

**VICTOR DOS SANTOS AZEVEDO LEITE**

**METABOLÔMICA GLOBAL DE AMOSTRAS DE ALHO BRASILEIRO (*Allium Sativum L.*) POR GC-MS E PS-MS**

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

Orientador: Frederico Garcia Pinto

**RIO PARANAÍBA - MINAS GERAIS  
2024**

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

T

L533m  
2024

Leite, Victor dos Santos Azevedo, 1992-  
Metabolômica global de amostras de alho brasileiro de amostras de alho brasileiro (*Allium Sativum L.*) por GC-MS E PS-MS / Victor dos Santos Azevedo Leite. – Rio Paranaíba, MG, 2024.

83 f.: il. (algumas color.).

Inclui apêndices.

Orientador: Frederico Garcia Pinto.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Ciências Exatas, 2024.

Referências bibliográficas: f.65-73.

1. Alho. 2. Metabolômica. 3. Espectrometria de massas. I. Pinto, Frederico Garcia, 1980-. II. Universidade Federal de Viçosa. Ciências Exatas. Doutorado Multicêntrico em Química de Minas Gerais. III. Título.

635.26

**VICTOR DOS SANTOS AZEVEDO LEITE**

**METABOLÔMICA GLOBAL DE AMOSTRAS DE ALHO BRASILEIRO (*Allium Sativum L.*) POR GC-MS E PS-MS**

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

APROVADA: 17 de maio de 2024.

Assentimento:



Documento assinado digitalmente  
**VICTOR DOS SANTOS AZEVEDO LEITE**  
Data: 02/09/2024 13:00:54-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

**Victor dos Santos Azevedo Leite**

**Autor**

Documento assinado digitalmente



**FREDERICO GARCIA PINTO**  
Data: 31/08/2024 11:38:57-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

**Frederico Garcia Pinto**  
**Orientador**

*A minha mãe, irmão, avós e a Brenda.*

## **AGRADECIMENTOS**

Queria agradecer primeiramente a Deus por me conceder saúde e disposição para concluir com essa importantíssima etapa em minha vida.

Gostaria de agradecer principalmente minha mãe Enilda, meu irmão Higor e minha avó Zélia pelo apoio todos esses anos, me dando força e sendo os alicerces para realização do meu sonho.

Agradeço a Brenda pelo companheirismo, confiança, paciência e carinho nesses anos de convivência, sendo uma pessoa importantíssima na minha vida.

Aos meus amigos, que desde de os tempos da graduação se tornaram minha nova família, que levarei para resto de minha vida. Gostaria de agradecer imensamente. Que Deus conserve essas amizades.

Aos professores da UFV Campus Rio Paranaíba (UFV-CRP) que contribuíram para minha formação nesta etapa. Meu orientador professor Frederico Garcia. Obrigado pelo conhecimento compartilhado e pela amizade.

Aos membros do Grupo de Pesquisa em Análise Metabolômica (GPAM) e do Laboratório de Compostos Lamelares (LCL) da UFV-CRP, principalmente técnicos e alunos, que deram todo suporte para que esse trabalho fosse realizado. Obrigado também pela amizade de vocês.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão da bolsa de estudos.

*“Fortis Fortuna Adiuvat”. “A sorte favorece os corajosos”*

(Proverbio Latim)

## RESUMO

LEITE, Victor dos Santos Azevedo, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa Campus Rio Paranaíba, março de 2024. **Metabolômica global de amostras de alho brasileiro (*Allium Sativum L.*) por GC-MS e PS-MS.** Orientador: Frederico Garcia Pinto.

Neste trabalho, a metabolômica global utilizando diferentes abordagens de análise dentro da espectrometria de massas foi aplicada para obtenção do perfil metabólico de amostras do alho brasileiro (*Allium Sativum L.*). Em um primeiro estudo, utilizou-se a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS), onde comparou-se os perfis metabólicos do alho produzido no Brasil com diferentes tonalidades das brácteas, com tonalidades roxo clara ou escura. Em outros dois estudos, foram realizadas comparações dos perfis metabólicos do alho brasileiro e do alho chinês por GC-MS e pela técnica de espectrometria de massas com ionização *paper spray* (PS-MS). Utilizando a análise multivariada, uma abordagem estatística essencial na metabolômica, e aplicando as técnicas de PCA (Principal Componente de Análises) e PLS-DA (Mínimos quadrados parciais - análise discriminante), foram observadas diferenças químicas distintas entre esses grupos de alhos avaliados, sendo o alho brasileiro mais abundante em compostos organossulfurados, enquanto o alho chinês apresentou maior disponibilidade de aminoácidos essenciais. As descobertas deste trabalho fornecem informações científicas valiosas tanto para a cadeia do agronegócio quanto para a comunidade científica, além de demonstrar a potencialidade da metabolômica como uma abordagem promissora para a autenticação da origem geográfica do alho.

Palavras-chave: Alho. Metabolômica. Espectrometria de massas.

## ABSTRACT

LEITE, Victor dos Santos Azevedo, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa Campus Rio Paranaíba, March 2024. **Global metabolomics of brazilian garlic samples (*Allium Sativum L.*) by GC-MS and PS-MS**. Adviser: Frederico Garcia Pinto.

In this work, global metabolomics using different analysis approaches within mass spectrometry was applied to obtain the metabolic profile of samples of Brazilian garlic (*Allium Sativum L.*). In a first study, gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS) was used to compare the metabolic profiles of garlic produced in Brazil with different shades of bracts, with light or dark purple shades. In two other studies, the metabolic profiles of Brazilian garlic and Chinese garlic were compared using GC-MS and paper spray ionization mass spectrometry (PS-MS). Using multivariate analysis, an essential statistical approach in metabolomics, and applying the PCA (Principal Component Analysis) and PLS-DA (Partial Least Squares - Discriminant Analysis) techniques, distinct chemical differences were observed between these groups of garlic evaluated, with Brazilian garlic being more abundant in organosulphur compounds, while Chinese garlic showed greater availability of essential amino acids. The findings of this work provide valuable scientific information for both the agribusiness chain and the scientific community, as well as demonstrating the potential of metabolomics as a promising approach for authenticating the geographical origin of garlic.

Keywords: Garlic. Metabolomics. Mass spectrometry.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1:** Esquema da cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas. .... 17
- Figura 1.2:** Esquema de funcionamento da técnica espectrometria de massas por ionização em *paper spray*. .... 18
- Figura 2.1:** Imagem ilustrativa mostrando a diferença entre o alho roxo escuro e o roxo claro..... 24
- Figura 2.2:** Análise multivariada de componentes principais (PCA) para as amostras de alho (n = 4 para cada grupo: alhos roxos escuros e claros). 27
- Figura 2.3:** Mapa de calor dos 46 metabólitos conhecidos significativamente diferentes entre alhos roxos claros e escuros. A barra colorida indica a abundância relativa de metabólitos, com o vermelho indicando uma maior abundância do metabólito e o azul indicando uma menor abundância do metabólito. Um valor bruto de  $p < 0,05$  foi considerado significativo. 29
- Figura 2.4:** Via de biossíntese de antocianina (visão simplificada) com foco na reação do ácido malônico com a enzima ativadora de acil (malonil-CoA sintetase). 33
- Figura 2.5:** Vias metabólicas alteradas no alho roxo escuro em comparação com aquelas do alho roxo claro. O tamanho e as cores dos círculos revelaram a magnitude das vias metabólicas impactadas (amarelo para relevância menor, vermelho para relevância maior, círculos pequenos para impacto de via menor e círculos grandes para impacto de via principal) de acordo com sua relevância estatística e impacto da via (PI) valores resultantes da análise de enriquecimento quantitativo (QEA) e análise de topologia de rede (NTA), respectivamente. A linha pontilhada representa o ponto de corte de significância em um valor de  $p < 0,05$ . 34
- Figura 3.1:** **A)** O gráfico de PCA representa a separação geral usando o perfil metabolômico global para amostras de alho produzidas no Brasil e na China. **B)** Gráfico de tela de variância acumulada explicada e variância explicada por PC individual. .... 43

**Figura 3.2:** **A)** Gráfico de pontuação PLS-DA das amostras de alho produzidas no Brasil e na China. **B)** Gráfico de dispersão de pontuação obtido do Ortho PLS-DA para amostras de alho produzidas no Brasil e na China. **C)** Parâmetros de validação do modelo Ortho PLS-DA obtidos do teste de permutação, configurando 20 permutações aleatórias. Os círculos ao redor dos grupos de observação no gráfico de pontuação exibem as regiões de confiança de 95%.....44

**Figura 3.3:** O mapa de calor ilustra 60 metabólitos que foram identificados como significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) entre o alho brasileiro e o chinês.....45

**Figura 3.4:** Vias metabólicas do alho brasileiro em comparação com o alho chinês. A cor do círculo representa relevância, vermelho para maior relevância e amarelo para menor relevância, e o tamanho do círculo representa o impacto da via metabólica, quanto maior o tamanho maior o impacto. Esses fatores revelaram a magnitude das vias metabólicas impactadas de acordo com a relevância estatística. A linha pontilhada representa o corte de significância no valor de  $p < 0,05$ .....50

**Figura 3.5:** Abundância relativas dos metabólitos presentes nas vias metabólicas significativas na comparação entre o alho brasileiro e chinês.....51

**Figura 4.1:** Gráfico mostrando a estimativa de amostras rotuladas com alho brasileiro ( $n = 6$ ) em comparação com amostras de alho chinês ( $n = 10$ ), conforme atribuído pela floresta aleatória (A). Todas (100%) as amostras foram previstas corretamente (B). As impressões digitais médias de PS-MS na faixa de  $m/z$  100 - 1800 mostram diferenças notáveis entre o alho do Brasil e da China (C&D).....57

**Figura 4.2:** Análise metabolômica global baseada em PS-MS em amostras de alho. A) Diagrama de mapa de calor da análise de agrupamento hierárquico que consiste em níveis de metabólitos em amostras de alho do Brasil ( $n = 6$ ) em comparação com a China ( $n = 10$ ). A medição da distância euclidiana, o algoritmo de agrupamento ward e o dimensionamento automático geraram o mapa de calor. (B) A análise de componentes principais (PCA) foi implementada para investigar a separação dos perfis metabólicos. (C) Curvas ROC para o modelo de previsão. A análise de

regressão logística foi implementada para calcular modelos de metabólitos combinados. (D) Gráfico de vulcão mostrando características significativas com base no limiar de valor  $p < 0,05$  e limiar de alteração de dobra  $> 1,0$  nas amostras de alho brasileiro em comparação com o alho chinês. ....59

**Figura 4.3:** Análise do impacto da via mostrando as redes metabólicas reguladas positivamente em amostras de alho do Brasil e da China. As cores e o tamanho dos círculos indicam a magnitude das vias metabólicas afetadas (amarelo = baixa relevância; vermelho = alta relevância; círculos pequenos = baixo impacto da via, círculos grandes = alto impacto da via) de acordo com seus valores de relevância estatística e impacto da via (PI) obtidos da Análise de Enriquecimento Quantitativo (QEA) e da Análise de Topologia de Rede (NTA), respectivamente. A linha pontilhada representa o ponto de corte de significância no valor de  $p < 0,05$ . ....62

**Figura A1:** Cromatograma de íons totais (TIC) GC-MS do alho roxo escuro. Metabólitos conhecidos significativamente ( $p \leq 0,05$ ) diferentes entre os alhos roxos escuros e claros são exibidos: (1) Trissulfeto de dimetila, (2) Dissulfeto de dialila, (3) Sulfeto de dialila, (4) Hidrodissulfeto de pentila, (5) Ácido malônico, (6) Ácido láctico, (7) Ácido palmítico, (8) D-Frutose, (9) D-Galactose, (10) DRibose, (11) Ácido Docosanóico, (12) Ácido Esteárico, (13) 1-Monopalmitina, (14) D-Trealose, (15) Maltose, (16) 1-Monostearina e (17) 1-Kestose. ....77

**Figura C1:** Previsão de biomarcadores por meio de análise exploratória usando uma curva ROC multivariada. (A) O gráfico exibe as precisões preditivas de seis modelos de biomarcadores distintos, com o ponto vermelho indicando a maior precisão observada no painel de 25 recursos do modelo 4. (B) Os 25 principais biomarcadores potenciais são identificados com base nas frequências de seleção durante a validação cruzada. ....83

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 2.1:</b> Alguns metabólitos conhecidos que são significativamente diferente ( $p < 0,05$ ) entre alhos roxos claros e escuros.....	30
<b>Tabela 3.1:</b> Vários metabólitos foram identificados com diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre o alho brasileiro e o alho chinês.....	46
<b>Tabela 4.1:</b> Metabólitos significativos (17) identificados pela aplicação de um valor de $p$ de significância $\leq 0,05$ .....	60
<b>Tabela A1:</b> Metabólitos conhecidos significativamente diferentes ( $p$ -valor $< 0,05$ ) entre os alhos roxos claros e escuros .....	74
<b>Tabela A2:</b> Análise da via que mostra a alteração do metabolismo associada à purga do bulbo do alho usando o Metabo Analyst .....	76
<b>Tabela B1:</b> Parâmetros usados no MS-DIAL no processamento de dados.....	78
<b>Tabela B2:</b> Metabólitos que apresentaram uma diferença significativa em suas intensidades relativas ( $p < 0,05$ ) .....	78
<b>Tabela C1:</b> AUC, frequência, importância e abundância usando a análise ROC para os 25 principais recursos que contribuíram para o modelo de previsão classificado por frequência selecionada comparando alho do Brasil e da China.....	82
<b>Tabela C2:</b> Tabela de resultados da análise de enriquecimento de vias metabólicas .....	83

## SUMÁRIO

1	Introdução.....	14
1.1	Alho ( <i>Allium sativum L.</i> ) .....	14
1.2	Metabolômica.....	15
1.3	Cromatografia Gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS) ...	16
1.4	Espectrometria de massas por ionização em <i>paper spray</i> .....	17
1.5	Análise multivariada e suas ferramentas .....	19
2	Metabolômica global revela alterações metabólicas ligadas ao roxo do bulbo no alho ( <i>Allium sativum L.</i> ) .....	21
2.1	Introdução .....	22
2.2	Materiais e métodos.....	23
2.2.1	Reagentes.....	23
2.2.2	Amostras de alho .....	23
2.2.3	Extração de Metabólitos para Análise GC-MS .....	24
2.2.4	Análise metabolômica global baseada em GC-MS .....	25
2.2.5	Processamento de dados obtidos por GC-MS .....	25
2.2.6	Análise estatística .....	26
2.3	Resultados e discussão .....	27
2.4	Conclusão .....	35
3	Abordagem metabolômica aplicada a autenticação de alhos ( <i>Allium sativum L.</i> ) produzidos no Brasil e na China.....	36
3.1	Introdução .....	36
3.2	Materiais e métodos.....	38
3.2.1	Reagentes.....	38
3.2.2	Amostras de alhos.....	38
3.2.3	Extração de metabólitos .....	38
3.2.4	Derivatização das amostras .....	39
3.2.5	Análises por GC-MS.....	40
3.2.6	Processamento de dados.....	40
3.2.7	Análise estatística .....	41
3.3	Resultados e discussão .....	42
3.3.1	Metabolômica global baseada em GC-MS .....	42
3.3.2	Vias Metabólicas .....	49
3.4	Conclusão .....	52

4	Rápida discriminação da origem geográfica do alho ( <i>Allium sativum</i> L.): uma abordagem metabolômica aplicada a dados de espectrometria de massas por <i>paper spray</i>	53
4.1	Introdução	54
4.2	Materiais e métodos	55
4.2.1	Amostras de alho e reagentes	55
4.2.2	Instrumentação	55
4.2.3	Análise metabolômica por PS-MS	56
4.2.4	Análise estatística	56
4.3	Resultados e discussão	56
4.4	Conclusão	63
5.	CONCLUSÕES	64
	REFERÊNCIAS	65
	APÊNDICE A – Material Suplementar	74
	APÊNDICE B – Material Suplementar	78
	APÊNDICE C – Material Suplementar	82

## 1 Introdução

### 1.1 Alho (*Allium sativum* L.)

O alho (*Allium sativum* L.) é uma planta amplamente conhecida e cultivada em todo o mundo devido às suas características distintas e suas propriedades medicinais. O alho tem desempenhado um papel importante na história, tanto no contexto culinário quanto medicinal. Sua presença remonta a civilizações antigas, como os egípcios, gregos, romanos e chineses, que reconheciam suas propriedades benéficas para a saúde e o utilizavam em diversas aplicações terapêuticas (ANKRI; MIRELMAN, 1999a; PETROVSKA; CEKOVSKA, 2010).

Atualmente, o alho é amplamente cultivado e consumido em todo o mundo. A produção e o comércio de alho têm um papel econômico significativo em vários países. China, Índia, Espanha, Coreia do Sul e Estados Unidos estão entre os principais produtores de alho. O comércio global de alho reflete uma indústria lucrativa, com a exportação e importação de alho fresco, alho em pó, óleo de alho e outros produtos relacionados. Além disso, a indústria de suplementos alimentares também utiliza o extrato de alho em várias formas para aproveitar suas propriedades medicinais (SANTHOSHA; JAMUNA; PRABHAVATHI, 2013).

O alho pertence à família das Alliaceae e é cultivado em todo o mundo devido à sua adaptabilidade a diferentes climas e solos. O bulbo do alho é composto por várias "dentes" ou segmentos, cada um envolvido por uma camada de pele fina. Contendo compostos bioativos, como alicina, que conferem ao alho suas propriedades medicinais (RAHMAN, 2003).

O alho tem sido amplamente estudado por suas propriedades medicinais. Ele contém compostos ativos, como compostos sulfurados, enzimas e antioxidantes, que conferem diversos benefícios à saúde humana. O alho é conhecido por suas propriedades antimicrobianas, anti-inflamatórias, antioxidantes, hipolipemiantes e hipoglicemiantes. Estudos científicos têm demonstrado que o consumo regular de alho pode ajudar a reduzir o risco de doenças cardiovasculares, regular os níveis de colesterol, fortalecer o sistema imunológico, além de possuir atividade anticancerígena e propriedades neuroprotetoras (BAR; BINDUGA; SZYCHOWSKI, 2022; NAKAMOTO et al., 2019).

## 1.2 Metabolômica

A metabolômica é uma área científica que estuda os metabólitos presentes em um organismo ou sistema biológico em resposta a diferentes condições fisiológicas, ambientais ou patológicas. Essa abordagem busca compreender as interações bioquímicas e o estado funcional de um sistema através da análise abrangente de seus metabólitos (NICHOLSON; LINDON; HOLMES, 1999; WISHART et al., 2013).

A metabolômica tem suas bases nas áreas da bioquímica, genômica e proteômica, que há muitos anos procuram compreender a complexidade dos sistemas biológicos. Ao analisar os metabólitos, que são os produtos e intermediários do metabolismo celular, é possível obter uma visão global das vias metabólicas e dos processos bioquímicos envolvidos (FIEHN, 2002; JOHNSON; IVANISEVIC; SIUZDAK, 2016).

Para realizar a análise metabólica, a metabolômica utiliza técnicas analíticas avançadas, como a espectrometria de massas e a ressonância magnética nuclear. Essas técnicas permitem a identificação e quantificação de múltiplos metabólitos em uma única amostra biológica. Além disso, métodos estatísticos aliados a bioinformática são aplicados para interpretação dos dados gerados (DUNN; ELLIS, 2005; VIANT et al., 2009).

A aplicação da metabolômica é vasta e abrange diversas áreas de pesquisa. Na área biomédica, por exemplo, a metabolômica tem sido utilizada para identificar biomarcadores metabólicos que possam auxiliar no diagnóstico e monitoramento de doenças, além de contribuir para o desenvolvimento de terapias personalizadas (USSHER et al., 2016; WISHART, 2008). Outras aplicações incluem estudos de toxicologia, nutrição, microbioma, farmacologia e ciências ambientais, fornecendo insights sobre processos metabólicos nessas áreas (JOHNSON; IVANISEVIC; SIUZDAK, 2016; PSYCHOGIOS et al., 2011).

A metabolômica tem desempenhado um papel importante no estudo da saúde e doença. Em estudos epidemiológicos, a análise metabólica de grandes populações pode revelar padrões metabólicos associados a diferentes condições de saúde, como diabetes, obesidade e câncer (CHENG et al., 2015; GISKEØDEGÅRD et al., 2015) . Esses achados podem fornecer *insights* valiosos para a compreensão da fisiopatologia dessas doenças e auxiliar no desenvolvimento de novos biomarcadores e estratégias terapêuticas.

A metabolômica também tem sido aplicada na área de agricultura e segurança alimentar. Por exemplo, a análise do perfil metabólico de alimentos pode ajudar a identificar adulterações, fraudes alimentares e contaminantes indesejáveis (LI et al., 2021; SELAMAT; ROZANI; MURUGESU, 2021). Além disso, a metabolômica tem sido utilizada para otimizar a produção de culturas agrícolas, selecionar características desejáveis em alimentos e melhorar a qualidade nutricional dos produtos alimentícios.

Em estudos ambientais, a metabolômica tem desempenhado um papel crucial na avaliação do impacto de poluentes e mudanças climáticas nos ecossistemas. A análise dos metabólitos em organismos e amostras ambientais pode fornecer informações sobre a resposta dos sistemas biológicos a estressores ambientais e ajudar na monitorização da qualidade ambiental. Essa abordagem integrativa permite uma compreensão mais abrangente dos efeitos das atividades humanas no meio ambiente (BEDIA, 2022; HALL; DE MAAGD, 2014; SUN et al., 2022).

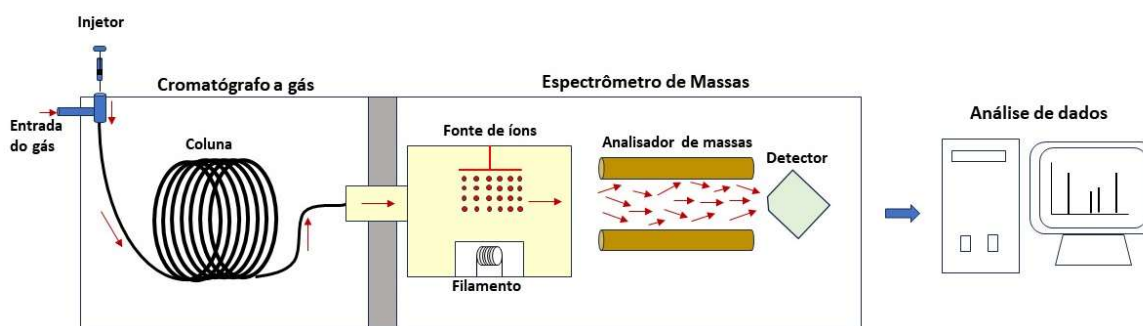
### **1.3 Cromatografia Gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS)**

A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS) é uma técnica analítica poderosa amplamente utilizada na metabolômica. Desempenha um papel fundamental na identificação e quantificação de metabólitos em uma amostra biológica. A combinação da separação cromatográfica com a alta sensibilidade e seletividade da espectrometria de massa permite uma análise abrangente dos metabólitos presentes em um sistema biológico (GIKA; THEODORIDIS; WILSON, 2008).

A GC-MS envolve a separação dos metabólitos por cromatografia gasosa, seguida pela ionização e detecção pela espectrometria de massa. Nesse caso, a separação é baseada nas propriedades químicas dos metabólitos, em que os componentes da amostra são vaporizados e separados em uma coluna capilar (ALSEEKH et al., 2021; DETTMER; ARONOV; HAMMOCK, 2007; FAHY et al., 2005). A ionização ocorre no espectrômetro de massa, onde os metabólitos são convertidos em íons e são fragmentados para gerar um espectro de massa característico. A identificação dos metabólitos é feita comparando os espectros de massa obtidos com bancos de dados de referência (DUNN; BAILEY; JOHNSON, 2005; KOEK et al., 2006).

A aplicação dessa técnica na metabolômica é de extrema importância devido à sua capacidade de análise abrangente e sensível dos metabólitos. A metabolômica visa entender as alterações nos perfis metabólicos em resposta a diferentes condições fisiológicas, ambientais ou patológicas. A GC-MS permite a identificação e quantificação de dezenas de metabólitos em uma única análise, fornecendo informações valiosas sobre as vias metabólicas, biomarcadores e modificações metabólicas associadas a uma determinada condição (PSYCHOGIOS et al., 2011).

A figura 1.1 demonstra o esquema de funcionamento da técnica GC-MS.



**Figura 1.1:** Esquema da cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas.

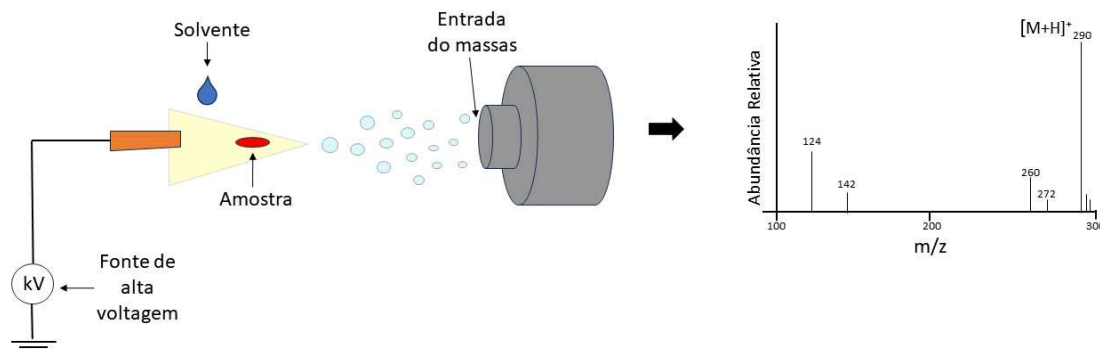
#### 1.4 Espectrometria de massas por ionização em *paper spray*

Desenvolvida em 2010, a espectrometria de massas por ionização em *paper spray* (PS-MS) tem se mostrado uma técnica revolucionária e vem transformando o campo da espectrometria de massas. A PS-MS permite a análise direta de uma grande gama de compostos, em diferentes tipos de amostras como alimentos e drogas (LIU et al., 2010).

A PS-MS é notável por sua simplicidade, velocidade e custo-benefício. Ela elimina a necessidade de preparação complexa da amostra e permite a análise direta da mesma. Além disso, a técnica tem se mostrado extremamente útil em aplicações forenses, permitindo a detecção rápida e precisa de drogas e outros compostos de interesse em uma variedade de matrizes (LIU et al., 2010).

A técnica funciona aplicando um alto potencial elétrico a um pedaço de papel embebido em uma solução contendo a amostra. Isso gera um spray de gotículas

carregadas que contêm os analitos, que são então detectados pelo espectrômetro de massas (ESPY et al., 2012). Como demonstra o esquema da Figura 1.2.



**Figura 1.2:** Esquema de funcionamento da técnica espectrometria de massas por ionização em *paper spray*.

No campo da metabolômica, a PS-MS tem se mostrado uma ferramenta valiosa. Por exemplo, ela tem sido utilizada para identificar biomarcadores metabólicos em amostras biológicas, como sangue e urina, o que pode ajudar no diagnóstico e monitoramento de várias doenças (MAHMUD et al., 2021; PINTO et al., 2022). Além disso, a PS-MS tem sido usada para estudar as vias metabólicas de diferentes organismos, ajudando a entender melhor como eles funcionam em nível molecular (OLAJIDE et al., 2022, 2023).

Na segurança alimentar, a PS-MS pode ser usada para identificar rapidamente a presença de compostos químicos indesejáveis ou perigosos, como pesticidas, micotoxinas e antibióticos (LIN et al., 2022; SANTOS et al., 2022). Além disso, a técnica pode ser usada para autenticar a origem e a qualidade dos alimentos, ajudando a combater a fraude alimentar (HRBEK et al., 2018).

No campo da metabolômica, a PS-MS tem sido usada para caracterizar o perfil metabólico de diferentes alimentos. Isso pode ajudar a discriminar entre diferentes variedades de um alimento, identificar adulterações ou substituições e entender como diferentes processos de produção e armazenamento podem afetar a composição química dos alimentos (PUMBUA et al., 2023; TANG; ZHU; SANG, 2020; WU et al., 2022). Com sua combinação única de simplicidade, velocidade e poder analítico, a PS-MS está se tornando uma ferramenta cada vez mais importante para estudos em segurança e qualidade alimentar.

## 1.5 Análise multivariada e suas ferramentas

A análise multivariada é uma abordagem estatística essencial na metabolômica, permitindo a análise de conjuntos de dados complexos e inter-relacionados. Essa abordagem utiliza diversas técnicas, cada uma com seus princípios e definições específicas, que desempenham um papel fundamental na extração de informações significativas a partir dos dados metabolômicos. Duas técnicas amplamente utilizadas são a análise de componentes principais (PCA, do inglês *Principal Component Analysis*) e a análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA, do inglês *Partial Least Squares-Discriminant Analysis*).

A PCA é uma técnica de análise multivariada não supervisionada que tem como objetivo principal reduzir a dimensionalidade dos dados. Ela permite identificar padrões de variação interna nos conjuntos de dados metabolômicos, agrupar amostras semelhantes e destacar variáveis (metabólitos) que contribuem de forma significativa para a variação total. A PCA baseia-se na transformação linear dos dados originais em um novo conjunto de variáveis chamadas de componentes principais, que são ortogonais e ordenados em termos de sua importância na explicação da variação (ERIKSSON; TRYGG; WOLD, 2008; TRYGG; WOLD, 2002).

Já a PLS-DA é uma técnica de análise multivariada supervisionada que tem como objetivo encontrar relações lineares entre as variáveis independentes (metabólitos) e a variável dependente (grupo de amostras). A PLS-DA é amplamente utilizada na metabolômica para a classificação e a discriminação de diferentes grupos de amostras, permitindo identificar metabólitos que são mais relevantes para distinguir esses grupos. Ela combina a regressão de mínimos quadrados parciais (PLS) com uma análise discriminante, que maximiza a separação entre os grupos e minimiza a variação dentro de cada grupo (CLOAREC et al., 2005).

Além do PCA e da PLS-DA, outras abordagens têm sido desenvolvidas para melhorar a interpretação dos resultados. Uma delas é a Orthogonal-PLS-DA (O-PLS-DA), que adiciona um componente ortogonal à PLS-DA. Esse componente representa a variação não relacionada com a variável dependente, ajudando a distinguir entre variação relevante e variação não informativa. A O-PLS-DA é particularmente útil quando existem fontes de variação não relacionadas com o objetivo do estudo, como variações sazonais ou variações técnicas (ERIKSSON; TRYGG; WOLD, 2008).

A aplicação da análise multivariada na metabolômica desempenha um papel crucial na extração de informações valiosas e no avanço do conhecimento sobre os sistemas biológicos. Essas técnicas permitem uma visão abrangente dos dados metabolômicos, facilitando a interpretação, a visualização e a comunicação dos resultados. Além disso, a análise multivariada possibilita a identificação de padrões complexos, a descoberta de biomarcadores potenciais e a compreensão de vias metabólicas e interações entre metabólitos. Através dessas ferramentas, a metabolômica tem o potencial de contribuir significativamente para a pesquisa biomédica, a medicina de precisão, a nutrição, a ciência de alimentos e outras áreas (ERIKSSON; TRYGG; WOLD, 2008; GOWDA et al., 2008).

## **2 Metabolômica global revela alterações metabólicas ligadas ao roxo do bulbo no alho (*Allium sativum* L.)**

Victor dos Santos Azevedo Leite<sup>1</sup>, Marcelo R. Reis<sup>2</sup> e Frederico G. Pinto<sup>1\*</sup>

1 - Instituto de Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade Federal de Viçosa, Campus de Rio Paranaíba, Km 7 – Zona Rural, MG-230, Rodoviário. 38810-000 Rio Paranaíba-MG, Brasil. \*e-mail: frederico.pinto@ufv.br

2 - Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Viçosa, Campus de Rio Paranaíba, Rodovia BR 354 km 310, CEP 38810-000, Rio Paranaíba - MG, Brasil.

### **Resumo**

O alho (*Allium sativum* L.) é uma hortaliça conhecida mundialmente, principalmente por seu aroma e sabor característicos e por apresentar diversas propriedades medicinais. Essa cultura tem significativa relevância econômica e social no cenário agrícola mundial. A maior parte da produção de alho é vendida em bulbos frescos, onde para alguns países os bulbos de casca mais roxa são mais valorizados no mercado. No entanto, ainda não há consenso sobre os fatores que intensificam a coloração roxa dos bulbos de alho. Aqui, empregamos metabolômica global baseada em cromatografia gasosa e espectrometria de massa para estudar o metaboloma de alhos roxos escuros e claros. A análise estatística multivariada revelou assinaturas metabólicas distintas entre esses grupos de alho. Como as alterações metabólicas desempenham um fator importante nas mudanças no fenótipo de células ou de um organismo, este trabalho apresenta uma abordagem fundamental para apoiar os produtores de alho na compreensão dos fatores que intensificam a cor arroxeada dos bulbos de alho, abrindo caminho para uma produção mais segura de alho com bulbos roxos escuros. Além disso, as propriedades medicinais do alho roxo escuro foram maiores que as do alho roxo claro, apresentando maior abundância em compostos organossulfurados, que são conhecidos por seus potenciais benefícios para a saúde, como a redução da pressão arterial e a melhoria do sistema imunológico. No geral, os dados sugerem que alguns ácidos orgânicos e ácidos graxos, como ácido malônico e ácido docosanóico, são os principais fatores de diferenciação entre alhos roxos escuros e claros.

**Palavras-chave:** metabolômica, cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa, alho roxo

## 2.1 Introdução

Alho (*Allium sativum* L.), que pertence à família Alliaceae, é um alimento conhecido mundialmente, principalmente por seu aroma e sabor característico e por possuir diversas propriedades medicinais como antibiótica, anticancerígena, antitrombótica e atividade antioxidante, sendo eficaz no controle do colesterol níveis de triglicerídeos e diminuição da pressão arterial (BANERJEE; MAULIK, 2002; KUMAR; PRASAD, 2015). Essa cultura é economicamente e socialmente relevante na agricultura cenário mundial com produção de 30,7 milhões de toneladas de bulbos em 2019, e gera empregos no plantio manual e na colheita (FAO, 2020).

A maior parte da produção é vendida em bulbos frescos em que a cor do bulbo é um importante fator de qualidade durante a comercialização do alho. Por exemplo, no Brasil e em alguns países latino-americanos, os consumidores têm preferência por alhos roxos escuros em vez de alhos roxos claros, em parte devido à forte associação entre a pungência e a intensidade da cor (DUFOO-HURTADO et al., 2013).

Assim, os produtores de alho em muitos países sempre buscam produzir bulbos de alho que apresentem a casca mais roxa possível; no entanto, ainda não há consenso sobre os fatores que intensificam a coloração roxa dos bulbos. Estudos anteriores sugeriram que a cor roxa do alho se deve às antocianinas (HRBEK et al. 2018). As antocianinas são produzidas pelo metabolismo secundário das plantas, tendo como principais funções a proteção de folhas e frutos coloridos contra a radiação ultravioleta para evitar a formação de radicais livres e atuar como agente quelante de íons metálicos com excesso desses íons. Assim, uma das hipóteses é que plantas de alho que passam por algum estresse produzem bulbos com maior concentração de antocianinas nas folhas reservas (os bulbos que são um conjunto de folhas modificadas com a função de armazenar reservas). Por exemplo, o estresse com altas concentrações de íons metálicos Cu e Zn em plantas de *Hibiscus sabdariffa* L. aumentou a concentração de antocianinas nas flores.

Consideramos que uma abordagem fundamental para apoiar pesquisas sobre a síntese e acúmulo de antocianinas em bulbos de alho é a metabolômica global, ou seja, triagem global de metabólitos de baixo peso molecular (HRBEK et al., 2018).

Várias técnicas instrumentais, como cromatografia líquida acoplada com espectrometria de massa (LC-MS) (MAHMUD et al., 2017), ressonância magnética nuclear (NMR) (MAHMUD et al., 2014, 2015a, 2015b) e cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massa (GC-MS) (SCHUEUERMANN et al., 2019), têm sido empregadas para análise metabolômica da matriz biológica diversa e descoberta de biomarcadores. Entre eles, o GC-MS tem sido amplamente utilizado na pesquisa do metabolismo devido à sua alta sensibilidade, resolução de pico e reprodutibilidade. No entanto, para a análise de metabólitos polares, como ácidos carboxílicos, álcoois, aminas e tióis, é necessária uma etapa de derivatização para aumentar a estabilidade térmica e a volatilidade do metabólito (BEALE et al., 2018). Na literatura, vários estudos têm demonstrado a aplicação de técnicas baseadas em GC-MS metabolômica em alimentos como tomate (LEE et al., 2019b), soja (LEE et al., 2019a), azeite (SALES et al., 2019), vinho (PINTO et al., 2019) e leite (SCANO et al., 2014).

## **2.2 Materiais e métodos**

### **2.2.1 Reagentes**

Uma mistura padrão de alcano (C9–C25), Cloridrato de metoxiamina, piridina, N-Metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida + 1% TMCS (clorotrimetilsilano), Ribitol (99%), Metanol grau HPLC, foram adquiridos da Sigma-Aldrich, e água ultrapura, preparada usando um sistema de purificação Milli-Q, foram utilizados para a extração dos metabólitos. O gás Hélio foi adquirido da empresa White Martins.

### **2.2.2 Amostras de alho**

As amostras de alho (*Allium sativum* L.) foram coletadas em lavouras dos produtores de alho no município de São Gotardo (19°11'38" S, 46°14'49" O), Minas Gerais, Brasil. O alho (variedade Ito) foi plantado em fevereiro de 2019 e colhido em setembro de 2019. A variedade de alho Ito foi utilizada neste estudo. Cultivo de alta tecnologia para produção de alho nobre com adubação balanceada e manejo fitossanitário e de irrigação adequados resultaram em produtividade média de 17,0 t de bulbos de alho.ha<sup>-1</sup>. Dois grupos de alho foram escolhidos de acordo com a cor da casca do bulbo: roxo escuro e roxo claro (Figura 1). Esses grupos de alho foram

escolhidos seguindo as pontas de uma escala roxa utilizada para comercialização do alho no Brasil.



**Figura 2.1:** Imagem ilustrativa mostrando a diferença entre o alho roxo escuro e o roxo claro

### 2.2.3 Extração de Metabólitos para Análise GC-MS

Amostras de alho colhidas ( $n = 4$  para o grupo de alho roxo claro;  $n = 4$  para o grupo de alho roxo escuro) foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e subsequentemente moídas em um pó fino usando um almofariz e um pistilo. As amostras homogeneizadas (50 mg) foram pesadas em tubos plásticos de centrifuga e extraídas com 1 mL de água contendo 25  $\mu\text{g/mL}$  de ribitol (padrão interno). As amostras foram agitadas por 5s, sonicadas por 15 min e depois centrifugadas a 13.000 g por 15 min. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo, e o mesmo procedimento foi aplicado ao resíduo remanescente utilizando 1 mL de metanol. Depois disso, ambos os sobrenadantes foram misturados para reações de derivatização. Essa quantidade de alho foi extraída para cada amostra e todas as medições de metabólitos foram normalizadas fisicamente para essa massa. O padrão interno também foi usado para normalizar a variação na recuperação do metabólito e na preparação da amostra. Um volume de amostra de 400  $\mu\text{L}$  foi coletado em um frasco de vidro e seco durante a noite em uma estufa de recirculação de ar forçado a 40 ° C. As alíquotas secas foram metoximadas em piridina com 50  $\mu\text{L}$  de cloridrato de metoxiamina 15 mg/mL a 37 ° C por 2 h e depois trimetilsililadas com 50  $\mu\text{L}$  de MSTFA [N-metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida] e 1% TMCS (clorotrimetilsilano) reagente a 37 ° C por 30 min. As amostras derivatizadas foram pipetadas em frascos de vidro de 400  $\mu\text{L}$  para análise GC-MS. As amostras de controle de qualidade (QC) foram

preparadas reunindo alíquotas de todas as amostras de alho por grupo e processadas usando o mesmo procedimento usado para as amostras experimentais. As amostras de QC foram analisadas por GC-MS antes, durante e após as injeções das amostras para garantir que o desvio instrumental fosse mínimo.

#### **2.2.4 Análise metabolômica global baseada em GC-MS**

Os extratos de alhos derivatizados foram analisados por GC-MS utilizando um protocolo estabelecido para metabolômica global (VIEIRA-POTTER et al., 2018). Os perfis metabólicos foram obtidos usando um sistema cromatográfico acoplado a um espectrômetro de massas (GCMS-QP2010, Shimadzu, Kyoto, Japão). Uma coluna capilar RTX-5 [30 m × 250 µm de diâmetro interno, 0,25 µm de espessura de filme (Ristek)] foi usada. A separação cromatográfica foi realizada com temperatura da coluna de 80 °C por 2 min, que foi então aumentada a uma taxa de 5 °C/min até 315 °C e mantida a 315°C por 12 min, com fluxo constante de 1,0 mL/min de gás hélio. O volume de injeção foi de 1 µL com uma proporção de divisão de 10:1. Os espectros de massa foram digitalizados de  $m/z$  50 a 650 na faixa do modo de varredura completa com uma velocidade de varredura de 5 varreduras  $s^{-1}$ . Um tempo de corte de solvente de 5 min foi usado com base no tempo de retenção do solvente de piridina. As temperaturas da interface e da fonte de íons foram de 280 e 240 °C, respectivamente. A voltagem do detector foi de 1,2 kV, e impacto de elétrons (EI) foi aplicado para ionização de metabólitos a 70 eV. Uma mistura de alceno padrão (C9-C25) foi usada para controle de qualidade GC-MS e cálculos de índice de retenção.

#### **2.2.5 Processamento de dados obtidos por GC-MS**

Os dados brutos GC-MS foram convertidos para o formato “abf” usando o software conversor ABF (<https://www.reifycs.com/AbfConverter/>). Em seguida, extração de pico bruto, alinhamento de pico, análise de deconvolução e identificação foram realizados usando MS-DIAL ([http://prime.psc.riken.jp/Metabolomics\\_Software/MS-DIAL/index.html](http://prime.psc.riken.jp/Metabolomics_Software/MS-DIAL/index.html)) (LAI et al., 2018; TSUGAWA et al., 2015). Os parâmetros de aquisição de dados usando o MS-DIAL foram semelhantes aos descritos anteriormente (LI et al., 2018; YOON et al., 2019). Detecção de pico: método de suavização, média móvel ponderada linear; nível de suavização, duas varreduras; largura média do pico, 20 varreduras; altura mínima do pico, amplitude de 1000. Parâmetros de deconvolução: valor da janela Sigma, 0,5; Corte do espectro EI,

amplitude de 10. Configurações de identificação: use o índice de retenção; arquivo MSP, banco de dados FiehnLib (KIND et al., 2009); Tolerância RI usando uma mistura de alcanos, 30; tolerância RT, 0.5; tolerância  $m/z$ , 0.5; corte de similaridade EI, 70%; pontuação de corte de identificação, 70%. Conforme mencionado acima, os picos de metabólitos foram normalizados para o padrão interno, ribitol, e para cada massa de alho, e os valores normalizados foram usados para comparações estatísticas.

A identificação dos metabólitos foi realizada comparando os espectros de massas experimentais e o índice de retenção calculado (RI) com a biblioteca de espectros de massa/RI FiehnLib usando o MS-DIAL. Além disso, software automatizado de deconvolução espectral de massa e sistema de identificação (AMDIS) (STEIN, 1999) foi usado para confirmar os componentes da amostra. Os dados foram deconvoluídos usando AMDIS e os metabólitos anotados foram identificados usando correspondência espectral ( $\geq 80\%$  semelhante) à biblioteca espectral de massa do Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (NIST 2014).

### 2.2.6 Análise estatística

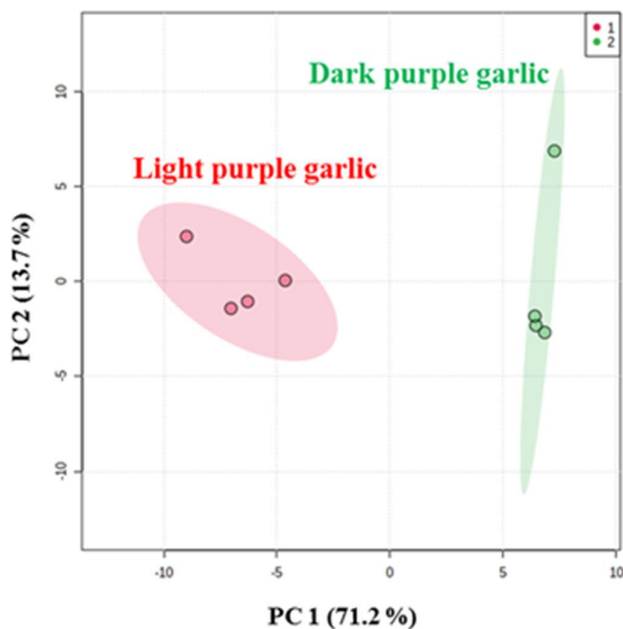
Toda a normalização de dados, análises estatísticas, análise de vias metabólicas e visualização foram realizadas usando o Metaboanalyst 4.0 (<http://www.metaboanalyst.ca>), um programa baseado em R de código aberto projetado especificamente para metabolômica (CHONG et al., 2018). Valores não presentes em 50% dos dados foram retirados da análise. Os valores ausentes foram substituídos por um valor pequeno (metade do valor positivo mínimo nos dados originais) e os dados foram filtrados por desvio padrão relativo, soma normalizada,  $\log_2$  transformado e dimensionado automaticamente.

Os metabólitos foram comparados em dois grupos diferentes, o grupo de alho roxo claro versus o grupo de alho roxo escuro, por meio do teste t-Student. Os resultados para os metabólitos anotados detectados pela magnitude e significância de suas intensidades de sinal diferenciais entre os grupos estão listados na Tabela A1. Um p-valor  $< 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo. Uma abordagem estatística multivariada usando análise de componentes principais (PCA) foi conduzida para classificar as amostras de alho. A análise hierárquica de mapa de calor baseada em agrupamento foi usada para visualização de dados metabolômicos, onde a

abundância relativa de íons detectados em cada amostra é representada pela intensidade da cor. A análise da via foi realizada usando todos os metabólitos identificados com significância estatística pelo *MetaboAnalyst* 4.0 com base na biblioteca de vias metabólicas da *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) de *Arabidopsis thaliana*.

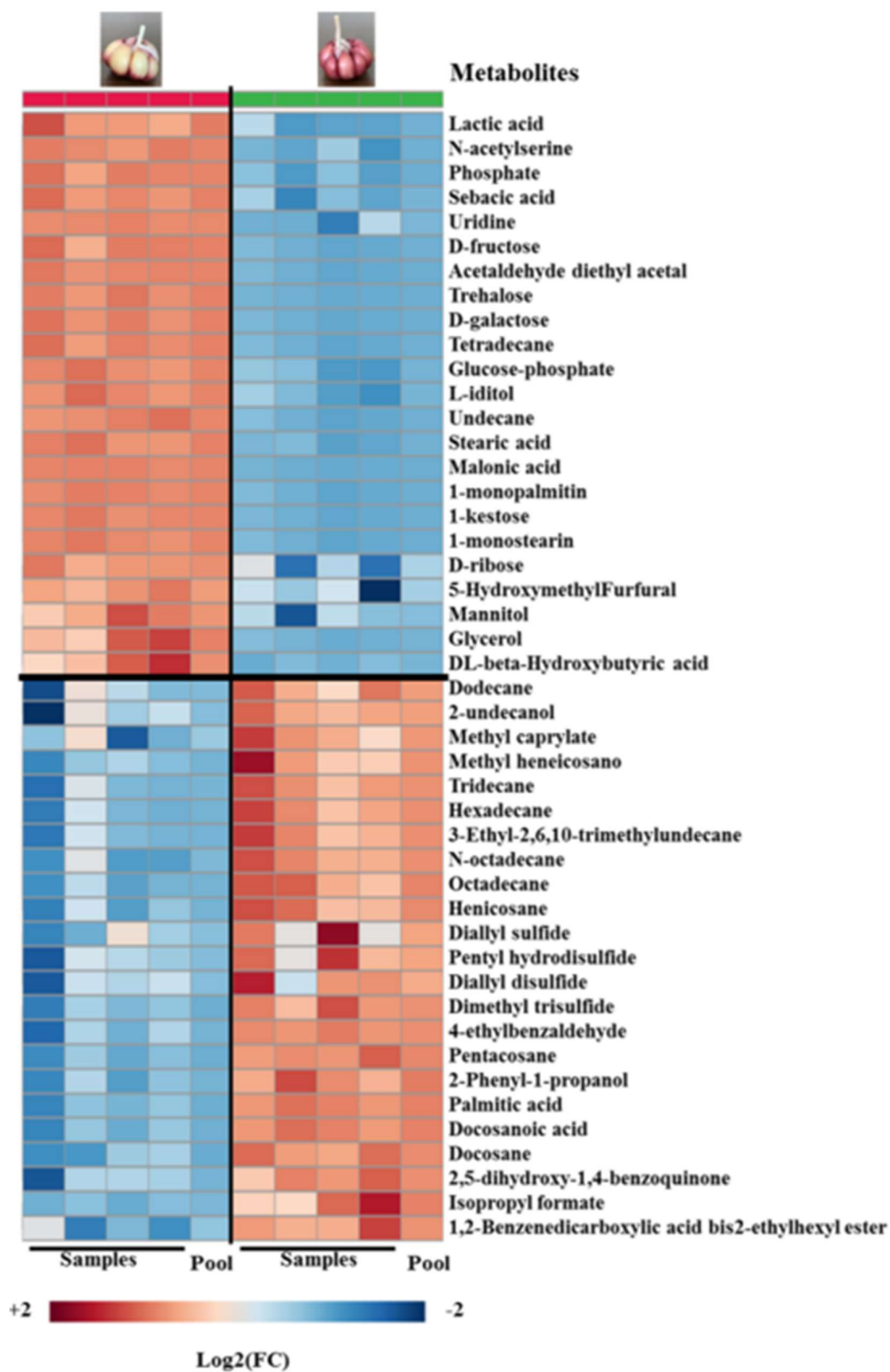
### 2.3 Resultados e discussão

Um total de 65 metabólitos conhecidos foram detectados nas amostras de alho por GC-MS. Entre todos os metabólitos conhecidos, 46 mostraram uma diferença estatisticamente significativa em suas intensidades relativas ( $p < 0,05$ ) entre os alhos roxos claros e os alhos roxos escuros. A análise de componentes principais (PCA) demonstra uma clara separação dos metabolomas do alho roxo escuro e do alho roxo claro. A separação do PCA foi observada principalmente ao longo da PC1 (71,2%). A variância explicada em duas componentes principais foi de 84,9% (Figura 2.2).



**Figura 2.2:** Análise multivariada de componentes principais (PCA) para as amostras de alho (n = 4 para cada grupo: alhos roxos escuros e claros).

A análise hierárquica do mapa de calor baseada em agrupamento de metabólitos conhecidos que diferiram significativamente entre os alhos roxos claros e escuros indicou o agrupamento dos dois grupos (Figura 2.3). Como pode ser visto no mapa de calor, entre os 46 metabólitos conhecidos que diferiram significativamente entre os grupos, 23 deles apresentaram uma abundância aumentada em alhos roxos claros e os outros 23 uma maior abundância em alhos roxos escuros.



**Figura 2.3:** Mapa de calor dos 46 metabólitos conhecidos significativamente diferentes entre alhos roxos claros e escuros. A barra colorida indica a abundância relativa de metabólitos, com o vermelho indicando uma maior abundância do metabólito e o azul indicando uma menor abundância do metabólito. Um valor bruto de  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

Alguns importantes metabólitos conhecidos significativamente diferentes entre os alhos roxos claros e escuros foram categorizados por classe (Tabela 1). Além disso, um cromatograma de íon total (TIC) GC-MS obtido para alho roxo escuro é exibido na Figura A1, discriminando os compostos da Tabela 2.1. Todos os 46 metabólitos conhecidos que são significativamente diferentes entre os grupos estão listados na Tabela A1, com a magnitude e significância da diferença em suas intensidades relativas.

**Tabela 2.1:** Alguns metabólitos conhecidos que são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) entre alhos roxos claros e escuros.

<b>Metabólitos</b>	<b>FC (Alho roxo escuro/Alho roxo claro)</b>	<b>p-valor</b>
<b>Compostos de enxofres</b>		
Hidrodissulfeto de pentila	1.8776	$1.96 \times 10^{-2}$
Dissulfeto de dialila	1.6754	$3.38 \times 10^{-2}$
Trissulfeto de dimetila	1.7116	$4.13 \times 10^{-4}$
Sulfeto de dialila	1.737	$4.45 \times 10^{-2}$
<b>Açúcares</b>		
1-Questose	0.0203	$1.24 \times 10^{-8}$
D-Galactose	0.0139	$8.65 \times 10^{-8}$
D-trealose	0.0008	$5.20 \times 10^{-8}$
D-frutose	0.0366	$3.57 \times 10^{-6}$
D-Ribose	0.0201	$4.60 \times 10^{-4}$
Manitol	0.1254	$5.23 \times 10^{-3}$
<b>Aminoácidos</b>		
O-acetilserina	0.2614	$7.48 \times 10^{-6}$
<b>Ácido graxos</b>		
Ácido docosanóico	6.0389	$4.33 \times 10^{-5}$
Ácido palmítico	4.488	$3.04 \times 10^{-5}$
Ácido esteárico	0.0123	$7.01 \times 10^{-7}$
1-Monoestearina	0.0448	$3.92 \times 10^{-8}$
Ácido sebácico	0.0079	$5.53 \times 10^{-5}$
Caprilato de metila	1.7826	$1.37 \times 10^{-2}$

Heneicosanoato de metila	1.4994	$5.01 \times 10^{-3}$
1-Monopalmitina	0.0468	$1.75 \times 10^{-8}$
<b>Ácidos orgânicos</b>		
Ácido malônico	0.0010	$1.84 \times 10^{-10}$
Ácido láctico	0.0982	$1.75 \times 10^{-4}$
<b>Ester</b>		
Éster bis2-etilexilico do ácido 1,2-benzenodicarboxílico	9.3892	$2.65 \times 10^{-3}$

Entre os metabólitos conhecidos significativamente diferentes entre os alhos roxos claros e escuros, é importante observar a abundância de compostos organossulfurados. A principal característica de qualidade dos produtos à base de alho é o sabor, e a classe de compostos mais importante responsável por esse sabor são os compostos organossulfurados (MARTINS; PETROPOULOS; FERREIRA, 2016; RANDLE; LANCASTER, 2002). Além disso, os compostos organossulfurados também fornecem propriedades medicinais ao alho contra um amplo espectro de doenças, incluindo câncer (LI; LE; CUI, 2018), diabetes (PADIYA; K BANERJEE, 2013) e infecções microbianas (ANKRI; MIRELMAN, 1999b), bem como distúrbios imunológicos (SOHN et al., 2009) e cardiovasculares (BANERJEE; MAULIK, 2002).

Quatro compostos organossulfurados foram detectados como significativamente diferentes entre os alhos roxo claro e escuro por GC-MS, dimetil trissulfeto (p-valor =  $4,14 \times 10^{-4}$ , intensidade 1,7 vezes maior no alho roxo escuro), hidrodissulfeto de pentila (p-valor =  $1,96 \times 10^{-2}$ , intensidade 1,9 vezes maior no alho roxo escuro), dissulfeto de dialila (p-valor =  $3,38 \times 10^{-2}$ , intensidade 1,7 vezes maior no alho roxo escuro) e sulfeto de dialila (p-valor =  $4,45 \times 10^{-2}$ , intensidade 1,7 vezes maior no alho roxo escuro). Todos os 4 compostos organossulfurados que foram significativamente diferentes entre os grupos mostraram maior abundância nas amostras de alho roxo escuro. A abundância desses compostos organossulfurados voláteis no alho está altamente relacionada aos mecanismos de defesa das plantas de alho contra pragas e patógenos, uma vez que a liberação desses compostos é causada por danos celulares e teciduais da planta (HILE et al., 2004).

Para a classe de açúcares, 6 metabólitos apresentaram diferenças significativas entre os alhos roxo claro e escuro, 1-Kestose (p-valor =  $1,24 \times 10^{-8}$  e intensidade 49

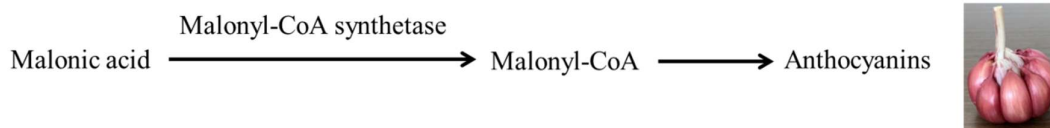
vezes maior no alho roxo claro), D-Galactose (p-valor =  $8,65 \times 10^{-8}$  e intensidade 72 vezes maior no alho roxo claro), D-Trealose (p-valor =  $5,20 \times 10^{-8}$  e intensidade 1,132 vezes maior no alho roxo claro), D-Frutose (p-valor =  $3,57 \times 10^{-6}$  e intensidade 27 vezes maior no alho roxo claro), D-Ribose (p-valor =  $4,61 \times 10^{-4}$  e intensidade 49 vezes maior no alho roxo claro) e Manitol (p-valor =  $1,75 \times 10^{-08}$  e 8 vezes maior intensidade no alho roxo claro). Dentre os 6 metabólitos da classe dos açúcares, 5 apresentaram maior abundância nas amostras de alho roxo claro. Dentre os açúcares, a trealose foi a que apresentou maior abundância de dobras no alho roxo claro. Foi demonstrado que a alteração das quantidades de trealose aumentou a tolerância ao estresse nas plantas, mas também resultou em muitas alterações fenotípicas inesperadas (DELORGE et al., 2014). Esta pode ser uma das causas da diferença de cor entre os bulbos de alho.

O-acetilserina (p-valor =  $7,48 \times 10^{-6}$  e intensidade 4 vezes maior no alho roxo claro) também apresentou diferença significativa entre os grupos. A O-acetilserina produz cisteína pela ação da enzima O-acetilserina(tiol)liase sendo a cisteína utilizada para a síntese de outros metabólitos contendo enxofre (WATANABE et al., 2018).

Oito ácidos graxos foram significativamente diferentes entre os alhos roxo escuro e roxo claro. Dentre os ácidos graxos com maior abundância no alho roxo escuro, o ácido docosanóico foi o mais expressivo. O ácido docosanóico (C22:0) é um ácido graxo que pode inibir a produção ou ação de citocinas pró-inflamatórias, sendo útil por suas ações anti-inflamatórias (RAINSFORD, 2006).

Entre os ácidos orgânicos, dois deles apresentaram diferença significativa entre os grupos de alho, ácido malônico (p-valor =  $1,84 \times 10^{-10}$  e intensidade 958 vezes maior no alho roxo claro) e ácido láctico (p-valor =  $1,76 \times 10^{-4}$  e 10 vezes maior intensidade em alho roxo claro). A concentração de ácido malônico pode ser a chave para entender a produção de alho roxo escuro. Estudos anteriores sugeriram que a cor roxa do alho se deve às antocianinas (DUFOO-HURTADO et al., 2013). A malonil-CoA é o precursor para a formação de antocianinas e este composto pode ser formado a partir do ácido malônico pela ação da enzima ativadora de acil malonil-CoA sintetase (Fig. 3) (CHEN et al., 2011). Redução significativa do acúmulo de antocianina e aumento do teor de ácido malônico em flores de petúnia foram observadas usando o silenciamento gênico induzido por vírus da malonil-CoA sintetase (CHEN et al., 2017). Assim, sugerimos que a diferença na intensidade da cor roxa do bulbo do alho pode

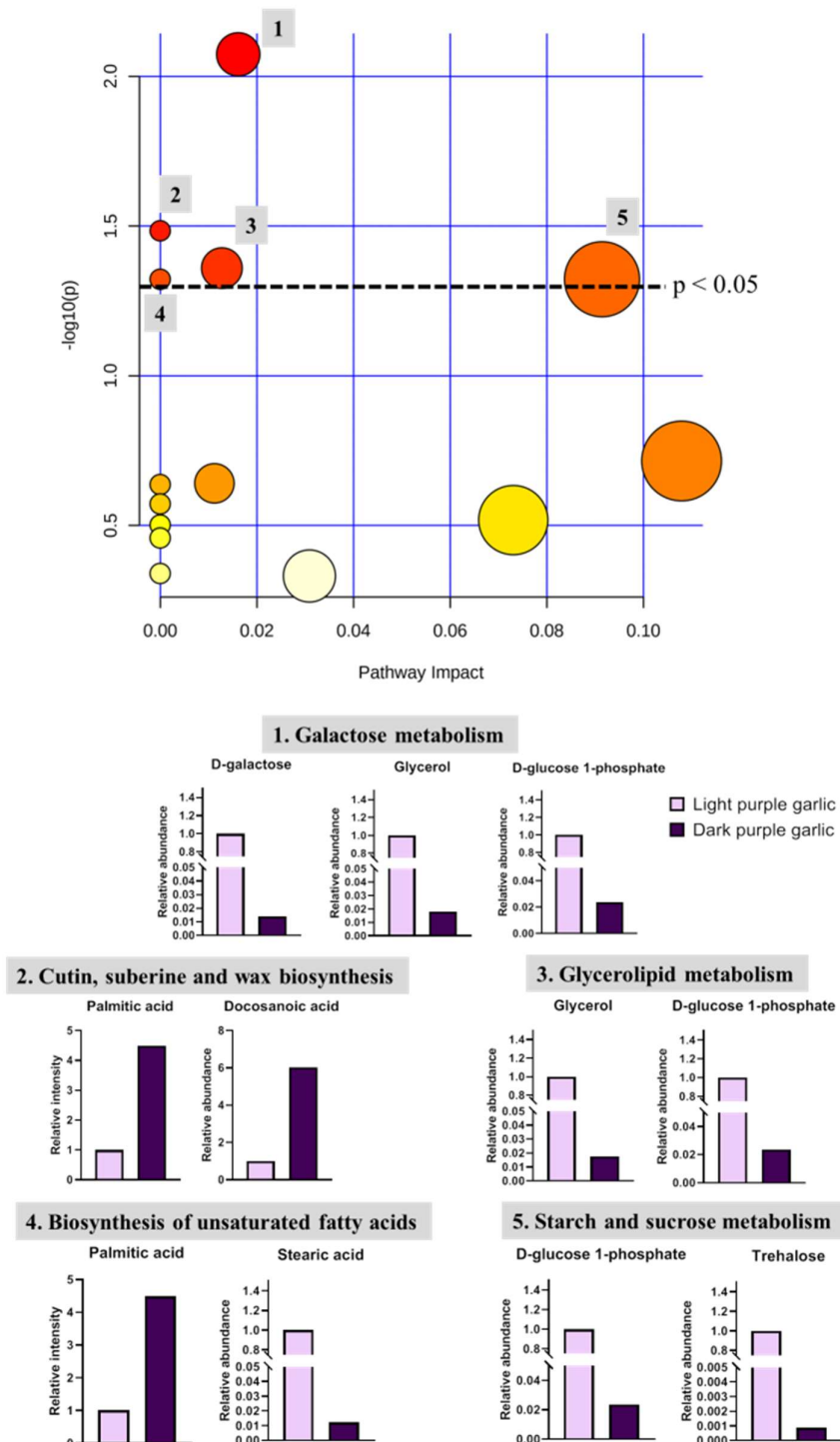
ser decorrente da presença ou ausência da enzima malonil-CoA sintetase. Novos estudos devem ser realizados para comprovar essa relação. Esta é uma descoberta importante que pode orientar os produtores de alho para uma produção mais eficaz de alho roxo escuro.



**Figura 2.4:** Via de biossíntese de antocianina (visão simplificada) com foco na reação do ácido malônico com a enzima ativadora de acil (malonil-CoA sintetase).

O éster bis 2-etilexílico do ácido 1,2-benzenodicarboxílico (p-valor =  $2,66 \times 10^{-3}$  e intensidade 9 vezes maior no alho roxo escuro) também apresentou diferença significativa na abundância entre o alho roxo claro e o alho roxo escuro. Este composto foi encontrado em algumas plantas medicinais (DAS et al., 2012; SINGH et al., 2011), e experimentos mostraram atividade anticancerígena deste composto em linhagens celulares e provou ser um forte estimulante imunomodulador de células B (SAVE; LOKHANDE; CHOWDHARY, 2015).

A análise de enriquecimento da via baseada em metabólitos foi realizada para revelar as vias mais relevantes associadas à distinção metabólica entre alhos roxos claros e alhos roxos escuros. Vias envolvendo dois ou mais metabólitos detectados e com valores de  $p < 0,05$  foram rastreadas como possíveis vias alvo de interesse. De acordo com essa seleção, cinco vias bioquímicas foram identificadas com evidências de regulação diferencial entre o alho roxo claro e o alho roxo escuro (Figura 2.4): metabolismo da galactose, biossíntese de cutina, suberina e cera, metabolismo de glicerolípídeos, biossíntese de ácidos graxos insaturados, amido e sacarose metabolismo. Entre essas vias, a biossíntese de cutina, suberina e cera foi a segunda via metabólica mais relevante regulada devido às diferenças de ácido docosanóico entre os grupos de alho. A biossíntese de cutina, suberina e cera tem efeito nas células epidérmicas das folhas e nas paredes celulares das raízes, proporcionando importantes interfaces lipofílicas entre a planta e seu ambiente, contribuindo significativamente para a regulação da absorção de água e transporte de solutos para dentro e para fora da planta (SCHREIBER, 2010).



**Figura 2.5:** Vias metabólicas alteradas no alho roxo escuro em comparação com aquelas do alho roxo claro. O tamanho e as cores dos círculos revelaram a magnitude das vias metabólicas impactadas (amarelo para relevância menor, vermelho para relevância maior, círculos pequenos para impacto de via menor e círculos grandes para impacto de via principal) de acordo com sua relevância estatística e impacto da via (PI) valores resultantes da análise de enriquecimento quantitativo (QEA) e análise de topologia de rede (NTA), respectivamente. A linha pontilhada representa o ponto de corte de significância em um valor de  $p < 0,05$ .

## **2.4 Conclusão**

A metabolômica global baseada em GC-MS revelou assinaturas de metabólitos distintos entre alhos roxos escuro e alhos roxos claros, embora sejam produzidos a partir de sementes do mesmo genótipo em condições agronômicas semelhantes. Alguns biomarcadores de alho roxo escuro foram descobertos, trazendo informações científicas importantes para o agronegócio e comunidade de pesquisa em química de alimentos. Além disso, a propriedade medicinal do alho roxo escuro mostra-se superior à do alho roxo claro, pois maior abundância em compostos organossulfurados. Os dados gerais sugerem que alguns ácidos orgânicos, como ácido malônico e ácido docosanóico são os principais fatores de diferenciação entre alhos roxos escuros e claros.

### **3 Abordagem metabólica aplicada a autenticação de alhos (*Allium sativum* L.) produzidos no Brasil e na China**

Victor dos Santos Azevedo Leite<sup>1</sup> Brena Rodrigues Mota Ikehara<sup>1</sup>, Natália Reis de Almeida<sup>1</sup>, Willian Rodrigues Macedo<sup>2</sup> e Frederico Garcia Pinto<sup>1\*</sup>

1 - Instituto de Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade Federal de Viçosa, Campus de Rio Paranaíba, Km 7 – Zona Rural, MG-230, Rodoviário. 38810-000 Rio Paranaíba-MG, Brasil. \*e-mail: frederico.pinto@ufv.br

2 - Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Viçosa, Campus de Rio Paranaíba, Rodovia BR 354 km 310, CEP 38810-000, Rio Paranaíba - MG, Brasil.

#### **Resumo**

Durante séculos, o alho (*Allium sativum* L.) foi cultivado e utilizado por suas propriedades medicinais. É um tempero bem conhecido que detém um valor econômico significativo globalmente. As diferenças metabólicas entre o alho brasileiro e o chinês foram investigadas neste estudo pela cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS). Foram observadas diferenças químicas distintas entre esses dois grupos de alho. O alho brasileiro apresentou maior abundância em compostos organossulfurados e precursores de aminoácidos do que o alho chinês. Em contraste, o alho chinês apresentou maior abundância em aminoácidos essenciais e açúcares em comparação ao alho brasileiro. Como as alterações metabólicas afetam o fenótipo das células ou organismos, este estudo fornece informações importantes sobre as diferenças entre o alho produzido na China e no Brasil. Também mostra que a genética vegetal, as condições ambientais e agrícolas têm grande influência na composição química do alho.

**Palavras-chave:** metabólica global, GC-MS, alho, autenticação de alimentos

#### **3.1 Introdução**

O alho (*Allium Sativum* L.) é considerado um dos condimentos mais importantes para a alimentação mundial, com uma produção de aproximadamente 30,7 milhões

de toneladas em 2019 (FAO, 2020). Devido ao seu sabor atraente e propriedades nutricionais distintas, o alho é usado principalmente na culinária. Além de suas várias propriedades, como atividade anticancerígena, antiinflamatória, antimicrobiana, cardioprotetora e antidiabética, o alho atraiu atenção por seus potenciais benefícios à saúde (Agbana et al., 2020; Shang et al., 2019; Vijayakumar et al., 2019; Zhang et al., 2020). As propriedades medicinais e o sabor pungente distinto do alho podem ser amplamente atribuídos aos seus compostos organossulfurados, que incluem alicina (dialil tiosulfonato), S-alil-cisteína sulfóxido (aliina), dialil dissulfeto, dialil trissulfeto, dialil sulfeto e S-alil-cisteína (D'Archivio et al., 2019). Outras classes de compostos também são encontradas no do alho, incluindo aminoácidos, vitaminas, açúcares, ácidos orgânicos, polifenóis e flavonoides (Liu et al., 2020; Morales-González et al., 2019). Sua concentração química nos bulbos de alho depende do ambiente geográfico, da cultivar e das condições de cultivo e armazenamento (Beato et al., 2011; Martins et al., 2016; Montaña et al., 2011).

A diferenciação precisa e confiável entre o alho produzido em diferentes países é essencial para garantir a autenticidade e a qualidade dos produtos alimentícios. A metabolômica global baseada em cromatografia gasosa-espectrometria de massa (GC-MS) surgiu como uma técnica promissora neste contexto (Guo et al., 2019; Shao et al., 2019). Esta abordagem permite a identificação e quantificação simultânea de um grande número de metabolitos presentes em amostras de alho, sem necessidade de conhecimento prévio dos compostos alvo (Pinto et al., 2019; Tian et al., 2020). Isso permite a descoberta de diferenças metabólicas inesperadas entre alho de diferentes origens, tornando a metabolômica GC-MS global uma ferramenta valiosa para caracterizar e diferenciar o alho produzido em diferentes países (Molina-Calle et al., 2016).

A análise multivariada desempenha um papel importante na interpretação dos dados complexos gerados pela metabolômica. Isso nos ajuda a extrair informações relevantes, identificar padrões e distinguir diferentes amostras. Duas técnicas amplamente utilizadas neste campo são a Análise de Componentes Principais (PCA) e a Análise Discriminante de Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA). O PCA nos ajuda a reduzir a complexidade dos dados, facilitando a visualização e identificação de grupos. Por outro lado, o PLS-DA é útil quando queremos distinguir grupos específicos de amostras, separando-os efetivamente. Além disso, existe a técnica *Orthogonal*

*Partial Least Squares Discriminant Analysis* (Ortho PLS-DA), que ajuda a eliminar variações irrelevantes nos dados, melhorando ainda mais a separação de grupos e identificando os metabólitos responsáveis por essa diferenciação (Pinto, 2017; Smolinska et al., 2014; Worley & Powers, 2013).

Este estudo teve como objetivo entender as diferenças químicas entre bulbos de alho do Brasil e da China. Para atingir esse objetivo, realizamos uma análise abrangente e comparativa da composição de metabólitos do alho brasileiro e chinês por meio do uso de metabolômica global baseada em cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS). A metabolômica global baseada em GC-MS tem sido usada como uma abordagem eficaz para caracterizar a composição química de produtos agrícolas de diferentes regiões (Rashid et al., 2021; Zhao et al., 2022). Métodos quimiométricos foram usados para modelagem de dados experimentais e descoberta de biomarcadores.

## **3.2 Materiais e métodos**

### **3.2.1 Reagentes**

A água deionizada foi obtida por meio de um sistema de purificação Milli-Q® da Millipore (Darmstadt, Alemanha). O gás hélio foi adquirido da White Martins. Uma mistura padrão de alcanos (C7-C30), metanol de alto desempenho para cromatografia líquida, cloridrato de metoxiamina (98%), N-Metil-N-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida com 1% de trimetilclorossilano (MSTFA + 1% TMCS), adonitol (99%) e piridina foram adquiridos da Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil).

### **3.2.2 Amostras de alhos**

As amostras de alho (*A. sativum* L.) foram obtidas de empresas associadas à Central Atacadista de Minas Gerais (CEASA MG). Foram fornecidas nove amostras da variedade Ito do Brasil e oito amostras da variedade branca Fukuchi da China. Até a realização das análises, as amostras foram mantidas em caixas de papelão com ventilação em ambiente escuro e em temperatura ambiente.

### **3.2.3 Extração de metabólitos**

As amostras de alho, foram congeladas em nitrogênio líquido e depois moídas em um pó fino usando um almofariz e pistilo. Para iniciar a análise, 50 mg de amostras de alho foram cuidadosamente pesadas e colocadas em tubos Eppendorf. A seguir, 1 mL de água contendo 25 µg/mL de adonitol foi adicionado como padrão interno. Para garantir que as amostras foram bem misturadas, elas foram agitadas por 5 segundos e sonicadas por 15 minutos. Posteriormente, as amostras de alho foram centrifugadas a 13.000g por 15 minutos e o sobrenadante foi cuidadosamente transferido para um novo tubo. O processo de extração foi concluído repetindo o mesmo procedimento no resíduo restante usando 1 mL de metanol. O sobrenadante obtido de ambas as extrações foi combinado para as reações de derivatização. Vale ressaltar que uma quantidade equivalente de material de alho foi utilizada para cada amostra para garantir consistência nas medições de metabólitos. Essa abordagem permitiu a normalização com base na massa do material usado, contabilizando assim quaisquer variações na recuperação do metabólito e na preparação da amostra. O padrão interno também foi incluído para garantir medições precisas. Uma vez concluídos os procedimentos necessários, um volume de amostra de 400 µL foi coletado em um frasco de vidro, e o solvente evaporado durante a noite em estufa de recirculação forçada de ar a 40°C.

#### **3.2.4 Derivatização das amostras**

As amostras secas foram submetidas à metoxiamina pela adição de 50 µL de piridina contendo 15,0 mg/mL de cloridrato de metoxiamina a 50 °C por 1 h. Em seguida, as amostras foram submetidas à trimetilsililação adicionando 50 µL de MSTFA [N-metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida] e reagente TMCS (cloro trimetil silano) a 1% e, em seguida, incubadas a 50°C por 1 hora. As amostras derivatizadas foram transferidas para frascos de vidro apropriados para a análise GC-MS. Além disso, amostras de controle de qualidade (QC) foram preparadas para garantir estabilidade e precisão instrumental. Essas amostras de QC foram criadas reunindo alíquotas de todas as amostras de alho dentro de cada grupo e foram processadas usando o mesmo procedimento das amostras experimentais. Isso garantiu que quaisquer alterações observadas na análise GC-MS fossem devidas às próprias amostras de alho e não ao instrumento. As amostras QC foram submetidas à análise GC-MS, antes, durante e após a injeção das demais amostras,. Esta abordagem de

análise rigorosa permitiu a obtenção de resultados consistentes e confiáveis e garantiu que qualquer potencial desvio instrumental fosse detectado e contabilizado.

### 3.2.5 Análises por GC-MS

A análise de metabólitos foi realizada usando um sistema de cromatografia gasosa-espectrometria de massa (GCMS-QP2010, Shimadzu, Kyoto, Japão) com uma coluna capilar RTX-5 (30 m x 250  $\mu$ m ID, espessura de filme de 0,25  $\mu$ m; Restek). A temperatura do forno foi inicialmente ajustada para 80°C por 2 minutos, aumentada para 315°C a uma taxa de 5°C/min e então mantida a 315°C por 12 minutos. O hélio foi usado como gás de arraste, fluindo constantemente a 1,0 mL/min. Para obter o desempenho ideal, as temperaturas da interface e da fonte de íons foram definidas para 240°C. Um volume de injeção de 1  $\mu$ L foi empregado, com uma proporção de divisão de 10:1, para garantir a entrega efetiva da amostra ao sistema. Isso foi feito para manter resultados consistentes e precisos em todo o processo de análise GC-MS. Os dados espectrais de massa foram adquiridos no modo de ionização de elétrons (EI) a 70 eV, com uma faixa de varredura de massa de 50-650  $m/z$  e uma taxa de 5 varreduras/s. Um tempo de corte de solvente de 4 minutos foi empregado, com base no tempo de retenção do solvente piridina. Para garantir a precisão de nossas medições de GC-MS e cálculos de índice de retenção, empregamos uma mistura de alceno padrão (C7-C30).

### 3.2.6 Processamento de dados

Para analisar os dados brutos obtidos do GC-MS, utilizamos o software conversor ABF (<https://www.reifycs.com/AbfConverter/>) para converter os dados no formato "abf". Os dados extraídos foram então submetidos a processamento adicional, incluindo alinhamento, deconvolução e identificação. Usamos o MS-DIAL 4.18 (<http://prime.psc.riken.jp/comprms/msdial/main.html>) para realizar essas etapas. Uma lista abrangente dos parâmetros utilizados no MS-DIAL pode ser encontrada na Tabela A2 do material suplementar.

Para determinar os metabólitos presentes nas amostras de alho, utilizamos uma abordagem de comparação. Especificamente, o FiehnLib é uma biblioteca de metabólitos de espectro de massa e índice de retenção (RI) que serve como referência

para a identificação de compostos desconhecidos, comparando espectros de massa experimentais e valores de IR com os da biblioteca. Por meio desse processo, conseguimos identificar com sucesso os metabólitos presentes em nossas amostras. Essa comparação foi feita usando MS-DIAL, o que nos permitiu combinar com precisão os espectros de massa e RI de cada metabólito em nossas amostras com os da biblioteca FiehnLib. AMDIS é uma ferramenta de software amplamente utilizada para analisar dados GC-MS. Ele ajuda a identificar e quantificar os componentes individuais de uma amostra deconvoluindo os espectros de massa e combinando os picos resultantes com uma biblioteca de referência. Essa abordagem analítica permitiu a verificação de nossas descobertas e garantiu que quaisquer erros potenciais fossem identificados e resolvidos prontamente. O AMDIS foi utilizado para deconvoluir os dados, permitindo-nos obter espectros de massa de alta qualidade. A correspondência espectral é uma técnica que compara o espectro de massa de um composto desconhecido com uma biblioteca de espectros de massa de compostos conhecidos para identificar correspondências potenciais com base em sua similaridade. Nesse caso, os autores usaram a biblioteca de espectros de massa do Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (NIST 2014) como referência para identificar os metabólitos anotados com uma similaridade de  $\geq 80\%$ . Isso ajuda a aumentar a confiança na identificação dos metabólitos nas amostras de alho.

### **3.2.7 Análise estatística**

Para analisar nossos dados, utilizamos o Metaboanalyst 4.0 (<http://www.metaboanalyst.ca>). A plataforma que utilizamos foi projetada especificamente para realizar normalização de dados, análise estatística e análise de vias metabólicas. Ao utilizar essa plataforma, conseguimos processar e analisar nossos dados com precisão e eficiência. Essa abordagem permitiu a identificação de possíveis padrões e tendências em nossos resultados, que foram posteriormente analisados para elucidar as vias metabólicas. Excluímos valores que estavam ausentes em 80% dos dados da análise, garantindo que nossos resultados fossem baseados em dados robustos e confiáveis. Para minimizar qualquer perda potencial de dados, os valores ausentes foram imputados com um valor pequeno equivalente à metade do valor positivo mínimo no conjunto de dados original. Essa abordagem nos permitiu reter o máximo de informações possível. Os dados foram submetidos à

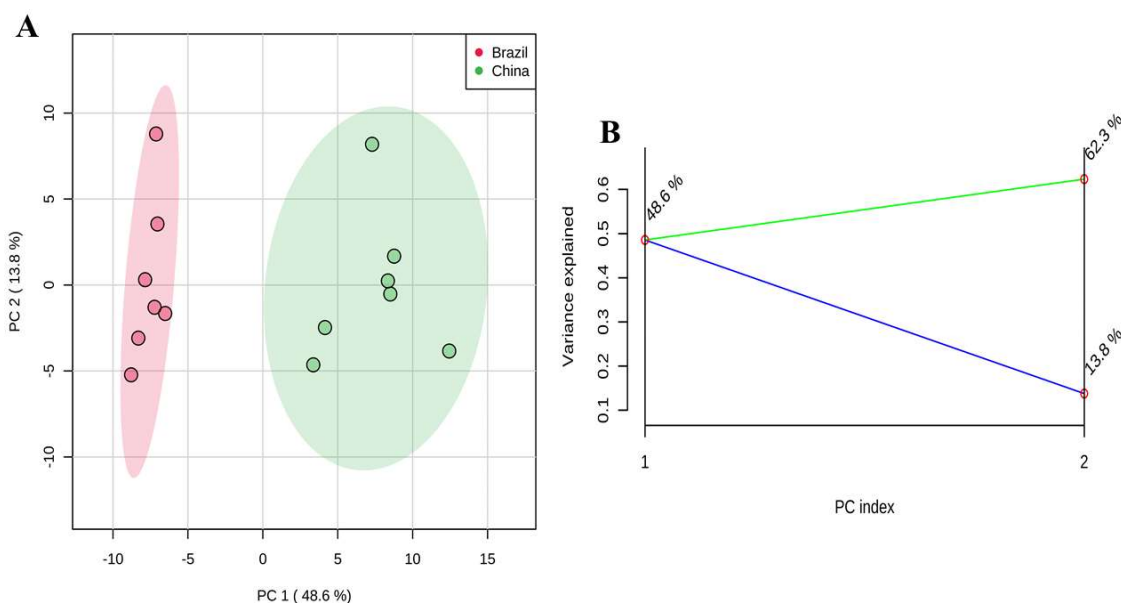
filtragem com base no desvio padrão relativo, seguido de normalização de soma, transformações de log 2 e escalonamento automático. Ao usar esses métodos, fomos capazes de otimizar e processar ainda mais os dados para análise posterior. Essas etapas foram necessárias para garantir que nossos dados fossem consistentes e comparáveis, permitindo-nos tirar conclusões significativas de nossa análise.

Para comparar o conteúdo de metabólitos em dois grupos de amostras de alho brasileiro e chinês, o teste t de Student foi realizado com um valor de  $p < 0,05$  considerado estatisticamente significativo. Para facilitar a classificação das amostras de alho e identificar potenciais biomarcadores, empregamos métodos estatísticos multivariados, como Análise de Componentes Principais (PCA), Quadrados Mínimos Parciais com Análise Discriminante (PLS-DA) e Quadrados Mínimos Orto Parciais com Análise Discriminante (Ortho PLS-DA). Essas abordagens analíticas nos permitiram identificar efetivamente padrões e tendências nos dados e classificar com precisão as amostras de alho de acordo com seus respectivos grupos. O modelo Ortho PLS-DA foi avaliado pela realização de um teste de permutação nas respostas, com 20 permutações aleatórias, e sua qualidade foi avaliada pelos valores de R<sup>2</sup>Y e Q<sup>2</sup>. Para entender e visualizar melhor nossos dados metabolômicos, empregamos análise hierárquica de mapa de calor baseada em agrupamento. Essa abordagem analítica nos permitiu categorizar e agrupar os dados com eficácia, fornecendo uma representação clara e concisa das tendências e padrões dos dados. Por meio desse método, pudemos entender melhor o perfil metabolômico geral de nossas amostras. Essa abordagem nos permitiu visualizar a abundância relativa dos íons detectados em cada amostra por meio da intensidade da cor, facilitando a identificação de padrões e tendências em nossos dados. Depois de identificar todos os metabólitos estatisticamente significativos, realizamos uma análise de via utilizando o Metaboanalyst 4.0. Conduzimos nossa análise com base na biblioteca de vias metabólicas de *Arabidopsis thaliana* da *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG). Isso nos permitiu obter informações sobre as vias biológicas afetadas pelos tratamentos experimentais, fornecendo uma compreensão mais abrangente das alterações metabólicas ocorridas.

### **3.3 Resultados e discussão**

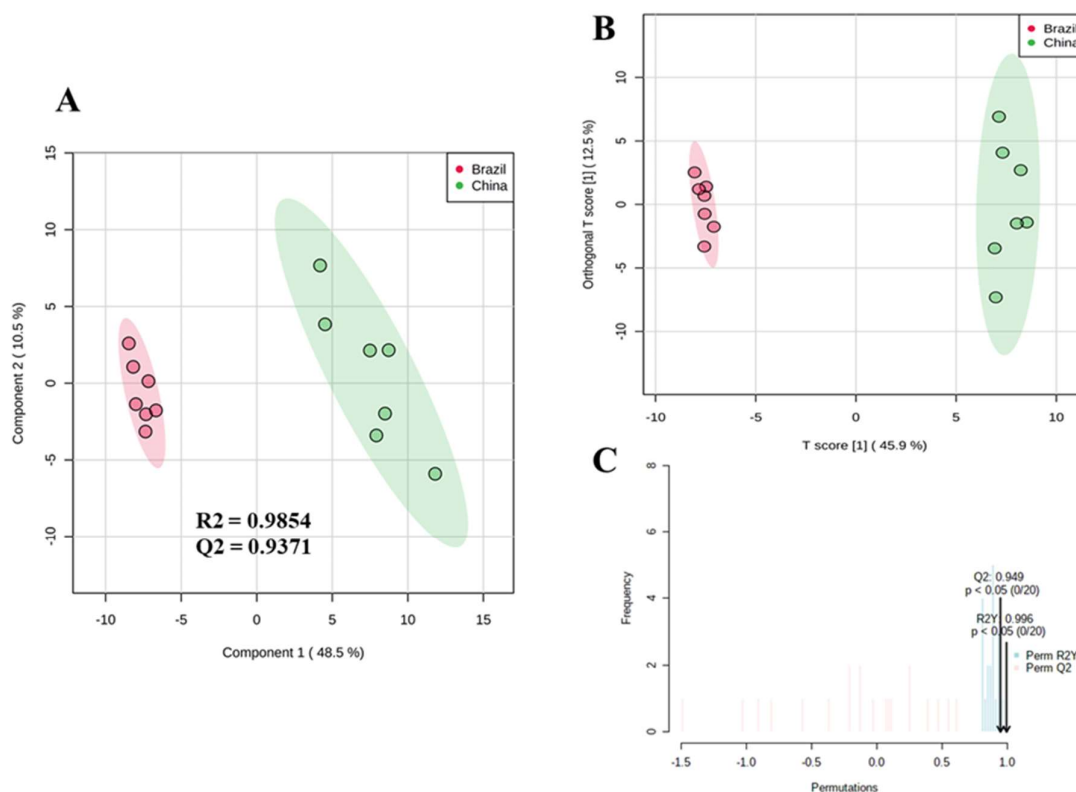
#### **3.3.1 Metabolômica global baseada em GC-MS**

Um conjunto de dados metabolômicos refinados compreendendo 334 *features*, foram detectadas nas amostras de alho por GC-MS, das quais 161 *features* eram desconhecidas, enquanto 173 *features* foram identificadas. Analisamos os dados metabolômicos e encontramos 84 *features* que mostraram uma diferença estatisticamente significativa ( $p$ -valor  $< 0,05$ ) em suas intensidades relativas entre amostras de alho brasileiro e chinês. Esta descoberta sugere que existem diferenças metabólicas significativas entre os dois tipos de alho. Para entender melhor a separação entre os grupos de alho, foi realizada a análise de componentes principais (PCA) (Figura 3.1A) que mostrou claramente uma separação dos metabolomas do alho do Brasil para o alho da China. A primeira componente principal (PC1) apresentou uma variância de 48,6%, enquanto a segunda componente principal (PC2) representou 13,8% da variância. A Figura 3.1B ilustra que as duas componentes principais (CPs) explicaram 62,4% da variância dos dados e houve uma clara separação entre os grupos. Os resultados indicam que os níveis de metabólitos variam significativamente entre os diferentes grupos de alho, apoiando nossas descobertas anteriores de diferenças metabólicas entre amostras de alho brasileiras e chinesas.



**Figura 3.1:** **A)** O gráfico de PCA representa a separação geral usando o perfil metabolômico global para amostras de alho produzidas no Brasil e na China. **B)** Gráfico de tela de variância acumulada explicada e variância explicada por PC individual.

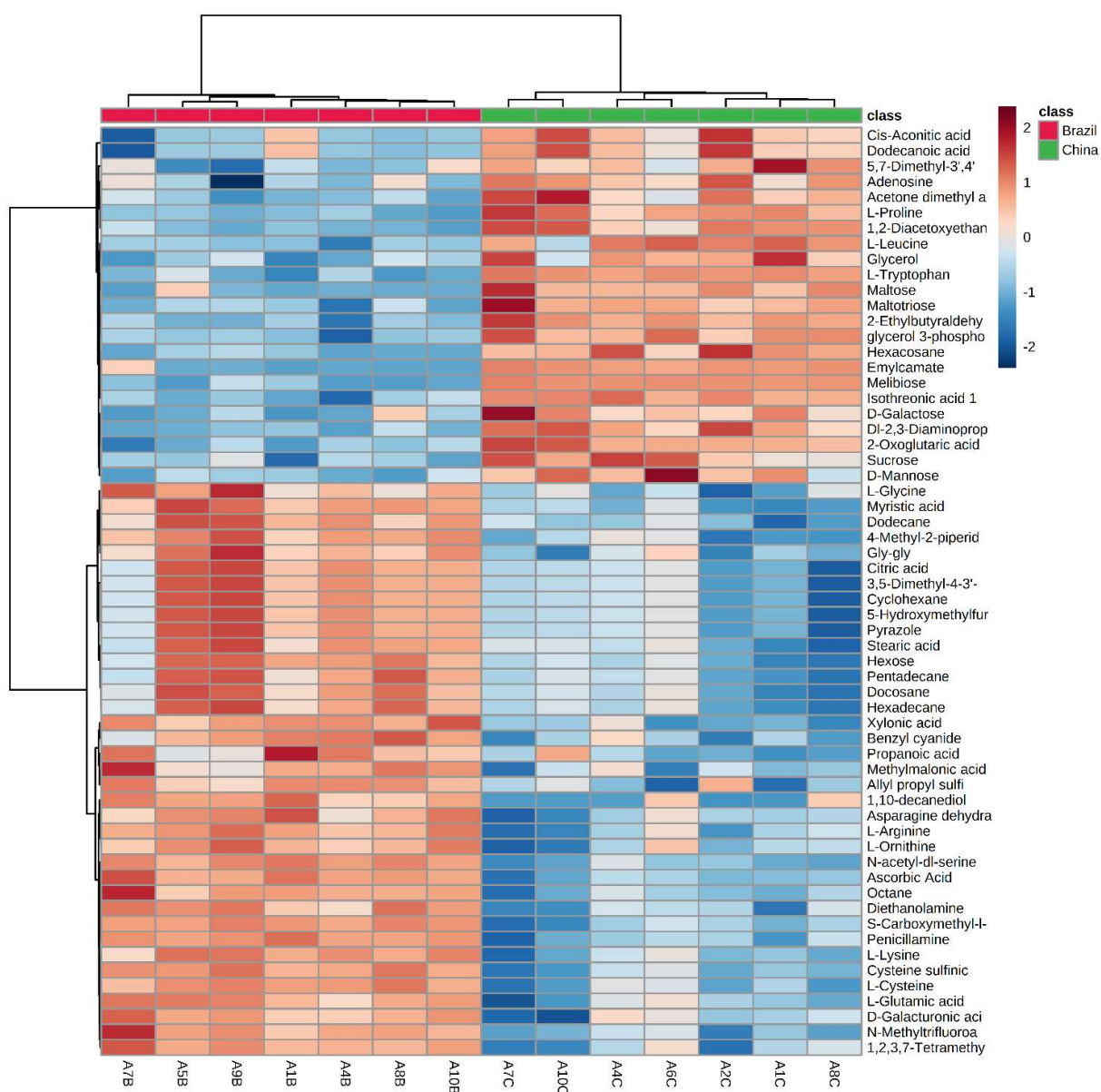
Análises supervisionadas utilizando PLS-DA e Ortho PLS-DA foram realizadas para identificar potenciais biomarcadores que possam distinguir os dois tipos de alho, brasileiro e chinês. Os resultados dessas análises mostraram agrupamentos distintos dos dois grupos de alho, com as componentes 1 e 2 explicando 59% e 58,4% da variância total, respectivamente. O modelo PLS-DA foi bem validado utilizando um teste de permutação, com R2 de 0,9854 e Q2 de 0,9371 (Figura 3.2A). Para o modelo Ortho PLS-DA (Figuras 3.2B e 3.2C), os valores de R2Y e Q2 obtidos pelo teste de permutação foram 0,996 e 0,949, respectivamente. Os valores validados gerados por ambos os modelos foram próximos de 1, indicando forte poder preditivo e boa qualidade (BARKER; RAYENS, 2003).



**Figura 3.2:** **A)** Gráfico de pontuação PLS-DA das amostras de alho produzidas no Brasil e na China. **B)** Gráfico de dispersão de pontuação obtido do Ortho PLS-DA para amostras de alho produzidas no Brasil e na China. **C)** Parâmetros de validação do modelo Ortho PLS-DA obtidos do teste de permutação, configurando 20 permutações aleatórias. Os círculos ao redor dos grupos de observação no gráfico de pontuação exibem as regiões de confiança de 95%.

Conduziu-se análise hierárquica de agrupamento utilizando um mapa de calor para identificar metabólitos conhecidos que mostrassem diferenças significativas

entre o alho brasileiro e o chinês. Os resultados desta análise são mostrados na Figura 3.3, que mostra os 60 principais metabólitos que apresentaram diferenças significativas entre os dois grupos de alho. Estas descobertas indicam que a metabolômica é uma ferramenta eficaz para classificar amostras de alho com base na sua origem. Dos 60 metabólitos conhecidos apresentados no mapa de calor, 37 foram expressos em níveis mais elevados no alho brasileiro, enquanto 23 exibiram expressão elevada no alho chinês.



**Figura 3.3:** O mapa de calor ilustra 60 metabólitos que foram identificados como significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) entre o alho brasileiro e o chinês.

Esses metabólitos conhecidos foram classificados em diferentes classes, incluindo compostos de enxofre, açúcares, ácidos orgânicos, aminoácidos e ácidos graxos, e seus valores de variação no alho brasileiro em comparação ao alho chinês são apresentados na Tabela 1. Um total de 84 metabólitos que foram identificados anteriormente mostraram diferenças significativas nas intensidades relativas (com valor de  $p$  inferior a 0,05) entre os dois grupos. Os detalhes desses metabólitos podem ser encontrados na Tabela S2.

**Tabela 3.1:** Vários metabólitos foram identificados com diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre o alho brasileiro e o alho chinês.

<b>Metabólitos</b>	<b>FC Brasil/China</b>	<b>p-valor</b>
<b>Compostos de enxofre</b>		
Sulfeto de alil propil	1.9753	$1.75 \times 10^{-3}$
Ácido cisteína sulfínico	4.41	$2.86 \times 10^{-6}$
S-Carboximetil-L-cisteína	4.2025	$1.54 \times 10^{-6}$
<b>Aminoácidos</b>		
L-Arginina	3.8656	$7.42 \times 10^{-5}$
L-Asparagina	1.2176	$4.12 \times 10^{-2}$
L-Cisteína	4.6081	$1.42 \times 10^{-5}$
L-Glutamina	2.1131	$3.34 \times 10^{-2}$
L-Ácido Glutâmico	1.8118	$1.38 \times 10^{-4}$
L-Glicina	1.4458	$7.91 \times 10^{-4}$
L-Leucina	0.47376	$3.40 \times 10^{-5}$
L-Tirosina	2.3819	$2.59 \times 10^{-2}$
L-Lisina	2.3242	$2.13 \times 10^{-5}$
L-Ornitina	3.107	$5.88 \times 10^{-4}$
L-Fenilalanina	0.65486	$4.10 \times 10^{-2}$
N-Acetil-Serina	2.6682	$1.60 \times 10^{-7}$
L-Prolina	0.10424	$3.22 \times 10^{-7}$
L-Triptofano	0.074684	$1.65 \times 10^{-7}$
L-Valina	0.70076	$3.01 \times 10^{-3}$
Citrulina	1.3153	$8.27 \times 10^{-3}$
<b>Açúcares</b>		

D-Frutose	0.83033	$3.48 \times 10^{-2}$
D-Galactose	0.39253	$8.13 \times 10^{-4}$
D-Manose	0.62757	$3.77 \times 10^{-4}$
D-Ribose	0.55222	$1.31 \times 10^{-2}$
Maltose	0.071228	$2.95 \times 10^{-5}$
Maltotriose	0.46453	$3.56 \times 10^{-5}$
Melibiose	0.0064685	$4.30 \times 10^{-9}$
$\alpha$ -Lactose	0.59724	$4.95 \times 10^{-2}$
Sacarose	0.5887	$3.49 \times 10^{-4}$
<b>Ácidos orgânicos</b>		
Ácido 2-oxoglutárico	0.40916	$3.65 \times 10^{-6}$
Ácido ascórbico	3.4429	$5.85 \times 10^{-7}$
Ácido isotreônico	0.38601	$1.15 \times 10^{-6}$
Ácido 2,3-diaminopropiônico	0.26623	$2.36 \times 10^{-6}$
ácido $\beta$ -hidroxibutírico	1.4778	$3.67 \times 10^{-3}$
Ácido málico	0.38624	$2.88 \times 10^{-3}$
Ácido Cis-Aconítico	0.7435	$8.75 \times 10^{-4}$
Ácido metilmalônico	1.9854	$6.82 \times 10^{-4}$
Ácido tranexâmico	1.2986	$2.98 \times 10^{-2}$
Ácido xilônico	1.7577	$4.15 \times 10^{-6}$
Ácido Cítrico	1.4524	$4.79 \times 10^{-4}$
Ácido propanóico	1.851	$2.55 \times 10^{-3}$
<b>Ácidos graxos</b>		
Ácido mirístico	1.8672	$1.04 \times 10^{-5}$
Ácido esteárico	1.3785	$1.93 \times 10^{-3}$
Ácido palmítico	1.3679	$6.34 \times 10^{-3}$
Ácido dodecanóico	0.72751	$1.02 \times 10^{-3}$

Entre os metabólitos conhecidos, foram observadas diferenças estatisticamente significativas, maiores concentrações no alho brasileiro do que no chinês, para os compostos de enxofre como o sulfeto de alil propil, ácido cisteína sulfínico e S-carboximetil-L-cisteína. Esses compostos são responsáveis pelo aroma e sabor característicos do alho, e também proporcionam atividades medicinais contra

diversas doenças, como inflamatórias, cardiovasculares, diabetes e câncer (JEONG et al., 2016; SEKI et al., 2012; VARSHNEY; BUDOFF, 2016; ZHAI et al., 2018).

Para a classe de aminoácidos, 16 metabólitos apresentaram diferença significativa entre os dois grupos de alho. Os aminoácidos L-cisteína, L-arginina, L-ácido glutâmico, L-asparagina, L-glutamina, L-lisina, L-glicina, L-ornitina, L-tirosina e N-acetilserina foram mais abundantes no alho brasileiro, enquanto L-Leucina, L-Fenilalanina, L-Prolina, L-Triptofano e L-Valina estão mais presentes no alho chinês. Dentre os aminoácidos essenciais presentes (L-Triptofano, L-Valina, L-Fenilalanina, L-lisina, L-Leucina), apenas a L-lisina foi mais abundante no alho brasileiro. Os aminoácidos essenciais não podem ser sintetizados pelo corpo humano e, portanto, devem ser adquiridos através da ingestão alimentar ou de suplementos. Eles são necessários para a construção de tecidos, músculos, alguns hormônios e enzimas (MASSEY; BLAKESLEE; PITKOW, 1998; WANG et al., 2017). L-glicina, L-cisteína e N-acetilserina participam da biossíntese de precursores de compostos de enxofre (LIU et al., 2020b; WATANABE et al., 2018).

Na classe açúcar, um total de 10 metabólitos apresentaram diferença significativa entre o alho brasileiro e chinês, D-manose, D-Ribose, D-Frutose, D-Galactose, Maltose, Maltotriose, Melibiose,  $\alpha$ -Lactose e Sacarose.

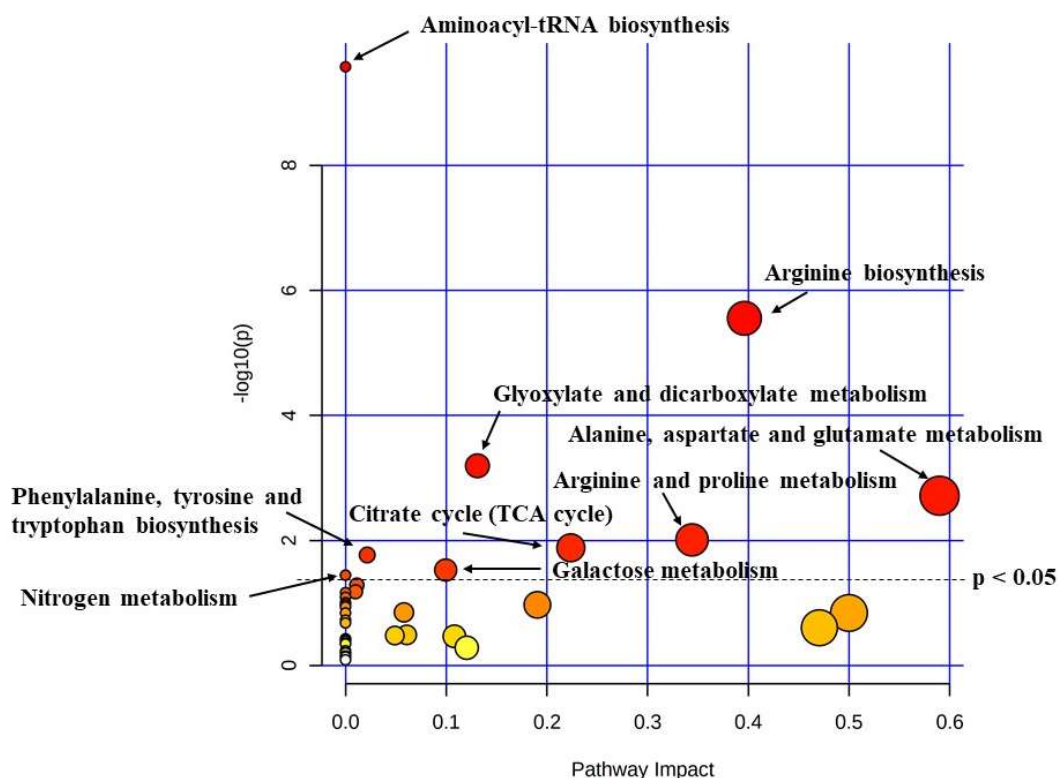
Dentre os ácidos orgânicos analisados, vários apresentaram diferenças significativas entre os dois grupos de alho, ácido 2-oxoglutárico, ácido cítrico, ácido ascórbico, ácido cis-aconítico, ácido isotreônico, ácido 2,3-diamino propiônico, ácido  $\beta$ -hidroxibutírico, ácido málico, ácido metilmalônico, ácido tranexâmico, ácido xilônico e ácido propanóico. O ácido 2-oxoglutárico, o ácido cis-aconítico, o ácido isotreônico, o ácido 2,3-diaminopropiônico e o ácido málico apresentaram maior abundância no alho chinês. O ácido ascórbico, também conhecido como vitamina C, é um dos ácidos orgânicos mais importantes para a saúde, não pode ser produzido no corpo humano e participa de diversas vias bioquímicas, neutralizando radicais e atuando como antioxidante (DASGUPTA; KLEIN, 2014). Enquanto os ácidos 2-Oxoglutárico, Cis-Aconítico, cítrico e Málico são substratos importantes para o ciclo de Krebs, responsável pela produção de energia e envolvidos nas vias metabólicas de carboidratos, lipídios e proteínas (PEREIRA et al., 2013).

A classe de ácidos graxos apresentou 4 metabólitos com diferença significativa entre o alho brasileiro e chinês, o ácido esteárico, o ácido palmítico, o ácido

dodecanóico e o ácido mirístico, sendo apenas o último mais abundante no alho chinês do que no alho brasileiro.

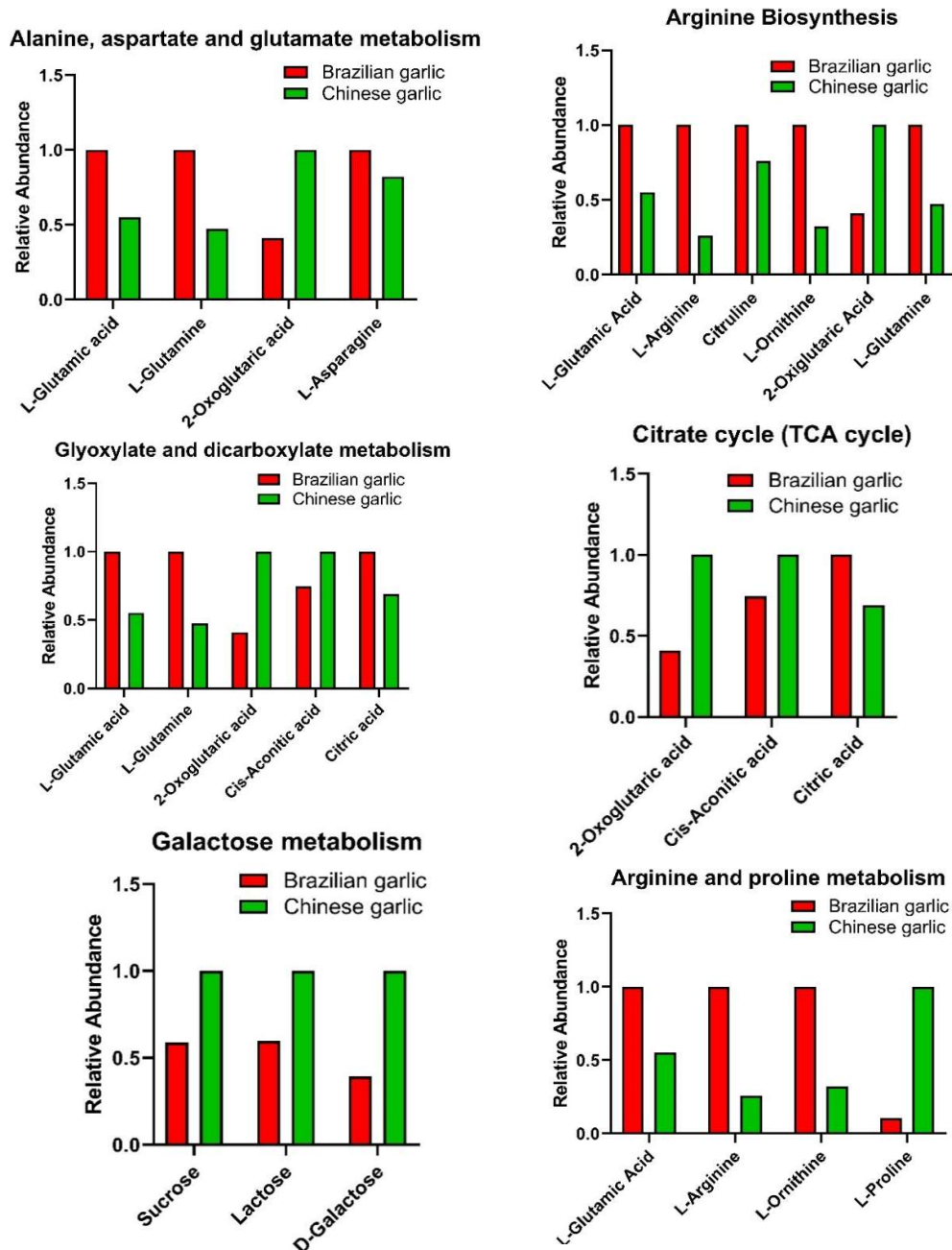
### **3.3.2 Vias Metabólicas**

As vias metabólicas mais relevantes para as diferenças entre o alho brasileiro e chinês foram determinadas pela análise do enriquecimento de vias baseadas em metabólitos. Com valor de corte para significância valor  $p < 0,05$ , as vias metabólicas apresentaram pelo menos três metabólitos como alvo de interesse. Foram identificadas seis vias metabólicas com magnitude relevante que diferenciam a regulação bioquímica entre o alho brasileiro e chinês, conforme mostrado na Figura 3.4. As vias metabólicas mais relevantes foram: Ciclo do citrato; Metabolismo de arginina e prolina; Alanina, biossíntese de arginina; Metabolismo do aspartato e glutamato; Metabolismo da galactose e metabolismo do glioxilato e dicarboxilato.



**Figura 3.4:** Vias metabólicas do alho brasileiro em comparação com o alho chinês. A cor do círculo representa relevância, vermelho para maior relevância e amarelo para menor relevância, e o tamanho do círculo representa o impacto da via metabólica, quanto maior o tamanho maior o impacto. Esses fatores revelaram a magnitude das vias metabólicas impactadas de acordo com a relevância estatística. A linha pontilhada representa o corte de significância no valor de  $p < 0,05$ .

Dentre as vias bioquímicas apresentadas, o metabólito que teve relevância significativa para a diferenciação entre os dois grupos de alho foi o ácido 2-oxoglutárico, também conhecido como  $\alpha$ -cetoglutarato. Presente como ponto regulador do ciclo do ácido cítrico, esse metabólito tem grande influência em outras vias bioquímicas. O  $\alpha$ -cetoglutarato é um intermediário importante que fornece esqueletos de carbono para a biossíntese de aminoácidos. Ao fornecer um esqueleto carbônico, a síntese de novos aminoácidos inicia-se pela formação do ácido L-glutâmico (Glutamato), sua molécula que dá origem a outros aminoácidos através do mecanismo de assimilação e dissimilação da amônia, formando outros aminoácidos importantes como como arginina, prolina, glutamina e ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) (FORDE; LEA, 2007; RAKHMANOVA; POPOVA, 2006).



**Figura 3.5:** Abundância relativa dos metabólitos presentes nas vias metabólicas significativas na comparação entre o alho brasileiro e chinês.

### **3.4 Conclusão**

Um estudo metabolômico global foi conduzido usando análise GC-MS para comparar as assinaturas de metabólitos do alho brasileiro e chinês. Os resultados mostraram diferenças distintas nos metabólitos entre os dois grupos de alho, com cada grupo apresentando biomarcadores específicos. O alho brasileiro apresentou alta concentração de compostos organossulfurados, responsáveis pelas propriedades medicinais do alho. Por outro lado, o alho chinês apresentou alta abundância de açúcares e aminoácidos essenciais, que não são produzidos pelo corpo humano e devem ser obtidos por meio da alimentação. O ácido ascórbico, também conhecido como vitamina C, que atua como antioxidante e neutraliza os radicais, foi mais abundante no alho brasileiro. Essas descobertas fornecem informações científicas valiosas tanto para a indústria do agronegócio quanto para a comunidade científica.

#### **4 Rápida discriminação da origem geográfica do alho (*Allium sativum* L.): uma abordagem metabolômica aplicada a dados de espectrometria de massas por *paper spray***

Victor dos Santos Azevedo Leite<sup>1</sup>, Brena Rodrigues Mota Ikehara<sup>1</sup>, Natália Reis de Almeida<sup>2</sup>, Rodinei Augusti<sup>3</sup> e Frederico Garcia Pinto<sup>1</sup>

1 - Instituto de Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade Federal de Viçosa, Campus de Rio Paranaíba, Km 7 – Zona Rural, MG-230, Rodoviário. 38810-000 Rio Paranaíba-MG, Brasil. \*e-mail: frederico.pinto@ufv.br

2 - Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Viçosa, Campus de Rio Paranaíba, Rodovia BR 354 km 310, CEP 38810-000, Rio Paranaíba - MG, Brasil.

3 - Instituto de Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte - MG, Brasil.

#### **Resumo**

Distinguir e categorizar a origem do alho é altamente significativo, considerando a sua utilização generalizada como agente aromatizante. Com bilhões de dólares anuais no comércio global, o alho é frequentemente suscetível a práticas fraudulentas. A espectrometria de massa com ionização por *paper spray* (PS-MS) foi empregada para analisar rapidamente amostras de alho de origens geográficas distintas: China e Brasil. Os dados PS-MS assim gerados foram tratados com abordagens multivariadas metabolômicas, e as amostras de alho destas diferentes regiões geográficas foram facilmente discriminadas. O alho brasileiro foi caracterizado por conter níveis mais altos de aminoácidos, como arginina, prolina e valina, e compostos organossulfurados, como alicina, aliina e L-γ-glutamil-S-alil-L-cisteína, em comparação com o alho chinês. Os dados PS-MS foram tratados utilizando abordagens multivariadas, tipicamente utilizadas no campo da metabolômica, e este protocolo foi prontamente capaz de discernir entre ambos os tipos de amostras. Assim, esta estratégia combinada é promissora não só como ferramenta eficaz para a autenticação da origem geográfica do alho, mas também como um meio poderoso para a descoberta de biomarcadores.

**Palavras-chave:** espectrometria de massa; quimiometria; autenticação de alimentos; alho; PS-MS.

#### 4.1 Introdução

O alho (*Allium sativum* L.) é um condimento culinário essencial usado em todo o mundo desde a antiguidade, conhecido por seu aroma pungente e suas propriedades medicinais, atribuídas principalmente a vários compostos bioativos, especialmente moléculas de organossulfeto (VELÍŠEK; KUBEC; DAVÍDEK, 1997). Sua composição química, incluindo aminoácidos, vitaminas, açúcares, ácidos orgânicos, polifenóis e flavonoides, pode variar de acordo com a origem geográfica, a cultivar, as práticas de cultivo e as condições de armazenamento (MARTINS; PETROPOULOS; FERREIRA, 2016). O alho chinês e o brasileiro são amplamente consumidos em todo o mundo. Eles apresentam pequenas diferenças de sabor e aparência, adequadas para aplicações culinárias distintas (CHAUDHARI et al., 2022; HAHN et al., 2022; PACHOLCZYK-SIENICKA; CIEPIELOWSKI; ALBRECHT, 2021). O alho chinês tem uma casca branca, um sabor forte e pungente e bulbos menores. Por outro lado, o alho brasileiro é caracterizado por sua casca arroxeadada e é mais saboroso, com notas ácidas mais robustas e bulbos mais grossos (CHAUDHARI et al., 2022; HAHN et al., 2022).

Verificar a origem geográfica do alho é fundamental para estabelecer a autenticidade e a rastreabilidade dos produtos derivados desse gênero alimentício. Esse processo envolve o emprego de técnicas analíticas para distinguir as características do alho cultivado em diferentes locais (DESTANOĞLU, 2022; MI et al., 2021). Essa verificação permite que os consumidores façam escolhas informadas, apoiando os agricultores e produtores locais enquanto protegem a reputação de regiões específicas de cultivo de alho e promovem o comércio justo (BYRNE; HEIMAN; JUST, 2020; EHMKE; LUSK; TYNER, 2008; LAURSEN et al., 2016; LIU; LIN; PENG, 2018). A espectrometria de massa com ionização *paper spray* (PS-MS) surgiu como uma ferramenta promissora para a autenticação de alimentos, permitindo a análise rápida e precisa de gêneros alimentícios (SHEN et al., 2013). Usando um suporte de papel como meio de amostragem, a PS-MS oferece uma plataforma versátil para detectar e identificar compostos químicos em gêneros alimentícios (DA SILVA et al., 2019). Essa abordagem inovadora tem se mostrado particularmente valiosa na avaliação da autenticidade dos alimentos, permitindo a identificação de

variações geográficas na composição dos alimentos e a detecção de adulterantes ou contaminantes (PEREIRA et al., 2021). Ao detectar marcadores moleculares ou metabólitos específicos, a PS-MS é uma ferramenta valiosa para evitar fraudes alimentares, oferecendo também informações sobre a origem, a qualidade e a integridade geral dos alimentos. Sua simplicidade, velocidade e sensibilidade tornam a PS-MS uma tecnologia promissora para a autenticação de alimentos, aumentando significativamente a rastreabilidade e a transparência em toda a cadeia global de suprimento de alimentos (MOURA et al., 2020).

A comparação do perfil químico entre as cultivares de alho cultivadas no Brasil e na China ainda não foi encontrada na literatura até o momento, e essas informações são valiosas, considerando-se a crescente atenção à origem geográfica do alho e de outros gêneros alimentícios. Portanto, o objetivo do presente estudo foi utilizar a PS-MS para obter impressões digitais químicas de amostras de alho de regiões distintas (Brasil e China). Métodos quimiométricos e abordagens metabolômicas típicas também foram empregados para modelar os dados experimentais de PS-MS e auxiliar na descoberta de biomarcadores.

## **4.2 Materiais e métodos**

### **4.2.1 Amostras de alho e reagentes**

No estudo de prova de conceito realizado aqui, o alho fresco e não danificado do Brasil (variedade Ito, n = 6) e da China (variedade Fukuchi white, n = 10) foi fornecido pelo Central de Abastecimento de Minas Gerais, Brasil, um mercado comercial certificado no Brasil que garantiu a origem geográfica das amostras. Após a coleta, todas as amostras foram transportadas em caixas de papelão ventiladas, não expostas à luz direta, e armazenadas em uma câmara fria até a análise. O metanol de grau HPLC foi obtido da J.T. Baker Chemicals (Center Valley, EUA). A água ultrapura foi preparada usando o sistema de purificação Milli-Q da EMD Millipore (Darmstadt, Alemanha).

### **4.2.2 Instrumentação**

A análise de espectrometria de massa foi realizada em um espectrômetro de massa de armadilha de íons Thermo LCQ Fleet (San Jose, EUA). Um aparelho

artesanal de PS acoplado ao MS foi usado como fonte de ionização. O método otimizado de PS-MS foi aplicado usando metanol como solvente de pulverização (20  $\mu\text{L}$ ), tensão de eletrospray de 4,5 kV e temperatura do tubo de transferência de 350°C. A faixa de varredura de massa foi de  $m/z$  100 a 1800. O software Xcalibur (ThermoScientific) foi usado para processar todos os espectros de massa. A análise foi realizada no modo de íons positivos de varredura completa. O banco de dados de perfis metabólicos foi continuamente atualizado para obter um modelo robusto de composição química.

#### 4.2.3 Análise metabolômica por PS-MS

Os bulbos de alho frescos foram divididos em dentes, descascados e fatiados. 10 mg de alho fatiado foram misturados com 1 mL de metanol e agitados em vórtex por 1 minuto. Depois de centrifugar cada amostra por 2 minutos a 7.000 rpm, cada extrato sobrenadante de alho foi analisado por PS-MS. O extrato (2,0  $\mu\text{L}$ ) foi aplicado a um pedaço triangular de papel de cromatografia (equilátero com 1,5 cm de comprimento lateral) fabricado pela Whatman (Little Chalfont, Buckinghamshire, Reino Unido) e mantido por um clipe jacaré de cobre conectado à fonte de alimentação do MS. Para cada execução, 20,0  $\mu\text{L}$  de metanol foram aplicados ao papel triangular, e a fonte de alimentação foi ligada.

#### 4.2.4 Análise estatística

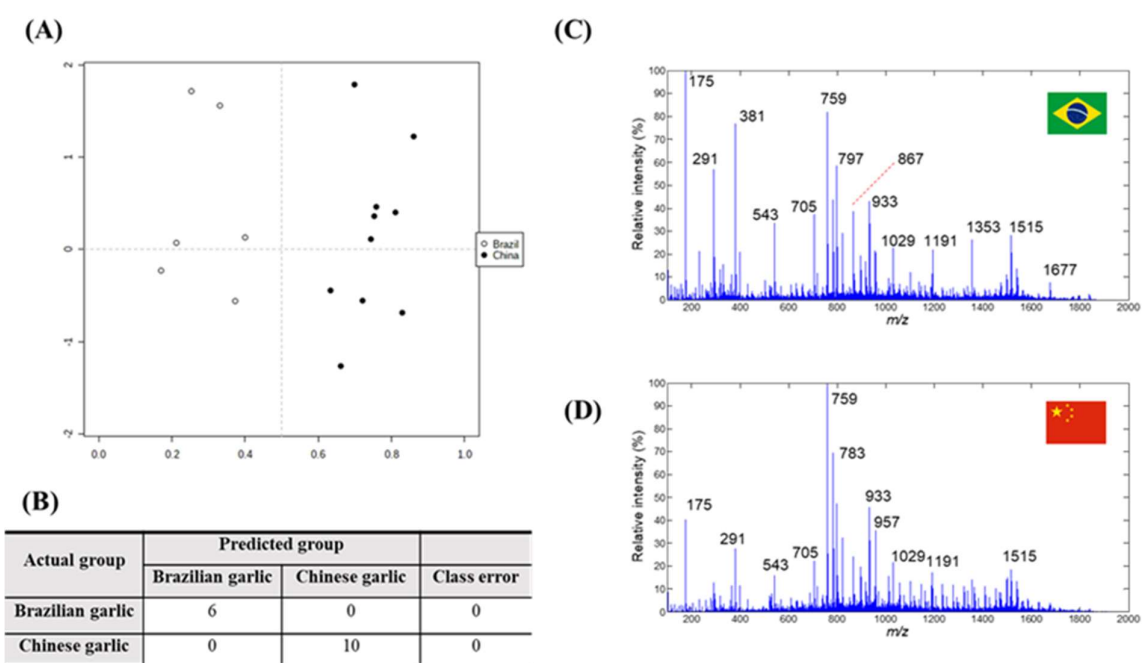
O MetaboAnalyst 4.0 (<https://www.metaboanalyst.ca>) foi usado para análise estatística. O método de pré-processamento selecionado foi a centralização da média. A significância foi definida usando um teste t de Student bicaudal e não pareado em grupos com variância igual com um valor de  $p \leq 0,05$  com uma correção de taxa de descoberta falsa de Bonferroni.

A análise da via metabólica foi realizada com o MetaboAnalyst 4.0 com base no banco de dados da via metabólica da Enciclopédia de Genes e Genomas de Kyoto (KEGG) de *Arabidopsis thaliana*.

### 4.3 Resultados e discussão

Um total de 1901 *features* foram detectadas para os metabolomas do alho brasileiro ( $n = 6$ ) e do alho chinês ( $n = 10$ ). Primeiro, foi realizada a classificação

*Random Forest* (Fig. 4.1A) para estimar o erro de classificação sem viés e o potencial poder preditivo da análise. Os resultados mostraram uma excelente previsão para as amostras com uma clara separação entre os tratamentos (alho brasileiro e chinês). Todas as amostras de ambos os grupos (100%) foram classificadas no grupo correto usando a análise de floresta aleatória, indicando um forte poder de diagnóstico sem falsos negativos (Fig. 4.1B). Houve diferenças notáveis entre as amostras de alho brasileiro e chinês. As impressões digitais PS-MS representativas das amostras de alho do Brasil e da China são mostradas na Fig. 4.1 C&D.



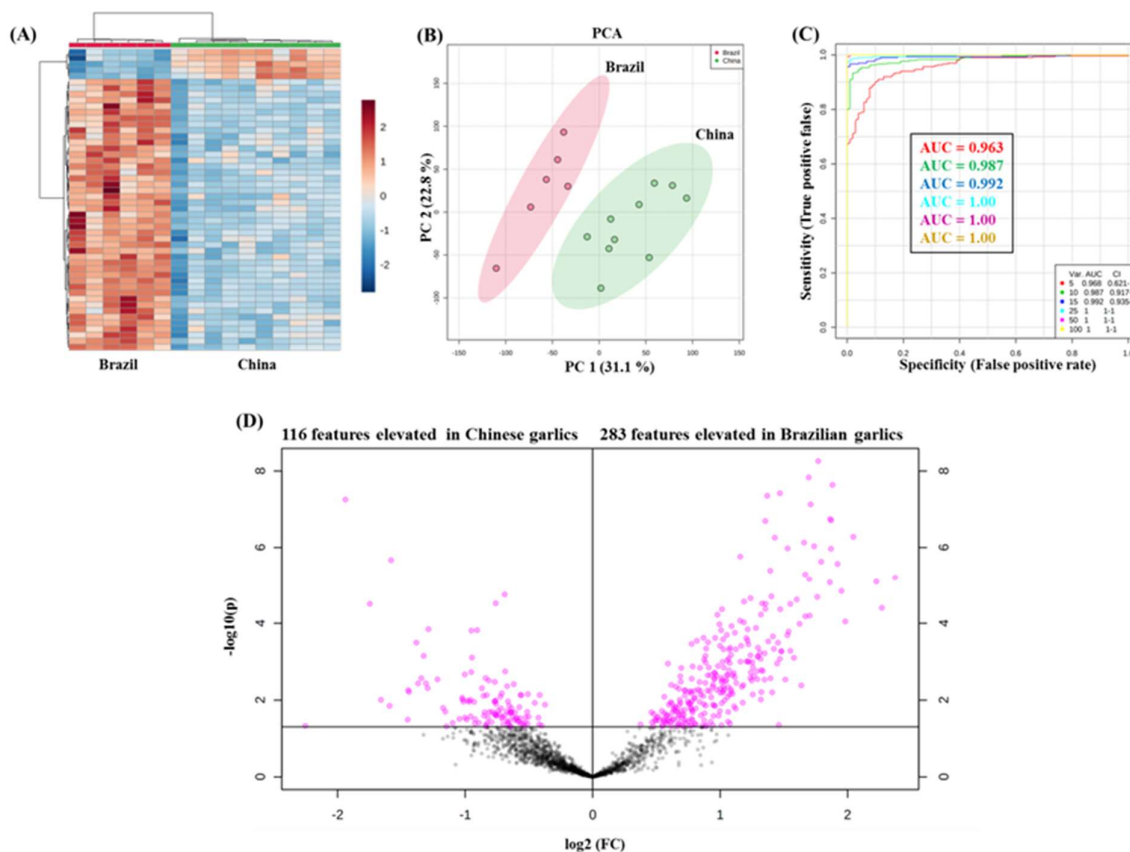
**Figura 4.1:** Gráfico mostrando a estimativa de amostras rotuladas com alho brasileiro ( $n = 6$ ) em comparação com amostras de alho chinês ( $n = 10$ ), conforme atribuído pela floresta aleatória (A). Todas (100%) as amostras foram previstas corretamente (B). As impressões digitais médias de PS-MS na faixa de  $m/z$  100 - 1800 mostram diferenças notáveis entre o alho do Brasil e da China (C&D).

Os dados de aquisição foram submetidos a agrupamento hierárquico por análise de mapa de calor. A análise do mapa de calor revelou níveis diferenciais do metaboloma global entre as amostras de alho brasileiro e chinês (Fig. 1A). A análise de componentes principais (PCA) foi realizada para avaliar a distância e a relação dos metabólitos entre o alho do Brasil e da China. A análise de PCA mostrou que os perfis metabólicos do alho brasileiro e chinês são visivelmente diferentes. (Fig. 1B). A separação das amostras foi explicada principalmente pelo PC1 (31,1%), com 53,9%

da variação explicada pelo uso de 2 PCs. É fundamental observar se essas características metabólicas significativas se traduzem em previsão de biomarcadores.

A previsão de biomarcadores usando a análise de desempenho da curva de características operacionais do receptor (ROC) foi realizada neste artigo. Uma combinação de cinco recursos mostrou uma área sob a curva (AUC) = 0,97, dez recursos mostraram AUC = 0,99, quinze recursos mostraram AUC = 0,99, vinte e cinco recursos mostraram AUC = 1,00, cinquenta recursos mostraram AUC = 1,00 e cem recursos mostraram AUC = 1,00 níveis de precisão de previsão, respectivamente (Fig. 1C). Esses resultados sugerem fortemente que uma assinatura de características metabólicas, em vez de um único metabólito, poderia ser o painel de biomarcadores em potencial para a análise de discriminação da origem do alho.

O gráfico de vulcão (Fig. 4.2D) foi usado para detectar a alta diversidade metabolômica entre os alhos brasileiro e chinês, representando a distribuição das características detectadas pela magnitude e significância de suas intensidades de sinal diferencial (Fig. 4.2D). Entre todas as características detectadas, 399 (21%) mostraram uma diferença estatisticamente significativa em suas intensidades entre os grupos usando um valor de  $p \leq 0,05$  com base em um teste t de Student (pressupondo variância igual). Considerando as 399 características que atenderam a esses critérios, 116 (29%) foram mais abundantes no alho chinês, enquanto os 283 compostos restantes foram mais abundantes no produto brasileiro.



**Figura 4.2:** Análise metabolômica global baseada em PS-MS em amostras de alho. A) Diagrama de mapa de calor da análise de agrupamento hierárquico que consiste em níveis de metabólitos em amostras de alho do Brasil ( $n = 6$ ) em comparação com a China ( $n = 10$ ). A medição da distância euclidiana, o algoritmo de agrupamento ward e o dimensionamento automático geraram o mapa de calor. (B) A análise de componentes principais (PCA) foi implementada para investigar a separação dos perfis metabólicos. (C) Curvas ROC para o modelo de previsão. A análise de regressão logística foi implementada para calcular modelos de metabólitos combinados. (D) Gráfico de vulcão mostrando características significativas com base no limiar de valor  $p < 0,05$  e limiar de alteração de dobra  $> 1,0$  nas amostras de alho brasileiro em comparação com o alho chinês.

Dezessete metabólitos significativos foram identificados por  $m/z$  de acordo com as referências (Tabela 4.1).

**Tabela 4.1:** Metabólitos significativos (17) identificados pela aplicação de um valor de  $p$  de significância  $\leq 0,05$ .

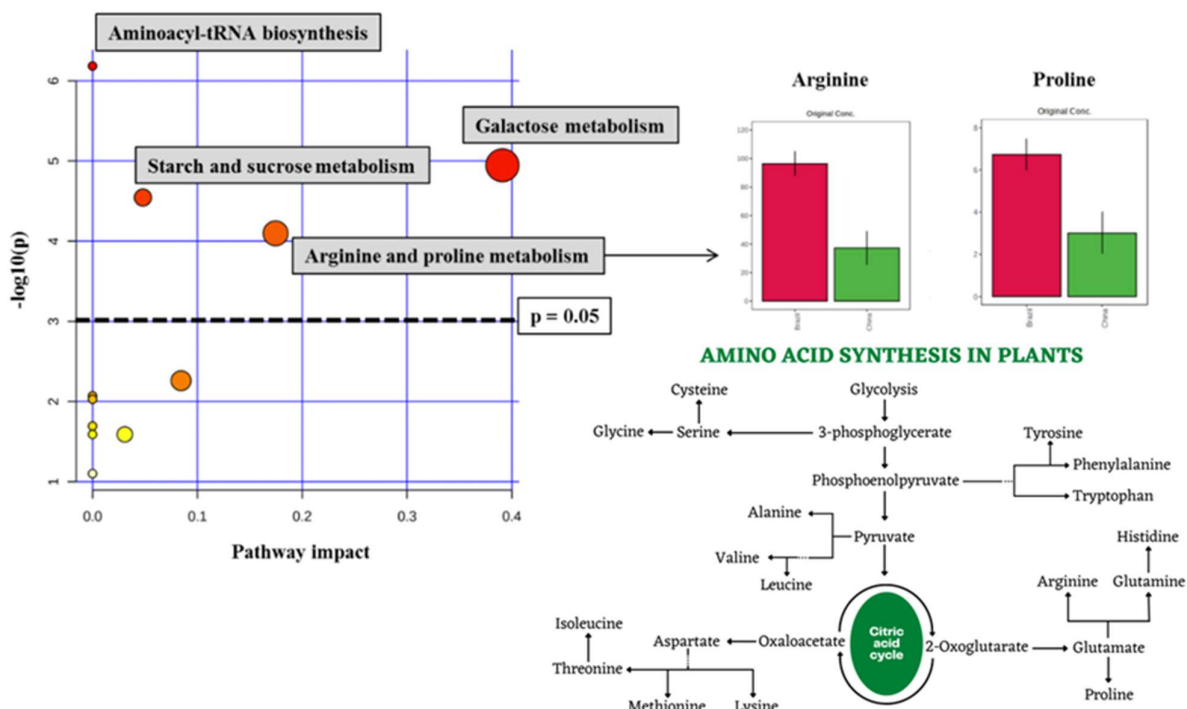
$m/z$	Direção ( $\uparrow$ ou $\downarrow$ ) e magnitude* da FC	Aduto	Nome	Referência
104	$\uparrow 2.0749$	$[M]^+$	Colina	Hrbek <i>et al.</i> , 2018
116	$\uparrow 2.231$	$[M+H]^+$	Prolina	Hrbek <i>et al.</i> , 2018
118	$\uparrow 2.628$	$[M+H]^+$	Valina	Zhang <i>et al.</i> , 2015
163	$\uparrow 1.8131$	$[M+H]^+$	Allicina	Hrbek <i>et al.</i> , 2018
175	$\uparrow 2.5846$	$[M+H]^+$	Arginina	Hrbek <i>et al.</i> , 2018
178	$\uparrow 1.9994$	$[M+H]^+$	Aliina	Zhang <i>et al.</i> , 2013
201	$\uparrow 1.5621$	$[M+K]^+$	Allicina	Zhang <i>et al.</i> , 2013
203	$\uparrow 1.5351$	$[M+Na]^+$	Glicose	-
216	$\uparrow 2.3412$	$[M+K]^+$	Aliina	Zhang <i>et al.</i> , 2013
291	$\uparrow 2.3741$	$[M+H]^+$	L- $\gamma$ -glutamil-S-allyl-L-cisteína	Hrbek <i>et al.</i> , 2018
296	$\uparrow 1.3912$	$[M+H]^+$	L-asparagina + L-tirosina	Misiorek <i>et al.</i> , 2017
329	$\uparrow 2.9301$	$[M+K]^+$	L- $\gamma$ -glutamil-S-allyl-L-cisteína	-
325	$\uparrow 1.4807$	$[2M+H]^+$	Allicina	Zhang <i>et al.</i> , 2015
347	$\uparrow 2.4514$	$[2M+H]^+$	Allicina	-
381	$\uparrow 1.7523$	$[M+K]^+$	Sacarose	Zhang <i>et al.</i> , 2013
543	$\uparrow 1.5122$	$[M+K]^+$	Maltotriose	Zhang <i>et al.</i> , 2013
689	$\downarrow 0.49532$	$[M+Na]^+$	Maltotetraose	-

Entre os metabólitos mais significativos identificados, três são compostos organossulfurados, Allicina ( $[M+H]^+$ , p-valor = 0,046733, intensidade 1,81 vezes maior no alho brasileiro), Aliina ( $[M+H]^+$ , p-valor = 0,000388, intensidade 1,99 vezes maior no alho brasileiro) e L- $\gamma$ -glutamil-S-allyl-L-cisteína ( $[M+H]^+$ , p-valor = 0,0031191, intensidade 2,37 vezes maior no alho brasileiro). Os compostos organossulfurados são a principal classe responsável pelo sabor característico dos produtos de alho (LIU et al., 2019). Além disso, esses compostos também proporcionam propriedades medicinais ao alho contra uma ampla gama de doenças, como câncer, infecções microbianas, diabetes e distúrbios imunológicos e cardiovasculares (ROUF et al., 2020; WALAG et al., 2020; ZHU et al., 2022). A abundância de compostos organossulfurados no alho está altamente relacionada aos mecanismos de defesa da planta contra pragas e patógenos, pois esses compostos são liberados ao danificar os tecidos celulares e vegetais (CASTRO et al., 2023).

Os aminoácidos são essenciais na regulação do crescimento do alho e contribuem para sua qualidade nutricional (LIU et al., 2020a; PEREZ et al., 2021). Entre esses aminoácidos, a arginina ( $m/z$  175,  $[M+H]^+$ , p-valor =  $4,46 \times 10^{-08}$ , intensidade 2,58 vezes maior no alho brasileiro) apresentou a diferença mais significativa entre os grupos de alho. Notavelmente, a arginina é um biomarcador geográfico conhecido para o alho e foi detectada em outros estudos (HRBEK et al., 2018c; LIU et al., 2019). Dois outros aminoácidos também apresentaram diferenças significativas entre os grupos de alho. A prolina ( $m/z$  116,  $[M+H]^+$ , p-valor =  $1,74 \times 10^{-06}$ , 2,23 vezes mais abundante no alho brasileiro) é reconhecida como um osmólito e tem capacidade comprovada de neutralizar radicais livres (Hoque et al., 2007; Signorelli et al., 2015). A valina ( $m/z$  118,  $[M+H]^+$ , valor p =  $4,10 \times 10^{-06}$ , intensidade 2,63 vezes maior no alho brasileiro) serve como um dos precursores do sulfóxido de S-alil-1-cisteína, um metabólito responsável pelo odor característico dos dentes de alho (YAMAGUCHI; KUMAGAI, 2019).

Todos os biomarcadores mencionados na Tabela 4.1 foram então enviados ao MetaboAnalyst para a análise da via bioquímica. Os resultados são mostrados na Fig. 4.3. As diferenças metabólicas no alho entre os bulbos do Brasil e da China foram significativamente enriquecidas em quatro vias metabólicas, a saber: biossíntese de aminoacil-tRNA, metabolismo de amido e sacarose, metabolismo de galactose e

metabolismo de arginina e prolina. A Tabela S2 mostra o status de correspondência das vias bioquímicas reguladas positivamente e o valor de p correspondente.



**Figura 4.3:** Análise do impacto da via mostrando as redes metabólicas reguladas positivamente em amostras de alho do Brasil e da China. As cores e o tamanho dos círculos indicam a magnitude das vias metabólicas afetadas (amarelo = baixa relevância; vermelho = alta relevância; círculos pequenos = baixo impacto da via, círculos grandes = alto impacto da via) de acordo com seus valores de relevância estatística e impacto da via (PI) obtidos da Análise de Enriquecimento Quantitativo (QEA) e da Análise de Topologia de Rede (NTA), respectivamente. A linha pontilhada representa o ponto de corte de significância no valor de  $p < 0,05$ .

#### 4.4 Conclusão

Os dados da espectrometria de massa com ionização por *paper spray* (PS-MS) foram tratados com ferramentas metabólicas típicas para a discriminação rápida e confiável de amostras de alho do Brasil e da China. A análise de PS-MS revelou impressões digitais químicas distintas entre o alho brasileiro e o chinês. Em comparação com o alho chinês, o alho brasileiro apresenta níveis mais altos de aminoácidos, como arginina, prolina e valina, e compostos organossulfurados, como alicina, aliina e L- $\gamma$ -glutamil-S-alil-L-cisteína. Além de demonstrar um desempenho exemplar no discernimento da origem geográfica dos alhos brasileiros e chineses, a PSMS demonstrou ser uma ferramenta poderosa para a descoberta de biomarcadores. Os resultados indicam que a combinação de perfil químico baseado em PS-MS e abordagens metabolômicas é promissora como uma estratégia eficaz para a autenticação da origem geográfica do alho.

## 5. CONCLUSÕES

Em conclusão, a análise integrada de dados metabolômicos e espectrométricos forneceu uma visão abrangente das diferenças bioquímicas entre variedades de alho e suas origens geográficas. A técnica de GC-MS identificou perfis metabólicos distintos entre alhos roxos escuros e claros, destacando compostos organossulfurados e ácidos graxos como marcadores diferenciadores. Além disso, o estudo comparativo entre alhos brasileiros e chineses, utilizando a mesma técnica, revelou uma maior concentração de compostos organossulfurados e ácido ascórbico no alho brasileiro, enquanto o alho chinês se destacou pela abundância de açúcares e aminoácidos essenciais.

A inclusão dos dados de PS-MS complementou essas descobertas, demonstrando a capacidade dessa técnica em discriminar rapidamente e com confiabilidade as amostras de alho do Brasil e da China. A PS-MS revelou impressões digitais químicas distintas, com o alho brasileiro apresentando níveis mais altos de aminoácidos específicos e compostos organossulfurados. Esses resultados não apenas confirmam as diferenças metabólicas previamente observadas, mas também destacam o potencial da PS-MS como uma ferramenta poderosa na descoberta de biomarcadores e na autenticação da origem geográfica do alho.

Portanto, a combinação de perfis químicos baseados em PS-MS com abordagens metabolômicas tradicionais é uma estratégia promissora para o agronegócio e a pesquisa científica, oferecendo um caminho eficaz para a autenticação e a compreensão das propriedades nutricionais e medicinais do alho. Essas informações são fundamentais para o desenvolvimento de práticas agrícolas informadas e para a escolha consciente de alimentos por parte dos consumidores.

## REFERÊNCIAS

- ALSEEKH, S. et al. **Mass spectrometry-based metabolomics: a guide for annotation, quantification and best reporting practices**. *Nature Methods* Nature Research, 1 jul. 2021.
- ANKRI, S.; MIRELMAN, D. **Antimicrobial properties of allicin from garlic**. *Microbes and Infection*, 1999a.
- ANKRI, S.; MIRELMAN, D. Antimicrobial properties of allicin from garlic. **Microbes and Infection**, v. 1, n. 2, p. 125–129, 1999b.
- BANERJEE, S. K.; MAULIK, S. K. Effect of garlic on cardiovascular disorders: A review. *Nutrition Journal*, v. 1, p. 1–14, 2002.
- BAR, M.; BINDUGA, U. E.; SZYCHOWSKI, K. A. **Methods of Isolation of Active Substances from Garlic (*Allium sativum* L.) and Its Impact on the Composition and Biological Properties of Garlic Extracts**. *Antioxidants*, 2022.
- BARKER, M.; RAYENS, W. Partial least squares for discrimination. *Journal of Chemometrics*, v. 17, n. 3, p. 166–173, 2003.
- BEALE, D. J. et al. **Review of recent developments in GC–MS approaches to metabolomics-based research**. *Metabolomics*. Springer New York LLC, 1 nov. 2018.
- BEDIA, C. **Metabolomics in environmental toxicology: Applications and challenges**. *Trends in Environmental Analytical Chemistry*. Elsevier B.V., 1 jun. 2022.
- BYRNE, A. T.; HEIMAN, A.; JUST, D. R. **Marketing Science Institute Working Paper Series 2021 New Insights into Country of Origin Labeling (COOL): The Effects of Nationalism, Patriotism, and Xenophobia “New Insights into Country of Origin Labeling (COOL): The Effects of Nationalism, Patriotism, and Xenophobia” New Insights into Country of Origin Labeling (COOL): The Effects of Nationalism, Patriotism, and Xenophobia**. [s.l: s.n.].
- CASTRO, V. et al. Sulfur-containing compounds from plants. Em: **Natural Secondary Metabolites: From Nature, Through Science, to Industry**. [s.l: s.n.].
- CHAUDHARI, G. V. et al. **Garlic: retrospect, status quo and dimensions**. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 2022.
- CHEN, G. et al. The acyl-activating enzyme PhAAE13 is an alternative enzymatic source of precursors for anthocyanin biosynthesis in petunia flowers. *Journal of Experimental Botany*, v. 68, n. 3, p. 457–467, 2017.
- CHEN, H. et al. Malonyl-CoA synthetase, encoded by ACYL ACTIVATING ENZYME13, is essential for growth and development of Arabidopsis. *Plant Cell*, v. 23, n. 6, p. 2247–2262, 2011.

CHENG, M. L. et al. Metabolic disturbances identified in plasma are associated with outcomes in patients with heart failure: Diagnostic and prognostic value of metabolomics. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 65, n. 15, 2015.

CHONG, J. et al. MetaboAnalyst 4.0: Towards more transparent and integrative metabolomics analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. W1, p. W486–W494, 2018.

CLOAREC, O. et al. Statistical total correlation spectroscopy: An exploratory approach for latent biomarker identification from metabolic <sup>1</sup>H NMR data sets. **Analytical Chemistry**, v. 77, n. 5, p. 1282–1289, 1 mar. 2005.

DA SILVA, L. C. et al. **Paper spray ionization and portable mass spectrometers: A review. Analytical Methods**, 2019.

DAS, J. et al. Isolation and Characterization of Antidermatophytic Bioactive Molecules from Piper longum L. Leaves. **Indian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 4, p. 624–629, 2012.

DASGUPTA, A.; KLEIN, K. **Antioxidants in food, vitamins and supplements: prevention and treatment of disease.** [s.l.] Academic Press, 2014.

DELORGE, I. et al. Fine tuning of trehalose biosynthesis and hydrolysis as novel tools for the generation of abiotic stress tolerant plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, n. APR, p. 1–10, 2014.

DESTANOĞLU, O. Discrimination and authentication of geographical origin of Turkish Taşköprü garlic by investigating volatile organosulfur compound profiles and multivariate analyses. **Turkish Journal of Chemistry**, v. 46, n. 4, 2022.

DETTMER, K.; ARONOV, P. A.; HAMMOCK, B. D. **Mass spectrometry-based metabolomics. Mass Spectrometry Reviews**, jan. 2007.

DUFOO-HURTADO, M. D. et al. Low-Temperature Conditioning of “Seed” Cloves Enhances the Expression of Phenolic Metabolism Related Genes and Anthocyanin Content in ‘Coreano’ Garlic (*Allium sativum*) during Plant Development. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 44, p. 10439–10446, 6 nov. 2013.

DUNN, W. B.; BAILEY, N. J. C.; JOHNSON, H. E. **Measuring the metabolome: Current analytical technologies. Analyst**Royal Society of Chemistry, , 2005.

DUNN, W. B.; ELLIS, D. I. Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, n. 4, p. 285–294, 2005.

EHMKE, M. D.; LUSK, J. L.; TYNER, W. Measuring the relative importance of preferences for country of origin in China, France, Niger, and the United States. **Agricultural Economics**, v. 38, n. 3, 2008.

ERIKSSON, L.; TRYGG, J.; WOLD, S. **CV-ANOVA for significance testing of PLS and OPLS® models.** Journal of Chemometrics. **Anais...**nov. 2008.

ESPY, R. D. et al. Spray mechanism in paper spray ionization. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 325–327, p. 167–171, 1 jul. 2012.

FAHY, E. et al. A comprehensive classification system for lipids. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 107, n. 5, p. 337–364, maio 2005.

FAO. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#home>>. Acesso em: 14 abr. 2020.

FIEHN, O. Metabolomics- link between genotypes to phenotypes. **Plant Molecular Biology**, v. 48, 2002.

FORDE, B. G.; LEA, P. J. Glutamate in plants: Metabolism, regulation, and signalling. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, n. 9, p. 2339–2358, 2007.

GHATAK, A.; CHATURVEDI, P.; WECKWERTH, W. Metabolomics in plant stress physiology. Em: **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**. [s.l.] Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, 2018. v. 164p. 187–236.

GIKA, H. G.; THEODORIDIS, G. A.; WILSON, I. D. Hydrophilic interaction and reversed-phase ultra-performance liquid chromatography TOF-MS for metabonomic analysis of Zucker rat urine. **Journal of Separation Science**, v. 31, n. 9, p. 1598–1608, maio 2008.

GISKEØDEGÅRD, G. F. et al. Metabolic markers in blood can separate prostate cancer from benign prostatic hyperplasia. **British Journal of Cancer**, v. 113, n. 12, 2015.

GOODACRE, R. et al. **Metabolomics by numbers: Acquiring and understanding global metabolite data**. **Trends in Biotechnology**, maio 2004.

GOWDA, G. A. N. et al. **Metabolomics-based methods for early disease diagnostics**. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, 2008.

HAHN, L. et al. Garlic (*Allium sativum*) feature-specific nutrient dosage based on using machine learning models. **PLoS ONE**, v. 17, n. 5 May, 2022.

HALL, R. D.; DE MAAGD, R. A. **Plant metabolomics is not ripe for environmental risk assessment**. **Trends in Biotechnology** Elsevier Ltd, , 2014.

HILE, A. G. et al. Aversion of European Starlings (*Sturnus vulgaris*) to Garlic Oil Treated Granules: Garlic Oil as an Avian Repellent. Garlic Oil Analysis by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 8, p. 2192–2196, abr. 2004.

HRBEK, V. et al. Authenticity assessment of garlic using a metabolomic approach based on high resolution mass spectrometry. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 67, n. December 2017, p. 19–28, 2018.

JEONG, Y. Y. et al. Comparison of anti-oxidant and anti-inflammatory effects between fresh and aged black garlic extracts. **Molecules**, v. 21, n. 4, p. 1–15, 2016.

- JOHNSON, C. H.; IVANISEVIC, J.; SIUZDAK, G. **Metabolomics: Beyond biomarkers and towards mechanisms**. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* Nature Publishing Group, , 1 jul. 2016.
- KIND, T. et al. FiehnLib: Mass spectral and retention index libraries for metabolomics based on quadrupole and time-of-flight gas chromatography/mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, v. 81, n. 24, p. 10038–10048, 2009.
- KOEK, M. M. et al. Microbial metabolomics with gas chromatography/mass spectrometry (Analytical Chemistry (2006) 78 (1272-1821)). *Analytical Chemistry*, v. 78, n. 11, p. 3839, 1 jun. 2006.
- KUMAR, U.; PRASAD, B. Evaluation of garlic (*Allium sativum* L.) genotypes for plant architecture and yield. *Journal Crop and Weed*, v. 11, n. 1, p. 128–131, 2015.
- LAI, Z. et al. Identifying metabolites by integrating metabolome databases with mass spectrometry cheminformatics. *Nature Methods*, v. 15, n. 1, p. 53–56, 2018.
- LAURSEN, K. H. et al. Advances in isotopic analysis for food authenticity testing. Em: **Advances in Food Authenticity Testing**. [s.l: s.n.].
- LEE, E. M. et al. Highly geographical specificity of metabolomic traits among Korean domestic soybeans (*Glycine max*). *Food Research International*, v. 120, n. September 2018, p. 12–18, 2019a.
- LEE, J. H. J. et al. Metabolomic studies of volatiles from tomatoes grown in net-house and open-field conditions. *Food Chemistry*, v. 275, n. September 2018, p. 282–291, 2019b.
- LI, S. et al. **Recent advances in the application of metabolomics for food safety control and food quality analyses**. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* Bellwether Publishing, Ltd., , 2021.
- LI, W. W. et al. Non-invasive urinary metabolomic profiles discriminate biliary atresia from infantile hepatitis syndrome. *Metabolomics*, v. 14, n. 7, p. 0, 2018.
- LI, Z.; LE, W.; CUI, Z. A novel therapeutic anticancer property of raw garlic extract via injection but not ingestion. *Cell Death Discovery*, v. 4, n. 1, 2018.
- LIN, Q. et al. Rapid determination of aldehydes in food by high-throughput reactive paper spray ionization mass spectrometry. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 114, 2022.
- LIU, J. et al. Development, characterization, and application of paper spray ionization. *Analytical Chemistry*, v. 82, n. 6, p. 2463–2471, 15 mar. 2010.
- LIU, J. et al. A new methodology for sensory quality assessment of garlic based on metabolomics and an artificial neural network. *RSC Advances*, v. 9, n. 31, p. 17754–17765, 2019.
- LIU, P. et al. Profiling of organosulfur compounds and amino acids in garlic from different regions of China. *Food Chemistry*, v. 305, 1 fev. 2020a.

LIU, T. SEN; LIN, J. N.; PENG, T. R. Discrimination of Geographical Origin of Asian Garlic Using Isotopic and Chemical Datasets under Stepwise Principal Component Analysis. **Journal of Forensic Sciences**, v. 63, n. 5, 2018.

LIU, Y. et al. Comparative non-targeted metabolomic analysis reveals insights into the mechanism of rice yellowing. **Food Chemistry**, v. 308, 5 mar. 2020b.

MAHMUD, I. et al. NMR-based metabolomics study of the biochemical relationship between sugarcane callus tissues and their respective nutrient culture media. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 406, n. 24, p. 5997–6005, 2014.

MAHMUD, I. et al. NMR-based metabolomics profile comparisons to distinguish between embryogenic and non-embryogenic callus tissue of sugarcane at the biochemical level. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 51, n. 3, p. 340–349, 19 jun. 2015a.

MAHMUD, I. et al. NMR Spectroscopy Identifies Metabolites Translocated from Powdery Mildew Resistant Rootstocks to Susceptible Watermelon Scions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 36, p. 8083–8091, 24 ago. 2015b.

MAHMUD, I. et al. Comparison of global metabolite extraction strategies for soybeans using UHPLC-HRMS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 409, n. 26, p. 6173–6180, 1 out. 2017.

MAHMUD, I. et al. Rapid Diagnosis of Prostate Cancer Disease Progression Using Paper Spray Ionization Mass Spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 93, n. 22, p. 7774–7780, 8 jun. 2021.

MARTINS, N.; PETROPOULOS, S.; FERREIRA, I. C. F. R. Chemical composition and bioactive compounds of garlic (*Allium sativum* L.) as affected by pre- and post-harvest conditions: A review. **Food Chemistry**, v. 211, p. 41–50, 2016.

MASSEY, K. A.; BLAKESLEE, C. H.; PITKOW, H. S. A review of physiological and metabolic effects of essential amino acids. **Amino Acids**, v. 14, n. 4, p. 271–300, dez. 1998.

MI, S. et al. Geographical discrimination and authentication of Chinese garlic based on multi-element, volatile and metabolomics profiling combined with chemometrics. **Food Control**, v. 130, 1 dez. 2021.

MOURA, A. C. M. et al. Rapid monitoring of pesticides in tomatoes (*Solanum lycopersicum* L.) during pre-harvest intervals by paper spray ionization mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 310, 2020.

NAKAMOTO, M. et al. Antimicrobial properties of hydrophobic compounds in garlic: Allicin, vinyl dithiin, ajoene and diallyl polysulfides (Review). **Experimental and Therapeutic Medicine**, 2019.

NICHOLSON, J. K.; LINDON, J. C.; HOLMES, E. “**Metabonomics**”: Understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via

**multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data.** *Xenobiotica*, 1999.

OLAJIDE, O. E. et al. Species-level discrimination of microorganisms by high-resolution paper spray – Ion mobility – Mass spectrometry. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 478, 2022.

OLAJIDE, O. E. et al. Strain-Level Discrimination of Bacteria by Liquid Chromatography and Paper Spray Ion Mobility Mass Spectrometry. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 34, n. 6, 2023.

PACHOLCZYK-SIENICKA, B.; CIEPIELOWSKI, G.; ALBRECHT, Ł. **The application of nmr spectroscopy and chemometrics in authentication of spices.** *Molecules*, 2021.

PADIYA, R.; K BANERJEE, S. Garlic as an anti-diabetic agent: recent progress and patent reviews. **Recent patents on food, nutrition & agriculture**, v. 5, n. 2, p. 105–127, 2013.

PEREIRA, C. et al. **Use of UFLC-PDA for the Analysis of Organic Acids in Thirty-Five Species of Food and Medicinal Plants.** *Food Analytical Methods*, 2013.

PEREIRA, H. V. et al. A fast and effective approach for the discrimination of garlic origin using wooden-tip electrospray ionization mass spectrometry and multivariate classification. **Talanta**, v. 230, 2021.

PEREZ, M. B. et al. Distribution, accumulation and speciation of selenium at the different growth stages of four garlic clones. **Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment**, v. 38, n. 9, 2021.

PETROVSKA, B.; CEKOVSKA, S. **Extracts from the history and medical properties of garlic.** *Pharmacognosy Reviews*, v.4, n.7, p.106-110, 2010.

PINTO, F. G. et al. Data-Driven Soft Independent Modeling of Class Analogy in Paper Spray Ionization Mass Spectrometry-Based Metabolomics for Rapid Detection of Prostate Cancer. **Analytical Chemistry**, v. 94, n. 4, 2022.

PINTO, J. et al. Characterization of chemical compounds susceptible to be extracted from cork by the wine using GC-MS and <sup>1</sup>H NMR metabolomic approaches. **Food Chemistry**, v. 271, n. July 2018, p. 639–649, 2019.

PSYCHOGIOS, N. et al. The human serum metabolome. **PLoS ONE**, v. 6, n. 2, 2011.

PUMBUA, R. et al. Paper spray mass spectrometry as an effective tool for differentiating coffees based on their geographical origins. **Food Chemistry: X**, v. 18, 30 jun. 2023.

RAHMAN, K. **Garlic and aging: new insights into an old remedy** *Ageing Research Reviews*. [s.l: s.n.].

- RAINSFORD, K. D. Influenza (“bird flu”), inflammation and anti-inflammatory/analgesic drugs. **Inflammopharmacology**, v. 14, n. 1–2, p. 2–9, 2006.
- RAKHMANOVA, T. I.; POPOVA, T. N. Regulation of 2-oxoglutarate metabolism in rat liver by NADP-isocitrate dehydrogenase and aspartate aminotransferase. **Biochemistry (Moscow)**, v. 71, n. 2, p. 211–217, 2006.
- RANDLE, W. M.; LANCASTER, J. E. 14 sulphur compounds in alliums in relation to flavour quality. **Allium crop science: Recent advances**, p. 329–356, 2002.
- ROUF, R. et al. **Antiviral potential of garlic (Allium sativum) and its organosulfur compounds: A systematic update of pre-clinical and clinical data. Trends in Food Science and Technology**, 2020.
- SALES, C. et al. Olive oil quality classification and measurement of its organoleptic attributes by untargeted GC–MS and multivariate statistical-based approach. **Food Chemistry**, v. 271, n. July 2018, p. 488–496, 2019.
- SANTHOSHA, S. G.; JAMUNA, P.; PRABHAVATHI, S. N. **Bioactive components of garlic and their physiological role in health maintenance: A review. Food Bioscience** Elsevier Ltd, , 2013.
- SANTOS, A. M. S. et al. Paper spray ionization mass spectrometry applied for quantification of pesticides and discrimination from tomato varieties (*Solanum lycopersicum*). **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 109, 2022.
- SAVE, S. A.; LOKHANDE, R. S.; CHOWDHARY, A. S. Determination of 1, 2-Benzenedicarboxylic acid, bis (2-ethylhexyl) ester from the twigs of *Thevetia peruviana* as a Colwell Biomarker. **Journal of Innovations in Pharmaceuticals and Biological Sciences**, v. 2, n. 3, p. 349–362, 2015.
- SCANO, P. et al. A gas chromatography-mass spectrometry-based metabolomic approach for the characterization of goat milk compared with cow milk. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 10, p. 6057–6066, 2014.
- SCHREIBER, L. Transport barriers made of cutin, suberin and associated waxes. **Trends in Plant Science**, v. 15, n. 10, p. 546–553, 2010.
- SCHUEUERMANN, C. et al. A GC–MS untargeted metabolomics approach for the classification of chemical differences in grape juices based on fungal pathogen. **Food Chemistry**, v. 270, p. 375–384, 1 jan. 2019.
- SEKI, T. et al. Anticancer property of allyl sulfides derived from garlic (*Allium sativum* L.). **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 20, n. SUPPL.1, p. 309–312, 2012.
- SELAMAT, J.; ROZANI, N. A. A.; MURUGESU, S. **Application of the metabolomics approach in food authentication. Molecules** MDPI, , 1 dez. 2021.
- SHEN, L. et al. High throughput paper spray mass spectrometry analysis. **Clinica Chimica Acta**, v. 420, 2013.

SINGH, K. V. et al. Molecular identification and phylogenetic relationship of seahorse, *Hippocampus kuda* (Bleeker 1852) using mitochondrial 16S rRNA and COI gene sequences from east and west coasts of India. 2011.

SOHN, D. W. et al. Anti-inflammatory and antimicrobial effects of garlic and synergistic effect between garlic and ciprofloxacin in a chronic bacterial prostatitis rat model. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 34, n. 3, p. 215–219, 2009.

STEIN, S. E. An integrated method for spectrum extraction and compound identification from gas chromatography/mass spectrometry data. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 10, n. 8, p. 770–781, 1999.

SUN, J. et al. **A review of environmental metabolism disrupting chemicals and effect biomarkers associating disease risks: Where exposomics meets metabolomics.** **Environment International** Elsevier Ltd, , 1 jan. 2022.

TANG, Y.; ZHU, Y.; SANG, S. A Novel LC-MS Based Targeted Metabolomic Approach to Study the Biomarkers of Food Intake. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 64, n. 22, 1 nov. 2020.

TRYGG, J.; WOLD, S. Orthogonal projections to latent structures (O-PLS). **Journal of Chemometrics**, v. 16, n. 3, p. 119–128, 2002.

TSUGAWA, H. et al. MS-DIAL: Data-independent MS/MS deconvolution for comprehensive metabolome analysis. **Nature Methods**, v. 12, n. 6, p. 523–526, 2015.

USSHER, J. R. et al. **The Emerging Role of Metabolomics in the Diagnosis and Prognosis of Cardiovascular Disease.** **Journal of the American College of Cardiology** Elsevier USA, , 27 dez. 2016.

VARSHNEY, R.; BUDOFF, M. J. Garlic and heart disease. **Journal of Nutrition**, v. 146, n. 2, p. 416S-421S, 2016.

VELÍŠEK, J.; KUBEC, R.; DAVÍDEK, J. Chemical composition and classification of culinary and pharmaceutical garlic-based products. **European Food Research and Technology**, v. 204, n. 2, 1997.

VIANT, M. R. et al. International NMR-based environmental metabolomics intercomparison exercise. **Environmental Science and Technology**, v. 43, n. 1, p. 219–225, 1 jan. 2009.

VIEIRA-POTTER, V. J. et al. Soy-Induced Fecal Metabolome Changes in Ovariectomized and Intact Female Rats: Relationship with Cardiometabolic Health. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–12, 2018.

VINAIXA, M. et al. **Mass spectral databases for LC/MS- and GC/MS-based metabolomics: State of the field and future prospects.** **TrAC - Trends in Analytical Chemistry** Elsevier B.V., , 1 abr. 2016.

WALAG, A. M. P. et al. Health Benefits of Organosulfur Compounds. Em: **Functional Foods and Nutraceuticals**. [s.l.: s.n.].

WANG, G. et al. Fortifying horticultural crops with essential amino acids: A review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 6, 2017.

WATANABE, M. et al. The effect of single and multiple serat mutants on serine and sulfur metabolism. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, n. May, p. 1–12, 2018.

WHEELOCK, C. E. et al. **Application of 'omics technologies to biomarker discovery in inflammatory lung diseases**. **European Respiratory Journal**, 1 set. 2013.

WISHART, D. S. **Metabolomics: applications to food science and nutrition research**. **Trends in Food Science and Technology**, set. 2008.

WISHART, D. S. et al. HMDB 3.0-The Human Metabolome Database in 2013. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. D1, 1 jan. 2013.

WU, W. et al. Emerging applications of metabolomics in food science and future trends. **Food Chemistry: X**, v. 16, 30 dez. 2022.

YAMAGUCHI, Y.; KUMAGAI, H. Characteristics, biosynthesis, decomposition, metabolism and functions of the garlic odour precursor, S-allyl-L-cysteine sulfoxide (Review). **Experimental and Therapeutic Medicine**, 27 dez. 2019.

YOON, S. J. et al. Systemic and Local Metabolic Alterations in Sleep-Deprivation-Induced Stress: A Multiplatform Mass-Spectrometry-Based Lipidomics and Metabolomics Approach. **Journal of Proteome Research**, v. 18, n. 9, p. 3295–3304, 2019.

ZHAI, B. et al. Hypoglycemic and hypolipidemic effect of S-allyl-cysteine sulfoxide (alliin) in DIO mice. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–7, 2018.

ZHU, L. et al. Garlic-Derived Organosulfur Compounds Regulate Metabolic and Immune Pathways in Macrophages and Attenuate Intestinal Inflammation in Mice. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 66, n. 7, 2022.

## APÊNDICE A – Material Suplementar

### Metabolômica global revela alterações metabólicas ligadas ao roxo do bulbo no alho (*Allium sativum* L.)

**Tabela A1:** Metabólitos conhecidos significativamente diferentes (p-valor < 0,05) entre os alhos roxos claros e escuros

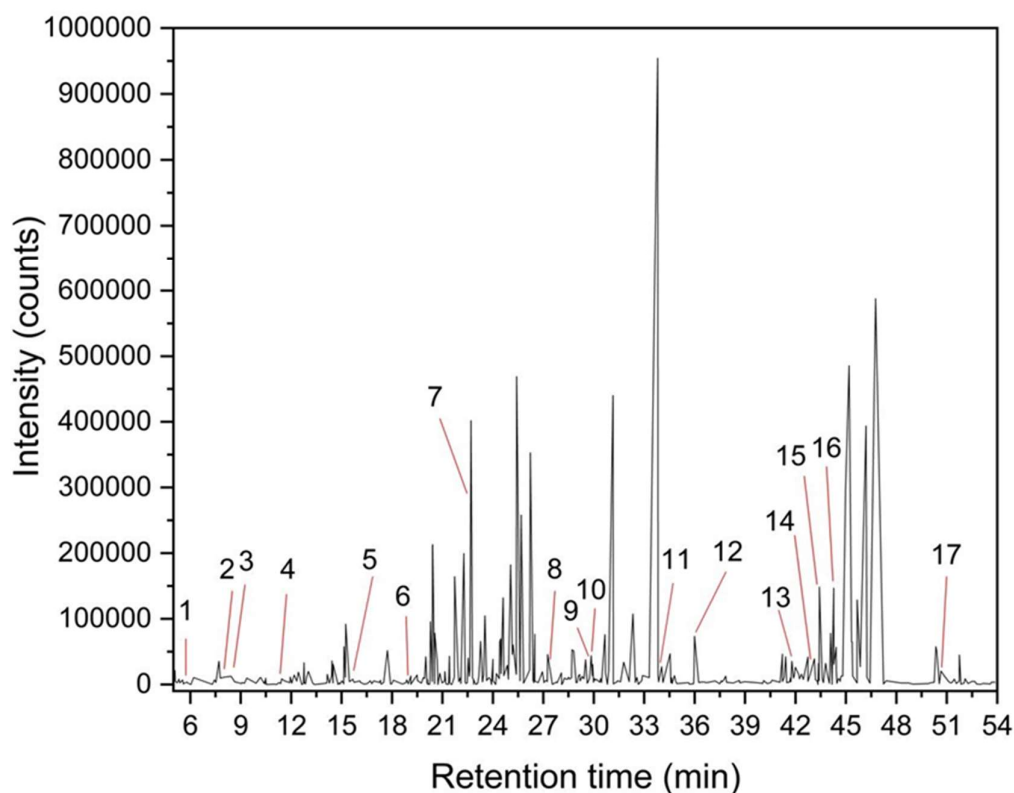
Metabólitos	FC (+) Roxo/ (-) Roxo	p-valor
Ácido malônico	0.00104	1.84 x 10 <sup>-10</sup>
1-cestose	0.02035	1.24 x 10 <sup>-8</sup>
1-Monopalmitina	0.04686	1.75 x 10 <sup>-8</sup>
Acetaldeído dietilacetal	0.02435	2.16 x 10 <sup>-8</sup>
1-Monostearina	0.04481	3.92 x 10 <sup>-8</sup>
Trealose	0.00088	5.20 x 10 <sup>-8</sup>
D-Galactose	0.01398	8.65 x 10 <sup>-8</sup>
Undecano	0.10049	3.70 x 10 <sup>-7</sup>
Tetradecano	0.04366	3.76 x 10 <sup>-7</sup>
Ácido esteárico	0.01231	7.01 x 10 <sup>-7</sup>
D-Frutose	0.03664	3.57 x 10 <sup>-6</sup>
D-Glucose 1-Fosfato	0.02355	7.08 x 10 <sup>-6</sup>
Fosfato	0.03782	7.23 x 10 <sup>-6</sup>
N-Acetilserina	0.26149	7.48 x 10 <sup>-6</sup>
L-Iditol	0.05473	2.64 x 10 <sup>-5</sup>
Ácido palmítico	4.48800	3.04 x 10 <sup>-5</sup>
Pentacosano	2.59210	4.32 x 10 <sup>-5</sup>
Ácido docosanoico	6.03890	4.33 x 10 <sup>-5</sup>
Ácido sebácico	0.00797	5.53 x 10 <sup>-5</sup>
Uridina	0.06347	8.89 x 10 <sup>-5</sup>
Docosano	2.88910	1.35 x 10 <sup>-4</sup>
Ácido láctico	0.09820	1.76 x 10 <sup>-4</sup>

2-fenil-1-propanol	4.69430	$3.89 \times 10^{-4}$
Trissulfeto de dimetila	1.71160	$4.14 \times 10^{-4}$
D-Ribose	0.02010	$4.61 \times 10^{-4}$
Octadecano	1.87300	$5.64 \times 10^{-4}$
4-etilbenzaldeído	3.31260	$6.99 \times 10^{-4}$
5-hidroximetilfurfural	0.14385	$1.13 \times 10^{-3}$
N-Octadecano	1.49000	$1.47 \times 10^{-3}$
Hexadecano	1.57750	$1.57 \times 10^{-3}$
Henicosano	1.56040	$1.73 \times 10^{-3}$
3-etil-2,6,10-trimetilundecano	1.60560	$2.13 \times 10^{-3}$
Tridecano	1.63290	$2.20 \times 10^{-3}$
Isopropilformato	2.19830	$2.31 \times 10^{-3}$
Éster bis2-etil-hexílico do ácido 1,2-benzenodicarboxílico	9.38920	$2.66 \times 10^{-3}$
Glicerol	0.01776	$3.88 \times 10^{-3}$
2,5-dihidroxi-1,4-benzoquinona	1.92500	$4.02 \times 10^{-3}$
Heneicosanoato de metila	1.49940	$5.01 \times 10^{-3}$
Manitol	0.12548	$5.23 \times 10^{-3}$
Ácido DL-beta-hidroxibutírico	0.11679	$1.26 \times 10^{-2}$
Caprilato de metila	1.78260	$1.38 \times 10^{-2}$
Dodecano	1.42170	$1.66 \times 10^{-2}$
Hidrodissulfeto de pentilo	1.87760	$1.96 \times 10^{-2}$
2-undecanol	1.63160	$2.18 \times 10^{-2}$
Dissulfeto de dialila	1.67540	$3.38 \times 10^{-2}$
Sulfeto de dialila	1.73700	$4.45 \times 10^{-2}$

---

**Tabela A2:** Análise da via que mostra a alteração do metabolismo associada à purga do bulbo do alho usando o Metabo Analyst

Nome da via	Status de correspondência	p-valor
Metabolismo da galactose	3/27 (D-Glucose 1-fosfato, glicerol, D-galactose)	$8.45 \times 10^{-3}$
Biossíntese de cutina, suberina e cera	2/18 (Ácido palmítico, ácido docosanóico)	$3.28 \times 10^{-2}$
Metabolismo de glicerolipídios	2/21 (Glicerol, D-Glucose 1-fosfato)	$4.37 \times 10^{-2}$
Biossíntese de ácidos graxos insaturados	2/22 (Ácido palmítico; ácido esteárico)	$4.76 \times 10^{-2}$
Metabolismo do amido e da sacarose	2/22 ((D-Glucose 1-fosfato, Trealose)	$4.76 \times 10^{-2}$



**Figura A1:** Cromatograma de íons totais (TIC) GC-MS do alho roxo escuro. Metabólitos conhecidos significativamente ( $p \leq 0.05$ ) diferentes entre os alhos roxos escuros e claros são exibidos: (1) Trissulfeto de dimetila, (2) Dissulfeto de dialila, (3) Sulfeto de dialila, (4) Hidrodissulfeto de pentila, (5) Ácido malônico, (6) Ácido láctico, (7) Ácido palmítico, (8) D-Frutose, (9) D-Galactose, (10) D-Ribose, (11) Ácido Docosanóico, (12) Ácido Estearico, (13) 1-Monopalmitina, (14) D-Trealose, (15) Maltose, (16) 1-Monostearina e (17) 1-Kestose.

## APÊNDICE B – Material Suplementar

**Metabolômica global baseada em GC-MS combinada com métodos quimiométricos para discriminação de alho (*Allium sativum L.*) produzido em diferentes países**

**Tabela B1:** Parâmetros usados no MS-DIAL no processamento de dados

<b>Parâmetros de processamento de dados de metabolômica global (GC-MS)</b>	
<b>Data collection</b>	
Mass range begin	50 Da
Mass range end	650 Da
Retention time begins	3 min
Retention time end	61 min
<b>Peak detection</b>	
Minimum peak height	1000 amplitude
Smoothing method	Linear weighted moving average
Smoothing level	2 scans
Average peak width	20 scans
<b>MS1 Dec</b>	
Sigma window value	0.5
El spectra cut off	10 amplitude
<b>Identification</b>	
Use retention index (RI)	-
Index type	Alkanes
MSP file	FiehnLib database
Retention index tolerance	30
Retention time tolerance	0.5 min
<i>m/z</i> tolerance	0.5 Da
El similarity cut off	70%
Identification score cut off	70%
<b>Alignment</b>	
Retention time tolerance	0.075 min
El similarity cut off	70%
Reference file	
Use retention index (RI)	30

**Tabela B2:** Metabólitos que apresentaram uma diferença significativa em suas intensidades relativas ( $p < 0,05$ )

<b>Metabólitos</b>	<b>FC Brasil/China</b>	<b>log<sub>2</sub>(FC)</b>	<b>p-valor</b>
--------------------	------------------------	----------------------------	----------------

1,10-Decanodiol	8.3306	3.0584	$5.53 \times 10^{-4}$
1,1-Dimetiletanol	1.9366	0.95354	$3.65 \times 10^{-3}$
1,2,3,7-Tetrametilindole	3.919	1.9705	$1.43 \times 10^{-4}$
1,2-Diacetoxietano	0.43875	-1.1885	$2.70 \times 10^{-6}$
2-Etilbutiraldeído	0.28837	-1.794	$6.47 \times 10^{-7}$
Ácido 2-oxoglutárico	0.40916	-1.2893	$3.65 \times 10^{-6}$
3,5-Dimetil-4-3'-acetilacetoniometil-isoxazol	1.4524	0.5384	$4.79 \times 10^{-4}$
3-Aminopropionitrila	0.46905	-1.0922	$9.85 \times 10^{-3}$
4-Metil-2-piperidona	1.7371	0.79672	$6.54 \times 10^{-5}$
5,7-Dimetil-3',4'-metilendioxiflavonol	0.51273	-0.96373	$2.00 \times 10^{-3}$
5-Hidroximetilfurfural	1.4524	0.5384	$4.79 \times 10^{-4}$
5-Nonanona	0.43097	-1.2144	$9.20 \times 10^{-3}$
Acetona dimetil acetal	0.48097	-1.056	$2.17 \times 10^{-4}$
Adenosina	0.57738	-0.7924	$1.86 \times 10^{-3}$
Sulfeto de alil propil	1.9753	0.98208	$1.75 \times 10^{-3}$
Alfa-lactose	0.59724	-0.74362	$4.95 \times 10^{-2}$
Ácido ascórbico	3.4429	1.7836	$5.85 \times 10^{-7}$
Asparagina desidratada	2.562	1.3573	$2.30 \times 10^{-3}$
Cianeto de benzila	2.5665	1.3598	$1.94 \times 10^{-4}$
Ácido Cis-Aconítico	0.7435	-0.42759	$8.75 \times 10^{-4}$
Ácido cítrico	1.4524	0.5384	$4.79 \times 10^{-4}$
Citrulina	1.3153	0.3954	$8.27 \times 10^{-3}$
Ciclohexano	1.4524	0.5384	$4.79 \times 10^{-4}$
Ácido cisteínico sulfínico	4.41	2.1408	$2.86 \times 10^{-6}$
D-Frutose	0.83033	-0.26825	$3.48 \times 10^{-2}$
D-Galactose	0.39253	-1.3491	$8.13 \times 10^{-4}$
Ácido D-Galacturônico	2.191	1.1316	$1.07 \times 10^{-3}$
Dietanolamina	1.9765	0.98298	$6.47 \times 10^{-5}$
Ácido 2,3-Diaminopropiônico	0.26623	-1.9093	$2.36 \times 10^{-6}$

Ácido beta-hidroxi-butírico	1.4778	0.56348	$3.67 \times 10^{-3}$
D-manose	0.62757	-0.67215	$3.77 \times 10^{-4}$
Docosano	1.4423	0.52841	$5.86 \times 10^{-4}$
Dodecano	1.461	0.54691	$9.90 \times 10^{-5}$
Ácido dodecanóico	0.72751	-0.45896	$1.02 \times 10^{-3}$
D-Ribose	0.55222	-0.85669	$1.31 \times 10^{-2}$
Emilcamato	0.064482	-3.955	$2.17 \times 10^{-6}$
Etanolamina	0.7718	-0.3737	$2.48 \times 10^{-2}$
Glutamina desidratada	0.46804	-1.0953	$9.54 \times 10^{-3}$
Glicerol	0.67726	-0.56221	$2.22 \times 10^{-4}$
3-fosfato de glicerol	0.28045	-1.8342	$3.78 \times 10^{-6}$
Gly-Gly	1.5928	0.67156	$5.77 \times 10^{-4}$
Guanosina	0.2077	-2.2674	$3.25 \times 10^{-2}$
Hexacosano	0.25353	-1.9797	$1.59 \times 10^{-6}$
Hexadecano	1.4057	0.49129	$5.92 \times 10^{-4}$
Hexose	1.4748	0.56051	$1.83 \times 10^{-4}$
Lactato de hexila	0.62884	-0.66924	$2.35 \times 10^{-2}$
Ácido isotreônico	0.38601	-1.3733	$1.15 \times 10^{-6}$
L-Arginina	3.8656	1.9507	$7.42 \times 10^{-5}$
L-Asparagina	1.2176	0.28407	$4.12 \times 10^{-2}$
L-Cisteína	4.6081	2.2042	$1.42 \times 10^{-5}$
Ácido L-Glutâmico	1.8118	0.85739	$1.38 \times 10^{-4}$
L-glutamina	2.1131	1.0794	$3.34 \times 10^{-2}$
L-Glicina	1.4458	0.53183	$7.91 \times 10^{-4}$
L-Leucina	0.47376	-1.0778	$3.40 \times 10^{-5}$
L-Lisina	2.3242	1.2167	$2.13 \times 10^{-5}$
L-Ornitina	3.107	1.6355	$5.88 \times 10^{-4}$
L-fenilalanina	0.65486	-0.61074	$4.10 \times 10^{-2}$
L-Prolina	0.10424	-3.262	$3.22 \times 10^{-7}$
L-Triptofano	0.074684	-3.7431	$1.65 \times 10^{-7}$

L-Tirosina	2.3819	1.2521	$2.59 \times 10^{-2}$
L-Valina	0.70076	-0.51301	$3.01 \times 10^{-3}$
Ácido málico	0.38624	-1.3724	$2.88 \times 10^{-3}$
Maltose	0.071228	-3.8114	$2.95 \times 10^{-5}$
Maltotriose	0.46453	-1.1062	$3.56 \times 10^{-5}$
Melibiose	0.006469	-7.2724	$4.30 \times 10^{-9}$
Ácido metilmalônico	1.9854	0.98942	$6.82 \times 10^{-4}$
Ácido mirístico	1.8672	0.90084	$1.04 \times 10^{-5}$
N-acetil-dl-serina	2.6682	1.4159	$1.60 \times 10^{-7}$
N-Metiltrifluoroacetamida	1.8886	0.91731	$1.09 \times 10^{-5}$
N-octadecano	1.3285	0.40982	$2.64 \times 10^{-2}$
Octano	2.4005	1.2634	$1.53 \times 10^{-5}$
Ácido palmítico	1.3679	0.45196	$6.34 \times 10^{-3}$
Penicilamina	2.3009	1.2022	$2.77 \times 10^{-6}$
Pentadecano	1.4305	0.51648	$9.14 \times 10^{-4}$
Ácido propanoico	1.851	0.88831	$2.55 \times 10^{-3}$
Pirazol	1.4524	0.5384	$4.79 \times 10^{-4}$
Ácido pirofosfórico	0.36161	-1.4675	$2.75 \times 10^{-2}$
S-Carboximetil-l-Cisteína	4.2025	2.0713	$1.54 \times 10^{-6}$
Ácido esteárico	1.3785	0.4631	$1.93 \times 10^{-3}$
Sacarose	0.5887	-0.7644	$3.49 \times 10^{-4}$
Ácido tranexâmico	1.2986	0.37699	$2.98 \times 10^{-2}$
Tridecano	2.0825	1.0583	$3.63 \times 10^{-3}$
Undecano	1.3118	0.3915	$1.53 \times 10^{-2}$
Ácido xilônico	1.7577	0.81371	$4.15 \times 10^{-6}$

---

### APÊNDICE C – Material Suplementar

#### Rápida discriminação da origem geográfica do alho (*Allium sativum* L.): uma abordagem metabolômica aplicada a dados de espectrometria de massa por *paper spray*

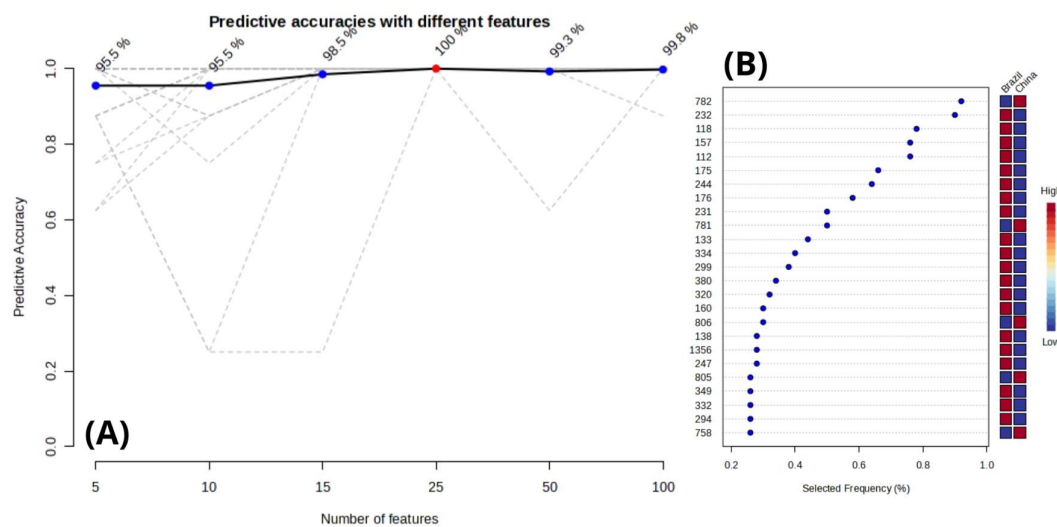
**Tabela C1:** AUC, frequência, importância e abundância usando a análise ROC para os 25 principais recursos que contribuíram para o modelo de previsão classificado por frequência selecionada comparando alho do Brasil e da China.

<i>m/z</i>	AUC	Frequência	Importância	Brasil	China
112	1.0000	0.76	0.0000216	Alta	Baixa
118	1.0000	0.78	0.0000220	Alta	Baixa
133	1.0000	0.44	0.0000199	Alta	Baixa
138	1.0000	0.28	0.0000193	Alta	Baixa
157	1.0000	0.76	0.0000224	Alta	Baixa
160	1.0000	0.3	0.0000180	Alta	Baixa
175	1.0000	0.66	0.0000210	Alta	Baixa
176	1.0000	0.58	0.0000204	Alta	Baixa
231	1.0000	0.5	0.0000204	Alta	Baixa
232	1.0000	0.9	0.0000227	Alta	Baixa
244	1.0000	0.64	0.0000207	Alta	Baixa
247	1.0000	0.28	0.0000157	Alta	Baixa
294	0.9833	0.26	0.0000161	Alta	Baixa
299	1.0000	0.38	0.0000191	Alta	Baixa
320	1.0000	0.32	0.0000190	Alta	Baixa
332	1.0000	0.26	0.0000176	Alta	Baixa
334	1.0000	0.4	0.0000192	Alta	Baixa
349	1.0000	0.26	0.0000176	Alta	Baixa
380	1.0000	0.34	0.0000184	Alta	Baixa
758	0.9833	0.26	0.0000161	Baixa	Alta
781	1.0000	0.5	0.0000197	Baixa	Alta
782	1.0000	0.92	0.0000235	Baixa	Alta
805	1.0000	0.26	0.0000186	Baixa	Alta

806	0.9833	0.3	0.0000172	Baixa	Alta
1356	0.9667	0.28	0.0000168	Alta	Baixa

**Tabela C2:** Tabela de resultados da análise de enriquecimento de vias metabólicas

Nome da via	Status de correspondência	p-valor
<b>Regulado para cima</b>		
Biossíntese de aminoácil-tRNA	3/46 (L-arginina, L-valina, L-prolina)	0.0020601
Metabolismo do amido e da sacarose	2/22 (sacarose, D-glucose)	0.0071042
Metabolismo da galactose	2/27 (Sacarose, D-glucose)	0.010625
Metabolismo da arginina e da prolina	2/34 (L-arginina, L-prolina)	0.01661



**Figura C1:** Previsão de biomarcadores por meio de análise exploratória usando uma curva ROC multivariada. (A) O gráfico exibe as precisões preditivas de seis modelos de biomarcadores distintos, com o ponto vermelho indicando a maior precisão observada no painel de 25 recursos do modelo 4. (B) Os 25 principais biomarcadores potenciais são identificados com base nas frequências de seleção durante a validação cruzada.