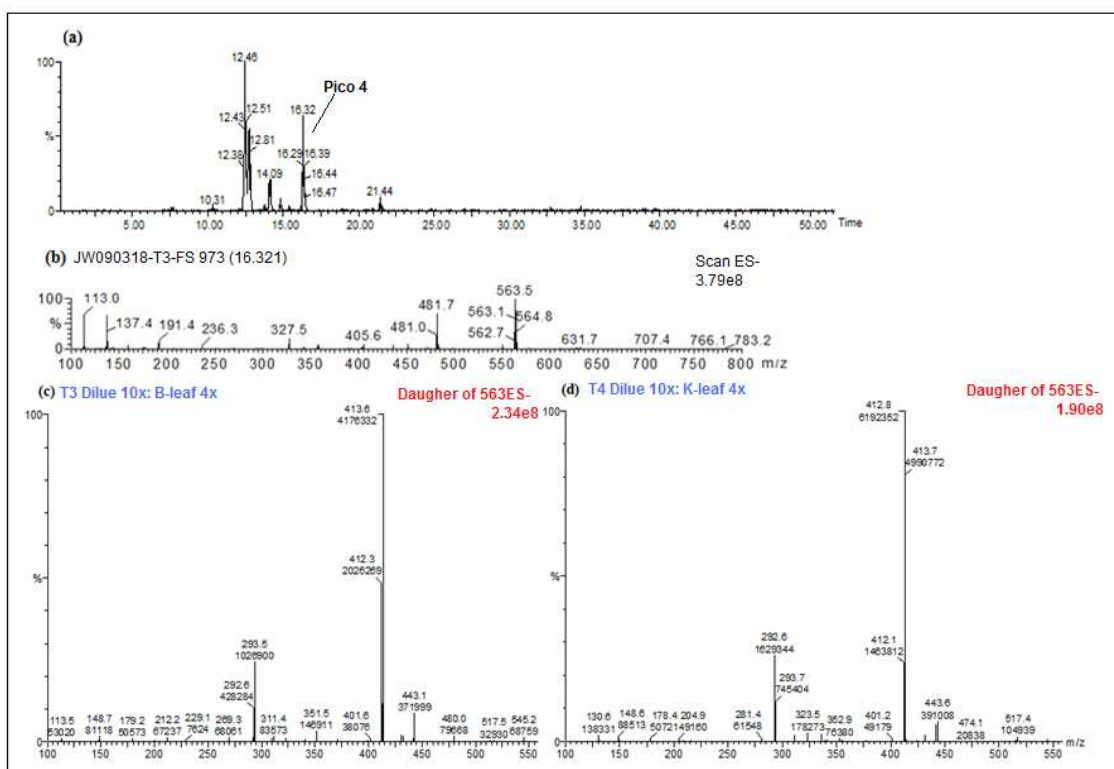


Figura 3.20. (a) Cromatograma de massas (MS); (b) Espectro de massas MS1, $[M-H]^-$ 563, do pico cromatográfico 4, $t_r = 16,3$ minutos; (c) Espectro de massas MS2, $[M-H]^-$ 563, do pico cromatográfico 4 para as amostras de folhas Bowman-Birk; (d) Espectro de massas MS2, $[M-H]^-$ 563, do pico cromatográfico 4 para as amostras de folhas Kunitz.

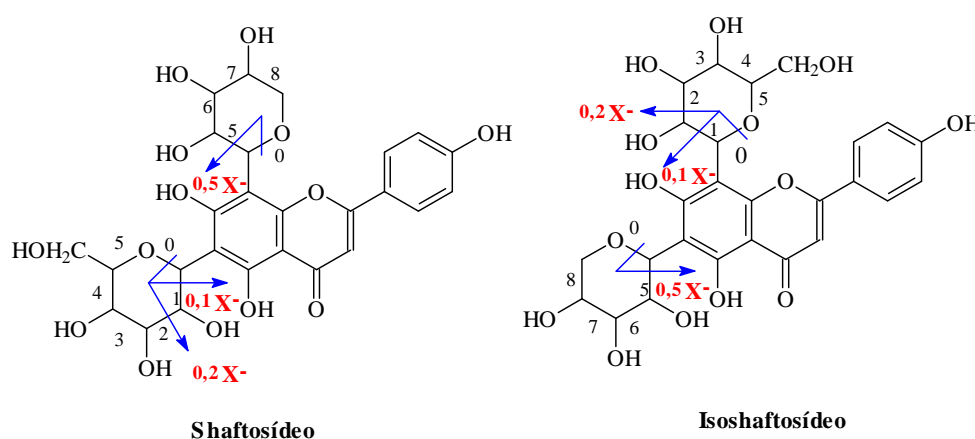


Figura 3.21. Esquema de fragmentação proposto para o shaftosídeo e isoshaftosídeo, seguindo a nomenclatura proposta por Domon e Costello [9].

(E) Pico cromatográfico 5: substâncias não identificadas

A substância referente ao pico cromatográfico 5 foi eluída no tempo de retenção em $t_r = 17,2$ minutos como mostra a figura 3.22-a. O espectro de ultravioleta (figura 2.15, capítulo 2) apresentou duas bandas de absorção em λ 250 nm, com ombro em λ 267 nm e outra em λ 349 nm, sugerindo presença de polifenol [22]. Entretanto, através da varredura da região entre 17,7-17,9 minutos verificou-se coeluição de substâncias, dificultando a identificação.

O espectro de MS1 apresentou íon quasi-molecular $[M-H]^-$ 431 igual ao do padrão vitexina (figura 3.5), entretanto, o tempo de retenção e os fragmentos apresentado no espectro de massas MS2 referente à fragmentação do íon 431 do padrão (figura 3.5-c e d) sugerem a presença de outro isômero de vitexina. Além disso, apesar de ser observado nos espectros de massas MS2 dos extratos de folhas das variedades transgênicas Bowman-Birk e Kunitz o íon quasi-molecular $[M-H]^-$ 431 para o tempo de retenção em t_r 17,2 minutos, há uma diferença no padrão de fragmentação apresentado nas figuras 3.22-c e d. Esta observação sugere a presença de diferentes isômeros da vitexina nas variedades transgênicas estudadas. Em ambos os espectros pode ser observado além do íon quase-molecular $[M-H]^-$ 431 o fragmento em m/z 385,8 referente à perda de 45,5 Da $[M-H- \cdot COOH]^-$, único fragmento comum aos espectros MS2 das duas variedades transgênicas. Esta perda de 45 Da é comum as substâncias contendo ácidos carboxílicos [23]. Além disso, fragmentação no modo negativo pode gerar adutos com ácido fórmico (componente da fase móvel). Assim, uma hipótese pode ser formulada para a substância do pico 5: íon quasimolecular $[M-H]^-$ 385 e aduto em m/z 431.

O espectro MS2 da variedade Bowman-Birk apresentou fragmento em m/z 205,3 $[M-H-180]^-$, se proveniente de $[M-H]^-$ 385, sugere a saída de hexose indicando presença de sinapóil hexose [24]. Entretanto, sem análises de MS³ fica complicado estabelecer a real proposta de estrutura para o pico 5, por dois motivos: a coeluição de substâncias verificada pelo espectro de UV-PDA e da ausência de informação sobre a origem dos fragmentos (análises de MRM-multiple reaction monitoring).

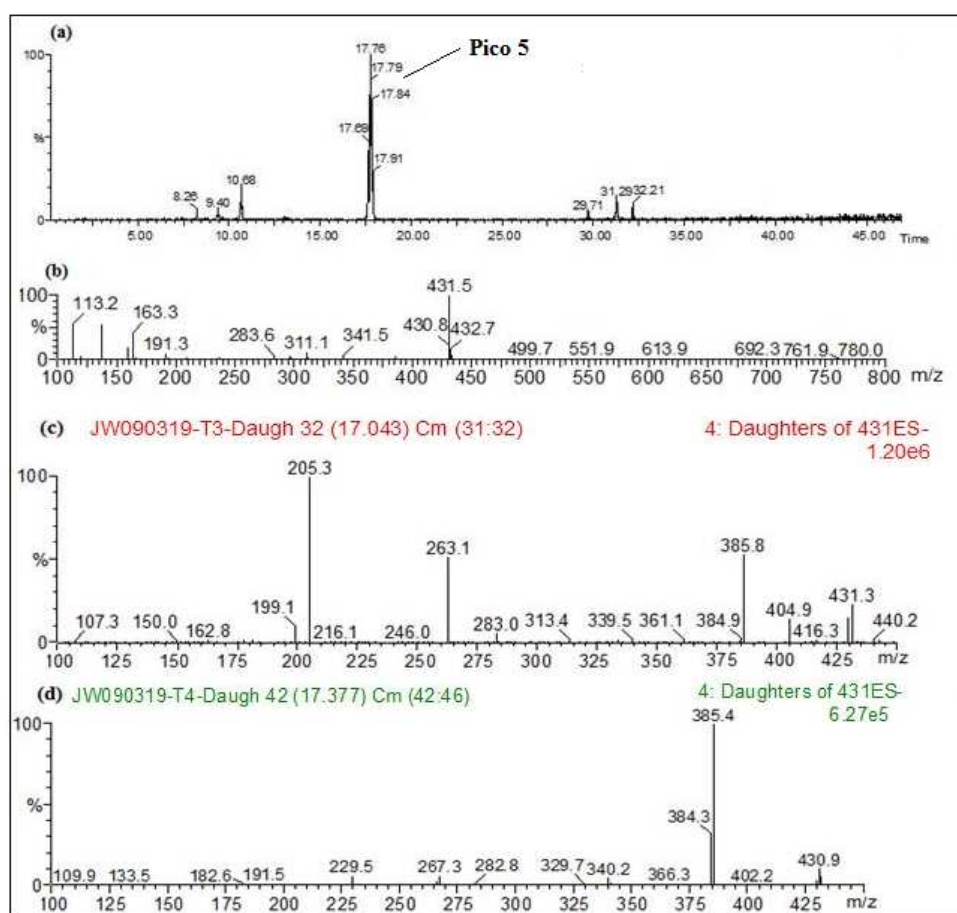


Figura 3.22. (a) Cromatograma de massas (MS); (b) Espectro de massas MS1, $[M-H]^-$ 431, do pico cromatográfico 5, $t_r = 17,8$ minutos; (c) Espectro de massas MS2, $[M-H]^-$ 431, do para as amostras de folhas Bowman-Birk; (d) Espectro de massas MS2, $[M-H]^-$ 431, para as amostras de folhas Kunitz.

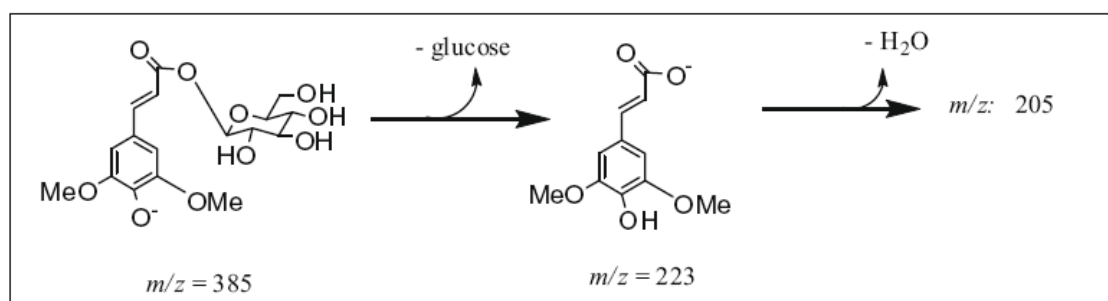


Figura 3.23. Estrutura sugerida para uma das substâncias presentes na quinta região cromatográfica selecionada pelo algoritmo OPS.

Em relação ao espectro MS2 para a variedade Kunitz, também se observa íon em m/z 385,4 $[M-H-COOH]^-$. Neste caso, o íon em m/z 267 indica a perda de 164 Da, sugerindo possível presença de ácido coumárico. Os espectro de ultravioleta de ambas as variedades apresentaram λ_{max} 249, 267(sh) e 349 nm sugerindo presença de fenilpropanóides. Para a completa identificação estrutural, técnicas de isolamento devem ser empregadas em trabalhos futuros.

(F) Pico cromatográfico 6: substância não identificada

A substância referente ao pico 6, apresentou tempo de retenção em $t_r = 24,2$ minutos, figura 3.19. O espectro de massas MS1 da figura 3.24-a indicou a presença do íon molecular $[M-H]^-$ 515. Pode-se descartar a presença de cinarina (1,5-ácidodicafeoil quínico, padrão), através da comparação entre o tempo de retenção da substância presente nos extratos de cana-de-açúcar ($t_r = 24,2$ min) com o do padrão cinarina (1,5-ácido dicafeoil quínico, $t_r = 12,2$ min), item 3.3.1, figura 3.5. Varredura do pico cromatográfico indicou coeluição de substâncias, o que dificulta a identificação da estrutura molecular.

Nos espectros de MS2 do pico 6, também foi observado diferenças no padrão de fragmentação do íon quasi-molecular $[M-H]^-$ 515 para a substância referente ao pico 6 em ambos os extratos de folhas (figura 3.24). Alguns fragmentos em comum estão apresentados na figura 3.24-c e d, como por exemplo, m/z 499, m/z 485, m/z 361, m/z 315, m/z 289 e m/z 167. O íon m/z 499 ($[M-H-15]^-$) refere-se à perda de metila (-15 Da), já o íon m/z 485,2 ($[M-H-30]^-$) indica a perda de duas metilas ($2 \times CH_3$). O fragmento em m/z 361,7 ($[M-H-154]^-$) sugere perda de dimetóxfenol, $C_8H_{10}O_3$ ($^{1,2} B^-$, figura 3.20). O fragmento em m/z 315 pode indicar presença de flavonóide metoxilado derivado de tricina (aglicona-H) condizente com as perdas de metila descritas anteriormente [26]. Entretanto, não foi possível estabelecer a estrutura devido à falta de experimentos MRM para identificar os fragmentos gerados pelo íon quase-molecular $[M-H]^-$ 515.

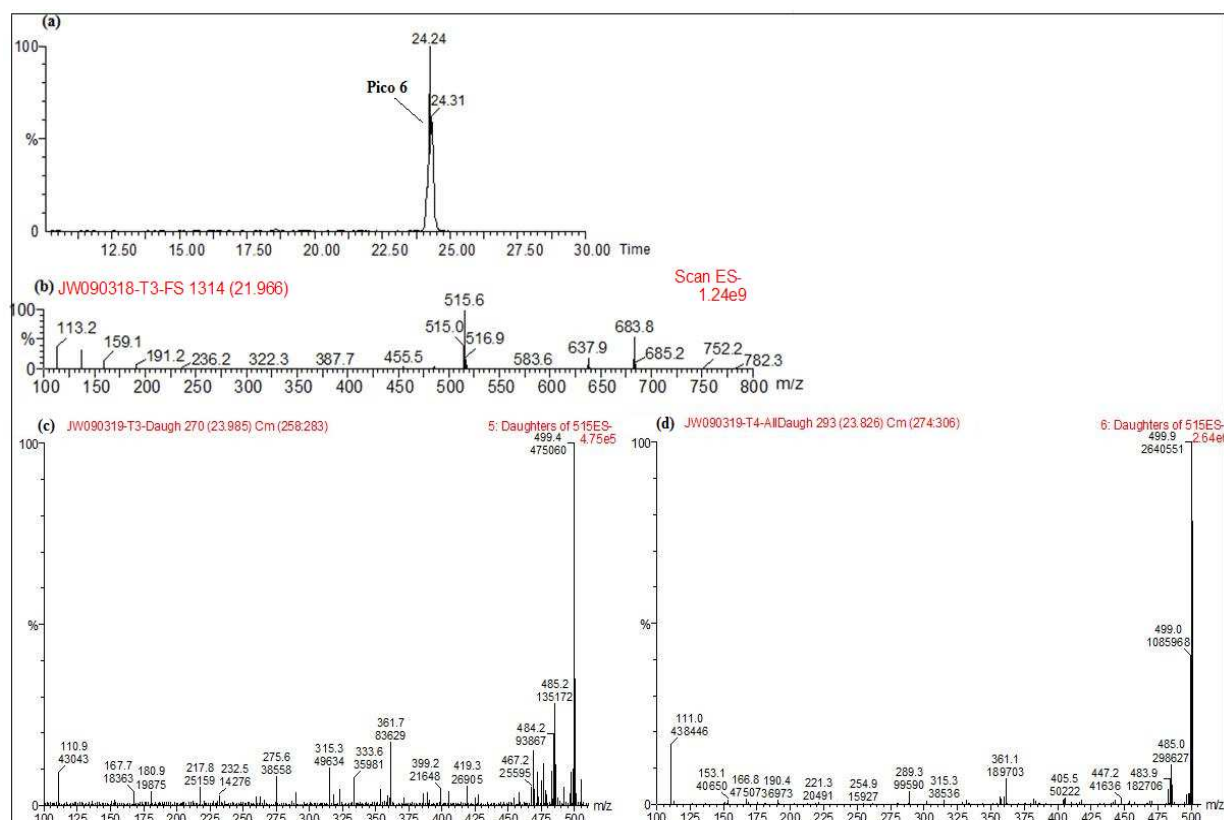


Figura 3.24. (a) Cromatograma de massas (MS); (b) Espectro de massas MS1, $[M-H]^-$ 515, do pico cromatográfico 6 em $t_r = 24,4$ minutos; (c) Espectro de massas MS2, $[M-H]^-$ 515, do pico cromatográfico 6, para as amostras de folhas Bowman-Birk; (d) Espectro de massas MS2, $[M-H]^-$ 515, do pico cromatográfico 6 para as amostras de folhas Kunitz.

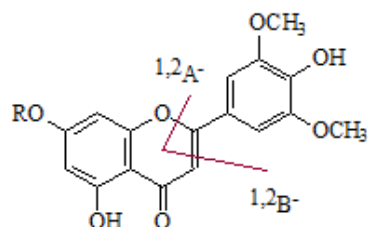


Figura 3.25. Possível estrutura representativa para a substância referente à sexta região cromatográfica selecionada pelo algoritmo OPS.

(G) Pico cromatográfico 7: substância não identificada

A substância referente ao pico 7, apresentou tempo de retenção em $t_r = 26,92$ minutos, figura 3.26-a. A pureza do pico cromatográfico foi avaliada através da varredura do espectro de ultravioleta obtido pelo detector de arranjo de fotodiodos, sugerindo nenhuma coeluição no pico 7.

O espectro de massas MS1 no modo negativo indicou a presença do íon quasi-molecular $[M-H]^-$ 579. Os espectros de massas MS2 do íon $[M-H]^-$ 579 para os dois extratos de folhas das variedades de cana-de-açúcar (figura 3.26-b e -c), apresentaram pico base em m/z 418 $[M-H-161]^-$, indicando a perda de uma unidade de glucose. Também, observa-se o fragmento em m/z 161 $[M-H-418]^-$, representando a retenção da carga negativa na glucose.

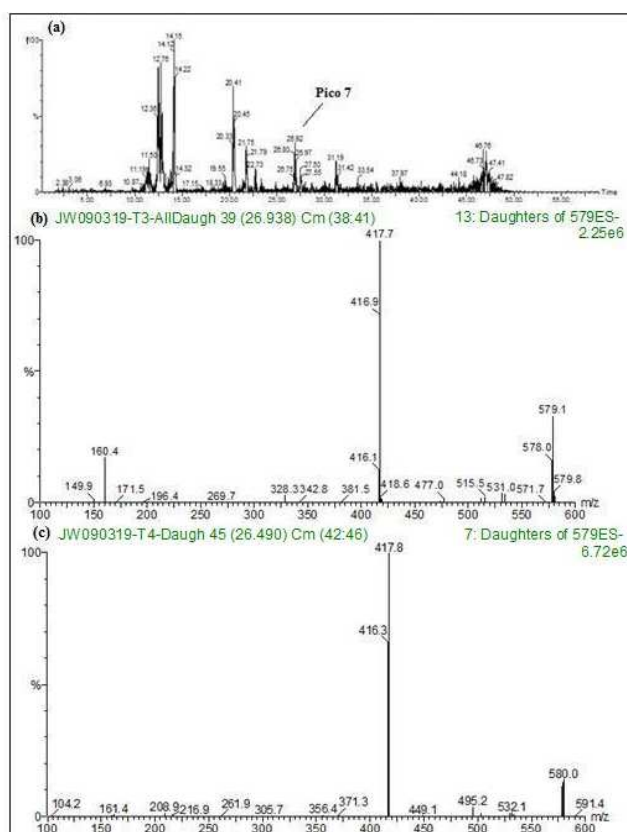


Figura 3.26. (a) Cromatograma de massas (MS); (b) Espectro de massas MS2, $[M-H]^-$ 579, do pico cromatográfico 7, $t_r = 26,9$ minutos, para as amostras de folhas Bowman-Birk; (c) Espectro de massas MS2, $[M-H]^-$ 579, do pico cromatográfico 7, $t_r = 26,9$ minutos, para as amostras de folhas Kunitz.

Para corroborar com a identificação parcial da substância referente ao pico 7, foi obtido espectro de massas no modo positivo (figura 3.27). Nesta análise foi observado o íon molecular $[M+3H]^+$ 582,6 e o pico base m/z 419,6 com a perda de 162 Da. O íon m/z 311,9 sugere perda de 270,7 Da (apigenina). Além disso, o espectro de ultra-violeta apresentou absorção máxima em λ_{max} 249, 267 e 349 nm, similar ao espectro obtido para o pico cromatográfico 8, indicando também presença de derivado de polifenol.

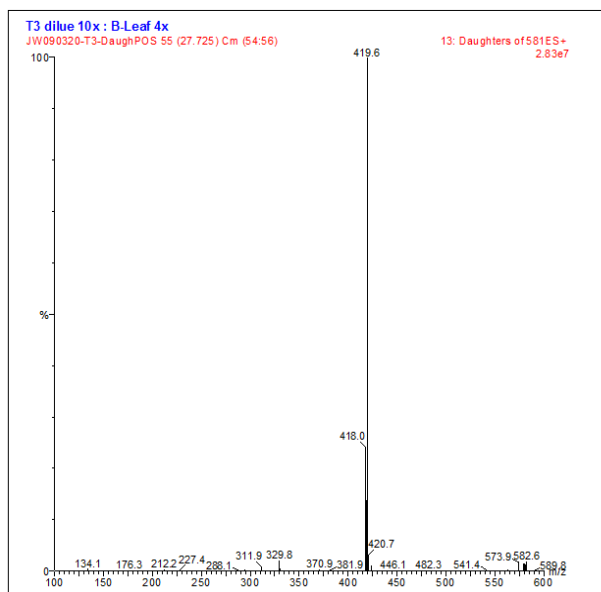


Figure 3.27. Espectro de massas MS2 $[M+H]^+$, modo positivo, do pico cromatográfico 7, $t_r = 26,9$ minutos.

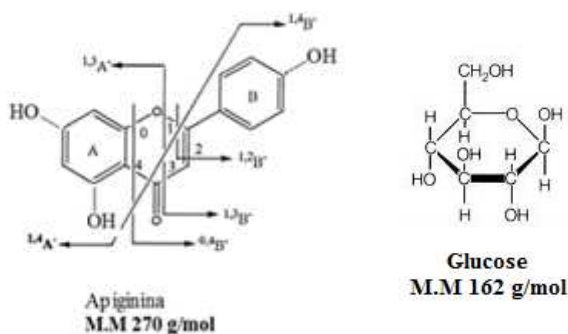


Figure 3.28. Substituinte da estrutura referente ao pico cromatográfico 7.

(H) Pico cromatográfico 8: tricina metoxicinamato

O pico cromatográfico 8 selecionado para discriminação das folhas de cana-de-açúcar da variedade Bowman-Birk em relação à variedade Kunitz, apresentou tempo de retenção em $t_r = 28,5$ minutos, figura 2.12, e $t_r = 29,55$ minutos, figura 3.24-a. Aparentemente, pela varredura do pico cromatográfico, não há indícios de co eluição. Pelo espectro de massas (MS1, figura 3.29-b) obtido no modo negativo, a substância referente ao pico 8, apresentou $[M]^- = 651,7$, figura 3.24-b.

Entretanto, os espectros MS2 para as variedades apresentam diferenças de um próton entre si (figura 3.29-c e d), sugerindo tratar-se de substâncias distintas. Para a variedade Kunitz, o espectro MS2 apresentou o íon m/z 328,5, indicando a saída de 323,4 Da e o íon m/z 320,4 indicando saída 331 Da. Esta substância não foi identificada neste trabalho.

Para a variedade Bowman-Birk (figura 3.29-d), observa-se em m/z 321,6 $[M-H-330]^-$ (7%), indicando a saída da aglicona tricina (figura 3.25). O íon m/z 329,4 sugere a perda de 322 Da, referente a metoxicinamato glicosilado (figura 3.30). A substância tricina-7-*O*-(6''-*p*-metoxicinamato)-glicosilado foi anteriormente isolada e identificada por Duarte-Almeida e colaboradores em extratos de garapa [27].

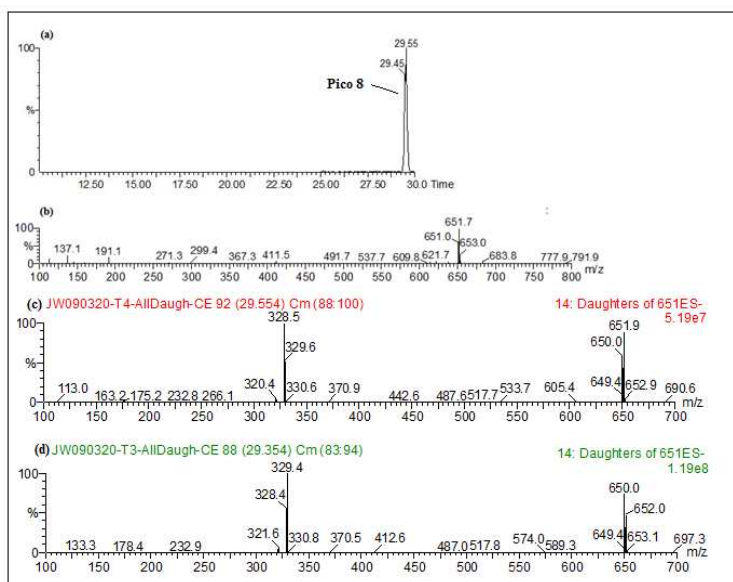


Figura 3.29. (a) Cromatograma de massas (MS); (b) Espectro de massas MS1, $[M-H]^-$ 651; (c) Espectro de massas MS2 $[M-H]^-$ 651 do pico cromatográfico 8, $t_r = 29,5$ minutos, para as amostras de folhas Kunitz; (d) Espectro de massas MS2 $[M-H]^-$ 651, do pico cromatográfico 8, $t_r = 29,5$ minutos, para as amostras de folhas Bowman-Birk.

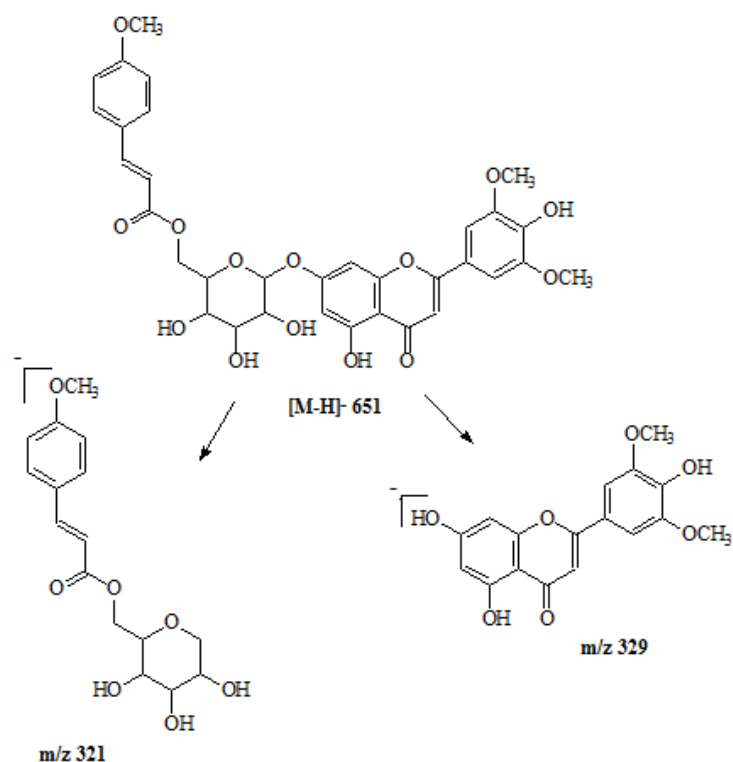


Figura 3.30. Fragmentos encontrados para a substância tricina-7-*O*-(6'-*p*-metoxicinamato)-glicosilado.

(I) Pico cromatográfico 9 ($t_r = 47,3$ minutos, figura 2.12): derivado de catequina

O pico cromatográfico 9 selecionado para discriminação das folhas de cana-de-açúcar da variedade Bowman-Birk em relação à variedade Kunitz, apresentou tempo de retenção em $t_r = 47,3$ minutos, figura 2.12, e $t_r = 44,9$ minutos, figura 3.26 (a). A substância referente ao pico cromatográfico 9 apresentou espectro no ultravioleta distinto das demais regiões selecionadas pela análise quimiométrica. Apenas uma banda de absorção máxima em $\lambda 320$ nm foi observada. Alguns polifenóis como estilbenos apresentam este perfil no espectro de ultravioleta, devido à interação eletrônica π - π referente à presença de dois anéis aromáticos [28]. Com a varredura do pico cromatográfico observou-se co-eluição de substâncias.

O espectro de massas (MS1, figura 3.31-b) obtido no modo negativo, apresentou íon molecular $[M-H]^-$ em m/z 307,5 e fragmentos típicos de derivados de catequina, m/z 289 (íon quasimolecular), m/z 185 e m/z 121, figura 3.31 (c e d). O íon $m/z = 121$, $[M-H-186]^-$ e m/z 289, sugere presença de catequina $[M-H-18]^-$ [29]. Traços do fragmento em m/z 169 e m/z 125 sugerem a presença de uma unidade de ácido gálico, provavelmente proveniente do anel B da catequina (figura 3.32).

Desta forma, não foi possível estabelecer a estrutura completa referente ao íon quase-molecular $[M-H]^-$ 307,5, sendo necessários mais experimentos de espectrometria de massas.

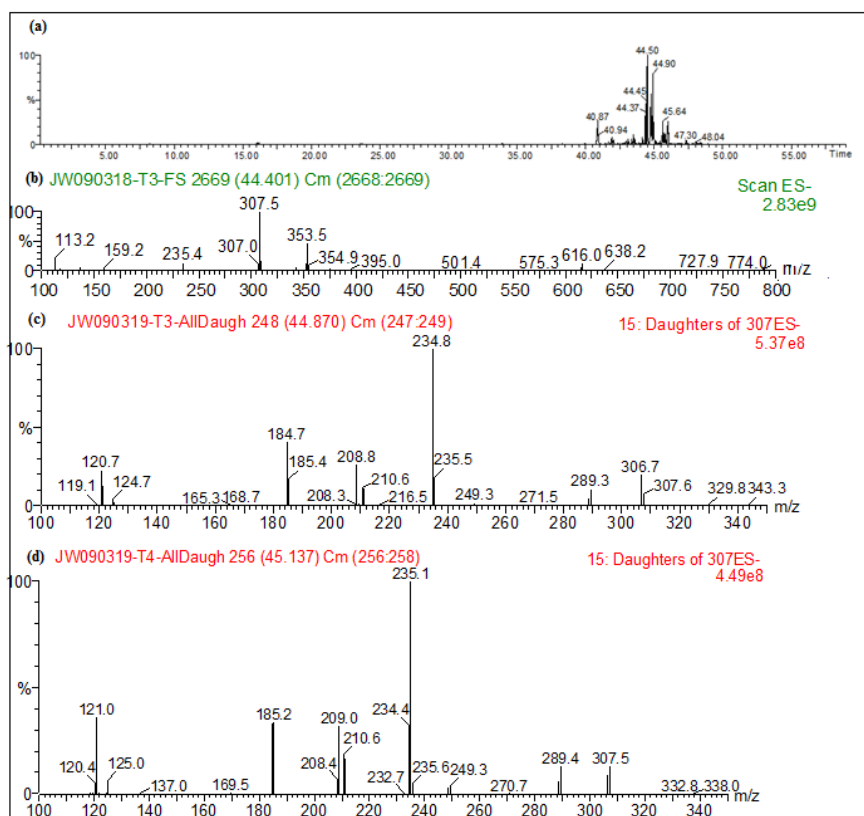


Figura 3.31. (a) Cromatograma de massas (MS); (b) Espectro de massas MS1 do pico cromatográfico 9, $t_r = 44,5$ minutos (c) Espectro de massas MS2 do pico 9, para as amostras de folhas Bowman-Birk; (c) Espectro de massas MS2, do pico cromatográfico 8, para as amostras de folhas Kunitz.

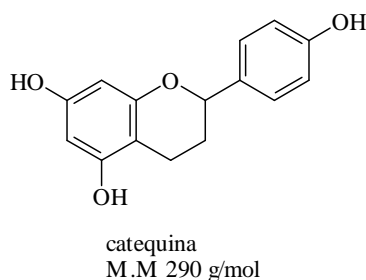


Figura 3.32. Fragmentos encontrados para a substância referente ao pico cromatográfico 9.

3.4. Conclusão Parcial

A espectrometria de massas acoplada com cromatografia líquida de alta eficiência é um método rápido para identificação parcial de substâncias em uma mistura complexa, sem a necessidade de utilizar métodos de isolamento que por sua vez requerem um grande consumo de tempo. Entretanto, para a identificação de substâncias inéditas ou de substâncias isoméricas o isolamento é estritamente necessário.

No caso da identificação do polifenóis da cana-de-açúcar, HPLC-MS foi extremamente útil para a identificação dos fenilpropanóides ($C_6-C_3-C_6$), como o ácido cafeoilquínico e feruloílquínico. Obviamente, apenas utilizando espectrometria de massas algumas informações não são obtidas, como por exemplo, a posição da ligação do éster dos derivados de ácido hidróxicinâmico no ácido quínico. Para a identificação dos mesmos, os espectros MS2 no modo negativo forneceram maiores informações que os espectros obtidos no modo positivo. Por outro lado, o modo positivo é mais recomendado para a identificação dos flavonóides, pois oferece informações dos substituintes na aglicona, enquanto que no modo negativo foi observada, preferivelmente, a quebra do anel C via mecanismo retro-Diels Alder com posterior perda de CO_2 e CO [1].

3.5. Referências Bibliográficas

- [1] CUYCKENS, F.; CLAEYS, M. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. **Journal of Mass Spectrometry**, 39, p.1-15, 2004.
- [2] DE PASCUAL-TERESA, S.; RIVAS-GONZALO, J. C. Application of LCMS for the identification of polyphenols. In *Methods in Polyphenol Analysis*; Santos-Buelga, C., Williamson, G., Eds.; The Royal Society of Chemistry: Cambridge, U.K., p 48-62, 2003.
- [3] WOLFENDER, J.L.; RODREIGUEZ, S., HOSTETTMANN, K. Liquid chromatography coupled to mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy for the screening of plant constituents. **Journal of Chromatography A**, v. 794, 299–316, 1998.
- [4] MA, Y. L. ; LI, Q. M. ; VAN DEN HEUVEL, H.; CLAEYS, M. Characterization of flavone and flavonol aglycones by collision-induced dissociation tandem mass spectrometry. **Rapid Communications Mass Spectrometry**, v. 11, p. 1357–1364, 1997.
- [5] CABRERA, G.M. Mass spectrometry in the structural elucidation of natural products: Glycosides. In *Phytochemistry: Advances in Research*
- [6] SCHIMID, R.D. Structure determination of flavonoids disaccharides by mass spectrometry. **Tetrahedron**, v.28, p.3259-3269, 1972.
- [7] HVATTUM, E; EKEBERG, D. Study of the collision-induced radical cleavage of flavonoid glycosides using negative electrospray ionization tandem quadrupole mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v.38, p.43, 2003.
- [8] ES-SAFI, N.E.; KERHOAS, L.; EINHORN, J.; DUCROT, P.H. Application of ESI/MS, CID/MS and tandem MS/MS to the fragmentation study of eriodictyol 7-*O*-glucosyl-(1→2)-glucoside and luteolin 7-*O*-glucosyl-(1→2)-glucoside. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 247, p.93–100, 2005.
- [9] DOMON, B.; COSTELLO, C.E. A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentation in FAB MS/MS spectra of glycoconjugates. **Glyconjugated Journal**, v.5, p.397-409, 1988.

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

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

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

[13] COLOMBO, R.; YARIWAKE, J.H.; QUEIROZ, E.F.; NDJOKO, K.; HOSTETTMAN, K. On-line identification of minor flavones from sugarcane juice by LC/UV/MS and post-column derivatization. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v.20, p.1574-1579, 2009.

[14] COLOMBO, Renata. Extração e análise cromatográfica (CLAE/EM) dos flavonóides da cana-de-açúcar. São Carlos, 2003. **Tese/doutorado** – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo.

[15] CLIFFORD, M.; JOHNSTONS, K.L.; KNIGHT S.; KUHNERT, N. Hierarchical scheme for LC-identification of chlorogenic acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p.2900-2911, 2003.

[16] WEISZ, G.M.; KAMMERER D.R.; CARLE, R. Identification and quantification of phenolic compounds from sunflower (*Helianthus annuus* L.) kernels and shells by HPLC-DAD/ESI-MSn. **Food Chemistry**, v. 115, p. 758–765, 2009.

[17] DIXON, R.; ACHNINE, L.; KOTA, P.; LIU, C.J.; M. S. SRINIVASA, R.; WANG, L. The phenylpropanoid pathway and plant defence—a genomics perspective. **Molecular Plant Pathology**, v.3, p.371-390, 2002.

[18] VUCKICS, V.; GUTTAMAN, A. Structural characterization of flavonoid glycosides by multi-stage mass spectrometry. **Mass Spectrometry Reviews**, v.29, p.1–16, 2010.

[19] QIMIN, L.; VAN DEN HEUVEL, DELORENZO, H.O.; CORTHOOT, O.; PIETERS, L.A.C.; VLIETINCK, A.J.; CLAEYS, M. Mass spectral characterization of C-glycosidic flavonoids isolated from a medicinal plant (*Passiflora incarnata*). **Journal of Chromatography B**, v.562, p.435-446, 1991.

[20] PAULI, G.F.; POETSH, F.; NAHRSTEDT, A. Structure assignment of natural quinic acid derivatives using proton nuclear magnetic resonance techniques. **Phytochemical Analysis**, v.9, p.177-185, 1998.

[21] LIN, L.Z.; HARNLY, J.M. Identification of hydroxycinnamoylquinic acids of arnica flowers and burdock roots using a standardized LC-DAD-ESI/MS profiling method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, p.101021-10114, 2008.

[22] MABRY, T.J.; MARKHAN, K.R.; THOMAS, M.B. **The Systematic Identification of Flavonoids**. New York, Ed. Springer-Verlag, 1970. p.3-35.

[23] BANDU, M.L.; GRUBBS, T.; HEATHER, M.K.; DESAIRE, H. Collision induced dissociation of alpha hydroxy acids: Evidence of an ion-neutral complex intermediate. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 251, p.40–46, 2006.

[24] sinapoil hexose

[25] PAREJOL, I.; JÁ'UREGUI, O.; VILADOMAT, F.; BASTIDA, J.; CODINAL, C. Characterization of acylated flavonoid-O-glycosides and methoxylated flavonoids from *tagetes maxima* by liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Rapid Communication in Mass Spectrometry**, v.18, p. 2801–2810, 2004.

[26] JIN, Y.; XIAO, Y.; ZHANG, F.; XUE, X.; XU, Q.; LIANG, X. Systematic screening and characterization of flavonoid glycosides in *Carthamus tinctorius* L. by liquid chromatography/UV diode-array detection/electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 46, p.418–430, 2008.

[27] DUARTE-ALMEIDA, J. M.; NEGRI, G.; SALATINO, A.; DE CARVALHO, J.E.; LAJOLO, F.M. Antiproliferative and antioxidant activities of a triclin acylated glycoside from sugarcane (*Saccharum officinarum*) juice. **Phytochemistry**, v.68, p.1165–1171, 2007.

[28] PUSSA, T.; FLOREN, J.; KULDKEPP, P.; RAAL, A. Survey of Grapevine *Vitis vinifera* stem polyphenols by liquid chromatography-diode array detection-tandem mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, p. 7488-7494, 2006.

[29] Li, H.; DEINZER, M.L. Tandem Mass Spectrometry for Sequencing Proanthocyanidins. **Analytical Chemistry**, v.79, 1739-1748, 2007.

Capítulo 4

Capítulo 4. Estudo preliminar do metaboloma das variedades transgênicas e seus respectivos controles da cana-de-açúcar

4.1. Introdução

Plantas são seres sésseis, e por isso são incapazes de escaparem das condições ambientais impostas a elas. Como resultado, estes organismos tiveram que desenvolver condições bioquímicas para adaptação ao meio ambiente. Desta forma, o genótipo das plantas está relacionado com respostas ambientais, gerando uma relação específica entre genes e fenótipo que por sua vez é altamente dependente das condições de crescimento e desenvolvimento da planta, como esquematizado na figura 4.1 [1].

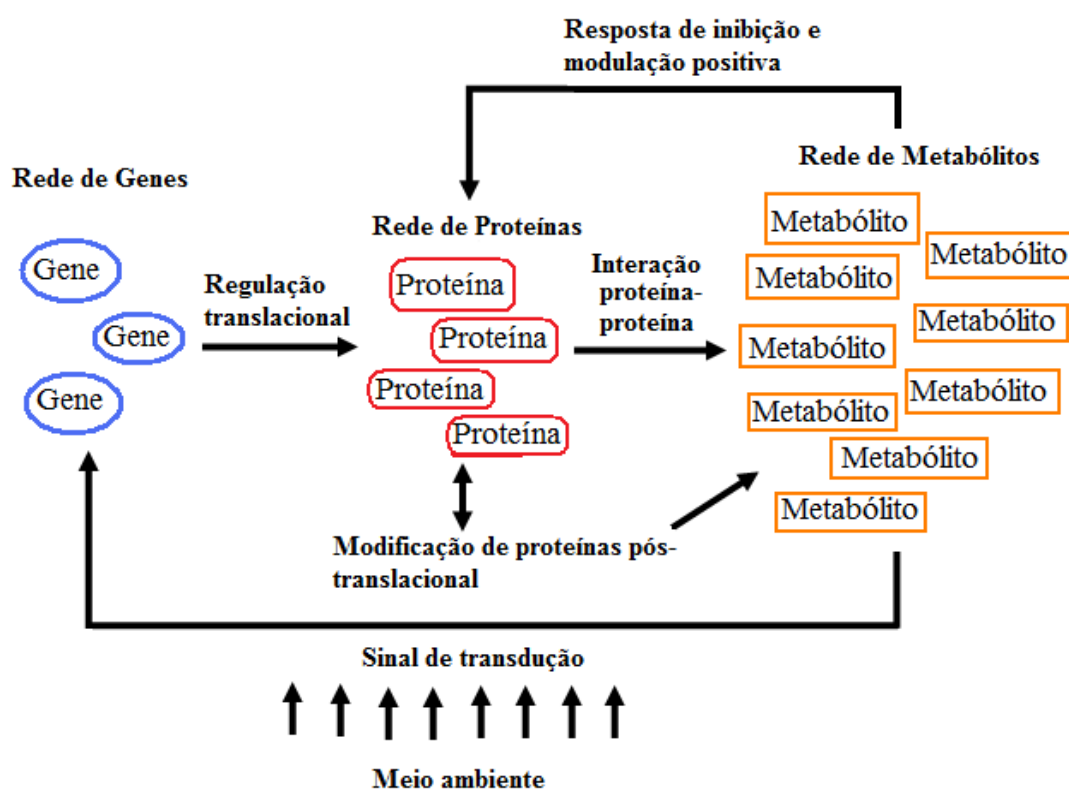


Figura 4.1. Representação da correlação entre fenótipo com o genótipo e condições ambientais.

Estudos sobre o genoma funcional de plantas aliados com análises multiparalelas sobre os produtos dos genes (mRNA e proteínas), vêm sendo aplicados com o objetivo de compreender as interações sobre os componentes biológicos de um organismo. Entretanto, estes métodos, além de serem complexos, não fornecem informações diretas sobre o quanto as mudanças que ocorrem no proteoma e transcriptoma das plantas, refletem em alterações nas funções biológicas [2]. Por isso, para determinar as relações entre genoma, proteoma, transcriptoma e meio ambiente, é importante analisar também o metaboloma, pois de acordo com os metabólitos expressos em uma planta, é possível determinar hipóteses sobre as rotas biossintéticas (biogênese).

A análise metabolômica consiste em mapear todos os metabólitos expressos em plantas sob determinadas condições de cultivo, tanto qualitativamente quanto quantitativamente. Entretanto, há uma grande complexidade em detectar e identificar todos os metabólitos devido às diferenças físico-químicas das substâncias produzidas pelas plantas, como por exemplo, solubilidade e polaridade. Desta forma, um ou mais métodos analíticos apropriados devem ser selecionados com o objetivo de identificar a maior parte dos metabólitos [3]. Espectrometria de massas acoplada à cromatografia e técnicas de ressonância nuclear magnética (RMN) são os métodos analíticos mais utilizados no estudo do metaboloma de plantas. Neste trabalho preliminar sobre o metaboloma das variedades de cana-de-açúcar Bowman-Birk e Kunitz, foram utilizadas técnicas de RMN em 1D e 2D, para detectar um grande número de substâncias independentemente de volatilidade, presença de cromóforos, polaridade, etc, além da RMN ser uma técnica reprodutível.

O estudo do metaboloma pode ser aplicado em diversas áreas como, por exemplo, no controle de qualidade de alimentos [4-6], na discriminação de plantas com diferentes genótipos ou tratamentos de cultivo [7-8] e como estratégia de identificação da função de genes desconhecidos [9].

Hendrawati e colaboradores (2006) estudaram a resposta ao estresse em plantas da espécie *Arabidopsis thaliana* por RMN e PCA, verificando que as plantas submetidas a tratamento com metil jasmonato mostraram aumento da produção de alguns metabólitos, como por exemplo, flavonóides, ácido fumárico e triptofano, quando comparadas às plantas controles [10].

Widarto e colaboradores (2006) avaliaram alterações metabólicas em folhas de *Brassica rapa* L. atacada por larvas da família Lepidoptera, através de RMN e análise multivariada [11]. Alanina, treonina, glucose, sucrose, feruloila malato, sinapoila malato e gluconapina foram os metabólitos que contribuíram para a discriminação de plantas saudas e plantas atacadas.

Através de análises de RMN e quimiometria, Choi e colaboradores (2005) classificaram 11 espécies de *Ilex* baseado em perfis metabolomicos, sendo que os metabólitos mais significantes para a classificação foram a arbutina, cafeína, treobromina e fenilpropanóides [12].

O capítulo 4 apresenta o estudo preliminar do metaboloma das variedades transgênicas e seus respectivos controles com o objetivo de verificar a possibilidade em discriminar as plantas transgênicas de seus controles, através de ^1H RMN e de PCA, além de identificar o maior número de metabólitos presentes nos extratos de folhas e garapa da cana-de-açúcar, utilizando RMN unidimensional (1D) e bidimensional (2D). Neste estudo não foram obtidos dados quantitativos, apenas uma análise qualitativa foi realizada em relação aos metabólitos produzidos pelas variedades de cana-de-açúcar.

4.2. Parte Experimental

4.2.1. Materiais e Reagentes

- Solventes: methanol grau analítico - Merck Biosolved Ltd. (Valkenswaard, The Netherlands), CD_3OD (99.96%) e D_2O (99.00%) da Cambridge Isotope Laboratories Inc. (Miami, FL, USA), NaOD da Cortec (Paris), sal de sódio do ácido trimetilsilano propiônico (TPS) e fosfato dihidrogenado de potássio da Merk (Darmstadt, Germany).
- Tubos de RMN de 5 mm.

4.2.2. Material Vegetal

Neste trabalho, utilizou-se as folhas das variedades transgênicas e seus controles nas análises dos perfis metabólicos. As plantas transgênicas foram obtidas através do prof. Dr. Marcio de Castro Silva Filho da Escola de Agricultura Luiz de Queiroz-ESALQ-USP. O material vegetal foi coletado em agosto/2008 no Centro de Tecnologia Canavieira (CTC), Piracicaba-SP. Cada planta foi cultivada em vasos individuais, sob condições de temperatura e umidade controlados em casa de plantio. Foram coletados 42 plantas, sendo que 21 vasos continham plantas modificadas com o gene da soja inibidor de proteinase Bowman-Birk, 15 vasos plantas modificadas com o inibidor Kunitz, 3 vasos com as plantas controle para a variedade Bowman-Birk e os outros 3 com os controles para a variedade Kunitz.

Após a coleta, as folhas foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido, em seguida trituradas em blinder e liofilizadas. Todo o material foi armazenado em refrigerador à -80 °C, até o momento da extração.

4.2.3. Método para extração do material vegetal

Devido às diversidades físico-químicas das substâncias expressas em plantas, como por exemplo, alcalóides, flavonóides, amino-ácidos, carboidratos, ácidos graxos, lipídeos, esteróides e terpenóides, a escolha apropriada dos solventes de extração é a etapa mais importante para o estudo do metaboloma de plantas. Choi e colaboradores (2004), mostraram que uma grande diversidade de metabólitos é extraída utilizando mistura de metanol e água (1:1) [3].

Para facilitar as análises metabolômicas, através de experimentos de RMN, de um grande número de amostras, é preferível extrair o material vegetal diretamente com solventes deutérios. Desta forma, evitam-se perdas e degradação de substâncias durante o processo de preparo de amostra. A reprodutibilidade é um fator importante na comparação de perfis metabólicos, por isso, em análises por RMN, é necessário manter o pH da solução estável para evitar a ionização de determinados metabólitos, como por exemplo, alcalóides e flavonóides, que afeta diretamente os deslocamentos químicos

dos prótons destas substâncias. Para inibir este efeito utilizam-se tampões ou adiciona-se ácido às soluções para análise [3].

Neste trabalho, para a análise da folhas da cana-de-açúcar, dois métodos de extração foram utilizados: método direto de extração e método indireto. O método direto consistiu em extração direta com solventes deuterados e tampão de fosfato dihidrogenado de potássio (KH_2PO_4), ajustado com 1N de NaOD à $\text{pH} = 6$, para análise imediata no espectrômetro de RMN, como apresentado na figura 4.2.

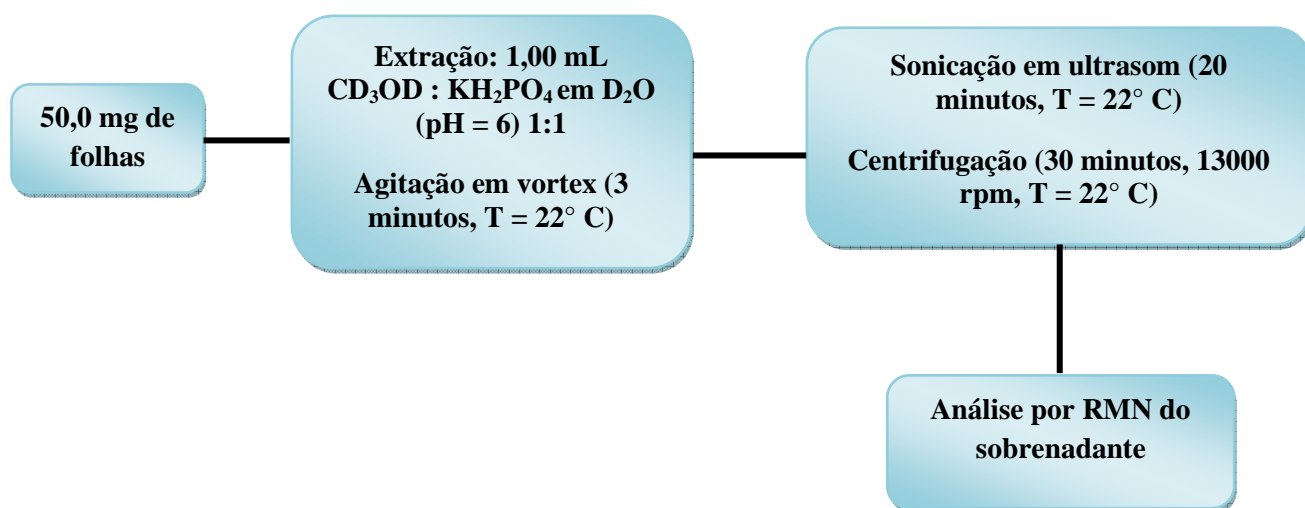


Figura 4.2. Método direto de extração para as amostras de folhas das variedades de cana-de-açúcar.

O método indireto de extração consistiu na utilização de solventes grau analítico, além de uma etapa para diminuir a concentração de açúcares (precipitação), com o objetivo de diminuir os sinais de prótons anoméricos, a fim de detectar sinais de outras substâncias na região de δ 5,50 à 3,80 ppm, além de aumentar os sinais de próton aromáticos na região de δ 6,00 à 8,50 ppm. Para isto, neste trabalho realizou-se a extração das folhas liofilizadas com metanol e posterior precipitação dos açúcares adicionando água e centrifugando o extrato para obtenção do sobrenadante. Após a

coleta do sobrenadante, o solvente foi completamente evaporado em rota-evaporador e o extrato foi re-suspendido em solvente deuterado na proporção de 8:2 de CD₃OD e KH₂PO₄ em D₂O (pH 6) para análise de RMN. A metodologia para a extração indireta está representada pelo esquema da figura 4.3.

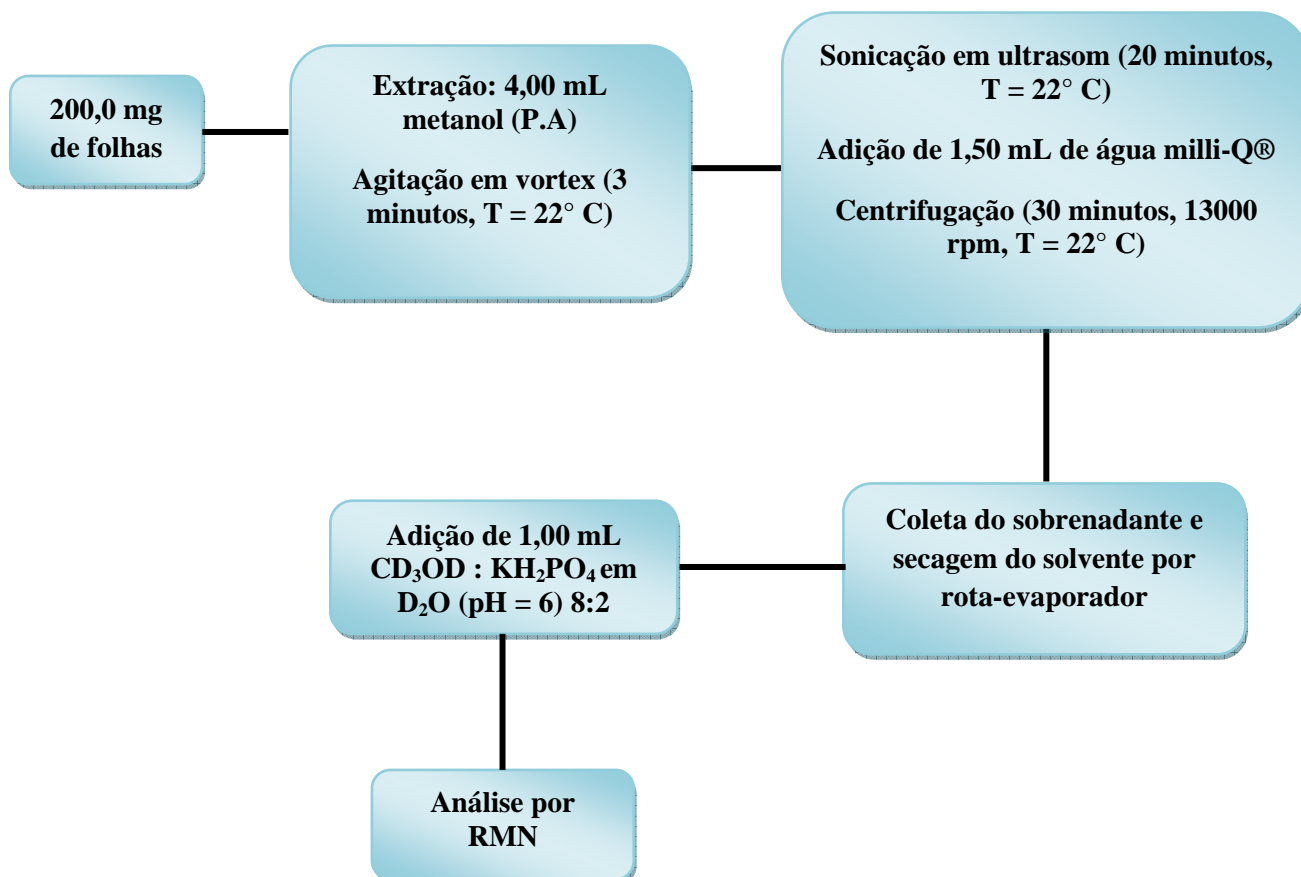


Figura 4.3. Método indireto de extração utilizado para as amostras de folhas das variedades de cana-de-açúcar.

Em todas as análises de RMN ¹H, adicionou-se aos extratos 0,05% (m/m) de sal de sódio do ácido trimetilsilano propiônico (TSP, δ = 0,00 ppm), como padrão interno, para calibração e ajuste de fase dos espectros de RMN ¹H.

4.2.4. Parâmetros para análise no espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de ^1H e *J*-Resolved foram obtidos em um equipamento de ressonância magnética nuclear à 25° C em espectrômetro de 500 MHz (Bruker AV-500) operando na frequência do próton de 500.13 MHz. Para calibração interna (internal lock) foi utilizado o sinal do metanol- d_4 . Cada espectro de RMN ^1H consistiu em 128 scans com tempo de aquisição de 10 minutos seguindo os parâmetros: 0,25 Hz/ponto, comprimento de pulso (PW) = 90° (6,6 μs), e tempo de relaxação (RD) = 5,0s. Utilizou-se uma sequência de presaturação para suprimir o sinal de água. Transformada de Fourier - FIDs com LB = 0.3 Hz e os espectros foram “zero filtered” à 32 K pontos. O espectro resultante foi manualmente alinhado e calibrado no sinal do TSP à 0.00 ppm, usando o programa XWIN NMR (versão 3.5 Bruker). O espectro de *J*-Resolved RMN ^1H foi adquirido usando 8 scans por 32 incrementos, coletado dentro de 16 K pontos de dados, com comprimento espectral de 5,208 kHz em F2 (eixo do deslocamento químico) e 50 Hz em F1 (acoplamento spin-spin). Empregou-se 1,0 s de tempo de relaxação resultando em total de tempo de aquisição de 14.52 min.

O espectro de COSY ^1H - ^1H foi adquirido com tempo de relaxação de 1.0 s e comprimento espectral de 4194 Hz em ambas as dimensões. O espectro de HMQC ^1H - ^{13}C foi obtido com tempo de relaxação de 1,0 s e comprimento espectral de 4401 Hz em F2 e 14500 Hz em F1.

4.2.5. Tratamento Quimiométrico

Neste trabalho, os espectros de RMN ^1H foram automaticamente reduzidos à extensão ASCII através do programa AMIX (versão 3.7, Bruker Biospin). As intensidades dos sinais dos espectros, na região de δ 0,4 à 10 ppm, foram escaladas com base na intensidade do sinal do TSP, e as regiões foram integradas e divididas no comprimento de 0,04 ppm. O sinal residual de água (δ 4,7-5,0 ppm) e o sinal do solvente CD_3OD (δ 3,30 - 3,33 ppm) foram excluídos da matriz de dados.

Para análise de componentes principais (PCA) foi utilizado o Software MATLAB versão 6.5 (The Mathwork, Natick, USA) juntamente com o pacote computacional PLS_Toolbox (Eingvector Research, Inc. – PLS_Toolbox versão 5.00).

4.3. Resultado e Discussão

4.3.1. Análise geral dos metabólicos das amostras de folhas das variedades transgênicas Bowman-Birk e Kunitz e seus respectivos controles por RMN em 1D e 2D

Imediatamente após a coleta de uma planta, o dano sofrido por ela age como sinal para seu sistema bioquímico resultando em diversas reações de defesa. O mecanismo de defesa das plantas consiste basicamente em reações de oxidação e hidrólise dos metabólitos expressos, que continuam de 12 até 72 horas após o dano causado à planta. Até mesmo novas substâncias podem ser produzidas, principalmente relacionadas à biossíntese das fitoalexinas, desde que o material biológico seja armazenado à temperatura ambiente. A fim de evitar tais reações, o material vegetal deve ser imediatamente congelado à temperatura de - 80°C após a coleta, desativando enzimas e cessando reações bioquímicas [3]. Outro fator a ser considerado é a liofilização do material vegetal após o congelamento, pois as plantas vivas possuem aproximadamente de 70 a 80% de água. Na análise de perfis metabólicos, esta água será misturada ao solvente de extração, alterando a proporção do solvente e ocasionando baixa reprodutibilidade nos perfis. Por isso, é importante congelar o material vegetal em N_{2(l)}, triturar em blinder para diminuir o tamanho de partícula e, conseqüentemente, aumentar a área superficial e por fim remover toda a água através da liofilização.

A identificação dos metabólitos de plantas através de técnicas de RMN foi iniciada avaliando-se o espectro de RMN ¹H, que não apenas fornece os deslocamentos químicos característico dos prótons das substâncias (δ , ppm), como também a multiplicidade dos sinais e das interações spin-spin [14]. Assim, os sinais obtidos no espectro de RMN ¹H foram comparados com os espectros de substâncias padrões de

ocorrência natural em plantas, como amino-ácidos, ácidos fenólicos, carboidratos, terpenos, alcalóides e ácidos graxos, obtidos nas mesmas condições experimentais das amostras de folhas [15]. De uma maneira geral e simplificada, o espectro de RMN ^1H pode ser dividido em regiões em que uma determinada classe de substâncias pode ser detectada através dos deslocamentos e multiplicidade dos prótons bem característicos a elas, como indica a figura 4.4.

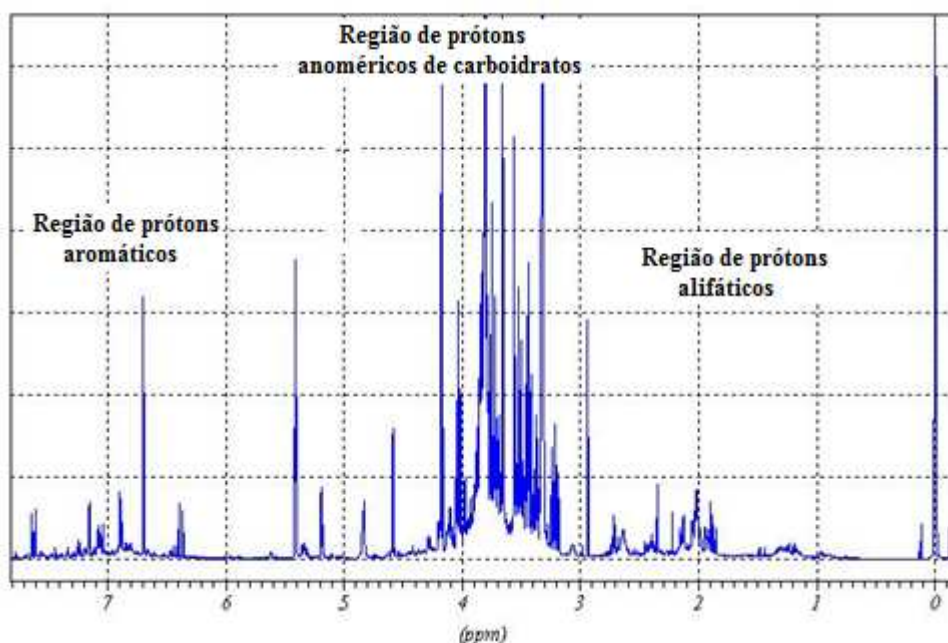


Figura 4.4. Espectro de RMN ^1H (500,13 MHz) em $\text{CD}_3\text{OD-KH}_2\text{PO}_4$ e D_2O (1:1) da amostra de folha do controle da variedade transgênica Bowman-Birk (WTB), referente à extração direta (item 4.2.3), para ilustrar as regiões contendo os sinais de prótons característicos para aminoácidos, carboidratos e polifenóis.

No geral, a região central do espectro (δ 5,60 – 3,90 ppm) apresenta sinais de prótons anoméricos característicos de carboidratos, como por exemplo, sucrose, frutose, glucose, xilose, etc. Na região de alto campo do espectro (δ 0,4-3,8 ppm), encontram-se os sinais característicos de metilas em aminoácidos alifáticos, como por exemplo, alanina, treonina, colina, glutamina, etc, e H- α,β de ácidos carboxílicos alifáticos, como por exemplo, ácido succínico, ácido logânico, ácido málico e ácido cítrico. Já em

relação à região de baixo campo (δ 6,00 - 8,00 ppm), apresenta sinais dos prótons aromáticos (H- *o,m,p*) de aminoácido aromáticos, como é o caso da fenilalanina e tirosina, bem como para substâncias fenólicas e/ou polifenólicas, como por exemplo, flavonóides, derivados de ácidos cinâmicos, etc [10 e 16-17].

Entretanto, apenas a análise do espectro de próton não é o suficiente para identificar a multiplicidade de sinais e os acoplamentos spin-spin, devido à sobreposição de sinais, uma vez que a amostra é complexa e possui grande diversidade de substâncias. A fim de aumentar a resolução dos espectros de prótons é essencial a aquisição de espectros de *J*-Resolved, que separa o deslocamento químico e o acoplamento spin-spin em dois eixos distintos: F1 para acoplamento spin-spin e F2 para deslocamento químico [16]. A figura 4.5 apresenta o espectro de *J*-resolved para amostras de folhas (extração direta, item 4.2.3, figura 4.2) do controle da variedade Bowman-Birk.

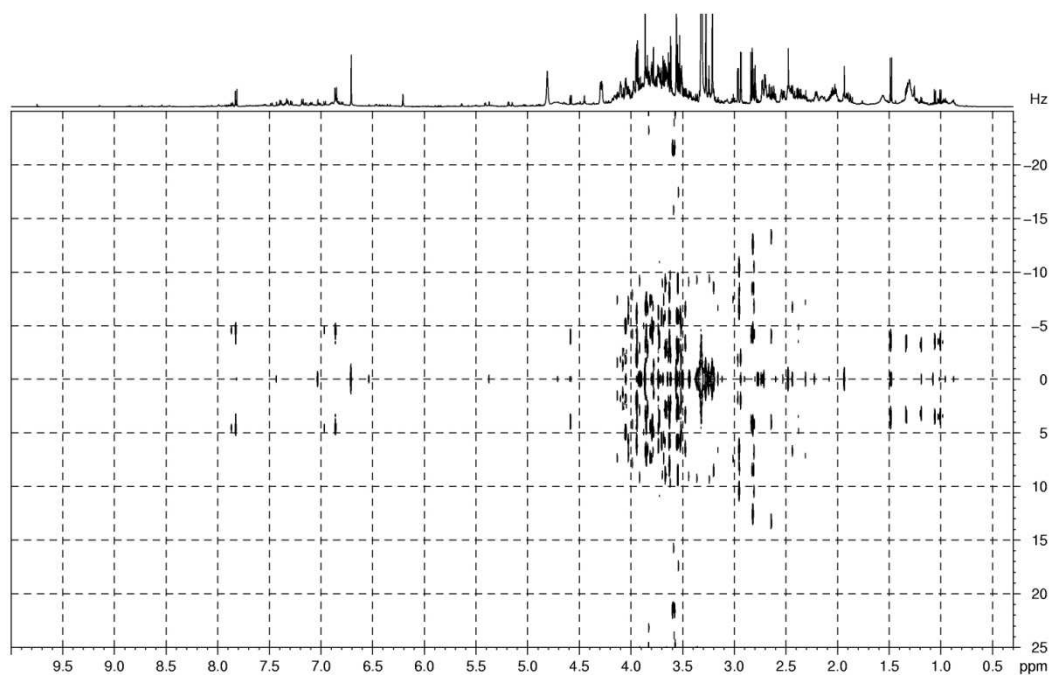


Figura 4.5. Espectro de *J*-resolved, em $\text{CD}_3\text{OD-KH}_2\text{PO}_4$ e D_2O (1:1) da amostra de folha do controle da variedade transgênica Bowman-Birk (WTB), obtida por extração direta (item 4.2.3).

Os espectros de 2D são essenciais para a confirmação estrutural dos metabólitos. Há diversos experimentos de RMN em duas dimensões, sendo que os mais usados em análise metabolômica são: a espectroscopia de correlação homonuclear (COSY ^1H - ^1H), a espectroscopia de correlação total (TOCSY), que fornecem informações sobre conectividade e correlações entre os prótons [18-19] e espectroscopias de correlação heteronuclear ^1H - ^{13}C (HSQC e HMBC), que fornecem informações de conectividade entre dois núcleos distintos. Em particular, experimento de RMN em 2D de correlação heteronuclear direta - J^1 (HSQC) é utilizado para identificar, por exemplo, carbonos anoméricos de carboidratos (δ 90-110 ppm), C-6 e C-8 de flavonóides (δ 95-125 ppm) e carbonos metilênicos de terpenos (δ 15-25 ppm), enquanto que experimento de correlação a longa distância - J^2 e J^3 (HMBC) têm como finalidade confirmar a estrutura da substância [3 e 17-19].

Neste trabalho, foram obtidos os seguintes espectros de RMN em 1D e 2D, para identificação dos metabólitos presentes nos extratos de folhas das variedades de cana-de-açúcar: RMN ^1H (figura 4.4), J -Resolved (figura 4.5), COSY ^1H - ^1H (figura 4.6) e HMBC ^1H - ^{13}C (figura 4.7).

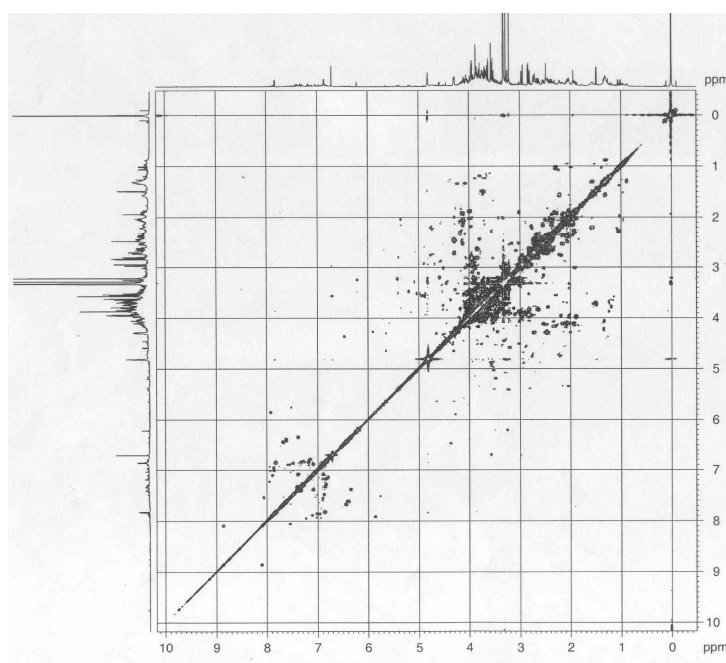


Figura 4.6. Espectro de COSY ^1H - ^1H , em CD_3OD - KH_2PO_4 e D_2O (1:1) da amostra de folha do controle da variedade transgênica Bowman-Birk (WTB), obtida por extração direta (item 4.2.3).

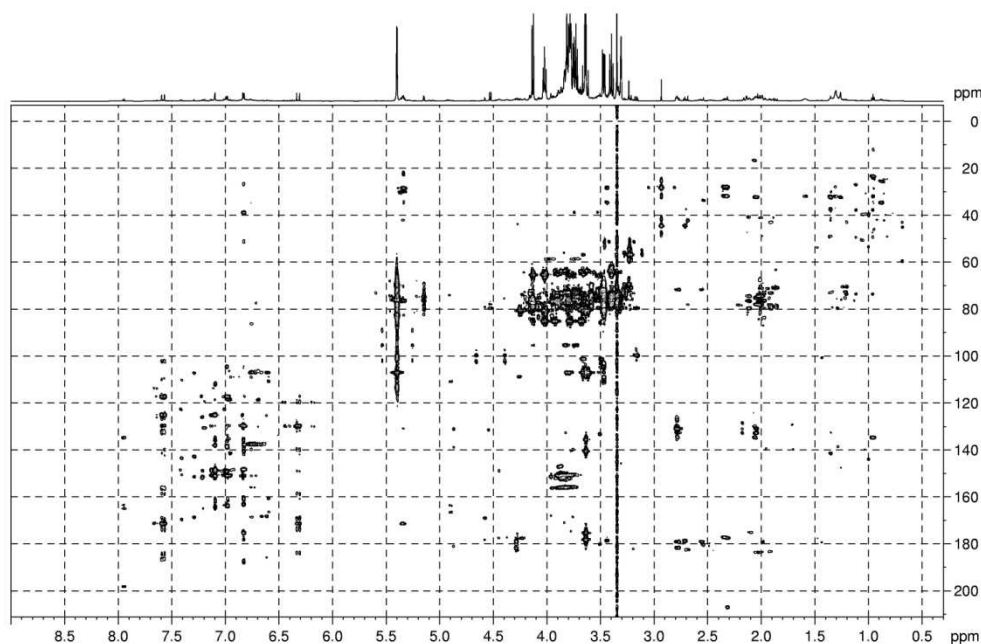


Figura 4.7. Espectro de HMBC ^1H - ^{13}C , em $\text{CD}_3\text{OD-KH}_2\text{PO}_4$ e D_2O (8:2) da amostra de folha do controle da variedade transgênica Bowman-Birk (WTB), obtida por extração indireta (item 4.2.3).

4.3.2. Identificação dos metabólitos das amostras de folhas das variedades transgênicas Bowman-Birk e Kunitz e seus respectivos controles por RMN em 1D e 2D

Neste item do capítulo 4, será discutido a identificação das substâncias presentes nos extratos da folhas das variedades transgênicas e seus respectivos controles utilizando informações dos espectros de ^1H RMN, *J*-resolved, COSY ^1H - ^1H (figuras 4.4-4.6), obtidos para as amostras de folhas resultantes dos dois métodos de extração descritos no item 4.2.3. O espectro de HMBC ^1H - ^{13}C , figura 4.7, foi adquirido apenas para a amostra de folha proveniente do método indireto de extração (item 4.2.3, figura 4.3).

A primeira região a ser considerada neste estudo para a identificação dos metabólitos presentes nos extratos de folhas das variedades transgênicas e seus respectivos controles foi a região de alto campo. Nesta região, verificou-se a presença de próton de metila característico da alanina ou ácido-2-aminopropanóico (figura 4.8) em δ 1,49 ppm (d, $J = 7,2$ Hz), figura 4.9 e 4.10 [15, 20]. O espectro de COSY ^1H - ^1H (acoplamento próton-próton vicinal, ^1H - ^1H), figura 4.13, foi utilizado para confirmar a presença de alanina, verificando a correlação entre o próton da metila em δ 1,49 ppm (H-3, d, $J = 7,2$ Hz) com próton do carbono alfa (H- α) carboxila em δ 3,74 ppm (H-2, m). Pelo espectro de HMBC ^1H - ^{13}C (resultado do acoplamento entre próton e carbono, ^1H - ^{13}C até três ligações), figura 4.14, observou-se correlações entre o H-3 (δ 1,49 ppm) com carbono de carboxila em δ 178 ppm (C-1) e com carbono sp_3 de amina vizinho a COOH em δ 54,0 ppm (C-2). No espectro de RMN ^1H e J -Resolved (figura 4.9, 4.11 e 4.12), pôde ser observado a presença de dois tripletos em δ 2,53 ppm (t, $J = 6,5$ Hz) e δ 3,16 ppm (t, $J = 6,5$ Hz) característico de β -alanina (figura 4.6). Pelo espectro de COSY ^1H - ^1H (figura 4.11), pode-se observar a correlação entre os prótons em δ 2,53 ppm e δ 3,16 ppm, confirmando a presença de β -alanina. Além disso, o espectro de HMBC ^1H - ^{13}C mostrou a correlação entre o próton em δ 2,53 ppm com o carbono carboxílico (C-1) em δ 179 ppm e carbono sp_3 de amina em δ 42 ppm (C-3), figura 4.12.

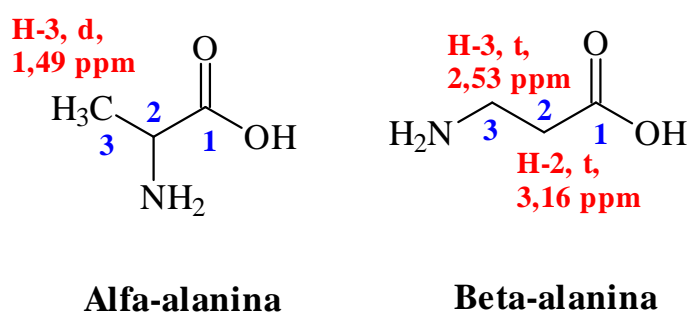


Figura 4.8. Estrutura da α -alanina e β -alanina.

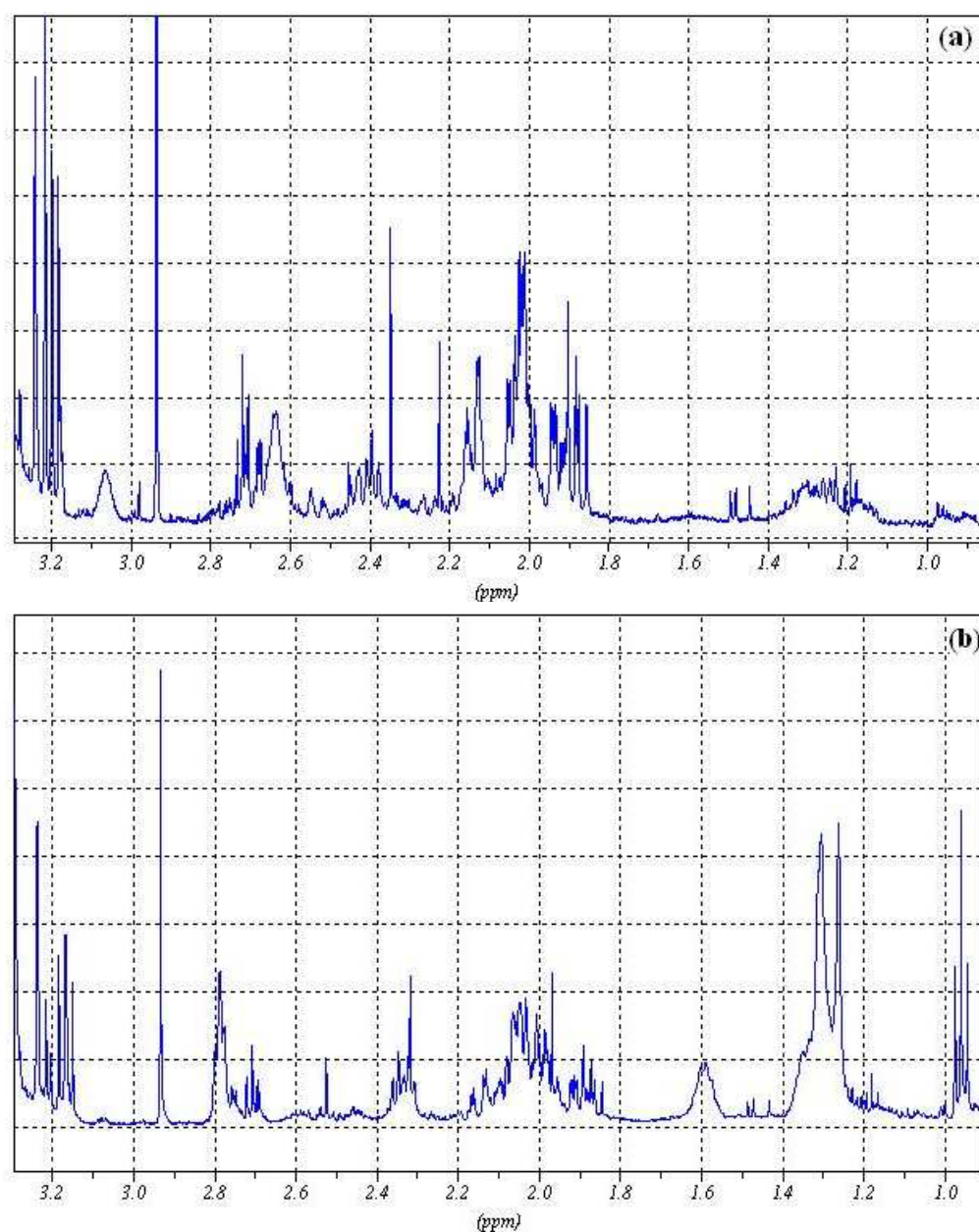


Figura 4.9. Espectro de ¹H RMN (500,13 MHz), expandido para a região de δ 0,9-3,3 ppm, para extrato de folha: (a) utilizando extração direta com CD₃OD-KH₂PO₄ e D₂O (1:1); (b) utilizando extração indireta com CD₃OD-KH₂PO₄ e D₂O (8:2).

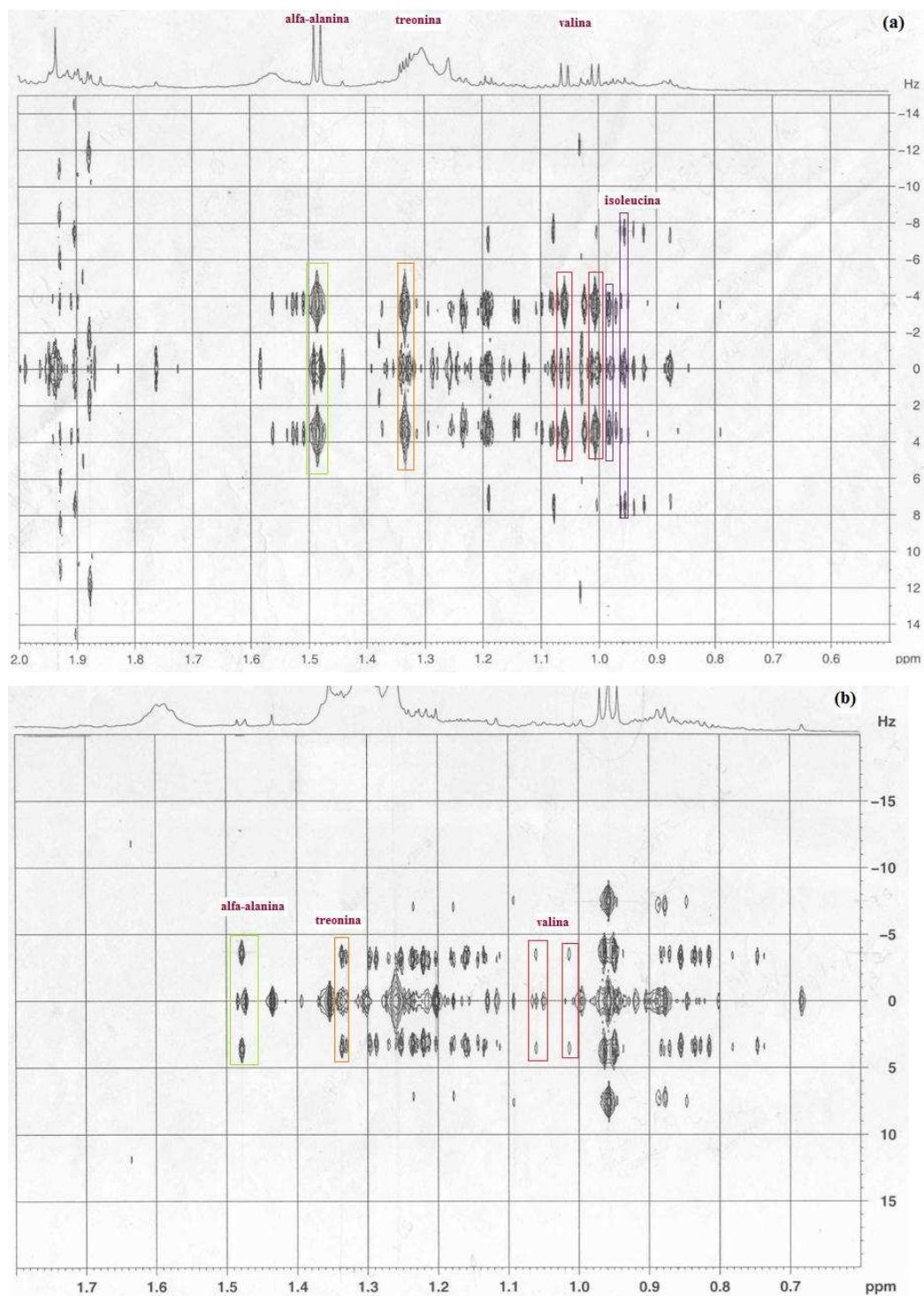


Figura 4.10. Espectro *J*-resolved expandido para a região em δ 0,50-2,00 ppm, para extrato de folha: (a) utilizando extração direta com $\text{CD}_3\text{OD-KH}_2\text{PO}_4$ e D_2O (1:1); (b) utilizando extração indireta com $\text{CD}_3\text{OD-KH}_2\text{PO}_4$ e D_2O (8:2).

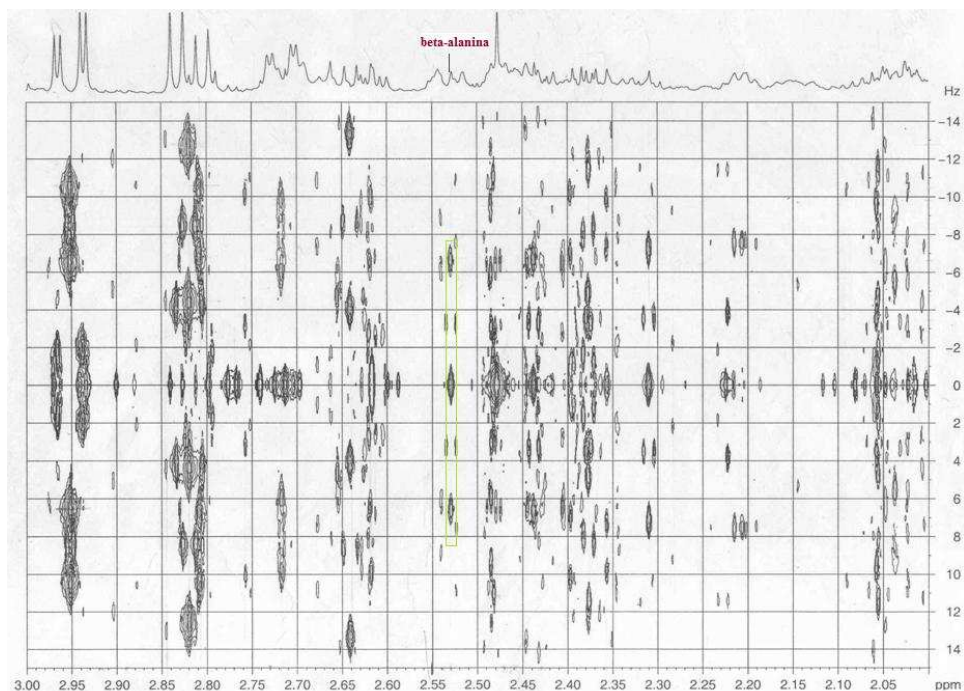


Figura 4.11. Expansão do espectro *J*-Resolved na região de δ 2,00 – 3,00 ppm, obtido para a extração direta $\text{CD}_3\text{OD-KH}_2\text{PO}_4$ e D_2O (1:1): β -alanina (δ 2,53 ppm, tripleto, $J = 6,50$ Hz).

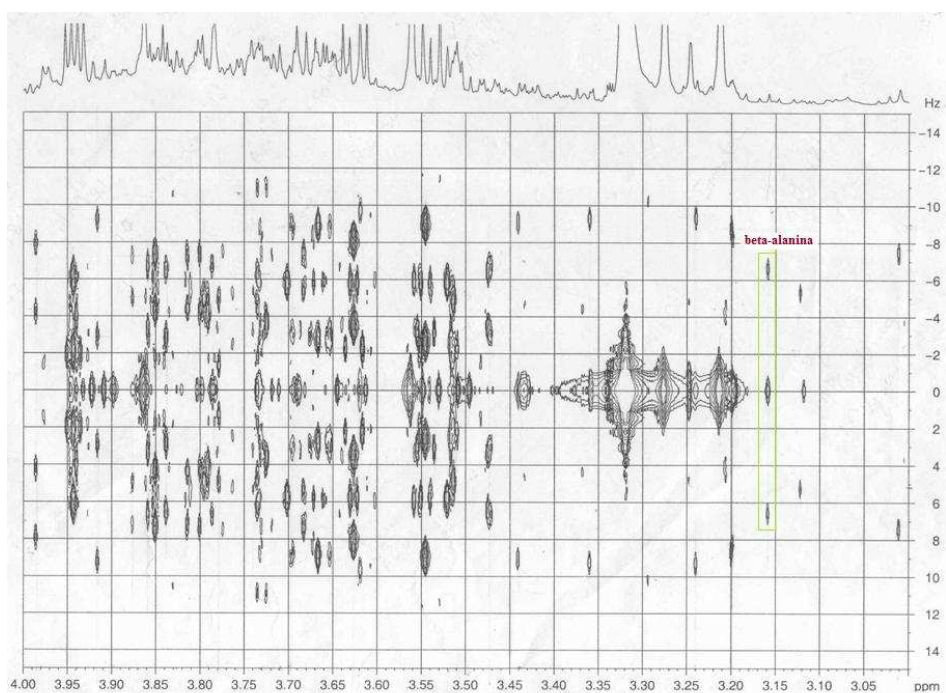


Figura 4.12. Expansão do espectro *J*-Resolved na região de δ 3,00-4,00 ppm, obtido para a extração direta $\text{CD}_3\text{OD-KH}_2\text{PO}_4$ e D_2O (1:1): β -alanina (δ 3,16 ppm, tripleto, $J = 6,50$ Hz).

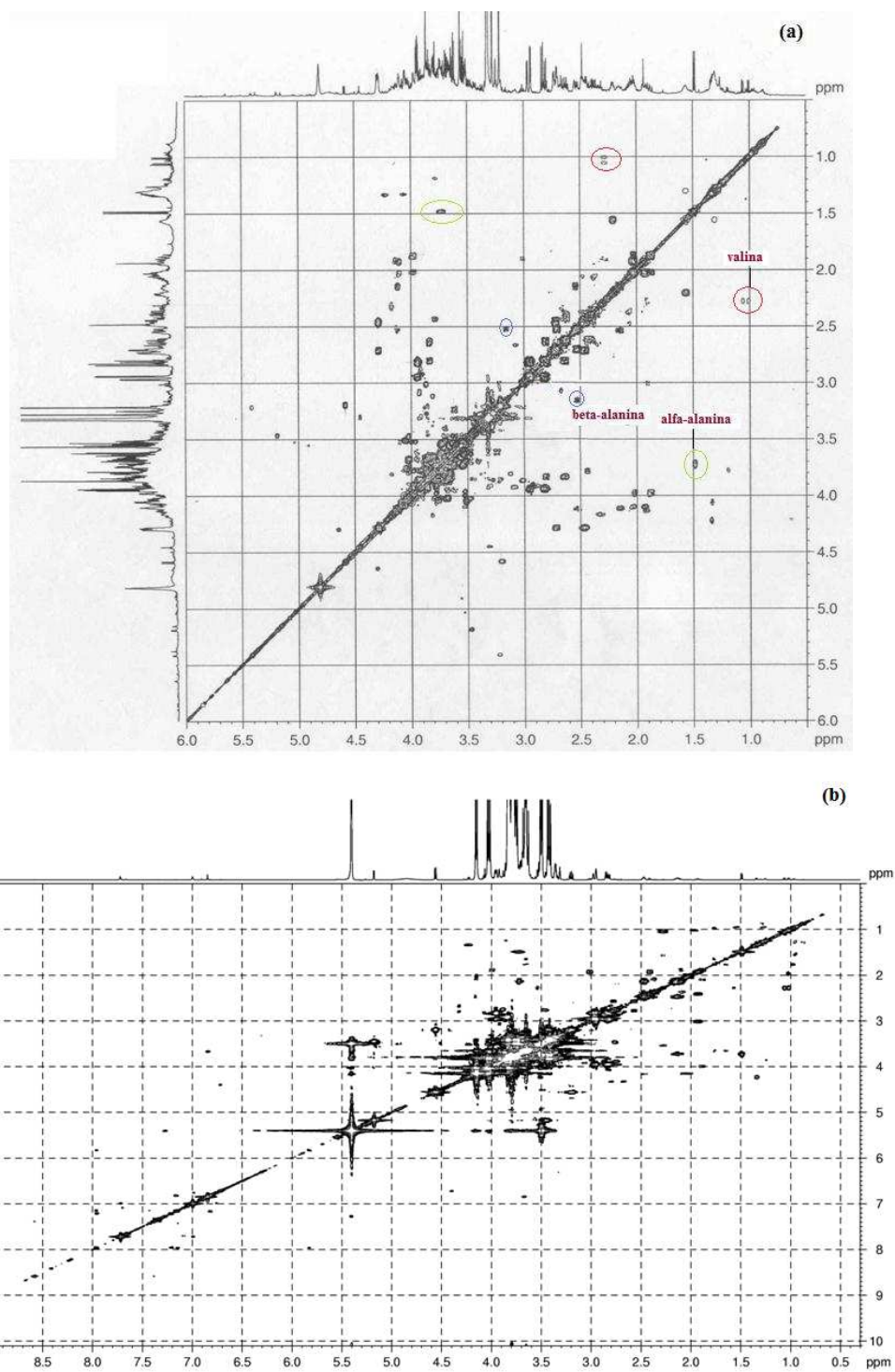


Figura 4.13. Espectro de COSY ^1H - ^1H para extrato de folha: (a) utilizando extração direta com $\text{CD}_3\text{OD-KH}_2\text{PO}_4$ e D_2O (1:1); (b) utilizando extração indireta com $\text{CD}_3\text{OD-KH}_2\text{PO}_4$ e D_2O (8:2).

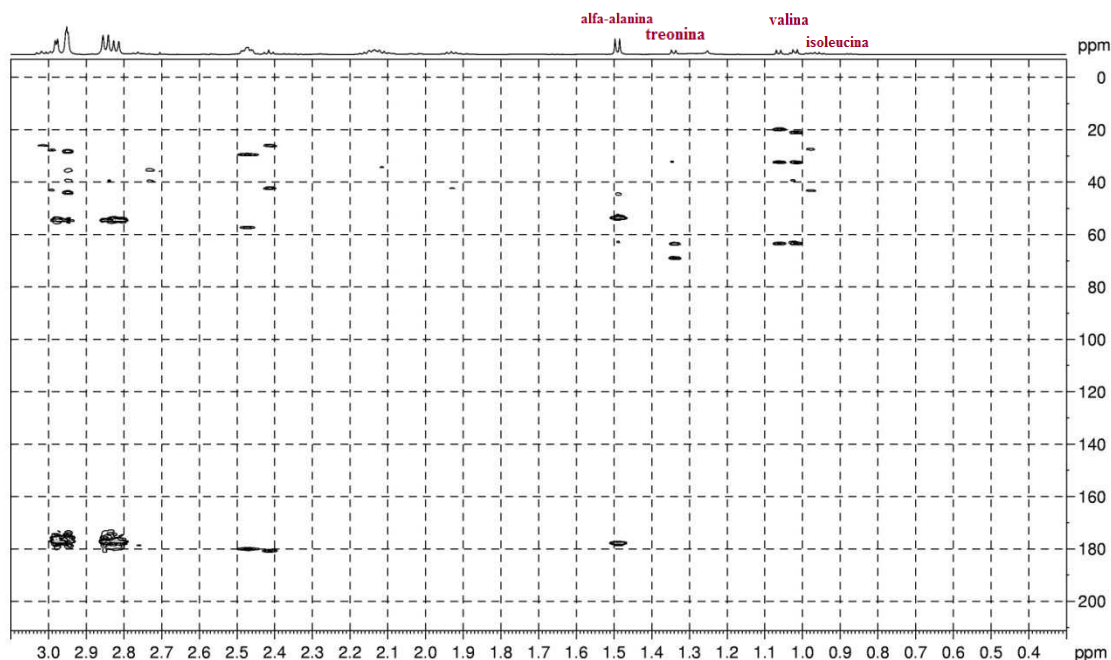


Figura 4.14. Expansão do espectro de HMBC ^1H - ^{13}C em $\text{CD}_3\text{OD-KH}_2\text{PO}_4$ e D_2O (8:2) na região de δ 0,3-3,1 ppm, para as amostras de folhas das variedades transgênicas da cana-de-açúcar e seus controles obtido utilizando extração indireta.

A valina ou ácido 2-amino-3-metil butanóico (figura 4.15), também foi identificada, através da presença de dois dubletos no espectro *J*-resolved (figura 4.10) em δ 1,01 ppm ($\text{H-}\gamma$, d, $J = 7$ Hz) e δ 1,05 ppm ($\text{H-}\gamma'$, d, $J = 7$ Hz) referentes às metilas presentes na estrutura representada na figura 4.13. O espectro de COSY ^1H - ^1H , figura 4.13, apresenta correlação dos dois dubletos metilênicos da valina (δ 1,01 e δ 1,05) com o próton em δ 2,33 ppm (H-3 , m) [15,20]. O espectro de HMBC ^1H - ^{13}C (figura 4.14), mostrou correlações entre os prótons em δ 1,01 ppm e δ 1,05 ppm com o C-2 em δ 64,0 ppm, referente a carbono de amina vizinho à carboxila, e C-3 em δ 34 ppm, referente ao carbono sp_3 vizinho à carbono de amina. Também foi observada correlação entre o próton metilênico em δ 1,01 com carbono metilênico em δ 21,0 ppm e do próton em δ 1,05 ppm com o outro carbono metilênico em δ 19,8 ppm.

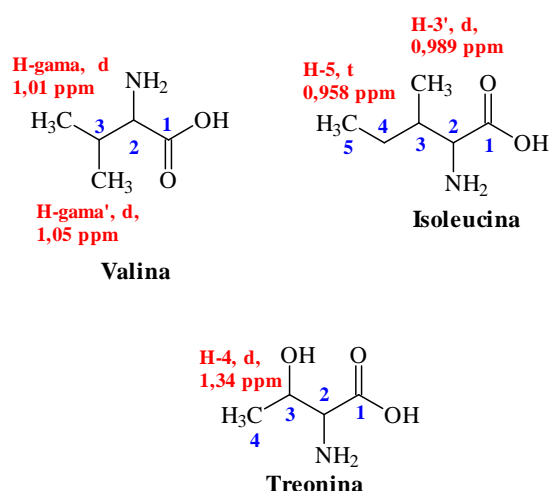


Figura 4.15. Estruturas da valina, isoleucina e treonina.

Sinais de ressonância de próton característicos do aminoácido isoleucina ou ácido 2-amino-3-metilpentanóico (figura 4.13) foram observados no intervalo em δ 0,90- 1,50 ppm em ambos espectros de RMN ^1H da figura 4.9. O tripleto em δ 0,958 ppm (H-5, t, $J = 7,6$ Hz) e o dubleto em δ 0,989 ppm (H-3', d, $J = 7,7$ Hz) sugere a presença dos prótons metilênicos da isoleucina (figura 4.10). No espectro de HMBC ^1H - ^{13}C (figura 4.14), correlações discretas entre H-3' (δ 0,989 ppm) e C-3 e C-4 (δ 27 e 44 ppm, respectivamente), podem ser observadas.

A região do próton entre δ 1,33-1,34 ppm (figura 4.9 e 4.10), pode ser observado um dubleto em δ 1,34 ppm (d, $J = 6,6$ Hz) e vários singletos, indicando a presença de prótons pertencentes a mais de uma substância. O dubleto em δ 1,34 ppm sugere a presença de próton metilênico de treonina ou ácido 2-amino-3-hidróxi-n-butírico (figura 4.15). No espectro de HMBC ^1H - ^{13}C (figura 4.14), correlações entre carbono de amina em δ 63,0 ppm (HC-NH₂) e carbono de álcool em δ 69,0 (CH-OH) com o próton metilênico (δ 1,34 ppm, d) puderam ser observadas, confirmando assim a presença de treonina nos extratos de folhas da cana-de-açúcar.

Os extratos analisados também apresentaram prótons com deslocamento químico, multiplicidade e acoplamento spin-spin característico da asparagina ou ácido 2-aminosuccinâmico (figura 4.16), em δ 2,95 ppm (H-2a, dd, $J = 4$ e 17,3 Hz) e δ 2,81 ppm (H-2b, dd, $J = 8,3$ e 17,3 Hz), figuras 4.17 e 4.18 [15,20]. O espectro de COSY ^1H - ^1H , figura 4.19, mostrou correlação entre H-2a e H-2b com H- α (δ 3,93 ppm, dd, $J = 4$ e 8,3 Hz) e no de HMBC ^1H - ^{13}C , figura 4.14, os prótons δ 2,95 e 2,81 ppm apresentaram correlação com o carbono carboxílico em δ 179 ppm e o carbono de amina substituída em δ 57 ppm.

Adicionalmente, observou-se no espectro de RMN ^1H e J -resolved, (figuras 4.18 e 4.16) prótons característicos de aspartato em δ 2,82 ppm (H-2, dd, $J = 4,0$ e 17,5 Hz), que no espectro de COSY ^1H - ^1H , figura 4.19, apresentou correlação com o H- α em δ 3,84 ppm (dd, $J = 4$ e 8,7 Hz).

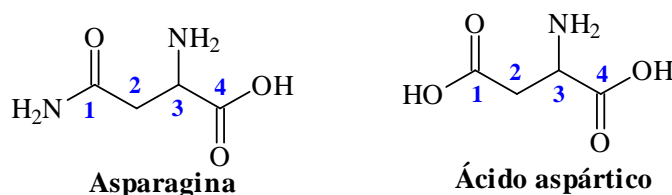


Figura 4.16. Estrutura da asparagina e ácido aspártico.

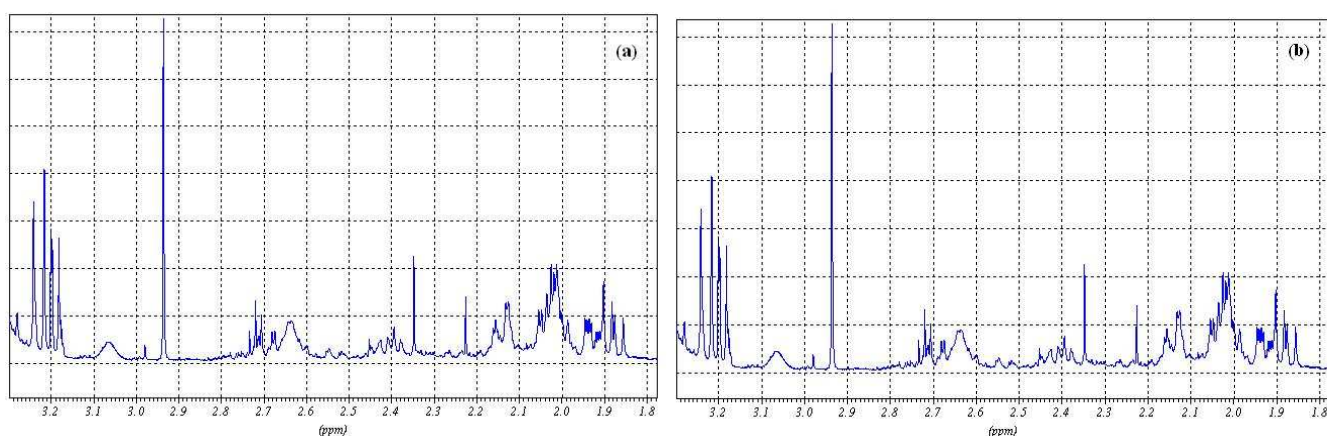


Figura 4.17. Espectro de RMN ^1H (500,13 MHz), expandido para a região de δ 1,8-3,2 ppm, para extrato de folha: (a) utilizando extração direta com $\text{CD}_3\text{OD-KH}_2\text{PO}_4$ e D_2O (1:1); (b) utilizando extração indireta com $\text{CD}_3\text{OD-KH}_2\text{PO}_4$ e D_2O (8:2).

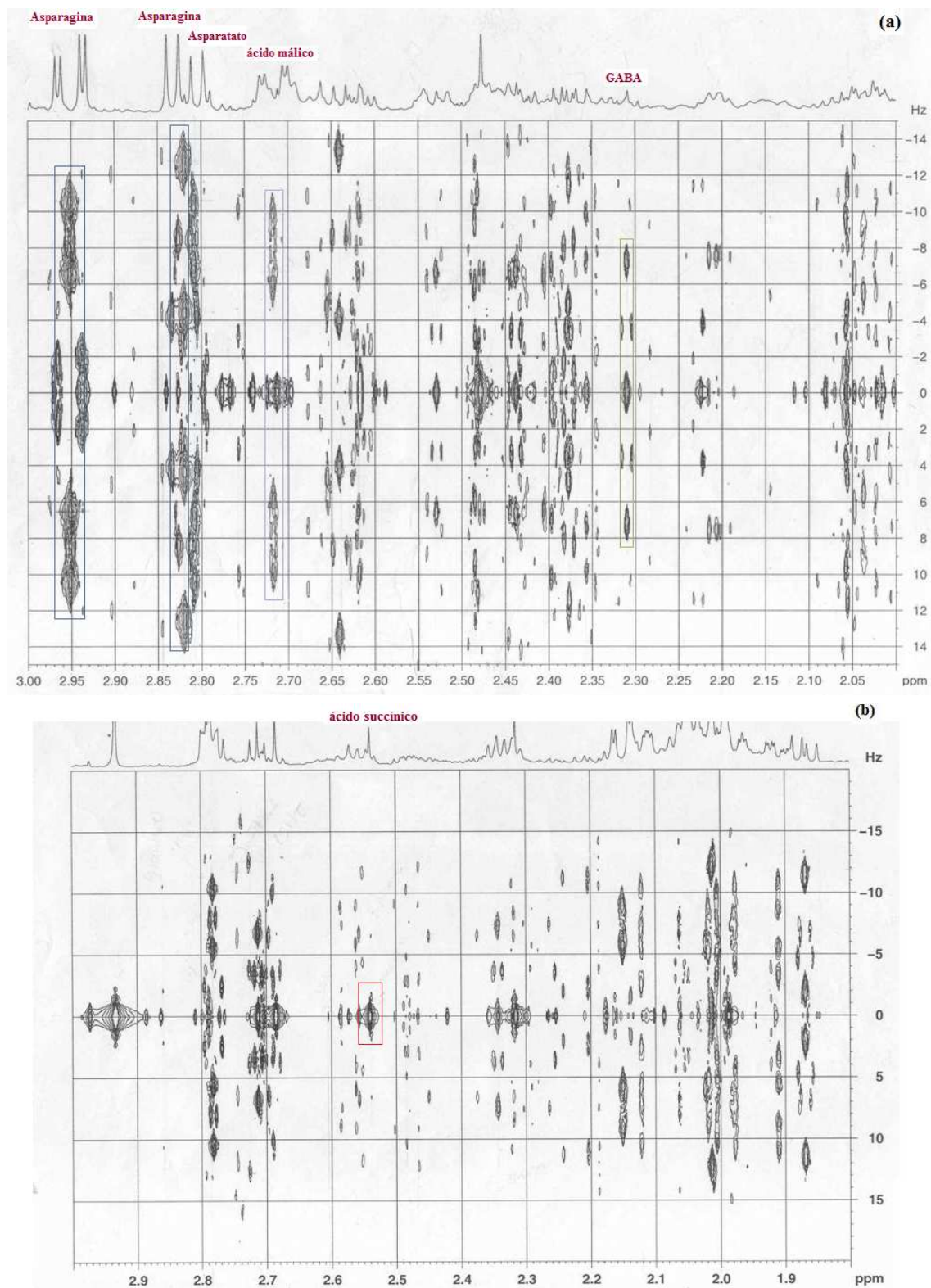


Figura 4.18. Espectro *J*-resolved expandido para a região em δ 1,80-3,00 ppm, para extrato de folha: (a) utilizando extração direta com $\text{CD}_3\text{OD-KH}_2\text{PO}_4$ e D_2O (1:1); (b) utilizando extração indireta com $\text{CD}_3\text{OD-KH}_2\text{PO}_4$ e D_2O (8:2).

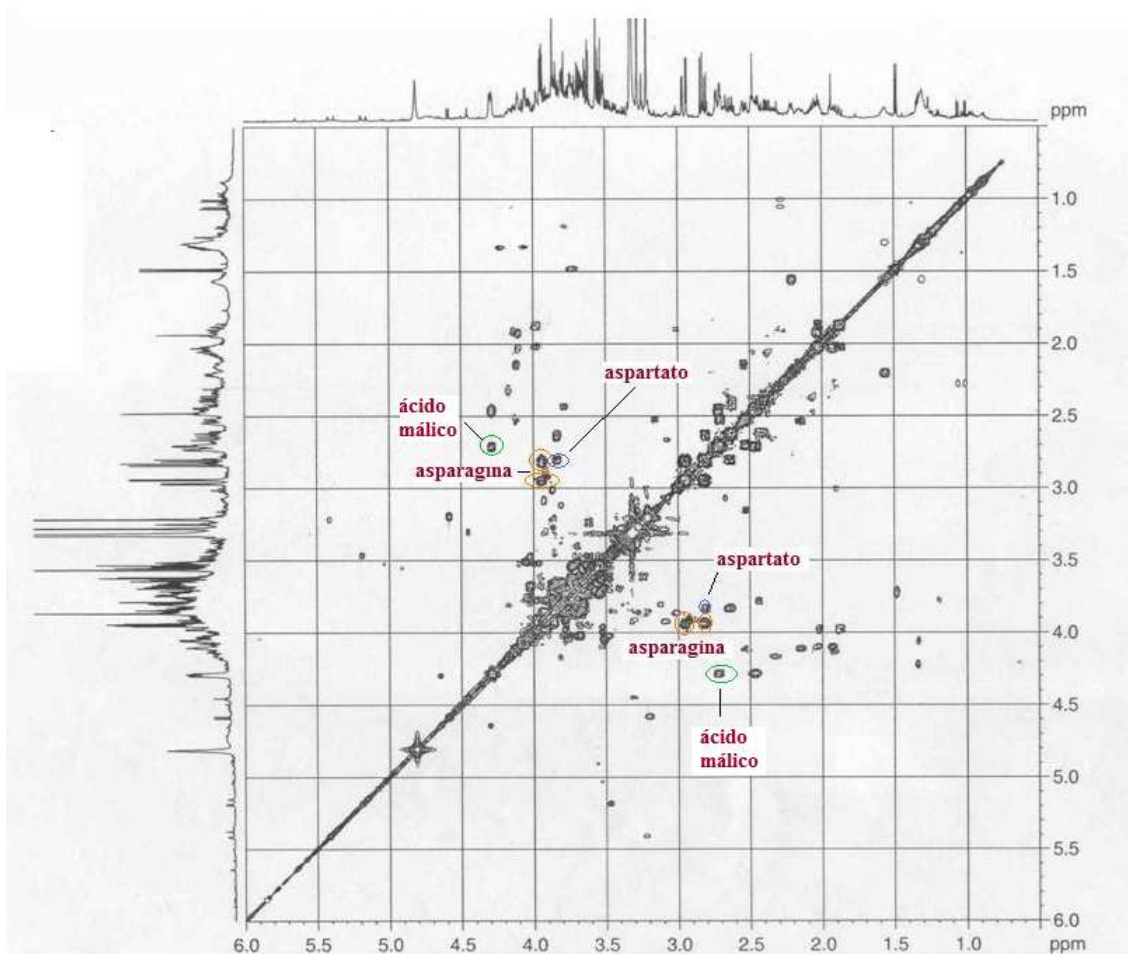


Figura 4.19. Expansão do espectro de COSY ^1H - ^1H na região de δ 0,50 - 6,0 ppm, para extrato de folha utilizando extração direta com CD_3OD - KH_2PO_4 e D_2O (1:1).

No espectro expandido de *J*-Resolved (figura 4.18-a), foi observado sinal de próton em δ 2,31 ppm (H-2, t, $J = 7,4$ Hz) e δ 1,903 ppm (H-3, q, $J = 7,4$ Hz), que comparado com dados da literatura mostra-se característico ao ácido γ -aminobutírico ou ácido 4-aminobutanóico (GABA, figura 4.20) [20]. Porém não foram observadas correlações no espectro de HMBC ^1H - ^{13}C , figura 4.14, devido à baixa intensidade do sinal, em relação aos prótons do GABA nos espectros obtidos com extração indireta.

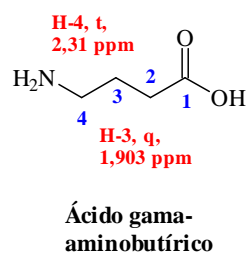


Figura 4.20. Estrutura do ácido 4-aminobutírico.

Alguns ácidos orgânicos puderam ser identificados, como é o caso do ácido succínico (figura 4.21), que apresentou sinal no espectro de próton em δ 2,54 ppm (s), figura 4.18-b, e no espectro de HMBC ^1H - ^{13}C , figura 4.14, foi observado correlação entre o próton com o carbono carboxílico em δ 178 ppm e o carbono alílico sp_3 alfa carboxílica δ 46,1 ppm [15]. A presença de ácido málico (figura 4.21) pôde ser detectado através dos sinais característicos dos prótons H- β em δ 2,72 ppm (dd, $J = 16,5$ e $3,9$ Hz), e apresentado na figura 4.18-a, que pode ser confirmado através da correlação destes prótons com o próton em δ 4,32 ppm (dd, $J = 9,0$ e $4,0$ Hz) apresentada pelo espectro COSY ^1H - ^1H (figura 4.19). Entretanto, os sinais dos prótons de ácidos orgânicos, bem como a constante de acoplamento variam de acordo com a concentração da substância presente na amostra, por isso a comparação com dados da literatura ou com espectros dos padrões de ácidos orgânicos devem ser cuidadosamente realizada [3, 15].

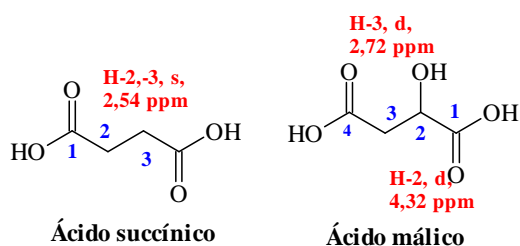


Figura 4.21. Estrutura dos ácidos succínico e maleico.

Um singleto característico de metila de colina (figura 4.22) em δ 3,215 ppm ($\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$, s) pode ser observado no espectro de J -resolved da figura 4.23. O espectro de HMBC ^1H - ^{13}C apresentou correlação do carbono sp_3 vizinho da amina ($\alpha\text{-CH}_2$) em δ 73,0 ppm com os prótons metilênicos em δ 3,215 ppm (figura 4.24).

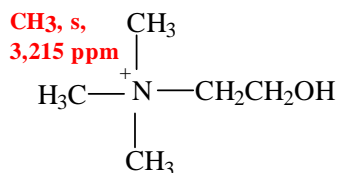


Figura 4.22. Estrutura da colina.

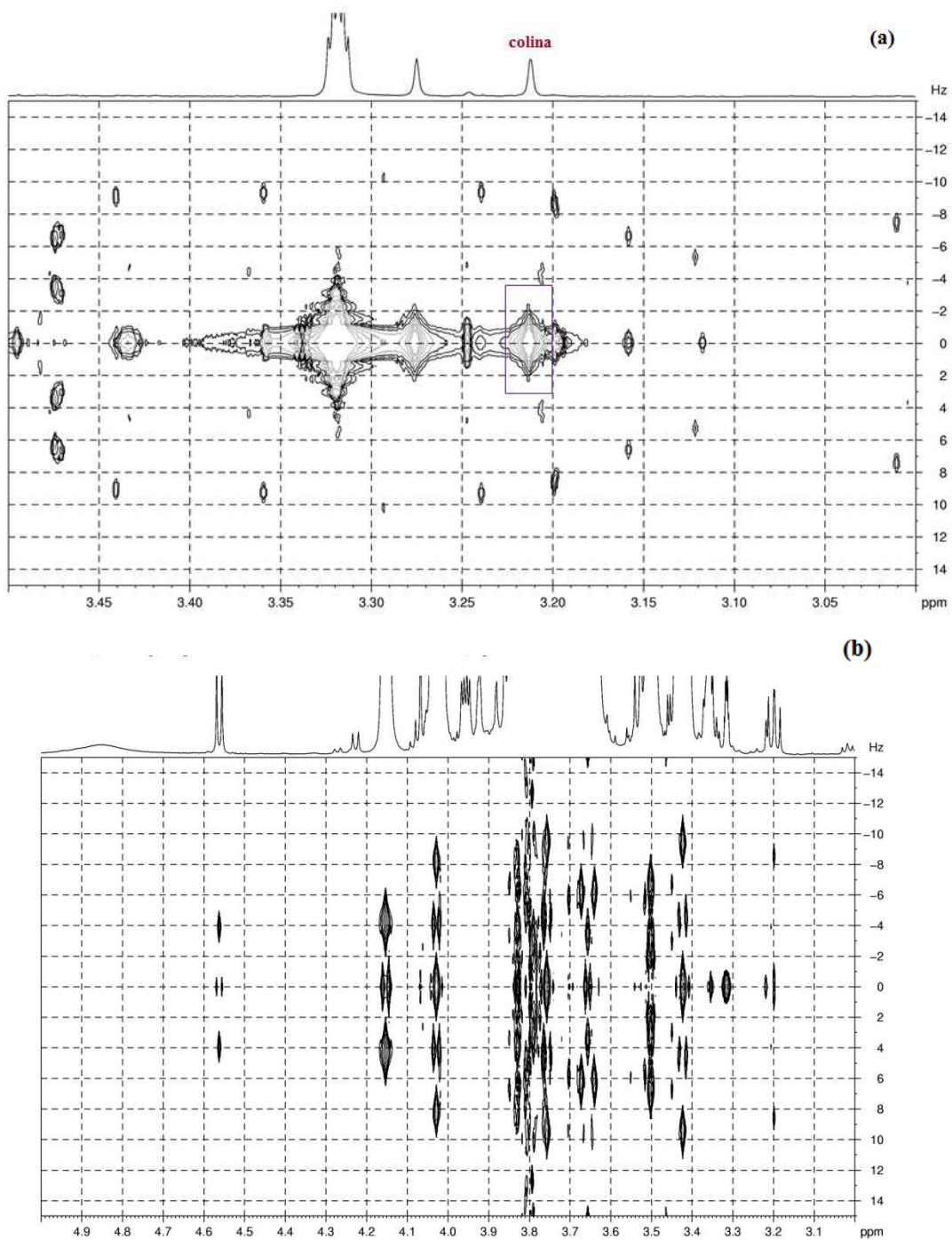


Figura 4.24. Espectro *J*-resolved expandido para a região em δ 3,00-3,50 ppm, para extrato de folha: (a) utilizando extração direta com $\text{CD}_3\text{OD-KH}_2\text{PO}_4$ e D_2O (1:1); (b) utilizando extração indireta com $\text{CD}_3\text{OD-KH}_2\text{PO}_4$ e D_2O (8:2).

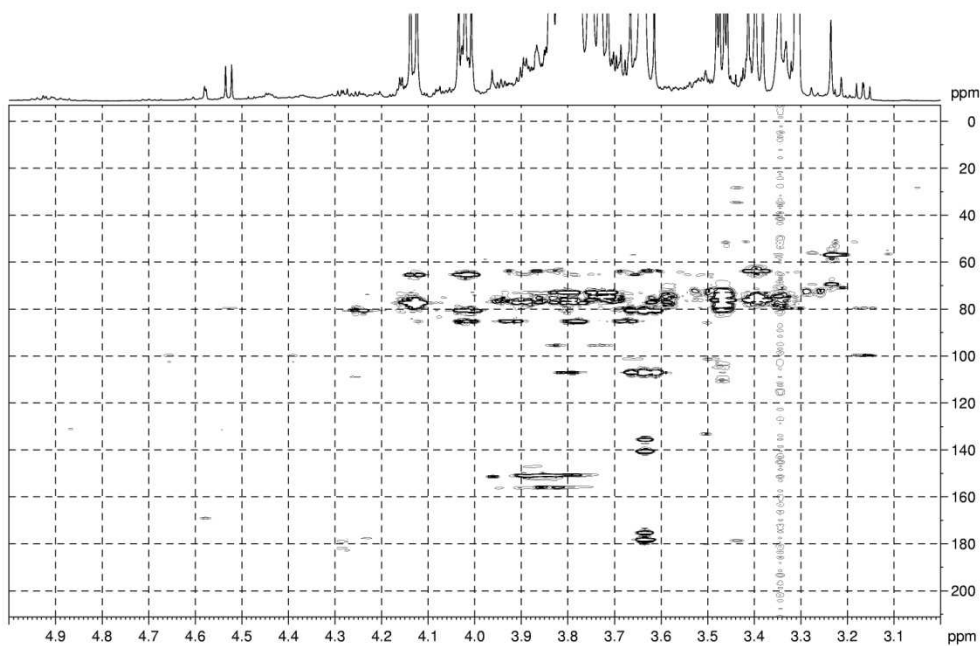


Figura 4.25. Expansão do espectro de HMBC ^1H - ^{13}C em $\text{CD}_3\text{OD-KH}_2\text{PO}_4$ e D_2O (8:2) na região do ^1H em δ 3,10 - 5,00 ppm, para as amostras de folhas das variedades transgênicas da cana-de-açúcar e seus controles obtido utilizando extração indireta.

Deslocamentos e multiplicidades característica de próton referente ao inositol, (figura 4.26), foram observadas no espectro de próton e *J*-resolved da figuras 4.27 em δ 3,62 ppm (H-3,-6, t, $J = 9,8$ Hz) e 3,245 ppm (H-4, t, $J = 9,8$ Hz). Sinal do próton H-2 da glicina ou ácido 2-aminoacético (figura 4.26), foi observado no espectro de *J*-resolved da figura 4.27 em δ 3,49 ppm (H-2, s). Tanto os prótons de inositol e glicina foram detectados nos espectros da extração direta, não sendo observados nos espectros obtidos para os extratos de folhas via extração indireta.

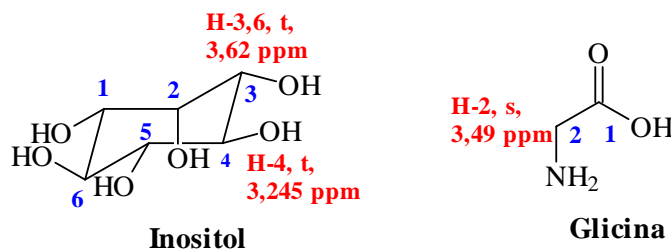


Figura 4.26. Estruturas do inositol e glicina.

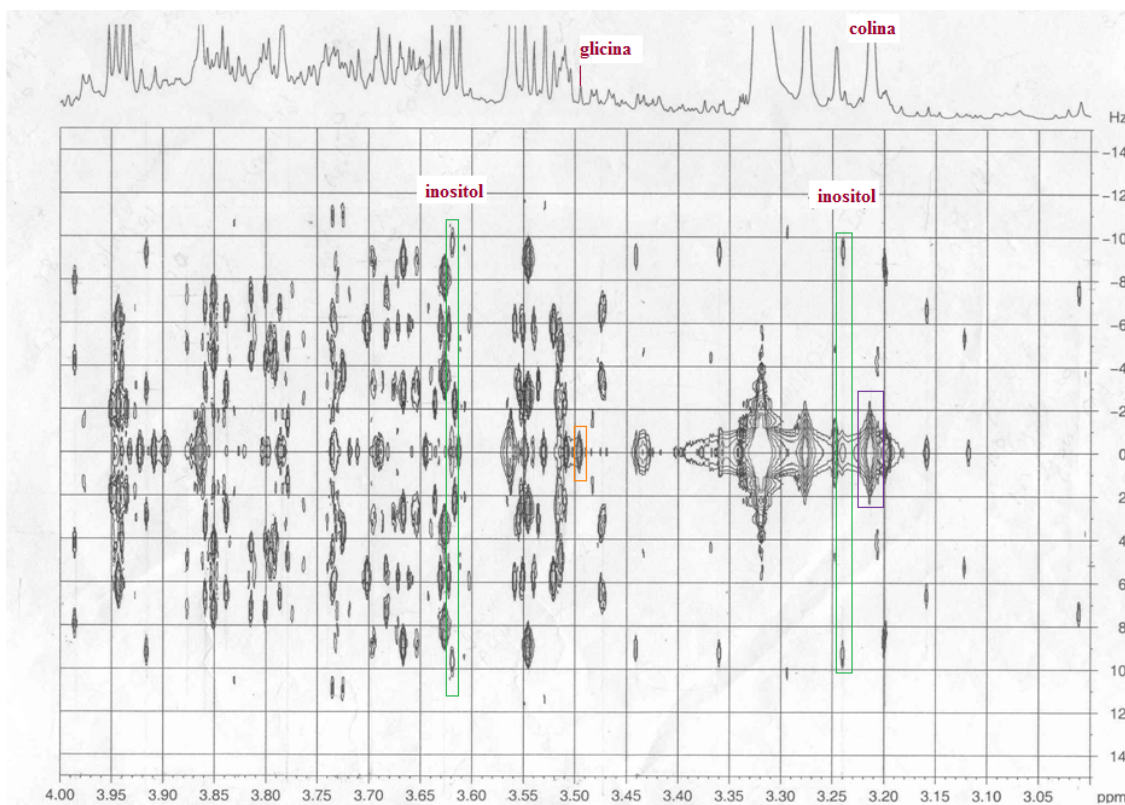


Figura 4.27. Expansão do espectro de *J*-resolved, utilizando extração direta com CD₃OD-KH₂PO₄ e D₂O (1:1), na região em δ 3,50-5,00 ppm.

Próton referente ao ácido shiquímico (figura 4.28), um dos precursores na biosíntese de fenóis e polifenóis com esqueleto básico C₆-C₃ e C₆-C₃-C₆, respectivamente, foram identificado no espectro de *J*-resolved (figura 4.29) em δ 4,452 ppm (t, *J* = 3,9 Hz).

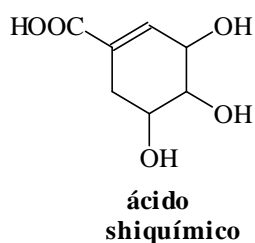


Figura 4.28. Estrutura do ácido shiquímico.

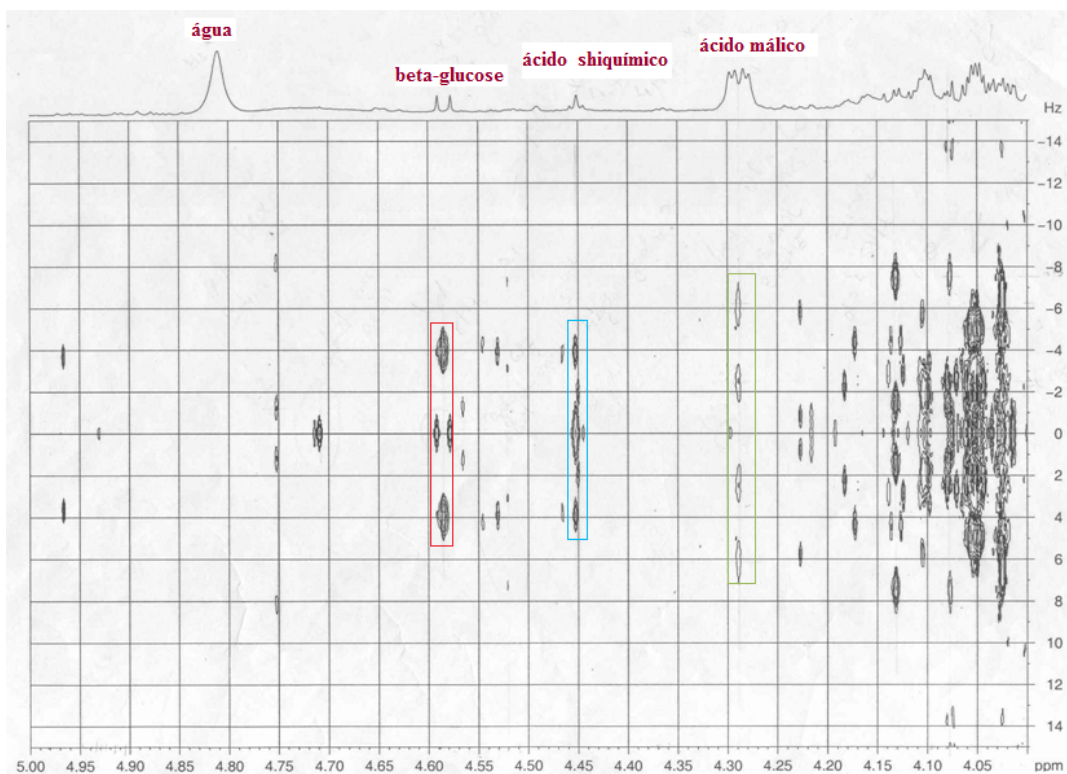


Figura 4.29. Espectro *J*-resolved expandido para a região em δ 3,50-5,00 ppm, para extrato de folha, utilizando extração direta com $\text{CD}_3\text{OD-KH}_2\text{PO}_4$ e D_2O (1:1).

Na região de sinais de prótons pertencentes a carboidratos, δ 5,80 à 3,30 ppm, foram observados sinais de prótons anoméricos de sacarose em δ 5,41 ppm (H-1, d, $J = 4$ Hz), α -glucose em δ 5,15 ppm (H-1, d, $J = 3,6$ Hz) e β -glucose em δ 4,53 ppm (H-1, d, $J = 8$ Hz), figura 4.30 [15, 20]. Pelo espectro de HMBC $^1\text{H-}^{13}\text{C}$, figura 4.31 o próton anomérico δ 5,41 ppm apresentou correlações com carbonos na faixa em δ 70,1 ppm (C-1), δ 73,1 ppm (C-3), δ 83,0 ppm (C-5'), confirmando a presença da substância. Em relação à α -glucose, cujo próton anomérico encontra-se em δ 5,15 ppm (H-1,d, $J = 3,6$ Hz), verificou-se no espectro de HMBC $^1\text{H-}^{13}\text{C}$, figura 4.31, correlações entre os H-1 com carbonos sp_3 substituídos com grupos hidroxila na região de δ 68,0 - 82,0 ppm, confirmando assim a presença do açúcar. As estruturas dos açúcares estão contidas na figura 4.32.

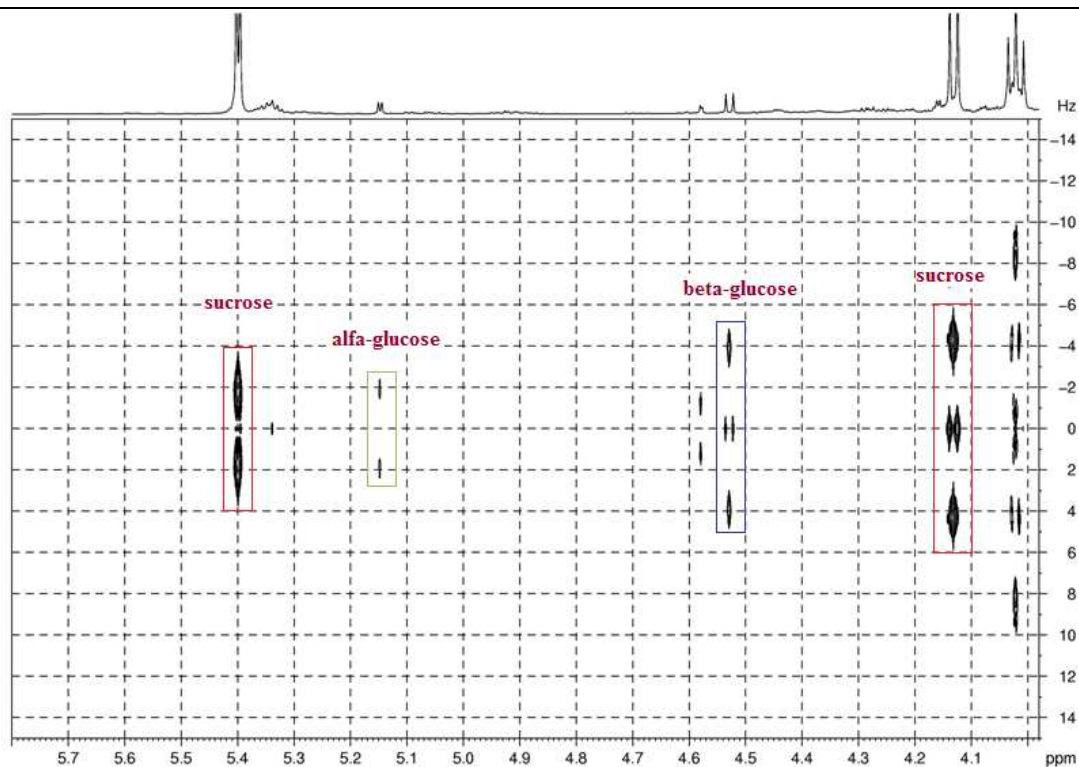


Figura 4.30. Espectro *J*-resolved expandido para a região em δ 4,00-5,60 ppm, para extrato de folha, utilizando extração indireta com $\text{CD}_3\text{OD-KH}_2\text{PO}_4$ e D_2O (8:2).

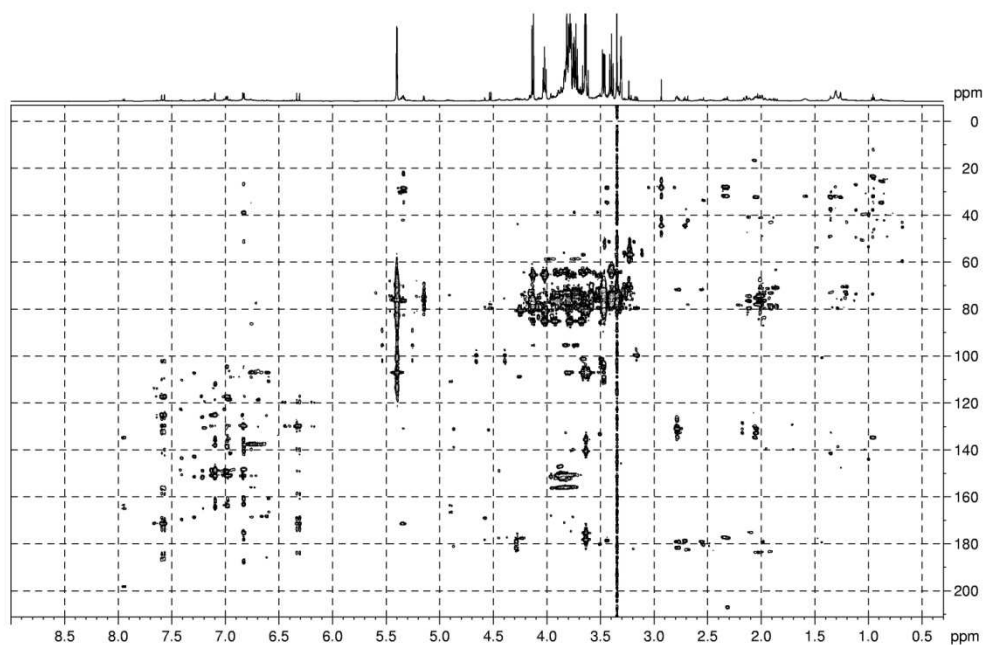


Figura 4.31. Espectro completo (δ 0,3-9,5 ppm) de ^1H - ^{13}C HMBC em $\text{CD}_3\text{OD-KH}_2\text{PO}_4$ e D_2O (8:2), para as amostras de folhas das variedades transgênicas da cana-de-açúcar e seus controles obtido utilizando extração indireta.

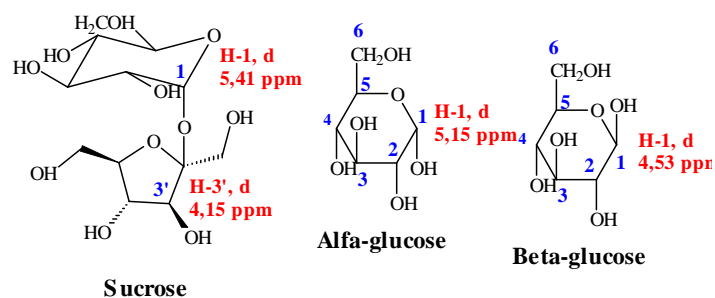


Figura 4.32. Estruturas dos açúcares: sacarose, α - β -glucose.

Analisando o espectro de RMN ^1H pôde-se realizar a identificação de algumas substâncias aromáticas (região do próton em δ 6,00 à 8,5 ppm), figura 4.33.

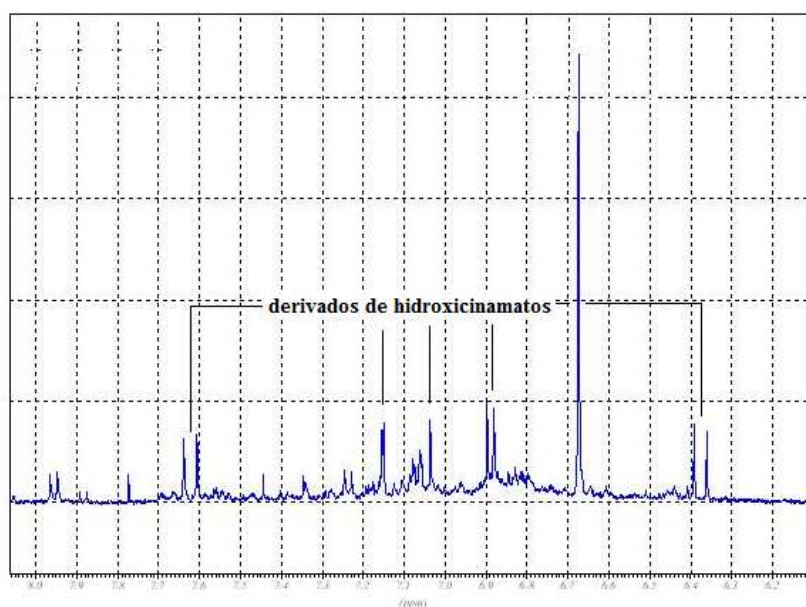


Figura 4.33. Espectro de RMN ^1H (500,13 MHz), expandido para a região de δ 6,00-8,20 ppm para extrato de folha em $\text{CD}_3\text{OD-KH}_2\text{PO}_4$ e D_2O (8:2).

O ácido fumárico (figura 4.34) apresenta um singlete em δ 6,54 ppm (α,β -CH=CH) em $\text{CD}_3\text{OD-KH}_2\text{PO}_4$ e D_2O [15], como pode ser observado no espectro *J*-resolved da figura 4.35. Também pôde ser detectado a presença do ácido trans-aconítico (figura 4.34), através dos singletos em δ 6,71 ppm (s) e outro em 3,55 ppm (s) que apresentaram correlação entre si como pode ser verificado através do espectro de

COSY ^1H - ^1H obtido para as folhas da cana-de-açúcar em $\text{CD}_3\text{OD-KH}_2\text{PO}_4$ e D_2O (1:1), figura 4.36 [18]. Somente espécies de Ranunculaceae e Gramineae apresentam ácido trans-aconítico como ácido orgânico majoritário [21-22].

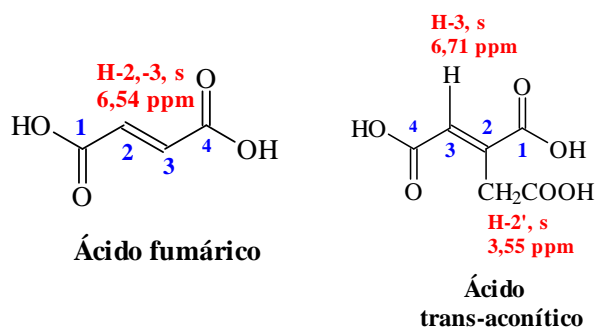


Figura 4.34. Estruturas dos ácidos orgânicos: fumárico e trans-aconítico.

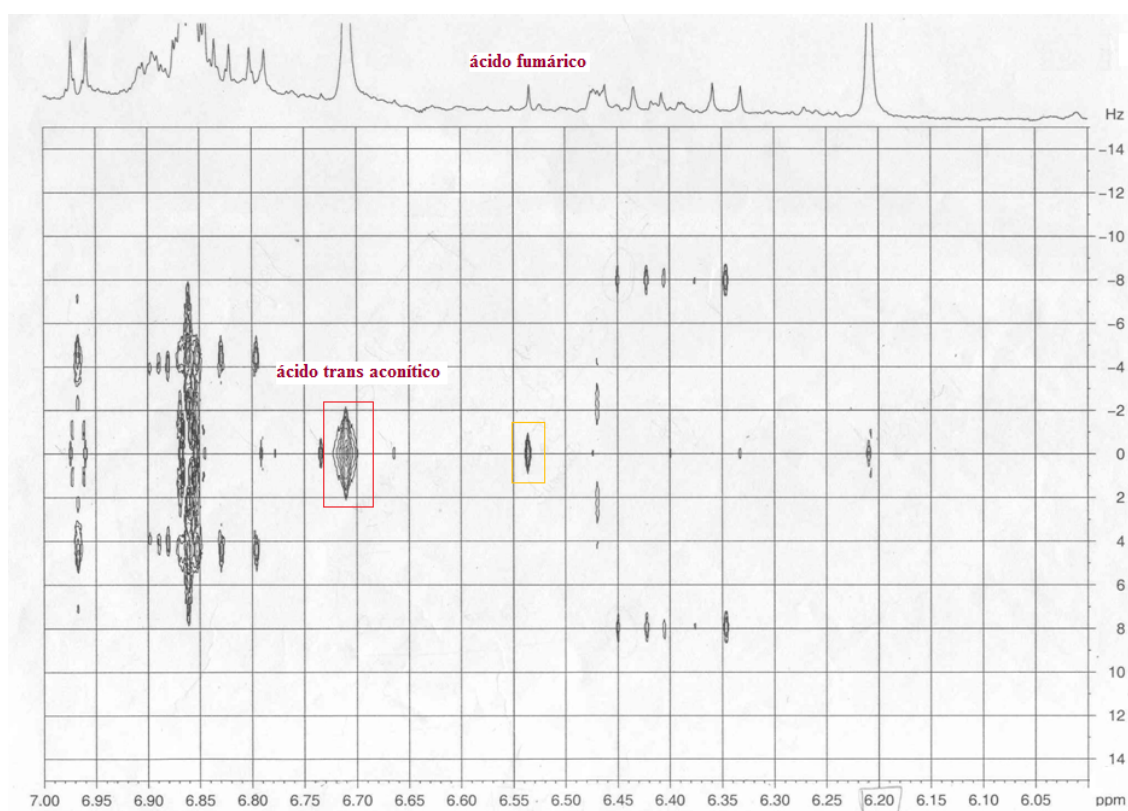


Figura 4.35. Espectro J -resolved expandido para a região em δ 6,00-7,00 ppm, para extrato de folha, utilizando extração direta com $\text{CD}_3\text{OD-KH}_2\text{PO}_4$ e D_2O (1:1).

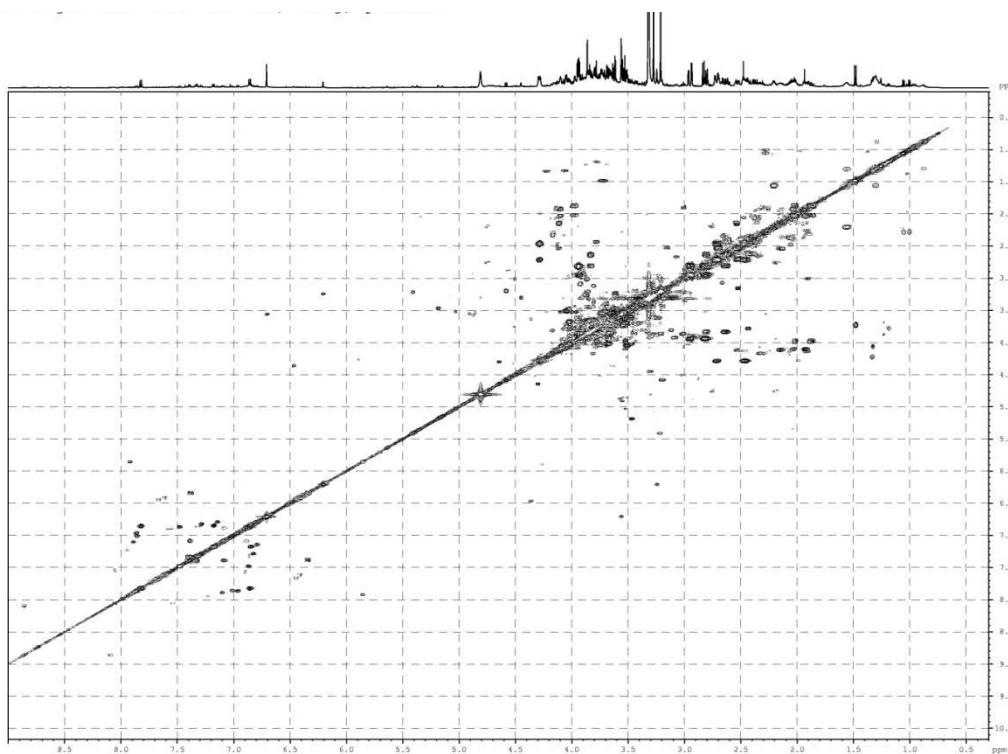


Figura 4.36. Espectro de COSY ^1H - ^1H , para extrato de folha utilizando extração direta com $\text{CD}_3\text{OD-KH}_2\text{PO}_4$ e D_2O (1:1).

Os extratos de folhas da cana-de-açúcar, estudadas neste trabalho, apresentaram como polifenóis majoritários, fenilpropanóides que puderam ser detectados através do espectro de J -resolved da figura 4.37, que apresentou multiplicidade de prótons trans-olefínicos na região do próton em δ 6,30-6,50 ppm (d, $J=16,0$ Hz) e δ 7,55-7,65 ppm (d, $J=16,0$ Hz) [23-25]. Adicionalmente, o espectro de J -resolved, sugere a presença de pelo menos 4 diferentes fenilpropanóides derivados do ácido cinâmico. O espectro de COSY ^1H - ^1H (figura 4.38), apresenta correlação entre o próton trans-olefínico em δ 7,59 ppm (H-7, d, $J = 16,0$ Hz) o outro próton trans-olefínico em δ 6,33 ppm (H-8, d, $J = 16,0$ Hz). No espectro de HMBC ^1H - ^{13}C , da figura 4.39, o próton H-7 correlaciona-se com os carbonos em δ 118, 124, 171 e 130 ppm (C-2, C-6, C-9 e C-1, respectivamente).

O C-9 apresenta deslocamento químico característico de carbono de éster (-COO), que por sua vez, apresentou correlação com o próton em δ 5,35 ppm (td, $J = 10,0$ e $4,80$ Hz) de ácido quínico substituído na posição 5' e/ou 3' (ácido 5-cafeoilquínico, figura 4.40). Dependendo da posição da substituição, mudanças nos deslocamentos dos prótons pertencentes a cadeia do ácido quínico podem ser observadas, como discutido pelo autor Pauli et al. (1998), entretanto para a substituição nas posições 3', e 5' mudanças nos deslocamentos de H-5' e H-3' não foram observadas quando adquiridos espectros de substâncias puras do ácido 3'-cafeoilquínico e 5'-cafeoilquínico nas mesmas condições experimentais descritas nos itens 4.2.3 e 4.2.4 [23], sugerindo assim a presença dos dois isômeros nos extratos de folhas de cana-de-açúcar. Outra evidência da presença de isômeros derivados de cafeoilquínico, foi observada nas análises de HPLC-MS dos extratos de folhas, que apresentou nos espectros de massas o íon molecular $[M-H]^-$ 353, característico de ácido cafeoilquínico, em diferentes regiões dos cromatogramas (capítulo 3).

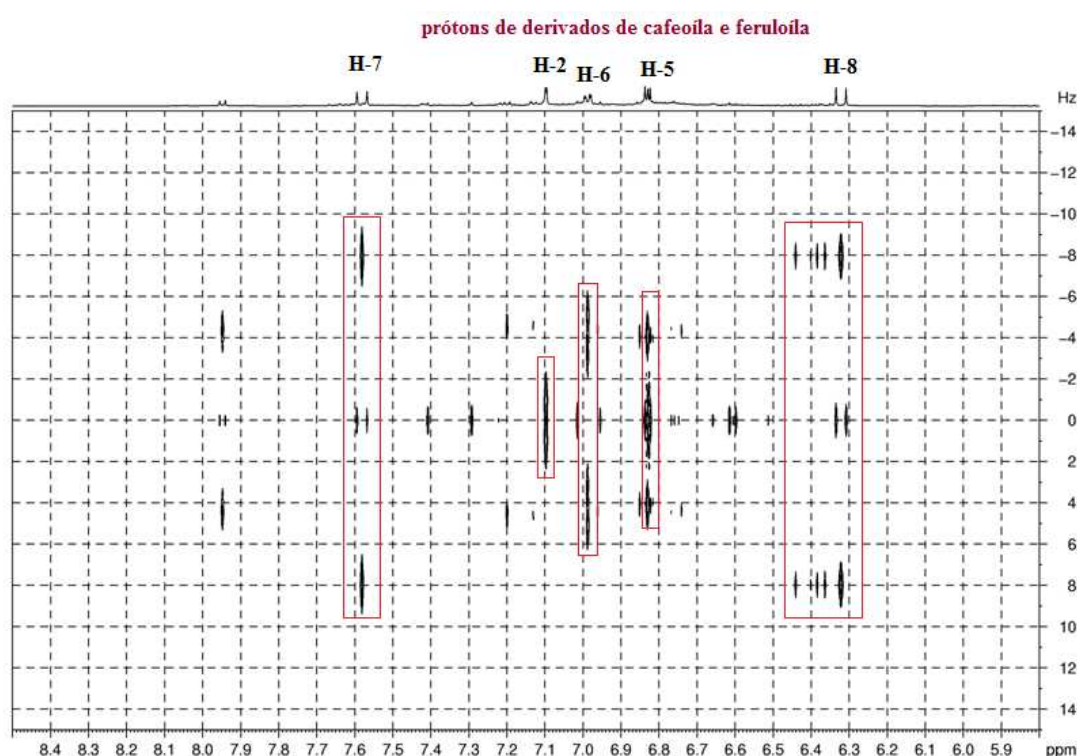


Figura 4.37. Espectro J -resolved expandido para a região em δ 5,8-8,5 ppm, para extrato de folha, utilizando extração indireta com $CD_3OD-KH_2PO_4$ e D_2O (8:2): H-8 e H-7, d, $J=16$ Hz; H-6, dd, $J = 8$ e 2 Hz; H-5, d, $J = 8$ Hz; H-2, d, $J = 2$ Hz.

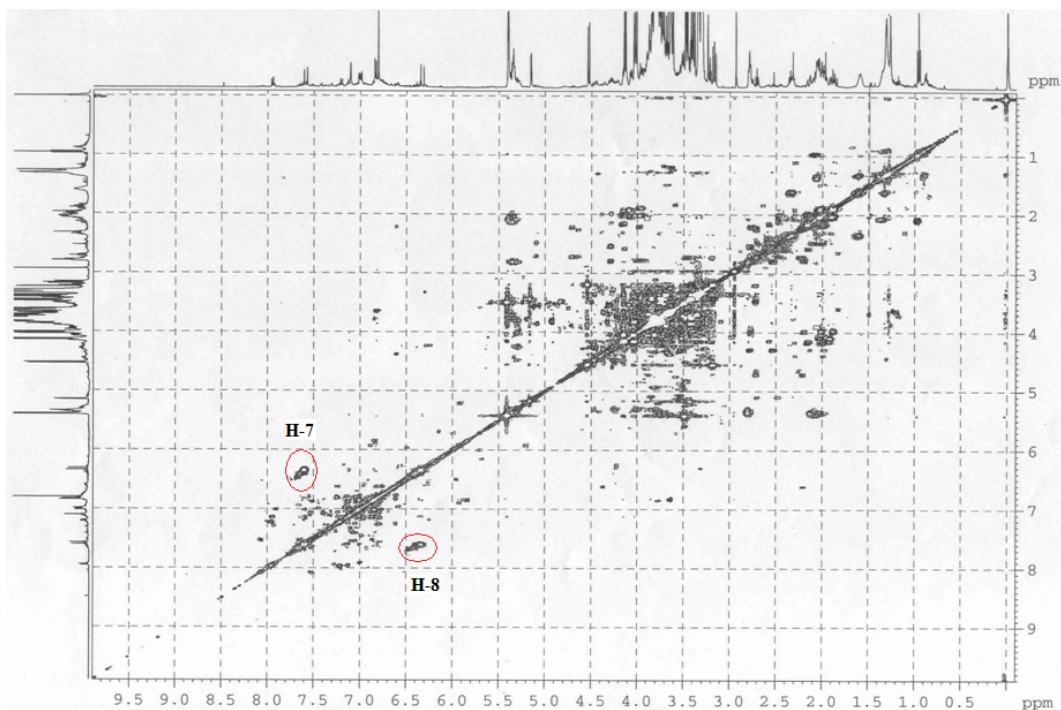


Figura 4.38. Espectro de COSY ^1H - ^1H em $\text{CD}_3\text{OD-KH}_2\text{PO}_4$ e D_2O (8:2) para extrato de folha de cana-de-açúcar.

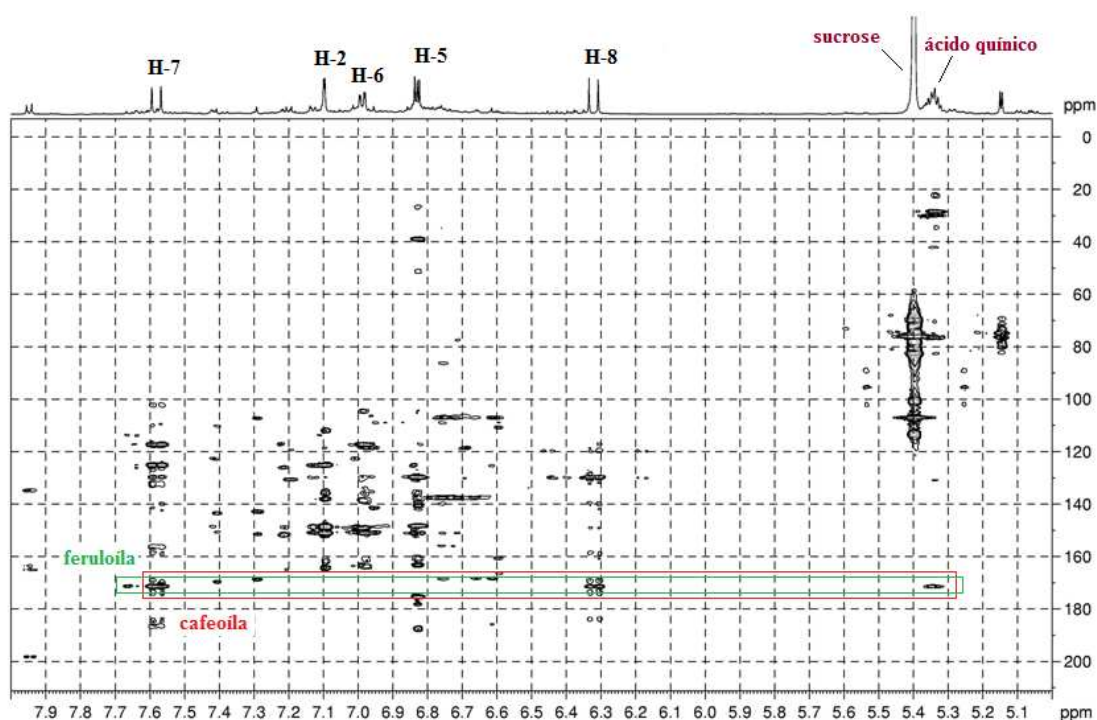


Figura 4.39. Espectro de HMBC ^1H - ^{13}C em $\text{CD}_3\text{OD-KH}_2\text{PO}_4$ e D_2O (8:2) expandido para a região do próton em δ 5,00-8,00 ppm: H-8 e H-7, d, $J=16$ Hz; H-6, dd, $J = 8$ e 2 Hz; H-5, d, $J = 8$ Hz; H-2, d, $J = 2$ Hz.

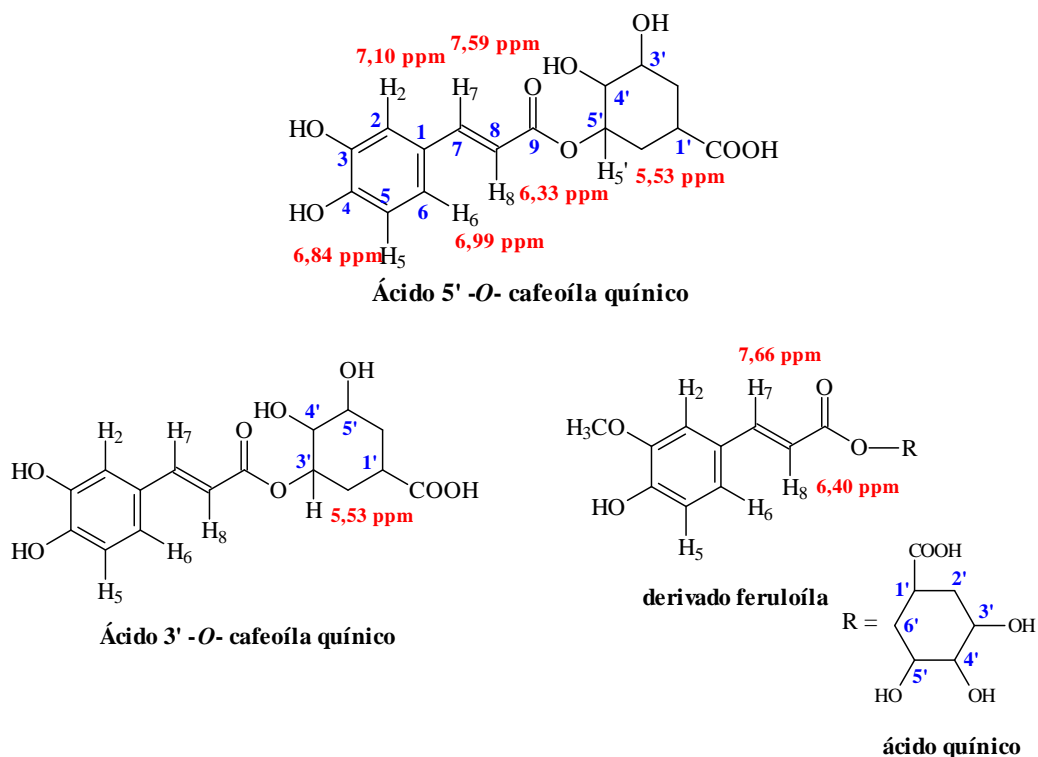


Figura 4.40. Estruturas dos fenilpropanóides identificados nos extratos de folhas de cana-de-açúcar por RMN em $\text{CD}_3\text{OD-KH}_2\text{PO}_4$ e D_2O (8:2).

Derivado do ácido ferúlico (figura 4.40) foi identificado com base no espectro de *J*-resolved (figura 4.37) e COSY $\text{H}^1\text{-H}^1$ (figura 4.38). A presença de uma metoxila no lugar de hidroxila na posição C-3 do ácido cafeico implica em um efeito positivo no anel aromático (efeito doador), promovendo ligeiro aumento do deslocamento químico dos prótons H-2, H-5, H-6, H-7 e H-8. No espectro de COSY $\text{H}^1\text{-H}^1$ (figura 4.38), além das correlações entre os prótons trans-olefínicos em δ 7,59 e 6,33, pode-se observar também correlações entre H-7 em δ 7,66 ppm (d, $J = 16$ Hz) e H-8 em δ 6,40 ppm (d, $J = 16$ Hz) sugerindo a presença de feruloíla (figura 4.41) [23]. No espectro de HMBC $\text{H}^1\text{-}^{13}\text{C}$ (figura 4.39) correlações entre os prótons em δ 7,66 ppm e δ 5,35 ppm (td) com o carbono C-9 (δ 171 ppm) forma observadas sugerindo a presença dos isômeros 3'e/ou 5' do ácido feruloíla quínico. No capítulo 3, com as análises de HPLC-MS dos extratos de folhas das variedades de cana-de-açúcar, foi possível identificar a presença de íon molecular $[\text{M-H}]^-$ em m/z 367 caracterizando o ácido feruloíla quínico.

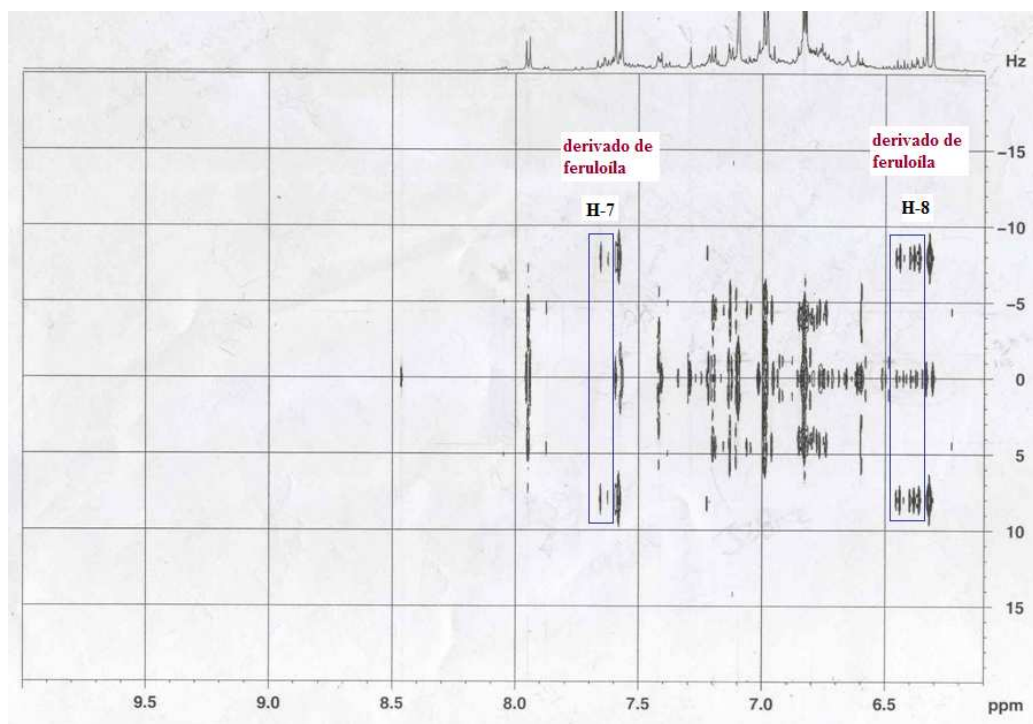


Figura 4.41. Espectro *J*-resolved expandido para a região em δ 6,40-9,60 ppm, para extrato de folha, utilizando extração indireta com $\text{CD}_3\text{OD-KH}_2\text{PO}_4$ e D_2O (8:2): H-8 (d, $J = 16$ Hz); H-7 (d, $J = 16$ Hz)

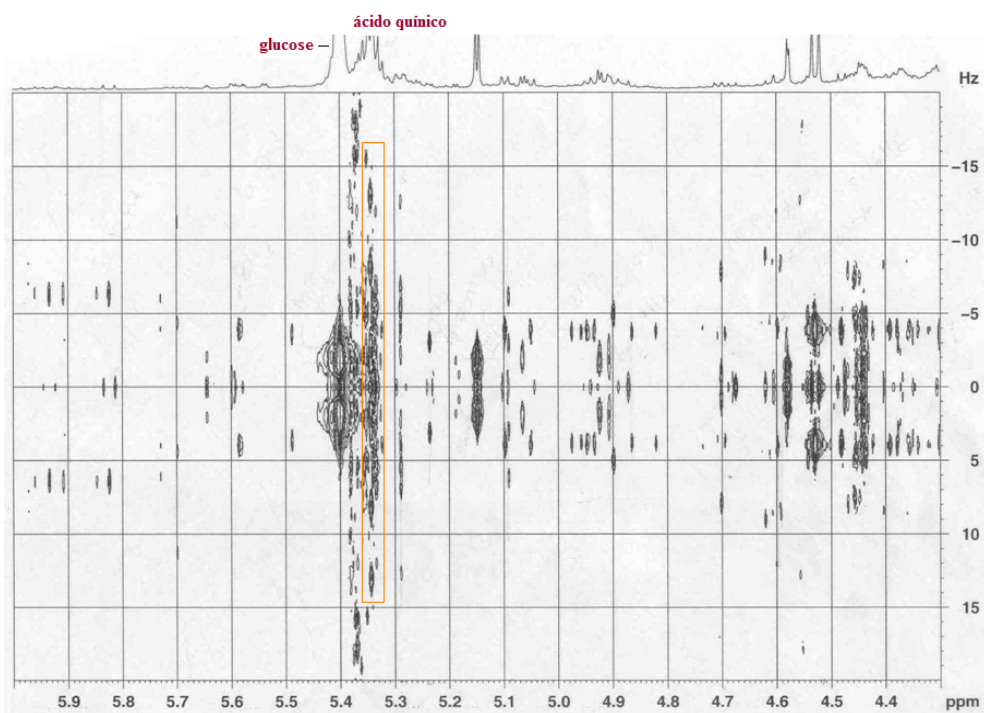


Figura 4.42. Espectro *J*-resolved expandido para a região em δ 4,30-6,00 ppm, para extrato de folha, utilizando extração indireta com $\text{CD}_3\text{OD-KH}_2\text{PO}_4$ e D_2O (8:2).

Sinal de próton aromático, característico de ácido siríngico, foi observado no espectro de *J*-resolved da figura 4.43 em δ 7,29 ppm (s). Com a análise do espectro de HMBC ^1H - ^{13}C (figura 4.44), verificou-se correlação do H-aromático com carbonos sp_2 aromático substituído em δ 108 ppm, δ 143 ppm, δ 151 ppm e carbono com carboxílico C-7 em δ 168 ppm, confirmando a estrutura do ácido siríngico (figura 4.45).

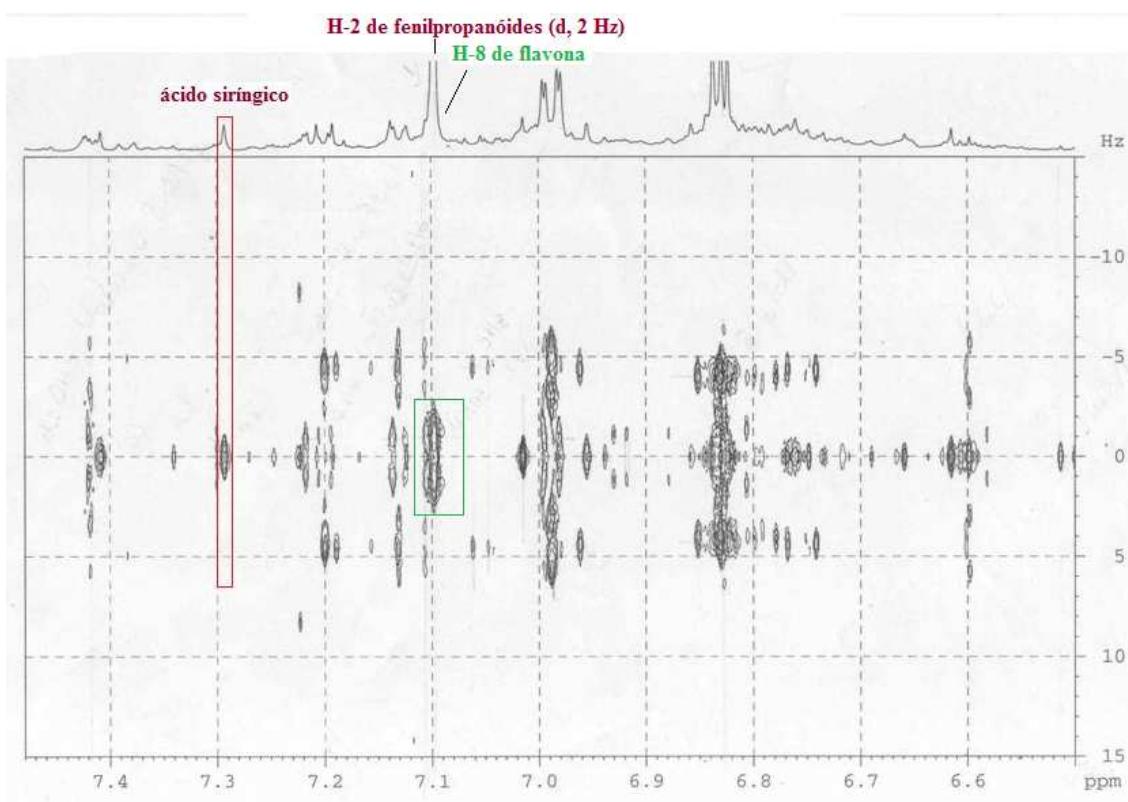


Figura 4.43. Espectro de *J*-resolved expandido na região de ressonância de próton em δ 6,50-7,50 ppm do extrato de folhas de cana-de-açúcar (extração indireta) em solvente $\text{CD}_3\text{OD-KH}_2\text{PO}_4$ e D_2O (8:2).

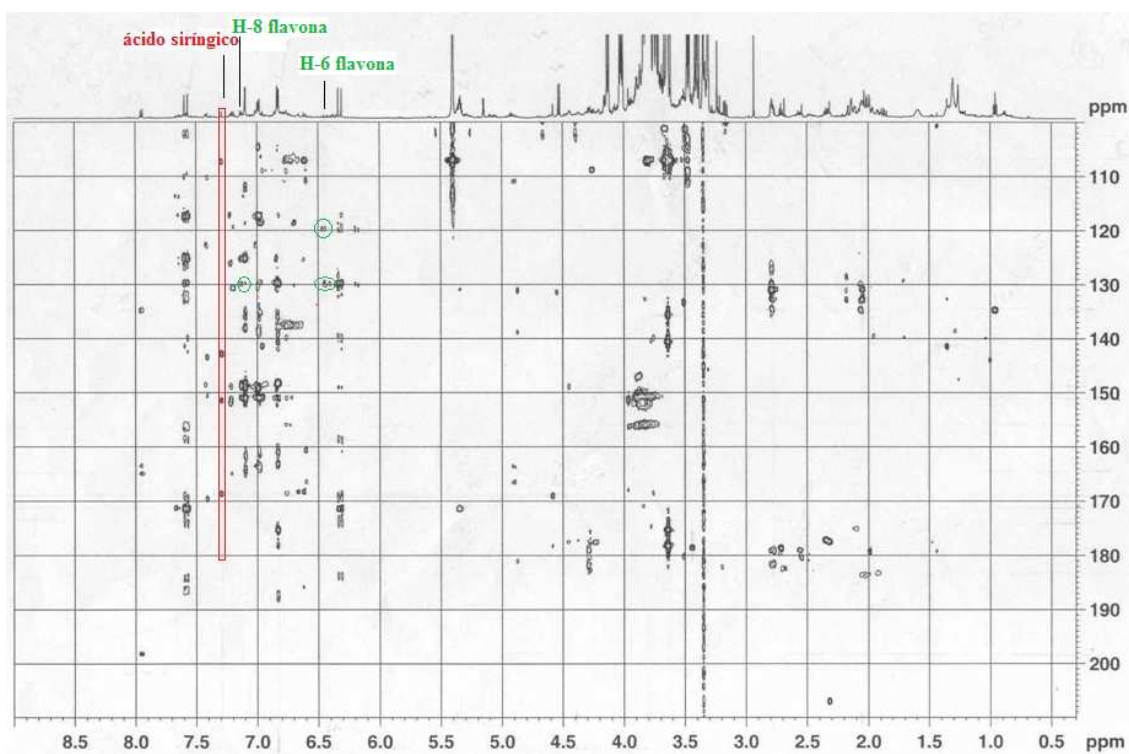


Figura 4.44. Espectro de HMBC ^1H - ^{13}C expandido na região de ressonância de ^{13}C em δ 105-210 ppm do extrato de folhas de cana-de-açúcar (extração indireta) em solvente $\text{CD}_3\text{OD-KH}_2\text{PO}_4$ e D_2O (8:2).

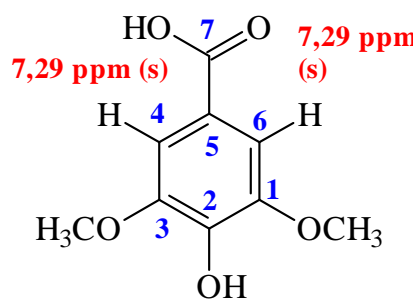


Figura 4.45. Estrutura do ácido siríngico.

Prótons característicos de flavonóides podem ser observados no espectro de *J*-resolved da figura 4.46, como o dubleto em δ 6,49 ppm (H-6, d, $J = 2$ Hz), que por sua vez apresenta correlações no espectro de HMBC ^1H - ^{13}C (figura 4.44) com os carbonos em δ 119,9 ppm (C-5) e δ 130 ppm (C-7). O carbono C-7 (δ 130 ppm) também apresenta correlação com o próton em δ 7,10 ppm (H-8, d, $J = 2$ Hz) sugerindo assim a presença de flavona com oxigenação nos carbonos C-5 e C-7 do anel A [26-28]. Em trabalhos anteriores, realizados pelo Grupo de Análise Fitoquímica, algumas flavonas foram identificadas, através da técnica de HPLC-MS, nos extratos de folhas da cana-de-açúcar das variedades transgênicas Bowman-Birk e Kunitz, que apresentaram este padrão de oxigenação no anel A (figura 4.47), como derivados de luteolina [29-31].

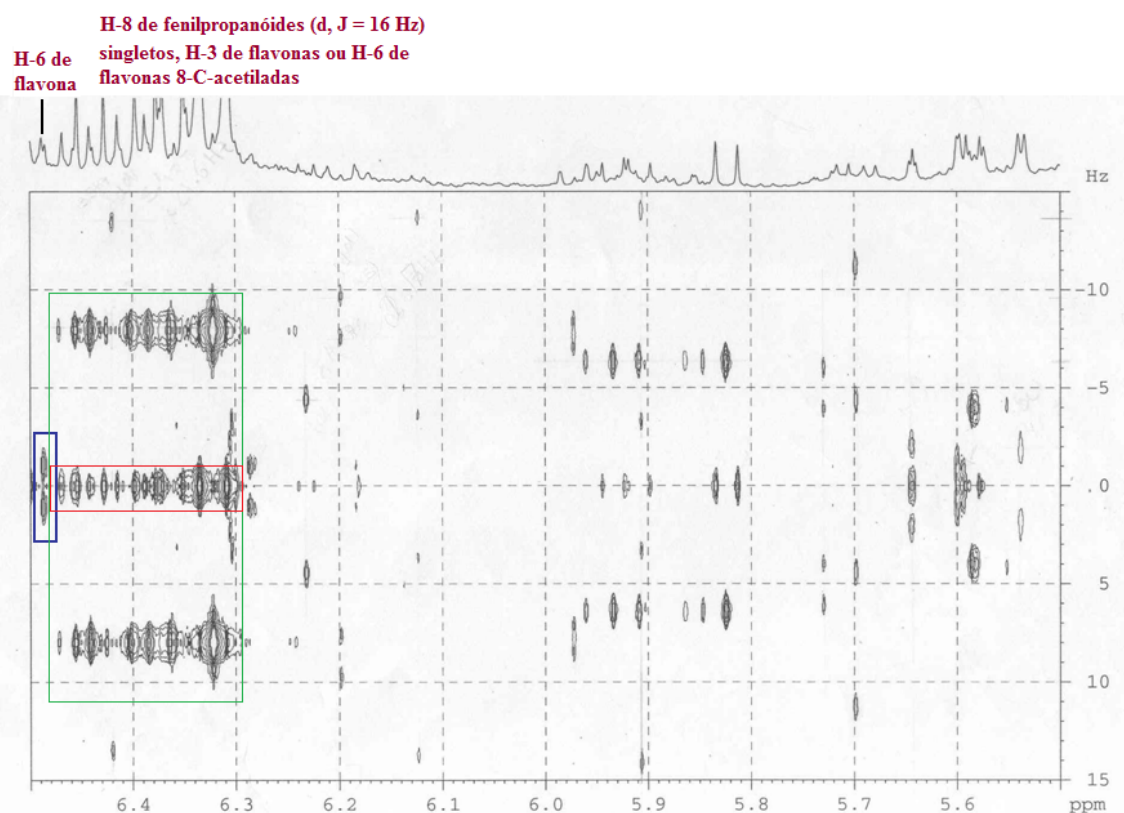


Figura 4.46. Espectro *J*-resolved expandido na região do próton em δ 5,50-6,50 ppm do extrato de folhas de cana-de-açúcar (extração indireta) em solvente $\text{CD}_3\text{OD-KH}_2\text{PO}_4$ e D_2O (8:2): δ 6,30-6,48 ppm região com sobreposição de sinais de ressonância de H-8 de fenilpropanóides (d, $J = 16$ Hz) e sinais de H-3 de flavonas e/ou H-6 de flavonas 8-C-acetiladas (s).

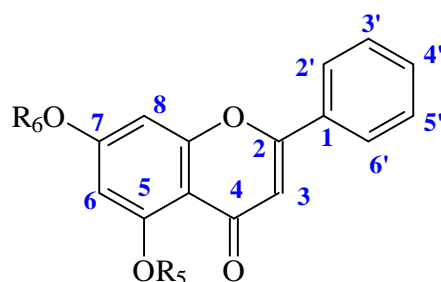


Figura 4.47. Flavonas com padrão de oxigenação C-5 e C-7.

Outros sinais de próton que corroboram a identificação da presença de flavonas, são observados na região em δ 6,18 – 6,50 ppm (H-6/H-8 e H-3, singletos) da figura 4.46, , sugerindo presença de flavonas glicosiladas na posição C-6 e/ou C-8 [26-28]. Shaftosídeo, isochaftosídeo, diosmetina-8-C-glicosídeo, diosmetina-8-C-glicosídeo-*O*-arabinosídeo e 4',5'-dimetil-luteolina-8-C-glicosídeo são alguns exemplos de flavonas identificadas em extratos de folhas de cana-de-açúcar com glicosilações nos carbonos C-6 e/ou C-8 (figura 4.48) [29-31].

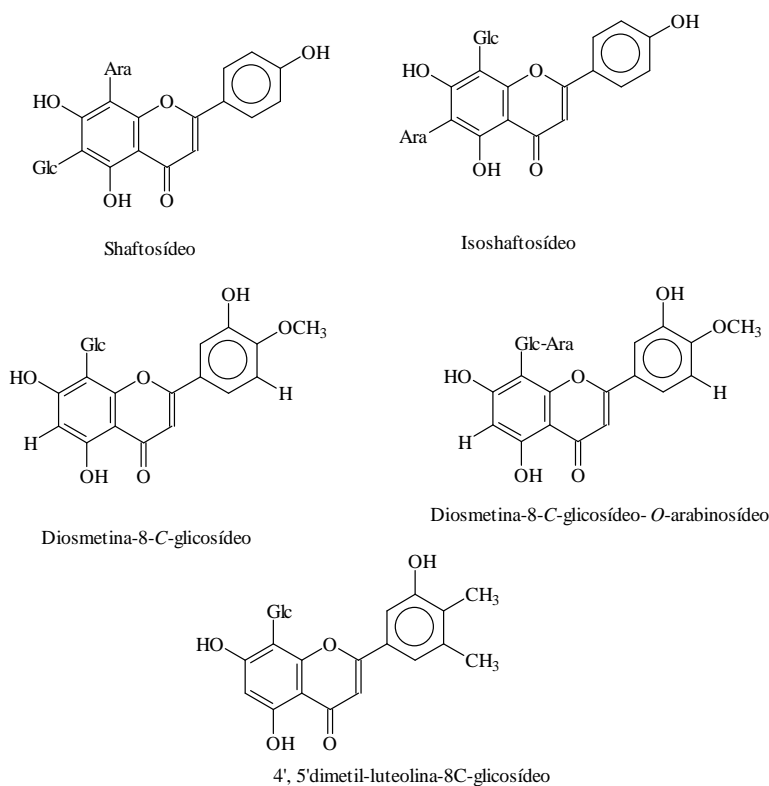


Figura 4.48. Flavonas C-6 e ou C-8 glicosiladas identificadas nos extratos de folhas de cana-de-açúcar por HPLC-MS [29-31].

Sinal típico de próton *orto* substituído no anel B em δ 7,42 ppm (H-6', dd, $J = 9$ e 2 Hz), pode ser observado no espectro de *J*-resolved da figura 4.49. Através dos deslocamentos químicos e do sistema spin-spin apresentados pelos prótons H-6', pode-se afirmar, que este flavonóide em particular, possui oxigenação nos carbonos C-3' e C-4' do anel B [27]. O espectro de HMBC ^1H - ^{13}C (figura 4.50) foi de fundamental importância para identificar a classe pertencente deste flavonóide. A correlação do próton H-6' com o carbono carbonílico C-4 em δ 169 ppm, sugere presença de isoflavona, representada na figura 4.51. Também puderam ser observadas correlações do H-6' com carbono aromático oxigenado C-4' em δ 142 ppm e carbono sp_2 de aromático C-2' em δ 110,5 ppm.

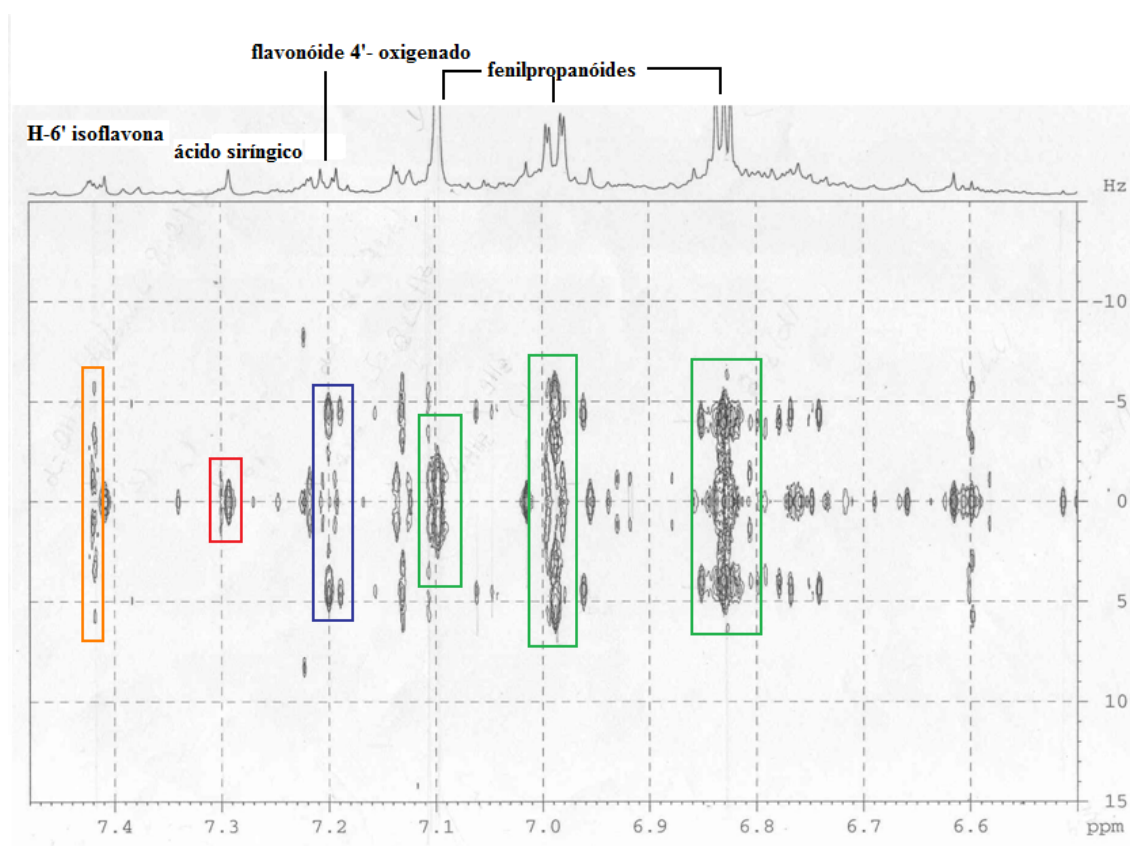


Figura 4.49. Espectro *J*-resolved expandido na região do próton em δ 6,50-7,50 ppm do extrato de folhas de cana-de-açúcar (extração indireta) em solvente $\text{CD}_3\text{OD-KH}_2\text{PO}_4$ e D_2O (8:2).

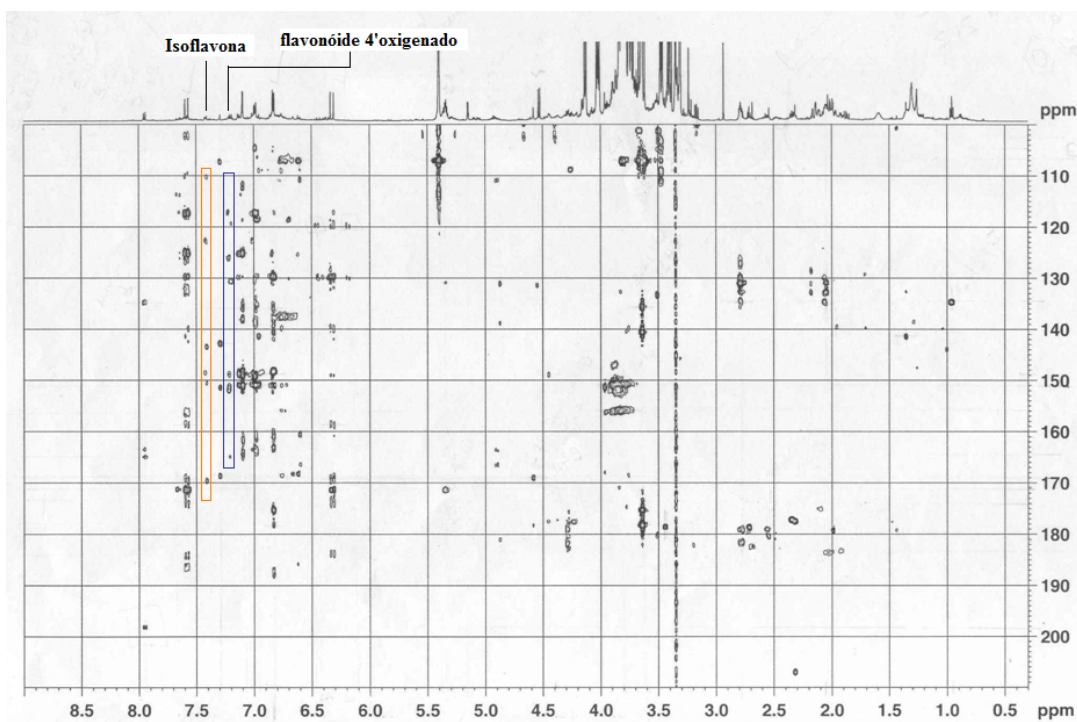


Figura 4.50. Espectro de HMBC ^1H - ^{13}C expandido na região de ressonância de ^{13}C em δ 105-210 ppm do extrato de folhas de cana-de-açúcar (extração indireta) em solvente $\text{CD}_3\text{OD-KH}_2\text{PO}_4$ e D_2O (8:2).

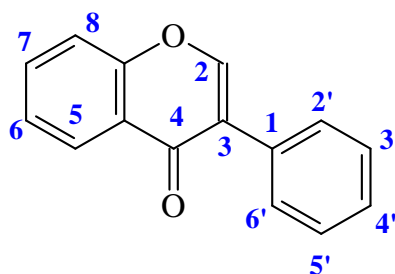


Figura 4.51. Estrutura geral das isoflavonas.

Sinais de ressonância de ^1H na região de δ 5,60-5,59 ppm (d, $J = 2$ Hz) sugere a presença de flavonóides 3-O- β -D-glucosídeos, figura 4.46 [27]. Com os dados dos espectros obtidos para os extratos de folhas da cana-de-açúcar não foi possível a identificação total dos flavonóides, requerendo assim futuros trabalhos de fracionamento de extratos e/ou isolamento destas substâncias.

A tabela 4.1, apresenta os metabólitos identificados pelo estudo do perfil metabólico das folhas de cana-de-açúcar das variedades transgênicas e seus respectivos controles.

Tabela 4.1. Deslocamento químico e constante de acoplamento característico de substâncias comumente encontradas em plantas [CD₃OD-KH₂PO₄ e D₂O, pH 6]

Metabólito	δ (ppm) e J (Hz) de ¹ H
<i>α-Alanina</i>	δ 1,49 (H-3, d, $J = 7,2$ Hz) e δ 3,74 (H-2, m)
<i>β-Alanina</i>	δ 2,53 (H-3, t, $J = 6,5$ Hz) e δ 3,16 (H-2, t, $J = 6,50$ Hz)
<i>Valina</i>	δ 1,01 (H- γ , d, $J = 7$ Hz), δ 1,05 (H- γ' , d, $J = 7$ Hz) e δ 2,33 (H- β , m)
<i>Treonina</i>	δ 1,34 (H-4, d, $J = 6,6$ Hz)
<i>Isoleucina</i>	δ 0,96 (H-5, t, $J = 7,6$ Hz) e δ 0,99 (H-3', d, $J = 7,7$ Hz)
<i>Asparagina</i>	δ 2,95 (H-2a, dd, $J = 4$ e 17,3 Hz), δ 2,81 (H-2b, dd, $J = 8,3$ e 17,3 Hz) e δ 3,93 (H-2c, dd, $J = 4$ e 8,3 Hz)
<i>Aspartato</i>	δ 2,82 (H-2, dd, $J = 4,0$ e 17,5 Hz) e δ 3,84 (H-3, dd, $J = 4$ e 8,7 Hz)
<i>GABA</i>	δ 2,31 (H-2, t, $J = 7,4$ Hz) e δ 1,90 (H-3, q, $J = 7,4$ Hz)
<i>Ácido succínico</i>	δ 2,54 (s)
<i>Ácido málico</i>	δ 2,72 (H- β , dd, $J = 16,5$ e 3,9 Hz) e δ 4,32 (H- α , dd, $J = 9,0$ e 4,0 Hz)
<i>Colina</i>	δ 3,215 (N(CH ₃) ₃ ⁺ , s)
<i>Inositol</i>	δ 3,62 (H-3,-6, t, $J = 9,8$ Hz) e 3,24 (H-4, t, $J = 9,8$ Hz)
<i>Glicina</i>	δ 3,49 (H-2, s)
<i>Ácido shiquímico</i>	δ 4,45 (t, $J = 3,9$ Hz)
<i>sacarose</i>	δ 5,41 (H-1, d, $J = 4$ Hz)
<i>α-glucose</i>	δ 5,15 (H-1, d, $J = 3,6$ Hz)
<i>β-glucose</i>	δ 4,53 (H-1, d, $J = 8$ Hz)
<i>Ácido fumárico</i>	δ 6,54 (α,β - CH=CH)
<i>Ácido trans- aconítico</i>	δ 6,71 (s) e δ 3,55 (s)
<i>Ácido 5' e 3'-O- cafeóila quínico</i>	δ 7,59 (H-7, d, $J = 16,0$ Hz), δ 6,33 (H-8, d, $J = 16,0$ Hz), δ 6,99 (H-6, dd, $J = 16,0$ e 4,80 Hz); δ 6,84 (H-5, d, $J = 8$ Hz), δ 7,1 (H-2, d, $J = 2$ Hz) e δ 5,35 (H-5', td, $J = 16,0$ e 4,80 Hz)
<i>Ácido 5' e/ou 3'-O- feruloíla quínico</i>	δ 7,66 (H-7, d, $J = 16,0$ Hz), δ 6,40 (H-8, d, $J = 16,0$ Hz) e δ 5,35 (H-5', td, $J = 16,0$ e 4,80 Hz)
<i>Ácido siríngico</i>	δ 7,29 (s)

4.3.3. Análise quimiométrica do perfil metabólico das variedades transgênicas de folhas, Bowman-Birk e Kunitz e seus respectivos controles.

O sucesso das análises quimiométricas está relacionado com o preparo das extrações e principalmente com a aquisição e consistência dos dados obtidos, como discutido anteriormente no capítulo 2. Em espectros de RMN é muito comum observar pequenas variações nos deslocamentos químicos, na linha de base e outros ruídos provocados durante o processamento dos espectros e pequenas flutuações do pH da amostra. Para minimizar estes efeitos, alguns autores, como por exemplo, Halouska e colaboradores (2006), aderiram ao uso de matrizes contendo os dados espectrais integrados em regiões de comprimento previamente definido (“bucket”), ao invés de usar o espectro inteiro [13, 32]. A grande vantagem de utilizar este tipo de processamento é o de descartar erros de flutuações no deslocamento químico e nas formas dos sinais do espectro, além de reduzir consideravelmente o número de variáveis. O estudo quimiométrico foi realizado com os espectros integrados em regiões de 0,04 ppm (“bucket”), conforme a figura 4.52.

Para a análise do perfil metabólico das variedades de folhas da cana-de-açúcar foi empregado análise de componentes principais (PCA) em duas matrizes distintas: uma delas contendo 42 espectros de RMN ^1H , das amostras de folhas empregando método direto de extração (item 4.2.3, figura 4.2) e outra contendo 42 espectros de RMN ^1H utilizando método indireto de extração das folhas (item 4.2.3, figura 4.3). Cada espectro foi segmentado em 243 regiões com deslocamento químico de δ 0,04 ppm cada uma delas (software AMIX-Brucker). Em seguida, a integral foi calculada para cada região do espectro. As regiões cujo valor da integral calculada foi menor que 5 vezes o valor do ruído, foram automaticamente descartadas, assim como a região contendo sinal de água (δ 4.80 ppm) residual e do solvente deuterado (CD_3OD , δ 3.30 ppm). O resultado obtido está apresentado na figura 4.52.

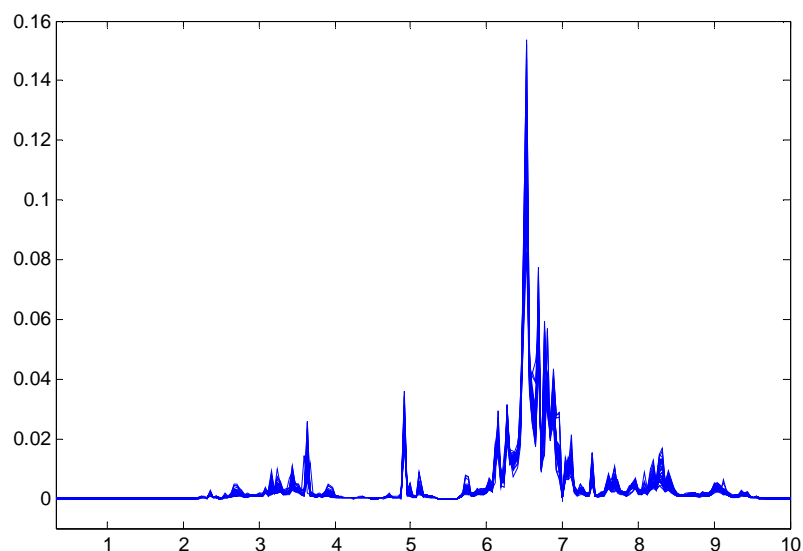


Figura 4.52. Espectros de RMN ^1H integrados em regiões de δ 0,04 ppm (“bucket”) das 42 amostras de folhas das variedades de cana-de-açúcar.

Após a obtenção dos espectros integrados, construiu-se planilhas contendo as 42 amostras de folhas com os valores integrados para cada região do espectro, resultando em duas matrizes $X_{42 \times 243}$. Em seguida, os dados das matrizes foram autoescalados, para garantir que todas as variáveis, possuam o mesmo peso, independente de estarem relacionadas a substâncias minoritárias ou majoritárias. Por fim a análise de componentes principais foi efetuada em cada matriz, separadamente, resultando em gráficos de pesos e escores para os conjuntos de dados obtidos via extração direta e indireta.

Analisando, inicialmente, a PCA realizada para a matriz de dados construída com espectros de RMN ^1H dos extratos de folhas obtidos pela extração direta, obteve-se o gráfico de escores, mostrado na figura 4.53, que fornecem informações sobre a distribuição de cada amostra contida na matriz de dados em função das novas componentes principais (PC1 e PC2), explicando a variância total em 63,21%. Não foi observado diferenças entre as amostras controles com seus respectivos transgênicos, sugerindo semelhança entre controle e transgênico em relação aos metabólitos presentes nos extratos de folhas. Entretanto, devido ao baixo número da amostragem, principalmente em relação as amostras controle, deve-se realizar ,em trabalhos futuros,

nova análise quimiométrica para verificar este mesmo comportamento é alcançado. Já em relação as variedades Bowman-Birk/ controle e Kunitz/ controle, verifica-se uma tendência na formação de dois grupos separados pela PC2, com 20,66 % de variância.

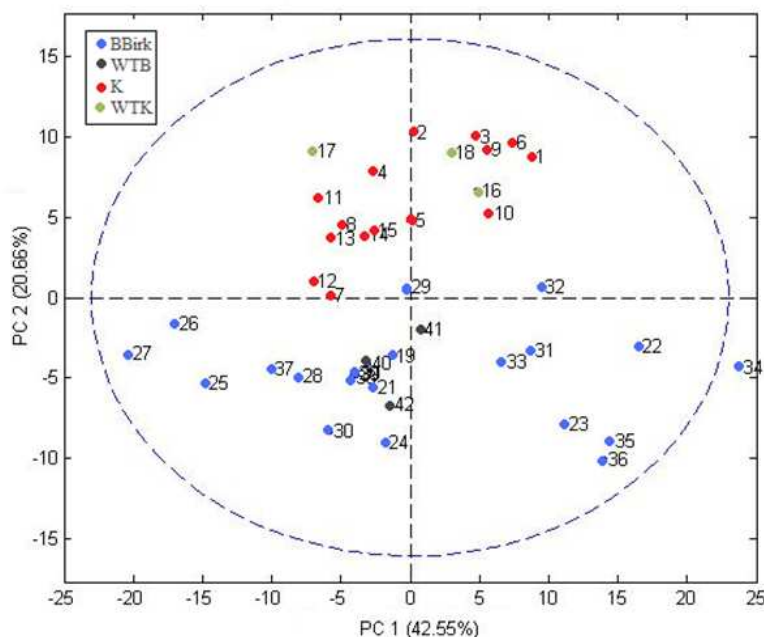


Figura 4.53. Gráfico de escores da matriz de dados $X_{42 \times 243}$ composta por regiões integradas dos espectros de RMN ^1H (500 MHz) dos extratos de folhas de cana-de-açúcar obtidos pelo método direto de extração.

Resumindo, em valores positivos da PC2 encontram-se as amostras transgênicas contendo o gene Bowman-Birk e as amostras controles para esta variedade. Já em valores negativos da PC2, observa-se as amostras transgênicas Kunitz e amostras controle desta variedade. Isto pode ser um indício de que o fator importante para diferenciação entre Bowman-Birk/control e Kunitz/control não está relacionado com o fator genético, mas com a variedade de cana-de-açúcar utilizada para a transformação gênica, sendo que ambas as variedades transgênicas (Bowman-Birk e Kunitz) foram transformadas através de plantas controle distintas.

O gráfico da figura 4.54, apresenta o resíduo gerado por cada amostra contida no modelo de PCA. Este gráfico é importante para detectar amostras de comportamento

anômalo no modelo, que podem influir negativamente na interpretação dos dados. O eixo Y do gráfico da figura 4.54, mostra os valores de Q residual, resíduo gerado na nova projeção de cada amostra, enquanto que o eixo X contém valores da distância calculada até o centróide para a projeção usada no modelo. No caso, das amostras de folhas, as amostras 10 (K) e 36 (BBirk) apresentaram alto valor de Q-residual (maior que o nível de confiança de 99%), porém os valores apresentados por elas da distância ao centróide estão abaixo de 99%, não caracterizando comportamento anômalo.

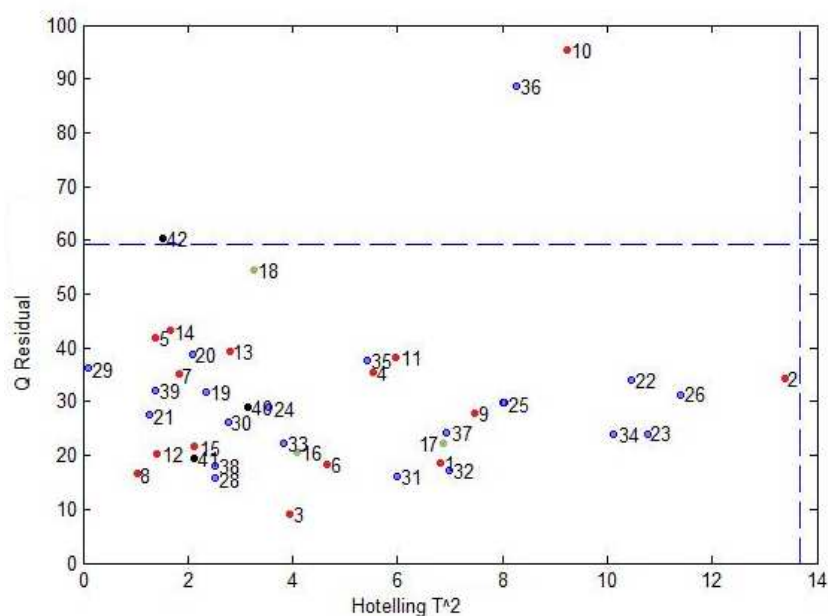


Figura 4.54. Gráfico de resíduo gerado pela análise de PCA em relação ao comportamento das amostras de folhas das variedades da cana-de-açúcar no modelo.

Adicionalmente, com a análise do gráfico de pesos (figura 4.55), pôde-se avaliar os metabólitos responsáveis pela diferença entre as folhas de cana-de-açúcar Bowman-Birk/controle das folhas Kunitz/controle. A figura 4.55, apresenta os valores dos pesos para as regiões integradas do espectro de RMN ¹H.

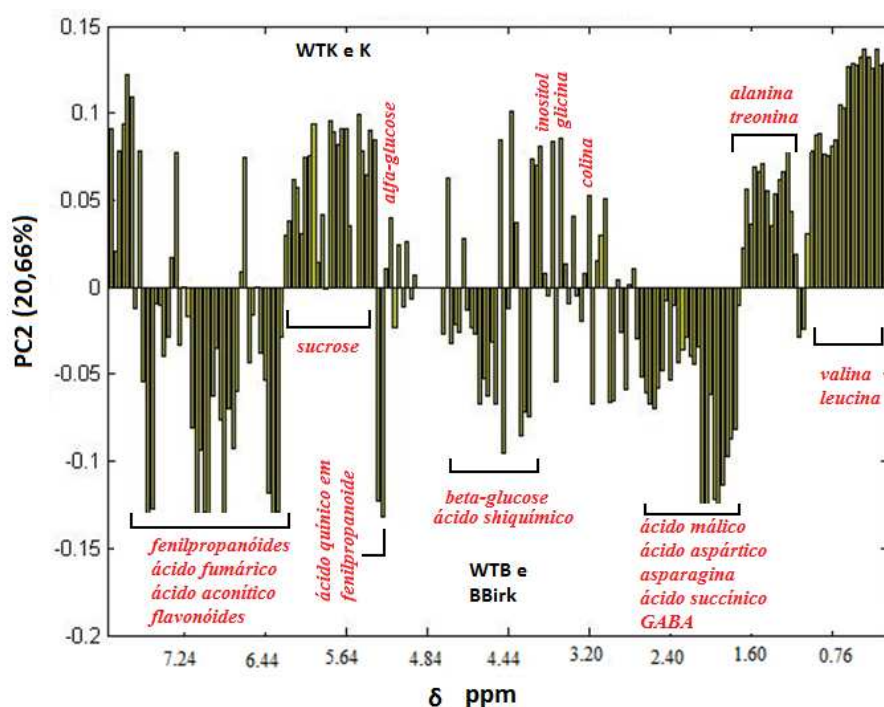


Figura 4.55. Gráfico de pesos da matriz de dados $X_{42 \times 243}$ composta por regiões integradas dos espectros de RMN ^1H (500 MHz) dos extratos de folhas de cana-de-açúcar obtidos pelo método direto de extração.

Em valores positivos dos pesos na PC2, encontram-se as regiões do espectro que contribuem com a distribuição das amostras à região positiva da PC2 do gráfico de escores. Isto significa dizer, que todos os metabólitos, cujos sinais de ressonância magnética pertencem a região positiva da PC2 no gráfico de pesos, estão presentes em maior abundância nas amostras de folhas Kunitz e seus controles e vice-versa. Desta forma, pôde-se determinar as substâncias capazes de discriminar as folhas Kunitz/controle das folhas Bowman-Birk/controle, como indicado na figura 4.55. Algumas informações interessantes podem ser observadas através da interpretação do gráfico de pesos, como por exemplo: as folhas de cana-de-açúcar WTK e K (variedade Kunitz) estão acumulando mais sacarose e glucose quando comparadas com as folhas WTB e BBirk (variedade Bowman-Birk). Em compensação, as folhas WTB e BBirk possuem em maior abundância ácido málico, fenilpropanóides e flavonóides que estão relacionados ao sistema de defesa da planta. Estas observações podem ser importantes para decidir qual das variedades resistentes à praga da broca-de-cana, deve ser utilizada

em plantações brasileiras, para obter maior rendimento na produção de açúcar e álcool. Entretanto, estudos quantitativos são necessários a fim de verificar se a diferença na concentração destes metabólitos é realmente expressiva.

A diferença entre as variedades de cana-de-açúcar está relacionada com a concentração dos metabólitos encontrados nos extratos de folhas como pode ser observado nos espectros apresentados na figura 4.56.

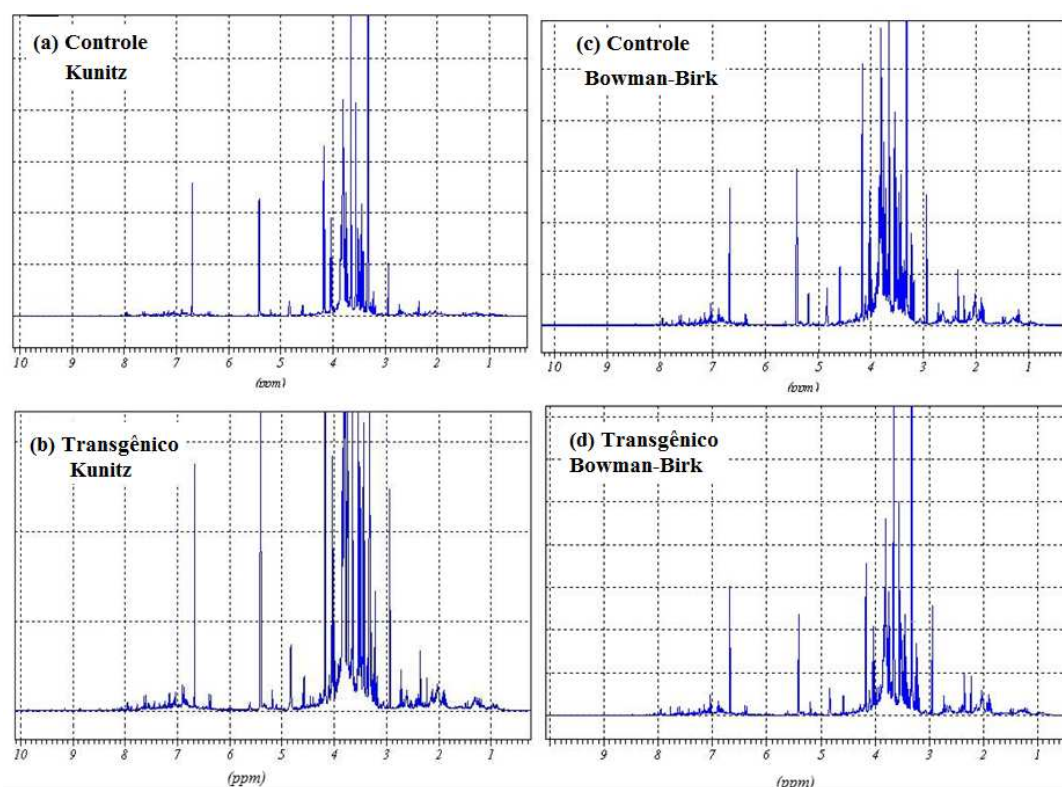


Figura 4.56. Espectros de RMN ^1H dos extratos de folhas (método direto de extração) das variedades transgênicas e seus respectivos controles de cana-de-açúcar: (a) controle Kunitz; (b) transgênico Kunitz; (c) controle Bowman-Birk; (d) transgênico Bowman-Birk.

Pela análise de PCA da matriz de dados elaborada com as regiões dos espectros de RMN ^1H dos extratos de folhas pelo método indireto, o gráfico de escores (figura 4.57) não apresenta nenhuma tendência de discriminação entre as variedades transgênicas e seus controles. Este resultado é um indicativo que substâncias como

sacarose, glucose, GABA, ácido shiquímico, são metabólitos importantes para a discriminação das folhas WTB/BBirk das folhas WTK/K, uma vez que os sinais de ressonância destas substâncias foram afetados (diminuídos ou não detectados, como discutido no item 4.3.2).

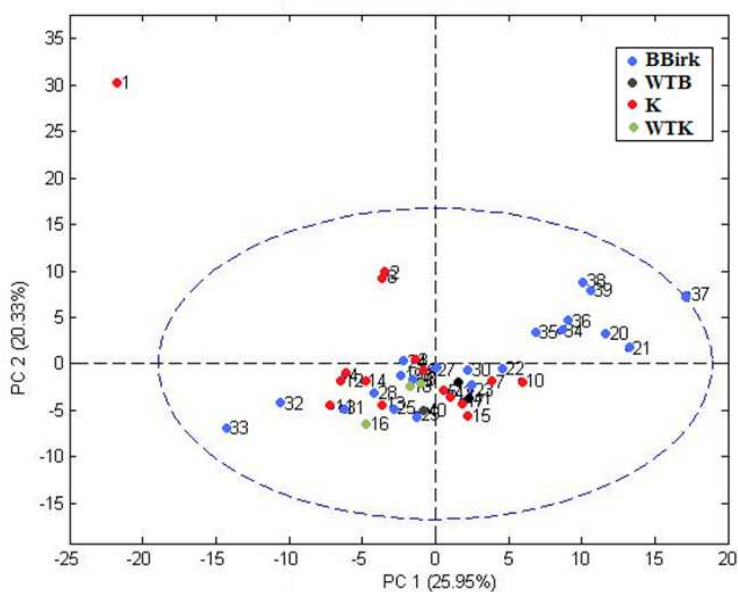


Figura 4.57. Gráfico de escores da matriz de dados $X_{42 \times 243}$ composta por regiões integradas dos espectros de RMN ^1H (500 MHz) dos extratos de folhas de cana obtidos pelo método indireto de extração.

4.4. Conclusão Parcial

Com a análise preliminar do metaboloma das variedades da cana-de-açúcar pode-se identificar metabólitos de origem comum em plantas, como os amino-ácidos, açúcares, fenilpropanóides, ácidos orgânicos e flavonóides. Em relação aos sinais de ressonância de próton dos aromáticos, verificou-se sobreposição dos deslocamentos de fenilpropanóides e flavonóides, dificultando a identificação de padrão de oxigenação dos anéis A e B pertencentes aos flavonóides. Entretanto foi possível observar sinais típicos de flavonas e de glicosídeos em flavonóides.

A análise de componentes principais sugeriu que não há diferenças significativas entre folhas controle para a variedade Bowman-Birk e folhas transgênica BBirk, assim

como para o controle da variedade Kunitz e folhas transgênicas K. Também foi observado pelas análises de PCA realizadas com espectros de RMN de ^1H dos extratos de folhas obtidos por métodos diferentes de extração, e que os metabólitos primários, como, por exemplo, sacarose, glucose, ácido shiquímico, isoleucina, 8ovalina, ácido málico e succínico, GABA, são importantes para diferenciação das variedades de folhas Bowman-Birk das Kunitz, uma vez que os sinais de ressonância dos prótons destas substâncias aparecem apenas nos espectros de RMN ^1H dos extratos de folhas obtidos pelo método direto de extração.

A identificação, por análise de RMN, dos fenilpropanóides como o ácido clorogênico e o ácido feruloil quínico, reforçou os resultados obtidos por LC-MS apresentados no capítulo 3, que indicaram a presença destas substâncias nos extratos de cana-de-açúcar.

4.5. Referências Bibliográficas

- [1] BOYES, D.C.; ZAYED, A.M.; ASCENZI, R.; MC-CASKILL, A.J; HOFFMAN, N.E. Growth stage-based phenotypic analysis of arabidopsis: a model for high throughput functional genomics in plants. **Plant Cell**, v.13, p.1499-1510, 2001.
- [2] FIEHN, O.; KOPKA, J.; DORMANN, P.; ALTMANN, T.; TRETHERWEY, R.N.; WILLMITZER, L. Metabolite profiling for functional genomics. **Nature Biotechnology**, v.18, p.1157-1161, 2000.
- [3] KIM, H.K.; CHOI, Y.H.; VERPOORTE, R. Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol. 57 in Plant Metabolomics. Springer Berlin Heidelberg 2006.
- [4] BRESCIA, M.A; CALDAROLA, V.; DE GIGLIO, A.; BENEDETTI, D.; FANIZZI, F.P.; SACCO, A. Characterization of the geographical origin of Italian red wine based on traditional and nuclear magnetic resonance spectrometric determinations. **Analytical Chimica Acta**, v. 458, p. 117–186, 2002.

-
- [5] CHARLTON, A.J.; FARRINGTON, W.H.H.; BRERETON, P. Application of ^1H NMR and multivariate statistics for screening complex mixtures: quality control and authenticity of instant coffee. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 50, p.3098–3103, 2002.
- [6] DUARTE, I.; BARROS, A.; BELTON, P.S.; RIGHELATO, R.; SPRAUL, M.; HUMPFER, E.; GIL, A.M. High-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy and multivariate analysis for the characterization of beer. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 50, p. 2475–2481, 2002.
- [7] ROESSNER-TUNALI, U.; HEGEMANN, B.; LYTOVCHENKO, A.; CARRARI, F.; BRUEDIGAM, C.; GRANOT, D.; FERNIE, A.R.. Metabolic profiling of transgenic tomato plants overexpressing hexokinase reveals that the influence of hexose phosphorylation diminishes during fruit development. **Plant Physiology**, v.133, p. 84–99, 2003.
- [8] ROESSNER-TUNALI, U.; LUEDEMANN, A.; BRUST, D., FIEHN, O.; LINKE, T.; WILLMITZER, L.; FERNIE, A.R. Metabolic profiling allows comprehensive phenotyping of genetically or environmentally modified plant systems. **The Plant Cell**, v. 13, p.11–29, 2001.
- [9] RAAMSDONK, L.M.; TEUSINK, B.; BROADHURST, D. A functional genomics strategy that uses metabolome data to reveal the phenotype of silent mutations. **Nature Biotechnology**, v.19, p.45–50, 2001.
- [10] HENDRAWATI, O.; YAO, Q.; KIM, H.K.; LINTHORST, C.E.; LEFEBER, A.W.M.; CHOI, Y.H.; VERPOORTE, R. Metabolic differentiation of Arabidopsis treated with methyl jasmonate using nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Plant Science**, v.170, p.1118-1124, 2006.
- [11] WIDRATO, H.T.; VAN DER MEIJDEN, E.; LEFEBER, A.W.M.; KIM, H.K.; CHOI, Y.H.; VERPOORTE, R. Metabolomic Differentiation of *Brassica rapa* Following Herbivory by Different Insect Instars using Two-Dimensional Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. **Journal of Chemical Ecology**, v.32, p.2417-2428, 2006.

-
- [12] CHOI, Y.H., SERTIC, S.; KIM, H.K.; WILSON, E.G.; MICHPOULOS, F.; LEFEBER, A.W.M.; ERKENLES, C.; KRICUN, S.D.P; VERPOORTE, R. Classification of *Ilex* Species Based on Metabolomic Fingerprinting Using Nuclear Magnetic Resonance and Multivariate Data Analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.1237-1245, 2005.
- [13] HALOUSKA, S.; POWERS, R. Negative impact of noise on the principal component analysis of NMR data. **Journal of Magnetic Resonance**, v.178, p.88-95, 2006.
- [14] COULQUHOUN, I.J. Use of NMR for metabolic profiling in plant systems. **Journal of Pesticide Science**, v.32, p.200-210, 2007.
- [15] VERPOORTE, R.; CHOI, Y.H.; KIM, H.K. NMR-based metabolomics at work in phytochemistry. **Phytochemistry Review**, v.6, p.6-14, 2007.
- [16] VIANT, M.R. Improved methods for the acquisition and interpretation of NMR metabolomic data. **Biochemistry and Biophysics Research Communications**, v.310, p.943-948, 2003.
- [17] FAN, T.M.W. Metabolite profiling by one- and two-dimensional NMR analysis of complex mixtures. **Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy**, v. 28, p.161-219,1996.
- [18] BAX, A.; DAVIS, D.G. MLEV-17-based two-dimensional homonuclear magnetization transfer spectroscopy. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 65, p.355-360, 1985.
- [19]BRAUNSCHWEILER, L.; ERNST, R.R. Coherence transfer by isotropic mixing: application to proton correlation spectroscopy. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 53, p.521-528, 1983.
- [20] SOBOLEV, A.P.; BROSIO, E.; GIANFERRI, R.; SEGREL, A.L. Metabolic profile of lettuce leaves by high-field NMR spectra. **Magnetic Resonance in Chemistry**, 43, p.625-638, 2005.

[21] SCHNITZLER, M.; PETEREIT, F.; NAHRSTEDT, A. Trans-Aconitic acid, glucosyl flavones and hydroxycinnamoyl tartaric acids from the leaves of *Echinodorus grandiflorus* ssp. *aureus*, a Brazilian medicinal plant. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.17, p.149-154, 2007.

[22] KROGH, A. Content of *trans*-aconitic acid in *Asarum europaeum* determined by means of a chromatogram spectrometer. **Acta Chimica Scandinavica**, v 25, p.1495-1496, 1971.

[23] PAULI, G.F.; POETSH, F.; NAHRSTEDT, A. Structure assignment of natural quinic acid derivatives using proton nuclear magnetic resonance techniques. **Phytochemical Analysis**, v.9, p.177-185, 1998.

[24] LIANG, Y.S.; KIM, H.K.; A.W.M. LEFEBER, A.W.M.; ERKELENS, C.; CHOI, Y.H. ; VERPOORTE, R. Identification of phenylpropanoids in methyl jasmonate treated *Brassica rapa* leaves using two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Journal of Chromatography A**, v.1112, p.148-155, 2006.

[25] CHOI, Y.H.; KIM, K.H.; LINTHORST, H.J.M.; HOLLANDER, J.G.; LEFEBER, A.W.M.; ERKELENS, C.; NUZILLARD, J.M.; VERPOORTE, R. NMR Metabolomics to Revisit the Tobacco Mosaic Virus Infection in *Nicotiana tabacum* Leaves. **Journal of Natural Products**, v.69, p.742-748, 2006.

[26] DEY, P.M.; HARBORNE, J.B. **Methods in Plant Biochemistry: Plant Phenolics**, Academic Press, London, 1989.

[27] HARBORNE, J.B. **The Flavonoids: Advances in research since 1986**, Chapman & Hall, Florida, 1996.

[28] MABRY, T.J.; MARKHAM, K.R.; THOMAS, M.B. **The Systematic Identification of Flavonoids**, Springer, New York, 1970.

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

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

[31] COLOMBO, R.; YARIWAKE, J.H.; QUEIROZ, E.F.; NDJOKO, K.; HOSTETTMAN, K. On-line identification of minor flavones from sugarcane juice by LC/UV/MS and post-column derivatization. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v.20, p.1574-1579, 2009.

[32] HOLMES, E.; NICHOLSON, J.K.; Nicholls, A.W.; LINDON, J.C.; CONNOR, S.C.; POLLEY, S.; CONNELLY, J. The identification of novel biomarkers of renal toxicity using automatic data reduction techniques and PCA of proton NMR spectra of urine. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 44, p.245–255, 1998.

Capítulo 5

5.1. Conclusão Geral

Neste trabalho foi possível investigar o metaboloma de duas variedades transgênicas da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*). Primeiramente, com a análise do perfil cromatográfico dos polifenóis presentes nos extratos de folhas das duas variedades, foi possível observar diferenças significativas entre as duas variedades transgênicas SBBI e KTI. A HPLC-MS/MS possibilitou a identificação parcial das substâncias indicadas pelo estudo quimiométrico como possíveis biomarcadores, dentre elas o ácido clorogênico, ácido ferúlico, sinapoil hexosídeo e flavonóides glicosilados. Analisando os espectros de massas verificou-se que a discriminação entre as folhas SBBI e KTI está relacionada com a quantidade de biomarcadores produzidos pelas plantas.

As substâncias fenólicas são sintetizadas nas plantas através da rota do ácido chiquímico, que converte carboidratos em amino ácidos aromáticos [1]. Diferenças nos perfis cromatográficos das duas variedades sugerem também alterações nas quantidades dos precursores envolvidos na produção dos polifenóis. A figura 5.1 apresenta de forma resumida as rotas de biosínteses dos polifenóis, podendo ser observado a conexão entre açúcares, ácido chiquímico e fenilpropanóides. De fato, no capítulo 4, através do estudo do metaboloma das variedades transgênicas foram constatadas alterações nas quantidades de açúcares (glucose, sacarose), ácido chiquímico (precursor de amino ácidos aromáticos), flavonóides (flavonas e isoflavonas) e fenilpropanóides (cafeílquínico e feruloílquínico). Estes resultados reforçaram as observações encontradas no estudo dos perfis cromatográficos das duas variedades transgênicas (KTI e SBBI). Adicionalmente, diferenças nas quantidades de ácidos orgânicos (ácido málico, ácido fumárico, ácido trans-aconítico e ácido succínico) e amino ácidos alifáticos (leucina, alanina, asparagina, valina e colina) também puderam ser verificadas. Assim, as duas variedades transgênicas apresentam mudanças nas quantidades de metabólitos produzidos pelas plantas, indicando alteração biosintética. A figura 5.1 apresenta de forma resumida rotas de biosíntese de flavonóides e pode-se observar a conexão entre açúcares, ácido chiquímico e fenilpropanóides.

Este trabalho é mais um indício da potencialidade na aplicação do estudo do metaboloma como estratégia para a investigação de alterações no metabolismo de plantas. De fato, a análise metabolômica fornece o máximo de informação funcional do que hoje denomina-se “omics”, ou seja, a visão holística dos metabolitos produzidos por um organismo, neste caso da cana-de-açúcar [2].

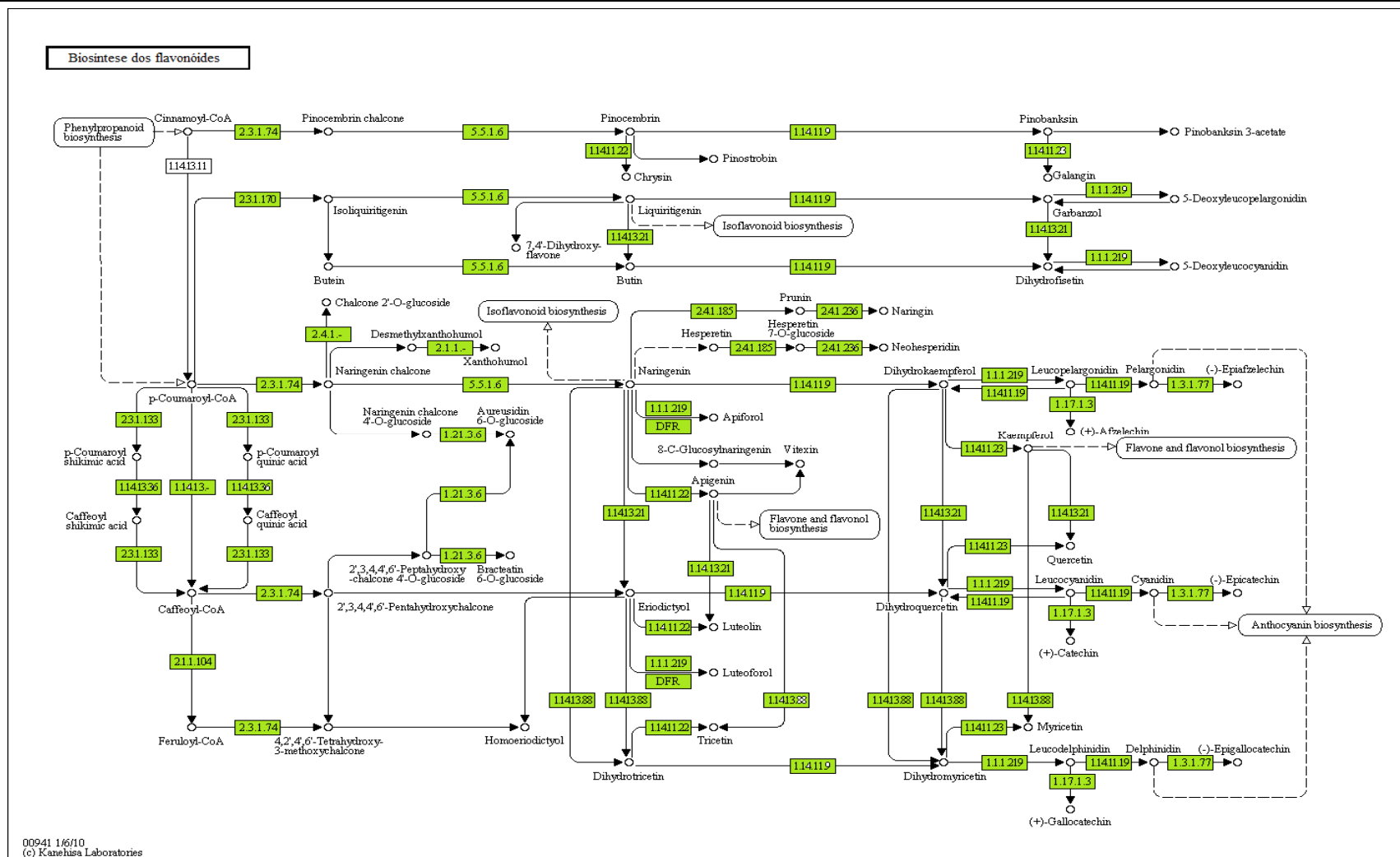


Figura 5.1. Rota Biosintética dos flavonóides (extraída do website http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?map00941, versão original).

Neste trabalho, a ressonância magnética nuclear (RMN) mostrou-se vantajosa no estudo do metaboloma da cana-de-açúcar, devido à não seletividade na detecção dos metabolitos e à não destruição da amostra. Além disso, a elucidação estrutural de compostos primários e secundários através de espectros em 2D (J-Resolved, COSY ^1H - ^1H , HMBC ^1H - ^{13}C), mostrou-se razoavelmente simples e bem eficiente. A identificação da posição de substituintes também pode ser analisada, principalmente para a substituição dos derivados de ácido cinâmico nas posições do ácido quínico. Apenas para metabolitos secundários como os flavonóides, técnicas de fracionamento ou isolamento serão necessárias para obtenção da identificação da estrutura completa. Entretanto, a presença de substâncias da classe dos flavonóides (flavonas, flavanonas, flavanóis etc) e padrões de oxigenação pôde ser reconhecida nos espectros de próton (RMN ^1H) e J-resolved.

O resultado do estudo do perfil cromatográfico das variedades transgênicas indicou alteração na rota do shiquimato, devido às diferenças expressivas encontrada entre as folhas das variedades Bowman-Birk e Kunitz em relação à diferença a quantidade dos derivados do ácido hidroxicinâmico (ácido cafeoilquínico e feruloílquínico) produzidos por cada planta. Uma vez alterada a quantidade de precursores envolvidos na rota do ácido chiquímico (responsável pela biosíntese dos fenilpropanóides), espera-se alterações também na formação dos flavonóides, uma vez que, os ácidos fenólicos são precursores bioquímicos deste tipo de classe de substância (figura 5.1). Esta observação também pôde ser constatada neste trabalho.

Apesar do estudo do metaboloma das duas variedades confirmar alterações nas quantidades de metabolitos produzidos pelas duas variedades transgênicas de folhas de cana-de-açúcar (SBBI e KTI), nenhuma discriminação entre os controles e seus respectivos transgênicos puderam ser observadas pelo estudo quimiométrico. Desta forma, é evidente que as mudanças nas quantidades dos metabolitos secundários e primários não estão relacionadas com as modificações genéticas. Entretanto, em futuros trabalhos sobre o metaboloma destas duas variedades de cana-de-açúcar, um número maior de plantas controle deve ser incluído para aumentar a significância do estudo quimiométrico.

Por fim, com o estudo metabolômico foi possível perceber que a variedade transgênica Bowman-Birk possui maior quantidade de açúcares e polifenóis que a variedade Kunitz. Desta forma, pode-se sugerir que a variedade transgênica Bowman-Birk é a mais indicada para cultivo do que a Kunitz. As razões inicialmente parecem óbvias, uma é pelo alto teor de mono e dissacarídeos (produção comercial de açúcar e álcool) e outra devido ao alto teor de polifenóis (antioxidantes). Os fenilpropanóides são substâncias utilizadas pelas plantas no mecanismo de defesa, principalmente por estresse sofrido através de infestação de patógenos [3-4]. Além disso, estas substâncias também são altamente reconhecidas como antioxidantes em potencial, servindo como matéria prima para indústrias farmacêuticas [5-7]. Contudo, futuras análises quantitativas do teor de açúcar contido em ambas as variedades deverão ser realizadas a fim de investigar se a diferença na concentração de açúcares totais e de polifenóis nas duas variedades transgênicas é significativa.

5.2. Referências Bibliográficas

- [1] DEY, P.M.; HARBORNE, J.B. Plant Phenolics. *In* Methods in Plant Biochemistry, v.1, Academic Press, 1989, London p.29-105.
- [2] SUMNER, L.W.; MENDES, P.; DIXON, R.A.. Plants metabolomics: large-scale phytochemistry in the functional genomics era. **Phytochemistry**, v.62, 817-836, 2003.
- [3] SUMMERS, C.B.; FELTON, G. Prooxidant effects of phenolic acids on the generalist herbivore *Helicoverpa zea* (Lepidoptera:Noctuidae): potential mode of action for phenolic compounds in plant anti-herbivore chemistry. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.24, p.943-953, 1994.
- [4] SAHOO, M.R.; KOLE, P.C.; DASGUPTA, M.; MUKHERJEE, A. Changes in phenolics, polyphenol oxidase and its isoenzyme patterns in relation to resistance in taro against *Phytophthora colocasiae*. **Journal of Phytopatology**, v.157, p.145-153, 2009.
- [5] DUARTE-ALMEIDA, J.M.; NEGRI, G.; SALTINO, A.; CARVALHO, J.E.; LAJOLO, F.M. Antiproliferative and antioxidant activity of tricetin acylated glycoside from sugarcane (*Saccharum officinarum*) juice. **Phytochemistry**, v. 68, p. 1165-1171, 2007.
- [6] VERSCHOYLE, R.E.; GREAVES, P.; CAI, H.; ARNDT, B.; BROGGINI, M.; DÍNCALCI, M.; RICCIO, E.; DOPPALAPEED, R.; KAPETANOVI, I.M.; STEWAND, W.P.; GESCHER, A.J. Preliminary safety evaluation of the putative cancer chemopreventive agent tricetin, a naturally occurring flavone. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 57, p.1-6, 2006.
- [7] SANCHÉZ-MORENO, S.; LARRAURI, J.A.; SAURA-CALIXTO, F. Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grape juices and related polyphenolic constituents. **Food Research International**, v.32, p.407-412, 1999.