Universidade de São Paulo

Instituto de Biociências

CARMEN E. PALACIOS JARA

**Efeito do déficit hídrico e CO₂ elevado
sobre substâncias fenólicas e ligninas do sorgo
var. BRS 330**

São Paulo

2017

Universidade de São Paulo

Instituto de Biociências

CARMEN E. PALACIOS JARA

**Efeito do déficit hídrico e CO₂ elevado sobre substâncias fenólicas e
ligninas do sorgo var. BRS 330**

**Effect of water deficit and elevated CO₂ on phenolic substances and
lignins of sorghum var. BRS 330**

VERSÃO ORIGINAL CORRIGIDA

**O ORIGINAL ENCONTRA-SE DISPONÍVEL NO INSTITUTO DE
BIOCIÊNCIA DA USP**

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de São
Paulo, para a obtenção de Título de
Doutor em Ciências, na Área de Botânica.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Salatino

Co-orientador: Prof. Dr. Marcos Silveira
Buckeridge

São Paulo

2017

Ficha Catalográfica

Palacios, Carmen E. Jara

Efeito do déficit hídrico e CO₂ elevado sobre substâncias fenólicas e ligninas do sorgo var. BRS 330

Orientador: Prof. Dr. Antonio Salatino

Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Botânica. 136p.

1. Mudanças climáticas. 2. Flavonoides. 3. Fenilpropanoides. 4. Ligninas. 5. Sorgo var. BRS 330

I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Botânica. II. Título

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que seja citada a fonte.

Comissão Julgadora:

Dr. Carlos Mario Donado Pestana

Prof. Dr. Wanderley Dantas dos Santos

Prof. Dr. Wagner Vilegas

Prof. Dr. Igor Cesarino

Prof. Dr. Antonio Salatino

Orientador

Aos meus amados e queridos pais

Justina Jara e Teodocio Palacios

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Antonio Salatino pela grandiosa orientação, paciência, ensinamentos e incentivo durante minha formação como pós-graduanda da USP.

Ao Prof. Dr. Marcos Silveira Buckeridge pela co-orientação, ensinamentos do lado crítico da ciência e disposição dos ambientes do Laboratório de Fisiologia Ecológica de plantas (LAFIECO).

À Profa. Dra. Maria Luiza Salatino pelo carinho, compartilhamento de experiências acadêmicas e atenção dispensada.

À Profa. Dra. Déborah Y. A. C. dos Santos pela confiança, sugestões e ensinamentos.

À Profa. Dra. Cláudia Maria Furlan pelas sugestões e críticas na banca de qualificação do doutorado.

Ao Prof. Dr. Marcelo Pena pela valiosa contribuição na caracterização das substâncias fenólicas por espectrometria de massa e por todo ensinamento.

À Profa. Dra. Veronica Angyalossy e Prof. Dr. José Rubens Pirani pelo apoio e incentivo na prova de seleção ao programa de doutorado do departamento.

Ao Prof. Dr. Wanderley Dantas dos Santos e ao pessoal técnico do departamento de Bioquímica da Universidade Estadual de Maringá (UEM) pela contribuição na determinação dos monômeros de ligninas.

Ao Prof. Dr. Romualdo Fukushima pelos esclarecimentos no método de extração de lignina.

À Dra. Amanda Pereira de Souza pela contribuição no período experimental nas Câmaras de Topo Aberto (OTC).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro.

À Profa. Cristina Borba da Escola Politécnica da USP pelo carinho, ensinamentos e direcionamento no processo de seleção da prova de inglês do departamento.

A Mourisa de Souza Ferreira, Aline Cruz e Leandro S. Santos, pessoal técnico do Laboratório de Fitoquímica, por sempre disponibilizar os ambientes de trabalho e auxílio no laboratório.

A Eglee Igarashi e Viviane Costa, pessoal técnico do Laboratório de Fisiologia Ecológica de plantas (LAFIECO) pelo apoio na parte experimental e burocrática.

Aos amigos, colegas e ex-colegas do Laboratório de Fitoquímica, em especial a Alice e Priscila por tantas alegrias compartilhadas durante nosso período na pós-graduação.

Ao grupo de amigos e colegas do Laboratório de Fisiologia Ecológica de plantas (LAFIECO) pelas críticas e sugestões durante as apresentações, especialmente à Dra. Adriana Grandis pelas sugestões e exploração dos resultados.

Aos funcionários da secretaria e programa de pós-graduação Instituto de Biociências – IB/USP.

À Superintendência de Assistência Social – SAS/USP pela bolsa de moradia concedida, em especial à assistente social Carla Magalhães Cucolo.

Ao Msc. Ing. Jack Burga Carmona pelo apoio na parte burocrática do visto estudantil.

A meus pais, Justina e Teodocio, modelos de força física, moral e espiritual na minha vida; a meus irmãos Mérida e Carlos; a meus coraçõezinhos agitados, Alejandro e Ricardo e meu tio Ruperto pelo carinho e compreensão.

Ao Dante Coaquira Begazo meu companheiro, amigo e namorado.

A Cinthia Campos Alvarado grande amiga e colega da escola nacional “República de Venezuela” (Callao – Perú) pelo carinho e amizade de muitos anos.

Por último, a Deus e minha comunidade da Paróquia, “Jesus de Nazareth”, ao meu lindo grupo “Maria, Luz de Esperanza” e em especial a meus amigos de sempre, Sophia Silva, Paola Quiroz, Ayme Zapata, Carlos Vásquez e Enrique Aguilar, pelas reuniões cheias de carinho e risos intermináveis a cada volta anual para casa.

Sumário

Resumo	XV
Abstract.....	XVII
I. CAPÍTULO 1.....	19
I.1 INTRODUÇÃO GERAL.....	21
I.2 CEREAL: SORGO	23
I.3 IMPLICAÇÕES DO CO ₂ ELEVADO E DÉFICIT HÍDRICO NAS PLANTAS.....	25
I.4 ESTUDO INTEGRADO DO METABOLISMO DE PLANTAS	27
I.5 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	29
II. CAPÍTULO 2.....	35
RESUMO.....	37
II.1 INTRODUÇÃO	38
II.2 MATERIAL E MÉTODOS	43
II.2.1 Material botânico	43
II.2.2 Análise de substâncias fenólicas solúveis por CLAE-DAD.....	46
II.2.3 Quantificação de taninos totais	47
II.2.4 Análises estatísticas	48
II.3 RESULTADOS	49
II.3.1 Dados microclimáticos de temperatura, umidade relativa, CO ₂ e umidade do solo.....	49
II.3.2 Conteúdo de substâncias fenólicas totais em CO ₂ ambiente e elevado aos 90 e 120 DAP	50
II.3.3 Conteúdo de fenilpropanoides em CO ₂ ambiente e elevado aos 90 e 120 DAP.....	51
II.3.4 Conteúdo de flavonoides em CO ₂ ambiente e elevado aos 90 e 120 DAP.....	52
II.3.5 Conteúdo de taninos totais sob CO ₂ ambiente e elevado aos 90 e 120 DAP.....	53
II.3.6 Perfil químico de substâncias fenólicas durante o desenvolvimento dos grãos.....	54

II.3.7	Influência do CO ₂ elevado sobre o teor de fenilpropanoides em órgãos de sorgo var. 'BRS330' aos 90 e 120 DAP.....	61
II.3.8	Variações na distribuição de flavonoides sob CO ₂ ambiente e elevado aos 90 e 120 DAP	64
II.3.9	Análise de Componentes Principais (PCA) de substâncias fenólicas sob influência de CO ₂ ambiente e elevado aos 90 e 120 DAP	66
II.4	DISCUSSÃO	67
II.4.1	Déficit hídrico, desenvolvimento das plantas e substâncias fenólicas	67
II.4.2	Efeito do CO ₂ sobre o conteúdo de substâncias fenólicas	68
II.4.3	Taninos	70
II.4.4	Caracterização e perfil de fenilpropanoides e flavonoides	71
II.4.5	Análises multivariadas	74
II.4.6	Substâncias fenólicas dos grãos de sorgo var. BRS 330	74
II.5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
III.	CAPÍTULO 3.....	83
	RESUMO.....	85
III.1	INTRODUÇÃO	86
III.2	MATERIAL E MÉTODOS	93
III.2.1	Material botânico	93
III.2.2	Análise dos ácidos fenólicos majoritários da parede celular	93
III.2.3	Extração e quantificação de lignina	94
III.2.4	Extração e quantificação de monômeros de lignina	95
III.2.5	Análise estatística	95
III.3	RESULTADOS	96
III.3.1	Ácidos fenólicos da parede celular	96
III.3.2	Conteúdo de ácido <i>p</i> -cumárico da parede celular.....	97
III.3.3	Conteúdo de ácido ferúlico da parede celular.....	98
III.3.4	Relação entre os ácidos ferúlico e <i>p</i> -cumárico da parede celular.....	99
III.3.5	Rendimento de lignina.....	100
III.3.6	Abundância relativa dos monômeros de lignina.....	101
III.3.7	Relação entre os monômeros siringila (S) e guaiacila (G)	103
III.3.8	Análise de Componentes Principais de substâncias fenólicas da parede celular das plantas de sorgo var. BRS 330	103
III.4	DISCUSSÃO	106

III.5 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	111
ANEXOS	116

Resumo

A presente tese compõe-se de três capítulos.

Capítulo I. Uma revisão geral é apresentada sobre os padrões de consumo de alimentos e a problemática da segurança alimentar diante do acelerado crescimento populacional, além dos desafios impostos pelas mudanças climáticas previstas para o futuro próximo. Busca-se neste capítulo uma compreensão abrangente sobre possíveis alterações na qualidade nutricional da planta, oriunda de alterações climáticas que se esperam até o final do século em curso.

Capítulo II. O capítulo refere-se à caracterização e determinação dos teores de substâncias fenólicas solúveis de órgãos de plantas de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) variedade BRS 330, cultivadas sob déficit hídrico e distintas concentrações atmosféricas de CO₂. As plantas foram cultivadas em Câmaras de Topo Aberto (OTC) por 120 dias após o plantio (DAP), sob condições de CO₂ ambiente (400 ppm) elevado (800 ppm) (tratamentos **A** e **E**, respectivamente). Após 60 dias, a irrigação foi reduzida a 23 % em relação às plantas controle. As coletas foram estabelecidas em duas fases de desenvolvimento do grão: estágio imaturo (90 DAP) e maduro (120 DAP). Foram feitas determinações de fenilpropanoides e flavonoides de folhas, pedúnculo, colmo, raízes escoras, raízes e grãos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), utilizando padrões externos para dosagem de flavonoides e fenilpropanoides, respectivamente. O teor de taninos totais dos mencionados órgãos foi determinado por precipitação com albumina de soro bovino e espectrofotometria. Técnicas de CLAE-DAD-EM-EM foram utilizadas para a caracterização das substâncias fenólicas de todos os órgãos da planta. Análises multivariadas de Agrupamento e Componentes Principais (PCA) foram utilizadas para avaliar afinidades entre 132 substâncias detectadas e 72 substâncias caracterizadas, respectivamente. As variações de abundância relativa de fenilpropanoides (24 substâncias) e flavonoides (48), devidas aos distintos estádios de maturação e formas de tratamento, são apresentadas por meio de *heat maps* para cada órgão. A maior diversidade de substâncias fenólicas foi observada em folhas, e a menor, nos grãos. Derivados de ácido ferúlico, ácidos clorogênicos, flavonas e flavanonas foram caracterizados na planta toda. Flavanonas foram detectadas apenas em raízes-escoras, raízes e grãos. As O-glicoflavonas foram detectadas com frequência muito maior do que C-glicosídeos. Aos 90 DAP, alterações significativas devidas a **E** foram observadas no conteúdo de fenilpropanoides das folhas e raízes-escoras e no conteúdo dos flavonoides das folhas e grãos. Aos 120 DAP, foram detectados incrementos no conteúdo de flavonoides das raízes escoras. O teor de taninos nos grãos da variedade BRS 330 é relativamente elevado, e foi reduzido significativamente com o tratamento **E** aos 120 DAP.

Capítulo III. Esse capítulo tem por objetivo a comparação da composição de substâncias fenólicas da parede celular e ligninas das mesmas plantas e órgãos enfocados no Capítulo II. Material de folhas, pedúnculo, colmo, raízes escoras, raízes e grãos nos estádios imaturo (90 DAP) e maduro (120 DAP) foram submetidos à hidrólise

alcalina para remoção dos ácidos *p*-cumárico e ferúlico, principais ácidos fenólicos ligados à parede celular de gramíneas. O teor de ligninas e a distribuição de seus monômeros constituintes *p*-hidroxifenila (H), guaiacila (G) e siringila (S) foram determinados por meio de tratamento da parede celular total dos órgãos com brometo de acetila e análise dos produtos por CLAE-DAD. Aos 90 DAP, alterações significativas induzidas por **E** foram observadas relativamente ao teor de ácido *p*-cumárico de folhas, pedúnculo e grãos. Paralelamente, o teor de ácido ferúlico foi alterado nas folhas e raízes escoras. Aos 120 DAP, reduções significativas nos teores de ácidos *p*-cumárico e ferúlico foram observadas nas folhas. O conteúdo de lignina foi alto nas raízes escoras em ambos os estádios de maturação e reduzido significativamente por **E** nos grãos. O conteúdo dos monômeros H, G e S do colmo foi também reduzido significativamente por **E**.

Palavras-chave: mudanças climáticas, flavonoides, fenilpropanoides, ligninas, sorgo var. BRS 330

Abstract

The present Dissertation comprises three chapters.

Chapter I. Taking into account the fast populational growth, the chapter presents a broad revision about patterns of food consumption and problems related to food safety. In addition, comments are made about challenges imposed by climate changes expected to occur in the near future. It is aimed to reach a broad understanding about possible changes affecting food quality due to world climatic changes expected to happen by the end of the current century.

Chapter II. This chapter refers to the characterization and measurement of the contents of phenolic substances of organs of sorghum plants (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) var. 'BRS', cultivated under conditions of hydric deficit and distinct atmospheric CO₂ concentrations. The plants were cultivated inside Open Top Chambers (OTC) over 120 days after planting (DAP), where they were subject to effects of environmental (400 ppm) and elevated CO₂ (800 ppm) (treatments **A** and **B**, respectively). After 60 days, irrigation was dropped to 23% relative the control. Material collection was scheduled to occur on two developmental phases: immature (90 DAP) and mature stages (120 DAP). The contents of phenylpropanoids and flavonoids from leaves, peduncle, culm, anchor roots, roots and grains were determined by High Performance Liquid Chromatography (HPLC), using as calibration external standards. The contents of tannins of the mentioned sorghum organs were determined by precipitation with bovine serum albumin and spectrophotometry. Techniques of HPLC-DAD-MS-MS were used for characterization of phenolic substances of all plant organs. Multivariate Cluster and Principal Components Analysis (PCA) were used to evaluate affinities among 132 detected and 72 characterized substances, respectively. Variations of relative abundance of phenylpropanoids (24 representatives) and flavonoids (48), due to distinct maturation stages and CO₂ concentrations, are presented by means of heat maps for each organ. The highest diversity of phenolic substances was observed in leaves and the lowest in grains. Derivatives of ferulic acid, chlorogenic acids, flavones and flavanones were characterized in extracts of all organs. Flavanones were detected only in anchor roots, roots and grains. *O*-Glycoflavones largely predominated over *C*-glycosides. At 90 DAP a significant increase of phenylpropanoids due to **E** was observed in leaves and anchor roots and of flavonoids in leaves and grains. At 120 DAP an increase was observed of the content of flavonoids in anchor roots. The content of tannins in grains of var. BRS 330 is relatively high and was significantly reduced by treatment **E** at 120 DAP.

Chapter III. This chapter aimed to compare the composition of phenolic substances of the cell wall and lignins of the same plants and organs mentioned in Chapter II. Material of leaves, peduncle, culm, anchor roots, roots and grains at the immature (90 DAP) and mature stages (120 DAP) were treated by alkaline hydrolysis for removal of *p*-coumaric and ferulic acids, the main phenolic acids attached to cell walls of grasses. For all organs, the contents of lignins and the distribution of their monomer constituents (*p*-hydroxyphenyl - H, guaiacyl - G and siringyl - S) were determined by treatment of

whole cell walls with acetyl bromide and analysis of the products was carried out by HPLC-DAD. At 90 DAP, significant changes induced by **E** were detected in connection with the content of *p*-coumaric acid of leaves, peduncle and grains. At the same developmental stage, the content of ferulic acid changed in leaves and anchor roots. At 120 DAP, significant decreases of the contents of *p*-coumaric and ferulic acids were detected in leaves. The content of lignin was high in anchor roots at both maturation stages and was significantly lowered by **E** in grains. The contents of the monomers H, G and S of the culm was also significantly lowered by **E**.

Key-words: climate changes, flavonoids, phenylpropanoids, lignins, sorghum var. BRS 330

I. CAPÍTULO 1

I.1 INTRODUÇÃO GERAL

O impacto do aquecimento global no setor agrícola compromete o abastecimento das principais culturas, devido ao declínio da produtividade com sérias implicações na segurança alimentar. Além de repercutir no setor econômico, esse panorama tem sido refletido nos aspectos sociais de cada região, sendo as populações rurais ou populações dedicadas à atividade agrícola as mais vulneráveis aos impactos negativos dessas mudanças (Wheeler & Von Braun, 2013).

A Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) define a segurança alimentar como a disponibilidade de alimento suficiente, com qualidade pertinente e apropriada para uma dieta, que pode ser fornecida através da produção doméstica ou importada de alimentos, de tal forma que se mantenha constante através do tempo (FAO, 2016). Portanto, num cenário caracterizado por distúrbios na produção de alimentos, podem prever consequências negativas que se refletirão na condição nutricional das populações humanas (Raiten & Aimone, 2017).

Segundo a FAO as doze principais culturas de maior consumo mundial são arroz, trigo, milho, batata, cana de açúcar, algodão, tomate, uvas, maçã, amendoim e abóbora (Sage & Zhu, 2011), nessa ordem. Estudos recentes sobre o impacto das mudanças climáticas preveriam que em meados de 2100 a repercussão negativa no setor agrícola estaria centrada principalmente no rendimento de milho, trigo, arroz e soja (Müller & Elliott, 2015). Essas quatro culturas abrangem 64% do consumo calórico da humanidade (Mariani, 2017).

Por outro lado, a população mundial estimada em 7,6 bilhões de pessoas no 2016, apresentaria um aumento projetado de 8,5 bilhões para 2030 e 9,9 bilhões para 2050 segundo United Nations (2017), significando o incremento da demanda de alimentos entre 70% a 100%, da produção mundial atual (Godfray et al., 2010), considerando-se o desejável aumento na renda.

Alternativamente, infraestruturas com vistas a uma agricultura sustentável com características de uma segunda revolução verde poderiam ser utilizadas como estratégia para superação do desafio de maior demanda de alimentos (Godfray et al., 2010; von Caemmerer et al., 2012). Consequentemente, a FAO preconiza o uso de culturas

tolerantes ao calor como exemplo de práticas de uma agricultura sustentável compatível com a realidade climática esperada (FAO, 2016). Nesse sentido, as culturas com maior capacidade de maximizar a fixação do CO₂ e suprimir os efeitos deletérios da fotoinibição podem ser uma opção.

Há três mecanismos fotossintéticos de assimilação do CO₂ atmosférico: C3, C4 e Metabolismo Ácido das Crassuláceas (CAM). As plantas C4 possuem maior rendimento de biomassa, além de apresentar maior eficiência no uso de minerais do solo, nitrogênio e água, diante de condições de temperatura elevada e alta intensidade luminosa, típicas de regiões áridas e semiáridas. O CO₂ fixado é armazenado em ácidos orgânicos com quatro átomos de carbono dentro das células do mesófilo, antes de serem captados pela Ribulose 1,5 bifosfato carboxilase/oxigenase (RUBISCO), presente nas células da bainha perivascular. Esse processo eleva a concentração de CO₂ interno e inibe a ação de oxigenase da RUBISCO, evitando a fotorrespiração (Bräutigam & Gowik, 2016). A fotossíntese C4 é uma adaptação da fotossíntese C3 que, minimizando a perda de carbono pela fotorrespiração, eleva o rendimento da fotossíntese e minimiza a perda de água em ambientes secos (Lara & Andreo, 2011); entretanto as plantas com fotossíntese C4 apresentam algumas limitações em ambientes frios, onde as plantas C3 são mais competitivas. Porém, apenas 5% das plantas vasculares possuem mecanismo fotossintético C4 (Yamori et al., 2017), representando 25% da fixação de carbono continental (Atkinson et al., 2016), conseqüentemente só duas culturas C4 encontram-se na lista das 12 culturas mais consumidas no mundo, milho e cana de açúcar (Sage & Zhu, 2011). De modo complementar, as plantas CAM fixam o CO₂ durante a noite e armazena-o na forma de ácido málico no vacúolo, no dia seguinte, com a incidência da luz há uma decarboxilação do ácido málico para formar os mesmos componentes produzido nas plantas C3 e C4 (Yamori et al., 2017).

Nesse sentido, grupos de pesquisa vêm tentando melhorar a produtividade de algumas culturas importantes na alimentação básica. O propósito seria introduzir características fotossintéticas das plantas C4 em plantas C3, o que vem sendo feito em tabaco, batata, arroz e plantas aquáticas (*Hydrilla verticillata*) (von Caemmerer, S., 2003). Com esse propósito, em 2006 formou-se o consórcio “International Rice Research Institute” (<https://c4rice.com/>), integrado por 12 instituições em 8 países e liderado pelo Dr. John Sheehy, com o intuito de desenvolver uma linhagem de arroz mais produtiva e resistente à seca, dotada de características fotossintéticas C4, embora o

arroz seja uma espécie C3 (Hibberd et al., 2008). Esses passos para se chegar ao objetivo desejado seriam: (1) identificar os elementos promotores que permitam a expressão dos genes no arroz; (2) modificação da anatomia foliar de C3 a C4, implicando o desenvolvimento da anatomia Kranz; (3) transformação bioquímica, pois um protótipo de arroz C4 pode ser alcançável com alguns subconjuntos de genes C4, mas um ‘bom’ arroz C4 requer ajustes finos de bioquímica e anatomia foliar (von Caemmerer et al., 2012, Wang et al., 2016).

Outra abordagem com objetivos similares é o estudo integral do desenvolvimento e crescimento das plantas nas condições previstas para o futuro. Basicamente há duas técnicas utilizadas para esses estudos: (1) câmaras de topo aberto (OTCs-*Open top chambers*) e (2) FACE (Free Air Carbon Enrichment). Em ambas, as condições de concentração de CO₂, temperatura, água e outros fatores são controláveis e monitoradas. Nesses estudos, foram observadas respostas expressivas, embora sem um consenso geral, devido aos diferentes tipos de fixação do CO₂ (fotossíntese C3 e C4) e/ou genótipo das plantas. Embora, a análise de estudos com a interação de dois ou mais fatores ambientais possam ser complexos, ela pode trazer resultados próximos aos esperados para o futuro (Jara, 2012).

Acredita-se que as condições de CO₂ elevado resultam em acúmulo de carbono no metabolismo primário das plantas, responsável por gerar blocos construtores do metabolismo secundário (Olivoto et al., 2017). Estudos têm relatado alterações induzidas no conteúdo de tricina (Moheb et al., 2013) e chaftosídeo (Ma et al., 2014) em resposta ao déficit hídrico. Os flavonoides, tricina e chaftosídeo pertencem ao grupo das flavonas presentes nas folhas de trigo. Inclusive, proantocianidinas e 3-deoxiantocianidinas do sorgo foram propostas como marcadores de resistência ao estresse hídrico (Dicko et al., 2005).

I.2 CEREAL: SORGO

Em muitos países, os cereais situam-se na base da pirâmide alimentar, por serem as principais fontes de calorias na dieta de humanos. Além disso, eles são fontes de proteínas, vitaminas (B e E) e minerais (ferro, zinco, magnésio e fósforo), além de variadas substâncias funcionais, como ácidos fenólicos e flavonoides. Os cereais e seus derivados perfazem 54% e 49% das calorias e proteínas, respectivamente, necessárias

na dieta diária do indivíduo (Flight & Clifton, 2006). Além disso, os cereais são fonte de fibras. As fibras insolúveis derivadas de polissacarídeos e ligninas não são digeríveis pelas enzimas do trato digestivo, tornando-se benéficas na prevenção de doenças como diverticulite e câncer de colón (Acosta-Estrada et al., 2014). Cereais, como cevada, milho, aveia, arroz, centeio, mileto e trigo, contêm polissacarídeos do tipo arabinoxilano que podem estar associados a dímeros de ácido ferúlico (Renger & Steinhart, 2000). Paiva e colaboradores (2013) revisaram o alto potencial bioativo do ácido ferúlico e derivados, concluindo que o consumo regular de cereais reduziria riscos de vários tipos de doenças crônicas, como a síndrome metabólica (obesidade), doenças cardiovasculares, diabetes tipo 2 e alguns tipos de câncer (Gani et al., 2012).

Os cereais são monocotiledôneas anuais da família Poaceae (Gramíneas). O grão comestível é um tipo de fruto chamado cariopse. Segundo a FAO, os cereais mais consumidos mundialmente são o milho, arroz, trigo, cevada, sorgo, aveia e mileto (nessa ordem). Em 2014, a produção mundial atingiu 2,8 bilhões de toneladas de cereais, sendo China e Estados Unidos os países de maior produção; o Brasil ocupou a quinta posição, com 101 milhões de toneladas (FAOSTAT, 2017).

O sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) é uma cultura muito antiga. Os primeiros vestígios de sua domesticação foram encontrados no nordeste da África. Estudos de datação relataram sementes carbonizadas com 8000 anos de antiguidade em Nabta Playa, local próximo à fronteira egípcio-sudanesa. A rota migratória proveniente da África e Ásia permitiu grande dispersão de semente através de ecossistemas tropicais e subtropicais, permitindo maior adaptabilidade e diversidade genética (Dahlberg et al., 2011).

O sorgo costuma ser utilizado de duas formas: consumo humano e ração animal. Em países em desenvolvimento e com problemas de déficit hídrico, o sorgo constitui importante fonte de calorias e proteínas para milhões de pessoas. Alguns anos atrás, na África e Ásia o consumo anual per capita foi de 16 Kg e 18 Kg, respectivamente (Hwang et al., 2002). Nos últimos anos, a procura de combustíveis renováveis tem levado ao uso do sorgo como fonte alternativa ao milho e soja. Nos Estados Unidos e na Europa, o sorgo é usado como matéria-prima em diferentes ramos da indústria, sendo aplicado como uma alternativa para o preparo industrial de alimentos sem glúten.

Entretanto, grande parte do sorgo produzido é utilizada na indústria de ração animal (Dahlberg et al., 2011).

Em 2014, a produção mundial de sorgo girou em torno de 70 milhões de toneladas. A produção no Brasil foi de 3 milhões de toneladas (FAOSTAT, 2017). Nos últimos 15 anos, o programa nacional da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) Milho e Sorgo tem incentivado o aumento da produção nacional, incluindo pesquisas de novas variedades. Esse programa tem classificado as variedades de sorgo como granífero (grão), forrageiro (biomassa), vassoura (panícula) e sacarino (colmo). Entretanto, Rooney & Murty (1982) dividiram as variedades de sorgo em três tipos, com base em critérios genético-químicos dos grãos. Assim, o sorgo tipo I não possui taninos, nem testa pigmentada, os do tipo II e III, têm testa pigmentada e taninos. A diferença entre os dois tipos contendo taninos baseia-se no seu armazenamento: no tipo II, os taninos são armazenados em vesículas dentro da camada da testa, enquanto no tipo III são armazenados ao longo da parede celular da testa e alguns estão presentes no pericarpo. Além disso, Rooney & Murty (1982) descreveram a cor do sorgo baseados na coloração do pericarpo, reconhecendo os tipos branco, amarelo, vermelho e marrom. Contudo, as colorações mais escuras não são indicativas de presença ou ausência de taninos (Pizzi & Cameron, 1986).

Independentemente da cor do grão, o sorgo contém carboidratos (75%), proteína (12%), lipídeos (3,3%), fibras (2,7%), cinzas (1,6%) e ceras (0,2%) (Henley, 2010), além de minerais (Mg, P, K, Na, Zn), vitaminas (B-6) e substâncias fenólicas (taninos, flavonoides e ácidos fenólicos) (Althwab et al., 2015). Dykes & Rooney (2007) estabeleceram uma escala de teores de ácidos fenólicos entre os principais cereais, como se segue: centeio > trigo > cevada > sorgo > milho > aveia. Os autores mencionam a presença do pigmento 3-desoxiantocianina, responsável pela estabilidade da coloração do pericarpo no grão de sorgo.

I.3 IMPLICAÇÕES DO CO₂ ELEVADO E DÉFICIT HÍDRICO NAS PLANTAS

O CO₂ em conjunto com outros gases (metano, oxônio e óxido nítrico) constituem os gases do efeito estufa (GEE), que cumprem a função importante de aquecer a superfície da terra (Choufani et al., 2017). Porém, desde o início da revolução

industrial, a concentração de CO₂ atmosférico ([CO₂]) vem aumentando em média 2,5 ppm (partes por milhão) de CO₂ por ano (Bala, 2013), principalmente devido à queima de combustíveis fósseis e mudanças no uso mundial de combustíveis. Na atualidade, a [CO₂] encontra-se em torno de 400 ppm (CO₂earth, 2017), com projeções de aumentar a 800 ou 1000 ppm até o final deste século (IPCC, 2014). Diante desse quadro, diversos cenários de eventos têm sido projetados, como alterações nos padrões climáticos, degelos dos polos e das partes mais altas das cordilheiras, provocando elevação do nível do mar e a possibilidade de perdas de territórios nas costas continentais (IPCC, 2014).

Nas plantas, essas mudanças climáticas podem exacerbar as respostas causadas pelo incremento de CO₂, alta temperatura e consequente carência d'água. Admite-se que as alterações na biologia das plantas serão distintas no confronto entre espécies com fotossíntese C₃ e C₄. Nas plantas C₃, elevado [CO₂] favorece a eficiência cinética da enzima RUBISCO, com incremento na velocidade de carboxilação e ao mesmo tempo redução competitiva da função oxigenase. Em consequência, ao elevar-se a taxa fotossintética, deve ocorrer o aumento no crescimento e incremento no rendimento, assim como melhoras na razão carbono/nitrogênio. Reddy e colaboradores (2010) mostraram o impacto do incremento de CO₂ e a interação com outros fatores ambientais no crescimento e produtividade vegetal com referência na resposta da aclimação fotossintética a elevadas concentrações de CO₂.

Por outro lado, nas plantas C₄, o CO₂ é convertido inicialmente a bicarbonato (HCO₃⁻) pela anidrase carbônica, e em seguida fixado pela fosfoenolpiruvato carboxilase (PEP carboxilase) em ácidos orgânicos de 4 carbonos (oxaloacetato e malato). O mecanismo concentrador de CO₂ baseia-se num ciclo de carboxilação e descarboxilação que se distribui entre dois tipos diferenciados de células fotossintéticas: células do mesófilo e células da bainha perivascular, conhecidas em seu conjunto como anatomia tipo Kranz (Lara & Andreo, 2011). Como foram mencionadas anteriormente, as espécies C₄ são predominantemente tropicais e subtropicais, incluindo importantes culturas, como milho, cana de açúcar, mileto e sorgo.

Experimentos desenvolvidos nas principais culturas como cana de açúcar (De Souza et al., 2008), mileto (Hao et al., 2017) e sorgo (Ziska & Bunce, 1997) demonstraram que espécies com fotossíntese C₄ podem responder ao incremento de CO₂, tal como foram observadas em plantas C₃; entretanto, os mecanismos usados ainda não

são claros. Essas respostas parecem estar mais associadas com a capacidade de carboxilação e armazenamento do CO₂ interno de cada espécie C4. Além disso, fatores ambientais como, luz, nutrição mineral e temperatura ótima da atividade da PEP carboxilase parecem determinar a capacidade desse armazenamento (Ziska & Bunce, 1997).

Estudos desenvolvidos em sistemas FACE (Free Air Concentration Enrichment) mostraram aumento de biomassa quando as plantas de sorgo foram submetidas a períodos de seca, minimizando assim os efeitos negativos do déficit hídrico e melhorando a eficiência no uso da água (Ottman et al., 2001). Adicionalmente, Conley e colaboradores (2001) observaram menor perda por evapotranspiração foliar e maior rendimento em biomassa dos grãos em condições de limitação hídrica.

Por seu turno, elevada [CO₂] pode resultar em quantidade de carbono suficiente para alimentar a síntese de substâncias secundárias baseadas em carbono. No entanto, a resposta do metabolismo secundário diante do incremento de [CO₂] pode ser característica específica de cada espécie (Peñuelas & Estiarte, 1998). Assim, a atividade da fenilalanina-amonialase (PAL), responsável da conversão de fenilalanina a ácido *trans*-cinâmico, aumentou nas folhas e nas raízes de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) (Matros et al., 2006) e nas folhas da gramínea *Poa annua* (Hartley et al., 2000) quando foram expostas a 1000 ppm e 720 ppm de [CO₂], respectivamente; porém esse aumento na atividade enzimática não necessariamente favoreceu o acúmulo de fenilpropanoides e ligninas em ambos os exemplos. Em outros estudos, a comparação de dois genótipos branco e preto de *Oryza sativa* L. (arroz) mostraram redução do conteúdo total de fenilpropanoides e flavonoides quando as plantas foram expostas a 550 ppm de CO₂ (Goufo et al., 2014). Em outra comparação, genótipos resistentes e susceptíveis ao fungo *Cercospora soja* de *Glycine max* (soja) mostraram redução da atividade enzimática de enzimas antioxidantes em folhas devido ao aumento de CO₂ (720 ppm) (Pritchard et al., 2000).

I.4 ESTUDO INTEGRADO DO METABOLISMO DE PLANTAS

A visão abrangente ou global de um ser vivo compreende processos biológicos complexos em diferentes níveis de organização. Nas plantas, o estudo individual de um determinado órgão (folha, caule, raiz ou fruto) tem produzido informações de grande

relevância. No entanto, esse tipo de abordagem limita a compreensão dos processos biológicos quando se leva em conta a totalidade do organismo, em especial ao se estudar a interação ou compartimentalização ao longo do tempo de desenvolvimento da planta.

Com o advento da genômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica a ciência têm acumulado enorme volume de dados de identificação, quantificação e caracterização de genes transcritos, proteínas e metabólitos que, em seu conjunto, auxiliam na elucidação de processos biológicos. Nesse sentido, a biologia de sistemas, disciplina que se dedica à integração dos resultados oriundos dessas áreas, possibilita resolver questões complexas, tais como a interação entre as plantas e o ambiente (Oltvai & Barabási, 2002; Blazier & Papin, 2012), revelando padrões de respostas de órgãos vegetais e facilitando o entendimento da síntese, alocação ou acúmulo de determinadas substâncias.

A metabolômica permite detectar, identificar e quantificar metabólitos em um determinado momento do desenvolvimento de um órgão, inferindo o fluxo metabólico de substâncias derivadas do metabolismo primário ou secundário (Brunetti et al., 2013). A cromatografia gasosa (CG) e líquida (CL), acopladas à espectrometria de massa (MS), são as principais técnicas usadas (Hu et al., 2016; Liu et al., 2017a). Geralmente, substâncias fenólicas, como fenilpropanoides e flavonoides, são extraídas com solventes polares (álcool ou solução hidroalcoólica) e analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência, acoplada à espectrometria de massa em tandem (LC-MS-MS) (Arbona et al., 2013; Liu et al., 2017b).

O presente trabalho tem por objetivo determinar a influência do déficit hídrico e da elevada [CO₂] sobre o perfil de substâncias fenólicas e ligninas de plantas de uma variedade de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench variedade BRS 330), em duas fases de desenvolvimento dos grãos (90 e 120 dias após plantio). Pretende-se realizar a determinação dos perfis químicos de modo sistêmico, analisando-se diversos órgãos das plantas, por meio de CLAE com detecção por arranjo de diodos (CLAE-DAD), acoplada à espectrometria de massas em tandem (MS-MS). A análise dos extratos contendo os componentes fenólicos solúveis (fenilpropanoides, flavonoides e taninos) constituirá o tema do Capítulo II, enquanto as análises de substâncias fenólicas ligadas à parede celular e composição das ligninas serão abordadas no Capítulo III.

I.5 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- Acosta-Estrada, B. A., Gutiérrez-Urbe, J. A., Serna-Saldívar, S. O. (2014). Bound phenolics in foods, a review. *Food chemistry*, 152, 46-55.
- Althwab, S., Carr, T. P., Weller, C. L., Dweikat, I. M., Schlegel, V. (2015). Advances in grain sorghum and its co-products as a human health promoting dietary system. *Food Research International*, 77, 349-359.
- Arbona, V., Manzi, M., Ollas, C. D., Gómez-Cadenas, A. (2013). Metabolomics as a tool to investigate abiotic stress tolerance in plants. *International journal of molecular sciences*, 14, 4885-4911.
- Atkinson, R. R., Mockford, E. J., Bennett, C., Christin, P. A., Spriggs, E. L., Freckleton, R. P., Thompson, K.; Rees, M., Osborne, C. P. (2016). C4 photosynthesis boosts growth by altering physiology, allocation and size. *Nature plants*, 2, 1-5.
- Bala, G. (2013). Digesting 400 ppm for global mean CO₂ concentration. *Current Science*, 104, 1471-1472.
- Blazier, A. S., Papin, J. A. (2012). Integration of expression data in genome-scale metabolic network reconstructions. *Frontiers in physiology*, 3, 1-7.
- Bräutigam, A., Gowik, U. (2016). Photorespiration connects C3 and C4 photosynthesis. *Journal of experimental botany*, 67, 2953-2962.
- Brunetti, C., George, R. M., Tattini, M., Field, K., Davey, M. P. (2013). Metabolomics in plant environmental physiology. *Journal of experimental botany*, 64, 4011-4020.
- Choufani, J., Davis, C., McLaren, R., Fanzo, J. (2017). *Climate change and variability: What are the risks for nutrition, diets, and food systems?* Intl Food Policy Res Inst. (IFPRI).
- CO2earth. (2017). <https://www.co2.earth/>.
- Conley, M. M., Kimball, B. A., Brooks, T. J., Pinter, P. J., Hunsaker, D. J., Wall, G. W., Adam, N. R., LaMorte, R. L., Matthias, A. D., Thompson, T. L., Leavitt, S. W., Ottman, M. J., Cousins, A. B., Triggs, J. M. (2001). CO₂ enrichment increases water-use efficiency in sorghum. *New Phytologist*, 151, 407-412.
- Dahlberg, J., Berenji, J., Sikora, V., Latkovic, D. (2011). Assessing sorghum [*Sorghum bicolor* (L) Moench] germplasm for new traits: food, fuels & unique uses. *Maydica*, 56, 85-92.
- De Souza, A. P., Gaspar, M., Da Silva, E. A., Ulian, E. C., Waclawovsky, A. J., Nishiyama JR, M. Y., Dos Santos, R. V., Teixeira, M. M., Souza, G. M., Buckeridge, M. S. (2008). Elevated CO₂ increases photosynthesis, biomass and

- productivity, and modifies gene expression in sugarcane. *Plant, cell & environment*, 31, 1116-1127.
- Dicko, M. H., Gruppen, H., Barro, C., Traoré, A. S., van Berkel, W. J., Voragen, A. G. (2005). Impact of phenolic compounds and related enzymes in sorghum varieties for resistance and susceptibility to biotic and abiotic stresses. *Journal of Chemical Ecology*, 31, 2671-2688.
- Dykes, L., Rooney, L. W. (2007). Phenolic compounds in cereal grains and their health benefits. *Cereal foods world*, 52, 105-111.
- FAO. (2016). *Food and Agriculture Organization of the United Nations. Climate change, agriculture and food security*. ISBN 978-92-5-109374-0.
- FAOSTAT. (2017). Obtenido de <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC/visualize>
- Flight, I., Clifton, P. (2006). Cereal grains and legumes in the prevention of coronary heart disease and stroke: a review of the literature. *European journal of clinical nutrition*, 60, 1145-1159.
- Gani, A., Wani, S. M., Masoodi, F. A., Hameed, G. (2012). Whole-grain cereal bioactive compounds and their health benefits: a review. *Journal of Food Processing & Technology*, 3, 146-156.
- Godfray, H. C., Beddington, J. R., Crute, I. R., Haddad, L., Lawrence, D., Muir, J. F., Pretty, J., Robinson, S., Thomas, S. M., Toulmin, C. (2010). Food security: the challenge of feeding 9 billion people. *Science*, 327, 812-818.
- Goufo, P., Pereira, J., Figueiredo, N., Oliveira, M. B., Carranca, C., Rosa, E. A., Trindade, H. (2014). Effect of elevated carbon dioxide (CO₂) on phenolic acids, flavonoids, tocopherols, tocotrienols, γ -oryzanol and antioxidant capacities of rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Cereal Science*, 59, 15-24.
- Hao, X. Y., Li, P., Li, H. Y., Zong, Y. Z., Zhang, B., Zhao, J. Z., Han, Y. H. (2017). Elevated CO₂ increased photosynthesis and yield without decreasing stomatal conductance in broomcorn millet. *Photosynthetica*, 55, 176-183.
- Hartley, S. E., Jones, C. G., Couper, G. C., Jones, T. H. (2000). Biosynthesis of plant phenolic compounds in elevated atmospheric CO₂. *Global Change Biology*, 6, 497-506.
- Henley, E. C. (2010). *Sorghum: An Ancient, Healthy and Nutritious Old World Cereal*. St. Louis, Missouri: United Checkoff Program.
- Hibberd, J. M., Sheehy, J. E., Langdale, J. A. (2008). Using C₄ photosynthesis to increase the yield of rice—rationale and feasibility. *Current opinion in plant biology*, 11, 228-231.

- Hu, C., Tohge, T., Chan, S. A., Song, Y., Rao, J., Cui, B., Lin, H., Wang, L., Fernie, A. R., Zhang, D., Shi, J. (2016). Identification of conserved and diverse metabolic shifts during rice grain development. *Scientific reports*, 6, 1-12.
- Hwang, K., Cuppett, S. L., Weller, C. L., Hanna, M. A. (2002). Properties, composition, and analysis of grain sorghum wax. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 79, 521-527.
- IPCC. (2014). *Intergovernmental Panel on Climate Change. Climate Change 2014: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of IPCC*. Obtenido de www.ipcc.ch/report/ar5/
- Jara, C. E. (2012). *Composição química dos grãos e da cera foliar de variedade Glycine max (L.) Merrill cv. MG/ BR-46 Conquista cultivada sob atmosfera enriquecida de gás carbônico e temperatura elevada*. São Paulo: Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Khlestkina, E. (2013). The adaptive role of flavonoids: emphasis on cereals. *Cereal Research Communications*, 41, 185-198.
- Lara, M. V., Andreo, C. S. (2011). C4 plants adaptation to high levels of CO₂ and to drought environments. En Arun Shanker and B. Venkateswarlu (eds). *Abiotic Stress in Plants-Mechanisms and Adaptations*. InTech. Obtenido de <https://www.intechopen.com/books/abiotic-stress-in-plants-mechanisms-and-adaptations/c4-plants-adaptation-to-high-levels-of-co2-and-to-drought-environments>
- Liu, J., Liu, Y., Wang, Y., Abozeid, A., Zu, Y. G., Tang, Z. H. (2017b). The integration of GC-MS and LC-MS to assay the metabolomics profiling in *Panax ginseng* and *Panax quinquefolius* reveals a tissue-and species-specific connectivity of primary metabolites and ginsenosides accumulation. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 135, 176-185.
- Liu, J., Liu, Y., Wang, Y., Abozeid, A., Zu, Y. G., Zhang, X. N., Tang, Z. H. (2017a). GC-MS metabolomic analysis to reveal the metabolites and biological pathways involved in the developmental stages and tissue response of *Panax ginseng*. *Molecules*, 22, 496.
- Ma, D., Sun, D., Wang, C., Li, Y., Guo, T. (2014). Expression of flavonoid biosynthesis genes and accumulation of flavonoid in wheat leaves in response to drought stress. *Plant physiology and biochemistry*, 80, 60-66.
- Maqbool, N., Sadiq, R. (2017). Allelochemicals as growth stimulators for drought stressed Maize. *American Journal of Plant Sciences*, 8, 985-997.
- Mariani, L. (2017). Carbon plants nutrition and global food security. *The European Physical Journal Plus*, 132, 69.

- Matros, A., Amme, S., Kettig, B., Buck-Sorlin, G. H., Sonnewald, U. W., Mock, H. P. (2006). Growth at elevated CO₂ concentrations leads to modified profiles of secondary metabolites in tobacco cv. SamsunNN and to increased resistance against infection with potato virus Y. *Plant, Cell & Environment*, 29, 126-137.
- Moheb, A., Agharbaoui, Z., Kanapathy, F., Ibrahim, R. K., Roy, R., Sarhan, F. (2013). Tricin biosynthesis during growth of wheat under different abiotic stresses. *Plant science*, 201, 115-120.
- Müller, C., Elliott, J. (2015). The global gridded crop model intercomparison: approaches, insights and caveats for modelling climate change impacts on agriculture at the global scale. In A. Elbehri (ed), *Climate change and food systems: global assessments and implications for food security and trade*. Food Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome, pp. 30-59.
- Olivoto, T., Nardino, M., Carvalho, I. R., Follmann, D. N., Szareski, V. I., Ferrari, M., Pelegri, A. J., Souza, V. Q. (2017). Plant secondary metabolites and its dynamical systems of induction in response to environmental factors: a review. *African Journal of Agricultural Research*, 12, 71-84.
- Oltvai, Z. N., Barabási, A. L. (2002). Life's complexity pyramid. *Science*, 298, 763-764.
- Ottman, M. J., Kimball, B. A., Pinter, P. J., Wall, G. W., Vanderlip, R. L., Leavitt, S. W., LaMorte, R. L., Matthias, A. D., Brooks, T. J. (2001). Elevated CO₂ increases sorghum biomass under drought conditions. *New Phytologist*, 150, 261-273.
- Paiva, L. B., Goldbeck, R., Santos, W. D., Squina, F. M. (2013). Ferulic acid and derivatives: molecules with potential application in the pharmaceutical field. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 49, 395-411.
- Peñuelas, J., Estiarte, M. (1998). Can elevated CO₂ affect secondary metabolism and ecosystem function? *Trends in Ecology & Evolution*, 13, 20-24.
- Pizzi, A., Cameron, F. A. (1986). Flavonoid tannins—structural wood components for drought—resistance mechanisms of plants. *Wood Science and Technology*, 20, 119-124.
- Pritchard, S. G., Ju, Z., Santen, E., Qiu, J., Weaver, D. B., Prior, S. A., Rogers, H. H. (2000). The influence of elevated CO₂ on the activities of antioxidative enzymes in two soybean genotypes. *Australian Journal of Plant Physiology*, 27, 1061-1068.
- Raiten, D. J., Aimone, A. M. (2017). The intersection of climate/environment, food, nutrition and health: crisis and opportunity. *Current opinion in biotechnology*, 44, 52-62.

- Reddy, A. R., Rasineni, G. K., Raghavendra, A. S. (2010). The impact of global elevated CO₂ concentration on photosynthesis and plant productivity. *Current Science*, 99, 46-57.
- Renger, A., Steinhart, H. (2000). Ferulic acid dehydrodimers as structural elements in cereal dietary fibre. *European Food Research and Technology*, 211, 422-428.
- Rooney, L. W., Murty, D. S. (1982). Proceeding of the international symposium on Sorghum Grain Quality. In L. W. Rooney, F. R. Miller, and J. Mertin (eds). *International Symposium on Sorghum Grain Quality*. International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics (ICRISAT). India, pp. 143-162.
- Sage, R. F., Zhu, X. G. (2011). Exploiting the engine of C₄ photosynthesis. *Journal of Experimental Botany*, 62, 2989–3000.
- Sarwar, M. H., Sarwar, M. F., Sarwar, M., Qadri, N. A., Moghal, S. (2013). The importance of cereals (Poaceae: Gramineae) nutrition in human health: A review. *Journal of Cereals and Oilseeds*, 4, 32-35.
- United Nations. (2017). *World population prospects: the 2017 revision, key findings and advance tables*. Working Paper No. ESA/P/WP. 248. New York, NY, USA: United Nations.
- von Caemmerer, S. (2003). C₄ photosynthesis in a single C₃ cell is theoretically inefficient but may ameliorate internal CO₂ diffusion limitations of C₃ leaves. *Plant, Cell & Environment*, 26, 1191-1197.
- von Caemmerer, S., Quick, W. P., Furbank, R. T. (2012). The development of C₄ rice: current progress and future challenges. *Science*, 336, 1671-1672.
- Wang, P., Vlad, D., Langdale, J. A. (2016). Finding the genes to build C₄ rice. *Current opinion in plant biology*, 31, 44-50.
- Wheeler, T., Von Braun, J. (2013). Climate change impacts on global food security. *Science*, 341, 508-513.
- Ziska, L. H., Bunce, J. A. (1997). Influence of increasing carbon dioxide concentration on the photosynthetic and growth stimulation of selected C₄ crops and weeds. *Photosynthesis Research*, 54, 199-208.

II. CAPÍTULO 2

RESUMO

O sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) ocupa o quinto lugar na produção de grãos no mundo. Mudanças climáticas ora em curso são atribuídas à elevação da concentração de CO₂, com consequências no aumento de temperatura e alterações nos regimes pluviométricos. Consequentemente, estudos associados de déficit hídrico e CO₂ elevado têm revelado que o incremento de CO₂ minimiza ou reduz os efeitos de alterações climáticas previstas para o futuro. Entretanto, os metabolitos secundários como as substâncias fenólicas têm sido relacionados não só com a defesa da planta senão também com a qualidade nutricional do alimento. Porém, informações sobre os efeitos climáticos no perfil de substâncias fenólicas em estádios de enchimento do grão de sorgo são insuficientes. O presente estudo teve por objetivo caracterizar e quantificar substâncias fenólicas das folhas, pedúnculo, colmo, raízes escoras, raízes e grãos da variedade de sorgo variedade BRS 330 em duas fases de desenvolvimento do grão, em plantas de sorgo submetidas a déficit hídrico severo acoplado a CO₂ elevado. As plantas foram crescidas e monitoradas em Câmaras de Topo Aberto (OTC's) por 120 dias após o plantio (DAP), sob condições de CO₂ ambiente (400 ppm) (A) e CO₂ elevado (800 ppm) (E). Após 60 dias, a irrigação foi reduzida em 70% em relação às plantas controle. As coletas foram aos 90 DAP e 120 DAP. A extração hidroalcoólica dos órgãos (MeOH 80%, 1h a 70 °C) foi analisada por CLAE-DAD e LC-MS-MS. O teor de taninos totais foi determinado pelo método de precipitação de proteínas com albumina de soro bovino (BSA). 132 substâncias fenólicas foram detectadas sendo caracterizados 24 fenilpropanoides e 48 flavonoides na planta toda de sorgo. Derivados de ácido ferúlico e isômeros de ácidos clorogênicos representaram os principais fenilpropanoides distribuídos na planta toda. Flavonas derivadas de tricina, apigenina, luteolina e crisoeriol são distribuídos preferencialmente em folhas. Flavanonas derivadas de eriodictiol e pinocembrina foram mostradas em grãos, raízes escoras e raízes, respectivamente. Observou-se amplo domínio de *O*-glicosídeos sobre *C*-glicosídeos. Qualitativamente, E não exerceu efeito sobre o perfil de substâncias em nenhum órgão, tanto aos 90 quanto aos 120 DAP. Quantitativamente, aos 90 DAP, o E incrementou significativamente o conteúdo de fenilpropanoides e flavonoides em folhas e grãos. Aos 120 DAP, o E reduziu significativamente o teor de taninos.

II.1 INTRODUÇÃO

O sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) é o quinto cereal mais importante na alimentação mundial, após o milho (*Zea mays*), arroz (*Oryza sativa*), trigo (*Triticum aestivum*) e aveia (*Avena sativa*) (FAOSTAT, 2017). Na América do Sul, Estados Unidos e Austrália costuma ser utilizado na alimentação animal, enquanto na América Central, Ásia e África representa uma das principais fontes de calorias na alimentação humana. Em comparação a outros cereais, o consumo de sorgo pode prover uma alimentação mais saudável, por conter maior teor de substâncias bioativas, chamadas compostos funcionais, que são capazes de prevenir o surgimento de doenças crônicas como diabetes, doenças cardiovasculares, mal de Alzheimer, mal de Parkinson, entre outras (Gani et al., 2012).

Entre os compostos funcionais, as substâncias fenólicas constituem uma classe muito diversa de metabólitos secundários, compreendendo fenilpropanoides (caracterizados como compostos C6-C3), ácidos benzóicos (C6-C1), flavonoides (C6-C3-C6), lignanas (C6-C3-C3-C6), além de substâncias mais complexas, como taninos e ligninas (Cheynier et al., 2013).

As substâncias fenólicas nas plantas vasculares provêm principalmente da via do ácido chiquímico (Buchanan et al., 2015). No metabolismo primário, essa via conduz à formação de três aminoácidos aromáticos: fenilalanina, tirosina e triptofano. O fator chave para o equilíbrio entre esses aminoácidos e os primeiros produtos do metabolismo secundário é a enzima fenilalanina-amoniolase (PAL), que converte fenilalanina em ácido *trans*-cinâmico por uma desaminação não-oxidativa (Verpoorte, 2000). A atividade da PAL pode ser alterada por diversos fatores externos, com desvios do carbono proveniente do metabolismo primário ora para a síntese de proteínas, ora para a produção de fenilpropanoides. Assim, em termos do fluxo de carbono a biossíntese dos metabólitos secundários fenólicos torna-se relevante no balanço carbono/nitrogênio no metabolismo vegetal. Os primeiros produtos formados na biossíntese de substâncias fenólicas são os fenilpropanoides, com destaque para o ácido *p*-cumárico, substância precursora de flavonoides e ligninas.

Na biossíntese de flavonoides, a chalcona sintase (CHS) catalisa a conversão de *p*-cumaril-CoA e três moléculas de malonil-CoA em naringenina chalcona. A chalcona

isomerase (CHI) atua para a formação do anel C da estrutura básica dos flavonoides resultando na naringenina (uma flavanona) (Figura II 1). A partir da naringenina, a rota diverge em várias outras vias, cada um resultando numa classe diferente de flavonoides tais como flavonas, isoflavonoides e dihidroflavonois, este último precursor dos flavonóis e antocianinas (Buchanan et al., 2015).

Figura II 1. Representação simplificada das flavanonas e flavonas encontradas em sorgo. Modificado de Eudes, et al., (2017). Abreviações: CHS: chalcona sintase; CHI: chalcona isomerase; FNS: flavona sintase; F3'H: flavonoide 3'-hidrolase; F3'5'H: flavonoide 3'5'-hidrolase; OMT: *O*-metiltransferase.

Nos cereais, predominam flavonas, como tricina, apigenina e luteolina (Figura II 1), não sendo raras as flavonas C-glicosídicas (Harborne & Williams, 1976). Além disso, flavanonas, como naringenina e eriodictiol, foram relatadas para o grão de sorgo (Dykes & Rooney, 2007; Wu et al., 2016a). Tricina e selgina foram detectadas nas partes aéreas da fração de lignina de *Sorghum bicolor* (Eudes et al., 2017) e *Sorghum halapense* (Huang et al., 2010), respectivamente. A distribuição de ácidos

hidroxibenzóicos e hidroxicinâmicos, antocianinas, flavan-4-óis, flavonas, flavanonas, flavonóis, dihidroflavanois e monômeros/dímeros/polímeros de proantocianidinas no grão de sorgo foi objeto de revisão (Dykes & Rooney, 2007).

As ligações *C*-glicosídicas podem compreender uma ampla diversidade de açúcares como glicose, galactose, ramnose, xilose e arabinose, formando flavonoides monoglicosídeos, diglicosídeos ou triglicosídeos (Veitch & Grayer, 2011). Os sítios de glicosilação costumam ser as posições C6 e C8 do núcleo estrutural do flavonoide (Figura II 2). Flavonas na forma de *C*-glicosídeo acilado (Cavaliere et al., 2005) ou *O*-glicosídeo acilado (tricina-7-*O*- β -(6''-*p*-metoxycinamato)-glucosídeo no suco de cana de açúcar) (Duarte-Almeida et al., 2007) têm sido relatados para Poaceae. As enzimas *C*-glicosiltransferases (CGTs) são as responsáveis pela *C*-glicosilação, enquanto na *O*-glicosilação as hidrolases conjugam o núcleo flavonoide aos açúcares (Brazier-Hicks et al., 2009).

Figura II 2. Estrutura geral de um flavonoide da classe flavona (C6-C3-C6). As setas indicam os principais sítios de glicosilação. C: *C*-glicosilação; O: *O*-glicosilação.

Ao contrário de outros cereais, o sorgo não possui uma proteção para o fruto, como a palha no milho, ou as glumas no trigo e na cevada. Por outro lado, nos grãos de sorgo há uma ampla diversidade de substâncias fenólicas (Gani et al., 2012), que serviriam como defesa química. Entre elas, os taninos de sorgo têm causado bastante controvérsia, uma vez que representam vantagens agronômicas, como resistência a pássaros e a doenças do grão; por outro lado, os taninos representam problemas na digestão pelos animais, pelo fato de formar complexos com proteínas e, conseqüentemente, diminuir a palatabilidade e a digestibilidade dos grãos (Magalhães et al., 2008).

Os metabólitos secundários, como as substâncias fenólicas, têm sido reconhecidos como relevantes na biologia das plantas por cumprir diversas funções de proteção diante de fatores bióticos (interação planta-patógeno) e abióticos (interação planta-ambiente físico). São relevantes em processos fisiológicos, como transporte de hormônios (ácido abscísico e auxina), sinalização nodular, fertilidade do pólen, pigmentação das flores, assim como na sinalização visual para atrair polinizadores (Bartwal et al., 2013). Além disso, são capazes de neutralizar radicais livres provenientes do estresse oxidativo (Ferreira et al., 2012).

Alterações climáticas estão previstas no último relatório do IPCC para finais do presente século (IPCC, 2014). Nesse sentido, o déficit hídrico severo representa um dos principais fatores de perda agronômica. Comparado a outros cereais, o sorgo desenvolveu estratégias de maior tolerância ao déficit hídrico, como formação de raízes secundárias mais extensas e profundas, tornando-se uma planta modelo para a elucidação de mecanismos de tolerância à seca (Amelework et al., 2015). Entretanto, diferentes respostas agronômicas e fisiológicas têm revelado que essa tolerância é limitada e pode variar em função da restrição hídrica ocorrer no período vegetativo (Adams & Erickson, 2017) e/ou reprodutivo (Assefa et al., 2010). Uma revisão bibliográfica com genótipos americanos de sorgo relata que a maior perda do rendimento final ocorre quando o déficit hídrico é imposto a partir do estágio reprodutivo (Assefa et al., 2010). Ao igual que outras plantas, períodos curtos de déficit hídrico não são tão prejudiciais quanto períodos longos no sorgo. Adicionalmente à frequência do déficit hídrico, a sua intensidade seria outro fator determinante. Por exemplo, em genótipos australianos de sorgo, a aplicação de irrigação limitada a 50% estimulou o incremento de polifenóis e elevou a atividade antioxidante do grão, em detrimento da perda do diâmetro e biomassa do grão. A irrigação limitada a 25% reduziu tanto o acúmulo de polifenóis quanto o diâmetro e biomassa do grão (Wu et al., 2017).

Estudos sobre o sorgo têm revelado atenuação dos efeitos negativos do déficit hídrico por incremento de CO₂ (Conley et al., 2001; Ottman et al., 2001), ocorrendo alterações anatômicas, ultraestruturais e bioquímicas nas folhas, como consequência de aclimação diante do aumento de [CO₂] (Watling et al., 2000). Em outras espécies, tem-se notado que alterações bioquímicas resultantes da maior disponibilidade de carbono podem afetar a proporção de hexoses, com incremento na extensão da cadeia de

frutanos do tipo inulina, com foi observado no rizóforo de *Chrysolaena obovata*, espécie nativa do Cerrado do Brasil (Oliveira et al., 2016). Nesse experimento, o CO₂ elevado minimizou os efeitos negativos do déficit hídrico observados na fotossíntese e atividade de enzimas metabólicas.

O perfil de metabólitos secundários nos alimentos influi na sua aparência, sabor, adstringência, aroma, estabilidade oxidativa e qualidade nutricional. Por essa razão, no que se refere às plantas de sorgo, quase todos os estudos sobre o perfil químico de substâncias fenólicas têm sido focados no grão, notando-se assim uma lacuna em relação à dinâmica de alocação dessas substâncias para os diferentes órgãos da planta submetida à combinação entre déficit hídrico e incremento de CO₂. O entendimento do fluxo de carbono no metabolismo secundário nos diferentes estádios de desenvolvimento pode indicar caminhos em direção ao melhoramento da bioquímica do grão e sua qualidade nutricional. O cultivo de plantas em condições controladas de temperatura, exposição ao CO₂ e disponibilidade hídrica, aliado ao uso de técnicas de análise cromatográfica acopladas à espectrometria de massas, têm contribuído para uma análise integral do desempenho de culturas alimentícias em condições futuras. Em publicação de 2015, De Souza et al., (2015) fazem uma apreciação integrada de ajustes regulatórios do metabolismo primário em diferentes órgãos da planta de sorgo, induzidos por condições de interação de déficit hídrico e incremento de CO₂.

OBJETIVOS

Geral

Avaliar os efeitos do déficit hídrico e elevado CO₂ sobre a dinâmica da produção de substâncias fenólicas em vários órgãos da planta de sorgo da variedade BRS 330 de sorgo, durante duas fases de desenvolvimento dos grãos (90 e 120 dias após plantio).

Específicos

1. Identificar e quantificar fenilpropanoides e flavonoides de folhas, pedúnculo, colmo, raízes escoras, raízes e grãos.

2. Determinar o conteúdo de taninos de folhas, pedúnculo, colmo, raízes escoras, raízes e grãos.

II.2 MATERIAL E MÉTODOS

II.2.1 Material botânico

O catálogo da EMBRAPA Milho e Sorgo refere-se ao híbrido sorgo granífero BRS 330 como planta de porte baixo, ciclo de crescimento de 120 dias, com panícula semiaberta, grão vermelho e alto potencial de rendimento. O bom desenvolvimento radicular confere melhor absorção de nutrientes em condições de déficit hídrico (www.embrapa.br).

Sementes de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) variedade BRS 330 foram postas a germinar em bandejas contendo vermiculita. Vinte e quatro plântulas foram transferidas, cada uma para um vaso contendo substrato comercial Plantmax[®]. Dos vinte e quatro vasos, seis vasos foram distribuídos aleatoriamente, em quatro câmaras de topo aberto (OTCs, *open-top chambers*) de 1,5 x 3,5 m (diâmetro x altura), providas de um sistema de circulação de ar. Em duas das câmaras, acoplou-se um cilindro de CO₂ com válvula ajustada para atmosfera interna com concentração de CO₂ elevado (800 ppm), constituindo o tratamento **E**. Nas outras duas câmaras, o ar de entrada era proveniente do ambiente, com concentração igual a 390 ppm (ambiente), constituindo o tratamento **A** (Figura 3). As concentrações internas do gás e dos dados microclimáticos de temperatura e umidade relativa foram monitoradas e obtidas com um sistema de sensores controlados pelo software Remote Integrated Control System (RICS). Adicionalmente, promoveu-se rotação de plantas semanalmente dentro de cada câmara e a cada duas semanas entre câmaras.

Figura II 3. Câmaras de topo aberto (OTC's) contendo plantas de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) variedade BRS330 cultivadas em câmaras de topo aberto, sob condições de déficit hídrico severo e CO₂ ambiente (A) e CO₂ elevado (E) aos 70 DAP (a). Detalhe da panícula numa planta de sorgo aos 105 DAP sob CO₂ ambiente (b) e sob CO₂ elevado (c).

O sistema de regas foi padronizado de acordo com sensores de umidade do solo 10HS (ICT International[®]), instalados 24 dias após a germinação. A condição de déficit hídrico foi aplicada segundo as fases de desenvolvimento da planta. Durante a fase vegetativa, o conjunto dos vasos foi regado com 1,5 L de água. Durante a fase reprodutiva, iniciada 60 dias após o plantio (DAP) e coincidente com a emergência da

folha bandeira, o volume de rega foi reduzido para 0,45 L de água (~ 30 % em relação ao controle) (Figura 4). Uma vez por semana, a cada vaso foram adicionados 400 mL de solução nutritiva de Hoagland modificada (Epstein, 1972). A composição da solução nutritiva compreendeu: 5 mL de nitrato de cálcio 1 M, 5 mL de nitrato de potássio 1 M, 2 mL de sulfato de magnésio heptahidratado 1 M, 1 mL de fosfato monopotássico 1 M, 5 mL de micronutrientes e 10 mL de Fe-EDTA por litro de solução.

Duas datas de coletas correspondentes aos estádios imaturo e maduro do grão, 90 DAP e 120 DAP, foram definidas para as análises. As plantas foram selecionadas aleatoriamente, a primeira coleta compreendendo cinco indivíduos representativos de cada tratamento e a segunda, quatro indivíduos submetidos ao tratamento com CO₂ ambiente e cinco indivíduos submetidos a CO₂ elevado. As coletas foram realizadas entre 9 e 11 h. O material coletado foi dividido em folhas, pedúnculo, colmo, raízes escoras, raízes, escapo floral e grãos. Em seguida, cada órgão da planta foi pesado e seco em liofilizador a – 80 °C e 200 mm Hg por 72 h. A amostra foi pulverizada com moinho de bolas e preservada em sílica em ambiente escuro até a análise.

Figura II 4. Desenho experimental adaptado de De Souza et al., (2015).

II.2.2 Análise de substâncias fenólicas solúveis por CLAE-DAD

Foi feita extração de 150 mg de massa seca dos órgãos das plantas com 1,6 mL de metanol 80% a 70 °C por 1 h. Após centrifugação a 13000 rpm por 12 min num MiniSpin® Eppendorf, os sobrenadantes foram recolhidos e mantidos a – 20 °C.

A caracterização e quantificação das substâncias fenólicas foram feitas por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) Agilent 1260, coluna de fase reversa Zorbax Eclipse Plus C18 (4,6 x 150 mm, 3,5 µm) e sistema de solventes contendo ácido acético 0,1% em água milliQ (A) e acetonitrila grau HPLC (B). Estabeleceu-se um gradiente de eluição, com concentração crescente de B, como se segue: 0 – 10 min: 0 – 10%; 10 – 27 min: 10 – 20%; 27 – 37 min: 20%; 37 – 38 min: 20 – 25%; 38 – 48 min: 25%; 48 – 88 min: 25 – 70%; 88 – 90 min: 70 – 100%. O volume de injeção foi de 3 µL, fluxo de 1 mL/min e tempo total de eluição 90 min. A temperatura da coluna foi mantida em 45 °C. A detecção por UV-Vis foi feita em 280, 320, 340 e 352 nm e a faixa de varredura para obtenção dos espectros de absorção foi ajustada para 200-600 nm. Nos Anexos A 1 – A 7 são apresentados os cromatogramas obtidos para cada órgão analisado.

Extratos de cada órgão foram também analisados com um cromatógrafo DADSPD-M10AVP (Shimadzu), equipado com detector de arranjo de diodos SPD-20A, acoplado a um espectrômetro de massas Esquire 3000 Plus (Bruker Daltonics). O detector de massas é um quadrupolo coletor de íons equipado com uma fonte de ionização à pressão atmosférica. As condições cromatográficas foram as mesmas utilizadas para a análise por CLAE-DAD com o cromatógrafo Agilent 1260. Os espectros de massas foram obtidos com fonte de ionização electrospray (ESI) em – 40 V e voltagem capilar offset de 4500 V para os modos positivo e negativo. A nebulização foi assistida por uma bainha coaxial de nitrogênio a 130 °C e fluxo de 4 L/min. Um fluxo contracorrente de nitrogênio foi estabelecido a 7 L/min e temperatura capilar de 320 °C para dessolvatação. O detector de massas foi programado para detecção no intervalo m/z 100-1000.

As substâncias fenólicas foram caracterizadas por comparação dos tempos de retenção, espectros de absorção UV-Vis, massas do íon precursor ou molécula protonada $[M+H]^+$, molécula desprotonada $[M-H]^-$ e íons produtos (MS-MS) com

padrões comerciais, além de dados da literatura. No Anexo A 8 são mostradas as substâncias caracterizadas em amostras de folhas, pedúnculo, colmo, raízes escoras, raízes, grãos a 90 DAP e 120 DAP.

Os picos dos cromatogramas obtidos nas análises por CLAE-DAD foram integrados e as áreas de cada substância usadas para determinação dos teores de cada constituinte fenólico das amostras. A quantificação das substâncias baseou-se em curvas de calibração construídas com soluções metanólicas de amostras autênticas de flavonoides e fenilpropanoides (Sigma-Aldrich): solução de orientina, para quantificar derivados de luteolina, crisoeriol e tricina; solução de vitexina, para derivados de apigenina; solução de pinocembrina, para derivados de pinocembrina e eriodictiol; e solução de ácido clorogênico, para fenilpropanoides. Os resultados obtidos foram agrupados para o cálculo dos teores totais de fenilpropanoides e flavonoides, assim como para os teores de substâncias fenólicas totais. Os Anexos A 9 – A 14 mostram os conteúdos de substâncias fenólicas caracterizadas correspondentes aos órgãos analisados.

II.2.3 Quantificação de taninos totais

A análise dos taninos foi obtida da extração com 1,8 mL de metanol 50% e 150 mg de amostra seca pulverizada a 40 °C por 1 h, agitados a intervalos regulares. A suspensão foi centrifugada por 5 min a 12000 rpm num MiniSpin® Eppendorf (Waterman & Mole, 1994).

O doseamento de taninos totais seguiu o protocolo de Hagerman & Butler (1978). A 100 µL do extrato foram adicionados 300 µL de solução de BSA (albumina de soro bovino) a 5 mg/mL e 250 µL de tampão pH 4,9, contendo ácido acético 0,2 M e NaCl 0,17 M. Após 30 min de incubação a temperatura ambiente, a mistura foi centrifugada por 5 min a 13000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado recuperado em 800 µL de solução aquosa de dodecilsulfato de sódio 1% (SDS) e trietanolamina 5% (v/v). O precipitado foi homogeneizado com auxílio do vórtex e em seguida adicionaram-se 200 µL de cloreto férrico 0,01 M acidificado com HCl 0,01 M. Após 15 min, a absorbância foi lida a 510 nm em espectrofotômetro THERMO modelo GENESYS 10S UV-VIS. A concentração de taninos totais foi calculada com base em curva de calibração preparada com soluções de tanino de quebracho purificado a 0,1,

0,2, 0,25, 0,3, 0,5, 0,8 mg/mL.

II.2.4 Análises estatísticas

Diferenças entre as médias dos tratamentos (CO₂ ambiente e CO₂ elevado) nos órgãos dos dois estádios de desenvolvimento do grão (90 DAP e 120 DAP) foram analisadas por análise de variância (ANOVA-one-way) e teste *t*-Student ($P < 0.05$) usando o software estatístico JMP, versão 5.0.1.

Para inferência sobre efeitos positivos ou negativos da [CO₂] e sua intensidade, foi aplicada a formula (1), de tal forma que o valor > 0 representa efeito positivo (incremento) e valor < 0 representa efeito negativo (redução). Os Anexos A 9 – A 14 mostram o teor do efeito do CO₂ elevado, aos 90 DAP e 120 DAP.

(1)

$$\text{Efeito (\%)} = \frac{(\text{média de CO}_2 \text{ elevado} - \text{média de CO}_2 \text{ ambiente}) \times 100}{\text{média CO}_2 \text{ ambiente}}$$

Análises multivariadas de agrupamento e componente principal (PCA) foram feitas com os programas estatísticos PAST version 2.17c (Hammer et al., 2013) e MINITAB 18, respectivamente. Nas análises de agrupamento foi usado o índice de Jaccard para avaliar a interdependência dos órgãos. Para isso, as substâncias fenólicas de folhas, pedúnculo, colmo, raízes escoras, raízes e grãos aos 90 DAP e 120 DAP detectadas por tempo de retenção por CLAE-DAD-UV foram utilizadas para construção de uma matriz. A análise de agrupamento dos órgãos considerou 1 para a substância presente e 0 para a substância ausente. A construção da matriz binária desconsiderou os resultados obtidos com o tratamento **E**. Por outro lado, a distribuição das substâncias fenólicas caracterizadas por CLAE-UV-ESI-MS-MS foi analisada por PCA, usando os dados de quantificação obtidos por padronização externa com substâncias padrões, levando-se em consideração ambos tratamentos **A** e **E** em duas fases de desenvolvimento 90 DAP e 120 DAP.

Para geração de heat maps, os dados foram normalizados e padronizados. Os dados brutos foram normalizados usando-se a função $\log_2$. Em seguida, os dados resultantes foram padronizados, subtraindo-se a média geral de cada substância fenólica e dividindo-se a subtração pelo desvio padrão geral da mesma substância fenólica. Os

resultados centrados entre valores negativos (mínimo, -2) e positivos (máximo, $+2$) foram usados para a obtenção dos gráficos. A normalização e padronização dos valores de substâncias fenólicas desconsideraram órgãos nos quais não se detectou a substância. O programa <https://software.broadinstitute.org/morpheus/>, de livre acesso, foi utilizado para gerar os gráficos.

II.3 RESULTADOS

II.3.1 Dados microclimáticos de temperatura, umidade relativa, CO₂ e umidade do solo

Os dados microclimáticos coletados do interior das câmaras foram utilizados para construção dos gráficos das Figuras II 5a, 5b, 5c e 5d, mostrando as variações médias de temperatura, umidade relativa, concentração de CO₂ e umidade do solo durante o experimento, respectivamente. A temperatura durante o experimento esteve em torno de 25,4 °C em ambos os tratamentos (Figura II 5a). A média da umidade relativa foi maior sob CO₂ elevado (**E**) (em torno de 69%) que sob CO₂ ambiente (**A**) (63.9%) (Figura II 5b). A [CO₂] em condição ambiente permaneceu em $492,9 \pm 27,2$ e com atmosfera enriquecida em $838,1 \pm 149,1$ (Figura II 5c). A resposta referente à umidade do solo caracterizou-se por maior conteúdo de água no solo sob **E** (Figura II 5d).

Figura II 5. Dados microclimáticos de temperatura (a), umidade relativa (b), concentração de CO₂ (c) e umidade do solo (d) no interior das câmaras de topo aberto (OTC), utilizadas para o cultivo de plantas de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) variedade BRS 330 crescidas sob atmosferas com CO₂ ambiente (A) e CO₂ elevado (E).

II.3.2 Conteúdo de substâncias fenólicas totais em CO₂ ambiente e elevado aos 90 DAP e 120 DAP

A Figura II 6 mostra os resultados referentes à soma dos conteúdos de substâncias fenólicas totais detectadas por CLAE em cada órgão, nas condições de déficit hídrico e CO₂ ambiente (A) e CO₂ elevado (E), referentes aos estádios de enchimento e maturação do grão (90 e 120 DAP, respectivamente).

De modo geral, as folhas acumularam maior conteúdo de substâncias fenólicas, seguidas por pedúnculo, colmo, raízes escoras, raízes e grãos. Aos 90 DAP, os grãos acumularam mais substâncias fenólicas que aos 120 DAP. O tratamento com CO₂ elevado incrementou significativamente o conteúdo de substâncias fenólicas de folhas e grãos (31% e 36%, respectivamente) aos 90 DAP. No estágio maduro (120 DAP) não se observaram diferenças estatísticas (Figura II 6).

Figura II 6. Conteúdo de substâncias fenólicas totais ($\mu\text{g.mg}^{-1}$ MS) de plantas de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) variedade BRS 330, cultivadas em câmaras de topo aberto, sob atmosferas com CO_2 ambiente (A) e CO_2 elevado (E) aos 90 e 120 DAP. Barras representam a média $\pm$ erro padrão (N=5). F: folhas, P: pedúnculo, C: colmo, Re: raízes escoras, R: raízes, G: grãos. Asteriscos indicam diferenças significativas ($P < 0,05$).

II.3.3 Conteúdo de fenilpropanoides em CO_2 ambiente e elevado aos 90 DAP e 120 DAP

A Figura II 7 mostra o conteúdo total de fenilpropanoides de cada órgão nas condições de déficit hídrico e CO_2 ambiente (A) e CO_2 elevado (E), nos estádios de enchimento e maturação do grão (90 DAP e 120 DAP, respectivamente). De modo geral, as folhas acumularam maior conteúdo de fenilpropanoides, seguidas por pedúnculo, colmo, raízes escoras, raízes e grãos. Aos 90 DAP, houve diferenças significativas em folhas e raízes escoras, comparando CO_2 ambiente (A) e CO_2 elevado (E), com incremento de 16% e redução de 6%, respectivamente. Aos 120 DAP, não se observaram diferenças significativas. Comparando 90 DAP com 120 DAP, o conteúdo de fenilpropanoides nos grãos aumentaram 42% em CO_2 ambiente e 7% em CO_2 elevado.

Figura II 7. Fenilpropanoides totais ($\mu\text{g.mg}^{-1}$ MS) de plantas de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) variedade BRS 330, cultivadas em câmaras de topo aberto, sob atmosferas com CO_2 ambiente (A) e CO_2 elevado (E) aos 90 e 120 DAP. Barras representam a média $\pm$ erro padrão (N=5). F: folhas, P: pedúnculo, C: colmo, Re: raízes escoras, R: raízes, G: grãos. Os asteriscos indicam diferenças significativas ($P < 0,05$).

II.3.4 Conteúdo de flavonoides em CO_2 ambiente e elevado aos 90 DAP e 120 DAP

A Figura II 8 mostra o conteúdo total de flavonoides de cada órgão sob déficit hídrico e CO_2 ambiente (A) e CO_2 elevado (E) para os estádios de enchimento (90 DAP) e maturação dos grãos (120 DAP). Em geral, as folhas acumularam maior conteúdo, seguidas por pedúnculo, colmo, raízes escoras, raízes e grãos, de modo semelhante ao observado com os fenilpropanoides (II.3.3).

A condição de CO_2 elevado incrementou significativamente o conteúdo de flavonoides nas folhas (45%) e grãos (46%) aos 90 DAP e raízes escoras (61%) aos 120 DAP. Do ponto de vista temporal, o conteúdo de flavonoides nos grãos (120 DAP) foi reduzido 63% sob a condição A e 67% na condição E (Figura II 8).

Figura II 8. Flavonoides totais ($\mu\text{g.mg}^{-1}$ MS) de plantas de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) variedade BRS 330, cultivadas em câmaras de topo aberto, sob atmosferas com CO_2 ambiente (A) e CO_2 elevado (E) aos 90 e 120 DAP. Barras representam a média $\pm$ erro padrão (N=5). F: folhas, P: pedúnculo, C: colmo, Re: raízes escoras, R: raízes, G: grãos. Asteriscos indicam diferenças significativas ($P < 0,05$).

II.3.5 Conteúdo de taninos totais sob CO_2 ambiente e elevado aos 90 DAP e 120 DAP

Os teores de taninos totais foram semelhantes durante os estádios 90 e 120 DAP. As raízes escoras foi o órgão com menor acúmulo de taninos totais, tanto aos 90 DAP quanto aos 120 DAP. Aos 90 DAP, o tratamento de CO_2 elevado não alterou significativamente o conteúdo de taninos totais, porém aos 120 DAP, nos grãos houve redução de 3% de taninos totais (Figura II 9).

Figura II 9. Taninos totais ($\mu\text{g.mg}^{-1}$ MS) de plantas de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) variedade BRS 330, cultivadas em câmaras de topo aberto, sob atmosferas com CO_2 ambiente (A) e CO_2 elevado (E) aos 90 e 120 DAP. Barras representam a média $\pm$ erro padrão (N=5). F: folhas, P: pedúnculo, C: colmo, Re: raízes escoras, R: raízes, G: grãos. Asteriscos indicam diferenças significativas ($P < 0,05$).

II.3.6 Perfil químico de substâncias fenólicas durante o desenvolvimento dos grãos sob CO_2 ambiente e elevado aos 90 DAP e 120 DAP

No conjunto das análises, foram detectadas 132 substâncias fenólicas. Não se observaram alterações nos perfis químicos de folhas, pedúnculo, colmo, raízes escoras e raízes comparando as duas datas de desenvolvimento dos grãos. No entanto, os perfis químicos dos grãos aos 90 e 120 DAP foram diferentes, sendo mais diversificado aos 90 DAP. O tratamento com CO_2 elevado (E) não alterou qualitativamente o perfil químico dos órgãos.

O dendrograma resultante da análise multivariada de agrupamento das 132 substâncias fenólicas é apresentado na Figura II 10. Do dendrograma destacam-se a formação de dois grupos o primeiro formado pelos grãos aos 90 DAP e 120 DAP e o

segundo formado pelas folhas, raízes, raízes escoras, colmo e pedúnculo. Dentro do segundo grupo, pedúnculo e colmo constituem um grupo com afinidades próximas (Figura II 10).

Figura II 10. Análise de agrupamento de distribuição de substâncias fenólicas detectadas por CLAE-DAD-UV de órgãos de plantas de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) variedade BRS 330, cultivadas em câmaras de topo aberto sob condição de déficit hídrico e CO₂ ambiente.

Por meio de LC-MS-MS, foram caracterizadas 72 substâncias fenólicas, compreendendo 24 fenilpropanoides e 48 flavonoides. No anexo A 8, são apresentados os cromatogramas e espectros de massas de íons obtidos nos modos positivo e/ou negativo, com os quais foram feitas as propostas de identificação das substâncias fenólicas. A Tabela 1 apresenta a relação das substâncias fenólicas, organizadas segundo os respectivos tempos de retenção, e sua distribuição nos órgãos das plantas.

Tabela 1. Lista de fenilpropanoides e flavonoides caracterizados em órgãos de plantas de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) variedade BRS 330, cultivadas em câmaras de topo aberto sob condição de déficit hídrico.

Nº	T. R. (min)	Identificação sugerida	Folhas	Pedúnculo	Colmo	Raízes escoras	Raízes	Grãos 90 DAP	Grãos 120 DAP
1	8,4	Ác. 3-O-cafeoilquínico	x			x		x	x
2	10,3	Derivado de ác. ferúlico 1	x					x	x
3	11,0	Ác. 5-O-cafeoilquínico	x	x	x	x	x		
4	11,3	Derivado de ác. ferúlico 2	x						
5	11,7	Ác. 4-O-cafeoilquínico	x	x		x			
6	12,1	Ác. 3-O-feruloilquínico	x	x	x	x			x
7	12,6	Derivado de ác. cafeico 1	x						
8	12,8	Api-C-pen-C-pen	x						
9	13,6	Derivado de ác. cafeico 2	x	x	x	x		x	
10	13,8	Derivado de ác. cafeico 3							x
11	15,2	Api-C-hex-C-pen 1		x			x		
12	15,5	Api-O,C-dihex					x		
13	15,8	Ác. 4-O-feruloilquínico	x	x	x	x	x	x	x
14	16,2	Lut-C-hex-C-pen		x		x	x		
15	16,8	Derivado de ác. ferúlico 3	x			x			
16	17,1	Derivado de ác. cafeico 4	x	x		x	x	x	x
17	17,7	Api-C-hex-C-pen 2	x	x	x	x			
18	18,3	Api-C-hex-C-pen 3	x	x	x	x	x		
19	18,4	Api-C-hex-C-pen 4	x			x			
20	18,8	Ácido ferúlico					x	x	x
21	18,9	Tri-O-hex-O-hex 1	x	x	x	x			
22	19,3	Api-C-hex (isovitexina)	x	x	x	x	x		
23	19,6	Lut-O-hex-ram	x						
24	19,9	Api-O-hex 1	x			x	x		
25	20,9	Api-C-hex-C-pen 5	x		x		x		
26	21,4	Api-C-hex (vitexina)					x		
27	22,0	Eri-O-hex 1						x	x
28	22,4	Lut-O-hex 1	x				x		

Tabela 1. Continuação.

Nº	T. R. (min)	Identificação sugerida	Folhas	Pedúnculo	Colmo	Raízes escoras	Raízes	Grãos 90 DAP	Grãos 120 DAP
29	22,7	Api-C-pen		x	x	x	x		
30	22,9	Eri-O-hex 2						x	x
31	23,0	Api-O-hex 2	x						
32	23,9	Derivado de tri-O-hex		x	x	x	x		
33	24,9	Lut-O-hex 2	x						
34	25,5	Api-O-hex 3	x			x	x		
35	25,9	Tri-O-hex 1	x					x	x
36	25,9	Api-O-hex-ram	x						
37	26,3	Api-O-hex 4	x				x		
38	26,8	Cri-O-hex-ram	x						
39	27,1	Tri-O-hex-ram	x						
40	27,3	Derivado de ác. ferúlico 4	x						
41	27,4	Tri-O-hex 2	x	x		x	x		
42	27,9	Cri-O-hex	x						
43	28,4	Tri-O-hex 3	x	x	x	x	x		
44	29,1	Tri-O-hex 4	x						
45	29,6	Pin-O-hex				x	x		
46	30,0	Api-O-hex-O-hex 1	x			x			x
47	32,5	Tri-O-guaiacilgliceril-O-hex 1	x						
48	32,8	Api-O-malhex	x						
49	33,5	Tri-O-guaiacilgliceril-O-hex 2		x	x	x			
50	34,7	Derivado de ác. ferúlico 5		x	x				
51	40,6	Tri-O-guaiacilgliceril-O-hex 3	x						
52	40,9	Api-O-hex-O-hex 2	x		x	x	x	x	
53	41,2	Tri-O-hex-O-hex 2	x	x					
54	41,2	Cri-O-hex-O-hex	x						
55	44,2	Derivado de tricina 1	x	x	x		x		
56	46,5	Derivado de ác. ferúlico 6		x	x				
57	47,0	Derivado de tricina 2		x					
58	48,1	Tricina	x	x	x	x	x		

Tabela 1. Continuação.

Nº	T. R. (min)	Identificação sugerida	Folhas	Pedúnculo	Colmo	Raízes escoras	Raízes	Grãos 90 DAP	Grãos 120 DAP
59	49,0	Derivado de ác. ferúlico 7	x						
60	49,4	Derivado de ác. ferúlico 8		x	x				
61	51,6	Tri-O-siringil álcool eter		x					
62	53,2	Tri-O-guaiacilgliceril 1	x	x	x	x			
63	54,3	Tri-O-guaiacilgliceril 2		x					
64	55,1	Derivado de ác. ferúlico 9	x	x	x		x		
65	55,6	Tri-O-guaiacilgliceril 3	x	x	x	x			
66	55,8	Derivado de ác. ferúlico 10				x	x		
67	57,5	Derivado de ác. ferúlico 11		x	x				
68	58,0	Derivado de ác. ferúlico 12		x	x		x		
69	58,8	Derivado de ác. ferúlico 13		x	x	x	x		
70	61,3	Tri-O-guaiacilgliceril metoxi 1	x	x	x				
71	61,7	Tri-O-guaiacilgliceril metoxi 2	x	x	x		x		
72	62,3	Derivado de ác. ferúlico 14	x	x	x	x	x	x	x

Nº: número de ordem de eluição; T.R. (min): Tempo de retenção; DAP: dias após o plantio; x: presença da substância; Api: apigenina; Lut: leuteolina; Tri: tricina; Eri: eriodictiol; Cri: crisoeriol; Pin: pinocembrina; pen: pentose; hex: hexose; ram: ramnose; mal: maloil.

Os fenilpropanoides foram caracterizados como pertencentes a quatro grupos estruturais principais, derivados de ácido ferúlico (14 substâncias) e ácido cafeico (4 substâncias), ácidos clorogênicos (5 substâncias) e ácido ferúlico propriamente dito. Na Figura II 11 mostra-se a frequência dos representantes dessas quatro categorias nos órgãos de sorgo. Nota-se que folhas, pedúnculo e colmo em geral apresentam maior diversidade de fenilpropanoides, enquanto os grãos possuem a menor diversidade.

Figura II 11. Distribuição de fenilpropanoides, segundo os tipos estruturais principais, detectados em folhas, pedúnculo, colmo, raízes escoras, raízes e grãos de plantas de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) variedade BRS 330, cultivadas em câmaras de topo aberto, em condição de déficit hídrico.

Particularmente, dois fenilpropanoides foram detectados em todos os órgãos: o ácido 4-*O*-feruloilquínico (mostrado no Anexo A 15) e um derivado do ácido ferúlico ($[M+H]^+ = 557.4$), correspondentes às substâncias **13** e **72**, respectivamente, da Tabela 1.

Quanto aos flavonoides, foram caracterizadas 48 substâncias, correspondendo a 45 flavonas e 3 flavanonas. As flavonas detectadas são derivadas de tricina (20 substâncias), apigenina (18), luteolina (4) e crisoeriol (3). As flavanonas são a pinocembrina e dois derivados de eriodictiol (Tabela 1). A Figura II 12 apresenta as classes de flavonoides distribuídas por órgão. As folhas apresentaram a maior diversidade, com um total de 35 flavonoides. Os grãos apresentaram a menor diversidade, com 5 substâncias. As flavanonas foram detectadas exclusivamente em raízes escoras, raízes e grãos.

Figura II 12. Distribuição de classes dos flavonoides caracterizados em folhas, pedúnculo, colmo, raízes escoras, raízes e grãos de plantas de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) variedade BRS 330, cultivadas em câmaras de topo aberto sob condição de déficit hídrico e CO₂ ambiente.

Entre os 48 flavonoides caracterizados, 39 são glicosídeos contendo hexoses ou pentoses. Entre os glicosídeos, há 22 monoglicosídeos e 17 diglicosídeos. Entre os monoglicosídeos, 19 são *O*-glicosídeos e 3 são *C*-glicosídeos. Os 17 diglicosídeos dividiram-se em nove *O,O*-diglicosídeos, sete *C,C*-diglicosídeos e um *O,C*-diglicosídeo.

A Figura II 13 mostra a distribuição dos flavonoides nos órgãos das plantas. É nítida a superioridade numérica de *O*-glicosídeos sobre *C*-glicosídeos. Novamente, as folhas destacam-se pela maior diversidade de flavonoides, principalmente no que se refere a *O*-glicosídeos, tanto mono quanto diglicosídeos. Os grãos são os órgãos com menor diversidade. Não foram detectados *C*-glicosídeos nos grãos.

Figura II 13 Distribuição de glicosídeos de flavonoides caracterizados em folhas, pedúnculo, colmo, raízes escoras, raízes e grãos de plantas de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) variedade BRS 330, cultivadas em câmaras de topo aberto sob condição de déficit hídrico e CO₂ ambiente.

Levando-se em conta a diversidade de substâncias fenólicas nos órgãos das plantas estudadas, tem-se o seguinte quadro sobre o número de fenilpropanoides (fp) e flavonoides (fl): folhas - 15 fp, 35 fl; pedúnculo - 14 fp, 21 fl; raízes escoras - 11 fp, 19 fl; raízes - 9 fp, 20 fl; colmo - 12 fp, 16 fl; grãos - 8 fp, 5 fl.

II.3.7 Influência do CO₂ elevado sobre o teor de fenilpropanoides em órgãos de sorgo var. BRS 330 aos 90 e 120 DAP

A seguir, serão apresentados dados sobre fenilpropanoides cujas concentrações apresentaram diferenças significativas sob tratamento E aos 90 e 120 DAP.

Nas folhas, houve alteração da concentração de 6 dentre os 15 fenilpropanoides, na condição de CO₂ elevado, quatro deles aos 90 DAP e dois aos 120 DAP. Aos 90 DAP, as concentrações do derivado do ácido ferúlico 1 e os ácidos 5-*O*-cafeoilquínico e 4-*O*-cafeoilquínico aumentaram 4%, 53% e 21%, respectivamente, contrariamente o

valor do ácido 3-*O*-feruloilquínico reduziu 25%. Aos 120 DAP, houve redução na concentração dos derivados 3 e 7 do ácido ferúlico em 43% e 58%, respectivamente na condição de CO₂ elevado (Anexo A 9).

A seguir, são dadas informações sobre variações das concentrações nos demais órgãos e as substâncias envolvidas na condição de CO₂ elevado. As alterações referem-se a 90 DAP: pedúnculo: redução de 21% em média – de 4 derivados de ácido ferúlico (Anexo A 10); colmo: elevação de 12% – ácido 3-*O*-feruloilquínico (Anexo A 11); raízes escoras: redução de 5% – ácido 3-*O*-cafeoilquínico (Anexo A 12); raízes: elevação de 18% em média – de 3 derivados de ácido ferúlico (Anexo A 13).

Nos grãos, as concentrações de quatro fenilpropanoides foram alteradas significativamente aos 90 DAP. A concentração do derivado do ácido ferúlico 1 reduziu 8% e o ácido 4-*O*-feruloilquínico, derivado do ácido cafeico 4 e o ácido ferúlico aumentaram 28%, 46% e 13%, respectivamente (Anexo A 14).

Os padrões de acúmulo dos fenilpropanoides com déficit hídrico nas condições **A** e **E** são apresentados para cada órgão na Figura II 14 por meio de gráficos heat maps. Após normalização e padronização, os valores das abundâncias relativas dos fenilpropanoides são mostrados em gradiente de colorações de intensidade azul e vermelho, passando pelo branco, que indica a média das concentrações; o azul refere-se a valores abaixo da média e o vermelho, acima da média.

Figura II 14. Representação por heat maps da abundância relativa de fenilpropanoides em órgãos de plantas de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) variedade BRS 330, cultivadas em câmaras de topo aberto, aos 90 e 120 dias após o plantio (DAP). A: CO₂ ambiente; E: CO₂ elevado.

II.3.8 Variações na distribuição de flavonoides sob CO₂ ambiente e elevado aos 90 e 120 DAP

São mencionados abaixo os órgãos e a proporção de flavonoides, cujas concentrações variaram aos 90 ou 120 DAP. É dada informação sobre aumento ou redução na concentração, taxa de variação e a caracterização dos flavonoides envolvidos.

Folhas: 15 entre 35 flavonoides detectados; 90 DAP; menor incremento: 17% (derivado da tricina 1); maior incremento: 198% (luteolina-*O*-hex-ram) (Anexo A 9);

Pedúnculo: 4 entre os 21 flavonoides detectados; 90 DAP; redução significativa, 38% em média; apigenina-*C*-hexosídeo-*C*-pentosídeo 2 (mostrado no Anexo 16), tricina-*O*-hexosídeo-*O*-hexosídeo 1, tricina-*O*-hexosídeo-*O*-hexosídeo 2 e tricina-*O*-guaiacilgliceril 1 (Anexo A 10);

Colmo: 3 entre 16 flavonoides detectados; 90 DAP; redução significativa, 22%-28%; apigenina-*C*-hexosídeo-*C*-pentosídeo 3, tricina-*O*-hexosídeo-*O*-hexosídeo 1 e apigenina-*C*-hexosídeo-*C*-pentosídeo 5 (Anexo A 11).

Raízes escoras: 4 entre 19 flavonoides detectados; 90 DAP: apigenina-*O*-hexosídeo-*O*-hexosídeo 1 – aumento de 102%; 120 DAP: a luteolina-*C*-hexosídeo-*C*-pentosídeo, apigenina-*C*-hexosídeo-*C*-pentosídeo 3 e apigenina-*O*-hexosídeo 1, aumentos de 67%, 196% e 174%, respectivamente (Anexo A 12).

Raízes: 5 entre 20 flavonoides detectados; 90 DAP; apigenina-*C*-hexosídeo-*C*-pentosídeo 5 – aumento de 35%; 120 DAP: derivado de tricina-*O*-hexosídeo, apigenina-*O*-hexosídeo 3, tricina-*O*-hexosídeo 3 e pinocembrina-*O*-hexosídeo, aumentos de 72%, 110%, 57% e 76%, respectivamente (Anexo A 13).

Grãos: 1 entre 5 flavonoides detectados; 90 DAP; aumento de 51%; tricina-*O*-hexosídeo 1 (Anexo A 14).

A distribuição de flavonoides nos diversos órgãos, nas condições **A** e **E**, é apresentada na Figura II 15 por meio de gráficos de heat maps.

Figura II 15. Representação por heat maps da abundância relativa de flavonoides em órgãos de plantas de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) variedade BRS 330, cultivadas em câmaras de topo aberto, aos 90 e 120 dias após o plantio (DAP). A: CO₂ ambiente; E: CO₂ elevado.

II.3.9 Análise de Componentes Principais (PCA) de substâncias fenólicas sob influência de CO₂ ambiente e elevado aos 90 e 120 DAP

Com base na distribuição e quantificação das 72 substâncias fenólicas caracterizadas em folhas, pedúnculo, colmo, raízes escoras, raízes e grãos, foi obtido o correspondente gráfico de PCA (Figura II 16). A soma de PC1 e PC2 explica 66,7% da variação implícita na matriz original. Os centroides observados no gráfico revelam a nítida separação das folhas dos demais órgãos, ao longo do eixo correspondente ao primeiro componente principal. Esse eixo não provê distinções de nenhuma outra natureza, quer referente a órgãos ou tratamentos. Relativamente ao segundo componente principal, colmo e pedúnculo situam-se próximos entre si num quadrante do gráfico. Em outro quadrante, em situação de grande proximidade e até sobreposição, situam-se os centroides correspondentes a raízes escoras e raízes. Os grãos situam-se no mesmo quadrante, próximos de raízes e raízes escoras, mas sem sobreposição. Diferenças de resultados entre tratamentos **A** e **E** não são claras no gráfico, observando-se várias sobreposições correspondentes a um e outro tratamento.

Figura II 16. Análise de componentes principais (PCA) de substâncias fenólicas caracterizadas por CLAE-UV-ESI-MS-MS e quantificadas por CLAE-DAD em órgãos de plantas de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) variedade BRS 330, cultivadas em câmaras de topo aberto sob CO₂ ambiente (símbolos vazios) e CO₂ elevado (símbolos cheios) aos 90 dias após o plantio (DAP) (quadrados) e 120 dias após o plantio (DAP) (círculos). Valores de porcentagem entre parênteses mostram a proporção da variância explicada para cada eixo (X = PC1, Y = PC2).

II.4 DISCUSSÃO

II.4.1 Desenvolvimento das plantas e substâncias fenólicas

O déficit hídrico no cultivo de plantas tem provocado alterações no crescimento e desenvolvimento vegetativo. Dependendo da duração, intensidade e estágio de desenvolvimento durante o qual a planta é afetada pelo déficit, a qualidade nutricional

do alimento pode ser comprometida. Segundo Assefa et al., (2010) a demanda hídrica do sorgo aumenta até a fase imediatamente após a antese (~ 60 DAP), diminuindo gradualmente durante o enchimento do grão até o estágio de senescência foliar.

De acordo com Wu et al., (2017), condições de déficit hídrico têm resultado em incremento de substâncias fenólicas no sorgo. Nesse trabalho, o déficit hídrico moderado (50% em relação ao controle) estimulou maior incremento de conteúdo total de flavonoides e fenilpropanoides que o déficit hídrico severo (25%). Em ambas condições, o diâmetro e a biomassa do grão foram comprometidas.

Com a redução da quantidade de água aplicada a partir dos 60 DAP, as plantas em nosso experimento foram submetidas à condição de déficit hídrico severo. A Figura II 4d mostra a redução da umidade do solo, tanto na condição **A** quanto na **E**, porém com o tratamento **E** houve menor perda d'água. Esses resultados corroboram evidências experimentais observadas tanto no sorgo (Conley et al., 2001) como no milho (Leakey et al., 2006), trigo (Varga et al., 2017) e arroz (Wang et al., 2017). Resultados obtidos com essas plantas mostraram que sob CO₂ elevado houve redução na condutância estomática induzida por um fechamento estomático parcial, que possibilitou que as plantas minimizassem a evapotranspiração e perda d'água, promovendo a economia hídrica do solo, especialmente durante o estágio reprodutivo, época em que a planta demanda maior consumo de água devido ao florescimento e subsequente formação e enchimento do grão.

II.4.2 Efeito do CO₂ sobre o conteúdo de substâncias fenólicas

Em nosso estudo, as concentrações de substâncias fenólicas totais das folhas e grãos elevaram-se significativamente aos 90 DAP sob **E** associado ao déficit hídrico, corroborando que o incremento de CO₂ pode favorecer a síntese de substâncias fenólicas no processo de adaptação das plantas no início do desenvolvimento dos grãos (90 DAP) (Khlestkina, 2013). O incremento do CO₂ aumenta a atividade fotossintética das folhas adultas e acelera a degradação de amido, ambos processos convergem para a formação de açúcares solúveis, que são mobilizados para órgãos de maior demanda energética, como os grãos. Em plantas de sorgo sob CO₂ elevado e severo déficit hídrico De Souza et al., (2015) não detectaram amido em folhas e observaram redução de sua concentração nos grãos aos 90 DAP. Nesse mesmo trabalho, foi observado

aumento significativo do teor de proteínas, açúcares solúveis e redução do teor de lipídeos. Associando essas informações com os resultados referentes ao incremento de substâncias fenólicas do presente estudo (Figura II 5, Anexo A 6), sugere-se que em plantas de sorgo aos 90 DAP parte dos recursos energéticos e de carbono são mobilizados para a síntese de metabólitos secundários.

Por outro lado, as variações nos perfis de substâncias fenólicas de folhas e grãos não mostraram a mesma tendência com o tratamento **E**. Assim, enquanto as folhas mostraram incremento do conteúdo de fenilpropanoides e flavonoides, os grãos mostraram incremento unicamente do conteúdo de flavonoides (Figuras II 7 e Figuras II 8), indicando distintas respostas de órgãos do sorgo à combinação de **E** e déficit hídrico aos 90 DAP.

Na fase de grãos maduros (120 DAP), as substâncias fenólicas totais de folhas e grãos foram reduzidas com o tratamento **E** (embora não significativamente), sugerindo maior sensibilidade da planta de sorgo ao déficit hídrico severo no estágio maduro. Altas taxas de transpiração podem comprometer a biossíntese de blocos construtores de metabólitos secundários (Tari et al., 2013), o que possibilitaria a remobilização de carbono para a formação de metabólitos envolvidos com o crescimento (Peñuelas & Estiarte, 1998). Como mencionado acima, um incremento na quantidade de proteínas (próximo de 60%) foi verificado por De Souza et al., (2015). Contudo, o acúmulo de flavonoides nas folhas aumentou durante o desenvolvimento do grão (de 90 para 120 DAP) na condição **A** (Figura II 8), mostrando o incremento do acúmulo de flavonoides mesmo em condições de déficit hídrico severo. Resultados semelhantes foram observados em folhas de trigo (Ma et al., 2014) e arroz (Chen et al., 2013).

Além das folhas e grãos, as raízes escoras mostraram alterações dos fenilpropanoides e flavonoides sob CO₂ elevado. Aos 90 DAP, o conteúdo de fenilpropanoides nas raízes escoras diminuiu significativamente sob CO₂ elevado (6%) (Figura II 7). Porém, esse resultado diverge do incremento significativo que foi observado no teor de açúcares e biomassa seca das raízes escoras aos 90 DAP (De Souza et al., 2015). Consequentemente, aos 120 DAP, o teor de flavonoides nas raízes escoras incrementou significativamente 61% na condição **E**. Poucos estudos bioquímicos têm revelado o padrão de resposta ao incremento do CO₂ de raízes escoras

em gramíneas, limitando-se essencialmente ao conhecimento da capacidade mecânica de ancorar a planta ao solo (Ennos et al., 1993).

II.4.3 Efeito do CO₂ sobre os taninos

Excetuando-se os grãos, pouco se sabe sobre os teores de taninos de outros órgãos de plantas do sorgo. De acordo com Lindroth (2012), sob condições de CO₂ elevado o conteúdo de taninos pode aumentar, diminuir ou não ser alterado nas plantas. No presente estudo, observou-se que o conteúdo de taninos nas folhas, pedúnculo e raízes praticamente não se alterou com o tratamento **E** aos 90 DAP e 120 DAP. Nas raízes escoras, o conteúdo de taninos foi reduzido em comparação aos outros órgãos (ambas condições **A** e **E**), tanto aos 90 DAP como aos 120 DAP (Figura II 9).

A propriedade dos taninos de formar ligações estáveis com proteínas, carboidratos e outros nutrientes reduz o valor nutricional e o torna menos palatável, com sabor amargo e adstringente. O benefício que os taninos proporcionam por ter atividade antioxidante (Kaufman et al., 2013) não compensa o prejuízo imposto ao valor nutricional e palatabilidade. Por essa razão, grande parte dos estudos sobre taninos em plantas de sorgo tem se concentrado na determinação do teor dessas substâncias nos grãos. Entretanto, altas temperaturas (38/21 °C) podem reduzir o teor de taninos nos grãos de sorgo Wu et al., (2016b).

No presente estudo, os níveis de taninos totais estão de acordo com estudos prévios realizados com sete cultivares americanas de sorgo, que foram cultivadas em condições de campo (Kaufman et al., 2013). Entretanto, nas variedades brasileiras estudos realizados por Moraes et al., (2012) têm reportado ampla faixa de variação de taninos condensados nas variedades de sorgo granífero BRS 305, BRS 309 e BRS 310, com valores menores a 1% para variedades classificadas como sem taninos. O catálogo da EMBRAPA Milho e Sorgo classificou à variedade BRS 330 como variedade sem taninos nos grãos, porém não está disponibilizado o método usado para quantificação. Segundo, Makkar et al., 1989 a quantificação de taninos poderiam resultar em valores divergentes segundo o método aplicado. Assim, é possível que não tenha sido feita a análise de taninos nos grãos aplicado na presente tese (método de precipitação de proteínas com albumina do soro bovino). Alternativamente, pode-se especular que o seu teor de taninos seja normalmente muito baixo ou nulo, e os valores observados em

nossas análises seriam o resultado de indução pela condição de déficit hídrico severo. Entretanto, o tratamento **E** associado ao déficit hídrico gerou redução significativa na quantidade de taninos dos grãos (3%) aos 120 DAP (Figura II 9). Esse resultado representa um benefício no que se refere ao valor nutritivo do sorgo variedade BRS 330 que independentemente do método usado para quantificação do conteúdo de taninos a diferença significativa estará representada.

II.4.4 Caracterização e perfil de fenilpropanoides e flavonoides

Fatores intrínsecos às espécies, como ontogenia e fenologia, induzem variações qualitativas e quantitativas nos diferentes órgãos e estádios de desenvolvimento vegetal (Bohm, 1987). No presente estudo, o acúmulo de fenilpropanoides e flavonoides foram diferentes aos 90 DAP e aos 120 DAP. Enquanto a distribuição de fenilpropanoides mostrou-se mais homogênea, o perfil de flavonoides mostrou-se mais característico quanto ao órgão e estágio de desenvolvimento da planta. Dois fenilpropanoides (o ácido 4-*O*-feruloilquínico e o derivado de ácido ferúlico 14) foram observados em todos os órgãos; contudo, o ácido 4-*O*-feruloilquínico mostrou maior abundância no pedúnculo, colmo, raízes escoras e raízes (média superior a 300 ng/mg, base seca) (Anexo A 10 – A 13). Quanto aos grãos, os teores baixos de ácido ferúlico livre e seus derivados foram semelhantes ao observado em variedades do oeste da Austrália (Wu et al., 2017), e foram incrementados com o tratamento **E** (Anexo A 14). Quanto aos flavonoides, o padrão de distribuição e acúmulo variou em todos os órgãos e nos dois estádios avaliados, em coerência ao que se admite sobre a variação na distribuição intraespecífica de flavonoides (Bohm, 1987).

Os resultados do presente trabalho revelaram preponderância de flavonas (Figura II 12), em conformidade com análises anteriores de plantas de sorgo (Dykes & Rooney, 2007; Wu et al., 2016a), trigo (Cavaliere et al., 2005), cevada (Ferrerres et al., 2008) e arroz (Chen et al., 2013). Os resultados deste estudo também estão de acordo os mencionados artigos, no que se refere à menor diversidade de flavanonas em cereais. No entanto, a distribuição de flavonoides apresentada na Figura II 12 não revela a ocorrência na variedade BRS 330 de glicosídeos de flavonóis, como ocorrem em órgãos de plantas de arroz (Dong et al., 2014). No entanto, e concordância com outros estudos sobre arroz (Dong et al., 2014; Yang et al., 2014; Hu et al., 2016), os nossos resultados

mostram que flavonas derivadas de tricina constituem os flavonoides predominantes em folhas, pedúnculo e colmo do sorgo variedade BRS 330 (Figura II 12). Esses resultados diferem da distribuição de flavonoides em folhas e caules de trigo, nos quais predominam C-glicosil-flavonas (Zhu & Sang, 2017). No presente estudo, verificou-se que a predominância é de O-glicosil-flavonas.

Nos trabalhos de Chen et al., (2013) e Goufo et al., (2014), flavonas derivadas de apigenina e tricina responderam significativamente ao déficit hídrico severo e CO₂ elevado. Porém, Goufo et al., (2014) reportaram, maior alteração de flavonas derivadas de apigenina que as derivadas de tricina, como também se observaram no presente estudo (Figura II 15 A). Respostas de incremento de diversas substâncias fenólicas foram também observadas em análises de folhas de trigo sob déficit hídrico (Ma et al., 2014). Coerentemente a esses resultados, esses autores observaram aumento no nível de expressão genica das enzimas chalcona sintase e chalcona isomerase, ambas desempenhando papel chave nas primeiras etapas da biossíntese de flavonoides.

Os heat maps de fenilpropanoides e flavonoides (Figura II 14 e Figura II 15) resumizam as variações particulares dos conteúdos de cada substância fenólica nos dois estádios de desenvolvimento do grão (90 e 120 DAP) sob os tratamentos A e E. O processo de normalização e centralização ordenaram divergentemente as substâncias fenólicas, de modo que substâncias fenólicas com valores mais baixos que a média são caracterizadas em escala de gradiente azul e substâncias fenólicas com valores mais altos, em escala de gradiente vermelho; substâncias com teores próximos à média geral, presente na planta toda, apresentam-se em tonalidades alvas. Além disso, a hierarquização produziu agrupamentos de substâncias fenólicas com valores próximos.

No heat map de fenilpropanoides correspondente a folhas (Figura II 14 A), observa-se a formação de dois grupos, o primeiro deles contendo ácidos clorogênicos. O ácido clorogênico foi reportado nos grãos de sorgo (Wu et al., 2017) e nas folhas de arroz (Yang et al., 2014). Segundo Bettaieb et al., (2011), o incremento da quantidade dessa substância se relaciona a vários sistemas de regulação metabólica em plantas submetidas a condições de estresse. Por exemplo, em plantas de *Salvia officinalis* o conteúdo de ácido clorogênico pode até triplicar quando a irrigação é reduzida em 75%. No pedúnculo, os ácidos clorogênicos encontram-se em menor concentração, havendo predominância de derivados de ácido ferúlico, que têm sua concentração elevada com a

maturação e CO₂ elevado (Figura II 14 B). Já, no colmo e nas raízes escoras, o ácido 4-*O*-feruloilquínico foi separado das outras substâncias destacando-se como o ácido clorogênico majoritário para ambos órgãos (Figuras II 14 C e 14 D, respectivamente), mas sem influência do tratamento **E** (Anexo A 11 e Anexo A 12, respectivamente). Nas raízes, a concentração do ácido 4-*O*-feruloilquínico foi reduzida e não teve influência da concentração de CO₂. Nesses órgãos, foram os derivados de ácido ferúlico que se destacaram pela elevada concentração (Figura II 14 E). Alguns derivados de ácido ferúlico, como o derivado 14, foi influenciado pelo tratamento **E**.

Entre os flavonoides, as flavonas derivadas de apigenina e tricina foram majoritárias nas folhas. Um pequeno grupo formado por derivados de tricina-*O*-guaiacilgliceril foram agrupados pelos baixos teores nas folhas (Figura II 15 A). Ao contrário, essas mesmas substâncias foram majoritárias no pedúnculo, com maior concentração aos 120 DAP (Figura II 15 B). De acordo com Chen et al., (2013) e Goufo et al., (2014), as concentrações de derivados de apigenina e tricina foram afetadas significativamente pelo déficit hídrico severo e CO₂ elevado nas folhas e nos grãos de arroz, observando-se maior efeito sobre os derivados de apigenina (Goufo et al., 2014). No presente estudo, observou-se que tanto flavonas derivadas de apigenina quanto de tricina são afetadas significativamente pela condição de CO₂ elevado nas folhas de sorgo variedade BRS 330 (Figura II 15 B, Anexo A 9). Respostas semelhantes de incremento de diversas substâncias fenólicas foram encontradas em folhas de trigo sob déficit hídrico (Ma et al., 2014). No colmo, *C*-glicosídeos de apigenina, *O*-glicosídeos de tricina e *O*-guaiacilglicerídeos de tricina foram frequentes, embora em baixa concentração (Figura II 15 C). Algumas substâncias foram afetadas pelo tratamento **E** (por exemplo, tricina-*O*-diglicosídeo; Figura II 15 C, Anexo A 11). As raízes escoras e raízes apresentaram baixo teor de flavonoides, o que é comum em órgãos não clorofilados. Os dois órgãos compartilham exclusivamente um *O*-glicosídeo da flavanona pinocembrina (Figuras II 15 D e 15 E), que é um dos flavonoides predominantes nas raízes e teve sua concentração elevada pelo tratamento **E** (Figura II 15 E, Anexo A 13). Nos grãos, chama a atenção a ocorrência de glicosídeos de eriodictiol, uma flavanona (Anexo A 14). Nesses órgãos ocorrem também *O*-glicosídeos de apigenina e tricina. É nítida a queda na concentração de flavonoides, comparando o estádio 90 DAP com 120 DAP. Nos grãos imaturos, observou-se efeito estimulante no incremento de flavonoides pelo tratamento **E** (Figura II 15 F).

II.4.5 Análises multivariadas

As análises de agrupamento e PCA (Figuras II 10 e II 16, respectivamente) revelaram relações de afinidade semelhantes entre os perfis químicos de órgãos das plantas de sorgo variedade BRS 330. Nas duas análises, as folhas caracterizaram-se como o órgão que mais se distingue entre todos os materiais analisados (Figura II 10 e II 16). Apesar de a análise por agrupamento ter sido feita com base na distribuição de 132 substâncias, muitas delas não caracterizadas, a lista de substâncias parcialmente caracterizadas da Tabela 1 é útil para explicar os agrupamentos observados na Figura II 10. Por apresentar a maior diversidade de substâncias fenólicas, a lista que se segue corresponde a substâncias exclusivas de folhas: substâncias **4, 7, 8, 23, 31, 33, 36, 38-40, 42, 44, 47, 48, 51, 54 e 59** (Tabela 1). Isso explica o destaque das folhas no dendrograma obtido. Os grãos constituem outro órgão à parte na análise de agrupamento (Figura II 10). A razão da distinção dos grãos reside, em parte, na exclusividade da ocorrência de derivados de eriodictiol (substâncias **27 e 30**), além do derivado de ácido cafeico 3 (substância **10**) e da substância **35** (glicosídeo de tricina). A proximidade entre colmo e pedúnculo é em parte devida à exclusividade nesses dois órgãos das substâncias **50, 56, 60 e 67** (todos fenilpropanoides). As raízes e as raízes escoras compartilham com exclusividade o derivado de pinocembrina (flavanona, substância **45**) e o derivado do ácido ferúlico 10 (substância **66**, Tabela 1).

Embora composta com dados de um número menor de substâncias e levando em conta os distintos tratamentos **A** e **E**, a matriz para a análise por PCA gerou um gráfico (Figura II 16) que, em essência, se assemelha às afinidades apontadas pela análise por agrupamento (Figuras II 10). As folhas são os órgãos que mais se destacam dos demais, pedúnculo e colmo estão próximos no mesmo quadrante, enquanto raízes e raízes escoras são praticamente indistinguíveis. A análise por PCA não revelou alterações facilmente detectáveis no gráfico, relativas a perfis de substâncias fenólicas de órgãos aos 90 DAP em comparação com 120 DAP, nem diferenças referentes aos tratamentos **A** e **E**.

II.4.6 Efeito do CO₂ sobre as substâncias fenólicas dos grãos de sorgo variedade BRS 330

Entre os flavonoides dos grãos de sorgo, as flavanonas se destacam. As que predominam no sorgo são glicosídeos de eriodictiol e naringenina (Yasumatsu et al., 1965; Kambal & Bate-Smith, 1976; Gujer et al., 1986). Há variedades de sorgo que acumulam nos grãos flavanonas baseadas em luteolina (luteolidina e eriodictiol), enquanto outras acumulam substâncias do grupo da apigenina (apigenidina e naringenina) (Awika, 2017). Certas variedades de sorgo podem conter elevadas concentrações de flavanonas. Por exemplo, verificou-se que uma variedade de sorgo vermelho contém 11,8 mg/g (base seca), de naringenina (Yang et al., 2012).

Eriodictiol é uma flavanona com reconhecidas propriedades e atividades biológicas. Muito se tem pesquisado sobre o significado funcional do eriodictiol e outras flavanonas em alimentos, principalmente no que se refere aos frutos de *Citrus* (Khan et al., 2014). Os benefícios que se têm sugerido como derivados do consumo de alimentos contendo eriodictiol e outras flavanonas incluem prevenção do câncer e de doenças cardiovasculares (Barreca et al., 2017).

No presente trabalho, constatou-se que os grãos imaturos de sorgo da variedade BRS 330, cultivadas sob déficit hídrico, contêm predominantemente *O*-glicosídeos de eriodictiol, ao lado de *O*-glicosídeos de apigenina e tricina (Figura II 15 E). Não foram detectados *C*-glicosídeos. Do ponto de vista nutricional, *O*-glicosídeos de flavonas são absorvidos mais facilmente que *C*-glicosídeos. Em contrapartida, os *C*-glicosídeos são mais estáveis em processamentos de fermentação e pasteurização (Hostetler et al., 2017). Desse modo, dependendo do uso que se vá fazer do cereal, há vantagens de um tipo de flavonoide sobre o outro: para o consumo *in natura*, os *O*-glicosídeos são mais benéficos; nos produtos derivados da indústria alimentícia, os *C*-glicosídeos levam vantagem.

Nas condições de déficit hídrico em que se realizaram os experimentos de cultivo das plantas, o teor de flavonoides nos grãos de sorgo variedade BRS 330 é relativamente baixo, comparando-se com estudos feitos com outras variedades. Em grãos imaturos e sob tratamento **A**, o teor é próximo de 0,4 µg/g e se eleva significativamente a 0,5 µg/g com o tratamento **E** (Figura II 8) em resposta ao microambiente com maior conteúdo de CO₂.

Os teores de fenilpropanoides dos grãos de sorgo são em geral um pouco superiores aos de flavonoides, mas sempre inferiores a 0,5 µg/mg. Componentes majoritários são ácidos clorogênicos, tanto baseados em ácido cafeico quanto em ácido ferúlico. As atividades biológicas de ácidos clorogênicos têm sido muito investigadas, principalmente em relação ao fato de essas substâncias serem os principais componentes fenólicos do café. Tem-se verificado que, ao lado das propriedades antioxidantes, o ácido clorogênico exerce efeitos antidiabético, anticarcinogênico, antiinflamatório e antiobesidade, sendo encarado como um recurso não farmacológico e não invasivo para prevenção de algumas doenças crônicas (Tajik et al., 2017).

O sorgo é reconhecidamente uma fonte de outras categorias de substâncias fenólicas, entre elas 3-desoxiantocianidinas e taninos. Altos teores de 3-desoxiantocianidinas no pericarpo são responsáveis pela coloração dos grãos mais escuros de variedades de sorgo. Os taninos são potencialmente benéficos por sua ação antioxidante e interação com a flora intestinal (Cardoso et al., 2017). Por outro lado, os taninos reduzem a digestibilidade de proteínas e o aproveitamento geral de calorias do alimento. De acordo com o teor de taninos nos grãos, as cultivares de sorgo são classificadas como: baixo-tanino (low-tannin sorghum, LTS; taninos < 0,16 %); médio-tanino (MTS; 0,67 % < taninos < 0,98 %); alto-tanino (1,11 % < taninos < 1,51 %). Em ração animal, a energia metabolizável e energia digerível podem ser reduzidas em até 200 kcal/kg com a elevação da proporção de taninos em 1 % nos grãos de sorgo (Pan et al., 2016). As variedades de sorgo cultivadas nos EUA produzem grãos praticamente isentos de taninos (Wu et al., 2012). O teor de taninos observado nos grãos da variedade BRS 330 (24 – 27 µg/mg; 2,4 – 2,7 %; Figura II 9) posiciona essa variedade na categoria alto-tanino. Se, de um lado, o alto teor de taninos nos grãos propicia maior resistência a doenças, por outro lado essa característica limita o aproveitamento proteico e energético dos nutrientes do grão. O alto CO₂ reduz significativamente o teor de taninos (Figura II 9), propiciando melhoria no que se refere ao valor nutricional do alimento. Foi verificado que a síntese de taninos em sorgo é condicionada por distintos alelos naturais do gene *TanI*. Provavelmente a seleção de variedades baixo-tanino envolve a eliminação de genótipos com genes *Tan* em condição ativa (Wu et al., 2012).

II.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, C. B., Erickson, J. E. (2017). Yield enhancement by short-term imposition of severe water deficit in the vegetative growth stage of grain sorghum. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 203, 309-314.
- Amelework, B., Shimelis, H., Tongoona, P., Laing, M. (2015). Physiological mechanisms of drought tolerance in sorghum, genetic basis and breeding methods: a review. *African Journal of Agricultural Research*, 10, 3029-3040.
- Assefa, Y., Staggenborg, S. A., Prasad, V. P. (2010). Grain sorghum water requirement and responses to drought stress: A review. *Crop Management*, 9,
- Awika, J. M. (2017). Sorghum: its unique nutritional and health-promoting attributes. In John R. N. Taylor, and Joseph M. Awika (eds). *Gluten-free ancient grains. Cereals, pseudocereals, and legumes: sustainable, nutritious, and health-promoting foods for the 21st century* Woodhead Publ. Series in Food Science, Technology and Nutrition, Elsevier, Cambridge, pp. 21-54.
- Barreca, D., Gattuso, G., Bellocco, E., Calderaro, A., Trombetta, D., Semriglio, A., Lagana, G., Daglia, M., Meneghini, S., Nabavi, S. (2017). Flavanones: citrus phytochemicals with health-promoting properties. *Biofactors*, 43, 495-506.
- Bartwal, A., Mall, R., Lohani, P., Guru, S. K., Arora, S. (2013). Role of secondary metabolites and brassinosteroids in plant defense against environmental stresses. *Journal of plant growth regulation*, 32, 216-232.
- Bettaieb, I., Hamrouni-Sellami, I., Bourgou, S., Limam, F., Marzouk, B. (2011). Drought effects on polyphenol composition and antioxidant activities in aerial parts of *Salvia officinalis* L. *Acta Physiol Plant*, 33, 1103-1111.
- Bohm, B. A. (1987). Intraspecific flavonoid variation. *The Botanical Review*, 53, 197-279.
- Brazier-Hicks, M., Evans, K. M., Gershater, M. C., Puschmann, H., Steel, P. G., Edwards, R. (2009). The C-glycosylation of flavonoids in cereals. *Journal of Biological Chemistry*, 284, 17926-17934.
- Buchanan, B. B., Gruissem, W., Jones, R. L. (2015). *Biochemistry & Molecular Biology of Plants* (2nd ed.). USA: Wiley-Blackwell.
- Cardoso, L. D., Pinheiro, S. S., Martino, H. S., Pinheiro-Sant'Ana, H. M. (2017). Sorghum (*Sorghum bicolor* L.): nutrients, bioactive compounds, and potential impact on human health. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, 57, 372-390.
- Cavaliere, C., Foglia, P., Pastorini, E., Samperi, R., Laganà, A. (2005). Identification and mass spectrometric characterization of glycosylated flavonoids in *Triticum*

- durum* plants by high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry*, 19, 3143-3158.
- Chen, W., Gong, L., Guo, Z., Wang, W., Zhang, H., Liu, X., Yu, S., Xiong, L., Luo, J. (2013). A novel integrated method for large-scale detection, identification, and quantification of widely targeted metabolites: application in the study of rice metabolomics. *Molecular plant*, 6, 1769-1780.
- Cheyrier, V., Comte, G., Davies, K. M., Lattanzio, V., Martens, S. (2013). Plant phenolics: recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. *Plant Physiology and Biochemistry*, 72, 1-20.
- Conley, M. M., Kimball, B. A., Brooks, T. J., Pinter, P. J., Hunsaker, D. J., Wall, G. W., Adam, N. R., LaMorte, R. L., Matthias, A. D., Thompson, T. L., Leavitt, S. W., Ottman, M. J., Cousins, A. B., Triggs, J. M. (2001). CO₂ enrichment increases water-use efficiency in sorghum. *New Phytologist*, 151, 407-412.
- De Souza, A. P., Cocuron, J. C., Garcia, A. C., Alonso, A. P., Buckeridge, M. S. (2015). Changes in whole-plant metabolism during grain-filling stage in *Sorghum Bicolor* L.(Moench) grown under elevated CO₂ and drought. *Plant physiology*, 169, 1755-1765.
- Dong, X., Chen, W., Wang, W., Zhang, H., Liu, X., Luo, J. (2014). Comprehensive profiling and natural variation of flavonoids in rice. *Journal of integrative plant biology*, 56, 876-886.
- Duarte-Almeida, J. M., Negri, G., Salatino, A., de Carvalho, J. E., Lajolo, F. M. (2007). Antiproliferative and antioxidant activities of a triclin acylated glycoside from sugarcane (*Saccharum officinarum*) juice. *Phytochemistry*, 68, 1165-1171.
- Dykes, L., Rooney, L. W. (2007). Phenolic compounds in cereal grains and their health benefits. *Cereal foods world*, 52, 105-111.
- Ennos, A. R., Crook, M. J., Grimshaw, C. (1993). The anchorage mechanics of maize *Zea mays*. *Journal of Experimental Botany*, 44, 147-153.
- Epstein, E. (1972). *Mineral Nutrition of Plants: Principles and perspectives*. New York: John Wiley & Sons.
- Eudes, A., Dutta, T., Deng, K., Jacquet, N., Sinha, A., Benites, V. T., Baidoo, E. E. K., Richel, A., Satter, S. E., Northen, T. R., Singh, S., Simmons, B. A., Loqué, D. (2017). SbCOMT (Bmr12) is involved in the biosynthesis of triclin-lignin in sorghum. *PloS one*, 12, e0178160.
- FAOSTAT. (2017). Obtenido de <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC/visualize>
- Ferreres, F., Andrade, P. B., Valentao, P., Gil-Izquierdo, A. (2008). Further knowledge on barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves *O*-glycosyl-*C*-glycosyl flavones by

- liquid chromatography-UV diode-array detection-electrospray ionisation mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1182, 56-64.
- Ferreira, M. L., Rius, S. P., Casati, P. (2012). Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. *Frontiers in plant science*, 3, 1-15.
- Gani, A., Wani, S. M., Masoodi, F. A., Hameed, G. (2012). Whole-grain cereal bioactive compounds and their health benefits: a review. *Journal of Food Processing & Technology*, 3, 146-156.
- Goufo, P., Pereira, J., Figueiredo, N., Oliveira, M. B., Carranca, C., Rosa, E. A., Trindade, H. (2014). Effect of elevated carbon dioxide (CO₂) on phenolic acids, flavonoids, tocopherols, tocotrienols, γ -oryzanol and antioxidant capacities of rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Cereal Science*, 59, 15-24.
- Gujer, R., Magnolato, D., Self, R. (1986). Glucosylated flavonoids and other phenolic compounds from sorghum. *Phytochemistry*, 25, 1431-1436.
- Hagerman, A. E., Butler, L. G. (1978). Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 26, 809-812.
- Hammer, Ø., Harper, D. A. T., Ryan, P. D. (2001). PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*, 4, 9.
- Harborne, J. B., Williams, C. A. (1976). Flavonoid patterns in leaves of the Gramineae. *Biochemical Systematics and Ecology*, 4, 267-280.
- Hostetler, G. L., Ralston, R. A., Schwartz, S. J. (2017). Flavones: food sources, bioavailability, metabolism, and bioactivity. *Advances in Nutrition: An International Review Journal*, 8, 423-435.
- Hu, C., Tohge, T., Chan, S. A., Song, Y., Rao, J., Cui, B., Lin, H., Wang, L., Fernie, A. R., Zhang, D., Shi, J. (2016). Identification of conserved and diverse metabolic shifts during rice grain development. *Scientific reports*, 6, 20942.
- Huang, H., Liu, Y., Meng, Q., Wei, S., Cui, H., Zhang, C. (2010). Flavonolignans and other phenolic compounds from *Sorghum halepense* (L.) Pers. *Biochemical Systematics and Ecology*, 38, 656-658.
- IPCC. (2014). *Intergovernmental Panel on Climate Change. Climate Change 2014: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of IPCC*. Obtenido de www.ipcc.ch/report/ar5/
- Kambal, A. E., Bate-Smith, E. C. (1976). A genetic and biochemical study on pericarp pigments in a cross between two cultivars of grain sorghum, *Sorghum bicolor*. *Heredity*, 37, 413-416.

- Kaufman, R. C., Herald, T. J., Bean, S. R., Wilson, J. D., Tuinstra, M. R. (2013). Variability in tannin content, chemistry and activity in a diverse group of tannin containing sorghum cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93, 1233-1241.
- Khan, M. K., Zill-E-Huma, D. O. (2014). A comprehensive review on flavanones, the major citrus polyphenols. *Journal of Food Composition and Analysis*, 33, 85-104.
- Khlestkina, E. K. (2013). The adaptive role of flavonoids: emphasis on cereals. *Cereal Research Communications*, 41, 185-198.
- Leakey, A. D., Uribeharrea, M., Ainsworth, E. A., Naidu, S. L., Rogers, A., Ort, D. R., Long, S. P. (2006). Photosynthesis, productivity, and yield of maize are not affected by open-air elevation of CO₂ concentration in the absence of drought. *Plant physiology*, 140, 779-790.
- Lindroth, R. L. (2012). Atmospheric change, plant secondary metabolites and ecological interactions. In G. R. Iason, M. Dicke and S. E. Hartley (eds). *The Ecology of Plant Secondary Metabolites: From Genes to Global Processes*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 120-153.
- Ma, D., Sun, D., Wang, C., Li, Y., Guo, T. (2014). Expression of flavonoid biosynthesis genes and accumulation of flavonoid in wheat leaves in response to drought stress. *Plant physiology and biochemistry*, 80, 60-66.
- Magalhães, P. C., Durães, F. O., Rodrigues, J. A. (2008). Cultivo do sorgo. *Sistema de Produção 2. EMBRAPA Milho e Sorgo*, 4 ed. Obtenido de www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/sorgo_4_ed/ecofisiologia.htm
- Makkar, H. P. S. (1989). Protein precipitation methods for quantification of tannins: A review. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 37, 1197-1202.
- Moraes, É. A., Natal, D. I., Queiroz, V. A., Schaffert, R. E., Cecon, P. R., de Paula, S. O., Benjamim, L. A., Ribeiro, S. M. R., Martino, H. S. D. (2012). Sorghum genotype may reduce low-grade inflammatory response and oxidative stress and maintains jejunal morphology of rats fed a hyperlipidic diet. *Food research international*, 49, 553-559.
- Oliveira, V. F., Silva, E. A., Carvalho, M. A. (2016). Elevated CO₂ atmosphere minimizes the effect of drought on the cerrado species *Chrysolaena obovata*. *Frontiers in plant science*, 7, 810.
- Ottman, M. J., Kimball, B. A., Pinter, P. J., Wall, G. W., Vanderlip, R. L., Leavitt, S. W., LaMorte, R. L., Matthias, A. D., Brooks, T. J. (2001). Elevated CO₂ increases sorghum biomass under drought conditions. *New Phytologist*, 150, 261-273.

- Pan, L., Li, P., Ma, X. K., Xu, Y. T., Tian, Q. Y., Liu, L., Li, D. F., Piao, X. S. (2016). Tannin is a key factor in the determination and prediction of energy content in sorghum grains fed to growing pigs. *Journal of Animal Science*, 94, 2879-2889.
- Peñuelas, J., Estiarte, M. (1998). Can elevated CO₂ affect secondary metabolism and ecosystem function?. *Trends in Ecology & Evolution*, 13, 20-24.
- Tajik, N., Tajik, M., Mack, I., Enck, P. (2017). The potential effects of chlorogenic acid, the main phenolic component in coffee, on health: a comprehensive review of the literature. *Europeana Journal of Nutrition*, 56, 2215-2244.
- Tari, I., Laskay, G., Takács, Z., Poór, P. (2013). Response of sorghum to abiotic stresses: a review. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 199, 264-274.
- Varga, B., Vida, G., Varga-László, E., Hoffmann, B., Veisz, O. (2017). Combined effect of drought stress and elevated atmospheric CO₂ concentration on the yield parameters and water use properties of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 203, 192-205.
- Veitch, N. C., Grayer, R. J. (2011). Flavonoids and their glycosides, including anthocyanins. *Natural Product Reports*, 28, 1626-1695.
- Verpoorte, R. (2000). Secondary Metabolism. En R. Verpoorte and A. W. Alfermann, *Metabolic Engineering of Plant Secondary Metabolism*. Kluwer Academic Publishers. Netherlands, pp. 1-29.
- Wang, Y., Xu, C., Zhang, B., Wu, M., Chen, G. (2017). Physiological and proteomic analysis of rice (*Oryza sativa* L.) in flag leaf during flowering stage and milk stage under drought stress. *Plant Growth Regulation*, 82, 201-218.
- Waterman, P., Mole, S. (1994). *Analysis of phenolic plant metabolites*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK.
- Watling, J. R., Press, M. C., Quick, W. P. (2000). Elevated CO₂ induces biochemical and ultrastructural changes in leaves of the C₄ cereal sorghum. *Plant Physiology*, 123, 1143-1152.
- Wu, G., Bennett, S. J., Bornman, J. F., Clarke, M. W., Fang, Z., Johnson, S. K. (2017). Phenolic profile and content of sorghum grains under different irrigation managements. *Food Research International*, 97, 347-355.
- Wu, G., Johnson, S. K., Bornman, J. F., Bennett, S. J., Clarke, M. W., Singh, V., Fang, Z. (2016a). Growth temperature and genotype both play important roles in sorghum grain phenolic composition. Scientific reports. *Scientific reports*, 21835.

- Wu, G.; Johnson, S. K.; Bornman, J. F.; Bennett, S. J.; Singh, V.; Simic, A.; Fang, Z. (2016b). Effects of genotype and growth temperature on the contents of tannin, phytate and in vitro iron availability of sorghum grains. *PloS one*, *11*, e0148712.
- Wu, Y., Li, X., Xiang, W., Zhu, C., Lin, Z., Wu, Y., Li, J., Pandravada, S., Ridder, D. D., Bai, G., Wang, M., Trick, H. N., Bean, S. R., Tuinstra, M. R., Tesso, T., Yu, J. (2012). Presence of tannins in sorghum grains is conditioned by different natural alleles of Tannin1. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, *109*, 10281-10286.
- Yang, L. Y., Allred, K. F., Geera, B., Allree, C. D., Awika, J. M. (2012). Sorghum phenolics demonstrate estrogenic action and induce apoptosis in nonmalignant colonocytes. *Nutrition and Cancer – An International Journal*, *64*, 419-427.
- Yang, Z., Nakabayashi, R., Okazaki, Y., Mori, T., Takamatsu, S., Kitanaka, S., Kikuchi, J., Saito, K. (2014). Toward better annotation in plant metabolomics: isolation and structure elucidation of 36 specialized metabolites from *Oryza sativa* (rice) by using MS/MS and NMR analyses. *Metabolomics*, *10*, 543-545.
- Yasumatsu, K., Nakayama, T. O., Chchester, C. O. (1965). Flavonoids of sorghum. *Journal of Food Science*, *30*, 663-667.
- Zhu, Y., Sang, S. (2017). Phytochemicals in whole grain wheat and their health-promoting effects. *Molecular Nutrition & Food Research*, *61*, 1600852.

III. CAPÍTULO 3

RESUMO

Os ácidos fenólicos insolúveis, em conjunto com os monômeros de lignina e polissacarídeos da parede celular, representam a barreira de proteção contra o ataque de patógenos e danos oxidativos. Estudos focando o incremento de CO₂ associado a outros fatores, como o déficit hídrico são necessários, pois aproximam às possíveis condições futuras. Nesse contexto, alterações nos componentes da parede celular podem aumentar a rigidez da planta, afetando diretamente a qualidade e biodisponibilidade dos alimentos.

O presente estudo pretende avaliar e determinar mudanças no perfil de substâncias fenólicas da parede celular de folhas, pedúnculo, colmo, raízes escoras, raízes e grãos da variedade ‘BRS’ 330 de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench), nos estádios de desenvolvimento imaturo (90 DAP) e maduro (120 DAP), de plantas submetidas às condições de déficit hídrico severo e elevado CO₂. Para esse objetivo, plantas de sorgo foram cultivadas em Câmaras de Topo Aberto (OTC’s) por 120 dias, sob condições de CO₂ ambiente (400 ppm) (tratamento A) e CO₂ elevado (800 ppm) (tratamento E). Após 60 dias, a irrigação foi reduzida a ~ 30 % em relação ao controle. Os ácidos fenólicos da parede celular foram removidos por hidrólise alcalina (NaOH 2 M). As ligninas processadas pelo método do brometo de acetila e monômeros de lignina obtidos pelo método alcalino com nitrobenzeno foram analisadas por espectrofotômetros e CLAE-UV-DAD, respectivamente.

Considerando a planta toda, observou-se que o ácido *p*-cumárico foi o ácido fenólico majoritário em órgãos de sustentação, como colmo e raízes escoras, mas minoritário nas folhas e grãos. O ácido ferúlico predominou sobre o ácido *p*-cumárico nos grãos no estágio maduro. Em 90 DAP, notou-se que E promoveu significativa elevação da quantidade dos ácidos *p*-cumárico e ferúlico nas folhas e grãos. Em 120 DAP, E promoveu redução da quantidade dos ácidos *p*-cumárico e ferúlico nas folhas. Nos grãos, houve redução significativa do conteúdo de ligninas aos 120 DAP, sob E. No colmo, observou-se também redução significativa nos teores dos monômeros H (*p*-hidroxifenila), G (guaiacila) e S (siringila). Os resultados sugerem efeito positivo do CO₂ elevado, revertendo efeitos de alterações provocados pelo déficit hídrico severo no metabolismo de substâncias fenólicas ligadas à parede celular.

III.1 INTRODUÇÃO

O consumo direto de cereais provê a maior parte de macro e micronutrientes na nutrição humana. A indústria de alimentos processa diversos produtos provenientes dos cereais e gera uma enorme diversidade de produtos consumidos por humanos e animais domésticos (Xu et al., 2005). Substâncias bioativas presentes nos alimentos, conhecidas também como “funcionais”, têm sido valorizadas nos últimos tempos. Muitas dessas substâncias encontram-se nos cereais e são de natureza fenólica. Estudos epidemiológicos têm revelado uma relação inversa entre a ingestão regular de cereais e a elevação de riscos de doenças crônicas degenerativas (Naczki & Shahidi, 2006).

Entre as substâncias bioativas, os ácidos fenólicos destacam-se por ocorrer em maior abundância, podendo encontrar-se sob forma solúvel ou insolúvel nas células. Os ácidos fenólicos solúveis ocorrem no vacúolo, conjugados ou não conjugados a outras substâncias. Existem também ácidos fenólicos insolúveis, que se encontram ligados à parede celular (Acosta-Estrada et al., 2014; Shahidi & Yeo, 2016). As concentrações dos ácidos fenólicos variam no mesmo órgão da planta e entre órgãos de uma mesma espécie. Verificou-se que no milho, trigo, aveia e arroz a proporção de ácidos fenólicos insolúveis é 1000 vezes maior que a de ácidos fenólicos solúveis livres e 100 vezes maior que a dos ácidos conjugados (Adom & Liu, 2002). Acosta-Estrada e colaboradores (2014) verificaram que a proporção de ácidos fenólicos insolúveis nos cereais é, em média, de 77%, enquanto em verduras e frutas é de 32% e 29%, respectivamente.

A biossíntese de ácidos fenólicos solúveis e insolúveis se realiza no retículo endoplasmático; em seguida, são transferidos por vesículas de membranas para o vacúolo ou parede celular (Shahidi & Yeo, 2016). Os ácidos *p*-cumárico e ferúlico são os ácidos fenólicos majoritários da parede celular primária das gramíneas, o maior grupo do clado Commelinídea. Esses ácidos fenólicos são conjugados à parede celular mediante ligações covalente do tipo éster e/ou éter (Xu et al., 2005), às vezes aparecendo na forma dimérica, como o ácido diferúlico (Jin et al., 2006) (Figura III 1). Por um lado, o ácido ferúlico esterifica-se a uma unidade de arabinose, formando parte da cadeia dos glucoarabinoxilanos (GAXs) das Commelinídeas (Buchanan et al., 2015). Por outro lado, o mesmo ácido (ou outro ácido hidroxicinâmico) pode conjugar-se a uma unidade monomérica da lignina, incorporando-se ao complexo polissacarídeo-

ácido fenólico-lignina (Xu et al., 2005) (Figura III 1). A presença desses ácidos na estrutura da parede celular é importante na adesão célula-célula nas gramíneas, assim como em aspectos físico-químicos que afetam a digestibilidade dos alimentos (Gani et al., 2012)

Figura III 1. Tipos de interligação entre ácidos fenólicos insolúveis, polissacarídeos e lignina na parede celular. **a)** éster hidroxycinnamato; **b)** éter ferulato; **c)** ponte éster-éter ferulato; **d)** ponte éster do ácido desidrodiferúlico; **e)** ponte carbono-carbono do ácido desidrodiferúlico. Adaptado de Buchanan (2015).

Em geral, a parede celular é constituída por proteínas estruturais, ligninas, ácidos fenólicos e mistura de polissacarídeos, incluindo celulose, hemicelulose e pectinas (Tavares & Buckeridge, 2015). As proporções desses constituintes variam durante o desenvolvimento da parede celular. No início, na fase de parede primária, os polissacarídeos encontram-se na faixa de 90 a 95% e as proteínas entre 5 e 10%; no

final, a parede celular se torna mais lignificada (35%) e a proporção de polissacarídeos se reduz a 65%, proporções típicas de paredes secundárias (Canut et al., 2017). O arranjo desses polissacarídeos é altamente ordenado e dinâmico. A celulose é organizada em microfibrilas, sobre as quais se adere à hemicelulose, formando o complexo celulose-hemicelulose da parede celular. A esse complexo juntam-se os ácidos fenólicos e as ligninas, que se encontram aderidas a uma matriz de pectinas. Estas assumem o aspecto de um gel que afasta as microfibrilas, facilitando seu deslizamento lateral durante o crescimento celular e elevando o grau de porosidade e a espessura da parede celular (Tavares & Buckeridge, 2015). Todos esses constituintes conferem flexibilidade, rigidez e resistência necessárias para o crescimento, manutenção e defesa da célula (Le Gall et al., 2015). A parede celular submetida a fatores internos e externos (ambientais) devem resistir a pressões de turgescência, expansão e relaxamento (Liyama et al., 1994).

Depois da celulose, a lignina é o material orgânico mais abundante da biosfera. O processo de lignificação inicia-se após a célula atingir o crescimento máximo. A lignina é constituída pela polimerização de três monômeros (ou monolignóis): álcoois *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico que dão origem às unidades *p*-hidroxifenila (H), guaiacila (G) e siringila (S), respectivamente (Figura III 2). Em menor proporção, outros monômeros podem fazer parte da constituição da lignina, como tricina, álcool di-hidroconiferílico, acetato monolignol, aldeído coniferílico, ácido ferúlico, *p*-hidroxibenzoato e éster *p*-cumarato (Li et al., 2016). Em geral, a distribuição das unidades H, G e S pode variar entre as espécies, órgãos, estádios de desenvolvimento e até entre as camadas da parede celular (Mottiar et al., 2016). Em geral, a proporção de H é menor que a de G e S; nas gramíneas, H ocorre em proporção ligeiramente maior (Miedes et al., 2014). A lignina e os carboidratos estruturais representam importante defesa química de resistência a danos de raios UV e ataques de enzimas de patógenos e herbívoros, contribuindo para a recalcitrância da parede celular (Shahidi & Yeo, 2016). A rigidez mecânica da lignina robustece os caules e o tecido vascular, permitindo o crescimento ascendente e possibilitando que a água e os sais minerais sejam conduzidos através do xilema sob pressão negativa, sem colapso do tecido (Mottiar et al., 2016).

Figura III 2. Biossíntese dos principais monômeros de lignina em gramíneas. Modificado de Cesarino et al., (2016). PAL fenilalanina amônia-liase; PTAL bifuncionalidade fenilalanina tirosina amônia-liase; C4H cinamato-4-hidrolase; C3H 4-hidroxycinamato 3-hidroxilase; CCoAOMT cafeoil-CoA O-metil transferase; 4CL 4-cumarato:CoA ligase; C3H *p*-cumarato 3-hidroxilase; HCT *p*-hidroxycinamoil-CoA:quinato/chikimato *p*-hidroxicinnamoiltransferase; CSE cafeoil chikimato esterase; CCoAOMT cafeoil-CoA O-metiltransferase; CCR cinnamoil-CoA redutase; CAD álcool cinamil desidrogenase; COMT ácido caféico O-metiltransferase; F5H ferulato 5-hidrolase; PMT *p*-cumaroil-CoA:monolinol transferase; CHS chalcona sintase; CHI chalcona isomerase; PRX: peroxidase; LAC: laccase.

Alterações nos fatores bióticos e abióticos promovem modificações no acúmulo de ligninas e de outros componentes da parede celular (Moura et al., 2010; Le Gall et al., 2015). Nesse sentido, absorção insuficiente de água, motivada por déficit hídrico severo, limita o desenvolvimento normal das culturas. Com isso, advêm respostas negativas em nível morfológico, anatômico, bioquímico e molecular (Rauf et al., 2016). Sinais fenotípicos em gramíneas, como murchas antecipadas, enrolamento das folhas e diminuição do comprimento dos entrenós de colmos têm sido associados a mecanismos adaptativos ao déficit hídrico (Le Gall et al., 2015; Perrier et al., 2017).

Comparado a outras culturas, o sorgo é uma planta bastante tolerante ao déficit hídrico, devido à capacidade mais eficiente do uso d'água (Amelework et al., 2015). Entretanto, sabe-se que o déficit hídrico após florescimento pode elevar os níveis de açúcares solúveis do colmo (Tovignan et al., 2016) e dos entrenós do colmo (Ghate et al., 2017) de sorgo, em detrimento da sua biomassa e altura. Além disso, o conteúdo de lignina e celulose do colmo pode ser reduzido (Perrier et al., 2017). No trigo, a perda da biomassa e enrolamento das folhas foi associada ao incremento da concentração de ácidos fenólicos insolúveis em resposta ao déficit hídrico (Hura et al., 2012). Em cevada, os incrementos de ácido ferúlico e diferúlico foram relacionados à redução do crescimento da parede celular (Liyama et al., 1994). Extensos períodos de déficit hídrico podem promover também uma prematura lignificação. Folhas de milho em crescimento mostraram maior conteúdo de ligninas após três semanas de seca. Paralelamente, as regiões de maior acúmulo de ligninas mostraram maior concentração de ácido caféico *O*-metiltransferase (COMT), responsável pela transformação de ácido caféico em ácido ferúlico; além disso, observou-se maior concentração de lignina na região basal da folha, mecanismo que evitaria lignificar regiões que poderiam crescer após reidratação da planta (Vincent et al., 2005).

O Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas projeta para finais do presente século alterações no padrão do clima, incluindo incrementos da demanda hídrica, temperatura global e emissões de CO₂, oriundas principalmente da queima de combustíveis fósseis (IPCC, 2014).

Segundo Peñuelas & Estiarte, (1998) o incremento de CO₂ pode promover elevação na concentração de algumas classes de metabolitos secundários da parede celular. Contudo, as respostas das plantas em experimentos com CO₂ elevado têm variado, ora pela heterogeneidade das condições experimentais, ora pelos distintos padrões de crescimento anual ou perene, ora pelos mecanismos de fotossíntese C3 ou C4. Blaschke et al., (2004) relataram maior crescimento e acúmulo de biomassa em folhas e caule de mutantes de *Nicotiana tabacum* cv. 'Samsun' deficiente na enzima COMT por exposição a 720 ppm de CO₂, embora o conteúdo de lignina tenha se reduzido. Davey, et al., (2004) verificaram aumento do diâmetro e redução da espessura dos elementos de vaso de folhas de *Plantago marítima* crescidas em duas concentrações de CO₂: 360 e 600 ppm. Houve incremento significativo de ácido *p*-cumárico solúvel e redução da quantidade de lignina nas raízes. No mesmo estudo, as concentrações dos

ácidos, ferúlico, caféico e verbascosídeo da fração solúvel, incrementaram sutilmente com CO₂ elevado. Em outro estudo, o perfil transcriptômico de *Populus tremuloides* foi analisado após exposição por 12 anos no sistema FACE (free-air CO₂ enrichment) a 560 ppm de CO₂. Foi observada sub-expressões de três genes 4CL e um gene OMT1 envolvidos na biossíntese de lignina. Com isso, o conteúdo de lignina na folha foi reduzido, enquanto o de hemicelulose foi incrementado (Wei et al., 2013).

Poucos estudos têm sido feitos combinando déficit hídrico com incremento de CO₂, duas condições que provavelmente serão comuns em futuro não muito distante. Alguns estudos realizados com plantas de sorgo relataram atenuação dos efeitos negativos de déficit hídrico por incremento de CO₂ no que se refere ao rendimento e número de grãos (Conley, et al., 2001; Ottman et al., 2001). No entanto, esses estudos não abordaram análises de substâncias fenólicas da parede celular. Respostas relativas aos ácidos fenólicos da parede celular submetidos a déficit hídrico têm sido verificadas no sorgo (Wu et al., 2017a; Wu et al., 2017b), porém sem associação com incremento de CO₂. Por outro lado, De Souza et al., (2015) analisaram as respostas de diversos órgãos de sorgo, no que diz respeito a substâncias do metabolismo primário por exposição à combinação de déficit hídrico severo e incremento de CO₂.

O perfil de ácidos fenólicos da parede celular pode estar diretamente relacionado com a qualidade nutricional do grão. Chiremba e colaboradores (2012) propuseram uma relação direta entre o incremento dos ácidos fenólicos da parede celular (*p*-cumárico, ferúlico e diferúlico, principalmente) e a dureza dos grãos de sorgo e milho. As propriedades físico-químicas dos grãos poderiam estar diretamente relacionadas o valor nutricional do grão, além de representar uma característica determinante para escolha dos grãos.

O presente estudo visa analisar os conteúdos de substâncias fenólicas da parede celular e segundo, e determinar o efeito da combinação dos tratamentos de déficit hídrico e incremento de CO₂, em dois estádios de desenvolvimento (90 e 120 dias após o plantio) de grãos de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) variedade BRS 330.

OBJETIVOS

Geral

O presente estudo pretende comparar a composição das substâncias fenólicas da parede celular de plantas de sorgo variedade BRS 330 sob déficit hídrico e incremento de CO₂, nos estádios de desenvolvimento dos grãos aos 90 e 120 após o plantio.

Específicos

1. Identificar e quantificar ácidos fenólicos majoritários da parede celular das folhas, pedúnculo, colmo, raízes escoras, raízes e grãos da planta de sorgo variedade BRS 330.
2. Quantificar o conteúdo de lignina e avaliar a composição de seus monômeros de nas folhas, pedúnculo, colmo, raízes escoras, raízes e grãos da planta de sorgo variedade BRS 330.

III.2 MATERIAL E MÉTODOS

III.2.1 Material botânico

O material botânico e os procedimentos para cultivo das plantas descritos no Capítulo II foram usados para a realização das análises químicas do presente capítulo.

III.2.2 Análise dos ácidos fenólicos majoritários da parede celular

O resíduo obtido após a extração com MeOH 80% foi lavado duas vezes seguidas com 1 mL de H₂O destilada para eliminação do solvente orgânico. Após secagem em estufa a 40 °C por 48 h, o resíduo foi mantido a 4 °C.

Após secagem, o resíduo foi desengordurado três vezes seguidas com 2,5 mL de hexano. Testes para verificar o tempo ótimo de hidrólise alcalina por agitação constante (0,5 a 5 h) demonstrou que 2 h é o mais eficiente. Desse modo, o resíduo desengordurado foi submetido a hidrólise alcalina por agitação com 10 mL de NaOH 2 M por 2 h, em frasco fechado e sob atmosfera de N₂. Após esse período, a mistura foi resfriada em banho de gelo e o pH ajustado para 1,5 – 2,0 com HCl 6 M. O sobrenadante foi extraído com 3 porções de 7 mL de acetato de etila, sendo a fração orgânica recolhida e evaporada sob fluxo de nitrogênio até seca (Qiu et al., 2010;

Chiremba et al., 2012). Posteriormente, o material foi ressuspensionado em MeOH para identificação e quantificação dos constituintes por CLAE-UV-DAD.

A análise por CLAE-UV-DAD foi realizada usando uma coluna de fase reversa Zorbax Eclipse Plus C18 (4,6 x 150 mm, 3,5 μ m). Os solventes utilizados foram 0,1% de ácido acético em água milliQ (A) e acetonitrila grau HPLC (B). Utilizaram-se as seguintes proporções de B, nos seguintes intervalos de tempo: 0 – 10%, 0 – 6 min; 10 – 15%, 6 – 7 min; 15%, 7 – 22 min; 15 – 50%, 22 – 32 min; 50 – 100%, 32 – 42 min; 100%, 42 – 50 min. O volume de injeção foi 3 μ L, fluxo 1 mL/min, temperatura da coluna 45 °C. O detector UV-Vis foi ajustado para 320 nm e os espectros de absorção foram obtidos no intervalo 200 a 600 nm.

A identificação dos ácidos fenólicos da fração insolúvel foi feita por comparação dos tempos de retenção e espectros de absorção UV-Vis entre as substâncias detectadas nas análises e amostras autênticas de ácidos *p*-cumárico e ferúlico. A quantidade dos ácidos liberados pela hidrólise alcalina foi determinada por padronização externa, construindo curvas padrões com soluções metanólicas a 1.5, 3, 4.5, 7.5, 15, 30, 45, 60 e 120 μ g/mL dos mencionados ácidos, por comparação com as áreas dos correspondentes picos.

III.2.3 Extração e quantificação de lignina

A análise para determinação da quantidade de lignina seguiu a metodologia de Dos Santos et al., (2008). Amostras contendo 30 mg de massa seca e pulverizada foram colocadas em tubos de Eppendorf de 2 mL, aos quais se adicionaram 1500 μ L de tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7,0. Os tubos foram colocados em agitador digital linear SK-L330-Pro a 500 rpm por 2 min. Em seguida, os extratos foram centrifugados por 5 min a 13,000 rpm num MiniSpin® Eppendorf. Os extratos foram lavados duas vezes com 1 mL de tampão fosfato 50 mM pH 7,0, três vezes com 1 mL de Triton® X-100 1% (v/v) pH 7,0, duas vezes com 1 mL de NaCl 1 M pH 7,0; 2 vezes com 1 mL de água destilada e 2 vezes com 1 mL de acetona. Após a última lavagem, os extratos foram secos em estufa a 60 °C e transferidos para dessecador. Os tubos foram pesados para obtenção das massas de parede celular isenta de proteínas.

A dosagem de lignina foi realizada seguindo o método do brometo de acetila Morrison (1972) modificado por Fukushima et al., (2015). Em tubos de vidro com tampa de rosca, foram pesados de 1 a 2 mg do material obtido no procedimento anterior e acrescentados 500 µL de brometo de acetila a 25% em solução de ácido acético. A mistura foi aquecida por 30 min em banho seco a 70 °C, com agitação por vórtex cada 10 min. Em seguida, as amostras foram resfriadas em banho de gelo e diluídas com 1 mL de ácido acético. Alíquotas de 100 – 200 µL da digestão foram adicionadas a 200 µL de NaOH 1,5 M, 150 µL de hidroxilamina-HCl 0,5 M e 750 µL de ácido acético. As absorvâncias foram medidas em 280 nm. A concentração de lignina foi expressa em µg por mg de massa seca.

III.2.4 Extração e quantificação de monômeros de lignina

Amostras de 10 mg de parede celular isenta de proteínas foram pesadas em tubos de vidro com tampa de rosca, aos quais foram adicionados 200 µL de NaOH 2 M e 20 µL de nitrobenzeno. Os tubos foram fechados e aquecidos a 170 °C por 150 min. A mistura foi então transferida para outro tubo, o primeiro tubo foi lavado duas vezes com 2 mL de água desionizada e as águas de lavagem reunidas no segundo tubo. O produto de digestão foi homogeneizado por agitação manual. Em seguida, foram feitas duas extrações por partição com 5 mL de clorofórmio, descartando-se as fases clorofórmicas. A fase aquosa foi acidificada com HCl 5 M até pH 3 – 4. Foram feitas então duas extrações por partição com 5 mL de clorofórmio, reunindo-se as fases clorofórmicas em frasco previamente tarado. O solvente foi totalmente evaporado e os tubos mantidos em geladeira protegidos da luz até a análise (Moreira-Vilar et al., 2014).

As amostras foram dissolvidas em solução contendo 20% de metanol 20% e 4% de ácido acético e analisadas por CLAE-UV-Vis e detecção em 290 nm. Os monômeros aldeídos obtidos foram quantificados por comparação com uma solução de padrões de *p*-hidroxibenzaldeído, vanilina e siringaldeído a 50 µM.

III.2.5 Análise estatística

Diferenças entre as médias dos tratamentos com CO₂ ambiente (A) e CO₂ elevado (E) nos órgãos nos estádios de desenvolvimento 90 dias após o plantio (DAP) e

120 após o plantio (DAP) foram avaliadas por análise de variância (ANOVA-one-way) e teste *t*-Student ($P < 0.05$), usando o software estatístico JMP, versão 5.0.1.

Para informação do efeito positivo ou negativo foi aplicada a formula abaixo, com a qual valores > 0 indicam efeito positivo (incremento) e valores < 0 indicam efeito negativo (redução).

$$\text{Efeito (\%)} = \frac{(\text{média de CO}_2 \text{ elevado} - \text{média de CO}_2 \text{ ambiente}) \times 100}{\text{média CO}_2 \text{ ambiente}}$$

A análise de componentes principais (PCA) foi o modelo multivariado empregado para correlacionar o desempenho dos ácidos fenólicos da parede celular e monômeros de lignina com os órgãos da planta de sorgo (folhas, pedúnculo, colmo, raízes escoras, raízes e grãos), estágio de maturação (90 e 120 DAP) e tratamentos **A** e **E**, utilizando o software estatístico MINITAB 18.

III.3 RESULTADOS

III.3.1 Ácidos fenólicos da parede celular

O cromatograma do perfil químico após hidrólise alcalina da fração insolúvel de sorgo é mostrado na Figura III 3. Os ácidos *p*-cumárico e ferúlico foram identificados como os ácidos fenólicos majoritários da parede celular de folhas, pedúnculo, colmo, raízes escoras, raízes e grãos. Outros ácidos fenólicos foram detectados, principalmente nos grãos, em pequenas proporções.

Figura III 3. Cromatograma obtido por CLAE-DAD da fração insolúvel após hidrólise alcalina do colmo de plantas de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) variedade BRS 330 cultivadas em câmaras de topo aberto. 1: ácido *p*-cumárico; 2: ácido ferúlico.

III.3.2 Conteúdo de ácido *p*-cumárico da parede celular

A quantidade de ácido *p*-cumárico da parede celular de folhas, pedúnculo, colmo, raízes escoras, raízes e grãos imaturos e maduros é apresentada na Figura III 4. As raízes escoras mostraram os valores mais altos de ácido *p*-cumárico aos 90 e 120 DAP (perto de 3500 ng.mg⁻¹, em base seca). O pedúnculo acumulou mais ácido *p*-cumárico que o colmo aos 90 DAP, mas aos 120 DAP o colmo acumulou mais ácido *p*-cumárico que pedúnculo. Os grãos se destacaram por acumular aproximadamente seis vezes mais ácido *p*-cumárico aos 90 DAP do que aos 120 DAP.

Por seu turno, aos 90 DAP o tratamento **E** induziu incrementos significativos do conteúdo de ácido *p*-cumárico de folhas (61%) e grãos (129%), e diminuiu significativamente o conteúdo do pedúnculo (31%). Aos 120 DAP, o teor de ácido *p*-cumárico de folhas foi reduzido significativamente (24%) (Figura III 4).

Figura III 4. Conteúdo de ácido *p*-cumárico (ng.mg⁻¹ MS) da parede celular de plantas de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) variedade BRS 330, cultivadas em câmaras de topo aberto, em atmosfera com CO₂ ambiente (A) e CO₂ elevado (E) aos 90 e 120 dias após o plantio (DAP). Barras representam a média $\pm$ erro padrão (N=5). F: folhas; P: pedúnculo; C: colmo; Re: raízes escoras; R: raízes; G: grãos. Asteriscos indicam diferenças significativas ($P < 0,05$).

III.3.3 Conteúdo de ácido ferúlico da parede celular

O conteúdo de ácido ferúlico obtido da parede celular de folhas, pedúnculo, colmo, raízes escoras, raízes e grãos variaram de 27 a 1000 ng.mg⁻¹ de massa seca. As raízes escoras aos 90 DAP e folhas aos 120 DAP apresentaram os valores mais altos, enquanto os grãos apresentaram os valores mais baixos nos períodos de maturação. O teor de ácido ferúlico dos grãos imaturos foi aproximadamente quatro vezes mais alto do que nos maduros (Figura III 5).

Com o tratamento E, aos 90 DAP houve incremento significativo do conteúdo de ácido ferúlico de folhas (100%) e redução nas raízes (39%). Aos 120 DAP, o teor de ácido ferúlico de folhas foi reduzido significativamente (20%) (Figura III 5).

Figura III 5. Conteúdo de ácido ferúlico (ng.mg^{-1} MS) da parede celular de plantas de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) variedade BRS 330, cultivadas em câmaras de topo aberto, em atmosfera com CO_2 ambiente (A) e CO_2 elevado (E) aos 90 e 120 dias após o plantio (DAP). Barras representam a média $\pm$ erro padrão (N=5). F: folhas; P: pedúnculo; C: colmo; Re: raízes escoras; R: raízes; G: grãos. Asteriscos indicam diferenças significativas ($P < 0,05$).

III.3.4 Relação entre os ácidos ferúlico e *p*-cumárico da parede celular

A relação entre os ácidos ferúlico e *p*-cumárico (F/*p*-C) dos órgãos de sorgo revelaram maiores valores para folhas e grãos e menores valores para pedúnculo, colmo, raízes escoras e raízes. Por seu turno, o tratamento E reduziu significativamente a relação nos grãos aos 90 DAP e a elevou nas raízes escoras aos 120 DAP (Tabela 1).

Tabela1. Relação de ácido ferúlico/ácido *p*-cumárico (F/*p*-C) da parede celular de plantas de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) variedade BRS 330, cultivadas em câmaras de topo aberto, em atmosfera com CO₂ ambiente (**A**) e CO₂ elevado (**E**) aos 90 e 120 dias após o plantio (DAP). Os valores representam a média ± erro padrão (N=5). Valores em negrito referem-se a diferenças significativas entre tratamentos ($P < 0,05$).

Órgão	90 A	90 E	120 A	120 E
Folhas	1,4 ± 0,21	1,8 ± 0,04	1,6 ± 0,03	1,7 ± 0,09
Pedúnculo	0,1 ± 0,03	0,1 ± 0,02	0,4 ± 0,05	0,3 ± 0,01
Colmo	0,3 ± 0,02	0,3 ± 0,04	0,3 ± 0,01	0,3 ± 0,00
Raízes escoras	0,3 ± 0,01	0,3 ± 0,01	0,2 ± 0,01	0,3 ± 0,00
Raízes	0,3 ± 0,03	0,3 ± 0,03	0,3 ± 0,00	0,3 ± 0,01
Grãos	2,0 ± 0,33	1,1 ± 0,15	2,9 ± 0,64	3,2 ± 0,63

III.3.5 Rendimento de lignina

A percentagem de lignina nas folhas, colmo, pedúnculo, raízes escoras, raízes e grãos é mostrada na Figura III 6. Entre os órgãos avaliados, as raízes escoras acumularam maior percentagem de lignina aos 90 e 120 DAP, com médias acima de 20%. Folhas, pedúnculo, colmo e raízes contêm individualmente 10% – 18% de ligninas. Aos 120 DAP, os grãos armazenaram próximo de 2% de ligninas sob **A**, o teor sendo reduzido significativamente a 1% por **E** combinado a déficit hídrico severo.

Figura III 6. Teor de lignina ($\mu\text{g.mg}^{-1}\text{MS}$) de plantas de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) variedade BRS 330, cultivadas em câmaras de topo aberto, em atmosfera com CO_2 ambiente (A) e CO_2 elevado (E) aos 90 e 120 dias após o plantio (DAP). Barras representam a média $\pm$ erro padrão (N=5). F: folhas; P: pedúnculo; C: colmo; Re: raízes escoras; R: raízes; G: grãos. Asteriscos indicam diferenças significativas ($P < 0,05$).

III.3.6 Abundância relativa dos monômeros de lignina

As unidades monoméricas de lignina avaliadas após obtenção por oxidação alcalina do nitrobenzeno foram *p*-hidroxifenila (H), guaiacila (G) e siringila (S) (Figuras III 7 A – III 7 C, respectivamente). Em geral, as médias dos teores de H foram menores em relação às medias G e S. Particularmente nos grãos, o acúmulo de H foi ligeiramente maior que G, não tendo havido detecção de S. Entre os órgãos analisados, o colmo apresentou-se com maior teor de S (Figura III 7 C). Nesse órgão, o tratamento E combinado com déficit hídrico reduziu o teor das três unidades monoméricas de lignina (Figura III 7 C).

Figura III 7. Conteúdo das unidades monoméricas de lignina ($\mu\text{g.mg}^{-1}$ MS) *p*-hidroxifenila (H), guaiacila (G) e siringila (G) de plantas de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) variedade BRS 330, cultivadas em câmaras de topo aberto, em atmosfera com CO_2 ambiente (A) e CO_2 elevado (E) aos 90 e 120 dias após o plantio (DAP). Barras representam a média $\pm$ erro padrão (N=5). F: folhas; P: pedúnculo; C: colmo; Re: raízes escoras; R: raízes; G: grãos. Asteriscos indicam diferenças significativas ($P < 0,05$).

III.3.7 Relação entre os monômeros siringila (S) e guaiacila (G)

O quociente entre os teores de S e G (relação S/G) nos órgãos de sorgo é mostrado na Tabela 2. Uma vez que a EMBRAPA classifica a variedade BRS 330 como granífera, é importante conhecerem-se modificações estruturais da lignina, algumas das quais se refletem na relação S/G. Aos 120 DAP, o tratamento **E** incrementou significativamente a relação S/G do colmo. Nos grãos, a ausência de siringila (S) impede a determinação de S/G.

Tabela 2. Relação entre os monômeros siringila e guaiacila (S/G) de plantas de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) variedade BRS 330, cultivadas em câmaras de topo aberto, em atmosfera com CO₂ ambiente (**A**) e CO₂ elevado (**E**) aos 90 e 120 dias após o plantio (DAP). Os valores representam a média $\pm$ erro padrão (N=5). Valores em negrito referem-se a diferenças significativas entre tratamentos ($P < 0,05$).

Órgão	90 A	90 E	120 A	120 E
Folhas	1,5 $\pm$ 1,0	0,7 $\pm$ 0,4	1,4 $\pm$ 0,5	2,6 $\pm$ 1,8
Pedúnculo	1,3 $\pm$ 0,2	2,3 $\pm$ 0,6	4,2 $\pm$ 2,6	2,4 $\pm$ 0,2
Colmo	4,7 $\pm$ 2,3	4,5 $\pm$ 3,4	1,7 $\pm$ 2,2	8,5 $\pm$ 1,4
Raízes escoras	5,4 $\pm$ 2,3	8,0 $\pm$ 3,4	4,7 $\pm$ 2,2	4,2 $\pm$ 1,4
Raízes	0,9 $\pm$ 0,1	1,3 $\pm$ 0,5	0,8 $\pm$ 0,1	0,9 $\pm$ 0,1
Grãos	-	-	-	-

III.3.8 Análise de Componentes Principais de substâncias fenólicas da parede celular das plantas de sorgo variedade BRS 330

Os parâmetros referentes aos centroides resultantes da Análise de Componentes Principais (PCA), obtidos a partir da composição de ácidos fenólicos da parede celular e monômeros de lignina nos diversos órgãos sob os tratamentos **A** e **E**, nos dois estádios de maturação (90 e 120 DAP), são mostrados na Tabela 3. As proporções calculadas a partir dos autovalores mostram que 48,8% pode ser atribuída ao Componente Principal 1 (CP1) e 25,5% ao Componente Principal 2 (CP2), (Tabela 3, seção A). Os fatores que correspondem à contribuição das variáveis independentes para formação dos eixos X (CP1) e Y (CP2) são mostrados na Tabela 3, seção B, além dos outros Componentes Principais (CP3-CP7). Segundo Field, (2005) os fatores com valores acima de 0,300 possuem maior contribuição no correspondente Componente Principal. Dessa forma, as variáveis H, G, S, ácido *p*-cumárico e a relação F/*p*-C, todos com valores acima de 0,342, podem ser explicados pelo CP1 e a relação S/G e ácido ferúlico (F), com valores acima de 0,447, podem ser explicados pelo CP2. A distribuição dos centroides

condicionada pelos dois componentes é apresentada no gráfico biplot de distâncias na Figura III 9.

Tabela 3. Valores resultantes de Análise de Componentes Principais (PCA) de substâncias fenólicas de parede celular e monômeros de lignina de plantas de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) variedade BRS 330, cultivadas em câmaras de topo aberto, em atmosfera com CO₂ ambiente e CO₂ elevado aos 90 e 120 dias após o plantio (DAP). **A.** Autovalores e proporções de variância geradas por PCA. **B.** Valores dos coeficientes calculados para cada uma das variáveis analisadas na condição de CO₂ ambiente e CO₂ elevado, nos estádios 90 e 120 DAP. H: *p*-Hidroxifenila; G: Guaiacila; S: Siringila; F/*p*-C: relação ácido ferúlico/ácido *p*-cumárico.

Seções	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7
A							
Autovalor	3,4186	1,7819	0,7845	0,4261	0,2799	0,2338	0,0752
Proporção	0,488	0,255	0,112	0,061	0,040	0,033	0,011
B							
H	0,465	-0,288	-0,116	-0,356	0,049	0,219	0,715
G	0,342	-0,480	-0,214	0,118	-0,582	-0,457	-0,211
S	0,484	-0,120	0,181	-0,436	0,311	0,186	-0,630
S/G	0,166	0,596	0,402	-0,391	-0,511	-0,182	0,094
Ácido <i>p</i> -cumárico	0,418	0,342	-0,121	0,239	0,496	-0,613	0,119
Ácido ferúlico	0,229	0,447	-0,727	0,074	-0,199	0,387	-0,154
F/ <i>p</i> -C	-0,421	-0,029	-0,450	-0,674	0,121	-0,386	-0,036

O desempenho dos vetores e centroides foram indicados levando em conta os estádios de maturação; estágio imaturo, estágio maduro e tratamentos **A** e **E** (Figura III 8).

Os centroides correspondentes aos órgãos folhas, pedúnculo, colmo, raízes escoras, raízes e grãos de sorgo distribuíram-se pelos quatro quadrantes do gráfico. O componente PC1 separou os centroides correspondentes a pedúnculo, colmo, raízes escoras e raízes (quadrantes do lado direito) de grãos e folhas (lado esquerdo). O componente PC2 separou folhas e raízes escoras (nos quadrantes superiores) de grãos, pedúnculo e raízes (quadrantes inferiores). Os centroides referentes a colmo mostraram distribuição mais ampla no gráfico. Assim, o centroide do colmo correspondente ao tratamento **E** aos 120 DAP posiciona-se no quadrante I (PC1 e PC2 com valores positivos), enquanto os centroides correspondentes aos tratamentos **A** e **E** do estágio 90 DAP e **A** do estágio 120 DAP distribuem-se no quadrante IV (PC1 positivo e PC2 negativo) (Figura III 8).

A proximidade do centroide à direção do vetor (vetor = variável) indica maior ou menor influência do vetor sobre o centroide. Os centroides mais próximos do vetor apresentam melhor desempenho, já os centroides mais afastados da direção do vetor indicam menor desempenho. Desse modo, os grãos apresentaram melhor desempenho que folhas para F/*p*-C, pedúnculo, colmo e raízes mostraram-se próximos aos vetores correspondentes aos monômeros H, G e S. O vetor S/G foi mais influente para colmo aos 120 DAP sob E. Altas correlações entre os vetores das variáveis ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico e a relação S/G foram definidos a partir do gráfico (Figura III 8). Entretanto, os vetores S/G e F encontram-se mais próximos entre si que os vetores S/G e *p*-C, indicando maior influência do ácido ferúlico sobre a relação S/G, o que sugere que órgãos mais brandos apresentarão maior conteúdo de ácido ferúlico. A relação S/G está relacionada à maior ou menor resistência do lenho e à degradação química da lignina. Valores mais altos de S/G implicam em maior rendimento de fibras de celulose nos processos industriais, pois os monômeros G são mais resistentes à degradação térmica. Outro grupo altamente correlacionado corresponde aos conjuntos dos monômeros H, G e S (Figura III 8).

Figura III 9. Gráfico de variáveis referentes a órgãos de plantas de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) variedade BRS 330, cultivadas em câmaras de topo aberto, em atmosfera com CO₂ ambiente (símbolos vazios) e CO₂ elevado (símbolos cheios), aos 90 dias após o plantio (DAP) (quadrados) e 120 dias após o plantio (DAP) (círculos). Valores de porcentagem entre parênteses referem-se à proporção da variância explicada para cada componente principal (X = PC1, Y = PC2). S/G: siringila/guaiacila; F: ácido ferúlico; p-C: ácido p-cumárico; H: p-hidroxifenila; G: guaiacila; S: siringila; F/p-C: ácido ferúlico/ ácido p-cumárico.

III.4 DISCUSSÃO

A produtividade e o valor nutritivo do grão são dois aspectos fortemente correlacionados quando nos referimos à segurança alimentar. Entretanto, num cenário

de mudanças climáticas, a informação de novos arranjos da composição da parede celular pode permitir explicar possíveis limitações em relação à qualidade do grão e biodisponibilidade do alimento.

O presente estudo demonstrou que a magnitude do impacto da combinação de déficit hídrico severo e CO₂ elevado nos padrões das substâncias fenólicas da parede celular variam entre os órgãos de sorgo e entre estádios de maturação dos grãos.

Em coerência a outros estudos, verificou-se que os ácidos fenólicos predominantes na parede celular de gramíneas são os ácidos *p*-cumárico e ferúlico. No entanto, os resultados do presente trabalho mostraram que a abundância desses ácidos fenólicos na parede celular varia entre os órgãos. Por exemplo, o teor de ácido *p*-cumárico é maior em órgãos com função de suporte (raízes escoras e colmo) e menor em folhas e grãos (Figura III 4). Shimada e colaboradores, (1970) sugerem que diferenças nos padrões de acúmulo dos ácidos fenólicos da parede celular dependem de vários fatores, inclusive de sua estabilidade química na parede celular. Por exemplo, os ácidos *p*-cumárico e ferúlico são mais estáveis que os ácidos 5-hidroxi ferúlico e sinápico. Nas gramíneas, tem-se observado abundante acúmulo de tirosina e alta atividade da enzima tirosina-amonialase (TAL), que tal como a fenilalanina-amonialase (PAL) catalisa a eliminação não oxidativa da amônia, contribuindo diretamente à maior formação de ácido *p*-cumárico na rota de biossínteses de fenilpropanoides (Shimada et al., 1970). Régnier & Macheix, (1996) verificaram a relação direta entre a redução das atividades das enzimas fenilalanina-amonialase (PAL) e tirosina-amonialase (TAL) com a redução dos ácidos *p*-cumárico e ferúlico durante o amadurecimento do grão de trigo. Nos órgãos de suporte, a maior parte do ácido *p*-cumárico acumula-se paralelamente com a lignificação, tornando a avaliação de seu teor um conveniente indicador da síntese de lignina (Ou & Sun, 2014).

Em toda a planta a proporção de ácido *p*-cumárico é maior que a de ferúlico, mas nos grãos aos 120 DAP o teor de ácido ferúlico foi o dobro do ácido *p*-cumárico (comparar Figuras III 4 e III 5). A exemplo dos grãos maduros de sorgo, outros cereais como trigo (Régnier & Macheix, 1996), arroz (Zhou et al., 2004), milho e sorgo (Chiremba et al., 2012) também apresentem maior conteúdo de ácido ferúlico que *p*-cumárico.

Aos 90 DAP, a o incremento de CO₂ associado ao déficit hídrico severo aumentou significativamente o conteúdo de ácido *p*-cumárico e ácido ferúlico da parede celular de folhas e grãos, porém as proporções de aumento entre os ácidos fenólicos da parede celular foram diferentes para folhas e grãos. Enquanto as folhas aumentaram mais ácido ferúlico (100%) os grãos aumentaram mais ácido *p*-cumárico (129%) (Figuras III 4 e III 5). Contudo, o excesso tanto de ácido *p*-cumárico quanto de ácido ferúlico na parede celular poderia resultar em indução de uma lignificação prematura nas folhas e nos grãos de sorgo do presente estudo. Zanardo et al., (2009) e Dos Santos et al., (2008) observaram lignificação induzida pela aplicação exógena de diferentes concentrações de ácido *p*-cumárico e ácido ferúlico nas raízes de soja após 3 dias de germinação. Nesse sentido, a Figura III 6 mostra que unicamente os grãos apresentaram incremento de lignina (72%, não significativo), já as folhas não apresentaram alteração na porcentagem de lignina, inferindo-se que o incremento de ácido *p*-cumárico pode induzir lignificação prematura nos grãos, enquanto as folhas podem manter mecanismos de bloqueio a processos de lignificação antecipada quando ainda não completou o ciclo de vida da planta. Consequentemente, o incremento excessivo de ácido *p*-cumárico nos grãos interferiu no incremento (embora não significativo) dos monômeros H e G de lignina (Figuras III 7 A e III 7 B, respectivamente). Conclui-se que H e S enrijecem a parede celular e restringem o crescimento do órgão (Zanardo et al., 2009).

Aos 90 DAP, no pedúnculo, a condição **E** reduziu o conteúdo de ácido *p*-cumárico (31%), enquanto a abundância de ácido ferúlico não foi alterada. O pedúnculo é um órgão contínuo ao colmo em direção à panícula, onde se formam e se desenvolvem os grãos. Segundo Vanderlip, (1979), próximo dos 60 DAP, a panícula emerge da folha bandeira sustentada pelo pedúnculo, iniciando-se a fase de maior alongamento deste. Contudo, condições hídricas limitantes podem levar à redução do alongamento de estruturas de suporte como colmo e pedúnculo do sorgo (Perrier et al., 2017); contrariamente, condições de CO₂ elevado levaram ao incremento de 17% na altura do colmo de cana de açúcar (De Souza et al., 2008). Entretanto, a associação da condição de déficit hídrico severo (irrigação limitada a 23% do controle) e CO₂ elevado (800 ppm) resultaram em incremento significativo da panícula, 10 cm a mais em relação ao déficit hídrico severo e condição de CO₂ ambiente (400 ppm) (De Souza et al., 2015). Portanto, o pedúnculo respondeu favoravelmente ao incremento de CO₂ na condição de déficit hídrico severo.

O sorgo tolera melhor condições de déficit hídrico em relação a outras culturas, devido à capacidade de desenvolver raízes secundárias mais profundas e ramificadas, o que permite maior eficiência de absorção de água e nutrientes do solo (Zegada-Lizarazu et al., 2012). Aos 90 DAP, a condição de déficit hídrico e E induziu a redução (embora, não significativa) do ácido *p*-cumárico (35%) e ácido ferúlico (39%) (Figura III 4 e Figura III 5).

Tal como se observou em relação ao colmo, nas raízes escoras o tratamento E não afetou o acúmulo de ácidos fenólicos aos 90 nem aos 120 DAP (Figura III 4 e Figura III 5). O mecanismo de ancoragem das raízes sustenta-se pelo alto conteúdo de fibras e ligninas nas raízes escoras observadas também no milho (Ennos et al., 1993).

Aos 120 DAP, a redução (embora não significativa) dos ácidos *p*-cumárico e ferúlico no colmo foram concomitantes com a redução do conteúdo de lignina e os monômeros de lignina (*p*-hidroxifenila (H), guaiacila (G) e siringila (S)) (Figura III 7). De Souza et al., (2008) encontraram genes relacionados à parede celular de folhas de cana de açúcar que responderam ao CO₂ elevado, após 22 semanas de exposição. Naquele experimento, o gene que codifica a síntese da enzima ácido caféico *O*-metiltransferase (COMT) foi repressado, contrariamente aos genes relacionados à expansão e alongamento da parede celular foram induzidos. Desse modo, os autores pressupõem que a 800 ppm de CO₂ houve indução da expansão celular na cana de açúcar. Contudo, o presente experimento revelou que sob maior tempo de exposição a uma condição de déficit hídrico severo, a condição de CO₂ elevado aparentemente não consegue atenuar perdas em relação às substâncias fenólicas da parede celular. De qualquer forma, o conteúdo de lignina observado no colmo, aos 120 DAP, foi próximo aos valores de 129,9 g/kg e 167,9 g/kg reportados para *Sorghum sudanense*, espécie próxima a *Sorghum bicolor* e usada principalmente como forrageira (Fukushima et al., 2015). Comparando com outras gramíneas, Moreira-Vilar et al., (2014) reportaram, para o método do brometo de acetila, 260 mg/g de lignina em bagaço de cana de açúcar e 4,35 mg/g, 5,75 mg/g e 6,23 mg/g para as unidades monoméricas H, G e S, respectivamente, pelo método alcalino com nitrobenzeno. Lacerda et al., (2006) reportaram 17% de lignina no caule, folhas e planta toda de aveia aos 65 DAP. Conclui-se que os resultados de pedúnculo e colmo não diferem muito dos valores obtidos com outras gramíneas, contudo as raízes escoras mostraram-se como o órgão mais lignificado da planta de sorgo.

No grão maduro, a redução do conteúdo de lignina (Figura III 6) vai em sentido contrário ao ligeiro incremento de H e G. É possível que outros componentes de ligninas, não considerados neste trabalho, mas que são reconhecidos como componentes dos grãos de sorgo (Kang et al., 2016; Li et al., 2016) possam influir substancialmente nos teores de lignina.

Os valores referentes aos teores dos ácidos *p*-cumárico e ferúlico da parede celular do grão maduro sob efeito de **E** (Figuras III 4 e III 5) foram inferiores aos valores reportados por Chiremba et al., (2012), (300 µg/g e 3282 µg/g para ácido *p*-cumárico e ácido ferúlico, respectivamente), embora se tenha adotado o mesmo procedimento de extração. O déficit hídrico imposto no presente trabalho pode ter sido suficientemente severo para impedir que o incremento de CO₂ a 800 ppm revertisse o efeito. Uma explicação alternativa seria de que os híbridos comerciais do Sul da África usados no estudo de Chiremba et al., (2012) tenham características distintas do híbrido comercial usado neste experimento, embora tenham pericarpo vermelho como a variedade BRS 330. As variedades de sorgo usadas na fabricação de dietas para frangos da Austrália apresentaram em média 34,7 µg/g de ácido *p*-cumárico e 402,16 µg/g de ácido ferúlico (Khoddami et al., 2015), valores mais baixos que os híbridos comerciais do Sul da África (Chiremba et al., 2012). Em outras variedades de sorgo de pericarpo vermelho (QL33/QL36, 'B923296' e 'QL33') da Austrália foram reportados valores ainda mais baixos, 1,86 a 6,69 mg/kg para ácido *p*-cumárico e 52,20 a 80,89 mg/kg para ácido ferúlico (Wu et al., 2017c). Em comparação a esses resultados, no presente trabalho o grão maduro sob efeito de **E** apresentou valores mais altos de ácido *p*-cumárico (9 ng/mg) e mais baixos de ácido ferúlico (27 ng/mg) (Figuras III 4 e III 5, respectivamente).

A proporção dos ácidos fenólicos da parede celular está diretamente relacionada com o grau de dureza do grão. A seleção de grãos mais duros e mais tenros se faz em função de distintas destinações em processos indústrias. A indústria moageira prefere grãos mais duros, porque a farinha produzida pode ser facilmente separada do farelo. A farinha assim obtida tem partículas mais pesadas, ocupando menor espaço nas embalagens. Ao contrário, os grãos mais tenros impõem maior dificuldade no processo de peneirar e embalar. No caso de dietas de frangos à base de sorgo, foi observado que grãos com maior conteúdo de ácidos fenólicos da parede celular agiam negativamente na absorção energética (Khoddami et al., 2015). Nesse sentido, foi calculada a relação

entre o ácido ferúlico e o ácido *p*-cumárico nos grãos e outros órgãos da planta de sorgo (Tabela 1) com o intuito de observar mudanças pela condição de CO₂ elevado e déficit hídrico severo. Nos grãos, observa-se que a relação entre ácido ferúlico e ácido *p*-cumárico (F/*p*-C) foi significativamente menor aos 90 DAP sob CO₂ elevado (igual a 1,1) em comparação à condição de CO₂ ambiente (igual a 2,0). Aos 120 DAP, a proporção mudou a relação sob E assumindo valor ligeiramente maior (3,2) do que sob A (2,9), embora sem significância (Tabela 1). Distintas proporções de ácidos fenólicos ligados à parede celular do grão, às vezes consequentes de mudanças climáticas, podem influir na dureza do grão (Chiremba et al., 2012) e com isso alterar as características sensoriais específicas de textura, aparência, aroma e sabor que influem na qualidade do grão.

III.5 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- Acosta-Estrada, B. A., Gutiérrez-Urbe, J. A., Serna-Saldívar, S. O. (2014). Bound phenolics in foods, a review. *Food chemistry*, 152, 46-55.
- Adom, K. K., Liu, R. H. (2002). Antioxidant activity of grains. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50, 6182-6187.
- Amelework, B., Shimelis, H., Tongoona, P., Laing, M. (2015). Physiological mechanisms of drought tolerance in sorghum, genetic basis and breeding methods: a review. *African Journal of Agricultural Research*, 10, 3029-3040.
- Blaschke, L., Legrand, M., Mai, C., Polle, A. (2004). Lignification and structural biomass production in tobacco with suppressed caffeic/5-hydroxy ferulic acid-O-methyl transferase activity under ambient and elevated CO₂ concentrations. *Physiologia plantarum*, 121, 75-83.
- Buchanan, B. B., Gruissem, W., Jones, R. L. (2015). *Biochemistry & Molecular Biology of Plants* (2nd ed.). USA: Wiley-Blackwell.
- Canut, H., Albenne, C., Jamet, E. (2017). Isolation of the cell wall. *Isolation of plant organelles and structures: Methods and Protocols*, 171-185.
- Cesarino, I., Simões, M. S., dos Santos Brito, M., Fanelli, A., da Franca Silva, T., Romanel, E. (2016). *Acta Physiol Plant*, 38, 269.
- Chiremba, C., Taylor, J. R., Rooney, L. W., Beta, T. (2012). Phenolic acid content of sorghum and maize cultivars varying in hardness. *Food chemistry*, 134, 81-88.
- Conley, M. M., Kimball, B. A., Brooks, T. J., Pinter, P. J., Hunsaker, D. J., Wall, G. W., Adam, N. R., LaMorte, R. L., Matthias, A. D., Thompson, T. L., Leavitt, S. W.,

- Ottman, M. J., Cousins, A. B., Triggs, J. M. (2001). CO₂ enrichment increases water-use efficiency in sorghum. *New Phytologist*, 151, 407-412.
- Davey, M. P., Bryant, D. N., Cummins, I., Ashenden, T. W., Gates, P., Baxter, R., Edwards, R. (2004). Effects of elevated CO₂ on the vasculature and phenolic secondary metabolism of *Plantago maritima*. *Phytochemistry*, 65, 2197-2204.
- De Souza, A. P., Cocuron, J. C., Garcia, A. C., Alonso, A. P., Buckeridge, M. S. (2015). Changes in whole-plant metabolism during grain-filling stage in *Sorghum Bicolor* L.(Moench) grown under elevated CO₂ and drought. *Plant physiology*, 169, 1755-1765.
- De Souza, A. P., Gaspar, M., Da Silva, E. A., Ulian, E. C., Waclawovsky, A. J., Dos Santos, R. V., Texeira, M. M., Souza, G. M., Buckeridge, M. S. (2008). Elevated CO₂ increases photosynthesis, biomass and productivity, and modifies gene expression in sugarcane. *Plant, cell & environment*, 31, 1116-1127.
- Dos Santos, W. D., Ferrarese, M. L., Nakamura, C. V., Mourão, K. S., Mangolin, C. A., Ferrarese-Filho, O. (2008). Soybean (*Glycine max*) root lignification induced by ferulic acid. The possible mode of action. *Journal of chemical ecology*, 34, 1230–1241.
- Ennos, A. R., Crook, M. J., Grimshaw, C. (1993). The anchorage mechanics of maize, *Zea mays*. *Journal of Experimental Botany*, 44, 147-153.
- Field, A. (2005). *Discovering Statistics Using SPSS* (2nd ed.). London: SAGE.
- Fukushima, R. S., Kerley, M. S., Ramos, M. H., Porter, J. H., Kallenbach, R. L. (2015). Comparison of acetyl bromide lignin with acid detergent lignin and Klason lignin and correlation with in vitro forage degradability. *Animal Feed Science and Technology*, 201, 25-37.
- Gani, A., Wani, S. M., Masoodi, F. A., Hameed, G. (2012). Whole-grain cereal bioactive compounds and their health benefits: a review. *Journal of Food Processing & Technology*, 3, 146-156.
- Ghate, T., Deshpande, S., Bhargava, S. (2017). Accumulation of stem sugar and its remobilisation in response to drought stress in a sweet sorghum genotype and its near-isogenic lines carrying different stay-green loci. *Plant Biology*, 19, 396-405.
- Hura, T., Hura, K., Dziurka, K., Ostrowska, A., Bączek-Kwinta, R., Grzesiak, M. (2012). An increase in the content of cell wall-bound phenolics correlates with the productivity of triticale under soil drought. *Journal of plant physiology*, 169, 1728-1736.
- Liyama, K., Lam, T. B., Stone, B. A. (1994). Covalent cross-links in the cell wall. *Plant physiology*, 104, 315-320.

- IPCC. (2014). *Intergovernmental Panel on Climate Change. Climate Change 2014: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of IPCC*. Fonte: www.ipcc.ch/report/ar5/
- Jin, Z., Katsumata, K. S., Lam, T. B., Liyama, K. (2006). Covalent linkages between cellulose and lignin in cell walls of coniferous and nonconiferous woods. *Biopolymers*, 83, 103-110.
- Kang, J., Price, W. E., Ashton, J., Tapsell, L. C., Johnson, S. (2016). Identification and characterization of phenolic compounds in hydromethanolic extracts of sorghum whole grains by LC-ESI-MSn. *Food chemistry*, 2011, 215-226.
- Khoddami, A., Truong, H. H., Liu, S. Y., Roberts, T. H., Selle, P. H. (2015). Concentrations of specific phenolic compounds in six red sorghums influence nutrient utilisation in broiler chickens. *Animal Feed Science and Technology*, 210, 190-199.
- Lacerda, R. S., Gomide, C. A., Fukushima, R. S., Schmidt, R. J., Herling, V. R. (2006). Lignin concentration in oat (*Avena byzantina* L.) aerial part as measured by four analytical methods. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 43, 400-407.
- Le Gall, H., Philippe, F., Domon, J. M., Gillet, F., Pelloux, J., Rayon, C. (2015). Cell wall metabolism in response to abiotic stress. *Plants*, 4, 112-166.
- Li, M., Pu, Y., Yoo, C. G., Ragauskas, A. J. (2016). The occurrence of tricin and its derivatives in plants. *Green Chemistry*, 18, 1439-1454.
- Liyama, K., Lam, T. B., Stone, B. A. (1994). Covalent cross-links in the cell wall. *Plant physiology*, 104, 315-320.
- Miedes, E., Vanholme, R., Boerjan, W., Molina, A. (2014). The role of the secondary cell wall in plant resistance to pathogens. *Frontiers in plant science*, 5, 358.
- Moreira-Vilar, F. C., Siqueira-Soares, R. de C., Finger-Teixeira, A., de Oliveira, D. M., Ferro, A. P., da Rocha, G. J., Ferrarese, M. de L., dos Santos, W. D., Ferrarese-Filho, O. (2014). The acetyl bromide method is faster, simpler and presents best recovery of lignin in different herbaceous tissues than klason and thioglycolic acid methods. *PLoS One*, 9, e110000.
- Morrison, I. M. (1972). A semi-micro method for the determination of lignin and its use in predicting the digestibility of forage crops. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 23, 455-463.
- Mottiar, Y., Vanholme, R., Boerjan, W., Ralph, J., Mansfield, S. D. (2016). Designer lignins: harnessing the plasticity of lignification. *Current opinion in biotechnology*, 37, 190-200.

- Moura, J. C., Bonine, C. A., De Oliveira Fernandes Viana, J., Dornelas, M. C., Mazzafera, P. (2010). Abiotic and biotic stresses and changes in the lignin content and composition in plants. *Journal of integrative plant biology*, 52, 360-376.
- Naczek, M., Shahidi, F. (2006). Phenolics in cereals, fruits and vegetables: occurrence, extraction and analysis. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 41, 1523-1542.
- Ottman, M. J., Kimball, B. A., Pinter, P. J., Wall, G. W., Vanderlip, R. L., Leavitt, S. W., LaMorte, R. L., Matthias, A. D., Brooks, T. J. (2001). Elevated CO₂ increases sorghum biomass under drought conditions. *New Phytologist*, 150, 261-273.
- Ou, J., Sun, Z. (2014). Feruloylated oligosaccharides: structure, metabolism and function. *Journal of Functional Foods*, 7, 90-100.
- Peñuelas, J., Estiarte, M. (1998). Can elevated CO₂ affect secondary metabolism and ecosystem function? *Trends in Ecology & Evolution*, 13, 20-24.
- Perrier, L., Rouan, L., Jaffuel, S., Clement-Vidal, A., Roques, S., Soutiras, A., et al. (2017). Plasticity of sorghum stem biomass accumulation in response to water deficit: a multiscale analysis from internode tissue to plant level. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1516.
- Qiu, Y., Liu, Q., Beta, T. (2010). Antioxidant properties of commercial wild rice and analysis of soluble and insoluble phenolic acids. *Food Chemistry*, 121, 140-147.
- Rauf, S., Al-Khayri, J. M., Zaharieva, M., Monneveux, P., Khalil, F. (2016). Breeding strategies to enhance drought tolerance in crops. En Al-Khayri J., Jain S., Johnson D. (eds) *Advances in Plant Breeding Strategies: agronomic, abiotic and biotic stress traits*. Springer, Cham, pp. 397-445.
- Régnier, T., Macheix, J. J. (1996). Changes in wall-bound phenolic acids, phenylalanine and tyrosine ammonia-lyases, and peroxidases in developing durum wheat grains (*Triticum turgidum* L. var. Durum). *Journal of agricultural and food chemistry*, 44, 1727-1730.
- Shahidi, F., Yeo, J. (2016). Insoluble-bound phenolics in food. *Molecules*, 21, 1216.
- Shimada, M., Yamazaki, T., Higuchi, T. (1970). Metabolism of p-coumaric acid during lignification of a bamboo. *Phytochemistry*, 9, 1-4.
- Tavares, E. Q., Buckeridge, M. S. (2015). Do plant cell walls have a code? *Plant Science*, 241, 286-294.
- Tovignan, T. K., Fonckea, D., Ndoeye, I., Cisse, N., Luquet, D. (2016). The sowing date and post-flowering water status affect the sugar and grain production of

- photoperiodic, sweet sorghum through the regulation of sink size and leaf area dynamics. *Field Crops Research*, 192, 67-77.
- Vanderlip, R. L. (1979). *How a sorghum plant develops* (No. C040. 065). Cooperative Extension Service: Kansas State University.
- Vincent, D., Lapierre, C., Pollet, B., Cornic, G., Negroni, L., Zivy, M. (2005). Water deficits affect caffeate O-methyltransferase, lignification, and related enzymes in maize leaves. A proteomic investigation. *Plant Physiology*, 137, 949-960.
- Wei, H., Gou, J., Yordanov, Y., Zhang, H., Thakur, R., Jones, W., Burton, A. (2013). Global transcriptomic profiling of aspen trees under elevated [CO₂] to identify potential molecular mechanisms responsible for enhanced radial growth. *Journal of plant research*, 126, 305-320.
- Wu, G., Bennett, S. J., Bornman, J. F., Clarke, M. W., Fang, Z., Johnson, S. K. (2017a). Phenolic profile and content of sorghum grains under different irrigation managements. *Food Research International*, 97, 347-355.
- Wu, G., Bornman, J. F., Bennett, S. J., Clarke, M. W., Fang, Z., Johnson, S. K. (2017c). Individual polyphenolic profiles and antioxidant activity in sorghum grains are influenced by very low and high solar UV radiation and genotype. *Journal of Cereal Science*, 77, 17-23.
- Wu, G., Johnson, S. K., Bornman, J. F., Bennett, S. J., Fang, Z. (2017b). Changes in whole grain polyphenols and antioxidant activity of six sorghum genotypes under different irrigation treatments. *Food Chemistry*, 214, 199-207.
- Xu, F., Sun, R. C., Sun, J. X., Liu, C. F., He, B. H., Fan, J. S. (2005). Determination of cell wall ferulic and p-coumaric acids in sugarcane bagasse. *Analytica Chimica Acta*, 552, 207-217.
- Yamori, W., Hikosaka, K. Way, D. A. (2014). Temperature response of photosynthesis in C3, C4 and CAM plants: temperature acclimation and temperature adaptation. *Photosynth Res*, 119, 101-117.
- Zanardo, D. I., Lima, R. B., Ferrarese, M. D., Bubna, G. A., Ferrarese-Filho, O. (2009). Soybean root growth inhibition and lignification induced by p-coumaric acid. *Environmental and Experimental Botany*, 66, 25-30.
- Zegada-Lizarazu, W., Zatta, A., Monti, A. (2012). Water uptake efficiency and above- and belowground biomass development of sweet sorghum and maize under different water regimes. *Plant and soil*, 351, 47-60.
- Zhou, Z., Robards, K., Helliwell, S., Blanchard, C. (2004). The distribution of phenolic acids in rice. *Food Chemistry*, 87, 401-406.

ANEXOS

A 1. Cromatograma obtido por CLAE-DAD (352 nm) da fração solúvel de folhas de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) variedade BRS 330 (aos 120 DAP) cultivadas em câmaras de topo aberto, em condições de déficit hídrico severo.

A 2. Cromatograma obtido por CLAE-DAD (352 nm) da fração solúvel de pedúnculo de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) variedade BRS 330 (aos 120 DAP) cultivadas em câmaras de topo aberto, em condições de déficit hídrico severo.

A 3. Cromatograma obtido por CLAE-DAD (352 nm) da fração solúvel de colmo de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) variedade BRS 330 (aos 120 DAP) cultivadas em câmaras de topo aberto, em condições de déficit hídrico severo.

A 4. Cromatograma obtido por CLAE-DAD (352 nm) da fração solúvel de raízes escoras de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) variedade BRS 330 (aos 120 DAP) cultivadas em câmaras de topo aberto, em condições de déficit hídrico severo.

A 5. Cromatograma obtido por CLAE-DAD (352 nm) da fração solúvel de raízes de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) variedade BRS 330 (aos 120 DAP) cultivadas em câmaras de topo aberto, em condições de déficit hídrico severo.

A 6. Cromatograma obtido por CLAE-DAD (352 nm) da fração solúvel de grãos de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) variedade BRS 330 (aos 90 DAP) cultivadas em câmaras de topo aberto, em condições de déficit hídrico severo.

A 7. Cromatograma obtido por CLAE-DAD (352 nm) da fração solúvel de grãos de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) variedade BRS 330 (aos 120 DAP) cultivadas em câmaras de topo aberto, em condições de déficit hídrico severo.

A 8. Substâncias fenólicas da fração solúvel para folhas, pedúnculo, colmo, raízes escoras, raízes e grãos de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) variedade BRS 330, tentativamente identificada por CLAE-DAD e LC-MS-MS

N°	T. R. (min)	Substância fenólica	λ max. (nm)	[M+H] ⁺ ; (m/z)	[M+H] ⁺ ; (m/z)	Referência bibliográfica *	Órgão
1	8,4	Ác. 3-O-cafeoilquínico	324	355.1; [MH-QA]+ 162.9 (pb), 148.9		Gobbo-Neto, L., & Lopes, N. P. (2008)	f, re, g90, g120
2	10,3	Derivado de ác. ferúlico 1	327	279.2; 261.9, 219.8, 204.8, 176.9 (pb), 144.8		Gobbo-Neto, L., & Lopes, N. P. (2008); Abad-García, B. et al., (2009)	f, g90 e g120
3	11,0	Ác. 5-O-cafeoilquínico	325	355.0; [MH-QA]+ 162.91 (pb)	353.07; 190.82 (pb)	Padrão comercial, Gobbo-Neto, L., & Lopes, N. P. (2008)	f, p, c, re, r
4	11,3	Derivado de ác. ferúlico 2	327	369.1; [MH-QA]+ 176.9 (pb), 144.8		Gobbo-Neto, L., & Lopes, N. P. (2008)	f
5	11,7	Ác. 4-O-cafeoilquínico	325	355.0; [MH-QA]+ 162.9 (pb), 144.8	353.07; 191.0, 179.0, 172.81 (pb), 134.79	Gobbo-Neto, L., & Lopes, N. P. (2008)	f, p, re
6	12,1	Ác. 3-O-ferulolquínico	325	369.1; [MH-QA]+ 176.9 (pb), 144.85	367.13; 192.8 (pb), 172.81, 133.81 489.24; 429.17, 415.2, 385.01, 327.15, 281.00, 160.75 (pb)	Gobbo-Neto, L., & Lopes, N. P. (2008)	f, p, c, re, g120
7	12,6	Derivado de ác. caféico 1	327			Narváez-Cuenca et al., (2012)	f
8	12,8	Api-C-pen-C-pen	270, 336		549.34; 353.16	Benayad, Z. et al., (2014)	f
9	13,6	Derivado de ác. caféico 2	329	461.1; 325.1, 299.1, 162.9 (pb)	459.22; 383.12, 323.06, 281.01, 250.92, 160.8 (pb)	Narváez-Cuenca et al., (2012); Chen et al., (2013)	f, p, c, re, g90
10	13,8	Derivado de ác. caféico 3	325	531.0; 162.9 (pb), 419.1, 276.9, 257.1		Gobbo-Neto, L., & Lopes, N. P. (2008)	g120
11	15,2	Api-C-hex-C-pen 1	273, 336		563.33; 503.21, 473.15 (pb), 443.09, 383.07, 353.06, 276.0, 222.28	Ferreres, F. et al., (2008)	p, r
12	15,5	Api-O,C-di-hex	N.D.	595.1; 577.0, 498.9, 433.0 (pb), 415.0, 367.0, 337.2, 270.9		Cavaliere, C. et al., (2005)	r
13	15,8	Ac. 4-O-ferulolquínico	322	369.17; [MH-QA]+ 177.11 (pb); 144.87	367.15; 172.80 (pb), 191	Gobbo-Neto, L., & Lopes, N. P. (2008)	f, p, c, re, r, g90, g120
14	16,2	Lut-C-hex-C-pen	348	581.1; 563.0 (pb), 545.1, 527.1, 515.2, 497.2, 473.2, 443.2, 425.3		Ferreres, F. et al., (2010)	p, re, r
15	16,8	Derivado de ác. ferúlico 3	327	369.3; 176.8 (pb), 144.8		Gobbo-Neto, L., & Lopes, N. P. (2008)	f, re
16	17,1	Derivado de ác. caféico 4	329	493.0; 475.1; 404.2; 369.1; 325.1 (pb), 162.9	491.16; 447.18; 323.05 (pb), 262.91; 220.85; 178.81	Gobbo-Neto, L., & Lopes, N. P. (2008)	f, p, re, r, g90, g120
17	17,7	Api-C-hex-C-pen 2	270, 336	565.2; 547.0, 529.1, 511.1, 481.3, 427.1 (pb), 409.1, 294.8	563.22; 473.16, 443.18 (pb), 383.11, 353.08	Cavaliere, C. et al., (2005); Ferreres, F. et al., (2008)	f, p, c, re
18	18,3	Api-C-hex-C-pen 3	270, 336	565.32; 547.0 (pb), 529.1, 511.1, 499.1, 493.2, 481.3, 469.3, 457.2, 451.4, 445.2	563.22; 503.2, 473.19, 443.13 (pb), 383.08, 353.08, 325.09	Cavaliere, C. et al., (2005); Ferreres, F. et al., (2008)	f, p, c, re, r
19	18,4	Api-C-hex-C-pen 4	270, 336	565.3; 547.0 (pb), 529.0, 511.0, 499.1, 481.1, 469.1, 457.3, 445.2, 415.1, 397.2	563.36; 503.19, 473.17 (pb), 443.15, 383.14, 353.08, 190.77	Ferreres, F. et al., (2008); Carbonara, et al., (2012)	f, re
20	18,8	Ácido ferúlico	323	Padrão comercial		Padrão comercial, Abad-García, B. et al., (2009)	r, g90, g120
21	18,9	Tri-O-hex-O-hex	272, 335	655.3; 493.0, 331.0 (pb)		Cavaliere, C. et al., (2005); Dong, et al., (2014)	f, p, c, re
22	19,3	Api-C-hex (Isovitexina)	271, 337	433.1; 415.0 (pb), 397.0, 379.1, 367.2, 337.2, 313.2, 295.3, 283.2		Abad-García, B. et al., (2009)	f, p, c, re, r

A 8. Continuação.

N°	T. R. (min)	Substância fenólica	λ max. (nm)	[M+H] ⁺ ; (m/z)	[M+H] ⁺ ; (m/z)	Referência bibliográfica *	Órgão
23	19,6	Lut-O-hex-ram	251, 260sh, 347	595.2; 449.0 (pb), 286.9		Cavaliere, C. et al., (2005)	f
24	19,9	Api-O-hex 1	272, 338	433.3; 271.1 (pb)		Cavaliere, C. et al., (2005); Abad-García, B. et al., (2009)	f, re, r
25	20,9	Api-C-hex-C-pen 5	269, 338	565.3; 547.0 (pb), 529.0, 511.1, 499.1, 481.2, 469.2, 457.3, 445.2		Cavaliere, C. et al., (2005)	f, c, r
26	21,4	Api-C-hex (Vitexina)	270, 302sh, 335	433.2; 415.0 (pb), 397.0, 397.0, 379.1, 367.1, 337.1, 313.0, 295.1, 283.0		Cavaliere, C. et al., (2005); Colombo, R. et al., (2006)	r
27	22,0	Eri-O-hex 1	285, 335sh	451.1; 432.9, 415.0, 355.0, 313.0, 289.9 (pb), 152.8		Tsimogiannis, D. et al., (2007); Wu, G. et. al., 2016	g90, g120
28	22,4	Lut-O-hex 1	253sh, 268, 349	449.20; 287.09	447.19; 284.95	Lin, et al., (2007); Abad-García, B. et al., (2009)	f, r
29	22,7	Api-C-pen	268, 338	401.17; 358.13, 220.93(pb), 176.93		Álvarez-Fernández, et al., (2016)	p, c, re, r
30	22,9	Eri-O-hex 2	285, 335sh	451.1; 432.9, 415.0, 355.0, 313.0, 289.9 (pb), 152.8		Tsimogiannis, D. et al., (2007); Wu, G. et. al., 2016	g90, g120
31	23,0	Api-O-hex 2	260, 332	433.20; 325.19, 271.04 (pb), 238.13, 126.77		Cavaliere, C. et al., (2005); Abad-García, B. et al., (2009)	f
32	23,9	Derivado de tri-O-hex	340		535.34; 373.16, 353.08, 329.19 (pb)	Dong, et al., (2014)	p, c, re, r
33	24,9	Lut-O-hex 2	260, 336	449.0; 418.2, 383.1, 286.9 (pb), 221.0		Lin, et al., (2007); Abad-García, B. et al., (2009)	f
34	25,5	Api-O-hex 3	267, 337	433.0; 270.9 (pb)		Cavaliere, C. et al., (2005); Abad-García, B. et al., (2009)	f, re, r
35	25,9	Tri-O-hex 1	251, 268sh, 350	493.1; 331.1 (pb)		Cavaliere, C. et al.; (2005); Dong, et al., (2014)	f, g90, g120
36	25,9	Api-O-hex-ram	269, 340	579.2; 433.0 (pb), 270.9		Abad-García, B. et al., (2009)	f
37	26,3	Api-O-hex 4	268, 330	433.2; 270.8 (pb)		Cavaliere, C. et al., (2005); Abad-García, B. et al., (2009)	f, r
38	26,8	Cri-O-hex-ram	255, 267sh, 350	609.3; 463.0 (bp); 300.9 (pb)		Dong, et al., (2014)	f
39	27,1	Tri-O-hex-ram	251, 269, 351	639.35; 493.28 (bp), 331.17		Dong, et al., (2014)	f
40	27,3	Derivado de ác. ferúlico 4	327	544.22; 527.32, 487.39, 363.5, 339.22, 256.97, 205.91, 176.88 (bp)		Gobbo-Neto, L., & Lopes, N. P. (2008); Abad-García, B. et al., (2009)	f
41	27,4	Tri-O-hex 2	251, 268sh, 350		491.36; 329.16 (pb)	Cavaliere, C. et al., (2005); Dong, et al., (2014)	f,p, re, r
42	27,9	Cri-O-hex	252, 268sh, 350	463.2; 300.9 (pb)		Dong, et al., (2014)	f
43	28,4	Tri-O-hex 3	249, 269sh, 350	493.18; 331.14 (pb)	491.27; 476.17, 329.08	Cavaliere, C. et al., (2005); Dong, et al., (2014)	f, p, c, re, r
44	29,1	Tri-O-hex 4	251, 268sh, 350	493.0; 331.0 (pb)		Cavaliere, C. et al., (2005); Dong, et al., (2014)	f
45	29,6	Pin-O-hex	268, 310sh	419.2; 256.9 (pb)		Lin, et al., (2007)	re, r

A 8. Continuação.

N°	T. R. (min)	Substância fenólica	λ max. (nm)	[M+H] ⁺ ; (m/z)	[M+H] ⁺ ; (m/z)	Referência bibliográfica *	Órgão
46	30,0	Api-O-hex-O-hex 1	270, 330	611.35; 602.26, 558.38, 449.21, 325.11, 287.07 (pb)		Dong, et al., (2014)	f, re, g120
47	32,5	Tri-O-guaiacilgliceril-O-hex 1	250, 267sh, 297sh, 337	689.3, 527.1, 331.1 (pb)		Colombo, R. et al., (2005) Mohanlal, S. et al., (2013); Dong, et al., (2014); Chen et al., (2013)	f
48	32,8	Api-O-malhex	270, 345	519.1, 432.9, 270.8 (pb)		Dong, et al., (2014)	f
49	33,5	Tri-O-guaiacilgliceril-O-hex 2	250, 268sh, 349		687.4; 525.24, 329.07 (pb)	Colombo, R. et al., (2005) Mohanlal, S. et al., (2013); Dong, et al., (2014); Chen et al., (2013)	p, c, re
50	34,73	Derivado de ác. ferúlico 5	323	515.23; 303.05, 176.92 (pb), 144.87		Gobbo-Neto, L., & Lopes, N. P. (2008); Abad-García, B. et al., (2009)	p, c
51	40,6	Tri-O-guaiacilgliceril-O-hex 3	250, 290 sh, 337	689.36; 527.0 (pb), 493.32, 331.20, 315.1		Colombo, R. et al., (2005) Mohanlal, S. et al., (2013); Dong, et al., (2014); Chen et al., (2013)	f
52	40,9	Api-O-hex-O-hex 2	270, 330	595.28; 271.06 (pb)		Dong, et al., (2014)	f, c, re, r, g90
53	41,2	Tri-O-hex-O-hex	330	655.36; 637.44, 531.46, 331.18 (pb)		Mohanlal, S. et al., (2013)	f, p
54	41,2	Cri-O-hex-O-hex	251, 263sh, 333	625.3; 476.9, 300.9 (pb)		Mohanlal, S. et al., (2013); Dong, et al., (2014)	f
55	44,2	Derivado de tricina 1	270, 340	689.34; 491.33, 331.18 (pb), 213.00		Mohanlal, S. et al., (2013)	f, p, c, r
56	46,5	Derivado de ác. ferúlico 6	328	515.24; 303.09 (pb), 176.90 (pb)		Gobbo-Neto, L., & Lopes, N. P. (2008); Abad-García, B. et al., (2009)	p, c
57	47,0	Derivado de tricina 2	271, 341	721.40; 703.30, 673.30 (pb), 579.25, 525.21, 329.04 (pb)		Mohanlal, S. et al., (2013)	p
58	48,1	Tricina	249, 268, 299sh, 350	331.0		Dong, et al., (2014)	f, p, c, re, r
59	49,0	Derivado de ác. ferúlico 7	328	339.1; 321.0, 176.8 (pb), 144.8		Gobbo-Neto, L., & Lopes, N. P. (2008); Abad-García, B. et al., (2009)	f
60	49,4	Derivado de ác. ferúlico 8	328	515.3; 302.9, 176.8 (pb), 144.8		Gobbo-Neto, L., & Lopes, N. P. (2008); Abad-García, B. et al., (2009)	p, c
61	51,6	Tri-O-siringil álcool eter	270, 285sh, 341	497.3; 331.0 (pb)		Mohanlal, S. et al., (2013)	p
62	53,2	Tri-O-guaiacilgliceril 1	270, 305sh, 340	527.30; 331.18 (pb)	525.28; 477.18, 329.07 (pb), 194.82	Mohanlal, S. et al., (2013)	f, p, c, re
63	54,3	Tri-O-guaiacilgliceril 2	270, 305sh, 335	527.3; 331.0 (pb)		Mohanlal, S. et al., (2013)	p
64	55,1	Derivado de ác. ferúlico 9	328	515.3; 302.9 (pb), 176.8 (pb), 144.9		Gobbo-Neto, L., & Lopes, N. P. (2008); Abad-García, B. et al., (2009)	f, p, c, r
65	55,6	Tri-O-guaiacilgliceril 3	270, 340	527.19; 331.11 (pb)	525.31; 329.05 (pb), 194.88	Bouaziz, M. et al., (2002); Dong, et al., (2014)	f, p, c, re

A 8. Continuação.

N°	T. R. (min)	Substância fenólica	λ max. (nm)	[M+H] ⁺ ; (m/z)	[M+H] ⁺ ; (m/z)	Referência bibliográfica *	Órgão
66	55,8	Derivado de ác. ferúlico 10	325	369.7; 337.0 (pb), 176.8 (pb), 144.9		Gobbo-Neto, L., & Lopes, N. P. (2008); Abad-García, B. et al., (2009)	re, r
67	57,5	Derivado de ác. ferúlico 11	328	557.2; 345.0 (pb), 302.8, 284.8, 176.8 (pb)		Gobbo-Neto, L., & Lopes, N. P. (2008); Abad-García, B. et al., (2009)	p, c
68	58,0	Derivado de ác. ferúlico 12	328	515.5; 302.9, 176.8 (pb), 144.9		Gobbo-Neto, L., & Lopes, N. P. (2008); Abad-García, B. et al., (2009)	p, c, r
69	58,8	Derivado de ác. ferúlico 13	327	557.3; 344.9, 302.9, 259.9, 176.8 (pb)		Gobbo-Neto, L., & Lopes, N. P. (2008); Abad-García, B. et al., (2009)	p, c, re, r
70	61,3	Tri-O-guaiacilgliceril metoxi 1	269, 340	541.22; 331.13 (pb)		Bouaziz, M. et al., (2002); Dong, et al., (2014)	f, p, c
71	61,7	Tri-O-guaiacilgliceril metoxi 2	270, 340	541.18; 331.15 (pb)		Bouaziz, M. et al., (2002); Dong, et al., (2014)	f, p, c, r
72	62,3	Derivado de ác. ferúlico 14	328	557.4; 345.0, 302.9, 284.9, 220.85, 176.8 (pb)		Gobbo-Neto, L., & Lopes, N. P. (2008); Abad-García, B. et al., (2009)	f, p, c, re, r, g90, g120

T.R.: Tempo de retenção; f: folhas; p: pedúnculo; c: colmo; re: raízes escoras; r: raízes; g90: grãos aos 90 DAP; g120: grãos aos 120 DAP; nd: não detectado; pb: pico base.

* Referência bibliográfica

- Abad-García, B., Berrueta, L. A., Garmón-Lobato, S., Gallo, B., Vicente, F. (2009). A general analytical strategy for the characterization of phenolic compounds in fruit juices by high-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray ionization and triple quadrupole mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1216, 5398-5415.
- Álvarez-Fernández, M. A., Hornedo-Ortega, R., Cerezo, A. B., Troncoso, A. M., García-Parrilla, M. C. (2016). Determination of nonanthocyanin phenolic compounds using high-resolution mass spectrometry (UHPLC-Orbitrap-MS/MS) and impact of storage conditions in a beverage made from strawberry by fermentation. *Journal of agricultural and food chemistry*, 64, 1367-1376.
- Benayad, Z., Gómez-Cordovés, C., Es-Safi, N. E. (2014). Characterization of flavonoid glycosides from fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) crude seeds by HPLC-DAD-ESI/MS analysis. *International journal of molecular sciences*, 15, 20668-20685.
- Bouaziz, M., Veitch, N. C., Grayer, R. J., Simmonds, M. S., Damak, M. (2002). Flavonolignans from *Hyparrhenia hirta*. *Phytochemistry*, 60, 515-520.
- Carbonara, T., Pascale, R., Argentieri, M. P., Papadia, P., Fanizzi, F. P., Villanova, L., Avato, P. (2012). Phytochemical analysis of a herbal tea from *Artemisia annua* L. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 62, 79-86.

- Cavaliere, C., Foglia, P., Pastorini, E., Samperi, R., Laganà, A. (2005). Identification and mass spectrometric characterization of glycosylated flavonoids in *Triticum durum* plants by high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry*, 19, 3143-3158.
- Chen, W., Gong, L., Guo, Z., Wang, W., Zhang, H., Liu, X., Yu, S., Xiong, L., Luo, J. (2013). A novel integrated method for large-scale detection, identification, and quantification of widely targeted metabolites: application in the study of rice metabolomics. *Molecular plant*, 6, 1769-1780.
- Colombo, R., Yariwake, J. H., Queiroz, E. F., Ndjoko, K., Hostettmann, K. (2005). On-line identification of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) methoxyflavones by liquid chromatography–UV detection using post-column derivatization and liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1082, 51-59.
- Colombo, R., Yariwake, J. H., Queiroz, E. F., Ndjoko, K., Hostettmann, K. (2006). On-line identification of further flavone C- and O-Glycosides from sugarcane (*Saccharum officinarum* L., Gramineae) by HPLC-UV-MS. *Phytochemical Analysis*, 17, 337-343.
- Dong, X., Chen, W., Wang, W., Zhang, H., Liu, X., Luo, J. (2014). Comprehensive profiling and natural variation of flavonoids in rice. *Journal of integrative plant biology*, 56, 876-886.
- Ferreres, F., Andrade, P. B., Valentao, P., Gil-Izquierdo, A. (2008). Further knowledge on barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves O-glycosyl-C-glycosyl flavones by liquid chromatography-UV diode-array detection-electrospray ionisation mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1182, 56-64.
- Ferreres, F., Gil-Izquierdo, A., Vinholes, J., Grosso, C., Valentão, P., Andrade, P. (2011). Approach to the study of C-glycosyl flavones acylated with aliphatic and aromatic acids from *Spergularia rubra* by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection/electrospray ionization multi-stage mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 25, 700-712.
- Gobbo-Neto, L., Lopes, N. P. (2008). Online identification of chlorogenic acids, sesquiterpene lactones, and flavonoids in the Brazilian arnica *Lychnophora ericoides* Mart.(Asteraceae) leaves by HPLC-DAD-MS and HPLC-DAD-MS/MS and a validated HPLC-DAD method for their simultaneous analysis. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56, 1193-1204.
- Lin, L., Mukhopadhyay, S., Robbins, R. J., Harnly, J. M. (2007). Identification and quantification of flavonoids of Mexican oregano (*Lippia graveolens*) by LC-DAD-ESI/MS analysis. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20, 361–369.
- Mohanlal, S., Maney, S. K., Santhoshkumar, T. R., Jayalekshmy, A. (2013). Tricin 4'-O-(erythro- β -guaiacylglyceryl) ether and tricin 4'-O-(threo- β -guaiacylglyceryl) ether isolated from Njavara (*Oryza sativa* L. var. Njavara), induce apoptosis in multiple tumor cells by mitochondrial pathway. *Journal of natural medicines*, 67, 528-533.
- Narváez-Cuenca, C. E., Vincken, J. P., Gruppen, H. (2012). Identification and quantification of (dihydro) hydroxycinnamic acids and their conjugates in potato by UHPLC–DAD–ESI-MSn. *Food chemistry*, 130, 730-738.
- Tsimogiannis, D., Samiotaki, M., Panayotou, G., Oreopoulou, V. (2007). Characterization of flavonoid subgroups and hydroxy substitution by HPLC-MS/MS. *Molecules*, 12, 593-606.
- Wu, G., Johnson, S. K., Bornman, J. F., Bennett, S. J., Clarke, M. W., Singh, V., Fang, Z. (2016). Growth temperature and genotype both play important roles in sorghum grain phenolic composition. *Scientific reports*, 6, 21835.

A 9. Conteúdo das substâncias fenólicas (ng.mg⁻¹ massa seca) nas folhas de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) variedade BRS 330, cultivadas em câmaras de topo aberto, sob atmosferas com CO₂ ambiente (**A**) e CO₂ elevado (**E**) aos 90 e 120 DAP. Barras representam a média ± erro padrão (N=5).

	Substância fenólica	90 DAP			120 DAP		
		[CO ₂] A	[CO ₂] E	% efeito	[CO ₂] A	[CO ₂] E	% efeito
Fenilpropanoide	Ác. 3-O-cafeoilquínico	102.4 ± 5.7	109.4 ± 4.7	7	156.8 ± 22.0	108.1 ± 28.4	-31
	Derivado de ác. ferúlico 1	50.4 ± 0.4	52.2 ± 0.3	4	69.2 ± 12.4	54.2 ± 5.1	-22
	Ác. 5-O-cafeoilquínico	606.0 ± 87.7	927.7 ± 91.3	53	399.2 ± 119.7	371.9 ± 116.6	-7
	Derivado de ác. ferúlico 2	185.2 ± 12.4	227.8 ± 14.9	23	184.4 ± 31.6	185.9 ± 57.3	1
	Ác. 4-O-cafeoilquínico	157.1 ± 5.6	190.7 ± 6.4	21	192.6 ± 25.1	163.7 ± 53.9	-15
	Ác. 3-O-feruloilquínico	285.6 ± 25.4	214.0 ± 4.3	-25	202.0 ± 14.6	181.2 ± 46.1	-10
	Derivado de ác. cafeico 1	65.1 ± 3.0	71.0 ± 2.8	9	81.6 ± 14.9	76.8 ± 20.4	-6
	Derivado de ác. cafeico 2	72.6 ± 1.4	76.1 ± 1.5	5	111.9 ± 23.1	84.7 ± 13.8	-24
	Ac. 4-O-feruloilquínico	237.8 ± 5.9	252.7 ± 8.9	6	201.3 ± 22.5	174.8 ± 22.7	-13
	Derivado de ác. ferúlico 3	119.2 ± 10.7	114.3 ± 9.3	-4	228.2 ± 21.1	131.3 ± 33.6	-42
	Derivado de ác. cafeico 4	56.7 ± 1.6	61.5 ± 2.0	9	78.9 ± 15.3	59.3 ± 7.2	-25
	Derivado de ác. ferúlico 4	47.4 ± 0.7	48.0 ± 0.8	1	70.3 ± 13.1	50.1 ± 1.8	-29
	Derivado de ác. ferúlico 7	71.5 ± 3.4	55.6 ± 14.3	-22	56.6 ± 10.5	23.7 ± 6.2	-58
	Derivado de ác. ferúlico 9	48.4 ± 1.2	49.8 ± 0.6	3	69.1 ± 12.3	53.3 ± 4.6	-23
	Derivado de ác. ferúlico 14	48.5 ± 0.6	50.5 ± 0.8	4	64.6 ± 12.0	56.2 ± 7.0	-13
Flavonoide	Api-C-pen-C-pen	14.4 ± 2.9	11.3 ± 0.3	-22	17.4 ± 0.4	10.9 ± 3.9	-37
	Api-C-hex-C-pen 2	12.2 ± 1.1	14.3 ± 0.8	17	26.2 ± 3.9	23.4 ± 8.4	-11
	Api-C-hex-C-pen 3	144.8 ± 7.3	188.9 ± 12.3	30	243.7 ± 31.2	196.0 ± 39.1	-20
	Api-C-hex-C-pen 4	92.7 ± 12.5	164.0 ± 15.1	77	237.1 ± 45.2	174.9 ± 38.5	-26
	Tri-O-hex-O-hex 1	41.5 ± 0.7	50.8 ± 5.8	22	43.5 ± 2.2	46.2 ± 11.0	6
	Api-C-hex (Isovitexina)	58.1 ± 3.5	80.2 ± 5.0	38	105.1 ± 14.4	64.9 ± 17.8	-38
	Lut-O-hex-ram	15.4 ± 1.5	45.9 ± 8.0	198	38.3 ± 11.3	33.8 ± 7.7	-12
	Api-O-hex 1	12.4 ± 0.8	21.1 ± 2.0	70	22.2 ± 2.8	17.6 ± 4.1	-21
	Api-C-hex-C-pen 5	14.8 ± 1.4	19.5 ± 2.1	32	23.0 ± 3.2	18.8 ± 6.3	-18
	Lut-O-hex 1	215.3 ± 21.3	370.8 ± 68.1	72	623.6 ± 108.4	439.2 ± 125.3	-30
	Api-O-hex 2	62.3 ± 10.1	144.3 ± 30.2	132	150.7 ± 40.6	125.9 ± 31.0	-16
	Lut-O-hex 2	42.7 ± 9.2	85.7 ± 12.2	101	133.1 ± 31.2	107.8 ± 31.6	-19
	Api-O-hex 3	31.9 ± 2.1	42.9 ± 4.5	35	68.8 ± 9.5	52.4 ± 13.1	-24
	Tri-O-hex 1	161.6 ± 31.7	244.2 ± 51.0	51	327.3 ± 65.1	245.1 ± 68.1	-25
	Api-O-hex-ram	19.1 ± 2.7	27.0 ± 4.0	41	40.5 ± 7.3	43.2 ± 15.3	7
	Api-O-hex 4	196.0 ± 14.2	288.4 ± 16.1	47	297.3 ± 40.8	236.7 ± 49.1	-20
	Cri-O-hex-ram	23.1 ± 1.4	33.6 ± 1.5	45	32.4 ± 3.1	28.5 ± 7.7	-12
	Tri-O-hex-ram	43.6 ± 3.2	49.0 ± 1.0	12	45.8 ± 3.3	41.2 ± 8.8	-10
	Tri-O-hex 2	15.5 ± 1.3	20.9 ± 1.7	35	28.1 ± 5.0	21.0 ± 5.2	-25
	Cri-O-hex	28.5 ± 3.3	44.9 ± 3.3	58	66.1 ± 11.3	51.6 ± 16.9	-22
	Tri-O-hex 3	51.5 ± 2.4	65.8 ± 1.7	28	64.0 ± 6.8	51.5 ± 11.5	-20

Substância fenólica	90 DAP			120 DAP		
	[CO ₂] A	[CO ₂] E	% efeito	[CO ₂] A	[CO ₂] E	% efeito
Tri-O-hex 4	32.3 ± 5.6	55.4 ± 11.6	72	61.1 ± 14.4	69.5 ± 22.6	14
Api-O-hex-O-hex 1	75.3 ± 5.5	107.7 ± 5.0	43	144.9 ± 18.3	114.8 ± 26.6	-21
Tri-O-guaiacilgliceril-O-hex 1	6.4 ± 0.9	10.7 ± 2.3	67	32.2 ± 7.5	22.2 ± 10.0	-31
Api-O-malhex	21.4 ± 1.2	24.2 ± 1.1	13	21.0 ± 1.1	19.1 ± 5.8	-9
Tri-O-guaiacilgliceril-O-hex 3	193.0 ± 26.7	308.9 ± 33.1	60	293.2 ± 28.4	248.4 ± 72.9	-15
Api-O-hex-O-hex 2	85.8 ± 8.5	97.9 ± 9.4	14	112.7 ± 11.7	98.9 ± 48.2	-12
Tri-O-hex-O-hex 2	51.0 ± 12.6	79.3 ± 4.5	55	38.9 ± 12.2	31.5 ± 11.0	-19
Cri-O-hex-O-hex	17.0 ± 0.7	29.2 ± 6.6	72	74.0 ± 13.2	50.2 ± 18.7	-32
Derivado de tricina 1	29.9 ± 1.8	34.9 ± 1.2	17	43.0 ± 6.6	27.6 ± 6.5	-36
Tricina	157.3 ± 11.6	153.9 ± 12.7	-2	169.5 ± 15.2	105.7 ± 28.3	-38
Tri-O-guaiacilgliceril 1	41.5 ± 2.2	41.7 ± 2.8	0	35.5 ± 5.5	40.9 ± 7.9	15
Tri-O-guaiacilgliceril 3	36.0 ± 1.9	35.9 ± 1.9	0	49.3 ± 6.9	37.4 ± 6.9	-24
Tri-O-guaiacilgliceril metoxi 1	16.4 ± 1.0	17.0 ± 1.6	3	17.2 ± 2.3	14.7 ± 3.6	-15
Tri-O-guaiacilgliceril metoxi 2	26.7 ± 1.0	23.8 ± 1.8	-11	25.9 ± 1.4	22.4 ± 5.2	-14

Api: apigenina; Lut: leuteolina; Tri: tricina; Cri: crisoeriol; pen: pentose; hex: hexose; ram: ramnose; mal: maloil. Os valores em negrito indicam diferenças estatísticas significativas entre tratamentos ($P < 0,05$).

A 10. Conteúdo das substâncias fenólicas (ng.mg⁻¹ massa seca) no pedúnculo de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) variedade BRS 330, cultivadas em câmaras de topo aberto, sob atmosferas com CO₂ ambiente (**A**) e CO₂ elevado (**E**) aos 90 e 120 DAP. Barras representam a média ± erro padrão (N=5).

Substância fenólica	90 DAP			120 DAP			
	[CO ₂] A	[CO ₂] E	% efeito	[CO ₂] A	[CO ₂] E	% efeito	
Fenilpropanoide	Ác. 5-O-cafeoilquínico	46.4 ± 0.7	56.6 ± 11.8	22	67.7 ± 6.3	65.8 ± 7.6	-3
	Ác. 4-O-cafeoilquínico	42.8 ± 0.3	43.9 ± 1.6	3	64.2 ± 1.8	63.5 ± 12.5	-1
	Ác. 3-O-feruloilquínico	74.8 ± 8.7	65.7 ± 7.0	-12	98.9 ± 16.6	87.9 ± 11.2	-11
	Derivado de ác. cafeico 2	47.9 ± 1.1	267.8 ± 159.4	459	45.7 ± 0.7	60.4 ± 9.9	32
	Ac. 4-O-feruloilquínico	418.6 ± 44.9	318.1 ± 31.0	-24	463.8 ± 29.0	520.2 ± 68.2	12
	Derivado de ác. cafeico 4	52.0 ± 0.7	49.5 ± 3.0	-5	48.2 ± 0.6	52.3 ± 3.1	9
	Derivado de ác. ferúlico 5	51.5 ± 0.8	44.6 ± 1.5	-14	48.3 ± 0.8	52.3 ± 3.9	8
	Derivado de ác. ferúlico 6	51.8 ± 1.5	42.1 ± 3.4	-19	56.6 ± 1.9	63.8 ± 7.1	13
	Derivado de ác. ferúlico 8	66.1 ± 6.0	51.6 ± 4.2	-22	95.1 ± 12.5	90.2 ± 4.3	-5
	Derivado de ác. ferúlico 9	96.4 ± 6.4	66.3 ± 7.3	-31	69.3 ± 4.3	95.3 ± 11.6	38
	Derivado de ác. ferúlico 11	52.9 ± 1.2	49.7 ± 2.2	-6	55.5 ± 0.9	60.7 ± 5.8	9
	Derivado de ác. ferúlico 12	55.8 ± 1.6	51.6 ± 3.0	-7	59.1 ± 1.5	65.7 ± 8.6	11
	Derivado de ác. ferúlico 13	67.7 ± 3.0	51.7 ± 3.9	-24	61.9 ± 2.4	67.4 ± 7.8	9
	Derivado de ác. ferúlico 14	136.4 ± 9.1	147.0 ± 15.5	8	77.0 ± 5.0	98.5 ± 10.4	28
Flavonoide	Apig-C-hex-C-pen 1	15.5 ± 1.3	11.7 ± 1.4	-25	22.1 ± 1.1	18.1 ± 2.0	-18
	Lut-C-hex-C-pen	11.3 ± 0.6	10.0 ± 1.4	-11	12.1 ± 0.9	14.6 ± 1.4	20
	Api-C-hex-C-pen 2	10.7 ± 2.0	5.0 ± 0.6	-53	9.9 ± 0.6	11.4 ± 0.9	15
	Api-C-hex-C-pen 3	51.3 ± 5.2	36.2 ± 8.2	-29	51.0 ± 4.3	54.0 ± 5.5	6
	Tri-O-hex-O-hex 1	35.0 ± 1.0	24.8 ± 7.7	-29	35.0 ± 1.7	40.9 ± 3.9	17
	Api-C-hex (Isovitexina)	19.1 ± 2.0	14.6 ± 3.0	-24	20.8 ± 1.8	24.2 ± 3.2	17
	Api-C-pen	16.1 ± 1.0	13.2 ± 1.8	-18	12.9 ± 0.7	14.2 ± 2.8	10
	Derivado de tri-O-hex	35.2 ± 3.8	33.9 ± 4.6	-4	25.8 ± 0.6	28.5 ± 2.9	11
	Tri-O-hex 2	12.5 ± 1.3	10.0 ± 3.3	-20	23.3 ± 7.3	31.2 ± 6.4	34
	Tri-O-hex 3	22.7 ± 1.8	19.5 ± 2.9	-14	26.4 ± 1.5	29.8 ± 4.7	13
	Tri-O-guaiacilgliceril-O-hex 2	19.1 ± 1.6	14.4 ± 2.0	-25	18.1 ± 1.2	21.3 ± 2.7	17
	Tri-O-hex-O-hex 2	54.3 ± 3.4	35.2 ± 4.6	-35	64.5 ± 5.6	41.2 ± 10.6	-36
	Derivado de tricina 1	16.2 ± 2.4	18.5 ± 3.7	14	18.9 ± 1.0	23.5 ± 3.3	24
	Derivado de tricina 2	13.5 ± 0.7	13.1 ± 4.5	-3	13.1 ± 0.7	12.7 ± 0.6	-3
	Tricina	108.6 ± 39.6	140.4 ± 20.0	29	175.9 ± 30.1	189.1 ± 24.5	8
	Tri-O-siringil álcool eter	24.4 ± 2.9	17.5 ± 2.6	-28	25.3 ± 3.0	22.8 ± 5.6	-10
	Tri-O-guaiacilgliceril 1	155.0 ± 12.0	103.9 ± 17.8	-33	169.8 ± 14.6	182.0 ± 24.1	7
	Tri-O-guaiacilgliceril 2	24.7 ± 2.2	18.2 ± 3.2	-26	27.6 ± 1.0	31.2 ± 4.7	13
	Tri-O-guaiacilgliceril 3	112.8 ± 8.0	89.5 ± 14.7	-21	136.7 ± 11.7	153.5 ± 19.3	12
	Tri-O-guaiacilgliceril metoxi 1	42.9 ± 5.5	34.0 ± 6.2	-21	40.8 ± 4.7	43.0 ± 4.5	5
	Tri-O-guaiacilgliceril metoxi 2	65.6 ± 7.8	56.8 ± 10.2	-13	70.5 ± 7.6	74.3 ± 8.8	5

Api: apigenina; Lut: leuteolina; Tri: tricina; pen: pentose; hex: hexose; ram: ramnose; mal: maloil. Os valores em negrito indicam diferenças estadísticas significativas entre tratamentos ($P < 0,05$).

A 11. Conteúdo das substâncias fenólicas (ng.mg⁻¹ massa seca) no colmo de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) variedade BRS 330, cultivadas em câmaras de topo aberto, sob atmosferas com CO₂ ambiente (**A**) e CO₂ elevado (**E**) aos 90 e 120 DAP. Barras representam a média ± erro padrão (N=5).

Substância fenólica		90 DAP			120 DAP		
		[CO ₂] A	[CO ₂] E	% efeito	[CO ₂] A	[CO ₂] E	% efeito
Fenilpropanoide	Ác. 5-O-cafeoilquínico	65.3 ± 4.5	60.1 ± 3.7	-8	57.2 ± 4.9	66.6 ± 4.0	16
	Ác. 3-O-feruloilquínico	63.1 ± 2.1	55.6 ± 1.5	-12	59.4 ± 4.8	72.6 ± 12.4	22
	Derivado de ác. cafeico 2	62.0 ± 5.2	66.6 ± 5.2	7	50.6 ± 1.9	58.0 ± 2.8	15
	Ac. 4-O-feruloilquínico	501.5 ± 24.1	473.0 ± 28.2	-6	436.8 ± 25.3	497.3 ± 73.9	14
	Derivado de ác. ferúlico 5	49.8 ± 0.2	48.6 ± 0.9	-2	48.4 ± 0.9	49.3 ± 2.0	2
	Derivado de ác. ferúlico 6	48.1 ± 0.9	47.8 ± 1.7	-1	45.9 ± 0.3	46.1 ± 0.6	0
	Derivado de ác. ferúlico 8	48.4 ± 2.7	44.9 ± 1.5	-7	44.9 ± 0.7	44.6 ± 0.8	-1
	Derivado de ác. ferúlico 9	48.8 ± 1.4	51.7 ± 2.5	6	47.1 ± 1.5	47.1 ± 1.8	0
	Derivado de ác. ferúlico 11	47.8 ± 0.9	46.0 ± 1.0	-4	46.6 ± 0.3	45.9 ± 1.0	-1
	Derivado de ác. ferúlico 12	50.7 ± 0.9	49.2 ± 1.3	-3	48.8 ± 0.5	48.3 ± 1.8	-1
	Derivado de ác. ferúlico 13	59.8 ± 0.9	60.0 ± 2.2	0	52.9 ± 0.8	55.2 ± 1.8	4
	Derivado de ác. ferúlico 14	58.4 ± 2.2	65.0 ± 2.5	11	53.9 ± 2.1	57.3 ± 2.2	6
Flavonoide	Api-C-hex-C-pen 2	16.8 ± 1.0	13.6 ± 1.5	-19	13.0 ± 2.5	12.8 ± 0.9	-2
	Api-C-hex-C-pen 3	89.8 ± 7.5	64.6 ± 6.6	-28	76.4 ± 18.4	52.5 ± 12.8	-31
	Tri-O-hex-O-hex 1	59.6 ± 2.7	46.8 ± 3.4	-22	51.4 ± 5.8	71.0 ± 8.1	38
	Api-C-hex (Isovitexina)	14.1 ± 0.8	12.2 ± 1.2	-14	11.9 ± 3.4	13.3 ± 1.5	12
	Api-C-hex-C-pen 5	10.3 ± 0.5	8.1 ± 0.4	-22	7.7 ± 1.5	7.8 ± 0.9	2
	Api-C-pen	7.0 ± 0.7	7.4 ± 0.5	6	5.0 ± 0.6	7.3 ± 1.8	46
	Derivado de tri-O-hex	33.0 ± 1.0	32.7 ± 1.9	-1	23.2 ± 1.7	28.7 ± 3.3	24
	Tri-O-hex 3	15.7 ± 0.7	16.8 ± 1.5	7	14.4 ± 2.5	16.2 ± 1.9	12
	Tri-O-guaiacilgliceril-O-hex 2	15.8 ± 0.6	17.9 ± 1.7	13	16.7 ± 2.4	17.9 ± 1.5	7
	Api-O-hex-O-hex 2	18.1 ± 1.9	19.5 ± 2.7	8	6.9 ± 2.9	12.5 ± 2.1	80
	Derivado de tricina 1	8.3 ± 0.3	9.8 ± 1.0	18	8.9 ± 0.7	10.2 ± 1.2	14
	Tricina	50.2 ± 3.9	51.2 ± 6.4	2	43.3 ± 7.2	50.6 ± 11.5	17
	Tri-O-guaiacilgliceril 1	35.6 ± 2.6	40.9 ± 5.2	15	40.6 ± 2.9	40.2 ± 9.0	-1
	Tri-O-guaiacilgliceril 3	36.0 ± 1.3	35.2 ± 3.9	-2	35.9 ± 2.7	33.8 ± 8.0	-6
	Tri-O-guaiacilgliceril metoxi 1	17.1 ± 0.6	18.8 ± 1.7	10	18.3 ± 1.0	15.1 ± 2.1	-18
	Tri-O-guaiacilgliceril metoxi 2	18.6 ± 1.1	24.1 ± 2.9	30	18.3 ± 1.1	19.1 ± 4.3	5

Api: apigenina; Tri: tricina; pen: pentose; hex: hexose; ram: ramnose; mal: malolil. Os valores em negrito indicam diferenças estatísticas significativas entre tratamentos ($P < 0,05$).

A 12. Conteúdo das substâncias fenólicas (ng.mg⁻¹ massa seca) nas raízes escoras de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) variedade BRS 330, cultivadas em câmaras de topo aberto, sob atmosferas com CO₂ ambiente (**A**) e CO₂ elevado (**E**) aos 90 e 120 DAP. Barras representam a média ± erro padrão (N=5).

	Substância fenólica	90 DAP			120 DAP		
		[CO ₂] A	[CO ₂] E	% efeito	[CO ₂] A	[CO ₂] E	% efeito
Fenilpropanoide	Ác. 3-O-cafeoilquínico	46.1 ± 0.5	44.0 ± 0.7	-5	35.8 ± 8.1	45.2 ± 0.2	26
	Ác. 5-O-cafeoilquínico	64.3 ± 4.5	57.7 ± 4.9	-10	45.1 ± 11.1	58.3 ± 3.4	29
	Ác. 4-O-cafeoilquínico	46.6 ± 0.7	46.2 ± 0.6	-1	38.0 ± 8.7	46.7 ± 0.3	23
	Ác. 3-O-feruloilquínico	67.2 ± 3.4	63.7 ± 4.1	-5	58.9 ± 15.5	65.3 ± 1.6	11
	Derivado de ác. cafeico 2	44.7 ± 0.4	44.1 ± 0.7	-1	34.1 ± 7.7	45.1 ± 0.3	32
	Ac. 4-O-feruloilquínico	421.0 ± 14.1	386.7 ± 20.2	-8	331.5 ± 80.0	372.4 ± 23.1	12
	Derivado de ác. ferúlico 3	49.2 ± 0.6	50.6 ± 0.7	3	48.8 ± 12.1	57.1 ± 2.3	17
	Derivado de ác. cafeico 4	60.7 ± 2.0	55.1 ± 2.5	-9	34.6 ± 7.9	47.4 ± 2.0	37
	Derivado de ác. ferúlico 10	47.8 ± 0.6	47.1 ± 1.4	-1	36.8 ± 8.3	49.6 ± 1.7	35
	Derivado de ác. ferúlico 13	46.2 ± 0.8	44.6 ± 0.8	-4	35.0 ± 7.9	47.5 ± 0.4	36
	Derivado de Ác. ferúlico 14	63.9 ± 1.9	64.1 ± 1.2	0	38.8 ± 8.5	51.1 ± 0.6	32
Flavonoide	Lut-C-hex-C-pen	8.9 ± 0.4	9.2 ± 0.5	4	4.5 ± 1.1	7.5 ± 0.6	67
	Api-C-hex-C-pen 2	4.5 ± 0.4	5.8 ± 0.6	28	3.7 ± 1.2	5.6 ± 1.0	50
	Api-C-hex-C-pen 3	46.1 ± 5.4	43.4 ± 5.6	-6	11.9 ± 4.7	35.3 ± 8.9	196
	Api-C-hex-C-pen 4	7.0 ± 1.3	8.1 ± 1.3	16	3.2 ± 0.7	5.1 ± 0.6	60
	Tri-O-hex-O-hex 1	8.9 ± 0.3	9.1 ± 0.4	2	7.0 ± 2.0	9.7 ± 0.8	38
	Api-C-hex (Isovitexina)	9.5 ± 1.1	10.3 ± 0.8	8	4.9 ± 1.2	9.0 ± 1.9	82
	Api-O-hex 1	2.3 ± 0.3	2.4 ± 0.2	5	0.6 ± 0.2	1.8 ± 0.4	174
	Api-C-pen	23.6 ± 1.5	23.9 ± 1.3	1	21.2 ± 5.7	28.2 ± 2.8	33
	Derivado de tri-O-hex	46.7 ± 2.9	51.2 ± 2.1	10	31.0 ± 7.2	43.9 ± 6.1	42
	Api-O-hex 3	6.7 ± 0.6	6.6 ± 0.8	-2	3.3 ± 0.7	4.9 ± 0.7	46
	Tri-O-hex 2	47.8 ± 5.1	47.1 ± 5.7	-1	9.1 ± 1.8	22.8 ± 6.2	150
	Tri-O-hex 3	11.9 ± 0.5	13.0 ± 0.9	10	8.9 ± 2.1	13.6 ± 0.9	53
	Pin-O-hex	27.4 ± 3.5	21.3 ± 3.1	-22	10.3 ± 2.2	10.3 ± 1.3	-0
	Api-O-hex-O-hex 1	1.1 ± 0.1	2.2 ± 0.3	102	0.7 ± 0.3	0.6 ± 0.2	-10
	Tri-O-guaiacilgliceril-O-hex 2	36.6 ± 5.5	23.9 ± 3.4	-35	12.6 ± 3.0	9.0 ± 0.9	-28
	Api-O-hex-O-hex 2	6.9 ± 1.2	4.3 ± 1.1	-38	3.1 ± 1.1	3.9 ± 1.7	29
	Tricina	23.3 ± 0.8	26.8 ± 3.9	15	16.0 ± 3.8	27.3 ± 4.3	71
	Tri-O-guaiacilgliceril 1	11.2 ± 0.7	22.7 ± 5.6	102	13.7 ± 3.5	26.4 ± 5.4	93
	Tri-O-guaiacilgliceril 3	17.9 ± 0.2	23.8 ± 2.9	33	13.2 ± 3.1	23.0 ± 4.0	74

Api: apigenina; Lut: leuteolina; Tri: tricina; pen: pentose; hex: hexose; ram: ramnose; mal: maloil. Os valores em negrito indicam diferenças estadísticas significativas entre tratamentos ($P < 0,05$).

A 13. Conteúdo das substâncias fenólicas (ng.mg⁻¹ massa seca) nas raízes de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) variedade BRS 330, cultivadas em câmaras de topo aberto, sob atmosferas com CO₂ ambiente (A) e CO₂ elevado (E) aos 90 e 120 DAP. Barras representam a média ± erro padrão (N=5).

Substância fenólica	90 DAP			120 DAP			
	[CO ₂] A	[CO ₂] E	% efeito	[CO ₂] A	[CO ₂] E	% efeito	
Fenilpropanoide	Ác. 5-O-cafeoilquínico	47.4 ± 0.5	47.5 ± 0.4	0	45.1 ± 0.3	48.6 ± 3.2	8
	Ac. 4-O-feruloilquínico	205.4 ± 17.8	174.8 ± 18.1	-15	141.7 ± 9.1	184.6 ± 25.0	30
	Derivado de ác. cafeico 4	58.4 ± 1.1	57.1 ± 1.6	-2	55.6 ± 1.9	59.4 ± 4.0	7
	Ácido ferúlico	51.5 ± 0.7	52.5 ± 1.2	2	47.1 ± 1.4	51.2 ± 3.4	9
	Derivado de ác. ferúlico 9	64.2 ± 4.0	82.4 ± 5.5	28	61.7 ± 3.8	81.4 ± 10.6	32
	Derivado de ác. ferúlico 10	52.6 ± 1.3	58.0 ± 1.7	10	56.2 ± 3.8	60.0 ± 6.0	7
	Derivado de ác. ferúlico 12	45.8 ± 1.2	46.3 ± 0.5	1	45.2 ± 1.5	48.3 ± 3.6	7
	Derivado de ác. ferúlico 13	45.2 ± 1.1	52.3 ± 1.9	16	48.7 ± 1.6	50.7 ± 5.6	4
	Derivado de ác. ferúlico 14	122.8 ± 8.7	142.1 ± 13.8	16	117.2 ± 10.8	145.2 ± 29.8	24
Flavonoide	Apig-C-hex-C-pen 1	34.7 ± 1.0	38.5 ± 3.1	11	27.8 ± 2.1	31.2 ± 1.9	13
	Api-O,C-dihex	4.9 ± 0.5	5.8 ± 0.5	20	3.0 ± 0.3	3.9 ± 0.6	29
	Lut-C-hex-C-pen	8.3 ± 0.3	9.7 ± 1.3	16	6.7 ± 1.2	10.2 ± 1.5	53
	Api-C-hex-C-pen 3	45.3 ± 5.6	66.1 ± 8.8	46	40.3 ± 11.6	72.5 ± 14.4	80
	Api-C-hex (Isovitexina)	10.0 ± 1.9	9.6 ± 0.6	-4	8.3 ± 2.4	14.3 ± 3.4	72
	Api-O-hex 1	10.7 ± 1.0	11.1 ± 2.2	4	3.9 ± 1.0	6.1 ± 1.1	54
	Api-C-hex-C-pen 5	33.1 ± 3.6	21.6 ± 2.9	-35	22.0 ± 7.5	14.3 ± 2.5	-35
	Api-C-hex (Vitexina)	6.1 ± 0.8	8.0 ± 0.7	31	4.9 ± 1.0	8.3 ± 2.3	70
	Lut-O-hex 1	31.6 ± 2.4	37.3 ± 3.9	18	23.7 ± 4.8	30.9 ± 1.4	30
	Api-C-pen	5.2 ± 0.3	6.3 ± 0.8	21	3.2 ± 0.3	5.2 ± 1.3	62
	Derivado de tri-O-hex	26.9 ± 1.1	29.2 ± 2.4	8	12.8 ± 1.0	22.1 ± 3.2	72
	Api-O-hex 3	8.8 ± 0.2	10.2 ± 1.3	16	3.6 ± 0.4	7.6 ± 0.8	110
	Api-O-hex 4	9.6 ± 1.3	8.2 ± 1.0	-15	5.7 ± 1.8	8.0 ± 2.0	41
	Tri-O-hex 2	35.9 ± 1.4	48.4 ± 10.1	35	22.0 ± 3.7	38.0 ± 7.7	73
	Tri-O-hex 3	15.0 ± 0.9	18.2 ± 1.6	21	10.8 ± 0.9	17.0 ± 2.0	57
	Pin-O-hex	39.7 ± 9.4	53.5 ± 4.6	35	24.9 ± 3.2	43.7 ± 2.7	76
	Api-O-hex-O-hex 2	30.4 ± 6.8	23.9 ± 6.7	-22	25.5 ± 7.7	20.1 ± 3.7	-21
	Derivado de tricina 1	9.2 ± 0.9	9.2 ± 0.8	1	10.9 ± 2.3	8.4 ± 0.8	-23
	Tricina	12.5 ± 0.5	12.7 ± 1.9	1	7.5 ± 1.5	11.6 ± 1.9	54
	Tri-O-guaiacilgliceril metoxi 2	7.4 ± 0.3	8.8 ± 0.8	19	8.0 ± 1.1	9.9 ± 0.5	25

Api: apigenina; Lut: leuteolina; Tri: tricina; Pin: pinocembrina; pen: pentose; hex: hexose; ram: ramnose; mal: malol. Os valores em negrito indicam diferenças estadísticas significativas entre tratamentos ($P < 0,05$).

A 14. Conteúdo das substâncias fenólicas (ng.mg⁻¹ massa seca) nos grãos de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) variedade BRS 330, cultivadas em câmaras de topo aberto, sob atmosferas com CO₂ ambiente (**A**) e CO₂ elevado (**E**) aos 90 e 120 DAP. Barras representam a média ± erro padrão (N=5).

		90 DAP			120 DAP		
Substância fenólica		[CO ₂] A	[CO ₂] E	% efeito	[CO ₂] A	[CO ₂] E	% efeito
Fenilpropanoide	Ác. 3-O-cafeoilquínico	29.5 ± 1.0	32.8 ± 1.9	11	26.6 ± 0.2	26.7 ± 0.2	1
	Derivado de ác. ferúlico 1	32.8 ± 0.6	30.2 ± 0.9	-8	29.0 ± 0.5	29.6 ± 0.7	2
	Ác. 3-O-feruloilquínico	n. d.	n. d.		59.6 ± 10.8	49.0 ± 10.6	-18
	Derivado de ác. cafeico 2	29.2 ± 1.5	40.3 ± 9.7	38	n. d.	n. d.	
	Derivado de ác. cafeico 3	n. d.	n. d.		73.6 ± 11.4	53.0 ± 13.5	-28
	Ac. 4-O-feruloilquínico	31.9 ± 1.3	40.8 ± 3.5	28	29.8 ± 0.4	29.1 ± 0.8	-2
	Derivado de ác. cafeico 4	30.8 ± 1.2	44.9 ± 5.7	46	29.9 ± 0.4	28.8 ± 0.5	-4
	Ácido ferúlico	34.7 ± 0.9	39.3 ± 1.3	13	31.5 ± 0.3	31.2 ± 0.9	-1
	Derivado de ác. ferúlico 14	27.7 ± 0.3	29.3 ± 0.7	6	27.4 ± 0.1	27.4 ± 0.1	0
Flavonoide	Eri-O-hex 1	55.2 ± 8.3	61.8 ± 8.0	12	16.9 ± 2.5	25.2 ± 7.8	49
	Eri-O-hex 2	33.0 ± 5.1	51.1 ± 8.7	55	12.5 ± 2.1	19.4 ± 6.4	55
	Tri-O-hex 1	265.4 ± 31	400.9 ± 43.2	51	98.7 ± 14.1	118. ± 29.3	20
	Api-O-hex-O-hex 1	n. d.	n. d.		1.3 ± 0.1	2.6 ± 0.7	99
	Api-O-hex-O-hex 2	5.4 ± 0.8	9.1 ± 2.2	68	n. d.	n. d.	

Api: apigenina; Lut: leuteolina; Tri: tricina; Pin: pinocembrina; pen: pentose; hex: hexose; ram: ramnose; mal: maloil, nd: não detectado. Os valores em negrito indicam diferenças estadísticas significativas entre tratamentos ($P < 0,05$).

A 15. Identificação da substância **13**: ác. 4-O-feruloilquínico. Espectro de UV **(a)**, estrutura química **(b)** e espectros de massas de íon produto no modo de ionização positiva **(c)** e negativa **(d)**.

A 16. Identificação da substância **17**: apigenina-C-hex-C-pen 2. Espectro de UV **(a)**, estrutura química **(b)**, espectros de massa de íon produto no modo de ionização negativa **(c)**.