

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA**

**MARIANA BEATRIZ TEIXEIRA DINIZ**

**AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DA CANA-DE-AÇÚCAR FRENTE À PRAGA  
BROCA DA CANA (*Diatraea saccharalis*) UTILIZANDO ANÁLISES  
CROMATOGRÁFICAS E MODELOS QUIMIOMÉTRICOS DE CLASSIFICAÇÃO A  
PARTIR DE DADOS ESPECTROSCÓPICOS**

**VIÇOSA – MINAS GERAIS  
2023**

**MARIANA BEATRIZ TEIXEIRA DINIZ**

**AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DA CANA-DE-AÇÚCAR FRENTE À PRAGA  
BROCA DA CANA (*Diatraea saccharalis*) UTILIZANDO ANÁLISES  
CROMATOGRÁFICAS E MODELOS QUIMIOMÉTRICOS DE CLASSIFICAÇÃO A  
PARTIR DE DADOS ESPECTROSCÓPICOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientadora: Maria Eliana L. R. de Queiroz

Coorientadores:

Márcio Henrique Pereira Barbosa  
Reinaldo Francisco Teófilo

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

D585a  
2023  
Diniz, Mariana Beatriz Teixeira, 1992-  
Avaliação da resistência da cana-de-açúcar frente à praga  
broca da cana (*Diatraea saccharalis*) utilizando análises  
cromatográficas e modelos quimiométricos de classificação a  
partir de dados espectroscópicos / Mariana Beatriz Teixeira  
Diniz. – Viçosa, MG, 2023.

1 tese eletrônica (82 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa,  
Departamento de Química, 2023.

Referências bibliográficas: f. 76-82.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2023.333>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Cromatografia a gás. 2. Quimiometria.  
3. Cana-de-açúcar - Resistência a doenças e pragas. 4. Broca da  
cana-de-açúcar. 5. Friedelina. I. Queiroz, Maria Eliana Lopes  
Ribeiro de, 1958-. II. Universidade Federal de Viçosa.  
Departamento de Química. Programa de Pós-Graduação em  
Agroquímica. III. Título.

CDD 22. ed. 543.85

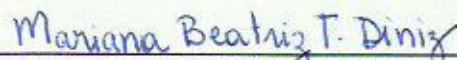
**MARIANA BEATRIZ TEIXEIRA DINIZ**

**AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DA CANA-DE-AÇÚCAR FRENTE À PRAGA  
BROCA DA CANA (*Diatraea saccharalis*) UTILIZANDO ANÁLISES  
CROMATOGRÁFICAS E MODELOS QUIMIOMÉTRICOS DE CLASSIFICAÇÃO A  
PARTIR DE DADOS ESPECTROSCÓPICOS**

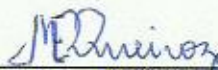
Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 28 de fevereiro de 2023

Assentimento:



Mariana Beatriz Teixeira Diniz  
Autora



Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz  
Orientadora

A todos aqueles que buscam a realização  
profissional no árduo caminho da ciência

## **AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS**

À Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Química e ao Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, pela oportunidade de realização do doutorado.

À professora Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz pela participação em toda minha formação acadêmica e em especial pela orientação nesta última etapa.

Aos professores Márcio Henrique Pereira Barbosa e Reinaldo Francisco Teófilo pela oportunidade de trabalhar neste projeto e por toda orientação ao longo desses anos.

Aos professores membros da banca, Antônio Augusto Neves, Deusanilde de Jesus Silva, Jemmyson Romário de Jesus e Reinaldo Francisco Teófilo pela disponibilidade.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar a pós-graduação.

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

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão da bolsa de estudos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro para realização do presente trabalho.

## **AGRADECIMENTOS PESSOAIS**

Ao Pedro, por partilhar comigo os caminhos que trilhei desde 2009, sempre comemorando as minhas vitórias por menores que fossem e me consolando nas derrotas, com amor, carinho, dedicação e alegria. Obrigada por fazer da nossa morada um lar aconchegante, repleto de risos, amor e amizade. Nunca existiria melhor companhia para o trajeto até aqui.

À minha família por acreditar que fosse possível e que, sendo possível, eu conseguiria. Por terem depositado em mim tamanha fé que serviu como inspiração para continuar nos momentos mais difíceis.

Aos meus amigos Cintia, Juliana, Mateus e Ricardo por todos os momentos de alegria que me proporcionaram ao longo de tantos anos. Agradeço ainda mais por serem o porto onde eu pudesse recorrer em absolutamente todas as ocasiões. Vocês fazem a vida ser mais feliz.

Aos amigos do LAQUA que me viram crescer profissionalmente e cresceram comigo até aqui.

A todos vocês,

o meu mais sincero e genuíno obrigada!

*“Durante toda a minha vida, as novas descobertas sobre a natureza me alegraram como uma criança”*

(Marie Curie)

## RESUMO

DINIZ, Mariana Beatriz Teixeira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2023. **Avaliação da resistência da cana-de-açúcar frente à praga broca da cana (*Diatraea saccharalis*) utilizando análises cromatográfica e modelos quimiométricos de classificação a partir de dados espectroscópicos.** Orientadora: Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz. Coorientadores: Márcio Henrique Pereira Barbosa e Reinaldo Francisco Teófilo.

Desde sua adaptação em solo brasileiro, a cana-de-açúcar sempre foi parte da economia do país, chegando a produzir mais de meio bilhão de toneladas por safra nos últimos anos. Apesar de ser uma cultura bem estabelecida nas nossas condições climáticas, seu cultivo pode ser afetado por diversos fatores, sendo um deles a infestação de pragas como as larvas da mariposa *Diatraea saccharalis* (broca da cana). Entretanto, alguns genótipos desenvolvidos com melhoramento genético apresentam resistência ao ataque da broca. Neste trabalho, foi feita a identificação de 28 compostos presentes na cera de folhas de cana-de-açúcar e um dos compostos identificados (friedelina) foi quantificado. Os teores de friedelina se mostraram diferentes na maioria dos genótipos resistentes e suscetíveis. Os genótipos resistentes apresentaram teores de friedelina superiores a 0,35 g em 100 g de cera, com exceção de dois genótipos que apresentaram concentrações de friedelina abaixo desse valor. Nos genótipos suscetíveis, o teor de friedelina observado foi inferior a 0,26 g a cada 100 g de cera, ou não foram detectados. Neste trabalho, também foi desenvolvido um modelo de classificação, quanto à resistência dos genótipos com base em espectros de infravermelho próximo obtidos das folhas da cana-de-açúcar. Para isso, foi utilizado o método quimiométrico de quadrados mínimos parciais para análise discriminante (Partial Least Squares Discriminant Analysis, PLS-DA) juntamente com um método de seleção de variáveis chamado “Seleção de Preditores Ordenados” (OPS). O modelo desenvolvido foi capaz de classificar corretamente os genótipos resistentes e suscetíveis com 11 meses após o plantio em campo, sendo sua principal vantagem não necessitar de etapas de preparo de amostra e ser um método não destrutivo. Além disso, também foi feito um bioensaio com larvas da broca da cana, onde foi oferecida uma dieta contaminada com concentrações compatíveis de friedelina encontradas na cera das folhas da cana. Este ensaio foi realizado para

investigar se as concentrações de friedelina que foram encontradas eram responsáveis pela resistência exibida por alguns genótipos. As larvas foram acompanhadas durante sete dias e a maior taxa de mortalidade observada foi de 62,5%. Além disso, também foi observado um *déficit* de desenvolvimento nas larvas que ingeriram a dieta contaminada com friedelina em relação ao grupo de controle. Com isso, foi possível concluir que a friedelina faz parte do mecanismo de resistência desses genótipos, embora possa não ser o único.

Palavras-chave: Cromatografia gasosa. Quimiometria. Cana-de-açúcar. Broca da cana. Friedelina.

## ABSTRACT

DINIZ, Mariana Beatriz Teixeira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2023. **Evaluation of sugarcane resistance against the sugarcane borer pest (*Diatraea saccharalis*) using chromatographic analyzes and chemometric classification models based on spectroscopic.** Adviser: Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz. Co-advisers: Márcio Henrique Pereira Barbosa and Reinaldo Francisco Teófilo

Since its adaptation on Brazilian soil, sugarcane has always been part of the country's economy, producing more than half billion tons per harvest in recent years. Despite being a well-established crop in the territory, its cultivation can be affected by several factors, one of which is the infestation of pests such as larvae of the moth *Diatraea saccharalis* (sugarcane borer). However, some genotypes developed with genetic improvement show resistance to the borer attack. In this work, 28 compounds present in sugarcane leaf wax were identified and one of the identified compounds (friedelin) was quantified. Friedelin levels were different in most resistant and susceptible genotypes. Resistant genotypes had friedelin levels greater than 0.35 g in 100 g of wax, with the exception of two genotypes that had friedelin concentrations below this value. In susceptible genotypes, the friedelin content observed was less than 0.26 g per 100 g of wax, or it was not detected. In this work, a classification model was also developed regarding the resistance of genotypes based on near infrared spectra obtained from sugarcane leaves. For this purpose, the partial least squares chemometric method for discriminant analysis (Partial Least Squares Discriminant Analysis, PLS-DA) was used together with a variable selection method called "Ordered Predictor Selection" (OPS). The developed model was able to correctly classify resistant and susceptible genotypes 11 months after field planting, with its main advantage not requiring sample preparation steps and being a non-destructive method. In addition, a bioassay was also carried out with sugarcane borer larvae, where a diet contaminated with compatible concentrations of friedelin found in the wax of sugarcane leaves was offered. This assay was performed to investigate whether the friedelin concentrations that were found were responsible for the resistance exhibited by some genotypes. Larvae were monitored for seven days, and the highest mortality rate observed was 62.5%. In addition, a development deficit was also observed in the larvae that ingested the diet contaminated with friedelin in relation to the control group.

Thus, it was possible to conclude that friedelin is part of the resistance mechanism of these genotypes, although it may not be the only one.

Keywords: Gas chromatography. Chemometrics. Sugarcane. Sugarcane borer. Friedelin.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Indivíduos adultos da espécie <i>Diatraea saccharalis</i> (AGROLINK).....	21
Figura 2: Comparação de um caule da cana saudável e um caule atacado pela broca, apresentando formação de galerias e contaminação de fungos oportunistas, levando à doença da podridão vermelha (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2018).....	22
Figura 3: Estrutura do triterpeno friedelina, encontrado em genótipos resistentes em estudos anteriores.....	23
Figura 4: Representação esquemática da matriz de dados X e seu correspondente vetor de classes y.....	28
Figura 5: Representação esquemática da relação entre o vetor de classe y e sua correspondente matriz de classes Y.....	28
Figura 6: Sistema de numeração utilizado para as folhas de cana-de-açúcar (KUIPJER, 1915).....	36
Figura 7: Comparação dos cromatogramas obtidos de dois genótipos classificados como suscetíveis (SUS) mostrando a diferença entre os perfis cromatográficos dentro de uma mesma classe.....	41
Figura 8: Comparação entre os cromatogramas de uma amostra sem friedelina (vermelho), da solução padrão do analito (verde) e de uma amostra contendo friedelina.....	43
Figura 9: Gráfico de resíduos da curva analítica.....	44
Figura 10: Teor de friedelina em g por 100 g de cera dos genótipos estudados antes da infestação (AI) e após a infestação (DI). Os dados destacados em verde correspondem aos dois genótipos de classificação desconhecida.....	48
Figura 11: Espectros obtidos com o espectrofotômetro de bancada (grupos A, B e C) com os espectros obtido com o espectrofotômetro portátil (grupos D, E e F), sendo as amostras em vermelho classificadas como suscetíveis e em preto como resistentes.....	55
Figura 12: Gráficos da classificação e previsão dos conjuntos de dados A (10 meses), B (11 meses) e C (12 meses) obtidos com espectrofotômetro de bancada Antaris e dos conjuntos de dados D (10 meses), E (11 meses) e F (12 meses) obtidos com espectrofotômetro portátil NIRScan Nano.....	61
Figura 13: Placa de Petri contendo o meio de cultura preparado, antes da transferência das larvas da broca da cana.....	67
Figura 14: Folha com as posturas dos ovos da mariposa da espécie <i>Diatraea saccharalis</i> transferida para a placa de Petri aguardando a eclosão.....	68

Figura 15: Posturas da mariposa da broca da cana um dia após a transferência para a placa de Petri. ....	69
Figura 16: Foto das posturas um dia antes da eclosão dos ovos.....	70
Figura 17: Larvas da broca da cana logo após a eclosão, transferidas para a placa de Petri. Dentro do retângulo é possível ver um dos indivíduos da espécie. ....	70
Figura 18: Porcentagem de mortalidade das brocas em função da concentração para o terceiro (A), quinto (B) e sétimo (C) dia.....	71
Figura 19: Comparação entre um indivíduo do grupo de controle (à direita) e um indivíduo cuja alimentação foi contaminada com friedelina (à esquerda). ....	74

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação dos 10 genótipos utilizados para identificação dos compostos presentes na cera, de acordo com avaliação em campo em relação a resistência frente a broca da cana.....	35
Tabela 2: Classificação dos 23 genótipos utilizados na quantificação dos compostos presentes na cera, de acordo com avaliação em campo, em relação a resistência frente a broca da cana. ....	35
Tabela 3: Lista dos compostos identificados na cera epicuticular da cana-de-açúcar dos genótipos estudados .....	41
Tabela 4: Teor de friedelina encontrado nas ceras dos diferentes genótipos estudados antes da infestação (AI) e depois da infestação (DI) com a broca da cana. ....	46
Tabela 5: Classificação como resistente (RES) ou suscetível (SUS) dos 30 genótipos utilizados de acordo com avaliação em campo em relação à broca da cana.....	53
Tabela 6: Organização dos grupos de amostras em relação ao instrumento utilizados nas análises e em relação à idade das mesmas quando foi realizada a coleta das folhas.....	54
Tabela 7: Resultados das figuras de mérito (sensibilidade, especificidade e erro) para os parâmetros de classificação, validação cruzada e previsão dos modelos quimiométricos utilizando o método PLS-DA para os dados obtidos com os espectrofotômetros Antaris II e NIRScan Nano.....	57
Tabela 8: Resultados das figuras de mérito (sensibilidade, especificidade e erro) para os parâmetros de classificação, validação cruzada e previsão dos modelos quimiométricos utilizando o método OPS-DA para os dados obtidos com os espectrofotômetros Antaris e NIRScan Nano.....	59

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL .....	16
CAPÍTULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	19
1.1. Cana-de-açúcar .....	20
1.1.2. Broca da cana .....	21
1.2. Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas .....	24
1.3. Espectroscopia no infravermelho próximo – NIR .....	25
1.4. Quimiometria .....	26
1.4.1. Reconhecimento de padrões .....	27
1.4.2. Quadrados mínimos parciais para análise discriminante (PLS-DA) .....	27
CAPÍTULO 2 – DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS PRESENTES NA CERA DAS FOLHAS DE CANA-DE-AÇÚCAR POR CROMATOLOGRAFIA GASOSA .....	31
2.1. INTRODUÇÃO .....	32
2.2. OBJETIVOS .....	33
2.2.1. Objetivo geral .....	33
2.2.2. Objetivos específicos .....	33
2.3. MATERIAL E MÉTODOS .....	33
2.3.1. Compostos químicos .....	33
2.3.2. Soluções padrão .....	34
2.3.3. Amostras .....	34
2.3.4. Extração sólido-líquido .....	36
2.3.5. Instrumentação e condições cromatográficas .....	37
2.3.6. Validação do método .....	38
2.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	40
2.4.1. Identificação .....	40
2.4.2. Validação do método .....	43
2.4.3. Quantificação .....	45
2.5. CONCLUSÕES .....	48
CAPÍTULO 3 – MODELOS QUIMIOMÉTRICOS A PARTIR DE DADOS ESPECTROSCÓPICOS DE INFRAVERMELHO-PRÓXIMO .....	50
3.1. INTRODUÇÃO .....	51
3.2. OBJETIVOS .....	52
3.2.1. Objetivo geral .....	52
3.2.2. Objetivos específicos .....	52

3.3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	53
3.3.1. Amostras e aquisição dos dados .....	53
3.3.2. Análise de dados .....	54
3.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	55
3.5. CONCLUSÕES .....	62
CAPÍTULO 4 – TESTE BIOLÓGICO .....	63
4.1. INTRODUÇÃO .....	64
4.2. OBJETIVOS .....	65
4.2.1. Objetivo geral.....	65
4.2.2. Objetivos específicos .....	65
4.3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	66
4.3.1. Preparo da dieta .....	66
4.3.2. Manejo das larvas da broca da cana .....	67
4.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	69
4.5. CONCLUSÕES .....	75
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	76

## INTRODUÇÃO GERAL

A cana-de-açúcar faz parte do grupo das gramíneas, sendo original da Ásia e Oceania, e foi introduzida na flora brasileira por volta do século XVI. Com o passar dos séculos se tornou um dos produtos essenciais na economia do país com produção superior a 620 milhões de toneladas ao ano (CAVALCANTE, 2011; COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2019).

Apesar da boa adaptação em solo brasileiro, a produção da cana depende de alguns fatores como irrigação e clima, bem como a presença de insetos nas plantações. No Brasil, cerca de 20% das perdas na produção se devem à infestação de pragas. Uma das pragas que podem atacar os canaviais é a larva da mariposa *Diatraea saccharalis*, popularmente conhecida como broca da cana. Após a postura e eclosão dos ovos, as larvas penetram no caule podendo causar desde perda de peso da planta até mesmo a morte de plantas mais jovens (FERRY, EDWARDS, *et al.*, 2004; DINARDO-MIRANDA, ANJOS, *et al.*, 2012; CHEAVEGATTI-GIANOTTO, ABREU, *et al.*, 2011).

Uma das formas de evitar perdas de rendimento nas lavouras é empregar genótipos que apresentem alta produção de açúcar e maior resistência ao ataque de insetos (MORAIS, CURSI, *et al.*, 2015). O melhoramento genético busca desenvolver genótipos com as qualidades citadas e para avaliar o sucesso do desenvolvimento, os novos genótipos devem ser plantados em campo e após o crescimento das plantas, é feita a infestação com a espécie de praga que se queira estudar. Esses genótipos são colhidos e avaliados tanto em relação à sua resistência ao ataque, quanto ao teor de açúcar e fibras. Nota-se que a avaliação da resistência desses genótipos demanda pelo menos o tempo correspondente ao amadurecimento dessas plantas além da remoção das mesmas do local de plantio (PURCELL, LEONARD, *et al.*, 2005). Portanto, o desenvolvimento de métodos não destrutivos capazes de prever a resistência da planta logo no início do plantio auxiliariam os pesquisadores a identificarem precocemente os genótipos que apresentam maior resistência à praga.

Métodos espectroscópicos de análises no infravermelho próximo (NIR) seriam uma alternativa interessante, pois as medidas de absorção podem ser feitas

diretamente nas folhas da cana, sem a necessidade de remoção das plantas e com um mínimo preparo das amostras (CALIARI, BARBOSA, *et al.*, 2017). Logo, este método não destrutivo, além de ser eficaz, simples e barato, permitiria o uso de equipamentos portáteis que poderiam ser levados a campo sem a necessidade de colheita da planta ou de suas partes. Os dados obtidos para as diferentes amostras de cana-de-açúcar podem ser tratados por métodos quimiométricos que permitem a identificação de genótipos resistentes e susceptíveis.

O uso de métodos quimiométricos, como os modelos de classificação utilizando quadrados mínimos parciais para análise discriminante (Partial Least Squares Discriminant Analysis, PLS-DA), é uma alternativa para avaliar a resistência dessas plantas frente ao ataque da broca da cana. Como PLS-DA é capaz de separar dados em grupos e prever em qual grupo um determinado resultado se encaixa, há a possibilidade de identificação dos genótipos resistentes e susceptíveis (NUNES, BRAGA, *et al.*, 2010).

Além disso, a cera produzida pela cana-de-açúcar, cuja função é impermeabilizar a superfície das folhas e caule também pode ser estudada com a finalidade de identificar genótipos mais resistentes. De modo geral essa cera é constituída de aldeídos, álcoois, ácidos graxos e hidrocarbonetos, cujas concentrações variam de um genótipo para outro (LAMBERTON e REDCLIFFE, 1960; FERREIRA, DEMUNER, *et al.*, 2005). Sendo assim, há a possibilidade de tal variação esteja relacionada à resistência observada em determinados genótipos (KOCH e ENSIKAT, 2008; EIGENBRODE e ESPELIE, 1995).

Para averiguar essa hipótese, o primeiro passo foi extrair a cera da cana, o que pode ser feito a partir de uma extração sólido-líquido convencional (PORTO, 2018). Depois de extraídos, os componentes da cera podem ser determinados utilizando um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas (GC-MS) que permite separar, identificar e quantificar os compostos presentes na cera (LISEC, SCHAUER, *et al.*, 2006). Os dados obtidos com essas análises também podem ser tratados por métodos quimiométricos, como o PLS-DA, com o objetivo de relacionar os resultados com as características dos genótipos estudados (TORAMAN, ABRAHAMSSON, *et al.*, 2018; SZYMANSKA, SACCENTI, *et al.*, 2012).

Após a identificação dos compostos que possivelmente são responsáveis pela resistência dos genótipos frente ao ataque da broca, é necessário realizar um bioensaio a fim de confirmar os resultados observados. Nesta etapa, as larvas da broca são alimentadas com dieta adequada para a sua espécie. Para parte desses indivíduos (população teste) deve-se oferecer alimentação contaminada com os constituintes da cera identificados nos genótipos resistentes, em diferentes concentrações. Sendo que a proporção de indivíduos pertencentes à população teste deve ser adequada para o número e concentração de compostos estudados. Os demais indivíduos (população de controle) recebem apenas a dieta original, sem adição de outros componentes. Um acompanhamento periódico deve ser realizado para verificar a mortalidade das larvas submetidas à cada tipo de alimentação. Uma vez que a mortalidade da população teste seja superior àquela apresentada pela população de controle, o composto em questão é atestado como responsável pela resistência da planta e mortalidade ou subdesenvolvimento da praga (MENA, 2010).

## **CAPÍTULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### 1.1. Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é uma planta pertencente ao grupo das gramíneas, que faz parte da família *Poaceae*, composta por angiospermas monocotiledôneas, oriunda da Índia. A difusão da cana na costa do Mar Mediterrâneo e do Oceano Índico ocorreu graças aos árabes e aos chineses, chegando posteriormente à Europa por volta do século VIII (CRONQUIST, 1981; RODRIGUES e ROSS, 2020).

O cultivo da cana-de-açúcar está intimamente relacionado ao crescimento e à história do Brasil, já que poucas décadas após a chegada dos portugueses foram construídos engenhos de açúcar na nova colônia, sendo o primeiro deles na então Capitania de São Vicente, onde hoje situa-se o estado de São Paulo (SCHWARTZ, 1988).

A cana adaptou-se muito bem em solo brasileiro e desde então a produção tem aumentado. O cultivo da cana-de-açúcar, que começou com o engenho de Martim Afonso de Sousa se tornou um dos produtos essenciais na economia do país chegando a 568,4 milhões de toneladas na safra 2021/22 podendo produzir 24,8 bilhões de litros de etanol e 33,9 milhões de toneladas de açúcar (PILETTI, 1996; FERREIRA, 1996; COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2021).

Para chegar a esse alto nível de produção, os programas de melhoramento genético foram indispensáveis nas últimas décadas, já que determinadas variedades não apresentam características apreciáveis à indústria. Somente a RIDESA (Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroenergético) desenvolveu 75 cultivares melhorados geneticamente desde 1990. Atualmente essas variedades desenvolvidas correspondem a 68% de toda área plantada no país (BARBOSA, RESENDE, *et al.*, 2012). Os programas de melhoramento genético avaliam variedades de cana-de-açúcar visando uma boa adaptabilidade da planta, alto teor de sacarose, tolerância às pragas e doenças além de características adequadas de fibra para moagem, a fim de melhorar o rendimento de açúcar e etanol produzidos. Um dos híbridos desenvolvidos por exemplo, combina o alto teor de açúcar da variedade *Saccharum officinarum* L. com a resistência da *Saccharum spontaneum* L. a doenças,

resultando em plantas com colmos mais suculentos e mais resistentes, diminuindo as perdas nas colheitas (Sugarcane (*Saccharum X officinarum*): A Reference Study for the Regulation of Genetically Modified Cultivars in Brazil, 2011).

Porém não é só a variedade da cana que afeta a produção já que o plantio no campo expõe essas plantas a fatores de stress como alterações climáticas, doenças e ataque de pragas. Um dos insetos que atacam as plantações de cana-de-açúcar são as larvas da mariposa *Diatraea saccharalis* conhecida como broca da cana.

### 1.1.2. Broca da cana

A broca da cana é uma espécie de mariposa nativa da região da América central que também pode ser encontrada nas regiões mais quentes da América do Sul. Segundo Quintana-Muñiz & Walker (QUINTANA-MUÑIZ e WALKER, 1970), as culturas mais atrativas para a oviposição são o milho, a cana-de-açúcar e o sorgo.

Os indivíduos adultos desta espécie possuem coloração marrom-amarelada (Figura 1), sendo que os machos podem chegar a 28 mm e as fêmeas até 39 mm. Esses artrópodes apresentam hábitos noturnos, permanecendo escondidos durante os horários de maior incidência solar (MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2007).



**Figura 1:** Indivíduos adultos da espécie *Diatraea saccharalis* (AGROLINK).

Após o acasalamento, as fêmeas da mariposa da espécie *Diatraea saccharalis* depositam os seus ovos nas folhas da cana-de-açúcar e em cerca de 4 dias as larvas

eclodem e passam a se alimentar do parênquima das folhas e conseqüentemente da cera presente nas mesmas. Com cerca de 15 dias, as larvas são capazes de furar e penetrar nos caules abrindo buracos e galerias (GALLO, NAKANO, *et al.*, 2002).

Os danos diretos causados pela broca são a quebra do caule, brotações e raízes laterais. Porém, também ocorrem danos indiretos como redução do teor de açúcar no caule e aumento do teor de fibra, associados à doença da podridão vermelha, ilustrada na Figura 2. Essa doença ocorre devido à entrada de microrganismos oportunistas como os fungos *Fusarium moniliforme* e *Colletotrichum falcatum* (LESLIE, 2004).

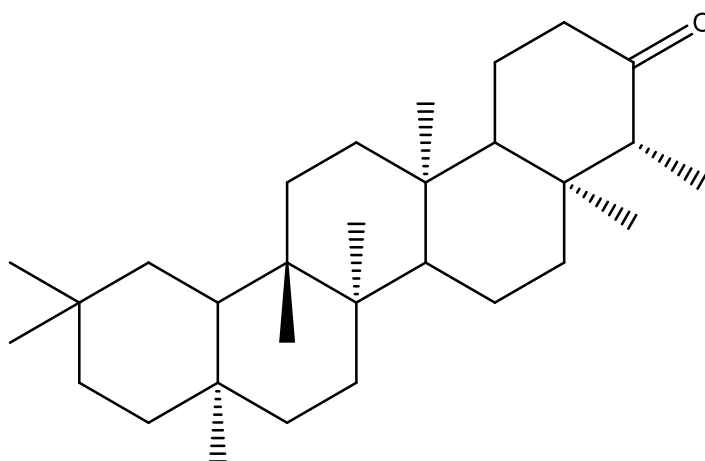


**Figura 2:** Comparação de um caule da cana saudável e um caule atacado pela broca, apresentando formação de galerias e contaminação de fungos oportunistas, levando à doença da podridão vermelha (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2018).

Com a expansão da área cultivada, os níveis de infestação têm crescido nos últimos anos. Outro fator que contribui para esse aumento nas infestações é a maior utilização da colheita mecanizada de plantações não queimadas. Essa mudança vem ocorrendo devido a pressões ambientais contra a queima, principalmente nas proximidades de áreas urbanas (EGGLESTON, ANTOINE, *et al.*, 2014). Em função disso, a conclusão do ciclo biológico do inseto é facilitada, assim como o conseqüente aumento de sua população.

Para controlar a população de broca da cana nas plantações, uma alternativa utilizada é a liberação em massa de parasitoides larvais, como as vespas *Cotesia flavipes*. Entretanto esse controle biológico apresenta algumas desvantagens, como por exemplo o alto custo da amostragem e monitoramento das populações da broca, necessária para indicar a quantidade de vespas a serem utilizadas e ainda o fato de o controle populacional realizado pelas vespas apresentarem eficácia moderada (GITAHY, SOUZA, *et al.*, 2007). Sendo assim, a resistência natural apresentada por certos genótipos é uma estratégia importante no manejo dessa cultura.

Essa resistência pode estar associada à cera epicuticular, característica da cana-de-açúcar que pode ser encontrada revestindo as folhas e o caule da planta, composta por hidrocarbonetos de cadeia longa, ácidos graxos, aldeídos, triterpenóides, entre outros (PURCELL, O'SHEA e KOKOT, 2009; ASIKIN, TAKAHASHI, *et al.*, 2012). A principal função da cera é criar uma barreira protetora contra a perda de água por evaporação e transpiração excessiva, porém há indícios de que esse componente natural da cana também está relacionado à resistência observada em alguns genótipos (DOMÍNGUEZ, HEREDIA, *et al.*, 1998). Em um estudo realizado em 1996 observou-se que genótipos cujas ceras continham maiores proporções de triacontanol e triacontanal em relação aos demais componentes apresentaram maior resistência frente a broca da cana (RUTHERFORD e STADEN, 1996). Mais recentemente também foi observado que um dos triterpenos encontrados na cera da cana-de-açúcar, a friedelina (Figura 3), estava relacionada aos genótipos resistentes (WARTHA, PORTO, *et al.*, 2022).



**Figura 3:** Estrutura do triterpeno friedelina, encontrado em genótipos resistentes em estudos anteriores.

A friedelina é um triterpeno pentacíclico que faz parte dos metabólitos secundários de algumas plantas como o “capim marandu”, uma espécie nativa da região amazônica e já foi observado em rejeitos de cana-de-açúcar (ROBERTS, 2007; SANTOS, FILHO, *et al.*, 2006; ATTARD, MCELROY, *et al.*, 2015). Estudos anteriores mostraram que a friedelina inibe o comportamento alimentar em insetos da mesma ordem da broca da cana, como larvas da espécie *Spodoptera littoralis*, levando à um consumo de alimentos reduzidos (MOITEIRO, CURTO, *et al.*, 2006).

Porém, para melhor aproveitar essa resistência natural que certos genótipos têm, é necessário que se faça a determinação dos compostos citados a partir, por exemplo, de análises cromatográficas e espectroscópicas que, por sua vez, podem ser aliadas à quimiometria.

## **1.2. Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas**

Uma das formas mais utilizadas de cromatografia nos últimos anos é a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Este tipo de técnica alia o alto poder de separação da cromatografia gasosa com a identificação dos compostos, oferecida pela espectrometria de massas. A cromatografia gasosa pode ser utilizada, por exemplo, para determinar componentes majoritários de óleos essenciais que possuem atividade antimicrobiana (SOUZA, PENTEADO, *et al.*, 2019), identificar metabólitos de raízes que possuem atividade anti-inflamatória (WONG, CHANG, *et al.*, 2011), quantificar certos compostos que atestam a qualidade de óleos vegetais (LIMA, SILVA, *et al.*, 2020), entre outros usos diversos.

Entretanto, essa técnica cromatográfica permite a separação apenas de compostos voláteis ou volatilizáveis presentes nas amostras. Sendo assim, na maioria dos casos é necessário um preparo de amostra cuidadoso, para garantir que somente compostos voláteis sejam injetados no cromatógrafo. Para este fim, pode-se empregar técnicas de extração como por exemplo, se a amostra for sólida, a extração sólido-líquido. Essa técnica é utilizada quando o analito presente em uma matriz sólida, pode ser extraído seletivamente com o uso de um solvente orgânico que seja adequado para injeção em cromatógrafo a gás (HARRIS, 2015).

Outra técnica que permite a extração de compostos voláteis presentes em amostras sólidas é a micro-extração em fase sólida com amostragem por headspace.

Nessa técnica é utilizado uma fibra extratora, geralmente feita de sílica fundida, que pode ser recoberta por uma fase polimérica líquida ou sólida, a qual é capaz de adsorver o analito de interesse. Essa fibra é introduzida no frasco de amostragem ficando suspensa sobre a amostra (headspace) e permanecendo por um determinado tempo enquanto adsorve os compostos voláteis. O frasco de amostragem pode ser aquecido antes ou durante a extração para facilitar a volatilização do analito. Ao final desta etapa, a fibra é removida do frasco e introduzida diretamente no injetor do cromatógrafo a gás, onde é aquecida, e os analitos são dessorvidos e injetados na coluna cromatográfica (ARTHUR e PAWLISZYN, 1990).

Além disso, outro ponto chave para as análises cromatográficas em fase gasosa é o ponto de ebulição dos compostos a serem determinados. Compostos cujos pontos de ebulição são próximos ou superiores à temperatura máxima de operação do instrumento podem condensar dentro da coluna diminuindo sua vida útil. Nesses casos, uma alternativa é derivatizar a amostra, convertendo os grupos de baixa volatilidade dos compostos, como os grupos carboxílicos, em grupos mais voláteis, como os trimetilsilil-ésteres (SOUSA, ROCHA e ROCHA, 2013).

Um exemplo em que esse tipo de preparo de amostra deve ser empregado, é justamente na determinação de compostos presentes na cera da cana-de-açúcar. Esse tipo de amostra apresenta vários compostos com cadeia carbônica grande, que pertencem, por exemplo, à classe dos álcoois e dos ácidos graxos, os quais apresentam pontos de ebulição próximos à temperatura máxima operacional do cromatógrafo a gás. Portanto uma alternativa para analisar essas amostras é a derivatização desses compostos adicionando um grupo trimetilsilil e diminuindo assim o ponto de ebulição desses compostos (PURCELL, LEONARD, *et al.*, 2005).

### **1.3. Espectroscopia no infravermelho próximo – NIR**

A espectroscopia de um modo geral estuda a interação da radiação eletromagnética com a matéria. No caso da espectroscopia no infravermelho próximo, o estudo baseia-se na interação da radiação compreendida na faixa de 12800 a 4000  $\text{cm}^{-1}$  (750 a 2500 nm) com a matéria, sendo que a energia proveniente desta radiação é capaz de promover alterações no estado vibracional das ligações moleculares (SKOOG, WEST, *et al.*, 2006).

Essas vibrações estão relacionadas ao momento dipolar das moléculas, desta forma, compostos orgânicos que apresentam ligações químicas entre átomos de hidrogênio e outros átomos, certamente mais eletronegativos, são predominantes nos espectros de infravermelho próximo. Devido à quantidade de ligações que apresentam essa característica em uma mesma molécula, os espectros de NIR se tornam complexos e aparentam não oferecer muitas informações em um primeiro momento. Além disso, um espectro de NIR geralmente apresenta bandas largas que podem se sobrepor dificultando ainda mais a interpretação dos resultados (SOUZA, BREITKREITZ, *et al.*, 2013). Entretanto, com o emprego de métodos quimiométricos de análise multivariada, os resultados obtidos com a espectroscopia NIR podem ser mais facilmente interpretados já que não é necessário que o analista avalie cada banda separadamente (PASQUINI, 2003; DRENNEN, KRAEMER e LODDER, 1991).

Uma das aplicações da combinação entre a espectroscopia no infravermelho próximo e a quimiometria, é a detecção e quantificação de adulteração em óleo de oliva (CHRISTY, KASEMSUMRAN, *et al.*, 2004; VIEIRA, ASSIS, *et al.*, 2021). Essa técnica pode ser usada ainda na identificação de drogas ilícitas como por exemplo tablets de ecstasy (SONDERMANN e KOVAR, 1999) e para atestar a autenticidade de medicamentos (VREDENBREGT, BLOK-TIP, *et al.*, 2006).

#### **1.4. Quimiometria**

Nos últimos 50 anos o avanço tecnológico em relação aos instrumentos utilizados nas pesquisas científicas gerou uma mudança drástica na quantidade de dados obtidos após as análises. Um espectro digitalizado, por exemplo, pode chegar facilmente a 2 mil valores de comprimentos de onda. Porém, esses dados por si só podem não apresentar significado químico de interpretação imediata. Nesses casos, é necessário que estes dados sejam transformados e interpretados adequadamente. A partir deste tipo de problema e dos avanços nas áreas de estatística e computacional, que levou a utilização de computadores dentro dos laboratórios por volta da década de 70, surgiu então a quimiometria (FERREIRA, 2015).

A quimiometria utiliza métodos matemáticos, estatísticos e computacionais com a intenção de fazer previsões em conjuntos de dados, investigar, interpretar e classificar, sendo as principais áreas o design de experimentos, reconhecimento de padrões e análise multivariada (SOUZA e POPPI, 2012; NETO, SCARMINIO e

BRUNS, 2006). Uma das vantagens de se utilizar esses métodos quimiométricos é a diminuição do tempo de análise com a criação de rotinas automáticas em softwares compatíveis, além de reduzir os impactos ambientais das análises químicas já que é possível utilizar técnicas espectroscópicas não invasivas, evitando por exemplo o uso de solventes orgânicos (PORTO, 2018).

#### **1.4.1. Reconhecimento de padrões**

De modo geral, os dados químicos podem ser um conjunto de compostos, de amostras analíticas, de espectros ou de cromatogramas, que por sua vez são descritos por um determinado número de variáveis. No caso de um cromatograma, por exemplo, as variáveis podem ser a altura ou área de cada pico presente no perfil cromatográfico. Uma das formas de avaliar esses dados é por meio de uma análise exploratória e/ou classificatória desses dados. Esse tipo de análise é conhecido como reconhecimento de padrões (NETO, SCARMINIO e BRUNS, 2006).

O reconhecimento de padrões, mais especificamente a análise exploratória é utilizada para detectar padrões presentes no conjunto de dados, que por apresentarem muitas variáveis, podem não ser percebidos imediatamente pelo analista. Desta forma, pode-se então estabelecer relações entre as amostras e suas variáveis, descobrir amostras anômalas ou agrupar as amostras semelhantes (NETO, SCARMINIO e BRUNS, 2006).

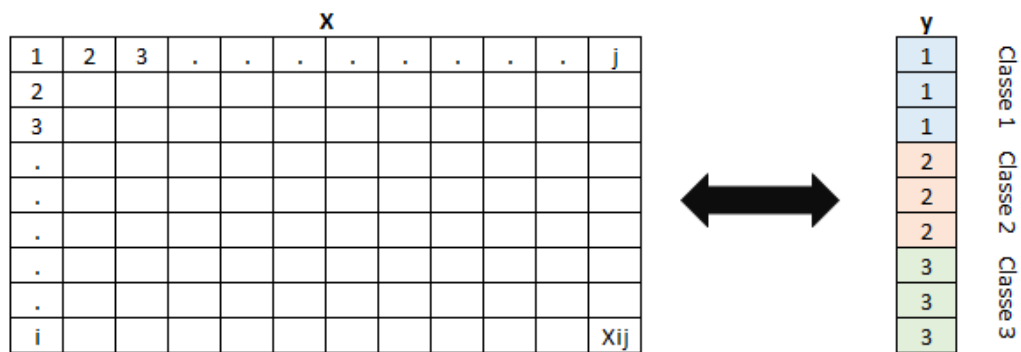
Há também o método de reconhecimento de padrões supervisionado no qual se atribui uma classe para cada amostra presente no grupo de dados, cuja característica estudada é conhecida. A partir desse grupo, constrói-se então um modelo que será utilizado na previsão de novas amostras. Os métodos de reconhecimento de padrões supervisionados mais utilizados em química são o do k-ésimo Vizinho Mais Próximo (Kth Nearest Neighbor – k-NN), a Análise Discriminante Linear (Linear Discriminant Analysis – LDA) e a de Quadrados Mínimos Parciais para Análise Discriminante (Partial Least Squares Discriminant Analysis - PLS-DA) (FERREIRA, 2015).

#### **1.4.2. Quadrados mínimos parciais para análise discriminante (PLS-DA)**

O método PLS-DA baseia-se no método de regressão por quadrados mínimos parciais (Partial Least Squares – PLS) juntamente com a análise discriminante

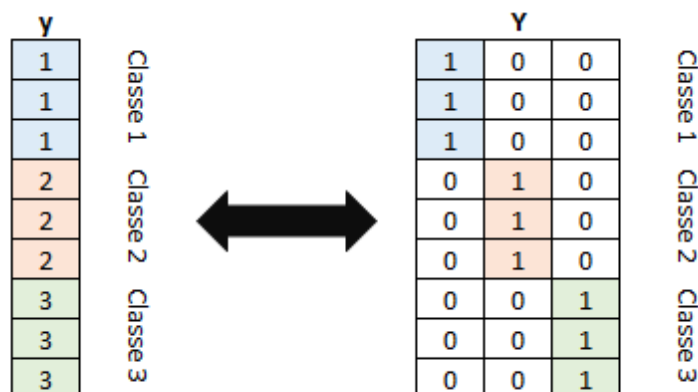
(Discriminant Analysis – DA) (FERREIRA, 2015). Desta forma é possível realizar uma regressão parcial entre um conjunto de classes que descreve as categorias e uma variável X de amostras preditoras, com o intuito de estimar a classe em que determinada amostra se encontra (BERRUETA, ALONSO-SALCES e HÉBERGER, 2007).

Para utilizar esse método, a matriz X de dados (variáveis independentes) deve ser organizada de modo em que cada linha corresponda a uma amostra e as colunas correspondam às variáveis. Cada amostra deve estar diretamente relacionada com um vetor de classes y (variáveis dependentes) onde cada classe é identificada por um valor discreto (1, 2, 3), como ilustrado na Figura 4 (BERRUETA, ALONSO-SALCES e HÉBERGER, 2007).



**Figura 4:** Representação esquemática da matriz de dados X e seu correspondente vetor de classes y.

Em seguida, o vetor de classe y deve ser transformado em uma matriz binária Y onde cada coluna se relaciona à uma classe (Figura 5) (FERREIRA, 2015).



**Figura 5:** Representação esquemática da relação entre o vetor de classe y e sua correspondente matriz de classes Y (FERREIRA, 2015).

Em seguida o modelo é construído a partir da decomposição da matriz X de acordo com a classe das amostras e os dados são compactados utilizando o número de variáveis latentes que apresentem o menor erro na validação cruzada (cross-validation) (BERRUETA, ALONSO-SALCES e HÉBERGER, 2007).

A validação cruzada é um processo em que uma ou mais amostras, de acordo com tamanho do grupo de dados, são removidas da matriz de dados e o modelo é novamente calculado. Em seguida, essas amostras conhecidas são previstas pelo modelo e então é avaliado o erro da previsão, comparando o valor predito e o conhecido da classe à qual cada amostra pertence (FERREIRA, 2015).

Entretanto, os valores previstos pelo modelo não são valores discretos, como 1 e 0, porém são próximos aos valores ideais. Desta forma, deve-se estipular um valor limite para distinguir as classes. Portanto, caso o valor previsto seja acima do valor limite, a amostra é classificada como pertencente aquela classe. Esse valor limite, conhecido como threshold, é calculado utilizando uma função de probabilidade normal (npdf) para os casos de a amostra pertencer à classe (npdf<sub>in</sub>), Equação 1, e de não pertencer a classe (npdf<sub>out</sub>), Equação 2, (PÉREZ, FERRÉ e BOQUÉ, 2009).

$$npdf_{in} = \frac{e^{(-0,5((\hat{y}_i - \mu_{in})/\delta_{in})^2)}}{\sqrt{(2\pi \cdot \delta_{in})}} \quad \text{Equação 1}$$

$$npdf_{out} = \frac{e^{(-0,5((\hat{y}_i - \mu_{out})/\delta_{out})^2)}}{\sqrt{(2\pi \cdot \delta_{out})}} \quad \text{Equação 2}$$

onde  $\hat{y}_i$  é o valor previsto da classe para cada amostra,  $\mu_{in}$  é a média dos valores previstos da classe para as amostras pertencentes a classe,  $\delta_{in}$  é o desvio padrão dos valores previstos para a classe.

Desta forma são construídas duas curvas Gaussianas, uma para npdf<sub>in</sub> e outra para o npdf<sub>out</sub> e o threshold é determinado pelo ponto onde as duas curvas se interceptam. Portanto, uma amostra que apresente  $\hat{y}_i$  maior que o threshold é considerada como pertencente a classe avaliada (FERREIRA, 2015).

Por fim, o desempenho do modelo é avaliado pelos parâmetros especificidade, sensibilidade e erros de classificação. A especificidade é calculada dividindo o número

de amostras previstas como não pertencentes à classe pelo número verdadeiro de amostras que realmente não pertencem à classe (Equação 3). De modo semelhante, a sensibilidade é obtida pela divisão do número de amostras previstas na classe, pelo número de amostras que realmente são daquela classe (Equação 4). O erro é dado pelas amostras previstas erroneamente, dentro ou fora da classe, dividido por número total de amostras (Equação 5) (FERREIRA, 2015).

$$\textit{Especificidade} = \frac{VN}{VN + FP} \quad \textit{Equação 3}$$

$$\textit{Sensibilidade} = \frac{VP}{VP + FN} \quad \textit{Equação 4}$$

$$\textit{Erro} = \frac{FP + FN}{VP + VN + FP + FN} \quad \textit{Equação 5}$$

onde VP (verdadeiro positivo) são as amostras previstas na classe e que realmente estão na classe, VN (verdadeiro negativo) são amostras que não foram previstas na classe e realmente não pertencem à classe, FP (falso positivo) são as amostras que foram previstas na classe e não pertencem à classe e FN (falso negativo) são as amostras que não foram previstas na classe, mas fazem parte dela.

**CAPÍTULO 2 – DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS PRESENTES NA CERA DAS  
FOLHAS DE CANA-DE-AÇÚCAR POR CROMATOGRAFIA GASOSA**

## 2.1. INTRODUÇÃO

A cera da cana-de-açúcar, assim como outros produtos naturais, é uma matriz complexa que apresenta uma grande quantidade de diferentes compostos. Em estudos anteriores, já foram identificados na cana-de-açúcar alcanos, ácidos graxos, aldeídos, ácidos graxos e triterpenos (PURCELL, LEONARD, *et al.*, 2005; LAMBERTON e REDCLIFFE, 1960; ATTARD, MCELROY, *et al.*, 2015; JÄGER, TROJAN, *et al.*, 2009).

Um dos compostos já identificados na cera das folhas da cana-de-açúcar é a friedelina (ATTARD, MCELROY, *et al.*, 2015). Esse composto é um triterpenóide pentacíclico, também caracterizado como uma terpenocetona cíclica devido à presença de um átomo de oxigênio ligado duplamente a um dos cinco anéis que a molécula apresenta (Figura 3).

Há relatos na literatura de diversas propriedades medicinais desse composto, bem como seus derivados apresentam, tais como analgesia e atividade anti-inflamatória, anticancerígena, bactericida e como agente vascularizante (FRAME, 2003; MOITEIRO, JUSTINO, *et al.*, 2001; MOITEIRO, MANTA, *et al.*, 2004; NAKAMURA, NAKASUMI, *et al.*, 1997; PIRES, MARTINS, *et al.*, 2009; ZHANG, WU, *et al.*, 2006)

Além disso, também consta na literatura a presença da friedelina nas folhas da espécie *Maytenus ilicifolia* conhecida como “espinheira santa” nativa da região sul e sudeste do Brasil. No caso desta espécie, esse triterpeno é sintetizado nas folhas e translocado para as raízes da planta onde é biotransformado em outros produtos (CORSINO, CARVALHO, *et al.*, 2000).

Entretanto, as concentrações observadas desse triterpeno nessas espécies não são elevadas, tendo em vista que esse composto é um metabólito secundário que por sua vez, representa apenas 2% do total de massa seca da planta (ROBERTS, 2007). Por isso, o emprego de métodos de extração capazes de realizar a pré-

concentração da friedelina e métodos instrumentais que auxiliem na identificação e quantificação desse composto é necessário.

## **2.2. OBJETIVOS**

### **2.2.1 Objetivo geral**

Identificar os compostos presentes na cera epicuticular de genótipos de cana-de-açúcar utilizando a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas e avaliar possíveis alterações na concentração de friedelina antes e depois da infestação com a broca da cana.

### **2.2.2. Objetivos específicos**

- Coletar folhas de cana-de-açúcar de diferentes genótipos, antes e depois da infestação com a broca da cana para realizar análises cromatográficas.
- Extrair a cera epicuticular das folhas usando extração sólido-líquido convencional.
- Identificar os compostos presentes no extrato utilizando a técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS)
- Validar o método para a determinação de friedelina por meio dos parâmetros de seletividade, linearidade, limites de detecção e de quantificação, recuperação e precisão.
- Utilizar o método validado para quantificar a friedelina identificada nos diversos genótipos de cana-de-açúcar e verificar possíveis alterações na concentração deste composto após a infestação com larvas da broca da cana.

## **2.3. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.3.1. Compostos químicos**

Foram adquiridos para este estudo os padrões de compostos encontrados na cera da cana-de-açúcar, tais como álcoois graxos, alcanos e triterpenos. Os alcanos hexacosano, heptacosano, octacosano, nonacosano, triacontano, hentriacontano, tritriacontano e octatriacontano, foram adquiridos na forma de mistura de alcanos saturados de C7 a C40. Também foram adquiridos padrões de álcoois graxos hexacosanol, octacosanol e triacontanol. O padrão de triterpeno utilizado na

identificação foi a friedelina. Todos os compostos supracitados foram adquiridos da empresa Sigma Aldrich, com pureza superior a 90%.

Também foi adquirido da empresa Sigma Aldrich o agente derivatizante hexametildissilano e trimetilclorossilano em piridina (2:1:10 - mistura sililante de acordo com Sweeley (SWEeley, BENTLEY, *et al.*, 1963)) utilizado para determinação dos álcoois graxos e ácidos carboxílicos de cadeia longa presentes na cera.

O clorofórmio P.A. utilizado na etapa de extração da cera e no preparo de soluções padrão foi adquirido da empresa Hexis, com teor mínimo de 99,8%.

### **2.3.2. Soluções padrão**

As soluções padrão estoque dos princípios ativos estudados foram preparadas por solubilização do padrão em clorofórmio, na concentração de 1000 mg L<sup>-1</sup>. A partir dessas soluções, foram feitas diluições utilizando clorofórmio para obtenção de concentrações na faixa de trabalho de 10 a 250 mg/L.

As soluções dos padrões de álcoois graxos, utilizadas para confirmar a identificação desses compostos nas amostras, passaram por uma etapa de derivatização a fim de diminuir o ponto de ebulição desses compostos e permitir a injeção no cromatógrafo a gás sem que houvesse risco de dano ao instrumento. O volume adequado de padrão correspondente a concentração de 50 mg/L foi adicionada ao vial. Em seguida, o solvente foi evaporado completamente e então o derivatizante foi adicionado. Esta etapa de derivatização consistiu em um processo de sililação, no qual uma ampola de um mL de hexametildissilano e trimetilclorossilano em piridina foi adicionada ao vial contendo a solução padrão. O frasco foi mantido em banho-maria em temperatura de 70 °C por 20 minutos e imediatamente injetado no cromatógrafo a gás (PORTO, 2018).

### **2.3.3. Amostras**

As amostras de folhas de cana-de-açúcar foram obtidas do banco de germoplasma do Programa de Melhoramento Genético de Cana-de-Açúcar da Universidade Federal de Viçosa (PMGCA/UFV) em parceria com a Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento da Indústria de Cana-de-Açúcar (RIDESA).

No estudo de identificação dos compostos presentes na cera foram utilizados 10 genótipos já caracterizados como resistente ou suscetível em relação ao ataque da broca da cana (TOMAZ, GONÇALVES, *et al.*, 2020). O código dos genótipos utilizados nesta etapa e suas respectivas classificações encontram-se na Tabela 1.

**Tabela 1:** Classificação dos 10 genótipos utilizados para identificação dos compostos presentes na cera, de acordo com avaliação em campo em relação a resistência frente a broca da cana.

<b>Resistente</b>	<b>Suscetível</b>
RB047050	RB047016
RB047201	RB057145
RB047212	RB057231
RB047226	RB057243
RB867515	RB057249

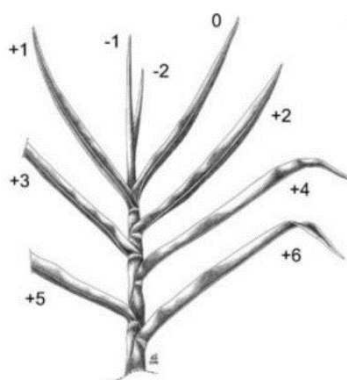
Na etapa de quantificação foram avaliados 21 genótipos já caracterizados como suscetíveis (S) ou resistentes (R) e dois genótipos que ainda não foram verificados quanto à resistência em campo (D), fornecendo assim um conjunto de dados abrangente na investigação dos compostos presentes na cera das folhas de cana-de-açúcar (TOMAS, 2018). Essas plantas foram cultivadas em casa de vegetação em oito repetições e após o seu desenvolvimento, foram coletadas as ponteiras de metade dessas amostras e em seguida foi feita a infestação com as larvas da broca. Uma semana após a infestação o restante das repetições de cada genótipo foi coletado a fim de verificar alterações nas concentrações de friedelina decorrentes da infestação. Os códigos dos genótipos utilizados nesta etapa estão discriminados na Tabela 2.

**Tabela 2:** Classificação dos 23 genótipos utilizados na quantificação dos compostos presentes na cera, de acordo com avaliação em campo, em relação a resistência frente a broca da cana.

<b>Genótipo (caracterização)</b>				
IM76228 (R)	RB147587 (R)	RB147588 (R)	RB147531 (S)	RB047016 (S)
RB047055 (R)	RB147590 (R)	RB147529 (S)	RB147532 (S)	RB127384 (D)
RB047201 (R)	RB147591 (R)	RB047226 (S)	RB057231 (S)	RB137243 (D)
RB047212 (R)	RB147592 (R)	RB147534 (S)	RB057249 (S)	
RB147589 (R)	RB867515 (R)	RB047248 (S)	RB147533 (S)	

(S) - suscetíveis (R) - resistentes (D) - não classificadas

Em ambas as etapas (identificação e quantificação), a cera utilizada foi extraída das folhas da ponteira, indicadas pelo número -2 na Figura 6. Essa parte específica da planta foi escolhida por apresentar maior incidência de oviposição. A ponteira foi coletada das plantas armazenadas na casa de vegetação e levada ao laboratório, onde suas folhas foram individualizadas, secas em estufa à 40 °C até a perda completa de umidade e o tamanho foi ajustado para aproximadamente 15 centímetros, sendo este o tamanho aproximado do tubo de ensaio utilizado na extração.



**Figura 6:** Sistema de numeração utilizado para as folhas de cana-de-açúcar (KUIPJER, 1915).

#### 2.3.4. Extração sólido-líquido

Para a extração da cera, 25,0 mL de clorofórmio foram adicionados ao tudo de ensaio contendo as folhas da ponteira previamente pesadas. O tubo foi agitado por um minuto de forma cuidadosa para evitar coextração de material citoplasmático das folhas. O clorofórmio foi recolhido e o procedimento foi realizado mais uma vez a fim de aumentar a quantidade de cera extraída.

Os 50,0 mL de extrato obtidos das duas extrações consecutivas foram filtrados em papel de filtro qualitativo, transferidos para balões de fundo redondo e secos até um volume aproximado de 2 mL em evaporador rotativo. Esse volume restante foi transferido para um vial (de 1,5 mL) e a solução evaporada até *secura* em chapa aquecedora na temperatura de 40 °C.

Tendo em vista que a composição de ceras epicuticular de um modo geral pode conter estéres de cadeia carbônica longa, foi adicionada uma etapa de hidrólise ácida

para obter os ácidos carboxílicos correspondentes (PURCELL, LEONARD, *et al.*, 2005; WARTHA, PORTO, *et al.*, 2022; TULLOCH e BERGTER, 1981; PEREIRA, FREIRE, *et al.*, 2005). Em cada amostra de cera foram adicionados 250 µL de solução de ácido clorídrico 50% v/v. Após a adição do ácido as amostras foram levadas ao banho ultrassônico por 30 minutos à 40 °C. Ao fim da contagem de tempo a solução de ácido clorídrico foi evaporada completamente em chapa aquecedora à 60 °C conforme indicado na literatura (BARROCA, SILVEIRA e ALVAREZ-LEITE, 2003).

Logo antes das análises por GC/MS, essa cera refinada foi derivatizada utilizando um processo de sililação, no qual uma ampola de um mL de hexametildissilano e trimetilclorossilano em piridina foi adicionada ao frasco contendo a cera. O frasco foi mantido em banho-maria em temperatura de 70 °C por 20 minutos. Antes da injeção no cromatógrafo, as amostras de cera foram filtradas utilizando filtros de seringa de PTFE de 0,22 µm.

### **2.3.5. Instrumentação e condições cromatográficas**

As análises cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas (GCMS-QP2010 Plus - Shimadzu), equipado com injetor automático (AOC-20i) usando coluna SH-Rtx-5MS (30 m, 0,25 mm d.i., 0,25 µm de espessura de filme). Um microlitro do extrato foi injetado no modo split, na razão de 1:20, utilizando hélio como gás de arraste com fluxo de 1,43 mL/min. A temperatura do injetor e do detector foram ajustadas para 300 °C (PORTO, 2018). Esses extratos foram obtidos em triplicata para cada genótipo.

As amostras foram injetadas no modo *scan* com a coluna aquecida inicialmente a 200 °C, mantendo essa temperatura por 2 minutos. Na sequência a temperatura aumentou 2 °C por minuto até atingir a temperatura de 300 °C, na qual permaneceu por 15 minutos, totalizando 67 min de análise. Os dados foram adquiridos utilizando o software LabSolutions GCMSsolutions.

Os compostos foram identificados comparando seus espectros de massas com aqueles presentes na biblioteca do Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (NIST) e por meio de comparação dos tempos de retenção dos padrões de alcanos, álcoois graxos e triterpenos descritos previamente no item 2.3.1.

Também foi calculado o Índice de Retenção Linear (LRI) de alguns compostos para auxiliar na identificação. Este índice é obtido por meio de interpolação do tempo de retenção do composto de interesse e de dois padrões de hidrocarbonetos eluidos antes e depois do componente em estudo, utilizando a seguinte equação (VAN DEN DOOL e KRATZ, 1963):

$$LRI = 100 \times \left( \frac{t_c - t_n}{t_{n+1} - t_n} + n \right) \quad \text{Equação 6}$$

Onde n é o número de carbonos do hidrocarboneto anterior,  $t_c$  é o tempo de retenção do analito e  $t_n$  e  $t_{n+1}$  são os tempos de retenção dos hidrocarbonetos eluidos imediatamente antes e depois do composto, respectivamente.

### 2.3.6. Validação do método

O método utilizado para quantificação da friedelina identificada na cera das folhas da cana-de-açúcar foi validado de acordo com os critérios estabelecidos pelo Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia – INMETRO (INMETRO, 2016). Os parâmetros avaliados foram seletividade, linearidade, recuperação, precisão, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ).

A seletividade do método foi verificada pela capacidade de distinguir a friedelina dos demais compostos nos cromatogramas das amostras. Essa verificação foi realizada ao injetar uma amostra de cera proveniente de um genótipo que não continha o analito, uma amostra que continha o analito de interesse e uma solução do padrão de friedelina.

A linearidade foi avaliada pelo coeficiente de correlação linear ( $r$ ), obtido a partir da raiz quadrada do coeficiente de determinação ( $r^2$ ) observado para a curva analítica. A curva analítica foi realizada a partir da fortificação de folhas de cana-de-açúcar isentas de friedelina. Antes da etapa de extração da cera, foram adicionadas quantidades da solução padrão de friedelina para obter sete níveis de concentração entre 10 e 250 mg/L, em triplicata. Após a adição do padrão, essas amostras passaram por todas as etapas do método e foram injetadas em cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas. Entretanto, somente o valor de  $r$  não é

conclusivo quanto à linearidade do método e por isso a aleatoriedade dos pontos no gráfico de resíduos também foi avaliado.

De acordo com as orientações do INMETRO para a validação de métodos analíticos (INMETRO, 2016), os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) podem ser obtidos a partir da relação sinal/ruído observadas nos cromatogramas de amostras que não apresentam o analito de interesse. Desta forma, foram obtidos os cromatogramas da cera de amostras que não continham friedelina (branco) em triplicata. A área cromatográfica do ruído, correspondente ao tempo de retenção da friedelina (área do branco) foi utilizado. O LD e o LQ foram estabelecidos de acordo com as equações abaixo.

$$LD = \frac{3,3 s}{b} \quad \text{Equação 7}$$

$$LQ = \frac{10 s}{b} \quad \text{Equação 8}$$

Sendo  $s$  o desvio padrão da resposta do branco e  $b$  o coeficiente angular da curva analítica.

Para os ensaios de recuperação, foi adicionada friedelina em três níveis de concentração (10, 100 e 250 mg/L) ao branco, antes da etapa de extração da cera. Após a aplicação do método, foi avaliada a porcentagem de recuperação dada pela Equação 9:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{(C_2 - C_1)}{C_3} \times 100 \quad \text{Equação 9}$$

Em que  $C_1$  é a concentração do analito inicialmente presente na amostra,  $C_2$  é a concentração do analito na amostra, determinada pelo método na amostra e  $C_3$  é a concentração que foi adicionada à amostra. Nesse caso, como foram utilizadas amostras de folhas de cana-de-açúcar que não possuíam friedelina, a concentração  $C_1$  é igual a zero. Para os níveis de concentração utilizados neste trabalho, a porcentagem de recuperação deve estar entre 80 e 110% (INMETRO, 2016).

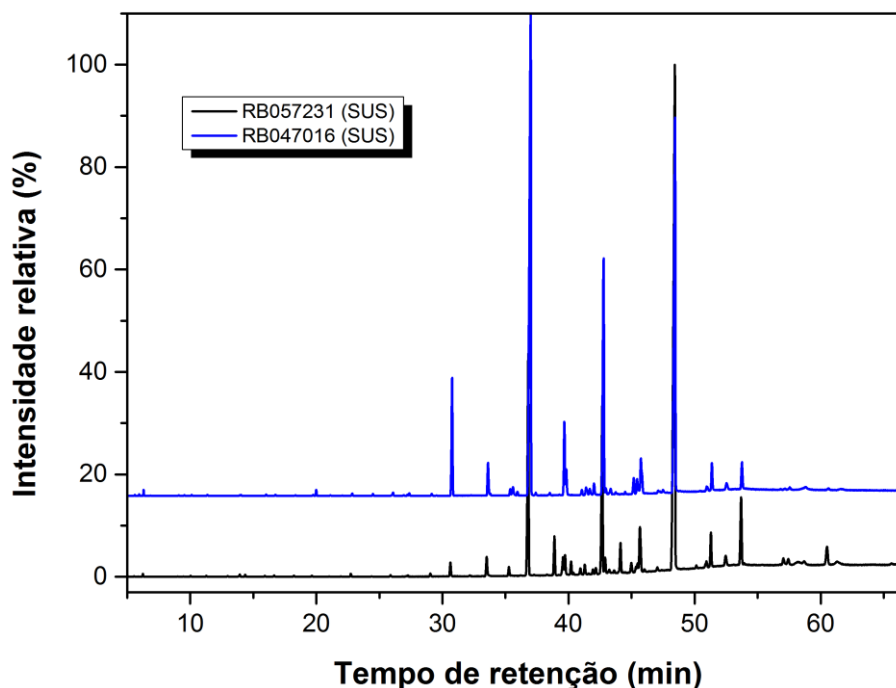
A precisão do método foi avaliada pela repetitividade e pela precisão intermediária. Em ambos os ensaios foram analisadas seis replicatas em três níveis de concentração de friedelina (10, 100 e 250 mg/L). As amostras do ensaio de repetitividade foram avaliadas no mesmo dia, enquanto as replicatas das amostras de precisão intermediária foram avaliadas em dias diferentes. O critério utilizado para verificar a precisão do método foi o coeficiente de variação, ou desvio padrão relativo, que para as concentrações citadas não deve ultrapassar 5,3% (INMETRO, 2016).

## **2.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **2.4.1. Identificação**

Para a identificação dos compostos presentes na cera epicuticular não foi necessária a otimização das condições cromatográficas, tendo em vista que foi realizada uma otimização prévia por Porto (2018) (PORTO, 2018) neste mesmo instrumento baseando-se no trabalho de Purcell et al. (2005) (PURCELL, LEONARD, *et al.*, 2005).

Em uma avaliação inicial, foi possível observar variações na composição da cera tanto em relação aos compostos presentes, quanto na intensidade relativa. Ou seja, diferentes compostos foram identificados nas amostras, e mesmo os compostos comuns à determinadas amostras, apresentaram quantidades diferentes. Não foi possível relacionar essas variações com a classe das amostras tendo em vista que as variações foram observadas mesmo dentro de uma classe específica, como pode ser observado nos cromatogramas apresentados na Figura 7.



**Figura 7:** Comparação dos cromatogramas obtidos de dois genótipos classificados como suscetíveis (SUS) mostrando a diferença entre os perfis cromatográficos dentro de uma mesma classe.

Após a injeção dos extratos das amostras, a identificação dos compostos foi realizada pela comparação dos tempos de retenção destes com os dos padrões disponíveis, listados no item 2.3.1, por comparação dos espectros de massas dos compostos alvo com os compostos indicados pela biblioteca do Instituto Nacional de Tecnologia (NIST).

Os compostos identificados na cera, constando os respectivos tempos de retenção, fórmula molecular e a classificação de acordo com o grupo funcional apresentado, estão detalhados na Tabela 3.

**Tabela 3:** Lista dos compostos identificados na cera epicuticular da cana-de-açúcar dos genótipos estudados

Tempo de retenção (min)	Composto	Fórmula molecular	Grupo funcional
5,69	Ácido Palmítico	$C_{16}H_{32}O_2$	Ácido graxo
18,18	Hexacosano	$C_{26}H_{54}$	Alcano
18,52	Monopalmitim	$C_{19}H_{38}O_4$	Ácido graxo
21,13	Heptacosano	$C_{27}H_{56}$	Alcano
24,15	Octacosano	$C_{28}H_{58}$	Alcano
27,17	Nonacosano	$C_{29}H_{60}$	Alcano
28,73	Hexacosanol	$C_{26}H_{54}O$	Álcool graxo

30,19	Triacontano	C <sub>30</sub> H <sub>62</sub>	Alcano
31,44	Hexacosanal	C <sub>26</sub> H <sub>52</sub> O	Aldeído
33,20	Hentriacontano	C <sub>31</sub> H <sub>64</sub>	Alcano
34,66	Octacosanol	C <sub>28</sub> H <sub>58</sub> O	Álcool graxo
36,19	Dotriacontano	C <sub>32</sub> H <sub>66</sub>	Alcano
37,41	Ácido Octacosanóico	C <sub>28</sub> H <sub>56</sub> O <sub>2</sub>	Ácido graxo
37,45	Octacosanal	C <sub>28</sub> H <sub>56</sub> O	Aldeído
39,01	Tritriacontano	C <sub>33</sub> H <sub>68</sub>	Alcano
40,34	Lanosterol	C <sub>30</sub> H <sub>50</sub> O	Triterpeno
40,40	Triacontanol	C <sub>30</sub> H <sub>62</sub> O	Álcool graxo
40,63	Lupeol	C <sub>30</sub> H <sub>50</sub> O	Triterpeno
41,90	Tetrtriacontano	C <sub>34</sub> H <sub>70</sub>	Alcano
42,95	Ácido Triacontanóico	C <sub>30</sub> H <sub>60</sub> O <sub>2</sub>	Ácido graxo
43,20	Triacontanal	C <sub>30</sub> H <sub>60</sub> O	Aldeído
44,40	Friedelina	C <sub>30</sub> H <sub>50</sub> O	Triterpeno
44,95	Pentatriacontano	C <sub>35</sub> H <sub>72</sub>	Alcano
47,35	Hexatriacontano	C <sub>36</sub> H <sub>74</sub>	Alcano
48,43	Dotriacantanol	C <sub>32</sub> H <sub>66</sub> O	Álcool graxo
49,40	Ácido Lignocérico	C <sub>24</sub> H <sub>48</sub> O <sub>2</sub>	Ácido graxo
49,97	Heptatriacontano	C <sub>37</sub> H <sub>76</sub>	Alcano
52,49	Octatriacontano	C <sub>38</sub> H <sub>78</sub>	Alcano

Neste estudo foram identificados 28 compostos, sendo 13 alcanos (46,4%), 5 ácidos graxos (17,9%), 4 álcoois graxos (14,3%), 3 aldeídos (10,7%) e 3 triterpenos (10,7%). Esses resultados estão de acordo com trabalhos anteriores onde foram identificados entre os metabólitos da cana-de-açúcar alcanos de cadeia longa, álcoois graxos e aldeídos (PURCELL, LEONARD, *et al.*, 2005; LAMBERTON e REDCLIFFE, 1960) bem como os ácidos graxos e triterpenos que são componentes de tecidos da cana-de-açúcar (ATTARD, MCELROY, *et al.*, 2015; JÄGER, TROJAN, *et al.*, 2009). Além dos compostos relacionados na Tabela 3, foram observados outros compostos os quais não foram adequadamente identificados.

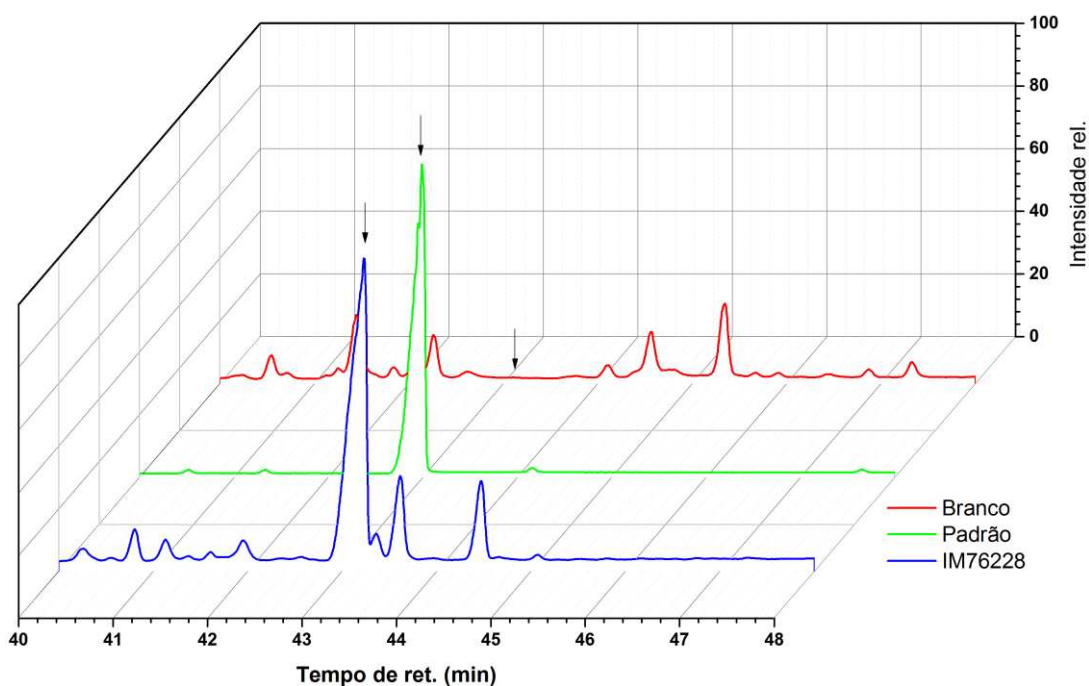
Para identificar corretamente os aldeídos hexacosanal (tr = 31,44) e octacosanal (tr = 37,45) foi necessário calcular o LRI e comparar com dados presentes na literatura. Essa etapa foi necessária já que para aldeídos de cadeia carbônica alifática longa e em baixas concentrações não é possível observar a presença do íon molecular que possibilitaria a diferenciação entre os compostos por meio da massa molar (CHRISTIANSEN, MAHADEVAN, *et al.*, 1969).

Os valores obtidos do índice de retenção linear para os compostos com os tempos de retenção iguais a 31,44 e 37,45 minutos foram 3041 e 3243, respectivamente. Ao comparar esses resultados com os valores encontrados na literatura foi possível confirmar que o composto eluído a aproximadamente 31 min era o hexacosanal e que o eluído em 37 min, era o octacosanal (MARTÍNEZ, FINOZZI, *et al.*, 2017).

A identificação dos demais compostos foi possível pela comparação com os padrões disponíveis ou pela comparação entre os espectros de massas do alvo e do composto presente na biblioteca do NIST.

#### 2.4.2. Validação do método

O primeiro parâmetro avaliado foi a seletividade por meio da comparação entre os cromatogramas de um genótipo que não continha friedelina (branco), de um genótipo que continha o analito (IM76228) e de uma solução com o padrão deste composto em clorofórmio (padrão). A comparação desses cromatogramas encontra-se na Figura 8.

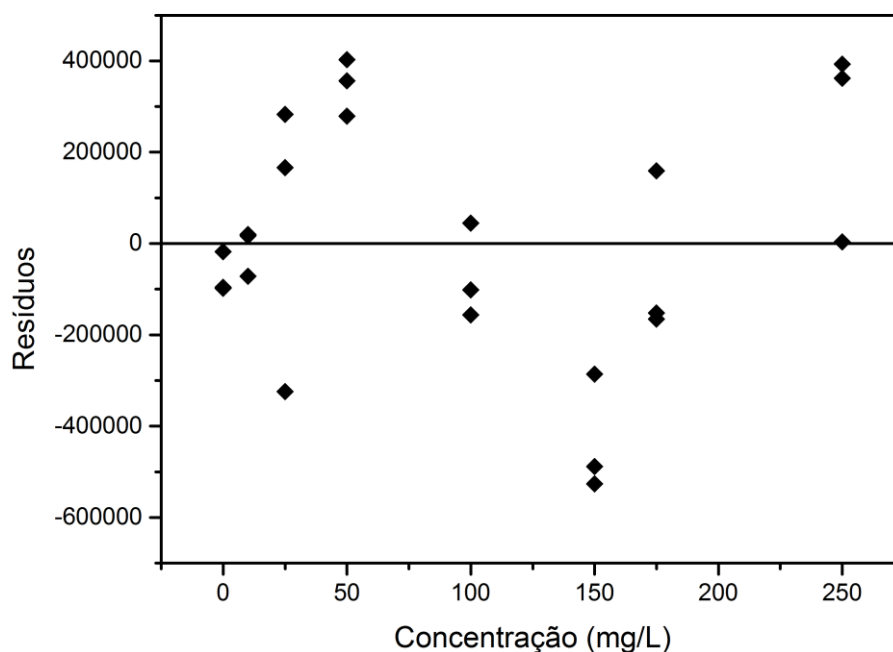


**Figura 8:** Comparação entre os cromatogramas de uma amostra sem friedelina (vermelho), da solução padrão do analito (verde) e de uma amostra contendo friedelina

Observando a Figura 8 pode-se verificar que não existem outros compostos presentes na cera que possam eluir juntamente com a friedelina causando alterações na área cromatográfica do padrão. Sendo assim, o método utilizado foi seletivo para quantificação da friedelina.

Para a obtenção da curva analítica, amostras isentas de friedelina foram fortificadas com uma solução do padrão, nas concentrações de 10, 25, 50, 100, 150, 175 e 250 mg/L, em triplicata. A curva analítica foi obtida por regressão linear, sendo expressa pela equação  $A = 26342C + 710411$  com  $r^2$  igual a 0,9903, onde A é a área do pico cromatográfico e C é a concentração da amostra em mg/L. O valor obtido do coeficiente de correlação linear (r) foi de 0,9951, indicando uma boa linearidade (INMETRO, 2016).

Entretanto, apenas o coeficiente de correlação linear (r) não é conclusivo quanto à linearidade da curva analítica, devendo também verificar se os resultados apresentados no gráfico de resíduos, disponível na Figura 9, apresentam alguma tendência.



**Figura 9:** Gráfico de resíduos da curva analítica.

É possível observar no gráfico de resíduos que não há uma tendência definida para os resultados da curva analítica. Sendo assim pode-se concluir, juntamente com

o valor do coeficiente de correlação que a curva analítica representa um bom modelo matemáticos para os resultados obtidos.

A partir do desvio padrão da área cromatográfica de amostras isentas de friedelina e com a curva analítica, foi possível determinar os limites de detecção e de quantificação. Os resultados obtidos foram 3,22 mg/L para o LD e 9,78 mg/L para o LQ.

Nos ensaios de recuperação, os valores obtidos foram 86% para a concentração de 10 mg/L, 90% para 100 mg/L e 101% para 250 mg/L. De acordo com o guia de Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos do INMETRO, os resultados obtidos são adequados, tendo em vista que a porcentagem de recuperação para essas concentrações deve estar entre 80 e 110% (INMETRO, 2016).

Os valores de coeficiente de variação obtidos para a precisão intermediária para os níveis de concentração 10, 100 e 250 mg/L foram 3,6, 2,8 e 2,5% respectivamente. Para a repetitividade, os valores dos coeficientes de variação encontrados para esses mesmos níveis de concentração foram de 3,0, 1,9 e 2,3%, respectivamente. Como indicado na literatura, a precisão do método foi satisfatória, uma vez que todos os resultados de coeficiente de variação foram inferiores a 5,3% (INMETRO, 2016).

#### **2.4.3. Quantificação**

A partir do método validado foi possível quantificar a friedelina nas amostras de cera utilizando a equação disponível no item 2.4.2. Essa quantificação foi realizada para as amostras antes e depois da infestação com a broca da cana, na intenção de verificar se ocorrem maiores expressões desse composto após a interação da planta com a broca.

Entretanto, como a massa de folhas da ponteira empregada na extração da cera não foi a mesma para todas as amostras, já era esperado que a massa de cera extraída também apresentasse variações. Portanto, o parâmetro utilizado para comparar as concentrações de friedelina nos diferentes genótipos foi o teor de friedelina em g por 100 g de cera. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 4.

**Tabela 4:** Teor de friedelina encontrado nas ceras dos diferentes genótipos estudados antes da infestação (AI) e depois da infestação (DI) com a broca da cana.

<b>Código</b>	<b>Genótipo</b>	<b>Teor (AI) (g/100 g)</b>	<b>Teor (DI) (g/100 g)</b>	<b>Classificação</b>
1	RB047248	NO	NO	Suscetível
2	RB057231	NO	NO	Suscetível
3	RB047016	NO	NO	Suscetível
4	RB057249	NO	NO	Suscetível
5	RB147592	NO	0,05	Resistente
6	RB147532	0,05	0,07	Suscetível
7	RB147531	0,05	0,09	Suscetível
8	RB147533	0,06	0,11	Suscetível
9	RB147589	NO	0,13	Resistente
10	RB047226	0,06	0,14	Suscetível
11	RB147529	0,09	0,17	Suscetível
12	RB147534	0,12	0,26	Suscetível
13	RB147588	0,35	0,52	Resistente
14	RB147587	0,39	0,57	Resistente
15	RB127384	0,48	0,69	Desconhecido
16	RB867515	0,79	0,87	Resistente
17	RB047212	0,70	0,91	Resistente
18	RB047055	0,50	0,93	Resistente
19	RB047201	0,74	1,49	Resistente
20	RB147590	1,12	1,62	Resistente
21	RB137243	1,07	2,07	Desconhecido
22	RB147591	2,67	3,74	Resistente
23	IM76228	19,07	25,19	Resistente

NO: não foi observado pico cromatográfico referente à friedelina

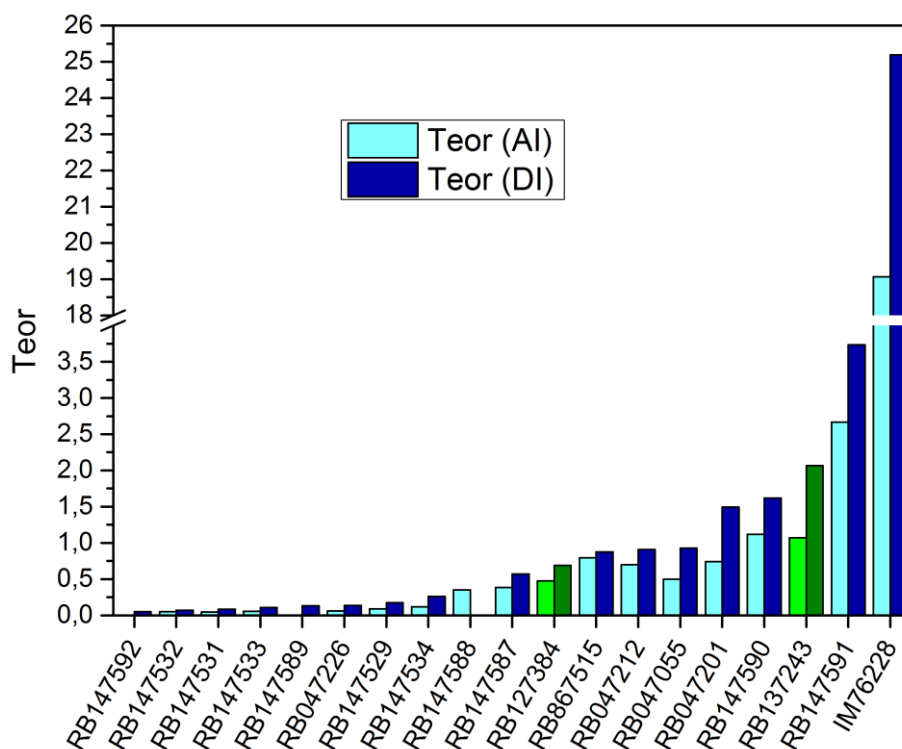
Observa-se pelos resultados apresentados na Tabela 4 que em quatro dos dez genótipos suscetíveis não foi possível detectar a presença da friedelina, mesmo após a infestação da cana com a broca. Além disso, a expressão desse composto nos demais genótipos suscetíveis foi muito baixa comparada com os valores observados para a maioria das amostras classificadas como resistentes.

Em relação às amostras dos genótipos resistentes há uma consideração importante que deve ser feita com base nos resultados obtidos. Nos genótipos RB147592 (5) e RB147589 (9) não foi possível verificar a presença de friedelina antes da infestação com a broca da cana. Ademais, mesmo após a infestação o teor de friedelina observado pode ser equiparado com os teores observados nos genótipos suscetíveis.

O fato desses dois genótipos apresentarem resistência em campo, mas não apresentarem quantidades significativas de friedelina pode estar relacionado com o efeito aditivo/sinérgico que certos compostos apresentam quando na presença de outros (FILHO, 2006). Essa pode ser uma justificativa para os resultados encontrados, tendo em vista que outros compostos, tais como os álcoois dotriacontanol e triacontanol, e os alcanos octatriacontano e heptacosano, também podem contribuir para a classificação de genótipos resistentes e suscetíveis (WARTHA, PORTO, *et al.*, 2022).

Além disso, níveis de friedelina superiores a 0,52 g a cada 100 g de cera, verificados após a infestação, estão relacionados somente a genótipos resistentes. Este é um indício de que para essas concentrações a friedelina possa ser diretamente responsável pela maior resistência desses genótipos frente ao ataque da broca. E a partir desta observação pode-se inferir que os genótipos RB127384 e RB137243 cuja informação quanto à resistência em campo não foi avaliada até o presente momento, apresente um menor índice de infestação pela broca já que apresenta níveis de friedelina compatíveis com os genótipos resistentes.

Outra informação que consta na Tabela 4, e pode ser melhor observada no gráfico da Figura 10 é que, de um modo geral, o teor de friedelina é maior após a infestação das amostras de cana-de-açúcar com a broca. Esse era um resultado esperado, considerando que a friedelina é um metabólito secundário, os quais tem a função de atuar defendendo as plantas de predadores (MAZZEU, 2019).



**Figura 10:** Teor de friedelina em g por 100 g de cera dos genótipos estudados antes da infestação (AI) e após a infestação (DI). Os dados destacados em verde correspondem aos dois genótipos de classificação desconhecida.

Como pode ser observado na Tabela 4 e na Figura 10, o genótipo IM76228 foi o que apresentou o maior teor de friedelina, isto é, 19,07 e 25,19 g em 100 gramas de cera, antes e depois da infestação da cana com a broca, respectivamente. Este teor é bem maior do que o observado para o genótipo RB147591, que é o segundo maior teor de friedelina obtido. E por isso, a escala do gráfico foi alterada para uma melhor visualização das informações relatadas no texto.

## 2.5. CONCLUSÕES

Utilizando a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas foi possível identificar 28 compostos que constituem a cera da cana-de-açúcar. Entre os compostos identificados foram encontrados alcanos, aldeídos, álcoois e ácidos graxos e triterpenos.

Não foi possível fazer uma correlação direta entre os compostos identificados e as classes dos genótipos, tendo em vista que genótipos de uma mesma classe apresentaram variações na quantidade e tipo de compostos presentes. Sendo assim,

é necessário uma investigação mais profunda para verificar se existe correlação entre os compostos observados e as classes dos genótipos estudados.

O método de extração apresentou valores apropriados para os parâmetros avaliados na validação, tais como porcentagens de recuperação dentro da faixa indicada para a concentração avaliada neste estudo e coeficiente de variação inferior a 5,3% indicando uma boa precisão do método.

Com o método validado foi possível quantificar a friedelina na cera nos genótipos de interesse. Os resultados obtidos indicaram uma relação entre concentrações de friedelina superiores a 5,2 g em 100 g de cera com a resistência apresentada em campo para os genótipos estudados. Além disso, com a quantificação da friedelina presente nas amostras de cera extraídas antes e depois da infestação com a broca da cana, foi possível constatar que houve um aumento na quantidade de friedelina encontrada na cera, levantando um indício de que esse composto participa de alguma forma do mecanismo de proteção da planta contra essa praga.

**CAPÍTULO 3 – MODELOS QUIMIOMÉTRICOS A PARTIR DE DADOS  
ESPECTROSCÓPICOS DE INFRAVERMELHO-PRÓXIMO**

### 3.1. INTRODUÇÃO

A análise discriminante por quadrados mínimos parciais (PLS-DA) é um método quimiométrico bastante utilizado em química (FERREIRA, 2015). Classificado como método supervisionado de reconhecimento de padrões, surgiu da alteração e da abordagem das variáveis dependentes no método de regressão dos quadrados mínimos parciais (PLS) (WOLD e SJÖSTRÖM, 1977). A principal alteração foi a utilização de propriedades de interesses, ou seja, as variáveis dependentes, discretas como verdadeiro/falso, bom/ruim, resistente/suscetível, entre outras.

Considera-se que o PLS-DA é um método supervisionado devido ao fato de se utilizar amostras representativas de cada classe e sobre as quais se sabe, *a priori*, em qual delas cada amostra se encaixa. A partir dessas informações é que o modelo empírico que busca discriminar essas amostras em suas respectivas classes é construído e pode ser utilizado para prever amostras que não se conhece a classificação (FERREIRA, 2015).

Modelos construídos com o método PLS-DA podem ser utilizados para discriminar espécies de madeiras (SOARES, SILVA, *et al.*, 2017), óleos vegetais comestíveis (SANTANA, SOUZA, *et al.*, 2020), tipos de mel (LENHARDT, BRO, *et al.*, 2015), óleo de oliva adulterado (VIEIRA, ASSIS, *et al.*, 2021) entre outros. A construção desses modelos pode ser feita por exemplo a partir de informações espectroscópicas ou cromatográficas obtidas das amostras, ou de uma pequena parte delas, quando se utilizar a cromatografia. Dessa forma, essas mesmas amostras podem ser utilizadas em outros tipos de análises.

Entretanto, a utilização de dados espectroscópicos e cromatográficos para a construção dos modelos de PLS-DA podem gerar resultados não satisfatórios. Um dos motivos para que esses modelos não sejam suficientemente exatos é a quantidade de variáveis independentes que essas técnicas geram, que podem não estar relacionadas com as variáveis dependentes incluídas no modelo (FERREIRA, 2015; YUN, WANG, *et al.*, 2015).

Por isso, para diminuir esse erro o ideal é utilizar um método de seleção de variáveis que torna o modelo construído mais simples e com maior capacidade

preditiva, uma vez que as variáveis empregadas na construção do modelo estão de fato relacionadas com o problema em questão (FERREIRA, 2015).

Um dos métodos utilizados para selecionar as variáveis mais representativas da propriedade de interesse é a seleção de preditores ordenados (OPS) (TEÓFILO, MARTINS e FERREIRA, 2009). De forma geral, o método OPS parte de um vetor informativo que indica quais variáveis apresentam maiores informações sobre a variável dependente. Uma vez que este vetor é estabelecido ele é usado para definir quais as variáveis originais que são importantes bem como o nível de importância de cada uma delas. As variáveis originais são então organizadas em ordem decrescente de importância e o modelo é novamente construído a partir de uma janela inicial de variáveis à qual adiciona-se incrementos (um número determinado das variáveis restantes). O modelo escolhido é aquele que apresentar o menor valor para o erro da previsão (FERREIRA, 2015; TEÓFILO, MARTINS e FERREIRA, 2009).

Sendo assim, o objetivo deste capítulo foi desenvolver um método não destrutivo capaz de identificar genótipos de cana-de-açúcar plantados em campo que sejam resistentes à broca da cana, utilizando a espectroscopia NIR aliada ao método quimiométrico de classificação de quadrados mínimos parciais para análise discriminante (PLS-DA) juntamente com um método de seleção de variáveis, isto é, o método de seleção de preditores ordenados (OPS).

## **3.2. OBJETIVOS**

### **3.2.1. Objetivo geral**

Desenvolver modelos quimiométricos capazes de identificar genótipos de cana-de-açúcar, resistentes e suscetíveis em relação à infestação da broca da cana, plantados em campo, utilizando dados de dois espectrofotômetros (portátil e de bancada) a fim de verificar a possibilidade de se realizar essas análises sem que seja necessário coletar as amostras.

### **3.2.2. Objetivos específicos**

- Coletar a folha +1 (Figura 6) de diferentes genótipos de cana-de-açúcar e realizar análises utilizando a técnica de espectroscopia no infravermelho próximo (NIR) com os equipamentos portátil e de bancada.

- Construir modelos utilizando o método de quadrados mínimos parciais para análise discriminante (PLS-DA) a partir dos espectros obtidos diretamente das folhas, que sejam capazes de identificar genótipos suscetíveis e resistentes.
- Comparar os modelos construídos a fim de verificar a possibilidade de realizar as análises em campo sem que seja necessário coletar as folhas utilizadas na construção dos modelos.

### 3.3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.3.1. Amostras e aquisição dos dados

As 30 amostras utilizadas nesta etapa foram disponibilizadas pelo banco germoplasma do Programa de Melhoramento Genético de Cana-de-Açúcar da Universidade Federal de Viçosa. Nesse caso, foram recolhidas as folhas +1 (ilustrada na Figura 6) dos genótipos listados na Tabela 5, em triplicata, em diferentes etapas do desenvolvimento das plantas.

**Tabela 5:** Classificação como resistente (RES) ou suscetível (SUS) dos 30 genótipos utilizados de acordo com avaliação em campo em relação à broca da cana.

<b>Resistente</b>	<b>Suscetível</b>
RB147539	RB147532
RB147529	RB147582
RB147586	RB147583
RB147589	RB147537
RB147585	RB047016
RB047050	RB147588
RB147592	RB147535
RB047201	RB147530
RB047055	RB147536
RB047212	RB147584
RB147590	RB147531
RB147591	RB047248
RB047226	RB057249
RB147538	RB147534
RB867515	RB057231

Os instrumentos utilizados para a aquisição de dados foram os espectrofotômetros de infravermelho próximo portátil DLP NIRScan Nano (Texas Instruments, EUA), na faixa de 900 a 1700 nm e o Thermo Scientific Antaris II com transformada de Fourier, na faixa de 1.000 a 2.500 nm.

As amostras foram organizadas em grupos, de acordo com o instrumento utilizado e com o tempo em que foi realizada a coleta, em relação ao plantio dos genótipos, como mostrado na Tabela 6.

**Tabela 6:** Organização dos grupos de amostras em relação ao instrumento utilizados nas análises e em relação à idade das mesmas quando foi realizada a coleta das folhas.

<b>Idade das amostras</b>	<b>Antaris II</b>	<b>NIRScan</b>
<b>10 meses</b>	A	D
<b>11 meses</b>	B	E
<b>12 meses</b>	C	F

Para essas análises, as amostras de folha foram coletadas em campo e os espectros de infravermelho próximo foram obtidos logo em seguida com o espectrofotômetro portátil NIRScan. Após essas análises, as amostras foram armazenadas em freezer à temperatura de  $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$  e no dia seguinte, após o descongelamento das amostras, foram obtidos novos espectros com o espectrofotômetro Antaris II. Em ambos os casos os espectros foram obtidos diretamente de três pontos diferentes, do terço médio das folhas, em triplicata, sem quaisquer outros preparos das amostras.

### 3.3.2. Análise de dados

Para a análise dos dados espectroscópicos inicialmente foi montada uma matriz de dados com as amostras organizadas em linhas e as variáveis (comprimento de onda) nas colunas.

O próximo passo consistiu em separar o conjunto de calibração, que foi usado na construção do modelo, e o conjunto de previsão, que após a obtenção do modelo foi utilizado para verificar seu nível de previsão. Os conjuntos de calibração e previsão foram separados aleatoriamente, usando o algoritmo de Kennard e Stone (KENNARD e STONE, 1969), contendo 70% e 30% dos dados, respectivamente. Para cada modelo foram testados diversos pré-processamentos de dados a fim de diminuir o ruído, por exemplo, avaliando sempre a necessidade de cada caso e visando a obtenção do melhor modelo possível.

O PLS-DA foi utilizado para construir os modelos de classificação considerando duas classes, suscetível e resistente. Para a validação cruzada, onde cada amostra

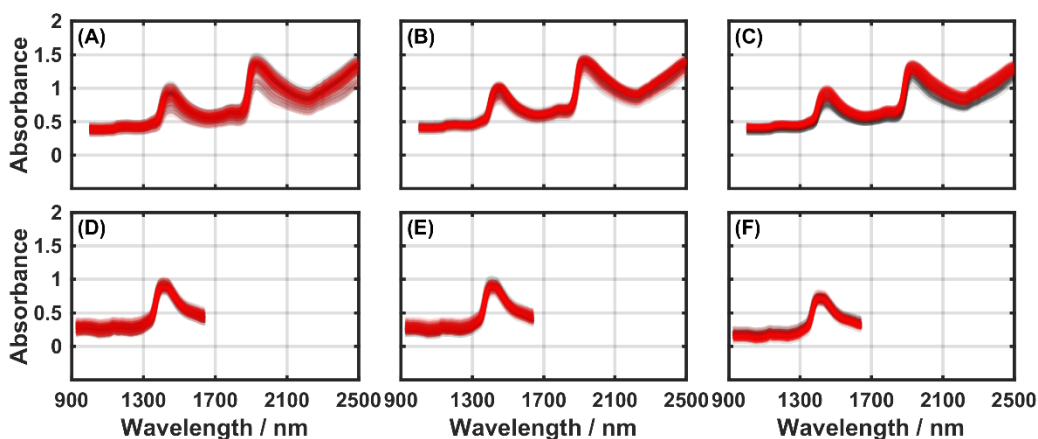
do conjunto de calibração é removida deste grupo e prevista pelo modelo desenvolvido, foi aplicada a técnica Venetian blinds onde define-se divisões em 10% do conjunto de calibração para ser prevista pelo modelo. Todos os cálculos foram realizados no software Matlab 2016a (Math Works, Natick, EUA).

Para a classificação das amostras foi determinado o valor limiar, conhecido como valor threshold, utilizando uma função de probabilidade normal (PÉREZ, FERRÉ e BOQUÉ, 2009). Desta forma, amostras que apresentaram valores acima do valor threshold foram classificadas como pertencentes à classe e aquelas com valores abaixo foram consideradas como não pertencentes à classe.

A validação do modelo foi feita avaliando a sensibilidade, especificidade e erro de classificação da calibração, da validação cruzada e da previsão utilizando as equações 3, 4 e 5, apresentadas anteriormente.

### 3.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Comparando os espectros obtidos nos três meses de acompanhamento dos genótipos, mostrados na Figura 11, não foi possível notar diferenças significativas entre os dados obtidos nos diferentes meses e nem mesmo entre os espectros dos genótipos resistentes (preto) e suscetíveis (vermelho).



**Figura 11:** Espectros obtidos com o espectrofotômetro de bancada (Grupos A, B e C) e com os espectros obtido com o espectrofotômetro portátil (Grupos D, E e F), sendo as amostras em vermelho classificadas como suscetíveis e em preto como resistentes.

A diferença que pode ser observada na Figura 11, entre os espectros dos Grupos A, B e C em relação aos Grupos D, E e F está relacionada com a faixa de radiação emitida por cada instrumento. Enquanto o espectrofotômetro de bancada

Antaris II abrange uma faixa de 1000 a 2500 nm, a radiação emitida pelo NIRScan varia apenas de 900 a 1700 nm. Por isso, os espectros dos Grupos D, E e F apresentam menor quantidade de informações, sendo essa a única discrepância observada.

Para obtenção dos modelos de previsão, foram realizados os pré-processamentos necessários para cada grupo de dados, visando o menor erro da calibração e da previsão, bem como a presença de outliers. Idealmente, os parâmetros sensibilidade e especificidade devem apresentar valores iguais a 1. A sensibilidade está relacionada com a capacidade do modelo prever os dados pertencentes a uma determinada classe, dentro do conjunto de dados. Já a especificidade indica que o modelo só prevê os dados como sendo de uma determinada classe caso eles realmente pertençam a essa classe. No que diz respeito ao erro, os valores obtidos deveriam idealmente ser iguais a zero, indicando que todas as amostras foram previstas corretamente em suas respectivas classes.

De acordo com os resultados obtidos para os modelos de PLS-DA de cada grupo de amostras (Tabela 7), pode-se notar que nenhum dos modelos apresentou os valores ideais almejados. Entre todos os modelos construídos, o que obteve os melhores valores para os parâmetros estudados foi o Modelo B, cujas amostras foram coletadas onze meses após o plantio e cujos espectros foram obtidos com o espectrofotômetro Antaris II. Com esse modelo foi possível atingir os valores máximos (iguais a um) para a sensibilidade e especificidade e o menor valor (zero) para o erro, dentro do conjunto de calibração. Apesar de não ser capaz de prever todas as amostras corretamente na validação cruzada e na previsão, o Modelo B apresentou o menor erro na previsão entre os grupos de dados (erro previsão = 0,32). Em relação aos dados obtidos pelo espectrofotômetro portátil (Grupos D, E e F), todos os modelos apresentaram resultados inferiores em comparação com o Grupo B. Sendo assim, o melhor período para coleta de amostras, com o intuito de prever quais genótipos são resistentes, seria aos onze meses após o plantio.

**Tabela 7:** Resultados das figuras de mérito (sensibilidade, especificidade e erro) para os parâmetros de classificação, validação cruzada e previsão dos modelos quimiométricos utilizando o método PLS-DA para os dados obtidos com os espectrofotômetros Antaris II e NIRScan Nano.

		PLS-DA											
		Antaris II						NIRScan Nano					
Classe	nVL	A (Dez meses)		B (Onze meses)		C (Doze meses)		D (Dez meses)		E (Onze meses)		F (Doze meses)	
		Sus	Res	Sus	Res	Sus	Res	Sus	Res	Sus	Res	Sus	Res
		5		6		8		6		8		6	
		<b>Calibração</b>		<b>Calibração</b>		<b>Calibração</b>		<b>Calibração</b>		<b>Calibração</b>		<b>Calibração</b>	
<b>Sensibilidade</b>		0,97	0,97	1	1	1	1	0,93	0,93	0,77	0,87	0,61	0,84
<b>Especificidade</b>		0,97	0,97	1	1	1	1	0,93	0,93	0,87	0,77	0,84	0,61
<b>Erro</b>		0,03		0		0		0,06		0,18		0,27	
		<b>Validação cruzada</b>		<b>Validação cruzada</b>		<b>Validação cruzada</b>		<b>Validação cruzada</b>		<b>Validação cruzada</b>		<b>Validação cruzada</b>	
<b>Sensibilidade</b>		0,71	0,67	0,77	0,87	0,93	0,84	0,61	0,61	0,54	0,84	0,58	0,68
<b>Especificidade</b>		0,67	0,71	0,87	0,77	0,84	0,93	0,61	0,61	0,84	0,54	0,68	0,58
<b>Erro</b>		0,31		0,18		0,11		0,38		0,31		0,37	
		<b>Previsão</b>		<b>Previsão</b>		<b>Previsão</b>		<b>Previsão</b>		<b>Previsão</b>		<b>Previsão</b>	
<b>Sensibilidade</b>		0,78	0,43	0,64	0,71	0,71	0,50	0,57	0,78	0,21	0,50	0,50	0,79
<b>Especificidade</b>		0,43	0,78	0,71	0,64	0,50	0,71	0,78	0,57	0,50	0,21	0,79	0,50
<b>Erro</b>		0,39		0,32		0,39		0,32		0,64		0,36	

nVL: número de variáveis latentes

Observando a Figura 11 é possível notar que algumas regiões dos espectros, obtidos com ambos os instrumentos, não apresentam picos, que são os sinais característicos quando a radiação é absorvida pela amostra. Esse é um indicativo que a amostra não interage com essa faixa de radiação e por isso os resultados de absorção para esses comprimentos de onda não são relevantes para a classificação dos genótipos estudados (XIAOBO, JIEWEN, et al., 2010). Além disso, podem existir regiões dos espectros em que a razão entre o sinal e o ruído do instrumento é pequena e, uma vez que esses resultados são incluídos na construção dos modelos, podem acarretar em prejuízos em sua capacidade preditiva (ROQUE, CARDOSO, et al., 2019).

Com a intenção de sanar essas limitações, foram construídos novos modelos nos quais utilizou-se apenas os resultados de absorbância dos comprimentos de onda que se mostraram significativos para a distinção entre as duas classes de genótipos estudadas. Para isso, foi utilizado um método de seleção de variáveis chamado seleção de preditores ordenados (OPS) a fim de melhorar os resultados obtidos com o método de classificação PLS-DA. Os resultados dos parâmetros sensibilidade, especificidade e erro da calibração, validação cruzada e previsão utilizando essa abordagem se encontram na Tabela 8.

**Tabela 8:** Resultados das figuras de mérito (sensibilidade, especificidade e erro) para os parâmetros de classificação, validação cruzada e previsão dos modelos quimiométricos utilizando o método OPS-DA para os dados obtidos com os espectrofotômetros Antaris e NIRScan Nano

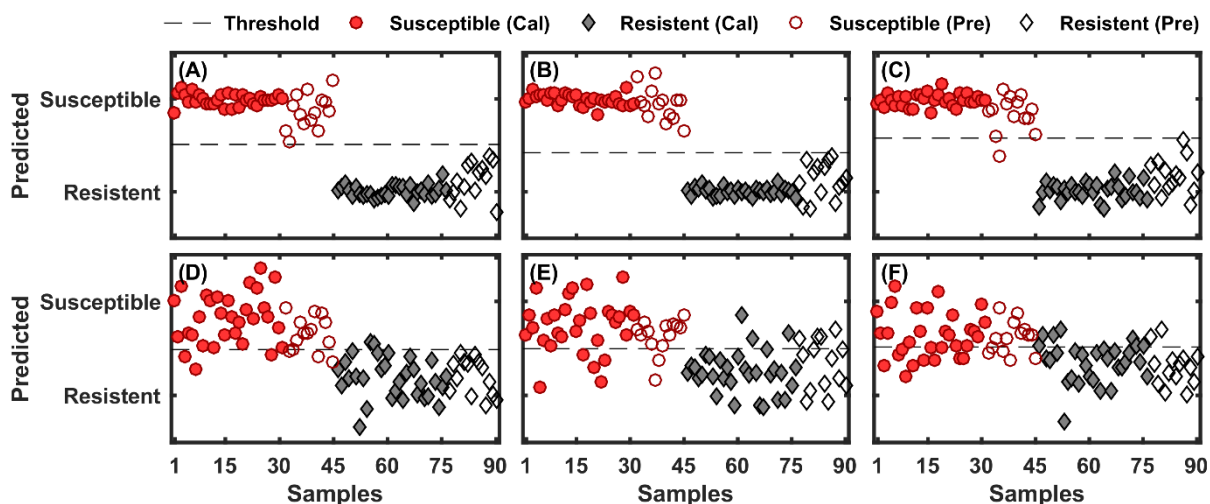
		OPS-DA											
		Antaris						NIRScan Nano					
Classe	nVL	A (Dez meses)		B (Onze meses)		C (Doze meses)		D (Dez meses)		E (Onze meses)		F (Doze meses)	
		Sus	Res	Sus	Res	Sus	Res	Sus	Res	Sus	Res	Sus	Res
		5		6		8		6		8		6	
		<b>Calibração</b>		<b>Calibração</b>		<b>Calibração</b>		<b>Calibração</b>		<b>Calibração</b>		<b>Calibração</b>	
<b>Sensibilidade</b>		1	1	1	1	1	1	0,90	0,93	0,84	0,87	0,64	0,8
<b>Especificidade</b>		1	1	1	1	1	1	0,93	0,90	0,87	0,84	0,8	0,64
<b>Erro</b>		0		0		0		0,08		0,14		0,27	
		<b>Validação cruzada</b>		<b>Validação cruzada</b>		<b>Validação cruzada</b>		<b>Validação cruzada</b>		<b>Validação cruzada</b>		<b>Validação cruzada</b>	
<b>Sensibilidade</b>		0,93	0,87	1	0,93	1	1	0,80	0,74	0,68	0,84	0,48	0,84
<b>Especificidade</b>		0,87	0,93	0,93	1	1	1	0,74	0,80	0,84	0,68	0,84	0,48
<b>Erro</b>		0,1		0,03		0		0,22		0,24		0,34	
		<b>Previsão</b>		<b>Previsão</b>		<b>Previsão</b>		<b>Previsão</b>		<b>Previsão</b>		<b>Previsão</b>	
<b>Sensibilidade</b>		1	1	1	1	0,93	1	0,78	1	0,85	0,57	0,71	0,85
<b>Especificidade</b>		1	1	1	1	1	0,93	1	0,78	0,57	0,85	0,85	0,71
<b>Erro</b>		0		0		0,03		0,11		0,28		0,21	

nVL: número de variáveis latente

Mesmo considerando essa outra abordagem, ou seja, a utilização do OPS, o modelo com os melhores resultados para a classificação, validação cruzada e previsão ainda foi o Modelo B, construído a partir dos dados obtidos com o espectrofotômetro Antaris II e das amostras coletadas onze meses após o plantio. Entretanto, a utilização do OPS levou aos valores ideais para a sensibilidade, especificidade e erro para o conjunto de previsão, e a um erro menor para a validação cruzada, que não foi possível atingir sem utilizar a seleção de variáveis.

Em relação aos espectros obtidos com o espectrofotômetro NIRScan Nano, mesmo apresentando melhora nos parâmetros avaliados ao utilizar o OPS como método de seleção de variáveis, ainda não foi possível alcançar os valores ideais. Isso pode ter ocorrido porque esse instrumento opera em uma faixa menor de radiação infravermelha, quando comparado ao Antaris II. Essa característica pode ser observada na Figura 11, onde os espectros obtidos com o Antaris II apresentam duas bandas enquanto aqueles obtidos com o NIRScan Nano apresentam somente uma banda, o que significa que uma menor quantidade de informação foi obtida com este instrumento.

Outra forma de verificar as informações contidas na Tabela 8 é por meio dos gráficos de previsão dos modelos OPS-DA que estão disponíveis na Figura 12. Nesses gráficos, as formas preenchidas correspondem aos dados do grupo de calibração, enquanto as formas vazias estão relacionadas aos dados do conjunto de previsão, sendo a cor vermelha atribuída à Classe 1 (suscetível) e a cor preta, à Classe 2 (resistente). Isso significa que idealmente todas as amostras em vermelho deveriam estar acima da linha tracejada, que indica o valor do threshold obtido para cada modelo, e todas as amostras em preto deveriam estar abaixo da referida linha.



**Figura 12:** Gráficos da classificação e previsão dos conjuntos de dados A (10 meses), B (11 meses) e C (12 meses) obtidos com espectrofotômetro de bancada Antaris e dos conjuntos de dados D (10 meses), E (11 meses) e F (12 meses) obtidos com espectrofotômetro portátil NIRScan Nano.

Corroborando com os dados apresentados na Tabela 8, é possível verificar na Figura 12 que nenhum dos modelos construídos com o espectrofotômetro portátil (D, E e F) atingiu o ideal esperado para a classificação e para a previsão, apresentando erros em ambos os conjuntos. Isso indica o baixo poder de classificação desses modelos. Em contrapartida, os modelos A, B e C, construídos a partir dos dados obtidos com o espectrofotômetro de bancada, apresentaram resultados satisfatórios inclusive atingindo os valores ideais para os modelos A e B.

Comparando com método de avaliação de resistência tradicionalmente empregado, a utilização do modelo desenvolvido não apresenta grandes vantagens em relação ao tempo entre o plantio e a coleta das amostras. Porém a superioridade deste método quimiométrico está no tipo e no preparo das amostras que são coletadas. Como citado anteriormente, para as análises espectrofotométricas apenas a folha +1 é coletada permitindo a utilização das demais partes da planta para outros tipos de análises. Neste trabalho, diferente do que foi realizado por Porto et al. (2019) não houve a necessidade de outras etapas de preparo de amostra, como o preparo de pellets, ou do manejo controlado das plantas, limitando o plantio dos genótipos em casas de vegetação.

No método tradicional o analista deve coletar o caule da planta, subdividi-lo nos entrenós e avaliar visualmente quantos dos entrenós foram perfurados pela larva para

que seja feito o cálculo do índice de incidência da broca da cana e a classificação dos genótipos. Em um pequeno grupo de amostras o tempo necessário para a obtenção dos dados em ambos os casos não seria tão diferente, entretanto quanto maior o número de genótipos a serem avaliados maiores são as dificuldades em obter os dados pelo método tradicional. Além disso, o fato de a avaliação da quantidade de entrenós avariados ser feita visualmente, há uma maior chance de erro na determinação da resistência a partir do índice de incidência da broca.

### **3.5. CONCLUSÕES**

A partir dos dados espectroscópicos obtidos com o espectrômetro de infravermelho próximo Thermo Scientific Antaris II foi possível construir um modelo de classificação para prever a resistência ou suscetibilidade de diferentes genótipos de cana-de-açúcar frente à praga broca da cana (*Diatraea saccharalis*) utilizando o método quimiométrico OPS-DA. Para os grupos cujos dados foram obtidos após 10 e 11 meses do plantio foi possível alcançar os valores ideais dos parâmetros sensibilidade, especificidade e erro para a classificação e previsão, mostrando a capacidade inequívoca de previsão dos modelos. Levando em consideração o menor erro da validação cruzada, o melhor modelo foi aquele construído a partir dos dados obtidos aos 11 meses (Grupo B), após o plantio. Como o método desenvolvido não necessita de pré-tratamento das amostras, ele se torna viável para análises de rotina. Além disso os novos genótipos podem ser plantados diretamente no campo e as outras partes da planta, exceto a folha +1, ainda podem ser utilizadas para diversas análises.

## **CAPÍTULO 4 – TESTE BIOLÓGICO**

#### 4.1. INTRODUÇÃO

Relembrando o que foi citado anteriormente, a mariposa da espécie *Diatraea saccharalis*, ou broca da cana-de-açúcar, é uma espécie nativa da América Central que também pode ser encontrada em regiões da América do Sul. Também é válido ressaltar que é na fase larval que esta espécie pode causar prejuízos nos cultivos de cana-de-açúcar.

Essa fase larval inicia-se após a eclosão dos ovos, que leva de quatro a seis dias para ocorrer, após a postura. A partir do momento em que saem dos ovos as larvas neonatas tendem a permanecer na ponteira da planta onde iniciam a alimentação do tecido das folhas e dentro de alguns dias, são capazes de abrir galerias nos colmos das plantas. Essa fase larval pode durar de 25 a 35 dias, a depender do clima local, culminando em novas mariposas (MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2007).

Devido aos buracos abertos pelas larvas da broca, iniciam-se os problemas nas lavouras. O dano no colmo pode debilitar a planta levando à quebra, além da diminuição do rendimento de sacarose em até 20% (MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2007). Pode ocorrer ainda a instalação de outros microrganismos oportunistas, como fungos, nos locais danificados levando a outras doenças como a podridão vermelha (LESLIE, 2004).

O controle da broca pode ser feito com a aplicação de inseticida enquanto as larvas ainda são jovens e não tenham adentrado no colmo da planta. Esse tipo de manejo não é tão simples de ser aplicado já que o desenvolvimento da broca da cana é rápido e as lavouras de cana-de-açúcar geralmente são de grande porte, levando à necessidade de que a aplicação do inseticida seja realizada com aeronave (MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2007).

O manejo também pode ser realizado por controle biológico utilizando vespas da espécie *Cotesia flavipes*, cujas larvas parasitam a broca da cana. Porém esse controle apresenta eficácia moderada e requer monitoramento e amostragem da população de broca na área a ser utilizada (GITAHY, SOUZA, *et al.*, 2007). Ou seja, as duas formas de controle apresentadas demandam um alto investimento e não são completamente eficazes.

Em estudos qualitativos realizados anteriormente por Porto (2018) foi feita uma observação relevante quanto à presença da friedelina na cera das folhas da cana (PORTO, 2018). Naquela ocasião, notou-se que os genótipos classificados como suscetíveis não apresentaram esse composto na composição da cera, indicando uma possível relação entre a presença da friedelina e a resistência apresentada pelos genótipos estudados. Entretanto, há a necessidade de realizar alguns testes biológicos para ajudar na confirmação desta correlação observada nesses estudos (PORTO, 2018).

Portanto, para verificar se a correlação entre resistência dos genótipos e presença de friedelina existe de fato, foi realizado um teste biológico no qual larvas da broca da cana foram alimentadas com uma dieta contaminada com diferentes concentrações de friedelina. A mortalidade dos indivíduos foi avaliada durante o experimento e usada para verificar a existência dessa correlação. As concentrações de friedelina empregadas estão correlacionadas com as concentrações previamente encontradas nas ceras dos genótipos suscetíveis e resistentes.

## **4.2. OBJETIVOS**

### **4.2.1. Objetivo geral**

Realizar um bioensaio a fim de verificar se as quantidades de friedelina encontradas nos genótipos estudados neste trabalho são capazes de interferir no desenvolvimento das larvas neonatas da broca da cana (*Diatraea saccharalis*).

### **4.2.2. Objetivos específicos**

- Obter posturas de mariposas da espécie *Diatraea saccharalis*.
- Transferir as larvas neonatas para placas de estudo a partir da eclosão dos ovos.
- Preparar a alimentação das larvas de acordo com o protocolo utilizado para a criação dos indivíduos desta espécie.
- Adicionar diferentes concentrações de friedelina na dieta e acompanhar as possíveis alterações no desenvolvimento das larvas, que possam ser relacionadas à quantidade de friedelina adicionada.

### **4.3. MATERIAIS E MÉTODOS**

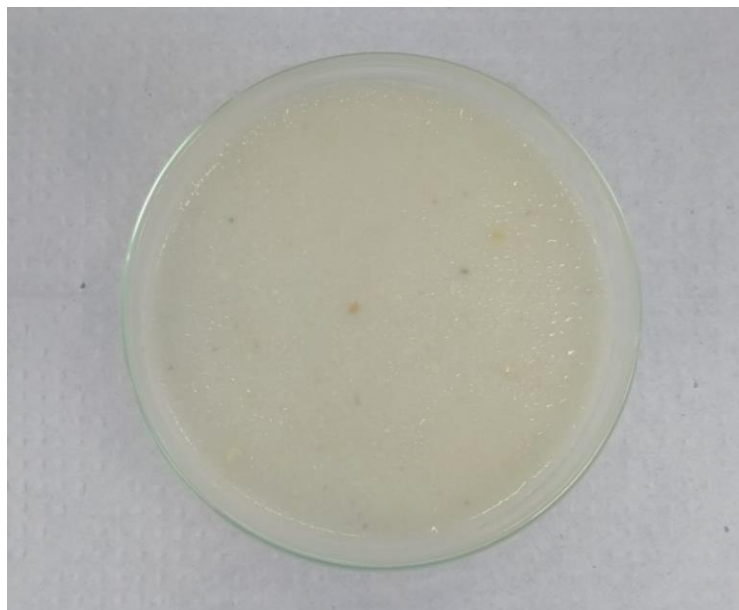
#### **4.3.1. Preparo da dieta**

Para a alimentação das brocas, inicialmente foi feito o preparo de uma solução vitamínica e de uma solução antibiótica. Para a solução vitamínica utilizou-se um sachê vitamínico solubilizado em 500 mL de água destilada, o qual foi armazenado em frasco âmbar. A solução antibiótica foi preparada solubilizando 8 g de terramicina e 100 g de açúcar em 450 mL de água destilada. Ambas as soluções foram armazenadas na geladeira.

Os ingredientes constituintes da alimentação das larvas bem como suas respectivas quantidades estão descritos a seguir: 7,5 g de germe de trigo, 27 g de farelo de soja, 26,25 g de açúcar, 3,75 g de sais de Wesson, 1,5 g de metilparabeno (Nipagin), 0,95 g de ácido ascórbico, 0,2 g de cloreto de colina, 0,375 mL de formol, 0,2 mL de Vitagold, 5,65 mL de solução vitamínica, 50 mL de solução antibiótica, 4,75 g de ágar e 450 mL de água destilada.

Todos os ingredientes, com exceção do ágar, foram homogeneizados em liquidificador com 250 mL de água destilada e em seguida aquecidos até fervura, sob agitação. Concomitantemente, o restante da água destilada (200 mL) e o ágar foram adicionados em outro recipiente onde foram aquecidos e agitados até a fervura. Neste ponto foi feita a mistura das duas partes da dieta em uma batedeira por cerca de 30 segundos, para melhor homogeneização dos componentes.

Logo após o preparo, enquanto o meio de cultura ainda estava quente, foram medidos 10 mL da mistura e transferidos para placas de Petri (Figura 13) com aproximadamente 7 cm de diâmetro, previamente autoclavadas e contaminadas com as devidas concentrações de friedelina. Essa quantidade da dieta foi utilizada para facilitar a visualização das larvas da broca caso elas adentrassem no meio de cultura.



**Figura 13:** Placa de Petri contendo o meio de cultura preparado, antes da transferência das larvas da broca da cana.

#### **4.3.2. Manejo das larvas da broca da cana**

Inicialmente, uma folha de papel manteiga contendo a postura dos ovos da mariposa da espécie *Diatraea saccharalis* foi recortada, escolhendo grupos de ovos. Esses ensaios foram realizados em uma capela com fluxo laminar, previamente esterilizada. As posturas escolhidas foram transferidas para placas Petri autoclavadas contendo algodão umedecido em água esterilizada (Figura 14), a fim de evitar o ressecamento dos ovos e a possível não eclosão dos mesmos.



**Figura 14:** Folha com as posturas dos ovos da mariposa da espécie *Diatraea saccharalis* transferida para a placa de Petri aguardando a eclosão.

Após a eclosão dos ovos, foram transferidas 24 larvas para cada placa com o auxílio de um pincel de cerdas macias.

Neste experimento foi utilizado um conjunto de placas como controle (Grupo T<sub>0</sub>), ou seja, sem a adição de friedelina. Nas demais placas foram adicionadas quantidades variáveis de friedelina, compatíveis com aquelas encontradas nas amostras de cera previamente analisadas neste trabalho. Todo o experimento foi realizado em triplicata. As quantidades de friedelina adicionadas à dieta foram: 0,0464% (T<sub>1</sub>); 0,2607% (T<sub>2</sub>); 0,4773% (T<sub>3</sub>); 3,735% (T<sub>4</sub>) e 19,07% (T<sub>5</sub>) (%(m/m)). Os grupos T<sub>1</sub> e T<sub>2</sub> correspondem às concentrações observadas nas amostras suscetíveis antes e após a infestação, respectivamente. Os grupos T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub> também correspondem às concentrações encontradas antes e após a infestação, nesta ordem, porém em amostras classificadas como resistentes. O grupo T<sub>5</sub> foi contaminado com a friedelina na mesma concentração da amostra de cera do genótipo IM76228, o qual apresentou a maior concentração do composto (Tabela 4).

Uma vez que as larvas foram transferidas para a dieta, as placas foram condicionadas em câmara incubadora (BOD) à temperatura de 28 °C, com fotoperíodo de 12 horas. A mortalidade das larvas foi verificada no terceiro, quinto e sétimo dia,

sendo que o critério para avaliação foi baseado na locomoção das larvas após realizar um leve toque com um pincel de cerdas macias (SILVA, SILVA, *et al.*, 2018).

#### 4.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se inicialmente que ocorreu uma mudança na coloração dos ovos com o passar dos dias. No dia da transferência para a placa de Petri, que não continha a dieta, os ovos apresentavam uma coloração amarelo claro, como mostra a Figura 14. Entretanto, no dia seguinte já foi possível notar alterações na cor das posturas que passaram a apresentar uma coloração próxima ao marrom como mostra a Figura 15.



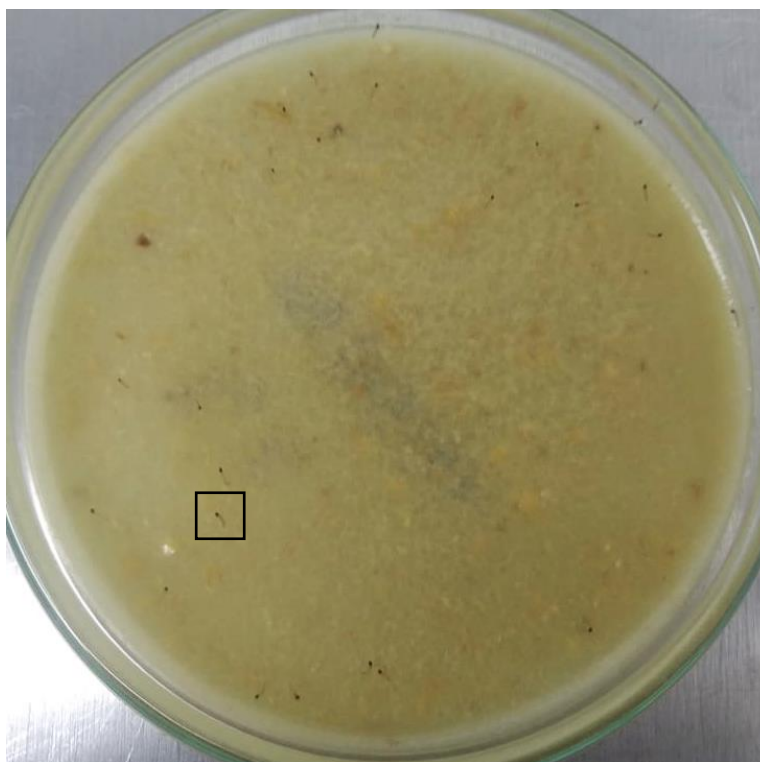
**Figura 15:** Posturas da mariposa da broca da cana um dia após a transferência para a placa de Petri.

No dia imediatamente anterior à eclosão dos ovos, foi observada mais uma alteração na cor das posturas, ilustrada na Figura 16, que passaram a apresentar pequenos pontos pretos indicando a maturação dos ovos.



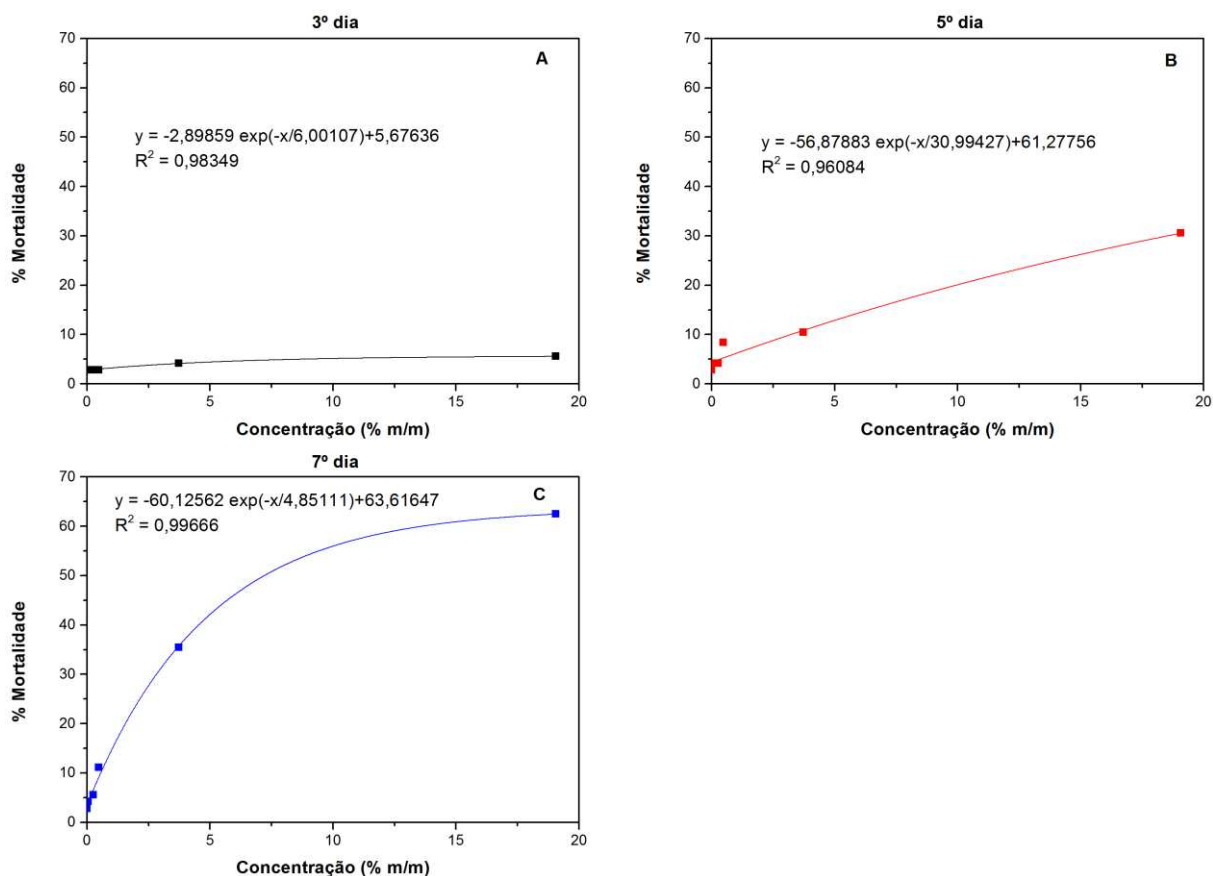
**Figura 16:** Foto das posturas um dia antes da eclosão dos ovos.

Assim que foi percebida a eclosão dos ovos, as larvas foram transferidas cuidadosamente para a superfície das placas contendo a dieta como mostra a Figura 17.



**Figura 17:** Larvas da broca da cana logo após a eclosão, transferidas para a placa de Petri. Dentro do retângulo é possível ver um dos indivíduos da espécie.

Como citado no item 4.3.2, a avaliação da porcentagem de mortalidade das brocas foi realizada nos dias 3, 5 e 7 a contar da ocasião da eclosão dos ovos, a partir da verificação da mobilidade das larvas após o toque com um pincel de cerdas macias. Os resultados obtidos estão ilustrados Figura 18.



**Figura 18:** Porcentagem de mortalidade das brocas em função da concentração para o terceiro (A), quinto (B) e sétimo (C) dia.

Observando os gráficos exibidos na Figura 18, pode-se perceber que no terceiro dia de verificação da mortalidade das larvas, praticamente não houve alteração na mortalidade para as diferentes concentrações de friedelina avaliadas. A porcentagem de mortalidade para o controle foi de 2,8% e para a maior concentração de friedelina ( $T_5 = 19,07\%$  m/m) a mortalidade foi de 5,6%.

Já no quinto dia, observou-se uma taxa de mortalidade entre 2,8 % ( $T_0$ ) e 10,4% ( $T_4$ ) para os grupos com menores concentrações de friedelina, e um máximo de 30,6% para a concentração de 19,07% m/m de friedelina.

No sétimo dia, com exceção do grupo de controle, os demais grupos apresentaram taxas de mortalidade maiores. Os grupos com concentrações de

friedelina compatíveis com as encontradas em genótipos suscetíveis apresentaram taxas de mortalidade próximas a 5% ( $T_1 = 4,2\%$  e  $T_2 = 5,6\%$ ). Os grupos  $T_3$  e  $T_4$ , cujas concentrações de friedelina foram equivalentes aquelas encontradas em genótipos resistentes, antes e depois da infestação da broca, apresentaram taxas de mortalidade de 11,1 e 35,4%, respectivamente. Com isso é possível perceber que o aumento da quantidade de friedelina após a infestação da praga aumenta a eficiência da defesa da cana-de-açúcar.

O Grupo  $T_5$ , com concentração equivalente ao genótipo IM76228, apresentou uma taxa de mortalidade de 62,5% no sétimo dia de verificação. Esse genótipo não apresenta características apreciáveis para a indústria sucroalcooleira. Entretanto, essa característica pode ser vantajosa no cruzamento de espécies e no melhoramento genético.

Outro ponto interessante que é possível notar no gráfico do sétimo dia é que não há grandes alterações na porcentagem de mortalidade do grupo de controle e das duas primeiras concentrações utilizadas neste experimento. Essas concentrações citadas de friedelina são compatíveis com aquelas observadas na cera dos genótipos suscetíveis indicando que a quantidade de friedelina não é suficiente para inibir o ataque da broca ao fim da primeira semana após a eclosão.

A dose letal mediana ( $DL_{50}$ ) foi calculada utilizando as equações descritas nos Gráficos A, B e C da Figura 18. Para o terceiro dia não foi possível estimar a concentração de friedelina necessária para atingir o valor de 50% de mortalidade. Para o quinto dia, a concentração estimada para atingir a  $DL_{50}$  foi de 50,15% de friedelina (%m/m), não sendo compatível com nenhuma das concentrações observadas nos genótipos estudados. Já a concentração estimada como necessária para surtir o mesmo efeito no sétimo dia de contato entre o substrato contaminado e a broca foi de 7,20% m/m.

Esse valor calculado é aproximadamente o dobro do teor observado no item 2.4.3 para o genótipo RB147591, após a infestação. A partir desta informação, apenas o genótipo IM76228, entre as variedades estudadas, seria capaz promover cerca de 50% de mortalidade da broca. Já os demais genótipos não apresentariam resultados

satisfatórios. Entretanto, os valores calculados de  $DL_{50}$  para o quinto e o sétimo dia mostram um declínio com o passar do tempo.

Essa informação torna possível inferir que caso o estudo continuasse por mais alguns dias, concentrações ainda menores que 7,20% de friedelina seriam capazes de causar 50% de mortalidade nos indivíduos estudados.

Outro fator que contribui para dar sustentabilidade a essa inferência é que ao longo das verificações das larvas durante o experimento, foi observado ainda que a partir do terceiro dia de contato, alguns dos indivíduos dos grupos cuja dieta foi contaminada com friedelina não respondiam vigorosamente ao toque realizado com o pincel. Enquanto no grupo de controle as larvas se moviam rapidamente após o toque, chegando a se movimentar pela placa buscando abrigo em outro ponto. As larvas dos demais grupos apesar de se moverem não o faziam de forma vigorosa, mesmo após um segundo toque.

Além disso, após a verificação realizada no último dia deste estudo (sétimo dia), foi feita uma comparação do tamanho entre um indivíduo pertencente ao grupo de controle e um indivíduo que se alimentou da dieta contaminada com friedelina que ainda demonstrava capacidade de se locomover pela placa, apesar de aparente debilitação. Enquanto a larva do grupo de controle chegou a aproximadamente 7 mm de comprimento a broca que se alimentou da dieta contendo a friedelina apresentou tamanho reduzido, cerca de 4 mm de comprimento (Figura 19).



**Figura 19:** Comparação entre um indivíduo do grupo de controle (à direita) e um indivíduo cuja alimentação foi contaminada com friedelina (à esquerda).

Esse déficit de desenvolvimento dos indivíduos que foram alimentados com a dieta contendo friedelina já era esperado, tendo em vista que um dos efeitos deste composto em larvas de outras espécies de mariposa foi a inibição do comportamento alimentar. Em larvas de mariposa das espécies *H. armigera* e *S. litura*, 84,57% e 75,28% dos indivíduos apresentaram diminuição na atividade alimentar. (MOITEIRO, CURTO, *et al.*, 2006; BASKAR, DURAI PANDIYAN e IGNACIMUTHU, 2014).

Sendo assim, durante o tempo utilizado nesse estudo, as concentrações T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub> não foram compatíveis com a DL<sub>50</sub> mesmo sendo equiparáveis às concentrações de genótipos previamente classificados como resistentes. Uma explicação para esse fator pode estar na presença de outros compostos na cera que também apresentam correlação com a resistência exibida por alguns genótipos.

Em estudo realizado por Wartha e colaboradores (2022) foi possível correlacionar outros compostos, além da friedelina, com a resistência à broca da cana apresentada em campo por algumas variedades de cana-de-açúcar (WARTHA, PORTO, *et al.*, 2022). Entre os compostos correlacionados estão os álcoois dotriacontanol e triacontanol, e os alcanos octatriacontano e heptacosano. Portanto, para complementar os resultados obtidos até este ponto seria interessante verificar por meio de bioensaio quais efeitos são observados ao utilizar um ou mais desses compostos aliados à friedelina.

#### 4.5. CONCLUSÕES

O bioensaio realizado permitiu observar os efeitos da friedelina em larvas da mariposa *Diatraea saccharalis*. O grupo T<sub>5</sub>, com concentração de friedelina compatível com o genótipo IM76228, apresentou os melhores resultados de mortalidade, chegando a 62,5%. A dose letal mediana (DL<sub>50</sub>) estimada para o sétimo dia foi de 7,20% m/m não sendo inferior apenas à concentração do grupo T<sub>5</sub> (19,07% m/m de friedelina). Entretanto, ao longo do experimento foi notado um déficit de desenvolvimento nos indivíduos alimentados com friedelina, corroborando com o efeito de inibição alimentar já evidenciado em outros estudos. Tendo em vista que a dose letal mediana diminuiu com o passar os dias, provavelmente um estudo mais longo pode mostrar que as concentrações encontradas em outros genótipos, além do IM76228, são capazes de inibir ainda mais o desenvolvimento das larvas e ultrapassar a DL<sub>50</sub>.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. Resolução RDC n° 166. **Diário Oficial da União**, 2017. Disponível em: <[https://www.in.gov.br/materia/-/asset\\_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/19194581/do1-2017-07-25-resolucao-rdc-n-166-de-24-de-julho-de-2017-19194412](https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/19194581/do1-2017-07-25-resolucao-rdc-n-166-de-24-de-julho-de-2017-19194412)>.
- AGROLINK. O portal do conteúdo agropecuário. Disponível em: <[https://www.agrolink.com.br/problemas/broca-do-colmo\\_375.html](https://www.agrolink.com.br/problemas/broca-do-colmo_375.html)>. Acesso em: 21 Abril 2022.
- ARTHUR, C. L.; PAWLISZYN, J. Solid-phase Microextraction with thermal desorption using fused-silica optical fibers. **Analytical Chemistry**, v. 62, p. 2145-2148, October 1990.
- ASIKIN, Y. et al. Wax, policosanol, and long-chain aldehydes of different sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) cultivars. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 114, p. 583-591, January 2012.
- ATTARD, T. M. et al. Sugarcane waste as a valuable source of lipophilic molecules. **Industrial Crops and Products**, v. 76, p. 95-103, 2015.
- BARBOSA, M. H. P. et al. Genetic improvement of sugar cane for bioenergy: the Brazilian experience in network research with RIDESEA. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 12, p. 87-98, 2012. ISSN 1984-7033.
- BARROCA, M. M.; SILVEIRA, J. N.; ALVAREZ-LEITE, E. M. Determinação da 2,5-hexanodiona em amostras de urina submetidas à hidrólise ácida: importância da coluna cromatográfica e do pH do meio. **Química Nova**, v. 26, p. 570-572, 2003.
- BASKAR, K.; DURAI PANDIYAN, V.; IGNACIMUTHU, S. Bioefficacy of the triterpenoid friedelin against *Helicoverpa armigera* (Hub.) and *Spodoptera litura* (Fab.) (Lepidoptera: Noctuidae). **Pest Management Science**, 70, 26 February 2014. 1877-1883.
- BERRUETA, L. A.; ALONSO-SALCES, R. M.; HÉBERGER, K. Supervised pattern recognition in food analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1158, n. 1-2, p. 196-214, 2007.
- CALIARI, I. P. et al. Estimation of cellulose crystallinity of sugarcane biomass using near infrared spectroscopy and multivariate analysis methods. **Carbohydrate Polymers**, v. 158, p. 20-28, 2017.
- CAVALCANTE, M. S. **A verdadeira história da cachaça**. São Paulo: Sá Editora, 2011.
- CHEAVEGATTI-GIANOTTO, A. et al. Sugarcane (*Saccharum X officinarum*): A reference study for the regulation of genetically modified cultivars in Brazil. **Tropical Plant Biology**, v. 4, p. 62-89, Mar 2011.
- CHRISTIANSEN, K. et al. Mass spectrometry of long-chain aliphatic aldehydes, dimethyl acetals and Alk-1-enyl ethers. **Lipids**, v. 4, p. 421-427, 1969.

CHRISTY, A. A. et al. The Detection and Quantification of Adulteration in Olive Oil by Near-Infrared Spectroscopy and Chemometrics. **Analytical Sciences**, v. 20, p. 935 - 940, 2004.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da Safra Brasileira - Cana-de-Açúcar**. Conab. Brasília, p. 62. 2018. (2318-7921).

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da Safra Brasileira - Cana-de-açúcar**. Conab. Brasília, p. 75. 2019. (2318-7921).

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar**. CONAB. Brasília, p. 8-11. 2021. (2318-7921).

CORSINO, J. et al. Biosynthesis of friedelane and quinonemethide triterpenoids is compartmentalized in *Maytenus aquifolium* and *Salacia campestris*. **Phytochemistry**, v. 55, n. 7, p. Dec, D 2000.

CRONQUIST, A. An integrated system of classification of flowering plants. **Columbia University Press**, New York, p. 1262, 1981.

DINARDO-MIRANDA, L. L. et al. Resistance of sugarcane cultivars to *Diatraea saccharalis*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, p. 1-7, 2012.

DOMÍNGUEZ, E. et al. La cutícula vegetal: estructura y funciones. **Ecologia**, v. 12, p. 293-305, 1998. ISSN 0214-0896.

DRENNEN, J. K.; KRAEMER, E. G.; LODDER, R. A. Advances and perspectives in Near-Infrared Spectrophotometry. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 22, p. 443-475, 1991.

EGGLESTON, G. et al. Brown and green sugarcane leaves as potencial biomass: hoe they deteriorate under dry and wet storage conditions. **Industrial Crops and Products**, v. 57, p. 69-81, 2014.

EIGENBRODE, S. D.; ESPELIE, K. E. Effects of Plant Epicuticular Lipids on Insect Herbivores. **Annual Review of Entomology**, v. 40, p. 171-194, 1995.

FERREIRA, E. A. et al. Composição Química da Cera Epicuticular e Caracterização da Superfície Foliar em Genótipos de Cana-de-Açúcar. **Planta Daninha**, v. 23, n. 4, p. 611-619, 2005.

FERREIRA, M. M. C. **Quimiometria - Conceitos, Métodos e Aplicações**. Campinas: Unicamp, 2015.

FERREIRA, O. L. **História do Brasil**. São Paulo: Ática, 1996.

FERRY, N. et al. Plant-insect interactions: Molecular approaches to insect resistance. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 15, n. 2, p. 155-161, 2004.

FILHO, A. P. S. S. Proposta metodológica para análise da ocorrência de sinergismo e efeitos potencializadores entre aleloquímicos. **Planta daninha**, v. 24, p. 607-610, Set 2006. ISSN 1806-9681.

FRAME, A. **Anti-bacterial plant compositions**. US20050222095A1, 2003.

GALLO, D. et al. **Entomologia Agrícola**. Piracicaba (SP): FEALQ, v. 10, 2002. 920 p. ISBN 85-7133-011-5.

GIL, L. **Cortiça - Produção, Tecnologia e Aplicação**. Instituto Nacional de Engenharia e Tecnologia Industrial. Lisboa. 1998.

GITAHY, P. M. et al. A brazilian *Bacillus thuringiensis* strain highly active to sugarcane borer *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 531-537, 2007. ISSN 1517-8382.

HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa**. 8<sup>a</sup> - Reimpressão. ed. [S.I.]: LTC, 2015.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA - INMETRO. Orientação sobre validação de métodos analíticos, 2016. Disponível em: <[http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8\\_05.pdf](http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_05.pdf)>.

JÄGER, S. et al. Pentacyclic triterpene distribution in various plants - rich sources for a new group of multi-potent plant extracts. **Molecules**, v. 14, n. 6, p. 2016-2031, Jun 2009.

KENNARD, R. W.; STONE, L. A. Computer Aided Design of Experiments. **Technometrics**, v. 11, n. 1, p. 137-148, 1969.

KOCH, K.; ENSIKAT, H. J. The hydrophobic coatings of plant surfaces: Epicuticular wax crystals and their morphologies, crystallinity and molecular self-assembly. **Micron**, v. 39, n. 7, p. 759-772, 2008.

KUIPJER, J. De groei van bladschijf, bladscheede en stegel van het suikerriet. **Archief Suikerind**, v. 23, p. 528-556, 1915.

LAMBERTON, J. A.; REDCLIFFE, A. H. The Chemistry of Sugar-Cane Wax. I. The Nature of Sugar-Cane Wax. **Australian Journal of Chemistry**, v. 13, n. 2, p. 261-268, 1960.

LENHARDT, L. et al. Fluorescence spectroscopy coupled with PARAFAC and PLS DA for characterization and classification of honey. **Food Chemistry**, v. 175, p. 284-291, May 2015.

LESLIE, G. Pests of Sugarcane. In: BLACKBURN, F. **Sugarcane**. 2<sup>a</sup>. ed. [S.I.]: Blackwell Publishing Ltd, 2004. Cap. 4, p. 78-100.

LIMA, M. C. F. et al. Quantificação do B-cariofileno e óxido de cariofileno para o controle de qualidade dos óleos de copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne). **Brazilian Journal of Development**, v. 6, p. 608-623, 2020.

LISEC, J. et al. Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. **Nature Protocols**, v. 1, p. 387-396, 2006.

MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. A broca da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis*, em milho, no Brasil. **Circular Técnica**, Sete Lagos - Minas Gerais, Agosto 2007. 1-12.

MARTÍNEZ, G. et al. Ovoposition preference but not adult feeding preference matches with offspring performance in the bronze bug *Thaumastocoris peregrinus*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 163, p. 101-111, 2017.

MAZZEU, B. F. **Avanços no processo de purificação da friedelina sintase e estudos de sua atividade e especificidade**. Universidade Estadual Paulista. Araraquara, p. 107. 2019.

MENA, E. F. G. **Toxicidade de inseticidas a *Diatraea saccharalis***. Universidade de São Paulo. Piracicaba, p. 61. 2010.

MOITEIRO, C. et al. Synthetic Secofriedelane and Friedelane Derivatives as Inhibitors of Human Lymphocyte Proliferation and Growth of Human Cancer Cell Lines in Vitro. **Journal of Natural Products**, v. 64, p. 1273-1277, 2001.

MOITEIRO, C. et al. Hemisynthetic secofriedelane triterpenes with inhibitory activity against the growth of human tumor cell lines in vitro. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 7, Jul 2004.

MOITEIRO, C. et al. Biovalorization of friedelane triterpenes derived from cork processing industry byproducts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 3566-3571, April 2006.

MORAIS, L. K. et al. **Melhoramento Genético da Cana-de-Açúcar**. Emprapa. Aracaju, p. 38. 2015. (1678-1953).

NAKAMURA, M. et al. **Analgesic anti-inflammatory drug**. 96106837.6, 1997.

NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. 25 Anos de Quimiometria no Brasil. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1401-1406, 2006.

NUNES, L. C. et al. Optimization and validation of a LIBS method for the determination of macro and micronutrients in sugar cane leaves. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, n. 9, p. 1453-1460, 2010.

PASQUINI, C. Near Infrared Spectroscopy: Fundamentals, Practical Aspects and Analytical Applications. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, p. 198-219, 2003.

PEREIRA, S. I. et al. Chemical composition of the epicuticular wax from the fruits of *Eucalyptus globulus*. **Phytochemical Analysis**, v. 16, p. 364-369, August 2005.

PÉREZ, N. F.; FERRÉ, J.; BOQUÉ, R. Calculation of the reliability of classification in discriminant partial least-squares binary classification. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 95, n. 2, p. 122-128, 2009.

PILETTI, N. **História do Brasil**. São Paulo: Ática, 1996.

PIRES, R. A. R. et al. **Extraction and purification of friedelin**. WO2009072916A1, Jun 2009.

PORTO, N. A. **Early Prediction of Sugarcane Genotypes Susceptible and Resistant to *Diatraea saccharalis* Using Spectroscopies, Chromatography, and Classification Techniques**. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, p. 58. 2018.

- PURCELL, D. E. et al. A chemometrics investigation of sugarcane plant properties based on the molecular composition of epicuticular wax. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 76, n. 2, p. 135-147, 2005. ISSN 0169-7439.
- PURCELL, D. E.; O'SHEA, M. G.; KOKOT, S. Complex biopolymeric systems at stalk/epicuticular wax plant interfaces: a near infrared spectroscopy study of the sugarcane example. **Biopolymers**, v. 91, p. 642-651, April 2009.
- QUINTANA-MUÑIZ, V.; WALKER, D. W. Oviposition preference by gravid sugarcane borer moths in Puerto Rico. **Journal of Economic Entomology**, College Park, 63, 1970. 987-988.
- ROBERTS, S. C. Production and engineering of terpenoids in plant cell culture. **Nature Chemical Biology**, v. 3, n. 7, p. 387-395, 2007.
- RODRIGUES, G. S. S. C.; ROSS, J. L. S. **A trajetória da cana-de-açúcar no Brasil: perspectivas geográfica, histórica e ambiental**. Uberlândia: EDUFU, 2020.
- ROQUE, J. V. et al. Comprehensive new approaches for variable selection using ordered predictors selection. **Analytica Chimica Acta**, v. 1075, p. 57-70, October 2019.
- RUTHERFORD, R. S.; STADEN, J. Towards a rapid near-infrared technique for prediction of resistance to sugarcane borer *Eldana saccharina* walker (Lepidoptera: Pyralidae) using stalk surface wax. **Journal of Chemical Ecology**, v. 22, p. 681-694, April 1996.
- SANTANA, F. B. et al. Experimento didático de quimiometria para classificação de óleos vegetais comestíveis por espectroscopia no infravermelho médio combinado com análise discriminante por mínimos quadrados parciais: um tutorial, parte V. **Química Nova**, v. 43, n. 3, p. 371-381, Fevereiro 2020.
- SANTOS, J. C. L. et al. **Efeito aditivo de substâncias isoladas de *Brachiaria brizantha* em ensaios alelopáticos frente a plantas invasoras de pastagens**. Sociedade Brasileira de Química (SBQ). Águas de Lindóia - SP. 2006.
- SCHWARTZ, S. B. **Segredos internos: engenhos e escravos na sociedade colonial, 1550-1835**. São Paulo: Companhia das Letras, 1988.
- SILVA, L. M. et al. Toxin gene contents and activity of *Bacillus thuringiensis* strains against two sugarcane borer species, *Diatraea saccharalis* (F.) and *D. flavipennella* (Box). **Neotropical Entomology**, v. 47, p. 292-301, 2018.
- SKOOG, D. A. et al. **Fundamentos de Química Analítica**. 8ª. ed. [S.l.]: Thomson, 2006.
- SOARES, L. F. et al. Avaliação de espectrômetro NIR portátil e PLS-DA para discriminação de seis espécies similares de madeiras amazônicas. **Química Nova**, v. 40, n. 4, p. 418-426, 2017.
- SONDERMANN, N.; KOVAR, K. A. Identification of ecstasy in complex matrices using near-infrared spectroscopy. **Forensic Science International**, v. 102, p. 133-147, 1999.

SOUSA, L. C.; ROCHA, E. D.; ROCHA, C. P. Análise de óleos vegetais e óleo residual bruto por cromatografia gasosa visando à produção de biodiesel. **Conexão Científica**, v. 8, n. 2, p. 85-91, 2013.

SOUZA, A. M. et al. Experimento didático de quimiometria para calibração multivariada na determinação de paracetamol em comprimidos comerciais utilizando espectroscopia no infravermelho próximo: um tutorial parte II. **Química Nova**, v. 36, n. 7, p. 1057-1065, 2013.

SOUZA, A. M.; POPPI, R. J. Experimento didático de quimiometria para análise exploratória de óleos vegetais comestíveis por espectroscopia no infravermelho médio e análise de componentes principais: um tutorial, parte I. **Química Nova**, v. 35, p. 223-229, 2012.

SOUZA, M. F. C. et al. Atividade antimicrobiana "in vitro" de óleos essenciais contra patógenos de peixes. **Brazilian Journal of Development**, v. 5, n. 10, p. 17911-17921, 2019.

SUGARCANE (*Saccharum X officinarum*): A Reference Study for the Regulation of Genetically Modified Cultivars in Brazil. **Tropical Plant Biology**, v. 4, n. 1, p. 62-89, 2011.

SWEELEY, C. C. et al. Gas-Liquid Chromatography of Trimethylsilyl Derivatives of Sugar and Related Substances. **Journal of the American Chemical Society**, v. 85, p. 2497-2507, 1963.

SZYMANSKA, E. et al. Double-check: validation of diagnostic statistics for PLS-DA models in metabolomics studies. **Metabolomics**, v. 8, p. 3-16, 2012.

TEÓFILO, R. F.; MARTINS, J. P. A.; FERREIRA, M. M. C. Sorting variables by using informative vectors as a strategy for feature selection in multivariate regression. **Journal of Chemometrics**, v. 23, n. 1, p. 32-48, October 2009.

TOMAS, A. C. **Genetic parameters and strategies for selecting sugarcane genotypes for borer resistance**. Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa. Viçosa - MG. 2018.

TOMAZ, A. C. et al. Genetic parameters and selection of sugarcane for borer resistance in the advanced selection stage. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 20, n. 1, 2020.

TORAMAN, H. E. et al. Application of Py-GC/MS coupled with PARAFAC2 and PLS-DA to study fast pyrolysis of genetically engineered poplars. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 129, p. 101-111, 2018.

TULLOCH, A. P.; BERGTER, L. Epicuticular wax of *Juniperus scopulorum*. **Phytochemistry**, v. 20, n. 12, p. 2711-2716, 1981.

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P. D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas—liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 11, p. 463-471, 1963.

VIEIRA, L. S. et al. Building robust models for identification of adulteration in olive oil using FT-NIR, PLS-DA and variable selection. **Food Chemistry**, v. 345, p. 128866, May 2021.

VREDENBREGT, M. J. et al. Screening suspected counterfeit Viagra and imitations of Viagra with near-infrared spectroscopy. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 40, n. 4, p. 840-849, 2006.

WARTHA, C. A. et al. Classification of sugarcane genotypes susceptible and resistant to the initial attack of sugarcane borer *Diatraea saccharalis* using epicuticular wax composition. **Phytochemistry**, v. 199, July 2022. ISSN 0031-9422.

WOLD, S.; SJÖSTRÖM, M. Chemometrics: Theory and application. **ACS Symposium series**, Washington, v. 52, p. 243-282, 1977.

WONG, S. L. et al. Secondary metabolites from the roots of *Neolitsea daibuensis* and their anti-inflammatory activity. **Journal of Natural Products**, v. 74, p. 2489-2496, 2011.

XIAOBO, Z. et al. Variables selection methods in near-infrared spectroscopy, v. 667, n. 1-2, p. 14-32, May 2010.

YUN, Y. H. et al. Using variable combination population analysis for variable selection in multivariate calibration. **Analytica Chimica Acta**, v. 862, p. 14-23, March 2015.

ZHANG, Y. et al. **An composition containing triterpenoid saponins extracted from bamboo, bamboo, and the preparation method and use thereof.** EP 1 576 958 A1, 2006.