

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ - UEM
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

GABRIELA GALVÃO MACHADO MENDES

**EFEITOS DE NARINGENINA NA BIOSÍNTESE DE LIGNINA E
TRICIN EM RAÍZES DE MILHO (*Zea mays* L.)**

Maringá
2019

GABRIELA GALVÃO MACHADO MENDES

**EFEITOS DE NARINGENINA NA BIOSÍNTESE DE LIGNINA E
TRICIN EM RAÍZES DE MILHO (*Zea mays* L.)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Área de Concentração – Biologia Celular e Molecular) da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Osvaldo Ferrarese-Filho

Maringá
2019

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

Machado-Mendes, Gabriela Galvão

M149e Efeitos de naringenina na biossíntese de Lignina e Tricin em raízes de milho (*Zea mays* L.) / Gabriela Galvão Machado Mendes. -- Maringá, 2019.

72 f. : il. color., figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Osvaldo Ferrarese-Filho.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, 2019.

1. Bioquímica de plantas. 2. Parede celular vegetal-milho. 3. Flavonoide. 4. Fenilpropanoide. 5. Fenilpropanoide. 6. Lignificação. 7. Tricin. I. Ferrarese-Filho, Osvaldo, orient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. III. Título.

CDD 22. ED.572.42492

Jane Lessa Monção CBR 1173/9

GABRIELA GALVÃO MACHADO MENDES

EFEITOS DE NARINGENINA NA BIOSÍNTESE DE LIGNINA E TRICIN
EM RAÍZES DE MILHO (ZEA MAYS L.)

Tese apresentada como requisito parcial
para obtenção do grau de Doutor em
Ciências Biológicas, do Programa de Pós-
Graduação em Ciências Biológicas, da
Universidade Estadual de Maringá, sob a
apreciação da seguinte banca
examinadora:

Aprovado em: 28 de fevereiro de 2019.



Prof. Dr. Osvaldo Ferrarese-Filho
(Presidente - Orientador – DBQ/PBC/UEM)



Profa. Dra. Graciene de Souza Bido
(Membro examinador externo - UNICESUMAR)



Prof. Dr. Rogério Marchiosi
(Membro examinador - DBQ/PBC/UEM)



Dra. Josielle Abrahão
(Membro examinador – UEM)



Prof. Dr. Wanderley Dantas dos Santos
(Membro examinador– DBQ/PBC/UEM)

Maringá
2019

BIOGRAFIA

Gabriela Galvão Machado Mendes nasceu em Paraguaçu Paulista/SP em 14/09/1988. Possui graduação em Ciências Biológicas, com habilitação em Licenciatura, pela Unicesumar (2011), e Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual de Maringá (2012). Concluiu o Mestrado no Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular) também pela Universidade Estadual de Maringá (2015) e iniciou o curso de Doutorado pelo mesmo programa em março de 2015, desenvolvendo o projeto “Efeitos de naringenina na biossíntese de lignina e tricín em raízes de milho (*Zea mays* L.)”. Tem experiência na área de Bioquímica, atuando principalmente nos temas relacionados à Bioquímica Vegetal com ênfase no Metabolismo Secundário de Plantas.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente e acima de tudo, agradeço a Deus. Sua presença foi, e é essencial em minha vida.

Para Ele são todas as coisas.

Agradeço a meu marido Bruno, que foi meu suporte e principal apoiador em meus estudos, e na execução deste trabalho. Á minha família que sempre me incentivou, a lutar e não desistir; Á minha amada filha, Giovanna, ainda em meu ventre, que veio para abençoar ainda mais este momento;

Agradeço ao querido professor Osvaldo pela oportunidade dada de desenvolver este trabalho. Meu coração será eternamente grato, por todos os ensinamentos e paciência, mesmo diante de minhas falhas;

Minha gratidão também ao querido professor Rogério. Lembrarei sempre de todos os ensinamentos, e o ser humano incrível que é e foi durante o doutorado;

Agradeço a cada um dos colegas do laboratório BIOPLAN pela amizade e companheirismo, e auxílio na execução e desenvolvimento da presente tese;

Agradeço a Cida, técnica do Laboratório de Bioquímica de Plantas, pela amizade, conselhos, sendo uma segunda mãe para mim;

Agradeço a todos os membros da célula Soul Essence, da Igreja Presbiteriana de Maringá – IPI, pelas orações e por torcerem sempre por mim.

Agradeço a CAPES pela concessão de bolsa e a Universidade Estadual de Maringá.

APRESENTAÇÃO

Esta tese é composta de dois artigos científicos. Inicia com a revisão “Flavonoides: Visão global e o papel do tricín nas plantas” que discorre sobre a presença dos flavonoides nas plantas, com especial destaque para tricín, o qual tem sido apontado como iniciador da via de fenilpropanoides. Encerra com o segundo artigo “Naringenina interfere nas vias de fenilpropanoides e de tricín e afeta a lignina e a digestibilidade de raízes de milho” que avalia os efeitos de naringenina no crescimento e processo de lignificação e digestibilidade das raízes de milho, submetido a este flavonoide e a inibidores das vias de fenilpropanoides e tricín. Em consonância com as regras do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, os artigos serão submetidos às seguintes revistas.

Mendes, G.G.M. Flavonoides: Visão global e o papel do tricín nas plantas. A forma de submissão (mini-revisão, revisão completa ou capítulo de livro) será motivo de posterior análise.

Mendes, G.G.M. e Ferrarese-Filho, O. Naringenina interfere nas vias de fenilpropanoides e de tricín e afeta a lignina e a digestibilidade de raízes de milho. *Plant Physiology and Biochemistry* (JCR = 2,718).

RESUMO GERAL

INTRODUÇÃO – Depois da celulose, o composto orgânico mais abundante nas plantas é a lignina, um polímero formado, principalmente, pela polimerização de três monolignóis (álcoois *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico), os quais variam no grau de metoxilação, além de uma diversidade menor de outros componentes secundários. Após a polimerização, estes monolignóis são convertidos em unidades monoméricas denominadas *p*-hidroxifenil (H), guaiacil (G) e siringil (S), respectivamente. Além destas unidades, o flavonoide tricín tem sido apontado como um novo monômero iniciador do processo de lignificação. Numa reação catalisada pela chalcona sintase (CHS), tricín é formado pela condensação de *p*-cumaroil-CoA, proveniente da via de fenilpropanoides, com malonil-CoA proveniente da via do malonato. O produto desta reação, naringeninachalcona é convertido em naringenina, pela ação da chalconoisomerase. Naringenina é oxidada pela enzima flavona sintase (FNSII) formando apigenina e, subsequentemente, luteolina, tricetina, selgine, finalmente, tricín. Além de intermediário da via de biossíntese de tricín, naringenina tem sido descrito como um inibidor da 4-hidroxicinamoil-CoA ligase (4-CL), enzima-chave da via de fenilpropanoides, a qual leva à produção de lignina nas plantas. A biomassa lignocelulósica é considerada um recurso renovável com potencial para a produção de biocombustíveis, porém a presença da lignina, fortemente ligada aos polissacarídeos celulose e hemicelulose, limita a digestibilidade enzimática durante os processos de hidrólise. A presença de tricín como componente da estrutura de lignina poderá ampliar ainda mais a diversidade no uso da lignina como matéria-prima para diversos produtos e, possivelmente, a melhora da sacarificação enzimática.

OBJETIVOS – Diante do descrito acima, o objetivo geral deste trabalho foi investigar os efeitos de naringenina nos processos de biossíntese de lignina e de tricín, e na digestibilidade das raízes de milho. Para isso, o trabalho foi dividido em duas partes. Na primeira etapa, as plântulas foram cultivadas em hidroponia por 24 horas e os ensaios realizados para avaliar os efeitos de naringenina no crescimento, nos teores de lignina e sua composição monomérica, e na formação de tricín nas raízes. Na segunda etapa, as plântulas foram crescidas por 24 horas com naringenina associada com inibidores das vias de fenilpropanoides e tricín. O crescimento das raízes, lignina e sua composição monomérica, ácidos ferúlico e *p*-cumárico esterificados à parede celular e a digestibilidade foram monitoradas.

MÉTODOS – Sementes de milho (*Zeamays* L. cv IPR-114) foram higienizadas com hipoclorito de sódio a 2% por 5 min, enxaguadas com água deionizada e germinadas a 25°C em duas folhas de papel germitestumedeido. Vinte e cinco plântulas de tamanhos uniformes foram sustentadas por uma placa de acrílico ajustável, e as raízes mergulhadas em um recipiente de vidro de 10 x 16 cm contendo 200 mL de solução nutritiva Dong (pH 6,0) sem ou com naringenina (0,1 a 0,3 mM). Inibidores da via de fenilpropanoides foram aplicados isoladamente ou em associações com naringenina 0,2 mM. Os inibidores utilizados foram ácido piperonílico (PIP 0,1 mM; inibidor

dacinamato 4-hidroxilase – C4H), ácido 3,4 metilenodioxicinâmico (MDCA 2,0 mM; inibidor da 4-CL), ácido protocatecuico (PROTO 0,5 mM; inibidor da *p*-hidroxicinamoil-CoA:chiquimato/quinato-*p*-hidroxicinamoil transferase– HCT) e ácido 2,4 piridinodicarboxílico (PDCA 0,05 mM; inibidor da FNSII). Os recipientes foram mantidos em câmara de germinação (25°C, fotoperíodo 12/12 horas claro/escuro, com densidade de fluxo de fótons de 280 $\mu\text{mol m}^{-1} \text{s}^{-1}$) durante 24 horas. As raízes foram medidas antes da incubação e no final dos experimentos, e a variação do comprimento foi obtida pela diferença entre eles. A biomassa fresca foi determinada imediatamente após a incubação e a biomassa seca após secagem em estufa a 60°C. O conteúdo de lignina, as atividades da 4-CL e a digestibilidade foram avaliados por espectrofotometria, enquanto a taxa de depleção de naringenina, a composição monomérica de lignina e os teores dos ácidos ferúlico e *p*-cumárico foram determinados cromatograficamente (HPLC). Os testes de Dunnett e Scott-Knott foram aplicados para avaliar as diferenças entre os parâmetros e valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO– Os resultados revelaram que 1) naringenina é rapidamente depletado da solução nutritiva, um indicativo de que é absorvido pelas raízes de milho durante 24 horas. 2) Naringenina reduziu comprimento e as biomassas frescas e secas das raízes, em comparação com os respectivos controles. Estes resultados estão em concordância com achados descritos em *Arabidopsis*, arroz, espinafre, alface, rabanete, tomate, cenoura e soja. 3) Naringenina aumentou teor de lignina nas raízes, em comparação com o controle. O fato de que naringenina estimula a produção de lignina devido à redução do crescimento das raízes foi também constatado em soja. Neste aspecto, a redução do crescimento das raízes tem sido associada com a lignificação prematura das paredes celulares, o que ocorre quando a expansão celular diminui, quer quando a célula está sob estresse ou quando ocorre diferenciação como no caso do xilema. Como uma consequência do aumento da lignina, a composição monomérica também foi afetada pela naringenina, ou seja, redução dos teores do monômero G, sem alterar os monômeros H e S e soma H+G+S. Diante disso, um aumento na razão S/G foi notado, o que sugere um maior número de subestruturas β -O-4, mais simples, o que pode tornar os tecidos radiculares macios e passíveis de degradação. 4) Naringenina não alterou a atividade da 4-CL quando aplicada isoladamente ou em conjunto com PIP, porém aumentou a atividade da 4-CL quando aplicada em conjunto com seu inibidor MDCA. Este aumento de atividade enzimática está em concordância com a produção de lignina causada pela naringenina, que assim potencializa o efeito do MDCA. 5) Naringenina aumentou a produção de tricín nas raízes; um indicativo de que o flavonoide deve estar atuando na formação de tricín, já que ele é um metabólito da via de biossíntese do flavonoide. 6) Isoladamente, PIP, MDCA, PROTO e PDCA inibiram a produção de tricín nas raízes. Quando aplicado juntamente com estes inibidores enzimáticos, naringenina restabeleceu a formação de tricín. 7) PIP, MDCA e PROTO reduziram o crescimento das raízes, enquanto PDCA não causou nenhum efeito. 8) Isoladamente, todos os inibidores enzimáticos reduziram a produção de lignina. Naringenina restabeleceu a produção de lignina quando associado com PIP, MDCA ou PDCA, mas não com PROTO. 9) Com respeito à composição monomérica de lignina, os resultados mais

expressivos revelam que MDCA e MDCA+NAR (naringenina) reduziram drasticamente os monômeros e, como consequência, as somas H+G+S e as proporções H:G:S, embora não tenham afetado as razões S/G; um indicativo de que, ao menos nas raízes de milho, a deslignificação não seria comprometida por este inibidor enzimático. Por seu lado, PDCA não afetou os teores de G e S, a soma H+G+S, a proporção H:G:S e a razão S/G. Entretanto, a associação PDCA+NAR aumentou os teores dos três monômeros e a soma H+G+S alterando a proporção H:G:S, o que mais uma vez reforça o papel de naringenina como crucial precursor da via de biossíntese de tricín.

10) Os teores de ácido ferúlico aumentaram (NAR, PROTO, PROTO+NAR; PDCA e PDCA+NAR), não foram alterados (PIP e PIP+NAR) e foram drasticamente reduzidos (MDCA; MDCA +NAR). Os teores de ácido *p*-cumárico aumentaram (PROTO; PROTO+NAR; PDCA), não foram alterados (PDCA+NAR) e foram reduzidos (NAR; PIP; PIP+NAR; MDCA; MDCA +NAR). Finalmente, **11)** o pré-tratamento alcalino das raízes revelou que, após 6 horas, a digestibilidade aumentou 12% (MDCA), 37% (PDCA) e 12% (PDCA+NAR) e foi reduzida em 26% (PROTO+NAR). Resultados similares foram obtidos após 24 horas de digestão enzimática, ou seja, aumentos de 10% (MDCA), 36% (PDCA) e 11% (PDCA+NAR) e redução de 10% (PROTO+NAR). Ofato marcante observado foi com respeito aos inibidores MDCA e PDCA; ambos aumentaram a digestibilidade, especialmente PDCA. Aumento da digestibilidade da biomassa de milho, pelo MDCA, tem sido constatado em nosso laboratório (dados não publicados), mas o mecanismo de ação é desconhecido. Não há, também, uma clara explicação para o efeito do PDCA sobre a digestibilidade. É possível que a enzima FNSII desempenhe papel crucial na deposição de lignina ligada a tricín na parede celular de monocotiledôneas, pois a deficiência de tricín é parcialmente compensada pela incorporação de naringenina na estrutura da lignina, seguido por aumento na digestibilidade.

CONCLUSÕES— Em resumo, o conjunto de resultados obtidos neste trabalho abre novas pistas quanto ao papel de naringenina nas duas vias metabólicas. Atuando como um inibidor da via de fenilpropanoides, naringenina afeta o crescimento das raízes de milho seguido por aumento de lignina e alteração na composição monomérica; uma característica relacionada à prematura lignificação das paredes celulares, e típica da ação, em geral, de aleloquímicos. Atuando como substrato da enzima FNSII, naringenina ativa a formação de tricín; um iniciador do processo de lignificação em monocotiledôneas. Neste aspecto, o papel do PDCA (inibidor da FNSII na via de tricín) no processo de produção de bioetanol a partir de milho e outras monocotiledôneas pode ser uma pista interessante a ser investigada.

GENERAL ABSTRACT

INTRODUCTION – After the cellulose, the most abundant organic compound in plants is the lignin that is formed by the polymerization of three monolignols (*p*-coumaryl, coniferyl and sinapyl alcohols), which vary in their degree of methoxylation, and other minor components. After polymerization, these monolignols are converted to *p*-hydroxyphenyl (H), guaiacyl (G) and syringyl (S) units, respectively. In addition to these units, the flavonoid tricetin has been appointed as a new monomer that initiates the lignification process in monocots. By action of the chalcone synthase (CHS), tricetin is formed by the condensation of *p*-coumaroyl-CoA from the phenylpropanoid pathway, and malonyl-CoA from the malonate pathway. The reaction product, naringenin chalcone is converted in naringenin by the chalcone isomerase. After, naringenin is oxidized by the flavone synthase (FNSII) forming apigenin and, subsequently, luteolin, tricetin, selgenin and tricetin. In addition to their role as a metabolite of the tricetin biosynthesis, naringenin has been described as an inhibitor of 4-hydroxycinnamoyl-CoA ligase (4-CL), a key enzyme of the phenylpropanoid pathway; an important route for the production of lignin in plants. Due to this, lignocellulosic biomass is considered a renewable resource with potential for the production of biofuels, but the presence of lignin, strongly linked to polysaccharides cellulose and hemicellulose, limits the enzymatic digestibility during the hydrolysis processes. Thus, the presence of tricetin as a structural component of lignin needs be studied to increase the diversity in the use of this polymer as a raw material for various products, and possibly to improve the enzymatic saccharification.

AIMS – In view of the above described, the general objective of this work was to investigate the effects of naringenin on the biosynthesis of lignin and tricetin, and the digestibility of maize roots. For this, the work was carried out in two steps. In the first, the seedlings were cultivated in hydroponics for 24 hours and the assays were made to evaluate the effects of naringenin on root growth, contents of lignin and its monomeric composition, and tricetin production. In the second step, the seedlings were grown under the action of naringenin jointly with inhibitors of the phenylpropanoid and tricetin pathways. The root growth, lignin contents and monomer composition, contents of ferulic and *p*-coumaric acids esterified to the cell wall, and digestibility of roots were monitored.

METHODS – Maize (*Zea mays* L. cv. IPR-114) seeds were sanitized with 2% sodium hypochlorite for 5 min, rinsed extensively with deionized water, and dark-germinated at 25°C on two sheets of moistened filter paper. Twenty-five three-day-old seedlings of uniform size were then supported by an adjustable acrylic and dipped into a 10 × 16 cm glass container filled with 200 mL of nutrient solution (pH 6.0) with or without naringenin (0.1 to 0.3 mM). Inhibitors of the phenylpropanoid and tricetin pathways were applied alone or jointly with naringenin 0.2 mM. The used inhibitors were piperonylic acid (PIP 0.1 mM; inhibitor of cinnamate 4-hydroxylase – C4H), 3,4-(methylenedioxy)cinnamic acid (MDCA, 2.0 mM; inhibitor of 4-CL), protocatechuic acid (PROTO 0.5 mM; inhibitor of *p*-hydroxycinnamoyl-CoA:shiquimate/quinate *p*-

hydroxycinnamoyl-CoA transferase – HCT) and 2,4-pyridinedicarboxylic acid (PDCA 0.05 mM; inhibitor of FNSII). The containers were kept in a growth chamber for 24 h at 25°C, with a light/dark photoperiod of 12/12 h and a photon flux density of 280 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Roots were measured before incubation and at the end of experiments, and the variation in length was obtained by the difference among them. Fresh root weight was determined immediately after incubation, and the dry weight was estimated after oven-drying at 60°C until it reached a constant weight. The lignin content, activities of 4-CL and digestibility were determined spectrophotometrically, whereas the naringenin depletion rate, lignin monomeric composition and the contents of ferulic and *p*-coumaric acids were assayed by high performance liquid chromatography (HPLC). The Dunnett and Scott-Knott tests were applied to evaluate the differences between parameters and *p* values ≤ 0.05 were considered statistically significant.

RESULTS AND DISCUSSION – The results revealed that **1)** naringenin is rapidly depleted of the nutrient solution; an indicative that it is absorbed by maize roots for 24 hours. **2)** Naringenin reduced the length and fresh and dry weights of roots, compared to the respective controls. These results agree with findings reported in *Arabidopsis*, rice, spinach, lettuce, radish, tomato, carrot, and soybean. **3)** Naringenin increased the lignin content in roots, in comparison to the control. The fact that naringenin stimulates the lignin production due to the reduction of root growth was also observed in soybean. In this regard, the reduction of root growth has been associated with the premature lignification of cell walls, which occurs when cell expansion decreases, either when the cell is under stress or when differentiation occurs in the xylem. Because of the reduction of lignin, the monomeric composition was also affected by naringenin, *i.e.*, reduction of the G monomer contents without altering the H and S monomers and the sum H + G + S. Therefore, an increase in the S/G ratio was noted suggesting a larger number of simpler β -O-4 substructures, which makes the roots more flexible and degradable. **4)** Naringenin did not alter the activity of 4-CL when applied alone or jointly with PIP but increased it when applied jointly with the inhibitor MDCA. This increase in enzymatic activity agrees with the production of lignin caused by naringenin, which potentiates the effect of MDCA. **5)** Naringenin increased the production of tricetin in the roots; an indicative that the flavonoid acts in the formation tricetin biosynthesis because it is a metabolite of the flavonoid biosynthetic pathway. **6)** Alone, PIP, MDCA, PROTO and PDCA inhibited the production of tricetin in roots. When applied jointly with these enzymatic inhibitors, naringenin restored the tricetin formation. **7)** PIP, MDCA and PROTO reduced the root growth, while PDCA had no effect. **8)** Alone, all enzyme inhibitors reduced the lignin production. Naringenin restored the lignin production when associated with PIP, MDCA or PDCA, but not jointly with PROTO. **9)** With respect to the lignin monomeric composition, the striking data show that MDCA and MDCA+NAR (naringenin) drastically reduced all monomers and, as a consequence, the H+G+S and H:G:S ratio, although have not affected the S/G ratio; an indicative that, at least for maize roots, delignification would not be compromised by this enzyme inhibitor. On the other hand, PDCA did not affect the contents of G and S, the H+G+S, H: G:S, and S/G ratio. However, the mixture PDCA+NAR increased the contents of the monomers and

H+G+S, changing the H: G:S ratio, and reinforcing the role of naringenin as a crucial precursor of the tricetin biosynthesis. **10**) The levels of ferulic acid increased (NAR, PROTO, PROTO+NAR, PDCA and PDCA+NAR), were not altered (PIP and PIP+NAR) and were drastically reduced (MDCA; MDCA+ NAR). The levels of *p*-coumaric acid increased (PROTO; PROTO+NAR; PDCA), were not altered (PDCA+NAR) and were reduced (NAR; PIP; PIP+NAR; MDCA; MDCA+NAR). Finally, **11**) alkaline root pretreatment revealed that, after 6 hours, the digestibility increased 12% (MDCA), 37% (PDCA) and 12% (PDCA+NAR), and was reduced by 26% (PROTO+NAR). Similar results were obtained after 24 hours of enzymatic digestion, *i.e.*, increases of 10% (MDCA), 36% (PDCA) and 11% (PDCA+NAR), and a reduction of 10% (PROTO+NAR). As noted, both MDCA and PDCA inhibitors increased the root digestibility, especially PDCA. Increased digestibility of the maize biomass by MDCA has been observed in our laboratory (unpublished data), but the mechanism of action is unknown. It is possible that FNSII enzyme plays a crucial role in the deposition of tricetin-bound lignin in the monocots cell wall since tricetin deficiency is partially compensated by the incorporation of naringenin into the structure lignin, followed by increased digestibility.

CONCLUSIONS – Overall, the set of results obtained in this work opens new clues about the role of naringenin in the two metabolic pathways. Acting as an inhibitor of the phenylpropanoid pathway, naringenin affects the maize root growth followed by increased lignin and altered monomeric composition; a characteristic related to the premature lignification of the cell walls, and typical of the action, in general, of allelochemicals. Acting as substrate of the enzyme FNSII, naringenin activates the formation of tricetin; an initiator of the lignification process in monocots. In this regard, the role of PDCA (as an inhibitor of FNSII in the tricetin pathway) in the process of bioethanol production from maize and other monocots can be an interesting road to be covered.

Flavonoides: Visão global e o papel do tricín nas plantas

G.G.M. Mendes

Laboratório de Bioquímica de Plantas, Universidade Estadual de Maringá, Paraná, Brasil

Resumo

Derivados do metabolismo secundário, os flavonoides são amplamente distribuídos no reino vegetal, onde desempenham importantes funções biológicas. Os flavonoides possuem diversas atividades farmacológicas como anticâncer, antidiabético, antiaterosclerótico, antioxidante, anti-inflamatório, entre outras. A maioria dos flavonóides possui uma estrutura típica com três anéis de carbono cíclicos, designados por A, B e C. As substituições no anel C distinguem diferentes flavonoides e subgrupos. Dentre os inúmeros flavonoides, tricín tem sido apontado como um novo monômero da complexa estrutura da lignina na parede celular de monocotiledôneas. Nesta revisão, objetivou-se descrever a biossíntese dos flavonoides, seus principais grupos de flavonoides e algumas das suas funções biológicas. Destaque tem sido dado ao tricín, no tocante a sua biossíntese, funções biológicas e, em especial, seu suposto papel como iniciador do processo de formação do complexo polímero de lignina.

Palavras-chave: flavonoide, fenilpropanoides, lignificação, tricín

Flavonoides: Estrutura, classificação e distribuição

Os flavonoides são os mais comuns e amplamente distribuídos compostos fenólicos que ocorrem em todas as partes das plantas, especialmente nas células vegetais responsáveis pelos processos fotossintéticos. Eles estão presentes como derivados de 2 fenil-benzo- γ -pirona, sendo que os átomos de carbono dos flavonoides são formados por dois anéis de benzeno (A e B) os quais estão conectados por um oxigênio ligado ao anel de pireno (C) (Brodowska, 2017). A estrutura química comum presente em todos os flavonoides é o esqueleto de carbono que constitui o sistema flavan (C₆-C₃-C₆) (**Fig. 1**) (Symonowicz e Kolanek, 2012). Os anéis A e B podem se condensar e formar um composto denominado chalcona. Este pode sofrer uma ciclização por uma isomerase formando uma flavonona – o componente inicial para a formação de outros grupos de flavonoides (Brodowska, 2017). Os flavonoides possuem baixo peso molecular e sua variedade pode ser resultado das combinações de grupos metil e hidroxil como substituintes na sua estrutura química básica (Volp *et al.*, 2008, Mbaveng e Hamm, 2014).

Flavonoides estão presentes na forma livre (agliconas) ou ligada (glicosídeos e derivados metilados) (Havsteen, 2002; Simões *et al.*, 2004; Veitch e Grayer, 2008; Kumar e Pandey, 2013). Devido as diferenças estruturais, os flavonoides podem ser classificados em seis subgrupos

(Kozłowska e Szostak-Węgierek, 2014): **1)** flavanols, **2)** antocianidinas, **3)** flavanonas, **4)** flavanóis, **5)** isoflavonas e **6)** flavonas. As várias classes de flavonoides diferem em seu nível de oxidação e substituição do anel C, enquanto que o componente individual dentro de uma classe difere em uma via de substituição dos anéis A e B (Kumar e Pandey, 2013). Em geral, flavonoides são encontrados em vegetais, frutas, raízes, caules, flores, chás, sementes e vinhos (Nijveldt, 2001). Todas as células vegetais são capazes de produzir flavonoides, e sua biossíntese baseia-se nas vias do ácido chiquímico e do ácido malônico (Taiz e Zeiger, 2013).

A **figura 2** mostra alguns exemplos de flavonoides de acordo com sua classificação. Apesar disso, Kozłowska e Szostak-Węgierek (2014) e Brodowska (2017) relataram a existência de outros flavonoides como os biflavonoides (por exemplo, ginknetin), prenilflavonoides, flavonolignans (por exemplo, silibin), éster glicosídeo de flavonoides, chalconas e proantocianinas.

1. Flavanols

Flavanols ou flavan-3-ols compreendem um grupo complexo de polifenóis. São caracterizados por apresentarem um esqueleto de carbono com um grupo hidroxil na posição 3 do anel C (Pascual-Teresa, 2010). Estão presentes geralmente em frutas, derivados e em chás. Estudos mostraram que pessoas que ingeriram alimentos ricos em flavanols tiveram um aumento na concentração de óxido nítrico na corrente sanguínea, trazendo benefícios para a saúde (Pascual-Teresa, 2010; Brodowska, 2017).

O principal representante dos flavanols é a catequina, os blocos estruturais de taninos. Catequinas geralmente ocorrem como agliconas ou são esterificadas com ácido gálico (Erlund, 2004). Existem vários tipos de catequinas que podem ser distinguidas como catequina 3-galato, galotocatequina 3-galato, epicatequina, epigalocatequina, epicatequina 3-galato e epigalocatequina 3-galato (Brodowska, 2017).

As principais atividades biológicas dos flavanols em especial das catequinas, estão relacionadas com processos que ocorrem no corpo humano. Para citar alguns: atividade anticarcinogênica, efeito anti-aterosclerótico, efeitos na perda de peso corporal e promotor da termogênese (Johnson *et al.*, 2012).

2. Antocianidinas

Antocianidinas correspondem a um grupo de fitoquímicos, que constituem os pigmentos naturais responsáveis pelas colorações azul, vermelho, púrpura e alaranjada das pétalas de flores, frutas e vegetais, e certas variedades especiais de grãos (Tsao, 2010). Mais de 500 tipos de antocianidinas já foram descritas. Estes compostos tem atraído grande interesse no campo tecnológico devido a seu impacto nas características sensoriais dos produtos alimentícios e na saúde humana devido a suas atividades biológicas (Pascual-Teresa *et al.*, 2000, Pascual-Teresa *et al.*, 2010).

Antocianidinas são encontradas nos vacúolos na forma ligada a açúcares, os quais fornecem maior estabilidade e solubilidade para o composto (Oancea e Oprean, 2010, Pascual-Teresa *et al.*, 2010) e também na forma aglicona; seus compostos derivados dependem do número e posição de grupos hidroxil e metoxil presentes em diferentes posições na estrutura básica (**Fig. 3**). As

principais antocianidinas encontradas em frutas e vegetais são cianidina, pelargonidina, delphinidina, malvidina, petunidina e peonidina (Brodowska, 2017). As antocianidinas possuem papel primordial em doenças cardiovasculares, decomposição do colesterol, eficácia antioxidante e citotoxicidade (Banchi *et al.*, 2004).

3. Flavanonas

As flavanonas estão amplamente disseminadas em 42 famílias de plantas, incluindo as *Asteraceae*, *Fabaceae* e *Rutaceae*. Dependendo do tipo de planta, as flavanonas podem ser encontradas em todas as suas partes, desde as vegetativas até os órgãos reprodutivos (Brodowska, 2017). De acordo com Khan *et al.* (2014) estima-se que aproximadamente 350 flavanonas estejam na forma aglicona e 100 na forma de glicosídeos.

Entre as flavanonas que apresentam maior interesse devido a sua alta prevalência em alimentos destacam-se naringenina e hesperetina (Khan *et al.*, 2014). Naringenina (5,7,4'-trihidroxi-flavanona) é encontrada em altas concentrações em frutas cítricas como limão e laranja, e em baixas concentrações em tomates e seus produtos (Erlund, 2004). Naringenina pode ser encontrada tanto na forma de agliconas como de glicosídeos (Khan, 2014). Assim como a naringenina, hesperetina (4'-metoxi-5,7,3'-trihidroxi-flavanona) e seus glicosídeos também estão presentes em frutas cítricas. A aglicona é a forma menos dominante na natureza, prevalecendo as formas glicosídicas (Manganaris, 2012, Khan, 2014).

As flavanonas apresentam alta atividade antioxidante, a qual depende do número e localização espacial dos grupos OH fenólicos. A flavanonanaringenina atua na inibição de citocinas pró-inflamatórias no intestino humano; protegem o DNA humano de danos causados pela radiação UV contra o desenvolvimento de tumores e apresentam potencial anti-ateroesclerótico (Bodet *et al.*, 2008; Brodowska, 2014). É de grande relevância destacar que naringenina possui um importante papel na síntese do flavonoide tricín, o qual foi recentemente descoberto como parte dos monômeros da lignina em monocotiledôneas (Lam *et al.*, 2015). Este tema será especialmente descrito adiante.

4. Flavonóis

Flavonóis (3-hidroxi-flavonas) são um dos mais analisados grupos devido as suas propriedades antioxidantes e biológicas. Estes polifenólicos estão presentes em muitos vegetais e frutas (Brodowska, 2017). Os principais flavonóis encontrados são quercetina, kaempferol e mircetina. Quercetina é o principal representante dos flavonols, apresentando inúmeras funções como antioxidante, anti-inflamatório, anti-histamínico, e protetor contra doenças cardiovasculares (Erlund, 2004). O kaempferol é encontrado em frutas, vegetais e especialmente brócolis. Outras funções para a saúde humana são diminuição do risco de doenças crônicas, apoptose de células cancerígenas, e efeito protetivo contra processos inflamatórios (Li e Ding, 2012; Brodowska, 2017). Mircetina é considerado um flavonol natural, presente em vegetais, chá de frutas e vinho tinto. Suas principais funções estão relacionadas à capacidade antioxidante e anti-inflamatória (Li e Ding, 2012).

5. Isoflavonas

As isoflavonas compreendem um grupo de flavonoides consistindo de fenóis heterocíclicos (Villares *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2016). São amplamente produzidas pelas famílias de plantas conhecidas como *Faboideae* e *Fabaceae*, em especial soja (Villares *et al.*, 2011), cujo conteúdo varia de 26 a 381 mg/100g de biomassa (Yu *et al.*, 2016). Daidzeína e genisteína são as mais comuns isoflavonas, e existem em estruturas químicas como agliconas, 7-O-glicosídeos, 6'-O-acetilglicosídeos e 6'-O-malonilglicosídeos (Yeung e Yu, 2003). As plantas sintetizam as isoflavonas como substâncias protetoras quando bactérias ou outros agentes infecciosos atacam os seus órgãos. Elas também participam em muitos mecanismos de regulação nas células vegetais (Vacek *et al.*, 2008). As formas agliconas são relativamente escassas nos tecidos de plantas e estão presentes em baixas concentrações. Seus conjugados glicosídicos prevalecem nos tecidos vegetais. A presença de isoflavonas nas plantas é influenciada pelo cultivo e condições climáticas (Vacek *et al.*, 2008).

Devido as suas estruturas químicas no qual o anel B está ligado na posição C3 do anel C ao invés da posição C2, as isoflavonas apresentam similaridade estrutural com o estrogênio, particularmente com o estradiol (Brodowska, 2017). Estes compostos tem atraído atenção devido as suas diversas funções biológicas como propriedades antioxidantes, propriedades anti-inflamatórias, antialérgica, redução do risco de doenças cardiovasculares, redução do crescimento de células cancerígenas, prevenção da osteoporose e sintomas da menopausa. Os efeitos das isoflavonas são fortemente influenciados pela estrutura química. Por exemplo, a substituição de um hidroxil dos anéis B e C, mas não do anel A, é essencial para a atividade antioxidante (Villares *et al.*, 2011).

6. Flavonas

As flavonas diferem dos outros flavonoides por possuírem dupla ligação entre o C2 e C3. Estes compostos apresentam três grupos funcionais, incluindo o grupo hidroxil, carbonil e dupla ligação conjugada. As flavonas podem reagir em vários caminhos incluindo reações de redução, degradação na presença de base, oxidação, substituição, adição e condensação (Singh *et al.*, 2014, Brodowska, 2017). As principais flavonas encontradas são apigenina e luteolina. Luteolina geralmente ocorre em vegetais e frutas como brócolis e maçãs enquanto a apigenina é encontrada em cebolas, chás e na camomila.

As flavonas estão na forma de glicosídeos, apresentando diversas funções. Elas são os pigmentos primários na coloração branca e creme nas flores, além disso, agem como copigmentos com as antocianidinas em flores azuis. Também atuam na proteção das plantas contra a radiação UVB, absorvendo luz na faixa de comprimento de onda de 280 a 315 nm. Agem como pesticidas naturais, providenciando proteção contra insetos e doenças fúngicas e atuam como moléculas sinalizadoras promovendo a colonização de raízes por bactérias fixadoras de nitrogênio e micorrizas (Hostetler *et al.*, 2017).

Devido a diversidade de estruturas químicas, as flavonas também apresentam inúmeras atividades biológicas em humanos, como antioxidante, anticancerígena, antiinflamatória,

neuroprotetiva, antidiabetes, antiúlcera, antifúngica, antimicrobiana e anti-HIV (Singh *et al.*, 2014).

Biossíntese dos flavonoides em plantas

Os flavonoides são sintetizados a partir da via dos fenilpropanoides pela atividade de um complexo multienzimático citosólico que está associado com a face citoplasmática do retículo endoplasmático. No entanto, existem outras enzimas envolvidas nessa via biossintética que estão associadas com as membranas de diferentes organelas como plastídeos, vacúolos e núcleo (Petruša *et al.*, 2013).

Na via dos fenilpropanoides o aminoácido fenilalanina é transformado em ácido cinâmico pela enzima fenilalanina amônia liase (PAL). O ácido cinâmico é convertido em ácido *p*-cumárico na reação catalisada pela cinamato 4-hidroxilase (C4H) (Karamet *et al.*, 2013). Esta via é seguida pela adição da CoA, proveniente da via do malonato, ao *p*-cumárico, sendo catalisada pelo *p*-cumarato-CoA liase originando *p*-cumaroil-CoA. Este finalmente entra na via de biossíntese de flavonoides. A primeira enzima específica para a via dos flavonoides é a chalcona sintase que reage com três moléculas de malonil-CoA formando chalcona, do qual todos os flavonoides serão derivados. Por seguinte ocorre a ciclização do anel A dando origem à naringenina pela ação da chalcona isomerase (CHI). Com a formação da naringenina ocorrem subsequentes reduções, hidroxilações e metilações conduzindo à formação das diferentes classes de flavonoides (**Fig. 2**) (Marques, 2008; Kaamet *et al.*, 2013). Assim, na biossíntese dos flavonoides o anel A é formado pela via do malonato, enquanto o anel B é resultado da via do chiquimato. Os três átomos de carbono provenientes do fosfoenolpiruvato ligam o anel A ao anel B (Samuelsson, 1999).

Um gradiente de prótons entre o citosol, vacúolo e a parede celular por H⁺ATP-ases é responsável pela força que direciona o transporte de alguns flavonoides dentro do vacúolo (Petruša *et al.*, 2013). Os flavonoides também podem ser transportados para longas distâncias nas plantas. Estudos com mutantes da via dos flavonoides, em *Arabidopsis thaliana*, indicaram que os produtos desta via acumularam dentro das células e não estavam presentes nas regiões entre as células. Isto indica que o movimento a longa distância destes compostos é simplástica.

Embora a via central de biossíntese de flavonoides seja conservada em plantas, em alguns grupos de enzimas, como isomerases e redutases, modificam o esqueleto básico dos flavonoides gerando diferentes subclasses (Martens *et al.*, 2010). A interligação de ambas as vias capacita as plantas a sintetizarem produtos naturais específicos e evitarem a interferência metabólica (Ferreira *et al.*, 2012).

Funções biológicas dos flavonoides

Diversas são as funções dos flavonoides. Eles podem atuar como catalisadores de luz para o processo de fotossíntese ou como reguladores de canais envolvidos na fosforilação (Pietta *et al.*, 1999). Também estão envolvidos na transferência de energia e fotossensibilização. Além disso, podem atuar com os hormônios vegetais de crescimento no controle da respiração, fotossíntese, morfogênese e determinação do sexo (Middleton *et al.*, 1993; Harborne *et al.*, 1999). Outras funções devem ser destacadas: proteção contra radiação ultravioleta (UV) e fitopatógenos, sinalização durante a nodulação, fertilidade, transporte de auxina, proteção das células foliares

contra danos causados pela fotooxidação e aumento na recuperação de nutrientes durante períodos de senescência. Outro fator primordial desenvolvido pelos flavonoides é sua participação em respostas ao estresse, por exemplo a eliminação de radicais livres como espécies reativas de oxigênio (ROS) e quelação de metais que geram ROS. Experimentos realizados com raízes de milho expostas ao alumínio comprovaram que estas plantas são resistentes à sua toxicidade, indicando a função quelante dos flavonoides (Ferreira *et al.*, 2012).

Os flavonoides são caracterizados por suas cores devido aos pigmentos das antocianidinas responsáveis pelos diversos tons de vermelho, laranja e azul. Em flores e alimentos eles são caracterizados pelos pigmentos amarelos devido as chalconas, flavonas e flavonóis (Timberlake e Henry, 1986; Brouillard e Cheminat, 1988). Como quase todos os flavonoides são encontrados na natureza como pigmentos, suas cores estão associadas a diversas funções biológicas desenvolvidas por estes (Middleton, 1994). Os flavonoides desempenham papéis na comunicação com o meio ambiente, sendo reconhecidos por polinizadores (Bradshaw e Schemske, 2003). As plantas liberam substâncias químicas para deter e atrair insetos, além disso, existem evidências de que os flavonoides estão entre os compostos que regulam o processo de ovoposição e alimentação de insetos. Mierziak *et al.* (2014) mostraram que a naringenina junto com outros compostos ativos estimulam a ovoposição de uma espécie de borboleta em folhas jovens de plantas cítricas.

Alguns flavonoides, especialmente proantocianidinas, proporcionam defesa contra a herbivoria nas interações plantas/animais. A presença desses compostos pode alterar a palatabilidade das plantas e reduzir seu valor nutritivo. Consequentemente, ocorre redução da digestibilidade dessas plantas pelos predadores tendo alta relevância para os mecanismos de defesa (Mierziak *et al.*, 2014).

Os flavonoides podem ser sintetizados e liberados em resposta a fatores abióticos ou bióticos na rizosfera; por exemplo a presença de fósforo pode induzir a síntese de flavonoides. Além disso, estes compostos podem ser produzidos em decorrência da indução por patógenos e simbiotes. A figura 4 resume as principais funções dos flavonoides na rizosfera (Hassan e Mathesius, 2012).

Um exemplo de interação simbiótica é indicada pela emissão de flavonas e flavonóis a partir de raízes de leguminosas, atraindo rizóbios por quimiotaxia e induzindo neles os genes necessários para a nodulação (Harborne, 2000). Baixas concentrações de nitrogênio no solo induzem o acúmulo de flavonoides nas plantas, o qual atrai organismos simbióticos como bactérias resultando no transporte de formas reduzidas de nitrogênio para as células das plantas. Mierziak *et al.* (2014) relataram que a naringenina pode estimular a colonização de uma espécie de bactéria conhecida como *Azorhizobium caulinodan* em raízes de trigo. Os mesmos autores mostraram que os flavonoides podem influenciar ambos positivamente ou negativamente o nível de expressão de genes da nodulação, os quais controlam a formação de nódulos em raízes de plantas por bactérias fixadoras de nitrogênio. Os flavonoides também podem atuar como repelentes contra nematódeos parasitas que vivem no solo e se alimentam de plantas. Estes compostos como daidzeína e kaempferol atuam restringindo o processo de incubação desses organismos nas plantas (Mierziak *et al.*, 2014).

As interações aleloquímicas entre as plantas podem ter efeitos positivos ou negativos, dependendo das concentrações de flavonoides liberadas pelas plantas. Estes compostos, quando excretados pelas raízes no solo ou pelas folhas e pólen, podem inibir a germinação e crescimento

de outras plantas que cercam a planta emissora. Não há muitos trabalhos relatando o mecanismo preciso de como os flavonoides participam no processo aleloquímico. Até o momento, os principais mecanismos estão relacionados a inibição do crescimento celular, distúrbios na produção e ação do hormônio vegetal auxina, e a produção de ROS, o qual ativa uma cascata de cálcio causando a morte do sistema radicular. Estes efeitos tem despertado grande interesse para a agricultura, visto que estas interações podem ser usadas no combate de plantas daninhas que prejudicam as culturas agrícolas (Mierziak *et al.*, 2014).

Relação entre flavonoides e lignina em plantas

Lignina é um polímero fenilpropanóico complexo presente na parede celular vegetal, o qual é depositada predominantemente nas paredes celulares secundárias de células espessas (Vanholme *et al.*, 2010). Depois da celulose, a lignina é a substância orgânica mais abundante encontrada nas plantas, sendo uma macromolécula reticulada constituída por monômeros que fornece a rigidez para as paredes celulares especializadas. Sua estrutura rígida permite que as plantas transportem água e minerais da raiz até as folhas, mesmo nas mais altas árvores (Taiz e Zeiger, 2013; Buchanan, 2015).

Lignina é amplamente distribuída em angiospermas e gimnospermas. Em gimnospermas, lignina é composta dos monômeros guaiacil (G) e siringil (S); já as angiospermas mostram os três tipos de monolignóis, G, S e *p*-hidroxifenil (H) (Malavasi *et al.*, 2016). Estas três unidades são derivadas, respectivamente, dos três monolignóis, os álcoois, coniferílico e sinapílico *ep*-cumarílico (Ralph, 2010).

Lignina representa cerca de 25% da biomassa total em plantas terrestres. Suas principais funções estão relacionadas a formação da casca em sementes, o qual modula sua dispersão em muitas espécies de plantas e estão envolvidas na fixação de CO₂ atmosférico para formar o espessamento das plantas terrestres maduras via ciclo do carbono. A incorporação da lignina dentro da parede celular resulta em uma estrutura rígida, proporcionando durabilidade aos tecidos das plantas. Os principais tipos de tecidos onde a lignina é encontrada são os traqueídeos e elementos de vaso do xilema. Quanto maior a lignificação da parede celular, maior sua recalcitrância e, deste modo, estudos na área da engenharia genética tem buscado desenvolver uma parede celular mais maleável para a penetração de enzimas digestoras com a finalidade de produzir bioetanol (Vanholme *et al.*, 2010, Malavasi *et al.*, 2016).

A síntese da lignina representa uma das maiores demandas de energia em vias biossintéticas de plantas, requerendo grandes quantidades de esqueletos de carbono (Malavasi *et al.*, 2016). Esse processo ocorre fora da célula vegetal, e há indicações de que os monolignóis destinados para a síntese são exportados como glicosídeos. Estes são hidrolisados fora da célula por ação de glicosidases. Embora a síntese dos monolignóis ocorra dentro da célula vegetal, a deposição de lignina está restrita a parede celular. O transporte de monolignóis assim como a síntese de lignina ainda não estão totalmente elucidados. Barros *et al.* (2015) sugeriram três tipos de mecanismos de transporte: difusão passiva, exocitose associada a vesículas e transporte ativo dependente de ATP usando transportadores ABC ou antiportadores de prótons.

A quantidade e proporção das unidades de H, G e de S, assim como a razão dessas unidades variam nas diferentes espécies de plantas, tipos de parede celular, e até mesmo o ambiente em que as plantas crescem (Boerjan *et al.*, 2003).

A biossíntese da lignina é alvo de muitas pesquisas, muitas destas com foco na redução da recalcitrância da parede celular. Lan *et al.* (2015) indicaram em seus trabalhos que as plantas são extremamente flexíveis em usar uma variedade de monômeros durante o processo de lignificação para formar o polímero de lignina. Fato mais recente indica que o flavonoide tricín pode ser incorporado como um monômero de lignina em monocotiledôneas. Este flavonoide é o primeiro monômero de fora da via de biossíntese de monolignóis e direcionado para a lignificação. A incorporação deste composto dentro da lignina foi evidenciada por reações de acoplamento biomimético do tricín com os monolignóis, e os resultados indicaram que ele pode agir como um sítio inicial para a lignificação (Lin *et al.*, 2016).

Tricín (5,7,4'-trihidroxi-3',5'-dimetoxiflavona) é uma flavona originada da combinação do chiquimato, da via dos fenilpropanoides, e do acetato/malonato, derivado da via biossintética do "poliacetido" (Lan *et al.*, 2016). Este composto é constituído estruturalmente de dois anéis fenil e um heterocíclico, os quais correspondem a um sistema benzoil (anel-A) um sistema cinamoil (anel-B), e um sistema heterocíclico (anel-C) (**Fig. 5**) (Li *et al.*, 2016). Além da sua função como um componente da lignina na parede celular vegetal, tricín apresenta um potencial na saúde humana devido as suas propriedades antioxidantes, anticâncer e cardioprotetora (Lan *et al.*, 2016)

Biossíntese do tricín

Como outros flavonoides, tricín é originado no metabolismo secundário das plantas. Sua biossíntese compreende dois estágios. No estágio 1, a flavanona é formada por compostos das vias de policetida e fenilpropanoides, seguida pela mediação com as enzimas chalcona sintase e chalconoisomerase. No estágio 2, tricín é gerado na última etapa da via de síntese da flavona, seguido por metilação (Li *et al.*, 2016).

A biossíntese da flavona em monocotiledôneas era obscura até anos recentes. No entanto, foi descoberto que chalcona sintase é uma enzima universal responsável pela catálise e produção dos flavonoides. Além disso, as chalconas sintetizadas são isomerizadas para flavanonas que são as precursoras comuns para todas as demais classes de flavonoides (Lam *et al.*, 2015).

Ralph (2010) descreveu em seu trabalho o processo biossintético de tricín indicando que após a formação do *p*-cumaroil-CoA pela ação da 4-cumarato ligase (4CL), na via de fenilpropanoides, ocorre uma ramificação da rota biossintética dos monolignóis através da condensação com o malonil-CoA proveniente da via do malonato. Desta via, formam-se a naringeninachalcona, pela ação da chalcona sintase (CHS), e a naringenina, pela ação da chalconoisomerase (CHI). Naringenina é oxidada em apigenina pela enzima flavona sintase (FNS) e, subsequentemente, é hidroxilada no anel B formando tricetina, pela ação da flavona 3'5' hidroxilase (F3'5'H). Por fim, ocorre a formação e metilação do tricín por uma *O*-metiltransferase (OMT) (**Fig. 6**) (Zhou e Ibrahim, 2010).

Ao contrário de outros flavonoides, onde se constata diversas informações sobre a regulação dos processos biossintéticos (Winkel-Shirley, 2001; Schijlen *et al.*, 2004; Winkel, 2006)

existe uma carência de informações sobre a regulação da biossíntese de tricín e, também, do seu papel na engenharia metabólica de cultura de plantas. Há evidências de que a regulação negativa da enzima chalcona sintase (CHS) pode redirecionar o fluxo de carbono da biossíntese de flavonoides para a síntese de monolignóis, resultando em plantas com altos níveis de lignina (Lamet *et al.*, 2017).

Tricin e lignificação

Por meio de espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) em técnicas de duas dimensões (2D HSQC), foram analisados detalhes estruturais da lignina, determinando os componentes básicos deste polímero (por exemplo, H, G e S) também sendo usado para detectar outros componentes como carboidratos, os quais ocasionalmente são encontrados em amostras de isoladas de lignina (Balakshinet *et al.*, 2011; Wen *et al.*, 2013). Estas modernas técnicas utilizadas também têm sido consideradas importantes para a detecção de estruturas não convencionais encontradas na lignina como álcool dihidroxiconiferílico e catequil lignina (C-lignina) de sementes de algumas espécies de plantas (Boerjanet *et al.*, 2003). Além disso, o uso destas técnicas permitiu constatar a presença de tricín, revelando seu acoplamento com monolignóis, sugerindo seu provável envolvimento no processo de lignificação, ao menos em algumas monocotiledôneas (Lan, 2015).

Existe uma teoria, desenvolvida inicialmente por Freudenberg (1956), que afirma que os monômeros de lignina são oxidados e depois ligados de forma combinatória, determinando que a lignificação é um processo químico onde qualquer fenol presente na parede celular é capaz de entrar no processo combinatório de acoplamento de radicais livres; processo esse que ocorre primeiro entre monolignóis para produzir dehidrodímeros que iniciam a cadeia que se estende pela polimerização final com os monolignóis (Morrelet *et al.*, 2004; Ralph, 2004; Ralph *et al.*, 2006; Gabaldónet *et al.*, 2006; Barsberget *et al.*, 2006; Méchinnet *et al.*, 2007). As reações entre os radicais entre duas cadeias crescentes de oligômero ou polímero servem para conectá-las, sendo assim a cadeia polimérica aumenta (Ralph *et al.*, 2008; Crestiniet *et al.*, 2011). Durante o processo de lignificação os monolignóis são oxidados por peroxidases ou lacases onde as especificidades amplas do substrato e a grande família de genes destas duas classes de oxidases torna-se difícil a identificação das isoformas que envolvem especificamente o processo e desenvolvimento da lignificação (Vanholmeet *et al.*, 2008).

Em um recente trabalho (Liet *et al.*, 2017) observou-se que a incorporação de tricín na lignina foi mais comum em monocotiledôneas como milho, trigo e bambu do que em dicotiledôneas ou gimnospermas. Por meio de RMN vários estudos foram efetuados visando detectar tricín na estrutura polimérica de lignina (del Rio *et al.*, 2012; Zenget *et al.*, 2013; Rencoretet *et al.*, 2015; Luterbacheret *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2016). As observações de que uma flavona é integralmente incorporada na lignina se constitui numa nova etapa de estudos sobre o processo de lignificação em plantas. Tal fato propõe que um monômero é exportado para a parede da célula onde sofre reações de acoplamento radicais com os monolignóis, ou pelo menos com o monolignol álcool coniferílico, e se tornando parte do polímero de lignina (del Rio *et al.*, 2012). Neste contexto, Ralph (2015) propõe que ao reagir inicialmente com os monolignóis, tricín atua como um

"iniciador" da cadeia polimérica de lignina. Portanto, a partir dessas descobertas ficou claro que tricín pode atuar como nucleador no crescimento da cadeia de lignina, em monocotiledôneas, em um papel que foi anteriormente proposto para arabinosilanos (Ralph *et al.*, 1995). Fortalecendo esta premissa, a estrutura de tricín e a sua incapacidade de desidrodimerização implica que ela só pode iniciar uma cadeia de lignina e não pode ser incorporada em uma já existente (Lan *et al.*, 2015). Entretanto, a quantidade real de tricín encontrada nos polímeros de lignina ainda é pouco conhecida e um método preciso e confiável para quantificar os seus níveis será necessário para elucidar a fundo as funções desse composto na lignificação.

Distribuição de tricín no reino vegetal

A ocorrência natural de tricín em plantas foi anteriormente ignorada devido à dificuldade de caracterizá-la com relação a outros compostos também metilados (Wollenweber *et al.* 2008). Tricín é encontrado naturalmente em plantas de grãos de cereais como aveia, milho, arroz, trigo e cevada, sendo detectado principalmente em folhas e caules, e raramente em raízes (Harbourne, 1967; Zhang *et al.*, 2008a; Wollenweber e Dorr, 2008). Recentemente tricín também foi observado em uma porção na lignina isolada de algumas monocotiledôneas perenes como palha de arroz, palha de trigo, plantas de milho, bambu e cana-de-açúcar (Youet *et al.*, 2013; Mao *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2013; Heikkinen *et al.*, 2014; Lan *et al.*, 2015; Fornalé *et al.*, 2015; Yoo *et al.*, 2015; Wen *et al.*, 2013; José *et al.*, 2015; Rencoret *et al.*, 2015). Tricín e tricetin, seu análogo não metilado, foram detectados em várias espécies de plantas como milheto japonês (*Echinochloa utilis*) (Watanabe, 1999), alfafa (*Medicago sativa*) (Stochmalet *et al.*, 2001), sementes, caule e folhas de bambu (*Phyllostachys nigra*) (Colombo *et al.*, 2006); *Sassaborealis* (Poaceae) (Jiao *et al.*, 2007), *Lygodium japonicum* (Zhang *et al.*, 2008) entre outros. Também foi verificada a ocorrência de outras formas de tricín em *M. flacata* (Polyakova, 1992); 4-O-glicosídeo (Hasegawa *et al.*, 2008) e 4-O-apiosídeo (Syrchinea *et al.*, 1992); 7-glicuronídeo (Harborne e Salão, 1964; Markham e Porter 1973); 7-diglicuronídeo (Timothy *et al.*, 2008); e sulfato de 7-glicuronídeo (Williams *et al.*, 1983).

De um modo geral, tricín é tipicamente acumulado nas folhas e caules de herbáceas e encontrado como **1)** tricín livre, **2)** tricín-glicosídeo, **3)** tricín-lignano e **4)** tricín-lignano-glicosídeo (Li *et al.*, 2016).

1. Tricín livre

Tricín livre foi isolado pela primeira vez em folhas de trigo (*Triticum dicoccum*) infectado pela ferrugem, onde se concluiu que seu acúmulo foi devido ao estresse (Anderson e Perkin, 1931). Tricín também foi encontrado em gramíneas e palmas (Harborne e Hall, 1964; Goodwin, 1965; Harborne 1975; Harborne e Williams, 1976). Recentemente, os teores de tricín livre foram quantificados em trigo, milho, aveia e palha de arroz nas quantidades de 376, 91, 601 e 64 mg kg⁻¹, respectivamente (Lan *et al.*, 2016).

2. Tricín-glicosídeos

Tricin-glicosídeos ocorrem em plantas como duas formas: tricín-O-glicosídeo (**Fig. 7**) e tricín-C-glicosídeo em que a unidade de carboidrato se encontra ligada ao grupo hidroxila e o carbono ligado no benzeno (Ferreret *et al.*, 2007). Embora tricín-glicosídeo seja principalmente tricín acoplado a glicose outras unidades de carboidratos como xilose, arabinose e ramnose estão ligados (Popoviciet *et al.*, 1977; Theodor *et al.*, 1981; Parveen *et al.*, 2010). Outras formas de tricín-glicosídeos como tricín-7-O-glicosídeo, C-glicosiltricín, 7-O-metilado tricín-glicosídeo e 4'-O-metilado tricín-glicosídeo foram relatadas (Williams *et al.*, 1974; Wang *et al.*, 2004; Marin *et al.*, 2004; Sun *et al.*, 2013). Alfafa e subespécies de plantas de arroz apresentaram teores relativamente elevados de tricín-glicosídeos (Stochmal e W. Oleszek, 2007; Awaadet *et al.*, 2008; Donget *et al.*, 2014).

3. Tricin-lignanós

Tricin-lignanós (**Fig. 8**) pertencem aos flavonolignanós em que a estrutura principal da flavona A é acilada com outra unidade de fenilpropanoide, geralmente no anel B (Begumet *et al.*, 2010). Os flavolignanós geralmente estão presentes junto com tricín e tricín-glicosídeos em plantas de arroz, aveia, palmeira, alfafa e cana-de-açúcar. O conteúdo de tricín-lignanós obtidos através do rendimento por isolamento geralmente é inferior a 30 mgkg⁻¹, sendo relativamente menor do que tricín e tricín-glicosídeos (Li *et al.*, 2016).

4. Tricin-lignano-glicosídeos

Tricin-lignano-glicosídeos (**Fig. 9**) foi relatado em algumas plantas como planta de arroz, cana-de-açúcar e alfafa. Nessa forma a unidade fenilpropanoide geralmente se liga a O-4'-OH de tricín, enquanto a unidade de carboidrato se liga a 7-OH, separadamente.

Funções biológicas de tricín em plantas

Tricin apresenta funções biológicas como, por exemplo, inibidor da germinação (Cooper *et al.*, 1977) e potencial atividade herbicida (Chunget *et al.*, 2005). Além disso, a acumulação de tricín em cereais está relacionado ao papel desempenhado no mecanismo de defesa da planta no que se diz a respeito às interações planta-inseto (Boerjanet *et al.*, 2012). Ao se acumular na superfície das folhas e flores das plantas, como aglicona lipofílica livre, isso permite sua passagem através das membranas celulares, atuando mais eficazmente contra herbívoros e patógenos (Wollenweber e Dorr, 2008).

As flavonas, incluindo a tricín apresentaram uma maior atividade fungicida contra 34 espécies de fungos diferentes e conhecidos por causar efeitos prejudiciais para as sementes

armazenadas (Weidenborner e Iha, 1997). Tricin inibe o crescimento de agentes patogênicos fúngicos e de ervas daninhas no arroz, sem afetar o crescimento do mesmo. A grande quantidade de tricinencontrada no solo ocorre provavelmente devido à sua liberação através da exsudação de raízes de arroz ou lixiviação; conseqüentemente sua acumulação no solo pode sugerir uma possível função aleloquímica, um biopesticida vegetal natural e de proteção do arroz contra patógenos e ervas daninhas (Kong *et al.*, 2004). A biomassa lignocelulósica é considerada um recurso renovável com potencial para a produção de biocombustíveis, porém a presença da lignina, fortemente ligada aos polissacarídeos celulose e hemicelulose, limita a digestibilidade enzimática durante os processos de hidrólise (Ragauskas *et al.*, 2006; Himmelet *et al.*, 2007). A presença de tricín como componente da estrutura de lignina poderá ampliar ainda mais a diversidade no uso da lignina como matéria-prima para diversos produtos e, possivelmente, a melhora da sacarificação enzimática (Himmelet *et al.*, 2007; Vermerriset *et al.*, 2007).

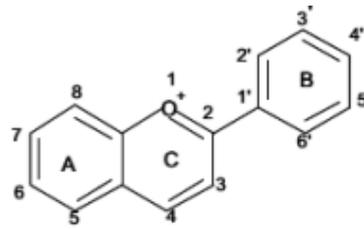


Figura 1. Estrutura básica dos flavonoides (Brodowska, 2017)

Group of flavanoid	Structure backbone	Examples
Flavones		 Luteolin Apigenin Chrysin
Flavanols		 Quercetin Kaempferol Galangin
Flavanones		 Hesperetin Naringenin
Flavanonol		 Taxifolin
Isoflavones		 Genistein Daidzein
Flavan-3-ols		 Catechin Epicatechin

Figura 2. Estrutura dos principais flavonoides (Kumar e Pandey, 2013).

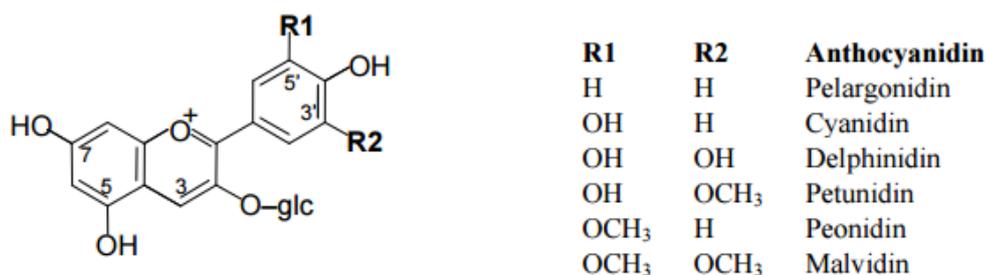


Figura 3. Estrutura dos derivados da antocianidina (Pascual-Teresa, 2010).

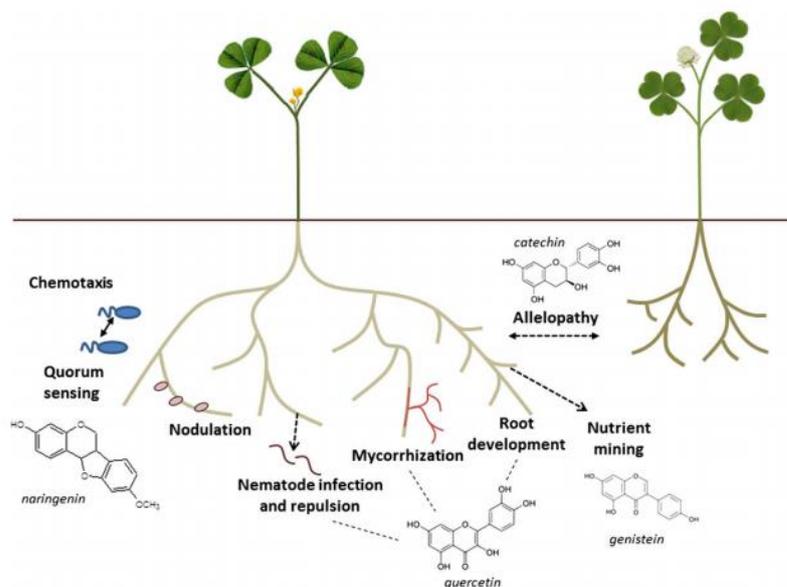


Figura 4. Funções dos flavonoides na rizosfera. Indução da nodulação por quimiotaxia, estimulantes para o processo de micorrização, repelentes para nematódeos parasitas, potentes estimulantes para desenvolvimento radicular e aleloquímicos nas interações planta-planta (Hassan e Mathesius, 2012).

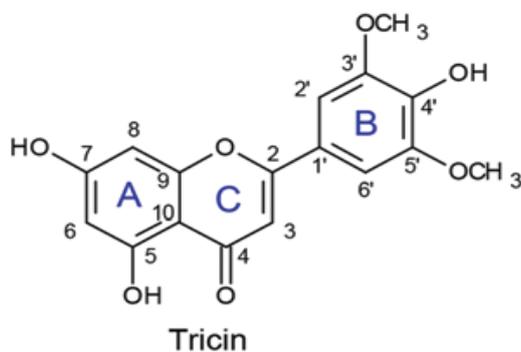


Figura 5. Estrutura química do tricín (Li *et al.*, 2016).

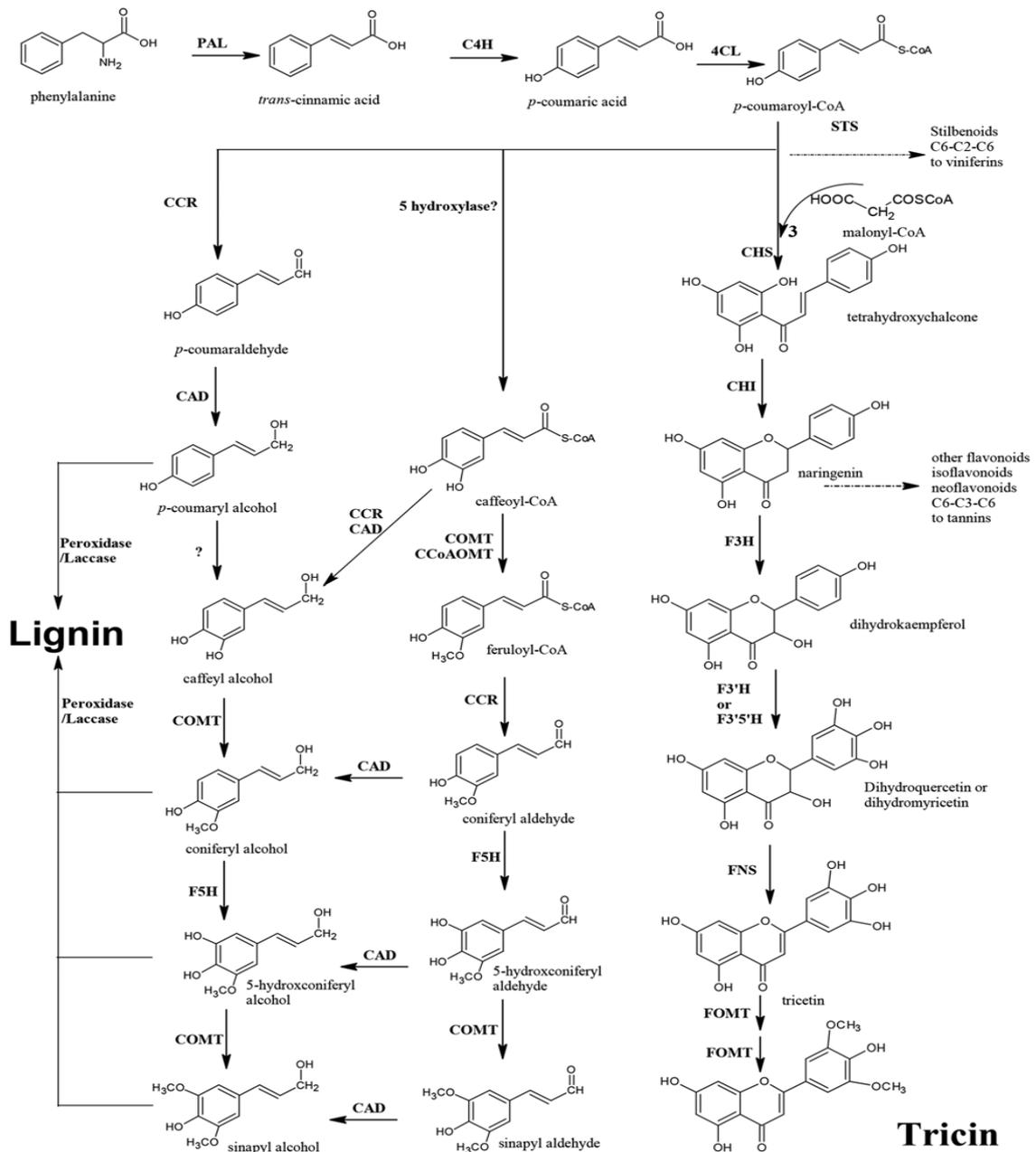
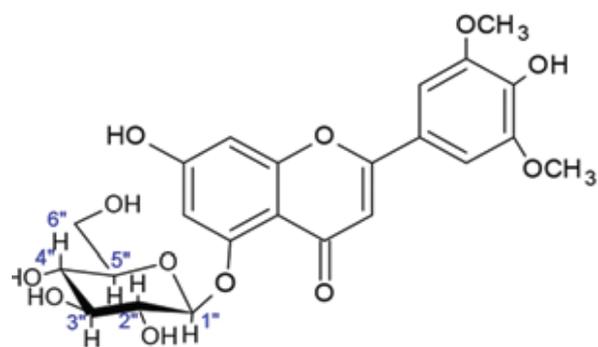
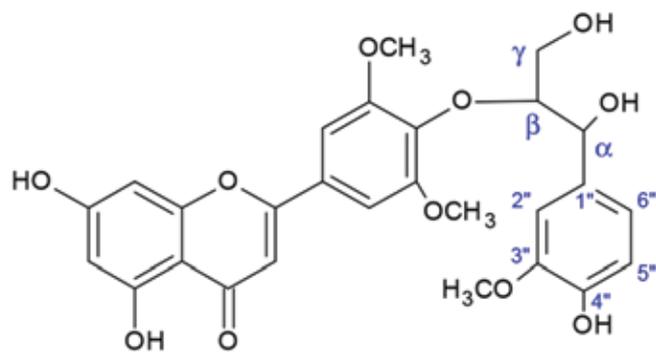


Figura 6. Visão esquemática da via de biossíntese para tricetin e lignina. PAL: fenilalanina amônia liase. C4H: cinamato-4-hidroxilase. 4CL: *p*-cumaroil-CoAligase. STS: stilbeno sintase. CHS: chalcona sintase. CHI: chalconaisomerase. F3H: flavanona-3-hidroxilase. F3'H: flavonoide 3' hidroxilase. F3'5'H: flavonoide 3' 5' hidroxilase. CCR: cinamoil coa redutase. CAD: cinamilalcolol desidrogenase. COMT: ácido cafeico-*O*-metiltransferase. CCoAOMT: cafeoil-CoA-*O*-metiltransferase. F5H: ferulato 5-hidroxilase. FOMT: flavona *O*-metiltransferase (Li *et al.*, 2016).



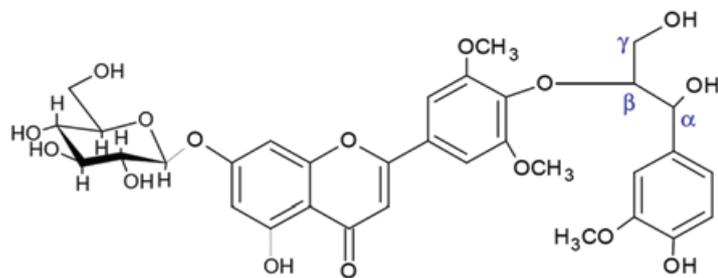
Tricin-5-O-glucoside

Figura 7. Estrutura química de tricín-O-glicosídeo (Li et al., 2016).



4'-O-β-guaiacylglyceryl tricín

Figura 8. Estrutura química de tricín-lignano (Li et al., 2016).



4'-O-β-guaiacylglyceryl ether-7-O-glucoside

Figura 9. Estrutura química de tricín-lignano-glicosídeo (Li et al., 2016).

Referências

- Anderson J. A., Perkin A. G. 1931. The yellow coloring matter of Khapli wheat, *Triticum dicoccum*. I. J Chem Soc: 2624–2625.
- Awaad A. S, Mohamed N.H, Maitland D. J and G. A. Soliman. 2008. Rec. Nat. Prod. 2, 76–82. Anti-ulcerogenic Activity of Extract and Some Isolated Flavonoids from *Desmostachiabipinnata* (L.) Stapf.
- Balakshin M; Capanema E; Gracz H; Chang H.-M; Jameel H. 2011. Quantification of lignin-carbohydrate linkages with high-resolution NMR spectroscopy. *Planta*, 233, 1097–1110.
- Banchi, D.; Sen, C. K.; Bagchi, M. and Atalay, M. 2004. Anti-angiogenic, Antioxidant, and Anticarcinogenic Properties of a Novel Anthocyanin-Rich Berry Extract Formula. *Biochemistry*; 69 (1), 75-80.
- Barsberg S, Matousek P, Towrie M, Jørgensen H, Felby C. 2006. Lignin radicals in the plant cell wall probed by Kerr-gated resonance Raman spectroscopy. *Biophys J.* 90:2978-2986.
- Barros J., Serk H., Granlund I., Pesquet E. 2015. The cell biology of lignification in higher plants. *Annals of Botany* 115: 1053–1074.
- Begum S. A., Sahai M. and A. B. Ray. 2010. Non-conventional Lignans: Coumarinolignans, Flavonolignans, and Stilbenolignans. *Fortschritte der Chemieorganischer Naturstoffe/Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, Springer, 2010, vol. 93, pp. 1–70.
- Bradshaw H.D, Schemske D.W. 2003. Allele substitution at a flower colour locus produces a pollinator shift in monkeyflowers. *Nature* 426:176–78.
- Brodowska, Katarzyna Malgorzata. 2017. Natural flavonoids: classification, potential role, and application of flavonoid analogues. *European Journal of Biological Research*; 7 (2): 108-123.
- Boerjan, Wout; Ralph, John; Baucher, Marie. 2003. Lignin Biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology*, v. 54, p. 519-546.
- Boudet, Alain-Michel. 2008. Evolution and current status of research in phenolic compounds. *Phytochemistry*, v. 68, p. 2722–2735.
- Bourdillat, B., Delautier, D., Labat, C., Benveniste, J., Potier, P., & Brink, C. 1988. Hispidulin, a natural flavone, inhibits human platelet aggregation by increasing cAMP levels. *Eur J Pharmacol* 147, 1– 6.
- Buchanan B., Gruissem W., Jones R. 2015. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. Wiley, Hoboken N.J., Second edition.
- Chung I. M, Hahn S. J and A. Ahmad, J. Chem. Ecol. 2005. Confirmation of Potential Herbicidal Agents in Hulls of Rice, *Oryza sativa* 31, 1339–1352.
- Cooper R., Gottlieb H. E. and D. Lavie, Isr. J. 1977. A New Flavolignan of Biogenetic Interest from *Aegilops ovata* L Chem., 16, 12–15.
- Colombo R, Yariwake JH, Queiroz EF et al; 2006. On-line identification of further flavone C- and O-glycosides from sugarcane (*Saccharum officinarum* L., Gramineae) byHPLC-UV-MS. *Phytochem Anal* 17:337–343.
- Crestini C, Melone F, Sette M, Saladino R. 2011. Milled wood lignin: a linear oligomer. *Biomacromolecules* 12: 3928-3935.
- del Rio JC, Rencoret J, Prinsen P, Martínez ÁT, Ralph J, Gutiérrez A. 2012. Structural characterization of wheat straw lignin as revealed by analytical pyrolysis, 2D-NMR, and reductive cleavage methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60: 5922-5935.
- Dong X, W. Chen, W. Wang, H. Zhang, X. Liu and J. Luo, J. 2014. Comprehensive profiling and natural variation of flavonoids in rice. *Integr. Plant Biol.*, 56, 876–886.
- Erlund, Iris. 2004. Review of the flavonoid quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutrition Research*; 24, 851–874.
- Ferreres, F.; Sousa, C.; Vrchovska, V.; Valentao, P.; Pereira, J.A.; Seabra, R.M.; 2007. Andrade, P.B. Chemical composition and antioxidant activity of *T. 'ronchuda cabbage* internal leaves. *Eur. Food Res. Technol*; 222, 88–98.

- Ferreira, María L. Falcone et al. 2012. Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. *Frontiers in Plant science*; 3.
- Freudenberg K.; 1956. Beiträge zur Erforschung des Lignins. *Angewandte Chemie* 68: 508-512.
- Fornalé, F J. Rencoret, L. Garcia-Calvo, M. Capellades, A. Encina, R. Santiago, J. Rigau, A. Gutiérrez, J.-C. del Río and D. Caparros-Ruiz. 2015. Cell wall modifications triggered by the down-regulation of Coumarate 3-hydroxylase-1 in maize. *Plant Sci.*, 236, 272–282.
- Gabaldón C, López-Serrano M, Pomar F, Merino F, Cuello J, Pedreno MA, Ros Barceló A. 2006. Characterization of the last step of lignin biosynthesis in *Zinnia elegans* suspension cell cultures. *FEBS Lett*, 580:4311-4316.
- Goodwin T. W. 1965. *Chemistry and biochemistry of plant pigments*, Academic Press, London, New York.
- Harborne J.B., e Hall. 1964. Plant polyphenols. XII. Occurrence of tricetin and of glycoflavones in grasses. *Phytochemistry* 3:421–428.
- Harborne, J. B. 1967. *Comparative biochemistry of the flavonoids*, Academic Press, London, New York.
- Harborne J. B. 1975. Biochemical systematics of flavonoids. In: Harborne JB, Mabry TJ, Mabry H (eds) *The flavonoids (part 2)*. Academic Press, New York, pp 1064–1095.
- Harborne J.B., Williams C. 1976. Flavonoid patterns in leaves of the Gramineae. *Biochem Syst Ecol* 4:267–280.
- Harborne JB, Baxter H. 1999. *The handbook of natural flavonoids*, Vols 1 and 2. Chichester, UK: John Wiley and Sons.
- Harborne JB, Williams CA. 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 2000; 55:481–504.
- Hassan, S. & Mathesius, U. 2012. *The role of flavonoids in root–rhizosphere signalling: opportunities and challenges for improving plant–microbe interactions*. *J. Exp. Bot.* 63, 3429–3444.
- Hasegawa T., Tanaka A., Hosoda A., Takano F. and T. 2008. Antioxidant C-glycosyl flavones from the leaves of *Sasakurilensis* var. *gigantea* Ohta, *Phytochemistry*, 69, 1419–1424.
- Havsteen, B. H. *Pharmacol. Ther.* 2002. The biochemistry and medical significance of the flavonoids; 96, 67.
- Heikkinen, H.; Elder, T.; Maaheimo, H.; et al. 2014. Impact of steam explosion on the wheat straw lignin structure studied by solution-state nuclear magnetic resonance and density functional methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 62, n. 43, p. 10437–10444.
- Himmel, G.W.; Ding, S.-Y.; Johnson, D.K., Adney, W.S; Nimlos, M.R.; J.W. Brady, Foust, T.D. 2007. Biomass Recalcitrance: Engineering Plants and Enzymes for Biofuels Production. *Science* 315: 804.
- Hostetler, Gregory L; Ralston, Robin A; Schwartz, Steven J. 2017. Flavones: Food Sources, Bioavailability, Metabolism, and Bioactivity. *An advance in Nutrition an international Review Journal*.
- Jiao J, Zhang Y, Liu C et al. 2007. Separation and purification of tricetin from an antioxidant product derived from bamboo leaves. *J Agric Food Chem* 55:10086–10092.
- Johnson, Rachel; Bryant, Susan; Huntley, Alyson L. 2012. Green tea and green tea catechin extracts: An overview of the clinical evidence. *Maturitas*; 73, 280-287.
- José, C; Lino, A; Colodette, J. L; Lima, C. F; Gutiérrez, A; Martínez, Á; Lu, T. F; Ralph, J and Rencoret, J. 2015. Differences in the chemical structure of the lignins from sugarcane bagasse and straw. 2015. *Biomass Bioenergy*, 81, 322–338.
- Khan, Muhammad Kamran. 2014. A comprehensive review on flavanones, the major citrus polyphenols. *Journal of Food Composition and Analysis*; 33, 85-104.
- Karam, T. K.; Dalposo, L. M.; Casa, D. M.; De Freitas, G. B. R. 2013. Carqueja (*Baccharis trimera*): utilização terapêutica e biossíntese. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 15, n. 2, p. 280–286.

- Kong C, Xu X, Zhou B. 2004. Two compounds from allelopathic rice accession and their inhibitory activity on weeds and fungal pathogens. *Phytochemistry* 65:1123–1128.
- Kozłowska A., Szostak-Wełgieriek D. 2014. Flavonoids-food sources and health benefits, *Rocz. Panstw. Zakł. Hig.* 65; 79e85.
- Kumar, Shashank and Pandey, Abhay K. 2013. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The ScientificWorld Journal*.
- Lam, Pui Ying; Liu, Hongjia and Lo, Clive. 2015. Completion of Tricin Biosynthesis Pathway in Rice: Cytochrome P450 75B4 Is aUniqueChrysoeriol; 59-Hydroxylase. *Plant Physiology*; 168, 1527–1536.
- Lam, P. Y.; Tobimatsu, Y.; Takeda, Y.; et al. 2017. Disrupting Flavone Synthase II Alters Lignin and Improves Biomass Digestibility. *Plant Physiology*, v. 174, n. 2, p. 972–985.
- Lan, W.; Lu, F.; Regner, M.; et al. 2015. Tricin, a Flavonoid Monomer in Monocot Lignification. *Plant Physiology*, v. 167, n. 4, p. 1284–1295.
- Lan, Wu; Rencoret, Jorge; Lu, Fachuang; Karlen, Steven D.; Smith, Bronwen G.; Harris, Philip J.; del Rio, Jose Carlos; Ralph, John. 2016. Tricin-lignins: occurrence and quantitation of tricin in relation to phylogeny. *The Plant Journal*; 88, 1046–1057.
- Li, Yong and Ding, Ye. 2012. Minireview: Therapeutic potential of myricetin in diabetes mellitus. *Food Science and Human Wellness*, 1, 19–25.
- Li M, Pu Y., Yoo C.G., Ragauskas A. J.2016. The occurrence of tricin and its derivatives in plants. *Green Chemistry* 18: 1439-1454.
- Li, M.; Pu, Y.; Tschaplinski, T. J.; Ragauskas, A. J. 2017. ³¹P NMR Characterization of Tricin and Its Structurally Similar Flavonoids. *ChemistrySelect*, v. 2, n. 12, p. 3557–3561.
- Luterbacher, J. S.; Azarpira, A.; Motagamwala, A. H.; et al. 2015. Lignin monomer production integrated into the γ -valerolactone sugar platform. *Energy and Environmental Science*, v. 8, n. 9, p. 2657–2663. Royal Society of Chemistry.
- Mbaveng, A. T.; Hamm, R. 2014. Harmful and protective effects of terpenoids from African medicinal plants In: KUETE, V. *Toxicological Survey of African Medicinal Plants*. 1. ed., Elsevier.
- Malavasi, Ubirajara Contro; Davis, Antony Swick; Malavasi, Marlene de Matos. 2016. Lignin in Woody Plants under Water Stress: A Review. *Floresta e Ambiente*; 23(4), 589-597.
- Manganaris, G.A and Goulas V. 2012. Exploring the phytochemical content and the antioxidant potential of Citrus fruits grown in Cyprus. *Food Chemistry*; 131, 39-47.
- Marin P. D., Grayer R. J., Grujic-Jovanovic S., Kite G. C. and N. C. Veitch. 2004. Glycosides of tricetin methyl ethers as chemosystematic markers in *Stachys subgenus* *Betonica*. *Phytochemistry*, 65, 1247–1253.
- Martens, S., Preuss, A., and Matern, U. 2010. Multifunctional flavonoid dioxygenases: flavonols and anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* L. *Phytochemistry* 71, 1040–1049.
- Marques, O.C.P. 2008. Desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas orais de *Uncaria tomentosa* com atividade antioxidante. 210p. Dissertação (Mestrado - Área de Concentração em Farmácia) - Departamento de Farmácia, Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal.
- Mao J. Z, X. Zhang, M.-F. Li and F. Xu. 2013. Effect of Biological Pretreatment with White-rot Fungus *Trametes hirsuta* C7784 on Lignin Structure in *Carex meyeriana* Kunth *BioResources*, 8, 3869–3883.
- Markham KR, Porter LJ. 1973. Flavonoids of the liverwort *Marchantia foliacea*. *Phytochemistry* 12:2007–2010.
- Méchin V, Baumberger S, Pollet B, Lapierre C. 2007. Peroxidase activity can dictate the in vitro lignin dehydrogenative polymer structure. *Phytochemistry*, 68:571-579.
- Mierziak, Justyna; Kostyn, Kamil; Kulma, Anna. 2014. Flavonoids as Important Molecules of Plant Interactions with the Environment. *Molecules*; 19, 16240-16265.
- Middleton, E. M., & Teramura, A. H. 1993. The role of flavonol glycosides and carotenoids in protecting soybean from ultraviolet-B damage. *Plant Physiol* 103, 741–752.

- Middleton Jr, E., Kandaswami, C. 1994. The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer. In: Harborne, J.B. (Ed.).
- Morreel K, Ralph J, Kim H, Lu F, Goeminne G, Ralph SA, Messens E, Boerjan W. 2004. Profiling of oligolignols reveals monolignol-coupling conditions in lignifying poplar xylem. *Plant Physiology* 136: 3537-3549.
- Nijveldt, R. J.; Nood, E.; Hoorn, D. E. C.; Boelens, P. G.; Norren, K.; Leeuwen, P. A. M. 2001. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am. J. Clin. Nutr.*, 74, 418.
- Oancea, Simona and Oprean, Letiția. 2011. Anthocyanins, from biosynthesis in plants to human health benefits. *Acta Universitatis Cibiniensis Series E: Food technology*.
- Parveen M., Khanam Z., Ali A., and S. M. Ahmad, *Chin. Chem. Lett.* 2010. A novel antimicrobial flavonoid glycoside from the leaves of *Alstonia macrophylla* Wall ex A. DC (Apocynaceae) 21, 593–595.
- Pascual-Teresa S, Santos-Buelga C, Rivas-Gonzalo JC. 2000. Quantitative analysis of flavan-3-ols in Spanish foodstuffs and beverages. *J Agric Food Chem*; 48:5331–7.
- Pascual-Teresa, S.; Moreno, D.A.; Garcia-Viguera, C. 2010. Flavanols and Anthocyanins in Cardiovascular Health: A Review of Current Evidence. *Int. J. Mol. Sci.* 11, 1679–1703.
- Petrussa, Elisa; Braidot, Enrico; Zancani, Marco; Peresson, Carlo; Alberto Bertolini; Patui, Sonia; Vianello, Angelo. 2013. Plant Flavonoids - Biosynthesis, Transport and Involvement in Stress Responses. *Int. J. Mol. Sci.*;14, 14950-14973.
- Pietta, G. P. 1999. Institute of Advanced Biomedical Technologies, National Council of Research Via F.lli Cervi 93, 20090 Segrate (MI), Italy Received September 13.
- Polyakova LV. 1992. Flavonoids of *Medicago falcata* L. and *Medicago romanica* Prod. in connection with age and vitality of individuals in natural populations. *Biologicheskie Nauki (Moscow)* 96–105.
- Popovici G., Weissenböck G., Bouillant M.-L., Dellamonica G., and J. Chopin, Z. 1977. *Pflanzenphysiologie, Isolation and Characterization of Flavonoids from Avena sativa* L., 85, 103–115.
- Ragauskas, A. J; Williams, C. K; Davison, B.H; Britovsek, G; Cairney, J; Eckert, C. A. Frederick, J; Hallett, J. P; Leak, D; Liotta, C. L; Mielenz, J. R; Murphy, R; Templer, R and Tschaplinski, T. 2006. The Path Forward for Biofuels and Biomaterials. *Science*, 311, 484.
- Ralph J, Grabber JH, Hatfield RD. 1995. Lignin-ferulate crosslinks in grasses: active incorporation of ferulate polysaccharide esters into ryegrass lignins. *Carbohydr. Res.* 275:167–78.
- Ralph J, Lundquist, K., Brunow, G. Lu, F., Kim, H., Schatz, P. F., Marita, J. M., Hatfield, R. D., Ralph, S. A. Christensen, J. H., Boerjan, W. 2004. Lignins: natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenylpropanoids. *Phytochemistry Reviews* 3: 29-60.
- Ralph, J. What makes a good monolignol substitute? In T Hayashi, ed, *The Science and Lore of the Plant Cell Wall: Biosynthesis, Structure and Function*. 2006. BrownWalker Press, Boca Raton, FL, pp 285–293.
- Ralph J, Bruno W. G, Harris PJ, Dixon RA, Schatz PF, Boerjan W. 2008. Lignification: Are lignins biosynthesized via simple combinatorial chemistry or via proteinaceous control and template replication? In F Daayf, An El Hadrami, L Adam, GM Ballance, eds, *Recent Advances in Polyphenol Research, Vol 1*. Wiley-Blackwell Publishing, Oxford, UK, pp 36-66.
- Ralph J. 2010. Hydroxycinnamates in lignification. *Phytochemistry Reviews* 9: 65-83.
- Rencoret, J.; Prinsen, P.; Gutiérrez, A.; Martínez, Á. T.; del Río, J. C. 2015. Isolation and structural characterization of the milled wood lignin, dioxane lignin, and cellulolytic lignin preparations from brewers spent grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 63, n. 2, p. 603–613.
- Samuelson G. 1999. *Drugs of Natural Origin. A text book of Pharmacognosy*. 4th. revised edition. Apotekarsocieteten. Sweden.
- Schijlen EG, de Vos CHR, van Tunen AJ et al. 2004. Modification of flavonoid biosynthesis in crop plants. *Phytochemistry* 65:2631–2648.

- Stochmal, A.; Simonet, A. M.; Macias, F. A.; Oleszek, W. Alfalfa (*Medicago sativa* L.) flavonoids. 2. 2001. Tricin and chrysoeriol glycosides from aerial parts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 49, n. 11, p. 5310–5314.
- Stochmal A. and W. Oleszek, J. 2007. Seasonal and structural changes of flavones in alfalfa (*Medicago sativa*) aerial parts. *Food Agric. Environ.*, 5, 170.
- Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosmann, G.; Mello, J. C. P.; Mentz, L. A.; Petrovick, P. R. 2004. *Farmacognosia - da Planta ao Medicamento*, 5ª ed., Editora da UFSC: Santa Catarina.
- Singh, Manjinder; Kaur, Maninder; Silakari, Om. 2014. Flavones: An important scaffold for medicinal chemistry. *European Journal of Medicinal Chemistry*; 84, 206-239.
- Sun, J. Y.-D. Yue, F. Tang, X.-F. Guo, J. Wang and X. Yao. 2013. Flavonoids from the Leaves of *Neosinocalamusaffinis* *Chem. Nat. Compd.*, 2013, 49, 822–825.
- Symonowicz M, Kolanek M. 2012. Flavonoids and their properties to form chelate complexes. *Biotechnol Food Sci* 76:3–41.
- Syrchina A. I, G. Gorshkov, V. V. Shcherbakov, S. V. Zinchenko, A. L. Vereshchagin, K. L. Zaikov and A. A. Semenov. 1992. Flavonolignans of *Salsolacollina*. *Chem. Nat. Compd.*, 28, 155–158.
- Taiz, L; e Zeiger, E. 2013. *Fisiologia Vegetal* 5º Edição. Porto Alegre; Artmed.
- Theodor R., Zinsmeister H. D., Mues R. and K. R. Markham. 1981. Flavone C-glycosides of two *Metzgeria* species. *Phytochemistry*, 20, 1851–1852.
- Timothy P, Karioti A, Leitao SG et al. 2008. HPLC/DAD/ESI-MS analysis of non-volatile constituents of 3 Brazilian chemotypes of *Lippia alba* (Mill.). *Nat Prod Commun* 3:2017–2020.
- Timberlake C.F and Henry B.S. 1986. Plant pigments as natural food colours. *Endeavour* 10:31–36.
- Tsao R. 2010. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*; 2(12): 1231–1246.
- Vacek, Jan; Klejdus, Borivoj; Lojkov, Lea; Kuban, Vlastimil. 2008. Current trends in isolation, separation, determination and identification of isoflavones: A review. *J. Sep. Sci.*; 31, 2054 – 2067.
- Vanholme, Ruben; Morreel, Kris; Ralph, John; Boerjan, Wout. 2008. Lignin engineering. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 11, p. 278 –285.
- Vanholme, Ruben; Demedts, Brecht; Morreel, Kris; Ralph, John; Boerjan, Wout. 2010. Lignin Biosynthesis and Structure. *Plant Physiology*, v. 153, p. 895– 905.
- Veitch, N. C.; Grayer, R. E. J. *Nat. Prod. Rep.* 2008. Flavonoids and their glycosides, including anthocyanins. 25, 555.
- Vermerris W, Saballos A, Ejeta G, Mosier N S, Ladisch M. R, Carpita N. C. 2007. Molecular breeding to enhance ethanol production from corn and sorghum stover. *CropSci* 47: S142–S153.
- Villares, Ana; Rostagno, Mauricio A.; García-Lafuente, Ana; Guillamón, Eva; Martínez, J. Alfredo. 2011. Content and Profile of Isoflavones in Soy-Based Foods as a Function of the Production Process. *Food Bioprocess Technol*; 4, 27–38.
- Volp, A.; Renhe, I.; Barra, K.; Stringueta, P. 2008. Flavonoides antocianinas: características e propriedades na nutrição e saúde. *Revista Brasileira de Nutrição*, v. 23, n. 2, p. 141–149.
- Wang H. B, Yao H, Bao G-H et al. 2004. Flavone glucosides with immunomodulatory activity from the leaves of *Pleioblastusamarus*. *Phytochemistry* 65:969–974.
- Watanabe M., J. *Agric. Food Chem.* 1999. Antioxidative Phenolic Compounds from Japanese Barnyard Millet (*Echinochloautilis*) *Grains* 47, 4500–4505.
- Weidenborner M, Iha H.C. 1997. Antifungal spectrum of flavone and flavanone tested against 34 different fungi. *Mycol Res* 101:733–736.
- Wen JL, Sun SL, Xue BL, Sun R. C. 2013. Recent advances in characterization of lignin polymer by solution-state nuclear magnetic resonance (NMR) methodology. *Materials (Basel)* 6: 359–391.

- Williams, C. A.; Harborne, J. B.; Clifford, H. T. 1974. Negatively charged flavones and tricin as chemosystematic markers in the *palmae*. *Phytochemistry*, v. 12, n. 10, p. 2417–2430.
- Williams CA, Fronczyk JH, Harborne J. B. 1983. Leaf flavonoid and other phenolic glycosides as indicators of parentage in six ornamental Fuchsia species and their hybrids. *Phytochemistry* 22:1953–1957.
- Winkel-Shirley B. 2001a. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology and biotechnology. *Plant Physiol* 126:485–493.
- Winkel B. S. J. 2006. The biosynthesis of flavonoids. In: Grotewold E (ed) *The science of flavonoids*. Springer Science, New York, pp 71–96.
- Wollenweber E, Dorr M. 2008. Occurrence and distribution of the flavone tricin and its methyl derivatives as free aglycones. *Nat Prod Commun* 3:1293–1298.
- Wu, M.; Pang, J.; Lu, F.; et al. 2013. Application of new expansion pretreatment method on agricultural waste. Part I: Influence of pretreatment on the properties of lignin. *Industrial Crops and Products*, v. 50, p. 887–895.
- Yeung, John and Yu, Tak-fu. 2003. Effects of isoflavones (soy phyto-estrogens) on serum lipids: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Nutrition Journal*; 2 (15).
- Yoo, C. G.; Kim, H.; Lu, F.; Azarpira, A.; Pan, X.; Oh, K. K.; Kim, J. S.; Ralph, J and Kim, T. H. 2015. Understanding the Physicochemical Characteristics and the Improved Enzymatic Saccharification of Corn Stover Pretreated with Aqueous and Gaseous Ammonia, *BioEnergy Res.*, 1–10.
- Yu, J.; Bi, X.; Yu, B.; Chen, D. 2016. Isoflavones: Anti-inflammatory benefit and possible caveats. *Nutrients*, 8, 361.
- You TT, Mao JZ, Yuan TQ, Wen JL, Xu F. 2013. Structural elucidation of the lignins from stems and foliage of *Arundo donax* Linn. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61: 5361-5370.
- Zhang LH, Fan CL, Ye WC et al. 2008a. Study on flavonoids and phenolic acids from the herb of *Lygodium japonicum*. *Zhong Yao Cai* 31:22422–22426.
- Zeng, J.; Helms, G. L.; Gao, X.; Chen, S. 2013. Quantification of wheat straw lignin structure by comprehensive NMR analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 61, n. 46, p. 10848–10857.
- Zhou, J. M.; Ibrahim, R. K. 2010. Tricin-a potential multifunctional nutraceutical. *Phytochemistry Reviews*, v. 9, n. 3, p. 413–424.

Naringenin interfere nas vias de fenilpropanoides e de tricinn e afeta lignina e a digestibilidade de raízes de milho

G.G.M. Mendes e O. Ferrarese-Filho*

Laboratório de Bioquímica de Plantas, Universidade Estadual de Maringá, Paraná, Brasil

Autor para correspondência:

Oswaldo Ferrarese-Filho (✉)

Laboratório de Bioquímica de Plantas

Departamento de Bioquímica

Universidade Estadual de Maringá

Av. Colombo, 5790

CEP 87020-900, Maringá, PR, Brasil

Tel.: +55 44 3011 4717

E-mail: osferrarese@gmail.com

Resumo

Lignina é um complexo fenilpropanóico presente na parede celular das plantas, originado da via de fenilpropanoides, e constituído dos monômeros de *p*-hidrofenil (H), guaiacil (G) e siringil (S). Além destas unidades de lignina, o flavonoide tricín tem sido apontado como um novo monômero iniciador do processo de lignificação. Naringenina, também um flavonoide, tem sido relatado como um inibidor da via de fenilpropanoides e um intermediário da via de biossíntese do tricín. Neste trabalho, os efeitos de naringenina foram avaliados em raízes de milho, de um modo geral, os resultados revelaram que este flavonoide: 1) reduz o crescimento das raízes; aumenta o teor de lignina, altera a sua composição monomérica e induz a formação de tricín, e 2) aplicados isoladamente ou em associações com naringenina, os inibidores da via de fenilpropanoides (PIP, MDCA e PROTO) e o inibidor da via de tricín (PDCA) afetam o crescimento das raízes, a formação de lignina e a composição monomérica, enquanto MDCA e PDCA aumentam a digestibilidade após um pré-tratamento alcalino da biomassa. No conjunto os resultados fornecem pistas interessantes quanto ao papel de naringenina nas duas vias metabólicas, como inibidor da via de fenilpropanoides e ativador da biossíntese de tricín. Uma possível aplicação do PDCA no processo de produção de etanol a partir de milho e outras monocotiledôneas pode ser uma destas pistas.

Palavras-chave: digestibilidade, lignificação, monolignóis, *Zeamays*

1. Introdução

Lignina é um complexo heteropolímero fenilpropanóico depositado predominantemente nas paredes celulares secundárias de células vegetais (Vanholme *et al.*, 2010), sendo o composto orgânico mais abundante encontrado nas plantas, após a celulose (Taiz e Zeiger, 2013; Buchanan, 2015). Consiste primariamente dos monômeros *p*-hidroxifenil (H), guaiacil (G) e siringil (S) que são formados pelo acoplamento oxidativo dos álcoois *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico, respectivamente, os quais são produtos da via de fenilpropanoides. Após a deposição completa na parede celular secundária, lignina fornece um revestimento para as microfibrilas de celulose-hemicelulose garantindo, assim, rigidez, resistência, e impermeabilidade para os tecidos lignificados (Moreira-Vilaret *et al.*, 2014).

A via dos fenilpropanoides (**Fig. 1**), cujo produto final é a lignina, se inicia com a desaminação do aminoácido L-fenilalanina, derivado da via do ácido chiquímico. Esta reação é catalisada pela fenilalanina amônia liase (PAL) que converte L-fenilalanina em ácido *t*-cinâmico.

O segundo passo da via utiliza o ácido *t*-cinâmico, o qual é hidroxilado no carbono 4 do anel aromático pela cinamato 4-hidroxilase (C4H), gerando ácido *p*-cumárico. Em monocotiledôneas, PAL também exibe atividade de tirosina amônia liase (TAL) que converte tirosina diretamente em ácido *p*-cumárico. Na reação subsequente, ocorre ativação do ácido *p*-cumárico a tioéster pela ação da hidroxicinamoil-CoAligase (4-CL) formando *p*-cumaroil-CoA, o qual segue dois caminhos. Primeiro, ele pode ser reduzido em seu correspondente aldeído (pela ação da cinamoil-CoA redutase; CCR), formando *p*-cumaraldeído, que por sua vez é reduzido em álcool *p*-cumarílico (pela ação da cinamil álcool desidrogenase; CAD), sendo polimerizado pela peroxidase (POD) ou lacase (LAC) gerando o monômero *p*-hidroxifenil(H). No outro caminho, o *p*-cumaroil-CoA é transesterificado pela chiquimato/quinato 4-hidroxicinamoil-CoA 4-hidroxicinamoil transferase (HCT). A reação de hidroxilação de *p*-cumaroil-CoA chiquimato/quinato, catalisada pela 4-hidroxicinamato 3-hidroxilase (C3H), produz cafeoil-chiquimato, que é transesterificado novamente pela HCT gerando cafeoil-CoA. A reação de metoxilação catalisada pela cafeoil-CoA-*O*-metiltransferase (CCOMT) gera feruloil-CoA a partir de cafeoil-CoA. Em etapas subsequentes, CCR, ferulato 5-hidroxilase (F5H), cafeato 3-*O*-metiltransferase (COMT) e CAD convertem cafeoil-CoA e feruloil-CoA nos álcoois *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico. Finalmente, esses monolignóis são oxidativamente polimerizados para formar os monômeros guaiacil (G) e siringil (S) da lignina (Boerjan *et al.*, 2003; Salvador *et al.*, 2013; Barros *et al.*, 2015).

É sabido que há uma estreita relação entre lignificação e recalcitrância, ou seja, quanto maior a lignificação da parede celular maior sua recalcitrância, e estudos na área de engenharia genética tem buscado desenvolver uma parede celular mais maleável para a penetração de enzimas digestoras com a finalidade de produzir bioetanol (Vanholme *et al.*, 2010, Malavasi *et al.*, 2016). Perturbações da via dos fenilpropanoides podem causar grandes alterações estruturais no polímero devido à incorporação de intermediários da via e outros compostos fenólicos (Wagner *et al.*, 2011). Recentemente diversos estudos têm sido realizados visando a manipulação das vias de biossíntese da lignina. Há enorme interesse neste assunto devido à possibilidade de se obter plantas mais adequadas aos processos de deslignificação, usadas na indústria de celulose e papel, bem como na indústria de conversão da biomassa lignificada em etanol (Carvalho *et al.*, 2009).

Tricin (5,7,4'-trihidroxi-3',5'-dimetoxiflavona) é originado da combinação de metabólitos da via dos fenilpropanoides e do acetato/malonato (Lan *et al.*, 2016). É estruturalmente constituído de dois anéis fenil e um anel heterocíclico dos quais correspondem a um sistema benzoil (anel-A) um sistema cinamoil (anel-B), e um sistema heterocíclico (anel-C) (**Fig. 1**) (Li *et al.*, 2016). Ao contrário de outros flavonoides com importantes atuações na regulação de processos biossintéticos (Winkel-Shirley, 2001; Schijlen *et al.*, 2004; Winkel, 2006). Há uma carência de informações sobre a regulação da biossíntese de tricín, e também do seu papel nas plantas. Por exemplo, há recente

evidência de que a regulação negativa da enzima chalcona sintase (CHS) pode redirecionar o fluxo de carbono da biossíntese de flavonoides para a síntese de monolignóis, resultando em plantas com altos níveis de lignina (Lamet *et al.*, 2017).

Dentreos diversos flavonoides existentes destaca-se naringenina(5,7,4'-trihidroxi-flavanona) (Fig. 1), classificada como flavanona, e utilizada neste trabalho. Naringenina é encontrada em altas concentrações em frutas cítricas como limão (*Citrus limonum*) e laranja (*Citrus maxima*), e em baixas concentrações no tomate (*Lycopersicon esculentum*) (Erlund, 2004). Naringenina pode ser encontrada tanto na forma aglicona como glicosilada (Khan, 2014). Plantas do tipo selvagem de *Arabidopsis* tratadas com naringenina apresentam redução no crescimento das raízes e gravitropismo (Brown *et al.*, 2001). Observou-se também que naringenina pode suprimir o crescimento de espécies vegetais anuais como tomate, *Spinacia oleracea*, *Lactuca sativa*, *Raphanus sativus*, *Daucus carota* (Chen *et al.*, 2004) e soja (Colpaset *et al.*, 2003). Em outro trabalho, relatou-se que em tecidos de plantas de petúnia (*Petunias purpuras*) haviam três tipos de isoenzimas 4-CL e naringenina inibiu suas atividades (Ranjeva *et al.*, 1976). Naringenina também foi considerada como um potente inibidor *in vitro* da enzima 4-CL de pinheiros (Voo *et al.*, 1995). Finalmente, destaque deve ser dado para o fato de que naringenina possui um importante papel na síntese de tricín, e que tem sido apontado como um nucleador da síntese de lignina (Lam *et al.*, 2015).

A prevalente hipótese relacionada ao processo de lignificação, inicialmente proposta por Freudenberg (1956), estabelece que os monolignóis (ou álcoois hidroxicinâmicos) são oxidados, por ação de peroxidases ou lacases, formando monômeros que, a seguir, são ligados entre si de forma combinatória. Este processo é conhecido como acoplamento químico combinatório (Vanholme *et al.*, 2008). Neste caso, ocorrem ligações entre monômeros formando dímeros que iniciam a cadeia. Além disso, a possibilidade de outros compostos efetuarem acoplamentos químicos tem sido descrita. É o caso de tricín.

A primeira evidência de que tricín poderia ser incorporada na lignina foi constatada na parede celular isolada da palha de trigo (del Río *et al.*, 2012). Em amostras de bagaço de malte foi observado que tricín sofre acoplamento com outros monômeros (Rencoret *et al.*, 2015). Em bagaço de cana-de-açúcar foi constatada a presença de duas unidades de tricín ligadas por meio de ligações β -O-4, à lignina. Isso tem contribuído para um teor de 10% da composição total de lignina (del Río *et al.*, 2012; Zenget *et al.*, 2013). Tal fato também foi notado em palha de trigo (Yelle *et al.*, 2013; Zenget *et al.*, 2013). Em decorrência destes achados, tricín tem sido considerado como um monômero de lignina em monocotiledôneas (del Río *et al.*, 2012). De fato, em recente trabalho divulgado por Li *et al.* (2017), foi constatado que a incorporação de tricín na estrutura da lignina

se mostrou mais comum em monocotiledôneas como milho, trigo e bambu, do que em dicotiledôneas ou gimnospermas.

Um dos aspectos mais discutidos atualmente é que a presença de lignina na parede celular gera recalcitrância, ou seja, lignina torna a parede menos digerível. Isso se dá pela forte ligação entre lignina e os polissacarídeos. Tal condição dificulta o aproveitamento destes açúcares oriundos da biomassa lignocelulósica para fins comerciais; por exemplo, na produção de biocombustíveis (Ragauskaset *al.*, 2006; Himmelet *al.*, 2007).

Diante do grande interesse na utilização da biomassa lignocelulósica para fins industriais e a recente descoberta de tricín como monômero de monocotiledôneas, mais esforços devem ser envidados para compreender o papel deste flavonoide na lignificação e sua influência sobre as propriedades estruturais e composicionais da lignina. Neste trabalho, o papel do flavonoide naringenina, como intermediário da via de biossíntese de tricín, foi avaliado em raízes de milho. Mais especificamente foram avaliados os efeitos no crescimento de raízes de milho e as respostas observadas no que tange aos teores de lignina e sua composição monomérica, atividade da 4-CL, produção de tricín, teores de ácidos hidroxicinâmicos (ferúlico e *p*-cumárico) e digestibilidade. Para isso as plântulas foram submetidas à ação de naringenina e de inibidores enzimáticos da via de fenilpropanoides e de tricín.

2. Material e Métodos

Material e condução experimental. As sementes de milho (*Zea mays* cv. IPR-264), obtidas junto ao IAPAR (Instituto Agrônômico do Paraná) foram previamente desinfetadas em solução de NaClO a 2%, e posteriormente germinadas em câmara escura, a 25°C. Após três dias, vinte e cinco plântulas foram selecionadas e transferidas para o sistema experimental com solução nutritiva Dong pH 6,0 (Ferrareseet *al.*, 2000) contendo, ou não, naringenina (0,1 a 0,4 mM) e os inibidores enzimáticos ácido piperonílico (PIP; 0,1 mM), ácido 3,4 metilenodioxicinâmico (MDCA; 2,0mM), ácido protocatecuico (PROTO; 0,5 mM) e ácido 2,4 piridinodicarboxílico (PDCA; 0,05 mM). A escolha destas concentrações se baseou em experimentos anteriores realizados no Laboratório de Bioquímica de Plantas (BIOPLAN) e dados da literatura. Experimentos com misturas de naringenina 0,2 mM e cada um dos inibidores enzimáticos, nas mesmas concentrações descritas, também foram realizados. Os recipientes foram acondicionados em câmara de crescimento (280 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 12 horas, 25°C) por 24 horas.

Determinação do comprimento e das biomassas frescas e secas. No início e término dos experimentos de cultivo, e com o auxílio de uma régua milimetrada, os comprimentos de todas as

plântulas foram medidos, para cada repetição. As diferenças encontradas entre os comprimentos iniciais e finais foram determinadas, e os resultados expressos em centímetros (Herriget *al.*, 2002). As raízes primárias foram separadas por excisão e imediatamente determinando-se assim as biomassas frescas, utilizando-se balança analítica. Após 72 horas de acondicionamento em estufa, a 60°C, foram obtidos valores da biomassa seca utilizando-se balança analítica. Os valores médios encontrados das repetições foram obtidos e os resultados expressos em grama.

Depleção da naringenina solução nutritiva. Para acompanhar o consumo da naringenina 0,1 mM pelas raízes nos sistemas hidropônicos, alíquotas de 1,0 mL foram coletadas dos sistemas de incubação após 0, 6, 12, 18 e 24h. O volume das soluções foi corrigido para 200 mL com água deionizada a cada momento em que se antecedia as coletas das alíquotas. As amostras foram filtradas através de membranas de 0,45 µm e analisadas (20 µL) em HPLC Shimadzu® (Tóquio, Japão). A detecção da naringenina se deu por meio de gradiente com dois solventes: metanol 60% “A” e ácido acético 0,1% “B”. As medidas de depleção da naringenina foram determinadas a 280 nm sob fluxo de 0,8 mL min⁻¹ utilizando-se coluna de 25cm (C 18).

Quantificação de lignina. Após incubação em hidroponia as biomassas secas (0,3 g) de raízes foram obtidas e subsequentemente homogeneizadas em 50 mM de tampão fosfato pH 7,0 (7,0 mL) sendo transferidas para um tubo de centrífuga (Ferrarese *et al.*, 2002). O precipitado foi centrifugado (1400g, 5 minutos), lavado e centrifugado sucessivamente como segue: mais duas vezes com 50 mM tampão fosfato pH 7,0 (7,0 mL); três vezes com 1% (v/v) Triton® X-100 em tampão pH 7,0 (7,0 mL); duas vezes com 1 M NaCl em tampão pH 7,0 (7,0 mL); duas vezes com água destilada (7,0 mL) e duas vezes com acetona (5,0 mL). O material foi seco em estufa (80°C, 24 horas) onde a massa resultante foi definida como a fração da parede celular livre de proteínas. Esse material foi utilizado para determinar o teor total de lignina pelo método do brometo de acetila (Morrison, 1972). Uma quantidade de 20 mg do material foi acondicionada em tubo de centrífuga e 0,5 mL de brometo de acetila 25% foram acrescentados. As amostras foram aquecidas por 30 minutos a 70°C, sendo transferidas para banho de gelo e a reação foi interrompida ao adicionar 0,9 mL de NaOH 2 M. A seguir, foram adicionados 0,1 mL de hidroxilamina-HCl 7,5 M e 2,0 mL de ácido acético gelado. Após centrifugação (1000g, 5 minutos), o sobrenadante foi diluído e usado para as leituras em 280 nm. Uma curva padrão a partir do padrão de lignina (Aldrich 37,096-7) foi gerada para determinação da concentração de lignina. Os resultados foram expressos mg lignina g⁻¹ de parede celular.

Determinação da composição monomérica de lignina. A composição monomérica da lignina foi obtida pela oxidação com nitrobenzeno (Zanardo *et al.*, 2009). Uma porção da parede celular livre de proteínas (50 mg) foi acondicionada e fechada em uma ampola Pyrex[®] contendo 1,0 mL de NaOH 2,0 M mais 0,1 mL de nitrobenzeno e transferida para aquecimento a 170°C por 2,5 horas, com agitação ocasional da amostra. Após esta etapa de oxidação, a amostra foi resfriada em banho de gelo e lavadas duas vezes com clorofórmio sendo acidificada para pH 3-4 com HCl 5,0 M, e extraída duas vezes com clorofórmio. Os extratos orgânicos foram roto-evaporados e ressuspendidos em metanol. Todas as amostras foram filtradas em filtro de seringa descartável 0,45 µm e analisada por HPLC. A fase móvel foi metanol/ácido acético 4% em água (20/80, v/v) com fluxo de 1,2 mL min⁻¹ para corrida isocrática de 20 minutos. As quantificações de *p*-hidroxibenzaldeído, vanilina e siringaldeído foram realizadas a 290 nm utilizando os padrões correspondentes. Os resultados foram expressos como µg monômero mg⁻¹ de parede celular.

Determinação da atividade da 4-hidroxicinamoil-CoA ligase (4-CL). Após incubação, raízes frescas (1,0 g) foram maceradas por 3 minutos em meio de extração contendo tampão Tris/HCl 0,2 M (pH 7,5); 5,0 mM de ditioneitol, 10,0 mM de MgCl₂ e 20% de glicerol. A suspensão foi centrifugada (10000g, 20 minutos, 4°C), sendo o sobrenadante considerado como extrato enzimático. O volume final do meio de reação (1,0 mL) continha 0,4 mL de extrato enzimático, 4,0 mM ATP, 0,4 mM de ácido *p*-cumárico e 0,2 mM de CoA em tampão de incubação (tampão Tris/HCl 0,2 M pH 7,5; 5,0 mM de DTT e 10,0 mM de MgCl₂). A reação foi iniciada com a adição de CoA, conduzida a 35°C por 10 minutos e lida em espectrofotômetro (Shimadzu[®] UV-2450, Tóquio, Japão). O aumento da absorbância em 333 nm, decorrente da formação de *p*-cumaroil-CoA, foi monitorado contra branco desprovido de CoA e ATP. A atividade da 4-CL foi expressa em µmol de *p*-cumaroil-CoA formado h⁻¹ g⁻¹ de matéria fresca.

Extração, caracterização e quantificação detricin. Raízes secas (5g para os tratamentos e 10g para o controle) foram maceradas com metanol 80% (1:3 v/v) por 5 minutos em gral e pistilo e posteriormente filtradas com auxílio de filtro de porcelana, quitasato e bomba a vácuo até obtenção de fase metanólica. Esta fase orgânica foi coletada e evaporada utilizando-se roto-evaporador e subsequentemente solubilizadas em 5mL de água. Com o auxílio de um funil de separação, adicionou-se na amostra 5 mL de acetato de etila observando-se o pH. Após homogeneização esperou-se a completa separação das fases aquosas e fração acetato para a coleta da fase acetato. O procedimento foi repetido por mais duas vezes adicionando-se apenas o acetato de etila, seguido de roto-evaporação. As amostras foram solubilizadas em 3 mL de metanol, diluídas (fd = 10x) e filtradas através de membranas de 0,45 µm e analisadas (20 µL) em HPLC Shimadzu[®] (Tóquio,

Japão). A detecção da tricín se deu por meio de gradiente com dois solventes: metanol 60% “A” e ácido acético 0,1% “B”. Os valores obtidos das áreas foram determinados a 350 nm sob fluxo de 0,8 mL min⁻¹ utilizando-se coluna de 25cm.

Análises em espectrômetro de massas foram também realizadas para reforçar os resultados obtidos pela cromatografia líquida e confirmar a presença de tricín nas amostras. Para isso, alíquotas das amostras injetadas no cromatógrafo foram coletadas após separação. Isso foi conseguido acoplando-se um tubo de ensaio de 1,5 mL à saída do detector de fotodiodos. A fase móvel contendo tricín foi coletada por um período de um minuto após o início da detecção do composto. As amostras coletadas foram filtradas e diluídas em acetonitrila antes das análises por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS). Para isso foi utilizado um cromatógrafo Waters 1525µ (HPLC bomba binária) acoplado ao espectrômetro Quattro micro API Waters (Beverly, EUA). Foi utilizada uma coluna Waters Symmetry[®] C18 (4,6 x 75 mm x 3,6 µm). A corrida cromatográfica de forma gradiente como segue: inicialmente com solvente A (água + 0,1% ácido fórmico; 40:60) seguido de solvente B (acetonitrila + 0,1% ácido fórmico; 20:80) por 20 minutos. O fluxo foi de 0,4 mL/min⁻¹. O espectrômetro foi operado em modo positivo. A voltagem do capilar foi de 2,5 KV, a voltagem do cone de 25,0 V, a temperatura da fonte de 120°C, a temperatura de dessolvatação de 350°C, o fluxo do gás no cone de 50 L h⁻¹ e fluxo do gás de dessolvatação de 600 L h⁻¹. O intervalo de massa utilizado no modo varredura foi de 100 a 400 m/z.

Determinação dos ácidos ferúlico e p-cumáricolivres e esterificados à parede celular. Raízes secas (0,05 g) foram maceradas com 3mL de metanol 50% e incubadas (80°C) por 90 minutos. Para parar a reação, utilizou-se gelo. As amostras foram centrifugadas a 4 °C, por 15 minutos a 3200 rpm por quatro vezes consecutivas, onde o sobrenadante era guardado, e então adicionava-se 1mL de metanol 50%. O volume final de 6 mL, foi armazenado em freezer para posterior análise dos ácidos ferúlico e p-cumárico solúveis em HPLC. O pellet foi seco por 24h em estufa a 60°C. Para libertar seletivamente os ácidos hidroxicinâmicos esterificados à parede celular foi efetuada saponificação do material seco com adição de NaOH 0,5 M, seguida por incubação a 96°C durante 2 h (de Ascensao e Dubery, 2003). Em seguida, as amostras foram acidificadas para pH 2 e centrifugadas. O sobrenadante foi transferido para um funil de separação, foi adicionado éter etílico e, após agitação, a fração etérea foi separada. Este procedimento foi realizado duas vezes e as frações etéreas foram combinadas, evaporadas rotativamente, ressuspendidas em fase móvel e analisadas em HPLC (Shimadzu[®], Tóquio, Japão). A separação dos ácidos hidroxicinâmicos se deu por meio de gradiente com dois solventes: ácido acético 4% “A” e metanol “B”. O gradiente de corrida foi definido pelo aumento gradual da quantidade de “B” em relação a “A”. No tempo de

0-15 min tem-se a proporção de 0:100 (B:A); de 15-45 min chega-se a seguinte proporção 60:40 (B:A); de 45-60 retorna-se à condição inicial de 0:100 (B:A), com fluxo de $0,8 \text{ mL}/\text{min}^{-1}$. O ácido ferúlico foi determinado a 322 nm e o ácido *p*-cumárico a 309 nm, comparando-se com seus respectivos padrões. Os resultados foram expressos em $\mu\text{g g}^{-1}$ de massa seca.

Determinação da digestibilidade enzimática. Inicialmente foi realizada a remoção dos açúcares solúveis, por meio de sucessivas lavagens com álcool 80%. Para isto, biomassa seca da raiz foi moída e transferida para tubos falcon e então adicionado 9 mL de etanol 80%. Posteriormente, os tubos foram acondicionados em um shaker a 55°C , sob agitação de 200 rpm por 4 horas. Após este período, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em etanol 80%, sendo novamente incubado a 55°C por mais 4 horas, sob agitação. Este procedimento foi realizado por cerca de seis vezes, até que todo o açúcar solúvel tivesse sido extraído. A eficiência da extração foi avaliada a partir de uma alíquota do sobrenadante para detectar a presença de açúcares pelo método do fenol-sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956). Após 15 minutos de reação foi realizada a leitura espectrofotométrica em 490 nm. Após a retirada total de açúcares solúveis, os extratos de parede celular foram centrifugados (3200g, 5 min.) e o precipitado insolúvel secado em estufa a 60°C .

As amostras foram submetidas a um pré-tratamento alcalino, adaptado de Lima *et al.* (2014). Depois de seco, 0,2 g de amostra foi pesada em tubos de vidro e adicionados 8 mL de NaOH 0,25M e acondicionados em banho seco a 130°C por 40 minutos. A seguir, as amostras foram colocadas em banho de gelo e, em seguida, centrifugadas. O sobrenadante foi descartado e para total remoção da base foram realizadas quatro lavagens com álcool 80%. Em cada lavagem, o pH do sobrenadante foi medido até que estivesse entre 6-7. Por fim, as amostras foram centrifugadas (3200g, 5 min.) e o sobrenadante descartado. O precipitado foi seco em estufa a 60°C , para posterior determinação da digestibilidade enzimática. Primeiramente foi determinada a atividade enzimática a fim de calcular a quantidade de enzima a ser aplicada. Para isso, foi adicionado em um tubo de ensaio 50 μL de xilano 1% e 50 μL do extrato enzimático de *Aspergillus niveus*, diluída 100 vezes, sendo incubado a 50°C por 30 minutos. Após este período, a reação foi interrompida com 100 μL de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) 1%, e imediatamente fervida a 100°C por 5 minutos, acondicionado em banho de gelo, e adicionado 800 μL de água. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 540 nm. Posteriormente, foi realizada a digestibilidade da biomassa por meio de adaptações das técnicas de Delabona *et al.* (2013) e Gonçalves *et al.* (2012). Para isso, foi pesado 0,015g de biomassa seca em tubos eppendorf, e efetuada a ressuspensão em tampão acetato 50 mM pH 5,0. A seguir, foi adicionado 20 U/mL do extrato enzimático e a mistura incubada a 50°C por 24 horas. Após este período, a suspensão foi homogeneizada. Então, 100 μL do sobrenadante foram retirados e analisados os açúcares redutores liberados pelo método do DNS

(Miller, 1959). A leitura foi realizada no espectrofotômetro a 540 nm. O teor de açúcares redutores liberados foi expresso por mgg^{-1} de resíduo insolúvel em etanol.

Análise estatística. Para testar a significância das diferenças observadas foi utilizado o programa estatístico Prism[®] (GraphPad 6.0, USA). Os dados foram expressos como as médias dos experimentos \pm erro padrão das médias. As diferenças entre os parâmetros foram avaliadas pelos testes de comparação múltipla de Dunnett e Scott-Knott. Os valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

3. Resultados e Discussão

Os relevantes fatos notados neste trabalho são que naringenina causa efeitos deletérios sobre o crescimento das raízes de milho afetando a via de fenilpropanoides ao mesmo tempo em que atua como indutor da via de tricín com efeitos sobre a produção de lignina e a digestibilidade da parede celular. Estas observações são suportadas pelos dados obtidos e informações da literatura como segue.

Naringenina e a biossíntese de lignina

Depleção de naringenina na solução nutritiva. O consumo da naringenina pelas raízes das plântulas, a partir da solução nutritiva, foi acompanhado em diferentes tempos. (**Fig. 2**). Experimentos na ausência de plântulas foram considerados controles, já que não haveria absorção de naringenina pelas raízes. Neste caso, pode-se notar que até 12 h não houve diferença significativa nos teores de naringenina presente na solução nutritiva, quando comparado com o tempo zero. Já, nos tempos de 18 e 24 h notam-se decréscimos de 14% e 19%, respectivamente, nos teores de naringenina presente na solução. Embora não houvessem plântulas capazes de absorver naringenina, os resultados não descartam a possibilidade de que esse composto possa ser oxidado e/ou degradado.

Ainda sob a análise da mesma figura, pode-se observar que experimentos com plântulas em solução nutritiva revelaram diferenças significativas em relação àqueles sem plântulas, e em comparação com o tempo zero. Após 6 h de incubação observa-se um decréscimo de 45% no teor de naringenina presente na solução nutritiva, em comparação com o tempo inicial. Após 12h, um decréscimo de 83% da naringenina na solução nutritiva foi observado e, conseqüentemente, após 18 h o flavonoide foi totalmente consumido da solução nutritiva. Estes dados sugerem que

naringenina foi gradativamente absorvida pelas plântulas de milho, o que contribuiu para a escolha de 24 h como o tempo de tratamento das plântulas nos experimentos subsequentes.

Efeitos de naringenina no crescimento das raízes. Os tratamentos com naringenina reduziram os comprimentos das raízes de milho de 28% a 97% com as concentrações variando de 0,1 a 0,4 mM (**Fig. 3A**). Naringenina também reduziu as biomassas frescas das raízes em 22% a 30% (**Fig. 3B**), nas concentrações de 0,2 a 0,4 mM, e as biomassas secas em 23% e 41%, a 0,3 e 0,4 mM, respectivamente (**Fig. 3C**). Estes dados estão em concordância com aqueles descritos em milho e arroz (Deng *et al.*, 1998), *Arabidopsis* (Brown *et al.*, 2001), espinafre, alface, rabanete, tomate, cenoura (Chen *et al.*, 2004) e raízes de soja (Bidoet *et al.*, 2010) sendo que, neste caso, os efeitos deletérios foram maiores que em milho.

Efeitos de naringenina sobre os teores de lignina e composição monomérica. Devido ao fato de que 0,4 mM de naringenina afetou drasticamente o comprimento das raízes (**Fig. 3A**), os experimentos subsequentes foram realizados com 0,1 a 0,3 mM do flavonoide. Como pode ser notado (**Fig. 4**), naringenina afetou significativamente os conteúdos de lignina nas raízes de milho com aumentos de 23% (a 0,2 mM) e 32% (a 0,3 mM), em comparação com o controle. Um dos principais aspectos revelado no presente estudo é que naringenina reduziu o crescimento radicular (comprimento em massa) de plântulas de milho (**Fig. 3**) seguido de aumentos significativos nos teores de lignina nas raízes (**Fig. 4**). O fato de que naringenina estimula a produção de lignina, reduzindo o crescimento das raízes foi também constatado em soja (Bidoet *et al.*, 2010), nas mesmas condições experimentais descritas no presente trabalho. Todavia, o possível mecanismo envolvido na ação deste flavonoide na biossíntese de lignina ainda não está devidamente esclarecido. Neste aspecto, a redução do crescimento das raízes tem sido considerada um dos primeiros efeitos de aleloquímicos e, em alguns casos, está associado com lignificação prematura das paredes celulares (Sánchez *et al.*, 1996; dos Santos *et al.*, 2004). Em geral, as paredes celulares tornam-se lignificadas quando a expansão celular aumenta, quer quando a célula está sob estresse ou quando ocorre diferenciação como no caso do xilema (Christensen *et al.*, 1998). Ao menos em princípio, este parece ser o caso.

Para aprofundar os estudos sobre a ação de naringenina na formação de lignina, a composição dos seus monômeros foi determinada cromatograficamente (**Fig. 5**). Naringenina não afetou os teores dos monômeros H (**Fig. 5A**) e S (**Fig. 5C**), em comparação com o controle. Entretanto, naringenina (0,1 a 0,3 mM) reduziu os teores do monômero G (13% a 23%, respectivamente; **Fig. 5B**).

Uma forma de testar a confiabilidade dos resultados de teores de lignina obtidos espectrofotometricamente (**Fig. 4**) é comparar com a soma dos valores obtidos para os monômeros H, G e S, ou seja, H+G+S. A soma de monômeros é muitas vezes referida como lignina, e os resultados (**Fig. 5D**) indicam a inexistência de efeito significativo de naringenina sobre ela, em comparação com o experimento controle. Todavia, as discrepâncias reveladas entre as determinações de lignina total (**Fig. 4**) e a soma dos seus monômeros (**Fig. 5D**) é fato que deve ser considerado nas interpretações dos resultados, haja vista que além de H, G e S, outros monômeros não usuais como catequil (C) e 5-hidroxi-guaiacil (5H) e, mais recentemente o flavonoide tricín, podem estar presentes na estrutura polimérica (Umezawa, 2018).

Além dos teores individuais e a soma dos monômeros, dois outros parâmetros podem ser obtidos dos mesmos experimentos; as proporções H:G:S e a razão S/G. No primeiro caso (**Fig. 5E**) nota-se que, em comparação com o controle, naringenina (0,1 a 0,3 mM) aumentou os percentuais de H e S e reduziu G. Comportamento semelhante pode ser observado quando se analisa a razão S/G (**Fig. 5F**), as quais aumentaram de 44% a 60%, após tratamentos das raízes com 0,1 a 0,3 mM de naringenina, em comparação com o controle. De certo modo os resultados obtidos sugerem que embora naringenina não altere H+G+S, as suas proporções sofrem modificações. Um destaque se refere à razão S/G, a qual é um indicador dos tipos de ligações químicas presentes na estrutura da lignina. Esta razão reflete o grau de metoxilação dos anéis fenólicos dos monolignóis determinando os diferentes tipos de ligações químicas da estrutura polimérica. Por exemplo, uma baixa razão S/G indica maiores teores de monômeros G e um maior número de ligações carbono-carbono (β -5 e 5-5) em adição às prevalentes ligações β -O-4, resultando em um maior número de subestruturas condensadas. Isso torna os tecidos mais resistentes à digestão químico-enzimática. Ao contrário, ou seja, uma alta razão S/G indica menores teores de monômeros G e das suas ligações químicas correspondentes; a presença de elevado teor de S resulta em um maior número de subestruturas β -O-4, mais simples. Isso torna os tecidos macios e passíveis de degradação (Umezawa, 2018).

Efeitos de naringenina e inibidores da via de fenilpropanoides na atividade da 4-CL. A partir dos resultados obtidos até aqui, uma questão levantada foi se naringenina afetaria enzimas da via de fenilpropanoides. Como descrito anteriormente, a via de fenilpropanoides é composta de várias enzimas que, em conjunto, participam de reações formando monolignóis que são polimerizados em lignina (Boerjan *et al.*, 2003). Uma delas é a 4-cumarato:CoA ligase (4-CL; **Fig.1**), que ocupa posição central na via metabólica convertendo hidroxicinamatos (*p*-cumarato, cafeato e ferulato) em seus ésteres-CoA correspondentes. Alguns estudos sugerem que a 4-CL pode ser alvo da ação de possíveis herbicidas e compostos que possam regular o fluxo metabólico da via e retardando o crescimento de plantas. Por exemplo, em arroz, 0,1 mM de naringenina reduz o crescimento e o

conteúdo de lignina devido à inibição da 4-CL (Deng *et al.*, 2004). Em milho e arroz, Deng *et al.* (2004) notaram que naringenina não somente inibiu o crescimento como aumentou os teores dos ácidos cinâmico, *p*-cumárico, cafeico e ferúlico.

Com base nas informações descritas acima, experimentos foram realizados com o intuito de avaliar os efeitos de naringenina e de inibidores enzimáticos da via de fenilpropanoides sobre a 4-CL (**Fig. S1**). Dois inibidores foram selecionados: o ácido piperolínico (PIP) e o ácido 3,4 metilenodioxicinâmico (MDCA). PIP é considerado um inibidor irreversível da enzima C4H enquanto MDCA tem sido relatado como um inibidor competitivo da 4-CL (Schochet *et al.*, 2002; Chakraborty *et al.*, 2009) (**Fig. 1**). Os resultados mostrados revelam que, em comparação com o controle, naringenina, PIP e a associação PIP + naringenina não afetaram a atividade da 4-CL. Já, MDCA revelou-se um ativador (8,8 vezes) desta enzima, ao menos nas condições experimentais aplicadas neste trabalho. O mesmo pode ser observado com a mistura MDCA+NAR, ou seja, um aumento de 18 vezes sobre a atividade enzimática. O resultado obtido com a associação entre MDCA+naringenina (MDCA+NAR), estimulando ainda mais a atividade da 4-CL está em concordância com o aumento da produção de lignina causado pela naringenina, que assim potencializa o efeito do MDCA. Além disso, este é um indicativo de que o flavonoide deve estar atuando na formação de tricín, já que ele é um metabólito desta via contígua à via de fenilpropanoides (**Fig. 1**).

Os resultados da mesma figura revelam um complicador, ou seja, os efeitos do PIP e MDCA, quando aplicados isoladamente. Não há uma clara explicação para os resultados obtidos, haja vista que ambos são inibidores da via de fenilpropanoides. PIP atua sobre a C4H e, portanto, em reação anterior àquela catalisada pela 4-CL. Deste modo, uma eventual inibição por PIP deveria evitar a formação de substratos para 4-CL. Ao inibir a 4-CL, MDCA deveria gerar acúmulo de seus substratos. A complexidade observada nestes resultados, em princípio inesperados, parece embasada por recente estudo com *Arabidopsis thaliana* (Steenackers *et al.*, 2016). Aplicando MDCA, estes autores avaliaram os efeitos deste composto sobre a lignificação da planta em estudo. Diante do acúmulo de inúmeros compostos após tratamento com MDCA, em especial, conjugados de MDCA, de ácido cinâmico e de PIP, os autores sugerem que o MDCA pode ser metabolizado pela planta, sendo inclusive convertido em PIP. Outro aspecto, ainda que especulativo, pode ser a ocorrência de uma possível redução nos teores dos intermediários da via, ocasionado pela presença do MDCA na célula. Um suposto mecanismo regulatório que estimule a expressão gênica de enzimas da via, incluindo 4-CL, pode ter ocorrido. Entretanto, estes argumentos precisam ser confirmados por meio de estudos adicionais que possibilitem melhor compreensão dos efeitos destes inibidores.

Naringenina e a biossíntese de tricín

Como descrito anteriormente (**Fig. 1**), a formação de tricín tem sua origem na via de fenilpropanoides – a partir da reação da 4-CL formando *p*-cumaroil-CoA – que em sequência, pela ação de chalcona sintase, gera naringeninachalcona, a qual é isomerizada pela chalconaisomerase formando naringenina(Lan *et al.*, 2016). Como se nota,naringenina tem papel crucial na via de formação de tricín. Este flavonoide é encontrado naturalmente e considerado raro e esporádico. É encontrado principalmente em plantas de grãos de cereais como aveia, milho, arroz, trigo e cevada, sendo detectado principalmente em folhas e caules e, também, em raízes (Harbourne, 1967; Zhang *et al.*, 2008, Wollenweber e Dorr, 2008).

Quantificação de tricín nas raízes de milho. Para caracterizar tricín nas raízes de milho experimentos foram realizados recorrendo-se à técnica de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa (MS/MS) (Dados Suplementares; **Fig.S2**).Após fragmentação do padrão e amostra, picos de mesma razão e carga foram observados.Os espectrogramas de massas revelam similaridades (ion molecular 331) entre um padrão de tricín (**Fig. S2A**) e de uma amostra de raiz de milho (**Fig. S2B**), o que confirma a presença de tricín nos tecidos.

Efeitos de naringenina e inibidores da via de fenilpropanoides sobre a produção de tricín.

Nas raízes de milho não submetidas à ação de naringenina (controle), o teor de tricín foi de 4,09 mg/g⁻¹de tecido (**Fig. 6A**); um valor considerável quando comparado com outras espécies de plantas. Por exemplo, o mais alto conteúdo detectado foi 7,15 mg/g⁻¹da palha de aveia (*Avena sativa*)(Lan *et al.*,2016). Neste mesmo estudo, os autores avaliaram os teores de tricín em 11 amostras de eudicotiledonêas, o qual foi detectado apenas em alfafa (*Medicago sativa*) com0,07 mg/g⁻¹ de folha.

Quando as raízes de milho foram submetidas à ação de 0,1 a 0,3 mM de naringenina, os teores de tricín aumentaram de 2,8a 5,1 vezes, respectivamente, em comparação com o controle (**Fig. 6A**). Estes dados reforçam, claramente, o papel de naringenina como precursor da via de biossíntese de tricín(Lan *et al.*, 2016).

Os teores de tricinnas raízes de milho submetidas aos inibidores enzimáticos – isoladamente ou em associações com naringenina – estão mostrados na **Fig. 6B**. Os resultados revelam que PIP (inibidor da C4H; **Fig. 1**), MDCA (inibidor da 4-CL; **Fig.1**) e PDCA (inibidor da FNSII; **Fig. 1**;Britsch, 1990)reduziram completamente a formação de tricín, enquanto PROTO (inibidor da HCT;**Fig.1**; Eudes *et al.*, 2016)reduziu a sua produção em 78%, em comparação com o controle. Os resultados indicam ainda que as associações PIP+NAR, PROTO+NAR e PDCA+NAR

revertem o efeito inibitório restaurando os teores de tricín nos mesmos níveis de naringenina (NAR). Embora a associação MDCA+NAR induza a produção de tricín em valores superiores ao controle não ocorreu reversão completa em comparação com o tratamento somente com naringenina. Isso é indicativo de que MDCA se revela um forte inibidor da 4-CL reduzindo a formação de *p*-cumaroil-CoA, o metabólito de origem na via de tricín (**Fig. 1**).

Naringenina e inibidores enzimáticos

Efeitos de inibidores das vias de fenilpropanoide de tricínno crescimento das raízes. Com mostrado anteriormente, naringenina reduziu o comprimento e as biomassas frescas e secas das raízes de milho (**Fig. 3**). Com base nisso, experimentos comparativos foram efetuados com os diferentes inibidores metabólicos (**Fig. 1**). Ao menos para as condições estabelecidas neste trabalho no que concerne ao tempo de exposição e a concentração de cada composto aplicado, os resultados revelaram que naringenina (NAR), PIP, MDCA e PROTO inibiram os comprimentos das raízes em 65%, 35%, 94% e 23% respectivamente, em comparação com o controle (**Fig. 7A**). Somente NAR e MDCA afetaram as biomassas; 21% (NAR) e 16% (MDCA) das biomassas frescas e 19% (NAR) e 18% (MDCA) das biomassas secas, em comparação com os respectivos controles (**Figs. 7B, C**). Fato a ser destacado é que o composto PDCA não afetou o comprimento e as biomassas das raízes.

Efeitos de inibidores enzimáticos sobre os teores de lignina e composição monomérica. Inibidores enzimáticos e suas associações com naringenina foram aplicados para avaliar os teores de lignina total nas raízes de milho (**Fig. 8**). Como mostrado anteriormente (**Fig. 4**) e confirmado nestes experimentos, naringenina (NAR) aumentou significativamente o teor de lignina (20%), em comparação com o controle. Os inibidores enzimáticos PIP, MDCA, PROTO e PDCA reduziram os teores de lignina em 9%, 23%, 25% e 19%, respectivamente. As aplicações de naringenina em associações com os inibidores revelaram que PIP+NAR, MDCA+NAR e PDCA+NAR reverteram os efeitos inibitórios, em comparação com o controle. Uma exceção foi notada com respeito à associação PROTO+NAR, a qual manteve o efeito inibitório. De um modo geral, os resultados obtidos revelam que naringenina, de fato, influencia a formação de lignina total das raízes de milho; fato similarmente observado quando o mesmo flavonoide foi aplicado em soja (Bido et al., 2010).

Com o intuito de avaliar se os inibidores também afetam a composição monomérica de lignina, subsequentes experimentos foram efetuados aplicando-os, isoladamente ou em associações com naringenina (**Fig. 9**). Como pode ser notado, e em comparação com o controle, naringenina (NAR) não alterou o teor do monômero H (**Fig. 9A**), reduziu o monômero G (**Fig.**

9B) e aumentou S (**Fig. 9C**). Isoladamente, os inibidores da via de fenilpropanoides (PIP, MDCA e PROTO) reduziram os teores de H (**Fig. 9A**), G (**Fig. 9B**) e S (**Fig. 9C**). Aplicados juntamente com naringenina, PIP+NAR e PROTO+NAR restabeleceram os teores do monômero H nos mesmos níveis do controle enquanto isso não ocorreu com MDCA+NAR (**Fig. 9A**). Os teores de G e S não foram restabelecidos pelas associações PIP+NAR, MDCA+NAR e PROTO+NAR (**Fig. 9B**), mas PROTO+NAR aumentou S no mesmo nível do controle (**Fig. 9C**). A soma H+G+S (**Fig. 9D**) foi reduzida pela ação de PIP, MDCA e PROTO e suas respectivas associações com naringenina. As proporções H:G:S (**Fig. 9E**) também foram afetadas pelos inibidores e associações com naringenina como pode ser notado pelos percentuais de cada monômero. As razões S/G (**Fig. 9F**) aumentaram somente com a aplicação de naringenina, PROTO e PROTO+NAR. Os dados mais significantes foram aqueles decorrentes da ação de MDCA e MDCA+NAR. Ambos reduziram drasticamente os monômeros e, como consequência, as somas H+G+S e as proporções H:G:S, embora não tenham afetado as razões S/G; um indicativo de que, ao menos nas raízes de milho, a deslignificação não seria comprometida por este inibidor enzimático (Ohra-aho et al., 2013). Entretanto, mais recentemente foi relatado que MDCA inibe a lignificação de plântulas de *Arabidopsisthaliana* num suposto mecanismo de distúrbios da homeostase de auxina (Steenackers et al., 2016).

Ainda com respeito à ação de inibidores enzimáticos, a **figura 9** revela que PDCA, um inibidor da enzima FNSII da via de biossíntese de tricín (**Fig. 1**), não afetou os teores de G e S, a soma H+G+S, a proporção H:G:S e a razão S/G, embora tenha reduzido (em 10%) o monômero H quando comparado com o controle (**Fig. 9A**). Por seu lado, a associação PDCA+NAR aumentou os teores dos três monômeros e a soma H+G+S alterando a proporção H:G:S, o que mais uma vez reforça o papel de naringenina como crucial precursor da via de biossíntese de tricín (Lan et al., 2016).

Naringenina, inibidores enzimáticos e a digestibilidade da parede celular

Efeitos de inibidores enzimáticos sobre os teores dos ácidos ferúlico e p-cumárico. A parede celular das plantas contém ácidos hidroxicinâmicos esterificados aos polissacarídeos, os quais formam âncoras com a lignina promovendo a deposição deste polímero e mantendo a complexa e rígida estrutura da parede (Oliveira et al., 2015). Quantificados cromatograficamente, os teores dos ácidos ferúlico e p-cumárico revelaram significantes efeitos de naringenina e inibidores enzimáticos em raízes de milho (**Fig. 10**). Comparativamente ao controle (**Fig. 10A**), os teores de ácido ferúlico aumentaram (34%, NAR; 77%, PROTO; 88%, PROTO+NAR; 27%, PDCA e PDCA+NAR); não foram alterados (PIP e PIP+NAR), e foram drasticamente reduzidos (85%,

MDCA; 71%, MDCA +NAR). Os teores de ácido *p*-cumárico (**Fig. 10B**) aumentaram (15%, PROTO; 39%, PROTO+NAR; 31%, PDCA); não foram alterados (PDCA+NAR), e foram reduzidos (15%, NAR; 17%, PIP; 21%, PIP+NAR; 62%, MDCA; 37%, MDCA +NAR).

Uma das principais características distintivas das paredes celulares de gramíneas e de outras monocotiledôneas é a prevalência dos ácidos ferúlico e *p*-cumárico (Harris e Trethewey, 2010). O ácido ferúlico está envolvido nas reações de reticulação da parede celular; na acilação de unidades de arabinofuranosil ligadas ao esqueleto de xilana em arabinoxilano (AX) ou glucuronoarabinoxilano (GAX), e formando ligações cruzadas com GAX ou lignina. Estas ligações cruzadas impedem o acesso de enzimas para a digestão de polissacarídeos o que dificulta a liberação e posterior sacarificação de açúcares fermentáveis. Embora possua características similares ao ácido ferúlico, o ácido *p*-cumárico não se acopla facilmente *in vivo* e, assim, não participa efetivamente das ligações cruzadas ainda que, ao gerar o monômero H, participe da polimerização da lignina (Ralph, 2010). Os resultados mostrados aqui (**Fig. 10A**) destacam que naringenina, PROTO, PDCA e suas associações com naringenina, aumentaram os teores de ácido ferúlico. Isso sugere que as paredes celulares das raízes de milho possuem um maior número de ligações cruzadas entre ácido ferúlico e xilanos e/ou lignina, condição que pode resultar em recalcitrância dificultando a ação de enzimas hidrolíticas. Ao contrário, tanto MDCA como MDCA+NAR (**Fig. 10A**) reduziram drasticamente os teores de ácido ferúlico indicando menor recalcitrância da parede celular. Estes resultados estão em concordância com a premissa de que há uma correlação entre a redução do conteúdo de ácido ferúlico esterificado e o aumento da digestibilidade da parede celular (Oliveira *et al.*, 2015). No que tange ao ácido *p*-cumárico, os resultados revelam que somente PROTO, PROTO+NAR e PDCA aumentaram os seus teores (**Fig. 10A**). De modo contrário, naringenina, PIP, PIP+NAR e, uma vez mais, MDCA e MDCA+NAR reduziram os teores de ácido *p*-cumárico contribuindo, de certa maneira, com uma possível redução da recalcitrância da parede celular.

Efeitos de naringenina e inibidores enzimáticos na digestibilidade da parede celular. A digestibilidade enzimática das raízes – expressa como os teores de açúcares redutores liberados – quando as plântulas de milho foram submetidas à ação de naringenina, inibidores enzimáticos e suas associações com naringenina revelaram significâncias em comparação com o experimento controle (**Fig. 11**). Nas condições em que as raízes não foram submetidas a qualquer pré-tratamento, e após 6 h de digestão enzimática (**Fig. 11A**), os dados mostraram que os inibidores, exceto PIP, reduziram a digestibilidade, ou seja, 21% (NAR), 10% (PIP+NAR), 20% (MDCA), 30% (MDCA+NAR), 10% (PROTO), 17% (PROTO+NAR), 13% (PDCA) e 39% (PDCA+NAR). É relevante notar que, em comparação com os inibidores aplicados isoladamente, as associações

com naringenina causaram maiores reduções na digestibilidade, indicando que o flavonoide tem maior efeito neste parâmetro. Após 24 horas de digestão enzimática das amostras (**Fig. 11B**), a digestibilidade foi reduzida em 18% (PIP+NAR), 13% (MDCA), 12% (MDCA+NAR) e 15% (PDCA+NAR).

Subseqüentes pré-tratamentos alcalinos das amostras (Lima *et al.*, 2014) foram efetuados e os resultados revelaram que, após 6 horas de digestão (**Fig. 11C**) e em comparação com o controle, a digestibilidade aumentou 12% (MDCA), 37% (PDCA) e 12% (PDCA+NAR) e foi reduzida em 26% (PROTO+NAR). Resultados similares foram obtidos após 24 horas de digestão enzimática (**Fig. 11D**), ou seja, aumentos de 10% (MDCA), 36% (PDCA) e 11% (PDCA+NAR) e redução de 10% (PROTO+NAR). É interessante destacar que, sem ou com pré-tratamento, a associação PDCA+NAR manteve um aumento da digestibilidade, em comparação com o controle, o que reforça o papel indutor do PDCA. Além disso, o fato marcante observado foi com respeito aos inibidores MDCA (inibe a enzima 4-CL da via de fenilpropanoides; **Fig. 1**) e PDCA (inibe a enzima FNSII da via de tricín; **Fig. 1**). Ambos aumentaram a digestibilidade, com especial destaque para PDCA. No caso do MDCA, resultados obtidos em nosso laboratório indicam que este composto de fato aumenta a digestibilidade da biomassa de milho em condições laboratoriais e de campo (resultados não publicados), embora não tenha sido descrito um definitivo mecanismo de ação. De modo similar, não há uma clara explicação para o aumento da digestibilidade causado pelo PDCA, neste trabalho. Entretanto, tem sido relatado que, sob reações *in vitro* catalisadas por peroxidase, dímeros de tricín são formados com os três monolignóis canônicos da via de fenilpropanoides (Lan *et al.*, 2015). Ainda valendo-se de experimentos *in vitro*, os mesmos autores constataram que tricín é incorporado na estrutura polimérica da lignina. Com base nisto, eles sugerem que tricín não somente se acopla com monolignóis como também atua como sítio iniciador da cadeia polimérica de lignina, em monocotiledôneas. Mais recentemente (Lam *et al.*, 2017), demonstraram que em arroz, um mutante *fnsII* completamente desprovido de tricín mostrou substancial conteúdo reduzido de lignina com menores teores dos monômeros guaiacil (G) e siringil (S). Estes resultados indicam que a enzima FNSII é essencial para a deposição de lignina ligada a tricín na parede celular de monocotiledôneas. Outro aspecto que confirma o importante papel da FNSII é que a deficiência de tricín é parcialmente compensada pela incorporação de naringenina na estrutura da lignina seguido por aumentada digestibilidade da parede celular.

4. Conclusões

Diante das várias informações extraídas dos experimentos realizados um sumário é mostrado (Dados Suplementares; **Tabela S1**). De um modo geral, e levando em conta as condições

estabelecidas neste trabalho no que concerne ao tecido analisado (raiz de milho), concentrações dos compostos aplicados e o tempo de exposição das plântulas (24 horas), constata-se que: **1)** naringenina reduz o crescimento das raízes; **2)** aumenta o conteúdo de lignina, altera a sua composição monomérica e **3)** induz a formação de tricín nas raízes. Aplicando-se inibidores enzimáticos da via de fenilpropanoides (PIP, MDCA, PROTO) e inibidor da via de tricín (PDCA) constata-se que: **4)** todos os inibidores da via de fenilpropanoides afetam o crescimento das raízes; exceto PDCA; **5)** todos os inibidores reduzem a produção de lignina afetando a composição monomérica; enquanto MDCA afeta negativamente, o PDCA não causa efeitos significativos sobre a composição monomérica; **6)** MDCA e PDCA causam efeitos contrários sobre os teores dos ácidos ferúlico e *p*-cumárico esterificados à parede celular e, **7)** o pré-tratamento alcalino da biomassa é necessário para distinguir os efeitos positivos do MDCA e do PDCA, dos demais inibidores, sobre a digestibilidade enzimática. No conjunto os resultados fornecem pistas interessantes quanto ao papel de naringenina nas duas vias metabólicas; como inibidor da via de fenilpropanoides e ativador da biossíntese de tricín, o qual é considerado um nucleador da lignificação em monocotiledôneas. Uma destas pistas está relacionada a um suposto papel do PDCA inibidor da FNSII na via de produção de tricín – no processo de produção de etanol a partir de milho e outras monocotiledôneas.

Referências

- Ana R.F.D.C.; de Ascensão, A.R.; Dubery, I.A. 2003. Soluble and wall-bound phenolics and phenolic polymers in *Musa acuminata* roots exposed to elicitors from *Fusarium axysporum* f.sp *cubense*. *Phytochemistry*, 63: 679-686.
- Barros J.; Serk H.; Granlund. I.; Pesquet, E. 2015. The cell biology of lignification in higher plants. *Annals of Botany*, 115: 1053–1074.
- Bido, G.S.; Lourdes, M.; Marchiosi, R.; Ferrarese-Filho, O. 2010. Naringenin inhibits the growth and stimulates the lignification of soybean root. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 53(3): 533-542.
- Boerjan, W.; Ralph, J.; Baucher, M. 2003. Lignin Biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology*, 54: 519-546.
- Britsch, L. 1990. Purification and characterization of flavone synthase I, a 2-oxoglutarate-dependent desaturase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 282: 152-160.
- Brown, D.E.; Rashotte, A.M.; Murphy, A.S.; Normanly, J.; Tague, B.W.; Peer, W.A.; Taiz, L.; Munday, G.K. 2001. Flavonoids act as negative regulators of auxin transport in vivo in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 126: 524–535.
- Buchanan, B.; Gruissem, W.; Jones, R. 2015. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*, Wiley, Hoboken N.J., Second edition.
- Carvalho, W.; Canilha, L.; Ferraz, A.; Milagres, A.M.F. 2009. Uma visão sobre a estrutura, composição e biodegradação da madeira. *Química Nova*, 32(8): 2191-2195.
- Chakraborty M.; Karun A.; Mitra A. 2009. Accumulation of phenylpropanoid derivatives in chitosan-induced cell suspension culture of *Cocos nucifera*. *Journal of Plant Physiology*, 166: 63–71.

- Chen, W.; Yun, M.S.; Deng, F.; Yogo, Y. 2004. Effects of root-applied naringenin and chalcone on the growth of annual plants. *Weed Biology and Management*, 4: 118-122.
- Christensen, J.H.; Bauw, G.; Welinder, K.G.; Van Montagu, M.; Boerjan, W. 1998. Purification and characterization of peroxidases correlated with lignification in poplar xylem. *Plant Physiology*, 118:125–135.
- Colpas, F.T.; Ono, E.O.; Rodrigues, J.D.; Passos, J.R.S. 2003. Effects of some phenolic compounds on soybean seed germination and on seed-borne fungi. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 46: 155-161.
- del Rio, J.C.; Rencoret, J.; Prinsen, P.; Martínez, A.T.; Ralph, J.; Gutiérrez, A. 2012. Structural characterization of wheat straw lignin as revealed by analytical pyrolysis, 2D-NMR, and reductive cleavage methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60: 5922-5935.
- Delabona, P.S.; Cota, J.; Hoffmam, Z.B.; Paixão, D.A.; Farinas, C.S.; Cairo, J.P.; Lima, D.J.; Squina, F.M.; Ruller, R.; Pradella, J.G. 2013. Understanding the cellulolytic system of *Trichoderma harzianum* P49P11 and enhancing saccharification of pretreated sugarcane bagasse by supplementation with pectinase and α -L-arabinofuranosidase. *Bioresource Technology*, 131: 500–507.
- Deng, F.; Aoki, M.; Yogo, Y. 1998. Effect of naringenin on the monolignol biosynthesis and the growth of annual plant. *J. Weed Science and Technology*, 43 (Suppl.): 292–293 (in Japanese).
- Deng, F.; Aoki, M.; Yogo, Y. 2004. Effect of naringenin on the growth and lignin biosynthesis of gramineous plants. *Weed Biology and Management*, 4: 49-55.
- Dubois, M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K.; Rebers, P.A.; Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Analytic Chemistry*, 28(3): 350-356.
- Erlund, I. 2004. Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutrition Research*, 24: 851–874.
- Eudes, A.; Pereira, J.H.; Yogiswara, S.; Wang, G.; Benites, V.T.; Baidoo, E.E.K.; Lee, T.S.; Adams, P.D.; Keasling, J.D.; Loque, D. 2016. Exploiting the substrate promiscuity of hydroxycinnamoyl-CoA:shikimate hydroxycinnamoyl transferase to reduce lignin. *Plant and Cell Physiology*, 57: 568–579.
- Ferrarese, M.L.L.; Ferrarese-Filho, O.; Rodrigues, J.D. 2000. Ferulic acid uptake by soybean root in nutrient culture. *Acta Physiologiae Plantarum*, 22: 121-124.
- Ferrarese, M.L.L.; Zottis, A.; Ferrarese-Filho, O. 2002. Protein-free lignin quantification in soybean (*Glycine max*) roots. *Biologia*, 57: 541-543.
- Freudenberg, K. 1956. Beiträge zur Erforschung des Lignins. *Angewandte Chemie*, 68: 508-512.
- Gonçalves, T.A.; Damásio, A.R.L.; Segato, F.; Alvarez, T.M.; Bragatto, J.; Brenelli, L.B.; Citadini, A.P.S.; Murakami, M.T.; Ruller, R.; Leme, A.F.P.; Prade, R.A.; Squina, F.M. 2012. Functional characterization and synergic action of fungal xylanase and arabinofuranosidase for production of xylooligosaccharides. *Bioresource Technology*, 119: 293–299.
- Harborne, J. B. 1967. *Comparative biochemistry of the flavonoids*, Academic Press, London, New York.
- Harris, P.; Trethewey, J.A.K. 2010. The distribution of ester-linked ferulic acid in the cell walls of angiosperms. *Phytochemistry Reviews*, 9:19-33.
- Herrig, V.; Ferrarese, M.L.L.; Suzuki, L.S.; Rodrigues, J.D.; Ferrarese-Filho, O. 2002. Peroxidase and phenylalanine ammonia-lyase activities, phenolic acid contents, and allelochemicals-inhibited root growth of soybean. *Biological Research*, 35: 59-66.
- Himmel, G.W.; Ding, S.-Y.; Johnson, D.K.; Adney, W.S.; Nimlos, M.R.; J.W. Brady, Foust, T.D. 2007. *Biomass Recalcitrance: Engineering Plants and Enzymes for Biofuels Production*. *Science* 315: 804.
- Khan, M.K. 2014. A comprehensive review on flavanones, the major citrus polyphenols. *Journal of Food Composition and Analysis*, 33: 85-104.

- Lam, P.Y.; Liu, H.; Clive, L. 2015. Completion of Tricin Biosynthesis Pathway in Rice: Cytochrome P450 75B4 Is a Unique Chrysoeriol 59-Hydroxylase. *Plant Physiology*, 168: 1527–1536.
- Lam, P.Y.; Tobimatsu, Y.; Takeda, Y.; Suzuki, S.; Yamamura, M.; Umezawa, T.; Lo, C. 2017. Disrupting flavone synthase II alters lignin and improves biomass digestibility. *Plant Physiology*, 174: 972–985.
- Lan, W.; Lu, F.; Regner, M.; Zhu, Y.; Rencoret, J.; Ralph, S.A.; Zakai, U.I.; Morreel, K.; Boerjan, W.; Ralph, J. 2015. Tricin, a Flavonoid Monomer in Monocot Lignification. *Plant Physiology*: 167: 1284–1295.
- Lan, W.; Rencoret, J.; Lu, F.; Karlen, S.D.; Smith, B.G.; Harris, P.J.; del Rio, J.C.; Ralph, J. 2016. Tricin-lignins: occurrence and quantitation of tricin in relation to phylogeny. *Plant Journal*, 88, 1046–1057.
- Li, M.; Pu, Y.; Yoo, C.G.; Ragauskas, A.J. 2016. The occurrence of tricin and its derivatives in plants. *Green Chemistry*, 18: 1439–1454.
- Li, M.; Yunqiao, J.P.; Tschaplinski, T.J.; Ragauskas, A.J. 2017. NMR Characterization of Tricin and Its Structurally Similar Flavonoids. *Chemistry Select*, 2: 3557–3561.
- Lima, M.A.; Gomez, L.D.; Steele-King, C.G.; Simister, R.; Bernardinelli, O.D.; Carvalho, M.A.; Rezende, C.A.; Labate, C.A.; de Azevedo, E.R.; Mcqueen-Mason, S.J.; Polikarpov, I. 2014. Evaluating the composition and processing potential of novel sources of Brazilian biomass for sustainable biorenewables production. *Biotechnology for Biofuels*, 7: 1.
- Malavasi, U.C.; Davis, A.S.; Malavasi, M.M. 2016. Lignin in Woody Plants under Water Stress: A Review. *Floresta e Ambiente*, 23: 589–597.
- Miller, G.L. 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3): 426–428.
- Moreira-Vilar, F.C.; Siqueira-Soares, R.C.; Teixeira, A.F.; Oliveira, D.M.; Ferro, A.P.; Rocha, G.J.; Ferrarese, M.L.L.; dos Santos, W.D.; Ferrarese-Filho, O. 2014. The acetyl bromide method is faster, simpler and presents best recovery of lignin in different herbaceous tissues than Klason and thioglycolic acid methods. *PLoS one*, 9(10), e110000.
- Morrison, I.M. 1972. A semi-micro method for the determination of lignin and its use in predicting the digestibility of forage crops. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 23: 455–463.
- Oliveira, D.M.; Teixeira, A.F.; Mota, T.R.; Salvador, V.H.; Moreira-Vilar, F.; Molinari, H.B.C.; Mitchell, R.A.C.; Marchiosi, R.; Ferrarese-Filho, O.; dos Santos, W.D. 2015. Ferulic acid: a key component in grass lignocellulose recalcitrance to hydrolysis. *Plant Biotechnology Journal*, 13: 1224–1232.
- Ohra-ahoa, T.F.J.B.; Gomes, J.L.; Colodette, T.T. 2013. S/G ratio and lignin structure among Eucalyptus hybrids determined by Py-GC/MS and nitrobenzene oxidation. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 101: 166–171.
- Ragauskas, A.J.; Williams, C.K.; Davison, B.H.; Britovsek, G.; Cairney, J.; Eckert, C.A.; Frederick, J.; Hallett, J.P.; Leak, D.; Liotta, C.L.; Mielenz, J.R.; Murphy, R.; Templer, R.; Tschaplinski, T. 2006. The Path Forward for Biofuels and Biomaterials. *Science*, 311: 484.
- Ralph, J. 2010. Hydroxycinnamates in lignification. *Phytochemistry Reviews*, 9: 65–83.
- Ranjeva, R.; Boudet, A.M.; Faggion, R. 1976. Phenolic metabolism in petunia tissues. IV. Properties of *p*-coumarate CoA ligase isozymes. *Biochimie*, 58: 1255–1262.
- Rencoret, J.; Prinsen, P.; Gutierrez, A.; Martinez, A.T.; del Rio, J.C. 2015. Isolation and structural characterization of the milled wood lignin, dioxane lignin, and cellulolytic lignin preparations from brewer's spent grain. *Agriculture and Food Chemistry*, 63: 603–613.
- Salvador, V.H.; Lima, R.B.; dos Santos, W.D.; Soares, A.R.; Böhm, P.A.F.; Marchiosi, R.; Ferrarese, M.L.L.; Ferrarese-Filho, O. 2013. Cinnamic acid increases lignin production and inhibits soybean root growth. *PLoS ONE* 8: e69105.

- Sánchez, M.; Peña, M.J.; Revilla, G.; Zarra, I. 1996. Changes in dehydrodiferulic acids and peroxidase activity against ferulic acid associated with cell walls during growth of *Pinus pinaster* hypocotyl. *Plant Physiology*, 111: 941-946.
- Santos, W.D.; Ferrarese, M.L.L.; Finger, A.; Teixeira, A.C.N.; Ferrarese-Filho, O. 2004. Lignification and related enzymes in Glycine max root growth inhibition by ferulic acid. *Journal of Chemical Ecology*, 30: 1199-1208.
- Schijlen, E.G.; de Vos, C.H.R.; van Tunen, A.J. et al. 2004. Modification of flavonoid biosynthesis in crop plants. *Phytochemistry*, 65:2631–2648.
- Schoch, G.A.; Nikov, G.N.; AlWorth, W.L.; Werckreichhart, D. 2002. Chemical inactivation of the cinnamate 4-hydroxylase allows for the accumulation of salicylic acid in elicited cells. *Plant Physiology*, 130:1022–1031.
- Steenackers, W.; Cesarino, I.; Klíma, P.; Quareshy, M.; Vanholme, R.; Corneillie, S.; Kumpf, R.P.; Wouwer, D.V.; Goeminne, K.L.G.; Zazímalová, O.N.E.; Boerjan, R.N.; Vanholme, B. 2016. The Allelochemical MDCA Inhibits Lignification and Affects Auxin Homeostasis. *Plant Physiology*, 172: 874–888.
- Taiz, L.; Zeiger, E. 2013. *Fisiologia Vegetal* 5^o Edição. Porto Alegre; Artmed.
- Umezawa, T. 2018. Lignin modification in planta for valorization. *Phytochemistry Reviews*, 17(6). doi: 10.1007/s11101-017-9545-x.
- Vanholme, R.; Morreel, K.; Ralph, J.; Boerjan, W. 2008. Lignin engineering. *Current Opinion in Plant Biology*, 151: 278 –285.
- Vanholme, R.; Demedts, B.; Morreel, K.; Ralph, J.; Boerjan, W. 2010. Lignin Biosynthesis and Structure. *Plant Physiology*, 153: 895– 905.
- Voo, K.S.; Whetten, R.W.; O'Malley, D.M.; Sederoff, R.R. 1995. 4-Coumarate: coenzyme A ligase from loblolly pine xylem. Isolation, Characterization, and complementary DNA cloning. *Plant Physiology*, 108: 85–97.
- Wagner, A.; Tobimatsu, Y.; Phillips, L.; Flint, H.; Torr, K.; Donaldson, L.; Pears, L.; Ralph, J. 2011. CCoAOMT suppression modifies lignin composition in *Pinus radiata*. *Plant Journal*, 67: 119–129.
- Winkel-Shirley, B. 2001. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology and biotechnology. *Plant Physiology*, 126:485–493.
- Winkel, B.S. 2006. The biosynthesis of flavonoids. In: Grotewold E (ed) *The science of flavonoids*. Springer Science, New York, pp 71–96.
- Wollenweber, E.; Dorr, M. 2008. Occurrence and distribution of the flavone tricetin and its methyl derivatives as free aglycones. *Natural Products Communication*, 3:1293–1298.
- Yelle, D.J.; Kaparaju, P.; Hunt, C.G.; Hirth, K., Kim, H., Ralph, J., Felby, C. 2013. Two-dimensional NMR evidence for cleavage of lignin and xylan substituents in wheat straw through hydrothermal pretreatment and enzymatic hydrolysis. *Bioenergy Research*, 6: 211-221.
- Zanardo, D.I.L.; Lima, R.B.; Ferrarese, M.L.L.; Bubna, G.A.; Ferrarese-Filho, O. 2009. Soybean root growth inhibition and lignification induced by *p*-coumaric acid. *Environmental and Experimental Botany*, 66: 25-30.
- Zhang, L.H., Fan, C.L., Ye, W.C. et al. 2008. Study on flavonoids and phenolic acids from the herb of *Lygodium japonicum*. *Zhong Yao Cai*, 31:22422–22426.
- Zeng, J.J.; Helms, G.L.; Gao, X.; Chen, S.L. 2013. Quantification of wheat straw lignin structure by comprehensive NMR analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61: 10848-10857.

Fig. 1. Via de fenilpropanoides e de tricín. PAL, fenilalanina amônia-liase; C4H, cinamato 4-hidroxilase; 4CL, *p*-cumarato:CoAligase; HCT, *p*-hidroxicinamoil-CoA:chiquimato/quinato-*p*-hidroxicinamoil transferase; C3H, *p*-cumaroilchiquimato/quinato 3-hidroxilase; CSE, cafeoilchiquimatoesterase; CCOMT, cafeoil-CoA 3-*O*-metiltransferase; CCR, cinamoil-CoA redutase; CAD, cinamoil álcool desidrogenase; F5H, ferulato 5-hidroxilase; COMT, cafeato 3-*O*-metiltransferase; CALDH, coniferaldeídodesidrogenase; POD, peroxidase; LAC, lacase; CHS, chalcona sintase; CHI, chalconaisomerase; FNSII, flavona sintase; F3H, naringenina 3-dioxigenase; OMT, *O*-metiltransferase. H, *p*-hidroxifenil; G, guaiacil; S, siringil.

Fig.2. Depleção da naringenina 0,1 mM na solução nutritiva. Valores médios (n = 4) ± erro padrão da média seguidos por * são significativamente diferentes do controle de acordo com o teste de Dunnett (p ≤ 0,05).

Fig.3. Efeitos da naringenina no comprimento (A), biomassa fresca (B) e biomassa seca (C) das raízes de milho. Valores médios (n = 4) ± erro padrão da média seguidos por * são significativamente diferentes do controle de acordo com o teste de Dunnett (p ≤ 0,05).

Fig.4. Efeitos da naringenina nos teores de lignina de raízes de milho após 24 h. Valores médios (n = 5) ± erro padrão da média seguidos por * são significativamente diferentes do controle de acordo com o teste de Dunnett (p ≤ 0,05).

Fig. 5. Efeitos de naringenina sobre a composição monomérica de lignina de milho. A) monômero H; B) monômero G; C) monômero S; D) soma H+G+S; E) proporção H:G:S; F) razão S/G. Valores médios ± erro padrão da média (n = 5), seguidos por * são significativamente diferentes de acordo com o teste de Scott-Knott (p ≤ 0,05).

Fig. 6. Efeitos de naringenina e de inibidores da via de fenilpropanoides nos teores de tricín de raízes de milho após 24 h. A) Naringenina 0,1 a 0,3 mM. B) Naringenina (NAR; 0,2 mM); PIP 0,1 mM; MDCA 2,0 mM; PROTO 0,5 mM; PDCA 0,05 mM e suas associações com NAR 0,2 mM. Valores médios ± erro padrão da média (n = 3), seguidos por * são significativamente diferentes de acordo com o teste de Scott-Knott (p ≤ 0,05). nd = não detectado.

Fig. 7. Efeitos de naringenina (NAR 0,2 mM) e de inibidores da via de fenilpropanoides (PIP 0,1 mM; MDCA 2,0 mM; PROTO 0,5 mM; PDCA 0,05 mM) no comprimento (A), biomassa fresca

(B) e biomassa seca (C) das raízes de milho. Valores médios ($n = 4$) \pm erro padrão da média seguidos por * são significativamente diferentes do controle de acordo com o teste de Dunnett ($p \leq 0,05$).

Fig. 8. Efeitos de naringenina (NAR 0,2 mM) e de inibidores da via de fenilpropanoides (PIP 0,1 mM; MDCA 2,0 mM; PROTO 0,5 mM; PDCA 0,05 mM) isolados e associados com NAR 0,2 mM sobre os teores de lignina de raízes de milho. Valores médios \pm erro padrão da média ($n = 5$), seguidos por * são significativamente diferentes de acordo com o teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

Fig. 9. Efeitos de naringenina (NAR 0,2 mM) e de inibidores da via de fenilpropanoides (PIP 0,1 mM; MDCA 2,0 mM; PROTO 0,5 mM; PDCA 0,05 mM) isolados e associados com NAR 0,2 mM sobre a composição monomérica de lignina de milho. **A)** monômero H; **B)** monômero G; **C)** monômero S; **D)** soma H+G+S; **E)** proporção H:G:S; **F)** razão S/G. Valores médios \pm erro padrão da média ($n = 5$), seguidos por * são significativamente diferentes de acordo com o teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

Fig. 10. Efeitos de naringenina (NAR 0,2 mM) e de inibidores da via de fenilpropanoides (PIP 0,1 mM; MDCA 2,0 mM; PROTO 0,5 mM; PDCA 0,05 mM) isolados e associados com NAR 0,2 mM nos teores dos ácidos ferúlico (**A**) e *p*-cumárico (**B**) esterificados à parede celular de raízes de milho após 24 h. Valores médios \pm erro padrão da média (ácido ferúlico, $n = 8$; ácido *p*-cumárico, $n = 5$), seguidos por diferentes letras são significativamente diferentes de acordo com o teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

Fig. 11. Efeitos de naringenina (NAR 0,2 mM) e de inibidores da via de fenilpropanoides (PIP 0,1 mM; MDCA 2,0 mM; PROTO 0,5 mM; PDCA 0,05 mM) isolados e associados com NAR 0,2 mM na digestibilidade de raízes após 6 h (**A**) e 24 h de raízes de milho (**B**) e após pré-tratamento alcalino após 6h (**C**) e 24h (**D**). Valores médios ($n = 4$) \pm erro padrão da média seguidos por diferentes letras são significativamente diferentes de acordo com o teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

Figure 1

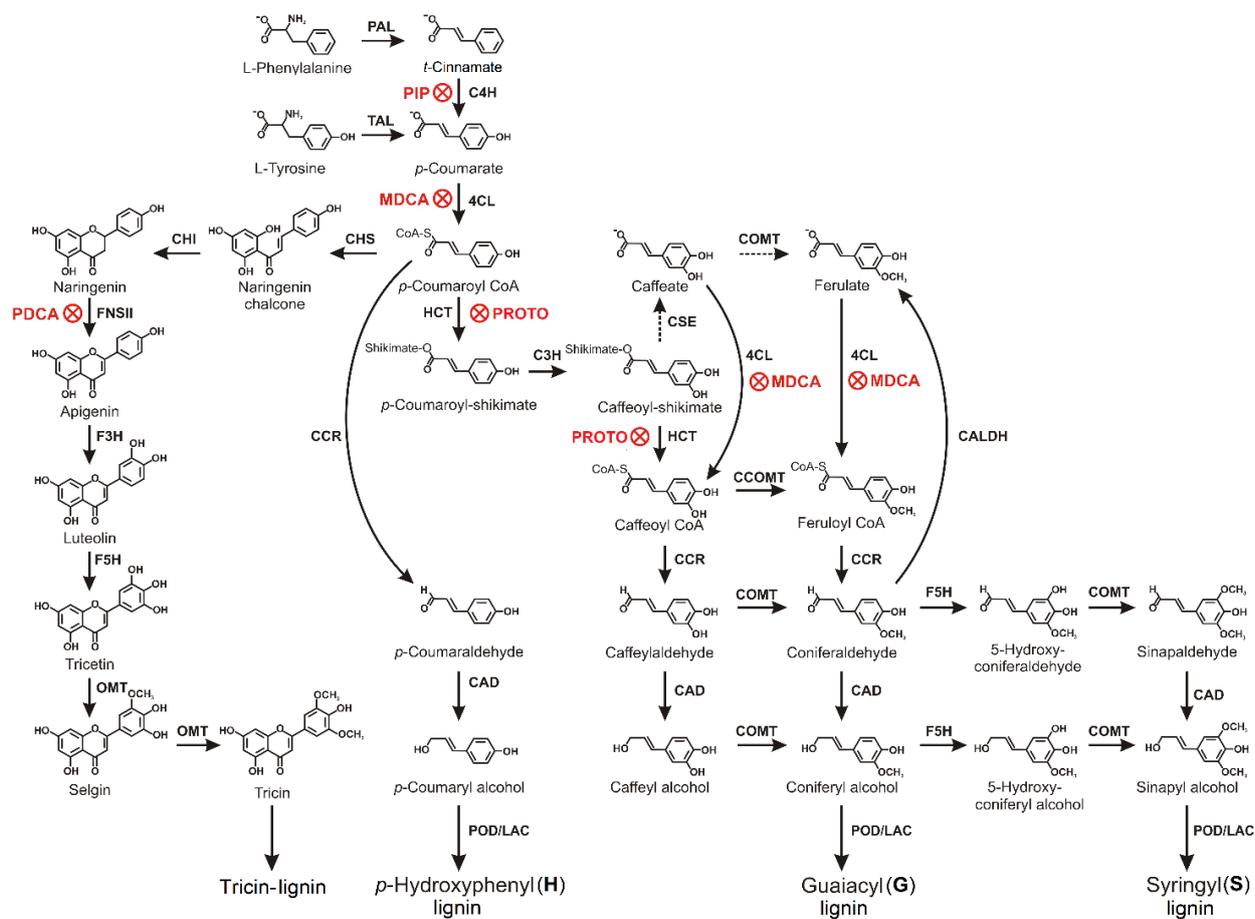


Figura 2

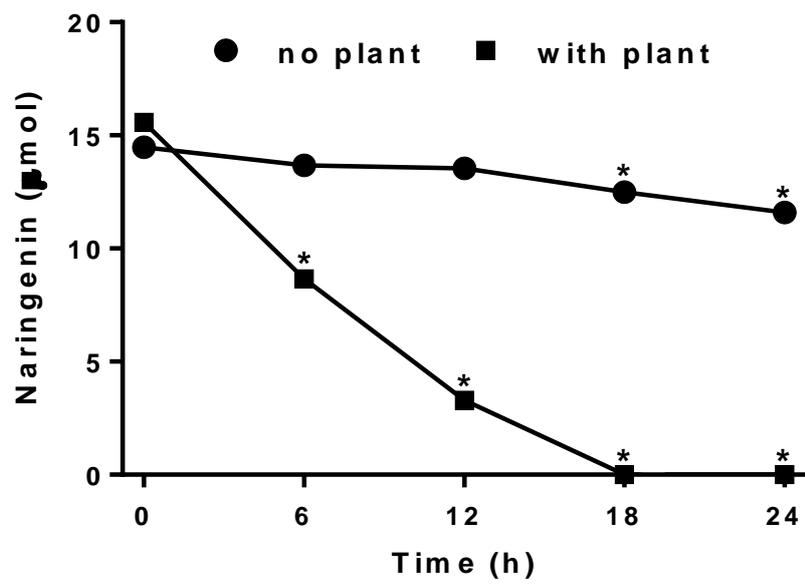


Figura 3

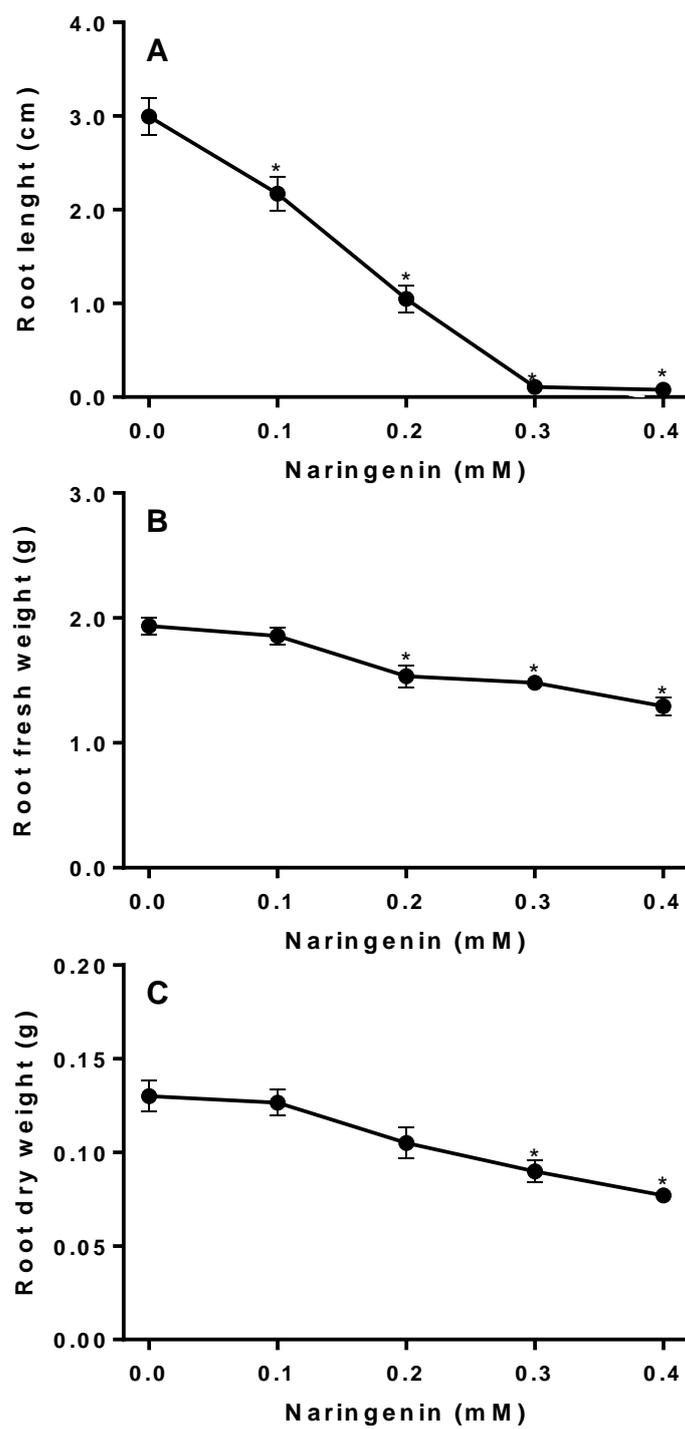


Figura 4

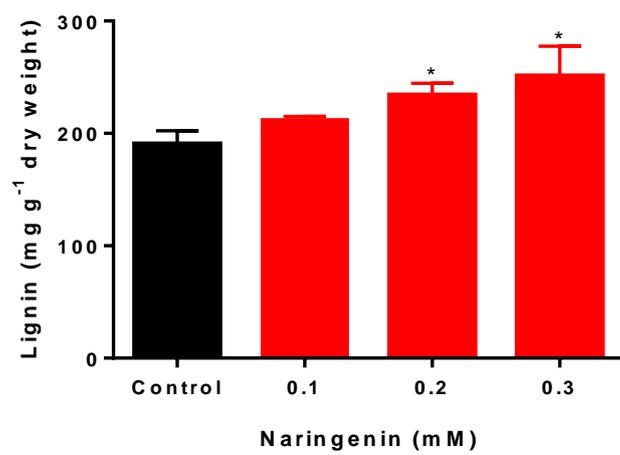


Figura 5

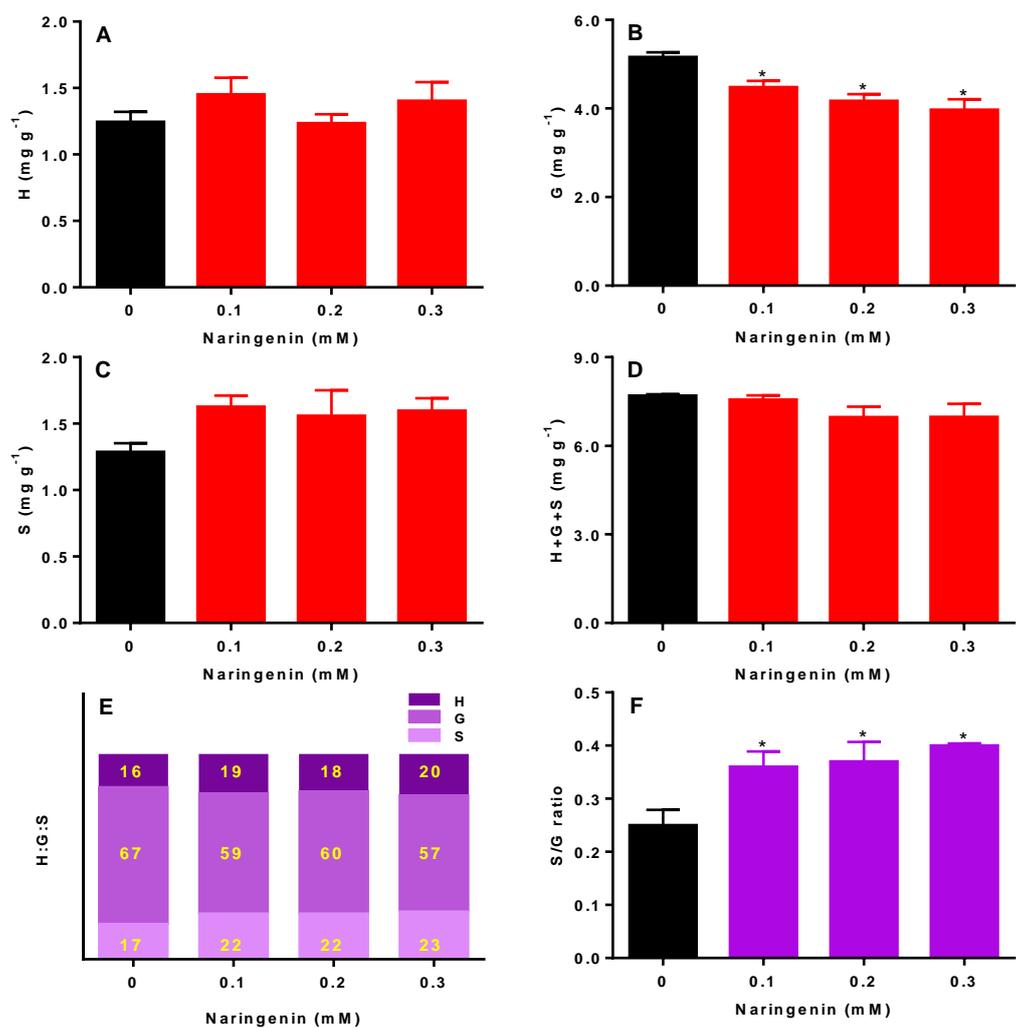


Figura 6

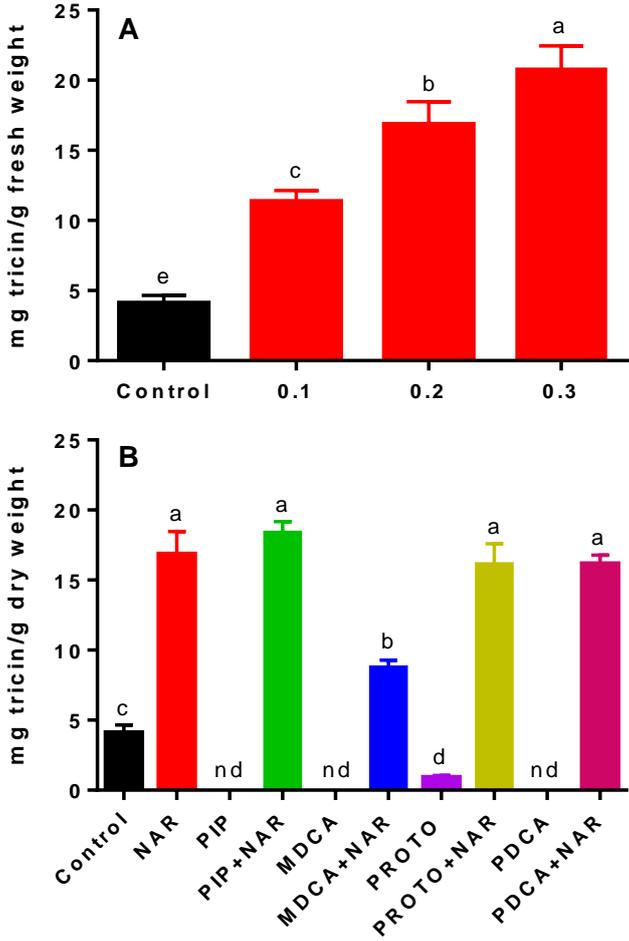


Figura7

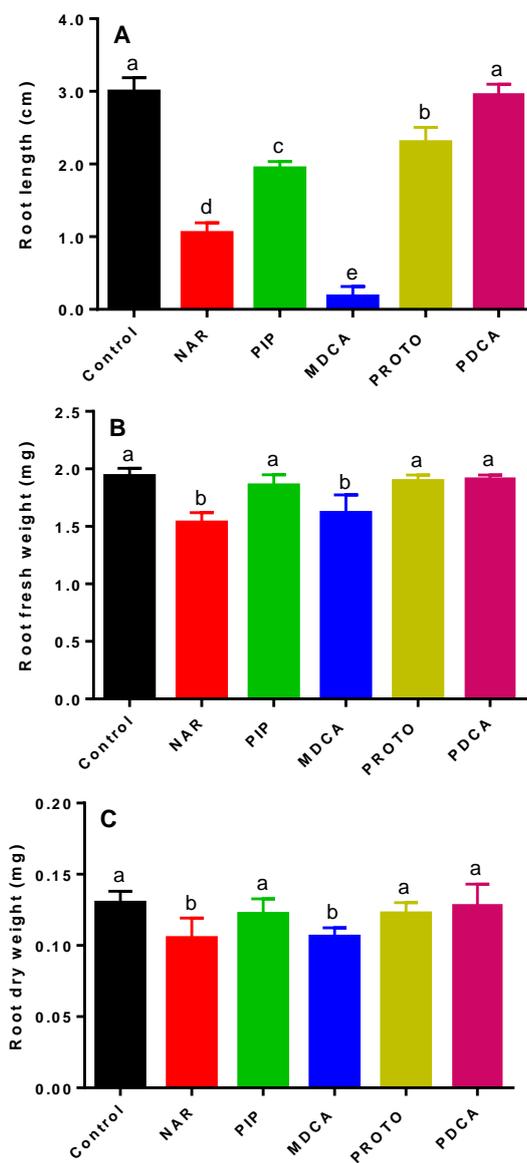


Figura 8

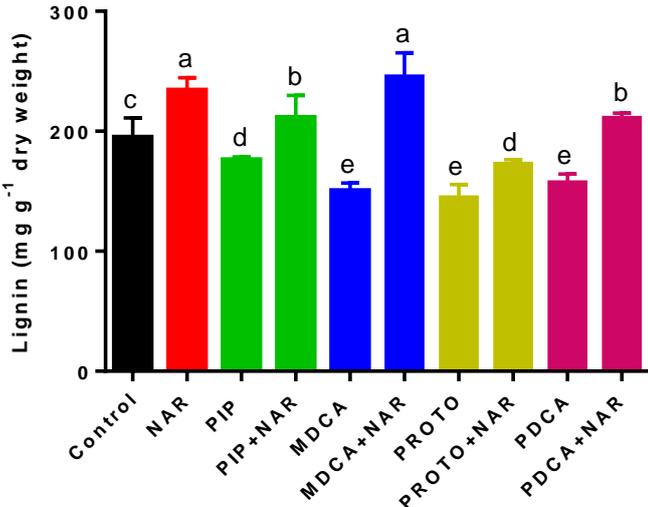


Figura 9

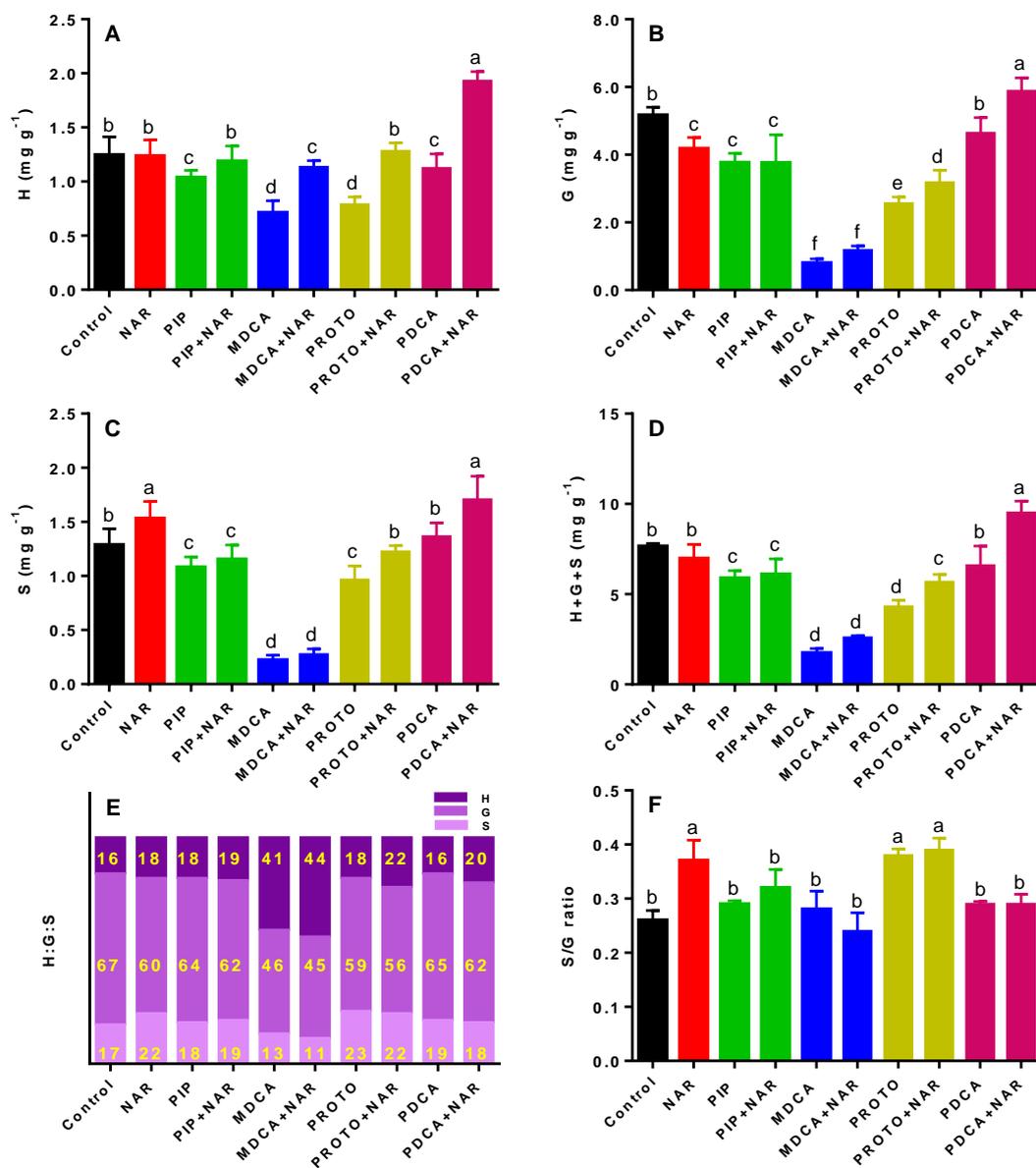


Figura 10

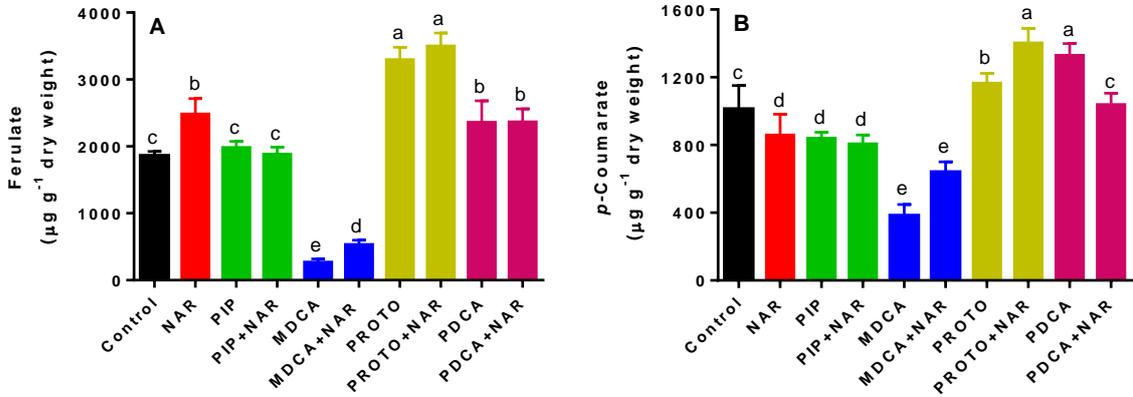
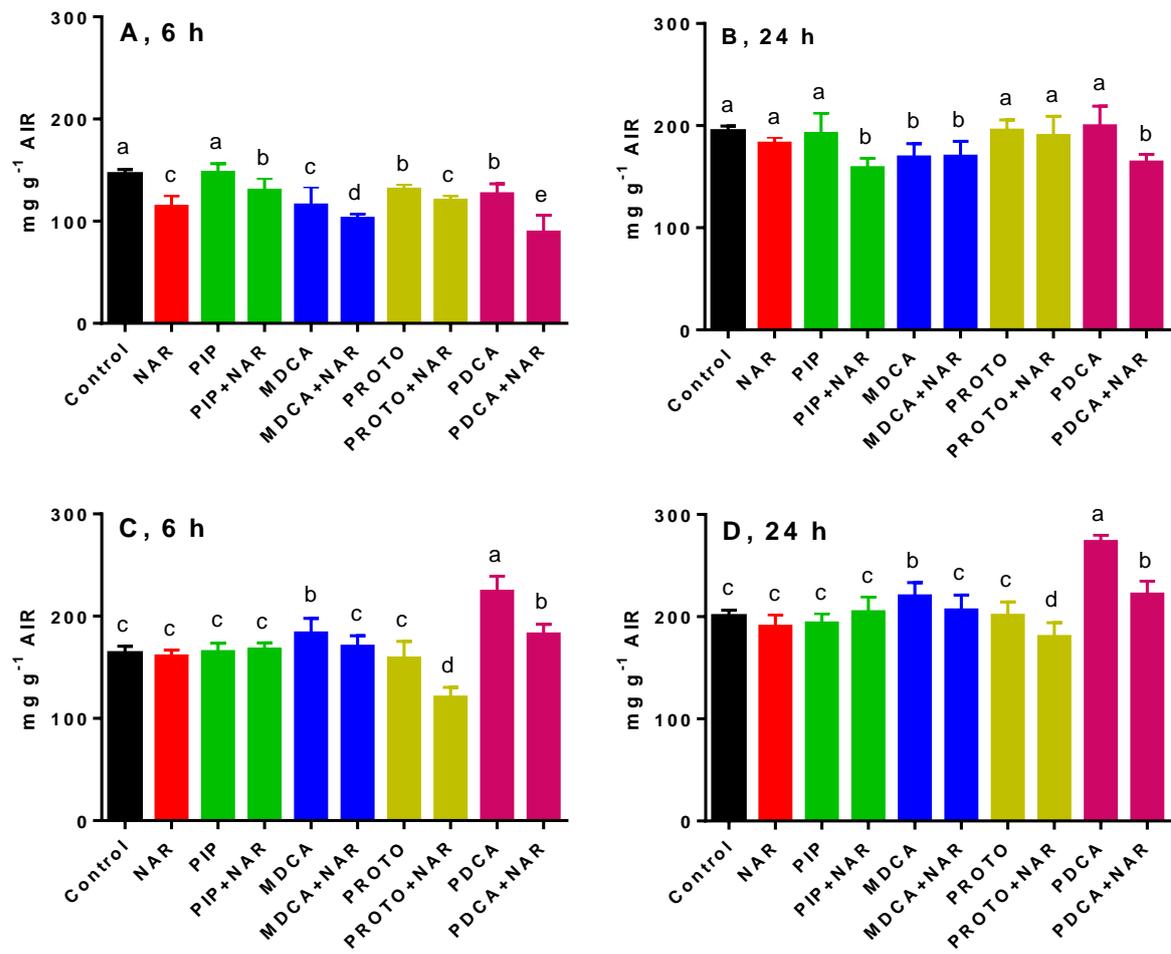


Figura 11



DADOS SUPLEMENTARES

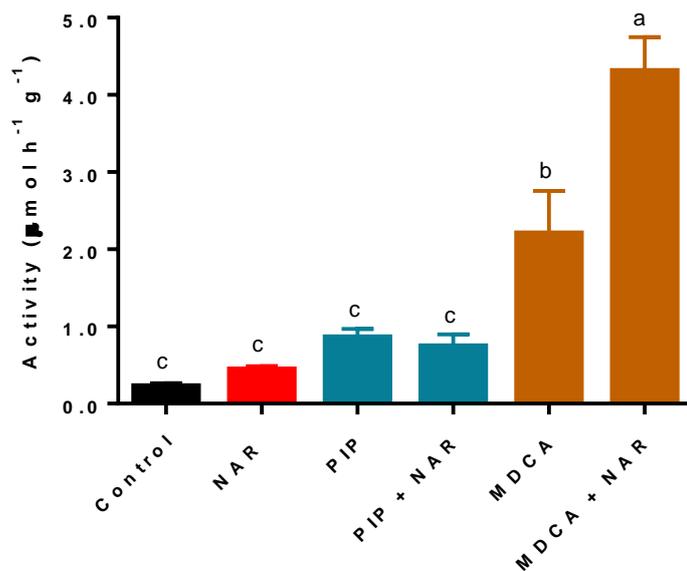


Fig. S1. Efeitos de naringenina (NAR 0,2 mM) e de inibidores da via de fenilpropanoides (PIP 0,1 mM e MDCA 2,0 mM) sobre a atividade da 4-cumarato:CoA ligase (4-CL) de raízes de milho, após 24 h. Valores médios \pm erro padrão da média (n = 4), seguidos por * são significativamente diferentes de acordo com o teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

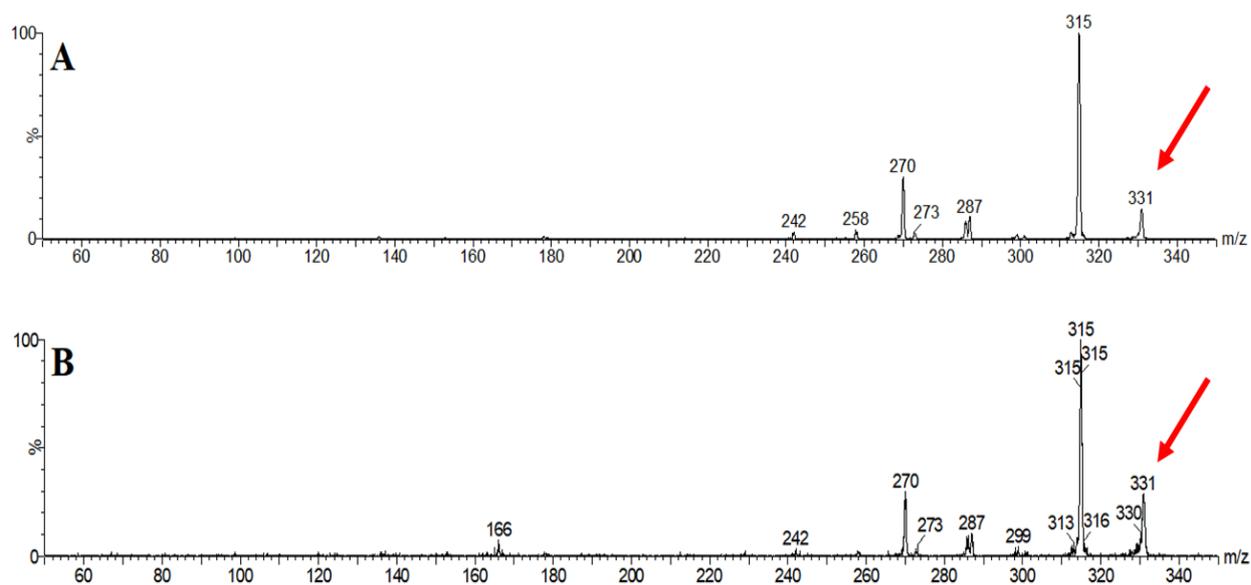


Fig.S2.Espectrogramas de massas de um padrão de tricín (**A**) e de uma amostra de raízes de milho (**B**). As figuras representam os espectros de fragmentações do íon molecular 331 referentes ao padrão (**A**) e ao tricín presente na amostra (**B**) de raízes. As setas vermelhas indicam o íon molecular.

Tabela S1. Sumário dos resultados obtidos neste trabalho.

Experimento	CR	BF	BS	Lignina	H	G	S	H+G+S	H:G:S			S/G	4-CL	Tricin	FER	<i>p</i> -CA	SEM 6 h	SEM 24 h	PRE 6 h	PRE 24 h
NAR	Red	Red	Red	Green	Yellow	Red	Green	Yellow	18	60	22	Green	Yellow	Green	Green	Red	Red	Yellow	Yellow	Yellow
PIP	Red	Yellow	Yellow	Red	Red	Red	Red	Red	18	64	18	Yellow	Yellow	Red	Yellow	Red	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow
PIP + NAR	White	White	White	Green	Yellow	Red	Red	Red	19	62	19	Yellow	Yellow	Green	Yellow	Red	Red	Red	Yellow	Yellow
MDCA	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	41	46	13	Yellow	Green	Red	Red	Red	Red	Red	Green	Green
MDCA + NAR	White	White	White	Green	Red	Red	Red	Red	44	45	11	Yellow	Green	Green	Red	Red	Red	Red	Yellow	Yellow
PROTO	Red	Yellow	Yellow	Red	Red	Red	Red	Red	18	59	23	Green	White	Red	Green	Green	Red	Yellow	Yellow	Yellow
PROTO + NAR	White	White	White	Red	Yellow	Red	Yellow	Red	22	56	22	Green	White	Green	Green	Green	Red	Yellow	Red	Red
PDCA	Yellow	Yellow	Yellow	Red	Red	Yellow	Yellow	Yellow	16	65	19	Yellow	White	Red	Green	Green	Red	Yellow	Green	Green
PDCA + NAR	White	White	White	Green	Green	Green	Green	Green	20	62	18	Yellow	White	Green	Green	Yellow	Red	Red	Green	Green

CR: comprimento da raiz

BF: biomassa fresca

BS: biomassa seca

4-CL: 4-cumarato-CoA ligase

FER: ácido ferúlico esterificado

p-CA: ácido *p*-cumárico esterificado

SEM: sem pré-tratamento

PRE: pré-tratamento alcalino

 AUMENTO

 REDUÇÃO

 SEM EFEITO