



**FABRÍCIO LELIS DA SILVA**

**ANÁLISE DO PERFIL METABOLÔMICO  
DIFERENCIAL DE MUDAS DE *Eucalyptus*  
*urograndis* SUBMETIDAS A ESTRESSE  
HÍDRICO**

**LAVRAS - MG**

**2016**

**FABRÍCIO LELIS DA SILVA**

**ANÁLISE DO PERFIL METABOLÔMICO DIFERENCIAL DE MUDAS  
DE *Eucalyptus urograndis* SUBMETIDAS A ESTRESSE HÍDRICO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, área de concentração em Biotecnologia Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. Leandro Eugenio Cardamone Diniz

Coorientador

Dr. Luciano Vilela Paiva

**LAVRAS - MG**

**2016**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha  
Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados  
informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Silva, Fabrício Lelis da.

Análise do perfil metabolômico diferencial de mudas de *Eucalyptus urograndis* submetidas a estresse hídrico / Fabrício Lelis da Silva. –  
Lavras: UFLA, 2016.

85 p.

Dissertação (mestrado acadêmico)–Universidade Federal de Lavras,  
2016.

Orientador(a): Leandro Eugenio Cardamone Diniz.

Bibliografia.

1. Estresse Hídrico. 2. *Eucalyptus urograndis*. 3. LC-MS. 4. Perfil  
Metabolômico. 5. Areia. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

**FABRÍCIO LELIS DA SILVA**

**ANÁLISE DO PERFIL METABOLÔMICO DIFERENCIAL DE MUDAS  
DE *Eucalyptus urograndis* SUBMETIDAS A ESTRESSE HÍDRICO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, área de concentração em Biotecnologia Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 2 de setembro de 2016.

Dr. Luciano Vilela Paiva UFLA

Dra. Vanessa Cristina Stein UFSJ

Dr. Luciano Vilela Paiva UFLA

Dr. Leandro Eugenio Cardamone Diniz  
Orientador

Dr. Luciano Vilela Paiva  
Coorientador

**LAVRAS - MG  
2016**

*Ao meu pai, que sempre me guiou pelos caminhos da vida e me mostrou os caminhos da ciência.*

*À minha mãe que, com seu carinho e apoio, foi fundamental para as minhas conquistas.*

*À Thatyana e à Teodora, amores maiores, por serem o alento para todas as minhas lutas diárias.*

***DEDICO***

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por sempre me iluminar, proteger e dar forças.

Aos meus irmãos, parceiros de todas as horas, pelo apoio de sempre.

A toda a parentada, por tornar a vida melhor de ser vivida.

À Universidade Federal de Lavras, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, pela oportunidade de cursar o mestrado.

Ao professor Luciano Vilela Paiva, por sempre me incentivar e, principalmente, por permitir que cursasse as disciplinas concomitantemente às minhas atribuições laborais no LCBM. Sem este apoio não seria possível concluir este trabalho.

Ao Dr. Leandro Diniz, por aceitar o desafio de me orientar, ciente da minha pequena disponibilidade de tempo para a necessária dedicação à pesquisa.

Aos membros da banca, por terem aceitado o convite e pelas sugestões em relação ao trabalho e aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, pelos conhecimentos transmitidos.

Aos amigos Douglas e Farley, por toparem essa empreitada junto comigo.

Aos colegas e amigos do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal e do LCBM, especialmente Heliete, Jussara, Ricardo e Rossilvânia, por dividirem comigo os bons e maus momentos.

Aos amigos que me receberam como parte de suas famílias em Lavras

Ao Eduardo, Luiz Fernando e Diego, da Bruker Daltonics, por não terem medido esforços para trazer de volta à vida o microTOF, essencial para minhas análises e pelo auxílio nos primeiros passos com a técnica.

A todos que colaboraram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho, meus mais sinceros agradecimentos.

## RESUMO GERAL

O agravamento das mudanças climáticas e o aumento populacional mundial provocam o aumento gradual da demanda mundial por água, seja para o consumo humano direto, seja para a produção de alimentos em geral. Cerca de 70% da água utilizada no planeta se destinam à produção agropecuária e, sendo assim, a descoberta de processos adaptativos a condições de restrição hídrica, visando implementá-los em espécies de interesse agrônômico, vem sendo objeto de muitos estudos no mundo inteiro. Ao se verificar a importância na economia nacional das atividades da silvicultura, em especial de espécies do gênero *Eucalyptus*, e diante da existência de clones com diferentes níveis de tolerância ao estresse hídrico, é vital compreender os mecanismos empregados pelas plantas em resposta a este estresse. Objetivando estudar estes mecanismos e a prospecção de genes relacionados ao estresse hídrico, diversos estudos são realizados, seja *in vitro* ou *ex vitro*. Foram avaliadas a utilização da areia como substrato para experimentos *ex vitro* com mudas de eucalipto e sua capacidade de simular condições de estresse hídrico, tendo sido alcançados valores de potencial que variaram de -0,036 kPa, no grupo controle, a -1.500 kPa, no grupo estresse intermediário. Para todos os pontos de estresse foram avaliadas as condições morfológicas das mudas de eucalipto. Durante o estudo de metabólitos produzidos em plantas submetidas a diferentes níveis de restrição de água foi possível observar, por meio de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC-MS), a existência de quarenta possíveis moléculas responsivas ao estresse, das quais, de acordo com as análises estatísticas realizadas, nove foram identificadas como efetivamente responsivas ao estresse hídrico. Entre estas moléculas estão o ácido 6-fosfogluconico, cuja diminuição na concentração pode-se associar à queda das taxas de metabolismo; a indolina, provavelmente relacionada a rotas catabólicas envolvendo o ácido indol-acético (AIA), na forma da espécie conjugada entre AIA-fenilalanina; o aminoácido valina, o fenil-β-D-glicopiranosídeo e o p-toluil-β-D-glicopiranosídeo, provavelmente associados ao combate de espécies reativas de oxigênio. Além destes, outros possíveis metabólitos responsivos ao estresse hídrico foram encontrados, devendo ser validados por meio de novos estudos. Todos estes compostos citados têm potencial de atuar como marcadores de nível de estresse ou de serem utilizados para a prospecção de mecanismos genéticos que possam conferir a plantas de interesse melhor adaptação ao estresse hídrico.

Palavras-chave: Estresse Hídrico. *Eucalyptus urograndis*. LC-MS. Perfil Metabolômico. Areia.

## GENERAL ABSTRACT

The worsening of climate change and global population growth causes a gradual increase in global demand for water, either for direct human consumption or for food production in general. Agricultural production consumes about 70% of the entire water that is used on the planet, therefore, it has been the subject of many studies worldwide the discovery of adaptive water restrictions, aiming to implement them in species of agronomic interest. Verifying the importance of forestry activities in the national economy, especially the *Eucalyptus* genus, and also the existence of clones with different levels of tolerance to water stress, it is vital to understand the mechanisms used by plants in response to this stress. Intending to study these mechanisms and the search for genes related to water stress, several studies are conducted either in vitro or ex vitro. Were evaluated the use of sand as a substrate for ex vitro experiments with eucalyptus seedlings and its ability to simulate conditions of water stress, have been reached potential values ranging from -0.036 kPa in the control group, and -1500 kPa, in the intermediate stress group. For all stress points were evaluated morphological conditions of eucalyptus seedlings. During the study of metabolites produced in plants submitted to different levels of water restriction was observed by means Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry (LC-MS), the existence of forty possible responsive molecules to stress, which, according with statistical analyzes, nine were identified as effectively responsive to water stress. Among these molecules are: 6-fosfogluônico acid, which decrease in concentration allows associating the drop in metabolic rate; indoline, probably related to catabolic pathways involving indole-acetic acid (IAA), in the form of the species coupled between EIA-Phenylalanine; the valine amino acid, phenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside and p-toluoyl- $\beta$ -D-glucopyranoside, probably associated with combat reactive oxygen species. Besides these, other potential metabolites responsive to water stress were found and should be validated by further studies. All these mentioned compounds have the potential to act as stress level markers or used for prospecting for genetic mechanisms that may confer to plants of interest better adaptation to water stress.

Keywords: Drought Stress. *Eucalyptus urograndis*. LC-MS. Metabolomic profile. Sand.



## LISTAS DE FIGURAS

Figura 1 -	Disponibilidade de recursos hídricos renováveis, <i>per capita</i> , no ano de 2013 (WWAP, 2015).....	17
Figura 2 -	Comparação da estimativa da demanda de água, global e por grupo de países, entre a estimativa para o ano de 2050 e os dados do ano 2000 (WWAP, 2015).....	18
Figura 3 -	Estresse hídrico mundial médio dos anos 1981 a 2010, considerando a relação entre a oferta e a demanda de água (WWAP, 2015).....	18
Figura 4 -	Redes biológicas, geradas <i>in silico</i> , após análise dos dados referentes a estudos metabolômicos disponíveis na literatura, de 1995 a fevereiro de 2010, por meio do software Pathway Studio (PINHEIRO; CHAVES, 2011).....	21
Figura 5 -	Área das florestas plantadas de eucalipto no Brasil, por estado (ABRAF, 2013).....	23
Figura 6 -	Fluxo de trabalho para um experimento em análise metabolômica. Adaptado de Zhou et al. (2012).....	27
Figura 7 -	Distanciamento entre o potencial, representado pelo DNA, e o produto final, representado pelo fenótipo - e os agentes intermediadores deste processo (GARCIA-FLORES et al., 2015).....	32
Figura 8 -	Equação de duplo Van Genuchten para a areia, com sua respectiva representação gráfica.....	48
Figura 9 -	Condição fisiológica das mudas no momento da coleta das amostras, sendo (A) condição C <sub>i</sub> , (B) condição EH <sub>1</sub> , (C) condição EH <sub>2</sub> e (D) condição EH <sub>3</sub> (barras de escala com 9 cm).....	49
Figura 11 -	Resultado da análise estatística OPLS-DA, mostrando o agrupamento de cada um dos grupos amostrais em relação aos possíveis metabólitos encontrados.....	66
Figura 12 -	Identificação das relações m/z que foram determinantes para o agrupamento das amostras que foi exibido na Figura 11.....	67
Figura 13 -	Reação do anabolismo do ácido 6-fosfogluconico.....	74
Figura 14 -	Cromatograma do íon extraído (EIC) para m/z = 120,0819 e espectro de massa mostrando a coeluição entre indolina e fenilalanina.....	76
Figura 15 -	Representação das estruturas químicas da indolina e da fenilalanina.....	76
Figura 16 -	Representação das estruturas químicas dos isóbaros propen-2-ilbenzeno e valina.....	79

## LISTAS DE TABELAS

Tabela 1 - Aumento da concentração de metabólitos secundários (fenóis, terpenos e alcaloides) ocasionado por estresse hídrico (SELMAR, 2008). .....	30
Tabela 2 - Características dos solventes mais comumente utilizados em extrações para análises metabolômicas (P' - polaridade; Xe, Xd, Xn – influência da capacidade de doar próton, receber próton e momento de dipolo, respectivamente, na polaridade do composto). Adaptado de Mushtaq et al. (2014). .....	34
Tabela 3 - Valores de umidade calculados após a secagem em estufa. ....	50
Tabela 4 - Potencial mátrico ( $\Psi_H$ ) calculado para cada um dos pontos de coleta das amostras submetidas ao estresse hídrico. ....	50
Tabela 5 - Potencial hídrico $\Psi_H$ calculado para cada um dos pontos de coleta das amostras submetidas ao estresse hídrico. ....	64
Tabela 6 - Dados de tempo de retenção e relação massa/carga (m/z) para os quarenta possíveis compostos identificados nas análises de alinhamento de tempos de retenção e m/z. ....	65
Tabela 7 - Resultados das buscas em bancos de dados (Chemspider, KEGG, GMD) baseadas nos espectros de fragmentação para os nove compostos significantes - 1ª parte. ....	68
Tabela 8 - Resultados das buscas em bancos de dados (Chemspider, KEGG, GMD) baseadas nos espectros de fragmentação para os nove compostos significantes - 2ª parte. ....	69
Tabela 9 - Resultados das buscas em bancos de dados (Chemspider, KEGG, GMD) baseadas nos espectros de fragmentação para os nove compostos significantes - 3ª parte. ....	70
Tabela 10 - Identificação dos nove metabólitos com significância estatística. .	73

## SUMÁRIO

	<b>CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	12
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	16
<b>2.1</b>	<b>Estresse hídrico</b> .....	16
<b>2.2</b>	<b>O eucalipto</b> .....	22
<b>2.2.1</b>	<b>Estresse hídrico em eucalipto</b> .....	24
<b>2.3</b>	<b>Metabolômica</b> .....	26
<b>2.3.1</b>	<b>Metabólitos</b> .....	27
<b>2.3.2</b>	<b>Metabólitos e o estresse hídrico em eucalipto</b> .....	29
<b>2.3.3</b>	<b>Análise metabolômica</b> .....	31
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	36
	<b>CAPÍTULO 2 METODOLOGIA PARA UTILIZAÇÃO DE AREIA EM EXPERIMENTOS DE INDUÇÃO DE ESTRESSE HÍDRICO EM PLANTAS DE <i>Eucalyptus urograndis</i></b> .....	42
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	44
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	46
<b>2.1</b>	<b>Aclimação das plantas de eucalipto em casa de vegetação:</b> .....	46
<b>2.2</b>	<b>Cálculo da equação duplo van Genuchten</b> .....	46
<b>2.3</b>	<b>Indução do estresse hídrico e determinação dos estágios de estresse</b> .....	47
<b>2.4</b>	<b>Cálculo do teor de água na amostra de areia e do potencial osmótico</b> .....	47
<b>3</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	48
<b>3.1</b>	<b>Curva de retenção de água</b> .....	48
<b>3.2</b>	<b>Determinação dos pontos para cálculo do potencial osmótico</b> .....	48
<b>3.3</b>	<b>Cálculo da umidade da areia e potencial osmótico</b> .....	49
<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	51
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	53
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	54
	<b>CAPÍTULO 3 IDENTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS RESPONSIVOS A ESTRESSE HÍDRICO EM <i>Eucalyptus urograndis</i></b> .....	56
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	58
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	60
<b>2.1</b>	<b>Obtenção das plantas de eucalipto sob estresse hídrico</b> .....	60
<b>2.2</b>	<b>Coleta das amostras</b> .....	61
<b>2.3</b>	<b>Análise metabolômica</b> .....	61
<b>3</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	64
<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	71

<b>4.1</b>	<b>Identificação dos metabólitos .....</b>	<b>72</b>
<b>4.1.1</b>	<b>Íon m/z = 277,033 .....</b>	<b>74</b>
<b>4.1.2</b>	<b>Íon m/z = 120,082 .....</b>	<b>75</b>
<b>4.1.3</b>	<b>Íons m/z = 257,102 e m/z = 271,110 .....</b>	<b>77</b>
<b>4.1.4</b>	<b>Íon m/z = 119,086 .....</b>	<b>78</b>
<b>4.1.5</b>	<b>Íons m/z = 365,105, m/z = 401,143, m/z = 579,293, m/z = 485,111 .</b>	<b>79</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>81</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>82</b>
	<b>CONCLUSÕES GERAIS .....</b>	<b>85</b>

## CAPÍTULO 1

### INTRODUÇÃO GERAL

#### 1 INTRODUÇÃO

O plantio de eucalipto é uma atividade agrícola importante no esforço de se implantar um sistema econômico ambientalmente sustentável. A planta é rústica, adaptável a solos pobres em nutrientes ou degradados, e sua madeira tem vários usos estabelecidos, com grande aceitação no mercado mundial. Seu cultivo pode, inclusive, impactar o ambiente de forma positiva: em valores médios, uma árvore com cinco anos estoca 29 kg de carbono no lenho comercial (SILVA, 2015), de modo que o ciclo entre plantio das florestas e industrialização ainda resulta em saldo positivo na estocagem de carbono (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE FLORESTAS PLANTADAS - ABRAF, 2013).

No Brasil existe cerca de 7,2 milhões de hectares de florestas plantadas, sendo 71% desta área ocupados com plantio de árvores do gênero *Eucalyptus* e, deste total, o estado de Minas Gerais responde por 28,2% (ABRAF, 2013). É um dos setores-chave na economia nacional, com bom desempenho em produção e faturamento próximo a US\$2,5 bilhões, representando cerca de 5% do PIB e gerando milhões de empregos diretos e indiretos (SOARES; SILVA; CORDEIRO, 2014).

Estas florestas, assim como todas as outras plantas, estão frequentemente expostas a vários tipos de estresses, sejam bióticos (vírus, bactérias e fungos) ou abióticos (restrição de água, variações de fotoperíodo, temperaturas extremas e salinidade, entre outros) que afetam seu crescimento,

desenvolvimento e produtividade (GUIMARÃES-DIAS et al., 2012; RAO; CHAITANYA, 2016).

Estas mudanças nas condições ambientais, possivelmente promotoras de estresse, às quais as florestas estão expostas, ameaçam a silvicultura mundial. Os efeitos já consolidados das mudanças climáticas, bem como os previstos em todos os cenários, dão conta de que as florestas continuarão sendo negativamente afetadas devido à seca prolongada, ao aumento da salinização do solo e da água e à exposição a baixas temperaturas, consequentemente diminuindo o crescimento e a sobrevivência das florestas (HARFOUCHE; MEILAN; ALTMAN, 2014).

A restrição de água afeta negativamente a produtividade em ecossistemas em todo o mundo, diminuindo a produtividade e a distribuição da população das plantas, em alguns casos podendo reduzir o retorno da cultura em até 50%. Aliada à salinização, afeta mais de 10% das terras cultiváveis em todo o mundo (BARTELS; SUNKAR, 2005). A forma como as plantas lidam com a falta deste recurso tem sido amplamente pesquisada, observando-se respostas diferentes, comparando espécie a espécie e população a população, para uma mesma espécie. Porém, há processos que são gatilhos para as respostas fisiológicas, como fechamento estomático e redução da taxa fotossintética, e que ainda não foram amplamente compreendidos (NIINEMETS, 2016).

Em diversos estudos foi demonstrada a capacidade do eucalipto de responder ao estresse hídrico, em especial pela sua capacidade de recuperação ao ser 'reidratado' após período de estresse, porém, os mecanismos e os processos que medeiam esta resposta permanecem incompreendidos e demandam novos estudos (CORREIA et al., 2014). Além disso, o eucalipto é uma espécie arbórea distribuída mundialmente, devido à sua capacidade de adaptação, e desempenha importante papel no setor econômico, por ser matéria-prima de diversos

produtos, como celulose, papel, carvão vegetal, serralheria e biomassa, além de uso farmacológico, entre outros (ARANTES, 2009).

A simulação das condições de estresse hídrico em casa de vegetação traz consigo um conjunto de variáveis que interferem na disponibilidade de água e na taxa de consumo de água pela planta, sendo necessário um estudo detalhado para a escolha das condições a serem utilizadas experimentalmente (LOPES et al., 2011; VELLINI et al., 2008). Ademais, as partes de interesse da planta em estudo configuram outro fator importante na escolha, uma vez que a não remoção completa dos contaminantes presentes no substrato pode interferir de forma determinante na qualidade das análises metabolômicas.

As respostas dos organismos às condições ambientais causam mudanças relevantes em sua composição química, consistindo em uma reprogramação do metabolismo primário, referente ao processo de desenvolvimento, e secundário, referente aos processos de adaptação, das plantas. Apesar de sua importância e da possibilidade de serem as únicas mudanças que ocorrem fora das rotas de metabolismo primário (MCKIERNAN et al., 2016), o papel dos metabólitos secundários é pouco claro, sendo suas mudanças difíceis de explicar e, principalmente, prever (NIINEMETS, 2016). Os metabólitos sintetizados como resposta ao ambiente, classificados como secundários, são produzidos em pequena escala (STAMP, 2003), sendo, portanto, necessário o uso de ferramentas altamente sensíveis para estas análises.

Na análise metabolômica, a metodologia de extração e de análise é variável para cada classe de metabólitos secundários, devido à sua natureza química. A detecção ou identificação destes compostos pode ser realizada com a utilização de cromatografia acoplada a detectores de arranjo de diodo (DAD), ressonância magnética nuclear (NMR) e espectrômetro de massa (MS), sendo este último o método de escolha, pois possibilita a análise de uma diversificada gama de compostos de forma simultânea (CHERNIN et al., 1996; GIKA et al.,

2012; MIKULIC-PETKOVSEK et al., 2013; RAAIJMAKERS; VLAMI; SOUZA, 2002).

Espécies ou variedades extremamente sensíveis não têm sua utilização recomendada para estudos de estresse hídrico, pois seus repertórios de resposta são limitados e, normalmente, culminam com a senescência e a morte da planta, em vez de adaptações ambientais que lhe permitam adaptar-se àquele ambiente (DEYHOLOS, 2010).



## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Estresse hídrico

As plantas estão frequentemente expostas a vários tipos de estresses, sejam bióticos (vírus, bactérias e fungos) ou abióticos (restrição à água, variações de fotoperíodo, temperaturas extremas e salinidade, entre outros) que afetam seu crescimento, desenvolvimento e produtividade (GUIMARÃES-DIAS et al., 2012; RAO; CHAITANYA, 2016). O déficit hídrico é uma importante limitação ambiental, afetando a produtividade e a distribuição da população das plantas, em alguns casos podendo reduzir o retorno da cultura em até 50% e, aliada à salinização, afeta mais de 10% das terras cultiváveis em todo o mundo (BARTELS; SUNKAR, 2005).

As perspectivas para o avanço da seca são preocupantes. Os modelos de predição das condições climáticas preveem o agravamento dos efeitos do aquecimento global nos próximos anos (SAPETA et al., 2016). Neste cenário, o Brasil tem posição privilegiada, pois a disponibilidade de água, *per capita*, está acima de 15.000 m<sup>3</sup> (Figura 1). Diante destes dados, em uma análise superficial, é possível ter a falsa impressão de que a situação não é preocupante. Porém, em contraste com esta disponibilidade, há o crescimento populacional e o consequente aumento do consumo de água (Figura 2), do qual a irrigação representava, aproximadamente, 70%, no ano 2000. Há a previsão de aumento da demanda de água em cerca de 57%, se comparado o ano de 2050 com o ano 2000 e, no caso dos países membros do bloco BRICS (Brasil, Rússia, Índia, China, África do Sul), espera-se um aumento de 77% para o mesmo período (WORLD WATER ASSESSMENT PROGRAMME - WWAP, 2015). Apesar do aumento dessa demanda, a quantidade de água disponível para utilização na irrigação deverá diminuir 17%, para os BRICS e 13%, em termos mundiais.

A análise desses dados possibilita prever o agravamento do nível de estresse hídrico que, em 2010 (Figura 3), mostrava boa parte das regiões subtropicais com níveis elevados de carência de água e, ainda mais preocupante, a região intertropical já apresentando severo estresse hídrico (WWAP, 2015).

Figura 1 - Disponibilidade de recursos hídricos renováveis, *per capita*, no ano de 2013 (WWAP, 2015).

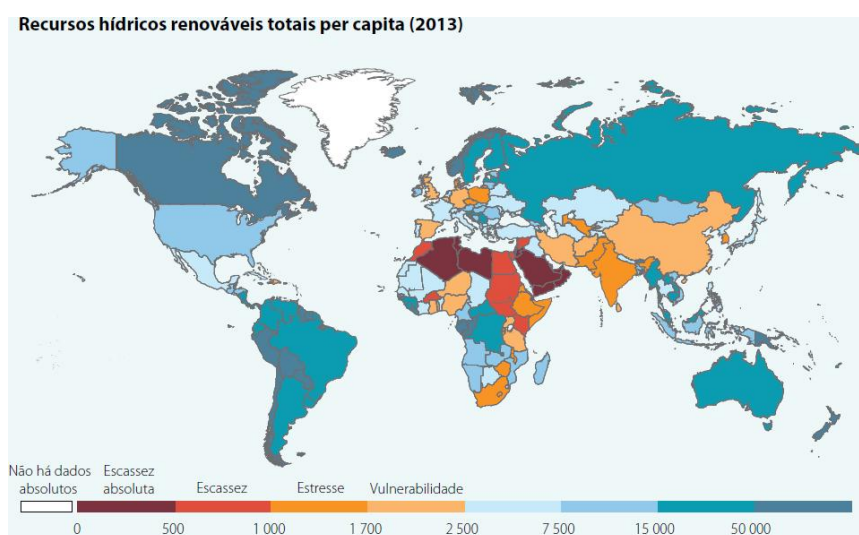


Figura 2 - Comparação da estimativa da demanda de água, global e por grupo de países, entre a estimativa para o ano de 2050 e os dados do ano 2000 (WWAP, 2015).

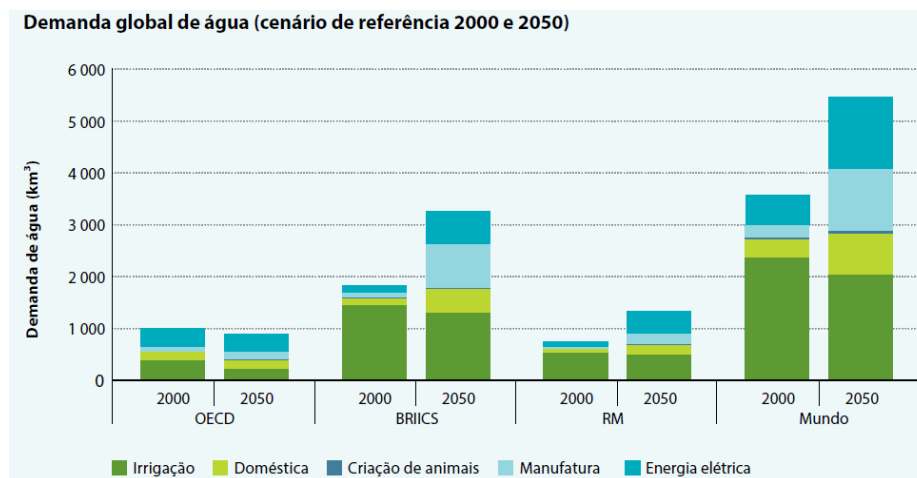
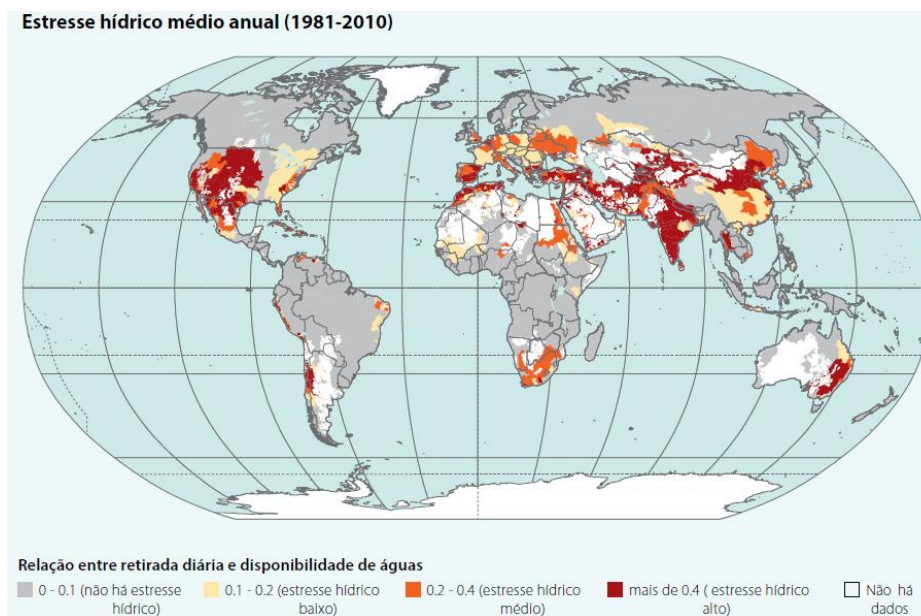


Figura 3 - Estresse hídrico mundial médio dos anos 1981 a 2010, considerando a relação entre a oferta e a demanda de água (WWAP, 2015).



As plantas lidam frequentemente com a indisponibilidade de água, seja por estresse no fornecimento ou por taxa excessiva de evapotranspiração. Em resposta ao estresse hídrico, diversas plantas desenvolveram estratégias para minimizar estes danos, os quais são desencadeados por alterações nas membranas celulares, na estrutura e na ultraestrutura de organelas celulares (RAO; CHAITANYA, 2016). A redução na disponibilidade de água para a planta gera uma série de reações fisiológicas, impactando negativamente o seu crescimento, devido ao fechamento estomático, à menor assimilação de CO<sub>2</sub>, à diminuição da área foliar, à menor eficiência do aparato fotossintético e à menor expansão radicular, entre outras (BARTELS; SUNKAR, 2005). Ainda podem ocorrer reações que envolvem a regulação do turgor das células guarda, reduzindo a abertura estomatal e colaborando na manutenção do potencial osmótico da planta por meio da redução na transpiração (MCKIERNAN et al., 2016).

Além destas reações, respostas moleculares também ocorrem para proteger as plantas mediante sua exposição ao estresse. Dentre estas mudanças, a alteração do balanço de fito-hormônios tem papel chave na tolerância à queda na disponibilidade de água, tendo o ácido abscísico (ABA) a maior influência, por participar de respostas fisiológicas importantes, como fechamento estomático, ativação de genes *downstream*, produção e acúmulo de íons, solutos e metabolitos, visando à proteção da planta na escassez de água (RAO; CHAITANYA, 2016).

A duração, a intensidade e a taxa de ocorrência do estresse hídrico interferem no tipo de resposta que a planta utilizará, possibilitando que caminhos totalmente distintos sejam trilhados no metabolismo para que a resposta à condição seja dada de forma adequada (OBIDIEGWU et al., 2015).

Ao enfrentar estresses suaves a moderados, a fotossíntese será afetada devido ao fechamento dos estômatos, resultando em perda da biomassa. Em

casos de estresse severo, as vias que envolvem a configuração dos estômatos passam a ter papel secundário, diminuindo a eficiência fotoquímica e a atividade da proteína rubisco, afetando os metabolismos bioquímicos e fisiológicos (XU; ZHOU; SHIMIZU, 2010). A ocorrência de estresse intermitente tem efeito biomassa e na produtividade da planta, sendo mais relacionada ao momento de ocorrência e à sua frequência do que com a intensidade propriamente dita (PINHEIRO; CHAVES, 2011).

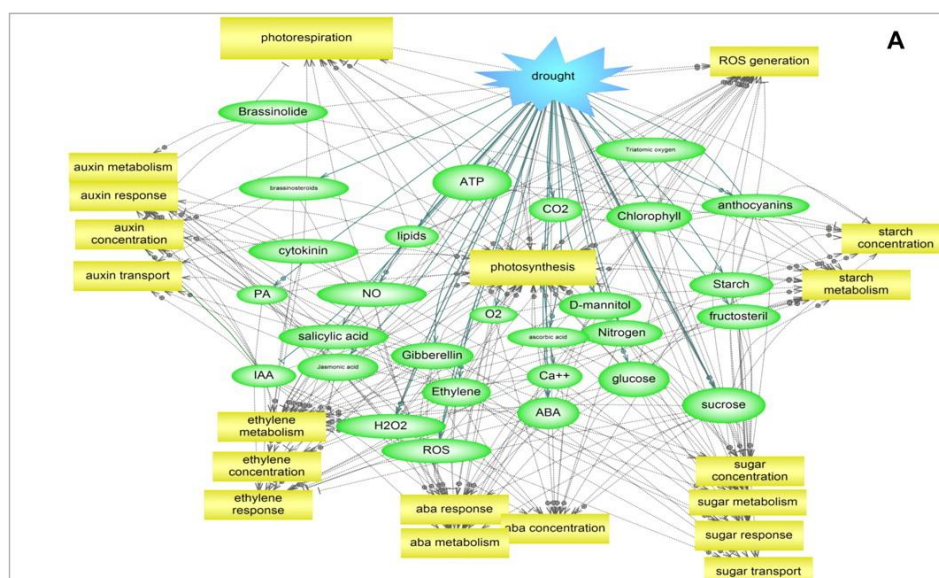
Há pouca informação disponível quanto aos efeitos fisiológicos do estresse hídrico prolongado, o que levaria à queda acentuada na disponibilidade de água. Alguns estudos demonstram que a restrição prolongada do fornecimento de água, caso a umidade do solo atinja níveis menores que 50% da capacidade de campo, tem como consequência a dificuldade da planta em absorver os nutrientes do solo, causando, juntamente com as respostas à diminuição da água disponível, impacto severo no aumento da biomassa e na produtividade (OBIDIEGWU et al., 2015).

Apesar dos avanços realizados nas últimas duas décadas, ainda não é possível traçar um painel exibindo o papel da regulação metabólica durante o estresse hídrico. Pinheiro e Chaves (2011) afirmam que, apesar dos avanços impressionantes a respeito dos eventos que ocorrem nas plantas submetidas ao estresse hídrico, um painel integrativo das respostas ainda não foi desenvolvido, em parte, devido a estudos que utilizam condições muito artificiais de déficit hídrico. É importante, ainda, o fato de a maioria dos experimentos que envolvem as análises moleculares não levar em conta dados fisiológicos, como condutância estomática e taxa fotossintética, dificultando a comparação dos dados gerados nestas pesquisas.

Em relação aos metabólitos, há um alto nível de interconectividade entre as rotas entre o estresse hídrico, a fotossíntese, espécies reativas de oxigênio (ROS), ABA, sacarose e amido (Figura 4). Processos relacionados às citocininas

não foram bem documentados, presumivelmente por não terem ainda sido profundamente estudados. São reportadas, ainda, interações entre diferentes rotas hormonais, envolvendo ABA, auxinas e etileno (PINHEIRO; CHAVES, 2011). Esta interconectividade, apesar de muito explorada, ainda não foi totalmente compreendida e deve ser mais bem estudada.

Figura 4 - Redes biológicas, geradas *in silico*, após análise dos dados referentes a estudos metabolômicos disponíveis na literatura, de 1995 a fevereiro de 2010, por meio do software Pathway Studio (PINHEIRO; CHAVES, 2011).



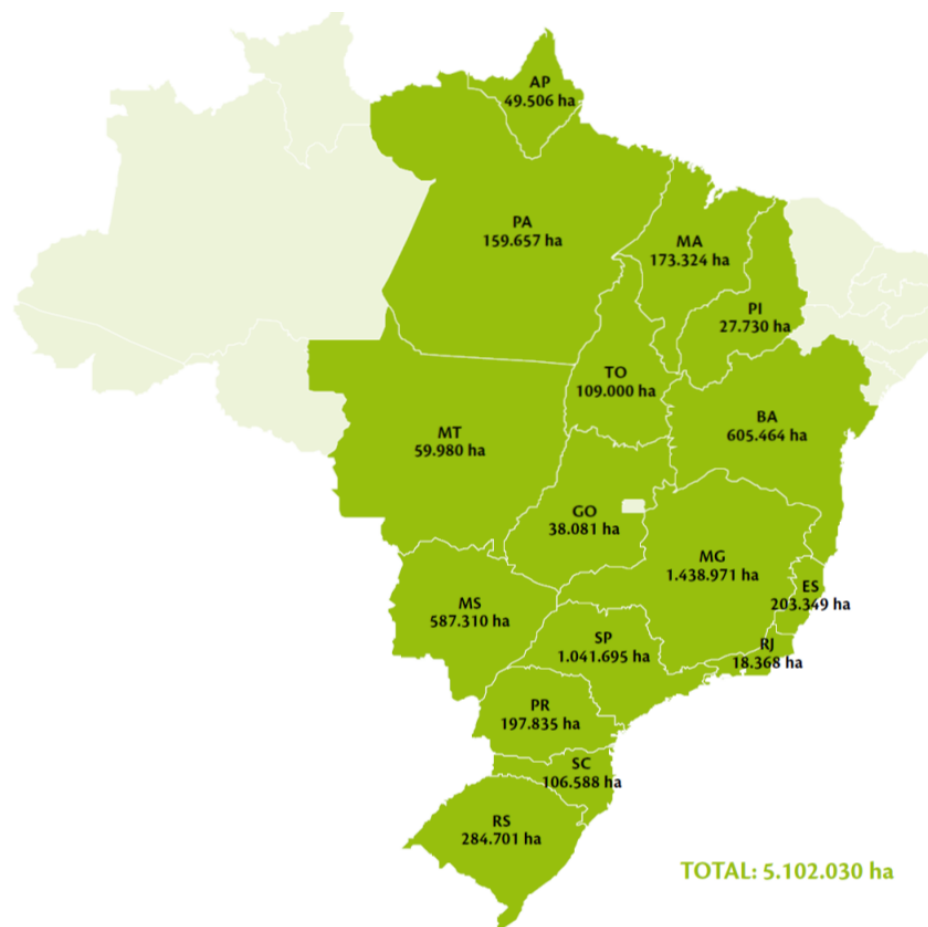
Um exemplo dessa interconectividade foi observado no estudo da variação do potencial osmótico em *Coriaria nepalensis*. O decréscimo neste potencial, tipicamente limitado a, aproximadamente,  $-0,2$  a  $-0,8$  MPa, provocou a manutenção do movimento de água do solo para a planta durante períodos de estresse hídrico, tendo este decréscimo sido proporcional à severidade do estresse. Este mecanismo se apresentou como uma vantagem ecológica para plantas jovens da espécie, ao possibilitar a manutenção da atividade metabólica

em condições subótimas, enquanto as raízes não alcançaram a água em maior profundidade, sugerindo que o ajuste osmótico é uma estratégia que aumenta a tolerância à desidratação (BARGALI; TEWARI, 2004; TAIZ; ZEIGER, 2004).

## **2.2 O eucalipto**

No Brasil há cerca de 7,2 milhões de ha de florestas plantadas – 0,84% da área do país e 1,55% da área total de florestas –, sendo 71% desta área ocupados com plantio de árvores do gênero *Eucalyptus*, se concentrando na região centro-sul do país (Figura 5). Deste total, o estado de Minas Gerais, com 1.438.971 ha, responde por 28,2% da área nacional de plantio de eucalipto, seguido por São Paulo com 20,4% e pela Bahia, com 11,8% (ABRAF, 2013).

Figura 5 - Área das florestas plantadas de eucalipto no Brasil, por estado (ABRAF, 2013).



O rendimento médio de uma floresta de eucalipto no Brasil varia entre 35 e 50 m<sup>3</sup>/ha/ano, sendo observados valores maiores para algumas regiões do território nacional. Ainda assim, a média nacional supera a média da Austrália, país de origem do eucalipto, que é de, aproximadamente, 25 m<sup>3</sup>/ha/ano (PINTO et al., 2014).

No Brasil, o eucalipto é utilizado para a produção de celulose e papel, carvão vegetal e biomassa, na construção civil e na indústria farmacêutica, sendo



um dos setores-chave na economia nacional, apresentando bom desempenho em produção, com faturamento próximo a US\$2,5 bilhões, 5% do PIB e gerando, aproximadamente, 2 milhões de empregos diretos e indiretos (SOARES; SILVA; CORDEIRO, 2014).

O gênero *Eucalyptus* é originário da Austrália e tem cerca de 600 espécies adaptadas a diferentes condições ambientais. A maioria das espécies pertence a florestas altas, com 30 a 50 m de comprimento ou de florestas abertas, com 10 a 25 m de comprimento. As espécies de eucaliptos mais utilizadas no mundo são *E. grandis*, *E. camaldulensis*, *E. tereticornis*, *E. globulus*, *E. urophylla*, *E. viminalis*, *E. saligna* e *E. citriodora* (ALZATE, 2004).

O *E. urograndis*, obtido no Brasil a partir do cruzamento entre *E. grandis* e *E. urophylla*, tem grande importância para a produção de papel e celulose de fibra curta (CARVALHO, 2000), sendo um dos híbridos mais utilizados no setor florestal e industrial brasileiro. Este cruzamento reúne as melhores características do *E. grandis*, como excelente taxa de crescimento, qualidade da madeira e tolerância ao estresse hídrico (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO, 1981; GONÇALVES et al., 2013) e do *E. urophylla*, como a resistência a doenças, particularmente ao fungo *Cryphonectria cubensis*, causador do cancro do eucalipto (SCANAVACA JUNIOR; GARCIA, 2003), sendo ambos os genótipos utilizados para diversos fins, como produção de celulose e de papel, chapas duras, serraria e carvão, além de outros (PINTO et al., 2014).

### **2.2.1 Estresse hídrico em eucalipto**

O consumo de água pelas florestas é, em geral, maior do que o consumo de vegetação de menor porte de culturas agrícolas não irrigadas, o que configura uma preocupação, pois se torna cada vez mais evidente a diminuição na

disponibilidade natural de água, um dos mais importantes temas relacionados ao manejo dos recursos naturais em todo o planeta (TRABULSI, 2011). As plantações florestais com espécies de crescimento rápido, como o eucalipto, apresentam maior consumo de água, comparadas às de vegetação de menor porte, às das florestas naturais e às plantações com espécies de crescimento lento (CALDER, 2007).

Apesar disso, é possível afirmar, analisando dados sobre taxa de transpiração, dinâmica dos estômatos, índice de área foliar, eficiência do uso da água, perdas por interceptação e balanço hídrico, que o eucalipto é uma espécie florestal altamente eficiente na produção de biomassa, proporcionalmente à quantidade de água absorvida, tornando-o uma alternativa viável para cenários de escassez de água (WHITEHEAD; BEADLE, 2004).

A resposta ao estresse hídrico em eucalipto, assim como em outras espécies, ocorre em diferentes estágios. A sinalização do estresse, fundamental para a resposta e a proteção do organismo, ocorre rapidamente. Apenas três horas após a indução do estresse hídrico em *E. globulus*, clone C14, observaram-se respostas fisiológicas significativas, destacando-se o papel do ABA xilemático e das mudanças no pH, como os primeiros sinais químicos ocorridos durante rápido estresse hídrico (GRANDA et al., 2011).

O ajuste osmótico como resposta ao estresse é uma resposta invariável no gênero *Eucalyptus*, mas variações interespecíficas do potencial osmótico correlacionam-se com a distribuição de espécies em ambientes onde a água é escassa (MERCHANT et al., 2007). Investigações em casa de vegetação sobre o efeito do estresse hídrico, induzido pela suspensão da irrigação, podem prever como as espécies de plantas respondem ao estresse hídrico em condições de campo (GINDABA; ROZANOV; NEGASH, 2004).

### 2.3 Metabolômica

A avaliação de um perfil de metabólitos é essencial para vários campos da ciência e, conseqüentemente, ele vem sendo amplamente estudado por vários grupos de pesquisa, em diversas partes do mundo, desde 1971, quando Horning introduziu este conceito com trabalhos utilizando espectrometria de massa (GREEF et al., 2013).

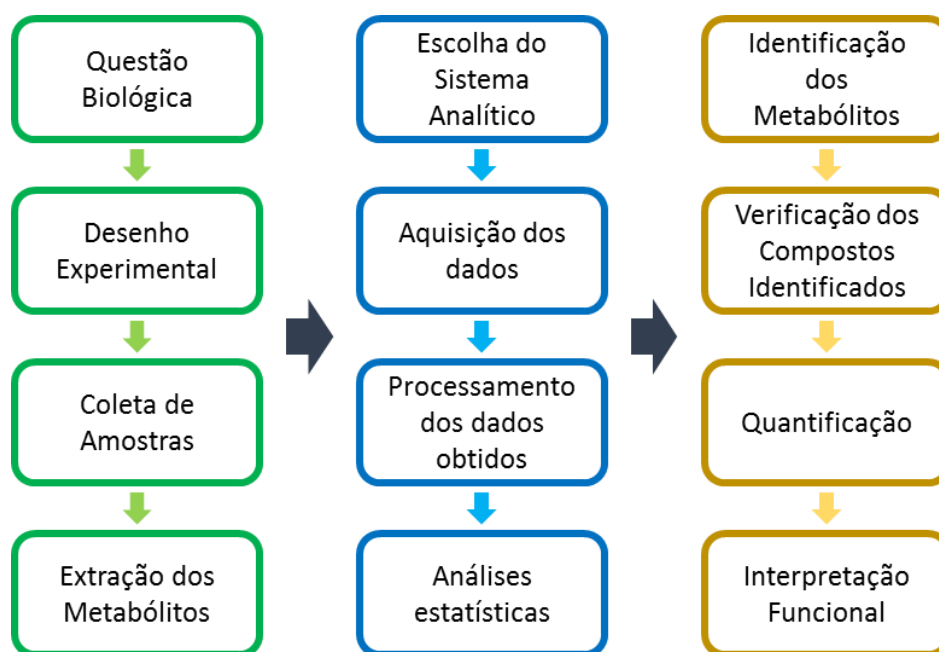
A importância do estudo dos metabólitos pode ser entendida por sua própria etimologia, uma vez que significa “mudança”, sendo estes os primeiros compostos a sinalizar variações no ambiente e a provocarem no organismo todas as mudanças necessárias para a sua adaptação (BING, 1971).

Para a análise de metabólitos em matrizes biológicas, nos anos de 1950 alguns pesquisadores acoplaram o cromatógrafo a gás a um espectrômetro de massa (GC-MS), permitindo a separação e a identificação de compostos presentes em matrizes como urina ou sangue. Porém, estes “perfis” metabolômicos eram restritos a uma classe de compostos, os ácidos orgânicos, pois, para análise via GC-MS, os compostos devem ser voláteis ou ser transformados em compostos voláteis, por meio de derivatização (GREEF et al., 2013).

Para que um experimento seja bem sucedido, ele deve ser bem planejado. Nas etapas iniciais (Figura 6), é definida a “questão biológica”, ou seja, o que se quer descobrir: marcadores biológicos, processos fundamentais; seguido pela definição do desenho experimental, a coleta das amostras e a extração dos compostos. Na fase analítica, a escolha do sistema é crucial, pois todos têm suas vantagens e limitações, devendo a escolha levar em conta a questão que motivou o experimento; a aquisição dos dados é crucial, e a escolha precipitada dos métodos analíticos pode impedir o correto processamento dos dados e toda a avaliação que se seguirá. Após as análises estatísticas, os dados

de interesse são analisados visando identificar, confirmar e quantificar os metabólitos com base nos dados de LC (cromatografia líquida), MS (espectrometria de massa) e MS/MS. Por fim, os dados são relacionados com os processos biológicos em curso e interpretados (ZHOU et al., 2012).

Figura 6 - Fluxo de trabalho para um experimento em análise metabolômica. Adaptado de Zhou et al. (2012).



### 2.3.1 Metabólitos

O termo metabólito se refere a qualquer molécula que foi produzida em processos ocorridos em seres vivos. Essas moléculas podem ser classificadas como metabólitos primários, responsáveis por dar suporte à vida em processos normais nas vias metabólicas essenciais, como as relacionadas ao crescimento, ou metabólitos secundários, moléculas pequenas (massa molecular menor que

1.000 Da) ausentes das vias metabólicas essenciais, porém, necessárias à sobrevivência por atuarem como sinalização e resposta a diversos fatores ambientais, permitindo o desenvolvimento e a adaptação do organismo. Dentre os metabólitos primários figuram aminoácidos, lipídeos e carboidratos, e, dentre os secundários, figuram os polifenóis, os alcaloides, os terpenos e as policetonas (dentre as quais micotoxinas), entre outros (WOLFENDER et al., 2015).

Estes compostos são produzidos devido à relação do organismo de interesse com outros organismos, patogênicos ou não, bem como serem frutos da interação com o meio, apresentando ou não condições de estresse abiótico (VERPOORTE; ALFERMANN, 2000).

A diversidade química dos organismos é diretamente ligada à evolução dos fatores de transcrição, que controlam as rotas correspondentes. Então, é evidente que as alterações ecológicas e evolutivas no repertório dos metabólitos devem ser associadas às concomitantes mudanças na regulação dos genes que correspondem àquelas rotas metabólicas. Apesar disso, não está claro o ponto em que os fatores de transcrição influenciam a diversidade metabólica dos organismos, nem como os reguladores das rotas metabólicas atuam visando manter o organismo constantemente apto a se adaptar às condições ambientais (GROTEWOLD, 2005).

Os metabólitos são compostos que apresentam grande importância econômica, sendo alguns utilizados como medicamentos, essências, inseticidas e corantes. Estima-se que 25% de todos os fármacos sejam derivados de plantas, como, por exemplo, morfina, codeína, vimblastina e digoxina, entre outros. Nos anos 1980 foi produzido um inventário que catalogou 121 compostos obtidos a partir de 95 espécies e que eram utilizados na farmacoterapia ocidental (VERPOORTE; ALFERMANN, 2000).

A diversidade metabólica não é dada apenas pelo número de genes presentes, mas também pelas múltiplas especificidades dos substratos por

diferentes enzimas, além de reações não enzimáticas. Aproximadamente 50.000 compostos foram elucidados em plantas, porém, estima-se que o total seja superior a 200.000, sendo a análise metabolômica um grande desafio para os pesquisadores em plantas (HALL et al., 2002).

Há diversos bancos de dados nos quais são depositadas as moléculas identificadas, possibilitando que novos trabalhos possam associar seus dados aos compostos presentes nestes bancos, com base nos dados de fragmentação gerados via espectrometria de massa, à medida que estes são analisados. Existem disponíveis, diferindo quanto ao órgão curador e à procedência da amostra, várias bases de dados de metabólitos, como, por exemplo, a METLIN (<https://metlin.scripps.edu/index.php>), a PLANTCYC ([www.plantcyc.org](http://www.plantcyc.org)), a FiehnLib (<http://fiehnlab.ucdavis.edu/projects/FiehnLib>) e a GMD (<http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/>).

### **2.3.2 Metabólitos e o estresse hídrico em eucalipto**

Dado que a manutenção da turgescência é necessária para o crescimento celular, o acesso limitado de água pode causar reduções no crescimento das plantas (WARREN; ARANDA; CANO, 2012).

Normalmente, as plantas têm certa capacidade de, utilizando uma gama de respostas bioquímicas, manter a turgescência e o crescimento das células, se aclimatando à situação de estresse. Para gênero *Eucalyptus*, por exemplo, as respostas ao estresse hídrico incluem alterações na alocação de biomassa, no controle estomático, no reforço da parede celular, no armazenamento de água na parede celular e na osmolaridade celular. Além destas respostas, o aumento da síntese de enzimas antioxidantes, as alterações nas quantidades relativas e absolutas de clorofilas e carotenoides, comuns em outras plantas, também devem ocorrer em eucalipto (BORGES, 2013).

A redução do potencial osmótico é atribuída a uma acumulação ativa de solutos, geralmente aminoácidos, polióis e compostos de amônio quaternário, ou ao aumento de sua concentração por meio da redução do volume celular, sendo um mecanismo utilizado por diversas espécies para adaptação a condições de desidratação (HARE; CRESS; STADEN, 1998).

Diversos experimentos comprovaram que plantas expostas ao estresse hídrico respondem com síntese aumentada (Tabela 1) de alguns metabólitos secundários, como fenóis, terpenos, alcaloides, glicosídeos cianogênicos, ou glucosinolatos, em função deste estresse (SELMAR, 2008). Estes compostos atuam, principalmente, como precursores de metabólitos primários, como a lignina e na sinalização para rotas de resposta fotossintética.

Tabela 1 - Aumento da concentração de metabólitos secundários (fenóis, terpenos e alcaloides) ocasionado por estresse hídrico (SELMAR, 2008).

<b>Metabólito</b>	<b>Espécie</b>	<b>Concentração</b>
Ácido clorogênico	<i>Helianthus annuus</i>	aumento massivo (900%)
Fenol total	<i>Echinacea purpúrea</i>	forte aumento (~70%)
Fenol total	<i>Prunus persica</i>	aumento em plantas estressadas
Compostos fenólicos	<i>Thymus capitatus</i>	aumento em plantas estressadas
Fenol total	<i>Hypericum brasiliense</i>	forte aumento (>80%)
Rutina	<i>Hypericum brasiliense</i>	aumento massivo (400%)
Flavonoides	<i>Pisum sativum</i>	forte aumento (>40%)
Antocianinas	<i>Pisum sativum</i>	forte aumento (>80%)
Epicatequinas	<i>Camellia sinensis</i>	aumento em plantas estressadas
Di-hidroxi-xantona	<i>Hypericum brasiliense</i>	aumento massivo (300%)
Ácido betulínico	<i>Hypericum brasiliense</i>	forte aumento (~60%)
Morfina	<i>Papaver somniferum</i>	forte aumento
Cinolizidina	<i>Lupinus angustifolius</i>	forte aumento
Pirrolizidina	<i>Senecio longilobus</i>	forte aumento
Trigonelina	<i>Glycine max</i>	forte aumento
Glucosinolatos	<i>Brassica napus</i>	aumento massivo

A restrição de água pode afetar a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), que podem desempenhar papel na sinalização intracelular por meio do estresse oxidativo, que pode ser diagnosticado pelo acúmulo de peróxidos lipídicos, proteínas oxidadas e bases de DNA modificadas. Durante a resiliência, a depuração destes compostos é dependente de um sistema de enzimas antioxidantes e metabólitos (SHVALEVA et al., 2006).

### **2.3.3 Análise metabolômica**

As análises metabolômicas de plantas são um desafio considerável para os biólogos da área vegetal, devido à sensibilidade limitada das plataformas ou, ainda, à falta de um método geral que possibilite extrair e detectar todo o conjunto de metabólitos de um sistema biológico ou extrato vegetal. O objetivo da realização das análises metabolômicas para bioquímica ou biotecnologia de plantas é obter identificação e quantificação não interferentes do conjunto completo dos metabólitos expresso na planta (WECKWERTH, 2003).

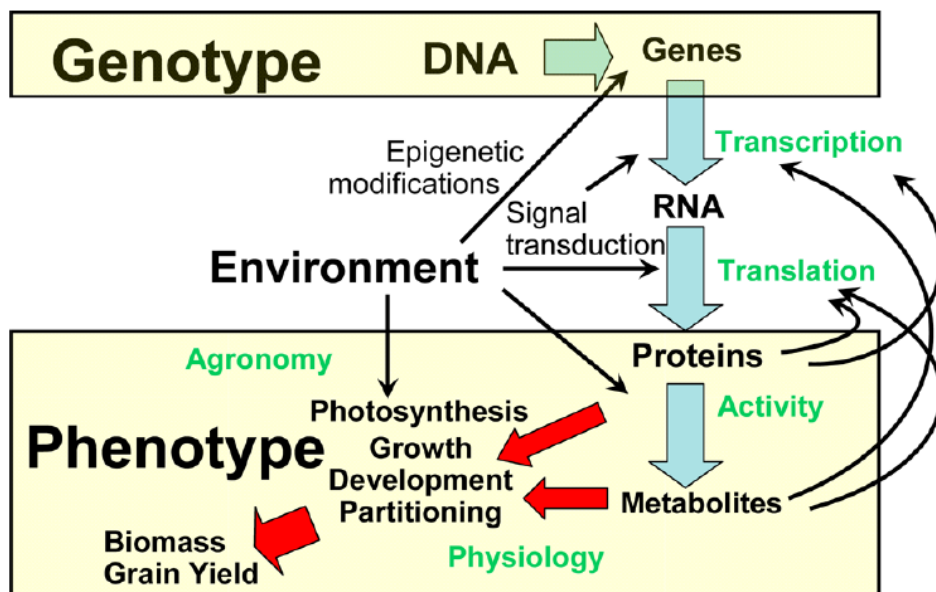
A metabolômica é a tecnologia mais recente do grupo das “ômicas”. Nos últimos anos, ela está cada vez mais sendo utilizada em vários campos da biologia, como genômica funcional, fisiologia, toxicologia, patologia, ecologia química, pesquisa de produtos naturais e na taxonomia química, que visa classificar os organismos em função do conjunto de compostos químicos que eles apresentam (CHOI; VERPOORTE, 2014).

O avanço das tecnologias para o DNA, que culminou com o sequenciamento completo de vários organismos, não foi devidamente acompanhado pelo avanço das tecnologias na análise metabolômica. Em função disso, há uma quantidade muito menor de informações a respeito do metaboloma em relação às do genoma. O melhoramento genético de plantas trouxe diversos avanços para a agricultura, porém, menores que os previstos inicialmente, pois



alguns dos alvos do melhoramento dependem de múltiplos fatores além do genoma propriamente dito, uma vez que o ambiente é capaz de modular a expressão dos genes (Figura 7) por meio das modificações epigenéticas, como a metilação ou a acetilação de histonas. Além disso, há diversos pontos com verdadeiras *loops* de informações biológicas envolvendo metabólitos, proteínas e sRNAs, complicando o padrão de expressão gênica. Pode-se considerar que, enquanto os genes representariam o “potencial”, proteínas e enzimas desenvolvem este potencial e os metabólitos são o resultado final – o que indica que os metabólitos seriam melhores biomarcadores que o DNA (GARCIA-FLORES et al., 2015).

Figura 7 - Distanciamento entre o potencial, representado pelo DNA, e o produto final, representado pelo fenótipo - e os agentes intermediadores deste processo (GARCIA-FLORES et al., 2015).



Os metabólitos são investigados desde antes da era cristã quando, por exemplo, os chineses observaram mudanças nas características de odor, cor e sabor da urina, relacionando-as com outros sintomas, hoje relacionados ao diabetes. Mais recentemente, no início do século XX, o químico alemão Eduard Büchner descobriu que havia compostos que, independente da permanência no interior de uma célula, continuavam executando sua função, tendo recebido o Prêmio Nobel de Química em 1907 por esta descoberta. Porém, o início dos maiores avanços na metabolômica data do fim dos anos 1940, quando a espectrometria de massa foi utilizada para traçar um perfil metabolômico de fluidos corporais de pacientes com esquizofrenia e alcoolismo e culminaram com o início do acoplamento entre técnicas cromatográficas e a espectrometria de massa, nos anos 1950 (GREEF et al., 2013).

Em vários trabalhos publicados recentemente, compararam-se as vantagens e as limitações das plataformas analíticas utilizadas em metabolômica, como espectrometria de massa (MS), ressonância magnética nuclear (NMR), infravermelho (IR) e ultravioleta (UV), combinadas ou não entre si e/ou com técnicas de cromatografia gasosa ou líquida. Protocolos robustos foram publicados para NMR, GC-MS e LC-MS. Mesmo com todos os avanços analíticos, a extração dos metabólitos pode afetar a qualidade dos dados obtidos, uma vez que são detectados apenas os metabólitos extraídos (CHOI; VERPOORTE, 2014).

Diferentes métodos de extração estão disponíveis para análise metabolômica, devendo ser levada em conta, no momento da escolha do método de extração, a polaridade dos metabólitos que serão extraídos e a compatibilidade do extrato com o método analítico a ser utilizado. Uma das principais vantagens em se utilizar solventes orgânicos em detrimento da água é que vários tipos de metabólitos podem ser extraídos. No caso, por exemplo, do sistema bifásico formado por água/metanol/clorofórmio, tanto metabólitos

polares quanto apolares poderão ser extraídos simultaneamente, além de o sistema metanol/água ser compatível com as plataformas analíticas mais comuns, como GC-MS (cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa), LC, LC-MS (cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa), NMR, CE (cromatografia por exclusão) e não carreamento de precipitados salinos, fácil evaporação e grande estabilidade do extrato. Os solventes utilizados nas metodologias de extração (Tabela 2), bem como suas características químicas e físico-químicas, são características fundamentais na tomada de decisão quanto à metodologia de extração a ser utilizada (MUSHTAQ et al., 2014).

Tabela 2 - Características dos solventes mais comumente utilizados em extrações para análises metabolômicas (P' - polaridade; X<sub>e</sub>, X<sub>d</sub>, X<sub>n</sub> – influência da capacidade de doar próton, receber próton e momento de dipolo, respectivamente, na polaridade do composto). Adaptado de Mushtaq et al. (2014).

Solvente	P'	X <sub>e</sub>	X <sub>d</sub>	X <sub>n</sub>	Capacidade de dissolução
Tolueno	2,3	0,32	0,24	0,44	0,29
Éter etílico	2,9	0,55	0,11	0,34	0,38
Etoxi-benzeno	2,9	0,27	0,29	0,44	N/D
Diclorometano	3,4	0,34	0,17	0,49	0,42
Propanol	3,9	0,53	0,21	0,26	~0,82
Butanol	3,9	0,53	0,21	0,26	N/D
Clorofórmio	4,4	0,28	0,39	0,33	0,40
Acetonitrila	6,2	0,30	0,26	0,41	0,65
Metanol	6,6	0,51	0,19	0,30	0,95
Água	9,0	0,40	0,34	0,26	>>1

Uma plataforma muito utilizada é a GC-MS, por oferecer larga cobertura dos analitos e fácil identificação dos compostos. No entanto, esta plataforma requer derivatização de amostra, para torná-la volátil, o que requer muito tempo e dinheiro, além de detectar, principalmente, metabólitos primários. NMR traz como vantagem a análise qualitativa e quantitativa rápida e precisa,

porém, apresenta baixa sensibilidade, não sendo capaz de detectar os metabólitos de menor concentração (BANIASADI et al., 2014).

No estudo de perfis metabolômicos, a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa se apresenta como a ferramenta mais versátil para as análises dessas moléculas, pois as análises via LC-MS/MS possibilitam a identificação e a quantificação de metabólitos, por serem altamente sensíveis, detectando os metabólitos mesmo em baixas concentrações, e muito precisas, possibilitando a identificação dos analitos. Há, também, limitações na técnica, como a baixa retenção dos compostos de interesse na cromatografia em fase reversa, pois a coluna é apolar e os eluentes, polares, assim como os metabólitos (GIKA et al., 2012).

As técnicas alternativas apresentam algumas limitações importantes, como, por exemplo, a NMR, que é pouco sensível, o que dificulta a identificação dos compostos de baixa concentração, e apresenta limitações quanto ao intervalo de moléculas detectáveis; a GC-MS, que necessita de etapas de preparo de amostra, como a derivatização, que pode não ser efetiva em compostos de maior massa molecular e estruturas químicas muito polares, como os metabólitos secundários, e a CE-MS, que não apresenta reprodutibilidade nos tempos de retenção, sendo esta uma limitação importante no caso de amostras reais (BANIASADI et al., 2014; CALDERÓN-SANTIAGO; PRIEGO-CAPOTE; LUQUE DE CASTRO, 2014).

Diante das limitações das técnicas alternativas e da relativamente simples resolução da limitação da LC-MS, esta é a técnica padrão para análise metabolômica (GIKA et al., 2012).

## REFERÊNCIAS

- ALZATE, S. B. A. **Caracterização da madeira de árvores de clones de Eucalyptus grandis, E. saligna e E. grandis x urophylla.** 2004. 133 p. Tese (Doutorado em Recursos Florestais)-Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2004.
- ARANTES, M. D. C. **Variação nas características da madeira e do carvão de um clone de eucalyptus grandis w. hill ex maiden x eucalyptus urophylla s. t. blake.** 2009. 149 p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia da Madeira)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE FLORESTAS PLANTADAS. **Anuário estatístico da ABRAF 2013 ano base 2012.** Brasília, DF, 2013. 146 p.
- BANIASADI, H. et al. Effect of environment and genotype on commercial maize hybrids using LC/MS-based metabolomics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 62, n. 6, p. 1412-1422, 2014.
- BARGALI, K.; TEWARI, A. Growth and water relation parameters in drought-stressed Coriaria nepalensis seedlings. **Journal of Arid Environments**, London, v. 58, n. 4, p. 505-512, 2004.
- BARTELS, D.; SUNKAR, R. Drought and salt tolerance in plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Abingdon, v. 24, n. 1, p. 23-58, 2005.
- BING, F. C. The history of the word ‘metabolism’. **Journal of the History of Medicine and Allied Sciences**, Oxford, v. 26, n. 2, p. 158-180, 1971.
- BORGES, J. D. S. **Análise comparativa do proteoma e metaboloma de raízes de dois clones de E. grandis x E. camaldulensis, sendo um tolerante e um susceptível a condições de estresse hídrico.** 2013. 200 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas)-Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piraciaba, 2013.
- CALDER, I. R. Forests and water-ensuring forest benefits outweigh water costs. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 251, n. 1/2, p. 110-120, 2007.

CALDERÓN-SANTIAGO, M.; PRIEGO-CAPOTE, F.; LUQUE DE CASTRO, M. D. Enhanced detection and identification in metabolomics by use of LC-MS/MS untargeted analysis in combination with gas-phase fractionation. **Analytical Chemistry**, New York, v. 86, n. 15, p. 7558-7565, 2014.

CARVALHO, A. M. **Valorização da madeira do híbrido *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* através da produção conjunta de madeira serrada em pequenas dimensões, celulose e lenha**. 2000. 129 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Madeiras)-Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2000.

CHERNIN, L. et al. Pyrrolnitrin production by an enterobacter agglomerans strain with a broad spectrum of antagonistic activity towards fungal and bacterial phytopathogens. **Current Microbiology**, New York, v. 32, n. 4, p. 208-212, 1996.

CHOI, Y. H.; VERPOORTE, R. Metabolomics: what you see is what you extract. **Phytochemical Analysis**, Chichester, v. 25, n. 4, p. 289-290, 2014.

CORREIA, B. et al. Hormonal dynamics during recovery from drought in two *Eucalyptus globulus* genotypes: from root to leaf. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, v. 82, p. 151-160, Sept. 2014.

DEYHOLOS, M. K. Making the most of drought and salinity transcriptomics. **Plant, Cell & Environment**, Oxford, v. 33, n. 4, p. 648-654, 2010.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **El eucalipto en la repoblación florestal**. Rome, 1981. 747 p.

GARCIA-FLORES, M. et al. Metabolic profiling of plant extracts using direct-injection electrospray ionization mass spectrometry allows for high-throughput phenotypic characterization according to genetic and environmental effects. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Easton, v. 63, n. 3, p. 1042-1052, 2015.

GIKA, H. G. et al. Quantitative profiling of polar primary metabolites using hydrophilic interaction ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1259, p. 121-127, Oct. 2012.

GINDABA, J.; ROZANOV, A.; NEGASH, L. Response of seedlings of two Eucalyptus and three deciduous tree species from Ethiopia to severe water stress. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 201, n. 1, p. 119-129, 2004.

GONÇALVES, J. L. D. M. et al. Integrating genetic and silvicultural strategies to minimize abiotic and biotic constraints in Brazilian eucalypt plantations. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 301, p. 6-27, Aug. 2013.

GRANDA, V. et al. Rapid responses of C14 clone of Eucalyptus globulus to root drought stress: time-course of hormonal and physiological signaling. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 168, n. 7, p. 661-670, 2011.

GREEF, J. van der et al. Looking back into the future: 30 years of metabolomics at TNO. **Mass Spectrometry Reviews**, New York, v. 32, n. 2, p. 399-415, Sept./Oct. 2013.

GROTEWOLD, E. Plant metabolic diversity: a regulatory perspective. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 10, n. 2, p. 57-62, 2005.

GUIMARÃES-DIAS, F. et al. Expression analysis in response to drought stress in soybean: shedding light on the regulation of metabolic pathway genes. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 35, n. 1, p. 222-232, 2012. Supplement.

HALL, R. et al. Plant metabolomics: the missing link in functional genomics strategies. **The Plant Cell**, Rockville, v. 14, n. 7, p. 1437-1440, 2002.

HARE, P. D.; CRESS, W. A.; STADEN, J. V. Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. **Plant, Cell & Environment**, Oxford, v. 21, n. 6, p. 535-553, 1998.

HARFOUCHE, A.; MEILAN, R.; ALTMAN, A. Molecular and physiological responses to abiotic stress in forest trees and their relevance to tree improvement. **Tree Physiology**, Oxford, v. 34, n. 11, p. 1181-1198, 2014.

LOPES, J. L. W. et al. Estresse hídrico em plantio de Eucalyptus grandis vs. *Eucalyptus urophylla*, em função do solo, substrato e manejo hídrico de viveiro. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 35, n. 1, p. 31-39, jan./fev. 2011.

MCKIERNAN, A. B. et al. Responses to mild water deficit and rewatering differ among secondary metabolites but are similar among provenances within Eucalyptus species. **Tree Physiology**, Victoria, v. 36, n. 2, p. 133-147, 2016.

MERCHANT, A. et al. Contrasting physiological responses of six Eucalyptus species to water deficit. **Annals of Botany**, Oxford, v. 100, n. 7, p. 1507-1515, 2007.

MIKULIC-PETKOVSEK, M. et al. Alteration of the content of primary and secondary metabolites in strawberry fruit by *Colletotrichum nymphaeae* infection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 61, n. 25, p. 5987-5995, 2013.

MUSHTAQ, M. Y. et al. Extraction for metabolomics: access to the metabolome. **Phytochemical Analysis**, Chichester, v. 25, n. 4, p. 291-306, 2014.

NIINEMETS, U. Uncovering the hidden facets of drought stress: secondary metabolites make the difference. **Tree Physiology**, Victoria, v. 36, n. 2, p. 129-132, 2016.

OBIDIEGWU, J. E. et al. Coping with drought: stress and adaptive responses in potato and perspectives for improvement. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 6, n. 542, p. 1-23, July 2015.

PINHEIRO, C.; CHAVES, M. M. Photosynthesis and drought: can we make metabolic connections from available data? **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 62, n. 3, p. 869-882, 2011.

PINTO, D. S. et al. Seleção precoce para características de crescimento em testes clonais de *Eucalyptus urophylla*. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 42, n. 102, p. 251-257, 2014.

RAAIJMAKERS, J. M.; VLAMI, M.; SOUZA, J. T. de. Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 81, n. 1, p. 537-547, 2002.

RAO, D. E.; CHAITANYA, K. V. Photosynthesis and antioxidative defense mechanisms in deciphering drought stress tolerance of crop plants. **Biologia Plantarum**, Plantarum, v. 60, n. 2, p. 201-218, 2016.

SAPETA, H. et al. Transcriptomics and physiological analyses reveal co-ordinated alteration of metabolic pathways in *Jatropha curcas* drought tolerance. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 67, n. 3, p. 845-860, 2016.



- SCANAVACA JUNIOR, L.; GARCIA, J. N. Potencial de melhoramento genético em *Eucalyptus urophylla* procedente da Lha Flores. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 64, p. 23-32, 2003.
- SELMAR, D. Potential of salt and drought stress to increase pharmaceutical significant secondary compounds in plants. **Landbauforschung - vTI** Agriculture and Forestry Research, Hamburgo, v. 58, n. 1/2, p. 139-144, June 2008.
- SHVALEVA, A. L. et al. Metabolic responses to water deficit in two *Eucalyptus globulus* clones with contrasting drought sensitivity. **Tree Physiology**, Victoria, v. 26, n. 2, p. 239-248, 2006.
- SILVA, C. A. et al. Estoque de carbono na biomassa aérea florestal em plantações comerciais de *Eucalyptus* spp. carbon stock in aboveground forest biomass in commercial *Eucalyptus* spp. plantation. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 43, n. 105, p. 135-146, 2015.
- SOARES, N. S.; SILVA, M. L. da; CORDEIRO, S. A. Produto interno bruto do setor florestal brasileiro, 1994 a 2008. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 38, n. 4, p. 725-732, 2014.
- STAMP, N. Out of the quagmire of plant defense hypotheses. **The Quarterly Review of Biology**, Chicago, v. 78, p. 23-55, 2003.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 820 p.
- TRABULSI, M. C. M. **Avaliação dos parâmetros hídricos do solo em um plantio adensado de *Eucalyptus urograndis***. 2011. 55 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia)-Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2011.
- VELLINI, A. L. T. T. et al. Respostas fisiológicas de diferentes clones de eucalipto sob diferentes regimes de irrigação. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 32, p. 651-663, 2008.
- VERPOORTE, R.; ALFERMANN, A. W. **Metabolic engineering of plant secondary metabolism**. Dordrecht: Kluwer Academic, 2000. 297 p.
- WARREN, C. R.; ARANDA, I.; CANO, F. J. Metabolomics demonstrates divergent responses of two *Eucalyptus* species to water stress. **Metabolomics**, Alberta, v. 8, n. 2, p. 186-200, 2012.

WECKWERTH, W. Metabolomics in systems biology. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 54, n. 1, p. 669-689, 2003.

WHITEHEAD, D.; BEADLE, C. L. Physiological regulation of productivity and water use in Eucalyptus: a review. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 193, n. 1/2, p. 113-140, 2004.

WOLFENDER, J. L. et al. Current approaches and challenges for the metabolite profiling of complex natural extracts. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1382, p. 136-164, Feb. 2015.

WORLD WATER ASSESSMENT PROGRAMME. **Encarando os desafios: estudos de caso e indicadores**. Paris: Ed. UNESCO, 2015. 78 p.

XU, Z.; ZHOU, G.; SHIMIZU, H. Plant responses to drought and rewatering. **Plant Signaling & Behavior**, Bonn, v. 5, n. 6, p. 649-654, 2010.

ZHOU, B. et al. LC-MS-based metabolomics. **Molecular BioSystems**, Cambridge, v. 8, n. 2, p. 470-481, 2012.

## CAPÍTULO 2

### METODOLOGIA PARA UTILIZAÇÃO DE AREIA EM EXPERIMENTOS DE INDUÇÃO DE ESTRESSE HÍDRICO EM PLANTAS DE *Eucalyptus urograndis*

#### RESUMO

O agravamento das mudanças climáticas e o aumento populacional provocarão aumento ainda maior na demanda mundial por água. Considerando que 70% da água utilizada no planeta se destinam à produção vegetal, a descoberta de processos adaptativos às condições de restrição de água, visando implementá-los em espécies de interesse agrônômico, vem sendo objeto de vários estudos. Ao se verificar a importância, para a economia nacional, das atividades da silvicultura, em especial de espécies do gênero *Eucalyptus*, e diante da existência de clones com diferentes níveis de tolerância ao estresse hídrico, é vital a compreensão dos mecanismos empregados pelas plantas em resposta ao estresse. Visando o estudo destes mecanismos e a prospecção de genes relacionados ao estresse hídrico, diversos estudos vêm sendo realizados, *in vitro* ou *ex vitro*. Apesar das vantagens de cada um dos métodos, há desvantagens importantes, como o fato de os experimentos *in vitro* se distanciarem muito da realidade de campo, onde as plantas realmente poderão estar sob a situação de estresse hídrico e os experimentos *ex vitro* com a utilização de vermiculita acabam por adicionar um agente competidor, uma vez que a vermiculita tem alta capacidade de absorção de água. Dessa forma, este trabalho foi realizado com o objetivo de desenvolver uma metodologia para a utilização de areia como substrato em experimentos em casa de vegetação, sendo possível mostrar a conveniência da utilização de areia como substrato para a realização de experimentos de estresse hídrico *ex vitro*, sendo possível, com o controle da umidade da areia, controlar o  $\Psi_H$  ao qual a planta está submetida.

Palavras-chave: Avaliação de substrato. *Eucalyptus urograndis*. Estresse hídrico. Areia.

## ABSTRACT

The worsening of climate change and global population growth causes a gradual increase in global demand for water, either for direct human consumption or for food production in general. Agricultural production consumes about 70% of the entire water that is used on the planet, therefore, it has been the subject of many studies worldwide the discovery of adaptive water restrictions, aiming to implement them in species of agronomic interest. Verifying the importance of forestry activities in the national economy, especially the Eucalyptus genus, and also the existence of clones with different levels of tolerance to water stress, it is vital to understand the mechanisms used by plants in response to this stress. Intending to study these mechanisms and the search for genes related to water stress, several studies are conducted either in vitro or ex vitro. Despite the advantages of each method, there are important disadvantages such as the fact that in vitro experiments get a significant distance from the field reality, where the plants may actually be under water stress situation; ex vitro experiments using vermiculite eventually add a competitive agent, since the vermiculite has high water absorption capacity. In this way, this study aimed to develop a methodology for the use of sand as a substrate in experiments in the greenhouse, it is possible to show the convenience of using sand as a substrate for conducting water stress experiments ex vitro is possible, with humidity control sand, control  $\Psi_H$  to which the plant is subjected.

Keywords: Substrate evaluation. *Eucalyptus urograndis*. Drought stress. Sand.

## 1 INTRODUÇÃO

As plantas estão frequentemente expostas a vários tipos de estresse, sejam bióticos (vírus, bactérias e fungos), sejam abióticos (restrição à água, variações de fotoperíodo, temperaturas extremas, salinidade, entre outros), que afetam seu crescimento, desenvolvimento e produtividade (GUIMARÃES-DIAS et al., 2012; RAO; CHAITANYA, 2016).

As perspectivas para o avanço da seca são preocupantes e os modelos de predição das condições climáticas trazem o agravamento dos efeitos do aquecimento global (SAPETA et al., 2016).

A queda na disponibilidade de água disponível para a planta gera uma série de reações fisiológicas, impactando negativamente o crescimento, devido ao fechamento estomático, à menor assimilação de CO<sub>2</sub> e síntese de assimilados, à diminuição da área foliar, à menor eficiência do aparato fotossintético e à menor expansão radicular, entre outras (BARTELS; SUNKAR, 2005).

No Brasil, as espécies *Eucalyptus grandis*, *E. urophylla* e o seu híbrido adquiriram grande importância para a produção de papel e celulose de fibra curta (CARVALHO, 2000), sendo um dos híbridos mais utilizados no setor florestal e industrial brasileiro.

O consumo de água pelas florestas é, em geral, maior do que o consumo de vegetação de menor porte de culturas agrícolas não irrigadas. As plantações florestais com espécies de crescimento rápido, como o eucalipto, apresentam maior consumo de água, comparadas às de vegetação de menor porte, às das florestas naturais e das plantações com espécies de crescimento lento (CALDER, 2007).

Investigações em casa de vegetação sobre o efeito do estresse hídrico, induzido pela suspensão da irrigação, podem prever como as espécies de plantas respondem ao estresse hídrico em condições de campo (GINDABA;

ROZANOV; NEGASH, 2004). São apresentadas, como possíveis substratos para a realização destes experimentos, a vermiculita (LOPES et al., 2011; VELLINI et al., 2008), que é capaz de absorver até 240% do seu peso em água (SUTCU, 2015) e a areia, utilizada por Balasubramaniyam, Chapman e Harvey (2015) em estudos para avaliação de resposta a estresse químico e hídrico, que não é capaz de absorver água.

Diante das características de cada substrato e da escassez de informações quanto à utilização da areia, neste trabalho objetivou-se desenvolver metodologia para indução de estresse hídrico em plantas de eucalipto, com a utilização de areia como substrato.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Aclimação das plantas de eucalipto em casa de vegetação:**

Para a realização deste trabalho foram selecionadas 67 mudas clonadas de eucalipto (clone VM<sub>1</sub>) com 90 dias de idade. As mudas foram plantadas em vasos de 700 mL, contendo, aproximadamente, 1 kg de areia média seca, homogeneizada e peneirada, e foram aclimatadas em casa de vegetação durante 30 dias. Durante a aclimação, a irrigação por aspersão foi interrompida e as mudas foram mantidas com adubação utilizada em viveiros comerciais, sendo irrigadas à capacidade de campo uma vez por semana. Destas mudas foram selecionadas as 54 que apresentavam maior uniformidade para compor os grupos experimentais. Após este período, a adubação foi interrompida e iniciada a irrigação diária com 50 mL de água, por cinco dias, até o início da indução do estresse.

### **2.2 Cálculo da equação duplo van Genuchten**

Os pontos utilizados nos ajustes das curvas de retenção de água foram obtidos a partir das três repetições. Para tanto, foram testados nove potenciais matriciais: -0,01 kPa, como condição de solo saturado; -2, -4, -6 e -10 kPa, por meio de mesas de tensão e -33, -100, -500 e -1.500 kPa, nos aparelhos extratores de Richards (CARDUCCI et al., 2011; DONAGEMA et al., 2011). Após atingir o equilíbrio hídrico, as amostras foram pesadas e, após a última tensão, foram secas em estufa, a  $\pm 105$  °C, por 24 horas, para definir o conteúdo volumétrico de água do solo ( $\Theta$ ) correspondente às várias tensões. Com base nos dados, foi realizada uma regressão e obtida a equação de duplo van Genuchten, relacionando o percentual de água e o potencial hídrico da areia.

### **2.3 Indução do estresse hídrico e determinação dos estágios de estresse**

Das 54 plantas selecionadas, nove foram marcadas como parcela “controle” e agrupadas três a três, cuja irrigação foi mantida com 50 mL diários e, dentre as demais, cuja irrigação foi interrompida, nove foram selecionadas e agrupadas três a três, tendo sido utilizadas para as pesagens. A massa do sistema planta+pote+areia para o grupo estresse hídrico foi medida e anotada diariamente, a fim de calcular a perda de água e o valor do potencial osmótico ao qual a planta estava submetida. As plantas foram mantidas sob estresse hídrico por seis dias, quando apresentaram sinais severos de restrição à água, conforme Figura 9, e foram reidratadas à capacidade de campo, para avaliação de sua capacidade de resiliência.

A partir da observação do aspecto morfológico da planta, foram determinados três pontos para cálculo do potencial osmótico: EH<sub>1</sub> (início da murcha nas folhas, aspecto geral bom, gema apical ereta), EH<sub>2</sub> (murcha avançadas das folhas, aspecto geral ruim, gema apical ereta) e EH<sub>3</sub> (murcha avançadas das folhas, aspecto geral ruim, gema apical pendente).

### **2.4 Cálculo do teor de água na amostra de areia e do potencial osmótico**

Para o cálculo do teor de umidade e de estresse hídrico, toda a areia contida nos potes referentes a cada parcela foi colocada em uma bandeja e homogeneizada. Uma amostra desta areia úmida foi coletada e submetida à secagem, a 70 °C, em estufa com ventilação forçada, sendo efetuadas pesagens a cada 3 horas, até massa constante, por três pesagens consecutivas.

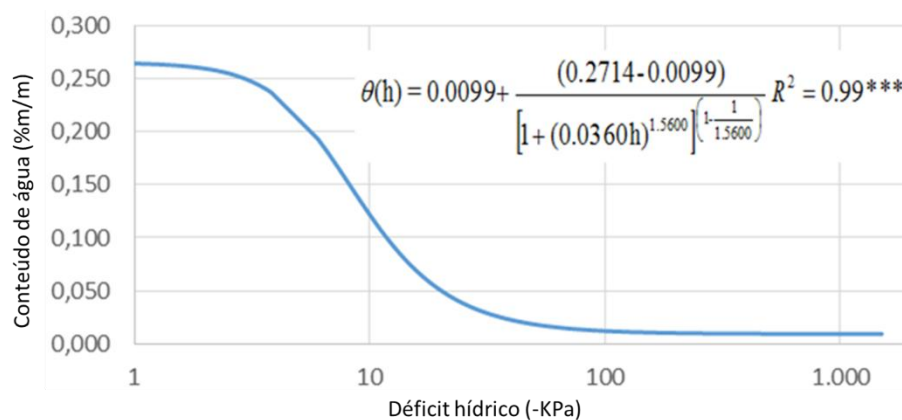


### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Curva de retenção de água

A partir dos dados obtidos nas mesas de tensão e do extrator de Richards, foi obtida a equação de duplo van Genuchten (Figura 8).

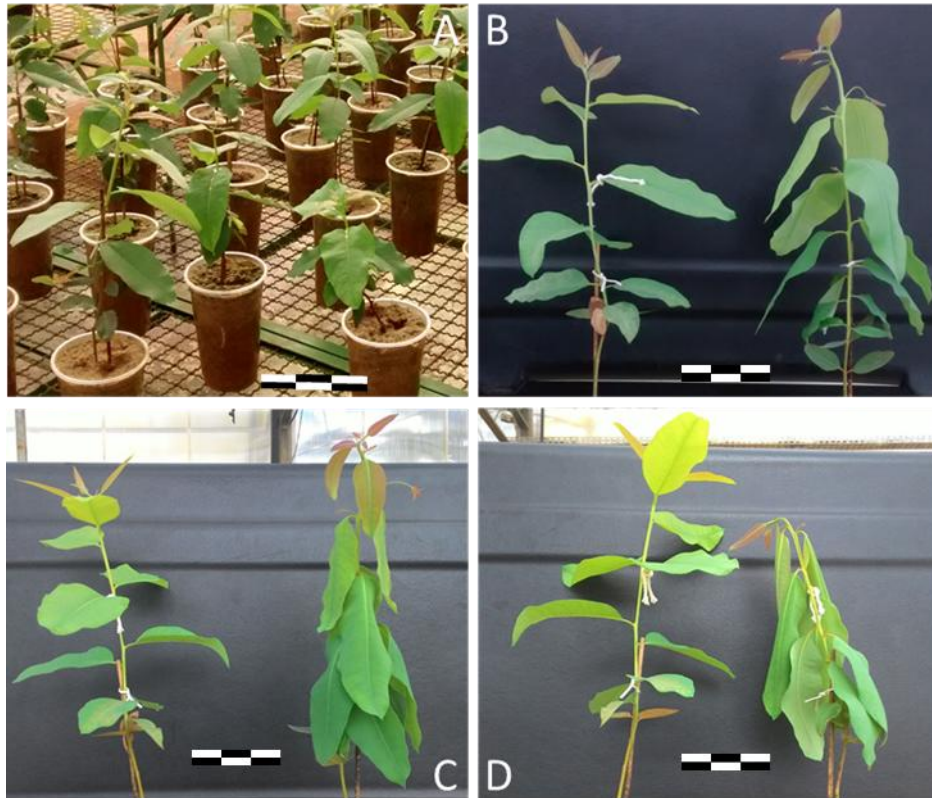
Figura 8 - Equação de duplo Van Genuchten para a areia, com sua respectiva representação gráfica.



#### 3.2 Determinação dos pontos para cálculo do potencial osmótico

A determinação de quais pontos seriam considerados para cada situação de estresse se baseou no julgamento visual do aspecto fisiológico da planta, tomando como base o observado no início do experimento (Figura 9). No primeiro ponto de coleta (EH<sub>1</sub>), as plantas apresentavam murcha inicial das folhas e ápice ereto. No segundo ponto (EH<sub>2</sub>), as plantas apresentavam murcha de moderada a severa e ápice ereto. No terceiro ponto (EH<sub>3</sub>), as plantas apresentavam murcha severa e ápice pendente. Os pontos de estresse se relacionam ao 4º, 5º e 6º dia após a interrupção de irrigação.

Figura 9 - Condição fisiológica das mudas no momento da coleta das amostras, sendo (A) condição C<sub>i</sub>, (B) condição EH<sub>1</sub>, (C) condição EH<sub>2</sub> e (D) condição EH<sub>3</sub> (barras de escala com 9 cm).



### 3.3 Cálculo da umidade da areia e potencial osmótico

As massas e a umidade da areia calculada para cada um dos pontos definidos (EH<sub>1</sub>, EH<sub>2</sub> e EH<sub>3</sub>) estão relacionadas na Tabela 3. De acordo com os dados de umidade e utilizando a equação obtida, foi possível calcular os déficits hídricos aos quais as plantas de eucalipto estavam submetidas (Tabela 4).

Tabela 3 - Valores de umidade calculados após a secagem em estufa.

	Areia úmida (g)	Areia seca (g)	Água (g)	Teor umidade
Controle	119,47	98,43	21,04	21,38%
	135,16	110,91	24,25	21,87%
	132,81	110,06	22,75	20,67%
Média	129,15	106,46	22,68	21,31%
EH1	89,04	86,72	2,32	2,67%
	93,51	92,05	1,45	1,58%
	91,57	86,32	5,24	6,07%
Média	91,37	88,37	3,00	3,44%
EH2	84,83	84,13	0,70	0,83%
	92,02	90,61	1,41	1,56%
	109,65	108,82	0,83	0,76%
Média	95,50	94,52	0,98	1,05%
EH3	138,44	137,76	0,67	0,49%
	144,25	143,76	0,50	0,35%
	135,88	134,90	0,98	0,73%
Média	139,52	138,81	0,72	0,52%
Resiliência	119,5	98,4	21,0	21,40%
	135,2	110,9	24,3	21,90%
	132,8	110,1	22,7	20,70%
Média	129,15	106,46	22,68	21,30%

Tabela 4 - Potencial mátrico ( $\Psi_H$ ) calculado para cada um dos pontos de coleta das amostras submetidas ao estresse hídrico.

Amostra	Teor umidade	$\Psi_H$
Ci	19,90%	- 0,036 kPa
Cf	21,30%	-0,032 kPa
EH <sub>1</sub>	3,40%	- 1,950 kPa
EH <sub>2</sub>	1,04%	- 1500,000 kPa
EH <sub>3</sub>	0,52%	-
Resiliência	20,60%	-0,034 kPa

#### 4 DISCUSSÃO

A areia foi utilizada na condução do experimento por não ter capacidade de absorção de líquido, tornando toda a água contida no vaso teoricamente disponível para a planta. A areia se mostrou um bom substrato para a realização do experimento, pois permitiu que a planta se desenvolvesse de forma satisfatória e não interferiu no resultado da análise.

A variação da umidade nos primeiros dois dias, com a perda de 50% da água contida nos frascos – seja por evapotranspiração da água contida na planta ou por evaporação da água contida na areia – indica uma imposição demasiadamente rápida a uma condição de estresse, levando, no quarto dia e com perda de 80% da água disponível, ao início dos sinais visuais de restrição à água.

Foi possível avaliar o teor de água na areia, relacionando a cada teor de umidade um determinado potencial hídrico,  $\Psi_H$ , dado este que é utilizado para a análise de experimentos de estresse hídrico em plantas, pois o teor de água na areia, por si só, não é uma indicação exata de déficit hídrico. A exposição, por 8 dias, a  $\Psi_H$ -140 kPa foi suficiente para causar efeitos fisiológicos (UTKHAO; YINGJAJAVAL, 2015), sem afetar drasticamente a planta.

Com o decréscimo gradual do  $\Psi_H$ , foi possível mimetizar as condições de campo, porém, a utilização da areia também possibilita analisar a resposta modulada por um determinado nível de estresse hídrico, bastando que, para tal, a umidade do substrato seja mantida no nível correspondente ao potencial hídrico desejado.

Das plantas levadas ao ponto máximo de estresse, 44% não conseguiram se recuperar depois de reidratadas, mostrando que a exposição a estresses muito acentuados, mesmo que obtidos de forma gradual, afeta severamente o eucalipto.

Por outro lado, é necessária pesquisa no sentido de identificar quais são os mecanismos responsáveis pela resposta das plantas que se recuperaram, ainda mais tendo sido este comportamento contrastante identificado em plantas monoclonais.

## 5 CONCLUSÃO

A areia se apresenta como alternativa para utilização como substrato em experimentos visando estudo de resposta a estresse hídrico, podendo o nível de déficit hídrico ser modulado de acordo com o teor de umidade que a areia apresenta durante a indução do estresse.

É necessário recalcular a equação de duplo van Genuchten, ou utilizar outro modelo matemático, para a areia em condições de déficit hídrico severas.

Devido a não retenção de umidade por parte da areia, a sua utilização deve estar condicionada ao monitoramento do teor de umidade e ao controle da sua queda, evitando-se a imposição do estresse de forma demasiadamente rápida, possibilitando o estudo das respostas às diferentes fases do estresse.

## REFERÊNCIAS

- BALASUBRAMANIYAM, A.; CHAPMAN, M. M.; HARVEY, P. J. Responses of tall fescue (*Festuca arundinacea*) to growth in naphthalene-contaminated sand: xenobiotic stress versus water stress. **Environmental Science and Pollution Research**, Oxford, v. 22, n. 10, p. 7495-7507, 2015.
- BARTELS, D.; SUNKAR, R. Drought and salt tolerance in plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Abingdon, v. 24, n. 1, p. 23-58, 2005.
- CALDER, I. R. Forests and water-ensuring forest benefits outweigh water costs. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 251, n. 1/2, p. 110-120, 2007.
- CARDUCCI, C. E. et al. Modeling the water retention curve in oxisols using the double Van Genuchten equation. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 35, n. 1, p. 77-86, 2011.
- CARVALHO, A. M. **Valorização da madeira do híbrido *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* através da produção conjunta de madeira serrada em pequenas dimensões, celulose e lenha**. 2000. 129 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Madeiras)-Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2000.
- DONAGEMA, G. K. et al. **Manual de métodos de análise de solos**. 2. ed. Rio de Janeiro: EMBRAPA Solos, 2011. 230 p.
- GINDABA, J.; ROZANOV, A.; NEGASH, L. Response of seedlings of two *Eucalyptus* and three deciduous tree species from Ethiopia to severe water stress. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 201, n. 1, p. 119-129, 2004.
- GUIMARÃES-DIAS, F. et al. Expression analysis in response to drought stress in soybean: shedding light on the regulation of metabolic pathway genes. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 35, n. 1, p. 222-232, 2012. Supplement.
- LOPES, J. L. W. et al. Estresse hídrico em plantio de *Eucalyptus grandis* vs. *Eucalyptus urophylla*, em função do solo, substrato e manejo hídrico de viveiro. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 35, n. 1, p. 31-39, 2011.

RAO, D. E.; CHAITANYA, K. V. Photosynthesis and antioxidative defense mechanisms in deciphering drought stress tolerance of crop plants. **Biologia Plantarum**, Plantarum, v. 60, n. 2, p. 201-218, 2016.

SUTCU, M. Influence of expanded vermiculite on physical properties and thermal conductivity of clay bricks. **Ceramics International**, Faenza, v. 41, n. 2, p. 2819-2827, 2015.

UTKHAO, W.; YINGJAJAVAL, S. Changes in leaf gas exchange and biomass of *Eucalyptus camaldulensis* in response to increasing drought stress induced by polyethylene glycol. **Trees**, Berlin, v. 29, n. 5, p. 1581-1592, 2015.

VELLINI, A. L. T. T. et al. Respostas fisiológicas de diferentes clones de eucalipto sob diferentes regimes de irrigação. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 32, p. 651-663, 2008.



### CAPÍTULO 3

## IDENTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS RESPONSIVOS A ESTRESSE HÍDRICO EM *Eucalyptus urograndis*

### RESUMO

O agravamento das mudanças climáticas e o aumento populacional provocarão o aumento da demanda mundial por água. Considerando que 70% da água utilizada no planeta se destinam à produção vegetal, a descoberta de processos adaptativos a condições de restrição de água, visando implementá-los em espécies de interesse agrônômico, vem sendo objeto de estudos. Ao se verificar a importância na economia nacional das atividades da silvicultura, em especial de espécies do gênero *Eucalyptus*, e diante da existência de clones com diferentes níveis de tolerância ao estresse hídrico, é vital a compreensão dos mecanismos empregados pelas plantas em resposta ao estresse. Durante o estudo de metabólitos produzidos em plantas submetidas a diferentes níveis de restrição de água, foi possível observar, por meio de análises de LC-MS, a existência de quarenta possíveis moléculas responsivas ao estresse, das quais, de acordo com as análises estatísticas realizadas, nove foram identificadas como efetivamente responsivas ao estresse hídrico. Dentre estas moléculas estão: o ácido 6-fosfogluconico, cuja diminuição na concentração permite associar a queda das taxas de metabolismo e a consequente decadência da planta; a indolina, provavelmente relacionada a rotas catabólicas envolvendo o ácido indol-acético (AIA), na forma da espécie conjugada entre AIA-fenilalanina; o aminoácido valina, o fenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo e o p-toluil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo, provavelmente associados ao combate de espécies reativas de oxigênio. Além destes, outros possíveis metabólitos responsivos ao estresse hídrico foram encontrados, devendo ser validados por meio de novos estudos. Todos estes compostos citados têm potencial de atuar como marcadores de nível de estresse ou ser utilizados para a prospecção de mecanismos genéticos que possam conferir a plantas de interesse melhor adaptação ao estresse hídrico.

Palavras-chave: Perfil metabolômico. *Eucalyptus urograndis*. LC-MS. Estresse hídrico.

## ABSTRACT

The worsening of climate change and global population growth causes a gradual increase in global demand for water, either for direct human consumption or for food production in general. Agricultural production consumes about 70% of the entire water that is used on the planet, therefore, it has been the subject of many studies worldwide the discovery of adaptive water restrictions, aiming to implement them in species of agronomic interest. Verifying the importance of forestry activities in the national economy, especially the Eucalyptus genus, and also the existence of clones with different levels of tolerance to water stress, it is vital to understand the mechanisms used by plants in response to this stress. During the study of metabolites produced in plants submitted to different levels of water restriction was observed by LC-MS analysis, the existence of forty possible responsive molecules to stress, which, according with statistical analyzes, nine were identified as effectively responsive to water stress. Among these molecules are: 6-fosfogluçônico acid, which decrease in concentration allows associating the drop in metabolism rates and the consequent decline of the plant; indoline, probably related to catabolic pathways involving indole-acetic acid (IAA), in the form of the species coupled between EIA-Phenylalanine; the valine amino acid, phenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside and p-toluoyl- $\beta$ -D-glucopyranoside, probably associated with combat reactive oxygen species. Besides these, other potential metabolites responsive to water stress were found and should be validated by further studies. All these mentioned compounds have the potential to act as stress level markers or used for prospecting for genetic mechanisms that may confer to plants of interest better adaptation to water stress.

Keywords: Metabolomic profile. *Eucalyptus urograndis*. LC-MS. Drought stress.

## 1 INTRODUÇÃO

As plantas estão frequentemente expostas a vários tipos de estresse, bióticos ou abióticos, que afetam seu crescimento, desenvolvimento e produtividade (GUIMARÃES-DIAS et al., 2012; RAO; CHAITANYA, 2016). A seca é uma importante limitação ambiental, afetando a produtividade e a distribuição da população das plantas, em alguns casos podendo reduzir o retorno da cultura em até 50% e, aliada à salinização, afeta mais de 10% da terra cultivável em todo o mundo (BARTELS; SUNKAR, 2005).

No Brasil há cerca de 7,2 Mha de florestas plantadas, sendo 71% desta área ocupados com plantio de árvores do gênero *Eucalyptus*. Entre os estados, Minas Gerais responde por 28,2% desta área, seguido por São Paulo, com 20,4% e pela Bahia, com 11,8% (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE FLORESTAS PLANTADAS - ABRAF, 2013). O eucalipto apresenta bom desempenho em produção, com faturamento próximo a US\$2,5 bilhões (5% do PIB) e gerando, aproximadamente, 2 milhões de empregos diretos e indiretos (SOARES; SILVA; CORDEIRO, 2014).

As plantações florestais com espécies de crescimento rápido, como o eucalipto, apresentam maior consumo de água, comparadas à vegetação de menor porte, às florestas naturais e às plantações com espécies de crescimento lento (CALDER, 2007). No entanto, é possível afirmar que o eucalipto é uma espécie florestal que não consome mais água por unidade de biomassa que as outras espécies, inclusive apresentando melhor eficiência do uso da água (WHITEHEAD; BEADLE, 2004).

Respostas moleculares, dentre elas a síntese de metabólitos secundários, são importantes para proteger as plantas mediante sua exposição ao estresse. Estes compostos, dentre eles polifenóis, alcaloides, terpenos, policetonas (dentre as quais micotoxinas), são necessários à sobrevivência em determinadas

condições ambientais, pois são produzidos devido à relação interorganismos e com o meio, inclusive em condições de estresse abiótico (RAO; CHAITANYA, 2016; VERPOORTE; ALFERMANN, 2000; WOLFENDER et al., 2015).

Mesmo com os avanços trazidos pelo melhoramento genético de plantas, nem todo o potencial genético inserido nas plantas se converte em respostas efetivas, como melhora na produtividade ou na capacidade de adaptação a uma condição ambiental. Seria possível compreender e modular estes comportamentos de forma mais eficiente a partir da compreensão de todo o processo de regulação gênica, no qual os metabólitos têm grande importância (GARCIA-FLORES et al., 2015).

Este trabalho foi realizado com o objetivo de identificar metabólitos responsivos ao estresse hídrico em mudas monoclonais de *Eucalyptus urograndis*.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Obtenção das plantas de eucalipto sob estresse hídrico

Para a realização deste trabalho foram selecionadas 67 mudas clonadas de eucalipto, clone VM<sub>1</sub>, com 90 dias de idade. As mudas foram plantadas em vasos contendo areia (seca, homogeneizada e peneirada) e aclimatadas em casa de vegetação, durante 30 dias.

Durante a aclimação, a irrigação por aspersão foi interrompida e as mudas foram mantidas com adubação utilizada em viveiros comerciais, sendo irrigadas, à capacidade de campo, uma vez por semana. Destas mudas, foram selecionadas as 54 que apresentavam maior uniformidade para compor os grupos experimentais. Após este período, a adubação foi interrompida e iniciada a irrigação diária, com 50 mL de água, por cinco dias, até o início da indução do estresse.

Das 54 mudas selecionadas, nove tiveram a irrigação diária mantida, com 50 mL de água, tendo sido identificada como o grupo “Controle Final (C<sub>f</sub>)”. Todas as outras mudas tiveram o suprimento de água cortado.

As mudas foram submetidas a déficit hídrico por seis dias, quando apresentaram sinais severos de restrição de água e foram reidratadas à capacidade de campo, para avaliação de sua resposta.

A partir da observação do aspecto fisiológico da muda, foram determinados três pontos para cálculo do potencial osmótico: EH<sub>1</sub> (início da murcha nas folhas, aspecto geral bom, gema apical ereta), EH<sub>2</sub> (murcha avançadas das folhas, aspecto geral grave, gema apical ereta) e EH<sub>3</sub> (murcha avançadas das folhas, aspecto geral grave, gema apical pendente).

## 2.2 Coleta das amostras

Nos pontos definidos, nove mudas foram coletadas aleatoriamente, excetuando-se as do grupo  $C_f$  e agrupadas três a três, formando as replicatas técnicas. Destas, a parte aérea foi retirada, congelada em nitrogênio líquido e armazenada, a  $-80\text{ }^\circ\text{C}$ , até a extração. Os grupos analisados foram Controle Inicial ( $C_i$ ) – dia 0; Estresse Hídrico 1 ( $EH_1$ ) – dia 4; Estresse Hídrico 2 ( $EH_2$ ) – dia 5; Estresse Hídrico 3 ( $EH_3$ ) – dia 6; Controle Final ( $C_f$ ) – dia 6 e Resiliência (RES) – dia 12.

## 2.3 Análise metabolômica

A extração dos metabólitos seguiu o protocolo MCW (BADINELLI, 2008), com algumas alterações. As folhas e o ápice de cada planta foram macerados com almofariz e pistilo em nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino e homogêneo. Foram pesados 75 mg de tecido macerado, aos quais foram adicionados 3 mL de solução MCW (metanol, clorofórmio e água, 12:5:3 (v/v/v)).

A suspensão obtida foi agitada em vórtex, por 10 segundos, e armazenada, por 72 horas, a  $4\text{ }^\circ\text{C}$ . Após o período de repouso, a amostra foi novamente agitada, por 10 segundos, em vórtex e centrifugada, a 16.100 g, a  $4\text{ }^\circ\text{C}$ , por 10 minutos. Do sobrenadante formado, 2 mL foram transferidos para um novo tubo falcon de 15 mL e adicionados 500  $\mu\text{L}$  de clorofórmio e 750  $\mu\text{L}$  de água. Após agitação em vórtex, por 10 segundos e centrifugação, a 16.100 g,  $4\text{ }^\circ\text{C}$ , por 10 minutos, o tubo foi deixado em repouso, por 2 horas, para separação das fases orgânica e aquosa.

A fase aquosa foi coletada, filtrada em filtro de seringa (membrana PES, hidrofóbica, 0,22  $\mu\text{m}$  de poro) e analisada via LC-MS em um sistema UFLC

série 20 (Shimadzu) acoplado a um espectrômetro de massa microTOF Q-II (Bruker). As amostras, cujo volume injetado foi de 25  $\mu\text{L}$ , foram separadas em uma coluna Ascentis Express C18 de 15 cm x 2,1 mm, 2,7  $\mu\text{m}$  (Supelco) em fase reversa, equipada com pré-coluna Ascentis Express C18 – 5 mm x 2,1 mm, 2,7  $\mu\text{m}$  (Supelco), mantida a 35  $^{\circ}\text{C}$ .

O fluxo de fase móvel foi de 200  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  e o gradiente de eluição, utilizando água com 0,1% de ácido fórmico (A) e acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico (B), foi composto por: 0-2 min: 2% B; 2-4 min: 2 – 50% B; 4-17 min: 50 – 98% B; 17-20 min: 98% B; 20-21 min: 98% - 2% B; 21-24 min: 2% B.

Os analitos foram detectados em modo positivo, no intervalo de 50 a 1.000m/z, estando o gás de secagem ( $\text{N}_2$ ) a 8  $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  a 180  $^{\circ}\text{C}$ , a voltagem do capilar a -4.500 V e a energia de fragmentação na célula de colisão variável entre 20 e 70 eV, tendo os dados de MS/MS sido obtidos para os íons precursores cuja intensidade estivesse acima de  $1 \times 10^3$ .

Os dados brutos obtidos foram analisados por meio software Profile Analysis 2.1 (versão 265) para calibração dos espectros, alinhamento dos cromatogramas e geração dos *buckets*, que são prováveis compostos obtidos nas análises dos espectros de MS. Para se obter um *bucket* é necessário o alinhamento de duas características inerentes a cada composto: o tempo de retenção cromatográfico, resultado da variação na interação preferencial do analito pela fase estacionária ou pela fase móvel cromatográfica, e o valor da relação m/z (massa/carga) do íon formado, resultado da interação da molécula com a fase móvel podendo ser positivo, no caso da acepção de um próton ou negativo, no caso da doação de um próton.

A partir da geração dos *buckets*, as análises estatísticas foram realizadas na plataforma online MetaboAnalyst 3.0 (<http://www.metaboanalyst.ca/faces/home.xhtml>). Para identificação dos *buckets*

de interesse, os espectros de MS e MS/MS foram utilizados para busca *on-line*, utilizando-se o algoritmo gratuito MetFrag (<http://msbi.ipb-halle.de/MetFrag/>).



### 3 RESULTADOS

Para cada um dos pontos de coleta foi calculado o potencial hídrico em função da umidade medida em cada grupo amostral (Tabela 5), relacionados aos pontos amostrais nos quais as plantas apresentaram os sinais de estresse hídrico (Figura 10).

Tabela 5 - Potencial hídrico  $\Psi_H$  calculado para cada um dos pontos de coleta das amostras submetidas ao estresse hídrico.

Amostra	Teor umidade (médio)	$\Psi_H$
Ci	19,90%	- 0,036 kPa
Cf	21,30%	-0,032 kPa
EH <sub>1</sub>	3,40%	- 1,950 kPa
EH <sub>2</sub>	1,04%	- 1500,000 kPa
EH <sub>3</sub>	0,52%	-
Resiliência	20,60%	-0,034 kPa

Figura 10 - Condição fisiológica das mudas de eucalipto no momento da coleta das amostras, sendo (A) a condição EH<sub>1</sub>, (B) a condição EH<sub>2</sub> e (C) a condição EH<sub>3</sub> (barras de escala com 9 cm).



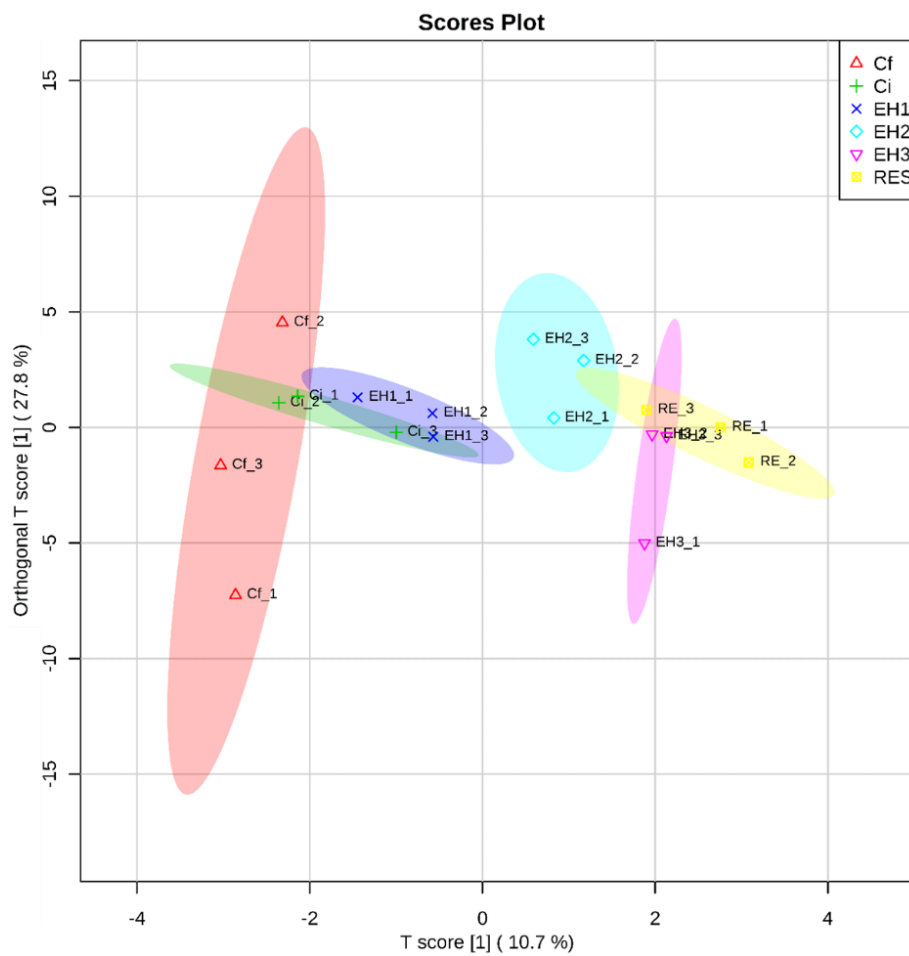
Os cromatogramas e os espectros de massa gerados durante as análises via LC-MS foram analisados por meio do software ProfileAnalysis, visando comparar os perfis metabolômicos das amostras analisadas em triplicata. A análise gerou um conjunto de 40 *buckets* (Tabela 6).

Tabela 6 - Dados de tempo de retenção e relação massa/carga (m/z) para os quarenta possíveis compostos identificados nas análises de alinhamento de tempos de retenção e m/z

Tempo (min)	m/z	Tempo (min)	m/z
1,36	151,045	8,78	316,321
1,36	165,061	9,16	427,123
1,37	128,020	9,17	270,545
1,37	133,035	9,34	225,112
1,54	219,027	9,76	255,122
1,61	381,079	9,86	239,128
1,62	277,033	10,41	437,193
1,94	365,105	10,41	119,086
6,44	120,082	10,43	415,211
6,49	217,104	12,85	253,107
7,09	447,092	13,46	299,162
7,11	415,156	13,46	221,117
7,34	549,160	14,57	579,293
7,41	527,246	14,57	301,141
7,77	439,154	15,39	463,302
7,87	288,290	17,04	485,111
8,00	244,263	18,76	683,543
8,11	304,284	18,76	353,266
8,31	401,143	18,76	313,273
8,60	257,102	18,76	331,284

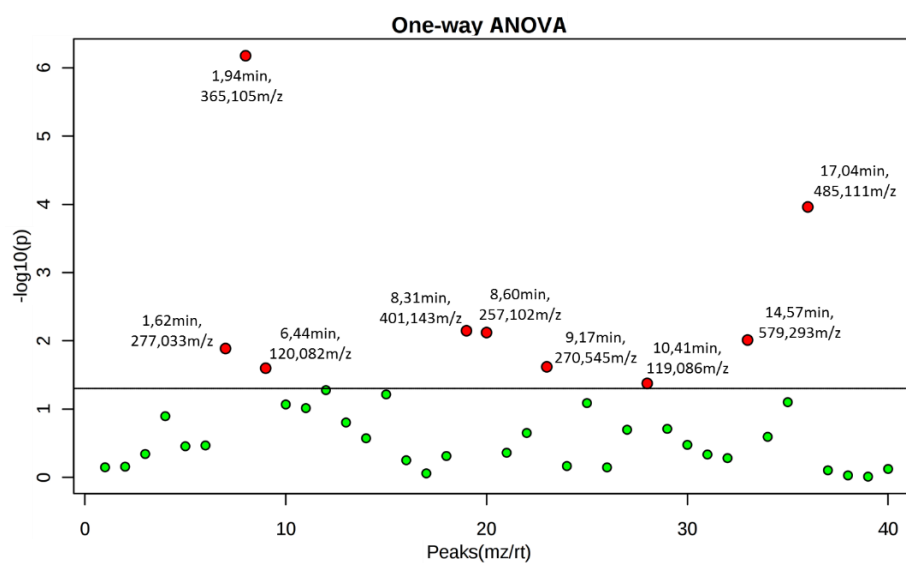
Cada *bucket* gerado, em função da variação de sua intensidade em cada uma das amostras, foi correlacionado com os grupos amostrais pré-definidos (Figura 11), por meio de projeção ortogonal, OPLS-DA.

Figura 11 - Resultado da análise estatística OPLS-DA, mostrando o agrupamento de cada um dos grupos amostrais em relação aos possíveis metabólitos encontrados.



Diante do agrupamento dos grupos amostrais em função do seu perfil metabolômico, foi realizada a análise de significância, ANOVA ( $p < 5\%$ ), visando determinar qual ou quais *buckets* seriam determinantes para o agrupamento das amostras (Figura 12).

Figura 12 - Identificação das relações m/z que foram determinantes para o agrupamento das amostras que foi exibido na Figura 11.



Assim, dos 40 buckets, nove apresentam significância estatística para o agrupamento das amostras em relação aos grupos pré-determinados. Para estes nove *buckets*, os dados de MS/MS foram analisados visando à identificação dos metabólitos, cujos resultados são mostrados nas Tabelas 7, 8 e 9.

Tabela 7 - Resultados das buscas em bancos de dados (Chempider, KEGG, GMD) baseadas nos espectros de fragmentação para os nove compostos significantes - 1ª parte.

Distribuição nos grupos amostrais	Composto	Espectros assinalados
<p>1.62min 277.033m/z</p>	<p>Mass: 276.0246 [C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>O<sub>10</sub>P<sub>1</sub>] (Original Compound)</p>	<p>Mass: 149.0444 [C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>7</sub>+2H]<sup>+</sup> (57.7 ppm)</p> <p>Mass: 185.0489 [C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>O<sub>7</sub>+H]<sup>+</sup> (41.0 ppm)</p> <p>Mass: 215.0315 [C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>7</sub>P<sub>1</sub>+2H]<sup>+</sup> (4.2 ppm)</p>
<p>1.94min 365.105m/z</p>	<p>Mass: 364.0984 [C<sub>19</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>S<sub>1</sub>] (Original Compound)</p>	<p>Mass: 147.0349 [C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>7</sub>+2H]<sup>+</sup> (0.1 ppm)</p> <p>Mass: 171.0349 [C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>7</sub>S<sub>1</sub>+H]<sup>+</sup> (42.1 ppm)</p> <p>Mass: 186.0379 [C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>7</sub>S<sub>1</sub>+H]<sup>+</sup> (17.8 ppm)</p> <p>Mass: 215.0323 [C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>7</sub>S<sub>1</sub>+H]<sup>+</sup> (22.2 ppm)</p>
<p>6.44min 120.082m/z</p>	<p>Mass: 119.0735 [C<sub>8</sub>H<sub>9</sub>N<sub>1</sub>] (Original Compound)</p>	<p>Mass: 91.0542 [C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>+H]<sup>+</sup> (11.0 ppm)</p> <p>Mass: 104.0621 [C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>]<sup>+</sup> (84.6 ppm)</p>

Tabela 8 - Resultados das buscas em bancos de dados (Chemspider, KEGG, GMD) baseadas nos espectros de fragmentação para os nove compostos significantes - 2ª parte.

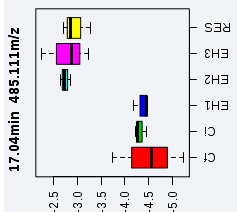
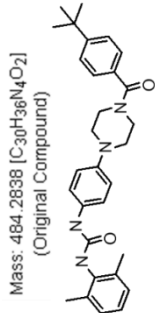
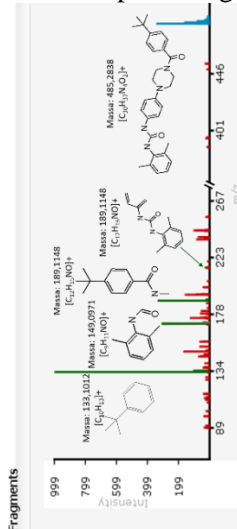
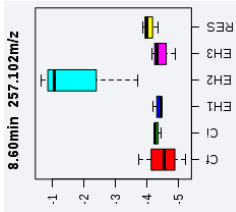
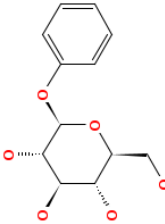
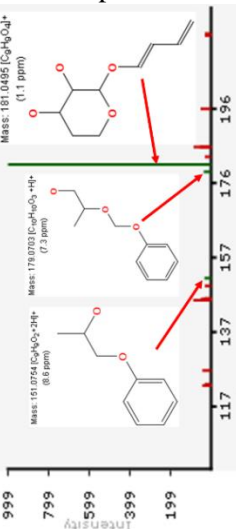
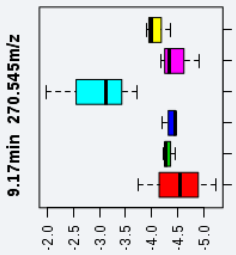
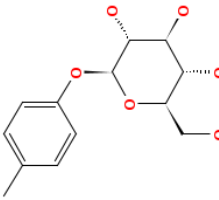
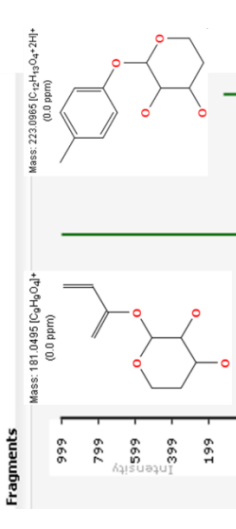
Distribuição nos grupos amostrais	Composto	Espectros assinlados
 <p>17.04min 485.111m/z</p>	<p>Mass: 484.2638 [C<sub>30</sub>H<sub>36</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>] (Original Compound)</p> 	
 <p>8.60min 257.102m/z</p>	<p>Mass: 256.0947 [C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>O<sub>6</sub>] (Original Compound)</p> 	
 <p>9.17min 270.545m/z</p>	<p>Mass: 270.1103 [C<sub>13</sub>H<sub>18</sub>O<sub>6</sub>] (Original Compound)</p> 	

Tabela 9 - Resultados das buscas em bancos de dados (Chemspider, KEGG, GMD) baseadas nos espectros de fragmentação para os nove compostos significantes - 3ª parte.

Distribuição nos grupos amostrais	Composto	Espectros assinalados
<p>14.57min 579.293m/z</p>	<p>579.2906</p>	<p>Mass: 301.1421 [C<sub>16</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>+H]<sup>+</sup></p> <p>Mass: 303.1459 [C<sub>16</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>+2H]<sup>+</sup></p> <p>Mass: 342.1832 [C<sub>16</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>+H]<sup>+</sup></p> <p>Mass: 505.2884 [C<sub>28</sub>H<sub>34</sub>N<sub>6</sub>O<sub>6</sub>+H]<sup>+</sup></p>
<p>8.31min 401.143m/z</p>	<p>Mass: 400.1416 [C<sub>16</sub>H<sub>29</sub>O<sub>8</sub>P<sub>2</sub>] (Original Compound)</p>	<p>Mass: 151.0519 [C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>O<sub>2</sub>P]<sup>+</sup></p> <p>Mass: 167.0468 [C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>O<sub>2</sub>P]<sup>+</sup></p> <p>Mass: 211.0444 [C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>O<sub>2</sub>P]<sup>+</sup></p> <p>Mass: 259.0506 [C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>O<sub>2</sub>P]<sup>+</sup></p> <p>Mass: 300.0486 [C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>O<sub>2</sub>P]<sup>+</sup></p>
<p>10.41min 119.086m/z</p>	<p>119.0866</p>	<p>Mass: 151.0519 [C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>O<sub>2</sub>P]<sup>+</sup></p> <p>Mass: 167.0468 [C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>O<sub>2</sub>P]<sup>+</sup></p> <p>Mass: 211.0444 [C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>O<sub>2</sub>P]<sup>+</sup></p> <p>Mass: 259.0506 [C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>O<sub>2</sub>P]<sup>+</sup></p> <p>Mass: 300.0486 [C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>O<sub>2</sub>P]<sup>+</sup></p>

Observação: Com base nos espectros de MS/MS não é possível afirmar qual das duas estruturas propostas corresponde ao metabólito que apresenta m/z=119,086.

## 4 DISCUSSÃO

Com base nos dados obtidos, foi possível comprovar a associação do perfil metabólico das mudas em relação ao nível de estresse hídrico ao qual estavam submetidas, uma vez que os grupos C<sub>i</sub>, EH<sub>1</sub>, EH<sub>2</sub> e EH<sub>3</sub> se distanciaram estatisticamente na análise de OPLS-DA (Figura 11). Apesar de ser claro o afastamento do grupo EH<sub>1</sub> em direção aos demais grupos de estresse, a pequena sobreposição entre os grupos C<sub>i</sub> e EH<sub>1</sub> provavelmente se deve ao pequeno tempo de adaptação que foi dado às mudas, uma vez que decorreram apenas quatro dias do t<sub>0</sub> até a coleta das amostras deste grupo. Os primeiros sinais de estresse foram observados em *E. camaldulensis*, por Utkhao e Yingjajaval (2015), 8 dias após a imposição da condição de estresse, a  $\Psi_H = - 0,140$  Mpa, situação diferente da encontrada neste trabalho, em que os primeiros sinais foram encontrados apenas quatro dias após a imposição da condição de estresse. Isso indica que, no trabalho com *E. camaldulensis*, um menor ritmo de queda no potencial hídrico do solo permitiu maior adaptação da planta à condição.

Além do tempo de adaptação, foi relevante a velocidade da imposição da condição de déficit hídrico no substrato. Como a areia não é capaz de reter água em sua estrutura, seja por absorção ou por adsorção, a água disponível foi perdida rapidamente, fazendo com que o  $\Psi_H$  decrescesse de forma brusca.

Os grupos EH<sub>2</sub> ( $\Psi_H = - 1500,000$  kPa), EH<sub>3</sub> e RES ( $\Psi_H = - 0,034$  kPa) foram significativamente distintos dos demais, porém, apresentando alguma relação entre si. Os grupos EH<sub>3</sub> e RES apresentaram maior semelhança do que em relação ao grupo EH<sub>2</sub>, provavelmente devido à natureza do grupo RES, que contém as mudas pertencentes ao grupo EH<sub>3</sub> e que foram reidratadas. O grupo EH<sub>2</sub> foi intermediário em relação às condições contrastantes, condição reproduzida na distribuição de seu perfil metabólico.



#### 4.1 Identificação dos metabólitos

Os metabólitos encontrados representam parte dos responsivos ao estresse nas condições do trabalho, pois, de acordo com Choi e Verpoorte (2014), é praticamente impossível encontrar um solvente e um procedimento que efetivamente extraíam todos os metabólitos, devido à grande variedade desses compostos. A opção pela extração utilizando metanol, clorofórmio e água (MCW) foi balizada em três aspectos: é um método não agressivo, preservando o extrato; é diretamente compatível com as análises posteriores via LC-MS e possibilita a extração de metabólitos polares e apolares, conforme afirmado por (MUSHTAQ et al., 2014).

Além do método de extração, a metodologia de detecção influenciou a identificação dos metabólitos neste trabalho, uma vez que a espectrometria de massa no modo positivo depende da ionização do composto pela acepção de um próton ( $H^+$ ), o que não ocorre da mesma forma em todas as moléculas. Assim, é possível admitir que não se tenha encontrado todos os compostos pertencentes a uma determinada via metabólica, ou metabólitos já identificados em outros trabalhos, que utilizaram diferentes configurações de cromatografia e de espectrometria de massa.

Dessa forma, dos 40 possíveis compostos encontrados, nove se mostraram significativamente relacionados à distribuição dos grupos amostrais. As informações sobre os metabólitos identificados encontram-se na Tabela 10.

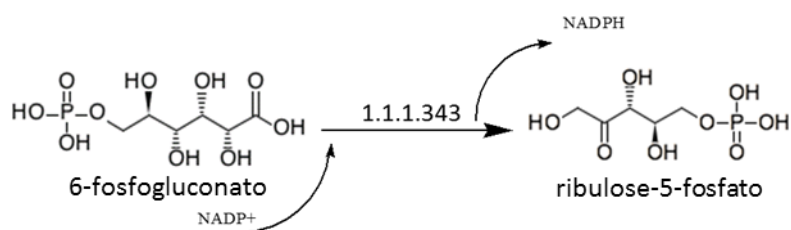
Tabela 10 - Identificação dos nove metabólitos com significância estatística.

Nome	Fórmula/relação m/z	Rota metabólica associada
Ácido 6-fosfo-glucônico	$C_6H_{13}O_{10}P$ / 277,033 m/z	Ciclo da pentose-fosfato
N-[4-(Benzo[ $\beta$ ][1,7]naftiridin-5-ilamino)fenil]metanossulfonamida	$C_{19}H_{16}N_4O_2S$ / 365,105 m/z	Desconhecida
Indolina	$C_8H_9N$ / 120,082 m/z	Metabolismo oxidativo do ácido indol-acético
2,2'-[(2,2-Dimetil-1,3-propanil)bis(oxi)]bis(5,5-dimetil-1,3,2-dioxofosfina) 2,2'-dióxido	$C_{15}H_{30}O_8P_2$ / 401,143 m/z	Desconhecida
fenil - $\beta$ - D - glicopiranosídeo	$C_{12}H_{16}O_6$ / 257,102m/z	Desconhecida
p-toluil - $\beta$ - D - glicopiranosídeo	$C_{13}H_{18}O_6$ / 271,110 m/z	Desconhecida
Valina**	$C_9H_{10}$ ou $C_5H_{12}NO_2$ / 119,086 m/z	Desconhecido
Tyr-Pro-Gly-Phe -Arg	$C_{30}H_{38}N_6O_6$ / 579,293 m/z	Desconhecida
1-(2,6-Dimetilfenil)-3-(4-[4-(2-metil-2-propil)benzoil]-1-piperazini)fenil)ureia	$C_{30}H_{36}N_4O_2$ / 485,111 m/z	Desconhecida

#### 4.1.1 Íon m/z = 277.033

O ácido 6-fosfogluconico, ou 6-fosfogluconato, está relacionado com a via das pentoses fosfato, sendo o precursor da reação de oxidação catalisada pela enzima 6-fosfogluconato desidrogenase (Figura 13).

Figura 13 - Reação do anabolismo do ácido 6-fosfogluconico.



Esta reação é um caminho alternativo do metabolismo da glicose e produz NADPH, que é utilizado em processos celulares importantes, como a biossíntese de esteróis, lipídeos, aminoácidos, multiplicação celular e rotas antioxidantes, dentre outros (HELDT; HELDT, 2005).

Mudas de *Oryza sativa* L. expostas a estresse abiótico apresentaram elevação na atividade da via das pentoses fosfato por meio da síntese da enzima 6-fosfogluconato desidrogenase, provocando aumento na síntese de NADPH, precursor da biossíntese de compostos responsivos ao estresse (HOU et al., 2007).

Observou-se que a redução dos níveis de 6-fosfogluconato é proporcional ao agravamento do estresse, culminando nos menores níveis no grupo EH<sub>3</sub>. Isto teria causado a diminuição da atividade da enzima 6-fosfogluconato desidrogenase e a conseqüente queda no nível de NADPH disponível para o metabolismo de resposta ao estresse. Na reidratação das

plantas (RES), os níveis de ácido 6-fosfogluconico se elevaram, indicando a diminuição da atividade desta enzima.

#### **4.1.2 Íon $m/z = 120,082$**

Com base nas buscas nos bancos de dados, este íon foi assinalado como a molécula indolina (Tabela 8), sobre a qual não foram encontradas informações biológicas, porém, devido à sua semelhança com a molécula de ácido 3-indolacético (AIA) e, diante da informação de que esta molécula sofre fragmentações a partir de 6 eV (OULKAR; BANERJEE; KULKARNI, 2011), é possível inferir que a indolina detectada se deve à presença do AIA.

Apesar disso, a variação observada na concentração de indolina em relação ao agravamento do estresse hídrico não encontra respaldo na literatura, no sentido de inferir que a indolina seria uma parte da molécula do AIA, pois os níveis deste diminuem na incidência do estresse (WANG et al., 2008).

Porém, ao se analisar o cromatograma da análise LC-MS, é possível notar a coeluição da indolina com a fenilalanina (Figura 14), cujos coeficientes de distribuição entre as fases móvel e estacionária esperavam-se completamente distintos, dada a natureza das duas moléculas (Figura 15).

Figura 14 - Cromatograma do íon extraído (EIC) para  $m/z = 120,0819$  e espectro de massa mostrando a coeluição entre indolina e fenilalanina.

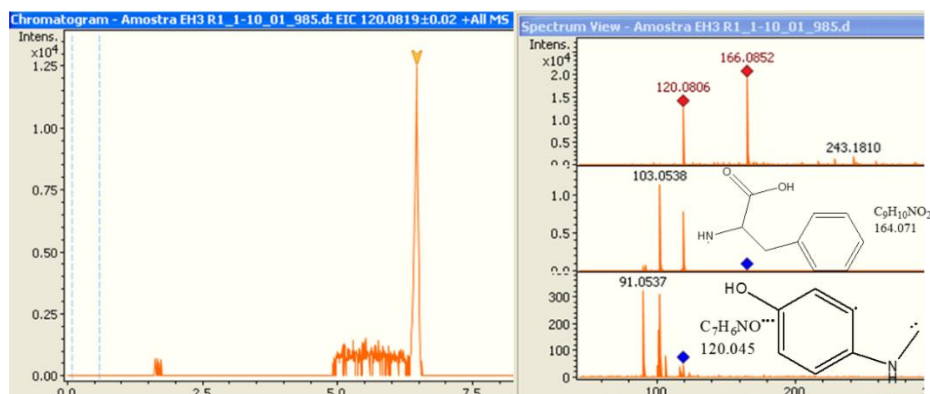
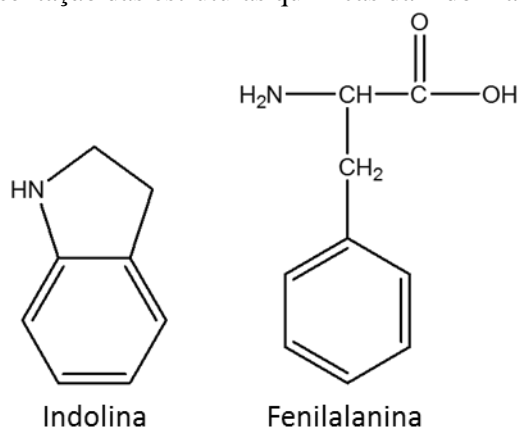


Figura 15 - Representação das estruturas químicas da indolina e da fenilalanina.



Diante da coeluição incomum destas duas moléculas, considerou-se uma possível conjugação entre as mesmas, já descrita para *Arabidopsis thaliana*, em uma rota de metabolismo oxidativo do AIA, na qual há conjugação deste à fenilalanina, diminuindo o nível de AIA livre no citosol (KAI et al., 2007), por meio da formação do composto N-(6-hidroxi-indol-3-ilacetil)-fenilalanina (6-OH-IAA-Phe). Esta diminuição é importante, pois sinaliza o estresse hídrico

para a planta, desencadeando, por exemplo, a síntese de ácido jasmônico, que ativa genes de síntese de proteínas e na sinalização para síntese de inibidores de proteases, atuando na indução de resistência entre folhas de um mesmo indivíduo e, até mesmo, entre indivíduos de uma população inteira. O ácido jasmônico atua, ainda, na inibição do crescimento e da germinação de sementes, promoção da senescência e abscisão de folhas, tuberização, amadurecimento de frutos, entre outros (DU; LIU; XIONG, 2013).

De posse destas informações e das características fisiológicas das plantas utilizadas neste experimento, e considerando a variação da concentração deste composto ao longo da evolução do estresse hídrico, é possível inferir que a indolina identificada no espectro de massa provavelmente está relacionada à síntese de 6-OH-IAA-Phe e à consequente sinalização para acionamento dos mecanismos de adaptação à condição de estresse hídrico.

Mesmo de posse dessas informações, é necessária, para validação da inferência realizada neste trabalho, a realização de estudos cromatográficos para avaliação da detecção do ácido indol-acético, da fenilalanina e do conjugado entre estas moléculas.

#### **4.1.3 Íons $m/z = 257,102$ e $m/z = 271,110$**

Dois compostos identificados nas análises de MS/MS têm moléculas muito semelhantes: o fenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo ( $257,102$   $m/z$ ) e o p-toluil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo ( $271,110$   $m/z$ ). Estes compostos também apresentam comportamento semelhante em relação à variação de sua abundância comparada ao nível de estresse hídrico ao qual a planta está submetida.

Apesar de ter sido preliminarmente identificada e tratada estatisticamente como  $m/z = 270,545$ , é possível afirmar, com base em análises de LC-MS posteriores que foram realizadas para a confirmação desta relação,

que o íon de interesse é a relação  $m/z = 271,110$ . Esta divergência pode estar relacionada a configurações inadequadas nos parâmetros seleção do íon precursor para a obtenção dos espectros de fragmentação. Estes dois íons diferem em um grupo metil, podendo sugerir que são moléculas pertencentes a alguma rota metabólica, que não está elucidada.

O fenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo, isolado em *Phellodendron amurense* por Hwang e Lee (2015), é descrito como um possível agente anti-inflamatório, devido à sua atuação, dentre outras, na diminuição das espécies reativas de oxigênio (ROS), que também estão associadas ao estresse hídrico em plantas (SUH et al., 2016; ZHANG et al., 2012). Este composto também foi associado a mecanismos de resposta a estresse biótico em cevada, causado por *Fusarium graminearum*, estando presente apenas nos genótipos resistentes. Além disso, compostos derivados de fenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo estão associados a respostas a estresses oxidativos, a exemplo do 4-(((3,4-di-hidroxibenzoil)-oxi)metil]fenil  $\beta$ -D-glicopiranosídeo (LI; MA, 2016).

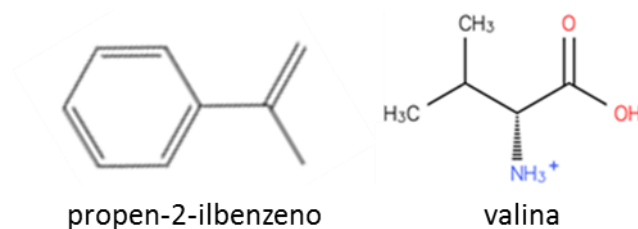
Dessa forma, é possível inferir, diante das informações do papel do fenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo e de seus derivados em rotas presentes em situações de estresse oxidativo e da variação de sua concentração em função do nível de estresse hídrico, que estas duas moléculas participam de reações associadas a mecanismos de adaptação da planta ao estresse, porém, novos estudos são necessários para a confirmação deste papel.

#### **4.1.4 Íon $m/z = 119,086$**

O espectro de MS/MS para este íon não foi conclusivo, permitindo afirmar apenas que as moléculas associadas a este íon teriam fórmula  $C_9H_{10}$  ou  $C_5H_{12}NO_2$  (Figura 16). Diante da pequena probabilidade de o composto de fórmula  $C_9H_{10}$  estar associado a vias metabólicas devido à sua natureza química,

foi preliminarmente associado a este m/z o composto  $C_5H_{12}NO_2$ , o aminoácido valina.

Figura 16 - Representação das estruturas químicas dos isóbaros propen-2-ilbenzeno e valina.



Soma-se ao descrito anteriormente o fato de a síntese de valina ter sido descrita em *Corynebacterium glutamicum* como dependente da concentração de NADPH (BARTEK et al., 2010). Assim, com a diminuição da concentração do 6-fosfogluconato e a conseqüente redução na síntese de NADPH, devido à queda na atividade da enzima 6-fosfogluconato desidrogenase, conforme descrito na seção 4.1.1, são esperados baixos valores para concentração de valina. A recuperação do metabolismo e da síntese de NADPH faz com que a concentração de valina novamente se eleve no grupo RES.

Seria possível realizar a confirmação da identificação deste aminoácido pela adição de padrão ao extrato ou pela análise via LC-MS de uma solução padrão de valina.

#### 4.1.5 Íons m/z = 365,105, m/z = 401,143, m/z = 579,293, m/z = 485,111

Não foi possível confirmar o papel metabólico dos compostos identificados para estes íons. Apesar da confiabilidade analítica que a técnica proporciona para a anotação dos compostos, novos trabalhos devem ser realizados, buscando confirmar a anotação e elucidar a forma de atuação destes



compostos na sinalização, na adaptação ou na recuperação de uma condição de estresse hídrico.

## 5 CONCLUSÃO

A identificação dos compostos fenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo e seu análogo, valina, indolina e ácido 6-fosfogluconico, como responsivos a diferentes pontos do processo adaptativo ao estresse hídrico, permite compreender melhor algumas das rotas metabólicas associadas ao estresse hídrico, sendo de extrema importância para a prospecção de genes responsivos a esta condição ou para a compreensão da regulação dos processos desencadeados.

Quanto aos compostos não associados a rotas conhecidas, estes podem se apresentar como novos atores nos processos celulares, sendo de extrema importância que as estruturas propostas sejam validadas em experimentos futuros, visando à sua confirmação.

Todos estes compostos citados têm potencial de atuar como marcadores de nível de estresse ou de serem utilizados para a prospecção de mecanismos genéticos que possam conferir a plantas de interesse melhor adaptação ao estresse hídrico.

## REFERÊNCIAS

- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE FLORESTAS PLANTADAS. **Anuário estatístico da ABRAF 2013 ano base 2012**. Brasília, DF, 2013. 146 p.
- BADINELLI, P. G. **Respostas bioquímicas e fisiológicas de plantas noduladas de soja submetidas à hipoxia**. 2008. 103 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal)-Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2008.
- BARTEK, T. et al. Importance of NADPH supply for improved L-valine formation in *Corynebacterium glutamicum*. **Biotechnology Progress**, New York, v. 26, n. 2, p. 361-371, 2010.
- BARTELS, D.; SUNKAR, R. Drought and salt tolerance in plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Abingdon, v. 24, n. 1, p. 23-58, 2005.
- CALDER, I. R. Forests and water-ensuring forest benefits outweigh water costs. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 251, n. 1/2, p. 110-120, 2007.
- CHOI, Y. H.; VERPOORTE, R. Metabolomics: what you see is what you extract. **Phytochemical Analysis**, Chichester, v. 25, n. 4, p. 289-290, 2014.
- DU, H.; LIU, H.; XIONG, L. Endogenous auxin and jasmonic acid levels are differentially modulated by abiotic stresses in rice. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 4, n. 397, p. 1-10, Oct. 2013.
- GARCIA-FLORES, M. et al. Metabolic profiling of plant extracts using direct-injection electrospray ionization mass spectrometry allows for high-throughput phenotypic characterization according to genetic and environmental effects. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Easton, v. 63, n. 3, p. 1042-1052, 2015.
- GUIMARÃES-DIAS, F. et al. Expression analysis in response to drought stress in soybean: shedding light on the regulation of metabolic pathway genes. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 35, n. 1, p. 222-232, 2012. Supplement.

HELDT, H. W.; HELDT, F. 6 - the Calvin cycle catalyzes photosynthetic CO<sub>2</sub> assimilation. In: \_\_\_\_\_. **Plant biochemistry**. 3<sup>rd</sup> ed. Burlington: Academic, 2005. p. 165-193.

HOU, F. Y. et al. The 6-phosphogluconate Dehydrogenase genes are responsive to abiotic stresses in rice. **Journal of Integrative Plant Biology**, Beijing, v. 49, n. 5, p. 655-663, 2007.

HWANG, S. J.; LEE, H. J. Phenyl-β-d-Glucopyranoside exhibits anti-inflammatory activity in lipopolysaccharide-activated RAW 264.7 cells. **Inflammation**, New York, v. 38, n. 3, p. 1071-1079, 2015.

KAI, K. et al. Three oxidative metabolites of indole-3-acetic acid from *Arabidopsis thaliana*. **Phytochemistry**, Saint Paul, v. 68, n. 12, p. 1651-1663, 2007.

LI, Y. W.; MA, C. L. First and efficient synthesis of 4-[(3,4-dihydroxybenzoyl)-oxy)methyl]phenyl β-D-glucopyranoside, an antioxidant from *Origanum vulgare*. **Journal of the Serbian Chemical Society**, Belgrado, v. 81, n. 1, p. 23-28, 2016.

MUSHTAQ, M. Y. et al. Extraction for metabolomics: access to the metabolome. **Phytochemical Analysis**, Chichester, v. 25, n. 4, p. 291-306, 2014.

OULKAR, D. P.; BANERJEE, K.; KULKARNI, S. Multiresidue analysis of plant growth regulators in grapes by triple quadrupole and quadrupole--time of flight-based liquid chromatography/mass spectrometry. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 94, n. 6, p. 1715-1721, Nov./Dec. 2011.

RAO, D. E.; CHAITANYA, K. V. Photosynthesis and antioxidative defense mechanisms in deciphering drought stress tolerance of crop plants. **Biologia Plantarum**, Plantarum, v. 60, n. 2, p. 201-218, 2016.

SAPETA, H. et al. Transcriptomics and physiological analyses reveal coordinated alteration of metabolic pathways in *Jatropha curcas* drought tolerance. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 67, n. 3, p. 845-860, 2016.

SOARES, N. S.; SILVA, M. L. da; CORDEIRO, S. A. Produto interno bruto do setor florestal brasileiro, 1994 a 2008. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 38, n. 4, p. 725-732, 2014.

SUH, J. Y. et al. Arabidopsis tóxicos en levadura 78 (AtATL78) mediates ABA-dependent ROS signaling in response to drought stress. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 469, n. 1, p. 8-14, 2016.

UTKHAO, W.; YINGJAJAVAL, S. Changes in leaf gas exchange and biomass of Eucalyptus camaldulensis in response to increasing drought stress induced by polyethylene glycol. **Trees**, Berlin, v. 29, n. 5, p. 1581-1592, 2015.

VERPOORTE, R.; ALFERMANN, A. W. **Metabolic engineering of plant secondary metabolism**. Dordrecht: Kluwer Academic, 2000. 297 p.

WANG, C. et al. Influence of water stress on endogenous hormone contents and cell damage of maize seedlings. **Journal of Integrative Plant Biology**, Beijing, v. 50, n. 4, p. 427-434, 2008.

WHITEHEAD, D.; BEADLE, C. L. Physiological regulation of productivity and water use in Eucalyptus: a review. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 193, n. 1/2, p. 113-140, 2004.

WOLFENDER, J. L. et al. Current approaches and challenges for the metabolite profiling of complex natural extracts. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1382, p. 136-164, Feb. 2015.

ZHANG, S. et al. Populus cathayana males exhibit more efficient protective mechanisms than females under drought stress. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 275, p. 68-78, July 2012.

## CONCLUSÕES GERAIS

A utilização de areia como alternativa à vermiculita e ao PEG, em experimentos para avaliação de estresse hídrico é viável, pois apresenta baixo custo, fácil aquisição e não compete com a raiz da planta pela água. Por permitir a realização de experimentos *ex vitro*, apresenta resultados mais próximos das condições de campo. Também, por não aderir à raiz da planta, sua utilização é adequada para experimentos que objetivem avaliação morfológica e/ou fisiológica deste tecido. Porém, é necessário um controle contínuo da umidade da areia e do potencial hídrico ao qual a planta está submetida, evitando que o estresse seja abrupto e possibilitando a melhor adaptação da planta a esta condição.

Foram detectados metabólitos responsivos ao estresse hídrico, porém, como esta detecção depende diretamente da metodologia de extração utilizada, é importante que estes sejam também avaliados em diferentes condições de extração, para que seja refletida a condição real. Ainda quanto à extração, é necessária a normalização desta com um padrão externo, visando corrigir eventuais erros do processo extrativo. Um limitante importante para estas análises é a falta de bancos de dados adequados, dificultando a identificação dos analitos e a interpretação das condições observadas.

Diante do exposto neste trabalho, novas pesquisas relativas a estresse hídrico devem ser realizadas, visando estudar a cronologia e a intensidade da sinalização e da resposta da planta a diferentes níveis de estresse, para encontrar e validar marcadores, rotas metabólicas ou genes de interesse que possibilitem a compreensão e o aprimoramento da tolerância ao estresse hídrico, que tende a se agravar nos próximos anos.