



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

JOVANDERSON JACKSON BARBOSA DA SILVA

**ANÁLISE DA VARIAÇÃO DIURNA DE CARBOIDRATOS E METABÓLITOS
DE CANA-ENERGIA E CANA-DE-AÇÚCAR**

CAMPINAS

2021

JOVANDERSON JACKSON BARBOSA DA SILVA

**ANÁLISE DA VARIAÇÃO DIURNA DE CARBOIDRATOS E METABÓLITOS
DE CANA-ENERGIA E CANA-DE-AÇÚCAR**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas como parte dos
requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em
Genética e Biologia Molecular na área de Bioinformática.

Orientador: Dr. Marcelo Falsarella Carazzolle

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELO ALUNO JOVANDERSON
JACKSON BARBOSA DA SILVA E
ORIENTADA PELO DR. MARCELO
FALSARELLA CARAZZOLLE.

CAMPINAS

2021

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

Si38a Silva, Jovanderson Jackson Barbosa da, 1994-
Análise da variação diurna de carboidratos e metabólitos de cana-energia e cana-de-açúcar / Jovanderson Jackson Barbosa da Silva. – Campinas, SP : [s.n.], 2021.

Orientador: Marcelo Falsarella Carazzolle.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Cana-de-açúcar. 2. Bioenergia. 3. Açúcares. 4. Metabolismo. I. Carazzolle, Marcelo Falsarella, 1975-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Analysis of the diurnal variation of carbohydrates and metabolites of energy-cane and sugarcane

Palavras-chave em inglês:

Sugarcane

Bioenergy

Sugars

Metabolism

Área de concentração: Bioinformática

Titulação: Mestre em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Marcelo Falsarella Carazzolle [Orientador]

Marcelo Mendes Bradão

Carlos Takeshi Hotta

Data de defesa: 26-02-2021

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-9601-6415>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/4964251426810835>

Campinas, 26 de fevereiro de 2021

COMISSÃO EXAMINADORA

Dr. Marcelo Falsarella Carazzolle

Prof. Dr. Marcelo Mendes Brandao

Dr. Carlos Takeshi Hotta

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular do Instituto de Biologia.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), processo nº 130066/2020-6.

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida, pelas oportunidades e por ter me dado forças para chegar até o fim, mesmo em momentos difíceis pela qual passamos. Aqui também quero agradecer a minha família, por ter me dado o apoio necessário durante o período de mestrado.

Ao meu orientador, o Dr. Marcelo Falsarella Carazzolle, pela amizade e por ter me orientado durante o período de mestrado, período aonde tive a oportunidade de crescer academicamente e desenvolver várias habilidades e competências como pesquisador e na área de Bioinformática.

A nossa equipe de colaboradores, ao Dr. Luís Guilherme Furlan de Abreu pela co-orientação no decorrer do desenvolvimento do projeto e pela ajuda nos procedimentos experimentais, ao Dr. Allan Jhonathan Ramos Ferrari por ter me ajudado nas análises de metabolômica e ao Dr. Lucas Miguel de Carvalho por ter me auxiliado nas análises estatísticas do projeto.

Ao grupo de pesquisa do Laboratório de Genômica e bioEnergia (LGE), coordenado pelo Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira. O LGE é um dos maiores e melhores laboratórios da UNICAMP, composto por pesquisadores e gestores de altíssimo nível. Fico feliz por ter participado desse grupo, é um lugar onde os alunos de graduação, mestrado, doutorado e pós-doutorado desenvolvem suas habilidades como pesquisadores.

Aos membros da banca de defesa da dissertação por ter aceito o convite e participado, composta por membros titulares e suplentes, os professores Dr. Marcelo Mendes Brandao (UNICAMP), Dr. Carlos Takeshi Hotta (USP), Dr. Carlos Alberto Labate (USP) e Dr. Rafael Vasconcelos Ribeiro (UNICAMP).

Aos colaboradores que ajudaram em parte desta pesquisa. A Prof. Dr.^a Taícia Pacheco Fill (IQ-UNICAMP) por ter colaborado na parte de metabolômica. A Dr.^a Adriana Grandis (USP) e ao Prof. Dr. Marcos S. Buckeridge (USP) pela colaboração na análise dos açúcares.

Parte desta pesquisa foi realizada e utilizou recursos do Laboratório Nacional de Biorrenováveis (LNBR), uma instalação nacional aberta do Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações (MCTIC) operada pelo Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM). Agradecemos a equipe do Jardim Varietal do laboratório pelo material vegetal e a equipe da *Facility* de Metabolômica pela assistência durante os experimentos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

"Em algum lugar, alguma coisa incrível está esperando para ser descoberta." – Carl Sagan

RESUMO

A cana-energia é um híbrido comercial que possui um alto teor de fibras, baixo teor de sacarose e maior produtividade em relação aos híbridos comerciais de cana-de-açúcar. No Brasil, algumas empresas tem desenvolvido variedades comerciais de cana-energia, como por exemplo a CanaVertix® da GranBio S/A. Embora muitas características fisiológicas e bioquímicas da cana-de-açúcar sejam conhecidas, pouco se sabe sobre os mecanismos de expressão gênica, produção, degradação e translocação de carboidratos e metabolitos nos tecidos (fonte e dreno) de cana-energia em função do período diurno (noite e dia), mecanismos que agem interativamente e resultam em maior acúmulo de biomassa, crescimento e desenvolvimento. Para compreender esses processos e propor novas estratégias baseadas em engenharia genética que aumente a produtividade destas cultivares, o objetivo deste projeto foi avaliar o metabolismo primário e secundário, e dos carboidratos dos tecidos da folha (fonte) e do colmo (dreno) de cana-energia e cana-de-açúcar, buscando compreender como os carboidratos e metabolitos se comportam em função da variação diurna e entender como esses órgãos interagem metabolicamente entre si para se adaptarem ao ambiente e sustentar seu crescimento. Para isso, realizamos um experimento aonde foram coletados os tecidos da folha e do colmo em plantas adultas de cana-energia e cana-de-açúcar durante um ciclo diurno de 24 horas. Em seguida, essas amostras foram submetidas às análises de quantificação de carboidratos e metabólica. Observamos uma mudança de fase no perfil dos açúcares solúveis (sacarose, glicose e frutose) e do amido de cana-energia e cana-de-açúcar durante o período diurno, sugerindo que o processo de partição de carbono em cana-energia e cana-de-açúcar difere e o carbono é desviado para vias biológicas distintas. Observamos também que cana-energia possui um maior teor de amido em seus colmos em contraste a cana-de-açúcar. Em relação ao metabolismo primário, encontramos vários metabólitos diferencialmente abundantes entre as cultivares e entre os períodos diurnos, sugerindo um metaboloma característico de cada cultivar. Em relação ao metabolismo secundário, identificamos e quantificamos vários metabólitos, muitos deles não foram identificados, mas possuíam diferenças estatísticas em função do tempo e entre cultivares. Analisando o papel

biológico dos metabólitos identificados em função da variação diurna, observamos muitas vias biológicas impactadas durante o período noturno em cana-energia (como a dos fenilpropanóides) em contraste a cana-de-açúcar, sugerindo que as maiores diferenças entre o metabolismo destas cultivares ocorre durante a noite.

Palavras-chave: cana-de-açúcar; cana-energia; açúcares; metabolismo primário; metabolismo secundário.

ABSTRACT

Energy-cane is a commercial hybrid that has a high fiber content, low sucrose content and greater productivity compared to commercial sugarcane hybrids. In Brazil, some companies have developed commercial varieties of energy-cane, such as CanaVertix® from GranBio S/A. Although many physiological and biochemical characteristics of sugarcane are known, little is known about the mechanisms of gene expression, production, degradation and translocation of carbohydrates and metabolites in the tissues (source and drain) of energy-cane depending on the daytime period (night and day), mechanisms that act interactively and result in greater accumulation of biomass, growth and development. To understand these processes and propose new strategies based on genetic engineering that increase the productivity of these cultivars, the objective of this project was to evaluate the primary and secondary metabolism, and the carbohydrates of the leaf (source) and stem (sink) tissues, seeking to understand how carbohydrates and metabolites behave due to daytime variation and to understand how these organs interact metabolically with each other to adapt to the environment and sustain their growth. For this, we carried out an experiment in which the tissues of the leaf and stem were collected from adult plants of energy-cane and sugarcane during a 24-hour day cycle. Then, these samples were subjected to analysis of carbohydrate quantification and metabolomics. We observed a phase change in the profile of soluble sugars (sucrose, glucose and fructose) and of starch sugarcane and energy-cane during the day/night, suggesting that the process of carbon partition into energy-cane and sugarcane differs and carbon is diverted to different biological pathways. We also observed that energy-cane has a higher starch content in its stalks in contrast to sugarcane. In relation to primary metabolism, we found several metabolites differentially abundant between cultivars and between diurnal periods, suggesting a metabolome characteristic of each cultivar. In relation to secondary metabolism, we identified and quantified several metabolites, many of which were not identified, but had statistical differences according to time and cultivars. Analyzing the biological role of the metabolites identified as a function of diurnal variation, we observed many biological pathways impacted during the night in energy-cane (such as

phenylpropanoids) in contrast to sugarcane, suggesting that the greatest differences between the metabolism cultivars occurs during the night.

Keywords: sugarcane; energy-cane; sugars; primary metabolism; secondary metabolism.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema geral do experimento de coleta	23
Figura 2. Metabolismo sacarose nas células foliares da cana-de-açúcar	28
Figura 3. Metabolismo sacarose nas células de armazenamento da cana-de-açúcar	29
Figura 4. Metabolismo de síntese e degradação do amido no tecido foliar	33
Figura 5. Metabolismo de síntese e degradação do amido nos tecidos de armazenamento	34
Figura 6. Variação diurna dos açúcares nos tecidos folha e nos entrenós de cana-energia e cana-de-açúcar durante o ciclo diurno	37
Figura 7. Variação diurna de amido nos tecidos folha +1 e entrenós +1, +3, +6 e +12 de cana-energia e cana-de-açúcar durante o ciclo diurno	40
Figura 8. Crescimento diurno de cana-de-açúcar e cana-energia	44
Figura 9. Pipeline de identificação e quantificação dos metabólitos	58
Figura 10. Metab. primário: PCA dos metabólitos encontrados na folha	62
Figura 11. Metab. primário: heatmap dos metabólitos encontrados na folha	63
Figura 12. Metab. primário: metabólitos com diferenças estatísticas na folha	64
Figura 13. Metab. primário: PCA dos metabólitos encontrados no entrenó	66
Figura 14. Metab. primário: heatmap com os metabólitos encontrados no entrenó	67
Figura 15. Metab. primário: metabólitos com diferenças estatísticas no entrenó	68
Figura 16. Número de sinais em cada etapa do processamento dos dados de LC-MS através do MZMine2 e GNPS para folha e entrenó	69
Figura 17. Metab. secundário: PLS-DA e análise VIP dos metabólitos da folha e do entrenó	71
Figura 18. Metab. secundário: ANOVA dos metabólitos da folha e do entrenó	72
Figura 19. Metab. secundário: Análise ASCA dos metabólitos da folha e do entrenó ..	73
Figura 20. Metab. secundário: Metabólitos encontrados na folha	76
Figura 21. Metab. secundário: Metabólitos encontrados no entrenó	77
Figura 22. Número de metabólitos anotados em cada cultivar, tecido e por tempo	75

Figura 23. UpSet mostrando o número de metabólitos únicos e compartilhados encontrados em cada tecido por ponto	78
Figura 24. Análise de via baseada nos metabólitos encontrados em cana-energia e cana-de-açúcar para a folha	80
Figura 25. Análise de via baseada nos metabólitos encontrados em cana-energia e cana-de-açúcar para o entrenó	82

LISTA DE FIGURAS SUPLEMENTARES

Figura 1 complementar. Normalização dos dados de GC-MS (metabolismo primário), dos tecidos da folha e do entrenó +3 cana-energia (CE) e cana-de-açúcar (CA), realizada no MetaboAnalyst	105
Figura 2 complementar. Normalização dos dados de LC-MS (metabolismo secundário), dos tecidos da folha e do colmo cana-energia (CE) e cana-de-açúcar (CA), realizada no MetaboAnalyst	106

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características da cana-energia	18
--	----

LISTA DE TABELAS SUPLEMENTARES

Tabela 1 complementar. Parâmetros usados no software MZMine2 para processar os dados de LC-MS, dos tecidos da folha +1 e entrenó +3 de cana-de-açúcar e cana-energia	107
---	-----

Tabela 2 complementar. Lista de compostos detectados na folha +1 de cana-de-açúcar e cana-energia, através do banco de dados GNPS	107
--	-----

Tabela 3 complementar. Lista de compostos detectados no entrenó +3 de cana-de-açúcar e cana-energia, através do banco de dados GNPS	111
--	-----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1.1. Variação diurna do metabolismo em plantas	19
1.2. OBJETIVOS GERAIS	21
1.3. DESENHO EXPERIMENTAL	22

CAPÍTULO I: AÇÚCARES SOLÚVEIS E AMIDO

2. INTRODUÇÃO	24
2.1.1. Metabolismo da sacarose em plantas	27
2.1.2. Metabolismo do amido em plantas	31
2.2. OBJETIVOS	35
2.3. MATERIAL E MÉTODOS	35
2.3.1. Material vegetal	35
2.3.2. Quantificação dos açúcares	36
2.4. RESULTADOS	37
2.4.1. Açúcares solúveis	37
2.4.2. Amido	40
2.5. DISCUSSÃO	41
2.5.1. As hexoses regulam importantes processos biológicos, tais como crescimento e fotossíntese	41
2.5.2. Cana-energia tem mais amido nos entrenós maduros em relação a cana-de-açúcar	46
2.6. CONCLUSÃO	48

CAPÍTULO II: METABOLISMO PRIMÁRIO E SECUNDÁRIO

3.1. INTRODUÇÃO	50
3.1.1. Metabolismo primário e secundário	52
3.2. OBJETIVOS	54
3.3. MATERIAL E MÉTODOS	55
3.3.1. Material vegetal: metabolismo primário e secundário	55
3.3.2. Análise do metabolismo primário	55
3.3.3. Análise do metabolismo secundário	56

3.4. RESULTADOS	60
3.4.1. Metabolismo primário	60
3.4.1.1. Metabólitos primários detectados na folha	61
3.4.1.2. Metabólitos primários detectados no colmo	65
3.4.2. Metabolismo secundário	69
3.4.2.1. Quantificação e análise estatística dos metabólitos da folha e do colmo .	69
3.4.2.2. Identificação dos metabólitos da folha e colmo	74
3.4.2.3. Análise de impacto de vias dos metabólitos da folha e colmo	79
3.5. DISCUSSÃO	83
3.5.1. Metabolismo primário	83
3.5.1.1. Metabólitos ligados ao processo respiração celular são mais significativos em cana-energia em comparação a cana-de-açúcar	83
3.5.1.2. Metabólitos relacionados a produção de biomassa são mais abundantes em cana-energia em comparação a cana-de-açúcar	84
3.5.1.3. Os aminoácidos são cruciais para suprir as demandas do metabolismo das cultivares e distinguir cana-de-açúcar e cana-energia	86
3.5.1.4. Compostos lipídicos	87
3.5.2. Metabolismo secundário	87
3.5.2.1. Processamento das amostras LC-MS: desafios de anotação	88
3.5.2.2. Análise estatística: revela que um perfil metabólico diferencial entre os tecidos da folha e do colmo de cana-de-açúcar e cana-energia ao longo do ciclo diurno	89
3.5.2.3. A análise de vias biológicas: sugere que as principais diferenças no metabolismo de cana-de-açúcar e cana-energia ocorrem durante a noite	90
3.6. CONCLUSÃO	93
4. Referências bibliográficas	95
A. APÊNDICES	105
B. ANEXOS	116
B.1. Anexo A - Bioética e Biossegurança	117
B.2. Anexo B - Direitos autorais	118

1. INTRODUÇÃO

No século XX, as tecnologias baseadas a combustíveis fósseis causaram uma grande revolução no mundo, o que proporcionou um grande desenvolvimento econômico. No entanto, a exploração dos recursos naturais que servem como matéria prima para alimentar essa cadeia, gerou diversos impactos ambientais, como as mudanças climáticas e o aquecimento global, que juntamente com o processo de crescimento populacional e suas consequências, se tornou uma grande preocupação mundial (Scheidel et al., 2012). Atualmente, governos de todo o mundo buscam minimizar estes impactos e assegurar o suprimento de recursos naturais para a atual e as futuras gerações, sem comprometer o desenvolvimento econômico, a qualidade de vida e a conservação dos ecossistemas, para tal, muitos países começaram a desenvolver o campo da agricultura energética, sendo a cana-de-açúcar uma protagonista nesta matriz (Leite et al. 2011; Leal et al., 2013).

A cana-de-açúcar (um complexo interespecífico de híbridos denominados *Saccharum* spp.) é uma monocotiledônea, alógama e perene, pertencente à família Poaceae (Amalraj e Balasundaram, 2006). Atualmente, ela é cultivada em mais de 130 países, em regiões tropicais e subtropicais, é uma planta que há décadas é utilizada na agroindústria para produção de açúcar, e recentemente é utilizada para produzir etanol de segunda geração, sendo o Brasil um dos países líderes na produção de biocombustíveis a base de cana-de-açúcar (Walter et al., 2014; FAOSTAT, 2021). Os cultivares atuais de cana-de-açúcar foram originados pela seleção e cruzamentos entre suas espécies parentais, *Saccharum officinarum* (possuindo um alto teor de sacarose, baixo teor de fibras, menos resistência a estresse biótico e abiótico) e *Saccharum spontaneum* (com um baixo teor de sacarose, elevado teor de fibras, sendo mais tolerante a doenças e a estresses abióticos) (Hoang et al., 2015). Neste contexto, para sustentar a economia açucareira, por muito tempo os programas de melhoramento genético buscaram aumentar a produtividade de sacarose e manter os teores de fibras. Entretanto, com o surgimento da matriz energética baseada em novas tecnologias para a produção de etanol de segunda geração, além da produção de energia elétrica através da queima da biomassa, os programas de melhoramento genético passaram a buscar plantas com maior teor de fibras

ao invés de sacarose. Para tal, os programas de melhoramento realizaram cruzamentos de espécies ancestrais, como *S. spontaneum*, com híbridos comerciais de cana-de-açúcar, resultando no desenvolvimento de plantas progenitoras, que ficaram conhecidas como cana-energia (Carvalho-Netto et al., 2014).

A cana-energia é uma planta ideal para fabricação de biocombustíveis, bioquímicos e cogeração de energia elétrica, pois possui um alto teor de fibras e baixo teor de sacarose, sendo mais produtiva e robusta em relação aos cultivares convencionais de cana-de-açúcar (Carvalho-Netto et al 2014). No Brasil, o desenvolvimento da cana-energia começou em 2005 com Matsuoka e Rubio na empresa CanaVialis (vendida à Monsanto em 2008) e hoje empresas como a Vignis dão continuidade ao trabalho de melhoramento (Lima, 2016). Atualmente, empresas como GranBio e Raízen operam no desenvolvimento de etanol de segunda geração em escala industrial, assim como na produção de cana-energia. A empresa GranBio, por exemplo, desenvolveu variedades de cana-energia chamada de CanaVertex® (Paiva et al., 2014). A Tabela 1, extraída da GranBio, mostra a comparação das características entre a cana-de-açúcar e cana-energia.

Tabela 1: Características da cana-energia. Fonte: GranBio Investimentos S.A.

Características	Cana-de-açúcar ⁽¹⁾	Cana-energia ⁽³⁾
Fibra	17,4%	27,0%
Açúcares	12,6%	8,5%
Produtividade (massa verde ton/ha) ⁽²⁾	92	180
Produtividade (fibra ton/ha)	16,0	48,6
Produtividade (açúcares ton/ha)	11,6	15,3
Ganho Genético (ao ano)	2%	5%
Exigência em Fertilidade	Alta	Média
Resistência à pragas e doenças	Baixa	Média
Colheitas (por ciclo)	5	10
Taxa de Propagação	01:05	01:100
Ciclo de Melhoramento (anos)	8 a 12	4 a 6

Notas:

(1) Considerando a colheita de 50% da palha (TCH de 80)

(2) São Paulo, Ambiente E

(3) Cultivar Vertex

Podemos observar, que cana-energia é uma planta com alto teor de fibras, cerca de 10% a mais em relação a cana-de-açúcar e com menos açúcares (cerca de 4% a menos em relação a cana-de-açúcar) (Tabela 1). Em relação a produtividade (ton/ha), podemos observar que cana-energia é bem mais produtiva no conteúdo de fibras e açúcares (Tabela 1) em comparação a cana-de-açúcar, essa produtividade de açúcares se dar principalmente pelo fato que cana-energia ter colmos longos e uma alta população deles (Zhao et al., 2017). Todas essas características agrônômicas favoráveis da cana-energia fazem com que essa variedade cresça ainda mais no setor sucroenergético, o que pode proporcionar

um aumento na produção de biocombustíveis, bioquímicos e produtos derivados. Dessa forma, entender as vias do metabolismo de cana-energia é de grande importância para ampliar o conhecimento sobre os mecanismos moleculares e fisiológicos dessa planta, conhecimento útil no desenvolvimento de novas variedades de cana, assim como proporciona que o setor sucroenergético cresça ainda mais.

Recentemente, o nosso grupo publicou um estudo descrevendo o desenvolvimento inicial de cana-energia e descobrimos que a estratégia de crescimento desta cultivar é diferente em comparação aos híbridos comerciais de cana-de-açúcar (De Abreu et al., 2020). Observamos que cana-energia desenvolve primeiro a parte aérea e depois a raiz, ao contrário da cana-de-açúcar, que desenvolve primeiro a raiz para depois desenvolver a parte aérea. Além disso, observamos que cana-energia cresce mais rápido do que a cana-de-açúcar, e seu crescimento ocorre tanto de dia quanto de noite, sugerindo que o metabolismo de partição de carbono em cana-energia é diferente em relação a cana-de-açúcar (De Abreu et al., 2020).

A diferença de crescimento e produtividade em cana-energia está ligada ao acúmulo de biomassa, que por sua vez é sustentada pela dinâmica na produção de carboidratos e metabólitos, que ocorre durante o ciclo diurno (De Souza et al., 2018; Wang et al., 2013; De Abreu et al., 2020). Existem alguns estudos sobre os ritmos diários na cana-de-açúcar, envolvendo a dinâmica de síntese de açúcares e partição de carbono em biomassa (Alves et al., 2019; De Souza et al., 2018), a relação fonte-dreno (McCormick et al., 2009), a regulação circadiana (Hotta et al., 2013). Em cana-energia, alguns estudos comparam as diferenças entre cana-de-açúcar e cana-energia (De Abreu et al., 2020), a relação biomassa e açúcares (Kim et al., 2011; Fanelli et al., 2020), a relação do metaboloma de cana-de-açúcar com o desenvolvimento e a produção de hormônios (Cunha et al., 2020). No entanto, pouco se sabe como o perfil dos carboidratos e metabólitos se comportam em função da variação diurna (dia e noite) em cana-de-açúcar e cana-energia, uma nova variedade com grande potencial para produção biomassa.

1.1.1. Variação diurna do metabolismo em plantas

Os ciclos diurnos influenciam vários processos no metabolismo das plantas, sendo a luz um dos fatores ambientais mais importantes na regulação da fotossíntese e ativação

de enzimas (Moss et al., 1961). Esses sinais ambientais são captados e sincronizados pelas plantas por osciladores biológicos endógenos, chamados relógios circadianos (McClung, 2006). Os ritmos circadianos ajuda a planta a ajustar sua fisiologia e seu desenvolvimento em função das mudanças diárias e sazonais, controlando desde a expressão gênica (Hotta et al., 2013) até eventos fisiológicos como abertura estomática (Hassidim et al., 2017), floração (Shim et al., 2017) e a produção de carboidratos e metabólitos (SEKI et al., 2017; Kim et al., 2017), tal mecanismo faz com que as plantas melhorem processos como a fotossíntese, crescimento, sobrevivência e tire vantagens competitivas (Dodd et al., 2005; Johnson et al., 1998). Dessa forma, através da regulação circadiana, as plantas sabem muito bem como coordenar seus processos biológicos ao longo dos ciclos claro/escuro, uma vez que elas captam os sinais ambientais e usa essa informação para saber que durante o dia, por exemplo, devem produzir carboidratos através da fotossíntese, e durante a noite, degradam este produto em substratos para suprir as necessidades de vias de crescimento e desenvolvimento (Nozue e Maloof, 2006; Inoue et al., 2018). Esses carboidratos produzidos durante o dia, podem ser metabolizados de várias formas, podem ser produtos para respiração, para o crescimento na forma de sacarose e açúcares solúveis ou usados para armazenamento na forma de amido (Liang et al., 2019).

Na cana-de-açúcar, a variação diurna influencia vários processos, principalmente na produção, degradação e translocação de carboidratos, que ocorre durante o ciclo diurno-noturno, carboidratos como a sacarose e amido são produzidos durante o dia e degradados durante a noite (Du Y-C et al., 2000). Em trabalhos recentes com cana-de-açúcar, foi demonstrado que o perfil de carboidratos sofrem variação durante o ciclo diurno, ou seja, o perfil de produção, degradação e translocação desses açúcares nos órgãos fonte e dreno são regulados em função dos ritmos diários, sendo alterados de acordo com o crescimento e dos estágios de desenvolvimento da cana-de-açúcar, e as variações ambientais, diurnas e sazonais são fatores chaves em tais processos (De Souza et al., 2018). Essas flutuações no perfil dos carboidratos estão associadas aos padrões de trocas gasosas e assimilação de carbono pela planta, processos pelos quais são mediados por uma série de enzimas. Du Y-C e colaboradores (2000) demonstraram que os metabólitos (malato, fosfoenolpiruvato e piruvato) e enzimas envolvidas na fotossíntese em folhas de cana-de-açúcar, como a fosfoenolpiruvato-carboxilase (PEPcase), enzima málica dependente de NADP (NADP-ME), Piruvato-fosfato-dicinasase (PPDK), ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase oxigenase (Rubisco) e frutose-1,6-bisfosfatase do cloroplasto (FBPase), sofrem flutuações diurnas em suas atividades. Também foi demonstrado que o

fotoperíodo tem uma grande influência na dinâmica de síntese/degradação de açúcares, uma vez que foi observado que dias curtos proporciona um aumento de sacarose, sugerindo que a cana-de-açúcar regula o acúmulo e produção/degradação de açúcares em função do ciclo diurno (Alves et al., 2019).

Todos estes resultados indicam que o ciclo diurno tem uma grande influência sobre o metabolismo da cana-de-açúcar. Embora muitas características fisiológicas e bioquímicas sejam conhecidas na cana-de-açúcar, pouco se sabe sobre os mecanismos de expressão gênica, produção, degradação e translocação desses carboidratos e metabolitos entre os tecidos em função dos ciclos diurnos em cana-energia, processos pelas quais resultam em maior acúmulo de biomassa, crescimento e desenvolvimento. Dessa forma, para entender melhor como a cana-energia em comparação a cana-de-açúcar se comporta em função do ciclo diurno, este trabalho buscou avaliar o perfil dos carboidratos e metabólitos ao longo de um ciclo de 24 horas.

1.2. OBJETIVOS GERAIS

Neste trabalho, avaliamos a variação diurna do metabolismo primário, secundário e dos carboidratos de cana-energia e cana-de-açúcar nos tecidos da folha e colmo. Desta maneira, buscamos entender como o carbono é particionado entre as cultivares, seja para carboidratos ou metabólitos, e como esses órgãos (folha e colmo) interagem metabolicamente entre si para adaptar as características fisiológicas e sustentar o crescimento. Para isso, realizamos:

1) Quantificação de carboidratos de cana-energia e cana-de-açúcar ao longo do ciclo diurno. Sabendo que a cana-energia apresenta um menor conteúdo de açúcar e mais fibra que a cana-de-açúcar, buscamos elucidar o mecanismo de partição de carbono destas duas cultivares. Os tecidos da folha e colmo de plantas adultas de cana-de-açúcar e cana-energia foram coletados ao longo do ciclo diurno e foram utilizados para quantificar o conteúdo de amido e dos açúcares solúveis (sacarose, glicose e frutose).

2) Análise de metaboloma da folha e do colmo de cana-de-açúcar e cana-energia ao longo do ciclo diurno. Este tipo de análise nos permitiu identificar e quantificar os metabólitos (metabolismo primário e secundário) em diferentes tecidos em

cana-açúcar e energia ao longo do ciclo diurno. Aqui utilizamos abordagens LC-MS e GC-MS para quantificar e identificar os metabólitos das cultivares.

A dissertação está dividida em dois capítulos, o primeiro capítulo contempla o primeiro objetivo, abordando sobre o perfil dos açúcares solúveis e do amido em cana-de-açúcar e cana-energia em função do ciclo diurno. Já o segundo capítulo, descrevemos a análise que foi realizada para identificar e quantificar os metabólitos (metabolismo primário e secundário) de cana-de-açúcar e cana-energia em função do ciclo diurno. A seguir, descrevemos com mais detalhes o desenho experimental que foi utilizado para realizar essas duas análises.

1.3. DESENHO EXPERIMENTAL

As plantas utilizadas neste projeto foram provenientes do jardim varietal do Laboratório Nacional de Biorrenováveis – LNBR (-22.8056819, -47.0531639). Foram utilizadas cultivares de cana-de-açúcar (RB867515) e cana-energia (Vertex 8), com 12 e 14 meses de idade, respectivamente. Em abril de 2018 (temp.: 24.6 °C, precip.: 44.5 mm, fonte: CEPAGRI/UNICAMP), coletamos os tecidos da folha+1 e dos entrenós +1, +3, +6 e +12 a cada 6 horas em um período de 24 horas. O entrenó +1 está conectado à primeira folha com uma barbeta visível, a contagem dos entrenós continua para baixo. O primeiro ponto coletado foi realizado às 6 horas da manhã, o que chamamos de ponto 0 horas, no momento em que o sol nasce, os demais pontos foram coletados em um intervalo de 6 horas, correspondendo ao meio-dia, às 18 horas da tarde, no momento em que o sol se põe no horizonte, a meia noite e novamente às 6 horas da manhã do dia seguinte, o que chamamos de ponto 24 horas. A coleta do material foi realizada em diferentes perfilhos, para assegurar que fossem em plantas diferentes. Os tecidos foram coletados e imediatamente mergulhados em nitrogênio líquido, sendo um total de 5 réplicas biológicas para cada tecido. A [Figura 1](#) mostra o esquema geral do experimento coletado.

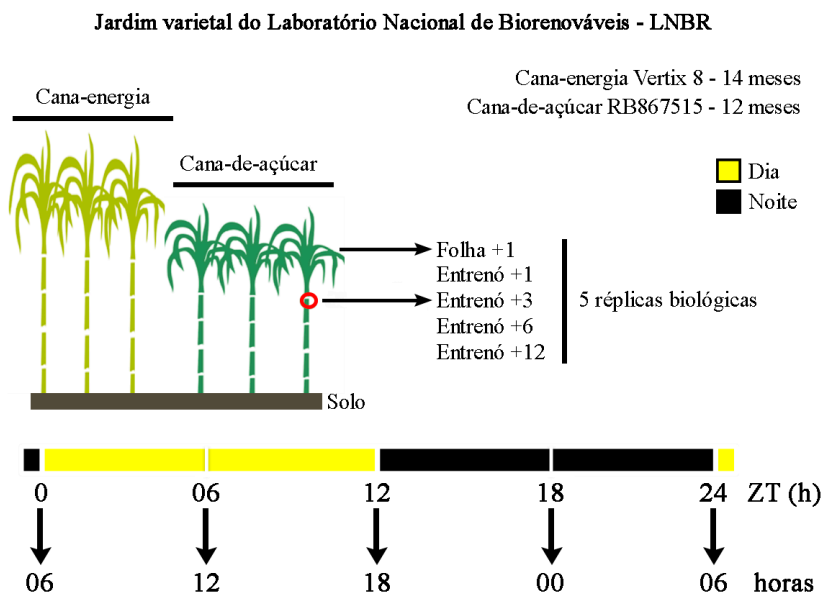


Figura 1. Esquema geral do experimento de coleta. Foram coletados a folha +1 e os entrenós +1, +3, +6 e +12 de cana-energia (Vertex 8) e cana-de-açúcar (RB867515), no intervalo temporal ZT0, ZT06, ZT12, ZT18 e ZT24, correspondendo a 06, 12, 18, 00 e 06 horas do dia, respectivamente. A cor amarela representa o dia e preta representa a noite.

CAPÍTULO I: AÇÚCARES SOLÚVEIS E AMIDO

2. INTRODUÇÃO

A partição de carbono é um processo de distribuição de energia química, originada pela planta durante a fotossíntese, na qual a energia luminosa é convertida e armazenada em ligações químicas de moléculas de carbono (Poorter & Villar, 1997). As moléculas de carbono sustentam uma miríade de vias biossintéticas, incluindo as vias do metabolismo primário e secundário, e sua quantidade depende do tipo de tecido e do estágio de desenvolvimento da planta. O carbono pode ser fixado através de três vias: C3, C4 e CAM (Kumar et al., 2017).

A via C3 é usada por maior parte das plantas superiores, ela começa com a entrada do CO₂ atmosférico nos estômatos (aberturas na superfície da epiderme vegetal), em seguida, o CO₂ se difunde pelos espaços intracelulares até o estroma dos cloroplastos das células do mesófilo, onde pode ser diretamente metabolizado no ciclo de Calvin (fase escura da fotossíntese). Composto por 3 fases, o ciclo de Calvin inicia com a entrada de 3 moléculas de CO₂, onde são fixadas em 3 moléculas de RuBP (Ribulose 1,5-bifosfato), o produto dessa reação é seis moléculas de um composto de três carbonos (gliceraldeído-3-fosfato – PGA), esta reação é catalisada pela RuBisCO (ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase). Essa primeira etapa é chamada de fase de carboxilação. Na segunda etapa, a fase de redução, o PGA é fosforilado em 6 moléculas de 1,3-bisphosphoglycerate, sendo este reduzido em 6 moléculas de gliceraldeído 3-fosfato (PGAL), essa reação usa os elétrons fornecidos pelo NADPH e energia fornecida pela hidrólise do ATP, moléculas fornecidas pela fase luminosa da fotossíntese. Na última etapa, a fase de regeneração, cinco das seis moléculas de PGAL são utilizadas para regenerar três moléculas de RuBP (composto inicial é regenerado). A molécula remanescente de PGAL é utilizada na produção de trioses-fosfatos, para serem remobilizadas para a produção de amido e sacarose (Evert e Eichhorn, 2013).

Na via C4, o primeiro composto é o oxaloacetato (uma molécula de 4 carbonos; também intermediário no ciclo de Krebs) ao invés do PGA. Essa via é caracterizada por uma separação espacial, onde as reações dependentes da luz acontecem nas células do mesófilo e o ciclo de Calvin ocorre nas células da bainha do feixe (células ao redor das nervuras da folha). O oxaloacetato é formado quando o CO₂ é fixado em fosfoenolpiruvato (PEP), reação catalisada pela PEP carboxilase (PEP-case), enzima encontrada no citosol das células do mesofilo. O oxaloacetato é convertido a malato ou aspartato (depende da espécie da planta) nos cloroplastos. O malato ou aspartato é transportado para as células da bainha do feixe ao redor dos feixes vasculares da folha, onde é descarboxilado para produzir CO₂ e piruvato. Em seguida, o CO₂ entra no ciclo de Calvin e reage com a RuBisCO, formando PGA, e o piruvato retorna às células do mesofilo, onde reage com o ATP para regenerar a PEP (Evert e Eichhorn, 2013; Kumar et al., 2017).

Na via CAM, ao invés de ocorrer uma separação espacial das reações de luz e o ciclo de Calvin, ocorre uma separação temporal. O CO₂ é fixado em oxaloacetato pela PEP carboxilase a noite, sendo reduzido a malato, a qual é armazenado em solução aquosa como ácido málico no vacúolo até o dia seguinte. Durante o dia, o ácido málico é recuperado dos vacúolos, e nos cloroplastos é descarboxilado para liberar CO₂, onde pode ser fixado pela RuBisCO no ciclo de Calvin (Evert e Eichhorn, 2013; Kumar et al., 2017).

Após a fotossíntese, o carbono assimilado é convertido em açúcares ou derivados, em seguida, são distribuídos para células coletoras distais (Wang et al., 2013). Para suprir as necessidades da planta, os açúcares são importados da folha para o floema através de tecidos de escoamento e são direcionados para vários destinos tais como armazenamento, respiração e biossíntese, garantindo o crescimento e o desenvolvimento vegetal (McDonald, 2003; Ayre, 2011).

Cerca de 35-40% dos carboidratos produzidos são destinados para o consumo da planta, fornecendo energia para muitos processos de crescimento celular tais como expansão, divisão, diferenciação, absorção de nutrientes e manutenção das células durante o desenvolvimento da planta. Outra porção é usada na biossíntese de intermediários metabólicos tais como açúcares simples, aminoácidos, ácidos orgânicos, lipídeos, etc (Wang et al., 2013). Os açúcares remanescentes são armazenados em vacúolos, as quais podem ser fixados em polímeros como o amido para mais tarde serem

remobilizados quando necessário ou podem ser armazenados na forma de biomassa estrutural: celulose, hemiceluloses e lignina (Stitt & Zeeman, 2012).

A cana-de-açúcar/cana-energia são plantas com metabolismo C4, isso faz com que essas plantas realize o processo de fotossíntese de forma eficiente, resultando no melhor aproveitamento de água, dos nutrientes e da radiação solar (Byrt et al. 2011). Os processos de fotossíntese e assimilação de carbono ocorrem nas folhas, especificamente nos cloroplastos das células do mesófilo e nas células da bainha em feixes (Leegood, 2000). Os tecidos imaturos da cana-de-açúcar possuem elevada atividade fotossintética e particionam carbono principalmente em proteínas e fibras, enquanto os tecidos maduros mobiliza o carbono preferencialmente em sacarose e amido, respectivamente (Bindon e Botha, 2002). Os principais carboidratos não estruturais encontrados nas folhas e nos colmos de cana-de-açúcar são a sacarose e os açúcares redutores (frutose e glicose) (Alves et al., 2019). Na cana-de-açúcar existem órgãos que produzem açúcares, chamados órgãos fontes, e órgãos que precisam da demanda desses açúcares para manter seu metabolismo, denominados órgãos drenos (Rae et al., 2005b). A sacarose produzida nas folhas (órgãos fonte), é transportada constantemente para os colmos (órgãos drenos) através do floema, tanto de dia quanto de noite, isso faz com que a interação entre estes órgãos forme um sofisticado sistema de fonte-dreno, ao chegar em seu destino final, a sacarose é armazenada nas células parenquimáticas dos colmos ou pode ser utilizada como fonte de carbono e energia para o crescimento e síntese de outras moléculas (Wang et al., 2013).

A sacarose armazenada nos colmos de cana-de-açúcar desempenha importantes funções nos estágios de maturação da planta, assim como, atua como molécula sinalizadora na relação fonte-dreno e no metabolismo foliar, regulando a fotossíntese (McCormick et al., 2008). Os colmos da cana-de-açúcar possuem três estágios de maturação: sendo eles imaturos, em processo de maturação e maduros. O processo de maturação depende da biossíntese de sacarose nas folhas, de sua translocação e armazenamento nos colmos, onde pode ser metabolizada em outros produtos. Esse processo depende de vários fatores, incluindo variáveis climáticas (como temperatura e disponibilidade hídrica e de nutrientes), potencial genético e manutenção das cultivares em campo (Cardozo e Sentelhas, 2013; Marafon, 2013). Os colmos imaturos possuem baixo teor de sacarose e alto teor de açúcares redutores (frutose e glicose), e no decorrer do processo de maturação, aumentam o teor de sacarose (Machado, 1987; Pereira, 2017). O processo de maturação dos colmos acarreta uma gradual diminuição da atividade

fotossintética (McCormick et al., 2009). No entanto, alguns estudos divergentes mostraram o oposto, isto é, que o acúmulo de sacarose nos colmos não inibe a fotossíntese nas folhas tão quanto a produção de biomassa (Inman-Bamber et al., 2011). O processo de acúmulo de sacarose nos colmos de cana-de-açúcar também é consequência da ciclagem de sacarose entre os compartimentos: vacúolo, citosol e apoplasto (Batta et al., 1986), assim como pelo relacionamento dos órgãos fonte-dreno (McCormick et al., 2006; McCormick et al., 2009).

2.1.1. Metabolismo da sacarose em plantas

Em plantas que possuem o metabolismo C₄, como a cana-de-açúcar, o processo de fotossíntese começa com as trocas gasosas nas células do mesófilo, onde a enzima PEP-case fixa o CO₂ para formar oxaloacetato (OAA; um ácido de 4 carbonos), o OAA é convertido em malato, a qual é transportado para as células da bainha do feixe, onde é descarboxilado para liberar CO₂, em seguida, a Rubisco fixa o CO₂ no ciclo de Calvin e no final desse processo são produzidas moléculas de trioses-fosfato. Nos cloroplastos, parte das trioses-fosfato originadas pela reação de fotossíntese são convertidas em amido e outra parte é transferida para o citoplasma para ser convertida em sacarose (McCormick et al., 2008). A sacarose é um dissacarídeo formado por monômeros de glicose e frutose, é produzida durante o dia nas células mesofílicas (Wang et al., 2017). A Figura 2 mostra um resumo da produção de sacarose nas folhas de cana-de-açúcar.

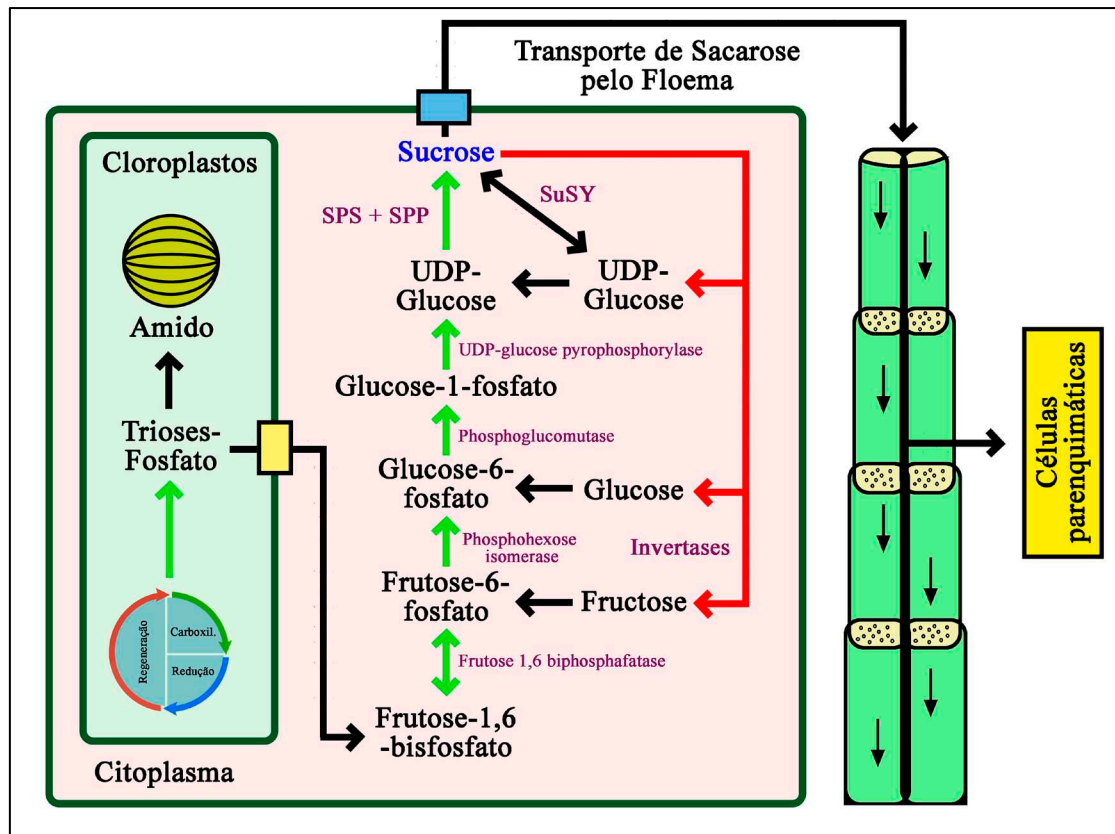


Figura 2. Metabolismo da sacarose nas células foliares de cana-de-açúcar. As setas verdes indicam a via de biossíntese e as setas vermelhas representam a via de degradação da sacarose. No citoplasma, as trioses-p são transportadas para o citosol para serem metabolizadas em intermediários até a formação da molécula final de sacarose. Após sua síntese na folha (órgão fonte), a sacarose é transportada via floema para os órgãos drenos (colmos), onde é depositada nas células parenquimáticas, ou pode ser metabolizada em subprodutos (hexoses e precursores da parede celular) para suprir a demanda de outras vias. As setas pretas representam o caminho dos compostos na via, as setas verdes indicam a via de síntese e a vermelha representa a via de degradação. Os retângulos amarelo e azul indicam transportadores de açúcares.

Após ser sintetizada nas células foliares, a sacarose é transportada para o floema via apoplasto. No floema, a sacarose é levada até os tecidos drenos (incluindo raízes e caules) por diferença de gradientes de concentração (Rae et al., 2005a; Wang et al., 2017). O transporte de sacarose pelo floema para as células parenquimáticas acontece por de três vias (Fig. 3): (1) via simplasto, predominante nos entrenós maduros da cana-de-açúcar, onde a sacarose é transportada através dos plasmodesmos até o citoplasma das células parenquimática; (2) via apoplasto, ocorre principalmente nos entrenós imaturos, onde a sacarose é transportada através dos espaços da parede celular, para dentro das células; e por último, (3) a sacarose pode ser hidrolizada em hexoses (frutose e glicose), por invertases ácidas insolúveis da parede celular, em seguida, as hexoses são transportas para

dentro do citoplasma (Wang et al., 2013). Para entrar nas células, a sacarose e as hexoses precisam da ajuda de transportadores, as quais estão fixados na membrana plasmática e na membrana dos vacúolos (Moore, 1995; Rae et al., 2005b). Na via apoplástica, a conversão de sacarose em hexoses ocorre predominantemente em tecidos imaturos, pois a demanda de glicose como precursor para a síntese de celulose e respiração celular é bem maior em comparação aos tecidos maduros (Bindon e Botha, 2012). No citoplasma, a sacarose pode ser convertida em hexoses por intermédio de invertases neutras, que servem para alimentar várias vias, tais como respiração celular, fenilpropanóides e Shikimate. Além disso, a sacarose citoplasmática pode ser convertida em UDP-glicose, a qual é um substrato para biossíntese de componentes da parede celular (celulose, lignina, hemicelulose), ou pode ser transportada via difusão facilitada para ser armazenada nos vacúolos, nestas organelas a sacarose pode ser hidrolisada em hexoses por invertases ácidas solúveis vacuolares ou pode ser usada para produzir polímeros de amido (Priesser and Komor, 1991; Wang et al., 2013).

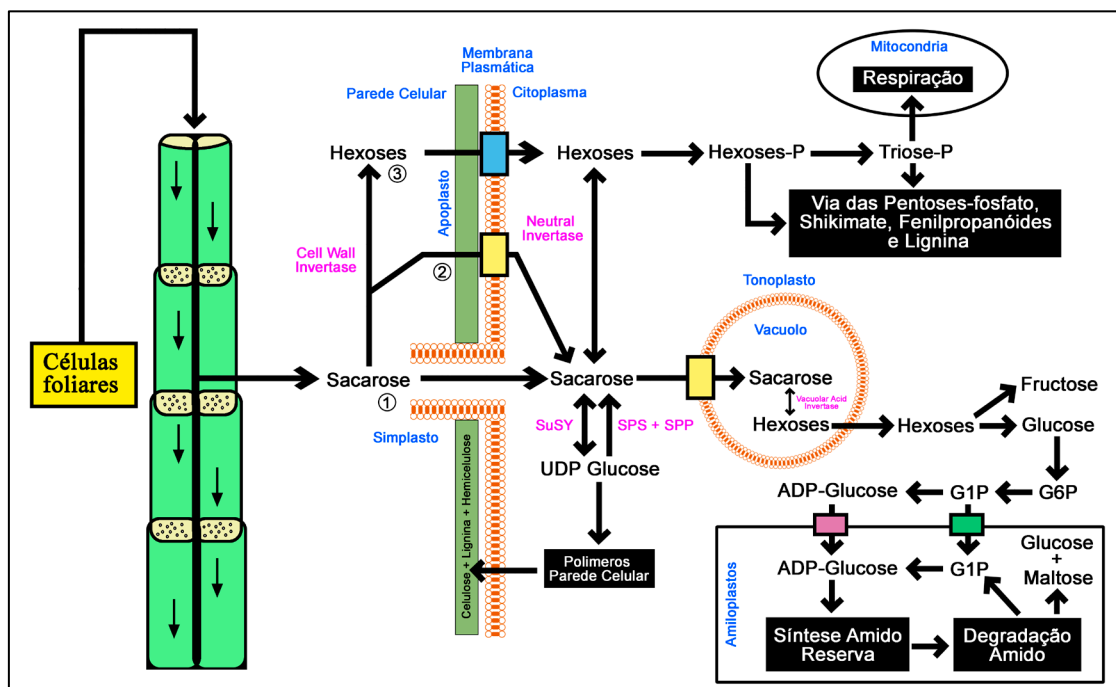


Figura 3. Metabolismo da sacarose nas células de armazenamento de cana-de-açúcar. A sacarose produzida nas células foliares (órgãos fontes) é transportada via floema para células parenquimáticas do colmo (órgãos drenos). A sacarose pode entrar nas células por duas vias: (1) via simplasto, a sacarose é transportada através dos plasmodesmos até o citoplasma; (2) via apoplasto, a sacarose é transportada através dos espaços da parede celular; (3) na via apoplasto, a sacarose pode ser hidrolizada em hexoses (frutose e glicose), em seguida, transportada para o citoplasma. No citoplasma, a sacarose pode ser convertida em hexoses, em precursores da parede celular (UDP-glicose) ou pode ser transportada para ser armazenada nos vacúolos,

onde pode ser interconvertida em hexoses. As caixas pretas representam as principais vias onde o carbono proveniente da sacarose é particionado para alimentar outras vias. G1P: glicose-1-fosfato; G6P: glicose-1-fosfato.

O metabolismo da sacarose é mediado por várias enzimas (Datir e Joshi, 2016). A conversão de sacarose em UDP-glicose (precursor dos componentes da parede celular) é mediada pela enzima SuSy (sacarose sintetase), na qual degrada a sacarose em UDP-glicose e frutose ou pode catalisar a reação sintética reversa. A UDP-glicose pode ser convertida em sacarose por uma via de duas etapas: primeiro a enzima SPS (sacarose-P-sintase) converte frutose-6-P e UDP-glicose em sacarose-P, em seguida, a enzima SPP (sacarose-P-fosfatase) converte sacarose-P em sacarose (Botha et al., 2000; Buczynski et al., 1993; Wendler et al., 1990). A SPS é expressa em folhas e colmos, sendo ativada por glicose-6-fosfato e inibida por Pi (Huber et al., 1996). Por fim, enzimas invertases convertem sacarose em hexoses e vice-versa e podem ser classificadas como invertase ácida solúvel (SAI) e invertase neutra (NI). As invertases ácidas solúveis são mais ativas em tecidos imaturos de cana-de-açúcar, uma vez que acumulam menos sacarose (Wang et al., 2017).

Todas essas reações fazem parte da via metabólica da sacarose, uma vez que esse açúcar é usado como produto para vários processos biológicos. Além disso, a interconversão de sacarose em hexoses e outros açúcares faz com que o carbono seja particionado e distribuído para alimentar outras vias, tais como respiração, via dos ácidos orgânicos, aminoácidos, das proteínas, fibras e dos componentes da parede celular. Essa dinâmica do carbono faz com que o metabolismo primário e secundário sejam importantes objetos de estudo para elucidar o processo de partição de carbono em plantas (Wang et al., 2013).

A regulação do acúmulo, consumo e metabolismo de síntese e degradação da sacarose nos colmos de cana-de-açúcar é influenciada por diversos fatores, incluindo fatores exógenos, como fatores ambientais (intensidade luminosa, temperatura, etc.) (Inman-Bamber et al., 2010), variações diurnas e sazonais (De Souza et al., 2018) e fatores endógenos como atividade enzimática (Zhu et al., 1997; Papini-Terzi et al., 2009), trocas gasosas (De Souza et al., 2018), expressão gênica (Chandra et al., 2015), relógio circadiano (Dalchau et al., 2011; Dodd et al., 2015), transportadores de açúcares (Julius et al., 2017), moléculas de transdução de sinal fonte-dreno (De Maria Felix et al., 2009),

fluxo entre os compartimentos celulares, estágio de maturação (Pereira et al., 2017), relação entre os órgãos fonte-dreno sobre as taxas fotossintéticas (McCormick et al., 2006). O conteúdo dos açúcares e da biomassa são diferentes entre genótipos de cana-de-açúcar, essa diferença é consequência da seleção e dos cruzamentos entre as espécies parentais e entre os híbridos de cana-de-açúcar, que por sua vez, altera a constituição genômica de cada cultivar (Pereira et al., 2017). Metabólitos e outros componentes relacionados a biomassa, tais como celulose, hemicelulose e lignina, também possuem variação entre os genótipo, assim como, entre as partes da planta e entre diferentes ambientes de cultivo (Mason et al., 2020; Perlo et al., 2020).

2.1.2. Metabolismo do amido em plantas

O amido é um polissacarídeo insolúvel e não estrutural, sua estrutura é composta por moléculas de glicose e pode ser dividido estruturalmente por uma matriz de polímeros de amilose (polímero linear) e amilopectina (polímero com cadeias longas e altamente ramificado, sendo a parte mais abundante da molécula de amido, constitui a estrutura semicristalina do amido) (Badenhuizen, 1963). As unidades de α -glicose desses polímeros são unidas por ligação α -1,4'-glicosídica e α -1,6'-glicosídica (Kossmann et al., 2000). A produção do amido acontece nos plastídeos – amiloplastos nos tecidos de armazenamento e nos cloroplastos das folhas, onde é sintetizado durante o dia e degradado em maltose, glicose e glicose-1-P durante a noite ou em períodos de limitação de carbono (Buléon et al., 1998; Zeeman et al., 2002). Após sua degradação, a maltose originada pode ser convertida em sacarose ou degrada em glicose e/ou hexose-fosfatos no citosol. A principal função do amido na maioria das plantas superiores é armazenar energia, no entanto, esse polissacarídeo também é produzido de forma transitória nos órgãos fotossintéticos para prevenir períodos de limitação de fosfato para a fotossíntese, e nos órgãos de armazenamento ele é usado como reserva de energia e carbono para ser usado em condições de crescimento desfavoráveis (Kossmann et al., 2000).

Existem dois tipos de amido: armazenamento e transitório. O amido de armazenamento é produzido nos amiloplastos dos tecidos não fotossintéticos (sementes, caules, raízes ou tubérculos) e tem como função armazenar energia a longo prazo. Já o amido transitório é sintetizado em paralelo a sacarose durante o dia e degradado a noite nos cloroplastos das folhas, porém, em alguns casos esse tipo de amido pode ser

sintetizado nos plastídios de células não fotossintéticas. Após sua degradação, os monômeros (glicose, maltose e G1P) formados são utilizados para sustentar o processo de respiração celular, metabolismo da sacarose e o crescimento (MacNeill et al., 2017; Pfister et al., 2016). Em tubérculos de batata em crescimento foi demonstrado que o amido pode ser produzido para controlar a alta demanda de sacarose nas células, processo que depende da disponibilidade carbono na célula (Geigenberger et al., 2004).

A molécula de ADP-glicose é o principal substrato para síntese de amido. Nas folhas, o amido é produzido por uma série de reações (Fig. 4), começando com as trioses-P oriundas do ciclo de Calvin, que são convertidas em moléculas de frutose-1,6-bifosfato pela enzima aldolase, em seguida, a frutose-1,6-bifosfato é convertida em frutose 6-fosfato por ação da enzima frutose-1,6-bifosfatase, na próxima etapa, essa molécula é convertida em glicose-6-fosfato por intermédio da enzima fosfohexose-isomerase, para então ocorrer a conversão de glicose-6-fosfato em glicose-1-fosfato pela enzima fosfoglicomutase, e por fim, a glicose-1-fosfato é convertida em ADP-glicose por ação da enzima UDP-glicose-pirofosforilase. A partir da molécula de ADP-glicose, a enzima amido-sintase catalisa a síntese e o alongamento dos precursores do amido: amilose e amilopectina (Ferreira, 2007; Lal, 2018). Nos tecidos não fotossintéticos, o amido é produzido nos amiloplastos pela mesma reação descrita acima, no entanto, as moléculas hexoses-fosfato (glicose-6-fosfato) e ADP-glicose são produzidas por hidrólise da sacarose no citosol, em seguida, essas moléculas são transportadas do citosol para os amiloplastos para que ocorra a síntese de amido (Geigenberger, 2011; Liloyd e Kötting, 2016). Esse processo garante que o carbono na forma glicose-6-fosfato e ADP-glicose esteja disponível para síntese de amido e outros processos quando a sacarose está baixa no citosol, de maneira oposta, quando tem muita sacarose no citosol, a sacarose é quebrada em intermediários preferencialmente para a síntese de amido (Ferreira, 2007).

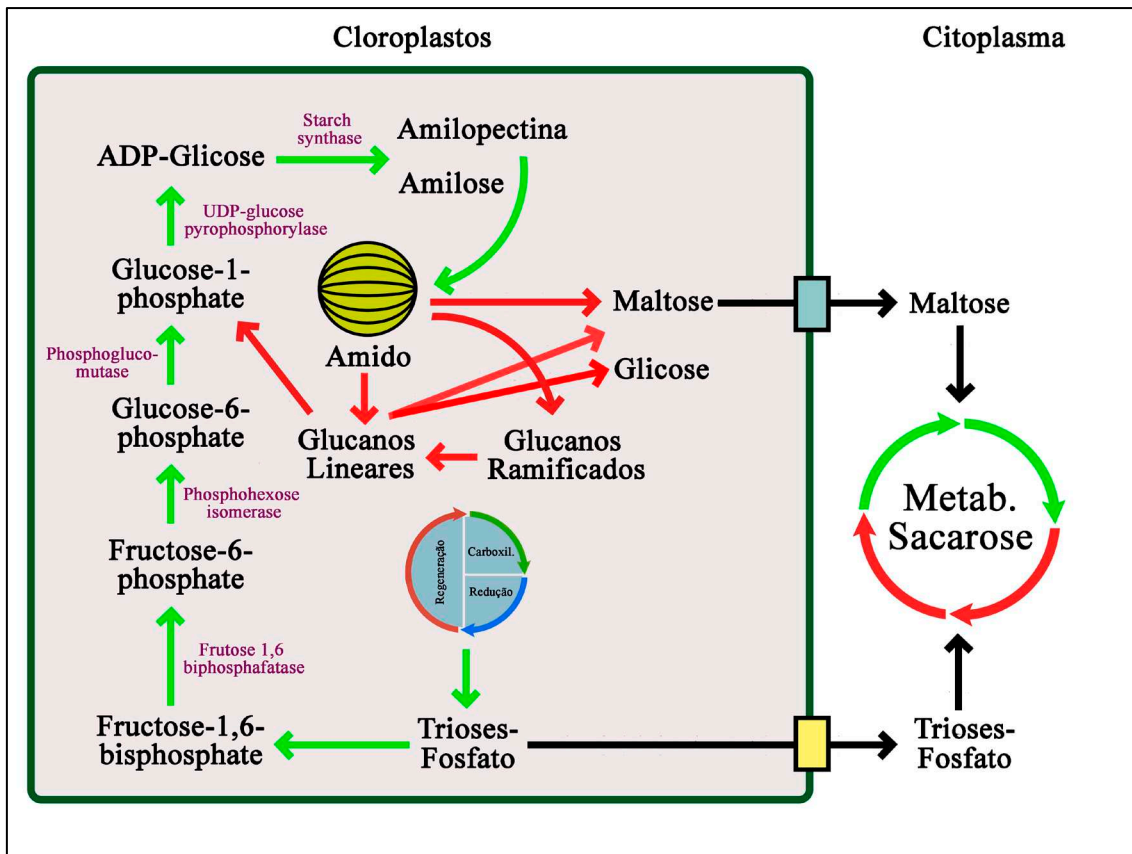


Figura 4. Metabolismo de síntese e degradação do amido no tecido foliar. As setas verdes representam a via de síntese do amido nos cloroplastos das células foliares e as setas vermelhas indicam a degradação do amido em subprodutos, as quais podem ser transportados para o citoplasma. Os retângulos coloridos representam os transportadores de açúcares na membrana do cloroplasto.

A degradação do amido ocorre principalmente no período da noite em plantas superiores, esse processo depende do órgão e do estágio de desenvolvimento da planta (Fig. 5). Em folhas de *Arabidopsis*, os grânulos de amido são primeiramente fosforilados pela ação de enzimas que atuam sobre a superfície do grânulo, através dessas reações de fosforilação reversível, os polímeros constituintes do amido são expostos para que outras enzimas iniciem o processo de degradação (Streb e Zeeman, 2012). Uma vez liberados, os polímeros sofrem ação de várias enzimas desramificadoras do amido (DBE), principalmente das enzimas isoamilase 3 e α -amilase, que atacam as ramificações da amilopectina. Por fim, os glucanos lineares resultantes desse processo são degradados em glicose, maltose, maltotriose e glicose-1-fosfato pela enzima β -amilase. As moléculas de glicose-1-fosfato podem entrar novamente na via de biossíntese do amido ou podem ser convertidas em moléculas de triose-fosfato, as quais são transportadas do cloroplasto

para o citoplasma para serem convertidas em sacarose (Smith et al., 2005; Ferreira, 2007; Lloyd e Kötting, 2016).

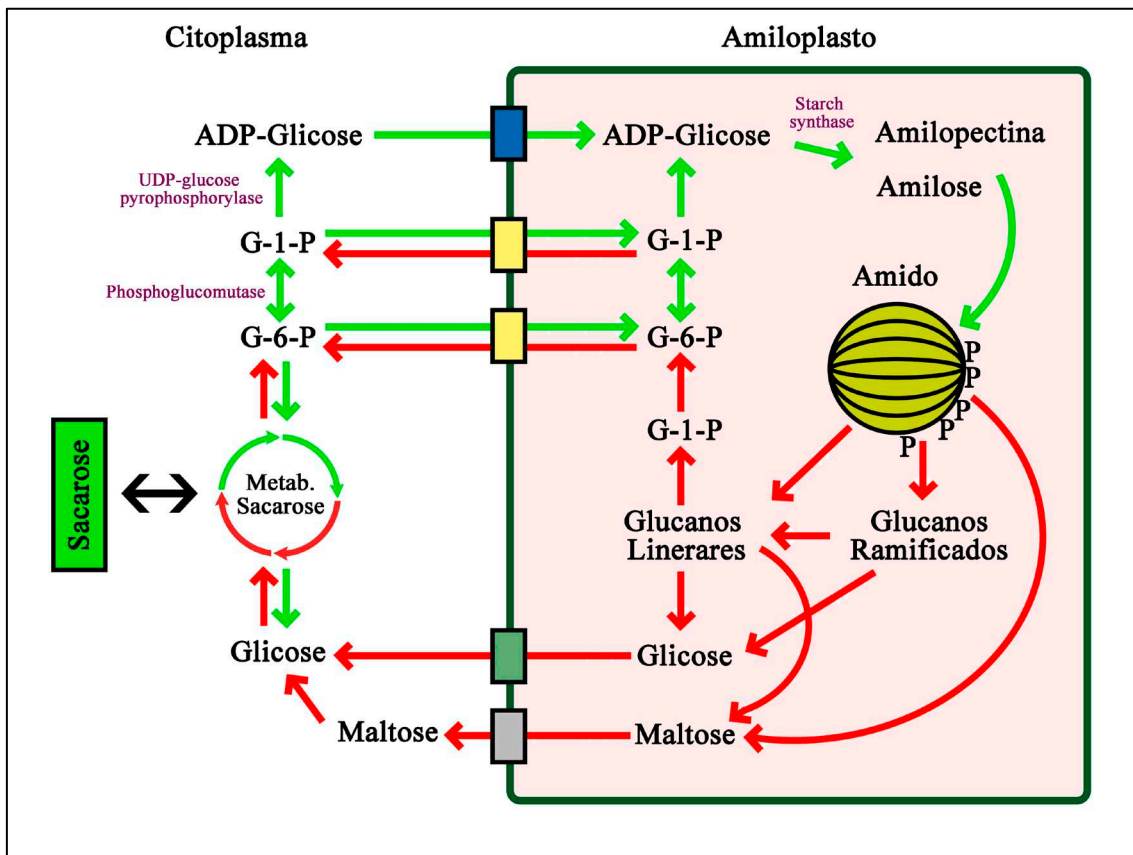


Figura 5. Metabolismo de síntese e degradação do amido nos tecidos de armazenamento. As setas verdes representam a via de biossíntese do amido, a qual ocorre nos amiloplastos das células de armazenamento, as setas vermelhas representam a degradação do amido, as quais são transportados para o citoplasma para serem metabolizados no metabolismo da sacarose e outros. Os retângulos coloridos representam os transportadores de açúcares na membrana do amiloplasto. G-1-P: Glucose-1-phosphate; G-6-P: Glucose-6-phosphate.

Na cana-de-açúcar, o amido transitório é produzido nas folhas durante o dia e degradado a noite para suprir as necessidades metabólicas e de crescimento (De Souza et al., 2018). Nos cloroplastos, a enzima aldolase converte triose-fosfato em frutose-1,6-bisfosfato, em seguida, a frutose-1,6-bisfosfato é convertida em frutose-6-glicose pela ação da enzima frutose-1,6-bisfosfatase. A frutose-6-glicose resultante é convertida em glicose-6-fosfato por intermédio da enzima glicose-6-fosfato isomerase, em seguida, a enzima fosfoglicomutase catalisa a conversão de glicose-6-fosfato em glicose-1-fosfato, a partir desse intermediário, a enzima ADP-glicose pirofosforilase (AGPase) produz

ADP-glicose. Por fim, o amido é produzido a partir das moléculas de ADP-glicose originadas, processo conduzido pela enzima amido sintase, que tem a função de transferir as porções glucosil das moléculas de ADP-glicose para cadeias de amido em crescimento, ou seja, no alongamento das extremidades de amilose e amilopectina (Santos e Diola, 2015).

2.2. OBJETIVOS

Em virtude dos aspectos abordados, podemos concluir que cana-energia é bem mais produtiva em relação aos híbridos comerciais de cana-de-açúcar, e tal produtividade está relacionada com os processos de partição de carbono, o que explica um maior conteúdo de biomassa e menos açúcares em seus colmos. No entanto, ainda não ficou claro em quais proporções esses açúcares são produzidos durante o ciclo diurno, desse modo, o principal objetivo deste capítulo foi:

1) **Quantificar o conteúdo dos açúcares solúveis (glicose, frutose e sacarose) e amido de cana-energia e cana-de-açúcar ao longo do ciclo diurno.** Sabendo que a cana-energia apresenta um menor conteúdo de açúcar e mais fibra que a cana-de-açúcar, buscamos entender as diferenças de produção entre as cultivares e durante o ciclo diurno.

2.3. MATERIAL E MÉTODOS

2.3.1. Material vegetal

Para compreender o processo de partição de carbono em carboidratos durante o ciclo diurno, utilizamos os tecidos da folha (fonte) e do colmo (dreno) de cana-energia e cana-de-açúcar para quantificar o conteúdo dos açúcares solúveis (sacarose, glicose e frutose) e amido. Para tal, coletamos 240 amostras da folha +1 e dos entrenós +1, +3, +6 e +12 (5 réplicas biológicas para cada ponto) de cana-energia (Vertix 8) e cana-de-açúcar (RB867515) durante um período de 24 horas. As amostras foram coletadas a cada seis

horas, começando as 6h da manhã, em seguida 12, 18, 00 e 06 horas do outro dia, esses pontos foram chamados de ZT0, ZT06, ZT12, ZT18 e ZT24, respectivamente.

2.3.2. Quantificação dos açúcares

Para analisar a concentração do amido e dos açúcares solúveis: frutose, glicose e sacarose, pesamos 20 mg do material macerado dos tecidos folha +1 e dos entrenós +1, +3, +6 e +12 de cana-energia e cana-de-açúcar, em seguida, as 240 amostras (5 réplicas biológicas por ponto) foram colocadas em estufa a 60 °C para secar.

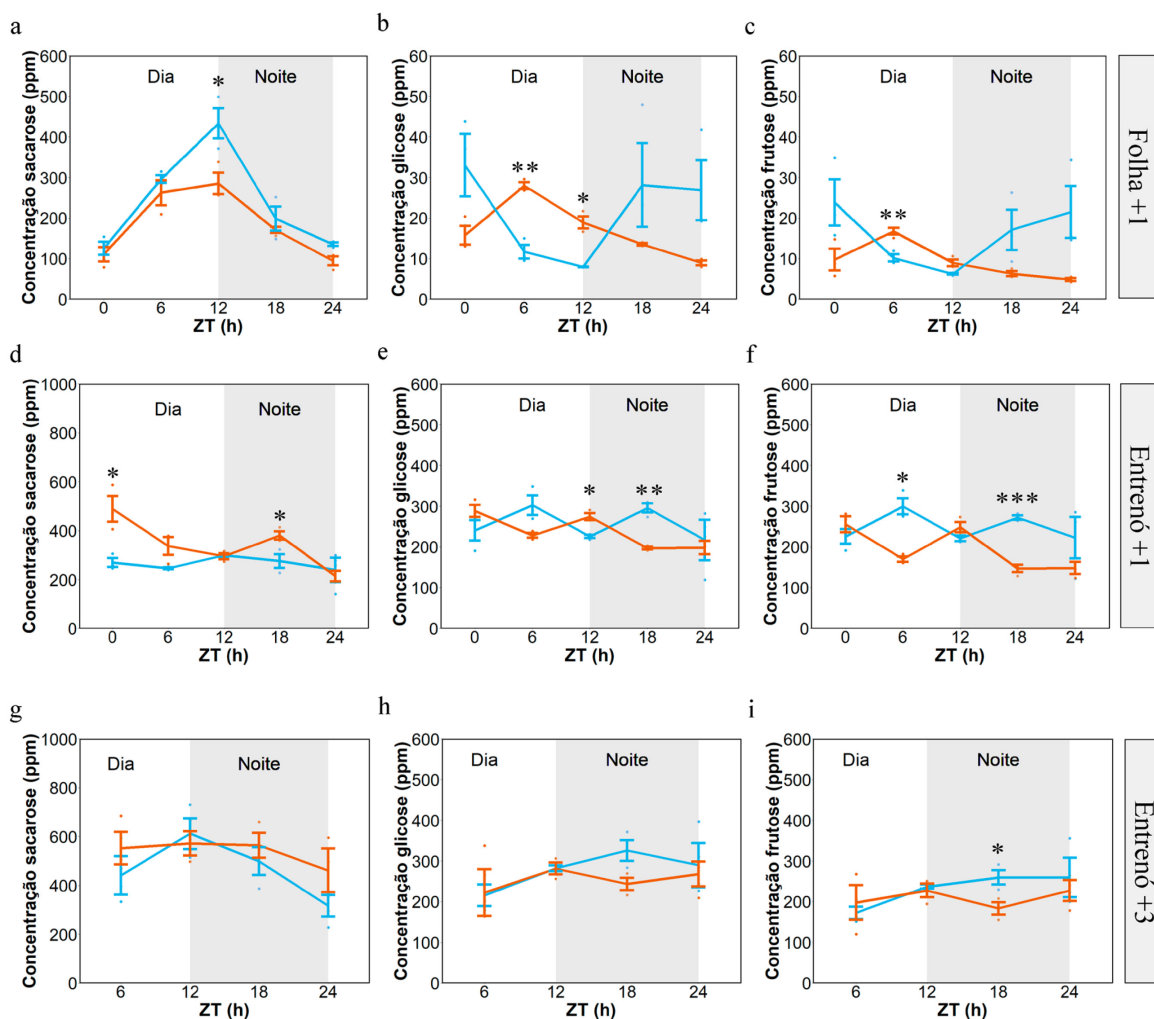
Para extrair os açúcares solúveis (sacarose, glicose e frutose), realizamos seis consecutivos processos de extração, usando etanol 80 %, a 80 °C por 20 min e agitação constante de 300 rpm em um termomixer, para cada etapa realizamos uma centrifugação à 14000 G e 4 °C por 10 min (Cross et al., 2006). Em seguida, o extrato etanólico foi concentrado a vácuo e ressuspendido em água MilliQ, após essa etapa, as amostras foram filtradas e analisadas por cromatografia de troca aniônica de alta resolução com detector de pulso amperométrico (HPAEC/PAD) em sistema de cromatografia (Dionex modelo ICS - 3000), utilizando uma coluna CarboPac PA-1.

Para quantificar o conteúdo do amido, o pellet obtido da extração etanólica foi seco a 60 °C em estufa, após a secagem, cada amostra foi tratada com 500 µL α -amilase (120 U/mL) a 75 °C por 30 min, em seguida, adicionamos 500 µL de amiloglucosidase (30 U/mL) por 30 min, a 50 °C. Após o processo de extração, submetemos as amostras ao processo de dosagem, sendo inicialmente centrifugadas a 13000 G por 5 min, em seguida, 50 µL do sobrenadante de cada amostra foi incubado com glicose oxidase/peroxidase (GOD/POD) a 30 °C por 15 min, em seguida, as amostras foram distribuídas em placas de 96 poços para serem analisadas por espectrofotometria, usando absorvância de 490 nm (De Souza et al., 2013). Os dados brutos de absorvância foram analisados no software R (versão 4.0) e o teste t de *Student* foi usado para comparar os cultivares de cana-energia e cana de açúcar nos diferentes pontos coletados.

2.4. RESULTADOS

2.4.1. Açúcares solúveis

Os principais açúcares encontrados nos tecidos fotossintéticos e de armazenamento de cana-de-açúcar são sacarose, glicose e frutose (De Souza et al., 2018; Alves et al., 2019). Para entender o comportamento desses açúcares nos tecidos da folha e do colmo de cana-de-açúcar e cana-energia durante ciclo diurno, extraímos e quantificamos esses açúcares, utilizando as amostras da folha+1 e dos entrenós +1, +3, +6 e +12, que foram coletados as 06 horas da manhã, 12, 18, 00 e 06 horas do outro dia, o que chamamos de ZT0, ZT6, ZT12, ZT18 e ZT24 (tempo em Zeitgeber), respectivamente. Na Figura 6, deprevenos os resultados dos açúcares: sacarose, glicose e frutose que foram quantificados para cada ponto.



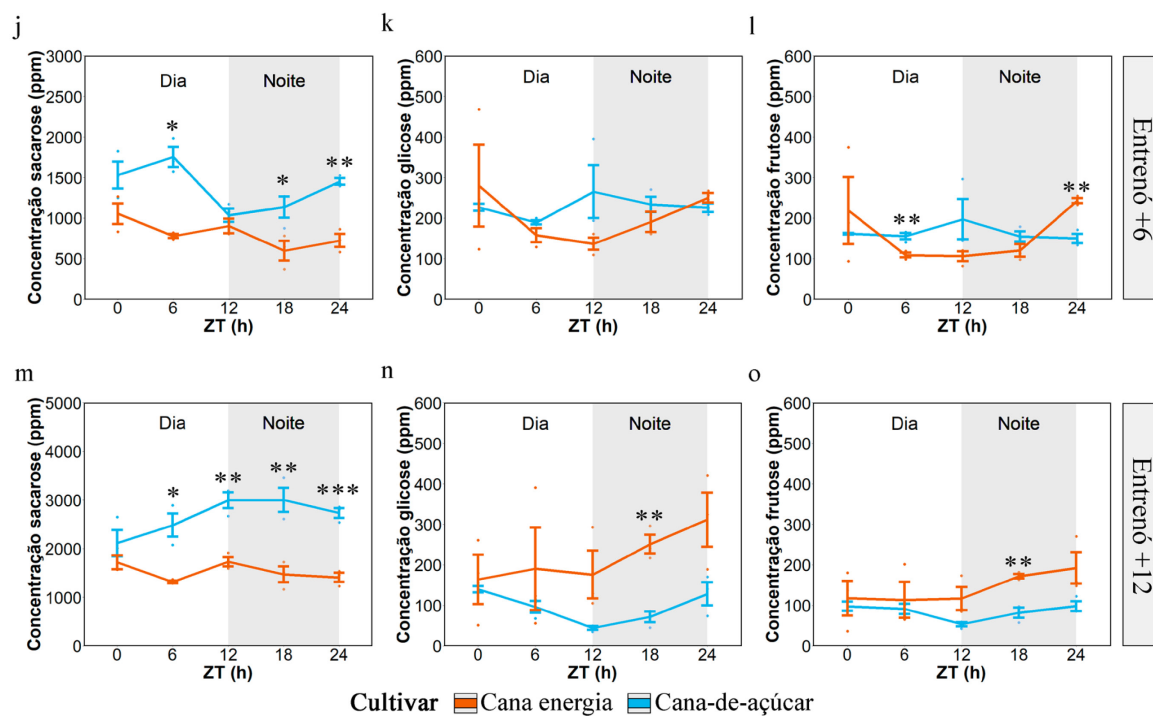


Figura 6. Variação diurna dos carboidratos nos tecidos folha (fonte) e nos entrenós de cana-energia (laranja) e cana-de-açúcar (azul) durante o ciclo diurno. Variação de sacarose no tecido da folha +1 (a) e dos entrenós +1 (d), +3 (g), +6 (j) e +12 (m); de glicose no tecido da folha +1 (b) e dos entrenós +1 (e), +3 (h), +6 (k) e +12 (n); e de frutose no tecido da folha +1 (c) e dos entrenós +1 (f), +3 (i), +6 (l) e +12 (o). O eixo x representa o tempo em Zeitgeber e o eixo y representa a concentração dos açúcares solúveis em ppm, as barras representam o erro padrão. As diferenças significativas foram avaliadas pelo Teste T de *Student* para cada ponto coletado: * P-value < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001.

Na folha +1 de cana-de-açúcar e cana-energia, o perfil de sacarose aumentou gradualmente durante o dia (ZT0 à ZT12), atingindo o pico máximo em ZT12, 433 ppm em cana-de-açúcar e 285 ppm em cana-energia (Fig. 6a). Ao final do dia (ZT24), o conteúdo de sacarose nas duas cultivares diminuiu gradualmente, chegando a 135 ppm em cana-de-açúcar e 94.3 ppm em cana-energia (Fig. 6a). O conteúdo de sacarose em todos os pontos foi maior em cana-de-açúcar em relação a cana-energia. Diferenças significativas na concentração de sacarose entre cana-energia e cana-de-açúcar foi observado no final do dia (ZT12) (Fig. 6a). O perfil de glicose e frutose na folha +1 foi oposto entre as cultivares (mudança de fase), enquanto cana-energia produziu glicose e frutose durante as primeiras do dia (ZT0 à ZT06) (Fig. 6b e Fig. 6c) e degradou durante o restante do dia (ZT06 à ZT24) (Fig. 6b e Fig. 6c), em cana-de-açúcar, o perfil desses açúcares declinou durante as primeiras horas do dia (ZT0 à ZT12) (Fig. 6b e Fig. 6c) e aumentou no período da noite (ZT12 às ZT24) (Fig. 6b e Fig. 6c). O pico máximo de produção de glicose e frutose em cana-energia foi no ponto ZT06, chegando a 27.9 e 16.7

ppm, respectivamente (Fig. 6b e Fig. 6c), já em cana-de-açúcar, os maiores picos de glicose e frutose ocorreram nos pontos ZT0 e ZT24 com picos máximos para glicose de 33 e 26.8 ppm, respectivamente (Fig. 6b), e de 23.8 e 21.5 ppm para frutose, respectivamente (Fig. 6c). Observamos um perfil de glicose diferencial nos pontos ZT06 e ZT12 (Fig. 6b), sendo que cana-energia apresentou um conteúdo maior deste açúcar em comparação a cana-de-açúcar. Em relação ao perfil de frutose, observamos diferenças significativas no ponto ZT06 (Fig. 6c) e conteúdo de frutose foi maior em cana-energia em relação a cana-de-açúcar.

Nos colmos em processo de desenvolvimento: entrenós +1, +3 e +6, observamos uma mudança de fase no perfil de frutose e glicose em alguns pontos do dia entre as cultivares. No entrenó +1, observamos diferenças significativas no perfil de glicose durante a noite, nos pontos ZT12 e ZT18 (Fig. 6e), já para frutose, as maiores diferenças ocorreram durante o dia (ZT06) e a noite (ZT18) (Fig. 6f). No entrenó +3, observamos uma maior variação de glicose e frutose durante a noite (ZT18) entre as cultivares (Fig. 6h e Fig. 6i), com diferenças significativas apenas no perfil de frutose. No entrenó +6, um entrenó em processo de maturação, as maiores diferenças observadas para glicose e frutose ocorreram durante o dia (ZT06) (Fig. 6k e Fig. 6l), no início da noite (ZT12) (Fig. 6k e Fig. 6l) e no final da noite (ZT24) (Fig. 6k e Fig. 6l), com diferenças significativas nos níveis de frutose nos pontos ZT06 e ZT24 (Fig. 6k e Fig. 6l). No entrenó +12, a concentração de glicose e frutose foram maiores em cana-energia em relação a cana-de-açúcar durante todos os pontos coletados, diferenças significativas foram observadas no início da noite (ZT18) (Fig. 6n e Fig. 6o). A concentração de glicose e frutose diminuiu com o processo de maturação, entretanto, observamos que cana-de-açúcar possui mais glicose e frutose nos entrenós imaturos, o oposto acontece para cana-energia, tendo uma maior concentração nos entrenós maduros. Em cana-de-açúcar, a maior concentração de glicose foi observada no ponto ZT18 do entrenó +3 com o pico máximo de 326 ppm (Fig. 6h), já em cana-energia, os maiores picos também foram observados no entrenó +3, com picos máximos nos pontos ZT12 (282 ppm) e ZT24 (290 ppm) (Fig. 6h). Os menores picos de glicose em cana-de-açúcar foram observados no entrenó +12, aonde o menor pico foi observado no ponto ZT12 (44.5 ppm) (Fig. 6n), já em cana-energia, o menor pico foi observado no ponto ZT12 (137 ppm) do entrenó +6 (Fig. 6k). Em relação a frutose, em cana-açúcar os maiores picos foram observados nos pontos ZT06 (299 ppm) e ZT18 (272 ppm) do entrenó +1 (Fig. 6f) e o menor pico foi detectado no ponto ZT12 (53.6 ppm) do entrenó +12 (Fig. 6o). Em cana-energia, os maiores picos de frutose foram detectados

nos pontos ZT0 (255 ppm) e ZT12 (249 ppm) do entrenó +1 (Fig. 6f) e as menores concentrações nos pontos ZT0 (118 ppm) e ZT12 (117 ppm) do entrenó +12, (Fig. 6o).

Em relação ao perfil de sacarose nos entrenós +1, +3, +6 e +12, observamos um aumento gradual em função do processo de maturação, tanto em cana-de-açúcar quanto em cana-energia. Em cana-de-açúcar, os picos máximos ocorreram nos pontos ZT12 (2996 ppm) e ZT18 (3002 ppm) do entrenó +12 (Fig. 6m). Já em cana-energia, os maiores picos foram observados nos pontos ZT0 (1719 ppm) e ZT12 (1729 ppm) do entrenó +12 (Fig. 6m).

2.4.2. Amido

Para quantificar o conteúdo do amido, foram utilizados os tecidos da folha +1 e dos entrenós em processo de maturação – entrenós +1, +3, +6 e +12 –, os resultados estão plotados no gráfico da Fig. 7, onde observamos o perfil do amido em função do ciclo diurno em cana-energia e cana-de-açúcar.

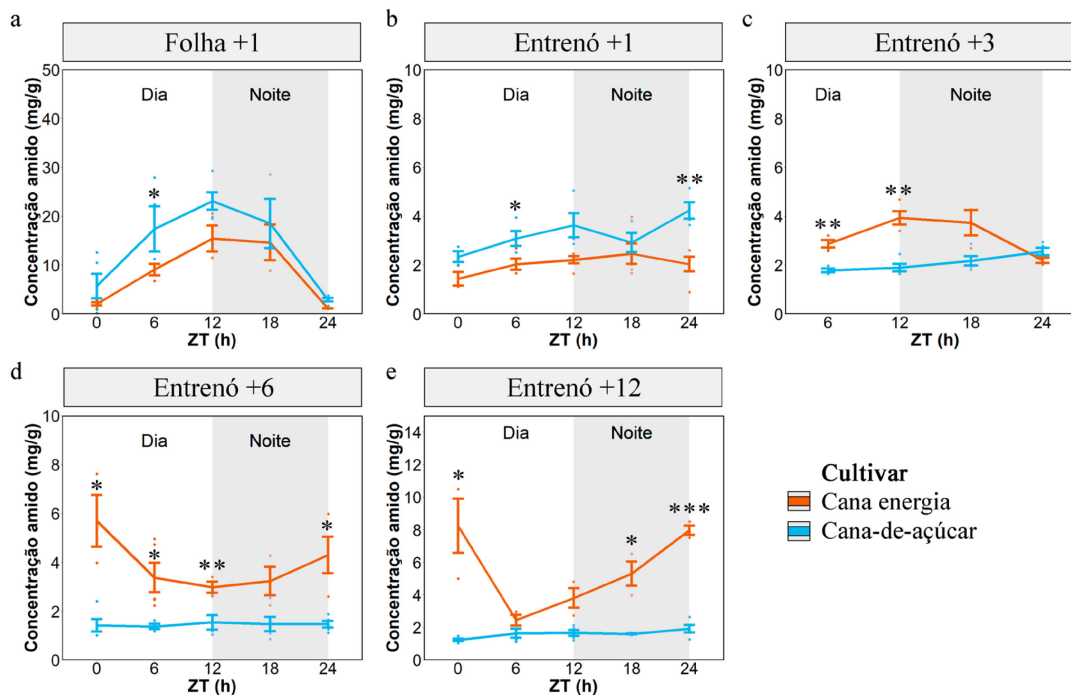


Figura 7. Variação diurna de amido nos tecidos folha +1 (a) e entrenós +1 (b), +3 (c), +6 (d) e +12 (e) de cana-energia (vermelho) e cana-de-açúcar (azul) durante o ciclo diurno. O eixo x representa o tempo em Zeitgeber e o eixo y representa a concentração dos açúcares solúveis em mg/g, as barras representam o erro padrão. As diferenças significativas foram analisadas pelo Teste T para cada ponto coletado: * P-value < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001.

No tecido da folha +1 (Fig. 7a), o teor de amido aumentou durante o dia (ZT0 à ZT12) e diminuiu durante o período da noite (ZT12 à ZT24) tanto em cana-de-açúcar quanto em cana-energia. Os maiores picos de amido foram encontrados no final do dia (ZT12), com concentração máxima de 23.1 mg/g em cana-de-açúcar (Fig. 7a) e 13.8 mg/g em cana-energia (Fig. 7a).

No entrenó +1 (Fig. 7b), observamos que em todos os pontos aferidos, cana-de-açúcar teve uma maior concentração de amido em relação cana-energia, também podemos observar que os pontos ZT06 e ZT24 apresentaram diferenças significativas entre as cultivares. Em contrapartida, a partir do entrenó +3 (Fig. 7c), observamos um maior teor de amido em cana-energia em relação a cana-de-açúcar, com diferenças significativas no entrenó +3 (nos pontos ZT0 e ZT06) (Fig. 7c), no entrenó +6 (ZT0, ZT06, ZT012 e ZT24) (Fig. 7d) e no entrenó +12 (ZT0, ZT18 e ZT24) (Fig. 7e). Os maiores picos de amido em cana-energia foram observados no ponto 0 ZT do entrenó +6 (5.69 mg/g) (Fig. 7d) e do entrenó +12 (8.24 mg/g) (Fig. 7e) e no ponto ZT24 do entrenó +6 (Fig. 7d) (4.30 mg/g) e do entrenó +12 (7.97 mg/g) (Fig. 7e).

2.5. DISCUSSÃO

2.5.1. As hexoses regulam importantes processos biológicos, tais como crescimento e fotossíntese

Na folha +1, observamos que a concentração de sacarose aumenta durante o dia nas duas cultivares, no entanto, cana-de-açúcar se destaca por acumular um maior conteúdo de sacarose em relação a cana-energia (Fig. 6a). Resultados similares foram encontrados em um estudo de variação diurna utilizando o tecido da folha de cana-de-açúcar (SP80–3280) com 12 meses de idade (De Souza et al., 2018), aqui os autores encontraram um menor teor de sacarose as 6 horas da manhã e as 2 horas da noite e um pico máximo as 14 horas, além disso, pouca variação foi observada para o conteúdo de glicose e frutose. Porém, os nossos resultados mostraram que os níveis de glicose e frutose foliar (Fig. 6b e Fig. 6c) sofreram oscilação em função do ciclo diurno e curiosamente

observamos uma mudança de fase em alguns pontos do dia, uma vez que os níveis de glicose e frutose aumentam na cana-energia em alguns pontos do dia (ZT0 e 0ZT06) e em cana-de-açúcar aconteceu o oposto, aumentou apenas durante a noite (ZT12 às ZT24).

Sabendo que que cana-energia possui mais biomassa e menos sacarose do que cana-de-açúcar (Carvalho-Netto et al., 2014), já era de se esperar um maior acúmulo e produção de sacarose no tecido foliar de cana-de-açúcar. Genomicamente, cana-energia é constituída por *Saccharum spontaneum* e *S. officinarum*, em que o último apresenta um baixo teor de sacarose e elevado teor de fibras, assim como, ocupa uma maior proporção do genoma (Carvalho-Netto et al., 2014). Devido a esse aspecto genético, já era de se esperar uma baixa concentração de sacarose no tecido foliar de cana-energia. Já o aumento de sacarose é explicado pelo fato que a produção desse açúcar ocorre durante o dia em decorrência do processo de fotossíntese, porém, quando as reações luminosas da fotossíntese cessam ao término do dia, a produção de sacarose tende a diminuir (Du et al., 2000). A diminuição de sacarose pode ser explicada pelo constante transporte desse açúcar para os órgãos drenos, processo caracterizado por uma relação de oferta (órgãos fonte) e demanda (órgãos dreno), e durante a noite, a relação fonte-dreno se torna mais evidente quando observamos baixas concentrações de sacarose no tecido da folha (McCormick et al., 2009).

Os açúcares frutose, glicose e sacarose são os principais carboidratos encontrados nos tecidos fotossintéticos (folhas) e de armazenamento (colmos) de cana-de-açúcar, a sacarose pode ser convertida em frutose e glicose por intermédio da ação de invertases (Batta et al., 1986). Já foi demonstrado que o perfil desses açúcares em cana-de-açúcar são alterados de acordo com a atividade de enzimas (Batta et al., 1986), estágio de desenvolvimento (Pereira et al., 2017), variação diurna (De Souza et al., 2018) e variáveis ambientais (Inman-Bamber et al., 2010). Lobo e colaboradores (2013) demonstraram que o fornecimento de sacarose exógena em folhas de cana-de-açúcar afeta o metabolismo dos carboidratos, a concentração de frutose e glicose e a atividade enzimática (SAI, NI, SuSy e SPS), além disso, a sacarose exógena pode inibir a fotossíntese por regulação negativa da Rubisco. Em outros estudos foi demonstrado que a sacarose e as hexoses (frutose e glicose) possuem um grande potencial para modular a fotossíntese (McCormick et al., 2008). Também foi relatado que açúcares como trealose 6-fosfato (Paul et al., 2008) e enzimas como hexoquinase e invertases podem modular a expressão de genes relacionados a fotossíntese (Kocal et al., 2008). Todos esses resultados revelam que os

açúcares tem uma grande influência em processos biológicos importantes para a planta, tais como a fotossíntese.

As hexoses atuam em vários processos importantes nas plantas, uma vez que servem como fonte carbono para sustentar o metabolismo foliar, especificamente para suprir as necessidades de processos como respiração celular, além disso, atuam na regulação da fotossíntese (McCormick et al., 2008) e sinalização dos açúcares (Rolland et al., 2005). Em trabalhos anteriores, foi demonstrado que o aumento da demanda de sacarose nos órgãos drenos resulta em um aumento da fotossíntese e a atividade fotossintética está correlacionada com os teores de hexose foliar (McCormick et al., 2006). McCormick e colaboradores (2008) demonstraram que o aumento de hexoses nas folhas de cana-de-açúcar ocasiona uma diminuição da taxa fotossintética, o que constitui um sistema de feedback para a regulação fotossintética. Tal mecanismo, regula a expressão de genes relacionados a fotossíntese e controla vias de transdução de sinal envolvendo fosforilação de proteínas por meio de quinases (Ehness et al., 1997; McCormick et al., 2008). Em nossos resultados foi observado que cana-de-açúcar acumula menos hexoses durante o dia, o que pode estar correlacionado com um aumento da taxa fotossintética e produção de sacarose, isso faz sentido, uma vez que cana-de-açúcar tende a acumular sacarose em seus colmos pelo mecanismo fonte-dreno, contrariamente, em cana-energia as hexoses são produzidas em um dado período do dia, sugerindo uma possível diminuição da taxa fotossintética e produção de açúcares, já na outra parte do dia, as hexoses são depletadas para suprir as necessidades metabólicas. No entanto, essas hipóteses precisam ser trabalhadas melhor na etapa de análise dos transcritos produzidos a partir de nossas amostras. Em outros estudos, Zhao e colaboradores (2017) analisaram a taxa fotossintética (P_n) em plantas de cana-de-açúcar e cana-energia e não encontraram diferenças na taxa fotossintética entre as cultivares de cana-de-açúcar e cana-energia analisadas, e atribuíram o ganho de biomassa de cana-energia a alta população de seus colmos, colmos longos e ótimo NDVI (*difference vegetation index*). Isso pode significar que a taxa fotossintética não tenha tanta influência para a alta concentração de biomassa em cana-energia, em vez disso, cana-energia pode usar esses açúcares para regular processos biológicos, tais como crescimento, e remobilizar o carbono de forma diferente da cana-de-açúcar.

Os açúcares podem regular a expressão de genes e também atuam como moléculas de sinalização (Rolland et al., 2002; Lastdrager et al., 2014). As hexoses tem um grande

potencial de sinalização, pois atuam no crescimento de órgãos e proliferação celular, enquanto a sacarose está mais associada a diferenciação e maturação celular (Eveland et al., 2012). Em um trabalho recentemente publicado por nosso grupo com a minha participação (De Abreu et. al 2020), observamos que a cana-energia apresenta uma maior taxa de brotação e desenvolve primeiro a parte área e depois a raiz, o contrário acontece para cana-de-açúcar, uma vez que desenvolve primeiro a raiz e depois a parte área, além disso, também observamos que a cana-energia cresce tanto de dia quanto de noite. Na figura a seguir (Fig. 8), extraída de nosso artigo (De Abreu et. al 2020), podemos observar estas diferenças no crescimento de cana-energia e cana-de-açúcar durante o período de 30 dias contínuos. Esses resultados mostram que o crescimento e desenvolvimento entre cana-de-açúcar e cana-energia são diferentes, isso implica que o metabolismo dessas cultivares são distintos e sugere que o metabolismo dos carboidratos e metabólitos possuem grande influência nesse processo de desenvolvimento.

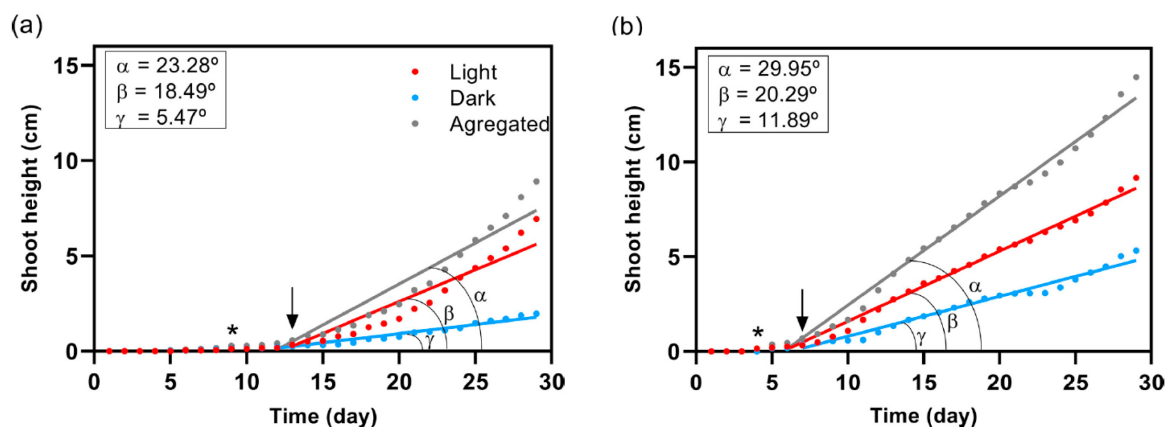


Figura 8. Fig. 7 do artigo *Energy cane vs sugarcane: Watching the race in plant development*. Altura do broto da cana-de-açúcar (a) e cana-energia (b) por 29 dias. O total da altura é representado em cinza. O desenvolvimento do dia é representado em vermelho para e o desenvolvimento do período noturno está representado em azul. O asterisco indica o início do desenvolvimento do broto. A seta indica o início da diferença de crescimento entre os períodos claro e escuro. Com os dados da altura do broto, foi realizada uma reta de regressão, e o valor do ângulo calculado a partir do coeficiente angular da reta (tangente da reta em relação ao eixo X). Os ângulos: α , β e γ indicam o ângulo de crescimento em relação ao eixo X do crescimento total, período de luz e período de escuridão, respectivamente.

O crescimento da cana-de-açúcar ocorre quando a planta acumula sacarose e biomassa em seus entrenós, o que resulta no espaçamento no diâmetro do colmo, além disso, o surgimento de novos entrenós no ápice do colmo é caracterizado pelo

alongamento e espessamento das paredes celulares (celulose e lignina). O conteúdo de sacarose, celulose e lignina tendem a aumentar durante esse processo (Lingle e Thomson, 2012). Em nossos resultados, a concentração de sacarose, glicose e frutose no entrenó +1, um tecido em processo de desenvolvimento, seguiu um padrão de oscilação diária na cana-energia e cana-de-açúcar (Fig. 6d, 6e e 6f). Podemos destacar o padrão de glicose e frutose ocorrendo praticamente de forma oposta (mudança de fase). No entrenó +3, os perfis de glicose e frutose (Fig. 6h e Fig. 6i) são semelhantes entre as cultivares, com exceção do ponto ZT18 que é diferente. No entrenó +6, observamos novamente uma mudança de fase nos perfis de glicose e frutose (Fig. 6k e Fig. 6l), na qual fica mais aparente em cana-energia e cana-de-açúcar, o que sugere que estes açúcares estão sendo particionados distintamente nas duas cultivares ao longo do processo de maturação do colmo. A sacarose aumenta sua concentração nos entrenós menos maduros (+1 e +3) (Fig. 6d e Fig. 6g) e chega a um platô nos entrenós mais maduros (+6 e +12) (Fig. 6j e Fig. 6m). Esses resultados sugerem, que cana-de-açúcar e cana-energia particiona o carbono de forma diferente durante o processo de maturação, alongamento e crescimento dos seus colmos, consequentemente, os componentes da parede celular também são afetados durante o processo.

Entre os tecidos analisados, o entrenó +12 é o tecido que mais caracteriza a cana-de-açúcar em sua fase adulta, no qual ela está pronta para ser colhida. Como esperado, os níveis de sacarose são maiores em cana-de-açúcar do que em cana-energia (Fig. 6m). Os níveis de glicose e frutose são maiores na cana-energia em relação a cana-de-açúcar (Fig. 6n, Fig. 6o). Wai e colaboradores (2017) demonstraram que híbridos de cana-de-açúcar com alto teor de biomassa convertem rapidamente sacarose em UDP-glicose (substrato para formar parede celular e intermediário para síntese de sacarose), além disso, também foi demonstrado que conversões de sacarose em glicose e frutose são bastante ativas, o que resulta em uma maior produção de energia, parede celular e alto crescimento celular, dessa forma, concluem que a produção de biomassa está intimamente ligada ao metabolismo da parede celular, alocação de hexose e divisão celular. Considerando que cana-energia é um híbrido com alto teor de biomassa (Carvalho-Netto et al., 2014), nossos resultados mostraram que cana-energia se destaca por concentrar mais hexoses nos entrenós maduros do que cana-de-açúcar, provavelmente para remobilizar a sacarose em hexoses para produção de biomassa e crescimento.

Tendo vista dos argumentos apresentados, nossos resultados mostraram que cana-energia tem uma estratégia metabólica e de partição de carbono diferente da cana-de-açúcar, o que contribui para explicar as diferenças fisiológicas existentes entre cana-de-açúcar e cana-energia. Aqui também demonstramos que a variação diurna contribui para explicar essas diferenças, como foi mostrado, a concentração dos açúcares solúveis é variável no tempo. No tecido da folha, a cana-energia acumula menos sacarose do que cana-de-açúcar, o que sugere que ela está sendo translocada para os tecidos drenos, porém, a sacarose também pode ser remobilizada em glicose e frutose para suprir a demanda de vários processos biológicos, incluindo respiração celular, manutenção do metabolismo foliar, partição do carbono para o metabolismo primário e secundário, sistema de feedback para regular a fotossíntese. E o carbono provenientes das hexoses nos entrenós em desenvolvimento pode ser remobilizado para o metabolismo da biomassa e do crescimento. Em nossas próximas etapas, iremos analisar a expressão de genes relacionado ao metabolismo da sacarose e o acúmulo de biomassa.

2.5.2. Cana-energia tem mais amido nos entrenós maduros em relação a cana-de-açúcar

O perfil do amido no tecido da folha+1 das cultivares analisadas foi similar ao encontrado nas folhas de *Arabidopsis* (Zeeman et al., 2006), em que foi observado um aumento do conteúdo do amido transitório no decorrer do dia (produção) e uma diminuição durante o período da noite (degradação). Nossos resultados demonstraram uma menor concentração de amido transitório nas folhas de cana-energia em comparação a cana-de-açúcar.

Nos entrenós, encontramos uma maior concentração de amido no entrenó +1 de cana-de-açúcar em relação a cana-energia. De acordo com a literatura (Eggleston et al., 2004), existe uma relação entre concentração do amido e maturação da cana-de-açúcar, isto é, a cana-de-açúcar imatura tem uma maior tendência de acumular amido em comparação a uma cana-de-açúcar madura. Nossos resultados são similares com esses achados, uma vez que observamos que os entrenós imaturos têm mais amido do que os entrenós em processo de maturação. Outros estudos demonstraram que o teor de amido entre cultivares de cana-de-açúcar pode variar e sua produção depende de alguns

fatores como temperatura, índice pluviométrico, condições de crescimento, variedade da planta, solo de cultivo e método de colheita (Anyangwa et al., 1993; Figueira et al., 2011). Em relação ao conteúdo do amido em função do ciclo diurno, podemos destacar uma maior oscilação no tecido da folha em ambas as cultivares durante o ciclo dia/noite e uma maior concentração de amido em cana-de-açúcar nos tecidos folha +1 e no entrenó +1 (Fig. 7a e Fig. 7b).

Quando avaliamos o perfil de amido nos entrenós +3, +6 e +12 (Fig. 7c, 7d e 7e), verificamos uma maior concentração de amido em cana-energia em contraste a cana-de-açúcar. Uma vez que cana-energia tem menos sacarose do que cana-de-açúcar, é interessante de se pensar que a sacarose proveniente da fotossíntese nessa cultivar pode ser direcionada preferencialmente para o metabolismo da biomassa ao invés de acumular açúcar na forma de sacarose como acontece na cana-de-açúcar, e a sacarose remanescente pode ser armazenada na forma de amido para suprir o metabolismo da planta na ausência de fontes de carbono. O amido também pode exercer a função de regular o feedback da fotossíntese nos órgãos fontes, uma vez que o aumento do amido nos caules resultara em uma inibição por feedback da fotossíntese, ocorrendo quando os caules atingem a capacidade máxima de retenção de sacarose (Gutjahr et al., 2013; Paul e Foyer, 2001). Isso pode significar que cana-energia pode ajustar sua fotossíntese e produção de açúcares para posteriormente converter açúcares em biomassa através do conteúdo do amido, o que favorece seu rendimento na planta adulta. No entanto, essa é uma hipótese que precisa ser testada.

Para melhor compreender as diferenças observadas em cana-de-açúcar e cana-energia, a expressão de genes envolvidos nas vias de biossíntese, regulação e degradação do amido precisa ser mais elucidada nos órgãos de armazenamento na cana-de-açúcar e cana-energia, existem poucos trabalhos que estudaram tais mecanismos em cana-de-açúcar. Em sorgo, McKinley e colaboradores (2018) estudaram a expressão de genes envolvendo o metabolismo do amido no caule e no transporte de açúcar através da membrana externa dos amiloplastos.

2.6. CONCLUSÃO

A cana-energia é caracterizada por ter menos sacarose e uma maior produtividade de biomassa em relação aos híbridos comerciais de cana-de-açúcar. Muitos estudos já mostraram as diferenças fisiológicas entre cana-de-açúcar e cana-energia, no entanto, pouco se sabe como a variação diurna influencia a produção e degradação de carboidratos em cana-energia. O processo de acúmulo de biomassa está ligada ao processo de partição de carbono, processo pela qual supre a demanda de diversas vias do metabolismo das plantas, principalmente através do metabolismo dos açúcares. Sabendo que grande parte do carbono alocado é destinado para síntese de açúcares, resolvemos investigar a concentração dos açúcares solúveis (frutose, glicose e sacarose) e do amido nos tecidos da folha e nos entrenós em desenvolvimento de cana-energia e cana-de-açúcar para tentar entender melhor o processo de partição do carbono em carboidratos nessas duas cultivares.

Nossos resultados mostraram que o conteúdo dos açúcares solúveis é bastante variável entre as cultivares analisadas, entre as fases de maturação dos entrenós e em função do ciclo diurno (dia/noite). Tais diferenças ocorrem provavelmente porque o carbono originado durante a fotossíntese é particionado de forma diferente entre as cultivares analisadas. O perfil de sacarose foi maior em cana-de-açúcar nos tecidos da folha e do colmo, como já sugerido pela literatura. No entanto, o perfil das hexoses (frutose e glicose) ao longo do ciclo diurno foi oposto em alguns pontos do dia. Essa mudança de fase, sugere que esses açúcares são usados de forma distinta em cana-de-açúcar e cana-energia, uma vez que podem atuar em diversos processos, tais como regulação da fotossíntese, respiração celular e relação fonte-dreno.

Em relação ao conteúdo do amido transitório, observamos um padrão de produção diária e degradação noturna característico de outras plantas. Mas curiosamente, observamos que cana-energia possui um maior conteúdo de amido de reserva nos seus tecidos de armazenamento em relação a cana-de-açúcar. Para entender melhor essas diferenças, em estudos posteriores iremos investigar a expressão de genes relacionados ao metabolismo da sacarose e do amido nessas cultivares. Para elaborar um modelo mais

consistente, agora iremos discutir as diferenças encontradas em torno do metabolismo primário e secundário das cultivares analisadas em função do ciclo diurno por meio da análise do perfil metabólico e esses resultados são apresentados no próximo capítulo.

CAPÍTULO II: METABOLISMO PRIMÁRIO E SECUNDÁRIO

3.1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento das tecnologias de sequenciamento de alto desempenho tornou possível a análise estrutural e funcional dos genomas (genômica) de praticamente todos os seres da Terra, isso possibilitou o desenvolvimento paralelo de outras tecnologias como análise da expressão gênica (transcriptômica) e análise de proteínas (proteômica) (Shendure et al., 2017). Entretanto, o desafio remanescente foi desenvolver uma plataforma de análise do produto final do metabolismo, os metabólitos, as quais são produzidos por uma complexa rede de interação gênica. A área responsável por estudar os metabólitos e o metabolismo ficou conhecida como metabolômica (Kell e Oliver, 2016). Abordagens de metabolômica possibilitam o desenvolvimento de análises robustas do conjunto de metabólitos em diferentes condições experimentais (Hall et al., 2002).

O conjunto de todas as tecnologias mencionadas ficou conhecido como ciências ômicas, que além de abrigar as plataformas citadas, também engloba outras áreas, como fenômica, interatômica e epigenômica, áreas pelas quais possibilitam o maior entendimento das interações moleculares, regulação epigenética, modificação pós-transcricional e pós-tradução (Fukushima et al., 2009). Nessa perspectiva, um dos maiores desafios atuais é integrar dados de uma ômica com outra, em metabolômica por exemplo, o resultado da integração com outras abordagens gera o melhor entendimento de vias biológicas e de características importantes do metabolismo, dando suporte para o desenvolvimento de novas estratégias e plataformas para o melhoramento de plantas (Kumar et al., 2017).

A metabolômica se baseia principalmente nas tecnologias de espectroscopia de ressonância magnética nuclear (NMR) e espectrometria de massa (MS) (Kin et al., 2010;

Jorge et al., 2016). A espectrometria NMR é um método não destrutivo, automatizável e altamente reproduzível, facilmente quantificável e requer pouca ou nenhuma separação cromatográfica, tratamento de amostra ou derivatização química (Emwas et al., 2019). No entanto, as plataformas mais populares e amplamente utilizadas nos estudos de metabolômica são baseadas em espectrometria de massa (MS), uma vez que essas técnicas possuem alta sensibilidade e seletividade em relação NMR, possibilitando a seleção e identificação de metabolitos com concentrações ínfimas (Ernst et al., 2014). A espectrometria de massa pode ser acoplada a métodos de cromatografia, o que dar origem a sistemas híbridos tais como cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS), cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC-MS) e cromatografia líquida de alta ou ultra alta performance acoplada a UV ou detecção fluorescente (HPLC/UPLC) (Al-Rubaye et al., 2017).

Sistemas baseados em LC-MS são adequados para detecção de metabolitos não voláteis e apolares, o preparo das amostras é simples e possui uma ampla cobertura para detecção de compostos (Wang, 2015). Uma das características do LC-MS é sua diversidade de métodos de ionização disponíveis, tais como ionização por eletrospray (ESI) e MALDI-TOF, as quais podem ser acopladas ao espectrômetro de massas (Famiglioni et al., 2017). Diferentemente do LC-MS, a abordagem GC-MS tem como fase móvel um gás ao invés de um líquido, é adequada para compostos voláteis, possui alta sensibilidade, resolução, reprodutibilidade e a fragmentação é altamente repetível, além de ter bancos de dados universais (bibliotecas espectrais) que facilitam a identificação de compostos (Jorge et al., 2016). No entanto, uma das desvantagens é que esta técnica exige muitas vezes que os compostos passem por uma etapa de derivatização (procedimento que aumenta a volatilidade e estabilidade térmica dos compostos polares) no pré-processamento das amostras (REN et al., 2018). A escolha da técnica depende do objetivo do estudo (Wang et al., 2010), da natureza das amostras (Salem et al., 2020), dos fatores como custo e acessibilidade do equipamento (t'Kindt et al., 2009) e da abordagem metabolômica: direcionada ou não direcionada (Roberts et al., 2012; Vinayavekhin e Saghatelian, 2010).

A metabolômica não-direcionada (*untarget metabolomics*) busca analisar todos os analitos mensuráveis em uma amostra, seja eles conhecidos ou desconhecidos. Uma das grandes dificuldades dessa abordagem é a identificação de compostos desconhecidos. Já a abordagem direcionada (*target metabolomics*) analisa metabolitos quimicamente

caracterizados e bioquimicamente anotados (Roberts et al., 2012). Plataformas GC-MS são utilizadas para análises direcionadas e não direcionadas, essa plataforma é preferencialmente usada para detecção de compostos do metabolismo primário, por outro lado, as plataformas LC-MS também são usadas para análises direcionadas e não-direcionadas, tanto para detecção de metabólitos do metabolismo primário quanto para compostos do metabolismo secundário (T'Kindt et al., 2009; Kumar et al., 2017).

Essas tecnologias são utilizadas para detectar uma vasta gama de compostos e/ou metabólitos em uma grande quantidade de misturas, seja elas simples ou complexa, de natureza biológica (orgânico) ou mista (inorgânico) (Kumar et al., 2017). A identificação e quantificação desses metabólitos, seja eles conhecidos ou não, são úteis para a melhor compreensão das funções de genes em vias biológicas, em camadas de regulação gênica, intercepção entre vias e interações entre metabólito-metabólito, proteína-proteína e metabólito-proteína (Wen et al., 2014).

As técnicas de metabolômica podem ser usadas para entender o metabolismo primário e secundário das plantas, uma vez que muitos estudos já foram feitos para detectar e quantificar metabólitos de várias espécies de plantas (Jorge et al., 2016; Johnson e Lange, 2015; Salem et al., 2020). No entanto, poucos estudos foram realizados para compreender o metabolismo primário e secundário da cana-de-açúcar e cana-energia, principalmente com ênfase nos compostos produzidos no ciclo diurno.

3.1.1. Metabolismo primário e secundário

O metabolismo das plantas é responsável por produzir uma ampla variedade de metabólitos vegetais e pode ser subdividido em metabolismo primário (central), a qual é composto por metabólitos essenciais para homeostase celular e sobrevivência da planta, e o metabolismo secundário (especializado), a qual é responsável por produzir compostos envolvidos no crescimento, desenvolvimento e interação da planta com o ambiente (Pott et al., 2019). Os metabólitos secundários são originados a partir de precursores do metabolismo primário, tais como açúcares, aminoácidos, nucleotídeos, ácidos orgânicos e ácidos graxos e as principais vias centrais que retroalimentam o metabolismo secundário são da glicólise, do ciclo do TCA e via do shiquimato (Kroymann, 2011). Muitos modelos foram construídos para explicar o metabolismo das plantas e reconstruir suas complexas

redes metabólicas (Baghalian et al., 2014; Beckers et al. 2016; Filho et al. 2018). Estima-se que cerca de 1 milhão de metabólitos sejam produzidos em todo o reino vegetal (Afendi et al., 2012). Em relação aos metabólitos secundários, já foram isolados e descritos cerca de 200 mil metabólitos, incluindo alcalóides, terpenos, terpenóides, flavonóides, taninos, entre outras classes (Kessler e Kalske, 2018).

O metabolismo primário é composto por um conjunto de vias altamente conservadas entre as plantas, uma vez que sofreu poucas alterações durante o processo de evolução em relação ao metabolismo secundário, que é altamente diversificado (Maeda, 2019). Uma das principais vias nas plantas é a da fixação de carbono atmosférico em carboidratos, tal via evoluiu nas plantas C3, C4 e CAM (Sage et al., 2011). A via C3 está presente em mais de 85% das plantas terrestres e as demais fixam o carbono atmosférico através das vias C4 ou CAM (Chaffey, 2010). Após a fixação do carbono por uma dessas vias, o carbono é particionado para suprir as necessidades de outras vias biológicas, incluindo a via dos carboidratos, aminoácidos e lipídios. Os carboidratos atuam em diversos processos nas plantas (Eveland e Jackson, 2012), isto é, podem ser moléculas de sinalização (Smeekens, 2000; Rolland et al., 2002), reguladores da expressão gênica (Koch, 1996) e são necessários para o crescimento e desenvolvimento vegetal (Koch, 2004). Os aminoácidos são blocos estruturais para síntese de proteínas, atuam como enzimas para catalisar uma série de reações no metabolismo das plantas e são intermediários metabólitos em certas vias, assim como, regulam algumas vias do metabolismo (Galili et al. 2016; Long et al., 2013; Yang et al., 2020). Além disso, o metabolismo dos aminoácidos é conectado a outras vias, tais como o metabolismo do carbono, dos carboidratos e de vias do metabolismo secundário (Maeda, 2019). Por último, os lipídeos são biomoléculas produzidas em vários compartimentos celulares das plantas, incluindo plastídios e retículo endoplasmático, atuam no armazenamento de carbono e energia em sua estrutura, são componentes importantes das membranas plasmáticas das plantas, atuam como moléculas de sinalização e são úteis para manter a integridade das células e organelas (Schmid e Ohlrogge, 2008; Kim, 2020).

Em cana-de-açúcar, muitos esforços foram realizados para entender como o metabolismo primário e secundário se comportam em relação a processos bióticos e abióticos, tecidos e entre cultivares (Ali et al., 2019). França e colaboradores (2001) investigaram uma coleção de genes relacionados ao metabolismo secundário da cana-de-açúcar, em que foram estudadas algumas classes de compostos, incluindo isoprenóides e

fenilpropanóides, assim como as expressões de enzimas chaves envolvidas no metabolismo desses compostos. O perfil metabólico nos entrenós em desenvolvimento de cana-de-açúcar foi estudado para entender como a abundância dos metabólitos se comporta a medida que a sacarose se acumula nos colmos (Glassop et al., 2007). Uma grande diversidade de glicosídeos flavonóides e ácidos fenólicos foram identificados em extratos de genótipos de cana-de-açúcar (Coutinho et al., 2016). Bactérias promotoras de crescimento e ácidos húmicos foram aplicados em folhas de cana-de-açúcar para entender como o perfil metabólico se comporta em função desses bioestimulantes (Aguiar et al., 2018). Abordagens metabolômicas foram utilizadas para explorar as redes metabólicas em gemas e colmos de cultivares comerciais de cana-de-açúcar e foi demonstrado que os metabólitos podem ser utilizados como indicadores do histórico genético das cultivares, assim como, diferentes tecidos possuem variabilidade no perfil metabólico (Ferreira et al., 2018). Recentemente, Perlo e colaboradores (2020) identificaram metabólitos associados a vias metabólicas correlacionadas com Brix (açúcares totais) e conteúdo de fibras. Embora muitos esforços tenham sido feitos para elucidar o metabolismo primário e secundário da cana-de-açúcar, ainda não temos estudos que relaciona o perfil metabólico em cana-energia e cana-de-açúcar com a variação diurna.

3.2. OBJETIVOS

Para analisar o metabolismo das cultivares ao longo do ciclo diurno, o principal objetivo deste capítulo foi: **Analisar o metabolismo primário e secundário dos tecidos da folha e do colmo de cana-energia e cana-de-açúcar ao longo do ciclo diurno.**

Para atingir o objetivo principal deste capítulo, os objetivos específicos são:

1. Quantificar e identificar os compostos do metabolismo primário nos tecidos da folha e do colmo em cana-energia e cana-de-açúcar para obter o perfil de cada metabólito ao longo do ciclo diurno;
2. Quantificar os compostos do metabolismo secundário nos tecidos da folha e do colmo das cultivares, em seguida, identificar os compostos e analisar quais vias biológicas está sendo mais impactada por aqueles metabólitos.

3.3. MATERIAL E MÉTODOS

3.3.1. Material vegetal: metabolismo primário e secundário

Para analisar o metabolismo primário de cana-de-açúcar e cana-energia, utilizamos 80 amostras no total, sendo 40 amostras da folha +1 e 40 amostras do entrenó +3 e com 5 réplicas biológicas para cada ponto. Para analisar o metabolismo secundário, utilizamos os tecidos folha +1 (30 amostras no total, com 3 réplicas biológicas para cada ponto) e do entrenó +3 (24 amostras no total, com 3 réplicas biológicas para cada ponto).

12.2. Análise do metabolismo primário

Para realizar a análise do metabolismo primário, primeiramente as amostras dos tecidos da folha +1 e do entrenó +3 de cana-de-açúcar e cana-energia foram processadas no Laboratório Nacional de Biociências – LNBio. Foi utilizado cerca de 50 mg do material macerado para MTBE: extração metanol:água, na proporção 3:1 (v/v), conforme descrito anteriormente (Giavalisco et al., 2011). Os 100 µL da fase polar foram secos e derivatizados conforme descrito em (Roessner et al., 2001). Em seguida, 1 µL das amostras derivatizadas foram analisadas em um amostrador automático Combi-PAL (*Agilent Technologies GmbH*, Waldbronn, Alemanha) acoplado a um cromatógrafo de gás *Agilent 7890A* acoplado a um *Leco Pegasus HT time-of-flight mass spectrometer* (LECO, St. Joseph, MI, EUA) conforme descrito por (Weckwerth et al, 2004). As amostras foram derivatizadas por 90 min a 30 °C com 10 µL de cloridrato de metoxiamina 40 mg mL⁻¹ em piridina seguido por um tratamento de 30 min a 37 °C com 90 µL de N-Metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida (MSTFA). As análises cromatográficas gasosas foram realizadas em um DB-35MS 30m x 0,32mm x 0,25 µm (Agilent J&W, Santa Clara, EUA), a temperatura de injeção foi fixada em 230°C e a fonte de íons ajustada para 250°C. O hélio foi usado como gás de arraste a uma taxa de fluxo de 2 mL min⁻¹ no seguinte programa de temperatura: 2 min de aquecimento isotérmico a 85°C, seguido por uma rampa de temperatura do forno de 15°C min⁻¹ para 360°C. Os cromatogramas foram

exportados do software Leco ChromaTOF (versão 4.51.6.0) para o software R. A detecção do pico, o alinhamento do tempo de retenção e a correspondência da biblioteca foram realizadas usando o pacote R-Target Search (Cuadros-Inostroza et al., 2009). Os metabólitos foram quantificados pela intensidade do pico de uma massa seletiva. As intensidades dos metabólitos foram normalizadas pela divisão do peso, seguido da soma do total.

Os dados obtidos foram normalizados e analisados através da interface web MetaboAnalyst 5.0 (Chong et al., 2018; Xia et al., 2009). Para realizar análise estatística, importamos os dados brutos no módulo *Statistical Analysis* do MetaboAnalyst. Os dados foram agrupados por coluna e cada coluna representa uma cultivar (cana-de-açúcar ou cana-energia) e seu tempo de coleta (ZT0, ZT06, ZT12, ZT18 e ZT24), desse modo, as colunas contêm o conjunto de metabólitos detectados naquela variável (cultivar:tempo) e cada linha representa um metabólito com sua abundância relativa entre as variáveis. Os dados foram transformados em log e as amostras foram normalizados pela mediana, usando a métrica de *Auto scaling* (centrado na média e dividido pelo desvio padrão de cada variável) como escala. Para verificar diferenças estatísticas entre as cultivares e entre os pontos de coleta foi utilizada a análise ANOVA.

Os dados normalizados no MetaboAnalyst foram importados no software R (v. 4.0.2). A análise exploratória de dados foi realizada através do método PCA (*Principal Component Analysis*) usando o pacote ggbiplot (v. 0.55). A análise dos principais clusters entre as variáveis foi realizada através de agrupamentos hierárquicos usando o pacote dendextend (v. 1.14.0) e por fim um heatmap foi criado para cada variável com o pacote pheatmap (v. 1.0.12). Os demais gráficos foram originados com o pacote ggplot2 (v. 3.3.2).

3.3.3. Análise do metabolismo secundário

A análise do perfil metabólico dos tecidos da folha (folha +1) e do colmo (entrenó +3) de cana-energia e cana-de-açúcar em função do ciclo diurno foi realizada em colaboração com a Prof.^a Dr.^a. Taicia Pacheco Fill do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas (IQ/UNICAMP). Utilizamos cerca de 30 mg do material macerado dos tecidos da folha +1 e do entrenó +3, em seguida, os compostos

foram extraídos conforme descrito na literatura (De Vos et al. 2007) com uma solução composta por 99,875% de metanol e 0,125% de ácido fórmico.

Para analisar os metabólitos secundários do entrenó +3 de cana-de-açúcar e cana-energia, utilizamos amostras dos pontos ZT6, ZT12, ZT18 e ZT24 (uma triplicata por ponto). As amostras foram analisadas em um sistema de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS), usando uma coluna Acquity UPLC®CSHTMC18 com 2,1x100 mm (Waters, Irlanda), 2,1 µm de tamanho de partícula e vazão 0,200 mL min⁻¹. Para a fase móvel foram usados dois eluentes: A (ácido fórmico 1% em água v/v) e B (metanol com ácido fórmico a 0,1% v/v). As amostras foram processadas no equipamento de modelo Maxis impact™ ESI-Q-TOF (Bruker Daltonics).

Para analisar os metabólitos secundários da folha +1 de cana-de-açúcar e cana-energia, utilizamos amostras dos pontos ZT0, ZT6, ZT12, ZT18 e ZT24 (uma triplicata por ponto). As amostras foram processadas através de um espectrômetro de massas, modelo Q Exactive™ Hybrid Quadrupole-Orbitrap™ Mass Spectrometer (Thermo Scientific) com energia de colisão 10-45 eV e faixa de massa (m/z) entre 50 e 1400 e com uma taxa de aquisição de 5 Hz para MS e 7 Hz para MS/MS em modo positivo [M+H]⁺ com potencial de compensação da placa final -500 V. Os quatro os íons mais intensos foram selecionados para fragmentação automática (AutoMS/MS). Os espectros foram processados no software DataAnalysis 4.2.

Para identificar e quantificar os espectros gerados pelos equipamentos de massas, inicialmente os dados brutos passaram por duas etapas de processamento (Fig. 9). Na primeira etapa, os metabólitos foram quantificados através do software MZMine2 (PLUSKAL, T., 2010) e identificados pelo banco de dados *Global Natural Products Social Molecular Networking* (GNPS) (Wang et al, 2016). Na segunda abordagem, realizamos apenas a etapa de identificação pelo GNPS, seguida por uma análise de impactos de vias na plataforma MetaboAnalyst (<https://www.metaboanalyst.ca/>). As diferenças entre essas duas abordagens serão discutidas nos resultados.

Antes de processar as amostras, os dados brutos do colmo e da folha das cultivares analisadas foram convertidos para o formato mzXML usando o software *MSConvert* (v. 3.0), ferramenta contida no *ProteoWizard Tools* (Chambers et al, 2012). A partir dessa etapa, obtemos os espectros em nível de MS1 e MS2 para cada amostra. A Fig. 9 mostra um resumo das abordagens usadas para quantificar e identificar os metabólitos.

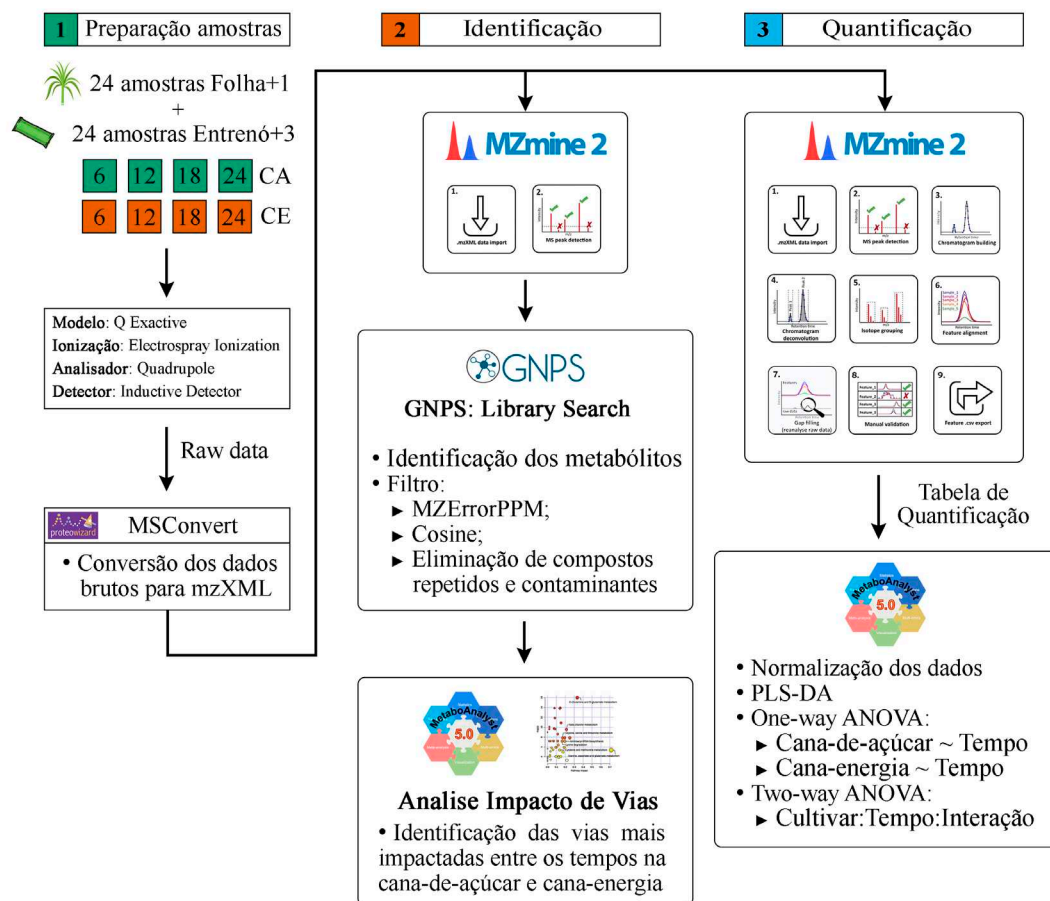


Figura 9. Pipeline de identificação e quantificação dos metabólitos. Após o (1) processamento das amostras, os dados brutos foram convertidos em mzXML, em seguida, eles foram submetidos a dois pipelines: (2) identificação e (3) quantificação dos metabólitos. Para identificar os metabólitos, as amostras mzXML foram submetidas MZMine (eliminação de sianis ruidosos), em seguida, os espectros foram submetidos ao banco de dados GNPS, seguida por identificação e a filtragem de dados, em seguida, os dados foram submetidos ao MetaboAnalyst para analisar as vias biológicas diferenciais. Para quantificar os metabólitos, as amostras mzXML foram submetidas primeiramente no MZMine (processamento dos espectros), em seguida, os arquivos MGF's e a tabela de quantificação dos compostos foi submetido ao MetaboAnalyst para realizar as análises estatísticas.

Como descrito anteriormente, na primeira abordagem do pipeline o foco principal foi a quantificação dos metabólitos. Para tal, inicialmente os arquivos mzXML foram submetidos ao software MZMine2 onde foram processados pelas seguintes etapas: *MS Peak Detection*, *Chromatogram building*, *Chromatogram deconvolution*, *Isotope grouping*, *Feature alignment*, *Gap filling* e *Feature .csv and table quant export*. Os parâmetros usados para processar as amostras da folha e do colmo estão contidos na seção do apêndice ([Tabela 1 suplementar](#)). Após o processamento dos espectros, obtemos uma lista de espectros sem identificação e armazenados na forma de matriz, além disso,

obtemos arquivos MGF (*Mascot Generic Format*) para cada amostra, nas quais contêm a reconstrução de cada pico.

Após a quantificação dos compostos no MZMine2, realizamos uma abordagem complementar para identificar os compostos, para tal, a tabela de quantificação e os arquivos MGF gerados foram submetidos ao módulo *Feature-Based Molecular Networking (FBMN)* do GNPS, usando os parâmetros *Precursor Ion Mass Tolerance* = 0.02 e *Fragment Ion Mass Tolerance* = 0.02 e mantendo os demais valores como padrão. Em seguida, os compostos identificados passaram por um filtro para eliminar redundâncias, utilizando como critério as variáveis internas do GNPS: $MZErrorPPM < 20$ e $cosine > 70$, além disso, foram eliminados compostos contaminantes e duplicados. Na etapa seguinte, a tabela de compostos identificados pelo GNPS foi concatenada com a tabela de quantificação originada pelo MZMine2, o que resultou em uma terceira matriz com os compostos identificados e quantificados. Após essa etapa, realizamos análises estatísticas para comparar as diferentes condições experimentais, para tal, a lista dos compostos quantificados foi submetida ao módulo *Statistical Analysis* do MetaboAnalyst 5.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/>). O MetaboAnalyst é um conjunto de ferramentas online para análise e interpretação de dados de metabolômica. Para realizar a análise estatística no módulo *Statistical Analysis*, primeiramente os dados foram agrupados por coluna, em que cada coluna representa o conjunto de metabólitos em função dos pontos coletados (ZT0, ZT06, ZT12, ZT18 e ZT24) em cada cultivar (cana-energia e cana-de-açúcar). Em seguida, foi realizada uma verificação de integridade e filtragem dos dados, usando o filtro *relative standard deviation* ($RSD = SD/mean$) com um valor de corte 25%. Logo depois, os dados foram transformados em log e normalizados pela média e a escala pela métrica de *Pareto Scaling*. Para explorar os dados utilizamos a Análise Discriminante de Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) e para verificar a existência de metabólitos estatisticamente significantes foram realizados os testes *one-way* e *two-way* ANOVA.

Na segunda abordagem, processamos os dados brutos de tal forma que os metabólitos não fossem quantificados, mas apenas identificados. Para tal, processamos os dados brutos (espectros) da folha e do colmo no MZMine2 e realizamos apenas a primeira etapa – *MS Peak Detection* – para eliminar sinais ruidosos, usando os seguintes parâmetros: *MS1 noise level* = 2.00E+04 (colmo) e 1.00E+03 (folha); *MS2 noise level* = 0 (colmo) e 5.00E+02 (folha); *Mass detector* = *Centroid* para ambos os tecidos. Após o pré-processamento, extraímos os arquivos filtrados no formato MGF, sendo um para cada

amostra, em seguida, os mesmos foram exportados para o GNPS para realizar a etapa de identificação.

No GNPS, os arquivos MGF provenientes da folha e do colmo foram submetidos ao módulo *Library Search* para serem identificados, utilizando os parâmetros padrões. Em seguida, os compostos identificados passaram por um filtro para eliminar redundâncias obedecendo os critérios de $MZErrorPPM < 20$ e $cosine > 70$, assim como, foram eliminados compostos contaminantes e duplicados. Como nessa abordagem não temos os valores de intensidade dos metabólitos, aqui aferimos apenas a presença ou a ausência entre as réplicas e condições experimentais, para tal, realizamos um filtro de presença e ausência entre as réplicas biológicas, no qual apenas os compostos presentes em 2 ou 3 réplicas foram mantidos e aqueles presentes em apenas uma das réplicas foram eliminados.

Em ambas as abordagens os nomes dos compostos foram manualmente acurados e revisados através do banco de dados *PubChem Compound* (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) e os compostos que apresentaram características de contaminantes foram eliminados nessa etapa, considerando a fórmula molecular do composto e se estavam presentes em plantas. Para desenhar a estrutura dos compostos foi utilizado o software ChemDraw (v. 19.0). Para caracterizar o papel biológico dos compostos, as listas individuais com os nomes dos compostos identificados em cana-de-açúcar e cana-energia em cada tempo foram submetidas ao módulo *Pathway Analysis* do MetaboAnalyst, os resultados foram plotados em gráficos de dispersão, escolhemos o teste hipergeométrico como método de enriquecimento e utilizamos a biblioteca de *Arabidopsis thaliana* (thale cress) (KEGG) como referência.

3.4. RESULTADOS

3.4.1. Metabolismo primário

Para analisar o metabolismo dos tecidos da folha (fonte) e do colmo (dreno) de cana-energia e cana-de-açúcar coletados durante o ciclo diurno, extraímos os metabólitos dos tecidos da folha +1 e do entrenó +3 de cada cultivar. Em um primeiro momento vamos

mostrar os resultados do metabolismo primário, em seguida, será apresentado os resultados do metabolismo secundário. Para analisar o metabolismo primário, utilizamos 80 amostras, sendo 40 provenientes do tecido da folha +1 (5 réplicas biológicas para cada ponto) e 40 amostras do entrenó +3 (5 réplicas biológicas para cada ponto), as amostras são provenientes dos seguintes pontos: ZT6, ZT12, ZT18 e ZT24.

3.4.1.1. Metabólitos primários detectados na folha

No total, foram detectados 41 metabólitos no tecido da folha de cana-de-açúcar (CA) e cana-energia (CE). Para facilitar a interpretação, esses metabólitos foram agrupados em sete classes, incluindo aminoácidos, carboidratos, ácidos orgânicos, fenilpropanóides, vitaminas, aminas e poliaminas e uma última classe chamada de *outros* que apresenta apenas um representante das classes: mono-hidroxipiridina, poliol, glicerofosfolípídeo, fosfatos e quinato. Dos 41 metabólitos detectados, 34.1% (14) foram classificados como aminoácidos, 21.9% (9) como ácidos orgânicos, 14.6% (6) como carboidratos, 9.7% (4) classificados na classe mista (*outros*), 9.7% (4) como fenilpropanóides, 4.8% (2) como vitaminas e 4.8% (2) como aminas e poliaminas.

A [Fig. 10](#) mostra o resultado da PCA do conjunto de metabólitos encontrados no tecido da folha, PC1 (eixo x) e PC2 (eixo y) explicaram 23,3% e 19,1% da variação geral, respectivamente. Na folha, observamos que PC1 separou todas as variáveis de cana-energia no lado direito e duas variáveis de cana-de-açúcar (ZT18 e ZT24) do lado esquerdo, apesar que os pontos ZT06 e ZT12 de cana-de-açúcar não terem seguido este padrão (lado direito). No quadrante direito superior, podemos observar que PC2 agrupou duas amostras dos pontos matinais (CE_06 e CE_24) e uma amostra com um ponto noturno (CE_18) pertencentes a cana-energia; no quadrante direito inferior, observamos o agrupamento de uma amostra noturna de cana-energia (CE_12) e duas amostras de cana-de-açúcar, sendo uma diurna (CA_06) e outra noturna (CA_12). No quadrante esquerdo superior, PC2 agrupou uma amostra diurna de cana-de-açúcar (CA_24) e no quadrante esquerdo inferior, podemos observar uma amostra noturna de cana-de-açúcar (CA_18).

Os compostos ficaram distribuídos de acordo com sua correlação com cada variável e podemos observar algumas tendências em relação a algumas classes de compostos, ou

seja, grande parte dos aminoácidos (9), aminas e poliaminas (2) ficaram do lado esquerdo, já a maior parte dos ácidos orgânicos, açúcares e fenilpropanóides ficaram do lado direito. Açúcares como a sacarose e glicose ficaram no mesmo quadrante (direito inferior) dos pontos de cana-de-açúcar (ZT06 e ZT12), a frutose e xilose ficaram agrupadas no quadrante inferior esquerdo, a rafinose e o myo-inositol ficaram do lado direito superior. Compostos importantes na via dos fenilpropanóides como a fenilalanina, ácido cafeico e ácido clorogênico agruparam no quadrante direito superior.

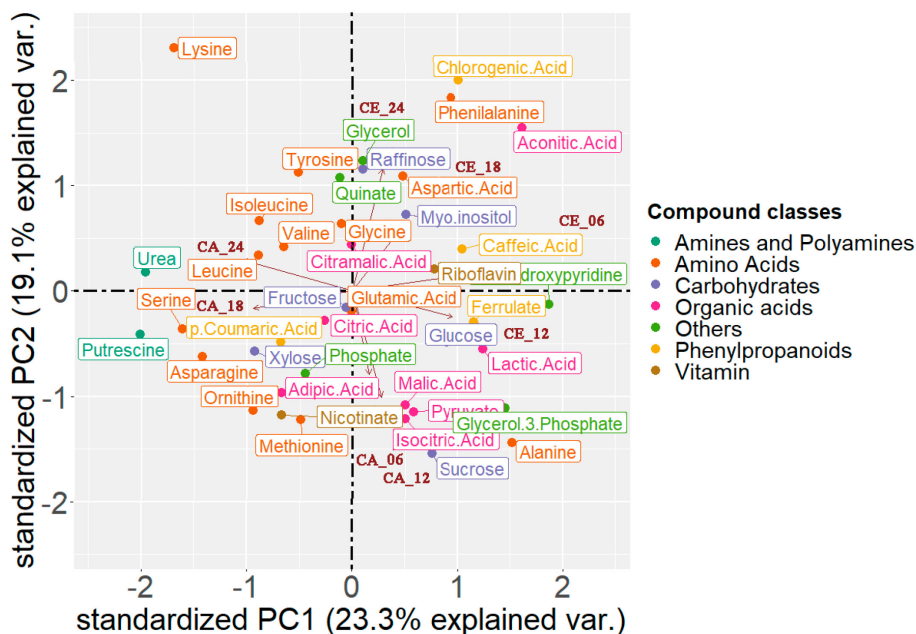


Figura 10. Análise de componentes principais (PCA) dos dados normalizados do tecido folha +1 (41 metabólitos). O gráfico bidimensional mostra a separação e correlação do conjunto de metabólitos (pontos coloridos) e as variáveis (setas) tempo (06, 12, 18 e ZT24) e cultivar (CA e CE). As cores representam a classe pela qual cada metabólito pertence. CA – cana-de-açúcar e CE – cana-energia.

Na Fig. 11, um mapa de calor (heatmap) mostra a abundancia relativa de cada metabólito detectado no tecido da folha+1 para cada cultivar por ponto de coleta. Podemos observar que o agrupamento hierárquico agrupou as amostras de cana-energia a direita, aqui podemos observar duas ramificações com as amostras CE_06 e CE_12 agrupados de um lado e do outro as amostras CE_18 e CE_24. Em relação a cana-de-açúcar, podemos observar que o agrupamento separou os ramos CA_18 e CA_24 do restante das amostras (lado esquerdo), enquanto que as amostras CA_06 e CA_12 ficaram mais próximas das amostras de cana-energia. No entanto, podemos observar uma ramificação entre as amostras de cana-de-açúcar e cana-energia. Os ramos CA_18 e

CA_24 ficaram separados porque alguns metabólitos apresentam perfis opostos na cana-de-açúcar, alguns são ativos durante a noite (CA_18), outros são ativos apenas durante o dia (CA_24) e outros são ativos de noite e de dia. Em cana-energia podemos observar um metabolismo bem mais ativo, ou seja, muitos metabólitos são abundantes em maior parte do ciclo diurno.

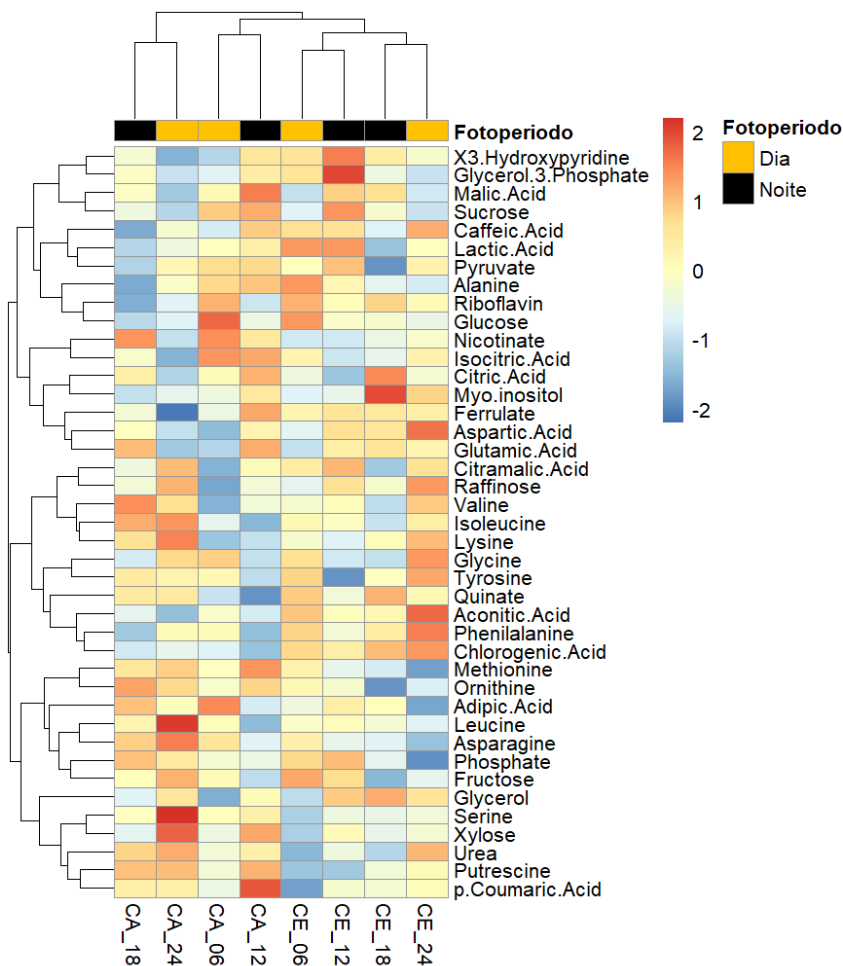


Figura 11. Heatmap com agrupamento hierárquico bidimensional dos dados GC-MS do tecido folha (40 metabólitos). O eixo horizontal representa os metabólitos e o eixo vertical representa o conjunto de metabólitos detectados (amostras individuais) em cana-de-açúcar (CA) e cana-energia (CE) para cada ponto (ZT06, ZT12, ZT18 e ZT24). Metabólitos com abundâncias significativamente aumentados estão em vermelho, enquanto metabólitos com abundâncias reduzidas estão em azul. Amostras coletadas durante o dia estão representadas em amarelo e a noite são exibidas em preto. As amostras foram normalizadas pela média e transformadas em log. Para construir o heatmap, utilizamos o algoritmo de ligação completa como método de agrupamento, a qual encontra clusters semelhantes, a distância entre cada ramo foi determinada através da distância euclidiana.

Uma análise ANOVA foi realizada no MetaboAnalyst e a normalização dos dados estão na seção do apêndice ([Figura 1 complementar](#)). Na [Fig. 12](#) podemos observar o perfil dos metabólitos que foram significativos na ANOVA ($p\text{-value} < 0,05$) ou entre os pontos de coleta (tempo) ou entre as cultivares. Podemos observar que alguns metabólitos possuem perfis distintos entre cana-de-açúcar e cana-energia. Alguns metabólitos se mostraram mais abundantes em cana-energia como o aconitato (ácido aconítico), ácido clorogênico e a fenilalanina, por outro lado, compostos como a putrescina, metionina, serina e ureia possuem perfis aumentados em cana-de-açúcar. Em relação à variação da abundância dos metabólitos entre as cultivares por ponto, alguns compostos se mostraram aumentados e outros diminuídos, como o aconitato (ZT24), asparagina (ZT24), ácido cítrico (ZT12), ferulate (ácido ferúlico) (ZT24), frutose, glicerol-3-fosfato (ZT12), metionina (ZT24), myo-inositol (ZT18), nicotinato (0ZT06), serina (ZT24) e a ureia (ZT18).

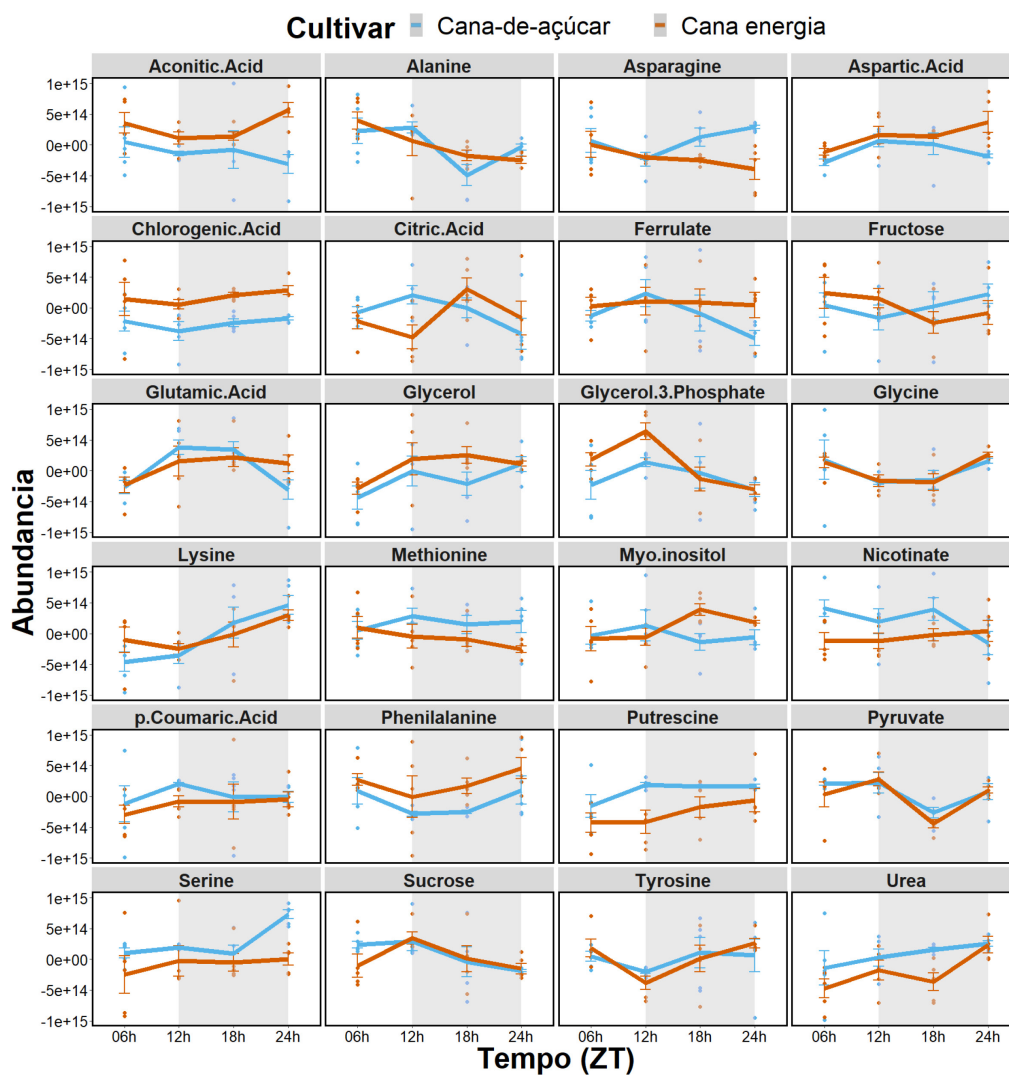


Figura 12. Compostos estatisticamente significativos pela ANOVA (p -value < 0.05) no tecido da folha +1 de cana-de-açúcar e cana-energia. O eixo x mostra os pontos de coleta (ZT06, ZT12, ZT18 e ZT24) e o eixo y representa a abundancia relativa dos metabólitos (log).

3.4.1.2. Metabólitos primários detectados no colmo

No entrenó +3 de cana-de-açúcar e cana-energia foram detectados 34 metabólitos, dos quais 28 também foram detectados no tecido da folha +1 e o remanescente (6) foi detectado apenas nesse tecido (ácido 4-aminobutírico, treonina, ácido piroglutâmico, succinato, prolina, trans-4-hidroxi-L-prolina). Aqui também classificamos os compostos por classes e dos 34 metabólitos detectados, 41.1% (14) foram classificados como aminoácidos, 20.5% (7) como ácidos orgânicos, 14.7% (5) classificados na classe mista (outros), 8.8% (3) como carboidratos, 5.8% (2) como fenilpropanóides, 5.8% (2) como aminas e poliaminas e 2.9% como vitaminas.

A [Fig. 13](#) mostra o resultado da PCA dos metabólitos do entrenó +3, PC1 e PC2 explicaram 33,4 e 22,1% da variação geral, respectivamente. Podemos observar que PC1 conseguiu separar as cultivares, uma vez que cana-de-açúcar ficou do lado esquerdo e cana-energia do lado direito. No quadrante direito superior, podemos observar que PC2 agrupou duas amostras de cana-energia, uma pertencente ao dia (CE_06) e a outra pertencente à noite (CE_12); no quadrante direito inferior, PC2 agrupou as outras duas amostras de cana-energia, sendo uma pertencente à noite (CE_18) e a outra pertencente ao dia (CE_24). No quadrante esquerdo superior, PC2 agrupou duas amostras de cana-de-açúcar: CA_06 (dia) e CA_12 (noite); e no quadrante esquerdo inferior, podemos observar as duas amostras remanescentes de cana-de-açúcar: CA_18 (noite) e CA_24 (dia).

Em relação aos metabólitos, maior parte dos ácidos orgânicos (ácido adípico, succinato, ácido piroglutâmico, ácido láctico, ácido málico e ácido aconítico) se concentrou do lado inferior, no mesmo local onde estão os pontos ZT18 e ZT24 de cana-de-açúcar e cana-energia, já a maior parte dos aminoácidos (alanina, fenilalanina, isoleucina, serina, metionina, valina, asparagina, treonina e prolina) ficaram no quadrante superior, local onde estão os pontos ZT06 (dia) e ZT12 (noite) de cana-de-açúcar e cana-energia e compostos relacionados a via dos fenilpropanóides (ácido cafeico e ácido

clorogênico) ficaram no lado inferior direito, onde estão os pontos CE_18 e CE_24 de cana-energia.

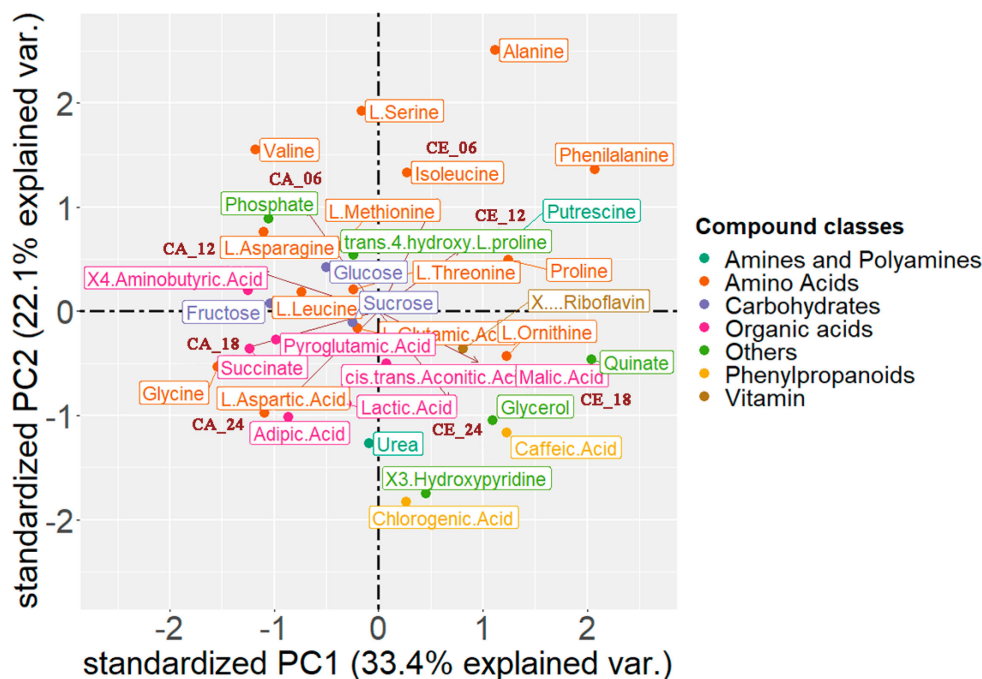


Figura 13. Análise de componentes principais (PCA) dos dados normalizados do tecido colmo (34 metabólitos). O gráfico bidimensional mostra a separação e correlação do conjunto de metabólitos (pontos coloridos) e as variáveis (setas) tempo (06, 12, 18 e ZT24) e cultivar (CA e CE). As cores representam a classe pela qual cada metabólito pertence. CA – cana-de-açúcar e CE – cana-energia.

Na Fig. 14 são representados os metabólitos clusterizados em um heatmap, observamos a separação das cultivares em duas ramificações principais (eixo vertical), cana-de-açúcar a esquerda e cana-energia a direita. Do lado esquerdo, onde está cana-de-açúcar, podemos observar que os ramos CA_18 e CA_24 se agruparam, enquanto que CA_06 e CA_24 ficaram do outro lado. Da mesma forma para cana-energia, no lado direito, podemos observar uma ramificação que separa os ramos CE_18 e CE_24 a direita e CE_06 e CE_24 a esquerda. Esse padrão é esperado, porque o perfil dos metabólitos produzidos em um determinado período tende a ser semelhante ao perfil de metabólitos produzidos em pontos próximos (ou seja, intersecção entre dia e noite ou vice-versa). No eixo horizontal (metabólitos) podemos observar a separação em dois grupos e na ramificação de cima podemos ver que muitos metabólitos foram abundantes em cana-de-açúcar em maior parte do ciclo diurno, já no grupo de baixo podemos observar que muitos

metabólitos foram mais abundantes em cana-energia. Esse padrão sugere que as cultivares podem ser distinguidas pelo seu metaboloma.

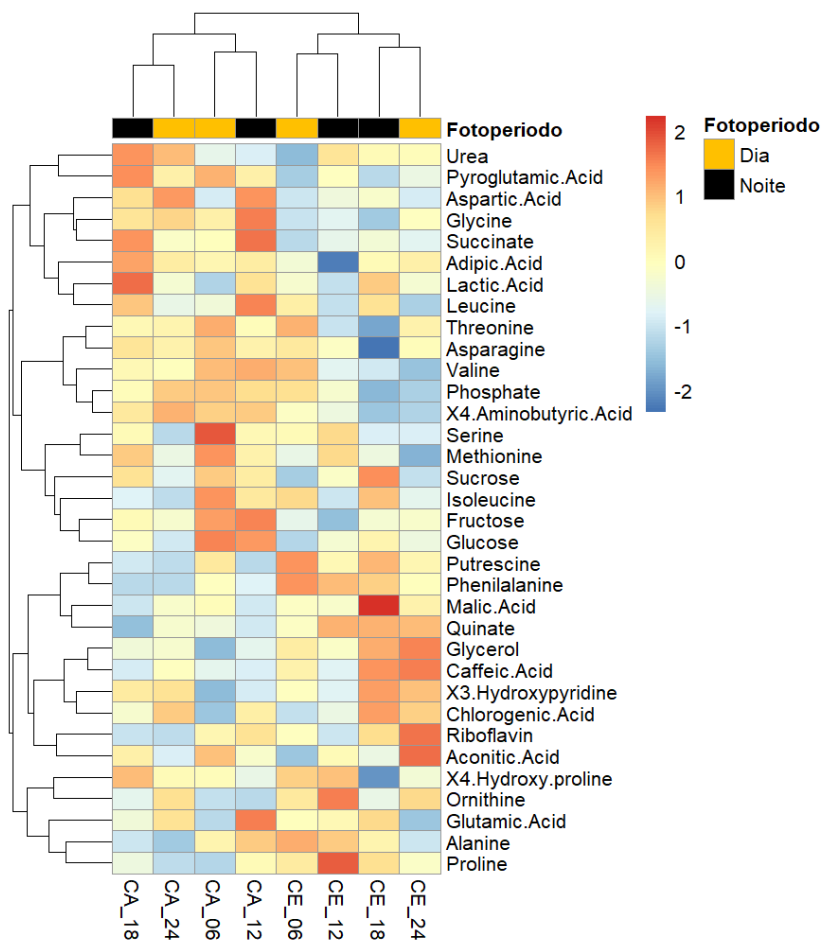


Figura 14. Heatmap com agrupamento hierárquico bidimensional dos dados GC-MS do tecido colmo (34 metabólitos). O eixo horizontal representa os metabólitos e o eixo vertical representa o conjunto de metabólitos detectados (amostras individuais) em cana-de-açúcar (CA) e cana-energia (CE) para cada ponto (06, 12, 18 e ZT24). Metabólitos com abundâncias significativamente aumentados estão em vermelho, enquanto metabólitos com abundâncias reduzidas estão em azul. Amostras coletadas durante o dia estão representadas em amarelo e a noite são exibidas em preto. As amostras foram normalizadas pela média e transformadas em log. Para construir o heatmap, utilizamos o algoritmo de ligação completa como método de agrupamento, a qual encontra clusters semelhantes, a distância entre cada ramo foi determinada através da distância euclidiana

O perfil dos metabólitos estatisticamente diferenciados pela ANOVA (p -value < 0,05), seja pelo ponto de coleta (tempo) ou entre as cultivares, estão exibidos na [Fig. 15](#). Aqui observamos que alguns compostos foram mais abundantes em cana-de-açúcar, incluindo o ácido 4-aminobutírico, glicina, succinato e valina, enquanto que outros foram mais abundantes em cana-energia, dentre eles a fenilalanina, prolina, putrecina e quinato.

Em relação aos pontos do ciclo diurno, alguns metabólitos tiveram perfis distintos entre cana-de-açúcar e cana-energia, incluindo o ácido adípico (ZT12), asparagina (ZT18), ácido cafeico (ZT18), frutose (ZT12), glicina (12 e ZT18), leucina (ZT12), ornitina (ZT12), fenilalanina (06, 12 e ZT18), quinato (12 e ZT18), succinato (ZT12), valina (ZT12), ácido 4-aminobutírico (18 e ZT24) e 4-hidroxi-prolina (ZT18).

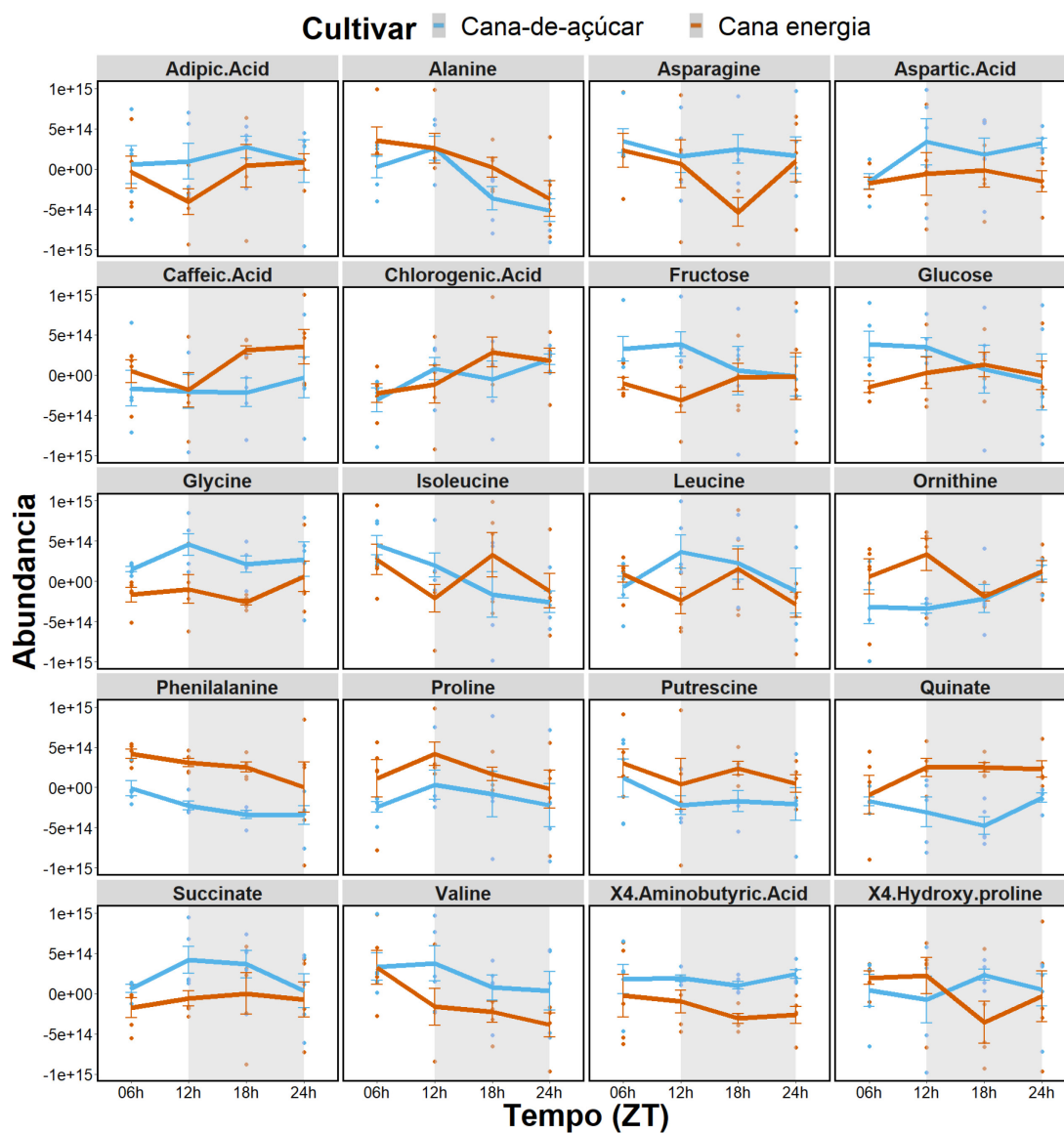


Figura 15. Compostos estatisticamente diferentes na ANOVA (< 0.05) no tecido colmo. Abundancia relativa dos metabólitos (eixo y) detectados no entrenó +3 em cana-de-açúcar e cana-energia em função da variação diurna (eixo x).

3.4.2. Metabolismo secundário

Para analisar o metabolismo secundário da folha e do colmo de cana-de-açúcar e cana-energia, primeiramente os metabólitos foram extraídos, em seguida, as amostras foram processadas pelos equipamentos de massas modelos Q-Exactive-Q-Orbitrap (folha) e Maxis Impact ESI-Q-TOF (colmo). Os resultados nas seções seguintes descrevem o perfil metabólico (metabólitos secundários) de cana-energia em comparação a cana-de-açúcar em função do ciclo diurno. Para tal, utilizamos 30 amostras da folha +1 (3 réplicas biológicas para cada ponto) e 24 amostras do entrenó +3 (3 réplicas biológicas para cada ponto). Os pontos analisados foram ZT0, ZT06, ZT12, ZT18 e ZT24 na folha e ZT06, ZT12, ZT18 e ZT24 no colmo. Primeiramente, será discutido os resultados de quantificação e análise estatística dos metabólitos (descrita como primeira abordagem na seção de métodos), em seguida, serão apresentados os resultados da segunda abordagem focada apenas na identificação dos compostos presentes em cada tecido e análise de impacto das vias biológicas onde se agrupam os metabólitos de cada tecido.

3.4.2.1. Quantificação e análise estatística dos metabólitos da folha e do colmo

Para quantificar os metabólitos foi realizado o processamento das 30 amostras da folha e 24 amostras de colmo utilizando o software MZMine2. Ao longo das etapas de processamento dos dados brutos no MZMine2, a média dos sinais (número de espectros) variou nos tecidos da folha (Fig. 16a) e de colmo (Fig. 16b).

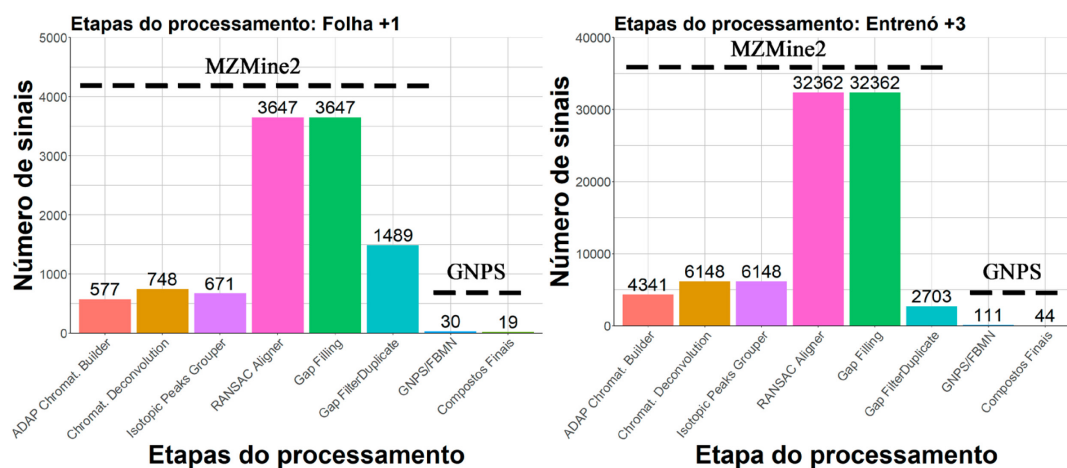


Figura 16. Número de sinais em cada etapa do processamento dos dados de LC-MS através do MZMine2 e GNPS para folha e entrenó. Variação do número de sinais (espectros analisados) e compostos identificados em cada etapa do processamento no MZMine2 e GNPS, respectivamente, para os tecidos folha+1 (a) e entrenó+3 (b). GNPS (Global Natural Products Social Molecular Networking); FBMN (Feature-Based Molecular Networking).

Após o processamento das amostras, realizamos a análise estatística dos metabólitos detectados em cada cultivar utilizando a lista com 1489 sinais quantificados no tecido da folha +1 e os 2709 sinais do entrenó +3. Para tal, as listas foram submetidas ao módulo *Statistical Analysis* do Metaboanalyst. Antes de realizar a análise estatística, os dados foram normalizados e o resultado da normalização para cada análise está na seção do apêndice ([Figura 2 complementar](#)).

Para avaliar a separação das amostras coletadas em cada ponto (ZT0, ZT06, ZT12, ZT18 e ZT24) realizamos uma análise exploratória através do método supervisionado PLS-DA (Análise Discriminante de Mínimos Quadrados Parciais). Na [Fig. 17](#), podemos observar o agrupamento das réplicas biológicas de cana-de-açúcar e cana-energia para cada ponto: resultado da PLS-DA na folha +1 de cana-de-açúcar ([Fig. 17a](#)) e de cana-energia ([Fig. 17b](#)), do entrenó +3 de cana-de-açúcar ([Fig. 17c](#)) e de cana-energia ([Fig. 17g](#)) e os gráficos VIP (Importância das Variáveis para a Projeção) extraído de cada análise. A análise VIP é derivada do resultado da PLS-DA e mostra os metabólitos que foram mais significativos ($VIP > 1$) para separação das amostras e podemos observar a variação desses compostos ao longo dos pontos de coleta: pontuação VIP dos metabólitos encontrados na folha +1 de cana-de-açúcar ([Fig. 17d](#)) e de cana-energia ([Fig. 17e](#)) e pontuação VIP dos metabólitos detectados no entrenó +3 de cana-de-açúcar ([Fig. 17f](#)) e de cana-energia ([Fig. 17h](#)). Podemos observar que a variação explicada pela PC1 (eixo x) na folha +1 de cana-de-açúcar foi de 7.4% ([Fig. 17a](#)) e 7.4% para cana-energia ([Fig. 17b](#)), já para o entrenó +3, o PC1 explicou 10.9% da variação dos metabólitos em cana-de-açúcar ([Fig. 17c](#)) e 11.4% em cana-energia ([Fig. 17g](#)). Já no PC2 (eixo y), a variação explicada na folha de cana-de-açúcar foi de 7.8% ([Fig. 17a](#)) e 13.4% em cana-energia ([Fig. 17b](#)) e para o entrenó+3, a PC2 explicou 9.8% em cana-de-açúcar ([Fig. 17c](#)) e 9.9% em cana-energia ([Fig. 17g](#)).

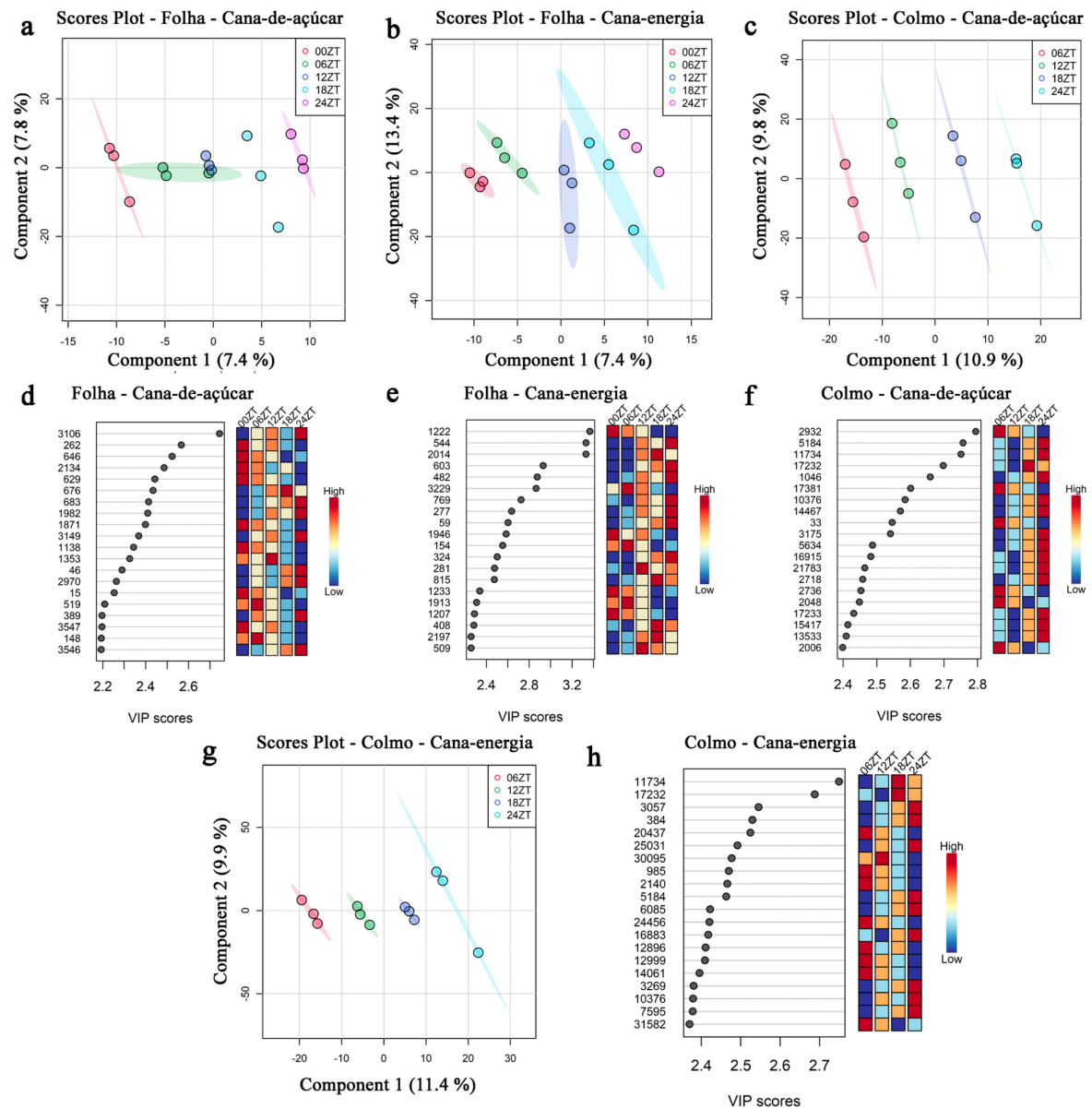


Figura 17. Gráficos de pontuação PLS-DA, mostrando a discriminação entre os pontos de coleta: ZT0 (vermelho), ZT6 (verde), ZT12 (azul escuro), ZT18 (azul claro) e ZT24 horas (rosa) para os tecidos da folha+1 de cana-de-açúcar (a) e de cana-energia (b) e para o entrenó +3 de cana-de-açúcar (c) e de cana-energia (d). A análise VIP correspondente de cada resultado da PLS-DA mostra os Escores VIP para folha+1 de cana-de-açúcar (e) e de cana-energia (f) e para o entrenó +3 de cana-de-açúcar (g) e de cana-energia (h). O box colorido a direita de cada gráfico VIP mostra a quantidade relativa dos metabólitos mais significativos para cada ponto de coleta de acordo com a escala do lado direito, que vai de baixo (azul) à alto (vermelho) e os sinais são categorizados em ordem decrescente de importância.

Em todos os casos, a análise PLS-DA (Fig. 17) agrupou bem as réplicas biológicas, o que significa que a abundância dos metabólitos em cada réplica é semelhante, assim como, separou as réplicas biológicas por ponto de coleta apesar da baixa explicação em PC1 e PC2. Estes resultados mostram que existe diferenças no perfil metabólico entre as cultivares analisadas e em função da variação diurna.

Para identificar os metabólitos com diferenças estatísticas entre as cultivares e entre os pontos da variação diurna (ZT0, ZT06, ZT12, ZT18 e ZT24), realizamos uma análise de variância (ANOVA) com valor de corte para o *p-value* ajustado de $< 0,05$. Aqui dois modelos de ANOVA foram usados e a Fig. 18 mostra os resultados da *one-way* ANOVA, que foi usada para distinguir os metabólitos diferenciais no ciclo diurno para o tecido da folha+1 de cana-de-açúcar (Fig. 18a) e de cana-energia (Fig. 18b) e para o tecido do entrenó+3 de cana-de-açúcar (Fig. 18d) e de cana-energia (Fig. 18e). Por fim, realizamos a análise *two-way* ANOVA para analisar os efeitos das variáveis tempo e cultivar, assim como a interação entre elas para o tecido da folha+1 (Fig. 18c) e do entrenó+3 (Fig. 18f).

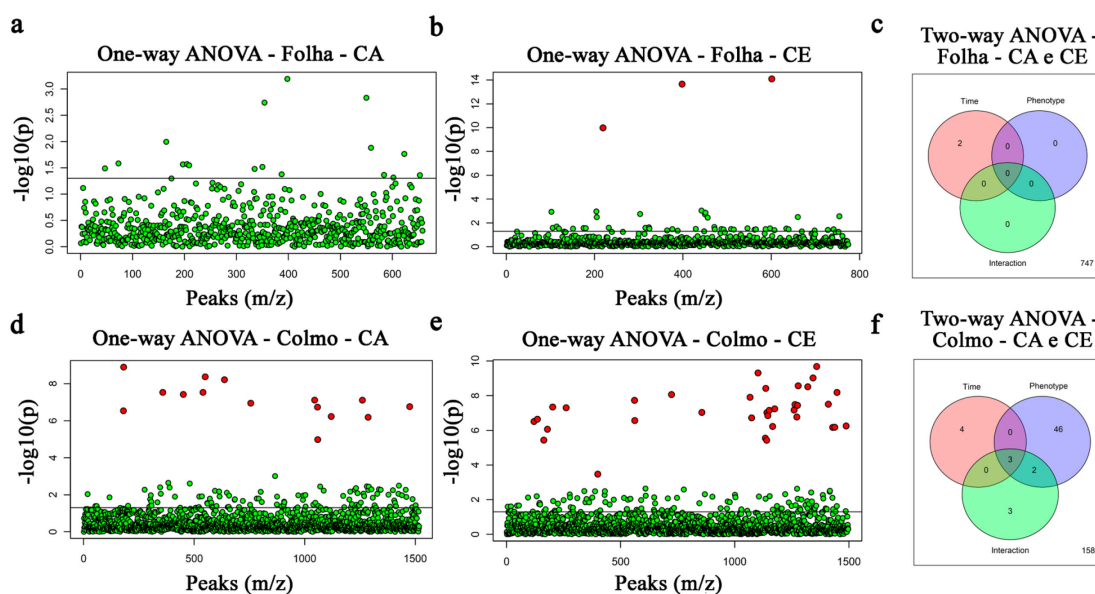


Figura 18. Análise *one-way* para folha +1 em cana-de-açúcar – CA (a) e em cana-energia – CE (b) e no tecido entrenó +3 em CA (d) e em CE (e). O eixo y representa o $-\log_{10}$ do *p-value* bruto entre os grupos comparados, enquanto o eixo x são os compostos após a normalização. A linha tracejada representa o limite significativo, que separa os compostos significativos e não significativos. Os pontos verdes representam os metabólitos não significativos na análise e os pontos vermelhos mostram os metabólitos que foram significativamente diferentes entre pelo menos duas amostras. Diagrama de Venn com os resultados da análise *two-way* ANOVA (fatores tempo e cultivar), para folha +1 (c) e entrenó +3 (f), em CA e CE.

Na folha +1 de cana-de-açúcar (Fig. 18a), a análise *one-way* ANOVA não revelou nenhum sinal afetado pelo fator tempo, porém, em cana-energia (Fig. 18b) três metabólitos foram diferencialmente significativos entre os pontos do ciclo diurno. No entrenó +3 de cana-de-açúcar (Fig. 18d) a *one-way* ANOVA revelou 15 sinais afetados pelo fator tempo e 35 sinais afetados pelo tempo em cana-energia (Fig. 18e).

A análise *two-way* ANOVA revelou dois metabólitos diferenciais pelo fator tempo na folha +1 de cana-de-açúcar e cana-energia (Fig. 18c). Para o entrenó +3 de cana-de-açúcar e cana-energia (Fig. 18f) quatro sinais foram diferenciais pelo fator tempo, 46 diferenciais entre as cultivares e três diferenciais pela interação (tempo:cultivar), além disso, dois sinais foram diferenciais na interseção dos fatores interação e fenótipo e três sinais diferenciais na interseção dos fatores tempo, cultivar e interação.

Para entender o comportamento dos metabólitos associados aos fatores tempo, cultivar e sua interação, realizamos uma análise ASCA (*ANOVA Simultaneous Component Analysis*). O resultado do modelo ASCA para o fator tempo explicou 27,14% da variação dos metabólitos encontrados na folha (Fig. 19a) e com base no componente 1 desse modelo, observamos que as pontuações aumentaram de ZT0 à ZT06 e diminuíram de ZT06 à ZT12, e voltaram a aumentar de ZT12 à ZT24. No entrenó +3 (Fig. 19d), o modelo ASCA para o fator tempo explicou 37,79% da variação, além disso, observamos um aumento na pontuação de ZT06 à ZT24. Em relação ao fator cultivar, as pontuações do modelo nos tecidos da folha e do entrenó (Fig. 19b e Fig. 19e) aumentaram de cana-de-açúcar para cana-energia. Em relação ao efeito de interação para os tecidos da folha (Fig. 19c) e do entrenó (Fig. 19f), o modelo ASCA explicou 28,71% da variação para o tecido da folha (Fig. 19c) e 43,18% no entrenó (Fig. 19f), observamos que as pontuações variaram entre as cultivares ao longo do tempo, o que caracteriza um comportamento oposto da abundância dos metabólitos entre as cultivares em cada ponto da variação diurna.

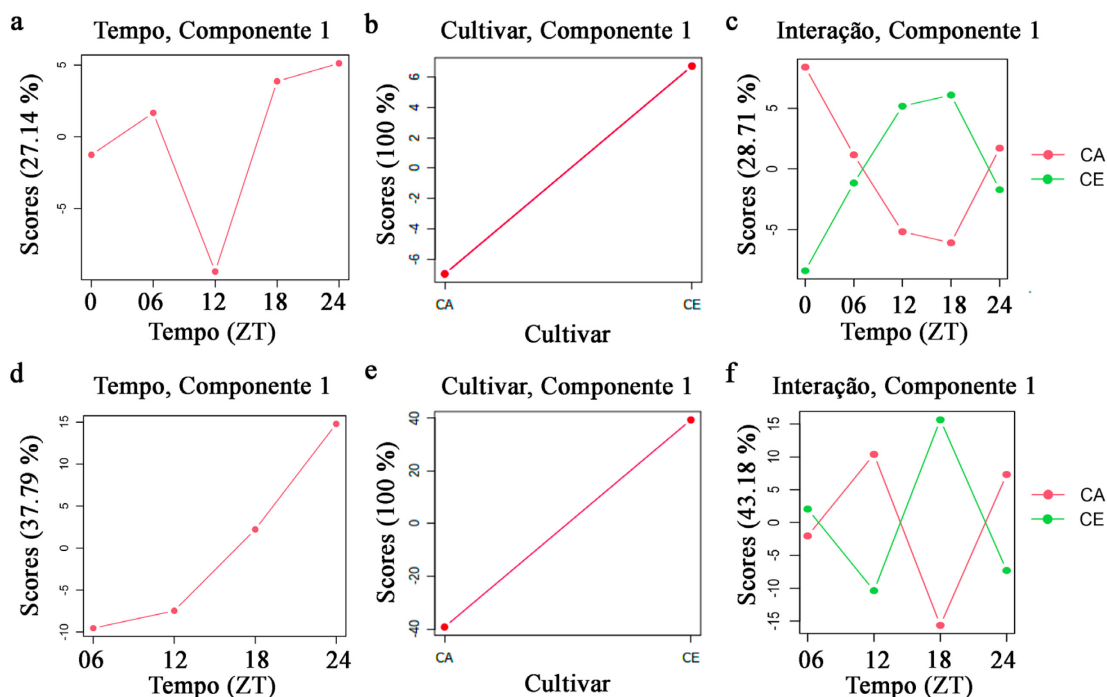


Figura 19. Resultados da análise ASCA. (a -c) Padrão principal para o tecido folha +1 associado ao tempo, cultivar e sua interação, respectivamente; (d - f) e para entrenó +3.

3.4.2.2. Identificação dos metabólitos da folha e colmo

A seguir serão apresentados os resultados da segunda abordagem do pipeline, em que foi realizado a identificação dos metabólitos. Como foi apresentado nas seções anteriores, a etapa de quantificação diminuiu muito o número final de espectros (Fig. 16), conseqüentemente, o número de metabólitos anotados pelo GNPS também diminuiu. Dessa forma, optamos por realizar uma análise focada apenas na identificação dos metabólitos, sem quantificação, em que usamos o GNPS para anotar os metabólitos dos tecidos aqui analisados.

Para realizar a anotação dos metabólitos detectados em cada tecido coletados em diferentes pontos temporais, inicialmente processamos os dados brutos (espectros) da folha e do colmo no MZMine2 e realizamos apenas a primeira etapa – *MS Peak Detection* – para eliminar sinais ruidosos. Em seguida, realizamos a anotação pelo GNPS. No total foram identificados 52 compostos na folha +1 (Fig. 20) e 72 compostos no entrenó +3 (Fig. 21). Uma lista detalhada dos metabólitos encontrados nos tecidos de folha (Tabela 2 suplementar) e do colmo (Tabela 3 suplementar) de cana-de-açúcar e cana-energia está na seção do apêndice.

Em relação ao número de metabólitos detectados na folha +1 (Fig. 22a) e no entrenó 3 (Fig. 22d), a maior parte dos metabólitos (33 na folha e 56 no entrenó) foram detectados tanto em cana-energia quanto em cana-de-açúcar. Alguns metabólitos foram detectados apenas em uma determinada cultivar (Fig. 22a, 22a), uns foram exclusivos por tecido (Fig. 22c, 22f) e outros encontrados somente em um determinado período do dia (Fig. 22b, 22e). Entre o tecido da folha e do colmo de cada cultivar, podemos ver que alguns metabólitos foram compartilhados e outros foram únicos em cana-de-açúcar (Fig. 22c) e cana-energia (Fig. 22f).

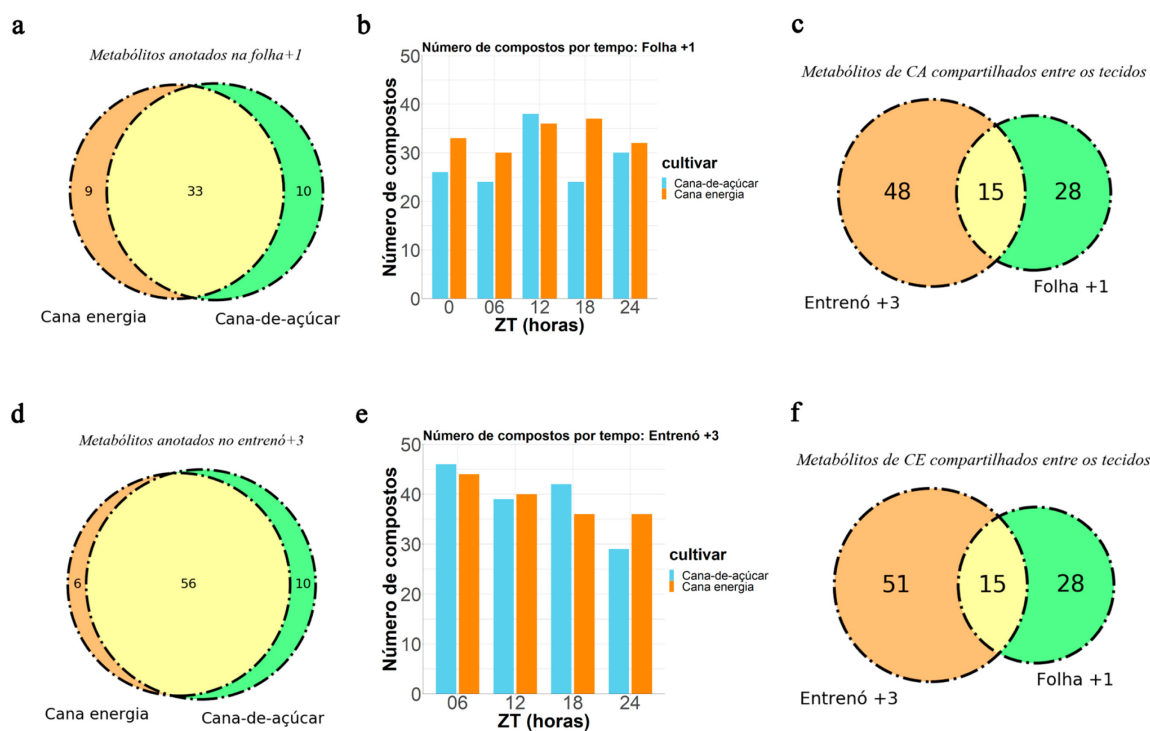


Figura 22. Número de metabólitos anotados em cada cultivar, tecido e por tempo. Metabólitos identificados compartilhados entre cana-energia e cana-de-açúcar na folha +1 (a) e no entrenó+3 (d). Quantidade de metabólitos identificados entre os tempos em cana-de-açúcar e cana-energia para nos tecidos folha (b) e colmo (e). Metabólitos compartilhados entre os tecidos folha e colmo, em cana-de-açúcar (c) e cana-energia (f).

Dos 52 metabólitos identificados no tecido da folha, 33 foram compartilhados entre cana-de-açúcar e cana-energia (Fig. 22a) e 14 foram detectados em todas as cultivares e períodos do dia (Fig. 20). Em relação aos metabólitos encontrados apenas em uma determinada cultivar, nove metabólitos foram detectados apenas em cana-energia (Fig. 22a), dentre eles o corymboside, sinapic acid, isovitexin, isovitexin 2"-O-rhamnoside, orientin; e 10 apenas em cana-de-açúcar (Fig. 22a), incluindo o sn-Glycero-3-phosphocholine, 3-Feruloylquinic acid, 3-O-Feruloylquinic acid, Tricin 5-glucoside, 4-O-Feruloyl-D-quinic acid, dianthoside.

Dos 72 metabólitos anotados no entrenó +3 (Fig. 21), 56 foram encontrados tanto em cana-de-açúcar quanto em cana-energia (Fig. 22d), dos quais 16 foram encontrados em todas as amostras (tempo de coleta e cultivar) (Fig. 21). Sobre os compostos únicos por cultivar, seis metabólitos foram detectados apenas em cana-energia (Fig. 22d), incluindo os metabólitos 1-Palmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine e a guanosine; e 10 metabólitos foram únicos em cana-de-açúcar (Fig. 22d), incluindo os compostos chicoric acid, melibiose e loliolide.

Compostos	CE 0ZT	CA 0ZT	CE 06ZT	CA 06ZT	CE 12ZT	CA 12ZT	CE 18ZT	CA 18ZT	CE 24ZT	CA 24ZT
(2-[[3-(hexadecanoyloxy)-2-[[icosa-5,8,11,14-tetraenoyloxy]propyl phosphonato]oxy]ethyl)trimethylazanium										
Erucamide										
1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine										
1-Hexadecanoyl-2-octadecadienoyl-sn-glycero-3-phosphocholine										
Oleamide										
cis-Caffeic acid										
Caffeic acid										
Chlorogenic acid										
Loliolide										
Malvidin 3-O-galactoside										
Schaftoside										
Glyceryl palmitate										
Rosmarinic acid										
Sucrose										
1-Palmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine										
Billirubin										
Trigonelline										
1-Hexadecanoyl-sn-glycerol										
(3R,5S)-4-[[E]-3-(3,4-Dihydroxyphenyl)prop-2-enoyloxy]-1,3,5-trihydroxycyclohexane-1-carboxylic acid										
Chioric acid										
(22E)-3alpha,12alpha-Dihydroxy-5beta-chole-22-en-24-oi Acid										
Monolinolenin (9c,12c,15c)										
(2R,3R,4S,5S,6R)-2-[3-Hydroxy-1-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-2-[[4-[[E]-3-hydroxyprop-1-enyl]-2-methoxyphenoxy]propoxy]-6-(hydroxymethyl)oxane-3,4,5-triol										
2-(Hydroxymethyl)-6-[5-[3-(hydroxymethyl)-5-(3-hydroxypropyl)-7-methoxy-2,3-dihydro-1-benzofuran-2-yl]-2-methoxyphenoxy]oxane-3,4,5-triol										
D-Turanose										
[(4S,4Ar,5S,8S,8aS)-4-acetyloxy-3,4a,5-trimethyl-9-oxo-4,5,6,7,8,8a-hexahydrobenzo[[f][1]benzofuran-8-yl] acetate										
Hexadecanamide										
5,7-Dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-6,8-bis(3,4,5-trihydroxyoxan-2-yl)chromen-4-one										
Syringin										
Corymboside										
Orientin										
Gelomulide N										
4-p-Coumaroylquinic acid										
sn-Glycero-3-phosphocholine										
(2S,3S,4S,5R,6R)-6-(3-Benzoyloxy-2-hydroxypropoxy)-3,4,5-trihydroxyoxane-2-carboxylic acid										
[(1S,2R,4Ar,8Ar)-1-acetyloxy-1,4a-dimethyl-6-oxo-7-propan-2-ylidene-2,3,4,5,8,8a-hexahydronaphthalen-2-yl] 2,3-dimethylloxirane-2-carboxylate										
Dibutyl phthalate										
Isoferulic acid										
Didodecyl 3,3'-thiodipropionate oxide										
Sinapic acid										
Isovitexin										
Isovitexin 2''-O-rhamnoside										
3-Feruloylquinic acid										
PC(18:3(9Z,12Z,15Z)/18:3(9Z,12Z,15Z))										
3-O-Feruloylquinic acid										
Tricin 5-glucoside										
4-O-Feruloyl-D-quinic acid										
Dianthoside										
3,4,5-Trimethoxy cinnamic acid										
3,4,5-Trimethoxybenzoic acid;(E)-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)prop-2-enoic acid										
7alpha-Hydroxy-3-oxo-Salpa-cholelan-24-oi Acid										
4H-1-Benzopyran-4-one, 2-(3,4-dihydroxyphenyl)-8-beta-D-glucopyranosyl-5,7-dihydroxy-										

Figura 20. Metabólitos identificados no tecido da folha +1 de cana-de-açúcar (CA) e cana-energia (CE) em função dos pontos temporais (0, 06, 12, 18 e ZT24). A cor azul indica presença do metabólito na amostra e a cor branca representa sua ausência.

Entre os tecidos de cana-de-açúcar e cana-energia, 15 metabólitos foram encontrados tanto na folha quanto no entrenó (Fig. 22c). Em cana-de-açúcar, 28 metabólitos foram detectados apenas na folha e não no colmo (Fig. 22c), da mesma forma, 48 compostos foram encontrados apenas no colmo e não na folha (Fig. 22c). Em cana-energia, 28 metabólitos foram detectados na folha e não no colmo (Fig. 22f) e 51 apenas no colmo e não na folha (Fig. 22f).

Em relação aos metabólitos detectados por período do dia (Fig. 23), alguns metabólitos únicos por período. Na folha de cana-de-açúcar (Fig. 23a), foi detectado um composto no ponto 0ZT06 (Dibutyl phthalate), seis no ponto ZT12 (3-Feruloylquinic acid, PC(18:3(9Z,12Z,15Z)/18:3(9Z,12Z,15Z)), 3-O-Feruloylquinic acid, triclin 5-glucoside, 4-O-feruloyl-D-quinic acid e dianthoside), em cana-energia, dois compostos foi detectado no ponto ZT18 (3,4,5-Trimethoxy cinnamic acid e 3,4,5-Trimethoxybenzoic acid;(E)-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)prop-2-enoic acid) e um

composto no ponto ZT24 (4H-1-Benzopyran-4-one, 2-(3,4-dihydroxyphenyl)-8-beta-D-glucopyranosyl-5,7-dihydroxy).

Compostos	CE 06ZT	CA 06ZT	CE 12ZT	CA 12ZT	CE 18ZT	CA 18ZT	CE 24ZT	CA 24ZT
Dihydro-alpha-ionone								
cis-Caffeic acid								
D-Fructose								
Dibutyl phthalate								
Genipin								
Palatinose								
Tryptophan								
Tyrosine								
Melezitose								
Myristoleic acid								
N-Butylbenzenesulfonamide								
2-(Hydroxymethyl)-6-[4-[[2S,3S]-3-(hydroxymethyl)-5-[(E)-3-hydroxyprop-1-enyl]-7-methoxy-2,3-dihydro-1-benzofuran-2-yl]-2-methoxyphenoxy]oxane-3,4,5-triol								
[1,14-Dihydroxy-8-(hydroxymethyl)-4,12,12,15-tetramethyl-5-oxo-13-tetracyclo[8.5.0.0.2,6.0.11,13]pentadeca-3,8-dienyl] acetate								
Dianthoside								
Orientin								
Sucrose								
Palmitoleic acid								
Chlorogenic acid								
4H-1-Benzopyran-4-one, 2-(3,4-dihydroxyphenyl)-6-beta-D-glucopyranosyl-5,7-dihydroxy-								
Phenylalanine								
Isovitexin 2''-O-arabinoside								
Isovitexin								
Phytosphingosine								
4-(3,4-Dihydroxyphenyl)-7-methoxy-5-[[2S,3R,4S,5S,6R]-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxychromen-2-one								
beta-Maltose								
(2R,3S,4S,5R,6S)-2-[[[2S,3R,4R]-3,4-Dihydroxy-4-(hydroxymethyl)oxolan-2-yl]oxymethyl]-6-(3,4,5-trimethoxyphenoxy)oxane-3,4,5-triol								
Alenin								
Erucamide								
1,2-Dilinoleoyl-SN-glycero-3-phosphocholine								
1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine								
(1S,3R,4S,5R)-4-[[[2E]-3-(3,4-dihydroxyphenyl)prop-2-enyl]oxy]-1,3,5-trihydroxycyclohexane-1-carboxylic acid								
(E)-11-Methyl-dodec-2-enoic acid								
C16 Sphingosine								
Arginine								
Corymboside								
Glutamic acid								
9-Hexadecenoic acid								
alpha-Gentiobiose								
1-Palmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine								
(3R,5S)-4-[[[E]-3-(3,4-Dihydroxyphenyl)prop-2-enyl]oxy]-1,3,5-trihydroxycyclohexane-1-carboxylic acid								
N,N-Bis(2-hydroxyethyl)dodecanamide								
Methionine								
Dodecyl-dimethylamine oxide								
4-[5-[[4-[5-[Acetyl(hydroxyamino)pentylamino]-4-oxobutanoyl]-hydroxyamino]pentylamino]-4-oxobutanoic acid								
DL-Arginine								
Gelomulide N								
Swertisin								
Vitexin 2''-O-rhamnoside								
2-(Hydroxymethyl)-6-[5-[3-(hydroxymethyl)-5-[3-hydroxypropyl]-7-methoxy-2,3-dihydro-1-benzofuran-2-yl]-2-methoxyphenoxy]oxane-3,4,5-triol								
Schaftoside								
Saponarin								
Glutamine								
D-(+)-Cellobiose								
Isovitexin 2''-O-rhamnoside								
Sinapoyl malate								
9-OxoODE								
D-Mannopyranose, 2-O-alpha-D-mannopyranosyl-								
Loliolide								
Trehalose								
Glutathione								
Bis(2-ethylhexyl) adipate								
Hyochoic acid								
Pantothenic acid								
Chicoric acid								
D-Melibiose								
[(1S,2R,4Ar,8aR)-1-acetyloxy-1,4a-dimethyl-6-oxo-7-propan-2-ylidene-2,3,4,5,8,8a-hexahydronaphthalen-2-yl] 2,3-dimethylloxirane-2-carboxylate								
Cynaroside								
1-Hexadecanoyl-sn-glycerol								
3-Genistein-8-C-glucoside								
(2S)-2-Amino-3-(4-hydroxyphenyl)propanoic acid;(1S,3R,4R,5R)-3-[[[E]-3-(3,4-dihydroxyphenyl)prop-2-enyl]oxy]-1,4,5-trihydroxycyclohexane-1-carboxylic acid								
5,7-Dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)chroman-4-one								
Guanosine								

Figura 21. Metabólitos identificados no entrenó +3 de cana-de-açúcar (CA) e cana-energia (CE) em função dos pontos temporais (06, 12, 18 e ZT24). A cor azul indica presença do metabólito na amostra e a cor branca representa sua ausência.

No entrenó de cana-de-açúcar (Fig. 23b), dois metabólitos apareceram apenas no ponto 0ZT06 (D-Mannopyranose 2-O-alpha-D-mannopyranosyl; e Loliolide), três no ponto ZT12 (Chicoric acid; D-Melibiose; e [(1S,2R,4Ar,8aR)-1-acetyloxy-1,4a-dimethyl-6-oxo-7-propan-2-ylidene-2,3,4,5,8,8a-hexahydronaphthalen-2-yl] 2,3-

dimethyloxirane-2-carboxylate) e dois no ponto ZT18 ((2S)-2-Amino-3-(4-hydroxyphenyl)propanoic acid (1S,3R,4R,5R)-3-[(E)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)prop-2-enoyl]oxy-1,4,5-trihydroxycyclohexane-1-carboxylic acid; e 5,7-Dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)chroman-4-one). Já no entrenó +3 de cana-energia (Fig. 23b), observamos que três metabólitos apareceram apenas no ponto ZT06 (methionine; dodecyldimethylamine oxide; e 4-[5-[[4-[5-[Acetyl(hydroxy)amino]pentylamino]-4-oxobutanoyl]-hydroxyamino]pentylamino]-4-oxobutanoic acid), um no ponto ZT12 (Bis(2-ethylhexyl) adipate) e um no ponto ZT24 (guanosine).

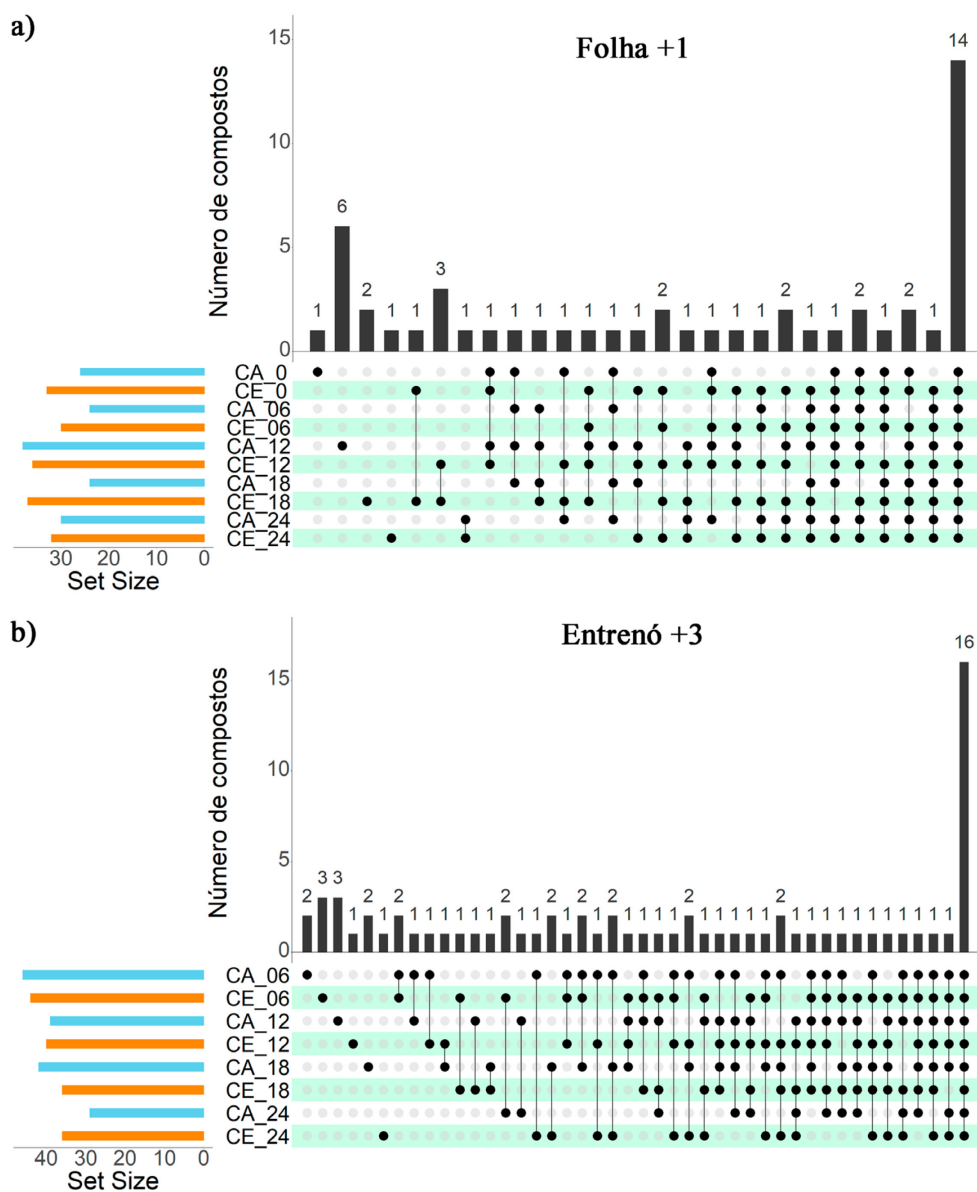


Figura 23. UpSet com matriz de pontos, representando metabólitos identificados na folha+1 (a) e no entrenó+3 (b) em cana-energia (CE) e cana-de-açúcar (CA), em função da variação diurna. As linhas horizontais com os pontos

representam a presença de metabólitos específicos em determinado tempo. As conexões verticais entre os pontos representam os metabólitos específicos entre as amostras.

Antes de entrar na discussão do papel biológico destes metabólitos é importante ressaltar que muitos dos compostos identificados nos tecidos são pouco conhecidos e muitos ainda precisam ser caracterizados biologicamente. Alguns metabólitos estão relacionados a vias conhecidas e outros nem se quer possui entrada nos bancos de dados.

3.4.2.3. Análise de impacto de vias dos metabólitos da folha e colmo

Para analisar o papel biológico dos metabólitos em função do ciclo diurno, submetemos a lista dos metabólitos identificados no módulo *Pathway Analysis* do MetaboAnalyst. Abaixo segue o resultado das vias biológicas impactadas no tecido da folha +1 (Fig. 24) e do entrenó +3 (Fig. 25) em cada cultivar por período do dia.

Os compostos identificados na folha de cana-de-açúcar e cana-energia fizeram *hit* com entradas de nove vias biológicas, incluindo a via do metabolismo dos glicerofosfolipídios; do ácido linoléico; do estilbenoide, diarilheptanoide e de gingerol; do ácido araquidônico; do amido e sacarose; do ácido alfa-linolênico; da galactose; da biossíntese de fenilpropanóide; e da biossíntese de flavonóides.

Os metabólitos detectados no entrenó +3 das cultivares analisadas fizeram *hit* com entradas de 37 vias, dentre elas as vias de biossíntese de aminoacil-tRNA; de fenilalanina, tirosina e triptofano; de arginina; de alcalóides indólicos; de glucosinolato; de alcalóides de tropano, piperidina e piridina; de estilbenóide, diarilheptanóide e gingerol; de fenilpropanóides; de alcalóides isoquinolina; de Ubiquinona e terpenóide-quinona; de flavonóides; de ácidos graxos; de pantotenato e CoA; e do metabolismo do ácido linoléico; da arginina e da prolina; dos glicerofosfolipídios; da fenilalanina; do ácido araquidônico; do nitrogênio; de tirosina; de butanoato; de esfingolipídios; de amido e sacarose; de alanina, aspartato e glutamato; da glutatona; da galactose; do ácido alfa-linolênico; do triptofano; de cianoaminoácido; de glioxilato e dicarboxilato; da glicina, serina e treonina; da cisteína e metionina; de porfirina e clorofila; de amino açúcar e açúcar nucleotídeo; da beta-alanina; da pirimidina; e da purina.

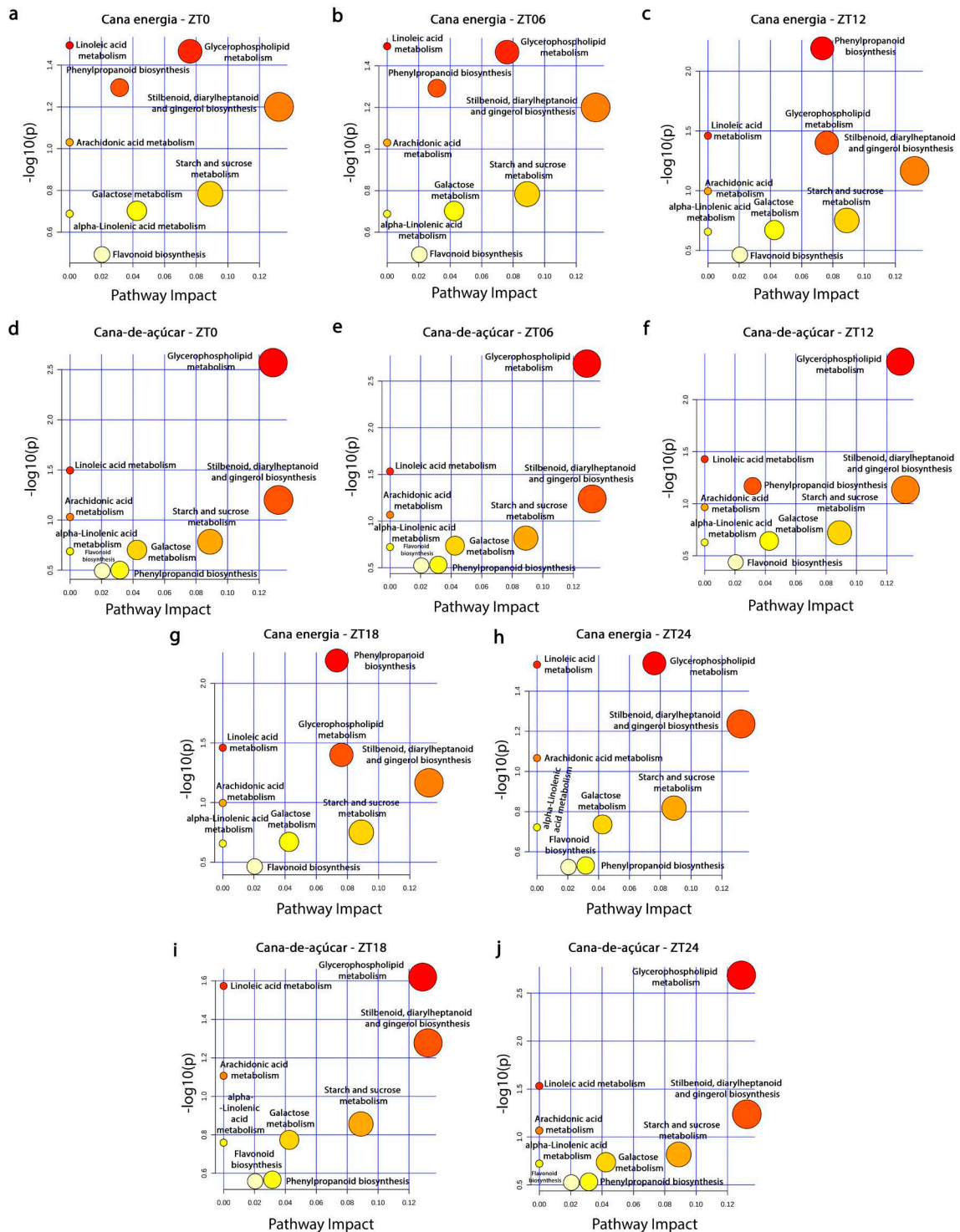


Figura 24. Análise de via baseada nos metabólitos encontrados em cana-energia e cana-de-açúcar para o tecido folha. Análise em cana-energia nos tempos ZT0 (a), ZT06 (b), ZT12 (c), ZT18 (g) e ZT24 (h) e para cana-de-açúcar nos tempos ZT0 (d), ZT06 (e), ZT12 (f), ZT18 (g) e ZT24 (h). O eixo X representa os valores de impacto na via e o eixo Y é o $-\log p$ -value da análise de enriquecimento da via. A cor e o diâmetro dos nós são baseados no p -value e nos valores de impacto na via, respectivamente.

Na folha +1 (Fig. 24), a via do metabolismo dos glicerofosfolipídeos foi uma das vias mais impactadas em cana-de-açúcar, durante o dia: ZT0 (Fig. 24d), ZT06 (Fig. 24e) e ZT24 (Fig. 24j) e durante a noite: ZT12 (Fig. 24f) e ZT18 (Fig. 24i); em cana-energia, essa via foi impactada principalmente durante o dia: ZT0 (Fig. 24a), ZT06 (Fig. 24b) e ZT24 (Fig. 24h). A via do metabolismo do ácido linoléico foi bastante impactada em cana-energia durante o dia: ZT0 (Fig. 24a), ZT06 (Fig. 24b) e ZT24 (Fig. 24h), em cana-de-açúcar essa via foi impactada apenas durante a noite: ZT18 (Fig. 24i). A via de biossíntese de estilbenóides, diarilheptanóide e gingerol foi impactada em cana-energia durante o dia: ZT0 (Fig. 24a), ZT06 (Fig. 24b) e ZT24 (Fig. 24h), em cana-de-açúcar, essa via foi impactada durante a noite: ZT18 (Fig. 24i). O que chama a atenção é a via de biossíntese de fenilpropanóides que foi bastante impactada em cana-energia durante a noite: ZT12 (Fig. 24c) e ZT18 (Fig. 24g).

No entrenó +3 (Fig. 25), podemos observar que a via de biossíntese de aminoacil-tRNA é a via mais impactada em cana-de-açúcar no período do dia: ZT06 (Fig. 25c) e ZT24 (Fig. 25h) e durante a noite: ZT12 (Fig. 25d) e ZT18 (Fig. 25g); em cana-energia, essa via é impactada durante o dia: ZT06 (Fig. 25a) e ZT24 (Fig. 25f) e a noite: ZT12 (Fig. 25b). A via de biossíntese de fenilalanina, tirosina e triptofano é impactada em cana-de-açúcar durante o dia: ZT06 (Fig. 25c) e ZT24 (Fig. 25h) e durante a noite: ZT18 (Fig. 25g). No entanto, em cana-energia essa via é impactada durante a noite inteira: ZT12 (Fig. 25b) e ZT18 (Fig. 25e). Podemos observar também que as vias do metabolismo do amido e sacarose, a via de biossíntese dos alcalóides indol e a via de biossíntese do alcalóide isoquinolina são bastantes impactadas em cana-energia durante a noite: ZT18 (Fig. 25e).

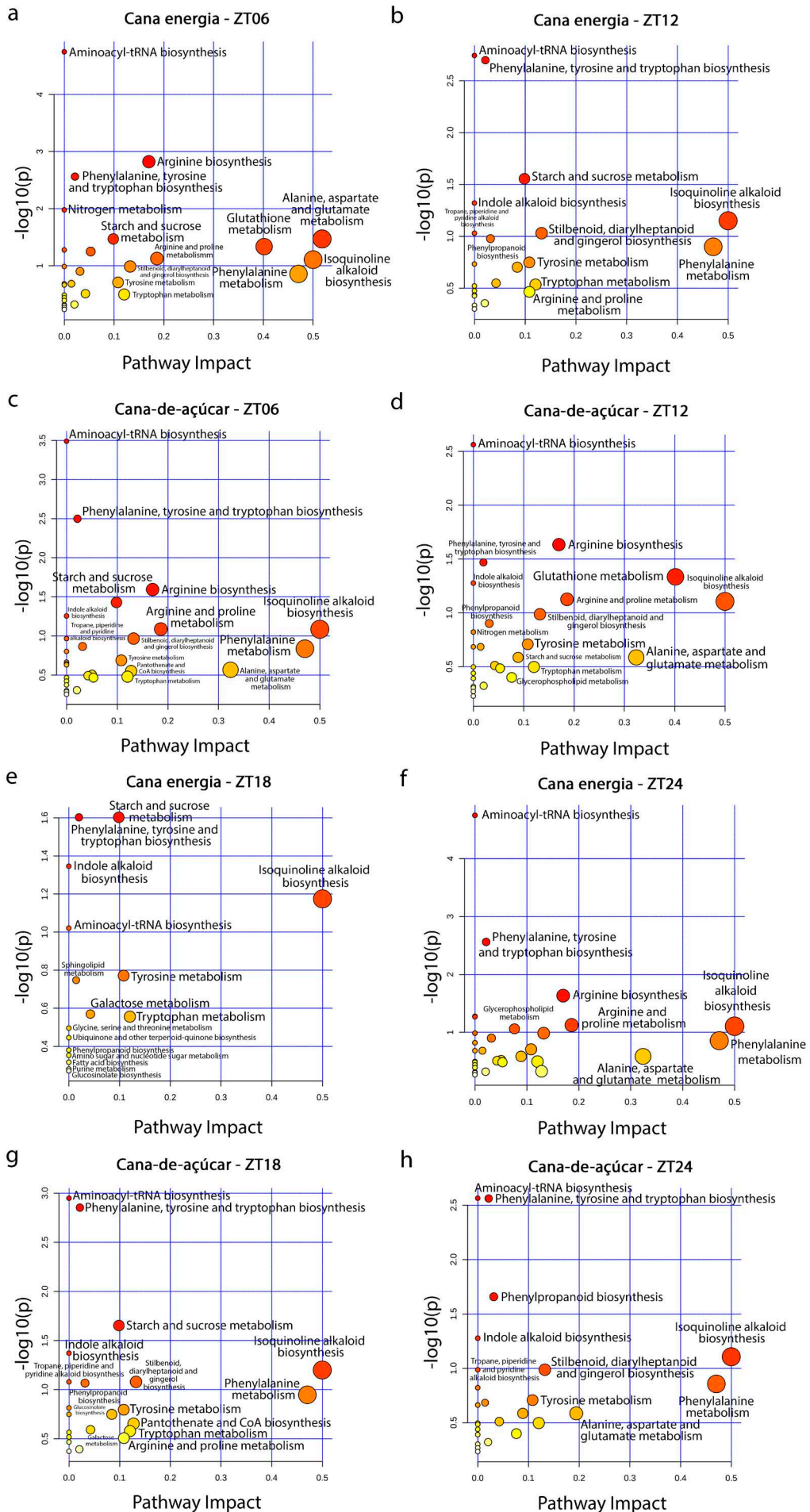


Figura 25. Análise de via baseada nos metabólitos encontrados em cana-energia e cana-de-açúcar para o tecido colmo. Análise em cana-energia nos tempos ZT0 (a), ZT06 (b), ZT12 (c) e ZT18 (f), e para cana-de-açúcar nos tempos ZT0 (e), ZT6 (d), ZT12 (g) e ZT18 (h). O eixo X representa os valores de impacto na via e o eixo Y é o $-\log p\text{-value}$ da análise de enriquecimento da via. A cor e o diâmetro dos nós são baseados no $p\text{-value}$ e nos valores de impacto na via, respectivamente.

3.5. DISCUSSÃO

3.5.1. *Metabolismo primário*

O metabolismo pode ser subdividido em primário e secundário, para entender as diferenças que ocorrem no metabolismo ao longo do ciclo diurno utilizamos as ferramentas de metabolômica. As ferramentas mais populares para o estudo da metabolômica são LC-MS e GC-MS (Rubaye et al., 2017). Neste estudo, usamos essas duas ferramentas para entender as diferenças que ocorrem no metabolismo da cana-de-açúcar e cana-energia ao longo do ciclo diurno, utilizando os tecidos da folha +1 e colmo (entrenó +3). Neste primeiro momento discutiremos os resultados do metabolismo primário, em seguida abordaremos sobre o metabolismo secundário.

3.5.1.1. **Metabólitos ligados ao processo respiração celular são mais significativos em cana-energia em comparação a cana-de-açúcar**

Na folha+1 podemos ver claramente que alguns metabólitos foram mais abundantes em cana-energia em relação a cana-de-açúcar, incluindo o ácido aconítico, ácido clorogênico e a fenilalanina. O ácido aconítico (aconitato) é um dos ácidos orgânicos mais predominantes na cana-de-açúcar e um importante intermediário metabólico do ciclo do TCA (ciclo do ácido tricarboxílico), sendo formado pela conversão de citrato (ácido cítrico) em isocitrato pela enzima aconitase. O aconitato possui duas formas geométricas – isômeros trans e cis – o isômero trans é estável e armazenado predominante nos tecidos e o isômero cis é produzido como resultado do ciclo de Krebs (Walford, 1998). O trans-aconitato é produzido a partir do cis-aconitado pela enzima aconitato isomerase (Igamberdiev e Eprintsev, 2016). Em altas concentrações, o trans-aconitado se torna um

forte inibidor da aconitase. Em nossos resultados, as concentrações de aconitato são aumentadas em cana-de-açúcar e cana-energia durante o dia (ZT06) e sofrem um aumento em cana-energia durante a noite (ZT18), isso sugere que esse composto é metabolizado no ciclo do TCA durante o dia nas duas cultivares e a noite sofre um aumento em cana-energia provavelmente porque o processo de respiração celular é bastante ativo em cana-energia, uma vez que essa variedade possui mais biomassa em comparação a cana-de-açúcar. Além disso, no final da noite esse composto é aumentado (cis-aconitado) por consequência da respiração e passa a inibir (trans-aconitado) essa via para que os processos de fotossíntese e de produção de carboidratos sejam priorizados. O citrato é aumentado em cana-energia no ponto ZT18 e diminui em ZT24, o que pode significar uma conversão de citrato em isocitrato pela aconitase, assim como, a geração de ácido aconítico com configuração *trans*. Para apoiar essa hipótese, o composto ferulato (outro intermediário do ciclo do TCA) é significativamente aumentado em cana-energia em relação a cana-de-açúcar (ZT18) e o piruvato é menos abundante em cana-energia durante a noite (ZT18). O piruvato é um composto oriundo do processo de glicólise e pode ser convertido em ácido láctico ou Acetil-CoA para ser direcionado ao ciclo de Krebs. Esse composto sofre uma diminuição nas duas cultivares no ponto ZT18 e um aumento no ponto ZT24, o que pode significar catabolismo para formar subprodutos: acetil-CoA ou ácido láctico.

3.5.1.2. Metabólitos relacionados a produção de biomassa são mais abundantes em cana-energia em comparação a cana-de-açúcar

Os fenilpropanóides são uma das principais classes no metabolismo das plantas (Maeda, 2019). A classe dos fenilpropanóides pode ser dividida em cinco subclasses – flavonóides, monolignóis, ácidos fenólicos, estilbenos e cumarinas – e são sintetizados a partir de precursores do metabolismo primário, incluindo a fenilalanina e a tirosina (Deng e Lu, 2017). Em nossos resultados detectamos alguns metabólitos dessa via, incluindo a fenilalanina, ácido cafeico, ácido clorogênico e o ácido p-cumárico. A fenilalanina foi um dos metabólitos mais abundantes em cana-energia tanto na folha (Fig. 12) quanto no colmo (Fig. 15), principalmente durante a noite. A fenilalanina é um aminoácido sintetizado principalmente nos plastídeos das plantas (Dal Cin et al., 2011; Maeda et al., 2012) e é precursor primário dos fenilpropanóides. A abundância desse aminoácido nos

tecidos da folha e do colmo, principalmente nos tecidos de cana-energia, sugere que este aminoácido é importante para o metabolismo da planta e podemos deduzir que a via dos fenilpropanóides é mais ativa em cana-energia em relação a cana-de-açúcar.

A lignina é o principal componente das paredes celulares das plantas e é produto da via dos fenilpropanóides, portanto, um composto produzido indiretamente através dos precursores dessa via: fenilalanina e tirosina. Sua síntese envolve três etapas: síntese de monômeros de lignina, transporte para o apoplasto e polimerização. Após sua produção no citoplasma, a lignina é transportada para o apoplasto para ser polimerizada por três tipos principais de monolignóis (álcool sinapílico, unidade S; álcool coniferílico, unidade G e álcool p-cumarílico, unidade H) (Liu et al. 2018). Em nossos resultados, algumas compostos da via biosintética da lignina foram detectados, incluindo a fenilalanina, o ácido caféico e o ácido p-cumárico na folha (Fig. 11) e no colmo (Fig. 14) de cana-de-açúcar e cana-energia, já a tirosina foi detectada apenas no colmo (Fig. 14). Como já discutido anteriormente, a fenilalanina foi um dos metabólitos mais abundantes em cana-energia tanto na folha (Fig. 12) quanto no colmo (Fig. 15) e podemos observar um aumento deste aminoácido na folha nos pontos diurnos (ZT12 a ZT24) (Fig. 12) e no colmo este aminoácido sofre uma redução (ZT12 a ZT24) (Fig. 15), o que pode significar que esse aminoácido está sendo catabolizado. A tirosina foi detectada apenas na folha (Fig. 11) e podemos ver uma diminuição durante o dia (ZT06 a ZT12) e um aumento gradativo em cana-energia durante a noite (ZT12 a ZT24) (Fig. 12), o que indica que esse composto está sendo degradado durante o dia e produzido durante a noite. Nas plantas, a tirosina pode ser precursor de outros compostos, tais como tococromanóis, alcalóides de benzilisoquinolina, glicosídeos cianogênicos (por exemplo, dhurrina) e ácidos rosmarínicos (Schenck e Maeda, 2018). Em relação ao ácido caféico, houve um aumento em sua abundância principalmente durante a noite no colmo de cana-energia (Fig. 15), o que pode significar que o ácido caféico pode ser usado a noite ou de dia para o crescimento, uma vez que esse composto é diferencial no metabolismo da biomassa de cana-energia. O ácido p-cumárico foi detectado apenas na folha (Fig. 11) e sua abundância também aumentou em cana-energia durante a noite.

O ácido clorogênico foi outro composto que sofreu alteração em sua abundância entre os pontos da variação diurna e entre as cultivares, uma vez que foi um dos compostos mais abundante nas folhas de cana-energia (Fig. 12) e diferencial pelo tempo no colmo (Fig. 15), também podemos observar um aumento em sua abundância no

período da noite no colmo de ambas as cultivares (Fig. 15). É importante ressaltar, que o ácido clorogênico é produto da via dos fenilpropanóides e Segundo Silva e colaboradores (2019) este composto pode ser redirecionado para a síntese de lignina.

3.5.1.3. Os aminoácidos são cruciais para suprir as demandas do metabolismo das cultivares e distinguir cana-de-açúcar e cana-energia

O metabolismo dos aminoácidos é muito importante para as plantas, pois atuam como precursores e intermediários para suprir a demanda de várias vias e processos biológicos, como por exemplo, atuam na regulação do metabolismo em resposta a estresse (Galili et al., 2011). Em nossos resultados, a concentração do ácido aspártico (aspartato) aumentou no ponto ZT24 da folha de cana-energia (Fig. 12), aumento que não ocorreu em cana-de-açúcar. No colmo (Fig. 15), podemos ver o oposto, ou seja, um aumento de aspartato em cana-de-açúcar. O ácido aspártico é um aminoácido precursor da lisina, treonina, metionina e isoleucina e também pode ser convertido em asparagina (Azevedo et al., 2006).

A asparagina é um aminoácido rico em nitrogênio (N) e por isso é um metabólito importante no metabolismo do nitrogênio em plantas, é sintetizada pelas vias de desaminação e transaminação, processos que liberam nitrogênio para síntese de aminoácidos e proteínas (Sieciechowicz et al., 1988). Descobertas recentes em cana-de-açúcar indicaram que o suprimento de nitrogênio influencia o aparato fotossintético ao longo da folha da cana-de-açúcar, aumentando o conteúdo de clorofila, a quantidade e a atividade das enzimas de carboxilação, proteína total, conteúdo de açúcar, N total e metabólitos relacionados à fotossíntese (Bassi et al., 2018). Em nossos resultados, observamos um aumento de asparagina na folha (Fig. 12) de cana-de-açúcar durante a noite e uma diminuição durante o dia, o que sugere que esse composto particiona nitrogênio para processos biológicos importantes, incluindo a fotossíntese. É interessante ressaltar, que a asparagina também está ligada a processos de senescência foliar (Yabuki et al., 2017; Diaz et al., 2008; Herrera-Rodríguez et al., 2006). Na folha de cana-energia, a asparagina sofre uma diminuição durante o dia (ZT12) (Fig. 12). Asparagina também pode ser convertida em aspartato (ácido aspártico). Aqui observamos que a abundância de asparagina na folha diminui em cana-energia durante a noite (ZT12 a ZT24) e no mesmo período, o aspartato sofre um aumento, o que sugere sua produção a partir de

asparagina (Fig. 12). O aspartato pode ser convertido em oxaloacetato nas mitocôndrias (composto intermediário no ciclo de Krebs), o que sugere que asparagina pode está sendo convertida em aspartato, em seguida, o aspartato é convertido em oxaloacetato para suprir as demandas do ciclo TCA (Herrera-Rodríguez et al., 2006). A reação inversa também pode acontecer e o aspartato pode ser produzido a partir do oxaloacetato nas células do mesófilo, reação catalisada pela enzima PEP carboxilase. Para suprir o ciclo de Calvin, o aspartato produzido por essa via, se converte em oxalacetato nas células da bainha. Altas concentrações de aspartato pode inibir a PEP carboxilase (Bräutigam et al., 2011).

3.5.1.4. Compostos lipídicos

Em nossos resultados detectamos alguns lipídios, incluindo o glicerol e o glicerol-3-P (G3P) no tecido da folha (Fig. 11). O glicerol é um poliálcool produzido durante a quebra de glicose, proteínas, piruvato, triacilgliceróis e outros glicerolipídios. No metabolismo dos glicerolipídios, o glicerol pode ser convertido em G3P (Chanda et al., 2008). O G3P está presente no citoplasma e nos plastídios (cloroplastos) das plantas (Miguel, 2003) e participa da biossíntese de glicerolipídios ou pode ser oxidado em DHAP (dihydroxyacetone phosphate), composto intermediário na via da glicólise (Shen et al., 2003; Xue et al., 2017). Outros lipídios como os triacilgliceróis são derivados de G3P. Em nossos resultados, encontramos um aumento de G3P durante o dia (ZT06 à ZT12) e uma diminuição significativa em cana-energia durante a noite (ZT12 à ZT24) (Fig. 12), o que sugere que o G3P está sendo consumido e redirecionado para suprir vias como glicerolipídios e/ou glicólise.

3.5.2. Metabolismo secundário

O metabolismo secundário é formado por compostos químicos altamente diversos entre as plantas, sendo a maior parte deles com funções desconhecidas. Neste trabalho analisamos os metabolitos secundários através da abordagem metabolômica non-target LC-MS. Para tal, utilizamos os tecidos da folha +1 e do entrenó +3 de cana-de-açúcar e cana-energia coletados em diferentes pontos da variação diurna.

3.5.2.1. Processamento das amostras LC-MS: desafios de anotação

Observamos que ao longo do processamento das amostras no MZMine2, o número de sinais sofre picos de aumento e diminuição, além disso, o número final de espectros processados não corresponde ao número de metabólitos identificados pelo GNPS (Fig. 16). O número de espectros aumenta após as etapas de construção dos cromatogramas e deconvolução dos sinais, em seguida, na etapa de alinhamento (etapa em que alinhamos os compostos entre as amostras de acordo com o tempo de retenção e a sua m/z) observamos um platô do número de sinais (*features*), em seguida, os sinais sofrem uma redução devido aos filtros que realizamos, as quais servem para eliminar sinais duplicados e as redundâncias do alinhamento entre as amostras. Podemos explicar essas diferenças pelo fato que o MZMine2 detecta sinais de MS1 e MS2 em cada biblioteca (amostras), entretanto, muitos desses sinais de MS1 não contem espectros de fragmentação (MS2) ou foi gerado com uma baixa qualidade. Para eliminar essa redundância, no final do processamento realizamos um filtro para deixar apenas os sinais de MS1 que contem espectros de fragmentação (MS2), o que elimina grande quantidade dos sinais de MS1 detectados, deixando apenas uma pequena parte que contem espectros de MS2.

De forma similar, a etapa de anotação dos metabólitos pode ser afetada por vários fatores, principalmente pelo número de espectros com padrão de fragmentação disponíveis. Segundo [Kind e Fiehn \(2006\)](#) é impossível identificar metabólitos apenas com espectros MS1 (massa precisa), o que gera na prática alta redundância e alto número de falsos positivos. Nossos resultados mostraram uma desproporção entre a quantidade de sinais detectados e o número de metabólitos identificados. De todos os sinais de nosso conjunto de dados, cerca de 0.8 e 1.6% dos sinais foram identificados nos tecidos da folha e do colmo, respectivamente. Podemos explicar essas diferenças (1.489 sinais gerados e 19 identificados para folha e 2709 sinais gerados e 44 identificados para colmo), primeiramente devido a sensibilidade do espectrômetro de massas que foi usado para processar cada tecido, na folha +1 foi usado um modelo Maxis impact™ ESI-Q-TOF (*Bruker Daltonics*), a qual é menos sensível do que o equipamento que foi usado para colmo, modelo Q Exactive™ Hybrid Quadrupole-Orbitrap™ Mass Spectrometer (*Thermo Scientific*). Por essa razão, decidimos seguir com dois pipelines, um que analisa apenas a parte estatísticas desses metabólitos por tecido e o outro focado na anotação dos mesmos.

É importante ressaltar que a anotação de metabólitos através da abordagem metabolômica não-direcionada baseada em LC-MS, continua sendo um desafio de modo geral e a identificação depende de vários fatores, incluindo complexidade da amostra, metabólitos disponíveis e conhecidos nos bancos de dados, protocolo experimental e diversidade de combinações de métodos cromatográficos com espectrômetros de massa (Allard et al., 2017; Chaleckis et al., 2018; Shen et al., 2019). A estratégia usada amplamente para anotação dos compostos consiste em comparar os espectros experimentais com os espectros teóricos de bancos de dados, entretanto, esse método é limitado pelos metabólitos conhecidos e disponíveis nesses bancos de dados (Shen et al., 2019). Recentemente, novas estratégias estão sendo usadas para resolver tais problemas, incluindo redes neurais (Dührkop et al., 2020).

3.5.2.2. Análise estatística: revela que um perfil metabólico diferencial entre os tecidos da folha e do colmo de cana-de-açúcar e cana-energia ao longo do ciclo diurno

Através da análise estatística realizada através da plataforma MetaboAnalyst, observamos que o resultado da PLS-DA (Fig. 17) separou bem as amostras de cada cultivar por ponto de coleta, isso sugere que o conjunto de metabólitos encontrados em cada tecido é diferente e muda ao longo do tempo. A análise VIP identificou muitos metabólitos que foram importantes para a separação das amostras ao longo do tempo, no entanto, como já discutido anteriormente, a maior parte dos metabólitos contidos em tais amostras se tratam de espectros não identificados pelo GNPS. Um dos próximos passos desse projeto será analisar esses metabólitos interessantes e não identificados através análises direcionadas (*targeted metabolomics*).

O resultado da análise ASCA ilustra as mudanças ocorridas no metaboloma em função da variação diurna (Fig. 19), o PC1 dessa análise conseguiu explicar 28.17 e 39.22% da variação ocorrida nos tecidos da folha e do colmo, respectivamente. Observamos, que o perfil dos metabólitos secundários encontrados na folha e no colmo das cultivares analisadas tiveram padrões opostos (mudança de fase), o que sugere que o conjunto desses metabólitos participam de processos biológicos diferentes entre as cultivares e ao longo do dia, o que já era de se esperar e está de acordo com os resultados dos açúcares solúveis e do amido, que mostram padrões de mudança de fase ao longo do

ciclo diurno. Já era de esperar um perfil metabólico característico a cada período do dia, pois o metabolismo nas plantas é influenciado pelas interações diurnas e sazonais com o relógio circadiano, uma vez que muitos genes envolvidos em vias de biossíntese de metabólitos secundários possuem padrões de expressão diurna (Gibon et al., 2006; Doherty et al., 2010). O mais interessante de nossos resultados é que nenhum outro trabalho relatou tais diferenças no metabolismo secundário de cana-de-açúcar e cana-energia em função do ciclo diurno e existe diferenças significativas para distinguir uma cultivar da outra usando apenas o metaboloma de um tecido.

Podemos concluir a partir da análise estatística, que muitos dos metabólitos presentes em nosso conjunto de dados, tanto para folha quanto para colmo, foram diferenciais durante o ciclo diurno e entre as cultivares, porém, não conseguimos identifica-los através dos métodos convencionais de anotação. Em estudos futuros, iremos trabalhar melhor com esses sinais não identificados, realizando análises *non-targeted* ou explorando outros *pipelines* de identificação e bancos de dados alternativos.

3.5.2.3. A análise de vias biológicas: sugere que as principais diferenças no metabolismo de cana-de-açúcar e cana-energia ocorrem durante a noite

Para saber quais vias biológicas foram mais impactadas durante o dia e a noite em cada cultivar, realizamos uma análise de vias no MetaboAnalyst e essa análise revelou que muitas vias são mais impactadas do que outras tanto por tecido quanto por cultivar ou por período diurno. Na folha +1 (Fig. 24) descobrimos que as vias do metabolismo do ácido linoléico (phosphatidylcholine), metabolismo dos glicerofosfolipídeos (1-Acyl-sn-glycero-3-phosphocholine e Phosphatidylcholine), biossíntese de fenilpropanóides (ácido clorogênico) e biossíntese de estilbenóides, diarilheptanóide e gingerol (ácido clorogênico) foram bem impactadas ao longo do ciclo diurno.

O ácido linoleico é um ácido graxo liberado dos gactolipídeos das membranas dos cloroplastos, é precursor do ácido jasmônico (JA) e das oxilipinas, está envolvido na resposta a condições de estresse biótico e abiótico, incluindo salinidade, UV, alta intensidade de luz e estresses mediados por ROS (Mata-Pérez et al., 2015). Em tomate, este composto foi encontrado em altas concentrações em folhas de plantas feridas (Conconi et al., 1996). Em nossos resultados, encontramos o composto phosphatidylcholine (lecithin) que dar origem ao ácido linoleico na via do metabolismo

do ácido linoléico. Essa via foi bastante ativa durante o dia na cana-energia e pode está associada na redução dos efeitos de estresses abióticos, tal como alta intensidade de luz.

A biossíntese de estilbenóides, diarilheptanóide e gingerol foi outra via bastante impactada entre as cultivares. Em nossos resultados detectamos um composto que faz parte dessa via, o ácido clorogênio. Os estilbenóides são compostos fenólicos e/ou glicosídeos, os diarilheptanóides são compostos com anéis fenil e o gingerol é um composto fenólico também conhecido como principal componente ativo do gengibre (Kanehisa e Goto, 2000). O ácido clorogênico faz parte de várias vias, dessa forma, é esperado que algumas vias tal como a biossíntese de estilbenóides, diarilheptanóide e gingerol seja impactada.

Os glicerolfosfolípídeos são compostos que fazem parte do metabolismo dos lipídios nas plantas, são abundantes nas membranas de plantas, animais e fungos e desenvolvem vários papéis no crescimento e desenvolvimento das plantas, uma vez que são essenciais para constituição das membranas plasmáticas e possuem papéis em vias de sinalização, incluindo mediação da transdução de sinal hormonal em plantas (Cowan, 2006; Janda, 2013). Em nossos resultados, encontramos o composto 2-Acyl-sn-glycero-3-phosphocholine que faz parte dessa via. É interessante destacar, que essa via foi impactada nas duas cultivares, porém, ela foi mais impactada em cana-de-açúcar durante a noite.

Os fenilpropanóides foi uma das vias mais impactadas em cana-energia. Essa via gera compostos fenólicos, tais como fenilpropanos, antocianinas, estilbenóides, flavonóides e monolignóis, este último é precursor para a síntese de lignina. A via dos fenilpropanóides é bastante estudada em cana-de-açúcar (Bottcher et al., 2013). Jardim-Messeder e colaboradores (2020) identificaram e analisaram a expressão de 70 genes envolvidos no metabolismo dos fenilpropanóides e monolignóis de cana-de-açúcar, dentre eles os genes que codificam as enzimas PAL, C4H, 4CL, HCT, C3H, CCoAOMT e COMT, que são enzimas chaves no metabolismo dos fenilpropanóides. Em seu estudo seguinte, Jardim-Messeder e colaboradores (2021) identificaram 15 genes candidatos envolvidos na biossíntese de lignina: PTAL1, PAL2, C4H4, 4CL1, HCT1, HCT2, C3'H1, C3'H2, CCoAOMT1, COMT1, F5H1, CCR1, CCR2, CAD2 e CAD7. Em nossos resultados descobrimos que a via dos fenilpropanóides foi bastante ativa em cana-energia, principalmente durante o período da noite, o que sugere que a planta destina recursos para

a produção de biomassa principalmente a noite. É bastante consistente estes resultados, já que cana-energia é um genótipo caracterizado pelo acúmulo de biomassa.

3.6. CONCLUSÃO

O metabolismo das plantas é dividido em metabolismo primário e secundário. Para explorar e analisar as diferenças no perfil metabólico em diferentes condições experimentais são utilizadas abordagens baseadas em metabolômica. Existem duas abordagens em metabolômica, uma abordagem que procura por metabólitos específicos e conhecidos (*targeted*) e outra que busca detectar tanto metabólitos conhecidos quanto desconhecidos em uma dada amostra (*non-targeted*). Nesse estudo utilizamos as duas abordagens para entender as diferenças no metabolismo da cana-de-açúcar e cana-energia em função do ciclo diurno. Para tal, foram processadas amostras da folha e do colmo de cana-de-açúcar e cana-energia coletadas em diferentes pontos do ciclo diurno (ZT0, ZT06, ZT12, ZT18 e ZT24). Essas amostras foram processadas por GC-MS para analisar o metabolismo primário e LC-MS para analisar o metabolismo secundário.

No metabolismo primário, nossos resultados demonstraram que o perfil metabólico é característico de cada cultivar, uma vez que existem metabólitos que tem o mesmo perfil entre as cultivares e outros que possuem perfis distintos (mudança de fase). As mudanças de fase observadas podem ser vistas entre as cultivares ou em um determinado ponto do ciclo diurno e isso significa que muitos genes e metabólitos apresentam comportamento diurno. Descobrimos que alguns metabólitos relacionados ao processo de respiração e a fotossíntese (ciclo de Calvin) são diferenciais entre as cultivares. Em cana-energia, por exemplo, compostos como o ácido aconítico e ferulato apresentaram perfis distintos em relação a cana-de-açúcar.

Os aminoácidos desenvolvem vários papéis no metabolismo das plantas. Descobrimos que os aminoácidos contribuem bastante para diferenciar molecularmente as cultivares e nos diferentes pontos do ciclo diurno. No tecido da folha que analisamos, aminoácidos como a fenilalanina foi mais abundante em cana-energia e aminoácidos como metionina e putrecina foram mais abundantes em cana-de-açúcar. Alguns aminoácidos, como a glicina, tiveram um comportamento diurno nas duas cultivares. No colmo, aminoácidos como a fenilalanina, prolina e putrescina foram mais abundantes em

cana-energia e os aminoácidos glicina e valina foram mais abundantes em cana-de-açúcar. A prolina por sua vez, teve um comportamento diurno nas duas cultivares. Diferenças entre os tecidos também foram vistas, como no caso da putrescina, que na folha foi mais abundante em cana-de-açúcar e no colmo foi mais abundante em cana-energia.

As análises do metabolismo secundário revelaram que as maiores diferenças metabólicas ocorridas em cana-de-açúcar e cana-energia ocorre durante o período da noite. Nesse período, vias relacionadas a produção dos aminoácidos fenilalanina e tirosina e a via dos fenilpropanóides foram bastante impactadas em cana-energia. É importante ressaltar, que essas vias são ligadas a produção de biomassa e isso sugere que o acúmulo de biomassa em cana-energia é influenciada por tais vias.

Quando analisamos o impacto das vias em cada tecido, descobrimos que na folha a via dos fenilpropanóides é mais impactada em cana-energia à noite em relação a cana-de-açúcar. No entrenó +3, observamos que a biossíntese de fenilalanina, tirosina e triptofano foi mais ativa em cana-energia, o que ressalta a importância dos aminoácidos para o acúmulo de biomassa e seu papel na via dos fenilpropanóides. Além disso, observamos que metabólitos relacionados ao metabolismo da sacarose e do amino foram mais abundantes em cana-energia, o que faz sentido, já que cana-energia possui mais amido em relação a cana-de-açúcar.

Em resumo, esses foram os principais resultados do capítulo de metabolômica e nos próximos passos (projeto de Doutorado) iremos analisar a expressão de enzimas chaves nas vias analisadas em metabolômica, além disso, iremos analisar a relação entre transcritos e metabólitos através da integração de metabolômica e transcriptômica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFENDI, F.M.; OKADA, T.; YAMAZAKI, M.; HIRAI-MORITA, A.; NAKAMURA, Y.; NAKAMURA, K., et al. 2012. **KNAPSAcK family databases: integrated metabolite-plant species databases for multifaceted plant research**. *Plant Cell Physiol*. 53:e1.
- AGUIAR, N.O.; OLIVARES, F.L.; NOVOTNY, E.H.; CANELLAS, L.P. 2018. **Changes in metabolic profiling of sugarcane leaves induced by endophytic diazotrophic bacteria and humic acids**. *PeerJ* 2018 1–28.
- ALI, A.; KHAN, M.; SHARIF, R.; MUJTABA, M.; GAO, S. J. 2019. **Sugarcane Omics: An Update on the Current Status of Research and Crop Improvement**. *Plants (Basel, Switzerland)*, 8(9), 344. <https://doi.org/10.3390/plants8090344>
- ALLARD, P. M.; GENTA-JOUVE, G.; WOLFENDER, J. L. 2017. **Deep metabolome annotation in natural products research: towards a virtuous cycle in metabolite identification**. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 36, 40–49.
- AL-RUBAYE, A.F.; HAMEED, I.H., KADHIM, M. J. 2017. **A review: Uses of gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) technique for analysis of bioactive natural compounds of some plants**. *International Journal of Toxicological and Pharmacological Research*, 9(01), 81–85.
- ALVES, L.C.; LLERENA, J.P.P.; MAZZAFERA, P.; VICENTINI, R. 2019. **Diel oscillations in cell wall components and soluble sugars as a response to short-day in sugarcane (*Saccharum* sp.)**. *BMC Plant Biol.* 19(1):215.
- AMALRAJ, V. A.; BALASUNDARAM, N. 2006. **On the taxonomy of the members of ‘*Saccharum* complex’**. *Genet. Resour. Crop Evol.* 53, 35–41.
- ANYANGWA, E. M.; KAPSEU, C. E.; MUSONGE, P. 1993. **The effect and removal of starch the sugar refining industry**. *International Sugar Journal*, v. 95, p. 210-213.
- AYRE, B.G. 2011. **Membrane-transport systems for sucrose in relation to whole plant carbon partitioning**. *Mol. Plant* 4(3):377-394.
- AZEVEDO, R.A.; LANCIEN, M.; LEA, P.J. 2006. **The aspartic acid metabolic pathway, an exciting and essential pathway in plants**. *Amino Acids*. 2006 Mar;30(2):143-62. doi: 10.1007/s00726-005-0245-2.
- BADENHUIZEN, N.P. 1963. **Formation and distribution of amylose and amylopectin in the starch granule**. *Nature* 197, 464–467.
- BAGHALIAN, K.; HAJIREZAEI, M.R.; SCHREIBER, F. 2014. **Plant metabolic modeling: achieving new insight into metabolism and metabolic engineering**. *Plant Cell*. 26(10):3847-66.
- BASSI, D.; MENOSSI, M.; MATTIELLO, L. 2018. **Nitrogen supply influences photosynthesis establishment along the sugarcane leaf**. *Sci Rep* 8, 2327 (2018).
- BECKERS, V.; DERSCH, L.M.; LOTZ, K. et al. 2016. **In silico metabolic network analysis of *Arabidopsis* leaves**. *BMC Syst Biol* 10, 102.

- BOTHA, F. C.; BLACK, K. G. 2000. **Sucrose phosphate synthase and sucrose synthase activity during maturation of internodal tissue in sugarcane.** *Aust. J. Plant Physiol.* 27, 81–85.
- BATTA, S.K.; SINGH, R. 1986. **Sucrose metabolism in sugar cane grown under varying climatic conditions: synthesis and storage of sucrose in relation to the activities of sucrose synthetase, sucrose phosphate synthase and invertase.** *Phytochemistry* 25: 2431–2437.
- BINDON, K.A.; BOTHA, F.C. 2002. **Carbon allocation to the insoluble fraction, respiration and triose-phosphate cycling in the sugarcane culm.** *Physiol. Plant.*
- BOTTCHER, A.; CESARINO, I.; SANTOS, A.B.; VICENTINI, R.; MAYER, J.L., et al. 2013. **Lignification in sugarcane: biochemical characterization, gene discovery, and expression analysis in two genotypes contrasting for lignin content.** *Plant Physiol.* 2013 Dec;163(4):1539-57.
- BRÄUTIGAM, A.; KAJALA, K.; WULLENWEBER, J.; SOMMER, M.; et al. 2011. **An mRNA blueprint for C4 photosynthesis derived from comparative transcriptomics of closely related C3 and C4 species.** *Plant Physiol.* 155(1):142-56.
- BUCZYNSKI, S. R.; THOM, M.; CHOUREY, P.; MARETZKI, A. 1993. **Tissue distribution and characterization of sucrose synthase isozymes in sugarcane.** *J. Plant Physiol.* 142, 641–646.
- BULÉON, A.; COLONNA, P.; PLANCHOT, V.; BALL, S. 1998. **Starch granules: structure and biosynthesis.** *International Journal of Biological Macromolecules* 23, 85–112
- BYRT, C.S.; GROF, C.P.L.; FURBANK, R.T. 2011. **C4 Plants as biofuel feedstocks: optimising biomass production and feedstock quality from a lignocellulosic perspective.** *Journal of Integrative Plant Biology* 53: 120–135.
- CARDOZO, N.P.; SENTELHAS, P.C. 2013. **Climatic effects on sugarcane ripening under the influence of cultivars and crop age.** *Sci Agric* 70: 449-456.
- CHANDA, B.; VENUGOPAL, S.C.; KULSHRESTHA, S.; NAVARRE, D.A.; DOWNIE, B.; VAILLANCOURT, L.; KACHROO, A.; KACHROO, P. 2008. **Glycerol-3-phosphate levels are associated with basal resistance to the hemibiotrophic fungus *Colletotrichum higginsianum* in *Arabidopsis*.** *Plant Physiol.* 147(4):2017-29.
- CONCONI, A.; MIQUEL, M.; BROWSE, J. A.; RYAN, C. A. 1996. **Intracellular Levels of Free Linolenic and Linoleic Acids Increase in Tomato Leaves in Response to Wounding.** *Plant physiology*, 111(3), 797–803.
- COUTINHO, I.D.; BAKER, J.M.; WARD, J.L.; BEALE, M.H.; CRESTE, S.; CAVALHEIRO, A.J. 2016. **Metabolite Profiling of Sugarcane Genotypes and Identification of Flavonoid Glycosides and Phenolic Acids.** *J Agric Food Chem.* 64(21):4198-206.
- CARVALHO-NETTO, O.V.; BRESSIANI, J.A.; SORIANO, H.L.; FIORI, C.S.; SANTOS, J.M.; BARBOSA, G.V.S.; XAVIER, M.A.; LANDELL, M.G.A., PEREIRA, G.A.G. 2014. **The potential of the energy cane as the main biomass crop for the cellulosic industry.** *Chemical and Biological Technologies in Agriculture* 1:20.
- CUNHA, C.P.; DE ABREU, L.S.G.F.; GRASSI, M.C.B.; ARICETTI, J.A.; MACHADO, E.C.; PEREIRA, G.A.A.G.; OLIVEIRA, J.V.C. 2020. **Metabolic Regulation and Development of Energy Cane Setts upon Auxin Stimulus.** *Plant Cell Physiol.* 2020 Mar 1;61(3):606-615.
- DAL CIN, V.; TIEMAN, D.M.; TOHGE, T.; MCQUINN, R.; DE VOS, R.C.H.; OSORIO, S., et al. 2011. **Identification of genes in the phenylalanine metabolic pathway by ectopic expression of a MYB transcription factor in tomato Fruit.** *Plant Cell* 23 2738–2753.
- DE ABREU, L.G.F.; GRASSI, M.C.B.; CARVALHO, L.M.; SILVA, J.J.B.; OLIVEIRA, J.V.C.; BRESSIANI, J.A.; PEREIRA, G.A.G. 2020. **Energy cane vs sugarcane: Watching the race in plant development.** *Industrial Crops & Products* 156, 1128683.

- DENG, Y, LU, S. 2017. **Biosynthesis and regulation of phenylpropanoids in plants**. Crit Rev Plant Sci. 36:257–290.
- DE SOUZA, A.P.; ARUNDALE, R.A.; DOHLEMAN, F.G.; LONG, S.P.; BUCKERIDGE, M.S. 2013. **Will the exceptional productivity of *Miscanthus giganteus* increase further under rising atmospheric CO₂?** Agricultural and Forest Meteorology 171–172, 82–92.
- DE SOUZA, A.P.; GRANDIS, A.; ARENQUE-MUSA, B.C.; BUCKERIDGE, M.S. 2018. **Diurnal variation in gas exchange and nonstructural carbohydrates throughout sugarcane development**. Funct Plant Biol. 45:865–76.
- DIAZ, C. et al. 2008. **Nitrogen Recycling and Remobilization Are Differentially Controlled by Leaf Senescence and Development Stage in *Arabidopsis* under Low Nitrogen Nutrition**. Plant Physiol 147, 1437 LP–1449.
- CHALECKIS, R.; MEISTER, I.; ZHANG, P.; WHEELOCK, C. E. 2018. **Challenges, progress and promises of metabolite annotation for LC-MS-based metabolomics**. Curr. Opin. Biotechnol. 55, 44–50.
- CHANDRA, A.; VERMA, P.K.; ISLAM, M.N.; GRISHAM, M.P.; et al. 2015. **Expression analysis of genes associated with sucrose accumulation in sugarcane (*Saccharum* spp. hybrids) varieties differing in content and time of peak sucrose storage**. Plant Biol (Stuttg). 17(3):608-17.
- CHAFFEY, N. 2010. **Encyclopedia of Ecology**. Annals of Botany, 105(3), vi–viii.
- DALCHAU, N., BAEK, S. J., BRIGGS, H. M., ROBERTSON, F. C., DODD, A. N., GARDNER, M. J., et al. 2011. **The circadian oscillator gene *GIGANTEA* mediates a long-term response of the *Arabidopsis thaliana* circadian clock to sucrose**. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 108, 5104–5109.
- DATIR, S.; JOSHI, S. 2016. **The contribution of sucrose metabolism enzymes to sucrose accumulation in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) genotypes**. Ind J Plant Physiol. 21, 76–82.
- DE MARIA FELIX, J.; PAPINI-TERZI, F.S.; ROCHA, F.R. et al. 2009. **Expression Profile of Signal Transduction Components in a Sugarcane Population Segregating for Sugar Content**. Tropical Plant Biol. 2, 98–109.
- DODD, A.N.; BELBIN, F.E.; FRANK, A.; WEBB, A.A.R. 2015. **Interactions between circadian clocks and photosynthesis for the temporal and spatial coordination of metabolism**. Front. Plant Sci. 6:245.
- DODD, A.N.; SALATHIA, N., HALL, A. et al. 2005. **Plant circadian clocks increase photosynthesis, growth, survival, and competitive advantage**. Science (New York, N.Y.), 309(5734):630-633.
- DOHERTY, C.; KAY, S. 2010. **Circadian control of global gene expression patterns**. Annual Review of Genetics. 2010;44:419-444.
- DU, Y.-C.; NOSE, A.; KONDO, A.; WASANO, K. 2000. **Diurnal changes in photosynthesis in sugarcane leaves: I. Carbon dioxide exchange rate, photosynthetic enzyme activities and metabolite levels relating to the C₄ pathway and the Calvin cycle**. Plant Production Science 3, 3–8.
- DÜHRKOP, K.; NOTHIAS, L.F.; FLEISCHAUER, M., et al. 2020. **Classes for the masses: Systematic classification of unknowns using fragmentation spectra**. bioRxiv.
- EGGLESTON, G.; LEGENDRE, B.; TEW, T. 2004. **Indicators of freeze-damaged sugarcane varieties which can predict processing problems**. Food Chemistry, v. 87, n. 1, p. 119-133.
- EHNESS, R.; ECKER, M.; GODT, D.; ROITSCH, T. 1997. **Glucose and stress independently regulate source/sink relations and defense mechanisms via signal transduction pathways involving protein phosphorylation**. The Plant Cell, vol. 9 (pg. 1825-1841).
- ERNST, M.; SILVA, D.B.; SILVA, R.R.; VÊNICO, R.Z.; LOPES, N.P. 2014. **Mass spectrometry in plant metabolomics strategies: from analytical platforms to data acquisition and processing**. Nat Prod Rep. 2014 Jun;31(6):784-806.
- EVELAND, A.L.; JACKSON, D.P. 2012. **Sugars, signalling, and plant development**. J Exp Bot 63: 3367–3377

- EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. 2013. **Raven Biology of Plants**. 8th Edition. W. H. Freeman, Macmillan.
- EMWAS, A.H.; ROY, R.; MCKAY, R.T.; TENORI, L.; SACCENTI, E.; GOWDA, G.A.N.; RAFTERY, D.; ALAHMARI, F.; JAREMKO, L.; JAREMKO, M.; WISHART, D.S. 2019. **NMR Spectroscopy for Metabolomics Research**. *Metabolites*. 9(7):123.
- FAMIGLINI, G.; PALMA, P.; TERMOPOLI, V.; CAPIELLO, A.; TSIZIN, S.; SEEMANN, B.; ALON, T.; FIALKOV, A.B.; AMIRAV, A. **Electron Ionization LC-MS: What Is It and Why Use It?**. *Comprehensive Analytical Chemistry*, Volume 79, 2017.
- FANELLI, A.; REINHARDT, L.; MATSUOKA, S.; FERRAS, A., et al. 2020. **Biomass composition of two new energy cane cultivars compared with their ancestral *Saccharum spontaneum* during internode development**. *Biomass and Bioenergy* 141:105696.
- FAOSTAT. 2021. **Crops. Food and Agriculture Organization of United Nations**. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>. Accessed 04 Feb 2021.
- Ferreira, D.A.; MARTINS, M.C.M.; CHEAVEGATTI-GIANOTTO, A., CARNEIRO, M.S.; AMADEU, R.R.; ARICETTI, J.A.; WOLF, L.D.; HOFFMANN, H.P.; DE ABREU, L.G.F.; CALDANA, C. 2018. **Metabolite Profiles of Sugarcane Culm Reveal the Relationship Among Metabolism and Axillary Bud Outgrowth in Genetically Related Sugarcane Commercial Cultivars**. *Front Plant Sci.*;9:857.
- Ferreira, S. J. 2007. **The analysis and reduction of starch in sugarcane by silencing ADP-glucose pyrophosphorylase and over-expressing β -amylase**. Thesis (MSc Plant Biotechnology). University of Stellenbosch.
- FIGUEIRA, J. A.; CARVALHO, P. H.; SATO, H. H. 2011. **Sugarcane starch: quantitative determination and characterization**. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* [online]. 2011, vol.31, n.3, pp.806-815.
- FILHO, H.A.; MACHICAO, J.; BRUNO, O.M. 2018. **A hierarchical model of metabolic machinery based on the kcore decomposition of plant metabolic networks**. *PLoS One*. 13(5):e0195843.
- FRANÇA, S.C.; ROBERTO, P.G.; MARINS, M.A.; PUG, R.D.; RODRIGUES, A.; PEREIRA, J.O. 2001. **Biosynthesis of secondary metabolites in sugarcane**. *Genet Mol Biol* 24:243-250.
- FUKUSHIMA, A.; KUSANO, M.; REDESTIG, H.; ARITA, M.; SAITO, K. 2009. **Integrated omics approaches in plant systems biology**. *Curr Opin Chem Biol*. 2009 Dec;13(5-6):532-8. doi: 10.1016/j.cbpa.2009.09.022. PMID: 19837627.
- GALILI, G., AMIR, R., FERNIE, A. R. 2016. **The regulation of essential amino acid synthesis and accumulation in plants**. *Annu. Rev. Plant Biol.* 67, 153–178.
- GALLI, F. 2007. **Amino acid and protein modification by oxygen and nitrogen species**. *Amino Acids* 32, 497–499.
- GALILI, G. 2011. **The aspartate-family pathway of plants: linking production of essential amino acids with energy and stress regulation**. *Plant signaling & behavior*, 6(2), 192–195.
- GEIGENBERGER, P.; STITT, M.; FERNIE, A.R. 2004. **Metabolic control analysis and regulation of the conversion of sucrose to starch in growing potato tubers**. *Plant Cell Environ* 27: 655–673.
- GEIGENBERGER, P. 2011. **Regulation of starch biosynthesis in response to a fluctuating environment**. *Plant Physiology*. 155(4)1566-1577.
- GIBON, Y.; USADEL, B., BLAESING, O.E.; KAMLAGE, B.; HOEHNE, M., et al. 2006. **Integration of metabolite with transcript and enzyme activity profiling during diurnal cycles in *Arabidopsis* rosettes**. *Genome Biology*. 7:R76.
- GLASSOP, D.; ROESSNER, U.; BACIC, A.; BONNETT, G.D. 2007. **Changes in the sugarcane metabolome with stem development. Are they related to sucrose accumulation?** *Plant Cell Physiol*. 48(4):573-84.
- GUTJAHR, S.; CLEMENT-VIDAL, A.; SOUTIRAS, A.; SONDEREGGER, N.; BRACONNIER, S.; DINGKUHN, M.; LUQUET, D. 2013. **Grain, sugar and biomass accumulation in photoperiod-**

sensitive sorghums. II. Biochemical processes at internode level and interaction with phenology. *Functional Plant Biology*, 40, 355–368.

- HASSIDIM, M.; DAKHIYA, Y.; TURJEMAN, A.; HUSSIEN, D.; SHOR, E.; ANIDJAR, A.; GOLDBERG, K.; GREEN, R.M. 2017. **CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED1 (CCA1) and the Circadian Control of Stomatal Aperture.** *Plant Physiol.* 175(4):1864-1877.
- HUBER, S.C.; HUBER, J.L. 1996. **Role and Regulation of Sucrose-Phosphate Synthase in Higher Plants.** *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47: 431-444.
- INOUE, K.; ARAKI, T.; ENDO, M. 2018. **Circadian clock during plant development.** *Journal of plant research*, 131(1), 59–66.
- KIM, H.K.; CHOI, Y.H.; VERPOORTE, R. 2010. **NMR-based metabolomic analysis of plants.** *Nat Protoc.* 5(3):536-49.
- KIM, H.U. 2020. **Lipid Metabolism in Plants.** *Plants (Basel, Switzerland)* vol. 9,7 871. 9 Jul. 2020.
- KIM, J.A.; KIM, H.S.; CHOI, S.H.; JANG, J.Y.; JEONG, M.J.; LEE, S.I. 2017. **The Importance of the Circadian Clock in Regulating Plant Metabolism.** *Int J Mol Sci.* 18(12):2680.
- KOCAL, N.; SONNEWALD, U.; SONNEWALD, S. 2008. **Cell wall-bound invertase limits sucrose export and is involved in symptom development and inhibition of photosynthesis during compatible interaction between tomato and *Xanthomonas campestris pv vesicatoria*.** *Plant Physiol.* 148:1523–36.
- KOCH, K. 2004. **Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development,** *Current Opinion in Plant Biology*, 2004, vol. 7 (pg. 235-246).
- KOCH, K.E. 1996. **Carbohydrate-modulated gene expression in plants,** *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 1996, vol. 47 (pg. 509-540).
- KROYMANN, J. 2011. **Natural diversity and adaptation in plant secondary metabolism.** *Curr Opin Plant Biol.* 14(3):246-51.
- KUMAR, V.; SHARMA, A.; SONI, J.K., PAWAR, N. 2017. **Physiological response of C3, C4 and CAM plants in changeable climate.** *Pharma Innovation.* 6(9):70-79.
- HALL, R.; BEALE, M.; FIEHN, O.; HARDY, N.; SUMNER, L.; BINO, R. 2002. **Plant metabolomics: the missing link in functional genomics strategies.** *Plant Cell.* 14(7):1437-40.
- HERRERA-RODRÍGUEZ, M. B.; MALDONADO, J. M.; PÉREZ-VICENTE, R. 2016. **Role of asparagine and asparagine synthetase genes in sunflower (*Helianthus annuus*) germination and natural senescence.** *J. Plant Physiol.* 163, 1061–1070.
- HILDEBRANDT, T.M.; NUNES, NESI, A.; ARAÚJO, W.L.; BRAUN, H.P. 2015. **Amino Acid Catabolism in Plants.** *Mol Plant.* 2015 Nov 2;8(11):1563-79. doi: 10.1016/j.molp.2015.09.005. Epub 2015 Sep 15. PMID: 26384576.
- HOANG, N.V.; FURTADO, A.; BOTHA, F.C.; SIMMONS, B.A.; HENRY, R.J. 2015. **Potential for genetic improvement of sugarcane as a source of biomass for biofuels.** *Front Bioeng Biotechnol* 3:182.
- HOTTA, C.T.; NISHIYAMA, M.Y.J.R.; SOUZA, G.M. 2013. **Circadian Rhythms of Sense and Antisense Transcription in Sugarcane, a Highly Polyploid Crop.** *PLoS One* 6;8(8):e71847.
- IGAMBERDIEV, A. U.; EPRINTSEV, A. T. 2016. **Organic Acids: The Pools of Fixed Carbon Involved in Redox Regulation and Energy Balance in Higher Plants.** *Frontiers in plant science*, 7, 1042.
- INMAN-BAMBER, N.G.; JACKSON, P.A.; HEWITT, M. 2011. **Sucrose accumulation in sugarcane stalks does not limit photosynthesis and biomass production.** *Crop and Pasture Science* 62: 848–858.
- INMAN-BAMBER, N.G.; BONNETT, G.D.; SPILLMAN, M.F.; HEWITT, M.H.; GLASSOP, D. 2010. **Sucrose accumulation in sugarcane is influenced by temperature and genotype through the carbon source–sink balance.** *Crop and Pasture Science* 61, 111-121.

- JARDIM-MESSEDER, D.; DA FRANCA SILVA, T.; FONSECA, J.P. et al. 2020. **Identification of genes from the general phenylpropanoid and monolignol-specific metabolism in two sugarcane lignin-contrasting genotypes.** *Mol Genet Genomics* 295, 717–739.
- JARDIM-MESSEDER, D.; FELIX-CORDEIRO, T.; BARZILAI, L.; DE SOUZA-VIEIRA, Y.; et al. 2021. **Genome-wide analysis of general phenylpropanoid and monolignol-specific metabolism genes in sugarcane.** *Funct Integr Genomics*. 2021 Jan;21(1):73-99.
- JOHNSON, C.H.; KNIGHT, M.; TREWAVAS, A.; KONDO, T. 1998. **Biological Rhythms and Photoperiodism in Plants.** P. L. Lumsden, A. J. Millar, Eds. (Bios Scientific, Oxford).
- JOHNSON, S.R., LANGE, B.M. 2015. **Open-access metabolomics databases for natural product research: present capabilities and future potential.** *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 3, 22.
- JORGE, T.F.; MATA, A.T.; ANTÓNIO, C. 2016. **Mass spectrometry as a quantitative tool in plant metabolomics.** *Philosophical transactions. Series A, Mathematical, physical, and engineering sciences*, 374(2079), 20150370.
- JULIUS, B.T.; LEACH, K.A., TRAN, T.M.; MERTZ, R.A.; BRAUN, D.M. 2017. **Sugar Transporters in Plants: New Insights and Discoveries.** *Plant Cell Physiol*. 58(9):1442-1460.
- KANEHISA, M.; GOTO, S. 2000. **KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes.** *Nucleic Acids Res*. 28, 27-30.
- KELL, D. B.; OLIVER, S. G. 2016. **The metabolome 18 years on: a concept comes of age.** *Metabolomics: Official journal of the Metabolomic Society*, 12(9), 148.
- KESSLER, A.; KALSKE, A. 2018. **Plant secondary metabolite diversity and species interactions.** *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 2018, 49, 115–138.
- KIM, M.; DAY, D.F 2011. **Composition of sugar cane, energy cane, and sweet sorghum suitable for ethanol production at Louisiana sugar mills.** *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 2011 Jul;38(7):803-807.
- KIND, T.; FIEHN, O. 2006. **Metabolomic database annotations via query of elemental compositions: a precisão da massa é insuficiente mesmo em menos de 1 ppm.** *BMC Bioinformatics* 7, 234.
- KOSSMANN, J.; LLOYD, J. 2000. **Understanding and Influencing Starch Biochemistry.** *Critical Reviews in Plant Sciences* 19: 171-226.
- LAL, A.M. 2018. **Metabolism of Storage Carbohydrates.** In: *Plant Physiology, Development and Metabolism.* Springer, Singapore.
- LASTDRAGER, J.; HANSON, J.; SMEEKENS, S. 2014. **Sugar signals and the control of plant growth and development.** *J Exp Bot*. 65:799–807.
- LEAL, M.R.L.V.; WALTER, A.S.; SEABRA, J.E.A. 2013. **Sugarcane as an energy source.** *Biomass Conv. Bioref.* 3, 17–26.
- LEITE, G. H. P.; CRUSCIOL, C. A. C.; SILVA, M. A. 2011. **Desenvolvimento e produtividade da cana-de-açúcar após aplicação de reguladores vegetais em meio de safra.** *Semina: Ciências Agrárias*, v.32, p.129-138.
- LEEGOOD, R.C. 2002. **C4 photosynthesis: principles of CO2 concentration and prospects for its introduction into C3 plants.** *J. Exp. Bot.* 53, 581–590.
- LIANG, X.G.; GAO, Z.; ZHANG, L. et al. 2019. **Seasonal and diurnal patterns of non-structural carbohydrates in source and sink tissues in field maize.** *BMC Plant Biol* 19, 508.
- LIMA, E.C. T. **Cana-energia como potencial fonte energética: Caracterização dos subprodutos (frações sólida, líquida e gasosa) provenientes da pirólise.** 2016. 1 recurso online (113 p.). Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Mecânica, Campinas, SP.

- LINGLE, S.E.; THOMSON, J.L. 2012. **Sugarcane internode composition during crop development**. *Bioenerg. Res.* 5, 168–178.
- LLOYD, J.R.; KÖTTING, O. 2016. **Starch biosynthesis and degradation in plants**. In eLS, John Wiley & Sons, Ltd (Ed.).
- LIU, W.G., REN, M.L.; LIU, T.; DU, Y.L.; ZHOU, T.; LIU, XIAO-MING, LIU JIANG, SAJAD HUSSAIN, YANG WEN-Y.U. 2018. **Effect of shade stress on lignin biosynthesis in soybean stems**. *Journal of Integrative Agriculture*.
- LOBO, A.K.; DE OLIVEIRA, M. M.; LIMA NETO, M.C.; et al. 2015. **Exogenous sucrose supply changes sugar metabolism and reduces photosynthesis of sugarcane through the down-regulation of Rubisco abundance and activity**. *J Plant Physiol.* 179:113-21.
- LONG, X.; LIU, Q.; CHAN, M.; WANG, Q.; SUN, S.S.M. 2013. **Metabolic engineering and profiling of rice with increased lysine**. *Plant Biotechnol. J.* 11, 490–501.
- MACHADO, E.C. 1987. **Sugarcane production physiology**. In: Paranhos SB. *Sugarcane: cultivation and use*. Editora Fundação Cargill, Campinas, SP, Brazil, p. 56-87.
- MAEDA, H.; DUDAREVA, N. 2012. **The shikimate pathway and aromatic amino acid biosynthesis in plants**. *Annu. Rev. Plant Biol.* 63 73–105.
- MAEDA, H.A. 2019. **Evolutionary Diversification of Primary Metabolism and Its Contribution to Plant Chemical Diversity**. *Frontiers in plant science*, 10, 881.
- MARAFON, A. C. 2012. **Análise quantitativa de crescimento em cana-de-açúcar: uma introdução ao procedimento prático**. Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE, Brasil, 29 p.
- MASON, P.J.; FURTADO, A.; MARQUARDT, A.; HODGSON-KRATKY, K.; HOANG, N.V.; BOTHA F.C.; PAPA, G.; MORTIMER, J.C.; SIMMONS, B.; HENRY, R.J. 2020. **Variation in sugarcane biomass composition and enzymatic saccharification of leaves, internodes and roots**. *Biotechnol Biofuels.* 13(1):201.
- MATA-PÉREZ, C.; SÁNCHEZ-CALVO, B.; BEGARA-MORALES, J.C.; LUQUE, F.; JIMÉNEZ-RUIZ, J.; PADILLA, M.N.; FIERRO-RISCO, J.; VALDERRAMA, R.; FERNÁNDEZ-OCAÑA, A.; CORPAS, F.J.; BARROSO, J.B. 2015. **Transcriptomic profiling of linolenic acid-responsive genes in ROS signaling from RNA-seq data in Arabidopsis**. *Front Plant Sci.* 2015 Mar 17;6:122.
- MCCLUNG, C. R. 2006. **Plant circadian rhythms**. *The Plant cell* vol. 18,4: 792-803.
- MCCORMICK, A.J.; CRAMER, M.D.; WATT, D.A. 2006, **Sink strength regulates photosynthesis in sugarcane**. *New Phytologist*, 171: 759-770.
- MCCORMICK, A.J.; CRAMER, M.D.; WATT, D.A. 2008. **Changes in photosynthetic rates and gene expression of leaves during a source-sink perturbation in sugarcane**. *Ann Bot.* 101(1):89-102.
- MCCORMICK, A.J.; WATT, D.A.; CRAMER, M.D. 2009. **Supply and demand: sink regulation of sugar accumulation in sugarcane**. *J Exp Bot.* 60(2):357-64.
- MCCORMICK, A.J.; CRAMER, M.D.; WATT, D.A. 2008. **Regulation of photosynthesis by sugars in sugarcane leaves**. *J Plant Physiol.* 165(17):1817-29.
- MCDONALD, M. S. 2003. **Photobiology of higher plants**. UK: John Wiley e Sons.
- MACNEILL, G.J.; MEHRPOUYAN, S.; MINOW, M.A.A.; PATTERSON, J.A.; TETLOW, I.J.; EMES, M.J. 2017. **Starch as a source, starch as a sink: the bifunctional role of starch in carbon allocation**. *J Exp Bot.* 68(16):4433-4453.
- MCKINLEY, B.; CASTO, A.; ROONEY, W.; MULLET, J. 2018. **Developmental dynamics of stem starch accumulation in Sorghum bicolor**. *Plant Dir.* 2 1–15.
- MIQUEL, M.2003. **What is New about Glycerol Metabolism in Plants?**. In: Murata N., Yamada M., Nishida I., Okuyama H., Sekiya J., Hajime W. (eds). *Advanced Research on Plant Lipids*. Springer, Dordrecht.

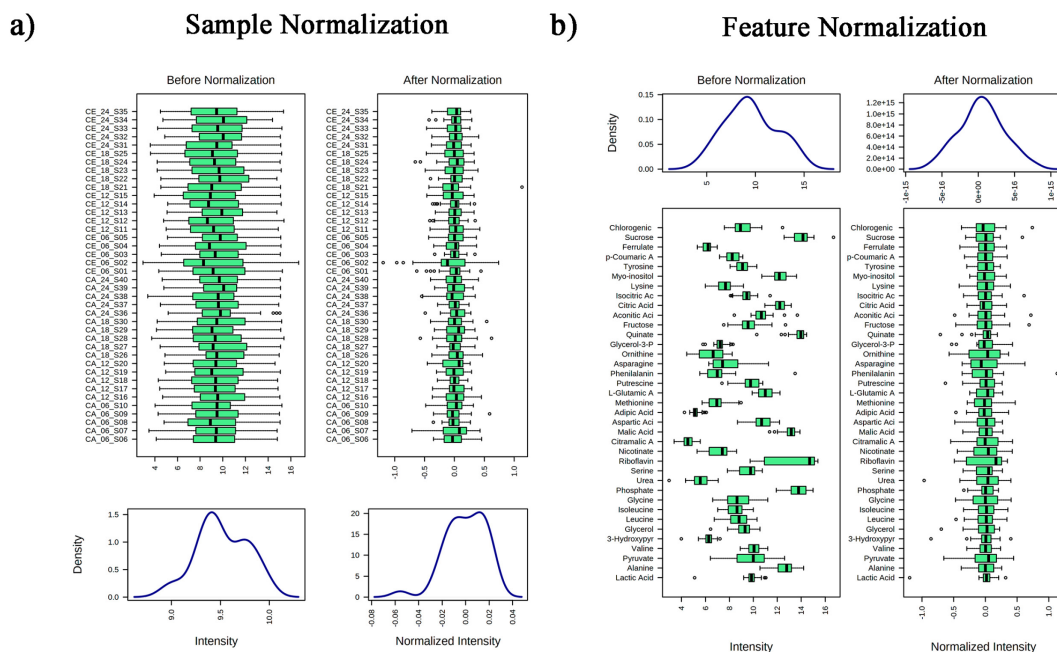
- MOORE, P.H. 1995. **Temporal and Spatial Regulation of Sucrose Accumulation in the Sugarcane Stem**. Aust J Plant Physiol 22: 661-680.
- MOSS, D.N.; MUSGRAVE, R.B. AND LEMON, E.R. 1961, **Photosynthesis Under Field Conditions. III. Some Effects of Light, Carbon Dioxide, Temperature, and Soil Moisture on Photosynthesis, Respiration, and Transpiration of Corn**. Crop Sci., 1: 83-87.
- NOZUE, K.; MALOOF, J.N. 2006. **Diurnal regulation of plant growth**. Plant Cell Environ. 2006 Mar;29(3):396-408.
- PAIVA, L. **Cana Online**. Paiva & Baldin Editora: Ribeirão Preto, SP, 2014.
- PAPINI-TERZI, F.S.; ROCHA, F.R.; VÊNICO, R.Z. et al. 2009. **Sugarcane genes associated with sucrose content**. BMC Genomics 10, 120.
- PAUL, M.J.; FOYER, C.H. 2001. **Sink regulation of photosynthesis**. Journal of Experimental Botany 52: 1381-1400.
- PAUL, M.J.; PRIMAVESI, L.F.; JHURREEA, D.; ZHANG, Y. 2008. **Trehalose metabolism and signaling**. Annu Rev Plant Biol. 59:417-41.
- PEREIRA, L.F.M.; FERREIRA, V.M.; DE OLIVEIRA, N. G.; SARMENTO, P.L.V.S.; ENDRES, L.; AND TEODORO; I. 2017. **Sugars levels of four sugarcane genotypes in different stem portions during the maturation phase**. An. Acad. Bras. Cienc. 89, 1231-1242.
- PERLO, V.; BOTHA, F.C.; FURTADO, A.; HODGSON-KRATKY, K.; HENRY, R.J. 2020. **Metabolic changes in the developing sugarcane culm associated with high yield and early high sugar content**. Plant Direct. 4(11):e00276.
- PFISTER, B.; ZEEMAN, S.C. 2016. **Formation of starch in plant cells**. Cell. Mol. Life Sci. 73, 2781-2807.
- POTT, D.M.; OSORIO, S.; VALLARINO, J.G. 2019. **From central to specialized metabolism : an overview of some secondary compounds derived from the primary metabolism for their role in conferring nutritional and organoleptic characteristics to fruit**. Front Plant Sci.
- POORTER, H.; VILLAR, R. 1997. **Plant resource allocation**. Academic Press: San Diego.
- PRIESSER, J.; KOMOR, E. 1991. **Sucrose uptake into vacuoles of sugarcane suspension cells**. Planta 186, 109-114.
- RAE, A.L.; GROF, C.P.L.; CASU, R.E.; BONNETT, G.D. 2005a. **Sucrose accumulation in the sugarcane stem: pathways and control points for transport and compartmentation**. Field Crops Research. 92(2-3):159-168.
- RAE, A.L.; PERROUX, J.M.; GROF, C.P. 2005b. **Sucrose partitioning between vascular bundles and storage parenchyma in the sugarcane stem: a potential role for the ShSUT1 sucrose transporter**. Planta 220: 817-825.
- REN, J.L.; ZHANG, A.H.; KONG, L.; WANG, X.J. 2018. **Advances in mass spectrometry-based metabolomics for investigation of metabolites**. RSC Adv 8(40):22335-22350.
- ROBERTS, L.D.; SOUZA, A.L.; GERSZTEN, R.E.; CLISH, C.B. 2012. **Targeted metabolomics**. Curr Protoc Mol Biol. Unit 30.2.1-24.
- ROLLAND, F.; MOORE, B.; SHEEN, J. 2002. **Sugar sensing and signaling in plants**. The Plant Cell, vol. 14 Suppl (pg. S185-S205).
- ROLLAND, F.; SHEEN, J. 2005. **Sugar sensing and signalling networks in plants**. Biochem Soc. 33(1): 269-271.
- SAGE, R. F.; CHRISTIN, P.A.; EDWARDS, E. J. 2011. **The C4 plant lineages of planet earth**. J. Exp. Bot. 62 3155-3169.

- SALEM, M. A.; PEREZ DE SOUZA, L.; SERAG, A.; FERNIE, A. R.; FARAG, M. A.; EZZAT, S. M.; ALSEEKH, S. 2020. **Metabolomics in the Context of Plant Natural Products Research: From Sample Preparation to Metabolite Analysis**. *Metabolites*, 10(1), 37.
- SANTOS, F.; DIOLA, V. 2015. **Physiology**. In: *Sugarcane*. Elsevier, pp. 13–33.
- SCHEIDEL, A.; SORMAN, A. 2012. **Energy transitions and the global land rush: Ultimate drivers and persistent consequences**. *Global Environmental Change* 22(3): 588–595.
- SCHMID, K.M.; OHLROGGE, J.B. 2008. Lipid metabolism in plants *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*. 97-130.
- SEKI, M.; OHARA, T.; HEARN, T.J. et al. 2017. **Adjustment of the Arabidopsis circadian oscillator by sugar signalling dictates the regulation of starch metabolism**. *Sci Rep* 7, 8305.
- SCHENCK, C.A.; MAEDA, H.A. 2018. **Tyrosine biosynthesis, metabolism, and catabolism in plants**. *Phytochemistry*.;149:82-102.
- SHEN, X.; WANG, R.; XIONG, X. et al. 2019. **Metabolic reaction network-based recursive metabolite annotation for untargeted metabolomics**. *Nat Commun* 10, 1516.
- SHEN, W.; WEI, Y.; DAUK, M.; ZHENG, Z.; ZOU, J. 2003. **Identification of a mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase from Arabidopsis thaliana: evidence for a mitochondrial glycerol-3-phosphate shuttle in plants**. *FEBS. Lett.* 536(1-3), 92-96.
- SHIM, J.S.; KUBOTA, A.; IMAIZUMI, T. 2017. **Circadian Clock and Photoperiodic Flowering in Arabidopsis: CONSTANS Is a Hub for Signal Integration**. *Plant physiology* vol. 173,1: 5-15.
- SHENDURE, J.; BALASUBRAMANIAN, S.; CHURCH, G. et al. 2017. **DNA sequencing at 40: past, present and future**. *Nature* 550, 345–353.
- SIECIECHOWICZ, K.A.; JOY, K.W.; IRELAND, R.J. 1988. **The metabolism of asparagine in plants**. *Phytochemistry*.
- SILVA, N.; MAZZAFERA, P.; CESARINO, I. 2019. **Should I stay or should I go: are chlorogenic acids mobilized towards lignin biosynthesis?** *Phytochemistry*.
- SMEEKENS, S. 2000. **Sugar-induced signal transduction in plants**. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 2000, vol. 51 (pg. 49-81).
- SMITH, A.M.; ZEEMAN, S.C.; SMITH, S.M. 2005. **Starch degradation**. *Annual Review of Plant Biology* 56: 73–97.
- STREB, S.; ZEEMAN, S.C. 2012. **Starch metabolism in Arabidopsis**. *Arabidopsis Book*. 10:e0160.
- STITT, M.; ZEEMAN, S.C. 2012. **Starch turnover: Pathways, regulation and role in growth**. *Curr. Opin. Plant Biol*, 15, 282–292.
- T'KINDT, R.; MORREEL, K.; DEFORCE, D.; BOERJAN, W.; VAN, BOCXLAER, J. 2009. **Joint GC-MS and LC-MS platforms for comprehensive plant metabolomics: repeatability and sample pre-treatment**. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 877(29):3572-80.
- VINAYAVEKHIN, N.; SAGHATELIAN, A. 2010. **Untargeted metabolomics**. *Curr Protoc Mol Biol*. Chapter 30:Unit 30.1.1-24.
- WAI, C.M.; ZHANG, J.; JONES, T.C. et al. 2017. **Cell wall metabolism and hexose allocation contribute to biomass accumulation in high yielding extreme segregants of a Saccharum interspecific F2 population**. *BMC Genomics* 18, 773.
- WALFORD, S.N. 1998. **A Laboratory Investigation of Aconitic Acid Isomerisation and some Observations on Isomerisation in Factory Processing**, *Proceeding of South African Sugar Technologist Ass.*, 72:234-241.

- WANG, G. 2015. **Applications of LC-MS in Plant Metabolomics**. In: Qi X., Chen X., Wang Y. (eds) *Plant Metabolomics*. Springer, Dordrecht.
- WANG, J.; NAYAK, S.; KOCH, K.; MING, R. 2013. **Carbon partitioning in sugarcane (*Saccharum* species)**. *Frontier Plant Science* 4:201.
- WANG, J.; ZHAO, T.; YANG, B.; ZHANG, S. 2017. **Sucrose Metabolism and Regulation in Sugarcane**. *J Plant Physiol Pathol* 5:4.
- WANG, J. H.; BYUN, J.; PENNATHUR, S. 2010. **Analytical approaches to metabolomics and applications to systems biology**. *Seminars in nephrology*, 30(5), 500–511.
- WEN, W.; LI, D.; LI, X.; GAO, Y.; LI, W.; LI, H.; LIU, J.; LIU, H.; CHEN, W.; LUO, J.; YAN, J. 2014. **Metabolome-based genome-wide association study of maize kernel leads to novel biochemical insights**. *Nat. Commun.* 5: 3438.
- YABUKI, Y. et al. 2017. **A temporal and spatial contribution of asparaginase to asparagine catabolism during development of rice grains**. *Rice* 10, 3.
- WALTER, A.; GALDOS, M.V.; SCARPARE, F.V.; LEAL, M.R.L.V.; SEABRA, J.E.A.; C. M.P.; PICOLI, M.C.A.; OLIVEIRA, C.O.F. 2014. **Brazilian sugarcane ethanol: developments so far and challenges for the future**. *WIREs Energy Environ* 3:70–92.
- WENDLER, R.; VEITH, R.; DANCER, J.; STITT, M.; AND KOMOR, E. 1990. **Sucrose storage in cell suspension cultures of *Saccharum* sp. (sugarcane) is regulated by a cycle of synthesis and degradation**. *Planta* 183, 31–39.
- XUE, L.L.; CHEN, H.H.; JIANG, J.G. 2017. **Implications of glycerol metabolism for lipid production**. *Progress in Lipid Research*.
- YANG, Q.; ZHAO, D.; LIU, Q. 2020. **Connections Between Amino Acid Metabolisms in Plants: Lysine as an Example**. *Frontiers in plant science*, 11, 928.
- ZHAO, D.; IREY, M.; LABORDE, C.; HU, C. 2017. **Identifying physiological and yield related traits in sugarcane and energy cane**. *Agronomy Journal*.
- ZEEMAN, S.C.; TIESSEN, A.; PILLING, E.; KATO, K.L.; DONALD, A.M.; SMITH, A.M. 2002. **Starch synthesis in Arabidopsis. Granule synthesis, composition, and structure**. *Plant Physiol.* 129(2):516-29.
- ZEEMAN, S.C.; DELATTE, T.; MESSERLI, G.; UMHANG, M.; STETTLER, M.; METTLER, T.; STREB, S.; REINHOLD, H.; KÖTTING, O. 2007. **Starch breakdown: recent discoveries suggest distinct pathways and novel mechanisms**. *Funct Plant Biol.* 34(6):465-473.
- ZHU, Y.J.; KOMOR, E.; MOORE, P.H. 1997. **Sucrose Accumulation in the Sugarcane Stem Is Regulated by the Difference between the Activities of Soluble Acid Invertase and Sucrose Phosphate Synthase**. *Plant physiology*, 115(2), 609–616.

APÊNDICES

Two-way ANOVA Folha +1



Two-way ANOVA Entrenó +3

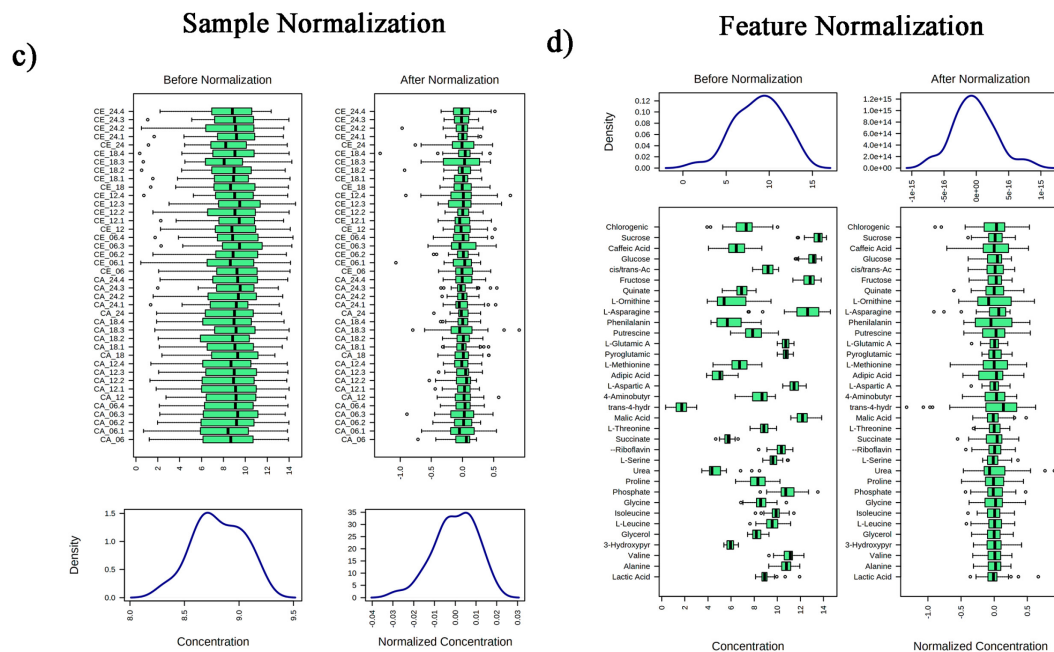


Figura 1 complementar. Normalização dos dados de GC-MS (metabolismo primário), dos tecidos da folha e do entrenó +3 cana-energia (CE) e cana-de-açúcar (CA), realizada no MetaboAnalyst. Os gráficos box-plots da esquerda mostram as distribuições compostos entre as amostras de folha (a) e colmo (c), e os da direita, mostra a distribuição dos compostos individuais na folha (b) e no colmo (c), enquanto que os

gráficos de baixo mostra a distribuição geral dos dados antes e depois da normalização. Os dados foram transformados em log e as amostras foram normalizados pela mediana, usando a métrica de *Auto scaling* (centrado na média e dividido pelo desvio padrão de cada variável) como escala. Os pontos vazios nos box-plots representam os valores atípicos antes e depois da normalização.

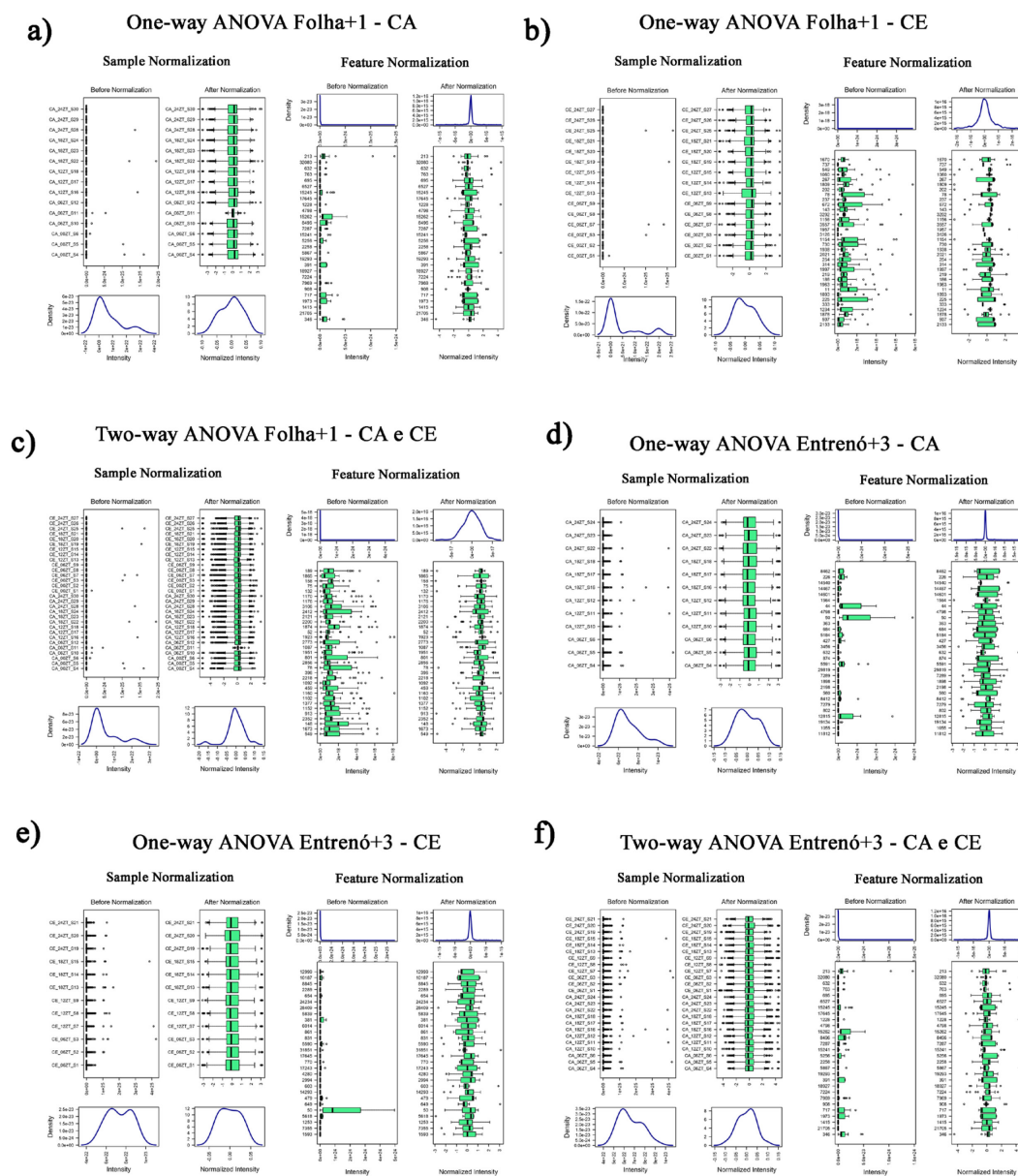


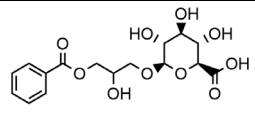
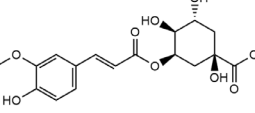
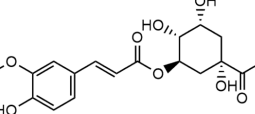
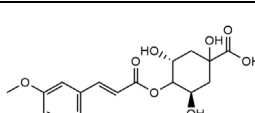
Figura 2 complementar. Normalização dos dados de LC-MS (metabolismo secundário), dos tecidos da folha e do colmo cana-energia (CE) e cana-de-açúcar (CA), realizada no MetaboAnalyst. Os gráficos box-plots da esquerda mostram as distribuições compostas entre as amostras, e os da direita, a distribuição dos compostos individuais, enquanto que os gráficos de baixo mostra a distribuição geral dos dados antes e depois da normalização. One-way ANOVA em folha+1 de CA (a) e CE (b) e no entrenó +3 de CA (d) e CE (e). Two-way ANOVA em folha+1 de CA e CE (c) e no entrenó +3 de CA e CE (f). Os dados foram transformados em log e as amostras foram normalizados pela mediana, usando a métrica de *Auto scaling*

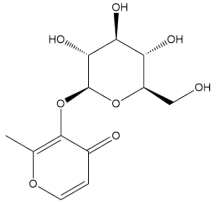
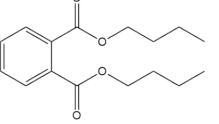
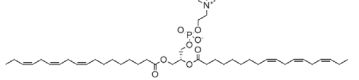
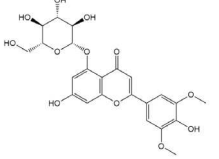
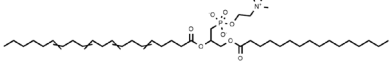
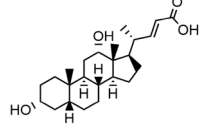
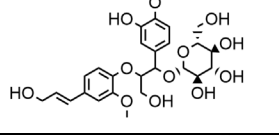
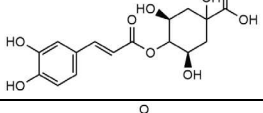
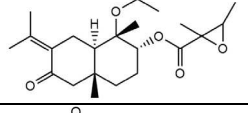
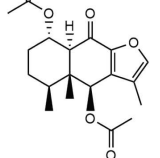
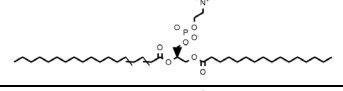
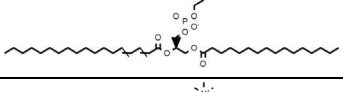
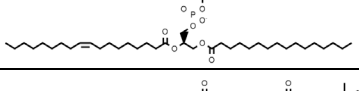
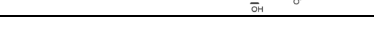
(centrado na média e dividido pelo desvio padrão de cada variável) como escala. Os pontos vazios nos box-plots representam os valores atípicos antes e depois da normalização.

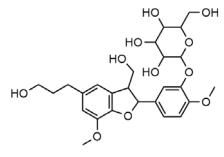
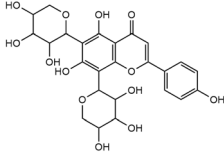
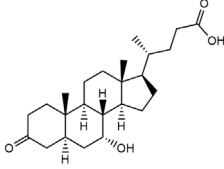
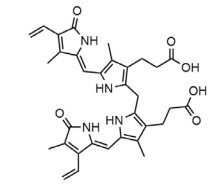
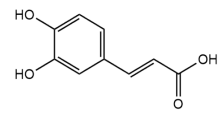
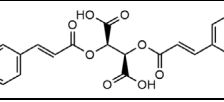
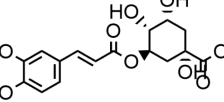
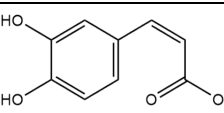
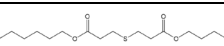
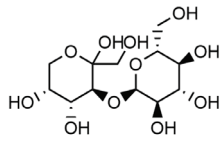
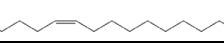
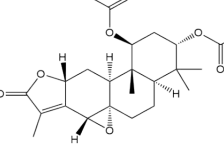
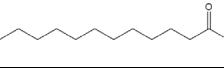
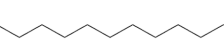
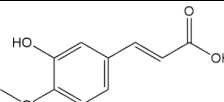
Tabela 1 suplementar. Parâmetros do software MZMine2 usados para processar os dados de folha +1 e entrenó +3.

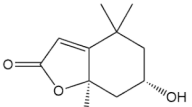
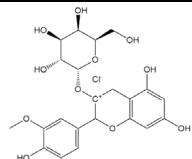
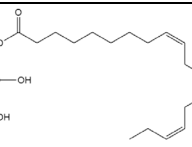
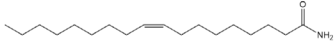
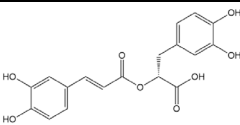
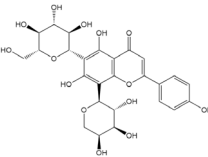
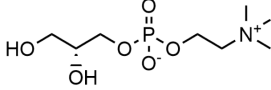
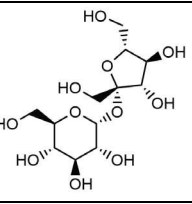
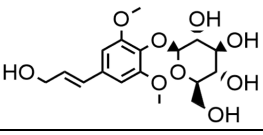
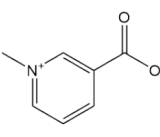
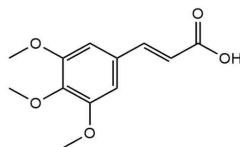
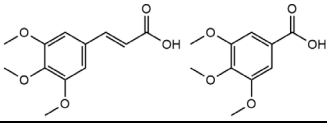
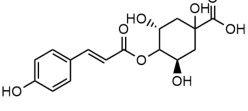
	Parâmetros	Entrenó +3	Folha +1
Mass Detection	MS level 1: Noise level	2.00E+04	1.00E+03
	MS level 2: Noise level	0	5.00E+02
	Mass detector	Centroid	Centroid
ADAP Chromatogram Builder	Min group size # of scans	5	5
	Group intensity threshold	2.00E+04	1.00E+03
	Min highest intensity	1.00E+05	1.00E+04
	m/z tolerance	0.0 m/z (or 10 ppm)	0.0 m/z (or 20 ppm)
Chromatogram Deconvolution	Algorithm	Baseline cut-off	Baseline cut-off
	Min peak height	1.00E+05	1.00E+04
	Peak duration range (min)	0-2	0-2
	Baseline level	2.00E+04	2.00E+04
	m/z center calculation	MEDIAN	MEDIAN
	m/z range for MS2 scan pairing (Da)	0.01	0.01
	RT range for MS2 Scan Pairing (min)	0.1	0.1
Isotopic Peaks Grouper	m/z tolerance	0.0 m/z (or 10 ppm)	0.0 m/z (or 20 ppm)
	Retention time tolerance (absolute: min)	0.2	0.2
	Monotonic shape	No	No
	Maximum charge	3	3
	Representative isotope	Lowest m/z	Lowest m/z
RANSAC Aligner	m/z tolerance	0.0 m/z (or 10 ppm)	0.0 m/z (or 10 ppm)
	RT tolerance	0.3	0.3
	RT Tolerance After Correction	0.1	0.1
	RANSAC Iterations	2000	2000
	Minimum Number of Points	70%	70%
	Threshold Value	0.5	0.5
	Liner Model	No	No
	Require Same Charge State	No	No
Gap Filling	Same RT and m/z Range Gap Filter - m/z tolerance	0.0 m/z (or 10 ppm)	0.0 m/z (or 10 ppm)
Duplicate Filter Peak	Filter Mode	New Average	New Average
	m/z tolerance	0 m/z (or 10 ppm)	0 m/z (or 10 ppm)
	RT Tolerance	0.1 Absolute (Min)	0.1 Absolute (Min)
	Require Same Identification	No	No
	Remove Original Peaklist	No	No

Tabela 2 suplementar. Lista de compostos final recuperados na folha+1 a partir do banco de dados GNPS. CA – cana-de-açúcar e CE – cana-energia.

Compostos	ID PubChen	m/z	Formula Molecular	Cultivar	Tempo CE	Tempo CA	Tecido	Vias	Estrutura Molecular
(2S,3S,4S,5R,6R)-6-(3-Benzoyloxy-2-hydroxypropoxy)-3,4,5-trihydroxyoxane-2-carboxylic acid	45783079	372.32	C16H20O10	CA	-	0, 06, 12, 18h	Folha	-	
3-Feruloylquinic acid	10133609	368.3	C17H20O9	CA	-	12h	Folha	-	
3-O-Feruloylquinic acid	9799386	368.3	C17H20O9	CA	-	12h	Folha	-	
4-O-Feruloyl-D-quinic acid	10177048	368.3	C17H20O9	CA	-	12h	Folha	-	

Dianthoside	5316639	288.25	C12H16O8	CA	-	12h	Folha e Colmo	-	
Dibutyl phthalate	3026	278.34	C16H22O4	CA	-	0h	Folha e Colmo	-	
PC(18:3(9Z,12Z,15Z)/18:3(9Z,12Z,15Z))	24778990	778	C44H76NO8P	CA	-	12h	Folha	-	
Tricin 5-glucoside	49800176	492.4	C23H24O12	CA	-	12h	Folha	-	
(2-([3-(hexadecanoyloxy)-2-[icosa-5,8,11,14-tetraenoyloxy]propyl phosphonato]oxy)ethyl)trimethylazanium	-	782.56	-	CA e CE	0, 06, 12, 18, 24h	0, 06, 12, 18, 24h	Folha	-	
(22E)-3alpha,12alpha-Dihydroxy-5beta-chol-22-en-24-oic Acid	5283987	390.6	C24H38O4	CA e CE	0, 06, 12 h	0, 12, 24h	Folha	-	
(2R,3R,4S,5S,6R)-2-[3-Hydroxy-1-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-2-[4-(E)-3-hydroxyprop-1-enyl]-2-methoxyphenoxy]propoxy]-6-(hydroxymethyl)oxane-3,4,5-triol	56776174	538.5	C26H34O12	CA e CE	0, 06, 12, 18, 24h	12, 18, 24h	Folha	-	
(3R,5S)-4-[(E)-3-(3,4-Dihydroxyphenyl)prop-2-enoyloxy]-1,3,5-trihydroxycyclohexane-1-carboxylic acid	5315600	354.31	C16H18O9	CA e CE	0, 06, 12, 18, 24h	0, 12, 18, 24h	Folha e Colmo	-	
[(1S,2R,4Ar,8aR)-1-acetyloxy-1,4a-dimethyl-6-oxo-7-propan-2-ylidene-2,3,4,5,8,8a-hexahydronaphthalen-2-yl]-2,3-dimethylloxirane-2-carboxylate	14414238	392.5	C22H32O6	CA e CE	12, 18h	0, 24h	Folha e Colmo	-	
[(4S,4Ar,5S,8S,8aS)-4-acetyloxy-3,4a,5-trimethyl-9-oxo-4,5,6,7,8,8a-hexahydrobenzo[f][1]benzofuran-8-yl] acetate	23843927	348.4	C19H24O6	CA e CE	0, 06, 12, 18, 24h	12, 24h	Folha	-	
1-Hexadecanoyl-2-octadecadienoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	-	758.569	-	CA e CE	0, 06, 12, 18, 24h	0, 06, 12, 18, 24h	Folha	-	
1-Hexadecanoyl-sn-glycerol	3084463	330.5	C19H38O4	CA e CE	0, 06, 12, 18, 24h	0, 06, 18, 24h	Folha e Colmo	-	
1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	5497103	760.1	C42H82NO8P	CA e CE	0, 06, 12, 18, 24h	0, 06, 12, 18, 24h	Folha e Colmo	alpha-Linolenic acid metabolism; Arachidonic acid metabolism; Glycerophospholipid metabolism; Linoleic acid metabolism	
1-Palmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	460602	495.6	C24H50NO7P	CA e CE	0, 06, 12, 18, 24h	0, 06, 12, 24h	Folha e Colmo	Glycerophospholipid metabolism	

2-(Hydroxymethyl)-6-[5-(3-(hydroxymethyl)-5-(3-hydroxypropyl)-7-methoxy-2,3-dihydro-1-benzofuran-2-yl)-2-methoxyphenoxy]oxane-3,4,5-triol	23786385	522.5	C26H34O11	CA e CE	0, 06, 12, 18, 24h	18, 24h	Folha e Colmo	-	
5,7-Dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-6,8-bis(3,4,5-trihydroxyoxan-2-yl)chromen-4-one	14427338	534.5	C25H26O13	CA e CE	0, 06, 12, 18, 24h	12h	Folha	-	
7alpha-Hydroxy-3-oxo-5alpha-cholan-24-oic Acid	5283934	390.6	C24H38O4	CA e CE	24h	24h	Folha	-	
Bilirubin	5280352	584.7	C33H36N4O6	CA e CE	0, 06, 12, 18, 24h	0, 06, 12, 24h	Folha	-	
Caffeic acid	689043	180.16	C9H8O4	CA e CE	0, 06, 12, 18, 24h	0, 06, 12, 18, 24h	Folha	-	
Chicoric acid	5281764	474.4	C22H18O12	CA e CE	0, 06, 12, 18, 24h	0, 12, 18, 24h	Folha e Colmo	Phenylpropanoid biosynthesis; Flavonoid biosynthesis; Stilbenoid, diarylheptanoid and gingerol biosynthesis	
Chlorogenic acid	1794427	354.31	C16H18O9	CA e CE	0, 06, 12, 18, 24h	0, 06, 12, 18, 24h	Folha e Colmo	-	
cis-Caffeic acid	1549111	180.16	C9H8O4	CA e CE	0, 06, 12, 18, 24h	0, 06, 12, 18, 24h	Folha e Colmo	-	
Didodecyl 3,3'-thiodipropionate oxide	-	531.408	-	CA e CE	12, 18, 24h	12, 24h	Folha	-	
D-Turanose	54301978	342.3	C12H22O11	CA e CE	0, 06, 18, 24h	06, 12, 18, 24h	Folha	-	
Erucamide	5365371	337.6	C22H43NO	CA e CE	0, 06, 12, 18, 24h	0, 06, 12, 18, 24h	Folha e Colmo	-	
Gelomulide N	24775138	432.5	C24H32O7	CA e CE	0, 12, 24h	12, 18h	Folha e Colmo	-	
Glyceryl palmitate	14900	330.5	C19H38O4	CA e CE	0, 06, 12, 18, 24h	0, 06, 12, 18, 24h	Folha	-	
Hexadecanamide	69421	255.44	C16H33NO	CA e CE	0, 06, 12, 18, 24h	12, 24h	Folha	-	
Isoferulic acid	736186	194.18	C10H10O4	CA e CE	18h	06, 12, 18h	Folha	-	

Loliolide	100332	196.24	C11H16O3	CA e CE	0, 06, 12, 18, 24h	0, 06, 12, 18, 24h	Folha e Colmo	-	
Malvidin 3-O-galactoside	3568969	493,4	C23H25O12+	CA e CE	0, 06, 12, 18, 24h	0, 06, 12, 18, 24h	Folha	-	
Monolinolenin (9c,12c,15c)	-	353.26	-	CA e CE	0, 12h	0, 12h	Folha	-	
Oleamide	5283387	281.5	C18H35NO	CA e CE	0, 06, 12, 18, 24h	0, 06, 12, 18, 24h	Folha	-	
Rosmarinic acid	5281792	360.3	C18H16O8	CA e CE	0, 06, 12, 18, 24h	0, 06, 12, 18, 24h	Folha	-	
Schaftoside	3550102	564.5	C26H28O14	CA e CE	0, 06, 12, 18, 24h	0, 06, 12, 18, 24h	Folha e Colmo	-	
sn-Glycero-3-phosphocholine	657272	257.22	C8H20NO6P	CA e CE	-	0, 06, 12, 18, 24h	Folha	Glycerophospholipid metabolism	
Sucrose	5988	342.3	C12H22O11	CA e CE	0, 06, 12, 18, 24h	0, 06, 12, 18, 24h	Folha e Colmo	Galactose metabolism; Starch and sucrose metabolism	
Syringin	5316860	372.4	C17H24O9	CA e CE	0, 06, 12, 18	12h	Folha	-	
Trigonelline	5570	137.14	C7H7NO2	CA e CE	0, 06, 12, 24h	0, 06, 12, 18, 24h	Folha	-	
3,4,5-Trimethoxy cinnamic acid	735755	238.24	C12H14O5	CE	18h	-	Folha	-	
3,4,5-Trimethoxybenzoic acid;(E)-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)prop-2-enoic acid	68139046	450.4	C22H26O10	CE	18h	-	Folha	-	
4-p-Coumaroylquinic acid	5281766	338.31	C16H18O8	CE	0, 18h	-	Folha	-	

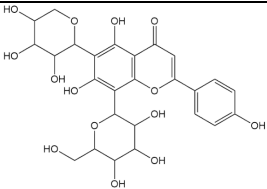
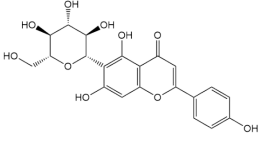
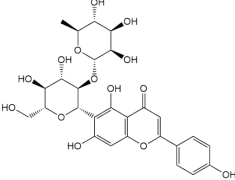
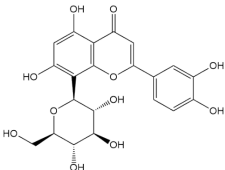
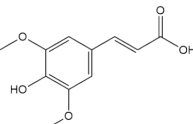
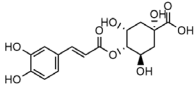
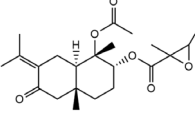
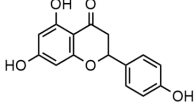
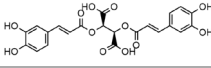
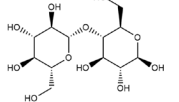
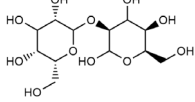
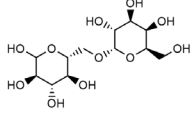
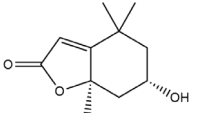
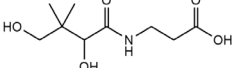
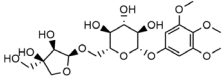
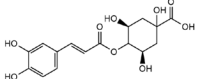
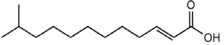
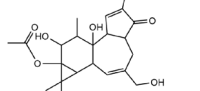
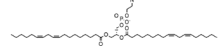
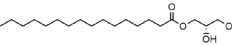
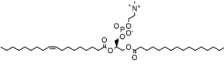
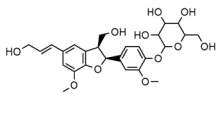
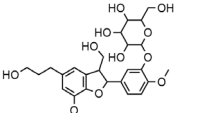
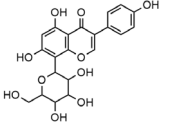
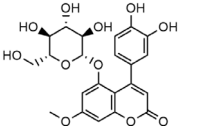
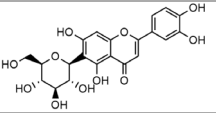
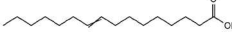
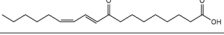
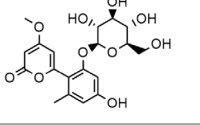
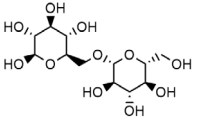
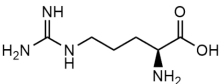
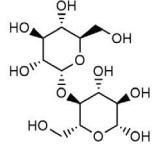
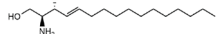
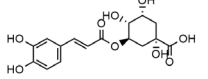
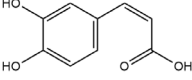
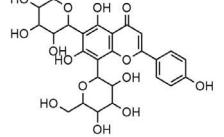
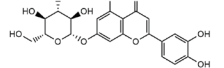
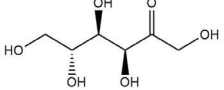
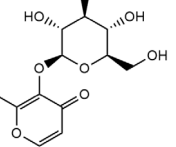
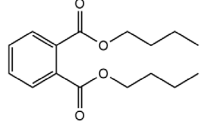
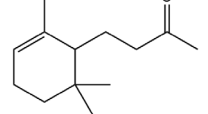
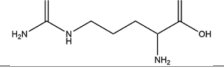

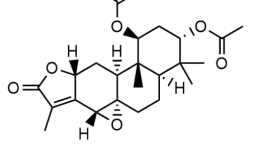
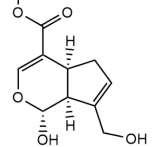
Corymboside	13644660	564.5	C26H28O14	CE	0, 06, 12, 18, 24h	-	Folha e Colmo	-	
Isovitexin	162350	432.4	C21H20O10	CE	12, 18h	-	Folha e Colmo	-	
Isovitexin 2"-O-rhamnoside	23844078	578.5	C27H30O14	CE	12, 18h	-	Folha e Colmo	-	
Orientin	5281675	448.4	C21H20O11	CE	0, 06, 12, 18, 24h	-	Folha e Colmo	-	
Sinapic acid	637775	224.21	C11H12O5	CE	12, 18h	-	Folha	-	

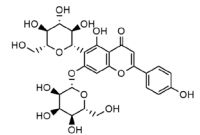
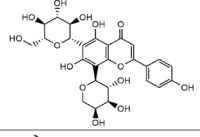
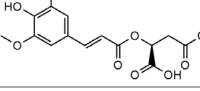
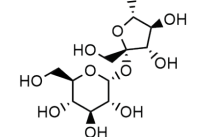
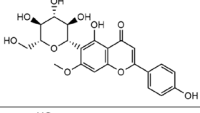
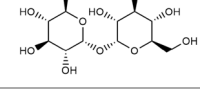
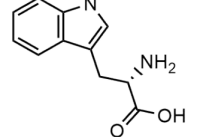
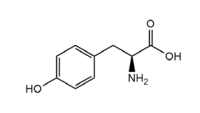
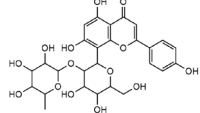
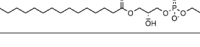
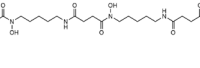
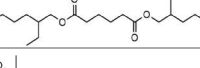
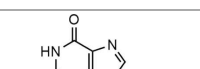
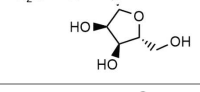
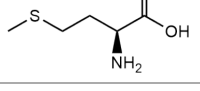
Tabela 3 suplementar. Lista de compostos final recuperados no entrenó+3 pelo banco de dados GNPS. CA – cana-de-açúcar e CE – cana-energia.

Compostos	ID PubChen	m/z	Formula Molecular	Cultivar	Tempo CE	Tempo CA	Tecido	Vias	Estrutura Molecular
(1S,3R,4R,5R)-3-[(E)-3,4,4-dihydroxyphenyl]prop-2-enyl]oxy-1,4,5-trihydroxycyclohexanecarboxylic acid	6479419	535.5	C25H29NO12	CA	-	12h	Colmo	-	
[(1S,2R,4Ar,8aR)-1-acetyloxy-1,4a-dimethyl-6-oxo-7-propan-2-ylidene-2,3,4,5,8,8a-hexahydronaphthalen-2-yl] 2,3-dimethylxirane-2-carboxylate	14414238	392.5	C22H32O6	CA	-	06h	Colmo e Folha	-	
5,7-Dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)chroman-4-one	932	272.25	C15H12O5	CA	-	12h	Colmo	-	
Chicoric acid	5281764	474.4	C22H18O12	CA	-	06h	Colmo e Folha	-	
D-(+)-Cellobiose	10712	342.3	C12H22O11	CA	-	06, 24h	Colmo	-	
D-Mannopyranose, 2-O-alpha-D-mannopyranosyl-	91746263	342.3	C12H22O11	CA	-	24h	Colmo	-	
D-Melibiose	440658	342.3	C12H22O11	CA	-	06h	Colmo	-	

Loliolide	100332	196.24	C11H16O3	CA	-	24h	Colmo e Folha	-	
Pantothenic acid	6613	219.23	C9H17NO5	CA	-	06, 18h	Colmo	-	
(2R,3S,4S,5R,6S)-2-[[[(2S,3R,4R)-3,4-Dihydroxy-4-(hydroxymethyl)oxolan-2-yl]oxymethyl]-6-(3,4,5-trimethoxyphenoxy)oxane-3,4,5-triol	23928091	478.4	C20H30O13	CA e CE	12, 24h	06, 12, 18, 24h	Colmo	-	
(3R,5S)-4-[(E)-3-(3,4-Dihydroxyphenyl)prop-2-enyl]oxy-1,3,5-trihydroxycyclohexanecarboxylic acid	5315600	354.31	C16H18O9	CA e CE	24h	18h	Colmo e Folha	-	
(E)-11-Methyldodec-2-enoic acid	11435803	212.33	C13H24O2	CA e CE	24h	24h	Colmo	-	
[1,14-Dihydroxy-8-(hydroxymethyl)-4,12,15-tetramethyl-5-oxo-13-tetracyclo[8.5.0.0.2.6.0 11,13]pentadeca-3,8-dienyl] acetate	45360040	390.5	C22H30O6	CA e CE	06, 12, 18, 24h	06, 12, 18, 24h	Colmo	-	
1,2-Dilinoleoyl-SN-glycero-3-phosphocholine	5288075	782.1	C44H80NO8P	CA e CE	24h	12, 24h	Colmo	-	
1-Hexadecanoyl-sn-glycerol	3084463	330.5	C19H38O4	CA e CE	18h	12h	Colmo e Folha	-	
1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	5497103	760.1	C42H82NO8P	CA e CE	24h	12, 24h	Colmo e Folha	Linoleic acid metabolism; Glycerophospholipid metabolism; Arachidonic acid metabolism; alpha-Linolenic acid metabolism	
2-(Hydroxymethyl)-6-[4-[(2S,3S)-3-(hydroxymethyl)-5-[(E)-3-hydroxyprop-1-enyl]-7-methoxy-2,3-dihydro-1-benzofuran-2-yl]-2-methoxyphenoxy]oxane-3,4,5-triol	23786437	520.5	C26H32O11	CA e CE	06, 12, 18, 24h	06, 12, 18, 24h	Colmo	-	
2-(Hydroxymethyl)-6-[5-[3-(hydroxymethyl)-5-(3-hydroxypropyl)-7-methoxy-2,3-dihydro-1-benzofuran-2-yl]-2-methoxyphenoxy]oxane-3,4,5-triol	23786385	522.5	C26H34O11	CA e CE	06, 18h	12, 24h	Colmo e Folha	-	
3-Genistein-8-C-glucoside	5472471	432.4	C21H20O10	CA e CE	18h	12h	Colmo	-	
4-(3,4-Dihydroxyphenyl)-7-methoxy-5-[[[2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxy]chromen-2-one	13962183	462.4	C22H22O11	CA e CE	06, 18, 24h	24h	Colmo	-	
4H-1-Benzopyran-4-one, 2-(3,4-dihydroxyphenyl)-6-beta-D-glucopyranosyl-5,7-dihydroxy-	6426860	448.4	C21H20O11	CA e CE	06, 12, 24h	06, 12, 24h	Colmo	-	
9-Hexadecenoic acid	5282745	254.41	C16H30O2	CA e CE	12, 18, 24h	06h	Colmo	Fatty acid biosynthesis	
9-OxoODE	9839084	294.4	C18H30O3	CA e CE	18h	24h	Colmo	-	
Aloenin	162305	410.4	C19H22O10	CA e CE	12, 18, 24h	06, 18, 24h	Colmo	-	
alpha-Gentiobiose	12302012	342.3	C12H22O11	CA e CE	12, 24h	06, 18h	Colmo	-	

Arginine	6322	174.2	C6H14N4O2	CA e CE	06, 12, 24h	06, 12, 18h	Colmo	Aminoacyl-tRNA biosynthesis; Arginine biosynthesis; Arginine and proline metabolism	
beta-Maltose	6255	342.3	C12H22O11	CA e CE	06, 18, 24h	24h	Colmo	-	
C16 Sphingosine	14767871	271.44	C16H33NO2	CA e CE	06, 12, 18, 24h	06, 12h	Colmo	-	
Chlorogenic acid	1794427	354.31	C16H18O9	CA e CE	06, 12, 24h	06, 12, 18, 24h	Colmo e Folha	Stilbenoid, diarylheptanoid and gingerol biosynthesis; Pterylpropanoid biosynthesis; Flavonoid biosynthesis	
cis-Caffeic acid	1549111	180.16	C9H8O4	CA e CE	06, 12, 18, 24h	06, 12, 18, 24h	Colmo e Folha	-	
Corymboside	13644660	564.5	C26H28O14	CA e CE	06, 12, 24h	06, 18h	Colmo e Folha	-	
Cynaroside	5280637	448.4	C21H20O11	CA e CE	12h	12h	Colmo	-	
D-Fructose	2723872	180.16	C6H12O6	CA e CE	06, 12, 18, 24h	06, 12, 18, 24h	Colmo	Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	
Dianthoside	5316639	288.25	C12H16O8	CA e CE	06, 12, 18, 24h	06, 12, 18, 24h	Colmo e Folha	-	
Dibutyl phthalate	3026	278.34	C16H22O4	CA e CE	06, 12, 18, 24h	06, 12, 18, 24h	Colmo e Folha	-	
Dihydro-alpha-ionone	35821	194.31	C13H22O	CA e CE	06, 12, 18, 24h	06, 12, 18, 24h	Colmo	-	
DL-Arginine	232	174.2	C6H14N4O2	CA e CE	06, 12h	06, 12, 24h	Colmo	-	
Erucaimide	5365371	337.6	C22H43NO	CA e CE	12, 24h	06, 24h	Colmo e Folha	-	
Gelomulide N	24775138	432.5	C24H32O7	CA e CE	06h	06, 12, 18, 24h	Colmo e Folha	-	
Genipin	442424	226.23	C11H14O5	CA e CE	06, 12, 18, 24h	06, 12, 18, 24h	Colmo	-	

Glutamic acid	33032	147.13	C5H9NO4	CA e CE	06, 24h	06, 12h	Colmo	Nitrogen metabolism; Butanoate metabolism; Alanine, aspartate and glutamate metabolism; Glutathione metabolism; Glyoxylate and dicarboxylate metabolism; Porphyrin and chlorophyll metabolism	
Glutamine	5961	146.14	C5H10N2O3	CA e CE	06h	24h	Colmo	Aminoacyl-tRNA biosynthesis; Arginine biosynthesis; Arginine and proline metabolism; Purine metabolism; Pyrimidine metabolism	
Glutathione	124886	307.33	C10H17N3O6 S	CA e CE	06h	12h	Colmo	-	
Hyocholic acid	92805	408.6	C24H40O5	CA e CE	12h	06h	Colmo	-	
Isovitexin	162350	432.4	C21H20O10	CA e CE	06, 12, 18, 24h	18, 24h	Colmo e Folha	-	
Isovitexin 2"-O- arabinside	44468060	564.5	C26H28O14	CA e CE	06, 18, 24h	06, 12, 18, 24h	Colmo	-	
Isovitexin 2"-O- rhamnoside	23844078	578.5	C27H30O14	CA e CE	18h	12, 24h	Colmo e Folha	-	
Melezitose	92817	504.4	C18H32O16	CA e CE	06, 12, 18, 24h	06, 12, 18, 24h	Colmo	-	
Myristoleic acid	5281119	226.35	C14H26O2	CA e CE	06, 12, 18, 24h	06, 12, 18, 24h	Colmo	-	
N,N-Bis(2- hydroxyethyl)dodecan amide	8430	287.44	C16H33NO3	CA e CE	24h	18h	Colmo	-	
N- Butylbenzenesulfona mide	19241	213.3	C10H15NO2S	CA e CE	06, 12, 18, 24h	06, 12, 18, 24h	Colmo	-	
Orientin	5281675	448.4	C21H20O11	CA e CE	06, 12, 18, 24h	06, 12, 18, 24h	Colmo e Folha	-	
Palatinose	439559	342.3	C12H22O11	CA e CE	06, 12, 18, 24h	06, 12, 18, 24h	Colmo	-	
Palmitoleic acid	445638	254.41	C16H32O2	CA e CE	06, 12, 18, 24h	06, 12, 24h	Colmo	-	
Phenylalanine	6140	165.19	C9H9NO2	CA e CE	06, 12, 24h	06, 18, 24h	Colmo	Aminoacyl-tRNA biosynthesis; Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis; Glucosinolate biosynthesis; Tropane, piperidine and pyridine alkaloid biosynthesis; Phenylpropanoid biosynthesis; Phenylalanine metabolism; Cyanoamino acid metabolism	
Phytosphingosine	122121	317.5	C18H39NO3	CA e CE	06, 18, 24h	18, 24h	Colmo	Sphingolipid metabolism	

Saponarin	441381	594.5	C27H30O15	CA e CE	06, 18h	24h	Colmo	-	
Schaftoside	3550102	564.5	C26H28O14	CA e CE	06, 18h	12, 24h	Colmo e Folha	-	
Sinapoyl malate	14605050	340.28	C15H16O9	CA e CE	18h	12, 24h	Colmo	Phenylpropanoid biosynthesis	
Sucrose	5988	342.3	C12H22O11	CA e CE	06, 12, 18, 24h	06, 12, 18, 24h	Colmo e Folha	Starch and sucrose metabolism; Galactose metabolism	
Swertisin	124034	446.4	C22H22O10	CA e CE	06, 12, 18h	12, 24h	Colmo	-	
Trehalose	7427	342.3	C12H22O11	CA e CE	06, 12, 18h	06, 18h	Colmo	-	
Tryptophan	6305	204.22	C11H12N2O2	CA e CE	06, 12, 18, 24h	06, 12, 18, 24h	Colmo	Aminoacyl-tRNA biosynthesis; Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis; Indole alkaloid biosynthesis; Glucosinolate biosynthesis; Tryptophan metabolism; Glycine, serine and threonine metabolism	
Tyrosine	6057	181.19	C9H9NO3	CA e CE	06, 12, 18, 24h	06, 12, 18, 24h	Colmo	Aminoacyl-tRNA biosynthesis; Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis; Isoquinoline alkaloid biosynthesis; Tyrosine metabolism; Ubiquinone and other terpenoid-quinone biosynthesis	
Vitexin 2"-O-rhamnoside	5282151	578.5	C27H30O14	CA e CE	06, 12, 18h	12, 24h	Colmo	-	
1-Palmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	460602	495.6	C24H50NO7P	CE	12, 24h	-	Colmo e Folha	Glycerophospholipid metabolism	
4-[5-[[4-[5-[Acetyl(hydroxyamino)pentylamino]-4-oxobutanoyl]-hydroxyamino]pentylamino]-4-oxobutanoic acid	57509383	460.5	C20H36N4O8	CE	24h	-	Colmo	-	
Bis(2-ethylhexyl) adipate	7641	370.6	C22H42O4	CE	06h	-	Colmo	-	
Dodecyltrimethylammonium chloride	15433	229.4	C14H31NO	CE	24h	-	Colmo	-	
Guanosine	135398635	283.24	C10H13N5O5	CE	18h	-	Colmo	-	
Methionine	6137	149.21	C5H11NO2S	CE	24h	-	Colmo	Aminoacyl-tRNA biosynthesis; Glucosinolate biosynthesis; Cysteine and methionine metabolism	

ANEXOS

Nas páginas a seguir, está o anexo do documento referente a bioética e biossegurança e a declaração referente aos direitos autorais.

DECLARAÇÃO

Em observância ao **§5º do Artigo 1º da Informação CCPG-UNICAMP/001/15**, referente a Bioética e Biossegurança, declaro que o conteúdo de minha Dissertação de Mestrado, intitulada “**Análise da variação diurna de carboidratos e metabólitos de cana-energia e cana-de-açúcar**”, desenvolvida no Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular do Instituto de Biologia da Unicamp, não versa sobre pesquisa envolvendo seres humanos, animais ou temas afetos a Biossegurança.



Assinatura: _____
Nome do(a) aluno(a): Jovanderson Jackson Barbosa da Silva



Assinatura: _____
Nome do(a) orientador(a): Marcelo Falsarella Carazzolle

Data: 26/02/2021

Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **Análise da variação diurna de carboidratos e metabólitos de cana-energia e cana-de-açúcar**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 26 de fevereiro de 2021.

Assinatura : _____



Nome do(a) autor(a): **Jovanderson Jackson Barbosa da Silva**

RG n.º 003.037.228

Assinatura : _____



Nome do(a) orientador(a): **Marcelo Falsarella Carazzolle**

RG n.º 25418564-2