Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

**Análise comparativa das respostas metabólicas à restrição hídrica e reidratação
em folhas de dois clones comerciais de eucalipto**

Hana Karina Pereira da Silva

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em
Ciências. Área de concentração: Genética e
Melhoramento de Plantas

**Piracicaba
2020**

Hana Karina Pereira da Silva
Engenheira Florestal

Análise comparativa das respostas metabólicas à restrição hídrica e reidratação em folhas de
dois clones comerciais de eucalipto

Orientador:
Prof. Dr. **CARLOS ALBERTO LABATE**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em
Ciências. Área de concentração: Genética e
Melhoramento de Plantas

Piracicaba
2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Silva, Hana Karina Pereira da

Análise comparativa das respostas metabólicas à restrição hídrica e reidratação em folhas de dois clones comerciais de eucalipto / Hana Karina Pereira da Silva. - - Piracicaba, 2020.

159 p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Estresse hídrico 2 Recuperação 3. GC-MS 4. LC-MS/MS 5. Flavonoides I. Título

Dedicatória

À minha família,

por estar ao meu lado me apoiando incondicionalmente em todos os momentos, por me incentivar a seguir adiante mesmo perante tantos obstáculos surgidos e por ficar alegre por minhas conquistas. Aos meus entes queridos que já partiram, em especial ao meu avô, por tudo que fizeram por mim. Sei que se estivessem presentes nesse momento estariam felizes por mais essa jornada concluída.

Agradecimentos

À Grande Lei Mística Universal por ser o âmago de minha existência e a força primordial que me guia em busca de atingir meus propósitos;

À Luiz Vicente de Sousa Queiroz que em sua benevolência e ato visionário doou a Fazenda São João da Montanha ao Governo do Estado de São Paulo no intuito de criar uma escola agrícola, a qual futuramente daria origem ao que hoje é a ESALQ;

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ-USP) por ser esta instituição Gloriosa e por ter guiado meus passos no caminho do conhecimento desde a minha graduação;

Ao Departamento de Genética (LGN) e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de plantas (PPG-GMP) da ESALQ, bem como aos seus Professores e funcionários, pelo apoio e colaboração ao longo de tantos anos;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - Processo: 143372/2017-3) e ao Departamento de Genética da ESALQ-USP pela concessão da bolsa de estudo que tive durante o doutorado, a qual foi fundamental para que eu pudesse desenvolver meus estudos;

Ao Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais (IPEF) e ao Viveiro do Departamento de Ciências Florestais da ESALQ-USP pela gentil concessão dos materiais vegetais utilizados neste trabalho;

Ao Professor Carlos Alberto Labate pela orientação e pela oportunidade de fazer parte de seu laboratório por quase doze anos;

À querida e competente especialista em espectrometria de massas do nosso laboratório, Thaís Regiani Cataldi, por toda colaboração e apoio científico ao longo da elaboração deste trabalho, bem como por todo incentivo e amizade durante minha jornada neste local;

À pós-doutora Lucélia Borgo pela solicitude em me ensinar a realizar as análises de peróxido e peroxidação lipídica contidas neste trabalho, bem como à Salete A. Gaziola, técnica do Laboratório de Genética Bioquímica de Plantas, por gentilmente esclarecer minhas dúvidas sobre os cálculos relacionados a tais análises;

Aos amigos do Departamento de Genética da ESALQ-USP Júlia S. Morosini, Fernando Espolador e Fernando Correr, além do meu amigo de laboratório Fabricio E. de Moraes, pelas nossas “discussões estatísticas” acerca deste trabalho;

A todos os colegas e amigos que fiz no laboratório Max Feffer ao longo desses quase doze anos, os quais de uma forma ou outra contribuíram, seja cientificamente ou com uma palavra amiga nos momentos de aflição. Nomear todos os que vi chegar e partir daqui seria impossível, contudo destaco alguns que permaneceram muito próximos nessa jornada: Mônica Labate, David Moon, Juliano Bragatto, Ana Paula Silveira, Livia Franceschini, Ilara Budzinski, Danielle Izilda, Júlia Morosini, Sarina Tsui, Marisângela Rodrigues, Gabriela Lavorente, Leonardo Ferreira, Fernando Cotinguiba e Luis Felipe Boaretto;

Aos amigos “Max Fefferianos” contemporâneos ao meu período de doutorado (Thaís, Gustavo, Fabricio, Alline, Juliana, Vanessa, Andressa, Ana Lúcia, Thalita, Lucas). Pessoal, tudo teria sido mais difícil sem vocês e sem os nossos devaneios e gargalhadas durante os almoços diários no laboratório;

À minha família pelo incentivo e apoio incondicional. Vocês são os únicos que realmente sabem os inúmeros percalços que enfrentei para conseguir estar aqui hoje. Espero que um dia eu tenha a possibilidade de tornar a vida de vocês melhor com o conhecimento que adquiri;

Aos amigos que me acompanham desde a infância pelo incentivo, risadas e por saber que vocês permanecem ao meu lado mesmo após tantos anos. Cabe aqui um agradecimento especial à querida amiga Lais de Queiroz que verificou a gramática desta tese;

À todos que de algum modo possam ter contribuído para a minha trajetória até aqui, bem como para a elaboração deste trabalho;

Minha mais sincera gratidão.

Epígrafe

*"Where there is desire, there is gonna be a flame
Where there is a flame, someone's bound to get burned
But just because it burns, doesn't mean you're gonna die
You gotta get up and try, and try, and try
Gotta get up and try, and try, and try
You gotta get up and try, and try, and try"*

Pink - Try

Sumário

RESUMO	11
ABSTRACT	12
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	13
LISTA DE SÍMBOLOS	15
1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS	21
2.1. GERAIS	21
2.2. ESPECÍFICOS	21
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
3.1. INTRODUÇÃO DO EUCALIPTO NO BRASIL E SUA IMPORTÂNCIA PARA O PAÍS	23
3.2. EFEITO DA SECA NAS PLANTAS	24
3.3. METABOLISMO ANTIOXIDANTE EM PLANTAS E A TOLERÂNCIA AO ESTRESSE ABIÓTICO.....	27
3.4. ESTUDOS ÔMICOS APLICADOS AO ESTRESSE EM PLANTAS.....	29
4. MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1. EXPERIMENTO PILOTO PARA DETERMINAÇÃO DOS PONTOS DE COLETA	33
4.1.1. <i>Materiais vegetais utilizados, montagem e coletas do experimento piloto</i>	33
4.1.2. <i>Determinação do conteúdo relativo de água (RWC) no experimento piloto</i>	35
4.1.3. <i>Determinação da temperatura da superfície foliar no experimento piloto</i>	35
4.1.4. <i>Determinação do conteúdo de clorofilas e carotenoides totais no experimento piloto</i>	35
4.1.5. <i>Análise estatística dos dados obtidos no experimento piloto</i>	36
4.2. EXPERIMENTO BASE PARA COLETA DE DADOS E MATERIAL VEGETAL PARA O ESTUDO	37
4.2.1. <i>Materiais utilizados, montagem e coletas do experimento base</i>	37
4.2.2. <i>Determinação de RWC, temperatura da superfície foliar e do conteúdo de clorofilas e carotenoides totais no experimento base</i>	38
4.2.3. <i>Formação de pool das plantas constituintes de uma parcela</i>	39
4.2.4. <i>Quantificação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e determinação da peroxidação lipídica dos tratamentos no experimento base</i>	39
4.2.5. <i>Análise estatística dos dados fisiológicos e bioquímicos obtidos no experimento base</i>	41
4.3. ANÁLISE DO PERFIL METABÓLICO PRIMÁRIO DOS MATERIAIS VEGETAIS COLETADOS NO EXPERIMENTO BASE POR MEIO DA TÉCNICA DE CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS (GC-MS) ...	41
4.3.1. <i>Extração de metabólitos para análise de GC-MS</i>	41
4.3.2. <i>Derivatização</i>	42
4.3.3. <i>Análise das amostras utilizando GC-MS e processamento dos dados obtidos</i>	42
4.3.4. <i>Análise estatística dos dados de GC-MS</i>	43
4.3.5. <i>Análise de vias metabólicas afetadas</i>	44
4.4. ANÁLISE DO PERFIL METABÓLICO SECUNDÁRIO DOS MATERIAIS VEGETAIS COLETADOS NO EXPERIMENTO BASE POR MEIO DA TÉCNICA DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS (LC-MS)	45
4.4.1. <i>Extração de metabólitos para análise de LC-MS</i>	45
4.4.2. <i>Separação, análise de metabólitos e pré-processamento dos dados obtidos por meio da cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS)</i>	45
4.4.3. <i>Análise estatística dos dados obtidos pré-processados</i>	46
4.4.4. <i>Seleção de prováveis metabólitos e análise de fragmentação (LC-MS/MS)</i>	47
4.4.5. <i>Elucidação estrutural dos metabólitos</i>	48
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
5.1. EXPERIMENTO PILOTO	50

5.1.1. Sintomas visuais das plantas nos diferentes pontos de coleta e parâmetros fisiológicos e bioquímicos determinados no experimento piloto	50
5.1.2. Pontos de coleta selecionados por meio do experimento piloto para montagem do experimento base do trabalho.....	56
5.2. EXPERIMENTO BASE - SINTOMAS VISUAIS, RESPOSTAS FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS DAS PLANTAS NAS COLETAS DE RESTRIÇÃO HÍDRICA E REIDRATAÇÃO	57
5.3. EXPERIMENTO BASE - ANÁLISE DE METABÓLITOS POR GC-MS DO MATERIAL VEGETAL OBTIDO	65
5.3.1. Visão geral do perfil metabólico primário das folhas dos clones AEC 0144 e IPB1 submetidos a restrição hídrica e reidratação	65
5.3.2. Efeito da restrição hídrica sobre o metabolismo primário das folhas dos clones AEC 0144 e IPB1	67
5.3.3. Efeito da reidratação sobre o metabolismo primário das folhas dos clones AEC 0144 e IPB1	73
5.3.4. Metabólitos primários presentes nas vias metabólicas responsivas à restrição hídrica e reidratação	78
5.3.5. Sumário das análises de metabólitos primários obtidos por GC-MS	85
5.4. EXPERIMENTO BASE - ANÁLISE DE METABÓLITOS POR LC-MS DO MATERIAL VEGETAL OBTIDO	85
5.4.1. Visão geral do perfil metabólico secundário das folhas dos clones AEC 0144 e IPB1 submetidos a restrição hídrica e reidratação	85
5.4.2. Efeito da restrição hídrica e reidratação sobre o acúmulo dos fenilpropanoides nos clones AEC 0144 e IPB1.....	94
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	103
REFERÊNCIAS.....	105

RESUMO

Análise comparativa das respostas metabólicas à restrição hídrica e reidratação em folhas de dois clones comerciais de eucalipto

O setor florestal brasileiro tem grande importância econômica, social e ambiental. O Brasil ocupa o topo do *ranking* mundial no quesito de exportação de celulose e a segunda posição no *ranking* mundial de produção desta fibra. A maior parcela da área ocupada por florestas plantadas no país é composta por espécies do gênero *Eucalyptus*. Nestas áreas, desvios de precipitação acumulada vêm sendo observados nos últimos anos. Tal fato aliado a projeções de aumento das secas acarretadas por mudanças climáticas, torna de interesse a obtenção de uma melhor compreensão da resposta das plantas a este tipo de situação estressante. A seca é capaz de causar vários danos a planta, limitando sua produtividade e gerando grandes perdas. Na tentativa de lidar com a situação estressante, a planta responde morfológica, fisiológica e bioquimicamente. A nível metabólico, a planta tem seu metabolismo primário e secundário afetados. Como consequência da condição estressante, espécies reativas de oxigênio (EROs) aumentam. Esses compostos são capazes de causar danos a outras moléculas conduzindo à morte celular. Dependendo da severidade do estresse, pode entrar em ação um importante sistema antioxidativo auxiliar que conta com a participação de compostos fenólicos como os flavonoides. No presente trabalho, o tecido foliar de dois clones comerciais de *Eucalyptus urophylla* (AEC 0144 e IPB1) submetidos a restrição hídrica e posteriormente a reidratação foi analisado. Para ambos os clones, a restrição hídrica diminuiu o conteúdo relativo de água e aumentou a temperatura da superfície foliar. Também, para ambos os clones, observou-se a tendência de plantas submetidas a restrição hídrica apresentarem maior conteúdo de H₂O₂ do que plantas controle, bem como de plantas IPB1 demonstrarem maior conteúdo deste do que plantas AEC 0144 sob tal condição. Ainda, a restrição hídrica aumentou a peroxidação lipídica, sendo menor a extensão dos danos causados por esta nas plantas AEC 0144 do que em plantas IPB1. Para estes parâmetros, diferenças estatísticas significativas não foram observadas entre os tratamentos após a reidratação. As análises de GC-MS (PCA, *volcano plot* e MetPA) permitiram identificar metabólitos e vias metabólicas associados a restrição hídrica e reidratação nos dois clones e demonstraram respostas específicas destes às condições hídricas analisadas. Ao que tudo indica, o clone AEC 0144 em restrição hídrica investe no acúmulo de dissacarídeos enquanto o clone IPB1 investe no acúmulo de inosítois. A análise de LC-MS (VIPs) demonstrou que as respostas às diferentes condições hídricas foram altamente específicas do genótipo e que os flavonoides foram importantes para a separação de grupos. Já as análises univariadas (*volcano plot*) mostraram que os flavonoides apresentaram maior abundância relativa em plantas tratadas do clone AEC 0144 do que em plantas do clone IPB1, incluindo, dentre estes, flavonoides com grande potencial antioxidante. Os dados observados confirmam que os flavonoides podem ser um interessante método de rastreio de plantas de eucalipto com melhor performance perante condições estressantes. A identificação de perfis associados a melhor performance durante o estresse, bem como melhor recuperação após este pode ser de grande valia para o avanço de programas de melhoramento genético.

Palavras-chave: Estresse hídrico; Recuperação; GC-MS; LC-MS/MS; Flavonoides

ABSTRACT

Comparative analysis of metabolic responses to water restriction and rehydration in leaves of two commercial clones of *Eucalyptus*

The Brazilian forest sector has a great economic, social and environmental importance. Brazil occupies in the world ranking the first position in the category pulp export and the second position in the pulp production. Most of the planted forest areas in the country are composed of species belonging to the *Eucalyptus* genus. In these areas, cumulative precipitation deviations have been observed in recent years. Based on this, and in the projections of increased droughts caused by climate changes, it becomes central the understanding of how plants respond to this type of stressful situation. Drought causes various damages in plant, limiting its yield and causing great losses. Plant responds morphologically, physiologically and biochemically when trying to deal with a stressful situation. At the metabolic level, plant primary and secondary metabolism are affected. As a consequence of the stressful condition, reactive oxygen species (ROS) increase. These compounds are capable of causing damages to other molecules leading to cell death. Depending on the stress severity, an important auxiliary antioxidant system that contains phenolic compounds such as flavonoids may act. In this work, leaf tissues of two commercial clones of *Eucalyptus urophylla* (AEC 0144 and IPB1) under water restriction and subsequent rehydration were analyzed. For both clones, water restriction decreased the relative water content and increased superficial leaf temperature. Also, for both clones, there was a tendency for plants under water restriction to have higher H₂O₂ content than control plants, as well as for IPB1 plants have higher content of this compound than AEC 0144 plants under such condition. In addition to this, water restriction increased lipidic peroxidation and a lesser extent of the damages caused by this peroxidation was observed in AEC 0144 plants than in IPB1 plants. For these parameters, statistically significant differences were not observed between control and treated plants after rehydration. GC-MS analyses (PCA, volcano plot and MetPA) allowed to identify metabolites and metabolic pathways associated with water restriction and rehydration in both clones and showed specific responses of these materials to the water regimes analyzed. Apparently, AEC 0144 clone under water-restriction invests in disaccharide accumulation while IPB1 clone invests in inositol accumulation. LC-MS analysis (VIPs) showed that the responses to different water conditions were highly genotype-specific and that flavonoids were important for group separation. Univariate analysis (volcano plot) showed that flavonoids had higher relative abundance in AEC 0144 treated plants than in IPB1 treated plants including, among these, flavonoids with high antioxidant potential. The results confirm that flavonoids may be an interesting screening method for a better performance in eucalyptus plants under stressful conditions. The identification of profiles related with better performance during stress, as well as better recovery after stress, may be of great value for the progress of genetic breeding programs.

Keywords: Water stress; Recovery; GC-MS; LC-MS/MS; Flavonoids

Lista de Abreviaturas e Siglas

ABA	- Ácido abscísico
ANOVA	- Análise de Variância
APX	- Ascorbato peroxidase
CAT	- Catalase
CCV	- Capacidade de campo em vaso
DBC	- Delineamento em blocos casualizados
DIC	- Delineamento inteiramente casualizado
EC	- Energia de colisão
EI	- Ionização por impacto de elétrons
ERO(s)	- Espécie(s) reativa(s) de oxigênio
ESI	- Ionização por <i>electrospray</i>
GC-MS	- Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
GMD	- <i>The Golm Metabolome Database</i>
GR	- Glutathione redutase
HMDB	- <i>Human Metabolome Database</i>
IQR	- Intervalo interquantil (IQR, <i>Interquantil range</i>)
LC-MS	- Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas
MDA	- Malondialdeído
MeOH	- Metanol
MSTFA	- <i>N-Methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide</i>
PA	- Ácido fosfatídico (PA, <i>phosphatidic acid</i>)
PAL	- Fenilalanina amônia liase (PAL, <i>phenylalanine ammonia lyase</i>)
PCA	- Análise de Componentes Principais (PCA, <i>Principal Component Analysis</i>)
PI	- Fosfoinosídeos (PI, <i>phosphoinositides</i>).
PLS-DA	- Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA, <i>Partial Least Squares Discriminant Analysis</i>)
PVPP	- Polivinilpolipirrolidona
RI	- Índice de retenção (RI, <i>Retention Index</i>)
RT	- Tempo de retenção (RT, <i>Retention Time</i>)
RWC	- Conteúdo relativo de água (RWC, <i>Relative Water Content</i>)
SOD	- Superóxido dismutase
SPI	- Índice de Precipitação Padronizado (SPI, <i>Standard Precipitation Index</i>)
TBA	- Ácido tiobarbitúrico
TCA	- Ácido tricloroacético
TMCS	- Trimetilclorosilano

TOF/MS - *Time-of-flight*

VIP - Importância da Variável na Projeção (VIP, *Variable Importance in Projection*)

Lista de Símbolos

Ca^{+2} – Íon cálcio

CH_3CN - Acetonitrila

H_2O_2 - Peróxido de hidrogênio

$\text{H}_2\text{O}_{\text{HPLC}}$ – Água grau HPLC

$m/\xi = \text{Massa/ carga}$

$\text{N}_{2\text{liq}}$ - Nitrogênio líquido

O_2 - Oxigênio

$^1\text{O}_2$ - Oxigênio singleto

$\text{O}_2^{\bullet-}$ - Radical superóxido

$\text{OH}^{\bullet}$ - Radical hidroxila

1. INTRODUÇÃO

Exótico no Brasil, o gênero *Eucalyptus* é constituído por centenas de espécies, adaptadas as mais diversas condições de solo e clima, e possuidoras das mais variadas características físicas, químicas e botânicas. Este fato possibilita a utilização das madeiras destas espécies em sua forma bruta (postes, lenha e móveis, por exemplo) ou, ainda, como matéria-prima para a produção de carvão, celulose, papel, chapas, dentre outras (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA, s.d.).

Espécies desse gênero são de suma importância para o setor florestal brasileiro, uma vez que compõem 73% da área de florestas plantadas no país. Este ramo contribuiu em 2018 com uma parcela superior a 1% do PIB nacional, além de ter gerado bilhões de reais em tributos e milhões de postos de trabalho. Ainda, o setor de árvores plantadas é destaque devido ao Brasil ser o maior exportador de celulose, o segundo maior produtor de celulose e o oitavo maior produtor de papel a nível mundial. Também, são dignas de menção as várias iniciativas que contribuem para a conservação do meio ambiente realizadas pelas empresas associadas a atividade florestal, tais como a posse de áreas naturais protegidas, programas de recuperação de áreas degradadas, uso de subprodutos de seus processos para a geração de energia, dentre outras (INDÚSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES - IBÁ, 2019).

Contudo a grandiosidade deste setor pode ser comprometida em face de um cenário de mudanças climáticas no qual o aumento da temperatura global é esperado (EL-ALL et al., 2011). Este aumento de temperatura pode culminar, segundo as projeções, em um aumento nos períodos de seca severa (AHRAR et al., 2017). Quanto ao Brasil, foram observados nos últimos anos eventos climáticos extremos, tais como as secas nos períodos de 2005, 2010 e 2016 na Amazônia, 2010-2016 na região nordeste e de 2014-2015 na região sudeste (MARENGO et al., 2018).

A seca é um importante fator ambiental capaz de ocasionar estresse, sendo o principal limitador ao desenvolvimento e, conseqüentemente, à produtividade da planta, além de causador de perdas significativas na área agrícola (VELLINI et al., 2008; MICHALETTI et al., 2018).

Plantas submetidas a uma condição hídrica limitante apresentam respostas nos mais diversos níveis (morfológico, fisiológico, bioquímico e molecular), sendo que tais repostas podem variar conforme a duração e intensidade do estresse (JALEEL et al, 2009; ANJUM et al., 2011).

Como uma das primeiras respostas ao estresse hídrico, e a fim de diminuir as perdas hídricas por transpiração, a planta fecha os estômatos, o que limita a condutância estomática, aumenta a temperatura foliar, diminui a fotossíntese e, em última instância afeta a produtividade desta (ANJUM et al., 2011; DA SILVA, F.G. et al., 2015; AHRAR et al., 2017). Segundo Perlikowski et al. (2016), a fotossíntese é um processo extremamente sensível a este tipo de estresse.

Outra consequência conhecida da condição de estresse é o aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs), compostos estes capazes de danificar por meio de reações oxidativas outras moléculas como ácidos nucleicos, proteínas, lipídios e pigmentos fotossintéticos (AHRAR et al., 2017; YILDIZLI;

ÇEVİK; ÜNYAYAR, 2018), desregulando o metabolismo das plantas e podendo, de acordo com Hasheminasab et al. (2012), conduzir à morte celular.

Com o seu metabolismo comprometido, a planta tenta se defender da condição de estresse utilizando diversas estratégias. Dentre estas estão a ativação de um sistema de defesa antioxidativo do qual participam várias enzimas, além de um sistema auxiliar não-enzimático que envolve a participação de metabólitos (HASHEMINASAB et al. (2012), AHRAR et al., 2017). Dentre tais metabólitos, é citada em literatura a participação de compostos fenólicos como os flavonoides, descritos como possuidores de potencial capacidade antioxidativa (BARREIROS, DAVID, DAVID, 2006; AGATI et al., 2012)

Além da indução da biossíntese de flavonoides (DI FERDINANDO et al., 2012; SHARMA et al., 2019), a planta pode ainda, sob condições de estresse hídrico, acumular açúcares, álcoois, aminoácidos, como a prolina, a fim de que estes atuem como osmoprotetores (PERLIKOWSKI et al., 2016).

Segundo Arbona et al. (2013) e Perlikowski et al. (2016), considerando todas as respostas metabólicas às situações de estresse abiótico como a seca, pode-se observar que as mais evidentes estão associadas ao metabolismo primário e às alterações no acúmulo de metabólitos associados a este. Já as respostas associadas ao metabolismo secundário são altamente específicas para uma espécie e/ou a condição de estresse a qual o organismo está submetido (ARBONA et al., 2013), ressaltando-se que metabólitos secundários tem atuação fundamental nos mecanismos de resposta da planta ao estresse oxidativo gerado pela seca (AHRAR et al., 2017).

Neste sentido, estudos baseados em metabólitos são de grande valia, uma vez que estes compostos agregam informações sobre a expressão de genes e proteínas, além da influência do ambiente, sendo, portanto, em comparação aos transcritos e proteínas, considerados mais fidedignos ao fenótipo exibido pelo organismo. Deste modo, o acúmulo, além da presença e/ ou ausência de metabólitos, auxiliam na compreensão das respostas das plantas a um dado tipo de situação estressante, bem como na identificação de perfis associados à tolerância (ARBONA et al., 2013).

Quanto ao caso particular do eucalipto, Dias et al. (2017) cita a necessidade de maiores estudos envolvendo a temática estresse/tolerância, análise *untarget* de metabólitos secundários (caracterizada por um amplo número de classes destes compostos) e análise de compostos fenólicos, sendo estes últimos citados pelos autores como sendo um bom indicador para a tolerância à seca em eucalipto.

Diante de todo esse panorama, é fundamental o desenvolvimento de estudos metabolômicos que visem compreender e obter maiores informações acerca da resposta do eucalipto à condição hídrica limitante, bem como estudos que busquem preencher as lacunas existentes quanto a esta temática. Ainda, segundo Wedeking et al. (2018), estudos relacionados a resposta metabólica das plantas reidratadas após terem sido submetidas a situação de estresse hídrico são escassos. Neste sentido, estes estudos podem servir de base para trabalhos mais detalhados que objetivem o desenvolvimento de biomarcadores para seleção de plantas tolerantes, permitindo o avanço dos programas de melhoramento genético e contribuindo para a manutenção da posição de destaque do setor florestal brasileiro.

Como base para tais investigações, a hipótese central deste trabalho se fundamenta no fato de que as plantas de eucalipto, assim como as plantas em geral, apresentam respostas nos diferentes níveis

(fisiológicos, bioquímicos e moleculares) quando são submetidas a condições hídricas distintas, culminando em diferentes perfis metabólicos. Ainda, considera-se que materiais distintos podem responder de maneira diferenciada a tais condições, o que pode ser de sumo interesse na busca pela associação de um determinado perfil metabólico a uma melhor performance da planta quando esta está submetida a situações adversas.

2. OBJETIVOS

2.1. Gerais

Este trabalho tem como objetivo geral obter uma melhor compreensão das respostas (fisiológicas, bioquímicas e moleculares) de dois clones comerciais de *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake amplamente plantados no Brasil (AEC 0144 e IPB1) à condição de restrição hídrica e posterior reidratação a que foram submetidos.

2.2. Específicos

Este trabalho teve como objetivos específicos:

- Realizar um experimento base com o objetivo de avaliar as respostas fisiológicas e bioquímicas das plantas dos dois clones em estudo quando submetidas a restrição hídrica e após a reidratação, bem como detectar metabólitos foliares primários e secundários relacionados à condição estressante e ao processo de recuperação das plantas de eucalipto;
- Identificar vias metabólicas associadas ao metabolismo primário que foram afetadas pela restrição hídrica e reidratação nos diferentes clones de eucalipto;
- Avaliar e identificar possíveis diferenças no perfil de fenilpropanoides (em especial flavonoides) extraídos das folhas desses dois clones de eucalipto submetidos à restrição hídrica e a reidratação, visando compreender melhor a resposta destes à seca e, em particular, ao estresse oxidativo gerado por tal condição.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Introdução do eucalipto no Brasil e sua importância para o país

Espécies do gênero *Eucalyptus* são nativas da Austrália e ilhas da Oceania. Tal gênero é composto por mais de 700 espécies e é caracterizado por uma ampla diversidade ao nível botânico, bem como ao nível de suas propriedades químicas e físicas, o que torna possível o uso múltiplo do eucalipto (EMBRAPA, s.d). Este vasto número de espécies possibilita também a existência de plantios em diferentes regiões, dada a existência de materiais que são adaptados a distintas características de clima e solo (MORETTI et al., 2010).

No Brasil, as primeiras espécies desse gênero exótico foram introduzidas em meados do século XIX com propósitos decorativos. Os primeiros plantios com finalidade econômica e as primeiras pesquisas realizadas com espécies pertencentes ao gênero *Eucalyptus* datam do início do século XX, os quais foram promovidos por Edmundo Navarro de Andrade com o objetivo de fornecer matéria-prima para a Companhia Paulista de Estradas de Ferro. Anos mais tarde, na década de 50, o eucalipto passou a ser utilizado para fins de produção de celulose e papel, bem como no ramo siderúrgico. Visando suprir a necessidade progressiva pela madeira, surgiram inúmeros incentivos fiscais. Já na década de 80, técnicas de clonagem alavancaram o crescimento florestal, tendo o nosso país, nos dias atuais, destaque na eucaliptocultura a nível mundial (FOELKEL, 2005; CONSELHO DE INFORMAÇÕES SOBRE BIOTECNOLOGIA - CIB, 2008).

Corroborando com essa posição de destaque, no ano de 2018, o Brasil ocupava a primeira posição no *ranking* de produtividade média dos plantios de eucalipto, a qual era da ordem de 36,0 m³/ ha ao ano (IBÁ, 2019).

Ainda, segundo a IBÁ (2019), cerca de 73% dos 7,83 milhões de ha que correspondiam a área total de árvores plantadas no Brasil em 2018 eram referentes a plantios de eucalipto. Isso demonstra a relevância das espécies deste gênero para o setor florestal brasileiro.

Já a notoriedade do setor de árvores plantadas no Brasil pode ser demonstrada por meio de seus indicadores econômicos. Este setor em 2018 foi responsável por 1,3% do PIB nacional e 6,9% do PIB industrial do país, arrecadando um montante de 12,8 bilhões de reais em tributos e gerando 3,8 milhões de postos de trabalho considerando empregos diretos, indiretos e os originados pelo efeito-renda (IBÁ, 2019).

A grandiosidade do setor florestal brasileiro também pode ser demonstrada pelas posições de destaque ocupadas pelo país: segundo maior produtor mundial de celulose, colocação entre os dez maiores produtores mundiais de papéis, painéis de madeira e madeira serrada. Ainda, o Brasil ocupa o topo do *ranking* da produção mundial de carvão vegetal, sendo que 91% da matéria-prima utilizada para esta produção é proveniente de árvores plantadas (IBÁ, 2019).

Muito além da importância econômica, as florestas plantadas também apresentam relevância ambiental, seja evitando a exploração de madeira nativa, seja pela recuperação de áreas degradadas realizadas pelas empresas do setor ou, ainda, pelas árvores atuarem como estoque de carbono (IBÁ, 2018).

Neste sentido, é notório que o setor florestal está alicerçado pelo tripé econômico-social-ambiental e que, dessa forma, é de suma importância para o Brasil.

Por conseguinte, estudos que englobem espécies amplamente utilizadas no país como o *Eucalyptus grandis* (devido a qualidade de sua madeira e produtividade), *E. urophylla* (devido ao seu bom crescimento na maior parte do território nacional, boa resistência a fungos patogênicos e tolerância à seca) e híbridos “urograndis” (que unem as características das outras duas espécies) são relevantes para a eucaliptocultura brasileira (MOURA, 2004; BARREIROS et al., 2007; PALUDZYSZYN FILHO; SANTOS, 2013; PINTO JÚNIOR; SANTAROSA; GOULART, 2014; RIBASKI, 2018).

3.2. Efeito da seca nas plantas

As plantas, por serem seres sésseis, estão sujeitas às mudanças nas condições do ambiente a que estão submetidas. Em especial, aquelas que possuem um ciclo longo de vida, como as espécies florestais, são suscetíveis a tais alterações uma vez que sua adaptação genética a estas são lentas (CORREIA et al., 2018). Neste sentido, o setor florestal pode sofrer graves prejuízos perante um cenário de mudanças climáticas.

De acordo com a *Food and Agriculture Organization of the United Nations* – FAO (2018), 83% dos danos e perdas causados ao setor agrícola no período de 2006 a 2016 foram acarretados pela seca.

Para o Brasil, dados de 2014 a 2018 revelam a existência de grandes desvios da precipitação acumulada neste período em relação a média climatológica. Tal fato indica a existência de um déficit de precipitação extremo em vasta área do país, bem como um déficit variando de moderado a extremo nos estados de Minas Gerais, São Paulo e Mato Grosso do Sul. Estas regiões brasileiras, segundo IBÁ (2019), são as principais produtoras de eucalipto, concentrando 57% da área plantada com esta espécie. (Figura 1).

Figura 1. A) Índice de Precipitação Padronizado (SPI, *Standard Precipitation Index*) para as regiões brasileiras. O período considerado para o acúmulo do valor de precipitação é de 48 meses, os quais se estendem até Dezembro de 2018. Os sete limiares “[...] correspondem ao número de desvios padrão que a precipitação cumulativa observada se afasta da média climatológica” (INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS – INPE, s.d.). B) distribuição das árvores plantadas por gênero (*Eucalyptus*, *Pinus* ou outras) e por estado brasileiro no ano de 2018. Os círculos coloridos referem-se a dimensão relativa da área plantada. Círculos em verde escuro referem-se a área plantada com eucalipto. Fontes: INPE (s.d.) e IBÁ (2019), respectivamente.

Baseado neste cenário alarmante, é de suma importância a obtenção de plantas tolerantes à condição hídrica limitante, tornando-se fundamental a existência de estudos que objetivam obter maiores informações acerca das respostas das plantas quando submetidas a tal situação adversa.

Quando uma planta está submetida a uma condição de seca, suas raízes são capazes de perceberem o *status* hídrico do solo e sinalizá-lo para a parte aérea, acarretando em diversas respostas e culminando na perda do turgor celular. O ácido abscísico (ABA) é um hormônio vegetal constituído por 15 carbonos que participa deste processo. Sua biossíntese está associada à rota dos terpenóides e envolve a participação da enzima zeaxantina epoxidase (TAIZ; ZEIGER, 2013a; JANIÁK; KWAŚNIEWSKI; SZAREJKO, 2016).

Sob condição hídrica limitante, a concentração de ABA pode aumentar até cinquenta vezes no tecido foliar, sendo esta uma das maiores mudanças nos níveis de um hormônio em resposta a um estímulo do ambiente (TAIZ; ZEIGER, 2013a).

A sinalização de ABA pode envolver o íon cálcio. Os níveis de Ca^{2+} citosólico podem ser alterados pela atividade de canais membranares, os quais por sua vez podem ser regulados por espécies reativas de oxigênio. Neste sentido, o aumento dos níveis do íon cálcio poderia afetar a conformação de algumas proteínas, alterando a atividade destas, bem como regular proteínas quinases e fosfatases, culminando em mudanças nos processos de fosforilação. Já a sinalização pela via independente de cálcio pode estar associada à alcalinização do citosol e ao decorrente efluxo de íons potássio das células-guarda. Como consequência, ambos os casos poderiam conduzir ao fechamento estomático (TAIZ; ZEIGER, 2013a).

O fechamento estomático pode estar associado a uma estratégia de evitamento a seca (OKUYAMA, s.d.) em uma tentativa de prevenir perdas hídricas ocasionadas pela transpiração

(FAROOQ et al., 2009), resultando assim em limitação das trocas gasosas e consequente prejuízo à taxa fotossintética, o que acaba por afetar o crescimento e produtividade da planta (SCHACHTMAN; GOODGER, 2008; ANJUM et al., 2011).

Desse modo, como consequência de um processo fotossintético prejudicado e de senescência foliar, plantas submetidas à condição hídrica limitante podem apresentar diminuição do número e do tamanho das folhas, culminando na diminuição da área foliar, diminuição na altura e diâmetro das plantas e, de um modo geral, diminuição na produção de biomassa fresca e seca (ANJUM et al., 2011).

Um exemplo desse fato em eucalipto, é reportado por Da Silva, P.H.M et al. (2015) que trabalhando com dois clones comerciais amplamente plantados no Brasil (H13 e I144), observaram que a condição hídrica limitante afetou negativamente os parâmetros de crescimento, tais como área foliar e biomassa de folhas, caule e raízes das plantas.

Além disso, alterações no crescimento radicular também podem ocorrer perante situações estressantes (PATAKAS, 2012). De acordo com Santos e Carlesso (1998), a planta pode expandir seu sistema radicular mediante condições de seca a fim de atingir regiões mais profundas do solo em busca de umidade. Segundo Okuyama (s.d.), o aprofundamento das raízes está também associado a um mecanismo de evitamento à seca.

Outra estratégia empregada pela planta é o ajuste osmótico, processo no qual a planta pode acumular diversos tipos de solutos (aminoácidos como a prolina, açúcares, açúcares complexos ou alcoólicos, dentre outros compostos orgânicos) resultando na diminuição do potencial osmótico e auxiliando na manutenção do turgor celular, dada a possibilidade de a célula permanecer absorvendo água (FAROOQ et al., 2009; MANTRI et al., 2012). Para a planta, manter uma turgescência positiva é fundamental para a continuidade de mecanismos básicos de sobrevivência como a fotossíntese, além de divisão celular, expansão e crescimento (SANTOS; CARLESSO, 1998).

Outras respostas das plantas à condição hídrica restritiva envolvem alterações nos níveis de pigmentos fotossintéticos e acessórios. A diminuição no conteúdo de clorofila, por exemplo, podem estar associadas a inativação da fotossíntese, geração de espécies reativas de oxigênio e danos as membranas cloroplásticas (JALEEL et al., 2009; ANJUM et al., 2011).

Ao nível molecular, tem-se como resposta à condição estressante alterações na expressão gênica, no sentido de indução ou repressão da transcrição de genes (FAROOQ et al., 2009). Tais alterações podem estar associadas à via dependente de ABA ou a via independente de ABA (TAIZ; ZEIGER, 2013a).

Os produtos dos genes induzidos em resposta à situação hídrica limitante podem estar associados à característica de tolerância, sendo esta influenciada por vários genes. Alguns exemplos de genes conhecidos por alterarem seus níveis de expressão mediante a condição de seca estão relacionados às proteínas LEA (*late embryogenesis abundant*)/ desidrinas e chaperonas. De um modo geral, proteínas desses grupos tem sua importância pautada na capacidade de prevenir a desnaturação de outras proteínas (FAROOQ et al., 2009).

Diante de todo esse panorama de mudanças moleculares é categórico observar que a nível metabólico, vários metabólitos primários e secundários serão afetados mediante uma situação estressante. De acordo com Arbona et al. (2013), estudos envolvendo metabólitos podem ser realizados com o objetivo de analisar o impacto de uma condição estressante sobre o metabolismo da planta, bem como buscar por padrões relacionados à tolerância a dada situação.

3.3. Metabolismo antioxidante em plantas e a tolerância ao estresse abiótico

Processos metabólicos como as cadeias transportadoras de elétrons, que tem como organelas sede de ocorrência as mitocôndrias e cloroplastos, podem naturalmente gerar espécies reativas de oxigênio. Contudo, perante uma condição estressante, os níveis de tais espécies podem ser elevados, o que pode culminar em danos às membranas celulares devido a peroxidação lipídica, danos ao DNA devido a possibilidade de quebra das fitas ou modificação de bases desta molécula, além de desnaturação de proteínas e inativação de enzimas, fatores estes que podem conduzir à morte celular (FAROOQ et al., 2009; MANTRI et al., 2012; BARBOSA et al., 2014; TSANG et al., 2014).

Radicais hidroxila ($\text{OH}^\bullet$), superóxido ($\text{O}_2^\bullet$), moléculas de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) são exemplos de EROs originadas por reações redox que podem estar, respectivamente, na forma de radicais livres ou de espécies não-radicalares. Para se proteger e tentar manter a homeostase redox, a planta possui um arcabouço enzimático do qual participam a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), glutatona redutase (GR), dentre outras (BARBOSA et al., 2014).

O radical $\text{O}_2^\bullet$ é considerado como um forte oxidante capaz de afetar a atividade de metaloenzimas e pode ser formado pela interação do oxigênio (O_2) com pigmentos presentes nas membranas tilacóides quando estes são excitados. A dismutação do radical superóxido é catalisada pela enzima SOD. Essa reação tem como substrato dois radicais superóxidos ($\text{O}_2^\bullet$) e como produtos o O_2 e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Esta última molécula possui um pequeno tamanho sendo, portanto, capaz de cruzar membranas e transitar por diferentes compartimentos celulares, podendo também desempenhar o papel de mensageira do estresse. A eliminação do H_2O_2 está associada a atuação da enzima catalase (CAT) em uma reação capaz de transformar duas moléculas de H_2O_2 em duas moléculas de H_2O e uma de O_2 (FAROOQ et al., 2009; BARBOSA et al., 2014).

Contudo, a inativação deste sistema antioxidativo constitutivo pode ocorrer em situações de estresse severo ou, ainda, mediante a exposição do organismo a diferentes estresses. Nesse momento, a planta pode valer-se de metabólitos antioxidantes (ácido ascórbico - vitamina C, α -tocoferol - vitamina E e carotenoides) para se proteger dos danos causados pela situação. Ainda, metabólitos secundários como os ácidos fenólicos (ácidos cafeico e cumárico, por exemplo) e uma ampla classe de compostos fenólicos denominada flavonoides podem também auxiliar a planta, sendo a biossíntese destes compostos induzida

sob condições estressantes (FINI et al., 2011; AGATI et al., 2012; MANTRI et al., 2012; ARBONA et al., 2013; BARBOSA et al., 2014; SHARMA et al., 2019).

Da biossíntese de compostos fenólicos participam a via do ácido chiquímico, associada à síntese da maior parcela dos compostos fenólicos em plantas superiores, e a via do ácido malônico, com uma atuação menos expressiva nestes organismos. Particularmente, a síntese de flavonoides está atrelada a via do chiquimato e envolve reações como a desaminação da fenilalanina pela atuação da enzima fenilalanina amônia liase (PAL, *phenylalanine ammonia lyase*) originando o primeiro precursor da via de biossíntese dos flavonoides: o ácido cinâmico (ARBONA et al., 2013, TAIZ; ZEIGER, 2013b) (Figura 3).

Figura 2. Esquema simplificado da biossíntese de flavonoides. Fonte: Modificado de Taiz e Zeiger (2013b).

Dependendo da estrutura química que possuem, os flavonoides podem ser separados em antocianinas, chalconas e diidrochalconas, diidroflavonois, flavan-3-óis, flavanois, flavanonas, flavonas, flavonois e isoflavonas. Derivados metilados dessas estruturas não são comuns, sendo assim, estes ocorrem principalmente na forma de glicosídeos e agliconas (ESCOBAR-CÉVOLI et al., 2017)

Os flavonoides podem ser considerados como um sistema antioxidativo auxiliar por apresentarem propriedades antioxidantes e serem capazes de auxiliar a planta nas situações em que esta está passando por estresses bióticos e abióticos (FINI et al., 2011; MIERZIAK, KOSTYN, KULMA, 2014).

A razão de os flavonoides apresentarem tais propriedades está associada às características de sua molécula, como número de hidroxilas, configuração e substituição. A estrutura básica destes compostos é constituída por dois anéis aromáticos conectados por três carbonos. Sendo composta por grupos funcionais nos anéis e ligações duplas conjugadas, essa estrutura molecular ideal possibilita a doação de elétrons ou de átomos de hidrogênio estabilizando radicais e inibindo, consequentemente, a ocorrência de reações como a de Fenton, apresentando capacidade de quelar metais e impedindo a formação de EROs,

bem como reduzindo as EROs já existentes (AGATI et al., 2012; KUMAR; PANDEY, 2013; TAIZ; ZEIGER, 2013b).

Diante destas características, os flavonoides são considerados compostos antioxidantes altamente eficientes no tocante ao sequestro de radicais quando comparados a outros metabólitos conhecidos por desempenharem tais funções, como por exemplo as vitaminas C e E (BARREIROS, DAVID, DAVID, 2006; MIERZIAK, KOSTYN, KULMA, 2014).

Corroborando para a hipótese de que os flavonoides atuam como antioxidantes, o fato de ocorrer um aumento preferencial de moléculas desta classe que apresentam substituição no anel β -diidróxi em detrimento de flavonoides monoidróxi quando a planta está submetida a estresses severos. Dois exemplos de flavonoides β -diidróxi considerados como bons antioxidantes são derivados de quercetina e a luteolina, enquanto que derivados de campferol e apigenina são considerados como antioxidantes pobres originados de flavonoides monoidróxi (AGATI et al., 2012; DI FERDINANDO et al., 2012) (Figura 4).

Figura 3. Estrutura molecular de flavonoides monoidróxi e β -diidróxi. A) Apigenina; B) Campferol; C) Luteolina e D) Quercetina. Fonte: Wikipedia – The Free Encyclopedia (s.d. a, b, c, d).

Na literatura, a indução da biossíntese de flavonoides em plantas submetidas a situações de estresse abiótico (FINI et al., 2011; AGATI et al., 2012; DI FERDINANDO et al., 2012; SHARMA et al., 2019) já é citada, sendo que alguns autores (AGATI et al., 2012; ARBONA et al., 2013) propuseram até mesmo uma associação entre flavonoides e tolerância das plantas a estas condições.

3.4. Estudos ômicos aplicados ao estresse em plantas

Metabólitos vegetais podem ser classificados como primários ou secundários, sendo ambos afetados por estresses abióticos e bióticos. Os primeiros são associados às funções de sobrevivência da planta, como por exemplo a fotossíntese e respiração, enquanto os segundos são comumente associados a

função de proteção contra ataques de herbívoros e agentes patogênicos (TAIZ; ZEIGER, 2013b; GRIESSER et al., 2015; TIWARI; RANA, 2015).

Outra característica associada aos metabólitos primários é a distribuição generalizada no reino vegetal, enquanto que para os metabólitos secundários essa distribuição se caracteriza por ser mais restrita (TAIZ; ZEIGER, 2013b). Ainda, estes últimos são descritos como sendo mais específicos de um dado tipo de estresse e de uma determinada espécie (ARBONA et al., 2013).

O estudo dos metabólitos apresenta um grande potencial dado que estas moléculas são consideradas mais fidedígnas ao fenótipo exibido pelo organismo por expressarem a união de fatores genéticos e ambientais. Dessa maneira, contar com informações sobre os padrões de acúmulo de metabólitos pode auxiliar na atribuição de um padrão à tolerância a uma referida condição, abrindo caminhos para o desenvolvimento de biomarcadores, fato este fundamental para programas de melhoramento vegetal (ARBONA et al., 2013; DIOLA; DALOSO; ANTUNES, 2013).

Nesse ponto, tem destaque a metabolômica, definida como o estudo dos metabólitos baseado em identificação e/ ou quantificação, a qual pode ser alicerçada pela técnica de espectrometria de massas associada à métodos cromatográficos (CHEN; INBARAJ; CHEN, 2012; ARBONA et al., 2013; DIOLA; DALOSO; ANTUNES, 2013).

A base desta técnica envolve a introdução da amostra no equipamento por meio de um método cromatográfico de separação, seguida da ionização de moléculas e do posterior deslocamento dos íons gerados quando estes são submetidos a um campo elétrico. Tal deslocamento transcorre ao longo do analisador, de acordo com a razão massa/carga (m/z) dos íons, ocorrendo a separação destes, que seguem posteriormente para a colisão nos detectores. Essa colisão gera um sinal elétrico que é convertido em um sinal no espectro de massas. Por fim, tais sinais são processados e interpretados com o auxílio de programas específicos (BUDZINSKI et al., 2013; REGIANI et al., 2013).

Metabólitos que apresentam massa inferior a 350 Da, compostos voláteis e metabólitos primários como açúcares e ácidos orgânicos, são comumente analisados por meio da técnica de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS), enquanto que metabólitos que apresentam massa até 1.500 Da, principalmente metabólitos secundários como os carotenoides e flavonoides, são normalmente analisados por meio da técnica de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS) (ARBONA et al., 2013; DIOLA; DALOSO; ANTUNES, 2013).

As técnicas de GC-MS e LC-MS diferem quanto a etapa final de preparo, ao método de introdução da amostra, a fonte de ionização que pode ser utilizada no processo de geração de íons e anotação em bancos de dados.

A primeira geralmente envolve uma etapa de derivatização, na qual os átomos de hidrogênio presentes nos compostos a serem analisados são substituídos por exemplo pelo grupo sili, acarretando na diminuição do ponto de ebulição destes e possibilitando a utilização da técnica de GC-MS, dado que a volatilidade é uma característica essencial para esta. Ainda, a etapa cromatográfica desta técnica tem como fase móvel um gás, enquanto que pela segunda técnica (LC-MS), a fase móvel é um líquido (REGIANI et al., 2013; MOLDOVEANU; DAVID, 2018).

Já quanto a fonte de ionização, equipamentos que utilizam a técnica de GC-MS possuem fonte de impacto de elétrons (EI), as quais atuam sob vácuo e tem como princípio da formação de íons o excesso de energia interna. Em contrapartida, equipamentos que utilizam a técnica de LC-MS podem estar associados a fontes de ionização por *electrospray* (ESI), sendo que técnicas baseadas nesta fonte são consideradas poderosas e de alta seletividade e sensibilidade. O princípio da ionização por ESI está centrado na injeção de gotículas carregadas eletricamente, formadas a partir da adição de ácidos orgânicos em solução. Ao longo da fonte de ionização, essas gotículas diminuem e explodem devido à forte repulsão das cargas iônicas, culminando na injeção isolada do íon para o analisador (REGIANI et al., 2013).

Por fim, quanto a identificação dos metabólitos, estudos baseados na técnica de GC-MS (como os desenvolvido para metabólitos primários), apresentam a vantagem de possuírem bancos de dados públicos disponíveis para essa finalidade. Todavia, tal fato não ocorre para os metabólitos secundários, tornando essa etapa em tais estudos mais árdua (ARBONA et al., 2013).

Diante de todo o exposto, valer-se de tais técnicas poderosas no intuito de estudar temáticas de interesse, como a resposta das plantas sob condições de estresse, pode ser um promissor potencial para o avanço dos programas de melhoramento genético.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Experimento piloto para determinação dos pontos de coleta

Considerando que alterações morfológicas e fisiológicas possuem uma base molecular (NEPOMUCENO et al., 2001), esta etapa inicial do experimento objetivou a identificação, baseada em dados fisiológicos, bioquímicos e visuais, de dois pontos de coleta de interesse, a fim de posteriormente detectar metabólitos relacionados à restrição hídrica, bem como ao processo de recuperação das plantas de eucalipto após a reidratação.

4.1.1. Materiais vegetais utilizados, montagem e coletas do experimento piloto

Foram utilizados no experimento os clones comerciais AEC 0144 (I144) e IPB1 (H13). De acordo com o Registro Nacional de Cultivares - RNC (2019), ambos os materiais são descritos como pertencentes a espécie *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake. Tais genótipos são amplamente difundidos em nosso país, dada a boa produtividade e adaptabilidade que apresentam (DA SILVA, P.H.M. et al., 2015).

Mudas (com aproximadamente 120 dias) desses materiais foram gentilmente cedidas pelo viveiro do Instituto de Pesquisa e Estudos Florestais - IPEF (Piracicaba-SP) e pelo viveiro do Departamento de Ciências Florestais da ESALQ-USP (Piracicaba-SP).

Na primeira quinzena de fevereiro de 2018, plantas clonais desses dois genótipos contando com aproximadamente 1 ano e 1 mês foram submetidas a um experimento de restrição hídrica e posterior reidratação. Tais plantas encontravam-se em vasos de cinco litros contendo manta de bidim e preenchidos com uma mistura de terra vegetal + vermiculita (proporção 2:1). A adubação ocorreu semanalmente com o fertilizante Plant-Prod® (20:20:20) na concentração de 4 g/L até o início do experimento.

O experimento teve duração de oito dias e foi realizado em casa-de-vegetação pertencente ao departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, localizada em Piracicaba-SP, Brasil (22° 43' 30" Sul, 47° 38' 51" Oeste) (CIDADE-BRASIL, 2019).

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC) com três repetições biológicas para cada um dos quatro tratamentos em estudo (AEC 0144_C: plantas do genótipo AEC 0144 na condição controle; AEC 0144_T: plantas do genótipo AEC 0144 tratadas; IPB1_C: plantas do genótipo IPB1 na condição controle; IPB1_T: plantas do genótipo IPB1 tratadas).

Ainda, a fim de evitar possíveis efeitos de luminosidade nas diferentes posições da casa-de-vegetação, as plantas foram aleatorizadas a cada três dias. Deste modo, foram utilizados três delineamentos ao longo do experimento (Figura 4).

IPB1_C_3	AEC 0144_C_2	IPB1_T_1	IPB1_T_3
IPB1_T_2	AEC 0144_T_3	AEC 0144_C_3	IPB1_C_2
AEC 0144_T_1	AEC 0144_T_2	IPB1_C_1	AEC 0144_C_1

IPB1_T_2	IPB1_T_1	IPB1_C_2	AEC 0144_T_3
IPB1_T_3	AEC 0144_T_2	IPB1_C_3	AEC 0144_C_2
AEC 0144_T_1	IPB1_C_1	AEC 0144_C_3	AEC 0144_C_1

IPB1_C_1	AEC 0144_T_2	IPB1_T_2	IPB1_C_3
IPB1_C_2	AEC 0144_T_1	IPB1_T_1	AEC 0144_C_1
AEC 0144_C_3	AEC 0144_T_3	AEC 0144_C_2	IPB1_T_3

Figura 4. Disposição das plantas em casa-de-vegetação ao longo do experimento. Primeira disposição (acima), segunda disposição (meio), terceira disposição (abaixo).

No primeiro dia de experimento (denominado dia 0), todas as plantas (controle e tratadas) foram irrigadas até a saturação. Em seguida, as plantas controle foram diariamente mantidas bem irrigadas ao longo de todo o experimento, enquanto as plantas tratadas foram mantidas em restrição hídrica até apresentarem sintomas visuais de estresse, como por exemplo folhas murchas, secas e retorcidas, momento este em que foi realizada a primeira coleta das folhas. Em seguida, as plantas tratadas foram submetidas a reidratação gradual, ao longo da qual ocorreram mais duas coletas.

Deste modo, a primeira coleta realizada foi referente a restrição hídrica e ocorreu na manhã do sexto dia de experimento, ou seja, aproximadamente 144 horas após a última irrigação das plantas tratadas. Já a segunda coleta foi referente ao primeiro ponto de reidratação das plantas tratadas e ocorreu na manhã do sétimo dia de experimento, ou seja, aproximadamente 24 horas após a capacidade de campo em vaso (CCV) ser elevada para 80%. Por sua vez, a terceira coleta referiu-se ao segundo ponto de reidratação das plantas tratadas e ocorreu na manhã do oitavo dia de experimento, ou seja, aproximadamente 24 horas após as plantas tratadas serem bem irrigadas (saturadas).

No momento de todas as três coletas, foram obtidos dados de temperatura foliar, bem como foram colhidas folhas jovens para determinações do conteúdo relativo de água (RWC, *Relative Water Content*) e discos foliares para os teores de clorofilas (a, b e total) e carotenoides totais (xantofilas + β -caroteno). Todos os dados foram obtidos de folhas jovens e saudáveis, ou seja, sem sinais de mancha ou patógeno.

Durante todo o experimento a CCV, definida como “a quantidade de água retida pelo solo após a drenagem ter ocorrido, ou cessado em um solo previamente saturado por chuva ou irrigação” (COUTO; SANS, 2002, p.7), foi monitorada através de pesagens diárias com uma balança digital simples (Multilaser®).

Visando obter uma caracterização da área de estudo na qual o experimento piloto foi conduzido, a temperatura e a umidade no interior da casa-de-vegetação foram monitoradas com auxílio de um termohigrômetro digital (Termo Higrô SH-122, J.Prolab®). As medições ocorreram no início da manhã (08:00h), ao meio do dia (12:00h) e ao final da tarde (17:00h) ao longo de todo o experimento.

4.1.2. Determinação do conteúdo relativo de água (RWC) no experimento piloto

Duas folhas jovens do terço superior da copa de cada uma das três repetições biológicas dos quatro tratamentos (AEC 0144_C, AEC 0144_T, IPB1_C e IPB1_T) foram coletadas no início da manhã para determinações do RWC seguindo a metodologia descrita por Merchant et al. (2007) com modificações.

As folhas foram coletadas em gelo e imediatamente levadas para o laboratório para determinação da massa fresca. Após a pesagem, tais folhas foram transferidas para placas de Petri contendo água deionizada, as quais por sua vez, foram mantidas a 4°C em uma câmara de germinação (Tecnal TE-400) por 12 horas, período após o qual realizou-se a determinação da massa túrgida das folhas. Posteriormente, as folhas foram transferidas para pequenos sacos de alumínio, mantidos em estufa a 37-38°C até que as folhas atingissem massa constante. Para o cálculo do RWC (%) utilizou-se a Equação (1):

$$\text{RWC (\%)} = \left(\frac{\text{Massa Fresca} - \text{Massa seca}}{\text{Massa Túrgida} - \text{Massa seca}} \right) \times 100 \text{ (Equação 1)}$$

4.1.3. Determinação da temperatura da superfície foliar no experimento piloto

Dados de temperatura da superfície foliar foram obtidos em triplicata de uma mesma folha para cada uma das três repetições biológicas dos quatro tratamentos (AEC 0144_C, AEC 0144_T, IPB1_C, IPB1_T). Para tanto, contou-se com o auxílio de um termômetro infravermelho com mira a laser (acurácia: $\pm 1,5^\circ\text{C}$; resolução: $0,1^\circ\text{C}$). Os dados foram obtidos a partir de folhas jovens, completamente expandidas, pertencentes ao terço superior da planta e perpendiculares aos raios solares.

A fim de evitar influências nas medições, essas ocorreram as 08:00h, período em que todas as plantas estavam submetidas as mesmas condições de luz, ou seja, sem nenhum tipo de sombreamento.

4.1.4. Determinação do conteúdo de clorofilas e carotenoides totais no experimento piloto

Com auxílio da própria tampa do microtubo foram coletados pequenos discos a partir de folhas jovens, completamente expandidas e sadias. Tais discos foliares foram obtidos em triplicata para cada uma das três repetições biológicas dos quatro tratamentos (AEC 0144_C, AEC 0144_T, IPB1_C, IPB1_T). Ressalta-se que foi coletado um disco por folha. A partir de tais discos foram realizadas as determinações de clorofilas (a, b e total), bem como de carotenoides totais (xantofilas + β -caroteno), seguindo Lichtenthaler (1987) com modificações.

Para tanto, os microtubos envoltos em papel alumínio (contendo os discos foliares) foram mantidos em gelo até o momento da determinação da massa fresca do disco. Após esta etapa, adicionou-

se aos microtubos 1,5 mL de acetona (100%). Os tubos foram, então, mantidos sob agitação lenta em agitador tridimensional GyroMini™ (Labnet) por 24 horas em geladeira. Após este período, procedeu-se a leitura das amostras em espectrofotômetro Hitachi U-3300 nos seguintes comprimentos de onda: 470 nm, 645 nm e 662 nm. Os teores de clorofilas (a, b e total) e carotenoides totais foram calculados com base em Lichtenthaler (1987), de acordo com as respectivas Equações 2, 3, 4 e 5:

$$\text{CloA} = (11,24 \times A_{662}) - (2,04 \times A_{645}) \text{ (Equação 2)}$$

$$\text{CloB} = (20,13 \times A_{645}) - (4,19 \times A_{662}) \text{ (Equação 3)}$$

$$\text{CloT} = (7,05 \times A_{662}) + (18,09 \times A_{645}) \text{ (Equação 4)}$$

$$\text{Carot.Totais} = \frac{(1.000 \times A_{470}) - (1,90 \times \text{CloA}) - (63,14 \times \text{CloB})}{214} \text{ (Equação 5)}$$

Os valores obtidos pelas equações acima, expressos em µg do pigmento/ mL de extrato da planta, foram convertidos em µg do pigmento/ g de massa fresca (MF) utilizando como base a Equação 6 descrita por Cuzzuol et al. (2016):

$$\text{Cpigmento}_{(\mu\text{g/g MF})} = \frac{(\text{Cpigmento}_{(\mu\text{g/mL})} \times 1,5)}{\text{MF}} \text{ (Equação 6)}$$

Onde, Cpigmento refere-se a concentração do pigmento e 1,5 refere-se ao volume de solvente (mL) utilizando na extração.

Salienta-se que todas as etapas após a coleta dos discos foram realizadas em condição de penumbra.

4.1.5. Análise estatística dos dados obtidos no experimento piloto

A fim de verificar diferenças estatísticas existentes entre os tratamentos (AEC 0144_C, AEC 0144_T, IPB1_C, IPB1_T), os dados obtidos no experimento foram analisados no programa estatístico R (versão 3.5.1), seguindo um delineamento inteiramente casualizado (DIC) por meio de ANOVA seguida de teste de Tukey, ambos considerando 5% de significância. A normalidade dos resíduos da ANOVA foi testada através do teste de Shapiro-Wilk. Nos casos em que o pressuposto da normalidade não foi observado por esse teste ($p\text{-valor} < 0,05$), realizou-se a transformação dos dados utilizando a função *powerTransform*.

Para todos os parâmetros fisiológicos e bioquímicos, em todas as coletas, as médias das avaliações realizadas para cada uma das três repetições biológicas de cada um dos quatro tratamentos foram utilizadas como *input* para a análise estatística dos dados.

4.2. Experimento base para coleta de dados e material vegetal para o estudo

Diferentemente do experimento piloto que objetivou a identificação de um ponto interessante de coleta referente à restrição hídrica e um ponto de coleta interessante referente à reidratação, o experimento base foi elaborado a fim de obter dados e material vegetal para o desenvolvimento de todo o trabalho, contemplando portanto análises fisiológicas, bioquímicas e moleculares.

4.2.1. Materiais utilizados, montagem e coletas do experimento base

O experimento base foi realizado na primeira quinzena do mês de abril de 2018 na mesma casa-de-vegetação onde foi realizado o experimento piloto (item 4.1.1).

Plantas de *E. urophylla* (clones AEC 0144 e IPB1) com aproximadamente 1 ano e 4 meses de idade e altura variando entre 1,00 -1,05 metros foram submetidas a restrição hídrica, bem como posterior reidratação. As plantas encontravam-se em vasos de cinco litros contendo manta de bidim e preenchidos com uma mistura de terra vegetal + vermiculita (proporção 2:1), sendo adubadas semanalmente com o fertilizante PlantProd® (20:20:20) na concentração de 4 g/L até o início do experimento.

O delineamento utilizado foi em blocos casualizados (DBC), com quatro repetições biológicas, sendo cada uma delas constituídas por três plantas (ou seja, três plantas por parcela). Tais plantas foram divididas em controles e tratadas (Figura 5 a).

No primeiro dia de experimento (denominado dia 0), todas as plantas controles e tratadas foram irrigadas até a saturação. Posteriormente, plantas controle foram mantidas bem irrigadas diariamente, enquanto que as plantas tratadas foram mantidas em restrição hídrica até atingirem CCV próxima a 65%, momento no qual, de acordo com o experimento piloto realizado, deveriam apresentar sintomas visuais de estresse, tais como folhas murchas, secas e retorcidas.

Deste modo, a coleta referente à restrição hídrica (coleta 1) ocorreu na manhã do quinto dia de experimento (≈ 120 horas após a última irrigação das plantas tratadas). No momento da coleta, foram obtidos dados de temperatura foliar, bem como foram colhidas folhas jovens e sadias (sem sinais de manchas ou de patógenos) para posteriores análises fisiológicas (RWC), bioquímicas (clorofilas, carotenoides totais, peróxido de hidrogênio e peroxidação lipídica) e moleculares (análise de metabólitos). A fim de evitar degradação, as folhas destinadas as análises bioquímicas (peróxido de hidrogênio e peroxidação lipídica) e moleculares foram coletadas e imediatamente acondicionadas em nitrogênio líquido, sendo posteriormente mantidas em *ultrafreezer* a -80°C até o momento do uso.

Após a primeira coleta, foi realizada a reidratação gradual das plantas tratadas. Para tanto, a CCV destas foi elevada para 75%, 80% e por fim, 85% ao final do sexto dia de experimento. Assim, a segunda coleta referente a reidratação (Coleta 2) foi realizada na manhã do sétimo dia de experimento, sendo colhidas folhas jovens e sadias para realização das mesmas análises já citadas para a coleta anterior. As mesmas precauções para evitar a degradação do material vegetal foram tomadas. Dados de temperatura foliar também foram obtidos.

Durante o experimento base, a CCV foi monitorada por meio de pesagens diárias com uma balança digital simples (Multilaser®) e, visando a caracterização da área de estudo no momento em que o experimento base foi conduzido, a temperatura e a umidade no interior da casa-de-vegetação foram monitoradas com auxílio de um termo-higrômetro digital (Termo Higro SH-122, J.Prolab®).

Ainda, a intensidade luminosa em algumas posições das parcelas experimentais (Figura 5 b) foi determinada utilizando-se um medidor Skye SKP200 calibrado para o sensor SKP 215. Em tais determinações o sensor foi localizado paralelamente ao topo das copas das plantas. Todas as medições ocorreram no início da manhã (08:00h), ao meio do dia (12:00h) e ao final da tarde (17:00h) no decorrer de todo o experimento base.

A)

BLOCO 1				BLOCO 2				BLOCO 3				BLOCO 4			
3	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33	36	39	42	45	48
2	5	8	11	14	17	20	23	26	29	32	35	38	41	44	47
1	4	7	10	13	16	19	22	25	28	31	34	37	40	43	46
AEC0144 C	IPB1 C	AEC0144 T	IPB1 T	IPB1 T	AEC0144 C	IPB1 C	AEC0144 T	IPB1 T	AEC0144 C	AEC0144 T	IPB1 C	AEC0144 T	AEC0144 C	IPB1 T	IPB1 C

B)

BLOCO 1				BLOCO 2				BLOCO 3				BLOCO 4			
10	3	6	9	12	9	15	18	21	24	8	27	30	33	36	7
	2	5	8	11		14	17	20	23		26	29	32	35	
1	1	4	7	10	2	13	16	19	22	3	25	28	31	34	4
	AEC0144 C	IPB1 C	AEC0144 T	IPB1 T		IPB1 T	AEC0144 C	IPB1 C	AEC0144 T		IPB1 T	AEC0144 C	AEC0144 T	IPB1 C	

Figura 5. A) Delineamento em blocos casualizados com 4 repetições biológicas e parcelas constituídas por 3 plantas. C refere-se as plantas controles, enquanto que T refere-se as plantas tratadas. B) Posições nas quais foram coletados os dados de intensidade luminosa (representadas pelas elipses).

4.2.2. Determinação do RWC, temperatura da superfície foliar e do conteúdo de clorofilas e carotenoides totais no experimento base

Para cada uma das quatro repetições biológicas de cada um dos tratamentos (AEC 0144_C, AEC 0144_T, IPB1_C e IPB1_T), foram coletadas três folhas (ou seja, uma folha por planta constituinte da parcela) para a determinação do RWC. As folhas amostradas eram jovens, sadias e localizavam-se no terço superior da copa. A metodologia seguida para a determinação e cálculo do RWC foi a descrita por Merchant et al. (2007) com modificações mencionadas anteriormente (item 4.1.2).

Já os dados de temperatura da superfície foliar foram obtidos em duplicata de uma mesma folha para cada uma das três plantas (parcela) constituintes de cada repetição biológica de cada tratamento. O termômetro utilizado para as medições e a metodologia de coleta dos dados foram os mesmos já citados (item 4.1.3), ressaltando-se que com o objetivo de evitar influências nas medições, essas ocorreram no

início da manhã, período em que todas as plantas estavam submetidas as mesmas condições de luz, sem nenhum tipo de sombreamento.

Por outro lado, no intuito de determinar o conteúdo de clorofilas e carotenoides totais, para cada uma das quatro repetições biológicas de cada um dos tratamentos (AEC 0144_C, AEC 0144_T, IPB1_C e IPB1_T), foram coletados três discos foliares (ou seja, um disco foliar por planta constituinte da parcela). Os discos foram obtidos a partir de folhas jovens, completamente expandidas e sadias. Os procedimentos utilizados para as determinações de clorofilas (a, b e total) e carotenoides totais a partir de tais discos foram os mesmos descritos para o experimento piloto (item 4.1.4).

4.2.3. Formação de *pool* das plantas constituintes de uma parcela

Após as coletas, as folhas colhidas de cada planta foram trituradas em nitrogênio líquido com o auxílio de almofariz e pistilo. Posteriormente, foi realizada uma pesagem proporcional com o material triturado e congelado proveniente de folhas colhidas das três plantas constituintes de uma parcela a fim de obter um *pool*, sendo este utilizado para as análises bioquímicas (peróxido de hidrogênio e peroxidação lipídica) e moleculares (análises de metabólitos). Portanto, tais análises contaram com quatro repetições biológicas por tratamento, sendo cada repetição biológica constituída pelo *pool* formado pelas folhas das três plantas da parcela.

4.2.4. Quantificação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e determinação da peroxidação lipídica dos tratamentos no experimento base

As análises de H₂O₂ e peroxidação lipídica contaram com quatro repetições biológicas por tratamento, sendo cada repetição biológica constituída pelo *pool* formado pelas folhas das três plantas da parcela. As determinações de peróxido de hidrogênio e da peroxidação lipídica (baseada no malondialdeído - MDA) seguiram, respectivamente, os protocolos descritos por Alexieva et al. (2001) e Heath e Packer (1968) com modificações. Todas as etapas de ambas as análises foram realizadas em condições de penumbra.

Assim, inicialmente, em um cadinho resfriado com nitrogênio líquido, adicionou-se a 200 mg de tecido foliar (previamente triturado e congelado), 2 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% e 25 mg de polivinilpolipirrolidona (PVPP). Com auxílio de um pistilo também resfriado em nitrogênio líquido, o material vegetal foi macerado até completa homogeneização, sendo a mistura resultante transferida com o auxílio de uma pipeta para tubos de 2mL. Estes tubos foram centrifugados a 10.000 rpm por 10 minutos e 4°C. A partir do sobrenadante obtido na centrifugação, procedeu-se a uma segunda etapa com procedimentos distintos para a quantificação de H₂O₂ e para a determinação da peroxidação lipídica.

No caso da quantificação H_2O_2 , nessa segunda etapa, separaram-se três alíquotas de 200 μL do sobrenadante obtido de cada repetição biológica extraída na etapa anterior. Tais alíquotas foram adicionadas a tubos diferentes e envoltos em papel alumínio, constituindo, portanto, triplicatas técnicas. A estes tubos envoltos em papel alumínio, adicionaram-se 800 μL de iodeto de potássio 1M e 200 μL de tampão fosfato 0,1 M (pH 7,5). Para compor o “branco”, os 200 μL do sobrenadante foram substituídos por 200 μL de TCA 0,1%. Os tubos foram misturados por inversão e incubados em ambiente protegido de luz por uma hora. Posteriormente, foi realizada a leitura em espectrofotômetro Hitachi U-3300 a 390 nm, utilizando cubeta de quartzo.

O cálculo do conteúdo de peróxido de hidrogênio foi realizado com base na curva de calibração, montada previamente com 12 pontos amostrais (concentrações variando de 0 a 1.078 μM H_2O_2) (Figura 6).

Figura 6. Curva de calibração para o cálculo do conteúdo de H_2O_2 . A curva relaciona a concentração (μM) e as leituras obtidas por meio da absorbância medida em nanômetros (nm).

Para o cálculo dos valores em $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 / \text{g MF}$ utilizou-se como base a Equação 7:

$$\text{H}_2\text{O}_2 [\mu\text{mol/g MF}] = \frac{[\text{X}]}{\left(\frac{\text{MF} \times \text{Va}}{\text{Vr}}\right)} \text{ (Equação 7)}$$

Onde, [X] equivale a concentração de H_2O_2 (μM) determinada com a curva de calibração montada; MF refere-se a massa fresca do material vegetal em gramas; Va equivale ao volume da alíquota em mL (0,2 mL); Vr equivale ao volume total da reação (2 mL).

Os valores demonstrados no presente trabalho foram expressos em $\text{mmol H}_2\text{O}_2 / \text{g MF}$.

Já para a determinação da peroxidação lipídica, de cada repetição biológica, separaram-se duas alíquotas de 250 μL do sobrenadante obtido na etapa anterior. Tais alíquotas foram adicionadas a tubos de rosca diferentes, constituindo, portanto, duplicatas técnicas. A estes tubos de rosca, adicionou-se 1 mL de uma solução de TCA 20% + ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5%. Para compor o “branco”, os 250 μL do sobrenadante foram substituídos por 250 μL de TCA 0,1%. Os tubos foram incubados em banho-maria a 95°C durante 30 minutos. Após este período, a reação foi barrada em banho de gelo por 10 minutos e as

amostras foram vertidas em cubetas de poliestireno, sendo mantidas por um período de 15 minutos à temperatura ambiente em um local protegido da luz para estabilização. Posteriormente, procedeu-se a leitura em espectrofotômetro Hitachi U-3300 nos seguintes comprimentos de onda: 535 e 600 nm. Os cálculos utilizados para a determinação da peroxidação lipídica, bem como para a conversão dos valores para nmol MDA/ g MF são demonstrados nas Equações 8 e 9:

$$C_{(mM| mL)} = \frac{(Abs.535 - Abs.600)}{\varepsilon \times 155000} \text{ (Equação 8)}$$

$$C_{(nmol\ MDA|g\ MF)} = \frac{(\text{Equação 8})}{\left(\frac{MF \times V_a}{V_r}\right)} \times 10^6 \text{ (Equação 9)}$$

Onde, MF refere-se a massa fresca do material vegetal em gramas; Va equivale ao volume da alíquota em mL (0,25 mL); Vr equivale ao volume total da reação (2 mL).

4.2.5. Análise estatística dos dados fisiológicos e bioquímicos obtidos no experimento base

Os dados fisiológicos e bioquímicos obtidos no experimento base foram analisados no programa estatístico R (versão 3.5.1) seguindo um delineamento em blocos casualizados (DBC). Para cada parâmetro fisiológico e bioquímico foi realizada a ANOVA (Teste F) seguida do Teste de comparações múltiplas de Tukey, ambos com 5% de significância. A normalidade dos resíduos da ANOVA foi testada utilizando-se o teste de Shapiro-Wilk ($p\text{-valor} > 0,05$).

Para todos os parâmetros fisiológicos e bioquímicos, em ambas as coletas, utilizou-se como *input* para análise estatística a média dos valores obtidos para cada uma das quatro repetições biológicas de cada um dos quatro tratamentos, totalizando, assim, um n amostral igual a 16.

4.3. Análise do perfil metabólico primário dos materiais vegetais coletados no experimento base por meio da técnica de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS)

4.3.1. Extração de metabólitos para análise de GC-MS

Na extração de metabólitos para a análise de cromatografia gasosa aplicada a espectrometria de massas (GC-MS), utilizaram-se quatro amostras biológicas por tratamento, sendo cada uma delas composta pelo *pool* de plantas da parcela. A extração baseou-se na metodologia descrita por HOFFMAN et al. (2010) executada com algumas modificações.

Para tanto, inicialmente pesou-se em microtubo tratado com metanol, 50 mg de tecido foliar de eucalipto previamente triturado em N_{2liq}. Em seguida, as amostras foram bomogeneizadas com auxílio de três *beads* magnéticas no moinho de bola Retsch MM400 por 30 segundos e 30 Hz. Ainda com as *beads* no tubo, adicionou-se 1 mL de solução extratora gelada composta por metanol: clorofórmio: água grau HPLC (60%: 20%: 20% v/v/v) + padrões internos. Como padrões internos foram utilizados os compostos isotopicamente marcados: ácido mirístico (1, 2, 3 – ¹³C₃, 99% - CLM 3665- 0.5), ácido palmítico (1, 2, 3, 4 – ¹³C₄) e ácido succínico (D4, 98% - DLM 584-5), em uma concentração de 1 mg/mL. Posteriormente, as amostras foram agitadas em vórtex por 30 segundos. As *beads* foram retiradas e procedeu-se à sonicação em banho de gelo por 15 minutos. Após esta etapa, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos, 4°C e 16.000xg. Em seguida, as amostras foram filtradas com auxílio de seringa e filtro Millex PVDF (0,22 µm) e armazenadas à -80°C até o momento do uso.

4.3.2. Derivatização

Do extrato obtido na etapa anterior, separou-se em *vials* de vidro uma alíquota de 100 µL de cada amostra, sendo estas levadas para o processo de liofilização até secagem completa do extrato.

Em seguida, realizou-se a derivatização das amostras. Nesta etapa, foram adicionados 30 µL de demetoxi-amina hidrocloreada (15 mg/mL) em piridina, sendo as amostras agitadas em vórtex e mantidas em repouso por 16 horas em temperatura ambiente e local isento de luz. Após este período, partiu-se para a etapa de sililação, na qual 30 µL de MSTFA (*N-Methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide*) com 1% TMCS (trimetilclorosilano) foram adicionados as amostras, sendo estas agitadas em vórtex e mantidas por 1 hora em temperatura ambiente e local isento de luz. Por fim, adicionaram-se às amostras 30 µL de heptano, sendo que após 30 minutos estas já estavam prontas para seguir para a análise de GC-MS.

4.3.3. Análise das amostras utilizando GC-MS e processamento dos dados obtidos

Para a análise das amostras por meio da cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas tomou-se por base Gullberg et al. (2004).

Após a derivatização, as amostras foram injetadas em cromatógrafo gasoso 7890A (*Agilent Technologies*, Santa Clara, EUA), acoplado a um processador automático Comb-xt (*Leap Technologies*, Carrboro, EUA). A temperatura de injeção da amostra foi de 280 °C e o *flow purge* do septo de 20 mL.min⁻¹ com duração de 60 segundos. A vazão do gás Hélio pela coluna foi constante com um fluxo de 1 mL.min⁻¹. A temperatura da coluna foi mantida a 80 °C por dois minutos e, em seguida, aumentada em 15 °C a cada minuto até atingir a temperatura de 305 °C, a qual foi mantida por mais 10 minutos.

O efluente da coluna foi inserido em uma fonte de ionização do tipo impacto de elétrons (EI) de um GCxGC/TOF MS (*Pegasus 4D*, *Leco Corp.*, St. Joseph, EUA) equipado com duas colunas de sílica fundida, sendo a coluna da primeira dimensão (*Agilent DB-5*) com 20 m de comprimento (0,18 mm

diâmetro interno x 0,18 µm de filme) e a coluna da segunda dimensão (RXT-17) de 0,98 m (0,10 mm diâmetro interno x 0,10 µm de filme). A temperatura da *transferline* e da fonte de íons foram, respectivamente, de 280 e 250 °C. Os íons foram gerados por um feixe de elétrons de 70 eV em uma corrente de ionização de 2,0 mA, e 10 espectros.s⁻¹ foram adquiridos em uma faixa de massa de m/z 45 a 800.

O programa ChromaTOF v.4.51.6.0 (Leco Corp., St. Joseph, EUA) foi utilizado para executar a correção de linha de base (*threshold* > 1) e exportar todos os arquivos de MS no formato *netCDF. A fim de garantir a homogeneidade dos dados, realizou-se uma visualização da qualidade das repetições técnicas, eliminando as que eram discrepantes. A detecção de picos (intensidade ≥ 10 vezes da linha de base), o alinhamento do tempo de retenção (RT, *Retention Time*) e a correspondência da biblioteca foram realizados usando o pacote *TargetSearch* v. 1.34.0 (CUADROS-INOSTROZA et al. 2009). Para o cálculo dos índices de retenção foi utilizada uma série de alcanos (C₁₀-C₄₀).

Para a identificação dos metabólitos, os índices de retenção (RI, *Retention Index*), os espectros com similaridade (*score*) superior a 600 e metabólitos com no mínimo três fragmentos (*mass count*) foram confrontados com os compostos armazenados no banco de dados *Golm-Metabolome* – GMD var (HP5) (<http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/>) (KOPKA et al. 2005). As intensidades dos metabólitos foram normalizadas pelos valores da contagem iônica total (TIC, *Total Ion Current*).

Antes de gerar a planilha final, a fim de realizar as análises estatísticas, foram excluídos os metabólitos que provavelmente pertenciam a coluna, como siloxano e derivados.

4.3.4. Análise estatística dos dados de GC-MS

A matriz de dados obtida na etapa anterior de processamento, a qual continha a intensidade de metabólitos presentes em no mínimo dois grupos de amostras (ou seja, tratamentos), serviu de base para as análises estatísticas realizadas na ferramenta *on-line* MetaboAnalyst 4.0 (<http://www.metaboanalyst.ca/MetaboAnalyst/>) (CHONG et al., 2018).

Os dados foram filtrados com base no intervalo interquartil (IQR, *Interquartil range*), transformados com base em log (*log transformation*) e dimensionados por Pareto (*Pareto Scaling*).

Inicialmente, no intuito de obter uma visão geral do perfil metabólico primário obtido por GC-MS dos clones AEC 0144 e IPB1 submetidos a restrição hídrica e reidratação, realizou-se a Análise de clusterização hierárquica (elaborada com base na Distância Euclidiana e algoritmo ward.D.) e a Análise de Componentes Principais (PCA, *Principal Component Analysis*). A primeira análise utiliza algoritmos (como o de ligação de Ward, baseado na minimização da soma de quadrado entre dois grupos quaisquer) para formar grupos cujos elementos que os integram sejam os mais semelhantes possíveis uns dos outros, formando uma estrutura hierárquica (dendrograma) (VALLI, 2012; METABOANALYST ANALYSIS REPORT, 2019). Já a segunda, trata-se de um tipo de análise multivariada não supervisionada utilizada para a redução de variáveis e separação de classes, nas quais os indivíduos em estudo se agrupam segundo

a variação de suas características (HONGYU, SANDANIELO, OLIVEIRA JR., 2015; METABOANALYST ANALYSIS REPORT, 2019).

Ambas as análises consideraram todas repetições biológicas e técnicas dos oito tratamentos em estudo, excetuando-se três repetições técnicas pertencentes ao clone AEC 0144 (A_R_AEC144C_R:1, J_R_AEC144C_R:3, K_R_AEC144T_R:2) e três repetições técnicas pertencentes ao clone IPB1 (I_IPB1T_DH:3, O_R_IPB1T_R:1, P_R_IPB1C_R:3), eliminadas durante o processamento dos dados a fim de garantir a homogeneidade destes.

Uma segunda etapa teve por objetivo avaliar, de modo mais específico, o efeito da restrição hídrica e reidratação sobre o perfil metabólico primário proveniente dos clones em estudo por meio da análise de GC-MS. Para tanto, os dados foram analisados com o auxílio do *volcano plot* (p -value threshold <0,05 ajustado pelo FDR e *fold change threshold* = 4,0), considerando como *input*, de modo individual, as seguintes comparações estatísticas: 1) IPB1_C_DH x IPB1_T_DH; 2) IPB1_C_R x IPB1_T_R; 3) AEC 0144_C_DH x AEC 0144_T_DH; 4) AEC 0144_C_R x AEC 0144_T_R. Em tais comparações, DH refere-se a coleta 1 (referente a restrição hídrica), enquanto que R refere-se a coleta 2 (após a reidratação da plantas). Os resultados destas análises foram baseados em termos de abundância relativa. Para as comparações de 1 a 4 também foram elaborados Diagramas de Venn com auxílio da ferramenta Venny – versão 2.1 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>).

4.3.5. Análise de vias metabólicas afetadas

Os metabólitos identificados diferencialmente abundantes obtidos por meio da análise do *volcano plot* para cada uma das comparações estatísticas mencionadas anteriormente (1 a 4), foram utilizados como *input* para a análise de vias metabólicas afetadas utilizando a opção *Pathway Analysis* da ferramenta *on-line* MetaboAnalyst 4.0 (MetPA).

Esta ferramenta é capaz de aliar análises topológicas e de enriquecimento e, com o auxílio de algoritmos, fornecer as vias metabólicas relacionadas à condição em estudo. A análise topológica realizada leva em consideração a centralidade de um metabólito (medida quantitativa que pode ser utilizada para estimar a importância de um nó) para a rede e fornece um *score* de impacto, o qual é calculado com base na normalização da importância dos metabólitos identificados em uma determinada via pela soma da importância de todos os metabólitos presentes nesta (XIA; WISHART, 2010).

Para a identificação das vias metabólicas afetadas utilizaram-se os seguintes parâmetros: *compound name* (*input type*), *hypergeometric test*, *out-degree centrality*, *Arabidopsis thaliana*, *use all compounds in the selected pathway* (*reference metabolome*). Considerou-se como via impactada aquelas com *score* $\geq 0,1$ ou $\geq 0,085$ e com mais de um *hit* (metabólito correspondente na via) (SARMA et al., 2018).

4.4. Análise do perfil metabólico secundário dos materiais vegetais coletados no experimento base por meio da técnica de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS)

4.4.1. Extração de metabólitos para análise de LC-MS

No intuito de estudar o perfil de alguns fenilpropanoides (em especial flavonoides) de interesse, a extração de metabólitos para a análise de LC-MS utilizou quatro amostras biológicas por tratamento (cada uma delas composta pelo *pool* de plantas da parcela) e baseou-se na metodologia descrita por Tattini et al. (2004), executada com algumas modificações.

Assim, em tubos de 15 mL previamente tratados com metanol, pesou-se 50 mg de material foliar macerado e liofilizado (etapa 1) aos quais foram adicionados 8 mL de solução extratora constituída por etanol:água (75:25 v/v) e ajustada ao pH 2,5 com ácido fórmico (etapa 2). Os tubos foram agitados em vórtex (2x, 30 segundos) com o auxílio de três *beads* metálicas, as quais foram removidas deste após tal procedimento (etapa 3). Os tubos contendo as amostras foram sonicados por 10 minutos em banho de gelo (etapa 4), centrifugados por 5 minutos, 8.000xg e 4°C (etapa 5), sendo ao final o sobrenadante transferido para um tubo de 50 mL também previamente tratado com metanol (etapa 6). Ao material vegetal já submetido a primeira extração, realizou-se, então, mais uma repetição das etapas 2 até 6. Todavia, o sobrenadante obtido ao final da etapa 6 foi transferido para um segundo tubo de 50 mL (etapa 7). Em cada tubo de 50 mL, adicionou-se 8 mL de hexano (etapa 8) e após esta etapa os tubos foram submetidos a agitação em vórtex (2x, 30 segundos) (etapa 9). As amostras foram centrifugadas por 2 minutos, 5.000xg e 4°C (etapa 10), o sobrenadante obtido foi descartado e as duas frações etanólicas de cada amostra foram unidas em um único tubo de 50 mL (etapa 11). Tais tubos foram levados ao liofilizador até secagem completa da fração etanólica (etapa 12). Por fim, o liofilizado foi ressuscitado em 500 µL de uma solução de eluição, composta por água^oHPLC: metanol: acetonitrila (20: 60: 20 v/v/v) e padrão externo. Como padrão externo foi utilizada a corticosterona (C₂₁H₃₀O₄, na proporção de 1:100 de um estoque de 1 mg/mL em acetonitrila). Em seguida, o ressuscitado foi filtrado com auxílio de uma seringa e filtro Whatman PVDF 0,22 µm (etapa 13), sendo posteriormente uma alíquota de 50 µL submetida a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS). Ressalta-se que todas as etapas da extração foram realizadas em gelo ou a baixa temperatura (4°C).

4.4.2. Separação, análise de metabólitos e pré-processamento dos dados obtidos por meio da cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS)

Para a separação cromatográfica dos metabólitos foliares por UPLC foram injetados 5 µL de amostra em coluna de fase reversa (C18 100 x 2.1 mm, 1.7 µm - Acquity Waters). Dois eluentes foram

utilizados como fase móvel: A (100% água contendo 0,1% de ácido fórmico) e B (100% acetonitrila contendo 0,1% ácido fórmico). Durante a corrida de 14 minutos, o gradiente da fase móvel utilizou as seguintes proporções: condição inicial composta por 95% A e 5% B ocorrendo alteração dentro de 6 minutos para 75% A e 25% B, nos próximos 6 minutos houve uma inversão de polaridade para 25% A e 75% B, no minuto seguinte alteração para 5% A e 95% B e restabelecimento da condição inicial em 1 minuto (95% A e 5% de B). O fluxo de solventes foi constante e correspondeu a 0,5 mL.min⁻¹.

Após a etapa de separação cromatográfica, as amostras foram analisadas em espectrômetro de massas Q-TOF-Ultima API (Waters), com fonte de ionização ESI (ionização por *electrospray*). A voltagem do capilar utilizada foi de 3 kV e a voltagem do cone de 35 kV. A temperatura na fonte de ionização manteve-se a 150°C e a temperatura de dessolvatação 200°C. O fluxo de nitrogênio utilizado no cone foi de 50 L/h e na fonte de 550 L/h. Os dados foram adquiridos em modo positivo e tipo de aquisição centróide, na faixa dinâmica de massa m/z 100 – 1000, pelo programa MassLynx 4.1.

Para a calibração do equipamento foi utilizado um padrão de 0,05 mM de formiato de sódio em solução de acetonitrila: água (90:10), solução esta que também foi utilizada como *lock-mass*, a fim de normalizar as m/z identificadas ao longo da corrida. Nesta etapa, foram utilizadas três réplicas técnicas para cada uma das repetições biológicas de cada tratamento.

Os dados brutos (.raw) provenientes da corrida foram pré-processados no programa MarkerLynx XS. Durante o processamento, os ruídos foram removidos, os picos alinhados, realizou-se também a deconvolução e a normalização pela contagem iônica total (TIC) da corticosterona. Por fim, realizou-se a detecção de picos (determinação da intensidade e de variáveis - prováveis metabólitos).

Para a etapa de pré-processamento, 1 e 13 minutos foram, respectivamente, considerados como o tempo inicial e final de retenção. A faixa dinâmica utilizada foi de m/z 50 - 1.000. A tolerância para o erro de massa foi de 0,25 Dalton, enquanto a tolerância de tempo de retenção foi de 0,30 minuto. O *threshold* utilizado foi de 400 *counts*. Como padrão externo foi utilizado a corticosterona (C₂₁H₃₀O₄) com 347,2222 Da e tempo de retenção de 8,14 minutos.

Dentro de cada tratamento, metabólitos que apresentavam valor zero em mais da metade das amostras tiveram todos os seus valores zerados. Nesse processamento também foi realizada uma normalização pela contagem iônica total (TIC).

4.4.3. Análise estatística dos dados obtidos pré-processados

Após a etapa de pré-processamento, a tabela contendo os dados de intensidade dos picos partiram para análises estatísticas, as quais foram realizadas no programa *on-line* MetaboAnalyst 4.0 (<http://www.metaboanalyst.ca/MetaboAnalyst/>).

Os dados foram filtrados com base no intervalo interquantil (IQR, *Interquantil range*), transformados com base em log (*log transformation*) e dimensionados por Pareto (*Pareto Scaling*).

Os dados foram analisados por meio do *volcano plot* (p -value threshold < 0,05 ajustado pelo FDR e *fold change threshold* = 4,0), considerando como *input* as seguintes comparações estatísticas: 1) IPB1_C_DH x IPB1_T_DH; 2) IPB1_C_R x IPB1_T_R; 3) AEC 0144_C_DH x AEC 0144_T_DH; 4) AEC 0144_C_R x AEC 0144_T_R; 5) AEC 0144_T_DH x IPB1_T_DH e 6) AEC 0144_T_R x IPB1_T_R, sendo os resultados obtidos em termos de abundância relativa. Para tais comparações, a Análise de Componentes Principais (PCA) também foi utilizada como base para identificação e remoção de possíveis *outliers*.

Também foram realizadas a Análise de Clusterização hierárquica e análises multivariadas como a Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA, *Partial least squares-discriminant analysis*), esta última realizada com o objetivo de obter a Importância da Variável na Projeção (VIP, *Variable Importance in Projection*).

A PLS-DA é uma análise supervisionada baseada em técnicas de regressão com o objetivo de estimular a separação entre os grupos do conjunto de dados, bem como de identificar variáveis que conduzem a separação de classes (METABOANALYST ANALYSIS REPORT, 2019; CAMO, s.d.). Já a análise de VIPs é capaz de indicar, através de *VIP scores*, a contribuição de uma variável para o modelo, e, deste modo, quais variáveis mais contribuem para a separação de classes observada nele (BANERJEE et al. 2013).

4.4.4. Seleção de prováveis metabólitos e análise de fragmentação (LC-MS/MS)

Para a etapa de fragmentação foram selecionados os 25 metabólitos classificados como VIPs que possuíam os maiores *scores* (>1,72), além de metabólitos provenientes das comparações pareadas (realizadas por meio do *volcano plot*) cujas massas experimentais de alta resolução eram equivalentes as massas nominais no modo positivo dos fenilpropanoides de interesse (*Apigenin*, *Apigenin-7-O-glucoside*, *Apigenin-7-rhamnoside*, *Apigenin-7-O-rutinoside*, *Kaempferol*, *Kaempferol-3-O-glucoside*, *Kaempferol-3-O-rhamnoside*, *Kaempferol-3-O-rutinoside*, *Luteolin*, *Luteolin-7-O-glucoside*, *Luteolin-7-O-rhamnoside*, *Luteolin-7-rutinoside*, *Quercetin*, *Quercetin-3-O-glucoside*, *Quercetin-3-O-rhamnoside*, *Quercetin-3-O-rutinoside*, *Myricetin*, *Caffeic acid*, *p-coumaric-acid*).

Com o objetivo de realizar a elucidação estrutural dos prováveis metabólitos selecionados foi realizada a fragmentação utilizando as mesmas condições da fonte de ionização já mencionada (item 4.4.2). As energias de colisão utilizadas para a fragmentação dos íons selecionados foram: 10 eV, 20 eV e 35 eV. O desvio de tempo de retenção permitido foi de $\pm 0,5$ minutos.

Após a fragmentação, para cada provável metabólito selecionado, foi salvo o melhor espectro de massa dentre as três energias de colisão.

4.4.5. Elucidação estrutural dos metabólitos

Para a realização da elucidação estrutural foram executadas inicialmente três etapas de busca por arquivos contendo a estrutura dos metabólitos.

A primeira delas consistiu na busca por arquivos de extensão *.mol ou *.sdf dos fenilpropanoides de interesse já mencionados (item 4.4.4) no banco *Human Metabolome Database* – HMDB (<http://www.hmdb.ca/>) e no banco PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>).

A segunda etapa, consistiu na busca no banco HMDB por meio da massa experimental do metabólito. Para a busca foi considerado o modo positivo, aduto $[M+H]^+$ e uma tolerância de erro na massa molecular de $\pm 0,05$ Da. Os primeiros cinco arquivos com extensão *.mol, referentes aos prováveis metabólitos relacionados à massa buscada, que apresentavam significado biológico ao estudo, bem como arquivos *.mol de possíveis flavonoides associados a tal massa, foram salvos para posterior utilização no programa ACDLabs. Nos casos em que a busca no HMDB não retornou nenhum resultado, realizou-se uma nova busca com uma tolerância de erro de $\pm 0,1$ Da.

Nas situações em que nenhum resultado pertinente foi encontrado, realizou-se uma terceira busca no banco Metlin (<https://metlin.scripps.edu>) por meio da massa experimental do metabólito, utilizando os mesmos parâmetros já descritos para a busca no HMDB. Desse modo, de posse do nome dos cinco primeiros possíveis metabólitos fornecidos pelo MetLin, realizou-se uma busca na web por arquivos de extensão *.mol ou *.sdf associados a tais metabólitos.

De posse de todos os arquivos (*.mol ou *.sdf) contendo as estruturas das moléculas, e dos espectros de massa advindos da fragmentação, partiu-se para a utilização da ferramenta *ACD/MS Workbook Suite* (ACDLabs). Por meio desse programa foi realizada uma fragmentação teórica da molécula, a qual foi comparada com a fragmentação real obtida por meio da técnica de MS/MS. Essa análise foi realizada utilizando os parâmetros *default* do programa.

Para atribuir uma identificação ao metabólito foram considerados os seguintes critérios: similaridade do pico base (fragmento mais intenso), similaridade dos fragmentos com alta intensidade, similaridade do maior número de fragmentos possíveis, além de menor erro de massa (delta) em relação a massa procurada no banco de dados para retornar o provável metabólito.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados deste trabalho são apresentados separadamente em termos de experimento piloto, o qual teve como objetivo a determinação de um ponto de coleta de restrição hídrica e reidratação, e o experimento base, etapa principal do trabalho com objetivo de discutir os dados fisiológicos, bioquímicos e metabolômicos, no intuito de obter uma melhor compreensão das respostas das plantas aos diferentes regimes hídrico a que foram submetidas.

Os dados obtidos são referentes às plantas que mantiveram-se em casa de vegetação sob condições variáveis de temperatura, umidade relativa do ar e luminosidade ao longo de ambos os experimentos (Figuras 7, 8 e 9).

Figura 7. A) Temperatura e B) Umidade relativa do ar, no interior da casa-de-vegetação ao longo do experimento piloto nos três diferentes horários. Os dias marcados com asterisco (*) representam os dias em que ocorreram a coleta de restrição hídrica e as duas coletas referentes a reidratação gradual das plantas, respectivamente.

Figura 8. A) Temperatura e B) Umidade relativa do ar no interior da casa-de-vegetação no decorrer do experimento base nos três diferentes horários. Os dias marcados com asterisco (*) representam os dias em que ocorreram a coleta de restrição hídrica (Coleta 1) e a coleta referente a reidratação das plantas (Coleta 2), respectivamente.

Figura 9. Intensidade de luz, em alguns pontos das parcelas experimentais no interior da casa-de-vegetação, determinada às 08:00h (A), 12:00h (B) e 17:00h (C). Os gráficos demonstram a média $\pm$ desvio padrão para cada posição amostrada, e consideram em seus cálculos os valores obtidos no decorrer de todo o experimento base.

5.1. Experimento piloto

5.1.1. Sintomas visuais das plantas nos diferentes pontos de coleta e parâmetros fisiológicos e bioquímicos determinados no experimento piloto

Ao longo do experimento a CCV (%) diminuiu devido à restrição hídrica imposta às plantas tratadas, sendo que plantas do clone AEC 0144 atingiram $CCV_{média}$ de 65,1%, enquanto plantas do clone IPB1 atingiram $CCV_{média}$ de 65,4% ao sexto dia de experimento (Figura 10). Realizou-se neste ponto, a primeira coleta das folhas e de dados foliares, uma vez que as plantas tratadas de ambos os clones apresentavam sintomas visuais de estresse hídrico variando de moderado a severo, segundo os critérios

utilizados por Navroski et. al (2014) trabalhando também com plantas do gênero *Eucalyptus*. Tais sintomas foram caracterizados por folhas murchas e/ou retorcidas e secas (Figuras 11 e 12 b,d)

Após essa coleta, no intuito de evitar abscisão foliar ou até mesmo a morte das plantas tratadas de ambos os genótipos, interrompeu-se a restrição hídrica e iniciou-se a reidratação progressiva destas, elevando-se a CCV para 80%. Assim, a segunda coleta de folhas e de dados foliares ocorreu na manhã do sétimo dia de experimento, ou seja, aproximadamente 24 horas após o início da reidratação gradual das plantas. No momento da coleta, plantas tratadas do clone AEC 0144 apresentavam $CCV_{média}$ de 78,9%, enquanto plantas do clone IPB1 apresentavam $CCV_{média}$ igual a 79,1% (Figura 10).

De um modo geral, foi possível observar que com a elevação da CCV (%) devido a reidratação, as plantas tratadas demonstraram sinais de recuperação de seu *status* hídrico, apresentando folhas mais túrgidas. Contudo, as plantas AEC 0144 tratadas demonstraram visualmente uma melhor recuperação de suas folhas do que as plantas tratadas IPB1. Nestas últimas, houve uma tendência de recuperação apenas para os primeiros pares de folhas de cada ramo, enquanto folhas mais velhas mantiveram-se secas e retorcidas (Figura 12 f,h). Ainda, foi possível observar que as plantas AEC 0144 tratadas reidratadas com $CCV_{média}$ de 78,9%, apresentavam um aspecto mais semelhante ao seu controle (Figura 12 e,f) do que plantas IPB1 com $CCV_{média}$ de 79,1% comparadas ao seu respectivo controle (Figura 12 g,h).

Após a segunda coleta, as plantas tratadas foram bem irrigadas (saturadas) e a terceira coleta ocorreu na manhã do oitavo dia de experimento, ou seja, aproximadamente 24 horas após a saturação. No momento da coleta, as plantas tratadas do clone AEC 0144 apresentavam $CCV_{média}$ de 90,4%, já as plantas tratadas do clone IPB1 apresentavam $CCV_{média}$ igual a 93,5% (Figura 10). Assim como na coleta anterior também referente a reidratação, plantas tratadas, em especial as do genótipo AEC 0144, demonstraram sinais de recuperação de seu *status* hídrico apresentando folhas mais viçosas (Figura 12 j,l). Em contrapartida, plantas tratadas do genótipo IPB1 demonstraram uma aparente progressão nos sintomas visuais gerados pelo estresse hídrico nas folhas mais velhas, apresentando inclusive maior abscisão foliar (Figura 12 l). Novamente, foi possível observar que as plantas AEC 0144 tratadas com $CCV_{média}$ de 90,4% apresentavam um aspecto mais semelhante ao seu controle (Figura 12 i,j) do que plantas IPB1 com $CCV_{média}$ de 93,5% comparadas ao seu controle (Figura 12 k,l).

Figura 10. Capacidade de campo em vaso – CCV (%) para as plantas tratadas de ambos os genótipos ao longo do experimento. No gráfico C1, C2 e C3 referem-se as coletas realizadas.

Figura 11. Detalhamento do aspecto visual das plantas tratadas na coleta 1 (referente a restrição hídrica). À esquerda, planta AEC 0144 tratada. Destaque para a presença de folhas retorcidas e secas. À direita, planta IPB1 tratada. Destaque para a grande quantidade de folhas secas e retorcidas ao longo de toda a copa da planta.

Figura 12. Aspecto visual das plantas na coleta 1 (referente a restrição hídrica), coleta 2 (referente ao primeiro ponto de reidratação) e coleta 3 (referente ao segundo ponto de reidratação). A) E) e I) planta AEC 0144 controle (bem irrigada); C), G) e K) planta IPB1 controle (bem irrigada); B), F) e J) planta AEC 0144 tratada; D), H) e L) planta IPB1 tratada.

Em síntese, no que tange aos sintomas visuais decorrentes da restrição hídrica, foi possível observar a existência de diferenças entre as plantas tratadas de ambos os genótipos. Já para as coletas de reidratação, foi possível observar a recuperação progressiva de plantas tratadas do genótipo AEC 0144, as quais demonstraram ser mais semelhantes aos seus respectivos controles, enquanto que tal fato não foi observado para plantas tratadas do genótipo IPB1, as quais, por sua vez, apesar da reidratação apresentaram uma aparente progressão dos sintomas de estresse hídrico nas folhas mais velhas, bem como uma acentuada abscisão foliar.

Quanto a determinação dos parâmetros fisiológicos e bioquímicos, após a coleta de dados, análises estatísticas foram realizadas no intuito de verificar a existência de diferenças entre os tratamentos. Para realizar tais análises estatísticas, alguns dados foram transformados (clorofila a, clorofila total e carotenoides totais da coleta 3).

Pelos resultados obtidos, é possível observar para a coleta 1 (referente a restrição hídrica) que em ambos os genótipos houve uma tendência do valor do RWC ser menor nas plantas tratadas do que nas plantas controle (bem irrigadas), embora diferenças estatísticas entre estas tenham sido observadas apenas para o genótipo IPB1 (Tabela 1). O RWC é um valioso indicador do *status* hídrico da planta, pois é capaz de representar o grau de déficit hídrico foliar uma vez que relaciona o conteúdo de água presente no

tecido vegetal com a capacidade máxima deste tecido em reter água (LUGOJAN; CIULCA, 2011; MULLAN; PIETRAGALLA, 2012). A diminuição do RWC quando uma planta está submetida a deficiência hídrica já é descrita em literatura, sendo um exemplo o trabalho de Merchant et al. (2007) desenvolvido com seis espécies de eucalipto. Deste modo, nota-se que a restrição hídrica aplicada foi capaz de afetar o *status* hídrico das plantas, sendo este efeito mais pronunciado em plantas do genótipo IPB1, o que corrobora com os sintomas visuais observados para esta coleta (Figura 11).

Quanto a temperatura foliar na coleta 1, é possível observar que essa foi maior nas plantas tratadas de ambos os genótipos, sendo tais valores estatisticamente significativos (Tabela 1). Isso pode indicar, indiretamente, uma menor transpiração das plantas tratadas devido ao fechamento estomático que pode ser ocasionado pela tentativa da planta em manter seu *status* hídrico mediante a interrupção da irrigação. Segundo Da Silva, F.G. et al. (2015), a temperatura foliar pode representar o grau de estresse hídrico da planta, dado que sua regulação está intimamente associada a transpiração, a qual, por sua vez, está relacionada a abertura estomática. É conhecido também que o fechamento estomático constitui uma das respostas iniciais, bem como uma relevante adaptação à restrição hídrica a qual a planta está submetida (ANJUM, 2011).

Ainda para a coleta 1, os conteúdos de clorofilas (a, b e total) e carotenoides totais não demonstraram diferenças estatísticas significativas entre as plantas tratadas e controle em ambos os genótipos (Tabela 1). Tal fato pode estar associado a duração do estresse, uma vez que, segundo Anjum et al. (2011), essa pode influenciar a ocorrência ou não de alterações nos teores de clorofilas em plantas submetidas ao déficit hídrico.

Na coleta 2 (referente ao primeiro ponto de reidratação), foi possível observar a existência de diferenças estatísticas significativas nos valores de temperatura foliar entre plantas tratadas e controle (bem irrigadas) em ambos os genótipos, demonstrando que nesta etapa de reidratação, tais plantas ainda não apresentavam recuperação desse parâmetro fisiológico. Todavia, é possível notar que todos os tratamentos apresentam RWC acima de 90%, apontando a recuperação deste parâmetro nessa coleta (Tabela 1).

Também notou-se na coleta 2 que a dinâmica dos conteúdos de clorofilas (a, b e total) e carotenoides foram distintas entre os dois genótipos, sendo menores nas plantas tratadas do que nas plantas controle para o genótipo IPB1, fato este não observado para o genótipo AEC 0144 (Tabela 1). Isso pode indicar que, mesmo após 24 horas da elevação da CCV para 80%, as plantas tratadas do genótipo IPB1 não demonstraram sinais de recuperação, mas sim um efeito progressivo da condição estressante anterior sob os pigmentos fotossintéticos e acessórios, o que pode, consequentemente, afetar a fotossíntese e, portanto, a sobrevivência da planta. Essa hipótese vai ao encontro dos sintomas visuais observados no momento da coleta 2 (Figura 12 d,h). Cabe ressaltar que, segundo Frosi et al. (2017), a recuperação é um processo progressivo, sendo que um dia após o retorno da irrigação, a taxa fotossintética máxima gira em torno de 40 a 60% em plantas que passaram por uma condição severa de seca.

Por outro lado, para a coleta 3, nenhum dos seis parâmetros fisiológicos e bioquímicos determinados demonstrou diferenças estatísticas entre as plantas tratadas e controle em ambos os

genótipos (Tabela 1), fornecendo indícios de que as plantas estariam recuperadas nessa etapa. Contudo, é interessante ressaltar que nesta coleta uma grande parcela das folhas de plantas IPB1 tratadas estavam senescentes, apresentando também acentuada abscisão foliar, restando poucas folhas disponíveis para serem colhidas. Já plantas tratadas AEC 0144 apresentavam-se visualmente mais próximas ao seu controle como já mencionado (Figura 12 j,l).

Tabela 1. Sumário dos parâmetros fisiológicos e bioquímicos obtidos nas três coletas para os diferentes tratamentos no experimento piloto. Médias $\pm$ desvio padrão (SD) acompanhados pela mesma letra em uma mesma linha não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de significância.

Coleta	Parâmetros	AEC 0144_C	AEC 0144_T	IPB1_C	IPB1_T
		Média $\pm$ SD	Média $\pm$ SD	Média $\pm$ SD	Média $\pm$ SD
1	RWC ⁽¹⁾	91,77 $\pm$ 1,64 a	74,62 $\pm$ 10,96 ab	90,48 $\pm$ 0,49 a	62,08 $\pm$ 7,43 b
1	T. foliar ⁽²⁾	24,67 $\pm$ 0,18 b	25,44 $\pm$ 0,08 a	24,17 $\pm$ 0,21 c	25,24 $\pm$ 0,19 a
1	CloA ⁽³⁾	221,45 $\pm$ 39,58 a	238,19 $\pm$ 41,11 a	351,94 $\pm$ 153,20 a	160,27 $\pm$ 50,81 a
1	CloB ⁽⁴⁾	60,37 $\pm$ 21,43 a	88,02 $\pm$ 4,16 a	92,73 $\pm$ 47,93 a	67,54 $\pm$ 17,47 a
1	CloT ⁽⁵⁾	281,82 $\pm$ 59,57 a	326,20 $\pm$ 44,95 a	444,67 $\pm$ 200,10 a	227,80 $\pm$ 68,11 a
1	Carot. Totais ⁽⁶⁾	98,69 $\pm$ 17,63 a	100,82 $\pm$ 21,72 a	176,43 $\pm$ 67,52 a	88,63 $\pm$ 31,93 a
2	RWC ⁽¹⁾	92,52 $\pm$ 0,42 ab	94,50 $\pm$ 2,36 ab	91,75 $\pm$ 0,20 b	95,45 $\pm$ 0,64 a
2	T. foliar ⁽²⁾	23,59 $\pm$ 0,27 b	24,44 $\pm$ 0,21 a	23,46 $\pm$ 0,29 b	24,97 $\pm$ 0,35 a
2	CloA ⁽³⁾	240,05 $\pm$ 83,41 b	168,50 $\pm$ 24,24 b	417,59 $\pm$ 96,18 a	151,52 $\pm$ 34,54 b
2	CloB ⁽⁴⁾	75,11 $\pm$ 26,87 b	61,75 $\pm$ 8,87 b	130,35 $\pm$ 4,33 a	59,37 $\pm$ 9,42 b
2	CloT ⁽⁵⁾	315,16 $\pm$ 110,27 b	230,25 $\pm$ 33,05 b	547,94 $\pm$ 94,97 a	210,89 $\pm$ 43,96 b
2	Carot. Totais ⁽⁶⁾	120,29 $\pm$ 28,31 b	83,08 $\pm$ 8,43 b	189,42 $\pm$ 40,62 a	79,95 $\pm$ 15,24 b
3	RWC ⁽¹⁾	92,08 $\pm$ 0,45 b	92,55 $\pm$ 0,32 ab	93,23 $\pm$ 1,51 ab	94,48 $\pm$ 0,25 a
3	T. foliar ⁽²⁾	22,33 $\pm$ 0,09 a	22,50 $\pm$ 0,42 a	22,19 $\pm$ 0,02 a	22,71 $\pm$ 0,16 a
3	CloA ⁽³⁾	212,08 $\pm$ 60,80 a	263,37 $\pm$ 36,83 a	332,17 $\pm$ 276,70 a	159,61 $\pm$ 18,97 a
3	CloB ⁽⁴⁾	65,88 $\pm$ 19,26 a	90,53 $\pm$ 18,15 a	97,30 $\pm$ 67,18 a	44,83 $\pm$ 2,25 a
3	CloT ⁽⁵⁾	277,96 $\pm$ 79,90 a	353,90 $\pm$ 53,30 a	429,47 $\pm$ 343,81 a	204,43 $\pm$ 20,83 a
3	Carot. Totais ⁽⁶⁾	98,85 $\pm$ 15,80 a	110,78 $\pm$ 11,03 a	138,82 $\pm$ 92,92 a	79,13 $\pm$ 7,46 a

(1) refere-se ao conteúdo relativo de água, determinado em %

(2) refere-se a temperatura da superfície foliar, determinada em °C

(3), (4), (5), (6) referem-se, respectivamente, ao conteúdo de clorofila a, clorofila b, clorofila total (a+b) e carotenoides totais, determinados em μg do pigmento/ g de massa fresca (MF)

Assim sendo, o ponto de coleta 1 demonstrou-se interessante para representar a restrição hídrica, uma vez que as plantas tratadas apresentaram *status hídrico* afetado, enquanto que o ponto de coleta 2 (primeiro ponto de reidratação) foi interessante devido ao fato de as plantas apresentarem sinais de recuperação, bem como maior número de folhas disponíveis para a coleta.

Do ponto de vista estatístico, o RWC e a temperatura foliar contribuíram mais fortemente para a escolha dos dois pontos de interesse uma vez que, para ambas as coletas, tais parâmetros demonstraram um baixo coeficiente de variação (CV), representando uma alta precisão experimental segundo os critérios de Pimentel-Gomes (1985) apud Da Cruz et al. (2012). Já os pigmentos analisados, demonstraram um CV muito alto na primeira coleta, e muito baixa precisão experimental, enquanto que na segunda coleta, o

conteúdo de clorofila a, clorofila total e carotenoides totais apresentaram alto CV e baixa precisão experimental. Ainda na segunda coleta, o conteúdo de clorofila b apresentou CV médio e, portanto, média precisão experimental (Tabela 2).

Tabela 2. Valores obtidos pelo teste F da Análise de variância e Coeficiente de Variação - CV (%) dos parâmetros analisados no experimento piloto para as coletas 1 e 2

Parâmetro	Coleta 1		Coleta 2	
	Restrição hídrica		Ponto 1 de Reidratação	
	Pr(>F)	CV (%)	Pr(>F)	CV (%)
RWC	0,0017*	8,3719	0,0220*	1,3308
T. Foliar	6,165e-05*	0,6831	0,0005*	1,1701
CloA	0,1227	35,2310	0,0046*	27,4376
CloB	0,4595	35,9567	0,0013*	18,4559
CloT	0,1879	35,0115	0,0026*	23,8568
Carot. Totais	0,0891	34,3348	0,0030*	22,2071

* indica diferenças estatísticas nas médias dos tratamentos pela Análise de Variância baseada no teste F a um nível de 5% de significância

Segundo Mohallem et. al (2008), o coeficiente de variação representa uma medida de dispersão capaz de tecer informações acerca da precisão; e, portanto, a validade de um experimento. Fatores como o delineamento experimental empregado, condições heterogêneas existentes no ambiente e o número de repetições utilizados podem afetar o CV.

Neste sentido, um experimento montado seguindo o delineamento em blocos casualizados e contendo maior número de repetições por tratamento talvez pudesse contribuir para a obtenção de menores CV (%) para os conteúdos dos pigmentos analisados, o que por sua vez poderia contribuir para a obtenção de informações mais fidedignas acerca destes parâmetros.

5.1.2. Pontos de coleta selecionados por meio do experimento piloto para montagem do experimento base do trabalho

A obtenção de dados fisiológicos e bioquímicos no experimento piloto objetivou a identificação de dois pontos de coleta: um de restrição hídrica, nos quais os materiais analisados apresentassem, nas condições a que estavam submetidos, respostas contrastantes (em especial entre plantas tratadas e seus respectivos controles) e um de reidratação, no qual as plantas apresentassem sinais de recuperação. Deste modo, aliando estas repostas fisiológicas e bioquímicas aos sintomas visuais demonstrados pelas plantas, escolheu-se como pontos interessantes de coleta um próximo a CCV 65% (após a irrigação das plantas tratadas ser interrompida) e um segundo ponto próximo a CCV 80% (após a reidratação ser iniciada).

Este primeiro momento não teve por objetivo a realização de uma extensa discussão acerca dos valores obtidos em cada parâmetro e suas implicações fisiológicas e bioquímicas para as plantas. Sendo assim, este experimento piloto serviu de base para a elaboração de um segundo experimento (denominado experimento base) a partir do qual todo o trabalho foi desenvolvido. Neste segundo experimento, foram

coletados dados e material foliar para análises fisiológicas e bioquímicas, bem como para análises moleculares (metabolômica).

5.2. Experimento Base - Sintomas visuais, respostas fisiológicas e bioquímicas das plantas nas coletas de restrição hídrica e reidratação

Com o decorrer do experimento base, a CCV (%) diminuiu devido à restrição hídrica a qual as plantas tratadas estavam submetidas, sendo que ao quinto dia de experimento plantas do clone AEC 0144 apresentavam $CCV_{média}$ de 68,6%, enquanto plantas IPB1 apresentavam $CCV_{média}$ de 69,5% (Figura 13). Neste momento, plantas tratadas de ambos os clones apresentavam sintomas visuais de estresse hídrico, tais como folhas murchas e/ou retorcidas e secas (Figuras 14). De acordo com os critérios utilizados por Navroski et. al (2014), esses sintomas foram considerados como variando de moderado a severo. Desse modo, neste ponto, foi realizada a primeira coleta das folhas e de dados foliares.

Após a primeira coleta, foi realizada a reidratação gradual das plantas tratadas. Assim, a CCV destas foi elevada para 75%, 80% e, por último, 85% ao fim do sexto dia de experimento. A segunda coleta (referente a reidratação) foi, portanto, realizada na manhã do sétimo dia de experimento. No momento da coleta, as plantas tratadas AEC 0144 apresentavam $CCV_{média}$ de 83,6%, enquanto que as plantas tratadas do clone IPB1 apresentavam $CCV_{média}$ de 83,9% (Figura 13).

Do mesmo modo que observado no experimento piloto, a elevação da CCV (%) devido a reidratação propiciou que as plantas tratadas demonstrassem sinais de recuperação de seu *status* hídrico, apresentando folhas túrgidas. Entretanto, visualmente, plantas do grupo AEC 0144 tratadas apresentaram um aspecto mais semelhante ao seu respectivo controle do que as plantas tratadas IPB1 (Figura 15 a,b). Inclusive, para estas últimas, aparentemente houve uma progressão dos sintomas de estresse hídrico, sendo que as folhas mais velhas mantiveram-se secas e retorcidas, apresentando também abscisão foliar, enquanto que apenas para os primeiros pares foliares em cada ramo foi observada uma tendência de recuperação (Figura 15 c,d). Tal fato poderia ser decorrente da aceleração da senescência foliar causado pela deficiência hídrica nesse clone. De acordo com Wolfe et al. (1988) apud Santos e Carlesso (1998), o solo seco devido à deficiência hídrica pode não ser capaz de suprir a demanda por nitrogênio e de crescimento da planta sendo, deste modo, este elemento translocado para pontos de crescimento a partir das folhas mais velhas, acarretando assim em senescência foliar.

Figura 13. Capacidade de campo em vaso – CCV (%) para as plantas tratadas de ambos os genótipos ao longo do experimento base. No gráfico, C1 refere-se a coleta de restrição hídrica, enquanto que C2 refere-se a coleta de reidratação.

Figura 14. A) Plantas do genótipo IPB1 na condição controle - bem irrigada (à esquerda) e em restrição hídrica (à direita); B) Detalhes do aspecto visual das plantas em restrição hídrica do genótipo IPB1; C) Aspecto visual das plantas do genótipo AEC 0144 na condição controle - bem irrigada (à esquerda) e em restrição hídrica (à direita); D) Detalhes do aspecto visual das plantas em restrição hídrica do genótipo AEC 0144; E) Detalhes dos sintomas visuais das plantas tratadas (em restrição hídrica).

Figura 15. Aspecto visual da planta: A) IPB1 controle (à esquerda) e tratada após a reidratação (à direita); B) AEC 0144 controle (à esquerda) e tratada após a reidratação (à direita); C) IPB1 em restrição hídrica e D) Mesma planta mostrada em (C) após a reidratação.

Quanto as respostas fisiológicas, a interrupção da irrigação afetou o *status* hídrico das plantas, dado que para ambos os genótipos foi observado significativo menor conteúdo relativo de água (RWC) em plantas tratadas (Figura 16 a). Essa observação corrobora com os sintomas visuais verificados para as plantas em restrição hídrica (Figura 14 b,d). A redução do RWC em plantas submetidas a deficiência hídrica é mencionada por vários autores (GUARNASCHELLI, PRYSTUPA, LEMCOF, 2006; MERCHANT et al., 2007; CIA et al., 2012) e é descrita como sendo associada ao fechamento estomático o que, conseqüentemente, pode acarretar em prejuízo da taxa fotossintética foliar (JALEEL et al., 2009; LUGOJAN; CIULCA, 2011).

Ainda, entre as plantas tratadas de genótipos distintos, embora não tenha sido possível observar diferenças estatísticas quanto ao RWC (%), verificou-se uma tendência de as plantas AEC 0144 apresentarem maior valor neste parâmetro ($\approx 67,1\%$) que as plantas IPB1 ($\approx 59,0\%$) (Figura 16 a). Essas plantas, segundo Cia et al. (2012), estavam submetidas ao estresse hídrico severo, uma vez que os autores citam em seu trabalho que tal condição pode ser representada por um RWC de 70%. Os mesmos autores acrescentam que a capacidade de manter o RWC é importante mediante a situações estressantes, pois tal fato está relacionado a continuidade de processos celulares. Nesse sentido, Lugojan e Ciulca (2011) citam

que a manutenção de altos níveis de RWC pode ser um mecanismo de resistência à condição hídrica limitante. Baseado nos resultados obtidos, poderia-se sugerir que as plantas AEC 0144 apresentam melhor capacidade de manter seu RWC do que plantas IPB1.

Outro indicativo de que o *status* hídrico das plantas submetidas a deficiência hídrica foi afetado deve-se a maior temperatura foliar destas frente as plantas bem irrigadas (controle) (Figura 16 b). Como já mencionado, diante da baixa oferta hídrica para a planta e no intuito dessa minimizar a perda de água, pode ocorrer o fechamento estomático acarretando em maiores temperaturas foliares como um reflexo da menor dissipação de calor latente devido a redução da transpiração, cenário esse capaz de afetar a fotossíntese (HATFIELD, 1990; DA SILVA, F.G. et al., 2015).

Dando continuidade aos fatores que podem afetar a fotossíntese, tem-se também o conteúdo de pigmentos como as clorofilas e carotenoides. Tais pigmentos são de suma importância dada suas funções de captação de luz. No caso dos carotenoides, além da atuação como antenas dos sistemas coletores de luz, estes podem atuar na defesa antioxidativa das plantas (STRZALKA, KOSTECKA-GUGALA, LATOWSKI, 2003; JALEEL et al., 2009). Pelos resultados obtidos no presente trabalho, os conteúdos de clorofilas (a, b e total) e carotenoides não demonstraram diferenças significativas entre plantas tratadas e seus respectivos controles, embora tenha sido observada uma tendência das primeiras apresentarem menor conteúdo desses pigmentos (Figura 16 c,d,e,f).

A diminuição do conteúdo de clorofilas quando as plantas estão submetidas ao estresse hídrico é citada por vários autores (JALEEL et al., 2009; ANJUM et al., 2011; DA SILVA et al., 2016), assim como a redução dos teores de carotenoides (JALEEL et al., 2009; DA SILVA et al., 2016). Essa diminuição pode ser encarada por duas vertentes. A primeira delas seria decorrente de prejuízos como a degradação dos pigmentos devido ao estresse oxidativo ou, ainda, devido a inibição da conversão dos precursores em seus respectivos pigmentos acarretados pela diminuição da atividade de enzimas que participam do processo. Uma outra possibilidade, seria encarar o reduzido conteúdo desses pigmentos como uma aclimação da planta à situação estressante, uma vez que este fato poderia evitar danos foto-oxidativos (ANJUM et al., 2011; DA SILVA et al., 2016). Contudo, a impossibilidade de observar diferenças estatísticas entre os tratamentos pode também ser decorrente da curta duração do experimento, uma vez que como já mencionado, a alteração ou não alteração de pigmentos como as clorofilas pode ser influenciada pela duração do estresse (ANJUM et al., 2011).

Quanto ao conteúdo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), não foi possível observar diferenças significativas entre as plantas tratadas e seus respectivos controles, embora tenha sido notada uma tendência de as primeiras apresentarem maior teor de H_2O_2 em detrimento das últimas (Figura 16 g). Plantas submetidas a condições estressantes, como a deficiência hídrica, apresentam aumento do conteúdo de espécies reativas de oxigênio (EROs). O H_2O_2 é uma ERO que pode ser originada a partir de reduções do O_2 ou pela dismutação do radical $O_2^{\cdot-}$, bem como pode ser reduzido gerando o radical $OH^{\cdot}$ (ERO considerada como a mais oxidante e, portanto, de alta reatividade). Tais EROs, dentre outras, são capazes de ocasionar danos oxidativos as membranas celulares, DNA e proteínas. Ainda, enzimas podem sofrer

inativação ocasionadas pela oxidação do grupamento tiol do peróxido de hidrogênio (HASHEMINASAB et al., 2012; BARBOSA et al., 2014; BARROS JUNIOR et al., 2016).

Um desses prejuízos acarretados pelas EROs (extensão de danos as membranas) pode ser quantificado pela formação de malondialdeído (MDA) no processo de peroxidação de ácidos graxos insaturados (ALEXIEVA et al., 2001). Neste sentido, foi possível observar que as plantas submetidas a restrição hídrica apresentaram maior conteúdo significativo de MDA do que as plantas bem irrigadas. Quando comparadas aos seus respectivos controles, plantas tratadas AEC 0144 apresentaram incremento de aproximadamente 45% no conteúdo de MDA, enquanto que plantas tratadas IPB1 apresentaram cerca de 59% (Figura 16 h). O aumento no conteúdo de MDA quando a planta está submetida a seca já é descrito em literatura (CIA et al., 2012; HASHEMINASAB et al., 2012), bem como o aumento desse composto orgânico em plantas de eucalipto submetidas a condições estressantes (ALCÂNTARA et al., 2015; BARROS JUNIOR et al., 2016).

O acúmulo de MDA demonstra que plantas tratadas apresentaram maior peroxidação lipídica e, portanto, maiores danos as suas membranas celulares. De acordo com Cia et al. (2012), tais danos podem culminar em degradação dos pigmentos fotossintéticos, prejuízos à fixação de carbono, danos a respiração celular, vazamento de eletrólitos e até mesmo morte celular. Ainda, foi possível verificar que as plantas tratadas do genótipo AEC0144 apresentaram menor conteúdo significativo de MDA do que as plantas tratadas IPB1 (Figura 16 h). Segundo Cia et al. (2012), o menor acúmulo desse composto orgânico está relacionado a genótipos com maior tolerância.

Figura 16. Parâmetros fisiológicos e bioquímicos determinados na coleta 1 (restrição hídrica) do experimento base para os diferentes tratamentos. CloA, CloB e CloT referem-se, respectivamente ao conteúdo de clorofila a, b e total (a+b). Quanto aos tratamentos, C refere-se a plantas controle, enquanto T refere-se as plantas tratadas. DH denota a coleta 1 (restrição hídrica).

Após a reidratação (coleta 2), não foram observadas diferenças estatísticas no RWC entre as plantas dos diferentes tratamentos (Figura 17 a). Em seu trabalho com *Leymus chinensis*, Xu, Zhou e Shimizu (2009) também não verificaram diferenças estatísticas entre o RWC de plantas bem irrigadas (controle) e plantas reidratadas. Também foi possível observar que não houve diferenças estatísticas entre os tratamentos com relação a temperatura foliar (Figura 17 b). Essas observações sugerem que as plantas tratadas recuperaram seu *status* hídrico com a reidratação. Tal fato corrobora com os sintomas visuais das folhas jovens após o retorno gradual da irrigação, as quais passaram de uma aparência murcha e retorcida para uma aparência túrgida (Figura 15 a,b).

Quanto ao conteúdo de clorofilas e carotenoides totais, diferenças significativas não foram observadas entre plantas tratadas e seus respectivos controles (Figura 17 c,d,e,f). Uma observação interessante quanto aos pigmentos ocorreu para a clorofila b, sendo que plantas do genótipo AEC 0144 apresentaram maior conteúdo significativo desta do que as plantas do genótipo IPB1, independentemente do regime hídrico a que estavam submetidas (Figura 17 d). A clorofila b atua auxiliando na captura de radiação luminosa e transferência energética para os centros reativos. A conversão deste pigmento em clorofila a pode ser realizada através da atuação da clorofila a oxigenase. A clorofila a, por sua vez, é fundamental para a etapa fotoquímica da fotossíntese (STREIT et al., 2005). Tal fato poderia indicar uma maior eficiência na captação de luz por parte das plantas AEC 0144, o que poderia, por sua vez, refletir em uma melhor recuperação dessas plantas, contribuindo após a reidratação para um aspecto visual mais semelhante ao seu respectivo controle, fato não observado para plantas IPB1.

Quanto a concentração de peróxido de hidrogênio, diferenças estatísticas não foram observadas entre nenhum dos tratamentos (Figura 17 g). O mesmo foi observado para o conteúdo de MDA (indicador da peroxidação lipídica), sugerindo que as plantas apresentaram recuperação deste efeito do estresse oxidativo após a reidratação (Figura 17 h). Comportamento semelhante foi identificado por Correia et al. (2014) trabalhando com clones de *E. globulus*, dos quais plantas submetidas a restrição hídrica apresentaram aumento no conteúdo de MDA, sendo observada uma reversão desta alteração após a recuperação.

Figura 17. Parâmetros fisiológicos e bioquímicos determinados na coleta 2 (reidratação) do experimento base para os diferentes tratamentos. CloA, CloB e CloT referem-se, respectivamente ao conteúdo de clorofila a, b e total (a+b). Quanto aos tratamentos, C refere-se a plantas controle, enquanto T refere-se as plantas tratadas. R denota a coleta 2 (reidratação).

Em síntese, baseando-se nas diferenças estatísticas significativas observadas e nos sintomas visuais descritos, é possível notar que para ambos os genótipos a interrupção da irrigação afetou o *status* hídrico das plantas, bem como conduziu a peroxidação lipídica. Contudo, quando tais plantas foram reidratadas, verificou-se a reversão de tais parâmetros, demonstrando, portanto, a recuperação destas. Diferenças significativas quanto a extensão dos danos oxidativos também foram notadas entre os genótipos, sendo a peroxidação lipídica menor em plantas tratadas AEC 0144 do que em plantas IPB1. Neste sentido, seria plausível sugerir que a menor peroxidação lipídica observada no clone AEC 0144 sob

restrição hídrica pode ter contribuído para uma melhor recuperação desse clone, o que justificaria o melhor aspecto visual dessas plantas perante o seu controle do que o observado para o clone IPB1.

5.3. Experimento base - Análise de metabólitos por GC-MS do material vegetal obtido

5.3.1. Visão geral do perfil metabólico primário das folhas dos clones AEC 0144 e IPB1 submetidos a restrição hídrica e reidratação

Pela técnica de GC-MS, considerando a presença em dois ou mais tratamentos, 92 metabólitos foram detectados, sendo que 42 destes não foram identificados (metabólitos descritos como NA).

A partir do dendrograma elaborado considerando todas as amostras, foi possível notar que, com exceção da repetição biológica N, todas as outras repetições biológicas e técnicas se agruparam juntamente ao seu respectivo tratamento, indicando a existência de metabólitos característicos para estes (Figura 18 a).

Analisando-se cada genótipo de maneira individual (Figura 18 a), é possível observar certa tendência de agrupamento das amostras controle (plantas bem irrigadas) da coleta 1 (referente a restrição hídrica) e coleta 2 (referente a reidratação) juntamente às amostras tratadas reidratadas (ou seja, plantas que inicialmente foram submetidas a restrição hídrica e posteriormente passaram por um período de reidratação), sugerindo a existência de um conjunto de metabólitos mais semelhante entre tais tratamentos e insinuando que a reidratação tenha surtido algum efeito.

Também é interessante verificar o grande distanciamento das amostras pertencentes ao clone AEC 0144 em restrição hídrica das demais amostras, indicando a presença de um conjunto de metabólitos demasiadamente distinto em relação aos outros tratamentos (Figura 18 a).

Já pela PCA, foi possível verificar que a soma dos dois componentes principais (PC 1 e PC 2) é responsável por explicar 40,9% da variância dos dados do modelo, sendo que *outliers* não foram observados (Figura 18 b).

Por meio da análise da PCA é possível observar para a coleta 1 que as amostras controle (IPB1C_DH, AEC144C_DH) e tratadas em restrição hídrica (IPB1T_DH, AEC144T_DH) de ambos os clones agruparam-se de modo separado, indicando que o tratamento aplicado acarretou em mudanças no perfil metabólico destas plantas. O grande distanciamento observado entre as amostras controle e tratadas do clone AEC 0144, sugerem que a restrição hídrica culminou em uma maior alteração no perfil metabólico primário revelado por GC-MS neste clone do que no clone IPB1. Também é possível notar um certo distanciamento dos grupos compostos pelas amostras tratadas de ambos os clones (IPB1T_DH e AEC0144T_DH), o que pode indicar que o perfil metabólico destas plantas submetidas a restrição hídrica seja característico de cada genótipo (Figura 18 b).

A análise da PCA também revela uma maior proximidade entre as amostras controle de ambas as coletas do clone IPB1 (IPB1C_DH e IPB1C_R), com as amostras reidratadas deste mesmo clone (IPB1T_R). A mesma tendência é observada para as amostras controles do clone AEC 0144

(AEC144C_DH e AEC144C_R) e reidratadas (AEC144T_R), embora neste último clone, tenha sido possível observar uma maior dispersão das amostras controle da coleta 1 (AEC144C_DH), indicando uma maior heterogeneidade do perfil metabólico destas (Figura 18 b).

De um modo geral, tais observações sugerem que a reidratação tenha surtido algum efeito, ou seja que as plantas apresentavam sinais de recuperação a nível metabólico após terem sido submetidas a restrição hídrica, como já mencionado na análise do dendrograma. Este efeito da reidratação, ou seja o processo de recuperação, aparenta ser mais pronunciado nas plantas do genótipo AEC 0144, uma vez que as amostras controle e reidratadas da coleta 2 (AEC144C_R e AEC144T_R) agrupam-se de maneira bem próxima, indicando que as diferenças existentes entre o perfil metabólico primário dessas plantas sejam menos discrepantes. Ainda, as amostras reidratadas de genótipos distintos (IPB1T_R e AEC144T_R) agruparam-se de maneira separada na PCA, sugerindo que o perfil metabólico das plantas submetidas inicialmente a restrição hídrica e posteriormente a reidratação é característico de cada genótipo (Figura 18 b).

Em síntese, e de um modo geral, foi possível observar pela análise do dendrograma e da PCA que as amostras distintas agruparam-se junto ao seu respectivo grupo, indicando que o perfil metabólico era característico de cada tratamento. Além disso, considerando que agrupamentos mais próximos indicam menores diferenças no perfil metabólico, sugere-se que a restrição hídrica afetou o perfil metabólico primário das plantas em ambos os clones, sendo as mudanças mais acentuadas no clone AEC 0144, bem como a reidratação surtiu efeito em ambos os clones, sendo o perfil metabólico de plantas reidratadas AEC 0144 menos discrepantes em relação ao seu respectivo controle do que plantas reidratadas do genótipo IPB1 em relação ao seu controle.

Figura 18. A) Clusterização hierárquica demonstrada na forma de dendrograma e elaborada com base na Distância Euclidiana e algoritmo ward.D, considerando as repetições biológicas e técnicas dos oito tratamentos em estudo. B) PCA 2D *Scores Plot* da comparação entre os oito grupos em estudo (considerando as repetições biológicas e técnicas). Para ambas as análises, após a denominação do clone, C_DH refere-se as amostras controle e T_DH as amostras tratadas na coleta 1 (restrição hídrica), enquanto que C_R refere-se as amostras controle e T_R as amostras tratadas na coleta 2 (após a reidratação).

5.3.2. Efeito da restrição hídrica sobre o metabolismo primário das folhas dos clones AEC 0144 e IPB1

Inicialmente, no intuito de observar a possível existência de efeitos específicos e comuns da restrição hídrica sob o metabolismo primário dos clones IPB1 e AEC 0144, elaborou-se um Diagrama de Venn (Figura 19) tomando como base todos os metabólitos diferencialmente abundantes obtidos da comparação realizada entre plantas controle e tratadas (em restrição hídrica) por meio do *volcano plot* para cada um dos genótipos (ANEXOS A e B). Juntamente ao diagrama, os metabólitos identificados para a comparação IPB1_C_DH x IPB1_T_DH (13 metabólitos) e AEC 0144_C_DH x AEC 0144_T_DH (17 metabólitos) também foram demonstrados.

Pelo diagrama é possível notar que a maior parte dos metabólitos diferencialmente abundantes responsivos à restrição hídrica são específicos de cada genótipo, sendo que apenas nove deles (15%) são

compartilhados por ambos os genótipos, sugerindo que o efeito da restrição hídrica possa ser distinto nos diferentes clones.

Ainda, a observação dos metabólitos identificados sugere que diferentes classes químicas de compostos estão sendo afetadas pela restrição hídrica imposta as plantas (Figura 19). Deste modo, a fim de ampliar tal observação, buscou-se identificar as classes químicas associadas aos metabólitos identificados diferencialmente abundantes responsivos à restrição hídrica obtidos pelas análises de *volcano plot* (ANEXOS C e D) para ambos os clones (Figura 20).

Figura 19. Diagrama de Venn elaborado com base em todos os metabólitos diferencialmente abundantes obtidos da comparação entre plantas controle e tratadas (em restrição hídrica) por meio do *volcano plot* ($p_{adj}(FDR) < 0,05$ e *fold change threshold* = 4,0) para cada um dos genótipos. Os metabólitos identificados para as duas comparações estatísticas em questão também são demonstrados.

Figura 20. Número de metabólitos identificados diferencialmente abundantes (*volcano plot*: $p_{\text{adj(FDR)}} < 0,05$ e *fold change threshold* = 4,0) que foram afetados pela restrição hídrica no clone A) IPB1 e B) AEC 0144, dispostos por classe química de compostos. Barras pretas referem-se a metabólitos que diminuíram sua abundância relativa em plantas submetidas a restrição hídrica; barras cinzas referem-se a metabólitos que aumentaram sua abundância relativa em tais plantas.

Tomando por base o número de metabólitos identificados diferencialmente abundantes para o clone IPB1, ou seja o número de metabólitos identificados que foram afetados pela condição hídrica limitante neste clone (13 metabólitos), é possível notar que aproximadamente 46% destes pertencem à classe dos açúcares ($\approx 23\%$) e polióis ($\approx 23\%$) (Figura 20, ANEXOS C). Realizando as mesmas considerações para o clone AEC 0144, é possível observar que cerca de 35% dos metabólitos afetados pela restrição hídrica pertencem à classe dos açúcares e aproximadamente 23% pertencem à classe ácido (Éster de ácido graxo) (Figura 20 b e ANEXO D).

Como é possível observar, a restrição hídrica afetou a abundância relativa de uma parcela importante de compostos associados à classe de açúcares em ambos os genótipos. Nas plantas, alterações no acúmulo de açúcares perante uma condição hídrica estressante são amplamente citadas em literatura (MANTRI et al., 2012; PERLIKOWSKI et al., 2016; GUO et al., 2018; NEMATİ et al., 2018), inclusive para espécies do gênero *Eucalyptus* (WARREN, ARANDA, CANO, 2012; CORREIA et al., 2018).

Tais alterações podem ser fruto de mudanças na partição do carbono por parte da planta, em uma tentativa desta lidar com a situação hídrica limitante a qual está submetida (WARREN, ARANDA, CANO, 2012; NEMATI et al., 2018). Sob condições estressantes, compostos relacionados a classe química dos açúcares e, mais precisamente o acúmulo destes, podem estar associados às funções osmótica ou de estabilidade de proteínas e membranas (XOCONOSTLE-CÁZARES et al., 2010; MANTRI et al., 2012; WARREN, ARANDA, CANO, 2012; PERLIKOWSKI et al., 2016; NEMATI et al., 2018).

Por outro lado, considerando as classes de metabólitos mais afetadas e as respostas específicas para um dado clone perante a restrição hídrica, é possível notar a existência de metabólitos classificados como polióis apenas no clone IPB1, enquanto metabólitos classificados como ésteres de ácido graxo são observados apenas no clone AEC 0144 (Figura 20 a, b; ANEXOS C e D).

Assim, para o clone IPB1, dois dos três polióis identificados foram classificados como inositóis, sendo eles o *allo-Inositol* e o *myo-Inositol* (Figura 20 a) (ANEXO C). Segundo Yildizli, Çevik, Ünyayar (2018), inositóis podem atuar como osmoprotetores e acredita-se que tais compostos sejam dotados da habilidade de manter o ambiente hidratado no entorno de macromoléculas, uma vez que seriam capazes de simular a estrutura da água. Outras funções creditadas aos inositóis seriam as de sinalização celular e comunicação intercelular, sendo que derivados de inositóis podem participar da regulação do cálcio nos estômatos, fato este de importância dado que tal cátion pode induzir genes responsivos a condições estressantes. Deste modo, seja exercendo a função de osmoprotetor, ou sinalizando alterações que ocorreram no meio, é plausível o fato de tais metabólitos terem aumentado sua abundância relativa perante a restrição hídrica.

Quanto ao clone AEC 0144, o metabólito *Eicosanoic acid*, descrito como um ácido graxo saturado de cadeia longa constituído por 20 carbonos (PUBCHEM, 2019) aumentou sua abundância relativa em resposta à condição hídrica limitante (Figura 20 b) (ANEXOS B e D). O aumento no conteúdo deste ácido também foi observado por Zhigacheva et al. (2013) estudando as alterações de lipídeos na membrana mitocondrial de plântulas de ervilha que foram previamente submetidas a seca. Ácidos graxos de cadeia muito longa (20-28 átomos de carbono, saturados ou insaturados) podem estar presentes em ésteres de cera cuticular cuja síntese pode ser uma das respostas da planta à condição de estresse a que está submetida, reiterando que as ceras, dentre outras funções de proteção, é capaz de evitar a desidratação da planta. Todavia, os ácidos graxos de cadeia muito longa saturados podem também estar presentes na membrana intercelular, sendo que o aumento do conteúdo destes sob situação limitante estaria atrelado a uma possível necessidade de menor fluidez para a síntese de membranas (BUSCHHAUS, JETTER, 2012; ZHIGACHEVA et al., 2013; ZHUKOV, 2018).

A determinação da origem dos ácidos graxos de cadeia muito longa (superfície ou membrana) é condicionada a realização de um processo de purificação da cutícula (ZHUKOV, 2018). No presente estudo, esse procedimento não foi realizado, o que impossibilita a determinação da origem do ácido graxo identificado. No entanto, seja participando da formação de ceras capazes de evitar a desidratação ou possibilitando que membranas celulares permaneçam sendo sintetizadas, o que garantiria a sobrevivência da planta, é coerente o fato do metabólito classificado como ácido graxo saturado de cadeia longa ter aumentado sua abundância relativa na restrição hídrica apenas no clone AEC 0144. Como já mencionado

anteriormente, esse genótipo apresentou menor peroxidação lipídica que o clone IPB1, e portanto, menores danos às suas membranas que o clone IPB1.

Uma vez que metabólitos pertencentes a diferentes classes químicas foram afetados pela restrição hídrica, e que algumas dessas classes químicas foram unicamente observadas em um clone ou em outro, torna-se de interesse a identificação das principais vias metabólicas impactadas pela condição estressante em cada um dos clones.

Assim, com base nos metabólitos identificados diferencialmente abundantes obtidos das comparações estatísticas IPB1_C_DH x IPB1_T_DH (ANEXO E) e AEC 0144_C_DH x AEC 0144_T_DH (ANEXO F) realizadas por meio do *volcano plot* e utilizados como *input* na ferramenta MetPA, foi possível verificar que a via impactada pela restrição hídrica no clone IPB1 foi a do metabolismo de inositol fosfato (*Inositol phosphate metabolism*) (Figura 21 a, Tabela 3), enquanto que para o clone AEC 0144, as vias impactadas foram a de metabolismo da galactose (*Galactose metabolism*) e de biossíntese de indol alcaloides (*Indole alkaloid biosynthesis*) (Figura 21 b, Tabela 4).

Figura 21. A) Vias metabólicas relacionadas a restrição hídrica no clone IPB1, sendo 1: *Inositol phosphate metabolism*; 2: *Ascorbate and aldarate metabolism*; 3: *Starch and sucrose metabolism*; 4: *Amino sugar and nucleotide sugar metabolism*; 5: *Histidine metabolism*; 6: *Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis*; 7: *Galactose metabolism*. Das sete vias identificadas, a via *Inositol phosphate metabolism* foi considerada como impactada pela restrição hídrica no referido clone (impacto $\geq 0,1$). B) Vias metabólicas relacionadas a restrição hídrica no clone AEC 0144, sendo 1: *Indole alkaloid biosynthesis*; 2: *Galactose metabolism*; 3: *Starch and sucrose metabolism*; 4: *Fatty acid metabolism*; 5: *Biosynthesis of unsaturated fatty acids*; 6: *Fatty acid biosynthesis*; 7: *Fatty acid elongation in mitochondria*. Das sete vias identificadas, as vias *Indole alkaloid biosynthesis* e *Galactose metabolism* foram consideradas como impactada pela restrição hídrica no referido clone (impacto $\geq 0,1$). Na figura, as vias (representadas por círculos) estão dispostas seguindo o p -valor proveniente da análise de enriquecimento (eixo Y) e o *score* de impacto (eixo X) proveniente da análise topológica. A cor dos círculos está associada ao eixo Y (onde, $-\log(p)$ menores são representados pela cor amarela, enquanto maiores são representados pela cor vermelha). Já o tamanho dos círculos refere-se ao *score* de impacto da via, sendo que quanto maior for este *score*, maior será o tamanho do círculo.

Tabela 3. Vias metabólicas relacionadas a restrição hídrica no clone IPB1 e seus correspondentes *scores* de impacto

Via Metabólica	Total ⁽¹⁾	Hits ⁽²⁾	Hit ID ⁽³⁾	-log(p)	Impacto ⁽⁴⁾
<i>Ascorbate and aldarate metabolism</i>	15	1	<i>Myoinositol</i>	2,41	0,083
<i>Histidine metabolism</i>	16	1	<i>Imidazoleacetic acid</i>	2,35	0,000
<i>Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis</i>	21	1	<i>Prephenate</i>	2,09	0,000
<i>Inositol phosphate metabolism</i>	24	1	<i>Myoinositol</i>	1,97	0,100
<i>Galactose metabolism</i>	26	1	<i>Myoinositol</i>	1,89	0,000
<i>Starch and sucrose metabolism</i>	30	1	<i>beta-D-Fructose</i>	1,76	0,029
<i>Amino sugar and nucleotide sugar metabolism</i>	41	1	<i>beta-D-Fructose</i>	1,48	0,027

(1) Número total de metabólitos na via

(2) Número de metabólitos correspondentes/ identificados na via

(3) Denominação do metabólito correspondente/ identificado na via

(4) *Score* de impacto da via**Tabela 4.** Vias metabólicas relacionadas a restrição hídrica no clone AEC 0144 e seus correspondentes *scores* de impacto

Via Metabólica	Total ⁽¹⁾	Hits ⁽²⁾	Hits ID ⁽³⁾	-log(p)	Impacto ⁽⁴⁾
<i>Biosynthesis of unsaturated fatty acids</i>	42	3	<i>Palmitic acid</i> ⁽⁵⁾ ; <i>Stearic acid</i> ⁽⁶⁾ ; <i>Arachidic acid</i> ⁽⁷⁾	6,05	0,000
<i>Galactose metabolism</i>	26	2	<i>Sucrose</i> ; <i>Melibiose</i>	4,35	0,133
<i>Fatty acid biosynthesis</i>	49	2	<i>Stearic acid</i> ; <i>Palmitic acid</i>	3,15	0,000
<i>Indole alkaloid biosynthesis</i>	7	1	<i>Secologanin</i>	3,04	0,200
<i>Fatty acid elongation in mitochondria</i>	13	1	<i>Palmitic acid</i>	2,44	0,000
<i>Starch and sucrose metabolism</i>	30	1	<i>Sucrose</i>	1,65	0,057
<i>Fatty acid metabolism</i>	34	1	<i>Palmitic acid</i>	1,54	0,027

(1) Número total de metabólitos na via

(2) Número de metabólitos correspondentes/ identificados na via

(3) Denominação do metabólito correspondente/ identificado na via

(4) *Score* de impacto da via(5) Sinônimo de ácido hexadecanoico (*Hexadecanoic acid*)(6) Sinônimo de ácido octadecanoico (*Octadecanoic acid*)(7) Sinônimo de ácido eicosanoico (*Eicosanoic acid*)

A via do metabolismo de inositol fosfato (*Inositol phosphate metabolism*) contempla conversões de fosfato-inositóis por meio da atuação de enzimas fosfatases e quinases (THE SMALL MOLECULE PATHWAY DATABASE - SMPDB, 2019a). O metabólito identificado que serviu de base para identificação dessa via como impactada foi o *myo-Inositol* (Tabela 3). Como discutido anteriormente, tal metabólito é classificado como um poliól e os metabólitos identificados diferencialmente abundantes pertencentes à classe química dos polióis (particularmente inositóis) tiveram expressiva importância no clone IPB1. De acordo com SMPDB (2019a) e Williams (2011), em eucariotos, os fosfato-inositóis estão associados a sinalização celular, sendo de suma importância para processos de crescimento, diferenciação, morte celular programada, dentre outros. As várias funções desempenhadas por tais moléculas implicam em uma alta regulação deste metabolismo.

Por outro lado, para o clone AEC 0144, uma das vias impactadas foi a de metabolismo da galactose (*Galactose metabolism*), via esta que contempla a conversão do açúcar galactose em outros açúcares e seus intermediários. Por essa via, produtos finais como glicose, frutose e galactose podem também ter origem a partir da conversão de outros di, tri e tetrassacarídeos. Ainda, a via engloba a conversão de álcoois de açúcares em produtos como, por exemplo, o *myo*-inositol. Os produtos finais e intermediários desta via atuam como substrato para diversos processos metabólicos (SMPDB, 2019b). Os metabólitos identificados que auxiliaram na identificação dessa via como impactada foram os açúcares *sucrose* e *melibiose* (Tabela 4). De fato, como já mencionado, muitos metabólitos diferencialmente abundantes identificados no clone AEC 0144 são pertencentes à classe química dos açúcares. Assim sendo, não é surpreendente que vias que contemplem inúmeras conversões baseadas nesses compostos fossem impactadas pela restrição hídrica no referido clone, uma vez que, segundo Perlikowski et al. (2016), estes podem atuar como osmólitos e osmoprotetores.

Por fim, outra via impactada pela restrição hídrica no clone AEC 0144 foi a de biossíntese de indol alcaloides (*Indole alkaloid biosynthesis*), sendo que o *secologanin* foi o metabólito que serviu de base para identificação dessa (Tabela 4). Grande parte dos indol alcaloides são sintetizados a partir do triptofano e do monoterpênóide secologanina (*secologanin*) (METACYC, s.d.). Alcalóides são descritos como associados a funções de proteção aos ataques de patógenos e herbívoros, além de participação em processos antioxidativos, auxiliando dessa forma a planta. Nesse sentido, é descrito em literatura que condições estressantes, como por exemplo estresse oxidativo, podem culminar na produção de alcaloides (MATSUURA, RAU, FETT-NETO, 2014), sendo plausível, portanto, o fato desta via ser impactada perante a condição restritiva.

De um modo geral, é possível notar que a restrição hídrica impactou vias distintas nos dois clones em estudo, o que torna de interesse uma observação mais detalhada acerca dos metabólitos presentes nessas. Tal fato será realizado mais adiante neste trabalho.

5.3.3. Efeito da reidratação sobre o metabolismo primário das folhas dos clones AEC 0144 e IPB1

Assim como realizado para a restrição hídrica, no intuito de observar a possível existência de efeitos específicos e comuns acarretados pela reidratação no metabolismo primário dos clones IPB1 e AEC 0144, elaborou-se um Diagrama de Venn (Figura 22). Este diagrama foi elaborado tomando como base todos os metabólitos diferencialmente abundantes obtidos da comparação realizada entre plantas controle e tratadas (reidratadas) por meio do *volcano plot* para cada um dos genótipos (ANEXOS G e H). Os metabólitos identificados para a comparação IPB1_C_R x IPB1_T_R e AEC 0144_C_R x AEC 0144_T_R também foram demonstrados.

Pela análise do diagrama, do mesmo modo que revelado para a condição de restrição hídrica, pode-se observar que a maior parte dos metabólitos diferencialmente abundantes responsivos à

reidratação, e consequentemente associados ao processo de recuperação, são específicos de cada clone. Apenas três deles (10,7%) são compartilhados por ambos os genótipos, sugerindo que o efeito da reidratação possa ser distinto nos diferentes clones (Figura 22).

No intuito de ampliar as informações acerca dos metabólitos identificados responsivos à reidratação (Figura 22), realizou-se a identificação das classes químicas destes (Figura 23, ANEXOS I e J).

Para o clone IPB1, dos 21 metabólitos diferencialmente abundantes responsivos à reidratação, apenas dez puderam ser identificados (Figura 22) e associados a alguma classe química. Deste modo, neste clone, 50% dos metabólitos identificados estavam associados a açúcares ou compostos relacionados a estes. Ainda, foi possível perceber que dentre as classes de metabólitos que apresentaram acúmulo diferencial na reidratação em relação à condição controle estavam os polióis, sendo estes representados por um inositol (Figura 23 a; ANEXO I). Ambas as classes químicas de metabólitos (açúcares e polióis/ inositóis) também foram afetadas pela restrição hídrica neste clone.

Como já mencionado, açúcares e inositóis podem, dentre outras funções, atuar como osmoprotetores. Estes compostos podem auxiliar no reparo de prejuízos, considerando também que durante o período de estresse os osmoprotetores podem atuar estabilizando a membrana e protegendo a síntese proteica dos danos oxidativos, contribuindo, assim, para uma maior taxa de reparo e uma recuperação mais rápida (PERLIKOWSKI et al., 2016; YILDIZLI, ÇEVİK, ÜNYAYAR, 2018; WEDEKING et al., 2018).

Já para o clone AEC 0144, dos dez metabólitos diferencialmente abundantes responsivos à reidratação, apenas três: frutose, o monoterpenóide *secologanin* cuja função foi mencionada no item 5.3.2 e o acil graxo *6-oxo-Prostaglandin F1A*, puderam ser identificados (Figura 22) e relacionados a alguma classe química (Figura 23 b, ANEXO J).

Com base na menor discrepância do perfil metabólico observado entre plantas controle (mantidas bem irrigadas ao longo de todo o experimento) e tratadas (plantas que passaram pela restrição hídrica e posteriormente pela reidratação), indica-se que o clone AEC 0144 demonstrou uma melhor recuperação que o clone IPB1, observação essa já mencionado pela análise da PCA (item 5.3.1). Nesse ponto, é interessante ressaltar que plantas do grupo AEC 0144 reidratadas apresentaram um aspecto visual mais semelhante ao seu respectivo controle do que as plantas reidratadas IPB1, como já discutido no item 5.2.

Contudo, Wedeking et al. (2018) trabalhando com raízes e folhas de plantas de *Beta vulgaris* L. (cultivar Pauletta) submetidas à seca por 13 dias e reidratadas por outros 12 dias, observaram que as principais alterações metabólicas desencadeadas pela condição limitante perduraram por até três dias do início da reidratação. Os mesmos autores pontuam que durante a recuperação, a planta deve lidar com os danos causados pela situação estressante e se preparar para reativar processos fundamentais como respiração e fotossíntese, primando por diferentes estratégias. Tais estratégias seriam: 1) investir em crescimento e reprodução, 2) manter ambos reduzidos e manter uma espécie de memória do estresse, estando pronta para eventuais situações estressantes que possam vir a ocorrer ou 3) atingir uma

recuperação intermediária. Os autores ainda salientam que durante o período da recuperação um novo estado de equilíbrio a nível fisiológico e metabólico é atingido.

Nesse sentido, uma estratégia interessante para determinar se as alterações observadas no clone IPB1 após a reidratação (alterações estas inclusive no metabolismo de açúcares e inositóis, já afetados durante a restrição hídrica nesse clone) poderiam ser decorrentes de um novo estado de equilíbrio atingido após o estresse ou de uma demanda por um período mais longo de recuperação (a fim de que os compostos atingissem o seu nível inicial) envolveria a existência de um maior número de pontos de coletas avançados ao longo do tempo após a reidratação. No entanto, tal procedimento seria impraticável no presente trabalho devido à escassez do material vegetal disponível para coleta.

Figura 22. Diagrama de Venn elaborado com base em todos os metabólitos diferencialmente abundantes obtidos da comparação entre plantas controle e tratadas (reidratadas) por meio do *volcano plot* ($p_{adj}(\text{FDR}) < 0,05$ e *fold change threshold* = 4,0) para cada um dos genótipos. Os metabólitos identificados para as duas comparações estatísticas em questão também são demonstrados.

Figura 23. Número de metabólitos identificados diferencialmente abundantes (*volcano plot*: $p_{\text{adj}}(\text{FDR}) < 0,05$ e *fold change threshold* = 4,0) associados a reidratação no clone A) IPB1 e B) AEC 0144, dispostos por classe química de compostos. Barras pretas referem-se a metabólitos que diminuíram sua abundância relativa em plantas reidratadas; barras cinzas referem-se a metabólitos que aumentaram sua abundância relativa em tais plantas.

Uma outra perspectiva de análise dos metabólitos associados à reidratação nos dois clones em estudo foi a identificação das vias metabólicas responsivas à esta condição. Para tanto, utilizou-se como *input* na ferramenta MetPA os metabólitos identificados diferencialmente abundantes obtidos das comparações estatísticas IPB1_C_R x IPB1_T_R (ANEXO K) e AEC 0144_C_R x AEC 0144_T_R (ANEXO L) realizadas por meio do *volcano plot*. Os resultados obtidos revelaram que a via responsiva à reidratação em plantas do clone IPB1 foi a do metabolismo de amido e açúcares (*Starch and sucrose metabolism*) (Figura 24 a, Tabela 5), enquanto que para o clone AEC 0144, assim como ocorreu na restrição hídrica, a via responsiva foi a de biossíntese de indol alcaloides (*Indole alkaloid biosynthesis*) (Figura 24 b, Tabela 6).

Os metabólitos que contribuíram para a identificação da via do metabolismo de amido e açúcares (*Starch and sucrose metabolism*) (Figura 24 a, Tabela 5) como responsiva foram os açúcares solúveis sacarose e frutose. De acordo com Rosa et al. (2009), alterações em fatores ambientais como a água podem culminar em mudanças na assimilação de CO₂, eficiência fotossintética, redução no suprimento de açúcares solúveis e alteração na partição do carbono. De fato, como já mencionado para a condição de

reidratação, 50% dos metabólitos identificados diferencialmente abundantes entre plantas controle e plantas que passaram inicialmente por um período de estresse seguido de reidratação no clone IPB1 eram pertencentes à classe química dos açúcares ou compostos relacionados a estes.

Já para o clone AEC 0144, assim como ocorreu na restrição hídrica (item 5.3.2), o metabólito que auxiliou na identificação da via de biossíntese de indol alcaloides (*Indole alkaloid biosynthesis*) como responsiva foi o *secologanin* (Figura 24 b, Tabela 6).

Novamente é possível observar que, assim como ocorreu para a restrição hídrica, as vias responsivas à reidratação das plantas foram distintas nos clones em estudo, o que torna de interesse uma observação mais detalhada acerca dos metabólitos presentes nessas.

Figura 24. A) Vias relacionadas a reidratação no clone IPB1, sendo 1: *Starch and sucrose metabolism*; 2: *Galactose metabolism*; 3: *Amino sugar and nucleotide sugar metabolism*; 4: *Biosynthesis of unsaturated fatty acids*. Das quatro vias identificadas, a via *Starch and sucrose metabolism* foi considerada como impactada em plantas reidratadas do referido clone (impacto $\geq 0,085$ e 2 bits). B) Vias relacionadas a reidratação no clone AEC 0144, sendo 1: *Indole alkaloid biosynthesis*; 2: *Starch and sucrose metabolism*; 3: *Amino sugar and nucleotide sugar metabolism*. Das três vias identificadas, a via *Indole alkaloid biosynthesis* foi considerada como impactada pela reidratação no referido clone (impacto $\geq 0,1$). Na figura, as vias (representadas por círculos) estão dispostas seguindo o p -valor proveniente da análise de enriquecimento (eixo Y) e o score de impacto (eixo X) proveniente da análise topológica. A cor dos círculos está associada ao eixo Y ($-\log(p)$) menores são representados pela cor amarela, enquanto maiores são representados pela cor vermelha). Já o tamanho dos círculos refere-se ao score de impacto da via, sendo que quanto maior for este score, maior será o tamanho do círculo.

Tabela 5. Vias metabólicas relacionadas a plantas reidratadas do clone IPB1 e seus correspondentes *scores* de impacto

Via metabólica	Total ⁽¹⁾	Hits ⁽²⁾	Hits ID ⁽³⁾	-log(<i>p</i>)	Impacto ⁽⁴⁾
<i>Starch and sucrose metabolism</i>	30	2	<i>beta-D-Fructose; Sucrose</i>	4,58	0,086
<i>Galactose metabolism</i>	26	1	<i>Sucrose</i>	2,02	0,067
<i>Amino sugar and nucleotide sugar metabolism</i>	41	1	<i>beta-D-Fructose</i>	1,59	0,027
<i>Biosynthesis of unsaturated fatty acids</i>	42	1	<i>Arachidic acid</i> ⁽⁵⁾	1,57	0,000

(1) Número total de metabólitos na via

(2) Número de metabólitos correspondentes/ identificados na via

(3) Denominação do metabólito correspondente/ identificado na via

(4) *Score* de impacto da via(5) Sinônimo de ácido eicosanoico (*Eicosanoic acid*)**Tabela 6.** Vias metabólicas relacionadas a plantas reidratadas do clone AEC 0144 e seus correspondentes *scores* de impacto

Via metabólica	Total ⁽¹⁾	Hits ⁽²⁾	Hits ID ⁽³⁾	-log(<i>p</i>)	Impacto ⁽⁴⁾
<i>Indole alkaloid biosynthesis</i>	7	1	<i>Secologanin</i>	4,12	0,200
<i>Starch and sucrose metabolism</i>	30	1	<i>beta-D-Fructose</i>	2,68	0,029
<i>Amino sugar and nucleotide sugar metabolism</i>	41	1	<i>beta-D-Fructose</i>	2,38	0,027

(1) Número total de metabólitos na via

(2) Número de metabólitos correspondentes/ identificados na via

(3) Denominação do metabólito correspondente/ identificado na via

(4) *Score* de impacto da via

5.3.4. Metabólitos primários presentes nas vias metabólicas responsivas à restrição hídrica e reidratação

Com o propósito de ampliar as observações acerca das vias metabólicas consideradas como impactadas (identificadas pela ferramenta MetPA com *score* de impacto $\geq 0,1$ ou *score* $\geq 0,085$ e mais de um *hit*), utilizou-se de uma segunda abordagem, baseada na tentativa de localizar em tais vias os metabólitos identificados diferencialmente abundantes provenientes de cada uma das quatro análises estatísticas: 1) IPB1_C_DH x IPB1_T_DH, 2) IPB1_C_R x IPB1_T_R, 3) AEC 0144_C_DH x AEC0144_T_DH e 4) AEC 0144_C_R x AEC 0144_T_R (ANEXOS E, F, K e L). Para tanto, utilizou-se como referência as vias do KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) para o *Arabidopsis thaliana* (*thale cress*), além de informações sobre a abundância relativa dos metabólitos nas diferentes comparações estatísticas (Figuras 25, 26, 27, 28).

00500 2/9/17
(c) Kanehisa Laboratories

Figura 25. Metabólitos, pertencentes a via de metabolismo de amido e sacarose, identificados nos clone IPB1 e AEC 0144 que variaram sua abundância relativa em relação a restrição hídrica e/ ou reidratação (destacados em amarelo). Setas coloridas para cima indicam aumento na abundância relativa do metabólito perante o tratamento imposto (restrição hídrica ou reidratação); setas para baixo indicam redução em relação a abundância relativa. Setas azuis referem-se a comparação estatística IPB1_C_DH x IPB1_T_DH, vermelhas a IPB1_C_R x IPB1_T_R, rosas a AEC 0144_C_DH x AEC 0144_T_DH e verdes a AEC 0144_C_R x AEC 0144_T_R.

Figura 26. Metabólitos, pertencentes a via de metabolismo de galactose, identificados nos clone IPB1 e AEC 0144 que variaram sua abundância relativa em relação a restrição hídrica e/ ou reidratação (destacados em amarelo). Setas coloridas para cima indicam aumento na abundância relativa do metabólito perante o tratamento imposto (restrição hídrica ou reidratação); setas para baixo indicam redução em relação a abundância relativa. Setas azuis referem-se a comparação estatística IPB1_C_DH x IPB1_T_DH, vermelhas a IPB1_C_R x IPB1_T_R, rosas a AEC 0144_C_DH x AEC 0144_T_DH e verdes a AEC 0144_C_R x AEC0144_T_R.

00562 8/15/18
(c) Kanehisa Laboratories

Figura 27. Metabólitos, pertencentes a via de metabolismo do inositol fosfato, identificados no clone IPB1 e que variaram sua abundância relativa em relação a restrição hídrica e/ ou reidratação (destacados em amarelo). Setas coloridas para cima indicam aumento na abundância relativa do metabólito perante o tratamento imposto (restrição hídrica ou reidratação). Setas azuis referem-se a uma comparação estatística IPB1_C_DH x IPB1_T_DH, enquanto a vermelha refere-se a uma comparação IPB1_C_R x IPB1_T_R. Metabólitos pertencentes a esta via não foram identificados no clone AEC 0144.

Figura 28. Metabólito, pertencente a via de biossíntese de indol alcaloides, identificado no clone AEC 0144 e que variou sua abundância relativa em relação a restrição hídrica e/ ou reidratação (destacado em amarelo). A seta colorida para cima indica aumento na abundância relativa do metabólito perante o tratamento imposto; a seta para baixo indica redução em relação a abundância relativa. A seta rosa refere-se a comparação estatística AEC 0144_C_DH x AEC 0144_T_DH e a verde a comparação AEC 0144_C_R x AEC0144_T_R. Metabólitos pertencentes a esta via não foram identificados no clone IPB1.

É notável que duas das quatro vias afetadas demonstradas anteriormente englobam conversões de açúcares, reiterando que o metabolismo de carboidratos foi afetado nos diferentes clones e nas diferentes condições hídricas. Observando a via do metabolismo de amido e sacarose e a via de galactose, é possível notar que durante a restrição hídrica o clone IPB1 diminuiu a abundância do monossacarídeo frutose, enquanto que o clone AEC 0144 aumentou a abundância relativa dos dissacarídeos sacarose, isomaltose e melibiose (Figuras 25 e 26).

Nemati et al. (2018) trabalhando com cultivares de *Triticum aestivum* L. submetidos a restrição hídrica por sete dias, sendo um deles o cultivar Sirvan, considerado tolerante e o Marvdasht, considerado sensível a seca, observaram que o primeiro demonstrou um acentuado incremento no conteúdo de sacarose durante a condição hídrica limitante. Já Guo et al. (2018) trabalhando com genótipos suscetíveis e tolerantes de trigo submetidos a um período de 15 dias de estresse hídrico observaram acúmulo de osmólitos pertencentes à classe dos açúcares, dentre eles a sacarose, no genótipo tolerante.

No caso do presente trabalho, é interessante notar que o genótipo que apresentou menor conteúdo de MDA na restrição hídrica, ou seja, menor peroxidação lipídica, foi justamente aquele que exibiu um aumento na abundância relativa dos dissacarídeos em resposta a tal condição limitante.

De acordo com Warren, Aranda e Cano (2012), os mecanismos de ajuste osmótico no eucalipto envolvem fortemente a participação de carboidratos das classes monossacarídeos e dissacarídeos. Assim sendo, frutose, sacarose e melibiose são exemplos de metabólitos que podem ser induzidos pela seca e que são capazes de atuar como osmoprotetores (PERLIKOWSKI et al., 2016; GUO et al., 2018).

Como já citado, os osmoprotetores atuam no ajuste osmótico por meio da diminuição do potencial celular (WARREN, ARANDA, CANO, 2012), bem como podem atuar na estabilidade de proteínas e membranas. A sacarose é um exemplo de composto capaz de exercer esta função, protegendo a célula dada sua capacidade de formar uma espécie de “vidro” no interior desta. No período de recuperação, os osmoprotetores que atuam na estabilidade membranar podem ser substituídos pela água, fazendo com que as membranas aos poucos recobrem suas funções (XOCONOSTLE-CÁZARES et al., 2010; MANTRI et al., 2012; PERLIKOWSKI et al., 2016; NEMATİ et al., 2018).

Após a reidratação, foi observada para o clone IPB1 diminuição na abundância relativa da sacarose em plantas tratadas quando estas foram comparadas às plantas controle. Por outro lado, para o clone AEC 0144 metabólitos classificados como dissacarídeos não foram diferencialmente abundantes entre plantas controle e tratadas (reidratadas), salientando que estes (dentre eles a sacarose) haviam apresentado alteração em sua abundância relativa durante a restrição hídrica.

Perlikowski et al. (2016) trabalhando com duas formas introgressivas de *Lolium multiflorum*/*Festuca arundinacea* submetidas a deficiência hídrica por 11 dias, seguida de outros 10 dias de reidratação observaram que após esta última houve, em ambas as formas, diminuição na abundância da sacarose, o que poderia estar relacionado a uma necessidade de retomada da atividade celular e crescimento por parte da planta.

Nesse sentido, tais fatos observados suscitam a ideia de que o perfil metabólico do clone AEC 0144 estaria retornando às condições iniciais, o que, por sua vez, poderia indicar que as funções

metabólicas estão sendo retomadas neste genótipo. Tais evidências estariam de acordo com o menor número de metabólitos diferencialmente abundantes observados para este genótipo (quando plantas controle foram contrastadas com plantas reidratadas) do que para o genótipo IPB1 (em relação ao mesmo tipo de comparação realizada), fato este já discutido anteriormente (item 5.3.3).

Quanto a outros compostos, duas vias das quatro impactadas (metabolismo de galactose e metabolismo do inositol fosfato) apresentaram inositóis (*myo-inositol* e/ou *scyllo-inositol*) que demonstraram variação em sua abundância relativa no clone IPB1 (Figuras 26 e 27). Assim, quando plantas tratadas e controle do clone IPB1 foram comparadas, verificou-se aumento da abundância relativa do *myo-inositol* e *scyllo-inositol* na restrição hídrica, sendo que este último não retornou a sua abundância inicial após a reidratação. Resultados semelhantes foram encontrados por Correia et al. (2018) estudando o efeito da seca e do calor, de modo individual e combinado, em *Eucalyptus globulus*. Tais autores observaram que o conteúdo de inositol aumentou em resposta a ambas condições estressantes e que este manteve-se alto mesmo após a recuperação em plantas que anteriormente haviam sido submetidas a seca e a combinação de seca e calor.

Os resultados obtidos poderiam insinuar que os inositóis estariam atuando como sinalizadores das alterações hídricas. Como já mencionado, o inositol está associado a diversas funções, as quais vão desde a participação em processos de sinalização celular até osmoproteção, dado que este é capaz de se ligar as moléculas de água (uma vez que podem ocorrer substituições entre os grupos hidroxila destas moléculas) auxiliando a célula a manter-se túrgida (PERLIKOWSKI et al., 2016; YILDIZLI, ÇEVİK, ÜNYAYAR, 2018).

Por fim, outra via afetada pelos diferentes regimes hídricos no clone AEC 0144 foi a de biossíntese de indol alcaloides (*Indole alkaloid biosynthesis*). O metabólito identificado como diferencialmente abundante pertencente a essa via foi a secologanina (*secologanin*), o qual aumentou em abundância na restrição hídrica e diminuiu em abundância na reidratação quando plantas tratadas foram comparadas a plantas controle (Figura 28).

Nas plantas, de acordo com Robinson (1974), Irmiler et al. (2000) e como pode ser observado pela Figura 28, a secologanina e o triptofano dão origem a muitos indol alcaloides. Os alcaloides são metabólitos secundários relacionados à função de defesa contra patógenos e herbivoria, podendo também apresentar propriedades antioxidantes graças a sua estrutura química (grupos hidroxilas, anel indol que contém nitrogênio e duplas ligações), bem como servirem de substrato para enzimas peroxidases, as quais tem capacidade de detoxificar o peróxido de hidrogênio, espécie reativa capaz de causar danos ao material genético e membranas (MATSUURA, RAU, FETT-NETO, 2014).

Deste modo, as variações na abundância relativa da secologanina observadas para o clone AEC 0144 poderiam sugerir que a via de biossíntese de indol alcaloides foi estimulada como um mecanismo de defesa antioxidante. Neste sentido, é interessante ressaltar que perante esta condição limitante, o clone AEC 0144 apresentou menor conteúdo de MDA que o clone IPB1 e, conseqüentemente, menor peroxidação lipídica. Embora diferenças estatísticas não tenham sido observadas quanto ao conteúdo de peróxido de hidrogênio em plantas de ambos os clones sob restrição hídrica, é possível observar que este

valor foi cerca de 19% superior em plantas do clone IPB1. Diante do exposto, os alcaloides poderiam estar contribuindo para tal ocorrência.

5.3.5. Sumário das análises de metabólitos primários obtidos por GC-MS

De um modo geral, é possível observar que a restrição hídrica e a reidratação afetaram o perfil metabólico dos dois clones em estudo (AEC 0144 e IPB1) e culminaram em efeitos distintos no metabolismo primário destes, corroborando com o achado de vias metabólicas distintas serem impactadas nestes quando submetidos a tais situações.

No tocante aos metabólitos pertencentes à classe química dos açúcares, é interessante notar que a restrição hídrica afetou a abundância relativa destes em ambos os clones. Todavia, quando plantas controle foram comparadas a plantas tratadas, o clone IPB1 apresentou diminuição da abundância relativa de alguns monossacarídeos, enquanto que no clone AEC 0144 os dissacarídeos aumentaram em abundância mediante a condição limitante.

Quanto aos resultados observados especificamente para um único clone, verificou-se que a restrição hídrica afetou a abundância relativa de ésteres de ácido graxo, além de aumentar a abundância relativa de um metabólito classificado como monoterpenóide no clone AEC 0144, enquanto que para o clone IPB1, tanto a restrição hídrica quanto a reidratação, afetaram a abundância relativa de metabólitos classificados como polióis (em especial inositóis).

Por fim, considerando o número de metabolitos diferencialmente abundantes e o perfil metabólico demonstrados ao longo da explanação sobre as análises de GC-MS, seria plausível supor que plantas do clone AEC 0144 reidratadas apresentaram uma recuperação mais efetiva que as plantas do clone IPB1 reidratadas.

Tais fatos, como já discutido ao longo das análises dos metabólitos primários, corroboram com o menor dano às membranas observado para as plantas do clone AEC 0144 submetidas a restrição hídrica, bem como ao aspecto visual mais próximo dessas plantas ao seu respectivo controle quando reidratadas, fatores estes não válidos para o clone IPB1.

5.4. Experimento base - Análise de metabólitos por LC-MS do material vegetal obtido

5.4.1. Visão geral do perfil metabólico secundário das folhas dos clones AEC 0144 e IPB1 submetidos a restrição hídrica e reidratação

Pela técnica de LC-MS, considerando a presença em dois ou mais tratamentos, foram detectados 1.328 variáveis (prováveis metabólitos).

A fim de se obter uma visão geral acerca dos prováveis metabólitos secundários afetados em ambos clones submetidos a diferentes condições hídricas (controle, em restrição hídrica e reidratação)

foram também realizadas análises de clusterização, bem como análises multivariadas (PLS-DA e identificação de VIPs).

O dendrograma obtido considerando os oito tratamentos em análise (Figura 29 a) demonstra a nítida formação de dois grandes agrupamentos, sendo um formado pelo genótipo IPB1 (parte superior da Figura 29 a) e outro formado pelo genótipo AEC 0144 (parte inferior da Figura 29 a), apontando, assim, a presença de um conjunto de metabólitos distintos para cada genótipo. Outro agrupamento visível dentro de cada genótipo é a separação existente entre plantas tratadas e plantas controle, as quais, de um modo geral, localizaram-se em grupos distintos independentemente da coleta (de restrição hídrica ou reidratação). Por fim, com exceção de uma única repetição técnica de uma planta controle submetida a restrição hídrica do clone AEC 0144, houve agrupamento das amostras junto ao seu respectivo tratamento. Tal fato indica que cada tratamento possui um conjunto de metabólitos característicos, bem como aponta a reprodutibilidade da técnica.

Já pela Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) (Figura 29 b), a soma dos dois componentes principais é responsável por explicar 56,7% da separação dos dados do modelo. Baseando-se na validação cruzada da PLS-DA, verificou-se que os três primeiros componentes do modelo explicaram 61,4% da separação observada entre os tratamentos e que os valores de R^2 e Q^2 foram, respectivamente, iguais a 0,99645 e 0,99378. De acordo com Teng (2013), o R^2 reflete a qualidade do modelo, enquanto que Q^2 mede a previsibilidade deste.

Assim, verifica-se pela PLS-DA que as amostras estão separadas no primeiro componente pelo genótipo e no segundo componente pelas categorias de planta controle ou tratadas (em restrição hídrica ou reidratação), indicando a presença de metabólitos característicos que explicam a existência de diferenças entre os tratamentos. Analisando cada genótipo de modo individual, é possível notar que as amostras provenientes de plantas controle das coletas 1 e 2 (restrição hídrica e reidratação, respectivamente) agruparam-se próximas, indicando um perfil metabólico menos discrepante, assim como ocorreu para as amostras tratadas (Figura 29 b).

Ainda, a maior separação observada entre os diferentes grupos (em especial plantas controle e tratadas) do clone IPB1 do que a verificada entre os grupos do clone AEC 0144, pode sugerir que os diferentes regimes hídricos tiveram um efeito mais pronunciado sobre o perfil metabólico secundário para o primeiro clone (Figura 29 b).

A partir da PLS-DA obteve-se a Importância da Variável na Projeção (VIP) (Figura 30). A análise de VIPs serviu como base para identificar as 25 m/z com maior contribuição para a separação de grupos. Observando tais m/z apresentadas, é possível verificar a existência de diferenças nas intensidades destas entre os tratamentos e, em especial, entre genótipos.

Deste modo, a análise de VIPs, bem como as análises de clusterização hierárquica e PLS-DA, indicam que o metabolismo secundário é altamente específico do clone e da condição hídrica imposta a este, corroborando com o já reportado por Arbona et al. (2013).

A próxima etapa de análise consistiu, então, na elucidação estrutural das VIPs (Tabela 7, ANEXO M).

Figura 29. A) Dendrograma, construído com base na Distância Euclidiana e algoritmo ward.D. Tal clusterização hierárquica considera as repetições biológicas e técnicas dos oito tratamentos em análise. Uma repetição técnica de cada uma das seguintes amostras: K_AEC144T_DH e P_IPB1C_DH, foram classificadas como *outliers* com o auxílio da PCA e foram removidas, não sendo, portanto, demonstradas. B) PLS-DA 2D *Scores Plot* da comparação entre os oito grupos em estudo (considerando as repetições biológicas e técnicas sem *outliers*)

Figura 30. Análise de VIPs. Os prováveis metabólitos são representados pelas respectivas m/z . Na figura, cores mais quentes indicam maior abundância de um dado metabólito para o respectivo tratamento, enquanto cores mais frias indicam o oposto.

Tabela 7. Elucidação estrutural das VIPs obtidas considerando todos os tratamentos (plantas controle e tratadas - em restrição hídrica ou reidratação) de ambos os genótipos

(continua)

RT (min) ⁽¹⁾	m/z ⁽²⁾	Grupo ⁽³⁾	Maior abundância ⁽⁴⁾	Nome	Classe de compostos orgânicos	Cód. Banco	VIP score
3,2845	295,1765	AEC 0144	AEC 0144_C_DH	<i>Ginsenoside B</i>	<i>Chlorohydrins</i>	HMDB0039134	1,7556
3,4774	677,3234	AEC 0144	AEC 0144_C_DH	<i>Artonin D</i>	<i>2'-hydroxychalcones</i>	HMDB0035961	1,7937
3,5963	495,0782	AEC 0144	AEC 0144_C_DH	Não elucidado estruturalmente	Não identificado	-	1,7983
4,0456	617,1147	IPB1	IPB1_T_DH	<i>6"-O-Galloylquercimeritrin</i>	<i>Flavonoid-7-o-glycosides</i>	HMDB0033593	1,7981
4,2434	611,1599	AEC 0144	AEC 0144_T_R	<i>Quercetin 3-O-rutinoside/ Rutin</i>	<i>Flavonoid-3-o-glycosides</i>	HMDB0003249	1,8302
4,3972	601,1192	IPB1	IPB1_T_R	<i>Kaempferol 7-(6"-galloylglucoside)</i>	<i>Flavonoid-7-o-glycosides</i>	HMDB0037439	1,7489
4,8799	595,1577	AEC 0144	AEC 0144_T_R	<i>Kaempferol-3-O-rutinoside/ Nicotiflorin</i>	<i>Kaempferol O-glucoside</i>	CID: 5318767	1,8690
4,9304	827,3342	AEC 0144	AEC 0144_C_DH	Não elucidado estruturalmente	Não identificado	-	1,7467
6,7122	481,1718	IPB1	IPB1_T_R	<i>PA(8:0/12:0)</i>	<i>1,2-diacylglycerol-3-phosphates</i>	HMDB0115483	1,7205
6,8018	835,2672	AEC 0144	AEC 0144_C_DH	<i>L-Tyrosylglycyl-L-threonyl-L-seryl-L-histidyl-L-leucyl-L-alanyl-L-serine</i>	-	918405-62-6 DTXSID20846088	1,7848
7,0419	913,3732	IPB1	IPB1_T_R	<i>PI(22:5(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z)/18:0)</i>	<i>Phosphatidylinositols</i>	HMDB0009917	1,8223
7,1298	487,2543	AEC 0144	AEC 0144_T_R	<i>PA(20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)e/2:0)</i>	<i>1-alkyl,2-acylglycerophosphates</i>	HMDB0011156	1,7710
7,1331	522,2921	AEC 0144	AEC 0144_T_R	Não elucidado estruturalmente	Não identificado	-	1,8097
7,1347	527,2483	AEC 0144	AEC 0144_C_DH	<i>(24E)-15alpha-Acetoxy-3alpha-hydroxy-23-oxo-7,9(11),24-lanostatrien-26-oic acid</i>	<i>Triterpenoids</i>	HMDB0035387	1,7839
7,1518	505,2666	AEC 0144	AEC 0144_C_DH	Não elucidado estruturalmente	Não identificado	-	1,7314
7,3195	617,2152	AEC 0144	AEC 0144_T_DH	Não elucidado estruturalmente	Não identificado	-	1,8402
7,3944	633,1821	IPB1	IPB1_T_R	Não elucidado estruturalmente	Não identificado	-	1,7357
7,4530	631,2016	IPB1	IPB1_T_R	<i>Brassica napus non-fluorescent chlorophyll catabolite 3</i>	<i>Tetrapyrroles and derivatives</i>	HMDB0040917	1,8269
7,6003	521,2014	IPB1	IPB1_T_R	<i>Myricanol 5-glucoside</i>	<i>Meta,meta-bridged biphenyls</i>	HMDB0036525	1,7634
7,6378	553,1337	IPB1	IPB1_T_R	<i>1-Hydroxy-3-methoxy-7-primeverosyloxyxanthone</i>	<i>Xanthones</i>	HMDB0030870	1,7316
7,7102	371,1697	AEC 0144	AEC 0144_C_DH	Não elucidado estruturalmente	Não identificado	-	1,7385

(conclusão)

RT (min)* ¹	<i>m/z</i> * ²	Grupo* ³	Maior abundância* ⁴	Nome	Classe de compostos orgânicos	Cód. Banco	VIP <i>score</i>
7,8478	563,2475	AEC0144	AEC 0144_C_DH	Não elucidado estruturalmente	Não identificado	-	1,7696
7,9919	585,1966	AEC0144	AEC 0144_T_R	Não elucidado estruturalmente	Não identificado	-	1,7205
8,1701	767,2174	IPB1	IPB1_T_R	Não elucidado estruturalmente	Não Identificado	-	1,7308
9,9544	239,1051	AEC0144	AEC 0144_T_DH	<i>3,4-Dimethyl-5-pentyl-2-furanpropanoic acid</i>	<i>Furanoid fatty acids</i>	HMDB0112083	1,7287

Nota 1: Os metabólitos em destaque foram buscados nos respectivos banco de dados considerando uma tolerância de $\pm 0,1$ Da. Todos os outros metabólitos foram elucidados considerando uma tolerância de $\pm 0,05$ Da na busca realizada no respectivo banco de dados.

(1) Tempo de retenção do metabólito expresso em minutos;

(2) Relação massa/ carga do metabólito;

(3) Genótipo em que o metabólito está presente

(4) Tratamento em que o metabólito apresentou maior abundância relativa

Pela análise de VIPs, nota-se que dentre os três VIPs com maior *score*, ou seja dentre os três prováveis metabólitos que mais contribuíram para a separação dos grupos, dois foram classificados como sendo pertencentes a classe dos flavonoides (*Kaempferol-3-O-rutinoside/ Nicotiflorin* e *Quercetin 3-O-rutinoside/ Rutin*) (Figura 30 e Tabela 7). Tais prováveis metabólitos apresentaram maior abundância relativa no genótipo AEC 0144 do que no genótipo IPB1 e, em especial, maior abundância relativa em plantas reidratadas. Outros VIPs identificados como flavonoides foram o *6"-O-Galloylquercimeritrin* e *Kaempferol 7-(6"-galloylglucoside)*, os quais apresentaram maior abundância relativa no genótipo IPB1, tendo o primeiro maior abundância em plantas submetidas a restrição hídrica, enquanto o segundo apresentou maior abundância relativa em plantas tratadas, especialmente em plantas reidratadas.

Como já mencionado, os flavonoides possuem uma estrutura molecular que propicia sua atuação como antioxidantes, dada a presença de grupos funcionais nos anéis e ligações duplas conjugadas. Como consequência, flavonoides que apresentam múltiplas hidroxilas, como os que possuem o grupo catecol, são tidos como antioxidantes mais fortes do que outros compostos reconhecidos por desempenharem esta atividade (ácido ascórbico, α -tocoferol e carotenoides como o β -caroteno). Um exemplo desse tipo de flavonoide é a quercetina (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; MIERZIAK; KOSTYN; KULMA, 2014).

Tattini et al. (2004) descrevem em seu trabalho que a atividade sequestradora de alguns flavonoides com relação ao radical superóxido foi maior no flavonol *Quercetin 3-O-rutinoside* quando em comparação as di e monohidroxi flavonas em estudo. Kumar e Pandey (2013) acrescentam que o *Quercetin 3-O-rutinoside/ Rutin* é um potente sequestrador de radicais livres e inibidor da peroxidação lipídica, uma vez que este atua aumentando a rigidez da membrana dada sua capacidade de interagir com a parte polar dos fosfolípidos. As observações realizadas por tais autores corroboram com a melhor performance do clone AEC 0144 mediante a restrição hídrica (apresentando menor MDA do que as plantas IPB1), bem como melhor recuperação mediante a reidratação do que o clone IPB1, apresentando, portanto, um aspecto visual mais semelhante ao seu respectivo controle.

Outro provável metabólito que apresentou maior abundância relativa no genótipo AEC 0144 do que no IPB1 foi o *Artonin D*, demonstrando menor abundância relativa em plantas tratadas (em restrição hídrica ou reidratadas) do que em seus respectivos controles (Figura 30, Tabela 7). Tal provável metabólito foi classificado pelo banco HMDB como *2'-hydroxychalcones*. Esses compostos são descritos como amplamente distribuídos nas plantas, sendo que participam de sua biossíntese a enzima chalcona sintase e três moléculas de *malonyl CoA* e *cinnamoyl CoA*, formando uma molécula que pode ser oxidada pela enzima polifenol oxidase originando auronas (uma rara classe de flavonoides naturais) ou então ser isomerizada a flavanona pela chalcona isomerase e, posteriormente, oxidada à flavonas com o auxílio da enzima flavona sintase (MASESANE, 2015). Nesse sentido, poderia haver a possibilidade desse menor acúmulo em plantas tratadas, e em especial em plantas reidratadas, estar associado a um maior investimento por parte da planta em produzir preferencialmente compostos relacionados a quercetina (como o flavonol *Quercetin 3-O-rutinoside/ Rutin*), uma vez que de acordo com Agati et al. (2012), existe um acúmulo preferencial de flavonoides com potente atividade sequestradora de EROs, ou seja, de flavonoides que possuem em sua

estrutura substituição no anel β -diidróxi, em plantas que foram submetidas a uma situação estressante severa.

Já o provável metabólito *3,4-Dimethyl-5-pentyl-2-furanpropanoic acid*, classificado pelo banco de dados HMDB como um ácido graxo de furano, apresentou maior abundância relativa em plantas submetidas a restrição hídrica no genótipo AEC 0144 (Figura 30, Tabela 7). Nas plantas, ácidos graxos heterocíclicos contendo em sua estrutura um anel de furano ocorrem em maior quantidade nos tecidos fotossintéticos, estando associados aos fosfolípidos e atuando como sequestradores de radicais livres. Essa função dos ácidos graxos de furano está associada ao fato destes serem capazes de sequestrar radicais peróxido, os quais podem ser formados durante a peroxidação lipídica acarretada pela geração de radicais livres originados pelo desbalanço no processo de dissipação do excesso de energia luminosa em plantas submetidas a condições hídricas limitantes (MAWLONG, KUMAR, SINGH, 2016). Tais observações corroboram com o fato das plantas AEC 0144 em restrição hídrica apresentarem menor peroxidação lipídica que plantas IPB1 submetidas a mesma condição.

As VIPs classificadas como ácido fosfatídico (PA, *phosphatidic acid*) foram observadas tanto em plantas do genótipo AEC 0144 (provável metabólito *PA(20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)e/2:0)*), quanto em plantas IPB1 (provável metabólito *PA(8:0/12:0)*), estando tais metabólitos presentes em maior abundância relativa em plantas reidratadas de ambos os genótipos (Figura 30, Tabela 7). Isso pode sugerir que os ácidos fosfatídicos desempenham um papel importante na recuperação destas plantas.

O PA é classificado como glicerofosfolípido e pode ser sintetizado pela membrana plasmática quando exerce função sinalizadora (HOU; UFER; BARTELS, 2016). Este composto pode atuar como mensageiro secundário mediando respostas do ácido abscísico, bem como pode estar associado à expressão de genes ABA-dependentes. Ainda, este ácido pode se ligar a várias proteínas (dentre elas as quinases e fosfatases) e enzimas, modificando a atividade e localização destas (TAIZ; ZEIGER, 2013a). Um exemplo de proteínas as quais o ácido fosfatídico é capaz de se ligar são as deidrininas. Durante o estresse gerado pela seca, pode ocorrer aumento do PA, o qual pode atuar ligando-se e gerando alterações conformacionais em tais proteínas, de modo que a expressão destas é estimulada com a regulação positiva do PA. Deidrininas são conhecidas por evitarem a desnaturação de outras moléculas, sendo esta propriedade relacionada a sua estrutura α -helical cuja formação é impulsionada pela ligação com o ácido fosfatídico (HOU; UFER; BARTELS, 2016). Nesse caso, tal ligação auxiliaria na manutenção do arcabouço proteico, favorecendo assim a recuperação das plantas.

Outra molécula associada a função sinalizadora identificada como VIP foi o provável metabólito *PI(22:5(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z)/18:0)*, o qual pertence a classe dos fosfatidilinosítois (*Phosphatidylinositols*) e foi observado em plantas IPB1, aumentando sua abundância relativa nas condições de deficiência hídrica e apresentando, em especial, maior abundância relativa em plantas reidratadas (Figura 30, Tabela 7).

Fosfatidilinosítois podem, conjuntamente com a atuação de enzimas fosfatases e quinases, originar lípidos sinalizadores como os fosfoinosítídeos (conhecidos como PIs). Estes últimos, podem estar presentes no núcleo e podem, perante situações estressantes, aumentar sua atividade, sugerindo a existência de uma associação entre tais compostos com a regulação de fatores de transcrição, bem como

da expressão gênica. É descrito também que os PIs são capazes de alterar a conformação e participar do direcionamento de uma proteína ao interagir com esta. Resposta ao estresse, crescimento apical e tráfego membranar são alguns processos biológicos nos quais os fosfoinosítídeos são considerados como valiosos sinalizadores (HOU, UFER, BARTELS, 2016).

Os fosfatidilinosítois e fosfoinosítídeos, têm sua biossíntese originada a partir de inosítois como o *myo*-inositol. Além de compostos sinalizadores como os já mencionados, o *myo*-inositol pode também originar osmoprotetores, sendo exemplo alguns carboidratos associados a rafinose (PERLIKOWSKI et al., 2016). Nesse ponto, aliando os resultados obtidos pelas técnicas de GC-MS e LC-MS sugere-se que os inosítois precursores estejam primando pela biossíntese de moléculas sinalizadoras, pois como mencionado anteriormente para os resultados de GC-MS do clone IPB1, as comparações entre plantas controle e tratadas revelaram que o *myo*-inositol e o *scyllo*-inositol aumentaram sua abundância relativa perante a restrição hídrica, sendo que para o *scyllo*-inositol a abundância manteve-se elevada mesmo após a reidratação. Tais observações estão de acordo com o perfil observado para o provável metabólito PI(22:5(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z)/18:0) no clone IPB1 (Figura 30, Tabela 7).

Outro VIP presente em plantas do grupo IPB1 que apresenta função sinalizadora é o *Brassica napus non-fluorescent chlorophyll catabolite 3*, o qual demonstrou menor abundância relativa em plantas IPB1 sob restrição hídrica e maior abundância relativa em plantas IPB1 reidratadas (Figura 30, Tabela 7). Tal provável metabólito é classificado pelo banco HMDB como um tetrapirrole e derivados. Segundo Larkin (2016), nas plantas os tetrapirroles são sintetizados nos plastídeos a partir do glutamato e possuem em sua composição anéis aromáticos formados por um átomo de nitrogênio e quatro de carbono, os quais podem estar associados a grupos metino. Sugere-se que o mecanismo de sinalização envolvendo estes compostos esteja relacionado a capacidade dos plastídeos em regular a expressão gênica nuclear. Ainda, essas moléculas podem atuar nos processos biológicos de captação e sinalização de energia luminosa, respiração, morte celular programada, bem como antioxidantes.

Antagonicamente a essa última função, EROs podem ser originadas pela desregulação do metabolismo desses compostos. Um exemplo é a possibilidade de geração de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) quando porfirinas (um tipo de tetrapirrole) que apresentam elétrons excitados transferem energia para o O_2 (LARKIN, 2016). A suposição de que esse metabolismo sofreu um desequilíbrio e estaria atuando como uma fonte de EROs em plantas IPB1 reidratadas, situação na qual o metabólito apresentou maior abundância relativa, poderia corroborar com o agravamento dos sintomas visuais (folhas secas, retorcidas e maior abscisão foliar) observado, fato este já discutido anteriormente.

Outro provável metabólito que apresentou maior abundância relativa em plantas tratadas, e em especial sob reidratação, do genótipo IPB1 é o *1-Hydroxy-3-methoxy-7-primeverosyloxyxanthone*, classificado pelo banco HMDB, como xantona (Figura 30, Tabela 7). A biossíntese das xantonas tem sua origem associada ao chiquimato e ao acetato, tendo participação a fenilalanina e envolvendo perdas de átomos de carbono, oxidações, dobramentos e hidroxilações. Tais compostos são descritos como apresentando atividade antioxidante (NEGI et al., 2013; GONDOKESUMO et al., 2019), sendo que o potencial antioxidativo das xantonas já foi alvo de estudos. Santos et al. (2003) observaram que, quando

confrontadas a padrões de quercetina, xantonas presentes nos extratos obtidos de duas espécies do gênero *Leiotbrix* demonstraram atividade antioxidante caracterizada como moderada.

De acordo com o exposto, propõem-se que os clones AEC 0144 e IPB1 demonstram metabólitos secundários altamente específicos de seu genótipo e aparentam responder de maneira distinta às condições hídricas a qual estão submetidos. Plantas do primeiro clone parecem investir na síntese de compostos com atividade antioxidativa, incluindo potentes antioxidantes como o *Quercetin 3-O-rutinoside/Rutin*, os quais podem aumentar sua abundância mediante aos tratamentos hídricos. Por outro lado, o segundo clone parece primar pela síntese de compostos sinalizadores, sendo a abundância destes afetada pelas condições hídricas a que as plantas foram submetidas. Ainda, o clone IPB1, ao que tudo indica, investe na biossíntese de alguns antioxidantes não tão potentes. Novamente, tais resultados estariam de acordo com algumas observações bioquímicas e morfológicas realizadas para o clone AEC 0144.

5.4.2. Efeito da restrição hídrica e reidratação sobre o acúmulo dos fenilpropanoides nos clones AEC 0144 e IPB1

Como mencionado anteriormente, é descrito em literatura que compostos fenólicos podem auxiliar as plantas mediante condições estressantes. Em particular, flavonoides são descritos como metabólitos que apresentam promissora atividade antioxidante e que constituem uma linha de defesa importante quando o sistema antioxidativo constitutivo, baseado em enzimas, foi comprometido devido a estresses severos ou a diferentes estresses aos quais a planta está submetida (BARREIROS, DAVID, DAVID, 2006; FINI et al., 2011; AGATI et al., 2012; MIERZIAK, KOSTYN, KULMA, 2014; SHARMA et al., 2019).

Aliando tal fato às observações obtidas pela análise de VIPs, a qual demonstrou que dentre os três prováveis metabólitos que mais contribuíram para a separação dos grupos analisados (três maiores VIP *scores*), dois foram classificados como flavonoides, verifica-se que, de fato, é de suma importância aprofundar as análises de metabólitos pertencentes a esta classe.

Nesse sentido, análises que possibilitem avaliar o perfil metabólico destes compostos, ou ao menos de alguns compostos de interesse pertencentes a esta classe, podem agregar informações sobre como essas moléculas se comportam perante a restrição hídrica e recuperação nos clones em estudo e, em particular, podem fornecer indícios sobre a resposta das plantas ao estresse oxidativo gerado pela condição hídrica limitante. Com este intuito, algumas comparações estatísticas foram realizadas (Tabela 8).

Tabela 8. Sumário da análise de LC-MS para o modo positivo nas diferentes comparações estatísticas realizadas por meio do *volcano plot* (p -value threshold < 0,05 ajustado pelo FDR, *fold change threshold* = 4)

Comparação Estatística ⁽¹⁾	Nº de DAMs ⁽²⁾	Nº de DAMs selecionados para MS/MS ⁽³⁾	Nº de metabólitos elucidados por MS/MS ⁽⁴⁾	Nº de prováveis fenilpropanoides ⁽⁵⁾
IPB1_C_DH x IPB1_T_DH	241	6	5	3
IPB1_C_R x IPB1_T_R	228	5	4	2
AEC 0144_C_DH x AEC0144_T_DH	223	8	5	4
AEC 0144_C_R x AEC0144_T_R	204	7	5	4
AEC 0144_T_DH x IPB1_T_DH	423	11	8	5
AEC 0144_T_R x IPB1_T_R	463	12	10	5

(1) Onde, C refere-se as plantas controle e T as plantas tratadas; DH refere-se a coleta de restrição hídrica (coleta 1) e R a coleta de reidratação (coleta 2);

(2) Número de prováveis metabólitos diferencialmente abundantes (DAMs, *Differentially Abundant Metabolites*) identificados para cada comparação;

(3) Número de DAMs selecionados para a etapa de fragmentação (MS/MS), com base nas massas nominais no modo positivo dos fenilpropanoides de interesse;

(4) Número de metabólitos elucidados estruturalmente com o auxílio da análise de fragmentação;

(5) Número de metabólitos elucidados estruturalmente por MS/MS que foram classificados como prováveis fenilpropanoides (não necessariamente retornou o fenilpropanoide de interesse buscado).

Os fenilpropanoides elucidados estruturalmente, classificados como flavonoides ou ácidos hidroxicinâmicos, e diferencialmente abundantes nas situações em que plantas controle foram comparadas às plantas tratadas (em restrição hídrica ou reidratação) para ambos os genótipos são demonstrados na Tabela 9, enquanto que os elucidados estruturalmente e diferencialmente abundantes quando foram comparadas plantas de genótipos distintos, porém sob mesmo regime hídrico são apresentados na Tabela 10. O Anexo N apresenta os espectros de massas, bem como as estruturas químicas dos principais fragmentos que auxiliaram na elucidação estrutural destes compostos.

Tabela 9. Elucidação estrutural de DAMs selecionados para MS/MS oriundos das comparações entre plantas controle (bem irrigadas) e tratadas (em restrição hídrica ou reidratação) para cada genótipo
(continua)

Comparação	RT (min) ⁽¹⁾	m/z ⁽²⁾	Nome	Classe de compostos orgânicos	Cód. Banco	Maior abundância ⁽³⁾	FC ⁽⁴⁾	log ₂ (FC) ⁽⁵⁾	p.adjusted ⁽⁶⁾
IPB1_C_DH x IPB1_T_DH	4,1449	449,0737	2,3-Dihydro-5,5',7,7'-tetrahydroxy-2-(4-hydroxyphenyl) [3,8'-bi-4H-1-benzopyran]-4,4'-dione	Pyranisoflavonoids	HMDB0037323	IPB1_C_DH	936,34	9,87	5,11E-09
	5,3358	433,1158	Pinostrobin 5-glucoside	Flavonoid o-glycosides	HMDB0040503	IPB1_C_DH	713,16	9,48	6,39E-05
	7,4375	579,1391	Não elucidado estruturalmente	Não identificado	-	IPB1_T_DH	0,0024	-8,69	0,0029
	8,3858	417,1410	4'-Methylquiritigenin 7-rhamnoside	Flavonoid-7-o-glycosides	HMDB0040545	IPB1_C_DH	789,90	9,63	6,39E-05
	9,1445	271,1100	Hypoglycin B	Dipeptides	HMDB0029428	IPB1_C_DH	7,24	2,86	0,0006
	9,2446	165,1268	(Z)-3-Methyl-2-(2-pentenyl)-2-cyclopenten-1-one	Cyclic ketones	HMDB0035601	IPB1_C_DH	620,52	9,28	6,39E-05
IPB1_C_R x IPB1_T_R	3,0020	449,0709	Naringenin 4'-O-glucuronide	Flavonoid o-glucuronides	HMDB0041759	IPB1_C_R	550,37	9,10	0,0015
	4,1449	449,0737	Carthamone	Hydroxycinnamic acids and derivatives	HMDB0037377	IPB1_C_R	1270,90	10,31	2,67E-30
	5,3455	287,0509	3'-Methoxyfukic acid	Phenylpropanoic acids	HMDB0029498	IPB1_C_R	3723,60	11,86	0,0056
	8,5617	465,1041	Não elucidado estruturalmente	Não identificado	-	IPB1_C_R	702,65	9,46	3,10E-05
	9,1445	271,1100	Hypoglycin B	Dipeptides	HMDB0029428	IPB1_C_R	3781,30	11,89	3,25E-33
AEC0144_C_DH x AEC 0144_T_DH	4,0635	303,0535	2',4',5,7,8-Pentahydroxyisoflavone	Isoflavones	HMDB0033264	AEC 0144_C_DH	885,93	9,79	0,0002
	4,3590	287,0599	Não elucidado estruturalmente	Não identificado	-	AEC 0144_C_DH	632,19	9,30	0,0002
	5,3586	303,0541	Hesperetin	4'-o-methylated flavonoids	HMDB0005782	AEC 0144_C_DH	523,52	9,03	0,0012
	5,6736	449,1087	Piperenol C	Pentacarboxylic acids and derivatives	HMDB0041536	AEC 0144_C_DH	1398,80	10,45	8,42E-06
	5,8396	271,0638	Pinostrobin chalcone	Chalcones and dihydrochalcones	HMDB0033702	AEC 0144_C_DH	1136,80	10,15	8,56E-06
	6,1913	579,1933	Não elucidado estruturalmente	Não identificado	-	AEC 0144_C_DH	589,43	9,20	0,0002
	6,4697	611,1399	Hesperetin 7-neohesperidoside	Flavonoid-7-o-glycosides	HMDB0030748	AEC 0144_T_DH	0,0013	-9,61	0,0002
	7,4375	579,1391	Não elucidado estruturalmente	Não identificado	-	AEC 0144_C_DH	680,42	9,41	8,39E-06

(conclusão)

Comparação	RT (min) ⁽¹⁾	m/z ⁽²⁾	Nome	Classe de compostos orgânicos	Cód. Banco	Maior abundância ⁽³⁾	FC ⁽⁴⁾	log ₂ (FC) ⁽⁵⁾	p.adjusted ⁽⁶⁾
AEC 0144_C_R x AEC 0144_T_R	4,1449	449,0737	2,3-Dihidro-5,5',7,7'-tetrahydroxy-2-(4-hydroxyphenyl) [3,8'-bi-4H-1-benzopyran]-4,4'-dione	Pyranoisoflavonoids	HMDB0037323	AEC 0144_C_R	1412,50	10,46	1,45E-45
	5,1616	303,0534	-(7)	Isoflavones	HMDB0033264	AEC 0144_C_R	1792,90	10,81	1,60E-09
	5,3455	287,0509	5,6,7,4'-Tetrahydroxyisoflavone	Isoflavones	HMDB0041688	AEC 0144_C_R	2431,20	11,25	0,0047
	5,8396	271,0638	1,2,8-Trihydroxy-3-methylanthraquinone	Hydroxyanthraquinones	HMDB0033790	AEC 0144_C_R	2517,10	11,30	6,46E-27
	6,1913	579,1933	Não elucidado estruturalmente	Não identificado	-	AEC 0144_T_R	0,0012	-9,74	1,52E-09
	6,4697	611,1399	Quercetin 3-(3-p-coumaroylglucoside)	Flavonoid-3-o-glycosides	HMDB0037365	AEC 0144_C_R	1305,00	10,35	1,52E-09
	7,4375	579,1391	Não elucidado estruturalmente	Não identificado	-	AEC 0144_C_R	608,61	9,25	0,0003

Nota 1: Todos os metabólitos foram elucidados considerando uma tolerância de $\pm 0,05$ Da na busca realizada no respectivo banco de dados.

Nota 2: Em destaque, metabólitos classificados como flavonoides ou ácidos hidroxicinâmicos.

(1) Tempo de retenção do metabólito expresso em minutos;

(2) Relação massa/ carga do metabólito;

(3) Tratamento em que o metabólito apresentou maior abundância relativa na comparação;

(4) FC refere-se ao *fold change* ou, em outras palavras, ao nível de abundância;

(5) log₂(FC) refere-se ao log₂ *fold change*, ou em outras palavras, log₂ da razão de abundância;

(6) valor de *p* ajustado pelo FDR (*False Discovery Rate*).

(7) Metabólito descrito apenas em termos de classe química, sendo que o provável metabólito que serviu de base para identificar tal classe é demonstrado na coluna “Cód. Banco”.

Tabela 10. Elucidação estrutural de DAMs selecionados para MS/MS oriundos das comparações entre plantas de genótipos contrastantes sob mesmo regime hídrico

(continua)

Comparação	RT ⁽¹⁾ (min)	m/z ⁽²⁾	Nome	Classe de compostos orgânicos	Cód. Banco	Maior abundância ⁽³⁾	FC ⁽⁴⁾	log ₂ (FC) ⁽⁵⁾	p.adjusted ⁽⁶⁾
AEC 0144_T_DH x IPB1_T_DH	3,6068	319,0479	-	Flavonols	HMDB0037357	AEC 0144_T_DH	1771,90	10,79	7,32E-31
	4,2434	611,1599	<i>Quercetin 3-O-rutinoside/ Rutin</i>	Flavonoid-3-o-glycosides	HMDB0003249	AEC 0144_T_DH	7080,10	12,79	8,46E-35
	4,8799	595,1577	<i>Kaempferol-3-O-rutinoside/ Nicotiflorin</i>	<i>Kaempferol o-glucoside</i>	CID: 5318767	AEC 0144_T_DH	12789,00	13,64	3,55E-40
	5,6736	449,1087	Não elucidado estruturalmente	Não identificado	-	IPB1_T_DH	0,0005	-10,95	6,97E-33
	6,4697	611,1399	<i>Hesperetin 7-neobesperidoside</i>	Flavonoid-7-o-glycosides	HMDB0030748	AEC 0144_T_DH	780,10	9,61	3,36E-06
	7,0444	595,1456	<i>Didymin</i>	Flavonoid-7-o-glycosides	HMDB0029482	AEC 0144_T_DH	1519,30	10,57	4,91E-34
	7,2698	287,0597	<i>Histidinyl-Methionine</i>	Dipeptides	HMDB0028891	AEC 0144_T_DH	2037,90	10,99	2,75E-37
	7,7216	287,0592	<i>3'-Methoxyfukiic acid</i>	Phenylpropanoic acids	HMDB0029498	IPB1_T_DH	0,0003	-11,56	1,92E-35
	8,7676	287,1262	Não elucidado estruturalmente	Não identificado	-	AEC 0144_T_DH	2286,80	11,16	2,75E-34
	9,2446	165,1268	<i>Trimethylpropylpyrazine</i>	Pyrazines	HMDB0040001	AEC 0144_T_DH	675,62	9,40	4,65E-08
	9,2894	449,1100	Não elucidado estruturalmente	Não identificado	-	IPB1_T_DH	0,0010	-10,00	1,52E-30
AEC 0144_T_R x IPB1_T_R	3,6068	319,0479	-	Flavonols	HMDB0037357	AEC 0144_T_R	1533,60	10,58	4,73E-10
	4,2434	611,1599	<i>Quercetin 3-O-rutinoside/ Rutin</i>	Flavonoid-3-o-glycosides	HMDB0003249	AEC 0144_T_R	12092,00	13,56	6,31E-45
	4,8799	595,1577	<i>Kaempferol-3-O-rutinoside/ Nicotiflorin</i>	<i>Kaempferol o-glucoside</i>	CID: 5318767	AEC 0144_T_R	15500,00	13,92	5,45E-42
	5,1616	303,0534	<i>Folerogenin</i>	7-o-methylated flavonoids	HMDB0037507	IPB1_T_R	0,0011	-9,80	1,44E-05
	6,1913	579,1933	Não elucidado estruturalmente	Não identificado	-	AEC 0144_T_R	799,45	9,64	4,58E-10
	6,8889	303,0573	<i>4',5,7-Trihydroxy-3-methoxyflavanone</i>	3-o-methylated flavonoids	HMDB0040560	AEC 0144_T_R	1005,20	9,97	4,19E-33
	7,2698	287,0597	<i>3'-Methoxyfukiic acid</i>	Phenylpropanoic acids	HMDB0029498	AEC 0144_T_R	2163,50	11,08	8,45E-44
	7,7216	287,0592	<i>3'-Methoxyfukiic acid</i>	Phenylpropanoic acids	HMDB0029498	IPB1_T_R	0,1281	-2,97	0,000176
	8,3858	417,1410	<i>8-Acetoxy-pinorezinol</i>	Furanoid lignans	HMDB0033280	IPB1_T_R	0,0015	-9,34	0,000162
	8,7676	287,1262	Não elucidado estruturalmente	Não identificado	-	AEC 0144_T_R	1974,90	10,95	1,46E-05

(conclusão)

Comparação	RT ⁽¹⁾ (min)	m/z ⁽²⁾	Nome	Classe de compostos orgânicos	Cód. Banco	Maior abundância ⁽³⁾	FC ⁽⁴⁾	log ₂ (FC) ⁽⁵⁾	p.adjusted ⁽⁶⁾
AEC0144_T_R x	9,1445	271,1100	<i>2-(3-Carboxy-3-(methylammonio)propyl)-L-histidine</i>	<i>Histidine and derivatives</i>	HMDB0011654	AEC 0144_T_R	1439,80	10,49	1,45E-05
IPB1_T_R	9,2894	449,1100	<i>Glucobrassicin</i>	<i>Alkylglucosinolates</i>	HMDB0030243	IPB1_T_R	0,0009	-10,10	3,40E-33

Nota 1: O metabólito em negrito foi buscado nos respectivos banco de dados considerando uma tolerância de $\pm 0,1$ Da. Todos os outros metabólitos foram elucidados considerando uma tolerância de $\pm 0,05$ Da na busca realizada no respectivo banco de dados.

Nota 2: Em destaque, metabólitos classificados como flavonoides ou ácidos hidroxicinâmicos.

Nota 3: Alguns metabólitos, representados por suas respectivas m/z, foram descritos apenas em termos de classe química, sendo que o provável metabólito que serviu de base para identificação de tais classe é demonstrado na coluna “Cód. Banco”.

(1) Tempo de retenção do metabólito expresso em minutos;

(2) Relação massa/ carga do metabólito;

(3) Tratamento em que o metabólito apresentou maior abundância relativa na comparação;

(4) FC refere-se ao *fold change* ou, em outras palavras, ao nível de abundância;

(5) log₂(FC) refere-se ao log₂ *fold change*, ou em outras palavras, log₂ da razão de abundância;

(6) valor de p ajustado pelo FDR (*False Discovery Rate*).

O aumento da biossíntese de flavonoides quando a planta está submetida a situações de estresse, incluindo o déficit hídrico é comumente descrito em literatura (AGATI et al., 2012; DI FERDINANDO et al., 2012; GUIDI et al., 2016). Contudo, excetuando-se o provável metabólito *Hesperetin 7-neohesperidoside* (comparação AEC0144_C_DH x AEC0144_T_DH), o comportamento observado foi o oposto (Tabela 9). Desse modo, é possível notar que os prováveis metabólitos relacionados à classe dos flavonoides ou de ácidos hidroxicinâmicos apresentaram maior abundância relativa nas plantas controle (bem irrigadas) do que em plantas submetidas a restrição hídrica (coleta 1) ou reidratadas (coleta 2).

Baroowa e Gogoi (2013), trabalhando com genótipos de *Vigna mungo* L e *Vigna radiata* verificaram que o conteúdo total de flavonoides diminuiu durante a deficiência hídrica, voltando a aumentar com a recuperação das plantas. Entretanto, para os níveis de antocianinas (um tipo de flavonoide), o comportamento observado foi inverso ao teor total de flavonoides.

Dias et al. (2017) trabalhando com quatro clones comerciais híbridos de *Eucalyptus grandis* e analisando o conteúdo de fenólicos e flavonoides totais, observaram que cada clone respondeu de um modo específico, de acordo com o nível de tolerância (suscetível, moderada ou tolerante) e a condição de estresse hídrico (deficiência hídrica moderada e severa) a qual estavam submetidos. Ainda, os autores avaliaram os níveis de alguns compostos fenólicos de interesse (dentre eles um flavonoide e um ácido hidroxicinâmico) nos respectivos clones, permitindo assim observar respostas específicas de tais metabólitos individuais, sendo que alguns variaram com a intensidade do estresse, enquanto outros não.

Kirakosyan et al. (2004) apud Pacheco, Camargo e Souza (2011) trabalhando com folhas de *Crataegus laevigata* e *C. monogyna* submetidas ao estresse hídrico verificaram que, para a primeira espécie, alguns flavonoides demonstraram aumento em sua concentração, outros apresentaram diminuição e alguns não demonstraram alteração significativa. Já para a segunda espécie, não foram identificadas alterações importantes na concentração dos compostos em análise.

Tais observações corroboram com as realizadas por Baroowa e Gogoi (2013) e Dias et al. (2017) mencionadas anteriormente, e sugerem que o comportamento de cada flavonoide mediante a situação estressante seja específico.

Os resultados obtidos na análise de VIPs (item 5.4.1) acerca de prováveis metabólitos classificados como flavonoides também fornecem respaldo a estas observações, uma vez que é possível verificar diferenças na abundância entre genótipos dos diferentes compostos, bem como diferenças de comportamento dentro de genótipos quando observa-se a condição controle e tratada. Por exemplo, no caso do metabólito elucidado estruturalmente como *Quercetin 3-O-rutinoside/ Rutin*, diferentemente dos outros três metabólitos classificados como flavonoides na análise de VIPs, observou-se uma diminuição na abundância relativa perante a restrição hídrica, considerando amostras controle e tratadas do genótipo AEC 0144 (Figura 30).

Contudo, é importante salientar que esta etapa do presente trabalho demonstra os efeitos dos diferentes regimes hídricos sobre os fenilpropanoides elucidados estruturalmente, partindo-se da m/z no modo positivo de alguns compostos alvos, não abrangendo portanto a totalidade de moléculas desta classe química que poderiam supostamente estarem presentes nas amostras. Nesse sentido, baseando-se apenas

nos prováveis metabólitos (flavonoides e ácidos hidroxicinâmicos) obtidos para as comparações estatísticas em análise (Tabela 9), sugere-se que o estresse hídrico resultou em um efeito negativo para a biossíntese desses, os quais mesmo perante a reidratação, não retornaram aos seus níveis iniciais.

Pacheco, Camargo e Souza (2011) também observaram a diminuição no teor de flavonoides tanto em plantas de calêndula submetidas a deficiência hídrica, quanto em plantas controle quando essas foram tratadas com ácido abscísico (ABA). Os autores argumentaram que o aumento deste hormônio poderia gerar um tipo de sinalização que prejudicaria a atuação de enzimas associadas à biossíntese de flavonoides. Em outras plantas, como a soja, efeitos negativos deste mesmo hormônio sob o metabolismo de fenilpropanoides também foram descritos por Graham e Graham (1996). É importante salientar que quando a planta está submetida a uma condição hídrica limitante, ocorre o acúmulo deste hormônio, acúmulo esse que pode ocorrer de forma rápida no tecido foliar culminando em respostas mais imediatas como o fechamento estomático ou respostas de longo prazo como regulação da expressão gênica (PACHECO; CAMARGO; SOUZA, 2011; TAIZ; ZEIGER, 2013a).

Outras respostas interessantes foram notadas quando genótipos contrastantes, porém sob mesma condição hídrica foram confrontados. Por meio de tais comparações, foi possível observar que o clone AEC 0144 apresentou, de um modo geral, maior abundância relativa de flavonoides do que o clone IPB1, independentemente do regime hídrico ao qual a planta estava submetida (restrição hídrica ou reidratação). Ainda, é interessante mencionar que os mesmos três flavonoides (flavonol com m/z 319,0479, *Quercetin 3-O-rutinoside/ Rutin* e *Kaempferol-3-O-rutinoside/ Nicotiflorin*) se mantiveram em maior abundância relativa em plantas AEC 0144 em ambas as comparações (Tabela 10).

Quanto às particularidades dos flavonoides elucidados estruturalmente nas comparações entre plantas de diferentes genótipos, verifica-se que a maior parte deles eram glicosilados ou metilados (Tabela 10). Segundo Koirala et al. (2016), a formação em plantas desse tipo de flavonoides está associada a uma maior estabilidade, e seus efeitos podem variar dependendo do tipo de substratos e grupos doadores que participam da reação. Por exemplo, a glicosilação, refere-se a reação na qual a enzima glicosiltransferase liga a molécula de açúcar a aglicona. Esta modificação é capaz de tornar os flavonoides mais solúveis no meio celular. Já na metilação, a enzima metiltransferase liga porções metílicas a agliconas nas hidroxilas livres presentes nos flavonoides, o que pode aumentar o transporte membranar (DI FERDINANDO et al., 2012; KOIRALA et al., 2016).

Como mencionado, com maior abundância relativa no clone AEC 0144 (em restrição hídrica ou reidratação) estão os glicosídeos de flavonoides *Quercetin 3-O-rutinoside/ Rutin* e *Kaempferol-3-O-rutinoside/ Nicotiflorin* (Tabela 10). Glicosídeos de campferol são antioxidantes mais pobres que glicosídeos de quercetina. Isso ocorre pois o campferol é um flavonoide monoidroxi, enquanto que a quercetina é um flavonoide caracterizado como um orto-diidroxi flavonoide com substituição no anel β . Esse grupo catecol dos diidroxi flavonoides é dotado da capacidade de reduzir as ERO's já formadas ao doarem elétrons ou hidrogênio, ou ainda, de inibir a formação de novas ERO's pela reação de Fenton. Ainda, a *Quercetin 3-O-rutinoside/ Rutin* é descrita como um eficiente sequestrador de $O_2^{\bullet-}$, radical este que pode afetar a atividade de metaloenzimas dada a sua capacidade de redução sobre metais de transição e

quinonas (TATTINI et al., 2004; AGATI et al., 2012; DI FERDINANDO et al., 2012; BARBOSA et al., 2014).

Dias et al. (2017) cita em seu trabalho que uma planta considerada tolerante a uma dada situação estressante é capaz de combater a formação de ROS e, consequentemente, minimizar os danos oxidativos através da síntese de antioxidantes como os compostos fenólicos.

Considerando tais aspectos, a presença de maior abundância relativa de flavonoides e, em especial, de antioxidantes potentes como *Quercetin 3-O-rutinoside/ Rutin* no clone AEC 0144 corrobora com os sintomas visuais anteriormente descritos para plantas deste clone, as quais, quando recuperadas, apresentaram um aspecto muito mais semelhante aos seus controles que plantas IPB1. Ademais, é importante salientar que durante a restrição hídrica, plantas AEC 0144 apresentaram menor peroxidação lipídica das membranas que plantas IPB1.

Isso indica que a biossíntese de flavonoides esteja mais estimulada nesse material nas diferentes situações hídricas do que em plantas IPB1, sugerindo uma possível associação de tal fato com a melhor performance das plantas AEC 0144 perante o estresse hídrico, bem como a melhor capacidade de recuperação destas quando reidratadas do que plantas IPB1. Nesse sentido, é plausível supor que as plantas que dispõem de compostos que atuam como efetivos antioxidantes durante a condição limitante são mais eficientes em manterem seu aparato molecular quando submetidas a esta e, portanto, estão mais aptas a uma melhor recuperação, enquanto que plantas que não possuem tais compostos podem ter todo o seu aparato molecular prejudicado pelo estresse, o que dificulta o processo de recuperação.

Dias et al. (2017), estudando os níveis de flavonoides totais e alguns poucos compostos fenólicos (ácidos gálico, clorogênico, cafeico, elágico e quercitrina) apontaram a fiabilidade da identificação de plantas híbridas de eucalipto tolerantes à seca por meio dos compostos fenólicos. Esses autores trabalharam com plantas híbridas de *E. grandis*, artificialmente estressadas por meio da aplicação de polietilenoglicol (PEG-6000) quando contavam com cerca de 5 meses de idade, e utilizaram a técnica de HPLC-UV/DAD, bem como curvas de calibração para a identificação de compostos fenólicos de interesse.

Por outro lado, os dados demonstrados na Tabela 10, oriundos da comparação entre plantas de diferentes genótipos, porém submetidas ao mesmo regime hídrico foram provenientes de plantas clonais jovens (1 ano e 4 meses) de *E. urophylla* submetidas ao estresse induzido pela restrição da água de irrigação e posterior reidratação, sendo tais dados analisados por meio de UPLC/Q-TOF e MS/MS abrangendo um maior número e outros fenilpropanoides (em especial flavonoides) de interesse.

Assim sendo, é de suma importância verificar que materiais distintos submetidos à aplicação de metodologias distintas conduziram a observações semelhantes, observações estas que sugerem que os fenilpropanoides, e em especial os flavonoides, podem ser importantes metabólitos indicadores de plantas que possuam uma boa performance mediante a uma situação de estresse hídrico, bem como uma melhor capacidade de recuperação quando reidratadas. Ademais, tais observações sugerem a ampliação desta suposição não apenas para híbridos de *E. grandis* como os citados por Dias et al. (2017), mas sim para o gênero *Eucalyptus*.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho teve por objetivo geral obter uma melhor compreensão da resposta de dois clones comerciais de *E. urophylla* (AEC 0144 e IPB1) submetidos a restrição hídrica e posterior reidratação, buscando obter maiores informações e auxiliar no preenchimento de algumas lacunas existentes quanto a esta temática.

Os dados obtidos pelo experimento base mostraram que o *status* hídrico das plantas de ambos os clones foi prejudicado pela restrição hídrica, sendo este recuperado após a reidratação. Sob condição hídrica limitante observou-se uma tendência ao aumento do conteúdo de H₂O₂ e um aumento efetivo da peroxidação lipídica em plantas de ambos os clones, sendo que a extensão de tais danos foi maior em plantas IPB1 do que em plantas AEC 0144. Após a reidratação, verificou-se a recuperação de tais parâmetros em ambos os clones, bem como notou-se que as plantas AEC 0144 tratadas apresentavam um aspecto visual muito mais semelhante aos seus respectivos controles.

A análise por GC-MS permitiu identificar metabólitos primários associados à resposta a restrição hídrica e reidratação em plantas de ambos os genótipos. Por tais análises, verificou-se de um modo geral que a resposta dos clones foi específica aos diferentes regimes hídricos aplicados, afetando classes químicas distintas, bem como diferentes vias metabólicas nos clones em estudo. Sob restrição hídrica, no tocante aos metabólitos primários, o clone AEC 0144 aumentou a abundância relativa de alguns dissacarídeos, enquanto que no clone IPB1 houve um aumento na abundância relativa de compostos classificados como inositóis. Após a reidratação, o perfil metabólico observado para o genótipo AEC 0144 sugeriu que este clone apresentou uma melhor recuperação.

A análise de VIPs utilizando dados obtidos por LC-MS, permitiu observar a alta especificidade das respostas dos metabólitos secundários de acordo com o genótipo e situação hídrica a qual a planta estava submetida. Ao que tudo indica, de um modo geral, o clone AEC 0144 investe na síntese de compostos com atividade antioxidativa promissora, enquanto que o clone IPB1 investe na síntese de metabólitos com função sinalizadora e compostos com atividade antioxidativa não tão promissora.

Enfatizando os fenilpropanoides, a análise de VIPs revelou a importância de prováveis metabólitos classificados como flavonoides para a separação entre grupos, com destaque para a separação entre genótipos. Já pelas análises univariadas, observou-se que a restrição hídrica exerceu um aparente efeito negativo sobre a biossíntese dos fenilpropanoides (em especial flavonoides) elucidados estruturalmente com a técnica de LC-MS/MS, sendo que a biossíntese destes manteve-se afetada mesmo após a reidratação. Contudo, as análises univariadas também revelaram que o genótipo AEC 0144 (em restrição hídrica ou reidratação) apresentou maior abundância relativa de flavonoides que o clone IPB1, incluindo o potente antioxidante *Quercetin 3-O-rutinoside*/Rutin. Desse modo, análises metabolômicas *target* e *untarget* demonstram que os flavonoides podem ser moléculas importantes na busca por genótipos de eucalipto que apresentam melhor performance perante condições limitantes.

Tendo em vista que a resposta dos flavonoides ao genótipo e a condição hídrica sejam específicas, é importante que métodos de rastreamento de possíveis plantas com melhor performance perante condições estressantes não considerem apenas o teor total de flavonoides ou padrão de abundância de flavonoides em plantas de um mesmo genótipo sob diferentes condições hídricas, mas sim que considerem os padrões de abundância entre genótipos distintos, além da presença de flavonoides com forte capacidade antioxidativa. Tais observações confirmam e ampliam algumas informações já obtidas para espécies do gênero *Eucalyptus*.

Pelos dados obtidos neste trabalho, é plausível supor que os clones em estudo apresentam regulação metabólica distinta, sendo que perfis metabólicos baseados no acúmulo de osmoprotetores e que primem pela síntese de compostos capazes de atuar como promissores antioxidantes, incluindo dentre estes flavonoides, estão mais aptos a lidarem com os danos causados pela condição estressante, garantindo uma melhor manutenção da maquinaria molecular e apresentando uma melhor performance durante a restrição hídrica, o que acabaria por refletir também na melhor capacidade de recuperação quando as plantas são reidratadas. Por outro lado, perfis que acumulam compostos sinalizadores da condição hídrica a qual a planta está submetida podem não ser tão eficientes em tais questões.

Em síntese, embora ambos os clones comerciais utilizados neste estudo sejam descritos como possuidores de boa produtividade e adaptabilidade, justificando o amplo plantio destes no território brasileiro (DA SILVA, P.H.M. et al., 2015), os resultados aqui obtidos indicam que a estratégia utilizada pelo clone AEC 0144 para lidar com a situação estressante é mais eficaz que a estratégia utilizada pelo clone IPB1.

Identificar perfis de resposta das plantas associados a uma melhor performance destas quando passaram por uma condição estressante pode ser de grande valia para outros estudos que visem o desenvolvimento de plantas tolerantes em programas de melhoramento genético. Ainda, a identificação de padrões de resposta (como o observado no caso dos flavonoides) podem ser importantes na definição de métodos de mais adequados de rastreio de plantas com melhor performance perante condições estressantes.

REFERÊNCIAS

- AGATI, G.; AZZARELLO, E.; POLLASTRI, S.; TATTINI, M. Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance. **Plant Science**, v.196, p.67–76, 2012.
- AHRAR, M.; DONEVA, D.; TATTINI, M.; BRUNETTI, C.; GORI, A.; RODEGHIERO, M.; WOHLFAHRT, G.; BIASIOLI, F.; VAROTTO, C.; LORETO, F.; VELIKOVA, V. Phenotypic differences determine drought stress responses in ecotypes of *Arundo donax* adapted to different environments. **Journal of Experimental Botany**, v.68, n.9, p.2439-2451, 2017.
- ALCÂNTARA, B.K.; PIZZAIA, D.; PIOTTO, F.A.; BORGIO, L.; BRONDANI, G.E.; AZEVEDO, R.A. Temporal dynamics of the response to Al stress in *Eucalyptus grandis* × *Eucalyptus camaldulensis*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.87, n.2, p.1063-1070, 2015.
- ALEXIEVA, V.; SERGIEV, I.; MAPELLI, S.; KARANOV, E. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. **Plant, Cell and Environment**, v.24, p. 1337-1344, 2001.
- ANJUM, S.A.; XIE, X.; WANG, L.; SALEEM, M.F.; MAN, C.; LEI, W. Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. **African Journal of Agricultural Research**, v. 6, n.9, p. 2026-2032, 2011.
- ARBONA, V.; MANZI, M.; DE OLLAS, C.; GÓMEZ-CADENAS, A. Metabolomics as a tool to investigate abiotic stress tolerance in plants. **International Journal of Molecular Sciences**. v.14, p. 4885-4911, 2013.
- BANERJEE, P.; GHOSH, S.; DUTTA, M.; SUBRAMANI, E.; KHALPADA, J.; ROYCHOUDHURY, S.; CHAKRAVARTY, B.; CHAUDHURY, K. Identification of key contributory factors responsible for vascular dysfunction in idiopathic recurrent spontaneous miscarriage. **PLoS One**, v. 8, n.11, e80940. 2013.
- BARBOSA, M.R.; SILVA, M.M.A.; WILLADINO, L.; ULISSES, C.; CAMARA, T.R. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciência Rural**, v.44, n.3, p.453-460, 2014.
- BAROOWA, B.; GOGOI, N. Biochemical changes in two *Vigna* spp. during drought and subsequent recovery. **Indian Journal of Plant Physiology**, v.18, n.4, p. 319-325, 2013.
- BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v.29, n.1, p.113-123, 2006.
- BARREIROS, R.M.; GONÇALVES, J.L.M.; SANSÍGOLO, C.A.; POGGIANI, F. Modificações na produtividade e nas características físicas e químicas da madeira de *Eucalyptus grandis* causadas pela adubação com lodo de esgoto tratado. **Revista Árvore [online]**, v.31, n.1, p. 103-111, 2007. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rarv/v31n1/12.pdf>>. Acesso em: 10 abr. 2019.
- BARROS JUNIOR, U.O.; LIMA, M.D.R.; BARBOSA, M.A.M.; BATISTA, B.L.; LOBATO, A.K.S. Biochemical responses of two species of *Eucalyptus* exposed to aluminium toxicity: oxidative stress and antioxidant metabolism. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, v.44, n.1, p.107-115, 2016.
- BUDZINSKI, I.G.F.; REGIANI, T.; LABATE, M.T.V., GUIDETTI-GONZALES, S.; DA SILVA, D.I.R.; RODRIGUES, M.J.C.; BORGES, J.S.; MOZOL, I.M.; LABATE, C.A. Proteômica. In: BORÉM, A.; FRITSCHÉ-NETO, R. (Eds.). **Ômicas 360º: aplicações e estratégias para o melhoramento de plantas**. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2013. Cap. 7, p.153-179.
- BUSCHHAUS, C.; JETTER, R. Composition and physiological function of the wax layers coating *Arabidopsis* leaves: β -amyirin negatively affects the intracuticular water barrier. **Plant Physiology**, v.160, p. 1120–1129, 2012.

- CAMO. **PLS-DA**. s.d. Disponível em: <<https://www.camo.com/resources/pls-da.html>>. Acesso em: 05 jun. 2019.
- CHEN, H.J.; INBARAJ, B.S.; CHEN, B.H. Determination of phenolic acids and flavonoids in *Taraxacum formosanum* Kitam by liquid chromatography-tandem mass spectrometry coupled with a post-column derivatization technique. **International Journal of Molecular Sciences**, v.13, n.1, 260-285; 2012.
- CHONG, J., SOUFAN, O., LI, C., CARAUS, I., LI, S., BOURQUE, G., WISHART, D.S. AND XIA, J. MetaboAnalyst 4.0: towards more transparent and integrative metabolomics analysis. **Nucleic Acids Research**, v.46, n. w1, p. W486-W494, 2018.
- CIA, M.C.; GUIMARÃES, A.C.R.; MEDICI, L.O.; CHABREGAS, S.M.; AZEVEDO, R.A. Antioxidant responses to water deficit by drought-tolerant and -sensitive sugarcane varieties. **Annals of Applied Biology**, v.161, n.3, p.313–324, 2012.
- CIDADE-BRASIL. **Município de Piracicaba**. Disponível em: <<https://www.cidade-brasil.com.br/municipio-piracicaba.html>>. Acesso em: 11 out. 2019.
- CONSELHO DE INFORMAÇÕES SOBRE BIOTECNOLOGIA - CIB. **Guia do EUCALIPTO: Oportunidades para um desenvolvimento sustentável**. Disponível em: <http://cib.org.br/wp-content/uploads/2011/10/Guia_do_Eucalipto_junho_2008.pdf>. Acesso em: 08 abr. 2019.
- CORREIA, B.; HANCOCK, R.D.; AMARAL, J.; GOMEZ-CADENAS, A.; VALLEDOR, L.; PINTO, G. Combined drought and heat activates protective responses in *Eucalyptus globulus* that are not activated when subjected to drought or heat stress alone. **Frontiers in Plant Science**, v.9, artigo 819, doi: 10.3389/fpls.2018.00819, 2018.
- CORREIA, B.; PINTÓ-MARIJUAN, M.; NEVES, L.; BROSSA, R.; DIAS, M.C.; COSTA, A.; CASTRO, B.B.; ARAÚJO, C.; SANTOS, C.; CHAVES, M.M.; PINTO, G. Water stress and recovery in the performance of two *Eucalyptus globulus* clones: physiological and biochemical profiles. **Physiologia Plantarum**, v.150, p. 580–592, 2014.
- COUTO, L.; SANS, L.M.A. Características físico-hídricas e disponibilidade de água no solo. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2002. 8 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular técnica, 21).
- CUADROS-INOSTROZA, A.; CALDANA, C.; REDESTIG, H.; KUSANO, M.; LISEC, J.; PEÑA-CORTÉS, H.; WILLMITZER, L.; HANNAH, M.A. TargetSearch-a Bioconductor package for the efficient preprocessing of GC-MS metabolite profiling data. **BMC Bioinformatics**, v.10, p.428, doi: 10.1186/1471-2105-10-428, 2009.
- CUZZUOL, G.R.F.; CANAL, E.C.; GAMA, V.N.; ZANETTI, L.V. Relações do N, P e K com a fluorescência da clorofila, teores de nutrientes foliares e carboidratos solúveis do caule de *Caesalpinia echinata* Lam. **Hoehnea**, v.43, n.1, p.151-158, 2016.
- DA CRUZ, E.A.; MOREIRA, G.R.; DE PAULA, M.O.; OLIVEIRA, A.C.M. Coeficiente de variação como medida de precisão em experimentos com tomate em ambiente protegido. **Enciclopédia Biosfera**, v.8, n.14; p. 220-233, 2012.
- DA SILVA, A.R.A.; BEZERRA, F.M.L.; DE LACERDA, C.F.; DE SOUSA, C.H.C.; CHAGAS, K.L. Pigmentos fotossintéticos e potencial hídrico foliar em plantas jovens de coqueiro sob estresses hídrico e salino. **Revista Agro@mbiente On-line**, v.10, n.4, p.317-325, 2016.
- DA SILVA, F.G.; DUTRA, W.F.; DUTRA, A.F.; OLIVEIRA, I.M.; FILGUEIRAS, L.M.B.; MELO, A.S. Trocas gasosas e fluorescência da clorofila em plantas de berinjela sob lâminas de irrigação. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.19, n.10, p.946–952, 2015.

- DA SILVA, P.H.M.; CAMPOE, O.C.; VIEIRA, I.G.; DE PAULA, R.C. Aplicação foliar de boro em eucalipto sob estresse hídrico. **Scientia Forestalis**, v. 43, n. 106, p. 395-405, 2015.
- DIAS, C.N.; PICOLI, E.A.T.; DE SOUZA, G.A.; FARAG, M.A.; SCOTTI, M.T.; BARBOSA FILHO, J.M.; DA SILVA, M.S.; TAVARES, J.F. Phenolics metabolism provides a tool for screening drought tolerant *Eucalyptus grandis* hybrids. **Australian Journal of Crop Science**, v.11, n.8, p. 1016-1024, 2017.
- DI FERDINANDO, M.; BRUNETTI, C.; FINI, A.; TATTINI, M. Flavonoids as antioxidants in plants under abiotic stresses. In: AHMAD, P.; PRASAD, M.N.V. (Eds.). **Abiotic Stress Responses in Plants: Metabolism, Productivity and Sustainability**. Dordrecht: Springer, 2012. cap.9, p.159-179.
- DIOLA, V.; DALOSO, D.M.; ANTUNES, W.C. Metabolômica. In: BORÉM, A.; FRITSCHÉ-NETO, R. (Eds.). **Ômicas 360º: aplicações e estratégias para o melhoramento de plantas**. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2013. Cap. 8, p.181-208.
- EL-AAL, H. A.; EL-HWAT, N.; EL-HEFNAWY, N.; MEDANY, M. Effect of sowing dates, irrigation levels and climate change on yield of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences**, v.11, n.1, p. 79-86, 2011.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. **Sobre o Eucalipto**. s.d. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/florestas/transferencia-de-tecnologia/eucalipto/tema>>. Acesso em: 08 abr. 2019.
- ESCOBAR-CÉVOLI, R.; CASTRO-ESPÍN, C.; BÉRAUD, V.; BUCKLAND, G.; ZAMORA-ROS, R. **An overview of global flavonoid intake and its food sources**. DOI: 10.5772/67655. 2017. Disponível em: <<https://www.intechopen.com/books/flavonoids-from-biosynthesis-to-human-health/an-overview-of-global-flavonoid-intake-and-its-food-sources>>. Acesso em: 18 out. 2019.
- FAROOQ, M.; WAHID, A.; KOBAYASHI, N.; FUJITA, D.; BASRA, S.M.A. Plant drought stress: effects, mechanisms and management. **Agronomy for Sustainable Development**, v.29, p. 185–212, 2009.
- FINI, A.; BRUNETTI, C.; DI FERDINANDO, M.; FERRINI, F.; TATTINI, M. Stress-induced flavonoid biosynthesis and the antioxidant machinery of plants. **Plant Signaling & Behavior**, v.6, n.5, p. 709-711, 2011.
- FOELKEL, C.E.B. Eucalipto no Brasil, história de pioneirismo. **Visão Agrícola**, n.4, p.66-69, 2005. Disponível em: < <https://www.esalq.usp.br/visaoagricola/sites/default/files/va04-florestas-plantadas03.pdf>>. Acesso em: 08 abr. 2019.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – FAO. **2017: The impact of disasters and crises on agriculture and food security**. 2018. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/I8656EN/i8656en.pdf>>. Acesso em: 22 set. 2019.
- FROSI, G.; HARAND, W.; OLIVEIRA, M.T.; PEREIRA, S.; CABRAL, S.P.; MONTENEGRO, A.A.A.; SANTOS, M.G. Different physiological responses under drought stress result in different recovery abilities of two tropical woody evergreen species. **Acta Botanica Brasilica**, v.31, n.2, p.153-160, 2017.
- GONDOKESUMO, M.E.; PARDJANTO, B.; SUMITRO, S.B.; WIDOWATI, W.; HANDONO, K. Xanthones analysis and antioxidant activity analysis (applying ESR) of six different maturity levels of mangosteen rind extract (*Garcinia mangostana* Linn.). **Pharmacognosy Journal**, v.11, p. 369-373, 2019.
- GRAHAM, T.L.; GRAHAM, M.Y. Signaling in soybean phenylpropanoid responses: dissection of primary, secondary, and conditioning effects of light, wounding, and elicitor treatments. **Plant Physiology**, v.110, p.1123-1133, 1996.

- GRIESSER, M.; WEINGART, G.; SCHOEDL-HUMMEL, K.; NEUMANN, N.; BECKER, M.; VARMUZA, K.; LIEBNER, F.; SCHUHMACHER, R.; FORNECK, A. Severe drought stress is affecting selected primary metabolites, polyphenols, and volatile metabolites in grapevine leaves (*Vitis vinifera* cv. Pinot noir). **Plant Physiology and Biochemistry**, v.88, p.17-26, 2015.
- GUARNASCHELLI, A.B.; PRYSTUPA, P.; LEMCOFF, J.H. Drought conditioning improves water status, stomatal conductance and survival of *Eucalyptus globulus* subsp. *bicostata* seedlings. **Annals of Forest Science**, v.63, n.8, p.941-950, 2006.
- GUIDI, L.; BRUNETTI, C.; FINI, A.; AGATI, G.; FERRINI, F.; GORI, A.; TATTINI, M. UV radiation promotes flavonoid biosynthesis, while negatively affecting the biosynthesis and the de-epoxidation of xanthophylls: Consequence for photoprotection? **Environmental and Experimental Botany**, v.127, p.14-25, 2016.
- GULLBERG, J.; JONSSON, P.; NORDSTRÖM, A.; SJÖSTRÖM, M.; MORITZ, T. Design of experiments: an efficient strategy to identify factors influencing extraction and derivatization of *Arabidopsis thaliana* samples in metabolomic studies with gas chromatography/mass spectrometry. **Analytical Biochemistry**, v.331, n.2, p.283-295, 2004.
- GUO, R.; SHI, L.; JIAO, Y.; LI, M.; ZHONG, X.; GU, F.; LIU, Q.; XIA, X.; LI, H. Metabolic responses to drought stress in the tissues of drought-tolerant and drought-sensitive wheat genotype seedlings. **AoB PLANTS**, v.10, n.2, p.016, doi: 10.1093/aobpla/ply016, 2018.
- HASHEMINASAB, H.; ASSAD, M.T.; ALIAKBARI, A.; SAHHAFI, S.R. Influence of drought stress on oxidative damage and antioxidant defense systems in tolerant and susceptible wheat genotypes. **Journal of Agricultural Science**, v.4, n.8, 2012.
- HATFIELD, J.L. Measuring plant stress with an infrared thermometer. **HortScience**, v. 25, n.12, p.1535-1538, 1990.
- HEATH, R.L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.125, n.1, p.189-198, 1968.
- HOFFMAN, D.E.; JONSSON, P.; BYLESJÖ, M.; TRYGG, J.; ANTTI, H.; ERIKSSON, M.E.; MORITZ, T. Changes in diurnal patterns within the *Populus* transcriptome and metabolome in response to photoperiod variation. **Plant, Cell and Environment**, v.33, p. 1298–1313, 2010.
- HONGYU, K.; SANDANIELO, V.L.M.; OLIVEIRA JUNIOR, G.J. Análise de Componentes Principais: resumo teórico, aplicação e interpretação. **Engineering and Science**, v. 1, p.83-90, 2015.
- HOU, Q.; UFER, G.; BARTELS, D. Lipid signalling in plant responses to abiotic stress. **Plant, Cell and Environment**, v. 39, 1029–1048, 2016.
- INDÚSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES - IBÁ. **Ibá - Relatório 2019**. Disponível em: <<https://www.iba.org/datafiles/publicacoes/relatorios/iba-relatorioanual2019.pdf>>. Acesso em: 02 out. 2019.
- INDÚSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES - IBÁ. **Sumário Executivo, 2018**. Disponível em: <<https://www.iba.org/datafiles/publicacoes/relatorios/digital-sumarioexecutivo-2018.pdf>>. Acesso em: 08 abr. 2019.
- INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS – INPE. **Índice de Precipitação Padronizado (SPI)**. s.d. Disponível em: <<http://clima1.cptec.inpe.br/spi/pt>>. Acesso em: 22 set. 2019.

- IRMLER, S.; SCHRÖDER, G.; ST-PIERRE, B.; CROUCH, N.P.; HOTZE, M.; SCHMIDT, J.; STRACK, D.; MATERN, U.; SCHRÖDER, J. Indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*: new enzyme activities and identification of cytochrome P450 CYP72A1 as secologanin synthase. **The Plant Journal**, v.24, n.6, p.797-804, 2000.
- JALEEL, C.A.; MANIVANNAN, P.; WAHID, A.; FAROOQ, M.; AL-JUBURI, H.J.; SOMASUNDARAM, R.; PANNEERSELVAM, R. Drought stress in plants: a review on morphological characteristics and pigments composition. **International Journal of Agriculture & Biology**, v.11, n.1, p.100–105, 2009.
- JANIAK, A.; KWAŚNIEWSKI, M.; SZAREJKO, I. Gene expression regulation in roots under drought. **Journal of Experimental Botany**, v.67, n.4, p.1003-1014, 2016.
- KOIRALA, N.; THUAN, N.H.; GHIMIRE, G.P.; VAN THANG, D.; SOHNG, J.K. Methylation of flavonoids: Chemical structures, bioactivities, progress and perspectives for biotechnological production. **Enzyme and Microbial Technology**, v.86, p.103–116, 2016.
- KOPKA, J.; SCHAUER, N.; KRUEGER, S.; BIRKEMEYER, C.; USADEL, B.; BERGMÜLLER, E.; DÖRMANN, P.; WECKWERTH, W.; GIBON, Y.; STITT, M.; WILLMITZER, L.; FERNIE, A.R.; STEINHAUSER, D. GMD@CSB.DB: the Golm Metabolome Database. **Bioinformatics**, v.21, n.8, p.1635-1638, 2005.
- KUMAR, S.; PANDEY, A.K. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. **The Scientific World Journal**, v. 2013, article ID 162750, 2013.
- LARKIN, R.M. Tetrapyrrole Signaling in Plants. **Frontiers in Plant Science**, v.7, article 1586, 2016.
- LICHTENTHALER, H.K. [34] Chlorophylls and Carotenoids: Pigments of Photosynthetic Biomembranes. **Methods in enzymology**, v.148, p. 350-382. 1987.
- LUGOJAN, C.; CIULCA, S. Evaluation of relative water content in winter wheat. **Journal of Horticulture, Forestry and Biotechnology**, v.15, n.2, p.173-177, 2011.
- MANTRI, N.; PATADE, V.; PENNA, S.; FORD, R.; PANG, E. Abiotic Stress Responses in Plants: Present and Future. In: AHMAD, P.; PRASAD, M.N.V. (Eds.). **Abiotic Stress Responses in Plants: Metabolism, Productivity and Sustainability**. Dordrecht: Springer, 2012. cap.1, p.1-19.
- MARENGO, J.A.; ALVES, L.M.; ALVALA, R.C.S.; CUNHA, A.P.; BRITO, S.; MORAES, O.L.L. Climatic characteristics of the 2010-2016 drought in the semiarid Northeast Brazil region. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.90, n.2, supl.1, p.1973-1985, 2018.
- MASESANE, I. B. A comprehensive review of the oxidative cyclisation of 2'-hydroxychalcones to aurones and flavones. **International Journal of Chemical Studies**, v.3, n.3, p. 53-59, 2015.
- MATSUURA, H.N.; RAU, M.R.; FETT-NETO, A.G. Oxidative stress and production of bioactive monoterpene indole alkaloids: biotechnological implications. **Biotechnology letters**, v.36, n.2, 191-200, 2014.
- MAWLONG, I.; SUJITH KUMAR, M.S.; SINGH, D. Furan fatty acids: their role in plant systems. **Phytochemistry Reviews**, v.15, n.1, p. 121–127, 2016.
- MERCHANT, A.; CALLISTER, A.; ARNDT, S.; TAUSZ, M.; ADAMS, M. Contrasting physiological responses of six *Eucalyptus* species to water deficit. **Annals of Botany** 100, p 1507–1515, 2007.
- METABOANALYST ANALYSIS REPORT**. 2019. Disponível em: <
<https://www.metaboanalyst.ca/MetaboAnalyst/home.xhtml>>. Acesso em: 16 fev. 2019.

- METACYC. **MetaCyc Pathways Class: Indole Alkaloid Biosynthesis**. s.d. Disponível em: <<https://biocyc.org/META/NEW-IMAGE?type=PATHWAY&object=INDOLE-ALKALOIDS>>. Acesso em: 11 set. 2019.
- MICHALETTI, A.; NAGHAVI, M.R.; TOORCHI, M.; ZOLLA, L.; RINALDUCCI, S. Metabolomics and proteomics reveal drought-stress responses of leaf tissues from spring-wheat. **Scientific Reports**, v. 8, article 5710, 2018.
- MIERZIAK, J.; KOSTYN, K.; KULMA, A. Flavonoids as important molecules of plant interactions with the environment. **Molecules**, v.19, n.10, 16240-16265, 2014.
- MOHALLEM, D.F.; TAVARES, M.; SILVA, P.L.; GUIMARÃES, E.C.; FREITAS, R.F. Avaliação do coeficiente de variação como medida da precisão em experimentos com frangos de corte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, n.2, p.449-453, 2008.
- MOLDOVEANU, S.C.; DAVID, V. **Derivatization Methods in GC and GC/MS**. DOI: 10.5772/intechopen.81954, 2018. Disponível em: <<https://www.intechopen.com/books/gas-chromatography-derivatization-sample-preparation-application/derivatization-methods-in-gc-and-gc-ms>>. Acesso em: 30 set. 2019.
- MORETTI, B.S.; FURTINI NETO, A.E.; PINTO, S.I.C.; BENATTI, B.P. Crescimento e produção de biomassa de seis clones de eucalipto na fase de muda. In: XIX CONGRESSO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UFPA, 2010, Lavras. **Anais/Resumos da Reunião Regional da SBPC em Lavras/MG - ISSN 2178-3969**. Disponível em: <<http://www.sbpnet.org.br/livro/lavras/resumos/1856.pdf>>. Acesso em: 10 abr. 2019.
- MOURA, V.P.G. O germoplasma de *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake no Brasil. **Comunicado Técnico 111**, 2004. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CENARGEN/28288/1/cot111.pdf>>. Acesso em: 08 abr. 2019.
- MULLAN, D.; PIETRAGALLA, J. Leaf relative water content. In: PASK, A.; PIETRAGALLA, J.; MULLAN, D.; REYNOLDS, M.P. (Eds.). **Physiological breeding II: a field guide to wheat phenotyping**. México, D.F.: CIMMYT, 2012. cap. 5, p. 25-27.
- NAVROSKI, M.C.; ARAÚJO, M.M.; CUNHA, F.S.; BERGHETTI, A.L.P.; PEREIRA, M.O. Influência do polímero hidrorretentor na sobrevivência de mudas de *Eucalyptus dunni* sob diferentes manejos hídricos. **Nativa**, v.2, n.2, p.108-113, 2014.
- NEGI, J. S.; BISHT, V. K.; SINGH, P.; RAWAT, M. S. M.; JOSHI, G. P. Naturally Occurring Xanthenes: Chemistry and Biology. **Journal of Applied Chemistry**, article ID 621459, 2013.
- NEMATI, F.; GHANATI, F.; AHMADI GAVLIGHI, H.; SHARIFI, M. Comparison of sucrose metabolism in wheat seedlings during drought stress and subsequent recovery. **Biologia Plantarum**, v.62, n.3, p. 595–599, 2018.
- NEPOMUCENO, A.L.; NEUMAIER, N.; FARIAS, J.R.B.; OYA, T. Tolerância à seca em plantas. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 23, p.12-18, 2001.
- OKUYAMA, L.A. **Estresses de altas temperaturas e deficiência hídrica em trigo (*Triticum aestivum* L.)**. s.d. Disponível em: <http://www.iapar.br/arquivos/File/zip_pdf/agrometeorologia/20131099-Calor-A.pdf>. Acesso em: 04 out. 2019.
- OLIVEROS, J.C. (2007-2015) **Venny. An interactive tool for comparing lists with Venn's diagrams. Venny 2.1**. Disponível em: <<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>>. Acesso em: 02 set. 2019.

- PACHECO, A. C.; CAMARGO, P.R.; SOUZA, C.G.M. Deficiência hídrica e aplicação de ABA nas trocas gasosas e no acúmulo de flavonoides em calêndula (*Calendula officinalis* L.). **Acta Scientiarum. Agronomy**, v.33, n.2, p. 275-281, 2011.
- PALUDZYSZYN FILHO, E.; SANTOS, P.E.T. Escolha de cultivares de eucaliptos em função do ambiente e do uso. **Comunicado Técnico** **316**, 2013. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/97498/1/CT-316-Escolha-de-cultivares.pdf>>. Acesso em: 10 abr. 2019.
- PATAKAS, A. Abiotic stress-induced morphological and anatomical changes in plants. In: AHMAD, P.; PRASAD, M.N.V. (Eds.). **Abiotic Stress Responses in Plants: Metabolism, Productivity and Sustainability**. Dordrecht: Springer, 2012. cap.2, p.21-39.
- PERLIKOWSKI, D.; CZYŻNIEJEWSKI, M.; MARCZAK, L.; AUGUSTYNIAK, A.; KOSMALA, A. Water deficit affects primary metabolism differently in two *Lolium multiflorum*/*Festuca arundinacea* introgression forms with a distinct capacity for photosynthesis and membrane regeneration. **Frontiers in Plant Science**, v.7, 1063, DOI: 10.3389/fpls.2016.01063, 2016.
- PINTO JÚNIOR, J.E.; SANTAROSA, E.; GOULART, I.C.G.R. Histórico do cultivo de eucalipto. In: SANTAROSA, E.; PENTEADO JÚNIOR, J.F.; GOULART, I.C.G.R. (Eds.). **Transferência de Tecnologia Florestal. Cultivo de eucalipto em propriedades rurais: diversificação da produção e renda**. Brasília, DF: Embrapa, 2014. cap. 01, p.11-12.
- PUBCHEM. **Compound summary: Arachidic acid**. 2019. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Arachidic-acid>>. Acesso em: 11 set. 2019.
- REGIANI, T.; BUDZINSKI, I.G.F.; GUIDETTI-GONZALES, S.; LABATE, M.T.V.; COTINGUIBA, F.; MARQUES, F.G.; MORAES, F.E.; LABATE, C.A. Eletroforese, cromatografia e espectrometria de massas. In: BORÉM, A.; FRITSCHÉ-NETO, R. (Eds.). **Ômicas 360º: aplicações e estratégias para o melhoramento de plantas**. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2013. Cap. 6, p.123-152.
- REGISTRO NACIONAL DE CULTIVARES - RNC**. Disponível em: <http://sistemas.agricultura.gov.br/snpc/cultivarweb/cultivares_registradas.php>. Acesso em: 17 abr. 2019.
- RIBASKI, J. Desempenho de espécies de *Eucalyptus* para uso em sistemas de integração floresta-pecuária no bioma Pampa. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 38, e201801638, p. 1-9, 2018. Disponível em: <<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/1103244/1/Ribaski1638186841PB.pdf>>. Acesso em: 04 out. 2019.
- ROBINSON, T. Metabolism and function of alkaloids in plants. **Science, New Series**, v.184, n.4135, p.430-435, 1974.
- ROSA, M.; PRADO, C.; PODAZZA, G.; INTERDONATO, R.; GONZÁLEZ, J.A.; HILAL, M.; PRADO, F.E. Soluble sugars - Metabolism, sensing and abiotic stress: A complex network in the life of plants. **Plant Signaling & Behavior**, v.4, n.5, p.388-393; 2009.
- SANTOS, L.C.; PIACENTE, S.; MONTORO, P.; PIZZA, C.; VILEGAS, W. Atividade antioxidante de xantonas isoladas de espécies de *Leiothrix* (Eriocaulaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.13, n.2, p.67-74, 2003.
- SANTOS, R.F.; CARLESSO, R. Déficit hídrico e os processos morfológico e fisiológico das plantas. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.2, n.3, p.287-294, 1998.

- SARMA, S.N.; SALEEM, A.; LEE, J.Y.; TOKUMOTO, M.; HWANG, G.W.; MAN CHAN, H.; SATOH, M. Effects of long-term cadmium exposure on urinary metabolite profiles in mice. **The Journal of Toxicological Sciences**, v.43, n.2, p.89-100, 2018.
- SCHACHTMAN, D.P.; GOODGER, J.Q.D. Chemical root to shoot signaling under drought. **Trends in Plant Science**, v.13, n.6, p. 281-287, 2008.
- SHARMA, A.; SHAHZAD, B.; REHMAN, A.; BHARDWAJ, R.; LANDI, M.; ZHENG, B. Response of phenylpropanoid pathway and the role of polyphenols in plants under abiotic stress. **Molecules**, v.24, 2452, doi:10.3390/molecules24132452, 2019.
- SINGH, D.; LAXMI, A. Transcriptional regulation of drought response: a tortuous network of transcriptional factors. **Frontiers in Plant Science**, v.6, 895, doi: 10.3389/fpls.2015.00895, 2015.
- STREIT, N.M.; CANTERLE, L.P.; DO CANTO, M.W.; HECKTHEUER, L.H.H. As Clorofilas. **Ciência Rural**, v.35, n.3, p.748-755, 2005.
- STRZALKA, K.; KOSTECKA-GUGALA, A.; LATOWSKI, D. Carotenoids and environmental stress in plants: significance of carotenoid-mediated modulation of membrane physical properties. **Russian Journal of Plant Physiology**, v.50, n.2, p.168-173, 2003.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. Ácido Abscísico: Um hormônio de maturação de sementes e Resposta ao estresse. In: _____. **Fisiologia vegetal**. Tradução de DIVAN JUNIOR, A. M. et al. Revisão de OLIVEIRA, P. L. Porto Alegre: Artmed, 2013a. cap. 23, p. 671-696.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. Metabólitos Secundários e Defesa Vegetal. In: _____. **Fisiologia vegetal**. Tradução de DIVAN JUNIOR, A. M. et al. Revisão de OLIVEIRA, P. L. Porto Alegre: Artmed, 2013b. cap. 13, p.369-400.
- TATTINI, M.; GALARDI, C.; PINELLI, P.; MASSAI, R.; REMORINI, D.; AGATI, G. Differential accumulation of flavonoids and hydroxycinnamates in leaves of *Ligustrum vulgare* under excess light and drought stress. **New Phytologist**, v.163, p. 547-561, 2004.
- TENG, Q. **Structural Biology**: practical NMR application. 2 ed. New York: Springer, 2013. 434p.
- THE SMALL MOLECULE PATHWAY DATABASE – SMPDB. **Pathway Description: Inositol Phosphate Metabolism**. 2019a. Disponível em: <<http://smpdb.ca/view/SMP0000462>>. Acesso em: 11 set. 2019.
- THE SMALL MOLECULE PATHWAY DATABASE – SMPDB. **Pathway Description: Galactose Metabolism**. 2019b. Disponível em: <<http://smpdb.ca/view/SMP0000043>>. Acesso em: 11 set. 2019.
- TIWARI, R.; RANA, C.S. Plant secondary metabolites: a review. **International Journal of Engineering Research and General Science**, v.3, n.5, p.661-670, 2015.
- TSANG, C.K.; LIU, Y.; THOMAS, J.; ZHANG, Y.; ZHENG, X.F. Superoxide dismutase 1 acts as a nuclear transcription factor to regulate oxidative stress resistance. **Nature Communications**, v. 5, n.3446, DOI: 10.1038/ncomms4446, 2014.
- VALLI, M. Análise de Cluster. **Augusto Guzzo Revista Acadêmica**, n. 4, p. 77-87, 2012. Disponível em: <http://fics.edu.br/index.php/augusto_guzzo/article/view/107>. Acesso em: 06 jun. 2019.
- VELLINI, A.L.T.T.; DE PAULA, N.F.; ALVES, P.L.C.A.; PAVANI, L.C.; BONINE, C.A.V.; SCARPINATI, E.A.; DE PAULA, R.C. Respostas fisiológicas de diferentes clones de eucalipto sob diferentes regimes de irrigação. **Revista Árvore**, v.32, n.4, p.651-663, 2008.
- WARREN, C.R.; ARANDA, I.; CANO, F.J. Metabolomics demonstrates divergent responses of two *Eucalyptus* species to water stress. **Metabolomics**, v.8, n.2, p. 186-200, 2012.

- WEDEKING, R.; MAUCOURT, M.; DEBORDE, C.; MOING, A.; GIBON, Y.; GOLDBACH, H.E.; WIMMER, M.A. ¹H-NMR metabolomic profiling reveals a distinct metabolic recovery response in shoots and roots of temporarily drought-stressed sugar beets. **PLoS ONE**, v.13, n.5, e0196102, 2018.
- WIKIPEDIA – THE FREE ENCYCLOPEDIA. **Apigenin**. s.d.a. Disponível em <<https://en.wikipedia.org/wiki/Apigenin>>. Acesso em: 23 set. 2019.
- WIKIPEDIA – THE FREE ENCYCLOPEDIA. **Kaempferol**. s.d.b. Disponível em <<https://en.wikipedia.org/wiki/Kaempferol>>. Acesso em: 23 set. 2019.
- WIKIPEDIA – THE FREE ENCYCLOPEDIA. **Luteolin**. s.d.c. Disponível em <<https://en.wikipedia.org/wiki/Luteolin>>. Acesso em: 23 set. 2019.
- WIKIPEDIA – THE FREE ENCYCLOPEDIA. **Quercetin**. s.d.d. Disponível em <<https://en.wikipedia.org/wiki/Quercetin>>. Acesso em: 23 set. 2019.
- WILLIAMS, M.G. **Inositol phosphate metabolism**. 2011. Disponível em: <<https://reactome.org/content/detail/R-HSA-1483249>>. Acesso em: 11 set. 2019.
- XIA, J.; WISHART, D.S. MetPA: a web-based metabolomics tool for pathway analysis and visualization. **Bioinformatics**, v.26, n.18, p.2342-2344, 2010.
- XOCONOSTLE-CÁZARES, B.; RAMÍREZ-ORTEGA, F.A.; FLORES-ELENES, L.; RUIZ-MEDRANO, R. Drought tolerance in crop plants. **American Journal of Plant Physiology**, v.5, n.5, p.241-256, 2010.
- XU, Z.; ZHOU, G.; SHIMIZU, H. Are plant growth and photosynthesis limited by pre-drought following rewatering in grass? **Journal of Experimental Botany**, v.60, n.13, p. 3737–3749, 2009.
- YILDIZLI, A.; ÇEVİK, S.; ÜNYAYAR, S. Effects of exogenous myo-inositol on leaf water status and oxidative stress of *Capsicum annuum* under drought stress. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.40, doi:10.1007/s11738-018-2690-z, 2018.
- ZHIGACHEVA, I.V.; BURLAKOVA, E.B.; MISHARINA, T.A.; TEREENINA, M.B.; KRIKUNOVA, N.I.; GENEROSOVA, I.P.; SHUGAEV, A.G.; FATTAKHOV, S.G. Fatty acid composition of membrane lipids and energy metabolism in mitochondria of pea seedlings under water deficit. **Russian Journal of Plant Physiology**, v.60, n.2, p. 212–220, 2013.
- ZHUKOV, A.V. Very long-chain fatty acids in composition of plant membrane lipids. **Russian Journal of Plant Physiology**, v.65, n.6, p. 784–800, 2018.

ANEXO A. Metabólitos diferencialmente abundantes provenientes da comparação IPB1_C_DH x IPB1_T_DH (*volcano plot*: *p-value threshold* < 0,05 ajustado pelo FDR e *fold change threshold* = 4,0) realizada com dados obtidos por meio da técnica de GC-MS

(continua)

Código ⁽¹⁾	Descrição	FC ⁽²⁾	log ₂ (FC) ⁽³⁾	<i>p.adjusted</i> ⁽⁴⁾	Maior abundância ⁽⁵⁾
1894	M000561_A260001 <i>n-Hexacosane</i>	0.0316	-4.9858	4.1400E-28	IPB1_T_DH
1442	M000000_A209004 <i>NA</i>	0.0261	-5.2608	4.0000E-23	IPB1_T_DH
2027	M000000_A275004 <i>NA</i>	0.0272	-5.2019	1.5900E-22	IPB1_T_DH
2471	M000000_A340002 <i>NA</i>	55.9650	5.8064	2.7600E-22	IPB1_C_DH
1855	M000000_A255001 <i>NA</i>	0.0281	-5.1516	1.0700E-20	IPB1_T_DH
2388	M000000_A323004 <i>NA</i>	39.3450	5.2981	4.2700E-19	IPB1_C_DH
2432	M000000_A333002 <i>NA</i>	57.8440	5.8541	1.0500E-17	IPB1_C_DH
2115	M000000_A283016 <i>D283309</i>	33.7460	5.0766	1.3600E-15	IPB1_C_DH
1883	M000000_A258005 <i>NA</i>	44.5700	5.4780	7.9400E-09	IPB1_C_DH
1832	M000775_A251011 <i>1-beta-D-Galactopyranosyl-3-D-arabinose</i>	0.0314	-4.9931	7.9400E-09	IPB1_T_DH
687	M000953_A165008 <i>Imidazole-4-acetic acid</i>	0.0199	-5.6539	3.1000E-08	IPB1_T_DH
1189	M000000_A192001 <i>NA192001 (classified unknown)</i>	49.9470	5.6423	9.4000E-05	IPB1_C_DH
1090	M000606_A187002 <i>Fructose MP</i>	49.5110	5.6297	9.4000E-05	IPB1_C_DH
1208	M000687_A193002 <i>Mannitol</i>	46.1010	5.5267	9.4000E-05	IPB1_C_DH
1105	M000000_A187020 <i>3-Hydroxytetradecanoic acid</i>	68.4980	6.0980	9.6500E-05	IPB1_C_DH
1441	M000129_A209003 <i>Prephenic acid</i>	42.0570	5.3943	9.6500E-05	IPB1_C_DH
1144	M000616_A189011 <i>allo-Inositol</i>	0.0362	-4.7890	9.6500E-05	IPB1_T_DH
1440	M000060_A209002 <i>myo-Inositol</i>	0.0418	-4.5798	9.6500E-05	IPB1_T_DH
1234	M000000_A194007 <i>NA</i>	44.8860	5.4882	6.7882E-04	IPB1_C_DH
2112	M001181_A283013 <i>6-oxo-Prostaglandin F1A, MP</i>	0.0321	-4.9623	9.9164E-04	IPB1_T_DH
605	M000958_A159008 <i>Digitoxose MP</i>	45.7490	5.5157	9.7548E-03	IPB1_C_DH
1192	M000640_A192004 <i>Gulonic acid-1,4-lactone</i>	39.0290	5.2865	9.7548E-03	IPB1_C_DH

(conclusão)

Código ⁽¹⁾		Descrição	FC ⁽²⁾	log ₂ (FC) ⁽³⁾	<i>p.adjusted</i> ⁽⁴⁾	Maior abundância ⁽⁵⁾
2003	M000000_A273012	NA	33.5490	5.0682	9.7548E-03	IPB1_C_DH
1837	M000000_A252004	NA	32.6020	5.0269	9.7548E-03	IPB1_C_DH
2129	M000788_A285002	Palatinose	17.4020	4.1212	9.7548E-03	IPB1_C_DH
751	M000000_A168027	NA168027	4.0704	2.0252	1.4163E-02	IPB1_C_DH

(1) Fornecido por GMD

(2) *Fold change*

(3) *log2 fold change*

(4) valor de *p*-ajustado com base no FDR

(5) Grupo em maior abundância

ANEXO B. Metabólitos diferencialmente abundantes provenientes da comparação AEC 0144_C_DH x AEC 0144_T_DH (*volcano plot*: p -value threshold < 0,05 ajustado pelo FDR e *fold change threshold* = 4,0) realizada com dados obtidos por meio da técnica de GC-MS

(continua)

Código ⁽¹⁾	Descrição	FC ⁽²⁾	log ₂ (FC) ⁽³⁾	<i>p</i> -ajustada ⁽⁴⁾	Maior abundância ⁽⁵⁾
2221	M000000_A295008 <i>N.A</i>	111.33	6.7988	2.46E-30	AEC 0144_C_DH
1832	M000775_A251011 <i>1-beta-Galactopyranosyl-3-D-arabinose</i>	104.91	6.713	2.46E-30	AEC 0144_C_DH
2215	M001187_A294009 <i>5alpha-allo-Pregnane-3,20-dione, MP</i>	134.87	7.0754	4.22E-29	AEC 0144_C_DH
1916	M000044_A264001 <i>Sucrose</i>	0.006517	-7.2615	1.54E-28	AEC 0144_T_DH
2474	M000426_A340005 <i>Tetratriacontane</i>	0.017498	-5.8366	7.51E-28	AEC 0144_T_DH
2185	M001111_A290015 <i>Secologanin MP</i>	0.004509	-7.793	1.09E-27	AEC 0144_T_DH
2284	M000000_A305002 <i>N.A</i>	148.2	7.2114	1.09E-27	AEC 0144_C_DH
1855	M000000_A255001 <i>N.A</i>	112.31	6.8114	4.41E-27	AEC 0144_C_DH
1563	M000000_A218001 <i>N.A</i>	74.689	6.2228	6.03E-27	AEC 0144_C_DH
1881	M001182_A258003 <i>Salicylic acid-glucopyranoside</i>	115.9	6.8568	1.95E-26	AEC 0144_C_DH
1679	M000767_A231007 <i>11-(Z)-Eicosenoic acid methyl ester</i>	88.274	6.4639	1.91E-23	AEC 0144_C_DH
704	M000000_A166016 <i>N.A_222_204_179_119_105</i>	77.6	6.278	1.13E-20	AEC 0144_C_DH
2232	M000000_A296006 <i>N.A</i>	165.06	7.3669	6.76E-20	AEC 0144_C_DH
2027	M000000_A275004 <i>N.A</i>	0.015894	-5.9754	1.35E-19	AEC 0144_T_DH
1745	M000558_A240003 <i>n-Tetracosane</i>	113.51	6.8267	1.19E-09	AEC 0144_C_DH
1706	M000000_A236001 <i>N.A</i>	133.21	7.0576	1.21E-09	AEC 0144_C_DH
2471	M000000_A340002 <i>N.A</i>	121.96	6.9302	1.3E-09	AEC 0144_C_DH
2560	M000000_A367002 <i>N.A367002</i>	0.017268	-5.8558	1.31E-09	AEC 0144_T_DH
2531	M000000_A354003 <i>N.A</i>	70.062	6.1306	1.34E-09	AEC 0144_C_DH
1883	M000000_A258005 <i>N.A</i>	0.014745	-6.0837	1.71E-09	AEC 0144_T_DH
751	M000000_A168027 <i>N.A168027</i>	63.294	5.984	1.02E-06	AEC 0144_C_DH
1307	M000596_A199002 <i>Galactonic acid</i>	52.45	5.7129	1.62E-06	AEC 0144_C_DH

						(conclusão)
Código ⁽¹⁾	Descrição	FC ⁽²⁾	log ₂ (FC) ⁽³⁾	p.adjusted ⁽⁴⁾	Maior abundância ⁽⁵⁾	
2388	M000000_A323004 <i>N/A</i>	0.002525	-8.6294	2.35E-05	AEC 0144_T_DH	
1778	M000489_A245001 <i>Eicosanoic acid</i>	0.004904	-7.6719	2.35E-05	AEC 0144_T_DH	
1762	M000000_A242009 <i>N/A</i>	137.29	7.1011	2.35E-05	AEC 0144_C_DH	
2298	M000000_A307008 <i>RL3_1</i>	112.27	6.8109	2.35E-05	AEC 0144_C_DH	
2158	M000000_A288003 <i>N/A</i>	101.75	6.669	2.35E-05	AEC 0144_C_DH	
2110	M000296_A283011 <i>Gentiobiose MP</i>	0.009862	-6.664	2.35E-05	AEC 0144_T_DH	
1759	M000000_A242002 <i>N/A</i>	99.935	6.6429	2.35E-05	AEC 0144_C_DH	
1391	M000483_A205001 <i>Hexadecanoic acid</i>	92.862	6.537	2.35E-05	AEC 0144_C_DH	
1738	M000000_A239004 <i>N/A</i>	90.191	6.4949	2.35E-05	AEC 0144_C_DH	
2145	M000107_A287001 <i>Isomaltose MP</i>	0.012329	-6.3418	2.35E-05	AEC 0144_T_DH	
1632	M000710_A225012 <i>Glucobep tonic acid-1,4-lactone</i>	78.182	6.2888	2.35E-05	AEC 0144_C_DH	
2129	M000788_A285002 <i>Palatinose</i>	76.135	6.2505	2.35E-05	AEC 0144_C_DH	
2270	M000000_A302004 <i>D302190</i>	70.847	6.1466	2.35E-05	AEC 0144_C_DH	
2044	M000000_A276007 <i>N/A</i>	0.024203	-5.3687	2.35E-05	AEC 0144_T_DH	
2432	M000000_A333002 <i>N/A</i>	132.1	7.0455	2.9E-05	AEC 0144_C_DH	
2136	M000000_A286002 <i>N/A</i>	0.01001	-6.6425	5.35E-05	AEC 0144_T_DH	
2352	M000000_A316008 <i>N/A</i>	107.09	6.7427	0.000227	AEC 0144_C_DH	
2223	M000000_A295012 <i>N/A</i>	66.723	6.0601	0.000227	AEC 0144_C_DH	
2155	M000000_A287014 <i>Palatinose</i>	0.022846	-5.4519	0.001425	AEC 0144_T_DH	
1626	M000485_A225002 <i>Octadecanoic acid</i>	6.5173	2.7043	0.003511	AEC 0144_C_DH	
2071	M000000_A278007 <i>N/A</i>	60.859	5.9274	0.005845	AEC 0144_C_DH	

(1) Fornecido por GMD

(2) *Fold change*

(3) *log₂ fold change*

(4) valor de *p*-ajustado com base no FDR

(5) Grupo em maior abundância

ANEXO C. Metabólitos identificados diferencialmente abundantes, provenientes da comparação IPB1_C_DH x IPB1_T_DH (*volcano plot*: p -value threshold < 0,05 ajustado pelo FDR e $fold\ change\ threshold = 4,0$) realizada com dados obtidos por meio da técnica de GC-MS, e suas respectivas classes químicas

(continua)

Código	GMD ID	Descrição	Classe	Fonte	Classe Geral	Maior abundância
1894	M000561_A260001	<i>n-Hexacosane</i>	<i>Alkane</i>	GMD http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Metabolites/cc0ef1c1-42c8-4428-ab5a-41e9c6a177e7.aspx	Alcano	IPB1_T_DH
2115	M000000_A283016	D283309	-	-	-	IPB1_C_DH
1832	M000775_A251011	<i>1-beta-D-Galactopyranosyl-3-D-arabinose</i>	<i>Sugar (Disaccharide)</i>	GMD http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Metabolites/fc5884a1-9157-431b-b646-284b32be1822.aspx	Açúcar	IPB1_T_DH
687	M000953_A165008	<i>Imidazole-4-acetic acid</i>	<i>Monocarboxylic acid</i>	PubChem https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/96215	Ácido Carboxílico	IPB1_T_DH
1090	M000606_A187002	<i>Fructose</i>	<i>Sugar (Hexose)</i>	GMD http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Metabolites/dfa8c62b-e34b-4603-a548-f6a8d25645dd.aspx	Açúcar	IPB1_C_DH
1208	M000687_A193002	<i>Mannitol</i>	<i>Polyol (Hexitol)</i>	GMD http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Metabolites/47e666d6-f38a-4b47-9a78-f33460542fc5.aspx	Poliol	IPB1_C_DH
1105	M000000_A187020	<i>3-Hydroxytetradecanoic acid</i>	<i>3-hydroxy fatty acid</i>	PubChem https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3-Hydroxytetradecanoic-acid	Ácido graxo	IPB1_C_DH
1441	M000129_A209003	<i>Prephenic acid</i>	<i>Dicarboxylic acid</i>	GMD http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Metabolites/d0caeb4e-fd01-4ad2-9dc4-aabebf5aed8a.aspx	Ácido carboxílico	IPB1_C_DH
1144	M000616_A189011	<i>allo-Inositol</i>	<i>Polyol (Inositol)</i>	GMD http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Metabolites/7b0cef84-d9ce-4a88-aa7d-ec50c89387a5.aspx	Poliol	IPB1_T_DH
1440	M000060_A209002	<i>myo-Inositol</i>	<i>Polyol (Inositol)</i>	GMD http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Metabolites/1d7a27bf-6060-4fa9-ac46-3bd18dba406e.aspx	Poliol	IPB1_T_DH
2112	M001181_A283013	<i>6-oxo-Prostaglandin F1A</i>	<i>Fatty Acyls</i>	HMDB http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB0002886	Acil graxo	IPB1_T_DH

(conclusão)

Código	GMD ID	Descrição	Classe	Fonte	Classe Geral	Maior abundância
605	M000958_A159008	<i>Digitoxose</i>	<i>Dideoxyhexose</i>	http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Metabolites/321a51d9-27dc-47c8-b131-764fc077b114.aspx	Açúcar dideoxi	IPB1_C_DH
1192	M000640_A192004	<i>Galonic acid-1,4-lactone</i>	<i>Acid (Hexonic, lactone)</i>	http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Metabolites/baf290d4-5a2b-424c-9f26-37dbb214e76b.aspx	Ácido (lactona)	IPB1_C_DH
2129	M000788_A285002	<i>Palatinose</i>	<i>Sugar (Disaccharide)</i>	http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Metabolites/bf360c7c-5540-4450-afb9-082fcf951dd1.aspx	Açúcar	IPB1_C_DH

ANEXO D. Metabólitos identificados diferencialmente abundantes, provenientes da comparação AEC 0144_C_DH x AEC 0144_T_DH (*volcano plot*: p -value threshold < 0,05 ajustado pelo FDR e *fold change threshold* = 4,0) realizada com dados obtidos por meio da técnica de GC-MS, e suas respectivas classes químicas

							(continua)
Código	GMD ID	Descrição	Classe	Fonte	Classe Geral	Maior abundância	
1832	M000775_A251011	<i>1-beta-D-Galactopyranosyl-3-D-arabinose</i>	<i>Sugar (Disaccharide)</i>	GMD http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Metabolites/fc5884a1-9157-431b-b646-284b32be1822.aspx	Açúcar	AEC 0144_C_DH	
2215	M001187_A294009	<i>5alpha-allo-Pregnane-3,20-dione</i>	<i>C21-steroid hormone</i>	PubChem https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/92810	Esteróide	AEC 0144_C_DH	
1916	M000044_A264001	<i>Sucrose</i>	<i>Sugar (Disaccharide)</i>	GMD http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Metabolites/4f0791e5-05fb-4aee-92ef-c876aabb4e1.aspx	Açúcar	AEC 0144_T_DH	
2474	M000426_A340005	<i>Tetratriacontane</i>	<i>Alkane</i>	GMD http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Metabolites/ff7bb6b8-4684-449e-9baa-3cedc172e786.aspx	Alcano	AEC 0144_T_DH	
2185	M001111_A290015	<i>Secologanin</i>	<i>Carboxylic ester</i>	GMD http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/ReferenceSubstances/ad0d7c0a-751c-4e55-b3a9-4a63cb747ac6.aspx	Éster carboxílico	AEC 0144_T_DH	
1881	M001182_A258003	<i>Salicylic acid-glucopyranoside</i>	<i>Monosaccharide derivative</i>	PubChem https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/151505#section=ChemIDplus	Derivados de açúcar	AEC 0144_C_DH	
1679	M000767_A231007	<i>11-(Z)-Eicosenoic acid methyl ester</i>	<i>Acid (Fatty acid methyl ester)</i>	GMD http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Metabolites/117aec6d-82ee-43e2-a944-cdf37f9e6c79.aspx	Ácido (Éster de ácido graxo)	AEC 0144_C_DH	
1745	M000558_A240003	<i>n-Tetracosane</i>	<i>Alkane</i>	GMD http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Metabolites/0a751d89-fc23-4e63-9fa0-2dd14da5803e.aspx	Alcano	AEC 0144_C_DH	
1307	M000596_A199002	<i>Galactonic acid</i>	<i>Sugar acid</i>	PubChem https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/D-Galactonic-acid	Açúcar ácido	AEC 0144_C_DH	
1778	M000489_A245001	<i>Eicosanoic acid</i>	<i>Acid (Fatty acid trimethylsilyl ester)</i>	GMD http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Metabolites/38660976-a573-4a36-b283-4ea09d1e22ec.aspx	Ácido (Éster de ácido graxo)	AEC 0144_T_DH	

(conclusão)

Código	GMD ID	Descrição	Classe	Fonte	Classe Geral	Maior abundância
2298	M000000_A307008	RL3_1	-	-	-	AEC 0144_C_DH
2110	M000296_A283011	<i>Gentiobiose</i>	<i>Sugar (Disaccharide)</i>	GMD http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Metabolites/99b689f5-16ab-4138-8e64-acffa981461.aspx	Açúcar	AEC 0144_T_DH
1391	M000483_A205001	<i>Hexadecanoic acid</i>	<i>Acid (Fatty acid trimethylsilyl ester)</i>	GMD http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Metabolites/ba71c79b-c9b1-451a-a5be-b480b5cc7d0c.aspx	Ácido (Éster de ácido graxo)	AEC 0144_C_DH
2145	M000107_A287001	<i>Isomaltose</i>	<i>Sugar (Disaccharide)</i>	GMD http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Metabolites/de946e5c-0d22-49a9-b187-a6c61343b83e.aspx	Açúcar	AEC 0144_T_DH
1632	M000710_A225012	<i>Glucobepionic acid-1,4-lactone</i>	<i>Acid (Heptonic, lactone)</i>	GMD http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Metabolites/3304b41c-9511-4da0-bcf1-3097fe028caf.aspx	Ácido (lactona)	AEC 0144_C_DH
2129	M000788_A285002	<i>Palatinose</i>	<i>Sugar (Disaccharide)</i>	GMD http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Metabolites/bf360c7c-5540-4450-afb9-082fcf951dd1.aspx	Açúcar	AEC 0144_C_DH
2270	M000000_A302004	D302190	-	-	-	AEC 0144_C_DH
2155	M000000_A287014	<i>Palatinose</i>	<i>Sugar (Disaccharide)</i>	GMD http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Metabolites/143bb4c7-69c7-4f7b-9f75-cca1022b6bb1.aspx	Açúcar	AEC 0144_T_DH
1626	M000485_A225002	<i>Octadecanoic acid</i>	<i>Acid (Fatty acid trimethylsilyl ester)</i>	GMD http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Metabolites/cd7993ea-ad14-452a-a907-33376cc98790.aspx	Ácido (Éster de ácido graxo)	AEC 0144_C_DH

ANEXO E. Metabólitos identificados diferencialmente abundantes, provenientes da comparação IPB1_C_DH x IPB1_T_DH (*volcano plot*: $p\text{-value threshold} < 0,05$ ajustado pelo FDR e $\text{fold change threshold} = 4,0$) realizada com dados obtidos por meio da técnica de GC-MS, utilizados como *input* para a análise de vias metabólicas impactadas (MetPA)

Código	GMD ID	Descrição	Input MetPA	FC	log ₂ (FC)	<i>p.adjusted</i>	Maior abundância
1894	M000561_A260001	<i>n-Hexacosane</i>	<i>n-Hexacosane</i>	0.03	-4.99	4.14E-28	IPB1_T_DH
2115	M000000_A283016	D283309	-	33.75	5.08	1.36E-15	IPB1_C_DH
1832	M000775_A251011	<i>1-beta-D-Galactopyranosyl-3-D-arabinose</i>	<i>1-beta-D-Galactopyranosyl-3-D-arabinose</i>	0.03	-4.99	7.94E-09	IPB1_T_DH
687	M000953_A165008	<i>Imidazole-4-acetic acid</i>	<i>Imidazole-4-acetic acid</i>	0.02	-5.65	3.10E-08	IPB1_T_DH
1090	M000606_A187002	<i>Fructose</i>	<i>Fructose</i>	49.51	5.63	9.40E-05	IPB1_C_DH
1208	M000687_A193002	<i>Mannitol</i>	<i>Mannitol</i>	46.10	5.53	9.40E-05	IPB1_C_DH
1105	M000000_A187020	<i>3-Hydroxytetradecanoic acid</i>	<i>beta-Hydroxymyristic acid</i>	68.50	6.10	9.65E-05	IPB1_C_DH
1441	M000129_A209003	<i>Prephenic acid</i>	<i>Prephenic acid</i>	42.06	5.39	9.65E-05	IPB1_C_DH
1144	M000616_A189011	<i>allo-Inositol</i>	<i>Scyllo-inositol</i>	0.04	-4.79	9.65E-05	IPB1_T_DH
1440	M000060_A209002	<i>myo-Inositol</i>	<i>Myo-Inositol</i>	0.04	-4.58	9.65E-05	IPB1_T_DH
2112	M001181_A283013	<i>6-oxo-Prostaglandin F1A</i>	<i>6-Keto-PGF1a</i>	0.03	-4.96	9.92E-04	IPB1_T_DH
605	M000958_A159008	<i>Digitoxose</i>	<i>Digitoxose</i>	45.75	5.52	9.75E-03	IPB1_C_DH
1192	M000640_A192004	<i>Galonic acid-1,4-lactone</i>	<i>D-Galactonic acid</i>	39.03	5.29	9.75E-03	IPB1_C_DH
2129	M000788_A285002	<i>Palatinose</i>	<i>Palatinose</i>	17.40	4.12	9.75E-03	IPB1_C_DH

ANEXO F. Metabólitos identificados diferencialmente abundantes, provenientes da comparação AEC 0144_C_DH x AEC 0144_T_DH (*volcano plot*: *p-value threshold* < 0,05 ajustado pelo FDR e *fold change threshold* = 4,0) realizada com dados obtidos por meio da técnica de GC-MS, utilizados como *input* para a análise de vias metabólicas impactadas (MetPA)

Código	GMD ID	Descrição	Input MetPA	FC	log ₂ (FC)	<i>p.adjusted</i>	Maior abundância
1832	M000775_A251011	<i>1-beta-D-Galactopyranosyl-3-D-arabinose</i>	<i>1-beta-D-Galactopyranosyl-3-D-arabinose</i>	104.91	6.71	2.46E-30	AEC 0144_C_DH
2215	M001187_A294009	<i>5alpha-allo-Pregnane-3,20-dione</i>	<i>3,20-Allopregnandione</i>	134.87	7.08	4.22E-29	AEC 0144_C_DH
1916	M000044_A264001	<i>Sucrose</i>	<i>Sucrose</i>	0.01	-7.26	1.54E-28	AEC 0144_T_DH
2474	M000426_A340005	<i>Tetratriacontane</i>	<i>Tetratriacontane</i>	0.02	-5.84	7.51E-28	AEC 0144_T_DH
2185	M001111_A290015	<i>Secologanin</i>	<i>Secologanin</i>	4.51E-03	-7.79	1.09E-27	AEC 0144_T_DH
1881	M001182_A258003	<i>Salicylic acid-glucopyranoside</i>	<i>Salicylic acid-glucopyranoside</i>	115.90	6.86	1.95E-26	AEC 0144_C_DH
1679	M000767_A231007	<i>11-(Z)-Eicosenoic acid methyl ester</i>	<i>11-(Z)-Eicosenoic acid methyl ester</i>	88.27	6.46	1.91E-23	AEC 0144_C_DH
1745	M000558_A240003	<i>n-Tetracosane</i>	<i>n-Tetracosane</i>	113.51	6.83	1.19E-09	AEC 0144_C_DH
1307	M000596_A199002	<i>Galactonic acid</i>	<i>Galactonic acid</i>	52.45	5.71	1.62E-06	AEC 0144_C_DH
1778	M000489_A245001	<i>Eicosanoic acid</i>	<i>Eicosanoic acid</i>	4.90E-03	-7.67	2.35E-05	AEC 0144_T_DH
2298	M000000_A307008	RL3_1	-	112.27	6.81	2.35E-05	AEC 0144_C_DH
2110	M000296_A283011	<i>Gentiobiose</i>	<i>6-O-Hexopyranosylhexose</i>	0.01	-6.66	2.35E-05	AEC 0144_T_DH
1391	M000483_A205001	<i>Hexadecanoic acid</i>	<i>Hexadecanoic acid</i>	92.86	6.54	2.35E-05	AEC 0144_C_DH
2145	M000107_A287001	<i>Isomaltose</i>	<i>Isomaltose</i>	0.01	-6.34	2.35E-05	AEC 0144_T_DH
1632	M000710_A225012	<i>Glucobepionic acid-1,4-lactone</i>	<i>Glucobepionic acid-1,4-lactone</i>	78.18	6.29	2.35E-05	AEC 0144_C_DH
2129	M000788_A285002	<i>Palatinose</i>	<i>Palatinose</i>	76.14	6.25	2.35E-05	AEC 0144_C_DH
2270	M000000_A302004	D302190	-	70.85	6.15	2.35E-05	AEC 0144_C_DH
2155	M000000_A287014	<i>Palatinose</i>	<i>Palatinose</i>	0.02	-5.45	1.42E-03	AEC 0144_T_DH
1626	M000485_A225002	<i>Octadecanoic acid</i>	<i>Octadecanoic acid</i>	6.52	2.70	3.51E-03	AEC 0144_C_DH

ANEXO G. Metabólitos diferencialmente abundantes provenientes da comparação IPB1_C_R x IPB1_T_R (*volcano plot*: *p-value threshold* < 0,05 ajustado pelo FDR e *fold change threshold* = 4,0) realizada com dados obtidos por meio da técnica de GC-MS

(continua)

Código ⁽¹⁾	Descrição	FC ⁽²⁾	log ₂ (FC) ⁽³⁾	<i>p.adjusted</i> ⁽⁴⁾	Maior abundância ⁽⁵⁾
2421	M000000_A331002-101 <i>N4</i>	0.0009	-10.1720	1.0359E-21	IPB1_T_R
2136	M000000_A286002 <i>N4</i>	0.0011	-9.8521	3.0701E-19	IPB1_T_R
1916	M000044_A264001 <i>Sucrose</i>	1502.8000	10.5530	5.3676E-08	IPB1_C_R
2270	M000000_A302004 <i>D302190</i>	0.0007	-10.4970	5.3676E-08	IPB1_T_R
2471	M000000_A340002 <i>N4</i>	0.0008	-10.2010	5.3676E-08	IPB1_T_R
605	M000958_A159008 <i>Digitoxose MP</i>	4018.1000	11.9720	6.9364E-08	IPB1_C_R
2298	M000000_A307008 <i>RL3_1</i>	0.0007	-10.5230	1.1101E-07	IPB1_T_R
2071	M000000_A278007 <i>N4</i>	1089.0000	10.0890	2.9885E-04	IPB1_C_R
2352	M000000_A316008 <i>N4</i>	0.0012	-9.6730	2.9885E-04	IPB1_T_R
1144	M000616_A189011 <i>allo-Inositol</i>	0.0014	-9.5026	2.9885E-04	IPB1_T_R
1778	M000489_A245001 <i>Eicosanoic acid</i>	704.6200	9.4607	3.1679E-04	IPB1_C_R
1307	M000596_A199002 <i>Galactonic acid</i>	0.0015	-9.3892	3.1679E-04	IPB1_T_R
1090	M000606_A187002 <i>Fructose MP</i>	0.0008	-10.3700	1.8565E-03	IPB1_T_R
1912	M000780_A263006 <i>3beta-hydroxy-5-androsten-17-one</i>	696.9900	9.4450	1.8565E-03	IPB1_C_R
2521	M000000_A352001 <i>N4</i>	0.0022	-8.8404	1.8565E-03	IPB1_T_R
1442	M000000_A209004 <i>N4</i>	0.0022	-8.8372	1.8565E-03	IPB1_T_R
2044	M000000_A276007 <i>N4</i>	1175.6000	10.1990	2.0372E-03	IPB1_C_R
2155	M000000_A287014 <i>Palatinose</i>	1192.1000	10.2190	7.5113E-03	IPB1_C_R
1677	M000557_A231003 <i>n-Octadecadienoic acid</i>	0.0012	-9.7615	7.5113E-03	IPB1_T_R

(conclusão)					
Código ⁽¹⁾	Descrição	FC ⁽²⁾	log ₂ (FC) ⁽³⁾	<i>p.adjusted</i> ⁽⁴⁾	Maior abundância⁽⁵⁾
2215	M001187_A294009 <i>5alpha-allo-Pregnane-3,20-dione</i> MP	0.0022	-8.8221	7.5113E-03	IPB1_T_R
751	M000000_A168027 <i>N4168027</i>	4.5516	2.1864	4.8353E-02	IPB1_C_R

(1) Fornecido por GMD
(2) *Fold change*
(3) *log₂ fold change*
(4) valor de *p*-ajustado com base no FDR
(5) Grupo em maior abundância

ANEXO H. Metabólitos diferencialmente abundantes provenientes da comparação AEC 0144_C_R x AEC 0144_T_R (*volcano plot*: $p\text{-value threshold} < 0,05$ ajustado pelo FDR e $fold\ change\ threshold = 4,0$) realizada com dados obtidos por meio da técnica de GC-MS

Código ⁽¹⁾	Descrição	FC ⁽²⁾	log ₂ (FC) ⁽³⁾	$p\text{-ajustado}$ ⁽⁴⁾	Maior abundância ⁽⁵⁾
1234	M000000_A194007 <i>N/A</i>	0.0071	-7.1421	4.8574E-28	AEC 0144_T_R
2071	M000000_A278007 <i>N/A</i>	165.4300	7.3701	5.5702E-26	AEC 0144_C_R
2185	M001111_A290015 <i>Secologanin MP</i>	128.9000	7.0101	9.5305E-21	AEC 0144_C_R
2432	M000000_A333002 <i>N/A</i>	77.9390	6.2843	3.5921E-16	AEC 0144_C_R
2521	M000000_A352001 <i>N/A</i>	0.0125	-6.3236	4.2339E-05	AEC 0144_T_R
2388	M000000_A323004 <i>N/A</i>	127.5500	6.9949	7.5551E-04	AEC 0144_C_R
1090	M000606_A187002 <i>Fructose MP</i>	70.0660	6.1306	7.5551E-04	AEC 0144_C_R
2112	M001181_A283013 <i>6-oxo-Prostaglandin F1A MP</i>	55.2360	5.7875	7.5551E-04	AEC 0144_C_R
2003	M000000_A273012 <i>N/A</i>	70.8460	6.1466	4.5782E-03	AEC 0144_C_R
2200	M000000_A292005 <i>N/A</i>	0.0238	-5.3934	1.5050E-02	AEC 0144_T_R

(1) Fornecido por GMD

(2) *Fold change*

(3) log₂ *fold change*

(4) valor de p -ajustado com base no FDR

(5) Grupo em maior abundância

ANEXO I. Metabólitos identificados diferencialmente abundantes, provenientes da comparação IPB1_C_R x IPB1_T_R (*volcano plot: p-value threshold* < 0,05 ajustado pelo FDR e *fold change threshold* = 4,0) realizada com dados obtidos por meio da técnica de GC-MS, e suas respectivas classes químicas

(continua)

Código	GMD ID	Descrição	Classe	Fonte	Classe Geral	Maior abundância
1916	M000044_A264001	<i>Sucrose</i>	<i>Sugar (Disaccharide)</i>	GMD http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Metabolites/4f0791e5-05fb-4acc-92ef-c876aabb4e1.aspx	Açúcar	IPB1_C_R
2270	M000000_A302004	D302190	-	-	-	IPB1_T_R
605	M000958_A159008	<i>Digitoxose</i>	<i>Dideoxyhexose</i>	GMD http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Metabolites/321a51d9-27dc-47c8-b131-764fc077b114.aspx	Açúcar dideoxi	IPB1_C_R
2298	M000000_A307008	RL3_1	-	-	-	IPB1_T_R
1144	M000616_A189011	<i>allo-Inositol</i>	<i>Polyol (Inositol)</i>	GMD http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Metabolites/7b0cef84-d9ce-4a88-aa7d-ec50c89387a5.aspx	Poliol	IPB1_T_R
1778	M000489_A245001	<i>Eicosanoic acid</i>	<i>Acid (Fatty acid trimethylsilyl ester)</i>	GMD http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Metabolites/38660976-a573-4a36-b283-4ea09d1e22ec.aspx	Ácido (Éster de ácido graxo)	IPB1_C_R
1307	M000596_A199002	<i>Galactonic acid</i>	<i>Sugar acid</i>	Pubchem https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/D-Galactonic-acid	Açúcar ácido	IPB1_T_R
1090	M000606_A187002	<i>Fructose</i>	<i>Sugar (Hexose)</i>	GMD http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Metabolites/dfa8c62b-e34b-4603-a548-f6a8d25645dd.aspx	Açúcar	IPB1_T_R
1912	M000780_A263006	<i>3-beta-hydroxy-5-androsten-17-on</i>	<i>Terpenoid (Sterols)</i>	GMD http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Metabolites/1a9d2040-240c-427d-ade4-0cb700b785cb.aspx	Terpenoide	IPB1_C_R
2155	M000000_A287014	<i>Palatinose</i>	<i>Sugar (Disaccharide)</i>	GMD http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Metabolites/143bb4c7-69c7-4f7b-9f75-cca1022b6bb1.aspx	Açúcar	IPB1_C_R

(conclusão)

Código	GMD ID	Descrição	Classe	Fonte	Classe Geral	Maior abundância
1677	M000557_A231003	<i>n-Octadecadienoic acid</i>	<i>Acid (Fatty acid trimethylsilyl ester)</i>	GMD http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Metabolites/ca973c8f-6877-4fd6-9bbc-d7ca5829a475.aspx	Ácido (Éster de ácido graxo)	IPB1_T_R
2215	M001187_A294009	<i>5alpha-allo-Pregnane-3,20-dione</i>	<i>C21-steroid hormone</i>	PubChem https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/92810	Esteróide	IPB1_T_R

ANEXO J. Metabólitos identificados diferencialmente abundantes, provenientes da comparação AEC 0144_C_R x AEC 0144_T_R (*volcano plot*: $p\text{-value threshold} < 0,05$ ajustado pelo FDR e $\text{fold change threshold} = 4,0$) realizada com dados obtidos por meio da técnica de GC-MS, e suas respectivas classes químicas

Código	GMD ID	Descrição	Classe	Fonte	Classe Geral	Maior abundância
2185	M001111_A290015	<i>Secologanin</i>	<i>Carboxylic ester</i>	GMD http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/ReferenceSubstances/ad0d7c0a-751c-4e55-b3a9-4a63cb747ac6.aspx	Éster carboxílico	AEC 0144_C_R
1090	M000606_A187002	<i>Fructose</i>	<i>Sugar (Hexose)</i>	GMD http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/Metabolites/eb37038e-44a6-4af7-b0d8-47a315ad2f74.aspx	Açúcar	AEC 0144_C_R
2112	M001181_A283013	<i>6-oxo-Prostaglandin F1A</i>	<i>Fatty Acyls</i>	HMDB http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB0002886	Acil graxo	AEC 0144_C_R

ANEXO K. Metabólitos identificados diferencialmente abundantes, provenientes da comparação IPB1_C_R x IPB1_T_R (*volcano plot*: *p-value threshold* < 0,05 ajustado pelo FDR e *fold change threshold* = 4,0) realizada com dados obtidos por meio da técnica de GC-MS, utilizados como *input* para a análise de vias metabólicas impactadas (MetPA)

Código	GMD ID	Descrição	Input MetPA	FC	log ₂ (FC)	<i>p.adjusted</i>	Maior abundância
1916	M000044_A264001	<i>Sucrose</i>	<i>Sucrose</i>	1502.80	10.55	5.37E-08	IPB1_C_R
2270	M000000_A302004	D302190	-	6.92E-04	-10.50	5.37E-08	IPB1_T_R
605	M000958_A159008	<i>Digitoxose</i>	<i>Digitoxose</i>	4018.10	11.97	6.94E-08	IPB1_C_R
2298	M000000_A307008	RL3_1	-	6.79E-04	-10.52	1.11E-07	IPB1_T_R
1144	M000616_A189011	<i>allo-Inositol</i>	<i>Scyllo-inositol</i>	1.38E-03	-9.50	2.99E-04	IPB1_T_R
1778	M000489_A245001	<i>Eicosanoic acid</i>	<i>Eicosanoic acid</i>	704.62	9.46	3.17E-04	IPB1_C_R
1307	M000596_A199002	<i>Galactonic acid</i>	<i>Galactonic acid</i>	1.49E-03	-9.39	3.17E-04	IPB1_T_R
1090	M000606_A187002	<i>Fructose</i>	<i>Fructose</i>	7.55E-04	-10.37	1.86E-03	IPB1_T_R
1912	M000780_A263006	<i>3-beta-hydroxy-5-androsten-17-on</i>	<i>Dehydroepiandrosterone</i>	696.99	9.45	1.86E-03	IPB1_C_R
2155	M000000_A287014	<i>Palatinose</i>	<i>Palatinose</i>	1192.10	10.22	7.51E-03	IPB1_C_R
1677	M000557_A231003	<i>n-Octadecadienoic acid</i>	<i>Conjugated linoleic acid</i>	1.15E-03	-9.76	7.51E-03	IPB1_T_R
2215	M001187_A294009	<i>5alpha-allo-Pregnane-3,20-dione</i>	<i>3,20-Allopregnanedione</i>	2.21E-03	-8.82	7.51E-03	IPB1_T_R

ANEXO L. Metabólitos identificados diferencialmente abundantes, provenientes da comparação AEC 0144_C_R x AEC 0144_T_R (*volcano plot*: $p\text{-value threshold} < 0,05$ ajustado pelo FDR e $\text{fold change threshold} = 4,0$) realizada com dados obtidos por meio da técnica de GC-MS, utilizados como *input* para a análise de vias metabólicas impactadas (MetPA)

Código	GMD ID	Descrição	Input MetPA	FC	log ₂ (FC)	<i>p.adjusted</i>	Maior abundância
2185	M001111_A290015	<i>Secologanin</i>	<i>Secologanin</i>	128.90	7.01	9.53E-21	AEC 0144_C_R
1090	M000606_A187002	<i>Fructose</i>	<i>Fructose</i>	70.07	6.13	7.56E-04	AEC 0144_C_R
2112	M001181_A283013	<i>6-oxo-Prostaglandin F1A</i>	<i>6-Keto-PGF1a</i>	55.24	5.79	7.56E-04	AEC 0144_C_R

Espectro de fragmentação do metabólito de m/z 617.1147 elucidado estruturalmente como *6''-O-Galloylquercimeritrin* (HMDB0033593). Grupo de maior abundância: IPB1_T_DH. EC = 10 eV. Representação da molécula precursora e alguns fragmentos mais intensos.

Espectro de fragmentação do metabólito de m/z 611.1599 elucidado estruturalmente como *Quercetin 3-O-rutinoside/Rutin* (HMDB0003249). Grupo de maior abundância: AEC 0144_T_R. EC = 10 eV. Representação da molécula precursora e alguns fragmentos mais intensos.

Espectro de fragmentação do metabólito de m/z 601.1192 elucidado estruturalmente como *Kaempferol 7-(6''-galloylglucoside)* (HMDB0037439). Grupo de maior abundância: IPB1_T_R. EC = 10 eV. Representação da molécula precursora e alguns fragmentos mais intensos.

Espectro de fragmentação do metabólito de m/z 595.1577 elucidado estruturalmente como *Kaempferol-3-O-rutinoside/Nicotiflorin* (CID: 5318767). Grupo de maior abundância: AEC 0144_T_R. EC = 10 eV. Representação da molécula precursora e alguns fragmentos mais intensos.

Espectro de fragmentação do metabólito de m/z 481.1718 elucidado estruturalmente como *PA(8:0/12:0)* (HMDB0115483). Grupo de maior abundância: IPB1_T_R. EC = 20 eV. Representação da molécula precursora e alguns fragmentos mais intensos.

Espectro de fragmentação do metabólito de m/z 835.2672 elucidado estruturalmente como *L-Tyrosylglycyl-L-threonyl-L-seryl-L-histidyl-L-leucyl-L-alanyl-L-serine* (US EPA: 918405-62-6 | DTXSID20846088; DTXCID00796830). Grupo de maior abundância: AEC 0144_C_DH. EC = 20 eV. Representação da molécula precursora e alguns fragmentos mais intensos.

Espectro de fragmentação do metabólito de m/z 913.3732 elucidado estruturalmente como *PI(22:5(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z)/18:0)* (HMDB0009917). Grupo de maior abundância: IPB1_T_R. EC = 35 eV. Representação da molécula precursora e alguns fragmentos mais intensos.

Espectro de fragmentação do metabólito de m/z 487.2543 elucidado estruturalmente como *PA(20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)/2:0)* (HMDB0011156). Grupo de maior abundância: AEC 0144_T_R. EC = 10 eV. Representação da molécula precursora e alguns fragmentos mais intensos.

Espectro de fragmentação do metabólito de m/z 527.2483 elucidado estruturalmente como *(24E)-15alpha-Acetoxy-3alpha-hydroxy-23-oxo-7,9(11),24-lanostatrien-26-oic acid* (HMDB0035387). Grupo de maior abundância: AEC 0144_C_DH. EC = 35 eV. Representação da molécula precursora e alguns fragmentos mais intensos.

Espectro de fragmentação do metabólito de m/z 631.2016 elucidado estruturalmente como *Brassica napus non-fluorescent chlorophyll catabolite 3* (HMDB0040917). Grupo de maior abundância: IPB1_T_R. EC = 20 eV. Representação da molécula precursora e alguns fragmentos mais intensos.

Espectro de fragmentação do metabólito de m/z 521.2014 elucidado estruturalmente como *Myricanol 5-glucoside* (HMDB0036525). Grupo de maior abundância: IPB1_T_R. EC = 20 eV. Representação da molécula precursora e alguns fragmentos mais intensos.

Espectro de fragmentação do metabólito de m/z 553.1337 elucidado estruturalmente como *1-Hydroxy-3-methoxy-7-primeverosyloxyxanthone* (HMDB0030870). Grupo de maior abundância: IPB1_T_R. EC = 10 eV. Representação da molécula precursora e alguns fragmentos mais intensos.

Espectro de fragmentação do metabólito de m/z 239.1051 elucidado estruturalmente como *3,4-Dimethyl-5-pentyl-2-furanpropanoic acid* (HMDB0112083). Grupo de maior abundância: AEC 0144_T_DH. EC = 20 eV. Representação da molécula precursora e alguns fragmentos mais intensos.

ANEXO N. Espectros de massa e estruturas químicas dos principais fragmentos que auxiliaram na elucidação estrutural de alguns m/z de interesse relacionados a possíveis fenilpropanoides

Espectro de fragmentação do metabólito de m/z 449.0737 elucidado estruturalmente como *2,3-Dihidro-5,5',7,7'-tetrahidrox-2-(4-hidroxifenil)[3,8'-bi-4H-1-benzopirano]-4,4'-dione* (HMDB0037323). Comparação estatística: IPB1_C_DH x IPB1_T_DH. Grupo de maior abundância: IPB1_C_DH. EC = 10 eV. Representação da molécula precursora e alguns fragmentos mais intensos.

Espectro de fragmentação do metabólito de m/z 433.1158 elucidado estruturalmente como *Pinostrobin 5-glucoside* (HMDB0040503). Comparação estatística: IPB1_C_DH x IPB1_T_DH. Grupo de maior abundância: IPB1_C_DH. EC = 10 eV. Representação da molécula precursora e alguns fragmentos mais intensos.

Espectro de fragmentação do metabólito de m/z 417.1410 elucidado estruturalmente como *4'-Methylquiritigenin 7-rhamnoside* (HMDB0040545). Comparação estatística: IPB1_C_DH x IPB1_T_DH. Grupo de maior abundância: IPB1_C_DH. EC = 10 eV. Representação da molécula precursora e alguns fragmentos mais intensos.

Espectro de fragmentação do metabólito de m/z 271.1100 elucidado estruturalmente como *Hypoglycin B* (HMDB0029428). Comparação estatística: IPB1_C_DH x IPB1_T_DH. Grupo de maior abundância: IPB1_C_DH. EC = 10 eV. Representação da molécula precursora e alguns fragmentos mais intensos.

Espectro de fragmentação do metabólito de m/z 165.1268 elucidado estruturalmente como *(Z)*-3-Methyl-2-(2-pentenyl)-2-cyclopenten-1-one (HMDB0035601). Comparação estatística: IPB1_C_DH x IPB1_T_DH. Grupo de maior abundância: IPB1_C_DH. EC = 20 eV. Representação da molécula precursora e alguns fragmentos mais intensos.

Espectro de fragmentação do metabólito de m/z 449.0709 elucidado estruturalmente como *Naringenin 4'-O-glucuronide* (HMDB0041759). Comparação estatística: IPB1_C_R x IPB1_T_R. Grupo de maior abundância: IPB1_C_R. EC = 10 eV. Representação da molécula precursora e alguns fragmentos mais intensos.

Espectro de fragmentação do metabólito de m/z 449.0737 elucidado estruturalmente como *Carthamone* (HMDB0037377). Comparação estatística: IPB1_C_R x IPB1_T_R. Grupo de maior abundância: IPB1_C_R. EC = 10 eV. Representação da molécula precursora e alguns fragmentos mais intensos.

Espectro de fragmentação do metabólito de m/z 287.0509 elucidado estruturalmente como *3'-Methoxyfukiic acid* (HMDB0029498). Comparação estatística: IPB1_C_R x IPB1_T_R. Grupo de maior abundância: IPB1_C_R. EC = 35 eV. Representação da molécula precursora e alguns fragmentos mais intensos.

Espectro de fragmentação do metabólito de m/z 271.1100 elucidado estruturalmente como *Hypoglycin B* (HMDB0029428). Comparação estatística: IPB1_C_R x IPB1_T_R. Grupo de maior abundância: IPB1_C_R. EC = 10 eV. Representação da molécula precursora e alguns fragmentos mais intensos.

Espectro de fragmentação do metabólito de m/z 303.0535 elucidado estruturalmente como *2',4',5,7,8-Pentahydroxyisoflavone* (HMDB0033264). Comparação estatística: AEC 0144_C_DH x AEC 0144_T_DH. Grupo de maior abundância: AEC 0144_C_DH. EC = 35 eV. Representação da molécula precursora e alguns fragmentos mais intensos.

Espectro de fragmentação do metabólito de m/z 303.0541 elucidado estruturalmente como *Hesperetin* (HMDB0005782). Comparação estatística: AEC 0144_C_DH x AEC 0144_T_DH. Grupo de maior abundância: AEC 0144_C_DH. EC = 35 eV. Representação da molécula precursora e alguns fragmentos mais intensos.

Espectro de fragmentação do metabólito de m/z 449.1087 elucidado estruturalmente como *Piperenol C* (HMDB0041536). Comparação estatística: AEC 0144_C_DH x AEC 0144_T_DH. Grupo de maior abundância: AEC 0144_C_DH. EC = 10 eV. Representação da molécula precursora e alguns fragmentos mais intensos.

Espectro de fragmentação do metabólito de m/z 271.0638 elucidado estruturalmente como *Pinostrobin chalcone* (HMDB0033702). Comparação estatística: AEC 0144_C_DH x AEC 0144_T_DH. Grupo de maior abundância: AEC 0144_C_DH. EC = 35 eV. Representação da molécula precursora e alguns fragmentos mais intensos.

Espectro de fragmentação do metabólito de m/z 611.1399 elucidado estruturalmente como *Hesperetin 7-neohesperidoside* (HMDB0030748). Comparação estatística: AEC 0144_C_DH x AEC 0144_T_DH. Grupo de maior abundância: AEC 0144_T_DH. EC = 20 eV. Representação da molécula precursora e alguns fragmentos mais intensos.

Espectro de fragmentação do metabólito de m/z 449.0737 elucidado estruturalmente como 2,3-Dihidro-5,5',7,7'-tetrahydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)[3,8'-bi-4H-1-benzopyran]-4,4'-dione (HMDB0037323). Comparação estatística: AEC 0144_C_R x AEC 0144_T_R. Grupo de maior abundância: AEC 0144_C_R. EC = 20 eV. Representação da molécula precursora e alguns fragmentos mais intensos.

Espectro de fragmentação do metabólito de m/z 303.0534 elucidado estruturalmente como pertencente a classe das Isoflavonas (com base no metabólito de código HMDB0033264). Comparação estatística: AEC 0144_C_R x AEC 0144_T_R. Grupo de maior abundância: AEC 0144_C_R. EC = 35 eV. Representação de alguns fragmentos mais intensos.

Espectro de fragmentação do metabólito de m/z 287.0509 elucidado estruturalmente como *5,6,7,4'-Tetrahydroxyisoflavone* (HMDB0041688). Comparação estatística: AEC 0144_C_R x AEC 0144_T_R. Grupo de maior abundância: AEC 0144_C_R. EC = 35 eV. Representação da molécula precursora e alguns fragmentos mais intensos.

Espectro de fragmentação do metabólito de m/z 271.0638 elucidado estruturalmente como *1,2,8-Trihydroxy-3-methylanthraquinone* (HMDB0033790). Comparação estatística: AEC 0144_C_R x AEC 0144_T_R. Grupo de maior abundância: AEC 0144_C_R. EC = 35 eV. Representação da molécula precursora e alguns fragmentos mais intensos.

Espectro de fragmentação do metabólito de m/z 611.1399 elucidado estruturalmente como *Quercetin 3-(3-p-coumaroylglucoside)* (HMDB0037365). Comparação estatística: AEC 0144_C_R x AEC 0144_T_R. Grupo de maior abundância: AEC 0144_C_R. EC = 20 eV. Representação da molécula precursora e alguns fragmentos mais intensos.

Espectro de fragmentação do metabólito de m/z 319.0479 elucidado estruturalmente como pertencente a classe dos flavonóis (com base no metabólito de código HMDB0037357). Comparação estatística: AEC 0144_T_DH x IPB1_T_DH. Grupo de maior abundância: AEC 0144_T_DH. EC = 35 eV. Representação de alguns fragmentos mais intensos.

Espectro de fragmentação do metabólito de m/z 611.1599 elucidado estruturalmente como *Quercetin 3-O-rutinoside/Rutin* (HMDB0003249). Comparação estatística: AEC 0144_T_DH x IPB1_T_DH. Grupo de maior abundância: AEC 0144_T_DH. EC = 10 eV. Representação da molécula precursora e alguns fragmentos mais intensos.

Espectro de fragmentação do metabólito de m/z 595.1577 elucidado estruturalmente como *Kaempferol-3-O-rutinoside/Nicotiflorin* (CID: 5318767). Comparação estatística: AEC 0144_T_DH x IPB1_T_DH. Grupo de maior abundância: AEC 0144_T_DH. EC = 10 eV. Representação da molécula precursora e alguns fragmentos mais intensos.

Espectro de fragmentação do metabólito de m/z 611.399 elucidado estruturalmente como *Hesperetin 7-neohesperidoside* (HMDB0030748). Comparação estatística: AEC 0144_T_DH x IPB1_T_DH. Grupo de maior abundância: AEC 0144_T_DH. EC = 20 eV. Representação da molécula precursora e alguns fragmentos mais intensos.

Espectro de fragmentação do metabólito de m/z 595.1456 elucidado estruturalmente como *Didymine* (HMDB0029482). Comparação estatística: AEC 0144_T_DH x IPB1_T_DH. Grupo de maior abundância: AEC 0144_T_DH. EC = 10 eV. Representação da molécula precursora e alguns fragmentos mais intensos.

Espectro de fragmentação do metabólito de m/z 287.0597 elucidado estruturalmente como *Histidinyl-Methionine* (HMDB0028891). Comparação estatística: AEC 0144_T_DH x IPB1_T_DH. Grupo de maior abundância: AEC 0144_T_DH. EC = 35 eV. Representação da molécula precursora e alguns fragmentos mais intensos.

Espectro de fragmentação do metabólito de m/z 287.0592 elucidado estruturalmente como *3'-Methoxyfukiic acid* (HMDB0029498). Comparação estatística: AEC 0144_T_DH x IPB1_T_DH. Grupo de maior abundância: IPB1_T_DH. EC = 35 eV. Representação da molécula precursora e alguns fragmentos mais intensos.

Espectro de fragmentação do metabólito de m/z 165.1268 elucidado estruturalmente como *Trimethylpropylpyrazine* (HMDB0040001). Comparação estatística: AEC 0144_T_DH x IPB1_T_DH. Grupo de maior abundância: AEC 0144_T_DH. EC = 20 eV. Representação da molécula precursora e alguns fragmentos mais intensos.

Espectro de fragmentação do metabólito de m/z 319.0479 elucidado estruturalmente como pertencente a classe dos flavonóis (com base no metabólito de código HMDB0037357). Comparação estatística: AEC 0144_T_R x IPB1_T_R. Grupo de maior abundância: AEC 0144_T_R. EC = 35 eV. Representação de alguns fragmentos mais intensos.

Espectro de fragmentação do metabólito de m/z 611.1599 elucidado estruturalmente como *Quercetin 3-O-rutinoside/Rutin* (HMDB0003249). Comparação estatística: AEC 0144_T_R x IPB1_T_R. Grupo de maior abundância: AEC 0144_T_R. EC = 10 eV. Representação da molécula precursora e alguns fragmentos mais intensos.

Espectro de fragmentação do metabólito de m/z 595.1577 elucidado estruturalmente como *Kaempferol-3-O-rutinoside/Nicotiflorin* (CID: 5318767). Comparação estatística: AEC 0144_T_R x IPB1_T_R. Grupo de maior abundância: AEC 0144_T_R. EC = 10 eV. Representação da molécula precursora e alguns fragmentos mais intensos.

Espectro de fragmentação do metabólito de m/z 303.0534 elucidado estruturalmente como *Folerogenin* (HMDB0037507). Comparação estatística: AEC 0144_T_R x IPB1_T_R. Grupo de maior abundância: IPB1_T_R. EC = 35 eV. Representação da molécula precursora e alguns fragmentos mais intensos.

Espectro de fragmentação do metabólito de m/z 303.0573 elucidado estruturalmente como *4',5,7-Trihydroxy-3-methoxyflavanone* (HMDB0040560). Comparação estatística: AEC 0144_T_R x IPB1_T_R. Grupo de maior abundância: AEC 0144_T_R. EC = 35 eV. Representação da molécula precursora e alguns fragmentos mais intensos.

Espectro de fragmentação do metabólito de m/z 287.0597 elucidado estruturalmente como 3'-Methoxyfukic acid (HMDB0029498). Comparação estatística: AEC 0144_T_R x IPB1_T_R. Grupo de maior abundância: AEC 0144_T_R. EC = 35 eV. Representação da molécula precursora e alguns fragmentos mais intensos.

Espectro de fragmentação do metabólito de m/z 287.0592 elucidado estruturalmente como 3'-Methoxyfukic acid (HMDB0029498). Comparação estatística: AEC 0144_T_R x IPB1_T_R. Grupo de maior abundância: IPB1_T_R. EC = 35 eV. Representação da molécula precursora e alguns fragmentos mais intensos.

Espectro de fragmentação do metabólito de $m/\tilde{z}$ 417.1410 elucidado estruturalmente como 8-Acetoxy-pinorsinol (HMDB0033280). Comparação estatística: AEC 0144_T_R x IPB1_T_R. Grupo de maior abundância: IPB1_T_R. EC = 20 eV. Representação da molécula precursora e alguns fragmentos mais intensos.

Espectro de fragmentação do metabólito de $m/\tilde{z}$ 271.1100 elucidado estruturalmente como 2-(3-Carboxy-3-(methylammonio)propyl)-L-histidine (HMDB0011654). Comparação estatística: AEC 0144_T_R x IPB1_T_R. Grupo de maior abundância: AEC 0144_T_R. EC = 10 eV. Representação da molécula precursora e alguns fragmentos mais intensos.

Espectro de fragmentação do metabólito de m/z 449.1100 elucidado estruturalmente como *Glucobrassicin* (HMDB0030243). Comparação estatística: AEC 0144_T_R x IPB1_T_R. Grupo de maior abundância: IPB1_T_R. EC = 20 eV. Representação da molécula precursora e alguns fragmentos mais intensos.