



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA/FITOTECNIA**

**DOMINGOS FERREIRA DE MÉLO NETO**

**ANÁLISE METABOLÔMICA APLICADA A DOIS GENÓTIPOS DE  
PINHÃO-MANSO (*Jatropha curcas* L.) COM NÍVEIS CONTRASTANTES DE  
ÉSTERES DE FORBOL**

**FORTALEZA**

**2023**

DOMINGOS FERREIRA DE MÉLO NETO

ANÁLISE METABOLÔMICA APLICADA A DOIS GENÓTIPOS DE PINHÃO-MANSO  
(*Jatropha curcas* L.) COM NÍVEIS CONTRASTANTES DE ÉSTERES DE FORBOL

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Agronomia/Fitotecnia. Área de concentração: Bioquímica, Fisiologia e Biotecnologia Vegetal.

Orientador: Francisco A. P. Campos  
Coorientador: Fábio C. S. Nogueira

FORTALEZA

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

M485a Mélo Neto, Domingos Ferreira de.  
Análise Metabólica Aplicada a Dois Genótipos de Pinhão-Manso (*Jatropha curcas* L.) com Níveis Contrastantes de Ésteres de Forbol / Domingos Ferreira de Mélo Neto. – 2023.  
152 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Fitotecnia), Fortaleza, 2023.

Orientação: Prof. Dr. Francisco de Assis de Paiva Campos.

Coorientação: Prof. Dr. Fábio César Sousa Nogueira.

1. Ésteres de forbol. 2. Metabólica de plantas. 3. Espectrometria de massas. 4. Terpenóides. 5. Oxilipinas. I. Título.

CDD 630

---

DOMINGOS FERREIRA DE MÉLO NETO

ANÁLISE METABOLÔMICA APLICADA A DOIS GENÓTIPOS DE PINHÃO-MANSO  
(*Jatropha curcas* L.) COM NÍVEIS CONTRASTANTES DE ÉSTERES DE FORBOL

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Agronomia/Fitotecnia. Área de concentração: Bioquímica, Fisiologia e Biotecnologia Vegetal.

Aprovada em: 15/03/2023

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Francisco A. P. Campos (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Fábio C. S. Nogueira (Coorientador)  
Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

---

Prof. Gilberto B. Domont  
Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

---

Dr. Rafael G. da Costa  
Boston Children's Hospital-Harvard Medical School

---

Prof. Hector H. F. Koolen  
Universidade do Estado do Amazonas (UEA)

*À minha mãe Vanaldi Ferreira, dedico!*

## AGRADECIMENTOS

**Ao Prof. Chico Campos** pela proposição dos experimentos, confiando a mim essa pesquisa que foi a primeira análise metabolômica realizada no nosso laboratório. Agradeço também pela supervisão com rigor em todas as etapas e revisão detalhada dessa tese. Esses 6,5 anos sob sua orientação, entre o Mestrado e o Doutorado, foram de muito aprendizado, especialmente pelos seus exemplos de dedicação ao trabalho.

**Aos meus amigos do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas**, tanto os mais antigos, Roberto, Emanoella (Manu), Moab, Fabiano, Raquel, Magda e João, que tão bem me receberam quando cheguei para fazer o Mestrado em 2016 e me deram grande ajuda no aprendizado e treinamento em proteômica de plantas, assim como os atuais, Sheheryar, Lucas, Ingrid e Augusto que na necessidade me ajudaram sem medir esforço, e não menos importante, pela amizade que construímos.

**À Manu** faço um agradecimento especial pela importante contribuição nesse trabalho, relativo a proposição e treinamento no experimento com plantas enxertadas.

**Ao Prof. Fábio Nogueira** que tão bem me recebeu na Unidade Proteômica (UP) e me coorientou tanto no mestrado quanto no doutorado. Além disso, foi responsável direto pelo meu treinamento em cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas, que sem dúvida alguma constitui-se num diferencial importante. Agradeço ainda por suas valiosas considerações, sempre muito lúcidas, à medida que tentávamos extrair o sentido biológico daquele universo dos espectros de massa.

**Ao Prof. Gilberto Domont** também pela recepção amigável na UP e pela oportunidade em realizar esse treinamento, inicialmente em proteômica e agora metabolômica, ambas baseadas em espectrometria de massas. Ressalto ainda os importantes questionamentos sobre esse trabalho e reflexões durante nossas reuniões de grupo, vindos de quem eu considero meu maior exemplo de vida dedicada a ciência, sempre motivado, inspirando a nós que estamos iniciando.

**Aos colegas da UP**, Natália, Yara, Jéssica, Maurício, Patrícia, Gabriel, Prof. Magno, Michele e Luis pela ótima recepção na UP e por todo auxílio durante as etapas de preparo de amostras, aquisição de dados nos sistemas LC-MS/MS, processamento de dados e observações pertinentes nas reuniões em que apresentei resultados parciais, além do clima de cordialidade sempre mantido entre todos no laboratório.

**Ao pessoal do Departamento de Fitotecnia** por liberarem o uso da área experimental no Setor de Agricultura para cultivo das plantas de pinhão-mansão.

À **Profa. Otilia e ao Dr. José Chagas (Chaguinha)** do Laboratório de Fitoquímica de Plantas Medicinais II (LAFIPLAM II), onde foram dados os primeiros passos dessa pesquisa e de quem recebi as primeiras orientações sobre a análise cromatográfica dos ésteres de forbol.

**Ao Prof. Rafael Garret**, à época coordenador do Laboratório de Metabolômica (LabMeta), LADETEC-UFRJ, por suas contribuições no desenho experimental dessa pesquisa e por liberar gentilmente o uso do equipamento Q-Exactive, assim como pelo empréstimo da coluna analítica, além de ter aceitado participar da banca de avaliação dessa tese e fazer expressivas contribuições para melhoria do trabalho.

À **Dra. Aline e a Profa. Marina**, também do LabMeta, por dedicarem tempo a me auxiliar durante a aquisição dos dados de LC-MS/MS.

**Ao Prof. Hector Koolen** por aceitar participar da banca de avaliação desse trabalho.

À **Profa. Mônica Padilha**, coordenadora do Laboratório de Pesquisa de Agentes Anabólicos, LADETEC-UFRJ, que gentilmente permitiu e confiou a mim os usos da balança de ultraprecisão e evaporador com fluxo de gás.

**Ao pessoal do Laboratório de Fisiologia Vegetal (LabPlant) da UFC** pelo uso do liofilizador e centrífuga para tubos de ensaio.

Às **Professoras Cândida e Rosilene**, por terem realizado considerações importantes nesse trabalho durante a defesa do projeto de qualificação.

**Ao Prof. Tadeu e ao Prof. Pedro** do Laboratório de Proteínas Vegetais de Defesa, da UFC, que gentilmente liberaram o uso do HPLC para determinação do padrão de deposição de EF nos tecidos de fruto em desenvolvimento.

**Ao Programa de Pós graduação em Fitotecnia** pela oportunidade de realização do curso com bolsa.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES)** pelo apoio financeiro na forma de bolsa de estudos.

À **Alexandra Elbakyan** pela criação e manutenção do Sci-Hub (<https://sci-hub.se/>), uma iniciativa que exige grande esforço e coragem tremenda na tentativa de democratizar o acesso à literatura científica.

**Aos meus pais Vanaldi e Lourinaldo e minha irmã Alaídes Priscila** pelo amor incondicional, apoio e compreensão diante de minha ausência em tantos momentos.

À quem ajudou na construção desse trabalho de alguma forma e eu esqueci de mencionar.

## RESUMO

O pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) tem sido estudado principalmente pelo seu potencial de prover óleo para produção de biodiesel. Além disso, a torta obtida após extração do óleo contém notável valor nutricional, mas seu uso na alimentação animal é impedido pela toxicidade atribuída aos éteres de forbol (EF) encontrados na maioria dos genótipos. Assim, este trabalho analisou o padrão de deposição de EF e o metaboloma de diferentes tecidos e estágios de desenvolvimento de dois genótipos de pinhão-manso (HPE e LPE) que contrastam no acúmulo de EF. Viu-se que o genótipo HPE acumula EF no *kernel* de sementes maduras numa concentração de  $0,55 \pm 0,062 \mu\text{g}.\text{mg}^{-1}$ , enquanto EF não foram detectados no genótipo LPE. Nas sementes produzidas pelos enxertos recíprocos dos genótipos HPE e LPE, não foi observado efeito da enxertia sobre o acúmulo de EF. Já, durante o desenvolvimento dos frutos, os EF foram detectados e quantificados relativamente em todos os tecidos (pericarpo, testa, tegma e endosperma) e estágios de desenvolvimento analisados (E1, E2, E3, E4 e E5) do genótipo HPE. Padrões de deposição de EF distintos entre tecidos maternos e filiais foram observados. Além disso, EF foram também detectados em folhas e raízes do genótipo HPE. A detecção de EF na testa isolada e nas raízes, são reportadas de maneira inédita na literatura. Pela abordagem metabolômica não-alvo, as raízes despontaram como principal repositório de terpenóides, especialmente sesqui e diterpenóides, em ambos os genótipos. Para maioria dos diterpenóides anotados, concentrações relativas mais altas foram vistas no genótipo HPE, dentre eles, diterpenóides com esqueleto tigliano, o mesmo encontrado nos EF, enquanto que o genótipo LPE apresentou concentrações relativas mais altas de sesquiterpenóides. No pericarpo e na testa em desenvolvimento, foram vistos principalmente diferenças no padrão de deposição de compostos fenólicos, como flavonoides, ácidos clorogênicos e taninos hidrolisáveis. Já, no tegma de ambos os genótipos, a abundância relativa de lipídeos de membrana cai acentuadamente, acompanhada pelo aumento de diversas oxilipinas. Em conclusão, esse trabalho detalhou a distribuição de EF em *J. curcas*, e explorou um conjunto rico de dados metabolômicos que podem contribuir com o entendimento da biossíntese de EF, como também destacou diferenças nas distribuições de metabólitos de outras classes químicas entre os genótipos, tecidos e estágios de desenvolvimento.

**Palavras-chave:** ésteres de forbol; metabolômica de plantas; espectrometria de massas; terpenóides; oxilipinas.



## ABSTRACT

The physic nut (*Jatropha curcas* L.) has been studied mainly for its potential to provide oil for biodiesel production. In addition, the cake obtained after extracting the oil contains remarkable nutritional value, but its use in animal feed is prevented by the toxicity attributed to the phorbol ethers (PE) found in most genotypes. Thus, this work analyzed the pattern deposition of PE and the metabolome of different tissues and developmental stages of two physic nut genotypes (HPE and LPE) that contrast in the accumulation of PE. Initially, it was observed that the HPE genotype accumulates PE in the kernel of mature seeds at a concentration of  $0.55 \pm 0.062 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ , while PE were not detected in the LPE genotype. In seeds produced by reciprocal grafts of the HPE and LPE genotypes, no effect of grafting on PE accumulation was observed. During fruit development, PE were detected and quantified in all tissues (pericarp, testa, tegmen and endosperm) and developmental stages analyzed (S1, S2, S3, S4 and S5). Distinct PE deposition patterns between maternal and filial tissues were observed. Furthermore, PE were also detected in leaves and roots of the HPE genotype. The detection of PE in the testa isolated and in the roots, are reported in an unprecedented way in the literature. By the non-target metabolomics approach, the roots emerged as the main repository of terpenoids, especially sesqui and diterpenoids in both genotypes. However, for most of the annotated diterpenoids, higher relative concentrations were seen in the HPE genotype, among them, diterpenoids with tiglane skeleton, the same found in the PE, while the LPE genotype showed higher relative concentrations of sesquiterpenoids. During pericarp and testa development, mainly differences in the deposition pattern of phenolic compounds such as flavonoids, chlorogenic acids and hydrolysable tannins were seen. Already in tegmen, there was a sharp drop in the concentration of membrane lipids, accompanied by an increase in several oxylipins. In conclusion, this work detailed the distribution of PE in *J. curcas*, and explored a rich-set of metabolomic data that may contribute to the understanding of PE biosynthesis, in addition to having been demonstrated differences in the distribution of metabolites of other chemical classes among genotypes, tissues and developmental stages.

**Keywords:** phorbol esters; plant metabolomics; mass spectrometry; terpenoids; oxilipins.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Estruturas dos ésteres de forbol isolados de <i>J. curcas</i> .....	23
Figura 2 -	Proposta do papel central do casbeno na formação de uma série de outros esqueletos básicos de diterpenóides em Euphorbiaceae.....	25
Figura 3 -	Estruturas moleculares de Jolkinol C e 12- <i>O</i> -tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA).....	30
Figura 4 -	Esquema geral da biossíntese de terpenóides.....	33
Figura 5 -	Distribuição dos diterpenóides isolados de <i>J. curcas</i> de acordo com a parte da planta de onde foram extraídos e tipo de esqueleto básico.....	37
Figura 6 -	Visão geral da biossíntese de compostos fenólicos.....	39
Figura 7 -	Fluxo de trabalho comum de uma análise metabolômica não-alvo baseada em cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS).....	41
Figura 8 -	Criação de redes moleculares a partir de espectros de fragmentação de metabólitos.....	42
Quadro 1 -	Caracterização morfológica de frutos de pinhão-manso em cinco estágios de desenvolvimento, denominados E1, E2, E3, E4 e E5.....	46
Figura 9 -	Esquema dos diferentes grupos de plantas do experimento com plantas enxertadas.....	48
Figura 10 -	Arquitetura geral do processamento dos dados da análise metabolômica não-alvo.....	53

Figura 11 -	Caracterização dos genótipos HPE e LPE de <i>J. curcas</i> por HPLC-DAD quanto ao acúmulo de ésteres de forbol nas sementes.....	57
Figura 12 -	Detecção e quantificação de ésteres de forbol em sementes maduras de plantas enxertadas de <i>J. curcas</i> .....	59
Figura 13 -	Padrão de deposição de ésteres de forbol ao longo do desenvolvimento do fruto de <i>J. curcas</i> , genótipo HPE.....	62
Figura 14 -	Esquema representativo das principais mudanças morfológicas sofridas por sementes de pinhão-mansão ao longo do desenvolvimento.....	63
Figura 15 -	Análises de correlação de Pearson entre as análises da mistura de extratos de tecidos isolados de frutos em desenvolvimento de <i>J. curcas</i>	65
Figura 16 -	Análises de correlação de Pearson entre as corridas da mistura de extratos de folha e raiz dos genótipos HPE e LPE de <i>J. curcas</i> .....	66
Figura 17 -	Cromatogramas de íons das corridas do padrão TPA e respectivos espectros de fragmentação.....	66
Figura 18 -	Anotação estrutural do padrão 12- <i>O</i> -tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) por similaridade do espectro de fragmentação.....	67
Figura 19 -	Detecção dos ésteres de forbol em diversos tecidos de <i>J. curcas</i> via LC-MS de alta resolução.....	69
Figura 20 -	Espectros de fragmentação dos ésteres de forbol de <i>J. curcas</i> a partir do precursor <i>m/z</i> 733,3710.....	70
Figura 21 -	Distribuição dos metabólitos anotados por similaridade espectral com pontuação de cosseno $\geq 0,6$ .....	73

Figura 22 -	Diagramas de Venn mostrando as distribuições das <i>features</i> totais detectadas em extratos de raiz e folha de pinhão-manso, genótipos HPE e LPE.....	75
Figura 23 -	Ontologia de classe química segundo a classificação <i>NPC#Superclass</i> das <i>features</i> detectadas em raiz e folha de <i>J. curcas</i> usando CANOPUS	76
Figura 24 -	Família molecular construída pela abordagem de Redes Moleculares Baseadas em <i>Features</i> , onde foram agrupados Carotenóides (C40) detectados em folhas de pinhão-manso, genótipos HPE e LPE.....	77
Figura 25 -	Análise de componente principal das <i>features</i> detectadas em raiz e folha dos genótipos de pinhão-manso HPE e LPE nos modos de ionização positiva e negativa.....	78
Figura 26 -	Clusterização hierárquica das <i>features</i> detectadas em raízes e folhas de pinhão-manso e que demonstraram diferença estatística entre os genótipos HPE e LPE.....	79
Figura 27 -	Diagramas de Venn com as distribuições das <i>features</i> totais detectadas em extratos de pericarpo, testa, tegma e endosperma isolados de frutos em desenvolvimento de <i>J. curcas</i> .....	80
Figura 28 -	Diagramas de Venn mostrando as distribuições das <i>features</i> totais detectadas em extratos de pericarpo em desenvolvimento (E1, E2 e E3) de <i>J. curcas</i> , genótipos HPE e LPE.....	81
Figura 29 -	Diagramas de Venn mostrando as distribuições das <i>features</i> totais detectadas em extratos de testa em desenvolvimento (E1, E2 e E3) de <i>J. curcas</i> , genótipos HPE e LPE.....	82

Figura 30 -	Diagramas de Venn mostrando as distribuições das <i>features</i> totais detectadas em extratos de tegma em desenvolvimento (E1, E2 e E3) de <i>J. curcas</i> , genótipos HPE e LPE.....	83
Figura 31 -	Diagramas de Venn mostrando as distribuições das <i>features</i> totais detectadas em extratos de endosperma em desenvolvimento (E1, E2 e E3) de <i>J. curcas</i> , genótipos HPE e LPE.....	84
Figura 32 -	Ontologia de classe química segundo a classificação <i>NPC#Superclass</i> das <i>features</i> detectadas no pericarpo em desenvolvimento dos genótipos de pinhão-manso HPE e LPE usando CANOPUS.....	86
Figura 33 -	Ontologia de classe química segundo a classificação <i>NPC#Superclass</i> das <i>features</i> detectadas na testa em desenvolvimento dos genótipos de pinhão-manso HPE e LPE usando CANOPUS.....	87
Figura 34 -	Ontologia de classe química segundo a classificação <i>NPC#Superclass</i> das <i>features</i> detectadas no tegma em desenvolvimento dos genótipos de pinhão-manso HPE e LPE usando CANOPUS.....	88
Figura 35 -	Ontologia de classe química segundo a classificação <i>NPC#Superclass</i> das <i>features</i> detectadas no endosperma em desenvolvimento dos genótipos de pinhão-manso HPE e LPE usando CANOPUS.....	89
Figura 36 -	Análise de componente principal (PCA) das <i>features</i> detectadas em pelo menos 85% das amostras de pericarpo (Prp) e testa (Tst) em desenvolvimento (estágios E1, E2 e E3) dos genótipos de pinhão-manso HPE e LPE.....	91
Figura 37 -	Análise de componente principal (PCA) das <i>features</i> detectadas em pelo menos 85% das amostras de tegma (Tg) e endosperma (End) em desenvolvimento (estágios E1, E2 e E3) dos genótipos de pinhão-manso HPE e LPE.....	92

Figura 38 -	Clusterização hierárquica das <i>features</i> detectadas no pericarpo (Prp) e na testa (Tst) em desenvolvimento de pinhão-manso e que mostraram diferença significativa segundo o teste de ANOVA entre os genótipos HPE e LPE e/ou entre os estágios de desenvolvimento E1, E2 e E3.....	95
Figura 39 -	Clusterização hierárquica das <i>features</i> detectadas no tegma (Tg) e no endosperma (End) em desenvolvimento de pinhão-manso e que mostraram diferença significativa segundo o teste de ANOVA entre os genótipos HPE e LPE e/ou entre os estágios de desenvolvimento E1, E2 e E3.....	96
Figura 40 -	Famílias moleculares formadas pelos íons correspondentes aos ésteres de forbol detectados em amostras de tegma em desenvolvimento (estágios E1, E2 e E3) do genótipo HPE.....	98
Figura 41 -	Sesquiterpenóides detectados em raízes de pinhão-manso e que apresentaram diferença significativa segundo o teste-t de Student à 5% de probabilidade entre os genótipos HPE e LPE.....	100
Figura 42 -	Giberelina A14 e <i>features</i> relacionadas detectadas em raízes de pinhão-manso e que apresentaram abundância relativa diferente segundo o teste-t de <i>Student</i> à 5% de probabilidade entre os genótipos HPE e LPE	105
Figura 43 -	Apocarotenóides detectados em raízes de pinhão-manso e que apresentaram abundância relativa estatisticamente diferente segundo o teste-t de <i>Student</i> à 5% de probabilidade entre os genótipos HPE e LPE	107
Figura 44 -	Lignanas e Neolignanas detectadas em raízes de pinhão-manso sob modo ionização positiva e que apresentaram abundância relativa estatisticamente diferente segundo o teste-t de <i>Student</i> à 5% de probabilidade entre os genótipos HPE e LPE.....	109

Figura 45 -	Famílias moleculares de lignanas e neolignanas detectadas em raízes de pinhão-manso sob ionização positiva nos genótipos HPE e LPE, obtidas pela abordagem FBMN.....	110
Figura 46 -	Chalconas detectadas em raiz, pericarpo e testa de <i>J. curcas</i> e que apresentaram abundância relativa estatisticamente diferente entre os genótipos HPE e LPE e/ou estágios de desenvolvimento	111
Figura 47 -	Flavonoides detectados no pericarpo e na testa em desenvolvimento de <i>J. curcas</i> e que tiveram abundâncias relativas estatisticamente diferentes segundo o teste de ANOVA entre genótipos HPE e LPE e/ou estágios de desenvolvimento.....	113
Figura 48 -	Flavonoides detectados no pericarpo em desenvolvimento de <i>J. curcas</i> e que apresentaram padrão de deposição estatisticamente diferente pelo teste de ANOVA, entre os genótipos HPE e LPE e/ou estágios de desenvolvimento.....	114
Figura 49 -	Ácidos clorogênicos detectados na testa em desenvolvimento de <i>J. curcas</i> , que foram estatisticamente diferentes segundo o teste de ANOVA entre os genótipos HPE e LPE e/ou estágios de desenvolvimento.....	115
Figura 50 -	Rota de biossíntese dos ésteres simples de galoilglicose.....	116
Figura 51 -	Ésteres simples de galoilglicose detectados no pericarpo e na testa em desenvolvimento de <i>J. curcas</i> , e que apresentaram diferença estatística de acordo com o teste de ANOVA entre os genótipos HPE e LPE e/ou estágios de desenvolvimento.....	118

Figura 52 -	Glicerofosfolípídeos detectados no tegma de <i>J. curcas</i> e que apresentaram abundâncias relativas estatisticamente diferentes entre os genótipos HPE e LPE e/ou estágios de desenvolvimento do tegma, segundo teste de ANOVA .....	121
Figura 53 -	Oxilipinas detectadas no tegma e que apresentaram abundâncias relativas estatisticamente diferentes entre os genótipos HPE e LPE e/ou estágios de desenvolvimento do tegma de pinhão-manso, segundo teste de ANOVA .....	122
Figura 54 -	Visão resumida da biossíntese de oxilipinas em plantas.....	123



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Lista dos diterpenóides isolados de <i>J. curcas</i> , com respectivos nomes, fórmula molecular, massa molecular, tipo de esqueleto diterpênicos, parte da planta de onde o composto foi isolado e a referência bibliográfica .....	34
Tabela 2 -	Composição da solução nutritiva utilizada no cultivo hidropônico de plantas de pinhão-manso .....	49
Tabela 3 -	Número de <i>features</i> detectadas e metabólitos anotados segundo análise metabolômica não-alvo de órgãos e tecidos de <i>J. curcas</i> .	73
Tabela 4 -	Número de <i>features</i> detectadas em raízes e folhas e que demonstraram diferença significativa pelo teste-t de Student à 5% de probabilidade entre os genótipos HPE e LPE .....	78
Tabela 5 -	Número de <i>features</i> detectadas no pericarpo, testa, tegma e endosperma de frutos em desenvolvimento de <i>J. curcas</i> , que demonstraram diferença significativa pelo teste de ANOVA entre os genótipos HPE e LPE e/ou entre os estágios de desenvolvimento E1, E2 e E3 .....	94
Tabela 6 -	<i>Features</i> detectadas nas raízes de <i>J. curcas</i> que receberam anotação para Diterpenóides ( $NPC\#Superclass \geq 0,7$ ) segundo CANOPUS .....	101

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
AFLP	Polimorfismo de Comprimento de Fragmento Amplificados
DDA	Aquisição Dependente de Dado
DDA-top3	Aquisição Dependente de Dado e fragmentação dos três íons mais intensos
diTPS	Diterpeno fosfato sintase
E1, E2, E3, E4 e E5	Estágio 1, Estágio 2, Estágio 3, Estágio 4 e Estágio 5
EF	Ésteres de forbol
FBMN	Rede Molecular Baseada em <i>Feature</i>
FDR	Taxa de Descoberta Falsa
GGPP	Geranilgeranilpirofosfato
GNPS	<i>Global Natural Products Social Molecular Networking</i>
HCD	Dissociação induzida por colisão de alta energia
HPE	Genótipo com Alto teor de ésteres de forbol
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Performance
HPLC-DAD	Cromatografia Líquida de Alta Performance com detecção usando “ <i>Diode Array Detector</i> ”
HPLC-UV	Cromatografia Líquida de Alta Performance com detecção na faixa do ultravioleta
LC-MS/MS	Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas em Tandem
LC-HRMS	Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas Alta Resolução
LPE	Genótipo com Baixo teor de Ésteres de forbol
$m/z$	Razão Massa/carga
MeOH	Metanol
MS <sup>1</sup>	Espectro de massa de todos os íons precursores numa faixa de $m/z$ pré-estabelecida
MS <sup>2</sup>	Espectro de Fragmentação
PC1	Componente Principal 1
PC2	Componente Principal 2

PCA	Análise de Componentes Principais
PCD	Morte Celular Programada
PKC-BII	Proteína quinase C - beta II
PVX	<i>Potato Virus X</i>
PVY	<i>Potato Virus Y</i>
QC	Controle de Qualidade
QTL	<i>Locus</i> de Característica Quantitativa
RAPD	Amplificação Aleatória de DNA polimórfico
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RNA <sub>m</sub>	Ácido Ribonucleico Mensageiro
SCoT	Códon de Início Direcionado
SNP	Polimorfismo de Nucleotídeo Único
SSR	Repetição de Sequência Simples
TPA	12- <i>O</i> -tetradecanoilforbol-13-Acetato

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	21
<b>1.1</b>	<b>Fundamentação teórica</b> .....	25
1.1.1	<i>Propriedades do óleo e da torta de pinhão-manso</i> .....	25
1.1.2	<i>Ésteres de forbol: toxicidade e principais avanços no entendimento de sua biossíntese</i> .....	27
1.1.3	<i>Métodos para quantificação dos ésteres de forbol</i> .....	30
1.1.4	<i>Terpenóides</i> .....	31
1.1.5	<i>Compostos fenólicos</i> .....	36
1.1.6	<i>Metabolômica não-alvo e suas contribuições na biologia de plantas</i> .....	38
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	43
<b>2.1</b>	<b>Objetivo geral</b> .....	43
<b>2.2</b>	<b>Objetivos específicos</b> .....	43
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	44
<b>3.1</b>	<b>Material vegetal</b> .....	44
3.1.1	<i>Obtenção e caracterização dos tecidos de frutos em desenvolvimento</i> .....	44
3.1.2	<i>Obtenção de sementes de plantas enxertadas</i> .....	46
3.1.3	<i>Obtenção de folhas e raízes</i> .....	47
<b>3.2</b>	<b>Extração dos metabólitos</b> .....	48
<b>3.3</b>	<b>Determinações dos ésteres de forbol por HPLC-DAD</b> .....	49
<b>3.4</b>	<b>Análise dos extratos por LC-MS/MS</b> .....	49
<b>3.5</b>	<b>Processamento dos dados brutos e anotação de metabólitos</b> .....	51
3.5.1	<i>Construção de redes moleculares baseadas em features</i> .....	53
3.5.2	<i>Quantificação relativa dos metabólitos</i> .....	53
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	55
<b>4.1</b>	<b>Caracterização dos genótipos HPE e LPE por HPLC-DAD</b> .....	55
<b>4.2</b>	<b>Acúmulo de EF em sementes de plantas enxertadas</b> .....	57
<b>4.3</b>	<b>Padrão de deposição de EF nos frutos em desenvolvimento</b> .....	59
<b>4.4</b>	<b>Análise metabolômica não-alvo</b> .....	62
<b>4.5</b>	<b>Performance da aquisição dos dados de LC-MS/MS</b> .....	63
<b>4.6</b>	<b>Análise dos EF via LC-MS/MS</b> .....	66
<b>4.7</b>	<b>Visão geral das features detectadas e metabólitos anotados</b> .....	70

4.7.1	<i>Raiz e Folha – features detectadas, classes químicas e quantificação relativa</i> .....	73
4.7.2	<i>Fruto em desenvolvimento – features detectadas, classes químicas e quantificação relativa</i> .....	79
<b>4.8</b>	<b>Redes moleculares baseadas em features</b> .....	96
<b>4.9</b>	<b>Padrão de deposição de Terpenóides</b> .....	97
4.9.1	<i>Sesquiterpenóides e Diterpenóides</i> .....	97
4.9.2	<i>Apocarotenóides</i> .....	104
<b>4.10</b>	<b>Padrão de deposição de compostos fenólicos</b> .....	107
4.10.1	<i>Lignanas</i> .....	107
4.10.2	<i>Flavonoides</i> .....	107
4.10.3	<i>Ácidos clorogênicos e taninos hidrolisáveis</i> .....	113
<b>4.11</b>	<b>Padrão de deposição de lipídeos estruturais e oxilipinas no tegma em desenvolvimento</b> .....	118
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	123
<b>6</b>	<b>PERSPECTICAS</b> .....	124
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	125
	<b>APÊNDICE A - CROMATOGRAMAS REPRESENTATIVOS DAS AMOSTRAS DE RAIZ</b> .....	135
	<b>APÊNDICE B - CROMATOGRAMAS REPRESENTATIVOS DAS AMOSTRAS DE FOLHA</b> .....	136
	<b>APÊNDICE C - CROMATOGRAMAS REPRESENTATIVOS DAS AMOSTRAS DE PERICARPO</b> .....	137
	<b>APÊNDICE D - CROMATOGRAMAS REPRESENTATIVOS DAS AMOSTRAS DA TESTA</b> .....	138
	<b>APÊNDICE E - CROMATOGRAMAS REPRESENTATIVOS DAS AMOSTRAS DA TEGMA</b> .....	139
	<b>APÊNDICE F - CROMATOGRAMAS REPRESENTATIVOS DAS AMOSTRAS DO ENDOSPERMA</b> .....	140
	<b>APÊNDICE G - LISTA DE TABELAS SUPLEMENTARES</b> .....	141
	<b>APÊNDICE H - FBMN DOS DADOS DE FOLHA E RAIZ DETECTADOS SOB IONIZAÇÃO POSITIVA</b> .....	142

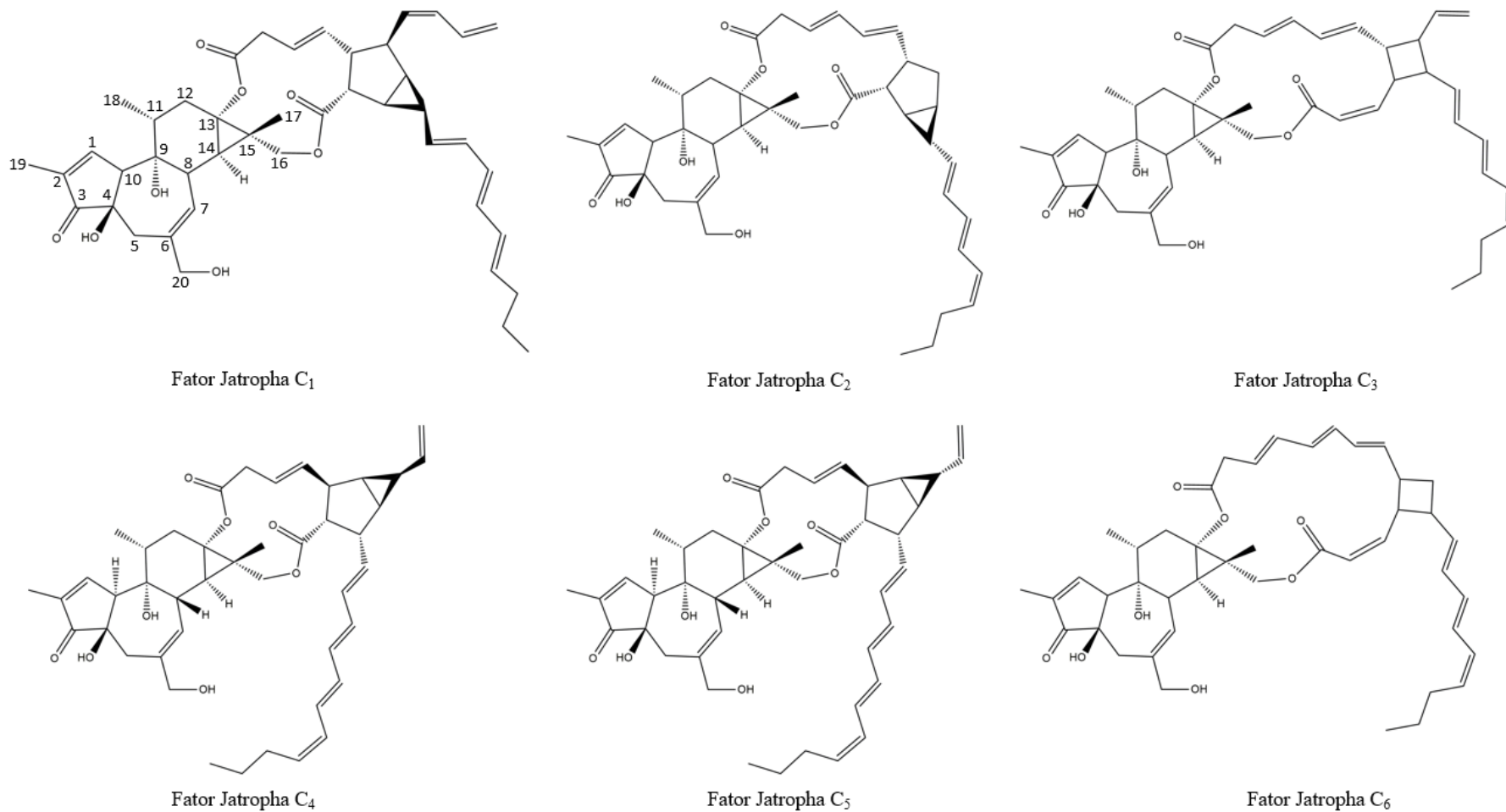
APÊNDICE I - FBMN DOS DADOS DE FOLHA E RAIZ DETECTADOS SOB IONIZAÇÃO NEGATIVA .....	143
APÊNDICE J - FBMN DOS DADOS DE PERICARPO EM DESENVOLVIMENTO SOB IONIZAÇÃO POSITIVA .....	144
APÊNDICE K - FBMN DOS DADOS DE PERICARPO EM DESENVOLVIMENTO SOB IONIZAÇÃO NEGATIVA .....	145
APÊNDICE L - FBMN DOS DADOS DE TESTA EM DESENVOLVIMENTO SOB IONIZAÇÃO POSITIVA .....	146
APÊNDICE M - FBMN DOS DADOS DE TESTA EM DESENVOLVIMENTO SOB IONIZAÇÃO NEGATIVA .....	147
APÊNDICE N - FBMN DOS DADOS DE TEGMA EM DESENVOLVIMENTO SOB IONIZAÇÃO POSITIVA .....	148
APÊNDICE O - FBMN DOS DADOS DE TEGMA EM DESENVOLVIMENTO SOB IONIZAÇÃO NEGATIVA .....	149
APÊNDICE P - FBMN DOS DADOS DE ENDOSPERMA EM DESENVOLVIMENTO SOB IONIZAÇÃO POSITIVA .....	150
APÊNDICE Q - FBMN DOS DADOS DE ENDOSPERMA EM DESENVOLVIMENTO SOB IONIZAÇÃO NEGATIVA .....	151
ANEXO A - PROPOSTAS PARA FORMAÇÃO DO DITERPENÓIDE JOLKINOL C EM ESPÉCIES DE EUPHORBIACEAE .....	152

## 1 INTRODUÇÃO

O pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) é uma Euphorbiaceae que surgiu no cenário agrícola mundial como cultura não alimentícia, com grande potencial de prover óleo para produção de biodiesel (MEHER et al., 2013). Atrelado à produção de óleo, o subproduto obtido após sua extração, conhecido por torta da semente de pinhão-manso (*Jatropha seed cake*), dada suas características que lhe conferem alto valor nutricional (SAETA; SUNTORNSUK, 2010; SÁNCHEZ-ARREOLA et al., 2015), é uma matéria prima com potencial de ser utilizada na alimentação animal. Além disso, o grande repertório de moléculas biologicamente ativas encontradas nesta espécie, especialmente diterpenóides, fazem do pinhão-manso uma planta também interessante do ponto de vista farmacológico, podendo ser uma fonte direta desses compostos ou servir de inspiração para síntese química de futuros fármacos (CAVALCANTE; DIEGO DA CONCEIÇÃO SANTOS; GUEDES DA SILVA ALMEIDA, 2020).

A ocorrência natural do pinhão-manso se dá em regiões tropicais e subtropicais, especialmente em países das Américas Central e do Sul, África e Ásia (LI et al., 2017). De modo geral, a variabilidade genética observada em bancos de germoplasma é baixa (TREBBI et al., 2015), enquanto a variabilidade em características agronômicas, como exemplo, produtividade de semente e óleo, período de floração e perfil de ácidos graxos é maior, o que são de grande importância em programas de melhoramento genético. Os maiores níveis de heterozigose têm sido observados em germoplasmas do México, particularmente nos genótipos considerados não tóxicos, em que os ésteres de forbol (EF) são ausentes (LAVIOLA et al., 2018; LI et al., 2017; MONTES; MELCHINGER, 2016). Esses compostos (Figura 1), são ésteres diterpênicos baseados num esqueleto do tipo tigliano, esterificado por ácidos graxos dicarboxílicos (HAAS; STERK; MITTELBAACH, 2002) e a eles é atribuído o caráter tóxico dos genótipos que os contém (HE et al., 2011). Assim, não se recomenda a utilização alimentícia da torta oriunda desse tipo de genótipo.

**Figura 1.** Estruturas dos ésteres de forbol isolados de *J. curcas*. São seis isômeros constitucionais, chamados de Fatores Jatropha C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, formados por esqueleto diterpenóide tetracíclico do tipo tigliano (com os carbonos numerados no Fator Jatropha C<sub>1</sub>), o 12-deoxi-16-hidroforbol, esterificado com ácidos graxos dicarboxílicos nos carbonos 13 e 16, os quais diferem estruturalmente entre si



**Fonte:** Elaborado pelo autor a partir de Haas et al., (2002)

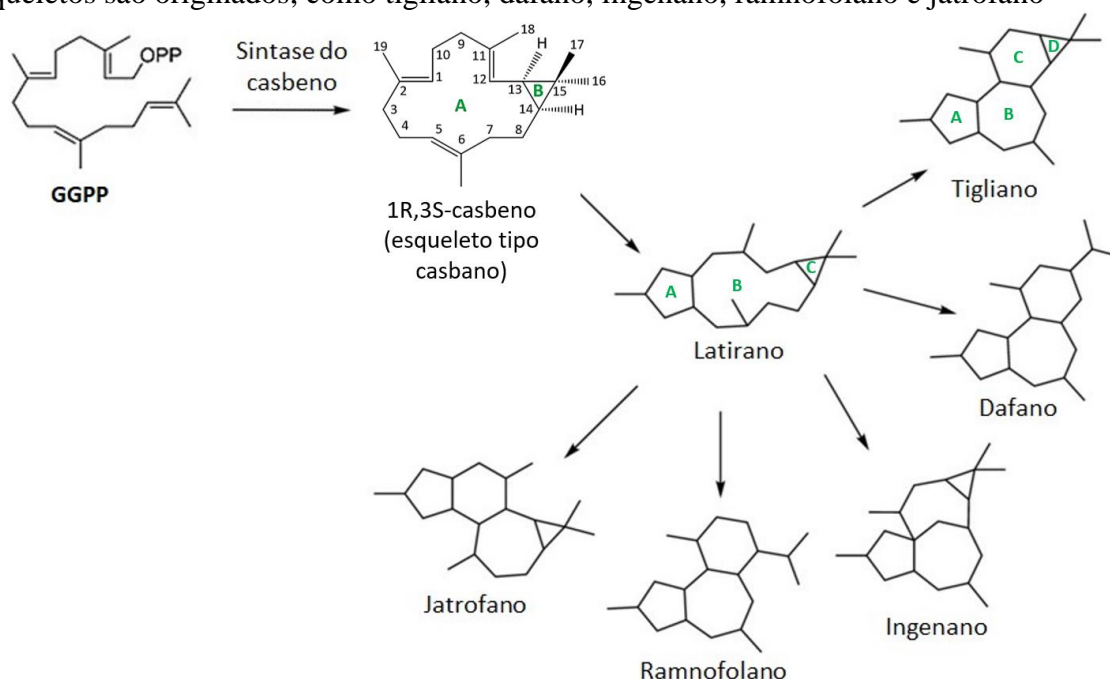


Diversos métodos físicos, químicos e biológicos já demonstraram ser capazes de desintoxicar a torta de pinhão-manso. A submissão a radiação solar ou gama mostraram-se como métodos eficientes na diminuição da concentração de EF a concentrações abaixo de  $0,1 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ , consideradas seguras (GOGOI; NIYOGI; TYAGI, 2014; YUNPING et al., 2012). De maneira semelhante, a extração com solventes orgânicos (metanol e etanol, por exemplo), aplicação de peróxido de hidrogênio, bases (NaOH e  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ) e surfactantes, são métodos químicos que também apresentam essa capacidade (GUEDES et al., 2014; ZHANG et al., 2014). Além disso, a biodegradação desses compostos por microrganismos tem se mostrado uma estratégia promissora (DE BARROS et al., 2011; RODRIGUES DA LUZ et al., 2014). No entanto, muitos desses métodos trazem consequências indesejáveis, como a diminuição da qualidade nutricional devido a degradação de proteínas e aminoácidos essenciais, ou toxicidade, por causa da permanência de solventes orgânicos na torta ou pela secreção de toxinas pelos microrganismos usados na biodegradação. Ademais, a maioria desses métodos, são aplicáveis apenas em escala de pesquisa. Diante desses problemas, alternativas fazem-se necessárias.

Desvendar a rota de biossíntese dos EF irá iluminar caminhos que levem a estratégias capazes de bloquear sua produção nos genótipos tóxicos. Esta seria, talvez, a alternativa mais econômica, sustentável e segura. Alguns esforços têm sido despendidos na tentativa de entender as bases genéticas por trás dessa característica. Um conjunto rico de marcadores moleculares dos tipos RAPD, SSR e SNP foram encontrados e relacionados à variação nos níveis de EF em diversos genótipos (TANYA et al., 2011; TREBBI et al., 2019; VISCHI; RARANCIUC; BALDINI, 2015). Assim como, o mapeamento de QTLs (*Quantitative Trace Locus*) determinou regiões genômicas nos grupos de ligação 3 e 8 como envolvidas com a biossíntese de EF (AMKUL et al., 2017; KING et al., 2013). Estudos bioquímicos também foram realizados e trouxeram contribuições significativas. Por exemplo, a formação de 1R,3S-casbano, um diterpeno bicíclico com esqueleto tipo casbano, a partir da ciclização de geranilgeranilpirofosfato (GGPP) (Figura 2), promovida pela enzima sintase do casbano, está estabelecida há bastante tempo, e é tida como a reação inicial da rota (KING et al., 2014). O casbano está no centro de várias rotas que levam à formação de uma variedade de diferentes esqueletos básicos de diterpenos, sendo, portanto, precursor comum de vários deles, inclusive do esqueleto tetracíclico tipo tigliano (Figura 2), encontrado nos EF. Trabalhos recentes mostraram como se dá a formação do diterpenóide tricíclico Jolkinol C, que tem esqueleto

tipo latirano, a partir de casbano (KING et al., 2016; LUO et al., 2016). Assim, uma análise metabolômica não-alvo de diversos tecidos e estágios de desenvolvimento poderia contribuir na compreensão da rota biossintética de EF por meio da anotação de possíveis intermediários químicos que precedem a formação dos EF.

**Figura 2.** Proposta do papel central do casbano na formação de uma série de outros esqueletos básicos diterpenóides. O casbano formado pela ciclização de GGPP, sofre uma ciclização intramolecular para produzir um esqueleto tipo latirano, e deste, diversos outros esqueletos são originados, como tigliano, dafano, ingenano, ramnofolano e jatrofano



**Fonte:** Adaptado de King et al., (2016).

Mesmo sendo mais abundantes nas sementes, trabalhos anteriores propuseram o envolvimento das raízes na biossíntese dos EF, haja vista, um conjunto de transcritos da sintase do casbano e seu produto proteico tenham sido expressos neste órgão, e os mesmos não tiveram a expressão detectada em tecidos da semente (DE ALMEIDA et al., 2021; FARIAS et al., 2020; NASCIMENTO, 2017; SOARES, 2015). Uma maneira possível de testar o papel das raízes na biossíntese de EF e o transporte de longa distância desses compostos (das raízes para parte aérea) seria aplicando a técnica de enxertia. Essa técnica tem sido usada na pesquisa científica para entender importantes aspectos da biologia vegetal, dentre esses, o padrão de distribuição de pequenas moléculas produzidas pelo metabolismo secundário, que pode envolver biossíntese órgão-específico, transporte de longa distância e armazenamento (DONG et al., 2022). O padrão de distribuição de nicotina (biossintetizada

nas raízes e translocada para folhas) em plantas de tabaco (BALDWIN, 1989) e dos glicosídeos cianogênicos em mandioca (biossintetizados nas folhas e translocados para raízes (JØRGENSEN et al., 2005), como também a demonstração da ausência de transporte de longa distância de brassinosteróides em plantas de ervilha (SYMONS; REID, 2004), são exemplos de estudos que utilizaram a enxertia para entender o padrão de distribuição de certos metabólitos.

Assim, esse trabalho foi concebido para criar um entendimento sobre a biossíntese dos EF no pinhão-manso, calcado em análise metabolômica. Para tanto, o trabalho foi dividido em duas etapas. Numa primeira etapa, foi feita a caracterização de dois genótipos de pinhão-manso em relação ao acúmulo de EF nas sementes maduras, para em seguida estudar o efeito da enxertia na deposição de EF nas sementes obtidas a partir dos enxertos recíprocos entre esses genótipos. Adiante, foi determinado o padrão de deposição de EF em quatro tecidos do fruto em desenvolvimento (pericarpo, testa, tegma e endosperma) de ambos os genótipos. Essas determinações foram baseadas em cromatografia líquida com separação em coluna de fase reversa octadecilsilano (C18) e quantificação dos compostos no comprimento de onda de 254 nm. Na segunda etapa, foram utilizados os tecidos dos frutos obtidos dos genótipos ora mencionados, em três dos estágios de desenvolvimento analisados no estudo anterior, mais folhas e raízes de plantas cultivadas em hidroponia, para um estudo metabolômico não-alvo baseado em cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (LC-HRMS).

## **1.1 Fundamentação teórica**

### *1.1.1 Propriedades do óleo e da torta de pinhão-manso*

A maior parte dos genótipos cultivados de pinhão-manso no mundo são tóxicos. Por essa condição, o óleo produzido por esses genótipos é destinado basicamente para a produção de biodiesel. Três principais atributos dos óleos vegetais devem ser observados para a produção de biodiesel: teor de óleo da semente, quantidade de ácidos graxos livres e a proporção entre ácidos graxos insaturados, mono e poliinsaturados. No pinhão-manso, essas características são bastante variáveis a depender do genótipo, das condições de cultivo e estágio de maturação do fruto. Rodrigues et al. (2013), ao compararem o teor de óleo de 12 genótipos de pinhão-manso, encontraram valores que variaram de 37 à 45% do peso seco de

sementes secas ao ar. Enquanto a quantidade de ácidos graxos livres variou de 0,6 a 1,1%. Já, os ácidos graxos oleico (18:1) e linoleico (18:2) apresentaram-se em maiores proporções (~40% cada), seguidos dos ácidos palmítico (16:0) e esteárico (18:0), com 13 e 6%, respectivamente. Kumar e Das, (2018), ao estudarem 19 genótipos de pinhão-mansão, encontraram valores semelhantes, porém a variação no teor de óleo foi de 13,7 a 54,3% do peso seco do *kernel* (semente sem a testa), sendo que para maioria dos genótipos, os valores estiveram entre 30 e 40%. Os valores de ácidos graxos livres foram de 0,21 a 1,82 para maioria dos genótipos. Além disso, uma dependência entre o estágio de desenvolvimento do fruto com o teor de óleo e sua composição de ácidos graxos também foi observada. O teor de óleo mais elevado e uma maior proporção dos ácidos graxos oleico e linoleico foram vistos em sementes colhidas a partir de frutos amarelos, em detrimento aos frutos no final da senescência, de coloração marrom (JONAS; KETLOGETSWE; GANDURE, 2020).

A torta, obtida após a extração do óleo, contém potencialmente alto valor nutricional. Mesmo havendo uma significativa variação no teor de proteína bruta a depender do genótipo, a torta de pinhão-mansão é considerada um material rico em proteínas. Bash et al., (2009), determinaram o teor de proteína bruta em 72 genótipos de pinhão-mansão, representativos de 13 países, e encontraram valores entre 18,8 e 34,5% do peso seco do *kernel*, sendo que, para maioria dos genótipos, o valor esteve próximo à média 28,3%. Esses valores ainda sofrem efeito do método de extração e, por essa razão, Ahluwalia et al., (2020), ao otimizarem a temperatura, pH de solubilização e precipitação e tempo, encontraram um valor de proteína bruta de 41,98% na torta fresca de pinhão-mansão. Além disso, a torta de pinhão-mansão contém altas concentrações de aminoácidos essenciais, com destaque para leucina (4,4%), fenilalanina (2,88%) e valina (2,84%). Assim, essas características, asseguram ser o pinhão-mansão uma oleaginosa com alto potencial para produção de biodiesel, e seu principal subproduto passível de ser utilizado como suplemento em rações para animais, desde que as rotas que levam aos EF sejam totalmente compreendidas, para embasar alternativas biotecnológicas que possam ser capazes de bloquear sua biossíntese ou reduzi-la a níveis seguros.

### 1.1.2 Ésteres de forbol: toxicidade e principais avanços no entendimento de sua biossíntese

Os EF do pinhão-mansão, nomeadamente fatores *Jatropha* C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, são seis isômeros constitucionais de fórmula e massa molecular C<sub>44</sub>H<sub>56</sub>O<sub>8</sub> e 710,37 u, respectivamente. Em comum, eles possuem um esqueleto diterpênico tetracíclico do tipo tigliano, especificamente 12-deoxi-16-hidroxi-forbol, esterificado com ácidos graxos dicarboxílicos nas hidroxilas dos carbonos 13 e 16 (HAAS; STERK; MITTELBAACH, 2002) (Figura 1). As diferenças estruturais, são encontradas, portanto, apenas na porção do ácido graxo. Em *J. curcas*, além de estarem depositados nas sementes, onde estão em maiores concentrações, também já foram detectados nas folhas (BALDINI et al., 2014). O carácter lipídico desses compostos, fazem com que eles permaneçam solubilizados no óleo após sua extração. A toxicidade atribuída a essas moléculas advém de estudos toxicológicos realizados em modelos animais. Em ratos que sofreram administração intragástrica de EF isolados do óleo de pinhão-mansão, foi evidenciada mortalidade dependente da dose, além de uma série de alterações histopatológicas nos órgãos coração, intestino delgado, cérebro e baço (LI et al., 2010). Os efeitos dos EF também foram analisados em caracóis e *Artemia salina*, em que a mortalidade dependente da dose também foi evidenciada. Além disso, foi constatado que o par de epímeros C<sub>4</sub> e C<sub>5</sub> são significativamente mais tóxicos (ROACH et al., 2012). Por fim, a atividade citotóxica dos EF do pinhão-mansão também foi testada em células de rim bovino. Foi visto que os EF alteram severamente o estado redox das células, o que leva à estresse oxidativo, além de induzirem aumento nas expressões de PKC-BII, proto-oncogenes, citocinas pró-inflamatórias e caspase-3, levando a um quadro de carcinogênese (OSKOEIAN et al., 2019).

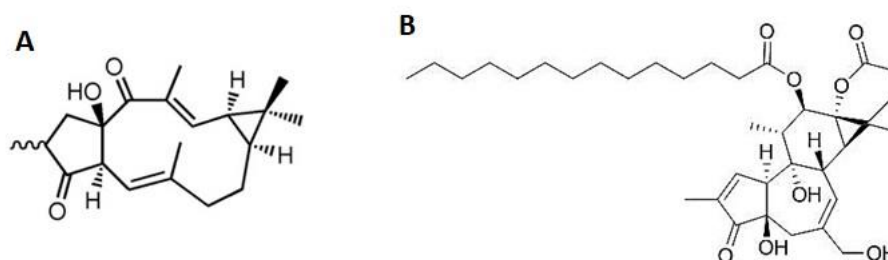
A distinção entre genótipos tóxicos e não tóxicos por meio de características morfológicas das plantas não é seguramente possível, o que alavancou as buscas por marcadores moleculares capazes de distinguir esses dois grupos. Entre os anos de 2007 e 2015, diversos grupos de pesquisa no mundo, ao estudarem a diversidade genética entre diversos genótipos de pinhão-mansão, entre os quais incluíam-se genótipos tóxicos (concentração de EF  $\geq 0,1 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) e não-tóxicos (EF não detectados ou presentes numa concentração abaixo de  $0,1 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ ), reportaram um conjunto rico de marcadores moleculares dos tipos RAPD, SSR, AFLP e SCoT, sejam específicos ou polimórficos, capazes de distinguir esses dois grandes grupos de genótipos (BASHA; SUJATHA, 2007; MULPURI;

MUDDANURU; FRANCIS, 2013; SUDHEER PAMIDIMARRI et al., 2009; TANYA et al., 2011; VISCHI; RARANCIUC; BALDINI, 2015). Além disso, ficou claro que a variabilidade genética entre genótipos tóxicos é baixa, enquanto, entre os genótipos mexicanos não-tóxicos, geralmente é mais alta. Nesse âmbito, um passo importante foi dado pelo trabalho publicado por King et al., (2013), ao reportarem um mapa de ligação genético de alta densidade, criado a partir de quatro populações e contendo mais de 400 marcadores codominantes tipos SSR e SNP. Nesse trabalho, os autores identificaram no grupo de ligação 8 um *locus* envolvido com a biossíntese de EF; viram também que essa característica sofre segregação 3:1, sendo portanto monogênica dominante, além de corroborarem com os resultados apresentados por Sujatha; Makkar; Becker., (2005), que ao avaliarem a deposição de EF em sementes F<sub>1</sub> do cruzamento de parentais tóxicas e não-tóxicas, viram que os teores de EF não são afetados pela fonte de grão de pólen, conduzindo a interpretação de que a biossíntese de EF está sob controle maternal. Em 2017, outro mapa de ligação genética, construído a partir de uma população F<sub>2</sub> de 92 indivíduos e usando 143 marcadores SSR, foi lançado por Amkul et al., (2017), e aqui, outro QTL relacionado à toxicidade no pinhão-manso foi identificado, mas agora no grupo de ligação 3. Em 2019, Trebbi et al., ao sequenciarem o genoma de plantas parentais tóxicas e não tóxicas, como também de 81 plantas F<sub>2</sub> oriundas do cruzamento dos parentais, identificaram mais dois marcadores SNP significativamente ligados a baixa toxicidade e localizados no grupo de ligação 8. Assim, de maneira geral, esses trabalhos trouxeram as principais descobertas, do ponto de vista genético, sobre a biossíntese dos EF.

Muito embora a rota bioquímica responsável pela formação dos EF permaneça desconhecida, alguns passos importantes estão reportados na literatura. De forma geral, geranilgeranilpirofosfato (GGPP) é precursor de todos os diterpenos conhecidos. Diversas enzimas, chamadas sintases de diterpenos (diTPS), podem atuar sobre GGPP para produzir uma variedade de esqueletos básicos de diterpenos, os quais são decorados com diferentes grupos químicos, proporcionando toda diversidade de diterpenóides que se conhece (ZERBE; BOHLMANN, 2015). Dentre as muitas diTPS de plantas, a sintase do casbano (EC: 4.2.3.8), uma diTPS monofuncional classe I (ZERBE; BOHLMANN, 2015) se destaca em Euphorbiaceae pela conversão de GGPP à casbano, um diterpeno bicíclico do tipo casbano, do qual se acredita derivar os demais esqueletos básicos dos diterpenos já reportados na família (CROMBIE et al., 1980) (Figura 3). Nos trabalhos publicados por Nascimento, (2017) e Soares, (2015), em *J. curcas* foi detectada a expressão de vários candidatos a sintase

do casbeno em raízes, e apenas um em folhas, enquanto Farias et al., (2020) reportaram, pela primeira vez, a identificação do produto proteico de sintase do casbeno, também nas raízes. Esse dado foi confirmado mais tarde por Almeida et al., (2021) via proteômica alvo-dirigida; nesse mesmo estudo não foi verificada diferença significativa na abundância dessa enzima entre genótipos com teores contrastantes de EF. Em 2016, duas pesquisas independentes, uma publicada por King et al., (2016), e outra por Luo et al., (2016), relataram os passos que levam à biossíntese do diterpenóide Jolkinol C (esqueleto tipo latirano; Figura 3A), em *J. curcas* (ANEXO AA) e *Euphorbia lathyris* L. (ANEXO AB), respectivamente. Inicialmente, casbeno deve sofrer oxidações sequenciais, especificamente nos carbonos 5, 6 e 9, por atividade de enzimas citocromo P450, o que favorece a formação de uma ligação intramolecular entre os carbonos 6 e 10. Dessa maneira, o bicíclico casbeno, passa à um tricíclico tipo latirano. A única diferença entre as propostas está na formação da ligação carbono-carbono 6-10, que em *E. lathyris* se diz ter o envolvimento de Álcool desidrogenase 1 (EC: 1.1.1.1), enquanto em *J. curcas*, foi colocado que é um passo espontâneo, não enzimático. Assim sendo, acredita-se que outras oxidações no esqueleto latirano leve a formação da ligação intramolecular carbono-carbono C5-C14, dando origem então ao esqueleto tetracíclico tigliano, aquele encontrado nos EF. Além disso, é esperado que enzimas aciltransferases estejam envolvidas na esterificação da porção ácido graxo. Diante de todas essas considerações, um estudo metabolômico não-alvo comparativo entre genótipos de pinhão-manso com teores contrastantes de EF, poderá detectar possíveis intermediários dessa rota, quer sejam exclusivos ou apresentem concentrações relativas significativamente diferentes entre dos genótipos, de modo a aprofundar nossa compreensão acerca da biossíntese de EF.

**Figura 3.** Estruturas moleculares de Jolkinol C e 12-*O*-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA). (A) Estrutura molecular do Jolkinol C. (B) Estrutura molecular do TPA



### 1.1.3 Métodos para a quantificação dos ésteres de forbol

A falta de padrões comerciais autênticos dos seis ésteres de forbol do pinhão-mansão, fez com que as suas determinações tenham sido realizadas indiretamente, por meio de equivalentes de um outro éster de forbol, o 12-*O*-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) (Figura 3B), isolado pela primeira vez de *Croton tiglium* e disponível comercialmente. O método que se estabeleceu é baseado em cromatografia líquida de alta performance (HPLC), com separação em coluna de fase reversa octadecilsilano (C18) e detecção à 280 nm, em que as áreas integradas do bloco de picos correspondente aos EF do pinhão-mansão, é comparada a área do padrão TPA (MAKKAR et al., 1997). Apesar de sua utilização para a quantificação dos EF do pinhão-mansão ser disseminada, esse método apresenta alguns problemas. Embora todos os seis isômeros absorvam bem luz próximo à 280 nm, o par de epímeros C<sub>4-5</sub> não absorve tão bem nessa faixa (KONGMANY et al., 2016); a integração das áreas referentes a todos os isômeros faz-se necessária porque é bastante difícil obter uma boa resolução entre os seis picos; se há coeluição com outros compostos, e esses também absorvem luz na faixa de 280 nm, não é possível eliminar essas substâncias interferentes (comum em tecidos pigmentados como folhas); finalmente, o TPA não apresenta banda máxima de absorção de luz em 280 nm, o que leva a uma superestimação do conteúdo de EF. Para minimizar este erro, um trabalho reportou o uso do comprimento de onda de 254 nm, banda em que tanto os EF de *J. curcas* quanto o TPA, possuem absorção semelhante (HERATH et al., 2017).

Mesmo com esses inconvenientes, esse método tem se mostrado consistente, reprodutível e com ótima linearidade em diferentes condições cromatográficas (tipos de coluna e fase móvel) (FARIA-MACHADO et al., 2019). Além disso, foi proposto um método de adição de padrão de EF, em que, inicialmente, deve-se obter uma fração purificada dos seis EF e depois adicioná-la em concentrações crescentes nos extratos de amostras, para construir uma curva de calibração. Dessa maneira, os valores alcançados, deixam de ser equivalentes de TPA, e passam à valores reais de EF (NEU; SCHOBBER; MITTELBAACH, 2018).

Além dos métodos baseados em HPLC-UV, métodos baseados em espectrometria de massas também estão disponíveis na literatura. Como vantagens, esses métodos são muitos mais sensíveis e problemas relacionados com a coeluição de compostos que não sejam isômeros de EF não impedem a análise. Baldini et al., (2014), conseguiram determinar os EF em extratos de folhas usando um método alvo-dirigido, ao monitorarem especificamente as



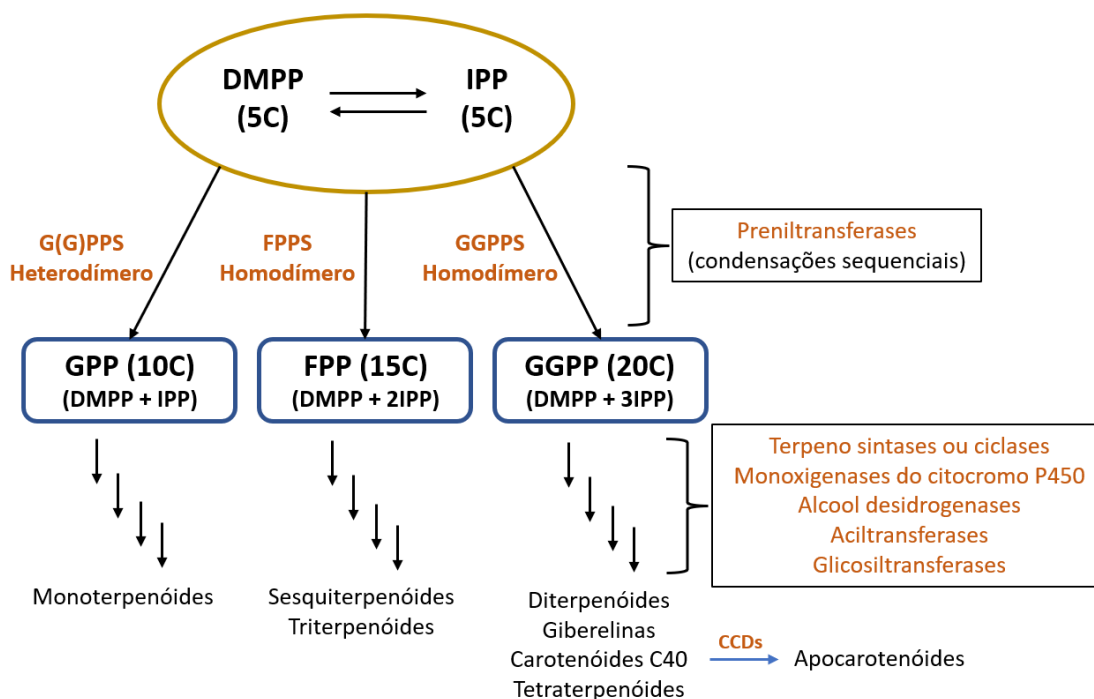
transições 695 >> 311, 677 >> 311 e 293 >> 265. Já, Verardo et al., (2019), conseguiram distinguir os diferentes EF do pinhão-mansão através dos perfis de fragmentação (MS/MS), porém, nesse trabalho, utilizaram um extrato de óleo, que é bem menos complexo do que extratos de folhas, sementes e raízes, por exemplo. Seria interessante, dessa maneira, um método LC-MS/MS não-alvo para determinação dos EF em matrizes complexas.

#### 1.1.4 Terpenóides

Para além dos EF, um conjunto interessante de outros produtos naturais isolados do pinhão-mansão foram caracterizados estruturalmente, dos quais, alguns apresentaram atividade biológica. Desse conjunto, os mais representativos em número pertencem as classes dos terpenóides e compostos fenólicos, sendo os primeiros, aqueles com maior número de estruturas determinadas (CAVALCANTE; DIEGO DA CONCEIÇÃO SANTOS; GUEDES DA SILVA ALMEIDA, 2020). De modo geral, os terpenóides, também conhecidos por isoprenóides, são distribuídos ubiquamente em todos os reinos da vida (GUILLAUME et al., 2019), e nas plantas, compreendem a classe de metabólitos secundários mais diversa, com mais de 25.000 estruturas identificadas (TISSIER; ZIEGLER; VOGT, 2015). Um esquema geral da biossíntese dos terpenóides é mostrado na Figura 4, em que, a adição sequencial de uma, duas ou três moléculas de isopentenilpirofosfato (IPP) ao iniciador dimetilalilpirofosfato (DMPP), por reação de acoplamento regular (cabeça-cauda), catalisada por preniltransferases específicas (CHANG; CHENG; WANG, 2021), produz os blocos de construção dos terpenóides, geranylpirofosfato (GPP; 10 carbonos), farnesilpirofosfato (FPP; 15 carbonos) e geranylgeranylpirofosfato (GGPP; 20 carbonos), respectivamente. Esses substratos, são então alvos de um diverso grupo de enzimas, chamadas terpeno sintases ou ciclases, que ciclizam essas moléculas de diferentes maneiras e geram esqueletos com um ou mais anéis (KARUNANITHI; ZERBE, 2019). Finalmente, esses *scaffold* podem ser modificados por oxidações seletivas, segundo atividade de monooxigenases da família citocromo P450. Esse ganho de funcionalidade, permite ainda a decoração dessas estruturas por metilação, alquilação, glicosilação, entre outras. Assim, esse vasto número de possibilidades de modificação dos esqueletos lineares, explica a grande diversidade de terpenóides existentes na natureza (MAFU; ZERBE, 2017).

Em *J. curcas*, destaca-se a subclasse dos diterpenóides, com 66 estruturas caracterizadas, onde incluem-se os EF (Tabela 1). Esses compostos estão distribuídos por toda planta, mas, as raízes têm se mostrado como principal repositório (Figura 5A). Além disso, esses diterpenóides compreendem seis tipos de esqueletos básicos, são eles: latirano, ramnofolano, premircinano, jatrolano, tigliano e podocarpano (Figura 5B). Outras classes de compostos também já foram isoladas e caracterizadas no pinhão-manso. A isso inclui-se mono, sesqui e triterpenos, lignanas, flavonoides, cumarinas e alcaloides, muitas delas com propriedades citotóxicas e antioxidantes, o que torna essa espécie interessante farmacologicamente (CAVALCANTE; DIEGO DA CONCEIÇÃO SANTOS; GUEDES DA SILVA ALMEIDA, 2020a).

**Figura 4.** Esquema geral da biossíntese de terpenóides. As unidades monoméricas de 5 carbonos DMPP e IPP são condensadas por enzimas preniltransferases específicas, para gerar esqueletos lineares de 10, 15 e 20 carbonos, respectivamente, geranylpirofosfato (GPP), farnesilpirofosfato (FPP) e geranylgeranylpirofosfato (GGPP). Essas moléculas, por sua vez, podem ser ciclizadas por terpeno sintases e serem modificadas por oxidação e adição de outros grupos químicos por enzimas Terpeno sintases, Monooxigenases do citocromo P450, Álcool desidrogenases, Aciltransferases e Glicosiltransferase



Fonte: Elaborada pelo autor.

**Tabela 1.** Diterpenóides isolados e caracterizados de *J. curcas*, com respectivos nomes, fórmula molecular, massa molecular, tipo de esqueleto diterpênicos, parte da planta de onde foram extraídos e a referência bibliográfica

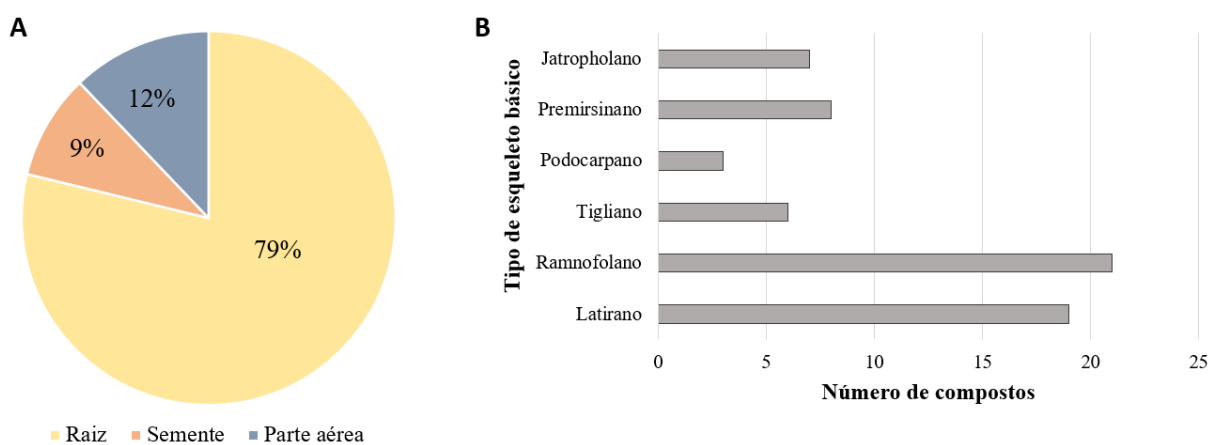
Número	Nome	Fórmula molecular	Massa monoisotópica	Órgão da planta	Esqueleto diterpênico	Referência bibliográfica
1	Jatrogrossidiona	C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> O <sub>3</sub>	312,1721	raiz	latirano	(LIU et al., 2015)
2	2-Epihidroxiisojatrogrossidion	C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O <sub>4</sub>	332,1982	raiz	latirano	(LIU et al., 2015)
3	2-Hidroxiisojatrogrossidion	C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O <sub>4</sub>	332,1982	raiz	latirano	(LIU et al., 2015)
4	Curcusona A	C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	296,1771	raiz	ramnofolano	(NAENGCHOMNONG et al., 1986)
5	Curcusona B	C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	296,1771	raiz	ramnofolano	(NAENGCHOMNONG et al., 1986)
6	Curcusona C	C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> O <sub>3</sub>	312,1721	raiz	ramnofolano	(NAENGCHOMNONG et al., 1986)
7	Curcusona D	C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> O <sub>3</sub>	312,1721	raiz	ramnofolano	(NAENGCHOMNONG et al., 1986)
8	Curcusona E	C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> O <sub>3</sub>	312,1721	raiz	ramnofolano	(CHIANESE et al., 2011)
9	Spirocurcasona	C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	296,1771	raiz	spiroramnofolano	(CHIANESE et al., 2011)
10	Fator Jatropha C1	C <sub>44</sub> H <sub>54</sub> O <sub>8</sub>	710,3813	semente	tigliano	(HAAS; STERK; MITTELBAACH, 2002)
11	Fator Jatropha C2	C <sub>44</sub> H <sub>54</sub> O <sub>8</sub>	710,3813	semente	tigliano	(HAAS; STERK; MITTELBAACH, 2002)
12	Fator Jatropha C3	C <sub>44</sub> H <sub>54</sub> O <sub>8</sub>	710,3813	semente	tigliano	(HAAS; STERK; MITTELBAACH, 2002)
13	Fator Jatropha C4	C <sub>44</sub> H <sub>54</sub> O <sub>8</sub>	710,3813	semente	tigliano	(HAAS; STERK; MITTELBAACH, 2002)
14	Fator Jatropha C5	C <sub>44</sub> H <sub>54</sub> O <sub>8</sub>	710,3813	semente	tigliano	(HAAS; STERK; MITTELBAACH, 2002)
15	Fator Jatropha C6	C <sub>44</sub> H <sub>54</sub> O <sub>8</sub>	710,3813	semente	tigliano	(HAAS; STERK; MITTELBAACH, 2002)
16	Heudelotinona	C <sub>18</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	268,1458	parte aérea	podocarpano	(RAVINDRANATH et al., 2004)
17	Jatrophalactama	C <sub>20</sub> H <sub>29</sub> NO <sub>3</sub>	331,2142	raiz	lactama latirano	(WANG et al., 2009)
18	Jatrophalactona	C <sub>20</sub> H <sub>26</sub> O <sub>5</sub>	346,1774	raiz		(LIU et al., 2012)
19	Jatrophadacetona	C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> O <sub>3</sub>	312,1721	raiz	ramnofolano	(LIU et al., 2012)
20	Jatrophodiona A	C <sub>20</sub> H <sub>26</sub> O <sub>4</sub>	330,1825	parte aérea	premirsinano	(XU et al., 2011)

21	Jatrowediol	$C_{20}H_{30}O_4$	334,2138	raiz	latirano	(LIU et al., 2015)
22	Isojatrogrossidion	$C_{20}H_{28}O_3$	316,2033	raiz	latirano	(LIU et al., 2015)
23	2- <i>epi</i> -isojatrogrossidion	$C_{20}H_{28}O_3$	316,2033	raiz	latirano	(LIU et al., 2015)
24	15- <i>O</i> -acetil-15- <i>epi</i> -(4E)-jatrogrossidentadion	$C_{22}H_{30}O_5$	374,2087	parte aérea	latirano	(RAVINDRANATH et al., 2004)
25	(14E)-14- <i>O</i> -acetil-5,6-epoxijatrogrossidentadion	$C_{22}H_{30}O_4$	358,2138	parte aérea	latirano	(RAVINDRANATH et al., 2004)
26	3 $\beta$ -acetoxi-12-metoxi-13-metil-podocarpa- 8,11,13-trien-7-one	$C_{21}H_{28}O_4$	344,1982	parte aérea	podocarpano	(RAVINDRANATH et al., 2004)
27	3 $\beta$ ,12-dihidroxi-13-metilpodocarpano-8,10,13-triene	$C_{18}H_{26}O_2$	274,1927	parte aérea	podocarpano	(RAVINDRANATH et al., 2004)
28	Jatrophalona	$C_{20}H_{26}O_4$	330,1825	raiz	jatrofolano	(LIU et al., 2012)
29	Latiranlactona	$C_{20}H_{28}O_4$	332,1982	raiz	latirano	(LIU et al., 2015)
30	Jatrocurcasenona A	$C_{20}H_{26}O_4$	330,1825	raiz	latirano	(LIU et al., 2015)
31	Jatrocurcasenona B	$C_{20}H_{26}O_5$	346,1774	raiz	latirano	(LIU et al., 2015)
32	Jatrocurcasenona C	$C_{20}H_{28}O_3$	316,2032	raiz	latirano	(LIU et al., 2015)
33	Jatrocurcasenona D	$C_{20}H_{26}O_3$	314,1876	raiz	latirano	(LIU et al., 2015)
34	Jatrocurcasenona E	$C_{20}H_{26}O_4$	330,1825	raiz	latirano	(LIU et al., 2015)
35	Jatrocurcasenona F	$C_{21}H_{25}O_5$	357,1707	raiz	latirano	(HUANG et al., 2021)
36	Jatrocurcasenona G	$C_{21}H_{32}O_4$	348,2295	raiz	latirano	(HUANG et al., 2021)
37	Jatrocurcasenona H	$C_{20}H_{26}O_5$	346,1774	raiz	latirano	(HUANG et al., 2021)
38	Jatrocurcasenona I	$C_{20}H_{26}O_3$	314,1876	raiz	latirano	(HUANG et al., 2021)
39	Jatrophodiona B	$C_{20}H_{28}O_3$	316,2032	raiz	premirsinano	(LIU et al., 2015)
40	Jatrophodiona C	$C_{20}H_{28}O_3$	316,2032	raiz	premirsinano	(LIU et al., 2015)
41	Jatrophodiona D	$C_{20}H_{26}O_2$	298,1927	raiz	premirsinano	(LIU et al., 2015)
42	jatrophodiona E	$C_{20}H_{26}O_2$	298,1927	raiz	premirsinano	(LIU et al., 2015)
43	2-hidroxi-3-dehidroxicaniojana	$C_{20}H_{24}O_5$	344,1618	raiz	ramnofolano	(YANG et al., 2013)
44	Jatrocurcadiona A	$C_{20}H_{26}O_3$	314,1876	parte aérea	premirsinano	(BAO et al., 2015)
45	Jatrocurcadiona B	$C_{22}H_{28}O_4$	356,1982	parte aérea	premirsinano	(BAO et al., 2015)
46	<i>Epi</i> -jatrophol	$C_{20}H_{24}O_3$	312,1721	casca da raiz	jatrofolano	(ZHANG et al., 2012)

47	Jatrophaldeido	$C_{20}H_{22}O_3$	310,1563	casca da raiz	jatrofolano	(ZHANG et al., 2012)
48	<i>Epi</i> -jatrophaldeido	$C_{20}H_{22}O_3$	310,1563	casca da raiz	jatrofolano	(ZHANG et al., 2012)
49	Curcusecona A	$C_{20}H_{24}O_5$	344,1624	raiz	<i>seco</i> -ramnofolano	(LIU et al., 2013)
50	Curcusecona B	$C_{20}H_{24}O_3$	312,1721	raiz	<i>seco</i> -ramnofolano	(LIU et al., 2013)
51	Curcusecona C	$C_{21}H_{28}O_3$	328,2033	raiz	<i>seco</i> -ramnofolano	(LIU et al., 2013)
52	Curcusecona D	$C_{20}H_{24}O_3$	312,1721	raiz	<i>seco</i> -ramnofolano	(LIU et al., 2013)
53	Curcusecona E	$C_{20}H_{24}O_3$	312,1721	raiz	<i>seco</i> -ramnofolano	(LIU et al., 2013)
54	Curcusona F	$C_{21}H_{28}O_3$	328,2033	raiz	ramnofolano	(LIU et al., 2013)
55	Curcusona G	$C_{20}H_{26}O_4$	330,1826	raiz	ramnofolano	(LIU et al., 2013)
56	Curcusona H	$C_{20}H_{24}O_3$	312,1721	raiz	ramnofolano	(LIU et al., 2013)
57	Curcusona I	$C_{20}H_{26}O_3$	314,1876	raiz	ramnofolano	(LIU et al., 2013)
58	Curcusona J	$C_{20}H_{26}O_3$	314,1876	raiz	ramnofolano	(LIU et al., 2013)
59	4- <i>epi</i> -curcusona E	$C_{20}H_{24}O_3$	312,1721	raiz	ramnofolano	(LIU et al., 2013)
60	3-Dehidroxi-2- <i>epi</i> -caniojana	$C_{20}H_{24}O_4$	328,1671	raiz	ramnofolano derivados	(LIU et al., 2013)
61	Jatrophadictona A	$C_{20}H_{24}O_4$	328,1669	raiz	ramnofolano	(HUANG et al., 2020)
62	18-hidroxijatrophadictona	$C_{20}H_{24}O_4$	328,1602	raiz	ramnofolano	(HUANG et al., 2020)
63	2- <i>epi</i> -macroripremirsinona A	$C_{20}H_{28}O_4$	332,1916	raiz	premirsinano	(HUANG et al., 2020)
64	7 $\beta$ -hidroxijatropholona A	$C_{20}H_{24}O_3$	312,1652	raiz	jatrofolano	(HUANG et al., 2020)
65	7 $\beta$ -hidroxijatropholona B	$C_{20}H_{24}O_3$	312,1652	raiz	jatrofolano	(HUANG et al., 2020)
66	Acetoxijatropholona	$C_{22}H_{26}O_4$	354,1831	raiz	jatrofolano	(CHIANESE et al., 2011)

**Fonte:** Elaborada pelo autor a partir das referências bibliográficas explicitadas.

**Figura 5.** Distribuição dos diterpenóides isolados de *J. curcas* de acordo com a parte da planta de onde foram extraídos e tipo de esqueleto básico



**Fonte:** Elaborada pelo autor a partir dos dados mostrados na Tabela 1.

### 1.1.5 Compostos fenólicos

Depois dos terpenóides, os compostos fenólicos são a classe de produtos naturais com maior número de estruturas caracterizadas em *J. curcas*, com destaques para lignanas e flavonoides (CAVALCANTE; DIEGO DA CONCEIÇÃO SANTOS; GUEDES DA SILVA ALMEIDA, 2020). Na natureza, essa classe de produtos naturais, compõem uma miríade de metabólitos produzidos a partir do metabolismo secundário, que em plantas são derivados em sua maioria de *L*-fenilalanina. À essa gama de compostos se atribui grande parte do sucesso das plantas vasculares no ambiente terrestre, por seu papel estrutural nas paredes celulares, como toxinas e, pigmentos depositados em estruturas florais para atrair polinizadores, são exemplos de funções dos compostos fenólicos na biologia das plantas (CHEYNIER et al., 2013). São, desde compostos simples, como o ácido gálico, até grandes polímeros como as ligninas.

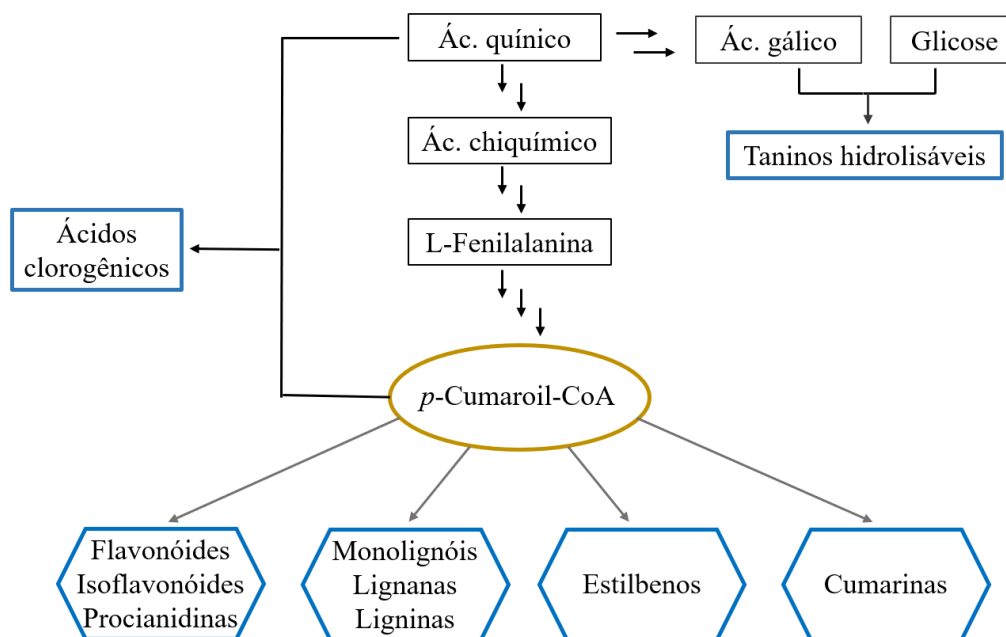
Majoritariamente, os compostos fenólicos são derivados da via dos fenilpropanóides, com poucas exceções, como é o caso dos taninos hidrolisáveis. Ainda que os compostos fenólicos sejam encontrados em todas as partes da planta, a distribuição espaço-temporal desses metabólitos segue um rígido controle. Exemplos dessa variação foram mostrados recentemente para 11 cultivares de *Zamthixylum bungeanum* (ZHANG et al., 2023). Um resumo das rotas de biossíntese de compostos fenólicos é mostrado na Figura 6. Como pode ser visto, *p*-cumaroil-CoA tem papel central, servindo de substrato para diversas enzimas que direcionam seu fluxo para diferentes subclasses de compostos fenólicos (Figura 6).

Em *J. curcas*, entre lignanas e neolignanas, foram caracterizados 10 compostos, todos isolados de sementes e com propriedades antioxidantes (LI et al., 2014; SUZUKI et al., 2016). Esses compostos são formados a partir do acoplamento oxidativo/dimerização das formas tautoméricas de monolignóis, principalmente do álcool coniferil radical, gerado pela atividade de peroxidases e lacases (ZÁLEŠÁK; BON; POSPÍŠIL, 2019). O acoplamento pode ser intermediado por *Dirigents Proteins* (DIR), proteínas que não possuem atividade catalítica propriamente dita, mas orientam as reações de maneira estereosseletiva, ou pode ocorrer espontaneamente sem interferência de proteínas (PANIAGUA et al., 2017). Sob dependência dos átomos envolvidos na ligação de acoplamento dos tautômeros radicalares, esses compostos são classificados em lignanas ou neolignanas. Por definição, lignanas possuem acoplamento C8-C8', enquanto nas neolignanas, a dimerização pode ocorrer por quaisquer ligações alternativas (LI et al., 2018).

Por outro lado, cinco flavonoides foram isolados do pinhão-mansão, sendo um de raiz, um do caule e três de folha (CAVALCANTE; DIEGO DA CONCEIÇÃO SANTOS; GUEDES DA SILVA ALMEIDA, 2020). A porta de entrada para as vias que levam à biossíntese dos flavonoides é catalisada por Chalcona sintase [EC 2.3.1.74] (LIU et al., 2021a), que combina três moléculas de malonil-CoA e quatro de *p*-cumaroil-CoA para formar naringenina chalcona. Esse composto, além de originar o subgrupo das chalconas, conhecidas como flavonoides de cadeia aberta, é o intermediário obrigatório das demais subclasses de flavonoides como flavanonas, dihidroflavonois, isoflavonóides, flavonas, flavonóis, flavan-3,4-diois e flavan-3-ol (DIAS et al., 2021). Além disso, a glicosilação de esqueletos flavan-3-ol, leva à formação das antocianinas. Todos os flavonoides possuem o *scaffold* comum representado por C6-C3-C6, em que dois anéis benzenos são unidos por uma ponte de três carbonos.

Diante disso, uma análise metabolômica baseada em cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas, pelo seu poder de analisar diversos metabólitos de diferentes classes químicas num único experimento, além da possibilidade de quantificação relativa entre diferentes grupos de amostras permitirá não apenas caracterizar os genótipos HPE e LPE em relação a biossíntese e distribuição de EF, como também estudar potenciais diferenças em outras classes de metabólitos entre os genótipos, tecidos e estágios de desenvolvimento.

**Figura 6.** Visão geral da biossíntese de compostos fenólicos. L-fenilalanina, formada a partir da rota do ácido chiquímico pode sofrer modificações para originar *p*-cumaroil-CoA. Esse metabólito tem papel central na biossíntese de compostos fenólicos, sendo o precursor de uma variedade enorme deles que compreendem diversas classes, como flavonóides, lignanas, chalconas, estilbenos e cumarinas. Além disso, *p*-cumaroil-CoA e moléculas estruturalmente semelhantes, como feruloil-CoA e cafeoil-CoA podem ser combinadas com o ácido quínico para originar os ácidos clorogênicos. Outro grupo de compostos fenólicos são os taninos hidrolisáveis, formados pela combinação de ácido gálico e glicose.



**Fonte:** Elaborado pelo autor.

### 1.1.6 Metabolômica não-alvo e suas contribuições na biologia de plantas

Uma análise metabolômica não-alvo, é uma abordagem analítica em que se busca detectar e quantificar relativamente o máximo de metabólitos (entende-se aqui como sendo pequenas moléculas com massa molecular  $\leq 1.500$  Da) presentes numa amostra. Um fluxo de trabalho geral de uma análise metabolômica não-alvo é ilustrado na Figura 7. Das plataformas analíticas capazes de realizar análise metabolômica não-alvo, tem notório destaque a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (LC-HRMS) (WOLFENDER et al., 2019). Em que, num primeiro momento, o extrato complexo é fracionado por cromatografia líquida (LC), e à medida que os analitos eluem da coluna, são ionizados e ingressam no espectrômetro de massas. Em equipamentos de espectrometria de massas sequencial (no tempo e no espaço), no primeiro estágio da análise por espectrometria de massas ( $MS^1$ ), é feita uma leitura de massa em alta resolução e precisão de íons numa faixa de  $m/z$  pré-estabelecida. Em seguida, íons selecionados (dependente do modo de aquisição



dos dados) são fragmentados numa câmara de colisão, para obtenção dos espectros de fragmentação ( $MS^2$ ). Os dados de  $MS^1$  representam a massa exata dos compostos e são bastante importantes na determinação das fórmulas moleculares, enquanto os dados de  $MS^2$  são utilizados na anotação estrutural.

Dentre as vantagens da técnica LC-MS/MS, destaca-se especialmente sua alta sensibilidade, o que requer pequenas quantidades de amostra e a possibilidade de detectar metabólitos que estejam em baixas concentrações no extrato. Junta-se a isso, a capacidade de detecção numa ampla faixa de massa sem a necessidade de derivatização de compostos polares (como realizado na técnica de cromatografia gasosa hifenada à espectrometria de massas), e de analisar metabólitos de diferentes polaridades simultaneamente. Além disso, o volume bastante grande de informação coletada, contribui significativamente no entendimento da relação entre a função de tecidos e vias bioquímicas. Das limitações, mas que não é inerente da técnica LC-MS/MS, e sim relacionado ao preparo da amostra, não há ainda um método capaz de extrair metabólitos de todas as classes químicas conhecidas com a mesma eficiência (MUSHTAQ et al., 2014). Outra limitação, diz respeito ao baixo número de metabólitos anotados por similaridade entre os espectros de  $MS^2$  experimentais e aqueles contidos nas bibliotecas espectrais. Por conta disso, muitos trabalhos de metabolômica, principalmente metabolômica de plantas, reportam um grande número *features*, termo em inglês usado para designar um sinal formado por um tempo de retenção, uma massa exata, e que está ausente no branco de extração, mas que não necessariamente representa um metabólito específico, podendo ser artefatos do mesmo metabólito, picos de isótopos ou artefatos. Esse fato é justificado pela baixa representatividade das bibliotecas de espectros, que ainda não cobrem a maioria dos metabólitos existentes na natureza; pelos diferentes métodos de fragmentação (CID, HCD, ECD, por exemplo) e intensidades de energia de colisão que podem ser aplicadas, que produzem diferentes perfis de fragmentação de um mesmo metabólito, ou ainda, pela *feature* simplesmente se tratar de artefatos que se formam durante o preparo e análise dos extratos (SINDELAR; PATTI, 2020).

**Figura 7.** Fluxo de trabalho comum de uma análise metabolômica não-alvo baseada em cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS). (1) Definição do desenho experimental. (2) Preparo e coleta de amostras de acordo com desenho experimental de cada estudo, isso envolve resumidamente amostragem e extração dos metabólitos. (3) Análise dos extratos por LC-MS/MS, para aquisição dos cromatogramas de íons, espectros de massa dos íons precursores ( $MS^1$ ) e respectivos espectros de fragmentação ( $MS^2$ ). (4) Processamento dos dados brutos por softwares dedicados a detecção de *features*, anotação de metabólitos, construção de redes moleculares e quantificação por métodos estatísticos uni e multivariados, de modo que informações biológicas relevantes sejam alcançadas



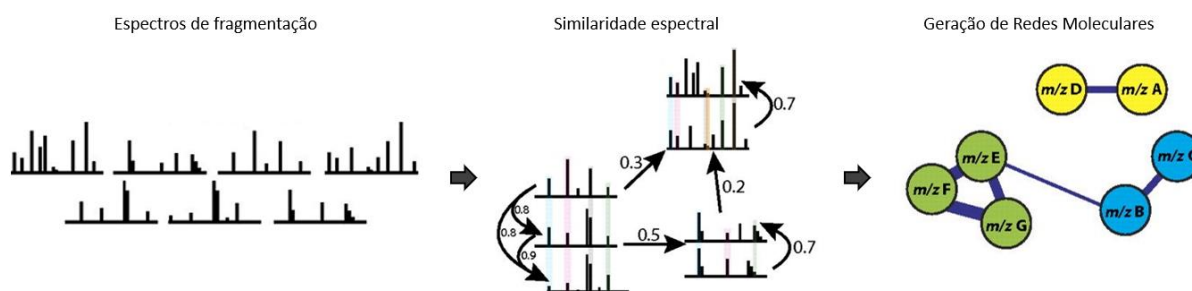
**Fonte:** Elaborada pelo autor.

O enorme volume de dados coletados por essas plataformas, aliado a alta complexidade, exige ferramentas computacionais capazes de processar os espectros de massa, de tal maneira, que informações biológicas relevantes sejam acessadas (Figura 7, passo 4). O processamento dos espectros inclui etapas, por exemplo, de eliminação de ruído, reconstrução dos cromatogramas de íons extraídos, desconvolução de sinais, alinhamento de cromatogramas, filtragem de sinais com base numa amostra branco, anotação dos metabólitos por correspondência espectral contra uma biblioteca, visualização dos resultados, entre outras. Para isso, vários pacotes de softwares estão disponíveis, onde incluem-se tanto programas disponíveis gratuitamente como MS-DIAL (TSUGAWA et al., 2015) MZmine (SCHMID et al., 2023) e XCMS (TAUTENHAHN et al., 2012), quanto comerciais como Compound Discoverer™ (Thermo Fisher Scientific). Para quantificação relativa, ainda que o MS-DIAL possua alguns módulos destinados a análise estatística, o MetaboAnalyst (PANG et al.,

2022a), disponível gratuitamente *on-line*, é um dos recursos mais usados para esse fim. Existem ainda, vários softwares que realizam anotação *in silico* dos metabólitos, por pesquisa em bases de dados de estruturas, como o SIRIUS (DÜHRKOP et al., 2019) e o MS-FINDER (TSUGAWA et al., 2016), sendo esta, uma alternativa para aumentar o número de anotações, ou pelo menos fazer ontologia de classe química.

De modo a enriquecer as análises metabolômicas, os arquivos de saída dos softwares que realizam o processamento dos espectros, podem ser usados para construção de redes moleculares. Atualmente, isso é possível gratuitamente usando a plataforma *on-line* do *Global Natural Products Social Molecular Networking* (GNPS) (<https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/static/gnps-splash.jsp>) (WANG et al., 2016). Por essa abordagem, é possível agrupar metabólitos anotados, ou simplesmente *features*, em “famílias moleculares” por semelhança dos seus espectros de fragmentação. Na representação gráfica das redes, os nós representam os metabólitos, os quais são unidos por arestas quando determinado nível de similaridade espectral é atingido (Figura 8). Um aspecto muito positivo dessa ferramenta, é que uma *feature* pode estar unida por uma aresta à um metabólito anotado, e assim, a descoberta de novas moléculas num grande conjunto de dados é facilitada. Um modelo específico de rede molecular, chamado *Feature-Based Molecular Networking* (FBMN) (NOTHIAS et al., 2020), vem sendo explorado e mostrando-se bastante útil em análises metabolômicas não-alvo, decorrente da inclusão dos dados quantitativos na rede molecular e da possibilidade de manter isômeros em nós distintos.

**Figura 8.** Criação de redes moleculares a partir de espectros de fragmentação de metabólitos.



Fonte: Adaptado de [Jeramie Watrous et al., \(2012\)](#)

Por meio de análise metabolômica, Zhao et al., (2022), ao estudarem a distribuição espacial de diterpenóides macrocíclicos, com esqueletos dos tipos ingenano e latirano em *Euphorbia lathyris*, determinaram que esses compostos são acumulados principalmente em raízes e sementes, e que o padrão de esterificação difere entre os dois órgãos. Esses resultados guiaram ainda um estudo de transcriptômica, onde foi possível identificar diversos transcritos relacionados com biossíntese e transporte desses diterpenóides. Já, Czechowski et al., (2018), foram capazes de correlacionar os níveis contrastantes de artemisinina e metabólitos relacionados entre dois quimiotipos de *Artemisia annua*, com a expressão de transcritos envolvidos na rota biossintética. Enquanto, Mannocho-Russo et al., (2022) realizaram uma investigação quimiotaxonômica da família Malpigiaceae, e ao alinharem ferramentas de análise metabolômica e de filogenia, conseguiram identificar famílias moleculares exclusivas de alguns gêneros. Assim, a integração de diversas ferramentas aplicadas as análises metabolômicas, vem trazendo valiosas contribuições no entendimento da biologia vegetal nos últimos anos.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Estudar o padrão de deposição dos ésteres de forbol e seus precursores e comparar o metaboloma de diversos tecidos e estágios de desenvolvimento dos genótipos de pinhão-manso HPE e LPE.

### 2.2 Objetivos específicos

- Determinar o teor de ésteres de forbol nas sementes maduras dos genótipos HPE e LPE;
- Estudar o efeito da enxertia entre os genótipos HPE e LPE no acúmulo de ésteres de forbol nas sementes maduras de plantas enxertadas;
- Determinar o padrão de deposição dos EF em tecidos de frutos em desenvolvimento dos genótipos HPE e LPE;
- Aplicar uma abordagem metabolômica não-alvo para comparar o padrão de deposição de metabólitos em folhas e raízes de plantas jovens dos genótipos HPE e LPE cultivados em sistema hidropônico;
- Aplicar uma abordagem metabolômica não-alvo para comparar o padrão de deposição de metabólitos em tecidos isolados de frutos em desenvolvimento dos genótipos HPE e LPE de pinhão-manso.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Material vegetal

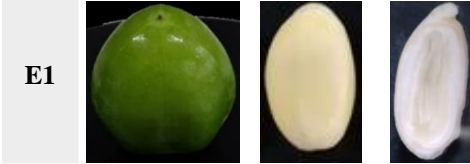
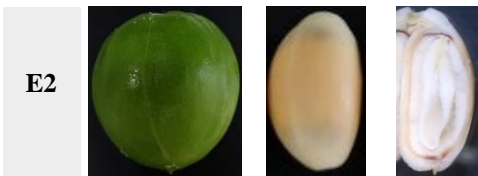



Todos os estudos foram realizados com dois genótipos de pinhão-manso com níveis contrastantes de EF, para os quais, existem depósitos no herbário Prisco Bezerra da Universidade Federal do Ceará, com números 62156 (chamado genótipo HPE) e 62157 (chamado genótipo LPE), ambos identificados como *Jatropha curcas* L.

Sementes maduras foram inicialmente utilizadas para caracterização dos genótipos HPE e LPE quanto ao acúmulo de EF. A seguir, estacas de ambos os genótipos, conseguidas com um colaborador, foram utilizadas para propagação das plantas na área experimental do Setor de Agricultura/Departamento de Fitotecnia/Universidade Federal do Ceará. Após o primeiro ciclo produtivo, sementes maduras sem a testa foram novamente utilizadas para determinação do teor de EF. Dessas plantas foram colhidos frutos em cinco estágios de desenvolvimento, como também sementes maduras para os experimentos descritos a seguir.

##### 3.1.1 Obtenção e caracterização dos tecidos de frutos em desenvolvimento

O padrão de deposição de EF foi avaliado nos frutos de ambos os genótipos em cinco estágios de desenvolvimento, denominados de E1, E2, E3, E4 e E5 (Quadro 1), com base na escala proposta por Shah, (2014). Após a coleta do material em campo, os frutos foram refrigerados à uma temperatura de ~4 °C e posteriormente dissecados em pericarpo, testa, tegma e endosperma. O isolamento dos tecidos de semente ocorreu em lupa Olympus modelo SZ2-ILST com auxílio de espátula e pinça, com transferência imediata para tubos imersos em gelo. Em seguida, os tecidos foram congelados e postos para liofilizar em liofilizador LIOTOP modelo L101.

**Quadro 1.** Caracterização morfológica de frutos de pinhão-manso em cinco estágios de desenvolvimento, denominados E1, E2, E3, E4 e E5

Frutos em desenvolvimento	Descrição
<p><b>E1</b></p> 	<p>Pericarpo verde intenso. As sementes possuem a testa branca em ambas as camadas e sem indício de lignificação, tegma espesso e o endosperma está no início do processo de celularização, mas já envolve todo o embrião e, suas primeiras camadas celularizadas já atingem a extremidade calazal, enquanto o embrião ainda é cordiforme.</p>
<p><b>E2</b></p> 	<p>Pericarpo verde intenso. A camada externa da testa permanece branca e maleável, enquanto a camada interna está no início da lignificação e apresenta coloração marrom nas extremidades micropilar e calazal. O tegma nesse estágio, cerca de 50% já foi digerido durante o processo de morte celular programada, e o endosperma aproximadamente dobrou de tamanho e, o embrião é cotiledonar.</p>
<p><b>E3</b></p> 	<p>Pericarpo ainda verde. A camada externa da testa permanece branca e maleável, enquanto a camada interna está completamente marrom e lignificada. O tegma foi cerca de 90% consumido e as poucas camadas de células remanescentes estão comprimidas junto a testa em razão do crescimento do endosperma, que já apresenta os primeiros aspectos de acúmulo de óleo. Aqui, o crescimento dos cotilédones já atinge a porção central da semente.</p>
<p><b>E4</b></p> 	<p>Pericarpo amarelo. Nas sementes, as camadas externa e interna da testa estão lignificadas e escuras. O tegma permanece como uma fina película comprimida entre o endosperma e a testa. O endosperma toma a maior parte do interior da semente, enquanto os cotilédones embrionários concluíram o crescimento, chegando próximo da extremidade calazal.</p>
<p><b>E5</b></p> 	<p>Pericarpo marrom e está nas fases finais de senescência. Enquanto a semente, em relação ao estágio anterior, está apenas mais desidratada.</p>

Fonte: Elaborado pelo autor.

Na sequência, os tecidos tegma e endosperma foram macerados em almofariz, enquanto o pericarpo e a testa foram moídos em moedor de café Cadence digrano modelo MDR302, em que apenas a fração mais fina aderida a tampa foi coletada. Após a obtenção do pó fino, as amostras foram transferidas para tubos plásticos e armazenados em freezer à -20 °C para posterior extração dos metabólitos.

### *3.1.2 Obtenção de sementes maduras de plantas enxertadas*

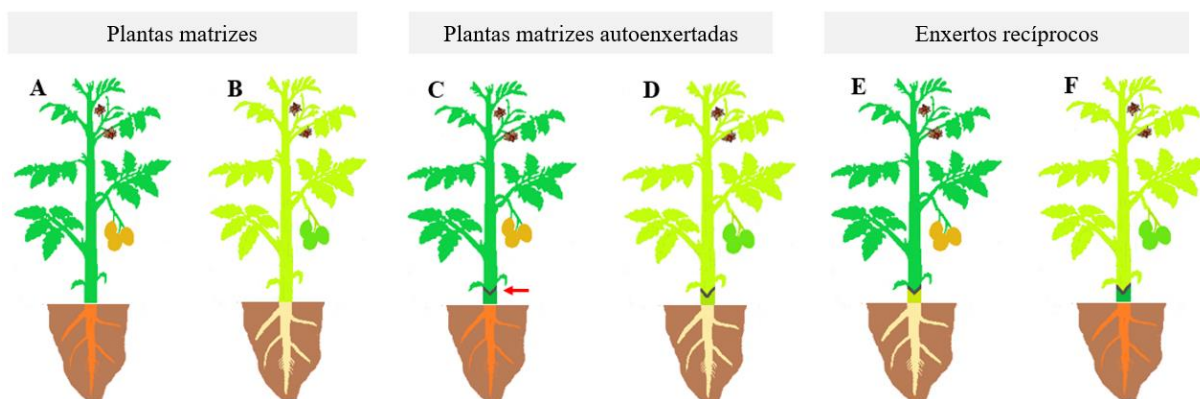
Para a análise do acúmulo de EF em sementes maduras de plantas enxertadas, sementes de ambos os genótipos foram postas para germinar em substrato contendo areia lavada e serrapilheira decomposta, na proporção 2:1. Ao atingirem 15 dias após a emergência, as plantas foram submetidas ao procedimento de enxertia (MUDGE et al., 2009). Primeiro, foi realizado um corte transversal, aproximadamente 1 cm abaixo das folhas cotiledonares. No porta-enxerto (cavalo), o corte longitudinal no centro do caule teve aproximadamente 1 cm de profundidade. A base do caule do enxerto (cavaleiro) foi cortada em bisel duplo, na forma de “V”. As duas partes foram encaixadas, seladas com fita adesiva porosa e as folhas destacadas, mantendo-se apenas as folhas imaturas próximas ao meristema apical.

As plantas recém enxertadas foram mantidas por duas semanas em câmara úmida no laboratório, depois foram levadas à casa de vegetação, onde permaneceram por 1,5 meses, e posteriormente transplantadas para o campo. Além dos enxertos recíprocos, dois grupos controles foram adicionados. Um formado por plantas não enxertadas (plantas matrizes), e outro formado por plantas autoenxertadas de ambos os genótipos. Na Figura 9 é mostrado um esquema de cada um dos grupos de plantas.

Logo na primeira safra, que ocorreu aproximadamente um ano após o transplântio, as sementes maduras foram colhidas. Após a remoção da testa, o grão restante (*kernel*), composto por tegma, endosperma e embrião foi fragmentado em pequenos pedaços e liofilizado. Seguindo-se com maceração em almofariz, o pó foi adquirido será transferido para tubos plásticos e armazenado em freezer -20 °C para posterior extração de metabólitos.



**Figura 9.** Esquema dos diferentes grupos de plantas do experimento com plantas enxertadas. **A.** Plantas matrizes do genótipo 62156 (HPE). **B.** Plantas matrizes do genótipo 62157 (LPE). **C.** Plantas autoenxertadas do genótipo HPE. **D.** Plantas autoenxertadas do genótipo LPE. **E.** Plantas enxertadas, em que o enxerto é oriundo do genótipo HPE, e o porta-enxerto do genótipo LPE. **F.** Plantas que correspondem aos enxertos recíprocos das plantas esquematizadas em **E.** A seta vermelha em **C** indica o local da enxertia



**Fonte:** Elaborada pelo autor.

### 3.1.3 Obtenção de folhas e raízes

O estudo comparativo entre folhas e raízes dos genótipos HPE e LPE, foi realizado com plantas jovens cultivadas em casa de vegetação. Para facilitar a coleta das raízes e reduzir as contaminações advindas de substratos sólidos, as plantas foram cultivadas em sistema hidropônico (YAMADA et al., 2018). Sementes colhidas das plantas matrizes, foram colocadas para germinar em recipientes plásticos contendo areia lavada. Passados 7 dias após a emergência, as plântulas foram transferidas para vasos de 4L contendo solução nutritiva adaptada de Hoagland e Arnon, (1950),  $\frac{1}{4}$  da força (duas plantas por vaso). O pH da solução nutritiva foi monitorado diariamente e ajustado para 6 quando necessário. A partir da segunda semana, a concentração da solução nutritiva foi aumentada para  $\frac{1}{2}$  da força, havendo trocas semanais, até completados 45 dias de cultivo. Os sais que compuseram a solução nutritiva, e suas respectivas concentrações, são mostradas na Tabela 2.

No ato da coleta, as folhas e raízes foram lavadas em água destilada e congeladas para liofilização. O material desidratado foi macerado e guardado em tubos plásticos e armazenado em freezer  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  para posterior extração dos metabólitos.

**Tabela 2.** Composição da solução nutritiva utilizada no cultivo hidropônico de plantas de pinhão-mansão

Sais de macronutrientes	Massa molecular	Concentração estoque (M)	1/2 da força (mL.L <sup>-1</sup> )	1/4 da força (mL.L <sup>-1</sup> )
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	236,15	1	1,25	0,625
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	174,18	1	0,5	0,25
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	246,48	1	0,5	0,25
KNO <sub>3</sub>	101,1	1	2,5	1,25
KCl	74,56	1	0,25	0,5
Fe-EDTA		1	0,5	0,25
Sais de micronutrientes				
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	61,83	0,04		
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	197,9	0,009		
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	249,68	0,003	0,5	0,25
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	287,54	0,007		
NaMoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	241,95	0,0001		

Fonte: Adaptada de Hoagland e Arnon 1950

### 3.2 Extração dos metabólitos

Para todos os estudos foram utilizadas três réplicas biológicas de cada grupo de amostras. Os metabólitos foram extraídos segundo o protocolo proposto por He et al., (2011). Foram pesados 100 mg de cada amostra e adicionados 1,5 mL da solução de extração (*n*-heptano/propan-2-ol na proporção 3:2). A mistura foi agitada vigorosamente em vórtex por 30 s e mantida sob agitação por 1 h em mesa agitadora. Em seguida, foi centrifugada por 20 min a temperatura ambiente e 1.300 x g. O sobrenadante foi coletado e transferido para um novo tubo. Foram realizadas mais duas lavagens do *pellet*, uma com a solução de *n*-heptano/propan-2-ol (3:2) e uma última com apenas propan-2-ol. Os sobrenadantes combinados tiveram os solventes evaporados em concentrador *Eppendorf* sob vácuo e temperatura de 30 °C. O extrato resultante foi solubilizado em 500 µL de *n*-heptano, ao qual, igual volume de acetonitrila (ACN) foi adicionado. A mistura foi agitada vigorosamente em vórtex e em seguida centrifugada por 15 min à temperatura ambiente e 500 x g. A fase de cima (*n*-heptano) foi descartada e esse passo repetido. Por fim, a fase de baixo (ACN), foi transferida para novo microtubo de 1,5 mL, previamente pesado em balança de alta precisão e seca nas condições descritas acima. Na sequência, o tubo contendo o extrato livre de solvente foi novamente pesado para quantificação do extrato bruto. Esse extrato foi solubilizado em de

ACN 70% para uma concentração aproximada de 5  $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ , centrifugado à 12.000 x g à temperatura ambiente por 10 min e usado para análises subsequentes.

### 3.3 Determinação dos ésteres de forbol por HPLC-DAD

Um volume de 50  $\mu\text{L}$  dos extratos na concentração de 5  $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ , foram analisados em HPLC Jasco equipado com coluna analítica Gemini C18 Phenomenex (250 x 4,6 mm; tamanho de partícula de 5  $\mu\text{m}$ , e poro de 110 Å), mantida à 40 °C sob uma vazão de 0,7  $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ . O padrão de eluição deu-se segundo um gradiente linear de 80 à 90% de fase B em 15 min, seguido de 90 à 98% de B em 7 min, e finalizando com fluxo isocrático de 98% de B por 13 min. A fase móvel foi constituída por  $\text{H}_2\text{O}$  (fase A), e ACN (fase B), ambas com 0,1% de TFA. Os dados foram adquiridos numa faixa de comprimento de onda de 200 à 700 nm, e os cromatogramas para visualização dos EF foram plotados à 280 nm. A identificação dos picos correspondentes aos ésteres de forbol foi feita pela análise dos espectros de absorção de luz e pelo padrão de eluição, já bem documentados na literatura. Além disso, o contraste desses picos entre os dois genótipos de pinhão-manso deu maior seguridade na identificação. A quantificação foi feita pela integração da área do bloco de picos referentes aos isômeros de EF à 254 nm, e comparação com uma curva de calibração do padrão TPA.

### 3.4 Análise dos extratos por LC-MS/MS

Os experimentos de LC-MS/MS foram conduzidos para amostras de folhas e raízes das plantas descritas no tópico 3.1.3 e, tecidos de fruto em desenvolvimento nos estágios E1, E2 e E3, descritos em 3.1.1. A aquisição dos dados brutos foi realizada em dois experimentos separados. O primeiro, correspondeu a análise dos extratos de folhas e raízes, formado por 12 amostras, sendo 2 órgãos (folha e raiz), 2 genótipos (HPE e LPE) e 3 réplicas biológicas, perfazendo 4 grupos de amostras. O segundo, correspondeu a análise dos tecidos de fruto em desenvolvimento. Este, formado por 72 amostras, as quais representavam 4 tecidos (pericarpo, testa, tegma e endosperma), 2 genótipos (HPE e LPE), 3 estágios de desenvolvimento (E1, E2 e E3), com três réplicas biológicas, representando 24 grupos de amostras. Os controles e garantias de qualidade desses experimentos seguiram recomendações do *Quality Assurance and Quality Control Consortium (mQAQC)* (KIRWAN et al., 2022) sendo baseados na injeção aleatória das amostras em duplicata analítica e injeções regulares das respectivas misturas de amostras (*pooled QCs*), do padrão comercial TPA como padrão externo e dos

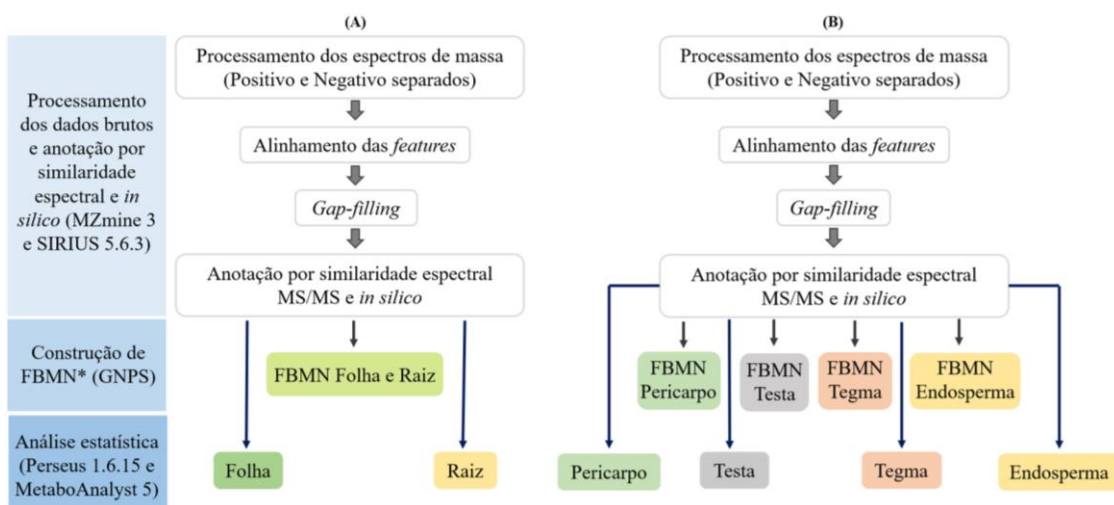
brancos de extração. As injeções de *pooled QCs*, TPA e brancos de extração ocorreram a cada 6 amostras durante a análise dos extratos de folha e raiz e, a cada 8 amostras a análise dos extratos de fruto em desenvolvimento. Além disso, imediatamente antes do início de cada um dos experimentos, o equipamento foi calibrado com as soluções comerciais Pierce™ (referência 88323) e Pierce™ (referência 88324) para os modos de ionização positivo e negativo, respectivamente.

Os extratos foram inicialmente diluídos para uma concentração de  $1 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  e analisado via sistema LC-MS/MS. Um volume de  $2 \mu\text{L}$  de extrato foram coletados por um amostrador automático TriPlus™ RSH Thermo Scientific e enviados a um cromatógrafo Dionex Ultimate 3000 (Thermo Scientific) equipado com coluna Ace ( $150 \times 2,1 \text{ mm}$ ; tamanho de partícula igual a  $3 \mu\text{m}$ ), mantida a  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ . A separação cromatográfica ocorreu sob uma vazão de  $0,250 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ , obedecendo o seguinte gradiente de eluição: 0 à 3,5 min manteve-se 80% de fase B; entre os minutos 3,5 e 4,5 foi aumentada para 95%, mantendo-se assim até atingir 16,5 min; entre 16,5 e 17,5 min a quantidade de fase B retornava para 80% de B, e era mantida até 23 min para reequilíbrio da coluna. As fases móveis foram compostas por  $\text{H}_2\text{O}$  (fase A) e MeOH (fase B), modificadas com 0,1% de ácido fórmico. Ao eluírem da coluna, os analitos eram analisados em espectrômetro de massas Q-Exactive Plus (Thermo Scientific). A ionização foi por ESI (*Eletrospray ionization*) operando com alternância de polaridade, à uma voltagem de 3,6 kV. A temperatura do capilar de transferência foi mantida em  $320 \text{ }^\circ\text{C}$ , e fluxos de gases de nebulização e auxiliar de 45 e 15 unidades arbitrárias. A aquisição dos dados ocorreu por método DDA (*Data dependent acquisition*), em que cada evento de varredura completa ( $\text{MS}^1$ ) abrangeu uma faixa de  $m/z$  200 – 1200, resolução 35.000, *AGC target*  $1^6$ , e tempo de injeção de 120 ms. Os três íons mais intensos foram selecionados para aquisição dos espectros de fragmentação ( $\text{MS}^2$ ), com resolução de 17.500, *AGC target*  $1^5$ , tempo de injeção de 50 ms, janela de isolamento de  $1,2 m/z$  e fragmentados por método HCD (*High energy collision dissociation*). Para ambas as polaridades, foram utilizadas rampas de energia de colisão normalizada, sendo de 30 a 50 para o modo positivo de 15 a 35 para o modo negativo. A exclusão dinâmica foi setada em 10 s. Por fim, os dados brutos foram arquivados no formato *.raw*.

### 3.5 Processamento dos dados brutos e anotação de metabólitos

Uma visão geral do processamento dos dados das análises metabolômicas, que incluíram detecção de *features*, alinhamento de cromatogramas, anotação de metabólitos, análise estatística uni e multivariada e, construção de redes moleculares baseadas em *features*, é mostrada na Figura 10. Os dados brutos de LC-MS/MS foram inicialmente processados utilizando o conjunto de ferramentas do MZmine 3 (SCHMID et al., 2023) (disponível em: <http://mzmine.github.io/>). A primeira etapa do processamento dos dados consistiu na separação dos conjuntos de dados, de acordo com o modo de ionização. A seguir, a eliminação do ruído eletrônico, pelo processo de detecção de picos usando o algoritmo *Mass detection*, obedeceu a uma intensidade mínima de  $3 \times 10^5$  em  $MS^1$  e  $3 \times 10^3$  em  $MS^2$ . Para reconstrução dos cromatogramas extraídos de íons foi utilizado o módulo *ADAP Chromatogram Builder*, em que os picos deveriam ter pelo menos 7 leituras de massa, limiar de intensidade de grupo e a intensidade mais alta mínima de  $8 \times 10^5$  e  $9,5 \times 10^5$ , respectivamente. A desconvolução dos picos e pareamento dos dados de  $MS^1$  e  $MS^2$  foi realizada com o módulo *Local minimum features resolver* (tolerância de tempo de retenção de 0,1 min; tolerância de erro de massa entre  $MS^1$  e  $MS^2$  de 5 ppm; limiar cromatográfico 0,95; intervalo mínimo de pesquisa de tempo de retenção 0,03; altura mínimo absoluta  $3 \times 10^5$  e intervalo de duração do pico de 0,01 minutos). A remoção de isótopos foi feita usando *13C isotope filter* (tolerância de  $m/z$  de 0,001 ou 3,5 ppm; tolerância de tempo de retenção 0,02 minutos; estado máximo de carga igual a 1 e manutenção do isótopo mais intenso). O alinhamento dos cromatogramas foi realizado com o algoritmo *Join aligner* (tolerância de  $m/z$  10 ppm; peso para dimensão  $m/z$  igual a 75; tolerância de tempo de retenção igual a 0,2 min e peso para a dimensão tempo de retenção de 25). Todo e qualquer sinal presente numa amostra e também em pelo menos uma corrida do branco de extração, foi eliminado. Além disso, mantiveram-se na lista de *features* detectadas apenas aquelas que foi obtido pelo menos um espectro de  $MS^2$ , já que as tentativas de anotação, contra a biblioteca e *in silico*, como também a construção das redes moleculares, requerem os espectros de fragmentação. A anotação dos metabólitos por similaridade espectral, foi realizada contra bibliotecas curadas contendo 290.856 e 36.848 espectros, para os modos positivo e negativo, respectivamente, obtidas diretamente no site do MS-DIAL (disponível em: <http://prime.psc.riken.jp/compms/msdial/main.html#MSP>) no formato msp. Para tanto, foi estabelecida a tolerância de  $m/z$  do precursor de 0,005 Da ou 20 ppm, dos fragmentos de 0,01 Da ou 20 ppm, pelo menos 4 fragmentos correspondentes e pontuação de cosseno  $\geq 0,6$ .

**Figura 10.** Arquitetura geral do processamento dos dados da análise metabolômica não-alvo. **(A)** Processamento de dados dos extratos de folha e raiz. **(B)** Processamento de dados dos extratos de tecidos do fruto em desenvolvimento



**Fonte:** Elaborada pelo autor.

Na tentativa de aumentar o número de metabólitos anotados, os espectros de massa ( $MS^1$  e  $MS^2$ ) do conjunto de *features* detectadas após processamento no MZmine 3, foram carregados e analisados pelo fluxo de trabalho do SIRIUS 5.6.3 (DÜHRKOP et al., 2019). A predição de fórmula molecular utilizando o módulo SIRIUS seguiu as configurações propostas pelos autores, com buscas nas bases de dados Bio Database, Biocyc, CHEBI, COCONUT, EcoCyc Mine, GNPS, KEGG, KEGG Mine, KNApSAcK, Natural Products, Plantcyc e PubChem. Foram aceitos os tipos de íons  $[M+H]^+$  e  $[M+Na]^+$  para o modo positivo e,  $[M-H]^-$  e  $[M+COOH-H]^-$  para o modo de ionização negativa. As 10 fórmulas moleculares mais bem ranqueadas pelo algoritmo ZODIAC foram utilizadas para construção das árvores de fragmentação, enquanto, a fórmula que ocupou a primeira posição do rank, foi utilizada para anotação *in silico* por pesquisa nas bases de dados de estruturas e tipos de íons supramencionados, por meio do algoritmo CSI:FinderID. Por fim, o módulo CANOPUS foi também utilizado para predição de classes químicas a partir da impressão digital prevista pelo CSI:FinderID.

### 3.5.1 Construção de Redes Moleculares Baseadas em Features

Outra ferramenta a que foram submetidos os dados exportados (espectros de MS<sup>2</sup> e tabela com dados quantitativos) após o processamento no MZmine 3, foi o módulo de construção de Redes Moleculares Baseada em *Features* (FBMN) do GNPS (Figura 10). Os parâmetros de filtro foram mantidos os padrões do programa, sendo removidos os picos com +/- 17 Da em torno do *m/z* do precursor, para retirada de possíveis sinais residuais do precursor, e eliminação de picos em janelas de +/- 50 Da, mantendo-se apenas os 6 picos mais intensos dentro de cada janela ao longo de todo espectro. A tolerância de massa do íon precursor e íons fragmentos aceitas foram de 0,02 Da. Redes moleculares foram então criadas quando uma pontuação de cosseno acima de 0,7 e mais de 6 picos correspondentes forem alcançados. Além disso, as arestas entre dois nós foram mantidas na rede se, e somente se, cada um dos nós aparecer nos 10 principais nós mais semelhantes entre si. Finalmente, o tamanho máximo de uma família molecular foi definido como 100 e as bordas de pontuação mais baixas foram removidas, até que o tamanho da família molecular estivesse abaixo desse limite. Foram criadas redes moleculares separadamente, sendo uma para cada tecido do fruto em desenvolvimento. Já, os dados de folha e raiz, foram colocados na mesma rede. O Cytoscape 3.9.1 (SU et al., 2014) (disponível em: <https://cytoscape.org/download.html>) foi usado para visualizar e editar as redes moleculares exportadas do GNPS.

### 3.5.2 Quantificação relativa dos metabólitos

A quantificação relativa dos metabólitos entre os grupos de amostra foi realizada utilizando módulos do Perseus 1.6.15 (TYANOVA et al., 2016) e MetaboAnalyst 5 (PANG et al., 2022) (Figura 9). No Perseus, as matrizes de dados foram carregadas e os diferentes grupos de amostras, categorizados. Adiante, os dados foram transformados para escala logarítmica, utilizando a função  $\log_2(x)$  e filtrados, permanecendo apenas os metabólitos detectados em duas réplicas biológicas de pelo menos um grupo, para aquisição do número total de *features* detectadas. Nesse ponto, houve então uma decomposição dos conjuntos de dados, os quais foram separados por tecido e submetidos a análise estatística. Por exemplo, o conjunto de dados do experimento comparativo entre folha e raiz, adquirido no modo de ionização positiva, foi separado em duas matrizes de dados, uma com os dados de folha, e outra com os dados de raiz. Assim, a quantificação relativa foi feita comparando os genótipos HPE e LPE. De maneira semelhante, porém mais complexa, o conjunto de dados do

experimento que analisou os extratos de fruto em desenvolvimento, foi separado em quatro subconjuntos de dados, um para cada tecido (pericarpo, testa, tegma e endosperma). Aqui, portanto, as comparações foram feitas entre os genótipos e estágios de desenvolvimento. Após essa decomposição, mais um filtro foi aplicado às matrizes, mantendo-se apenas *features* detectadas em duas réplicas biológicas de pelo menos um grupo, sendo este conjunto considerado como número total de *features* detectadas em cada grupo. Já, para os testes estatísticos propriamente ditos, as matrizes sofreram mais um processo de filtragem, excluindo-se as *features* que possuem menos de 85% dos dados de área. Finalmente, os dados foram normalizados por subtração da mediana na coluna, enquanto os valores ausentes foram imputados de acordo com a distribuição normal (largura da distribuição gaussiana igual a 0,3; e o deslocamento para baixo usando unidades de desvio padrão igual a 1,8) e então se procedeu com as análises de componentes principais (PCA), e testes de comparação de médias, realizados no MetaboAnalyst 5.0. Para os conjuntos de dados de folha e raiz, as comparações das médias deram-se pela aplicação do teste-T de *Student* à 5% de probabilidade. Já, para os conjuntos de dados do fruto em desenvolvimento, os dados foram submetidos previamente a teste de ANOVA, e a ao teste de Tukey à *posteriori*, à 5% probabilidade com p-valor ajustado por FDR (*False Discovery Rate*). As *features* diferencialmente abundantes estatisticamente foram submetidas a clusterização hierárquica, após os dados terem sido normalizados por *Z-score* na linha.



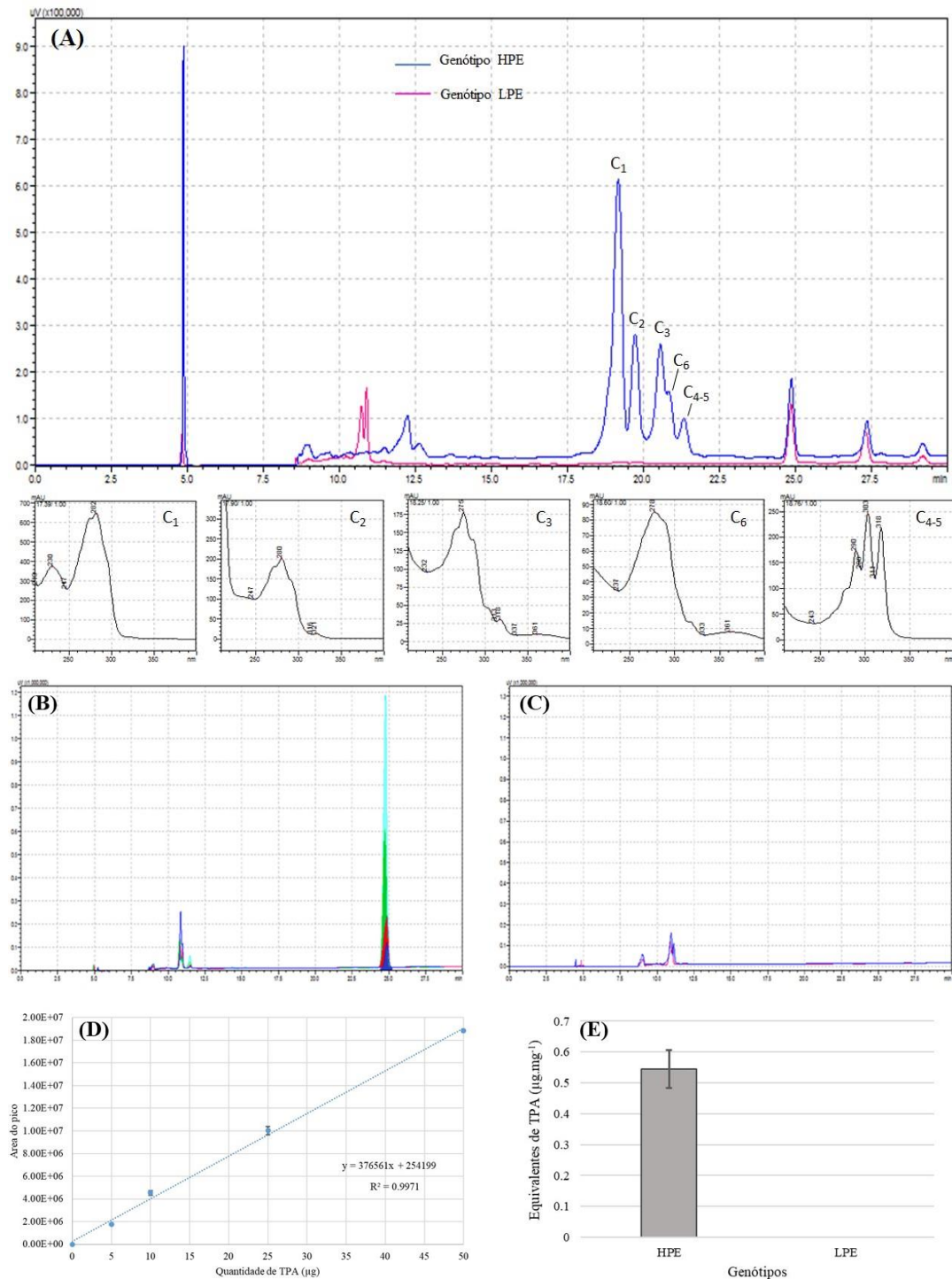
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Caracterização dos genótipos HPE e LPE por HPLC-DAD

A análise dos extratos de sementes por cromatografia líquida em coluna de fase reversa, permitiu caracterizar os dois genótipos quanto ao acúmulo de EF. Os cromatogramas dos extratos de sementes de ambos os, obtidos à 280 nm, são mostrados na Figura 11, em que o cromatograma relativo ao genótipo HPE (linha azul) apresenta uma sequência de 5 picos que eluíram entre 17,5 – 22,5 min, os quais estão ausentes no cromatograma do genótipo LPE (linha rosa). Com base na literatura, (BALDINI et al., 2014; KONGMANY et al., 2016; FARIA-MACHADO et al., 2019) esse perfil cromatográfico e os espectros de absorção de luz característicos desse conjunto de picos, correspondem aos seis isômeros de EF do pinhão-mansão, especificamente chamados de Fatores *Jatropha* C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>. Ademais, a comparação da área integrada desse bloco de picos com uma curva de calibração do padrão TPA (variando de 0,1 à 1 µg.µL<sup>-1</sup>; volume de injeção igual a 50 µL, o que correspondeu as quantidades de 5 à 50 µg de TPA; tempo de retenção = 24,75 min; Figuras 11B e 11D), levou à uma concentração de EF de 0,5519 ± 0,062 µg.mg<sup>-1</sup> no genótipo HPE (Figura 11E). É importante ressaltar, que para a quantificação, utilizou-se o comprimento de onda de 254 nm, a fim de minimizar o erro experimental, já que 280 nm promove uma superestimação da concentração de EF (HERATH et al., 2017).

A ocorrência de diversos genótipos de pinhão-mansão com quantidades variáveis de EF em suas sementes tem sido demonstrada em diversos trabalhos. Basha et al., (2009), ao analisarem 72 genótipos de pinhão-mansão, encontraram valores que variaram desde 0,01 a 6,44 mg.g<sup>-1</sup> de ésteres de forbol em equivalentes de TPA, usando o comprimento de onda de 280 nm para quantificar. Como também, para certos genótipos, EF não foram detectados. De maneira semelhante, Borah et al., (2018) caracterizaram 28 genótipos de pinhão-mansão coletados de diferentes localidades da Índia, e determinaram concentrações de EF no óleo extraído das sementes valores que variaram de 1,09 à 4,3 mg.g<sup>-1</sup>. Mais recentemente, Vega-Quirós et al., (2021), na busca por marcadores moleculares SNPs associados à ausência ou baixa concentração de EF em sementes de *J. curcas*, caracterizaram 54 genótipos de diferentes países, e encontraram tanto genótipos com EF não detectáveis, como genótipos com concentração de EF na faixa de 0,78 mg.g<sup>-1</sup>. Com isso, torna-se claro a grande variabilidade que ocorre na concentração de EF nos diferentes genótipos cultivados no mundo.

**Figura 11.** Caracterização dos genótipos HPE e LPE de *J. curcas* por HPLC-DAD quanto ao acúmulo de ésteres de forbol nas sementes. **(A).** Cromatogramas obtidos após separação em coluna de fase reversa e detecção à 280 nm. Imediatamente abaixo dos cromatogramas, constam os respectivos espectros de absorção de luz apontados como C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>6</sub> e C<sub>4-5</sub>. **(B).** Cromatogramas do padrão 12-*O*-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA), nas quantidades 0 (linha rosa), 5 (linha azul escuro), 10 (linha vermelha), 25 (linha verde) e 50 µg (linha azul claro). **(C).** Cromatogramas dos solventes puros. **(D).** Curva padrão de TPA. **(E).** Quantificação dos ésteres de forbol nas sementes maduras de *J. curcas*, genótipos HPE e LPE



Fonte: Elaborada pelo autor; Dados da tese.

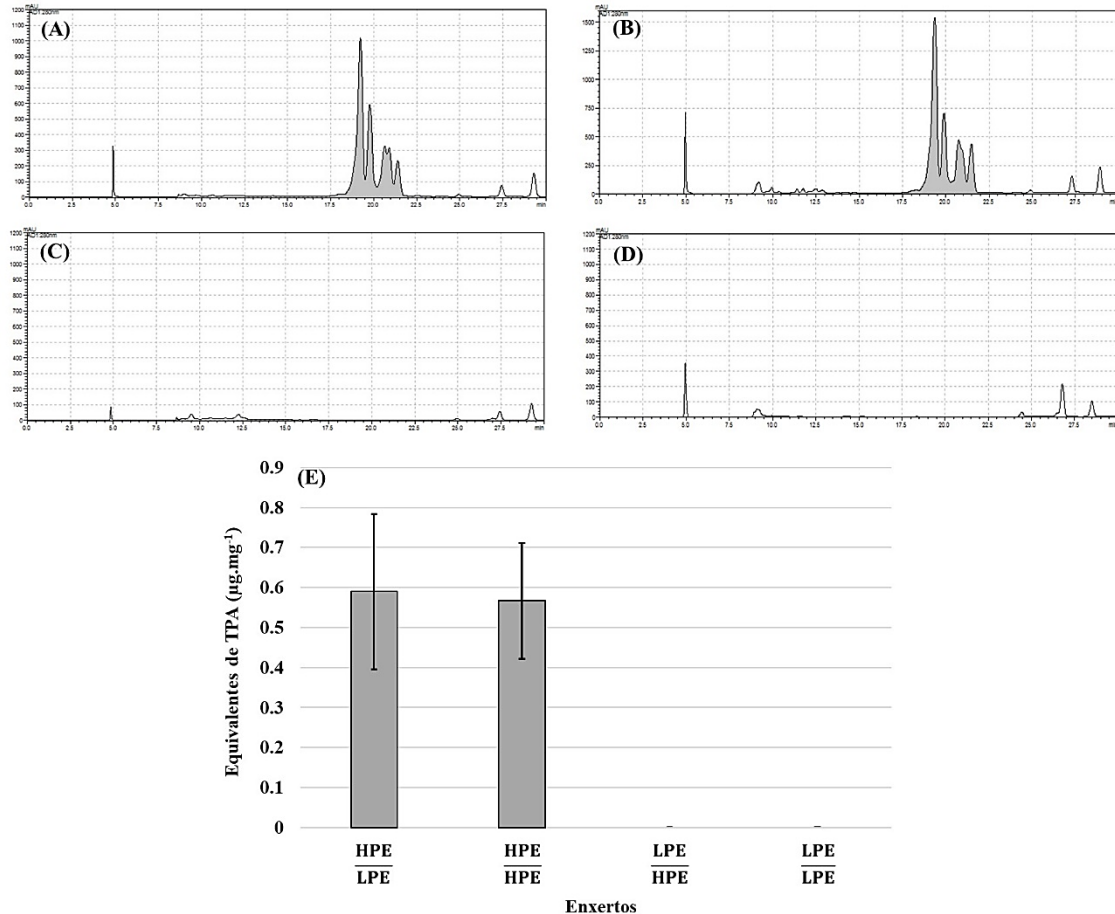
## 4.2 Acúmulo de EF em sementes de plantas enxertadas

As plantas de *J. curcas* mostraram alta compatibilidade para enxertia. Nas plantas em que a parte aérea foi proveniente do genótipo HPE e o porta-enxerto do genótipo LPE (Figura 12A e 12E), os EF foram detectados em concentrações semelhantes aos das plantas HPE autoenxertadas (Figura 12B e 12E) e não enxertadas (Figura 11E). Já, nas plantas em que a parte aérea foi oriunda do genótipo LPE e o porta-enxerto do genótipo HPE, não foi detectada nas sementes maduras a presença de EF (Figura 12C), de tal maneira que esse fenótipo foi o mesmo das plantas LPE autoenxertadas (Figura 12D).

A separação espacial entre biossíntese e acúmulo de compostos de defesa vegetal, é uma característica que parece ser comum em plantas. Casos clássicos na literatura são da nicotina em tabaco e glicosídeos cianogênicos na mandioca (BALDWIN, 1989; JØRGENSEN et al., 2005). Mais recentemente, foi demonstrada a distribuição espacial da rota de biossíntese de artemisinina em *Artemisia annua*, através do transporte de longa distância, em que o intermediário inicial da rota, amorfo-4,11, foi detectado apenas em folhas jovens, enquanto os passos finais da via ocorrem nas folhas maduras (CZECHOWSKI et al., 2016, 2018). Nesse mesmo contexto, a dinâmica de distribuição de glicosinolatos entre diferentes partes de plantas de *A. thaliana* foi determinado com auxílio de microenxertias entre plantas WT e mutantes para transportadores desses compostos (JØRGENSEN; NOUR-ELDIN; HALKIER, 2015), como também, foi demonstrado a ausência de transporte de longa distância de brassinosteróides em plantas de ervilha (SYMONS; REID, 2004).

Em *J. curcas*, a hipótese do transporte de longa distância de EF das raízes para a parte aérea surgiu a partir de resultados anteriores do nosso grupo de pesquisa, que detectaram por RT-qPCR nove candidatos à sintase do casbeno em raízes, e apenas um em folhas (NASCIMENTO, 2017; SOARES, 2015). Além disso, a proteína foi detectada apenas em raízes, tanto por proteômica *shotgun*, quanto por proteômica alvo-dirigida (DE ALMEIDA et al., 2021; FARIAS et al., 2020). Contudo, pelos resultados alcançados nesse trabalho, relativos ao acúmulo de EF em sementes de plantas de pinhão-manso enxertadas, sendo os enxertos formados por plantas dos genótipos HPE e LPE, não foram encontradas evidências que sugiram o transporte desses compostos das raízes para a parte aérea, haja vista o acúmulo de EF nas sementes não tenha sofrido efeito dos porta-enxertos (sistema radicular), após comparação com os grupos controles.

**Figura 12.** Detecção e quantificação de ésteres de forbol em sementes maduras de plantas enxertadas de *J. curcas*. **(A)**. Cromatograma do extrato de sementes oriundas de plantas formadas por um porta-enxerto do genótipo LPE e parte aérea do genótipo HPE. **(B)**. Cromatograma do extrato de sementes colhidas das plantas do genótipo HPE autoenxertadas. **(C)**. Cromatograma do extrato de sementes oriundas de plantas enxertadas, sendo porta-enxerto do genótipo HPE e parte aérea do genótipo LPE. **(D)**. Cromatograma do extrato de sementes de plantas do genótipo LPE autoenxertadas. Todos os cromatogramas foram plotados à 280 nm. **(E)**. Concentração de ésteres de forbol, através de equivalentes de TPA, em sementes de plantas enxertadas de *J. curcas*



Fonte: Elaborada pelo autor; Dados da tese.

### 4.3 Padrão de deposição de EF nos frutos em desenvolvimento

O padrão de deposição de compostos do metabolismo secundário é complexo, e normalmente sofre dependência de órgão e/ou tecido e estágio de desenvolvimento. Neste sentido, foi analisado por HPLC-UV o padrão de deposição de EF ao longo do desenvolvimento do fruto, através da análise do pericarpo, testa, tegma e endosperma. É importante ressaltar que amostras de folhas e raízes foram também submetidas à essa análise, mas não foi possível distinguir sinais de EF, pela baixa concentração e/ou coeluição dos EF com pigmentos, no caso das folhas.

Os EF foram detectados e quantificados relativamente em todos os tecidos e estágios de desenvolvimento do fruto analisados do genótipo HPE (Figura 13A), o que não foi possível para nenhuma amostra do genótipo LPE. Surpreendentemente, EF foram quantificados na testa em todos os estágios de desenvolvimento analisados (Figuras 13A e 13C), contrariando a literatura (DEVAPPA; MAKKAR; BECKER, 2012; HE et al., 2011). Esses resultados demonstraram que EF são ubiquamente distribuídos nos tecidos do fruto, já que He et al., (2011), também os detectaram no embrião.

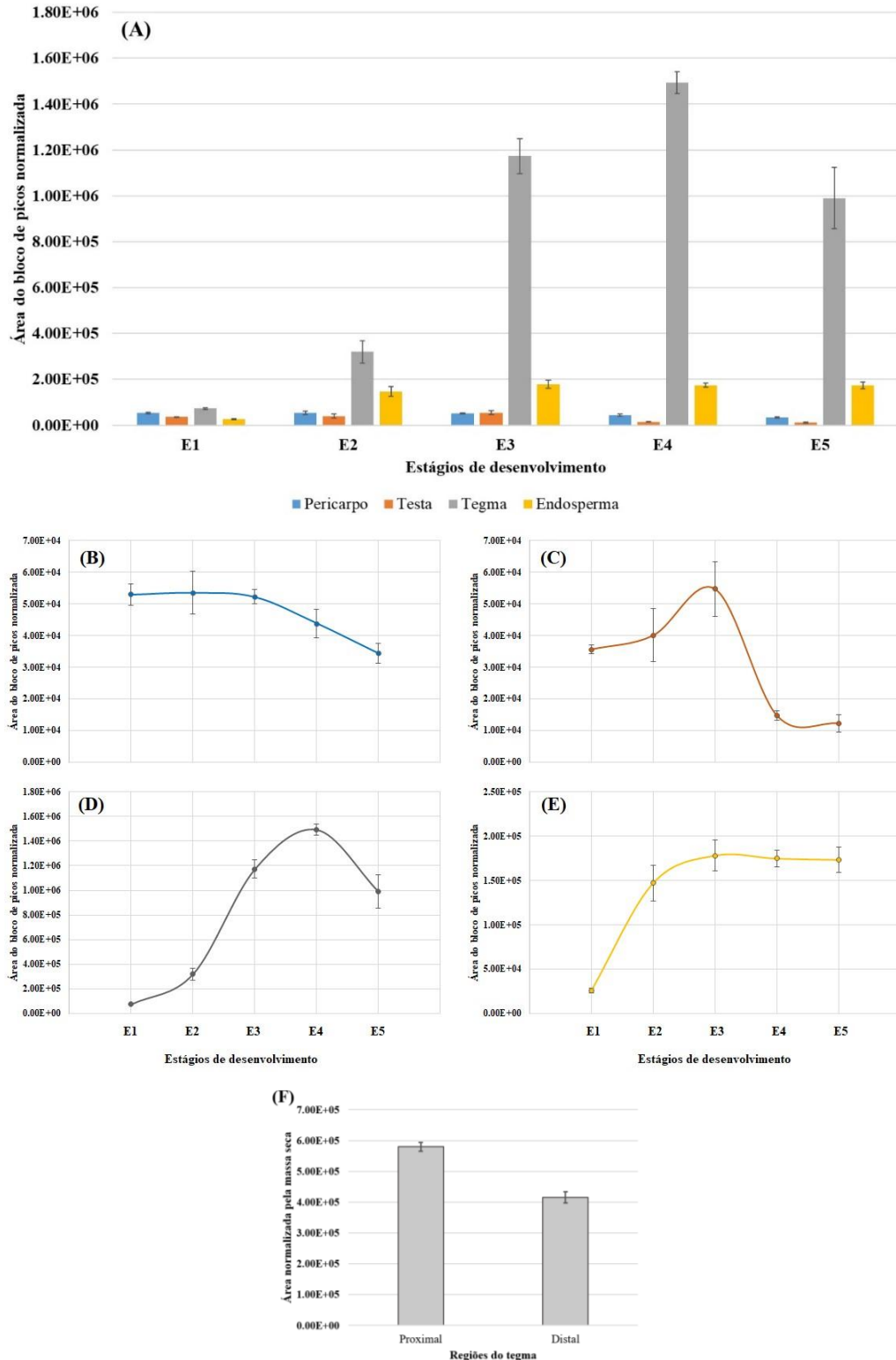
Apesar de já ter sido descrito o padrão de deposição de EF nos tecidos da semente madura (HE et al., 2011), as flutuações na concentração desses compostos durante o desenvolvimento dos tecidos do fruto não são mencionadas na literatura. Três padrões de deposição puderam ser observados ao longo do desenvolvimento. No pericarpo, a concentração de EF foi estável de E1 até E3, mas quando esse tecido entrou em senescência, a concentração sofreu uma diminuição (Figura 13B). Na testa e no tegma, observou-se aumento gradual até atingir um pico máximo (em E3 na testa e E4 no tegma), seguido de queda (Figuras 13C e 13D). Já no endosperma, viu-se aumento de E1 à E2, e nos demais estágios a concentração de EF permaneceu estável (Figura 13E).

Segundo a literatura, a biossíntese de EF é de controle materno (KING et al., 2013; VISCHI et al., 2014), logo, a deposição de EF nos tecidos filiais (endosperma e embrião) depende da importação dos tecidos maternos. Um indicativo dessa translocação, deve-se ao fato da concentração de EF ser ~4 vezes mais alta na porção mais externa do endosperma, que se encontra adjacente ao tegma, em comparação com a região mais interna, próxima ao embrião (HE et al., 2011; Figura 14). Dessa maneira, a constância na concentração de EF observada no endosperma entre os estágios E2 e E5, pode ser explicada em função da importação desses compostos ocorrer concomitante ao seu crescimento.

Contudo, apesar da possibilidade de biossíntese de EF ocorrer nos tecidos maternos do fruto (pericarpo, testa e tegma) ser plausível, não se pode descartar a importação desses compostos pelo fluxo de seiva, já que o fruto como um todo é um dreno. Assim, o aumento dramático na concentração de EF no tegma entre os estágios E1 e E3 (Figuras 13A e 13D), pode estar associada a redução drástica do volume desse tecido devido ao processo de morte celular programada (Figura 14) e não a uma superatividade da rota biossintética (haja vista, o tecido estar em senescência), que provavelmente não é acompanhada na mesma velocidade pela transferência desses compostos para o endosperma. Além disso, essa hipótese de transferência de EF do tegma para o endosperma, é ainda mais corroborada, tanto pela queda na concentração de EF no tegma entre os estágios E4 e E5 (Figura 13C), já que entre esses estágios não são observadas mudanças estruturais no tegma, quanto pela maior concentração de EF na porção proximal do tegma, aquela adjacente ao endosperma, que chega a ser aproximadamente 30% maior em relação a porção distal (distante do endosperma) (Figura 13F).

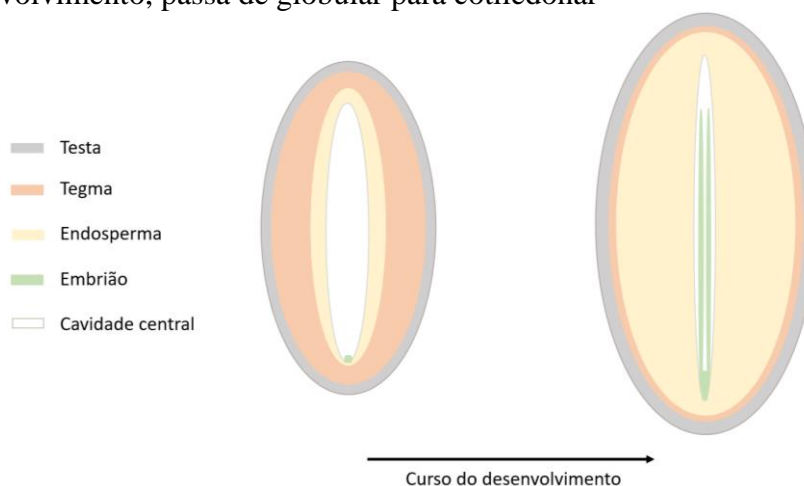
Assim, esses experimentos permitiram caracterizar os dois genótipos de pinhão-manso no que tange ao perfil de distribuição de EF nos frutos. Foi demonstrado um contraste marcante entre os genótipos, dada a ausência de EF em todos os extratos analisados do genótipo LPE. Além disso, viu-se que a deposição de EF nas sementes dos enxertos recíprocos entre os genótipos HPE e LPE é fenótipo-dependente da parte aérea das plantas, e que cada tecido do fruto analisado durante o desenvolvimento apresenta um padrão de deposição de EF característico.

**Figura 13.** Padrão de deposição de ésteres de forbol ao longo do desenvolvimento do fruto de *J. curcas*, genótipo HPE. (A). Quantificação relativa de ésteres de forbol em pericarpo, testa, tegma e endosperma isolados de frutos de *J. curcas* em desenvolvimento. (B), (C), (D) e (E). Curvas do padrão de deposição de ésteres de forbol no pericarpo, na testa, no tegma e no endosperma isolados de frutos de *J. curcas* em desenvolvimento. (F). Quantificação relativa do conteúdo de ésteres de forbol no tegma do estágio E1, dissecado nas regiões proximal e distal em relação ao endosperma



Fonte: Elaborada pelo autor; Dados da tese.

**Figura 14.** Esquema representativo das principais mudanças morfológicas sofridas por sementes de pinhão-manso ao longo do desenvolvimento. Testa e tegma compreendem os revestimentos da semente, oriundos dos tegumentos externo e interno do óvulo. Nos estágios iniciais do desenvolvimento, o tegma é volumoso e ocupa o maior volume da semente, que ao passar do tempo sofre morte celular programada, de modo a apresentar apenas uma fina camada de tecido na semente madura. O endosperma, originado pela fecundação da célula média por uma das células gaméticas, é o principal tecido de reserva, ocupando a maior parte da semente madura. O embrião é formado pela fecundação da oosfera pela outra célula gamética, que no curso do desenvolvimento, passa de globular para cotiledonar



**Fonte:** Elaborada pelo autor.

#### 4.4 Análise metabolômica não-alvo

Uma abordagem metabolômica não-alvo foi aplicada às amostras de folha e raiz de plantas cultivadas em sistema hidropônico, assim como às amostras dos tecidos de fruto em desenvolvimento, nos estágios E1, E2 e E3. Esses três estágios foram escolhidos por serem representativos das principais mudanças ocorridas durante o desenvolvimento da semente. Com essa abordagem, buscou-se primeiramente, confirmar a identidade dos EF detectados por HPLC-DAD por meio da massa exata e espectros de fragmentação. Na sequência, foi estudado o padrão de deposição de outros terpenóides nas raízes, de maneira a ser possível explicar o contraste no acúmulo de sesquiterpenóides e diterpenóides entre os dois genótipos. Por fim, foram analisadas outras diferenças marcantes nos tecidos e estágios de desenvolvimento entre ambos os genótipos, concernentes a outras classes químicas, como compostos fenólicos, lipídeos estruturais e oxilipinas.



#### 4.5 Performance da aquisição dos dados de LC-MS/MS

Antes de proceder com o processamento dos dados da análise por LC-MS/MS, alguns critérios de qualidade foram observados, de acordo com o *Quality Assurance and Quality Control Consortium (mQAQC)* (KIRWAN et al., 2022), visto que o sistema LC-MS/MS é extremamente sensível, e pequenas variações durante a aquisição dos dados podem levar à grandes consequências nas etapas subsequentes de análise, como alinhamento de cromatogramas e correspondência de massa com a biblioteca.

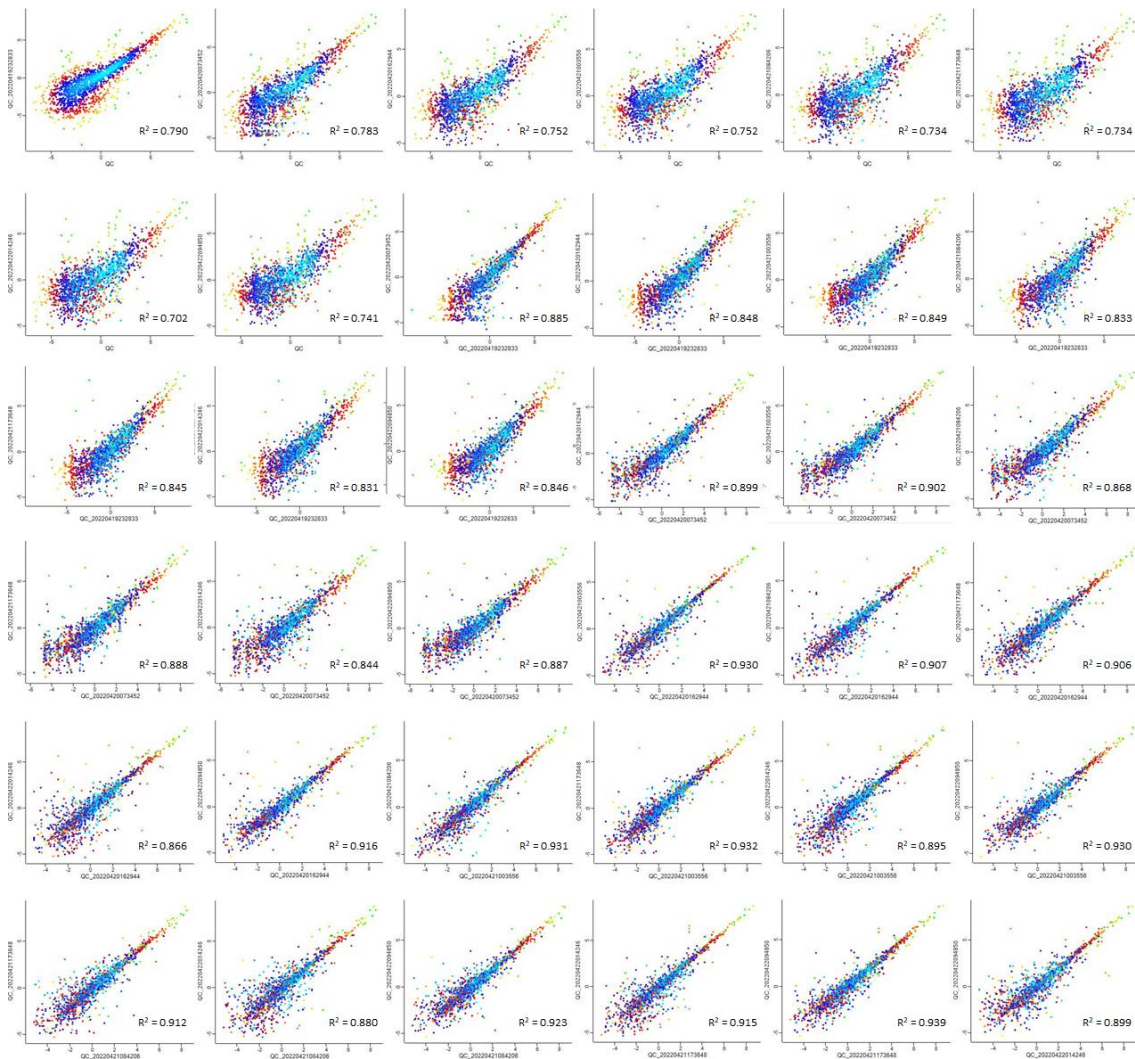
No experimento dos tecidos de fruto em desenvolvimento, o branco de extração, a mistura de amostra (*pooled QC*) e o padrão TPA, foram injetados regularmente a cada 8 amostras, enquanto para o experimento dos extratos de folha e raiz, isso ocorreu à cada 6 amostras. A reprodutibilidade das análises cromatográficas das misturas de amostras foi avaliada objetivamente através do coeficiente de correlação de *Pearson*, usando os valores de área das *features* que possuíam pelo menos um espectro de MS<sup>2</sup>, após o alinhamento dos cromatogramas e subtração dos sinais do branco de extração. Durante a aquisição dos dados dos extratos de fruto em desenvolvimento, coeficientes de correlação de *Pearson* mais baixos (de 0,734 a 0,790) foram vistos ao comparar a primeira com as demais análises do QC (Figura 15). A partir da segunda injeção, os valores foram sempre acima de 0,83, chegando à 0,93 em alguns casos (Figura 15). Considerando o método de aquisição DDA-top3 com inversão de polaridade, considerou-se essa variação aceitável. No outro experimento (análise dos extratos de folha e raiz), os coeficientes de correlação foram todos acima de 0,9 (Figura 16). Diante disso, viu-se a grande importância das injeções aleatórias das amostras, de modo a normalizar possíveis variações no *spray*, por exemplo, como também das injeções das amostras em duplicata, já que determinado íon na primeira corrida pode não ser escolhido para fragmentação, e na segunda sim.

Em relação a avaliação das corridas do padrão externo TPA, o tempo de retenção, a massa exata do precursor e os espectros de fragmentação, mantiveram-se reprodutíveis em ambos os experimentos (Figura 17). Comparado ao sistema HPLC-UV, o tempo de retenção do TPA reduziu para  $10,95 \pm 0,04$  min, em função especialmente da coluna usada no sistema LC-MS/MS ser de dimensões menores como também o tamanho de partícula da fase estacionária, levando a uma trabalho ser mais alta. Já, a variação máxima de massa do precursor, para o TPA na forma de adulto de sódio ( $m/z$  teórico 639,38), manteve-se abaixo de 2,01 ppm. Por fim, os espectros de fragmentação tiveram o mesmo perfil, salvo discretas variações nas intensidades dos fragmentos (Figura 18), sendo possível a anotação por

similaridade espectral usando o fluxo de trabalho do MZmine 3.0 descrito no tópico 3.5, obtendo pontuação de cosseno igual a 0,903 (Figura 18).

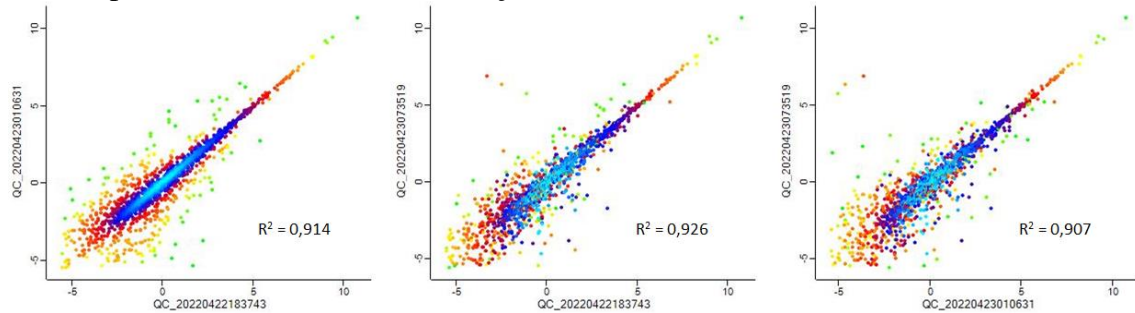
Em suma, os dados das análises de LC-MS/MS apresentados adiante nesse trabalho, seguiram as principais recomendações da comunidade em relação ao controle e garantias de qualidade explicitadas no *mQAQC*. Não foram observadas variações nas análises das misturas de amostras que comprometessem os resultados e interpretações ora descritas, tão pouco nas análises do padrão TPA, que se mantiveram com alta reprodutibilidade.

**Figura 15.** Análises de correlação de Pearson entre as análises da mistura de extratos de tecidos isolados de frutos em desenvolvimento de *J. curcas*. A mistura de extratos foi injetada nove vezes em intervalos regulares durante aquisição dos dados LC-MS/MS, como controle de qualidade da análise metabolômica não-alvo. As injeções foram confrontadas entre si por meio da análise de correlação de *Pearson*.



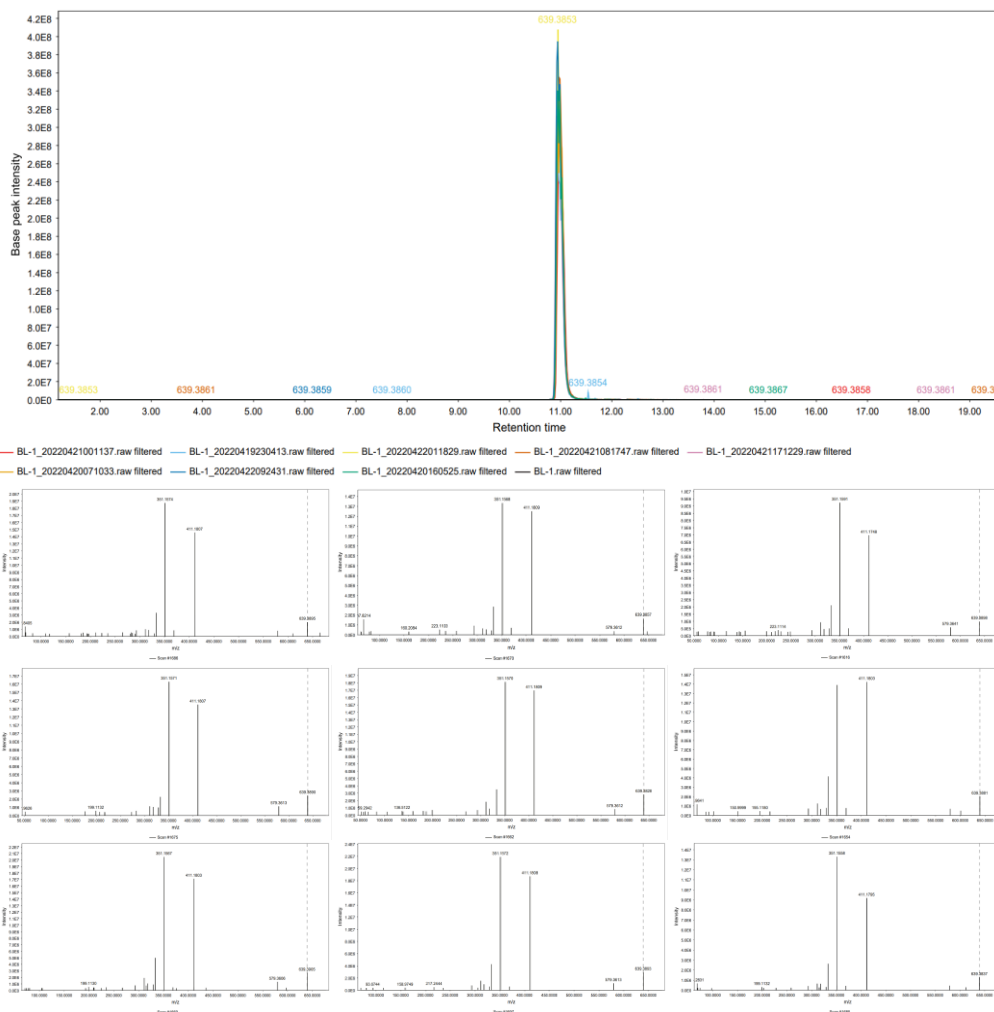
**Fonte:** Elaborada pelo autor; Dados da tese.

**Figura 16.** Análises de correlação de Pearson entre as corridas da mistura de extratos de folha e raiz dos genótipos HPE e LPE de *J. curcas*. A mistura de extratos de folhas e raízes foi injetada três vezes em intervalos regulares durante aquisição dos dados LC-MS/MS, como controle de qualidade da análise metabolômica não-alvo. As injeções foram confrontadas entre si por meio da análise de correlação de *Pearson*



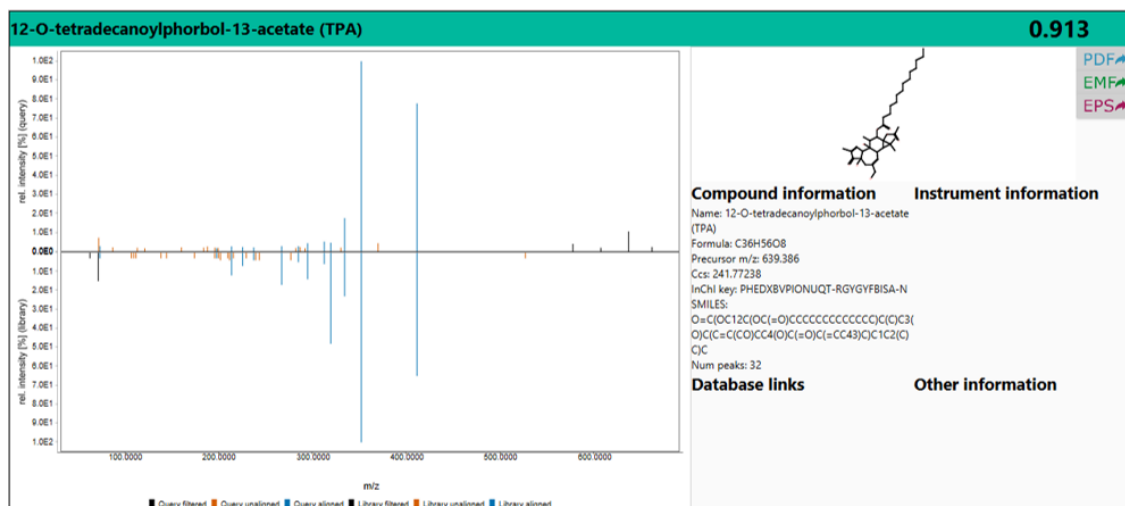
**Fonte:** Elaborada pelo autor; Dados da tese.

**Figura 17.** Cromatogramas de íons das corridas do padrão TPA e respectivos espectros de fragmentação. Os cromatogramas de íons foram plotados com filtro para o  $m/z$  639,38, correspondente ao TPA na forma de adulto de sódio, e os respectivos espectros de fragmentação são mostrados imediatamente abaixo



**Fonte:** Elaborada pelo autor; Dados da tese.

**Figura 18.** Anotação estrutural do padrão TPA por similaridade do espectro de fragmentação. A anotação do TPA foi possível a partir da comparação do espectro MS/MS do precursor  $m/z$  639,38  $[M+Na]^+$  contra a biblioteca de espectros disponível no site do MS-DIAL, atingindo pontuação de cosseno igual a 0,903



Fonte: Elaborada pelo autor; Dados da tese.

#### 4.6 Análise dos EF por LC-MS/MS

Ainda que os perfis cromatográficos dos EF adquiridos nos experimentos HPLC-UV tenham apresentado correspondência com os descritos na literatura, a confirmação pela massa exata e espectros de fragmentação foi realizada via LC-MS/MS. Além disso, dada a maior sensibilidade da espectrometria de massas, haveria a possibilidade de detecção desses compostos em raízes e folhas.

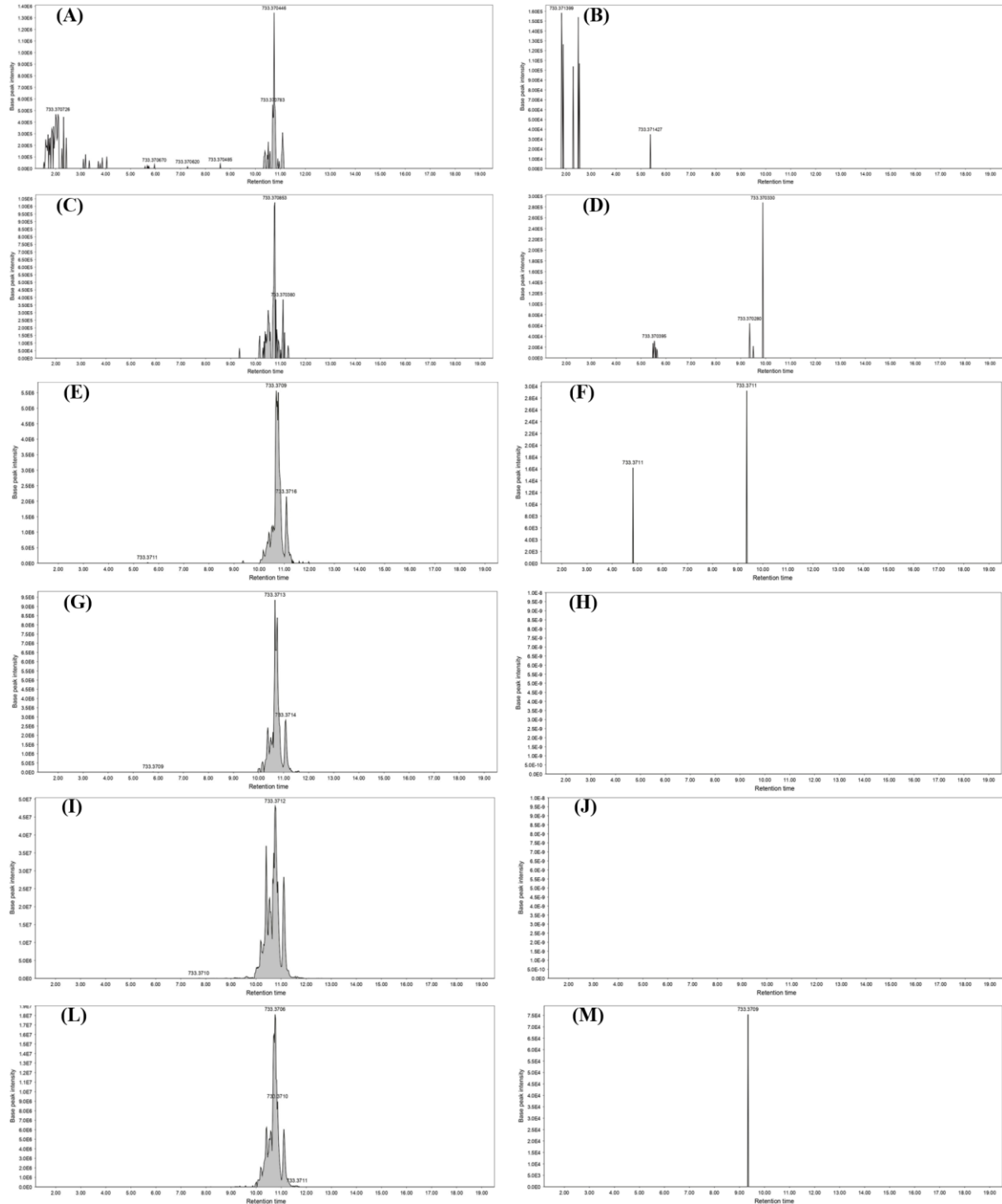
A modificação no sistema cromatográfico (coluna de menores dimensões e menor tamanho de partícula), levou a uma redução nos tempos de retenção. Além de eluírem mais cedo (entre 10,1 e 11,2 minutos; Figura 19), houve também uma alteração na ordem de eluição, como já reportado por Verardo et al., 2019, ao substituir ACN por MeOH na fase móvel. No modo positivo, os EF foram detectados sob a forma de cinco tipos de íons:  $[M+H]^+$ ,  $[M-H_2O+H]^+$ ,  $[M-H_4O_2+H]^+$ ,  $[M-H_6O_3+H]^+$  e  $[M+Na]^+$ , que correspondem, respectivamente, aos valores de  $m/z$  711,3925, 693,3749, 675,3664, 657,3548 e 733,3710, sendo que os quatro últimos foram ~45% mais intensos que o íon protonado em MS<sup>1</sup>. Já, um maior número de espectros MS/MS foi adquirido para os íons na forma de adulto de sódio. Cabe observar, que exceto os tipos de íons  $[M+H]^+$  e  $[M+Na]^+$ , os demais são resultado de fragmentação na fonte dos íons  $[M+H]^+$ , caracterizados por perdas sucessivas de 18 u (elementos de água).

Pelo processamento automatizado dos dados, foi possível a desconvolução dos sinais de EF em seis *features*, para os íons na forma  $[M+Na]^+$  (Tabela Suplementar III; *Features* IDs 3020, 3150, 3165, 3320, 3544 e 3957), provavelmente os isômeros majoritários, para os quais as estruturas foram determinadas e chamamos Fatores *Jatropha* C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, muito embora, seja possível perceber claramente, após inspeção manual dos cromatogramas de íons, que o bloco de picos filtrado para massa 733,3710, corresponde a pelo menos nove isômeros. Além disso, outra dimensão dos dados que deu mais segurança na identidade dos EF, foram os espectros de fragmentação muito semelhantes entre si (Figura 20), o que corresponde ao fato das estruturas sempre muito parecidas, além da correspondência com aqueles publicados por Verardo et al., (2019).

Não apenas foram confirmados os sinais dos EF por LC-MS/MS nos tecidos de fruto em desenvolvimento do genótipo HPE (Figuras 19E, 19G, 19I e 19L), como também, esses compostos foram detectados nos extratos de folha e raiz (Figuras 19A e 19C). Enquanto que em nenhum tecido analisado do genótipo LPE, foram encontrados indícios da presença de EF (Figuras 19B, 19D, 19F, 19H, 19J e 19M). Além disso, nas folhas, os EF tinham sido detectados até o momento apenas por método alvo-dirigido (BALDINI et al., 2014), sendo essa também, a primeira demonstração experimental da ocorrência de EF nas raízes de *J. curcas* (Figura 19A). Contudo, nas amostras de folha e raiz, em razão da baixa intensidade desses íons, não foi possível a aquisição de espectros de MS<sup>2</sup>. Em *Euphorbia fischeriana*, um diterpenóide com esqueleto tigliano já foi isolado das raízes (ADELAKUN et al., 2019).

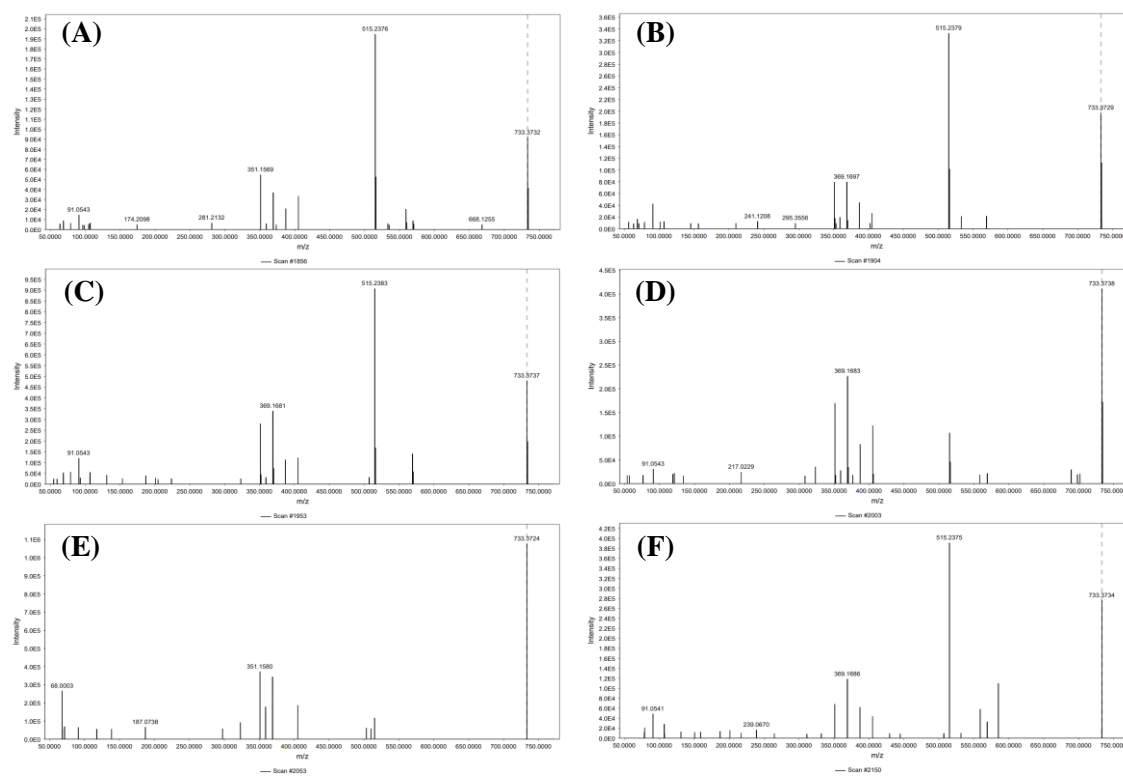
Assim, nos extratos específicos dos grupos de amostras, a consistência dos dados de EF, relativos aos tempos de retenção, massa exata e espectros de fragmentação, confirmaram a robustez do sistema LC-MS/MS durante a aquisição dos dados. Isso permitiu, não apenas confirmar a identidade desses compostos nos extratos dos tecidos de frutos em desenvolvimento, como também detectá-los nos extratos de raiz e folha do genótipo HPE.

**Figura 19.** Detecção de ésteres de forbol em diversos tecidos de *J. curcas* via LC-MS de alta resolução. Cromatogramas de íons com filtro para o  $m/z$  733,3710 (erro de massa de 3 ppm), correspondente a massa exata dos isômeros de ésteres de forbol na forma de adulto de sódio. (A), (C), (E), (G), (I) e (L), correspondem aos cromatogramas dos extratos de raiz, folha, pericarpo, testa, tegma e endosperma do genótipo HPE. (B), (D), (F), (H), (J) e (M), correspondem aos cromatogramas dos extratos de raiz, folha, pericarpo, testa, tegma e endosperma do genótipo LPE



Fonte: Elaborada pelo autor; Dados da tese.

**Figura 20.** Espectros de fragmentação dos ésteres de forbol de *J. curcas* a partir do precursor  $m/z$  733,3710, correspondentes aos íons dos isômeros na forma de adulto de sódio. Íon ID *feature* 3020, RT 10,30 min (A). Íon ID *feature* 3150, RT 10,42 min (B). Íon ID *feature* 3165, RT 10,42 min (C). Íon ID *feature* 3320, RT 10,66 min (D). Íon ID *feature* 3544, RT 10,73 min (E). Íon ID *feature* 3957, RT 11,09 min (F).



**Fonte:** Elaborada pelo autor; Dados da tese.

#### 4.7 Visão geral das *features* detectadas e metabólitos anotados

A abordagem metabolômica não-alvo foi aplicada à dois experimentos separados, como já descrito anteriormente. Um, consistiu na análise dos tecidos de fruto em três de estágios de desenvolvimento (E1, E2 e E3), e o outro, na análise de amostras de folha e raiz. Cromatogramas representativos de cada grupo de amostras em ambos os modos de ionização podem ser vistos nos Apêndices dessa tese (APÊNDICES A – F). A análise dos tecidos de fruto, levou à detecção de 2.628 e 1.039 *features* nos modos de ionização positivo e negativo, respectivamente (Tabela 3). Já, a análise dos extratos de folha e raiz, permitiu a detecção de 2.032 *features* no modo positivo e 851 *features* no modo negativo (Tabela 3). A lista completa das *features* detectadas, anotações, distribuição em raízes e folhas nos modos de ionização positiva e negativa são mostradas nas Tabelas Suplementares I e II, respectivamente. Já, as *features* detectadas nos frutos em desenvolvimento, contendo as anotações e distribuição nos quatro tecidos e três estágios de desenvolvimento, são mostradas nas Tabelas Suplementares III e IV. Além disso, em cada uma das tabelas suplementares, constam os respectivos resultados das análises estatísticas entre os grupos.

As *features* detectadas foram submetidas a três métodos de anotação, a saber: similaridade espectral contra as bibliotecas de espectros curados disponíveis no site do MS-DIAL (<http://prime.psc.riken.jp/compps/msdial/main.html#MSP>; acessada em agosto de 2022); anotação *in silico* de estrutura usando CSI:FingerID e anotação *in silico* de classe química usando CANOPUS. Ambos os métodos de anotação *in silico* integram o pacote SIRIUS 5.5.7, que também dispõe do próprio software Sirius para previsão de fórmulas moleculares. Como tem sido comum para esse tipo de experimento, um número relativamente baixo de anotações foi possível por similaridade espectral. Com pontuação de cosseno igual ou superior a 0,6, o máximo de *features* anotadas correspondeu a 15,35% para os extratos de folha e raiz no modo positivo (Tabela 3). Enquanto o valor mínimo foi 9,47% para os dados de fruto em desenvolvimento, também no modo positivo (Tabela 3). As distribuições das anotações para ambos os experimentos de acordo com a pontuação de cosseno podem ser vistas na Figura 21. No modo negativo de ionização, a maior parte dos metabólitos anotados, tiveram pontuação de cosseno variando de 0,9 a 1 (Figura 21A). Já, para as *features* detectadas no modo positivo, um maior número de anotações recebeu valor de cosseno entre 0,8 e 0,89 (Figura 21B).

A utilização dos métodos de anotação *in silico*, estendeu um pouco mais o acesso às informações contidas nos espectros de massa. Usando CSI:FingerID, o número relativo de



estruturas anotadas ficou entre ~20 e 29%, após considerar apenas aquelas que obtiveram valor de *score* maior ou igual a -100 (Tabela 3). Em relação a atribuição de classe química pelo CANOPUS, a quantidade relativa de *features* anotadas com probabilidade igual ou maior a 0,7, esteve entre ~29 e 34%, considerando ambos experimentos e modos de ionização (Tabela 3).

Diante desses dados, torna-se claro como a anotação de metabólitos a partir de dados LC-MS/MS continua a ser o calcanhar de Aquiles dessa técnica de análise (MUKHOPADHYAY, 2023). As bibliotecas espectrais, mesmo com as expansões ocorridas nos últimos anos, e o incentivo para compartilhamento de espectros, representam uma pequena fatia do espaço químico contido nos diferentes organismos. A título de conhecimento, em meados de 2015, encontravam-se depositadas na base de dados PubChem cerca 60 milhões de estruturas, das quais, um número aproximado de 20 mil, possuíam espectros MS/MS disponíveis para uso em experimentos de metabolômica não-alvo (DA SILVA; DORRESTEIN; QUINN, 2015). Além da baixa representatividade das bibliotecas de espectros MS/MS, que atualmente chegam a ~0,5 milhão para compostos de referência, a grande quantidade de artefatos de informática, contaminantes químicos e sinais redundantes, contribuem significativamente para o baixo número de anotações, quando comparado ao número de *features* detectadas (SINDELAR; PATTI, 2020).

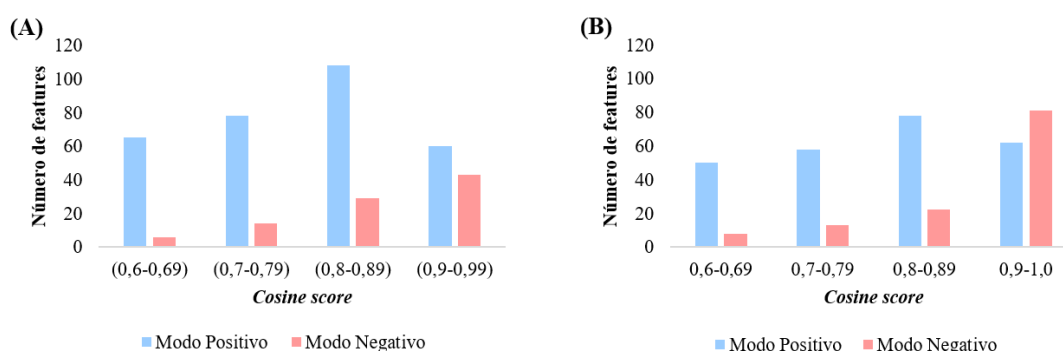
**Tabela 3.** Número de *features* detectadas e metabólitos anotados segundo análise metabolômica não-alvo de órgãos e tecidos de *J. curcas*. As *features* detectadas nos modos de ionização positivo e negativo em raízes, folhas e tecidos isolados do fruto foram anotadas em três níveis: similaridade espectral contra uma biblioteca de espectros curados, *in silico* usando CSI:FinderID e tiveram as classes químicas previstas pelo CANOPUS

	Raiz e Folha		Fruto em desenvolvimento	
	Ionização positiva	Ionização negativa	Ionização positiva	Ionização negativa
<i>Features</i> totais detectados	2.032	851	2.628	1.039
Anotações <sup>1</sup> (MS/MS similaridade)	312	92	249	124
Anotações <i>in silico</i> <sup>2</sup> (CSI:FingerID)	589	177	747	214
Anotações <i>in silico</i> <sup>3</sup> (CANOPUS)	697	252	893	307
% Anotações MS/MS	15,35	10,81	9,47	11,93
% Anotações <i>in silico</i> CSI:FingerID	28,98	20,79	28,42	20,59
% Anotações <i>in silico</i> CANOPUS	34,30	29,61	33,98	29,54

<sup>1</sup>pontuação de cosseno  $\geq 0,6$ ; <sup>2</sup>CSI:FingerID\_score  $\geq -100$ ; <sup>3</sup>Probabilidade de *NPC#Superclass*  $\geq 0,7$

**Fonte:** Elaborada pelo autor; Dados da tese.

**Figura 21.** Distribuição dos metabólitos anotados por similaridade espectral com pontuação de cosseno  $\geq 0,6$ . **(A)**. Distribuição dos metabólitos detectados em raiz e folha de *J. curcas* segundo a pontuação de cosseno; **(B)**. Distribuição dos metabólitos detectadas em tecidos de fruto em desenvolvimento de *J. curcas* de acordo com a pontuação de cosseno



**Fonte:** Elaborada pelo autor; Dados da tese.

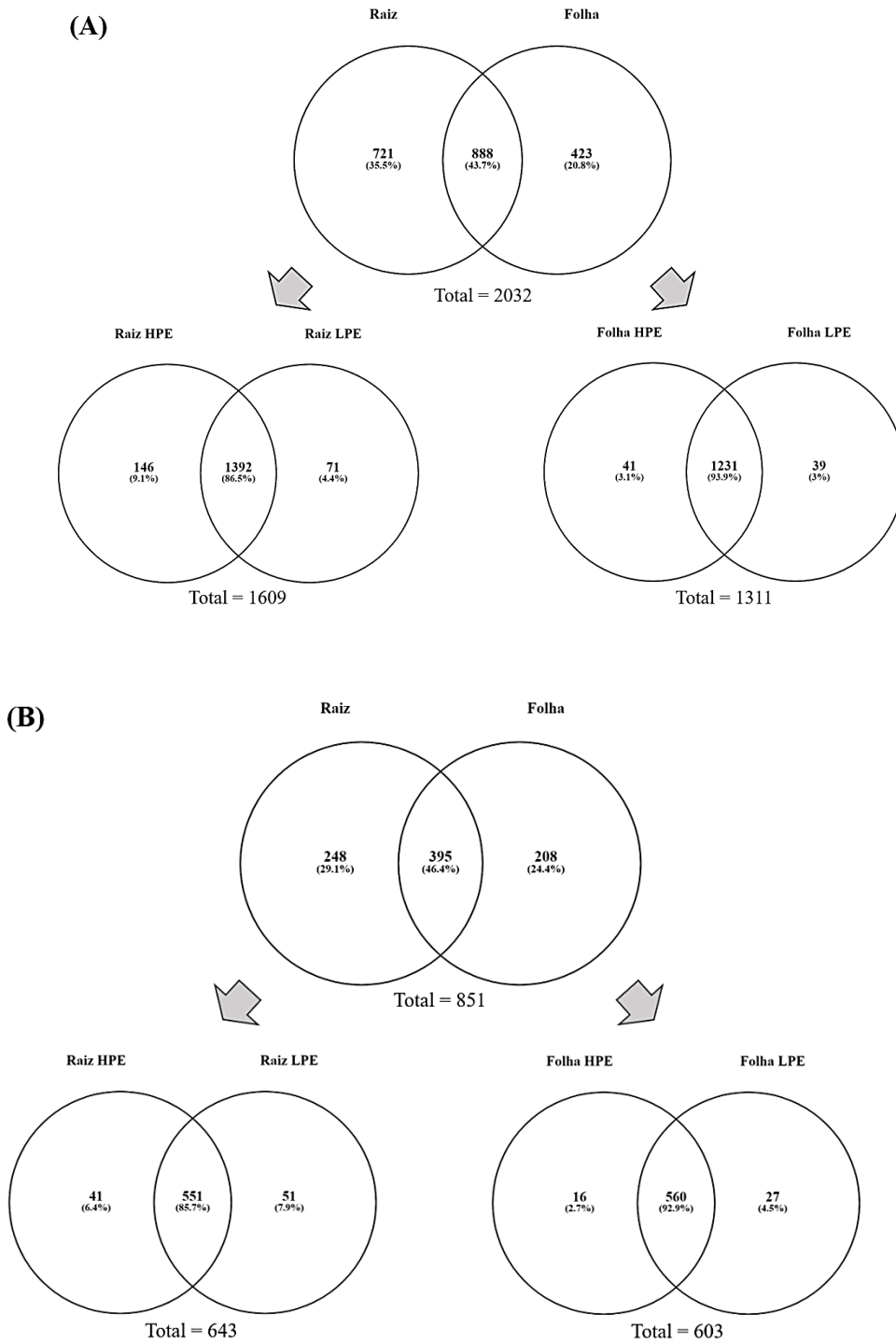
#### 4.7.1 Raiz e Folha – *features* detectadas, classes químicas e quantificação relativa

Das *features* totais detectadas em raiz e folha, menos da metade foram encontradas concomitantemente nos dois órgãos, ou seja, a maioria mostrou ser órgão-específica. Nas raízes, em torno de 85% das *features* detectadas tanto sob o modo de ionização positiva, quanto negativa, estiveram presentes nos genótipos HPE e LPE (Figura 22A e 22B). Apesar dessa similaridade qualitativa, pelos padrões de distribuição das áreas de pico avaliadas pelas análises de PCA, foi vista uma separação clara entre os genótipos (Figuras 25A e 25C). Já, nas folhas, a similaridade qualitativa entre os genótipos mostrou ser ainda maior, haja vista, ~93% das *features*, também em ambos os modos de ionização, foram encontradas tanto em HPE quanto em LPE (Figura 22A e 22B). Até mesmo pela análise de PCA, não foi possível observar uma separação dos grupos (Figura 25B e 25D).

Segundo a análise de ontologia de classe química usando CANOPUS, as *NPC#Superclass* mais enriquecidas foram de glicerofosfolipídeos e glicerolipídeos, tanto nas raízes quanto nas folhas, o que condiz com o método de extração dos metabólitos (Figura 23). Por outro lado, quantidades substancialmente maiores de diterpenóides e sesquiterpenóides, foram anotados nas raízes em comparação com as folhas (Figura 23A). Dentre os terpenóides, as folhas tiveram maior destaque no acúmulo de carotenóides (C40), que inclusive formaram uma família molecular pela análise de FBMN (Figura 24). Além disso, as raízes também se destacaram quanto a deposição de compostos fenólicos, como lignanas, cumarinas e fenilpropanóides C6-C3 (Figuras 23A e 23B).

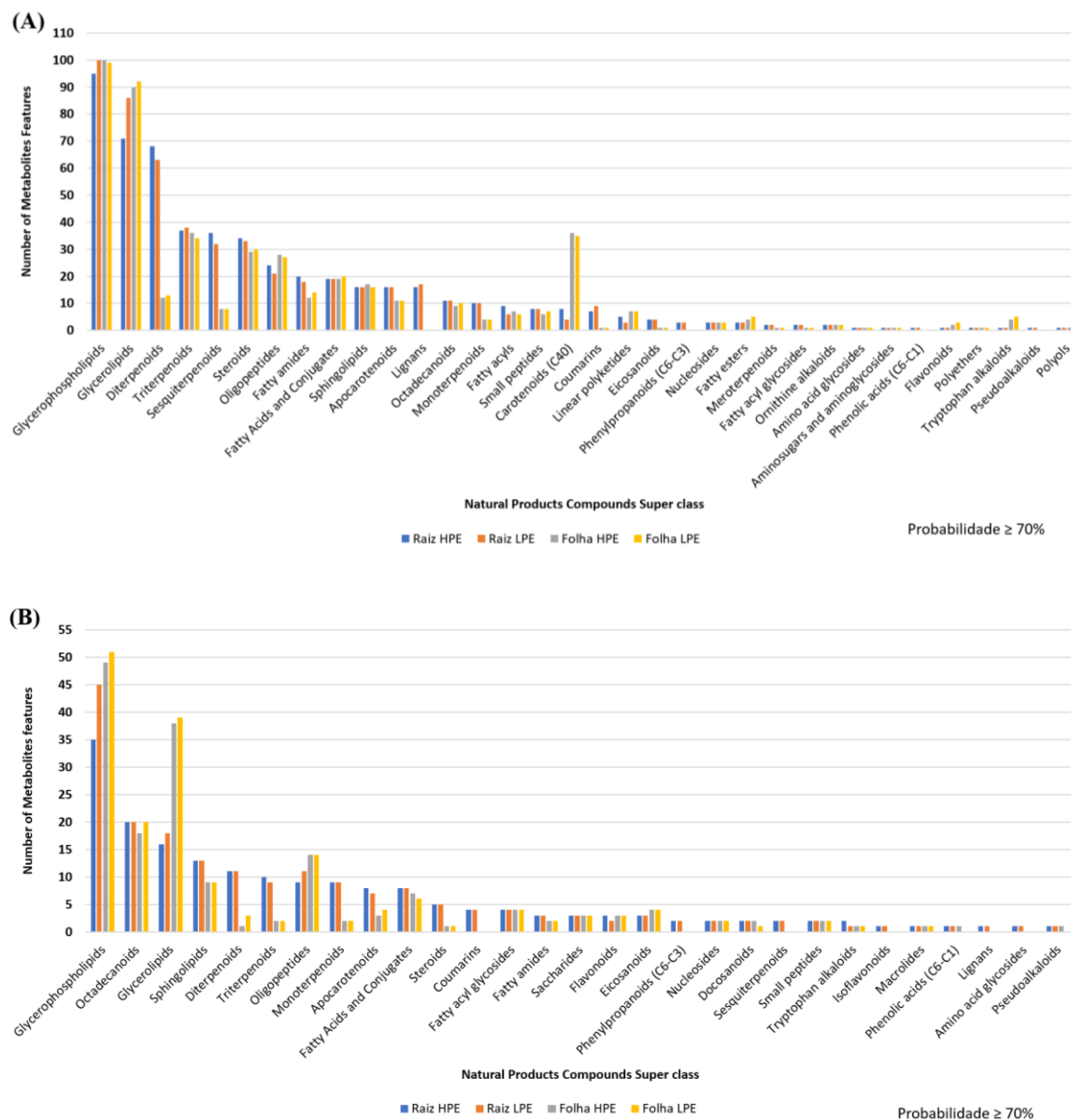
Dessas classes bastante contrastantes entre raiz e folha, diferenças quantitativas marcantes entre os genótipos puderam ser vistas após aplicação do teste-t, que serão descritas em detalhes mais adiante. O número de *features* diferencialmente abundantes entre os grupos são mostradas na Tabela 4, enquanto a análise de clusterização hierárquica discriminou muito bem os genótipos e os dois órgãos comparados de acordo com o padrão de deposição dessas *features* (Figuras 26A, 26B, 26C e 26D).

**Figura 22.** Diagramas de Venn mostrando as distribuições das *features* totais detectadas em extratos de raiz e folha de pinhão-manso, genótipos HPE e LPE. **(A).** Distribuição das *features* detectadas no modo de ionização positivo. **(B)** Distribuição das *features* detectadas no modo de ionização negativo.



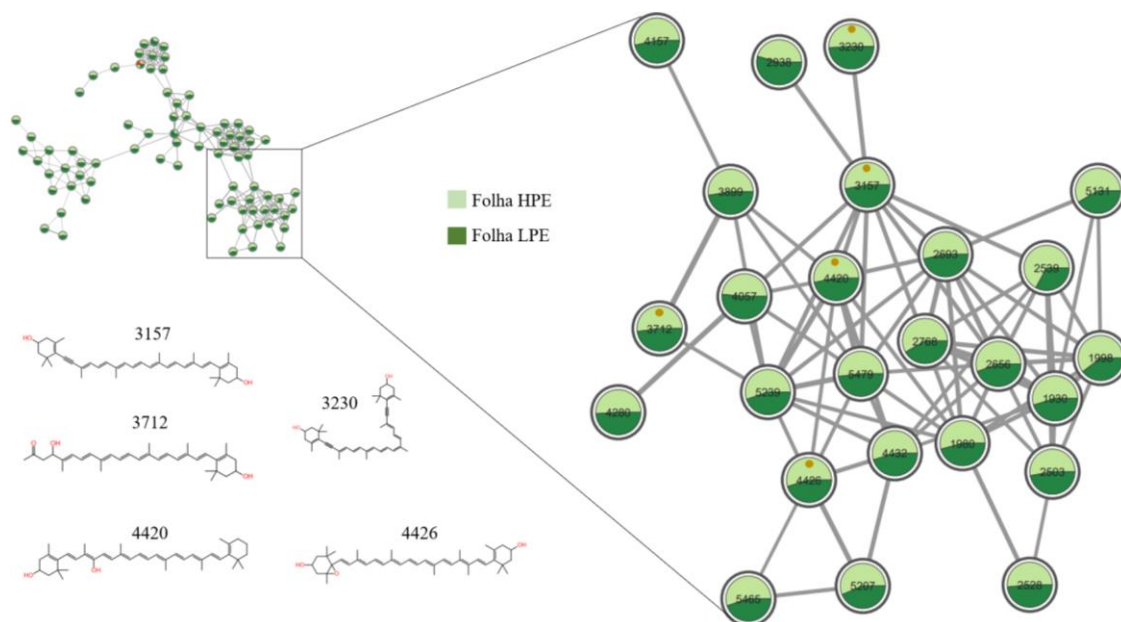
Fonte: Elaborada pelo autor; Dados da tese.

**Figura 23.** Ontologia de classe química segundo a classificação *NPC#Superclass* das *features* detectadas em raiz e folha de *J. curcas* usando CANOPUS. **(A).** Classes químicas das *features* detectadas em raiz e folha dos genótipos HPE e LPE no modo de ionização positiva. **(B).** Classes químicas das *features* detectadas em raiz e folha dos genótipos HPE e LPE no modo de ionização negativa



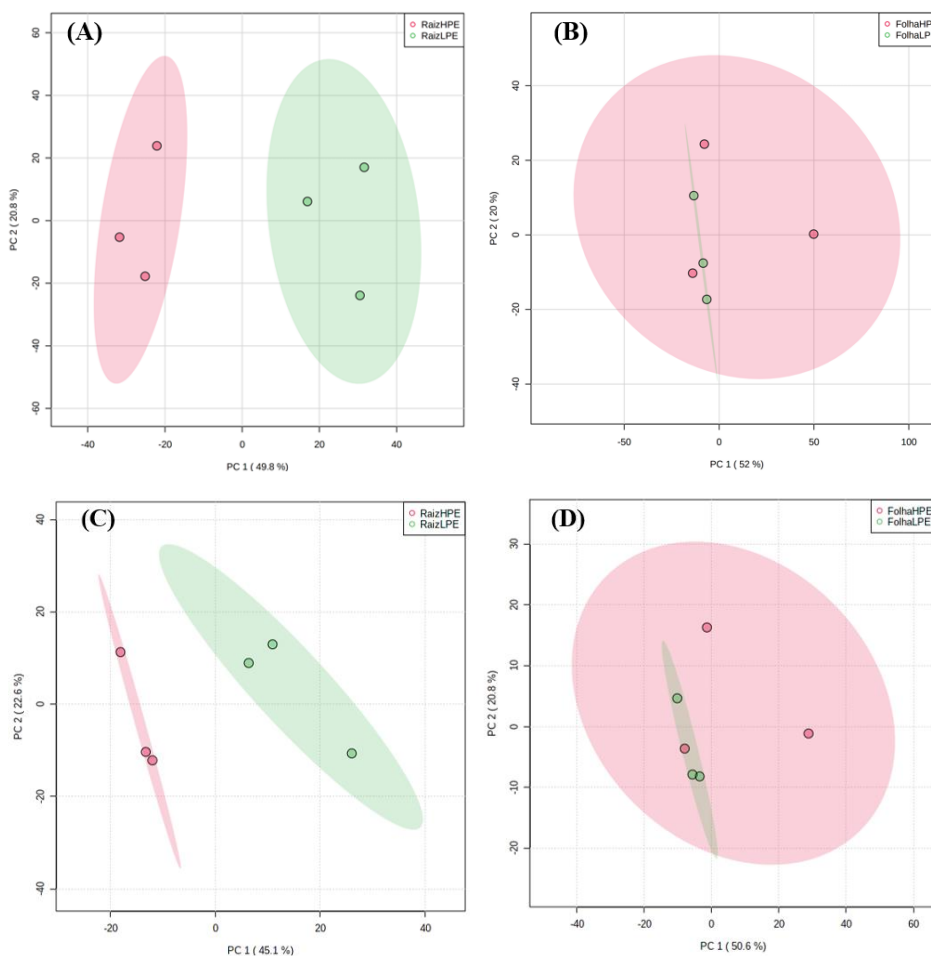
**Fonte:** Elaborada pelo autor; Dados da tese.

**Figura 24.** Família molecular construída pela abordagem de Redes Moleculares Baseadas em *Features*, onde estão inseridos Carotenóides (C40) detectados em folhas de pinhão-manso, genótipos HPE e LPE. Os nós representam metabólitos e são mostrados na forma de gráfico tipo pizza, que expressam a abundância relativa do metabólito nos grupos de amostra analisados. Para nós assinalados com bolas cor caramelo, as respectivas estruturas são mostradas ao lado esquerdo da Figura. Para esses compostos, não houve diferença estatística entre os genótipos



**Fonte:** Elaborada pelo autor; Dados da tese.

**Figura 25.** Análise de componente principal das *features* detectadas em raiz e folha dos genótipos de pinhão-manso HPE e LPE nos modos de ionização positiva e negativa. Raiz (A) e folha (B) sob ionização positiva; Raiz (C) e folha (D) sob ionização negativa



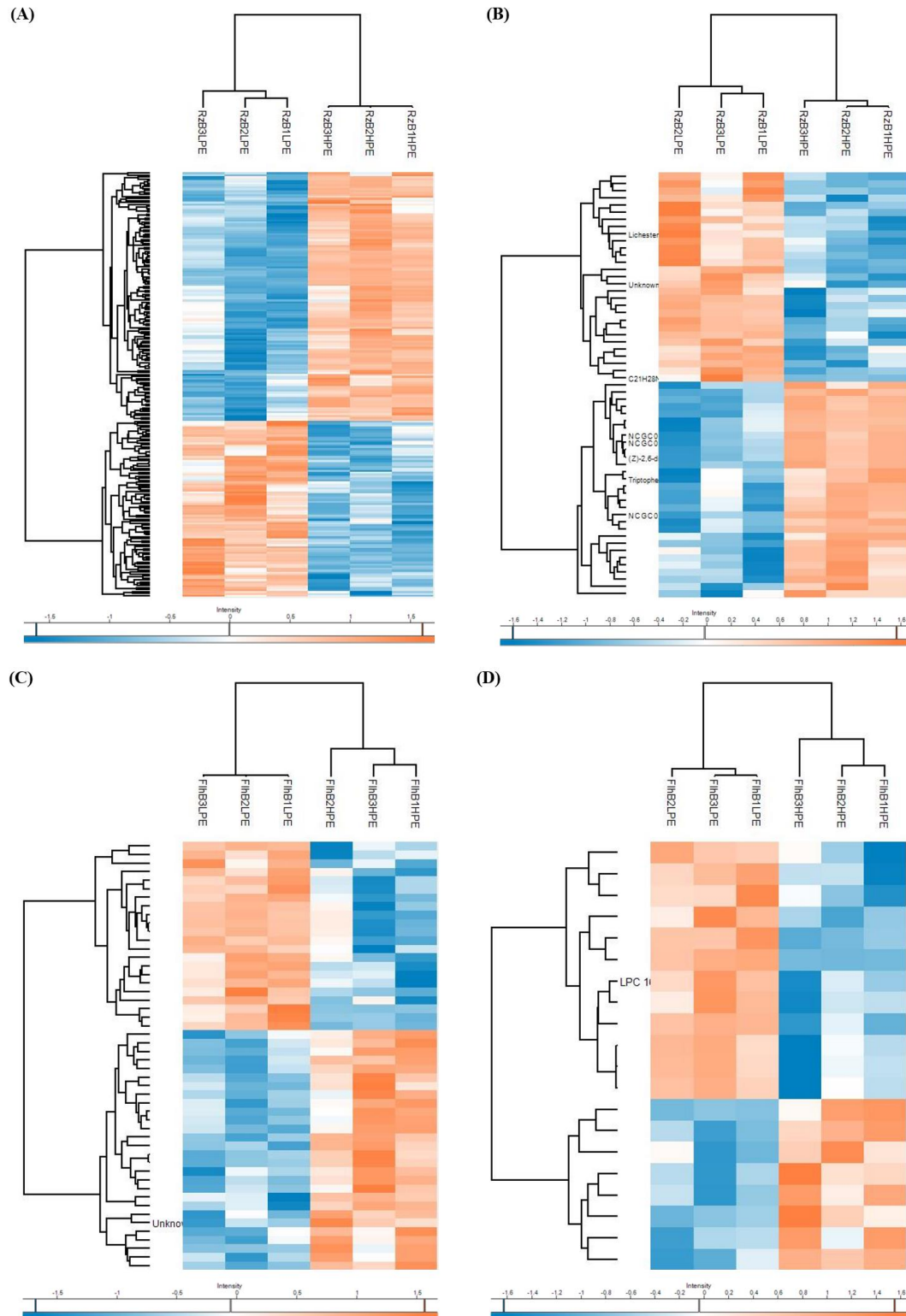
**Fonte:** Elaborada pelo autor; Dados da tese.

**Tabela 4.** Número de *features* detectadas em raízes e folhas que demonstraram diferença significativa pelo teste-t de *Student* à 5% de probabilidade entre os genótipos HPE e LPE

Modo de Ionização	Órgão analisado	
	Raiz	Folha
Positivo	271	50
Negativo	59	20

**Fonte:** Elaborada pelo autor; Dados da tese.

**Figura 26.** Clusterização hierárquica das *features* detectadas em raízes e folhas de pinhão-manso que demonstraram diferença significativa segundo o teste-t de *Student* à 5% de probabilidade entre os genótipos HPE e LPE. *Features* diferencialmente abundantes detectadas nas raízes no modo de ionização positivo (A) e negativo (B). *Features* diferencialmente abundantes detectadas nas folhas no modo de ionização positivo (C) e negativo (D)



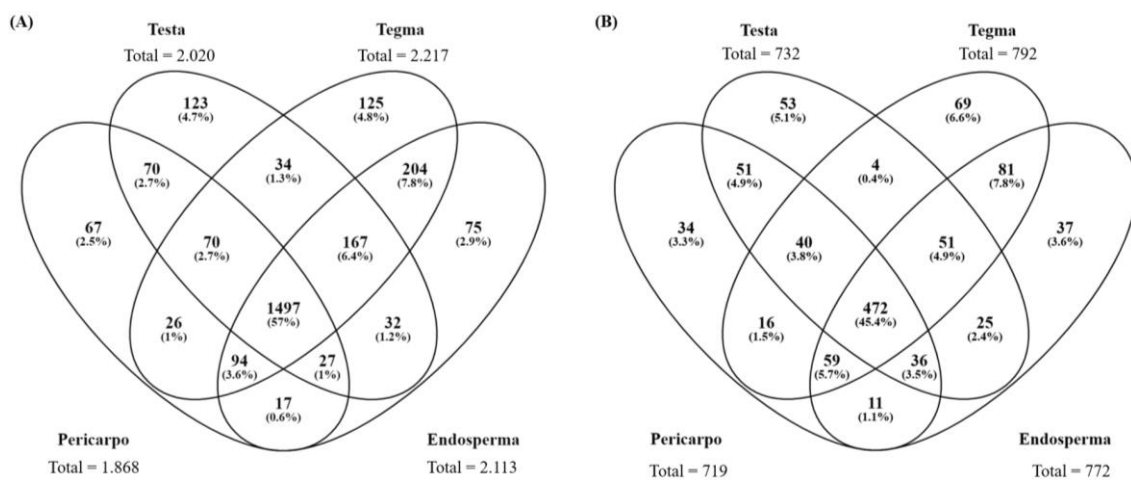
Fonte: Elaborada pelo autor; Dados da tese.



#### 4.7.2 Fruto em desenvolvimento – *features* detectadas, classes químicas e quantificação relativa

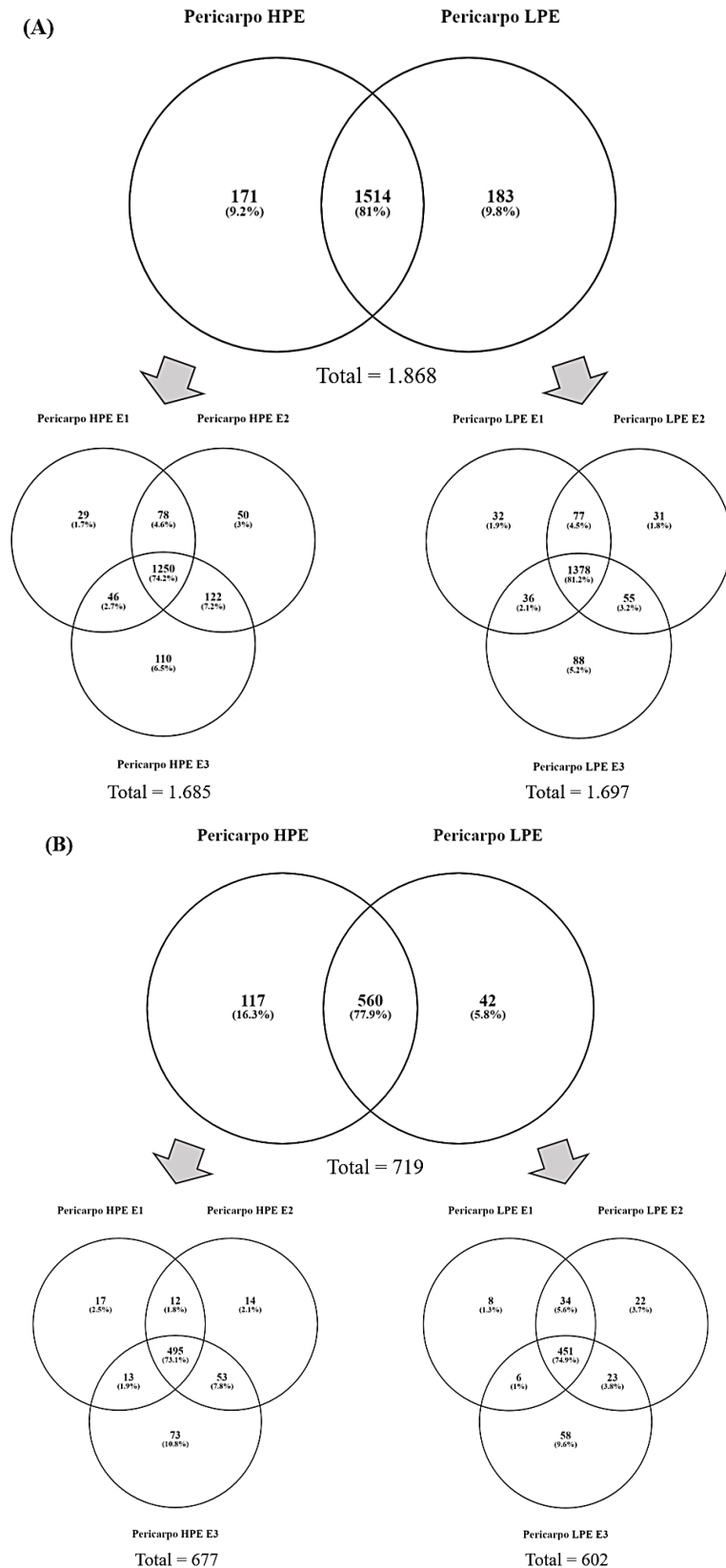
Nos tecidos dissecados do fruto em desenvolvimento, foram detectados no modo de ionização positiva, 1.868, 2.020, 2.217 e 2.113 *features* nos extratos de pericarpo, testa, tegma e endosperma, respectivamente (Figura 27A e Tabela suplementar III). Enquanto, no modo negativo, os valores foram 719, 732, 792 e 772 (Figura 27B e Tabela suplementar IV). Um número razoável de *features* foram onipresentes nos quatro tecidos (57% no modo positivo e 45,4% no modo negativo; Figuras 27A e 27B). As distribuições das *features* em cada tecido e modo de ionização, de acordo com o genótipo e estágio de desenvolvimento são mostradas nas Figuras 28, 29, 30 e 31.

**Figura 27.** Diagramas de Venn com as distribuições das *features* totais detectadas em extratos de pericarpo, testa, tegma e endosperma isolados de frutos em desenvolvimento de *J. curcas*. **(A).** Distribuição das *features* detectadas no modo positivo. **(B).** Distribuição das *features* detectadas no modo negativo



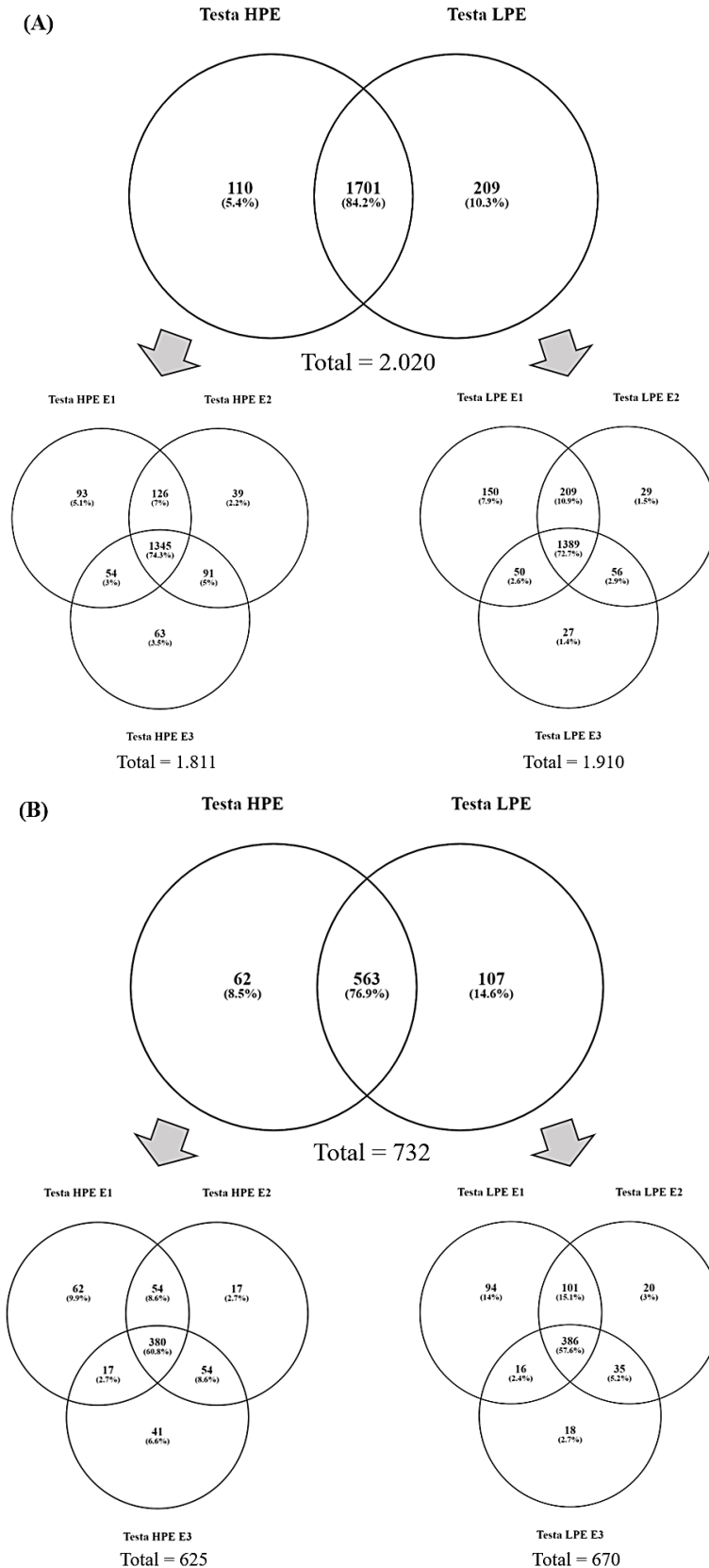
**Fonte:** Elaborada pelo autor; Dados da tese.

**Figura 28.** Diagramas de Venn mostrando as distribuições das *features* totais detectadas em extratos de pericarpo em desenvolvimento (E1, E2 e E3) de frutos de *J. curcas*, genótipos HPE e LPE. **(A).** Distribuição das *features* detectadas no modo de ionização positivo. **(B)** Distribuição das *features* detectadas no modo de ionização negativo



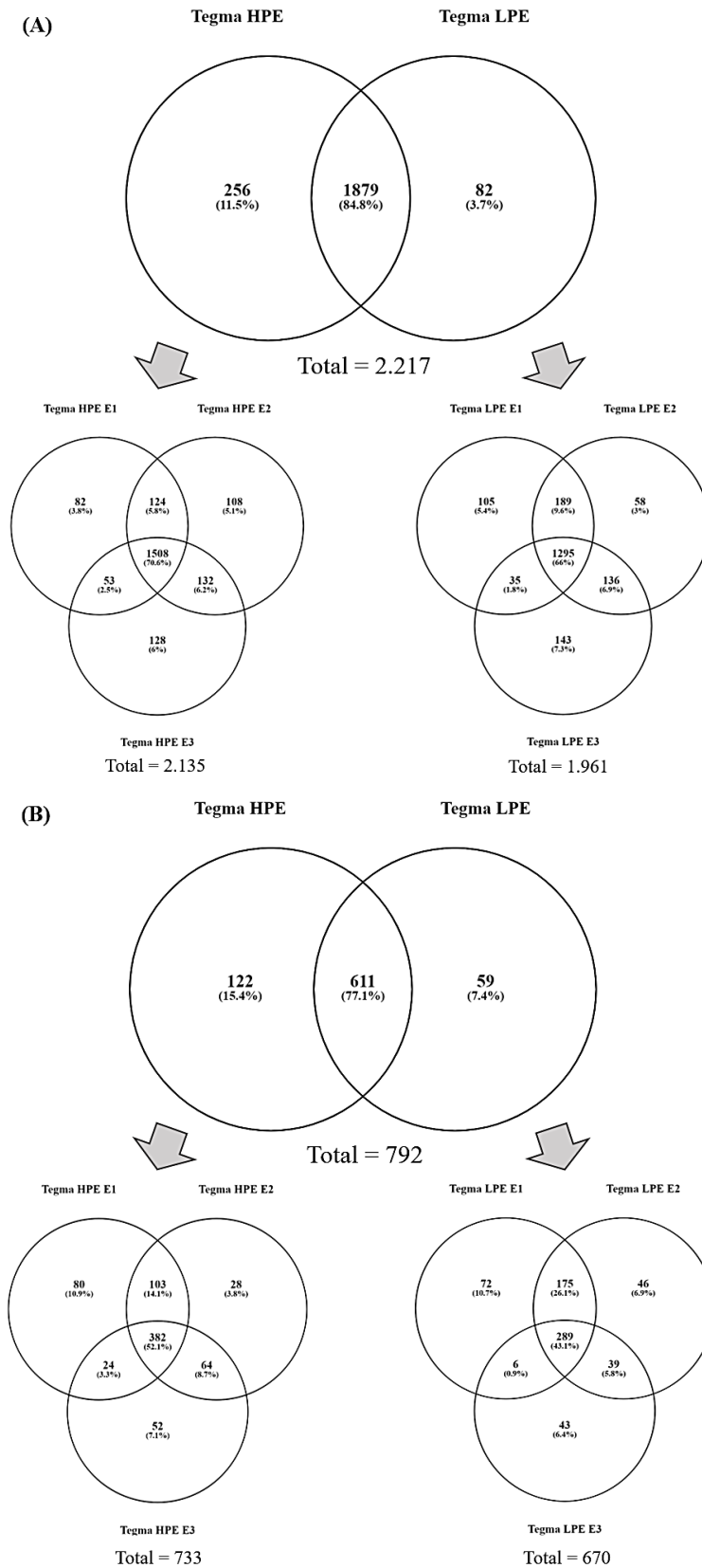
**Fonte:** Elaborada pelo autor; Dados da tese.

**Figura 29.** Diagramas de Venn mostrando as distribuições das *features* totais detectadas em extratos de testa em desenvolvimento (E1, E2 e E3) de *J. curcas*, genótipos HPE e LPE. **(A).** Distribuição das *features* detectadas no modo de ionização positivo. **(B)** Distribuição das *features* detectadas no modo de ionização negativo



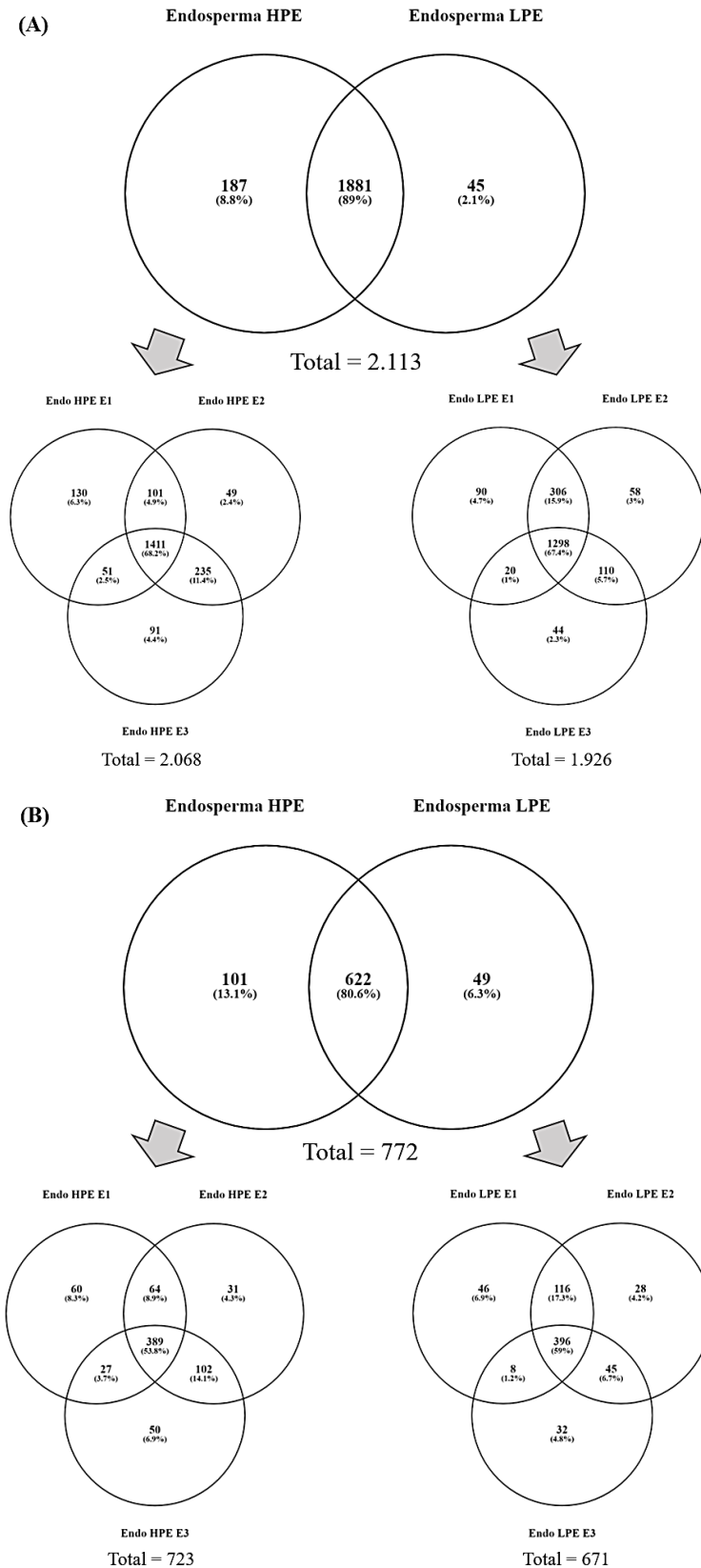
**Fonte:** Elaborada pelo autor; Dados da tese.

**Figura 30.** Diagramas de Venn mostrando as distribuições das *features* totais detectadas em extratos de tegma em desenvolvimento (E1, E2 e E3) de *J. curcas*, genótipos HPE e LPE. **(A).** Distribuição das *features* detectadas no modo de ionização positivo. **(B)** Distribuição das *features* detectadas no modo de ionização negativo



**Fonte:** Elaborada pelo autor; Dados da tese.

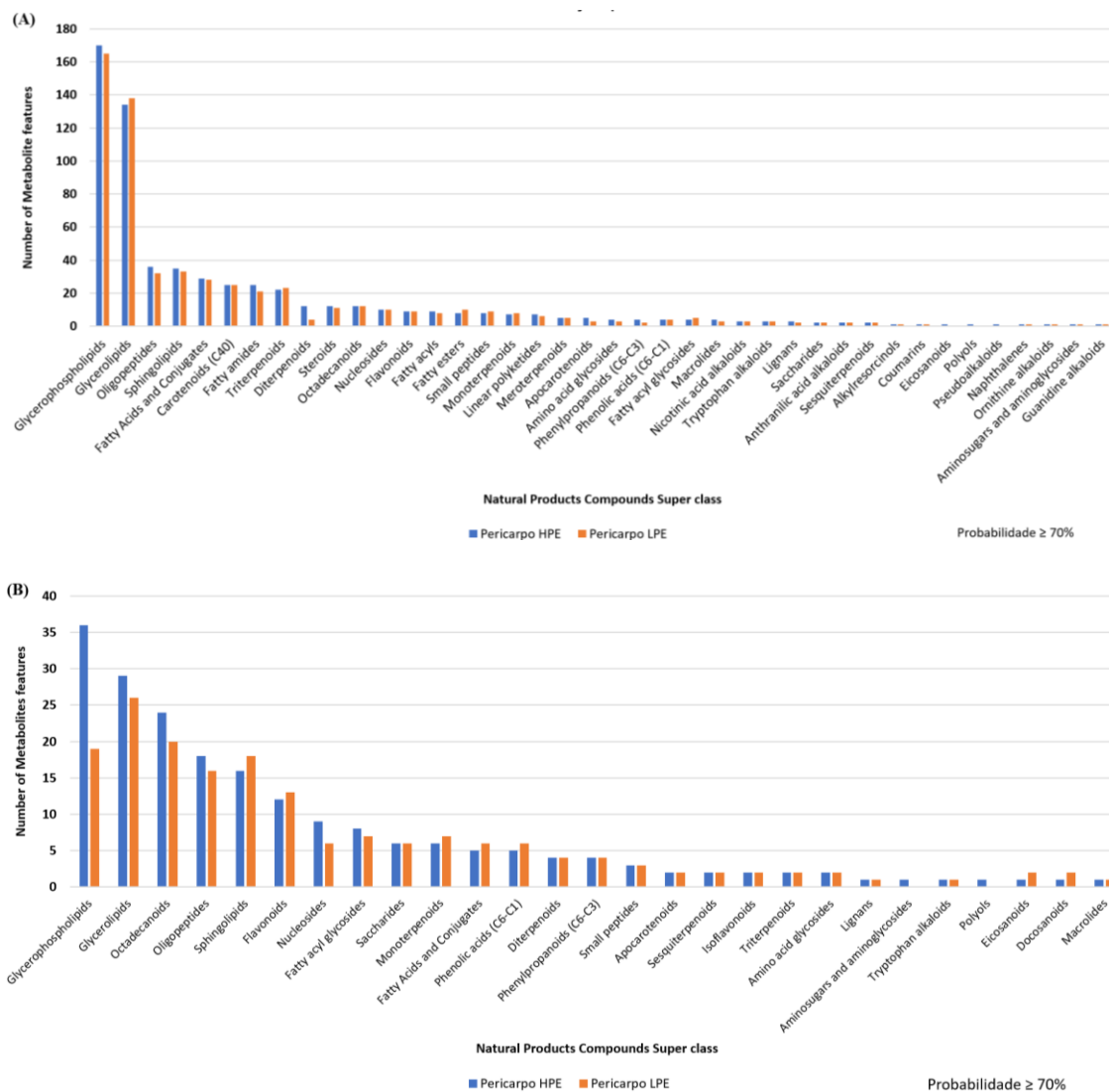
**Figura 31.** Diagramas de Venn mostrando as distribuições das *features* totais detectadas em extratos de endosperma em desenvolvimento (E1, E2 e E3) de *J. curcas*, genótipos HPE e LPE. **(A).** Distribuição das *features* detectadas no modo de ionização positivo. **(B)** Distribuição das *features* detectadas no modo de ionização negativo



**Fonte:** Elaborada pelo autor; Dados da tese.

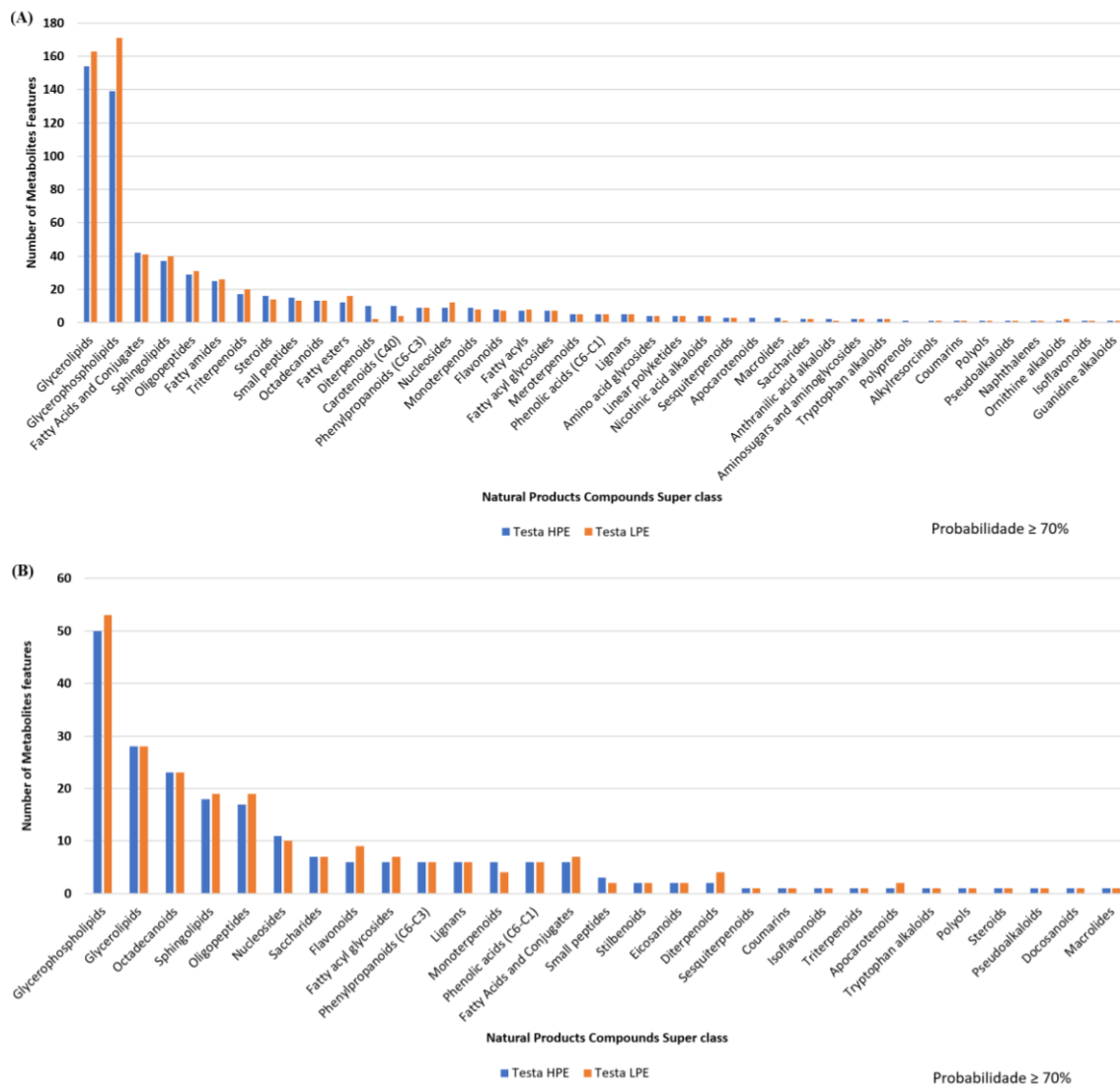
Semelhante ao observado nos extratos de folha e raiz, os extratos dos tecidos de fruto foram acentuadamente enriquecidos com lipídeos de acordo com a anotação das classes químicas pelo CANOPUS, o que é explicado pelo solventes usados no ato da extração dos metabólitos. Foram notoriamente destacadas as *NPC#Superclass* de glicerofosfolipídeos, glicerolipídeos, esfingolipídeos, ácidos graxos e conjugados e amidas de ácido graxos no modo de ionização positiva (Figuras 32A, 33A, 34A e 35A), enquanto no modo negativo, a classe de octadecanóides apresentou um número expressivo de anotações (Figuras 32B, 33B, 34B e 35B). A classe dos diterpenóides foi consistentemente mais abundante nas amostras do genótipo HPE no modo positivo, isso em função principalmente dos EF. Curiosamente, uma diferença interessante entre os genótipos HPE e LPE foi observada em relação ao número de carotenóides (C40), pois, o dobro foi encontrado na testa do genótipo HPE (Figura 33B).

**Figura 32.** Ontologia de classe química segundo a classificação *NPC#Superclass* das *features* detectadas no pericarpo em desenvolvimento dos genótipos de pinhão-manso HPE e LPE usando CANOPUS. **(A).** Classes químicas das *features* detectadas no pericarpo dos genótipos HPE e LPE no modo de ionização positiva. **(B).** Classes químicas das *features* detectadas no pericarpo dos genótipos HPE e LPE no modo de ionização negativa



**Fonte:** Elaborada pelo autor; Dados da tese.

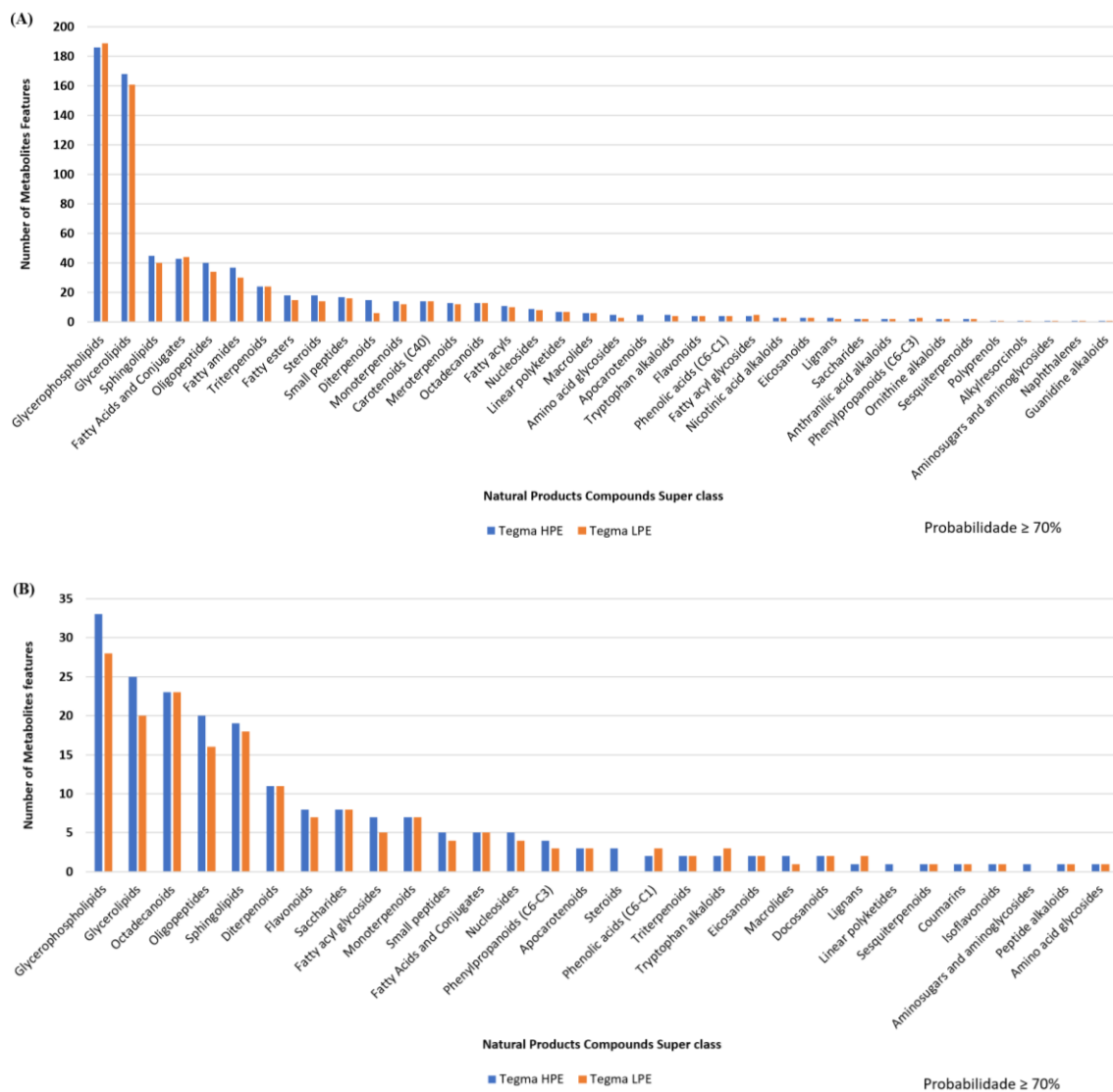
**Figura 33.** Ontologia de classe química segundo a classificação *NPC#Superclass* das *features* detectadas na testa em desenvolvimento dos genótipos de pinhão-manso HPE e LPE usando CANOPUS. **(A).** Classes químicas das *features* detectadas na testa dos genótipos HPE e LPE no modo de ionização positiva. **(B).** Classes químicas das *features* detectadas na testa dos genótipos HPE e LPE no modo de ionização negativa



**Fonte:** Elaborada pelo autor; Dados da tese.

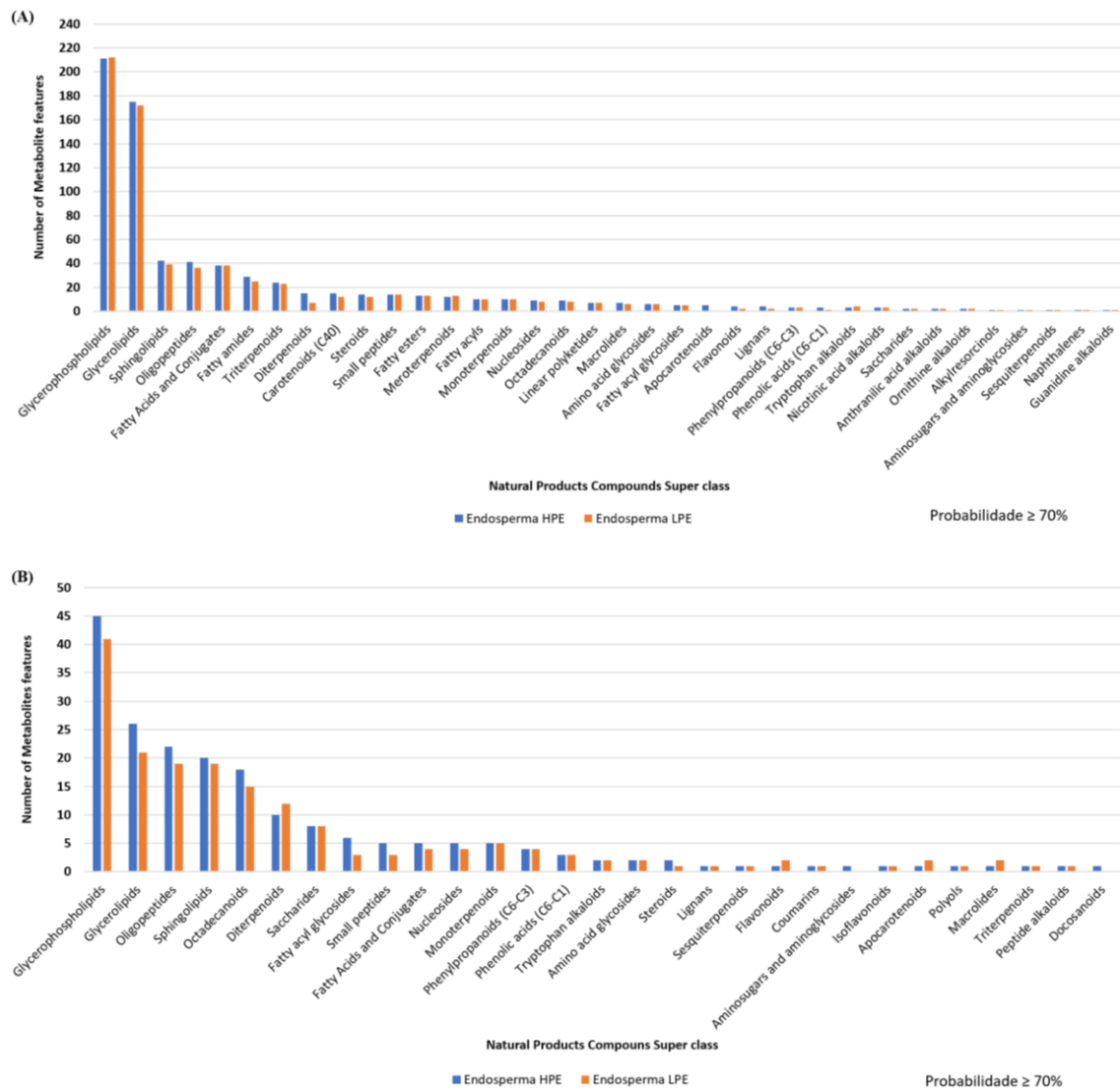


**Figura 34.** Ontologia de classe química segundo a classificação *NPC#Superclass* das *features* detectadas no tegma em desenvolvimento dos genótipos de pinhão-manso HPE e LPE usando CANOPUS. **(A).** Classes químicas das *features* detectadas no tegma dos genótipos HPE e LPE no modo de ionização positiva. **(B).** Classes químicas das *features* detectadas no tegma dos genótipos HPE e LPE no modo de ionização negativa



**Fonte:** Elaborada pelo autor; Dados da tese.

**Figura 35.** Ontologia de classe química segundo a classificação *NPC#Superclass* das *features* detectadas no endosperma em desenvolvimento dos genótipos de pinhão-manso HPE e LPE usando CANOPUS. **(A).** Classes químicas das *features* detectadas no endosperma dos genótipos HPE e LPE no modo de ionização positiva. **(B).** Classes químicas das *features* detectadas no endosperma dos genótipos HPE e LPE no modo de ionização negativa

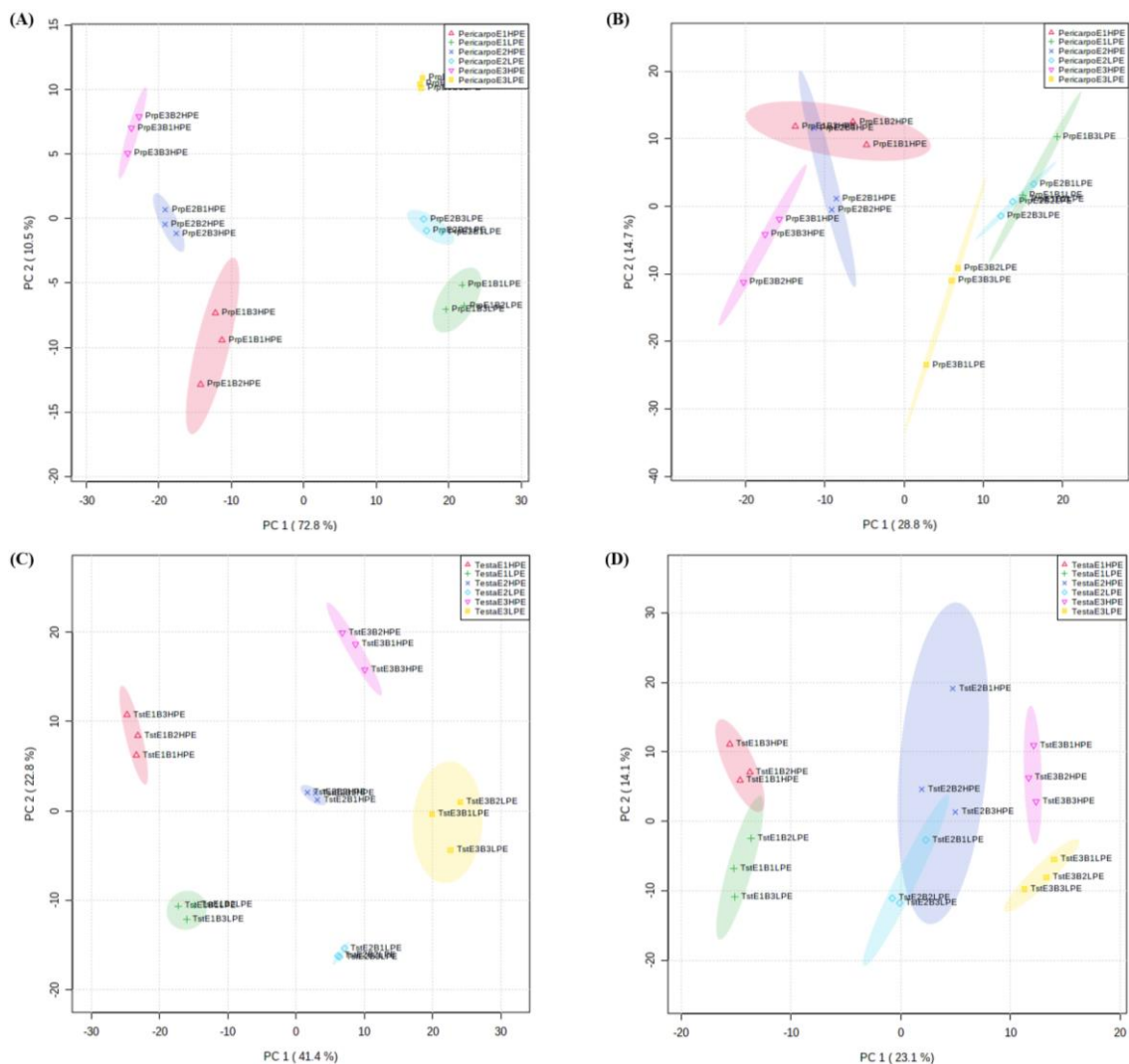


**Fonte:** Elaborada pelo autor; Dados da tese.

De acordo com as análises de PCA, os grupos de amostras do pericarpo foram bem discriminados, tanto em relação aos genótipos quanto aos estágios de desenvolvimento. No modo positivo de ionização, os genótipos foram separados especialmente pelo PC1, que respondeu por 78,8% da variação, em que as amostras do genótipo HPE estiveram nos quadrantes 2 e 3, e as do genótipo LPE, nos quadrantes 1 e 4 (Figura 36A). Já, os estágios de desenvolvimento, foram mais bem distanciados pelo PC2, com 10,5% de variação, onde as amostras do estágio E1 ficaram nos quadrantes 3 e 4, as do estágio E2 próximas do zero, e as do estágio E3 foram alocadas nos quadrantes 1 e 2 (Figura 36A).

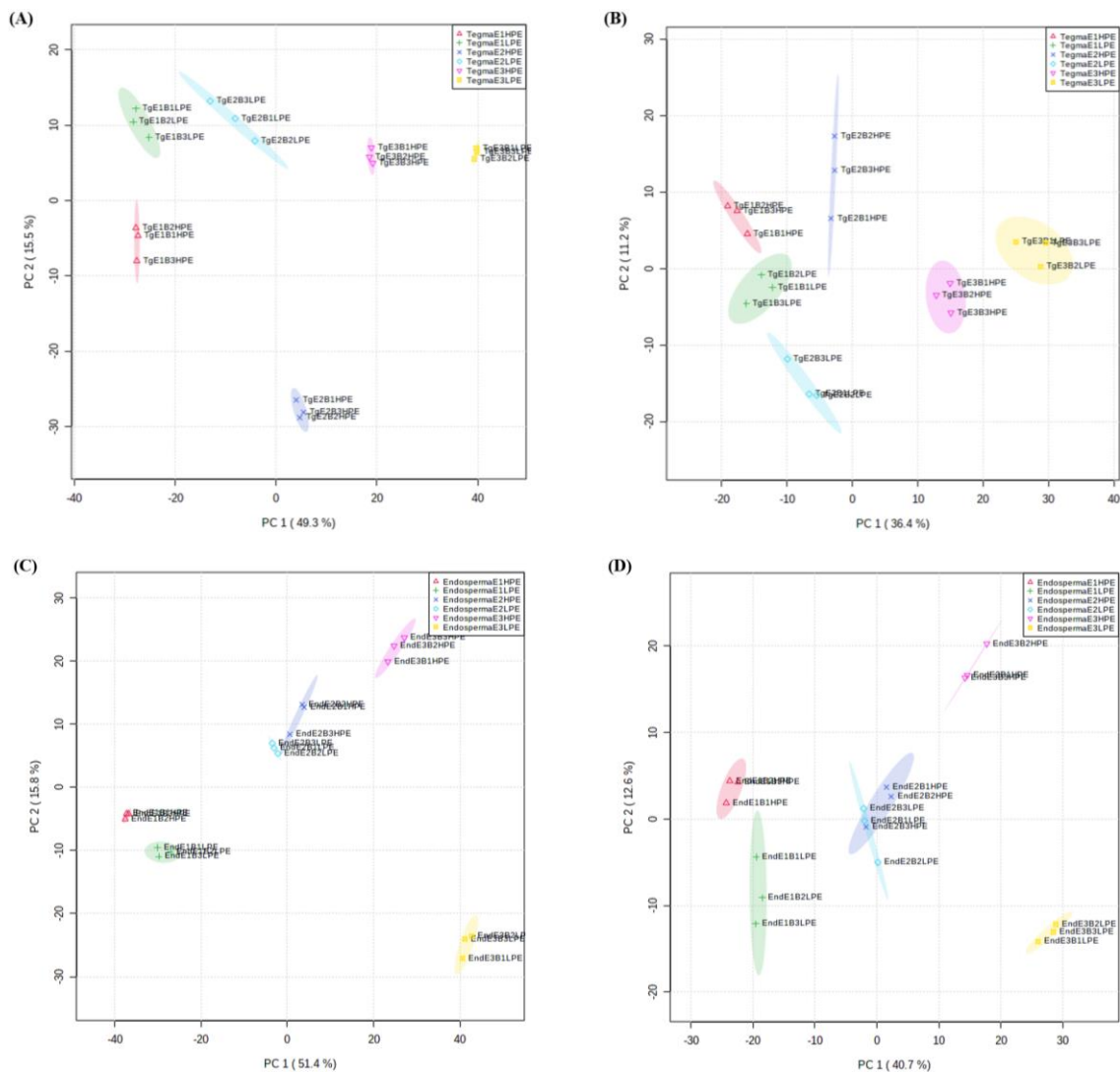
Para as amostras de testa no modo positivo de ionização também houve uma boa separação dos grupos, sendo que o PC1, que respondeu por 41,4% da variação, discriminou melhor os estágios de desenvolvimento, enquanto o PC2, com variação de 22,8%, foi responsável pela separação dos dois genótipos (Figura 36C). Algo semelhante ocorreu com as amostras de tegma, em que os estágios de desenvolvimento foram mais bem discriminados pelo PC1, com 49,3% de variação, e os genótipos pelo PC2, apesar das amostras do estágio E3 de ambos genótipos terem ficado no quadrante 1 (Figura 37A). Já, em relação as amostras de endosperma, os três estágios de desenvolvimento analisados foram consistentemente distinguidos pelo PC1, com variação de 51,4%, enquanto os genótipos apresentaram diferenças um pouco mais claras apenas entre as amostras do estágio E3 (Figura 37C).

**Figura 36.** Análise de componente principal (PCA) das *features* detectadas em pelo menos 85% das amostras de pericarpo (Prp) e testa (Tst) em desenvolvimento (estágios E1, E2 e E3) dos genótipos de pinhão-manso HPE e LPE. **(A)** PCA das *features* detectadas sob ionização positiva no pericarpo nos estágios de desenvolvimento E1, E2 e E3, dos genótipos de pinhão-manso HPE e LPE. **(B)** PCA das *features* detectadas sob ionização negativa no pericarpo nos estágios de desenvolvimento E1, E2 e E3, dos genótipos de pinhão-manso HPE e LPE. **(C)** PCA das *features* detectadas sob ionização positiva na testa nos estágios de desenvolvimento E1, E2 e E3, dos genótipos de pinhão-manso HPE e LPE. **(D)** PCA das *features* detectadas sob ionização negativa na testa nos estágios de desenvolvimento E1, E2 e E3, dos genótipos de pinhão-manso HPE e LPE. Cada grupo de amostra foi representado por três réplicas biológicas. E1 HPE (vermelho); E2 HPE (púrpura); E3 HPE (rosa); E1 LPE (verde); E2 LPE (azul); E3 LPE (amarelo)



**Fonte:** Elaborada pelo autor; Dados da tese.

**Figura 37.** Análise de componente principal (PCA) das *features* detectadas em pelo menos 85% das amostras de tegma (Tg) e endosperma (End) em desenvolvimento (estágios E1, E2 e E3) dos genótipos de pinhão-mansó HPE e LPE. **(A)** PCA das *features* detectadas sob ionização positiva no tegma nos estágios de desenvolvimento E1, E2 e E3, dos genótipos de pinhão-mansó HPE e LPE. **(B)** PCA das *features* detectadas sob ionização negativa no tegma nos estágios de desenvolvimento E1, E2 e E3, dos genótipos de pinhão-mansó HPE e LPE. **(C)** PCA das *features* detectadas sob ionização positiva no endosperma nos estágios de desenvolvimento E1, E2 e E3, dos genótipos de pinhão-mansó HPE e LPE. **(D)** PCA das *features* detectadas sob ionização negativa no endosperma nos estágios de desenvolvimento E1, E2 e E3, dos genótipos de pinhão mansó HPE e LPE. Cada grupo de amostra foi representado por três réplicas biológicas. E1 HPE (vermelho); E2 HPE (púrpura); E3 HPE (rosa); E1 LPE (verde); E2 LPE (azul); E3 LPE (amarelo)



**Fonte:** Elaborada pelo autor; Dados da tese.

A análise de clusterização hierárquica foi procedida com as *features* diferencialmente abundantes (Tabela 5) segundo os testes de ANOVA e Tukey, à 5% de probabilidade. De modo geral, as amostras do pericarpo foram mais bem separadas em função dos genótipos, enquanto as amostras de testa, tegma e endosperma se agruparam melhor em razão dos estágios de desenvolvimento. Vale ressaltar que todas as réplicas biológicas de cada grupo estiveram sempre juntas no mesmo grupo.

Para as amostras de pericarpo foram observados dois grandes ramos, um contendo as amostras do genótipo HPE, subdividido de acordo com os estágios de desenvolvimento, e um outro ramo formado pelas amostras do genótipo LPE, com subdivisões semelhantes (Figuras 38A e 38B). Isso se deu para os dados adquiridos em ambos os modos de ionização.

Em relação as amostras da testa, a clusterização dos grupos deu-se melhor de acordo com os estágios de desenvolvimento. No modo positivo, formaram-se dois ramos principais, um menor, contendo amostras do estágio E1, e outro maior, que englobou amostras dos estágios E2 e E3. Esse ramo maior foi subdividido em outros dois subgrupos principais, sendo um formado pelas amostras do estágio E2 de ambos os genótipos mais as amostras do estágio E3 do genótipo LPE, e outro grupo mais distante que conteve as amostras do estágio E3 do genótipo HPE (Figura 38C). No modo negativo, uma clusterização semelhante foi observada, porém no ramo maior, foram as amostras do estágio E3 do genótipo LPE que formaram um subgrupo separado (Figura 38D).

No tegma, para os dados adquiridos no modo positivo, dois ramos principais puderam ser formados, um com as amostras do estágio E1 de ambos os genótipos, mais as amostras do estágio E2 do genótipo LPE mais distanciadas. O outro ramo conteve as amostras do estágio E2 do genótipo HPE, que formaram um subgrupo aparte das amostras do estágio E3 (Figura 39A). Já, para o modo negativo, foi observado um ramo maior que englobou as amostras dos estágios E1 e E2, sendo que as amostras do estágio E1 ficaram em um subgrupo, e as amostras do estágio E2 formaram subgrupos individuais. Enquanto no outro ramo, ficaram as amostras do estágio E3 de ambos genótipos (Figura 39B).

Finalmente, as amostras do endosperma também apresentaram uma melhor separação em razão dos estágios de desenvolvimento. No modo positivo, um ramo maior conteve as amostras dos estágios E1 e E2, sendo que para cada estágio formaram-se subgrupos individuais. No outro ramo, encontraram-se as amostras do estágio E3 de ambos os genótipos (Figura 39C). Já, no modo negativo, a clusterização foi semelhante, contudo, as amostras do estágio E3 do genótipo HPE, ficaram incluídas num subgrupo mais próximo do estágio E2, enquanto as amostras do estágio E3 do genótipo LPE ficaram individualizados em outro ramo

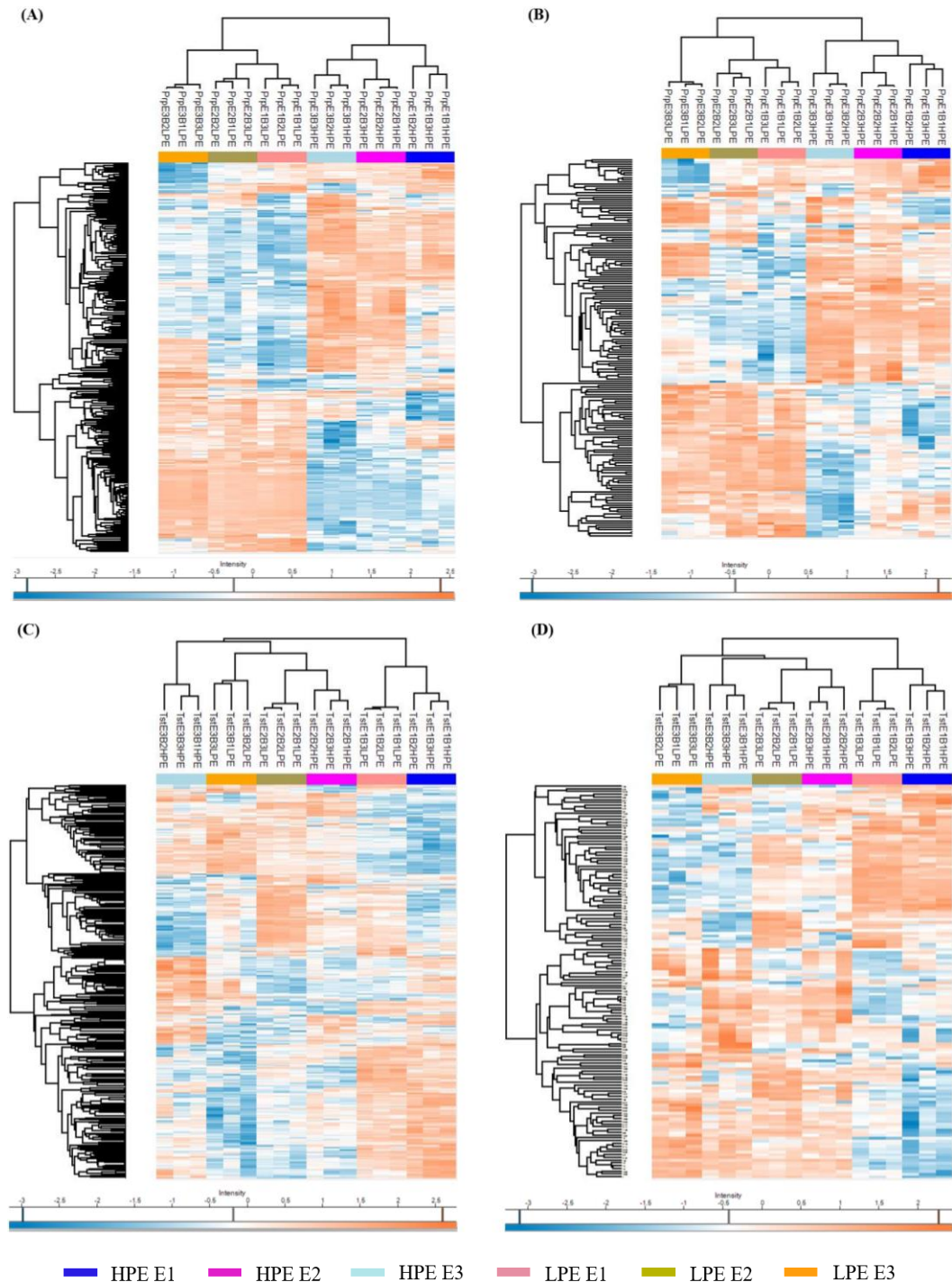
(Figura 39D). Em resumo, esses dados demonstraram que as amostras de pericarpo se distinguem muito mais devido aos genótipos, já que variações mais brandas foram vistas entre os três estágios de desenvolvimento analisados. Por outro lado, os tecidos de semente analisados (testa, tegma e endosperma), além de mostrarem variações razoáveis entre os genótipos, sofreram mudanças mais acentuadas no curso do desenvolvimento.

**Tabela 5.** Número de *features* detectadas no pericarpo, testa, tegma e endosperma de frutos em desenvolvimento de *J. curcas*, que demonstraram diferença significativa pelo teste de ANOVA usando FDR baseado em permutação à 5% de probabilidade entre os genótipos HPE e LPE e/ou entre os estágios de desenvolvimento E1, E2 e E3

Modo de ionização	Tecido analisado			
	Pericarpo	Testa	Tegma	Endosperma
Positivo	272	526	655	765
Negativo	171	142	183	234

**Fonte:** Elaborada pelo autor; Dados da tese.

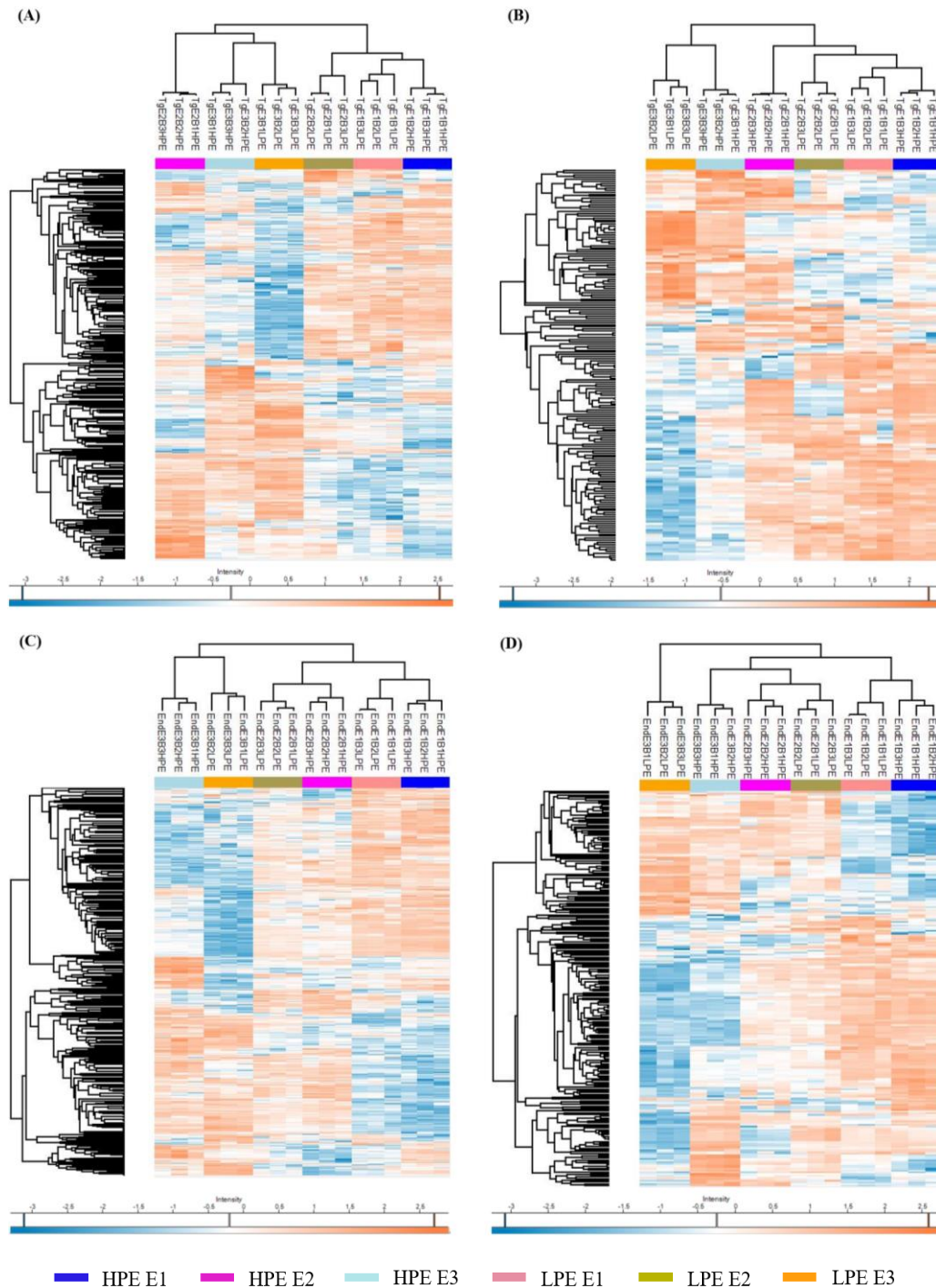
**Figura 38.** Clusterização hierárquica das *features* detectadas no pericarpo (Prp) e na testa (Tst) em desenvolvimento de pinhão-mansó e que mostraram diferença significativa segundo o teste de ANOVA entre os genótipos HPE e LPE e/ou entre os estágios de desenvolvimento E1, E2 e E3. Clusterização hierárquica das *features* detectadas no pericarpo nos modos de ionização positiva (A) e negativa (B) que mostraram diferença significativa segundo o teste de ANOVA entre os genótipos HPE e LPE e/ou entre os estágios de desenvolvimento E1, E2 e E3. Clusterização hierárquica das *features* detectadas na testa nos modos de ionização positiva (C) e negativa (D) que mostraram diferença significativa segundo o teste de ANOVA entre os genótipos HPE e LPE e/ou entre os estágios de desenvolvimento E1, E2 e E3



Fonte: Elaborada pelo autor; Dados da tese.



**Figura 39.** Clusterização hierárquica das *features* detectadas no tegma (Tg) e no endosperma (End) em desenvolvimento de pinhão-mansó e que mostraram diferença significativa segundo o teste de ANOVA entre os genótipos HPE e LPE e/ou entre os estágios de desenvolvimento E1, E2 e E3. Clusterização hierárquica das *features* detectadas no tegma nos modos de ionização positiva (A) e negativa (B) que mostraram diferença significativa segundo o teste de ANOVA entre os genótipos HPE e LPE e/ou entre os estágios de desenvolvimento E1, E2 e E3. Clusterização hierárquica das *features* detectadas no endosperma nos modos de ionização positiva (C) e negativa (D) que mostraram diferença significativa segundo o teste de ANOVA entre os genótipos HPE e LPE e/ou entre os estágios de desenvolvimento E1, E2 e E3



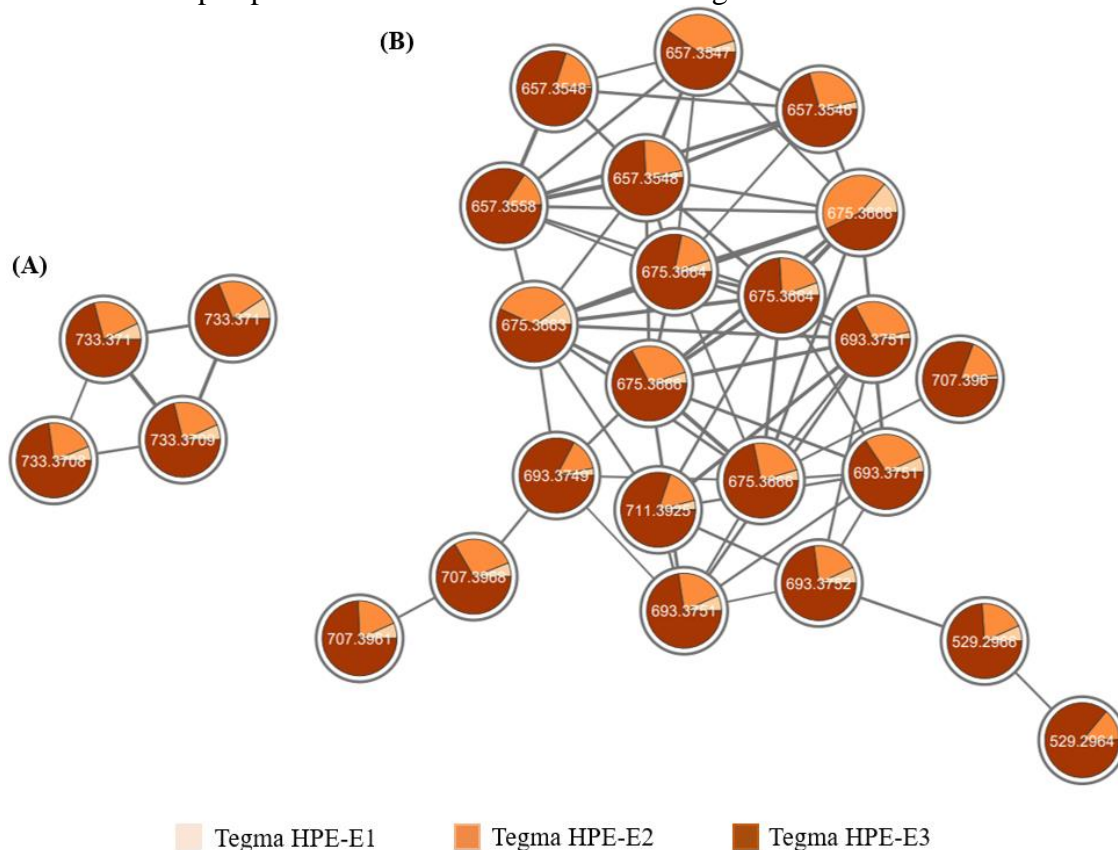
**Fonte:** Elaborada pelo autor; Dados da tese.

#### 4.8 Redes Moleculares Baseadas em *features*

O conjunto completo de dados metabolômicos adquiridos a partir de extratos de folhas, raízes e tecidos de frutos em desenvolvimento de plantas de pinhão-manso, foram usados para construção de 10 FBMN, duas para os dados de folha e raízes, sendo uma para cada modo de ionização, e as oito restantes corresponderam a duas para cada tecido do fruto, também uma para cada modo de ionização. Logo, nas redes construídas com os dados de folhas e raízes, a quantificação relativa inserida nos nós compreende quatro grupos (folha e raiz dos genótipos HPE e LPE), enquanto nas redes dos dados de fruto em desenvolvimento, os nós contêm dados da quantificação relativa entre 6 grupos (genótipos HPE e LPE e os estágios de desenvolvimento E1, E2 e E3).

Todas essas FBMN podem ser vistas nos Apêndices ao final deste documento (APÊNDICES G – P). Logo abaixo de cada uma das redes, estão os links de acesso às redes originais pela plataforma *online* do GNPS. Além disso, os respectivos arquivos no formato *.cys* que contém as FBMN editadas, encontram-se no material suplementar e podem ser visualizadas usando o Cytoscape. Especificamente em relação aos EF, famílias moleculares desses compostos não foram vistas nos dados de folha e raiz, em razão desse método requerer os espectros de MS<sup>2</sup>. Por outro lado, duas famílias moleculares para os EF foram formadas nos dados de todos os tecidos de fruto em desenvolvimento do genótipo HPE no modo positivo de ionização. Uma das famílias correspondeu aos íons  $m/z$  733,371 [M+Na]<sup>+</sup>, em que o algoritmo apenas reconheceu quatro compostos, e outra, para os íons  $m/z$  711,3925 [M+H]<sup>+</sup>,  $m/z$  693,3751 [M-H<sub>2</sub>O+H]<sup>+</sup>,  $m/z$  675,3664 [M-H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>+H]<sup>+</sup> e  $m/z$  657,3548 [M-H<sub>6</sub>O<sub>3</sub>+H]<sup>+</sup>. A representação esquemática das famílias moleculares de EF nos dados do tegma do genótipo HPE em três estágios de desenvolvimento (E1, E2 e E3), é mostrada na Figura 40. Como pode ser observado, o grande número de íons agrupados na família molecular maior (Figura 40B), é resultado de fragmentos formados na fonte, marcados por perdas sucessivas de elementos de água (18 u). Para esses dados de tegma, a quantificação relativa inserida nos nós, corroborou com o mesmo padrão mostrado na Figura 13, em que a concentração de EF aumenta significativamente entre os estágios E1 e E3.

**Figura 40.** Famílias moleculares formadas pelos íons correspondentes aos ésteres de forbol detectados em amostras de tegma em desenvolvimento (estágios E1, E2 e E3) do genótipo HPE. Em (A) é mostrada a família molecular formadas pelos íons detectados como adultos de sódio  $m/z$  733,371, enquanto que em (B), são os íons de EF protonado e seus fragmentos gerados na fonte após perdas sucessivas de elementos de água.



**Fonte:** Elaborada pelo autor; Dados da tese.

## 4.9 Padrão de deposição de Terpenóides

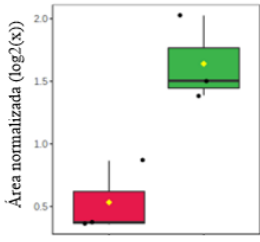
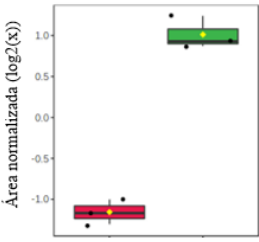
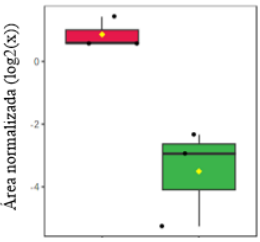
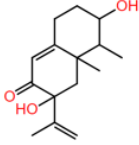
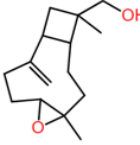
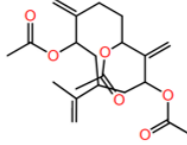
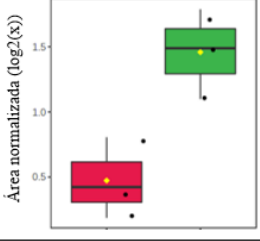
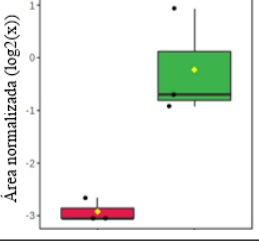
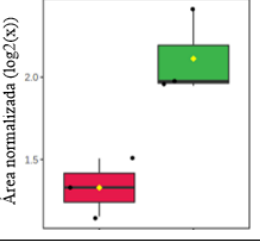
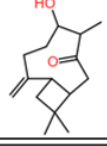
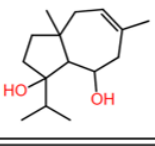
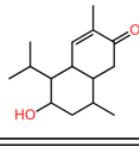
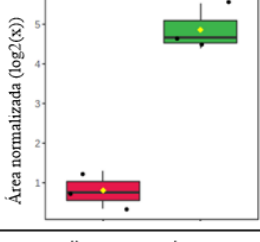
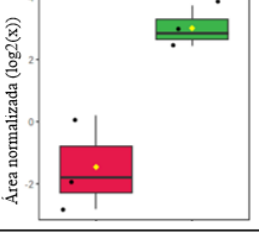
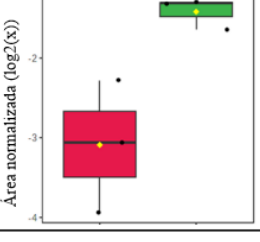
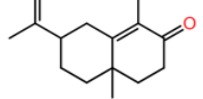
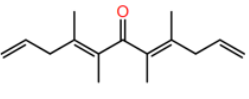


### 4.9.1 Sesquiterpenóides e Diterpenóides

Foram anotados um total de 36 sesquiterpenóides nas raízes, segundo a atribuição de classe química usando CANOPUS com probabilidade igual ou superior a 0,7 (Tabela Suplementar I; ver em *NPC#Superclass "Sesquiterpenoids"*). Esse número é ~5 vezes maior em relação aos que foram anotados nas folhas (Figura 23A). Desse total, 25 tiveram estruturas preditas pelo CSI:FinderID com bom nível de confiabilidade ( $score \geq -80$ ), e 14 tiveram correspondências razoavelmente boas com espectros de sesquiterpenóides da biblioteca utilizada (pontuação de cosseno  $\geq 0,8$ ). Após a quantificação relativa desses metabólitos, nove

apresentaram diferença significativa entre os genótipos, dos quais, oito mostraram-se mais abundantes no genótipo LPE (Figura 41).

Por outro lado, 69 *features* detectadas nas raízes foram atribuídas à diterpenóides segundo a classificação *NPC#Superclass* com probabilidade acima de 0,7 usando o fluxo de trabalho do CANOPUS (Figura 23A e Tabela 6). Infelizmente, nenhuma dessas *features* corresponderam aos diterpenóides caracterizados estruturalmente de *J. curcas* apresentados na Tabela 1 (pag. 33), em razão particular da ausência dos espectros MS/MS desses metabólitos na biblioteca, já que nos trabalhos que reportaram suas estruturas, constam apenas os dados de espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) e massa exata. Usando o fluxo de trabalho do CSI:FinderID, também não foram alcançados bons números de anotações para os diterpenóides indicados pelo CANOPUS. Provavelmente, a falta dos espectros MS/MS representativos das subclasses de diterpenóides presentes em *J. curcas* para treinar o algoritmo, seja a principal causa. Apesar disso, os dados da quantificação relativa desses metabólitos mostraram contrastes interessantes entre os genótipos HPE e LPE. Um total de 28 mostraram diferença estatística entre os genótipos, dentre os quais, 26 tiveram abundância superior no genótipo HPE (Tabela 6; apontados com asterisco preto na última coluna). Destacaram-se as *features* 495 (2,03 min;  $m/z$  329,174) e 676 (2,12 min;  $m/z$  329,174), anotadas pelo CSI:FinderID como 4-alfa-forbol (Tabela Suplementar 1), intimamente relacionado à 12-deoxi-16-hidroxiforbol encontrado nos EF, e as *features* 204 (1,68 min;  $m/z$  331,19), 372 (1,88 min;  $m/z$  313,179) e 628 (2,1 min;  $m/z$  331,189), anotadas como ingenol, um diterpenóide tetracíclico que guarda certo nível de relação estrutural com os tiglianos (LIU et al., 2021b), em que todas apresentaram abundâncias expressivamente mais altas nas raízes do genótipo HPE (Tabela 6). Acrescentam-se a essas, as *features* 1190 (2,63 min;  $m/z$  305,247), 2011 (4,69 min;  $m/z$  289,252), 2711 (9,59 min;  $m/z$  359,185), 2714 (9,63 min;  $m/z$  643,361) e 3293 (10,63 min;  $m/z$  611,371) (Tabela 6) anotadas pelo CANOPUS como “*Tigliane and Ingenane Diterpenoids*” segundo a classificação *ClassFire#level 5*. As duas primeiras foram significativamente mais abundantes no genótipo HPE, e as duas últimas foram detectadas apenas nesse genótipo. Além disso, os dados de massa exata dessas últimas (Tabela 6), sugerem decoração com outros grupos químicos. Assim, esses resultados mostram que apesar da capacidade de ambos os genótipos em produzir uma grande variedade de diterpenóides nas raízes, com destaque particular para os que são estruturalmente relacionados aos EF, suas vias biossintéticas são mais intensas no genótipo HPE, e isso alimenta a hipótese de que a ausência de EF no genótipo LPE pode estar relacionada a carência de enzima(s) ligadas aos passos finais da via de biossíntese desses compostos.

**Figura 41.** Sesquiterpenóides detectados em raízes de pinhão-mansó e que apresentaram diferença significativa segundo o teste-t de *Student* à 5% de probabilidade entre os genótipos HPE e LPE

ID feature 276	ID feature 619	ID feature 900
RT = 1,74 ; m/z = 233,15	RT = 2,09; m/z = 259,16	RT = 2,32; m/z = 361,20
		
		
ID feature 1425	ID feature 1608	ID feature 1758
RT = 2,97; m/z = 259,16	RT = 3,31; m/z = 221,19	RT = 3,92; m/z = 219,17
		
		
ID feature 1976	ID feature 1977	ID feature 2025
RT = 4,34; m/z = 291,17	RT = 4,31; m/z = 241,15	RT = 4,8; m/z = 249,18
		
		
 Genótipo HPE  Genótipo LPE		

Fonte: Elaborada pelo autor; Dados da tese.

**Tabela 6.** Features detectadas nas raízes de *J. curcas* que receberam anotação para Diterpenóides (probabilidade de  $NPC\#Superclass \geq 0,7$ ) segundo CANOPUS. Os asteriscos na coluna “Significância estatística”, indicam features que apresentaram abundância relativa maior no genótipo HPE (\*) e no genótipo LPE (\*), segundo o teste-T de Student à 5% de probabilidade

ID feature	m/z	RT (min)	Adulto	Fórmula Molecular (probabilidade)	NPC#super classe (probabilidade)	NPC#classe (probabilidade)	ClassyFire#classe mais específica (probabilidade)	Raiz HPE	Raiz LPE	Significância estatística
165	319.19	1.66	[M - H <sub>2</sub> O + H] <sup>+</sup>	C <sub>19</sub> H <sub>28</sub> O <sub>5</sub> (1)	Diterpenoids (0.78)	Daucane sesquiterpenoids (0.10)	Prenol lipids (0.57)	X	X	*
204	331.19	1.68	[M - H <sub>2</sub> O + H] <sup>+</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O <sub>5</sub> (1)	Diterpenoids (0.97)	Lathyrane diterpenoids (0.46)	Diterpenoids (0.60)	X	X	*
216	315.159	1.72	[M + H] <sup>+</sup>	C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub> (1)	Diterpenoids (0.86)	Pseudopterane diterpenoids (0.13)	Butenolides (0.50)	X	X	
256	301.179	1.84	[M + H] <sup>+</sup>	C <sub>19</sub> H <sub>24</sub> O <sub>3</sub> (1)	Diterpenoids (0.93)	Lathyrane diterpenoids (0.55)	Lipids and lipid-like molecules (0.61)	X	X	*
372	313.179	1.88	[M - H <sub>4</sub> O <sub>2</sub> + H] <sup>+</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O <sub>5</sub> (1)	Diterpenoids (0.98)	Tetracyclic diterpenoids (0.48)	Diterpenoids (0.68)	X	X	*
384	369.168	1.89	[M + Na] <sup>+</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>26</sub> O <sub>5</sub> (0.99)	Diterpenoids (0.86)	Colensane and Clerodane diterpenoids (0.34)	Phenols (0.62)	X	X	
415	301.179	1.92	[M + H] <sup>+</sup>	C <sub>19</sub> H <sub>24</sub> O <sub>3</sub> (1)	Diterpenoids (0.88)	Pimarane and Isopimarane diterpenoids (0.19)	Cyclohexenones (0.92)	X	X	*
448	305.211	1.9	[M + H] <sup>+</sup>	C <sub>19</sub> H <sub>28</sub> O <sub>3</sub> (1)	Diterpenoids (0.72)	Labdane diterpenoids (0.44)	Carboxylic acid esters (0.63)	X	X	*
457	395.184	1.96	[M + Na] <sup>+</sup>	C <sub>22</sub> H <sub>28</sub> O <sub>5</sub> (0.79)	Diterpenoids (0.76)	Tetracyclic diterpenoids (0.10)	Dicarboxylic acids and derivatives (0.82)	X		
462	375.178	1.91	[M + H] <sup>+</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>26</sub> O <sub>6</sub> (0)	Diterpenoids (0.75)	Cembrane diterpenoids (0.24)	Cyclohexenones (0.64)	X	X	
495	329.174	2.03	[M - H <sub>4</sub> O <sub>2</sub> + H] <sup>+</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O <sub>6</sub> (1)	Diterpenoids (0.81)	Tigliane diterpenoids (0.24)	Terpene lactones (0.52)	X	X	*
500	385.162	1.97	[M + Na] <sup>+</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>26</sub> O <sub>6</sub> (0.57)	Diterpenoids (0.76)	Germacrane sesquiterpenoids (0.43)	Diterpene lactones (0.62)	X	X	
537	303.159	2.01	[M - H <sub>4</sub> O <sub>2</sub> + H] <sup>+</sup>	C <sub>18</sub> H <sub>26</sub> O <sub>6</sub> (1)	Diterpenoids (0.78)	Labdane diterpenoids (0.23)	Dicarboxylic acids and derivatives (0.50)	X	X	
545	347.184	1.94	[M + H] <sup>+</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>26</sub> O <sub>5</sub> (0)	Diterpenoids (0.84)	Pimarane and Isopimarane diterpenoids (0.28)	Cyclohexenones (0.60)	X	X	*
585	319.191	2.05	[M + H] <sup>+</sup>	C <sub>19</sub> H <sub>26</sub> O <sub>4</sub> (1)	Diterpenoids (0.71)	Erythromycins (0.27)	Terpene lactones (0.60)	X	X	

589	313.179	2.07	[M - H <sub>4</sub> O <sub>2</sub> + H] <sup>+</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O <sub>5</sub> (1)	Diterpenoids (0.97)	Tetracyclic diterpenoids (0.46)	Prenol lipids (0.78)	X	X	
628	331.189	2.1	[M - H <sub>2</sub> O + H] <sup>+</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O <sub>5</sub> (1)	Diterpenoids (0.94)	Tetracyclic diterpenoids (0.45)	Diterpenoids (0.56)	X	X	*
646	303.195	2.13	[M + H] <sup>+</sup>	C <sub>19</sub> H <sub>26</sub> O <sub>3</sub> (1)	Diterpenoids (0.91)	Lathyrane diterpenoids (0.12)	Diterpenoids (0.53)	X	X	*
676	329.174	2.12	[M - H <sub>4</sub> O <sub>2</sub> + H] <sup>+</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O <sub>6</sub> (0.99)	Diterpenoids (0.87)	Rhamnofolane diterpenoids (0.18)	Prenol lipids (0.69)	X	X	*
796	285.184	2.28	[M + H] <sup>+</sup>	C <sub>19</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub> (1)	Diterpenoids (0.71)	Irregular monoterpenoids (0.11)	Prenol lipids (0.90)	X	X	*
798	313.18	2.26	[M + H] <sup>+</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> O <sub>3</sub> (0)	Diterpenoids (0.97)	Lathyrane diterpenoids (0.37)	Prenol lipids (0.52)	X	X	*
807	361.234	2.28	[M + Na] <sup>+</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>34</sub> O <sub>4</sub> (1)	Diterpenoids (0.90)	Labdane diterpenoids (0.68)	Prenol lipids (0.78)	X	X	*
812	271.169	2.29	[M + H] <sup>+</sup>	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub> (1)	Diterpenoids (0.77)	Eudesmane sesquiterpenoids (0.28)	Prenol lipids (0.69)	X	X	
855	303.195	2.34	[M + H] <sup>+</sup>	C <sub>19</sub> H <sub>26</sub> O <sub>3</sub> (1)	Diterpenoids (0.87)	Lathyrane diterpenoids (0.14)	Diterpenoids (0.56)	X	X	*
865	341.208	2.35	[M + Na] <sup>+</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O <sub>3</sub> (1)	Diterpenoids (0.79)	Cannabinoids (0.38)	Diterpenoids (0.70)	X	X	
914	311.164	2.36	[M + H] <sup>+</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> O <sub>3</sub> (0)	Diterpenoids (0.82)	Abeoabietane diterpenoids (0.18)	Diterpenoids (0.50)	X	X	
919	283.169	2.37	[M + H] <sup>+</sup>	C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub> (1)	Diterpenoids (0.84)	Abeoabietane diterpenoids (0.13)	Prenol lipids (0.91)	X	X	*
929	343.19	2.37	[M - H <sub>4</sub> O <sub>2</sub> + H] <sup>+</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>6</sub> (1)	Diterpenoids (0.82)	Cassane diterpenoids (0.44)	Diterpenoids (0.78)	X	X	
965	309.148	2.4	[M - H <sub>4</sub> O <sub>2</sub> + H] <sup>+</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> O <sub>5</sub> (1)	Diterpenoids (0.85)	Tetraketide meroterpenoids (0.29)	Dihydropyranones (0.75)	X	X	
1020	377.172	2.54	[M + Na] <sup>+</sup>	C <sub>22</sub> H <sub>26</sub> O <sub>4</sub> (1)	Diterpenoids (0.99)	Lathyrane diterpenoids (0.04)	Diterpenoids (0.95)	X	X	*
1023	355.189	2.48	[M + H] <sup>+</sup>	C <sub>22</sub> H <sub>26</sub> O <sub>4</sub> (1)	Diterpenoids (0.99)	Abietane diterpenoids (0.02)	Diterpenoids (0.77)	X	X	
1070	313.18	2.5	[M - H <sub>2</sub> O + H] <sup>+</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>26</sub> O <sub>4</sub> (1)	Diterpenoids (0.96)	Cycloabietane diterpenoids (0.22)	Furanones (0.52)	X	X	*
1116	315.196	2.6	[M + H] <sup>+</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>26</sub> O <sub>3</sub> (1)	Diterpenoids (0.96)	Lathyrane diterpenoids (0.65)	Diterpenoids (0.73)	X	X	*
1170	377.172	2.57	[M + Na] <sup>+</sup>	C <sub>22</sub> H <sub>26</sub> O <sub>4</sub> (0)	Diterpenoids (0.99)	Lathyrane diterpenoids (0.05)	Diterpenoids (0.91)	X	X	*
1190	305.247	2.63	[M + H] <sup>+</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub> (1)	Diterpenoids (0.92)	Labdane diterpenoids (0.91)	Diterpenoids (0.61)	X	X	*

1226	329.176	2.69	[M - H <sub>4</sub> O <sub>2</sub> + H] <sup>+</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O <sub>6</sub> (1)	Diterpenoids (0.82)	Tigliane diterpenoids (0.61)	Tigliane and ingenane diterpenoids (0.64)	X	X	
1300	339.194	2.75	[M + Na] <sup>+</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O <sub>3</sub> (0.92)	Diterpenoids (0.88)	Cembrane diterpenoids (0.33)	Diterpenoids (0.69)	X	X	
1302	383.22	2.78	[M + Na] <sup>+</sup>	C <sub>22</sub> H <sub>32</sub> O <sub>4</sub> (0.98)	Diterpenoids (0.83)	Labdane diterpenoids (0.14)	Diterpenoids (0.91)	X	X	
1307	331.189	2.76	[M + H] <sup>+</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>26</sub> O <sub>4</sub> (0)	Diterpenoids (0.89)	Pimarane and Isopimarane diterpenoids (0.21)	Diterpenoids (0.57)	X	X	*
1362	313.18	2.84	[M + H] <sup>+</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> O <sub>3</sub> (0)	Diterpenoids (0.90)	Pimarane and Isopimarane diterpenoids (0.11)	Butenolides (0.58)	X	X	
1372	303.232	2.85	[M + H] <sup>+</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub> (1)	Diterpenoids (0.85)	Pimarane and Isopimarane diterpenoids (0.28)	Diterpenoids (0.50)	X	X	
1383	269.153	2.85	[M + H] <sup>+</sup>	C <sub>18</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub> (1)	Diterpenoids (0.72)	Linear diarylheptanoids (0.43)	17-oxosteroids (0.61)	X	X	
1447	379.188	2.91	[M + Na] <sup>+</sup>	C <sub>22</sub> H <sub>28</sub> O <sub>4</sub> (0.83)	Diterpenoids (0.79)	Eremophilane sesquiterpenoids (0.06)	Diterpenoids (0.89)	X	X	
1469	299.201	2.98	[M - H <sub>2</sub> O + H] <sup>+</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O <sub>3</sub> (1)	Diterpenoids (0.94)	Casbane diterpenoids (0.44)	Diterpenoids (0.80)	X	X	*
1482	317.212	3.03	[M + H] <sup>+</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O <sub>3</sub> (1)	Diterpenoids (0.93)	Pimarane and Isopimarane diterpenoids (0.47)	Diterpenoids (0.65)	X	X	*
1494	305.248	3.06	[M - H <sub>2</sub> O + H] <sup>+</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>34</sub> O <sub>3</sub> (1)	Diterpenoids (0.90)	Cembrane diterpenoids (0.96)	Diterpenoids (0.80)	X	X	
1564	345.24	3.2	[M + Na] <sup>+</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>34</sub> O <sub>3</sub> (1)	Diterpenoids (0.81)	Labdane diterpenoids (0.68)	Diterpenoids (0.65)	X	X	
1579	305.248	3.22	[M - H <sub>2</sub> O + H] <sup>+</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>34</sub> O <sub>3</sub> (1)	Diterpenoids (0.92)	Labdane diterpenoids (0.91)	Diterpenoids (0.89)	X	X	
1584	379.188	3.23	[M + Na] <sup>+</sup>	C <sub>22</sub> H <sub>28</sub> O <sub>4</sub> (0.99)	Diterpenoids (0.97)	Lathyrane diterpenoids (0.42)	Steroid esters (0.56)	X	X	
1596	385.234	3.29	[M + Na] <sup>+</sup>	C <sub>22</sub> H <sub>34</sub> O <sub>4</sub> (1)	Diterpenoids (0.75)	Labdane diterpenoids (0.16)	Diterpenoids (0.65)	X	X	
1611	305.248	3.3	[M - H <sub>2</sub> O + H] <sup>+</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>34</sub> O <sub>3</sub> (1)	Diterpenoids (0.93)	Cembrane diterpenoids (0.67)	Diterpenoids (0.76)	X	X	
1658	301.217	3.5	[M - H <sub>2</sub> O + H] <sup>+</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O <sub>3</sub> (1)	Diterpenoids (0.95)	Colensane and Clerodane diterpenoids (0.91)	Colensane and clerodane diterpenoids (0.72)	X	X	*
1667	321.183	3.54	[M + Na] <sup>+</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub> (0.99)	Diterpenoids (0.73)	Trachylobane diterpenoids (0.35)	Steroids and steroid derivatives (0.53)	X	X	*
1674	257.154	3.53	[M + H] <sup>+</sup>	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub> (1)	Diterpenoids (0.93)	Abeoabietane diterpenoids (0.18)	Prenol lipids (0.78)	X	X	

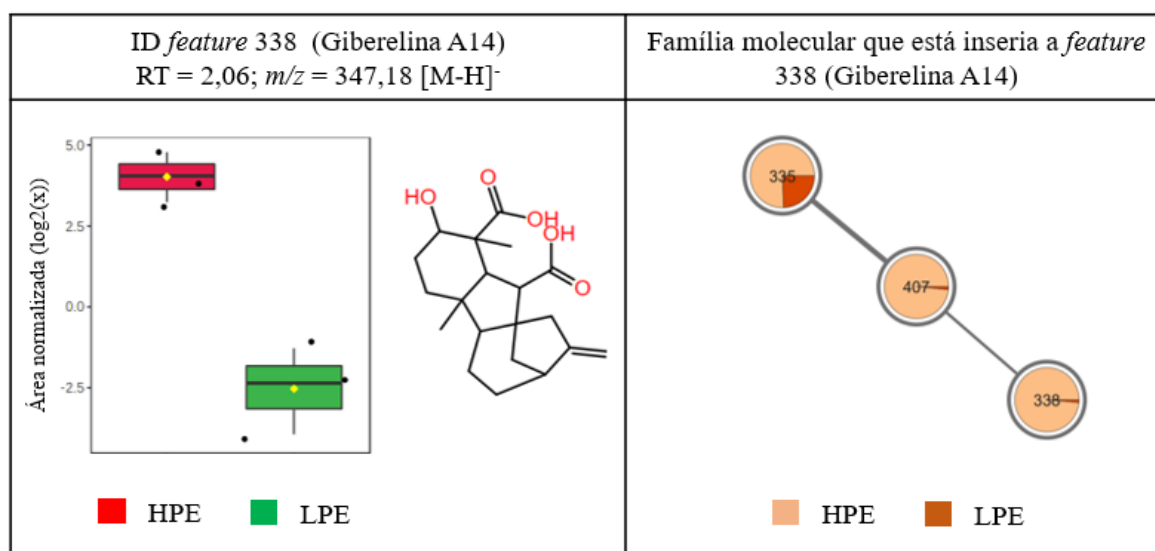


1711	305.248	3.73	[M - H <sub>2</sub> O + H] <sup>+</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>34</sub> O <sub>3</sub> (1)	Diterpenoids (0.93)	Cembrane diterpenoids (0.64)	Diterpenoids (0.63)	X	X	
1715	301.217	3.69	[M - H <sub>2</sub> O + H] <sup>+</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O <sub>3</sub> (1)	Diterpenoids (0.94)	Labdane diterpenoids (0.39)	Diterpenoids (0.84)	X	X	
1748	347.257	3.89	[M + Na] <sup>+</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>36</sub> O <sub>3</sub> (1)	Diterpenoids (0.94)	Labdane diterpenoids (0.97)	Diterpenoids (0.73)	X	X	
1757	283.169	3.92	[M + H] <sup>+</sup>	C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub> (0)	Diterpenoids (0.99)	Abeoabietane diterpenoids (0.56)	Quinones (0.59)	X	X	
1934	307.262	4.21	[M + H] <sup>+</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub> (1)	Diterpenoids (0.93)	Labdane diterpenoids (0.95)	Naphthopyrans (0.59)	X	X	
1965	307.262	4.24	[M + H] <sup>+</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub> (1)	Diterpenoids (0.93)	Labdane diterpenoids (0.98)	Diterpenoids (0.51)	X	X	
2003	301.216	4.58	[M - H <sub>2</sub> O + H] <sup>+</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O <sub>3</sub> (1)	Diterpenoids (0.80)	Labdane diterpenoids (0.41)	Diterpenoids (0.79)	X	X	
2011	289.252	4.69	[M - H <sub>4</sub> O <sub>2</sub> + H] <sup>+</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>36</sub> O <sub>3</sub> (1)	Diterpenoids (0.90)	Labdane diterpenoids (0.96)	Diterpenoids (0.70)	X	X	*
2051	627.366	4.9	[M - H <sub>2</sub> O + H] <sup>+</sup>	C <sub>40</sub> H <sub>52</sub> O <sub>7</sub> (1)	Diterpenoids (0.99)	Tetracyclic diterpenoids (0.73)	Tiglane and ingenane diterpenoids (0.59)	X		
2146	289.252	5.25	[M - H <sub>2</sub> O + H] <sup>+</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub> (1)	Diterpenoids (0.95)	Labdane diterpenoids (0.91)	Diterpenoids (0.70)	X	X	
2711	359.185	9.59	[M - H <sub>2</sub> O + H] <sup>+</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>28</sub> O <sub>6</sub> (1)	Diterpenoids (0.86)	Cassane diterpenoids (0.21)	Diterpenoids (0.74)		X	
2714	643.361	9.63	[M + H] <sup>+</sup>	C <sub>40</sub> H <sub>50</sub> O <sub>7</sub> (0)	Diterpenoids (0.98)	Tetracyclic diterpenoids (0.55)	Tiglane and ingenane diterpenoids (0.68)	X		
2932	627.366	9.98	[M + H] <sup>+</sup>	C <sub>40</sub> H <sub>50</sub> O <sub>6</sub> (0.73)	Diterpenoids (0.95)	Tetracyclic diterpenoids (0.50)	Tiglane and ingenane diterpenoids (0.67)	X		
3293	611.371	10.63	[M - H <sub>2</sub> O + H] <sup>+</sup>	C <sub>40</sub> H <sub>52</sub> O <sub>6</sub> (1)	Diterpenoids (0.98)	Tiglane diterpenoids (0.44)	Diterpenoids (0.57)	X		
3808	611.372	11.58	[M - H <sub>2</sub> O + H] <sup>+</sup>	C <sub>40</sub> H <sub>52</sub> O <sub>6</sub> (0.97)	Diterpenoids (0.90)	Tiglane diterpenoids (0.49)	Phorbol esters (0.72)	X		

Fonte: Elaborada pelo autor; Dados da tese.

Ainda relacionado aos diterpenóides encontrados nas raízes, foi possível a anotação de uma giberelina no modo de ionização negativa, especificamente Giberelina A14 (Figura 42), por similaridade MS/MS (pontuação de cosseno 0,978), que está inserida numa família molecular junto de outras duas *features*, todas mais abundantes no genótipo HPE (Figura 42). Usando métodos de proteômica alvo-direcionada, Almeida et al., (2021) conseguiu quantificar um conjunto de enzimas das vias de biossíntese de giberelinas nas raízes dos genótipos de pinhão-manso HPE e LPE, contudo, para a maioria delas não foi observado diferença significativa entre os genótipos.

**Figura 42.** Giberelina A14 e *features* relacionadas detectadas em raízes de pinhão-manso e que apresentaram abundância diferente segundo o teste-t de *Student* à 5% de probabilidade entre os genótipos HPE e LPE



**Fonte:** Elaborada pelo autor; Dados da tese.

#### 4.9.2. Apocarotenóides

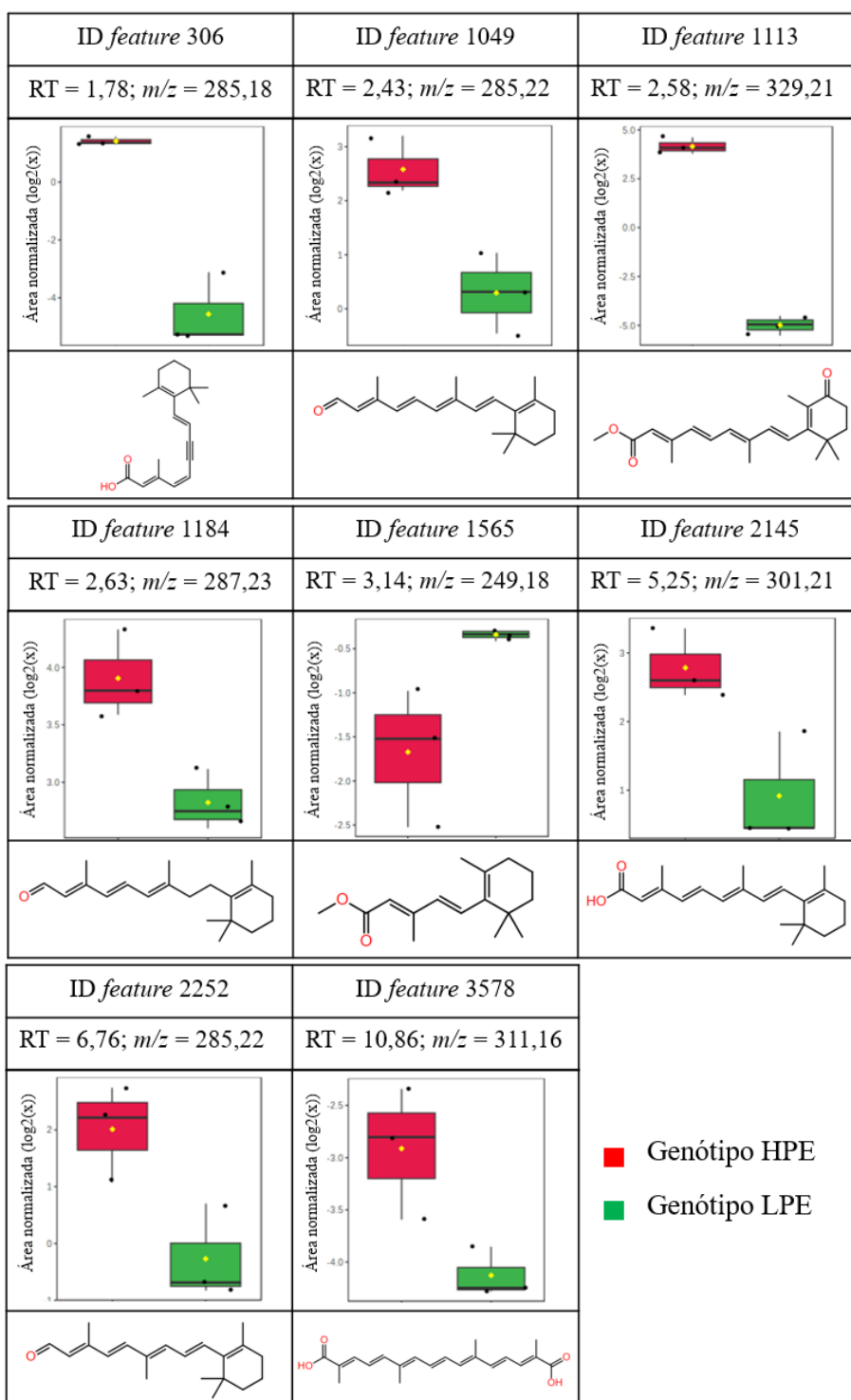
Outro grupo de terpenóides que demonstraram contraste entre os genótipos HPE e LPE, foram os apocarotenóides. Esses compostos são formados por clivagem oxidativa de carotenóides C40 (HOU et al., 2016). O precursor geral dos carotenóides C40, *15-cis-phytoene*, é formado a partir da condensação de duas moléculas de GGPP, por ação da enzima *Phytoene synthase* (EC 2.5.1.32). Esse composto pode sofrer vários tipos de modificações para produzir diferentes tipos de carotenóides, além de servir de substrato para enzimas conhecidas como *Carotenoid cleavage dioxygenases* (CCDs), que provocam clivagem oxidativa do esqueleto principal de carbono para originar os chamados apocarotenóides. Em

plantas, apocarotenóides bem conhecidos são os fitohormônios ácido abscísico e estrigolactonas, relacionados a diferentes processos do desenvolvimento e respostas a estresses (FELEMBAN et al., 2019).

Uma maior diversidade de apocarotenóides foram anotados nas raízes comparado com as folhas (Figura 23A), ainda que nas folhas, uma maior variedade de precursores carotenóides C40 tenha sido encontrada (Figura 23A). Esse padrão de distribuição já é bem conhecido em plantas, apesar de não se ter conhecimento claro sobre as razões que levam a esse fato, é provável que haja uma maior atividade de CCDs nas raízes. Portanto, assume-se que essa baixa diversidade de carotenóides C40 nas raízes, seja suficiente para alimentar as vias que levam à biossíntese de apocarotenóides. Em número, 16 *features* detectadas nas raízes receberam anotação segundo CANOPUS (probabilidade  $\geq 0,7$ ) para apocarotenóides, todas encontradas nos dois genótipos. Desse total, 9 foram diferencialmente abundantes segundo teste-t de *Student* (Figura 43), das quais 7 foram mais abundantes no genótipo HPE.

Assim, em relação ao padrão de deposição dos terpenóides de *J. curcas*, a maior diversidade de diterpenóides nas raízes poder estar relacionada a expressão de um conjunto de isoformas de sintase do casbeno, não vista em outros tecidos (NASCIMENTO, 2017; SOARES, 2015). Além disso, o notável contraste entre os genótipos HPE e LPE concernente aos metabólitos derivados de FPP e GGPP nas raízes, em que concentrações relativas mais altas de sesquiterpenóides foram vistas no genótipo LPE, enquanto esses valores para diterpenóides e apocarotenóides foram mais elevados no genótipo HPE, pode ser explicada pela abundância cerca de 6 vezes maior da enzima Farnesilpirofosfato sintase (FPPS; EC:2.5.1.10) nas raízes do genótipo LPE comparado ao HPE encontrada por Farias et al., 2020. Essa enzima concorre diretamente com Geranilgeranilpirofosfato sintase (GGPPS; EC:2.5.1.10) pelos substratos DMPP e IPP. Logo, o maior acúmulo dos derivados de GGPP (diterpenóides e apocarotenóides) encontrado nas raízes do genótipo HPE, de fato não se deve a abundância diferencial de sintase do casbeno, em concordância com os dados de proteômica alvo-dirigida publicados por Almeida et al., 2021 e de RT-qPCR encontrados por Nascimento, (2017).

**Figura 43.** Apocarotenóides detectados em raízes de pinhão-manso e que apresentaram abundância estatisticamente diferente segundo o teste-t de *Student* à 5% de probabilidade entre os genótipos HPE e LPE



**Fonte:** Elaborada pelo autor; Dados da tese.

## 4.10 Padrão de deposição de compostos fenólicos

### 4.10.1 Lignanans

Além de conter um grande repertório de terpenóides, as raízes de pinhão-manso também reservam a maior diversidade de lignanas, ao ser comparado com as folhas (Figura 23A) e tecidos do fruto em desenvolvimento (Figuras 32A, 33A, 34A e 35A). Curiosamente, nenhum composto dessa classe foi detectado em folhas. Dessa maneira, a maior diversidade de lignanas encontradas nas raízes de pinhão-manso, corroboram com a análise proteômica publicada por Farias et al., 2020, em que foram identificadas 7 isoformas de proteínas DIR nas raízes e apenas uma nas folhas.

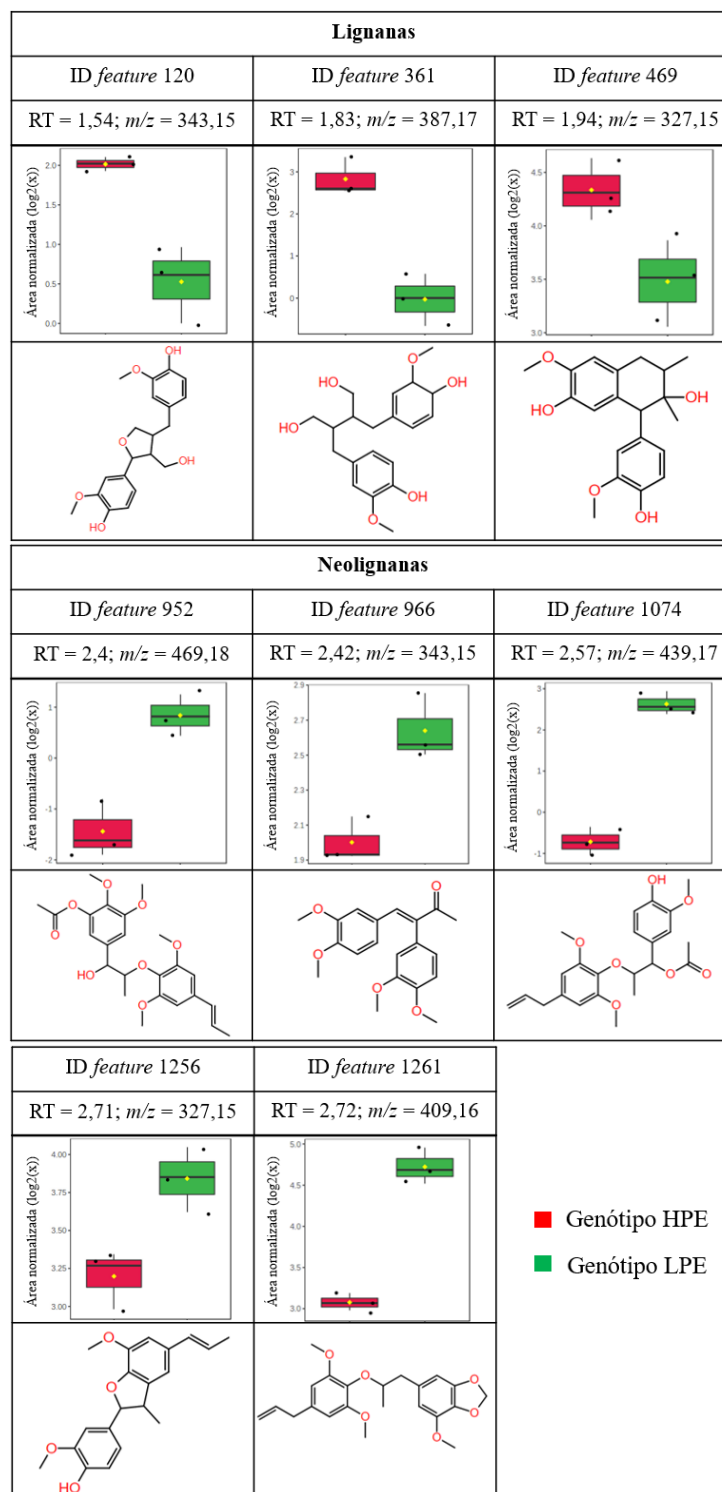
Usando o modo de ionização positiva, um total de 17 *features* foram anotadas dos extratos de raiz como lignanas, pela classificação *NPC#Superclass* (probabilidade  $\geq 0,7$ ) usando CANOPUS (Tabela Suplementar I; ver coluna *NPC#Superclass* e selecionar “*Lignans*”), e dessas, 16 foram detectadas em ambos os genótipos. Por comparação de espectros MS/MS, seis apresentaram similaridade com lignanas presentes na biblioteca, enquanto 13 tiveram estruturas de lignanas atribuídas pelo CSI:FinderID (*score* > -90). A *feature* 980 recebeu a mesma anotação, tanto por similaridade espectral (pontuação de cosseno 0,995), quanto *in silico* via CSI:FinderID (*score* = -31,09), e foi ainda classificada segundo *NPS#Class* como neolignana (probabilidade = 0,99). Consistente com a abordagem FBMN, esses compostos formaram famílias moleculares (Figura 45), e a quantificação relativa inserida nos nós foi condizente com a análise estatística feita no Perseus. Além disso, agrupou *features* que não receberam anotação em nenhum nível, como foi o caso dos isômeros de número 402 (RT 1,9 min; *m/z* 357,17) e 786 (RT 2,25 min *m/z* 357,17).

Contudo, o que mais saltou os olhos em relação a esse conjunto de lignanas encontradas nas raízes, foi o padrão de deposição contrastante apresentado entre os genótipos HPE e LPE. Curiosamente, de oito desses compostos que apresentaram diferença estatística entre os genótipos, cinco foram neolignanas mais abundantes no genótipo LPE, enquanto os outros três, eram lignanas mais abundantes no genótipo HPE (Figura 44).

As vias biossintética desses compostos são pouco compreendidas, e as divergências nas reações de acoplamento, especificam a direção da biossíntese no sentido de lignanas ou neolignanas. Nos genomas de plantas geralmente ocorrem várias isoformas de proteínas DIR. Em *J. curcas*, por exemplo, foram anotadas 38. Dessa maneira, é razoável pensar que esse

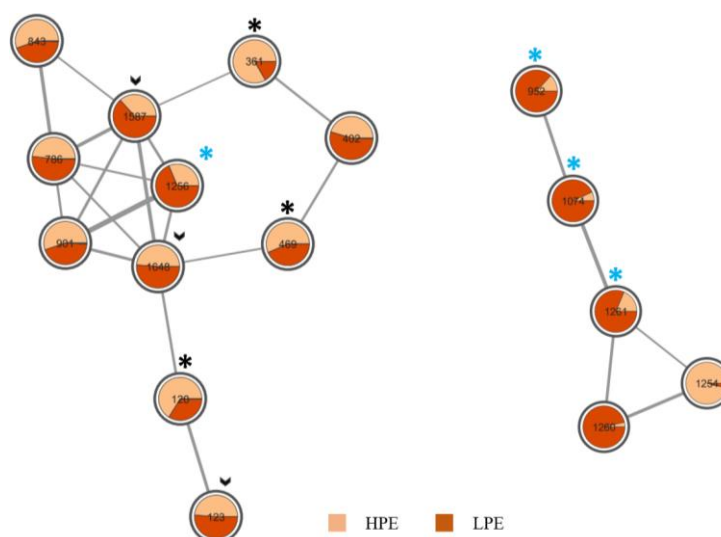
contraste entre lignanas e neolignanas observado entre os genótipos de pinhão-mansão, pode estar relacionado a um padrão diferencial de atividade dessas isoformas de proteínas DIR.

**Figura 44.** Lignanas e Neolignanas detectadas em raízes de pinhão-mansão por LC-MS/MS sob modo ionização positiva e que apresentaram abundância significativamente diferente segundo o teste-t de *Student* à 5% de probabilidade entre os genótipos HPE e LPE



Fonte: Elaborada pelo autor; Dados da tese

**Figura 45.** Famílias moleculares de lignanas e neolignanas detectadas em raízes de pinhão-mansó sob ionização positiva nos genótipos HPE e LPE, obtidas pela abordagem FBMN. \*indicam Lignanas diferencialmente abundantes segundo o teste-t de *Student* (5% de probabilidade); \*indicam Neolignanas diferencialmente abundantes segundo teste-t de *Student* (5% de probabilidade); ▶ indicam *features* que não receberam anotação em nenhum nível

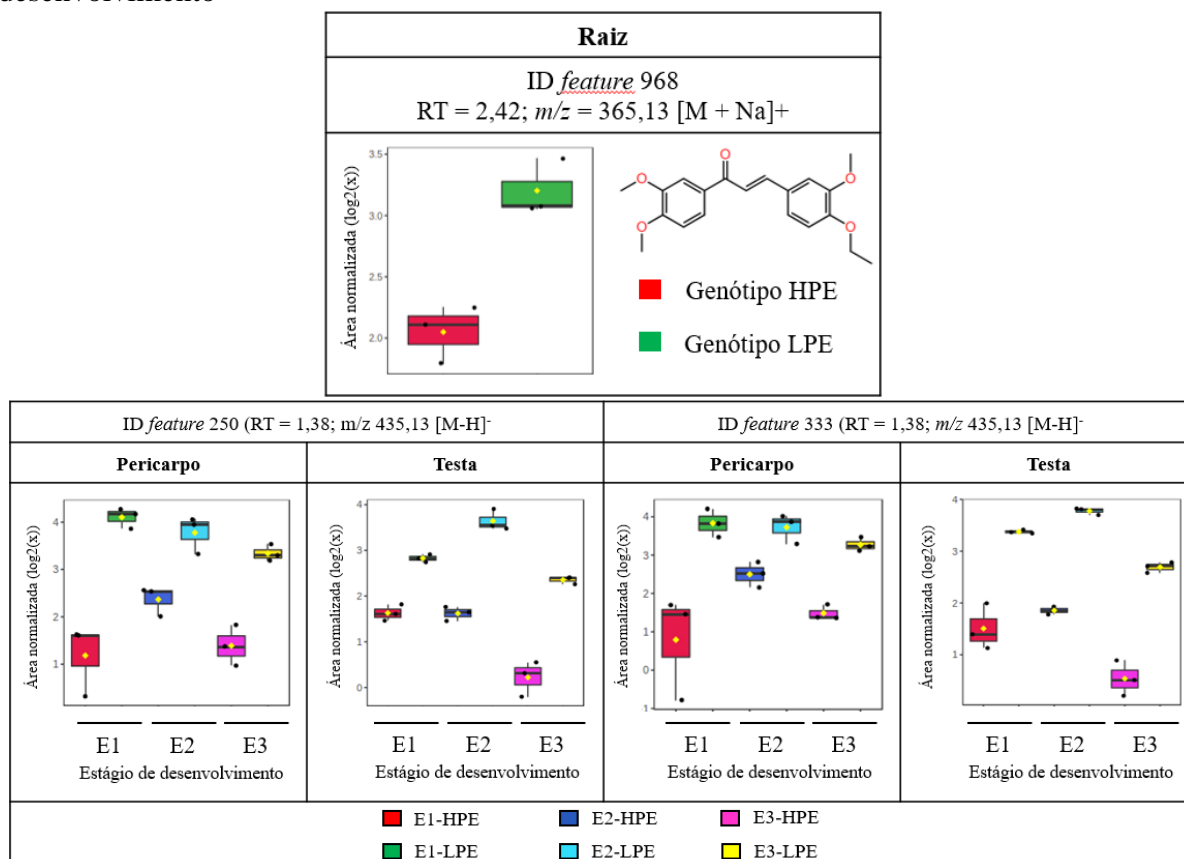


**Fonte:** Elaborada pelo autor; Dados da tese.

#### 4.10.2 Flavonoides

Chalconas foram encontradas em maior número depositadas nos tecidos do fruto em desenvolvimento (Tabela Suplementar IV). Interessantemente, três compostos dessa subclasse de flavonoides mostraram diferença significativa entre os genótipos, e foram todos mais abundantes no genótipo LPE (Figura 46). Desses três, um foi detectado nas raízes no modo de ionização positiva sob forma de adulto de sódio (Figura 44; ID *feature* 968), e possuía modificações por metilação. Já, os outros dois, foram encontrados no pericarpo e na testa (Figura 44; ID *features* 250 e 333). Ambas, ao que indicaram os dados, são um par de isômeros, com  $m/z$  435,13 e que eluíram no mesmo tempo de retenção (1,38 min). A distinção desses compostos pelos métodos de anotação utilizados não foi possível, e pela correspondência espectral contra a biblioteca, os dois compostos foram anotados como *Phloridzin*, uma chalcona glicosilada.

**Figura 46.** Chalconas detectadas em raiz, pericarpo e testa de *J. curcas* e que apresentaram abundância significativamente diferente entre os genótipos HPE e LPE e/ou estágios de desenvolvimento



**Fonte:** Elaborada pelo autor; Dados da tese.

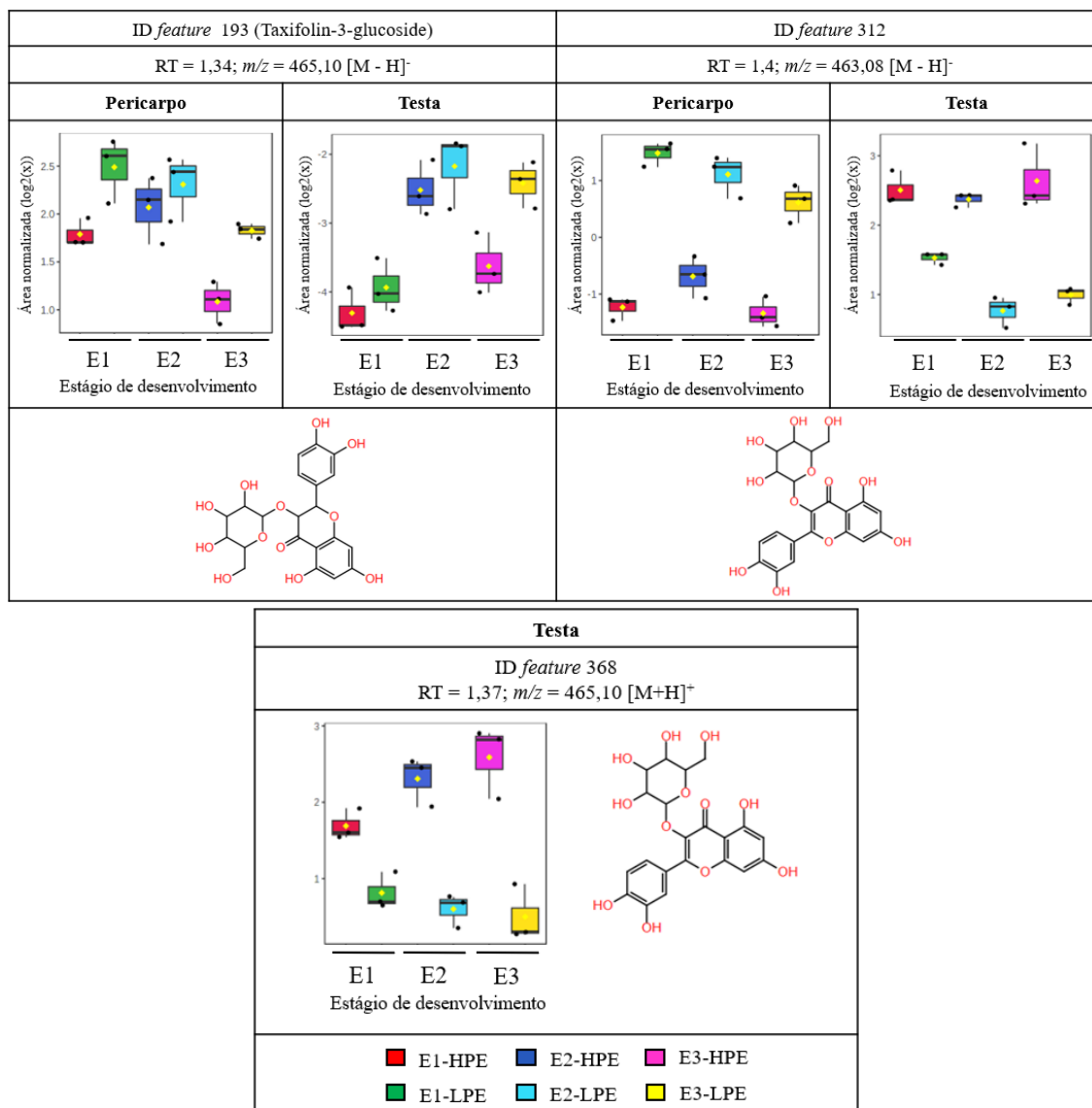
Outros flavonóides, representativos das subclasses dihidroflavonóis (ID *feature* 193), flavonóis (IDs *features* 312, 368, 173 e 74) e flavan-3-ol (IDs *features* 45 e 117) foram detectados majoritariamente no pericarpo e na testa sob modo de ionização negativa (Tabela Suplementar IV), e apresentaram padrões de deposição contrastantes não apenas entre os genótipos, mas também sofreram flutuações significativas ao longo do desenvolvimento desses tecidos. A *feature* 193 foi anotada como *Taxifolin-3-glucoside*, enquanto as *features* 312 e 368 receberam anotações para *Hyperoside* e *Isoquercetin*, porém, esses dois últimos metabólitos são isômeros de posição, e pelas técnicas de anotação empregadas, torna-se impossível diferenciá-los. As *features* 193 e 312 apresentaram padrões de deposição significativamente diferentes entre os genótipos e estágios de desenvolvimento do pericarpo e da testa (Figura 47). *Taxifolin-3-glucoside* tendeu a reduzir sua abundância ao longo dos três estágios de desenvolvimento do pericarpo, e mostrou maior abundância no genótipo LPE. Enquanto na testa, apesar de também ser mais abundante no genótipo LPE, apresentou aumento acentuado entre os estágios E1 e E2, seguido de uma diminuição em E3. Já a *feature*



312, mesmo apresentando variações discretas durante os estágios de desenvolvimento analisados, no pericarpo foi bem mais abundante no genótipo LPE, enquanto na testa, o contrário foi observado, dada sua maior abundância no genótipo HPE. Um padrão de deposição semelhante ao comparar os genótipos, foi observado para a feature 368 detectada sob modo de ionização positiva, que também recebeu anotação pra flavonoide. Esse metabólito, não apenas foi dramaticamente mais abundante no genótipo HPE, como também, neste genótipo tendeu a aumentar ao longo dos estágios E1, E2 e E3, enquanto no genótipo LPE foi observado uma redução com o desenvolvimento, mesmo que discreta. (Figura 47).

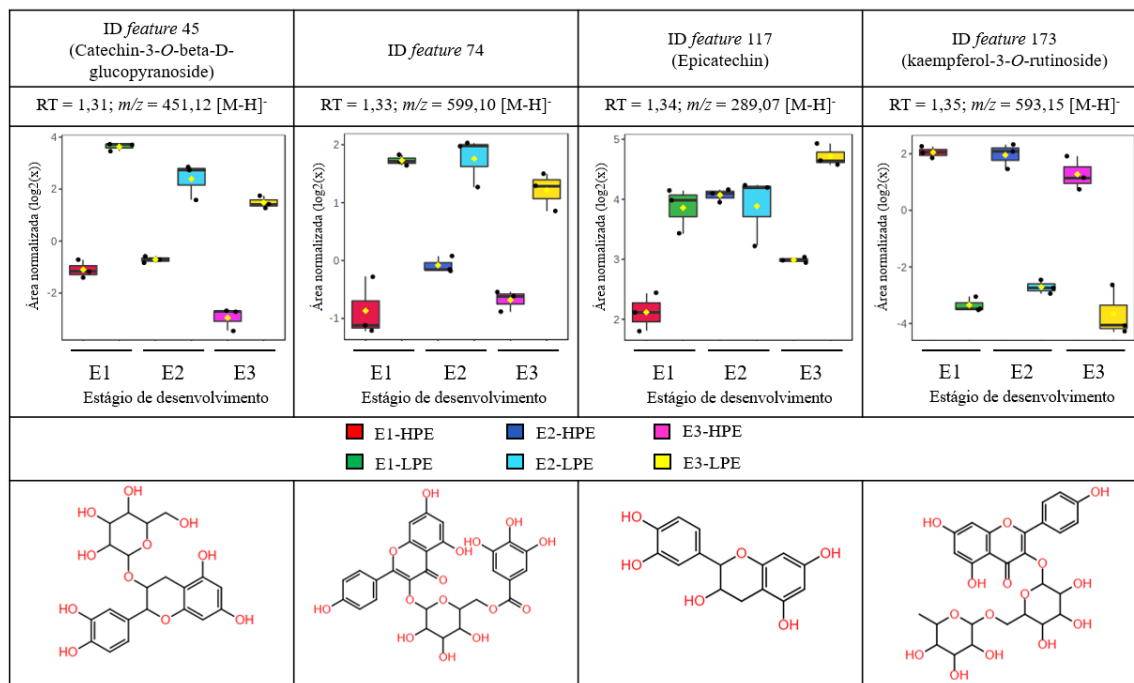
Por fim, outros quatro flavonoides que mostraram diferenças significativas apenas nos extratos de pericarpo, todos detectados sob modo de ionização negativa, são mostrados na Figura 48. As *features* identificadas pelos IDs 45 e 74 (Figura 48), a primeira tendo sido anotada como *Catechin-3-O-beta-glucopiranoside*, apresentaram abundâncias mais altas no genótipo LPE, com suave tendência de diminuição durante o desenvolvimento. Por outro lado, a *feature* 173 (*kaempferol-3-O-rutinoside*), mostrou um padrão de deposição completamente oposto entre os genótipos, marcado por abundâncias expressivamente mais altas no genótipo HPE em todos os três estágios de desenvolvimento analisados (Figura 48).

**Figura 47.** Flavonóides detectados no pericarpo e na testa em desenvolvimento de *J. curcas* e que tiveram abundâncias significativamente diferentes segundo o teste de ANOVA usando FDR baseado em permutação à 5% de probabilidade, entre genótipos HPE e LPE e/ou estágios de desenvolvimento



**Fonte:** Elaborada pelo autor; Dados da tese.

**Figura 48.** Flavonóides detectados no pericarpo em desenvolvimento de *J. curcas* e que apresentaram padrão de deposição estatisticamente diferente pelo teste de ANOVA usando FDR baseado em permutação à 5% de probabilidade, entre os genótipos HPE e LPE e/ou estágios de desenvolvimento



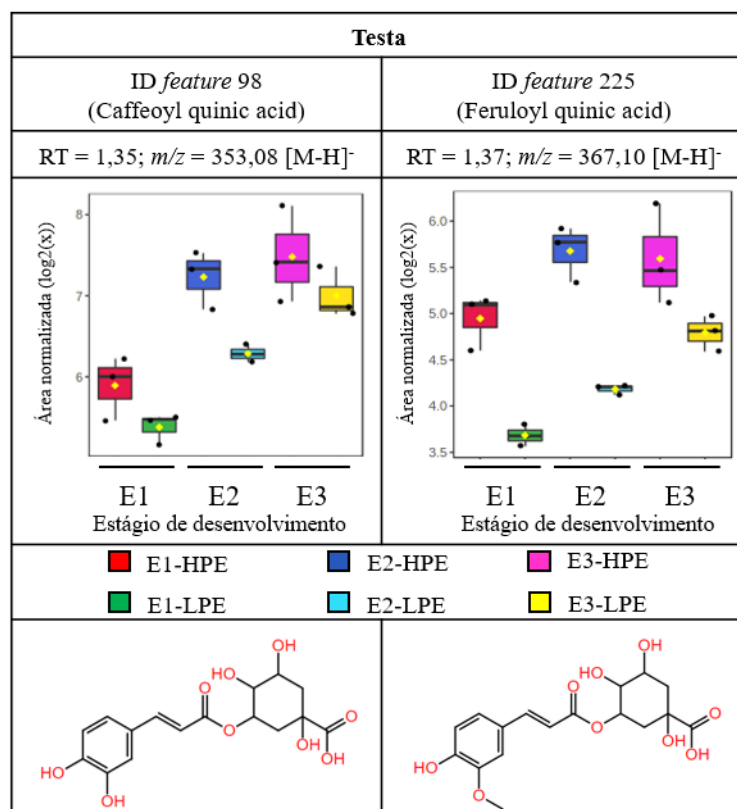
**Fonte:** Elaborada pelo autor; Dados da tese.

#### 4.10.3 Ácidos clorogênicos e taninos hidrolisáveis

Os ácidos clorogênicos, compreendem um grupo de compostos formados pela esterificação de ácidos fenólicos, como os ácidos cafeico, ferúlico, cumárico e sinápico, com o ácido quínico (CLIFFORD et al., 2017). Esses compostos são amplamente distribuídos no reino vegetal, e apresentam uma série de características promotoras de saúde, especialmente a prevenção à vários tipos de cânceres (GUPTA et al., 2022). Três ácidos clorogênicos foram detectados no modo de ionização negativa, ácido quínico cafeoil, ácido quínico cumaroil e ácido quínico feruloil, correspondentes as *features* 98, 185, 225, foram anotados nos tecidos de fruto em desenvolvimento, tanto por similaridade espectral (pontuações de cosseno de 0,971, 0,989 e 0,981, respectivamente), quanto *in silico* pelo CSI:FinderID. Os dois últimos foram detectados nos quatro tecidos analisados, enquanto o primeiro foi ausente no tegma e no endosperma (Tabela Suplementar IV). Desses três compostos, os ácidos quínico cafeoil e ácido quínico feruloil demonstraram padrão de deposição diferente estatisticamente entre os genótipos e estágios de desenvolvimento analisados (Figura 49). Para ambos, observou-se

tendência de aumento durante os estágios E1, E2 e E3. Além disso, foi visto que o genótipo HPE acumula maiores quantidades desses dois compostos (Figura 47).

**Figura 49.** Ácidos clorogênicos detectados na testa em desenvolvimento de *J. curcas*, que foram estatisticamente diferentes segundo o teste de ANOVA usando FDR baseado em permutação à 5% de probabilidade, entre os genótipos HPE e LPE e/ou estágios de desenvolvimento E1, E2 e E3

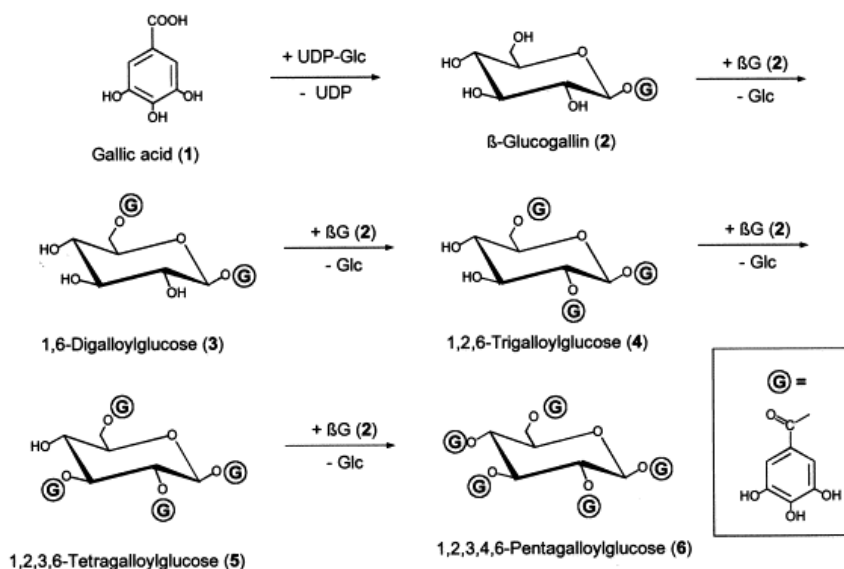


**Fonte:** Elaborada pelo autor; Dados da tese.

Por outro lado, os taninos hidrolisáveis são formados por um núcleo central de glicose e suas hidroxilas esterificadas com ácido gálico. O primeiro passo comprometido com a biossíntese dos taninos hidrolisáveis ocorre pela atividade de UDP-glicosiltransferase, que une por ligação éster ácido gálico e UDP-glicose para formar *b*-glicogalina (i). Essa molécula, ao receber mais uma, duas, três ou quatro moléculas de ácido gálico, forma, respectivamente, 1,6-Di- (ii), 1,2,6-Tri- (iii), 1,2,3,6-Tetra- (iv), e 1,2,3,4,6-Pentagaloilglicose, sendo estes, referidos como ésteres simples de galoilglicose (GRUNDHÖFER et al., 2001). Uma representação esquemática da rota de biossíntese desses compostos, é mostrada na Figura 48. A adição de resíduos galoil à pentagaloilglicose, forma taninos hidrolisáveis complexos, chamados galotaninos, enquanto a ligação C-C entre resíduos adjacentes de galoil em

pentagalloylglicose, forma-se elagitaninos, que podem formar subsequentemente, dímeros e oligômeros. Nas plantas, os taninos hidrolisáveis foram encontrados depositados nos cloroplastos, paredes celulares e espaços intracelulares (GRUNDHÖFER et al., 2001) e são compostos que apresentam atividades antioxidantes e antimicrobianas (BOBASA et al., 2021).

**Figura 50.** Rota de biossíntese dos ésteres simples de galoilglicose



**Fonte:** Elaborada pelo autor; Dados da tese.

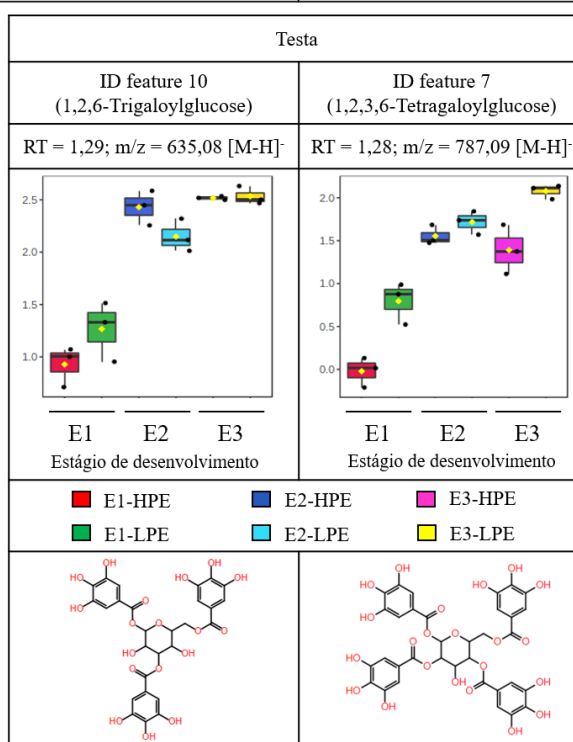
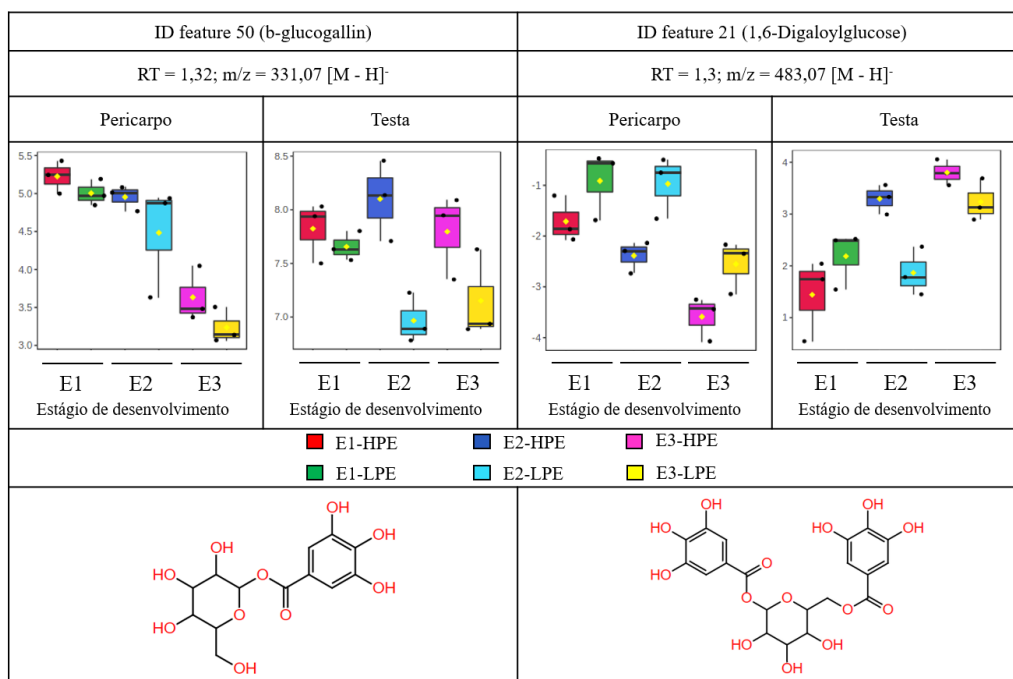
Quatro ésteres simples de galoilglicose foram detectados no modo de ionização negativa nos tecidos de fruto em desenvolvimento (**i**, **ii**, **iii** e **iv**, identificados respectivamente pelos IDs 50, 21, 10 e 7; Tabela suplementar IV), sendo que **ii**, **iii** e **iv**, não foram detectados em amostras de tegma e endosperma. Curiosamente, *b*-glicogalina (**i**), não foi detectado em nenhuma amostra de tegma do genótipo HPE, no entanto, esteve presente nos três estágios analisados do tegma do genótipo LPE. Algo semelhante foi observado para o composto **iv**, que também não foi detectado em amostras de pericarpo do genótipo HPE, porém estava presente nos estágios E1 e E2 do pericarpo do genótipo LPE. Em raízes e folhas, apenas **i** foi detectado (Tabela suplementar II). Enquanto nos extratos de testa, esses quatro compostos foram detectados nos três estágios de desenvolvimento analisados e em ambos os genótipos de *J. curcas*.

Os compostos **i** (ID *feature* 50) e **ii** (ID *feature* 21) mostraram diferença estatística no padrão de deposição ao longo do desenvolvimento do pericarpo e da testa (Figura 51), em que **i** tende a diminuir em ambos tecidos entre os estágios analisados, e foi encontrado em maior abundância na testa do genótipo HPE. Já, o composto **ii**, enquanto diminui no pericarpo e é

mais abundante no genótipo LPE, aumenta sua abundância na testa em função do desenvolvimento. De modo semelhante, os compostos **iii** (ID *feature* 10) e **iv** (ID *feature* 7), apresentaram diferença significativa na testa, e ambos ficam mais concentrados à medida que o desenvolvimento progride, com tendência de **iv** ser mais abundante no genótipo LPE (Figura 51). O aumento da concentração desses compostos na testa da semente, especialmente **iii** e **iv**, realmente está de acordo com a função protetora desse tecido (MOCTEZUMA et al., 2014).

Em resumo, viu-se que algumas classes de compostos fenólicos possuem distribuição órgão-específica na planta. As lignanas foram encontradas em maior diversidade nas raízes, havendo um contraste marcante entre os genótipos, já que neolignanas foram mais abundantes no genótipo LPE. Por outro lado, o pericarpo detém a maior diversidade de flavonoides, e estes sofrem alterações nas suas abundâncias, seja de aumento ou diminuição, no decorrer do desenvolvimento, e ainda foram vistos padrões distintos na comparação entre os genótipos. Por fim, ácidos clorogênicos e taninos hidrolisáveis se destacaram principalmente na testa da semente, que para a maioria dos que foram anotados, tendem a aumentar suas concentrações no curso do desenvolvimento, além de alguns possuírem diferenças significativas entre os genótipos.

**Figura 51.** Ésteres simples de galoilglicose detectados no pericarpo e na testa em desenvolvimento de *J. curcas*, que apresentaram diferença estatística de acordo com o teste de ANOVA usando FDR baseado em permutação à 5% de probabilidade, entre os genótipos HPE e LEP e/ou estágios de desenvolvimento E1, E2 e E3. *b*-glicogalina (ID feature 50) e 1,6-Digaloilglicose (ID feature 21) foram diferencialmente abundantes no pericarpo e na testa, enquanto 1,2,6-Trigaloilglicose (ID feature 10) e 1,2,3,6-Tetragaloilglicose (ID feature 7), demonstraram diferença estatística apenas na testa



**Fonte:** Elaborada pelo autor; Dados da tese.

#### **4.11 Padrão de deposição de lipídeos estruturais e oxilipinas no tegma em desenvolvimento**

Nesse trabalho, um conjunto de lipídeos estruturais detectados no tegma, especialmente glicerofosfolinas (Tabela suplementar III), mostraram diminuição acentuada durante o desenvolvimento das sementes de *J. curcas* (Figura 52). Isso é consistente com o processo de morte celular programada (PCD) sofrida por esse tecido, e corrobora com dados encontrados por Shah et al., (2016), que ao analisarem o proteoma de gerontoplastos isolados do tegma, encontraram um conjunto de 13 lipases, não encontradas em plastídeos isolados do endosperma (PINHEIRO et al., 2013).

No início do desenvolvimento da semente de *J. curcas*, o tegma é um tecido volumoso, e ocupa a maior parte do interior da semente, ao passo que no curso do desenvolvimento, é digerido gradativamente por PCD (ver Figura 10), de tal maneira que na semente madura resta apenas uma fina camada formada por tecido vascular (SOARES, 2015). Esse processo de PCD tem importante papel na transferência de fontes de C e N e disponibilidade de espaço físico para o endosperma e embrião em crescimento. O início desse processo é marcado pela transição dos etioplastos à gerontoplastos, em que ocorre o desmantelamento dos sistemas de membranas internas. Imagens ultraestruturais e uma análise proteômica dessa transição estão disponíveis (SOARES et al., 2017; SHAH et al., 2016).

Interessantemente, a redução dos lipídeos estruturais foi acompanhada pelo aumento significativo de um conjunto de oxilipinas, mostradas na Figura 53. Esses dados estão de acordo com a abundância cerca de sete vezes aumentada de lipoxigenase na região proximal do tegma (adjacente ao endosperma) em relação a região distal (distante do endosperma) (SOARES et al., 2014). As lipoxigenases, são enzimas responsáveis pela formação dos hidroperóxidos de ácidos graxos, precursores das oxilipinas. Em plantas, são conhecidos dois tipos de lipoxigenases, chamadas de 9-LOX (EC:1.13.11.58) e 13-LOX (EC:1.13.11.12), que adicionam um grupamento hidroxila aos carbonos 9 e 13 da cadeia do ácido graxo, respectivamente (VISWANATH et al., 2020).

Oxilipinas, é um termo usado para designar compostos derivados da oxidação de ácidos graxos poliinsaturados, sendo estes, liberados pela atividade de fosfolipases sobre os lipídeos de membrana (GRIFFITHS, 2015). Esse grupo é subdividido em octadecanóides, eicosanóides e docosanóides, a depender se o metabólito possui 18, 20 ou 22 carbonos. Em *J. curcas*, oxilipinas octadecanóides foram isoladas recentemente de sementes após extração do



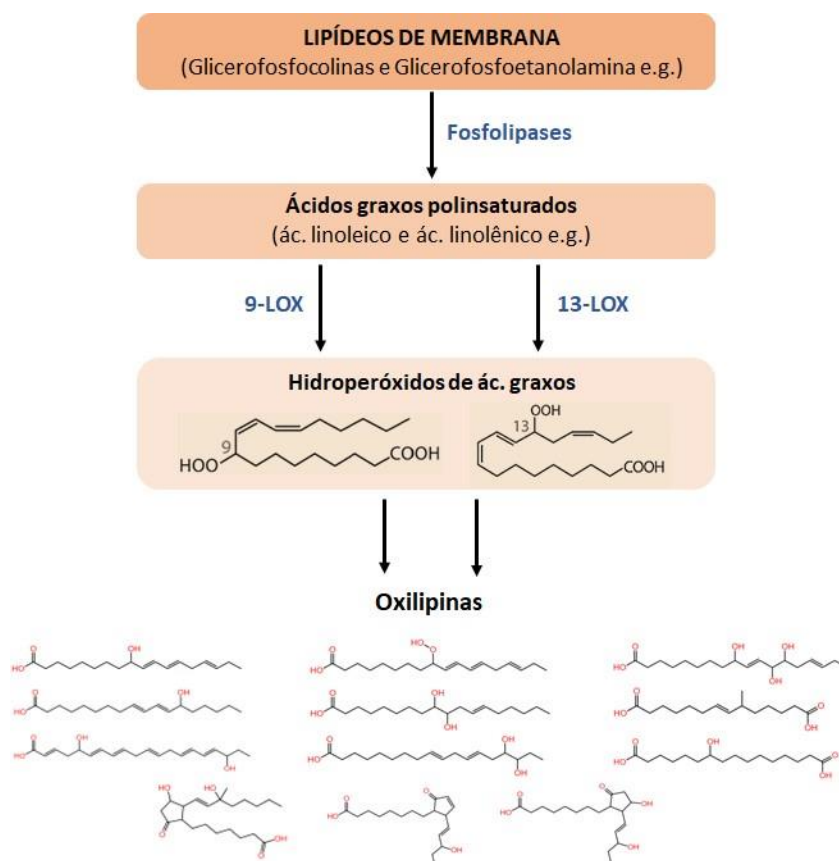
óleo, e caracterizadas estruturalmente (WANG et al., 2020). Além disso, esses autores apresentaram na literatura o primeiro relato em discordância sobre a toxicidade da torta de pinhão-manso atribuída aos EF, ao associarem essa característica aos octadecanóides ora isolados, apesar de não terem realizado uma análise comparativa entre genótipos com teores de EF contrastantes, por exemplo, já que as oxilipinas descritas, são potencialmente produzidas por quaisquer genótipos.

Aqui, um maior número de octadecanóides foram anotados em relação as outras subclasses de oxilipinas (Tabelas Suplementares II e IV). Um esquema ilustrativo da biossíntese de oxilipinas é mostrado na Figura 54. Dentre as oxilipinas mais bem estudadas está o ácido jasmônico e seus derivados, envolvidos com respostas a estresses e aspectos do desenvolvimento vegetal (LIU et al., 2016). Dada sua origem, as oxilipinas são potencialmente produzidas por todos os tecidos das plantas, contudo é esperado que sua deposição seja aumentada em determinados contextos celulares que provoquem aumento da peroxidação lipídica, como situações de estresse ou alguns eventos normais do desenvolvimento como senescência e PCD. A relação entre oxilipinas e morte celular também já foi descrita durante a infecção de plantas de batata e tomate por vírus, em que níveis aumentados de 9-LOX, 13-LOX e DOX-1 foram observados nos estágios iniciais da infecção por PVX ou PVY, momentos antes da morte celular (GARCÍA-MARCOS et al., 2013). Assim, durante o processo de PCD do tegma em *J. curcas*, é provável que os eventos que levam à peroxidação lipídica nos plastídeos produzam moléculas sinais, que através de sinalização retrógrada, alterem o padrão de expressão gênica e provoquem uma superexpressão de peptidases e carboidrases, culminando com a total digestão do tegma. A sinalização retrógrada mediada por oxilipinas durante a transição de cloroplastos para gerontoplastos é conhecida em folhas senescentes (MUÑOZ; MUNNÉ-BOSCH, 2020).





**Figura 54.** Visão resumida da biossíntese de oxilipinas em plantas. Os lipídeos estruturais de membrana são hidrolisados por fosfolipases (em plantas, fosfolipases a e d). A seguir, os ácidos graxos livres são usados para formação de hidroperóxidos de ácidos graxos por atividade de lipoxigenases (em plantas, 9-LOX e 13-LOX). Finalmente, esses compostos são alvos de outros grupos de proteínas, que levam à biossíntese das diversas oxilipinas



**Fonte:** Elaborada pelo autor.

## 5 CONCLUSÕES

Em conclusão, esse trabalho descreveu o padrão de deposição dos ésteres de forbol em diversas partes de plantas de pinhão-manso, abordando alguns aspectos sobre sua biossíntese, assim como a possibilidade de transporte de longa distância, ao combinar por enxertia, plantas com teores contrastantes de EF, como também, analisou suas variações de abundância em tecidos isolados de frutos em desenvolvimento. Trouxe ainda fortes evidências que determinados genótipos de *J. curcas* são totalmente incapazes de produzir EF, a exemplo do genótipo LPE, provavelmente por deficiências de enzimas que executam os passos finais da via de biossíntese, já que diterpenos estruturalmente relacionados ao 12-deoxi-16-hidroxi-forbol foram encontrados em ambos os genótipos. Além disso, esse é o primeiro relato que mostrou de maneira inequívoca a ocorrência desses compostos em raízes e na testa isolada da semente.

Finalmente, ao aplicar uma abordagem metabolômica não-alvo às amostras de raízes, folhas e tecidos de fruto em desenvolvimento, foi possível verificar, que além das raízes apresentarem a maior diversidade de terpenóides e lignanas, padrões muito contrastantes desses compostos foram observados entre os genótipos. Enquanto o genótipo HPE acumula concentrações relativas mais altas de diterpenóides e outros compostos derivados de GGPP, o genótipo LPE apresenta maiores concentrações de sesquiterpenóides, resultados que puderam ser associados a mais alta abundância da enzima FPPS no genótipo LPE reportada na literatura. Já, neolignanas demonstraram ser mais abundantes nas raízes do genótipo LPE, e lignanas, do genótipo HPE. Também foram determinados padrões de deposição característicos dos genótipos e estágios de desenvolvimento de tecidos do fruto relacionados a outros compostos fenólicos como flavonoides, ácidos clorogênicos e ésteres simples de galoilglicose, precursores dos taninos hidrolisáveis. Além disso, ao analisar especificamente o tegma em desenvolvimento, foi possível associar a redução na abundância relativa de lipídeos de membrana seguido do aumento na abundância de oxilipinas, com o processo de morte celular programada sofrida por esse tecido durante o desenvolvimento da semente. Assim, esses dados mostraram que as diferenças entre os genótipos HPE e LPE vão além dos ésteres de forbol.

## 6 PERSPECTIVAS

Em decorrência do grande volume de dados coletados, de imediato será desejável vasculhar as redes moleculares que foram construídas, na tentativa de encontrar possíveis *features* que tragam mais informações sobre a biossíntese de EF, sendo necessária uma análise mais aprofundada.

Pelo potencial papel das raízes na biossíntese de ésteres de forbol, uma outra abordagem que poderá ser aplicada para testar o transporte de longa distância desses compostos, quer seja as moléculas completas ou parte delas, é a análise da seiva vascular, especificamente do xilema. Trabalhos reportaram a presença de tiglianos glicosilados em espécies de Euphorbiaceae (PAN et al., 2011; WANG et al., 2017; YUAN et al., 2022). Essa conjugação de diterpenóides com açúcar talvez seja uma estratégia da planta para o transporte de longa distância desses compostos, de modo a proporcionar maior solubilidade na seiva aquosa. Nesses estudos das raízes, cabe ainda uma validação das atividades das enzimas FPPS e GGPPS nos genótipos HPE e LPE por proteômica alvo-dirigida e RT-qPCR, de modo a explicar de forma mais contundente o contraste observado nas abundâncias de sesqui e diterpenóides.

Além disso, partindo da hipótese de que a ausência de EF no genótipo LPE está ligada a deficiência(s) nos passos finais da via, um grupo interessante de proteínas que poderá ser alvo de estudos comparativos entre os genótipos, compreende as BAHD aciltransferases, que possivelmente são as responsáveis por ligar os ácidos graxos ao esqueleto diterpenóide. Isso poderá ser testado aplicando técnicas de proteômica alvo-direcionadas para todas as enzimas BAHD aciltransferases codificadas pelo genoma do pinhão-manso, como também, pelo silenciamento dessas isoformas.

## REFERÊNCIAS

- ADELAKUN, T. A. et al. A new highly oxygenated abietane diterpenoid and a new lysosome generating phorbol ester from the roots of *Euphorbia fischeriana* Steud. **Natural Product Research**, *s. l.*, v. 34, n. 21, p. 3027–3035, 1 nov. 2019.
- AHLUWALIA, S. et al. Optimization of protein extraction from detoxified *Jatropha* seed cake using response surface methodology and amino acid analysis. **International Journal of Environmental Science and Technology**, *s. l.*, v. 17, n. 2, p. 1087–1100, 1 fev. 2020.
- AMKUL, K. et al. Mapping of QTLs for seed phorbol esters, a toxic chemical in *Jatropha curcas* (L.). **Genes**, *s. l.*, v. 8, n. 8, p. 205, 18 ago. 2017.
- BALDINI, M. et al. Determination of phorbol esters in seeds and leaves of *Jatropha curcas* and in animal tissue by high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Industrial Crops and Products**, *s. l.*, v. 59, p. 268–276, 1 ago. 2014.
- BALDWIN, I. T. Mechanism of damage-induced alkaloid production in wild tobacco. **Journal of Chemical Ecology**, *s. l.*, v. 15, n. 5, p. 1661–1680, maio 1989.
- BAO, J. M. et al. Jatrocucadiones A and B: two novel diterpenoids with an unusual 10,11-seco-premyrsinane skeleton from *Jatropha curcas*. **RSC Advances**, *s. l.*, v. 5, n. 77, p. 62921–62925, 20 jul. 2015.
- BASHA, S. D. et al. A comparative study of biochemical traits and molecular markers for assessment of genetic relationships between *Jatropha curcas* L. germplasm from different countries. **Plant Science**, *s. l.*, v. 176, n. 6, p. 812–823, 1 jun. 2009.
- BASHA, S. D.; SUJATHA, M. Inter and intra-population variability of *Jatropha curcas* (L.) characterized by RAPD and ISSR markers and development of population-specific SCAR markers. **Euphytica**, *s. l.*, v. 156, n. 3, p. 375–386, 10 mar. 2007.
- BOBASA, E. M. et al. Hydrolysable tannins in *Terminalia ferdinandiana* Exell fruit powder and comparison of their functional properties from different solvent extracts. **Food Chemistry**, *s. l.*, v. 358, p. 129833, 1 out. 2021.
- BORAH, N. et al. Variability of growth and oil characteristics of *Jatropha curcas* L. in North-east India. **Biofuels**, *s. l.*, v. 12, n. 3, p. 327–337, 25 may. 2018.
- CAVALCANTE, N. B.; DA CONCEIÇÃO SANTOS, A. D.; DA SILVA ALMEIDA, Jackson Roberto Guedes. The genus *Jatropha* (Euphorbiaceae): A review on secondary chemical metabolites and biological aspects. **Chemico-biological interactions**, *s. l.*, v. 318, p. 108976, 2020.
- CHANG, H. Y.; CHENG, T. H.; WANG, A. H. J. Structure, catalysis, and inhibition mechanism of prenyltransferase. **IUBMB Life**, *s. l.*, v. 73, n. 1, p. 40–63, 1 jan. 2021.
- CHEYNIER, V. et al. Plant phenolics: Recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. **Plant Physiology and Biochemistry**, *s. l.*, v. 72, p. 1–20, 1 nov. 2013.

CHIANESE, G. et al. Spirocurcasone, a diterpenoid with a novel carbon skeleton from *Jatropha curcas*. **Organic Letters**, *s. l.*, v. 13, n. 2, p. 316–319, 21 jan. 2011.

CLIFFORD, M. N. et al. Chlorogenic acids and the acyl-quinic acids: discovery, biosynthesis, bioavailability and bioactivity. **Natural Product Reports**, *s. l.*, v. 34, n. 12, p. 1391-1421, may. 2017.

CZECHOWSKI, T. et al. *Artemisia annua* mutant impaired in artemisinin synthesis demonstrates importance of nonenzymatic conversion in terpenoid metabolism. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, *s. l.*, v. 113, n. 52, p. 15150–15155, 27 dez. 2016.

CZECHOWSKI, T. et al. Detailed phytochemical analysis of high- and low artemisinin-producing chemotypes of *Artemisia annua*. **Frontiers in Plant Science**, *s. l.*, v. 9, p. 641, 18 may. 2018.

DA SILVA, R. R.; DORRESTEIN, P. C.; QUINN, R. A. Illuminating the dark matter in metabolomics. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, *s. l.*, v. 112, n. 41, p. 12549–12550, 13 out. 2015.

DE ALMEIDA, N. P. et al. Monitoring casbene synthase in *Jatropha curcas* tissues using targeted proteomics. **Plant Methods**, *s. l.*, v. 17, n. 1, p. 1–13, 1 dez. 2021.

DE BARROS, C. R. M. et al. The potential of white-rot fungi to degrade phorbol esters of *Jatropha curcas* L. seed cake. **Engineering in Life Sciences**, v. 11, n. 1, p. 107–110, 1 fev. 2011.

DEVAPPA, R. K.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Localisation of antinutrients and qualitative identification of toxic components in *Jatropha curcas* seed. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, *s. l.*, v. 92, n. 7, p. 1519–1525, 1 maio 2012.

DIAS, M. C. et al. Plant flavonoids: chemical characteristics and biological activity. **Molecules**, *s. l.*, v. 26, n. 17, p. 5377, 4 set. 2021.

DONG, D. et al. Grafting: a potential method to reveal the differential accumulation mechanism of secondary metabolites. **Horticulture Research**, *s. l.*, v. 9, 5 jan. 2022.

DÜHRKOP, K. et al. SIRIUS 4: a rapid tool for turning tandem mass spectra into metabolite structure information. **Nature Methods**, *s. l.*, v. 16, n. 4, p. 299–302, 18 mar. 2019.

FARIA-MACHADO, A. F. et al. Method validation for analysis of phorbol esters from *Jatropha curcas*. **Industrial Crops and Products**, *s. l.*, v. 140, p. 111627, 15 nov. 2019.

FARIAS, A. R. B. DE et al. Quantitative proteome analysis of *Jatropha curcas* L. genotypes with contrasting levels of phorbol esters. **Proteomics**, *s. l.*, v. 20, n. 14, p. 1900273, 1 jul. 2020.

FELEMBAN, A. et al. Apocarotenoids involved in plant development and stress response. **Frontiers in Plant Science**, *s. l.*, v. 10, p. 1168, 27 set. 2019.



GARCÍA-MARCOS, A. et al. Oxylin biosynthesis genes positively regulate programmed cell death during compatible infections with the synergistic pair Potato Virus X - Potato Virus Y and tomato spotted wilt virus. **Journal of Virology**, *s. l.*, v. 87, n. 10, p. 5769–5783, 15 maio 2013.

GOGOI, R.; NIYOGI, U. K.; TYAGI, A. K. Reduction of phorbol ester content in jatropha cake using high energy gamma radiation. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, *s. l.*, v. 7, n. 3, p. 305–309, 1 jul. 2014.

GRIFFITHS, G. Biosynthesis and analysis of plant oxylin. **Free Radical Research**, *s. l.*, v. 49, n. 5, p. 565–582, 4 maio 2015.

GRUNDHÖFER, P. et al. Biosynthesis and subcellular distribution of hydrolyzable tannins. **Phytochemistry**, *s. l.*, v. 57, n. 6, p. 915–927, 1 jul. 2001.

GUEDES, R. E. et al. Detoxification of *Jatropha curcas* seed cake using chemical treatment: Analysis with a central composite rotatable design. **Industrial Crops and Products**, *s. l.*, v. 52, p. 537–543, 1 jan. 2014.

GUILLAUME, F. C. et al. The landscape of natural product diversity and their pharmacological relevance from a focus on the Dictionary of Natural Products®. **Phytochemistry Reviews**, *s. l.*, v. 18, n. 3, p. 601–622, 24 abr. 2019.

GUPTA, A. et al. Chlorogenic acid for cancer prevention and therapy: current status on efficacy and mechanisms of action. **Pharmacological Research**, *s. l.*, v. 186, p. 106505, 1 dez. 2022.

HAAS, W.; STERK, H.; MITTELBACH, M. Novel 12-deoxy-16-hydroxyphorbol diesters isolated from the seed oil of *Jatropha curcas*. **Journal of Natural Products**, *s. l.*, v. 65, n. 10, p. 1434–1440, 1 out. 2002.

HE, W. et al. Analysis of seed phorbol-ester and curcumin content together with genetic diversity in multiple provenances of *Jatropha curcas* L. from Madagascar and Mexico. **Plant Physiology and Biochemistry**, *s. l.*, v. 49, n. 10, p. 1183–1190, 1 out. 2011.

HERATH, K. et al. Application of time-of-flight mass spectrometry for screening of crude glycerins for toxic phorbol ester contaminants. **Journal of Chromatography B**, *s. l.*, v. 1046, p. 226–234, 1 mar. 2017.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. The water-culture method for growing plants without soil. **Circular. California Agricultural Experiment Station**, *s. l.*, v. 347, n. 2nd edit, 1950.

HOU, X. et al. Synthesis and function of apocarotenoid signals in plants. **Trends in Plant Science**, *s. l.*, v. 21, n. 9, p. 792–803, 1 set. 2016.

HUANG, J. DI et al. Isolation and identification of five new diterpenoids from *Jatropha curcas*. **Phytochemistry Letters**, *s. l.*, v. 40, p. 37–41, 1 dez. 2020.

HUANG, J. DI et al. New lathyrane diterpenoids with anti-inflammatory activity isolated from the roots of *Jatropha curcas* L. **Journal of Ethnopharmacology**, *s. l.*, v. 268, p. 113673, 25 mar. 2021.

JONAS, M.; KETLOGETSWE, C.; GANDURE, J. Variation of *Jatropha curcas* seed oil content and fatty acid composition with fruit maturity stage. **Heliyon**, *s. l.*, v. 6, n. 1, p. e03285, 1 jan. 2020.

JØRGENSEN, K. et al. Cassava plants with a depleted cyanogenic glucoside content in leaves and tubers. Distribution of cyanogenic glucosides, their site of synthesis and transport, and blockage of the biosynthesis by RNA interference technology. **Plant Physiology**, *s. l.*, v. 139, n. 1, p. 363–374, 1 set. 2005.

JØRGENSEN, M. E.; NOUR-ELDIN, H. H.; HALKIER, B. A. Transport of defense compounds from source to sink: lessons learned from glucosinolates. **Trends in Plant Science**, *s. l.*, v. 20, n. 8, p. 508–514, 1 ago. 2015.

KARUNANITHI, P. S.; ZERBE, P. Terpene synthases as metabolic gatekeepers in the evolution of plant terpenoid chemical diversity. **Frontiers in Plant Science**, *s. l.*, v. 10, p. 1166, 1 out. 2019.

KING, A. J. et al. Linkage mapping in the oilseed crop *Jatropha curcas* L. reveals a locus controlling the biosynthesis of phorbol esters which cause seed toxicity. **Plant Biotechnology Journal**, *s. l.*, v. 11, n. 8, p. 986–996, 1 out. 2013.

KING, A. J. et al. Production of bioactive diterpenoids in the Euphorbiaceae depends on evolutionarily conserved gene clusters. **The Plant Cell**, *s. l.*, v. 26, n. 8, p. 3286–3298, 25 set. 2014.

KING, A. J. et al. A Cytochrome P450-Mediated intramolecular carbon–carbon ring closure in the biosynthesis of multidrug-resistance-reversing lathyrane diterpenoids. **ChemBioChem**, *s. l.*, v. 17, n. 17, p. 1593–1597, 2 set. 2016.

KIRWAN, J. A. et al. Quality assurance and quality control reporting in untargeted metabolic phenotyping: mQACC recommendations for analytical quality management. **Metabolomics: Official journal of the Metabolomic Society**, *s. l.*, v. 18, n. 9, p. 70, 27 ago. 2022.

KONGMANY, S. et al. Semi-preparative HPLC separation followed by HPLC/UV and tandem mass spectrometric analysis of phorbol esters in *Jatropha seed*. **Journal of Chromatography B**, *s. l.*, v. 1038, p. 63–72, 1 dez. 2016.

KUMAR, R.; DAS, N. Seed oil of *Jatropha curcas* L. germplasm: Analysis of oil quality and fatty acid composition. **Industrial Crops and Products**, *s. l.*, v. 124, p. 663–668, 15 nov. 2018.

LAVIOLA, B. G. et al. Establishment of new strategies to quantify and increase the variability in the Brazilian *Jatropha* genotypes. **Industrial Crops and Products**, *s. l.*, v. 117, p. 216–223, 1 jul. 2018.

- LI, C. Y. et al. Toxicity of *Jatropha curcas* phorbol esters in mice. **Food and Chemical Toxicology**, *s. l.*, v. 48, n. 2, p. 620–625, 1 fev. 2010.
- LI, H. et al. Genetic tracing of *Jatropha curcas* L. From its mesoamerican origin to the world. **Frontiers in Plant Science**, *s. l.*, v. 8, p. 1539, 7 set. 2017.
- LI, X. et al. Two new lignans with antioxidative activities from *Jatropha curcas*. **Natural Product Research**, *s. l.*, v. 28, n. 22, p. 1985–1991, 1 nov. 2014.
- LI, Y. et al. Chemical structures of lignans and neolignans isolated from Lauraceae. **Molecules**, *s. l.*, v. 23, n. 12, p. 3164, 30 nov. 2018.
- LIU, J. Q. et al. Three new diterpenes from *Jatropha curcas*. **Tetrahedron**, *s. l.*, v. 68, n. 4, p. 972–976, 28 jan. 2012.
- LIU, J. Q. et al. Cytotoxicity of naturally occurring rhamnofolane diterpenes from *Jatropha curcas*. **Phytochemistry**, *s. l.*, v. 96, p. 265–272, 1 dez. 2013.
- LIU, J. Q. et al. Cytotoxic diterpenoids from *Jatropha curcas* cv. nigroviensrugosus CY Yang Roots. **Phytochemistry**, *s. l.*, v. 117, p. 462–468, 1 set. 2015.
- LIU, L. et al. Exogenous jasmonic acid and cytokinin antagonistically regulate rice flag leaf senescence by mediating chlorophyll degradation, membrane deterioration, and senescence-associated genes expression. **Journal of Plant Growth Regulation**, *s. l.*, v. 35, n. 2, p. 366–376, 1 jun. 2016.
- LIU, W. et al. The flavonoid biosynthesis network in plants. **International Journal of Molecular Sciences**, *s. l.*, v. 22, n. 23, p. 12824, 26 nov. 2021.
- LIU, Z. et al. Balancing skeleton and functional groups in total syntheses of complex natural products: a case study of tigliane, daphnane and ingenane diterpenoids. **Natural Product Reports**, *s. l.*, v. 38, n. 9, p. 1589–1617, 23 set. 2021.
- LUO, D. et al. Oxidation and cyclization of casbene in the biosynthesis of Euphorbia factors from mature seeds of *Euphorbia lathyris* L. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, *s. l.*, v. 113, n. 34, p. E5082–E5089, 23 ago. 2016.
- MAFU, S.; ZERBE, P. Plant diterpenoid metabolism for manufacturing the biopharmaceuticals of tomorrow: prospects and challenges. **Phytochemistry Reviews**, *s. l.*, v. 17, n. 1, p. 113–130, 20 maio 2017.
- MAKKAR, H. P. S. et al. Studies on nutritive potential and toxic constituents of different provenances of *Jatropha curcas*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, *s. l.*, v. 45, n. 8, p. 3152–3157, 1997.
- MANNOCHIO-RUSSO, H. et al. Untargeted metabolomics sheds light on the diversity of major classes of secondary metabolites in the Malpighiaceae botanical family. **Frontiers in Plant Science**, *s. l.*, v. 0, p. 1074, 14 abr. 2022.

MEHER, L. C. et al. *Jatropha curcas* as a renewable source for bio-fuels - A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, *s. l.*, v. 26, p. 397–407, 1 out. 2013.

MOCTEZUMA, C. et al. Specific polyphenols and tannins are associated with defense against insect herbivores in the tropical oak *quercus oleoides*. **Journal of Chemical Ecology**, *s. l.*, v. 40, n. 5, p. 458–467, 1 maio 2014.

MONTES, J. M.; MELCHINGER, A. E. Domestication and breeding of *Jatropha curcas* L. **Trends in Plant Science**, *s. l.*, v. 21, n. 12, p. 1045–1057, 1 dez. 2016.

MUDGE, K. et al. A history of grafting. **Horticultural Reviews**, *s. l.*, v. 35, p. 437–493, 2009.

MUKHOPADHYAY, M. Annotating unknown metabolites. **Nature Methods**, *s. l.*, v. 20, n. 1, p. 33–33, 12 jan. 2023.

MULPURI, S.; MUDDANURU, T.; FRANCIS, G. Start codon targeted (SCoT) polymorphism in toxic and non-toxic accessions of *Jatropha curcas* L. and development of a codominant SCAR marker. **Plant Science**, *s. l.*, v. 207, p. 117–127, 1 jun. 2013.

MUÑOZ, P.; MUNNÉ-BOSCH, S. Oxylipins in plastidial retrograde signaling. **Redox Biology**, *s. l.*, v. 37, p. 101717, 1 out. 2020.

MUSHTAQ, M. Y. et al. Extraction for Metabolomics: Access to The Metabolome. **Phytochemical Analysis**, *s. l.*, v. 25, n. 4, p. 291–306, 1 jul. 2014.

NAENGCHOMNONG, W. et al. Isolation and structure determination of four novel diterpenes from *Jatropha curcas*. **Tetrahedron Letters**, *s. l.*, v. 27, n. 22, p. 2439–2442, 1 jan. 1986.

NASCIMENTO, José Roberto da Silva. **Análise da expressão de genes para a sintase do casbano em genótipos de pinhão manso com teor contrastante de ésteres de forbol**, CE. 2017. 68 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade Federal do Ceará, 2017.

NEU, P. M.; SCHOBER, S.; MITTELBACH, M. Quantification of Phorbol Esters in *Jatropha curcas* by HPLC-UV and HPLC-ToF-MS with Standard Addition Method. **European Journal of Lipid Science and Technology**, *s. l.*, v. 120, n. 8, p. 1800146, 1 ago. 2018.

NOTHIAS, L. F. et al. Feature-based molecular networking in the GNPS analysis environment. **Nature Methods**, *s. l.*, v. 17, n. 9, p. 905–908, 24 ago. 2020.

OSKOUEIAN, E. et al. Mode of action of *Jatropha curcas* phorbol esters in bovine kidney cells. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, *s. l.*, v. 17, p. 514–524, 1 jan. 2019.

PAN, L. L. et al. Tiglane-type diterpenoid glycosides from *Euphorbia fischeriana*. **Journal of Natural Products**, *s. l.*, v. 74, n. 6, p. 1508–1512, 24 jun. 2011.

PANG, Z. et al. Using MetaboAnalyst 5.0 for LC–HRMS spectra processing, multi-omics integration and covariate adjustment of global metabolomics data. **Nature Protocols**, *s. l.*, v. 17, n. 8, p. 1735–1761, 17 jun. 2022.

PANIAGUA, C. et al. Dirigent proteins in plants: modulating cell wall metabolism during abiotic and biotic stress exposure. **Journal of Experimental Botany**, *s. l.*, v. 68, n. 13, p. 3287–3301, 22 ago. 2017.

PINHEIRO, C. B. et al. Proteome analysis of plastids from developing seeds of *Jatropha curcas* L. **Journal of Proteome Research**, *s. l.*, v. 12, n. 11, p. 5137–5145, 1 nov. 2013.

RAVINDRANATH, N. et al. New lathyrane and podocarpane diterpenoids from *Jatropha curcas*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, *s. l.*, v. 52, n. 5, p. 608–611, maio 2004.

ROACH, J. S. et al. Isolation, stability and bioactivity of *Jatropha curcas* phorbol esters. **Fitoterapia**, *s. l.*, v. 83, n. 3, p. 586–592, 1 abr. 2012.

DA LUZ, J. M. R. et al. Bio-detoxification of *Jatropha curcas* seed cake by *Pleurotus ostreatus*. **African Journal of Microbiology Research**, *s. l.*, v. 8, n. 11, p. 1148–1156, 2014.

RODRIGUES, J. et al. Variability in oil content and composition and storage stability of seeds from *Jatropha curcas* L. grown in Mozambique. **Industrial Crops and Products**, *s. l.*, v. 50, p. 828–837, 1 out. 2013.

SAETAE, D.; SUNTORNSUK, W. Toxic compound, anti-nutritional factors and functional properties of protein isolated from detoxified *Jatropha curcas* seed cake. **International Journal of Molecular Sciences**, *s. l.*, v. 12, n. 1, p. 66–77, 28 dez. 2010.

SÁNCHEZ-ARREOLA, E. et al. Biodiesel production and de-oiled seed cake nutritional values of a Mexican edible *Jatropha curcas*. **Renewable Energy**, *s. l.*, v. 76, p. 143–147, 1 abr. 2015.

SCHMID, R. et al. Integrative analysis of multimodal mass spectrometry data in MZmine 3. **Nature Biotechnology**, *s. l.*, p. 1–3, 1 mar. 2023.

SCHMIDT, RICHARD J. The biosynthesis of tiglane and related diterpenoids; an intriguing problem. **Botanical journal of the Linnean Society**, *s. l.*, v. 94, n. 1-2, p. 221–230, 1987.

SHAH, Mohibullah. **Proteome Analysis of developing seeds of *Jatropha curcas* L**, CE. 2014. 168 f. Tese (Doutorado em Bioquímica). Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade Federal do Ceará, 2014.

SHAH, M. et al. Deep proteome analysis of gerontoplasts from the inner integument of developing seeds of *Jatropha curcas*. **Journal of Proteomics**, *s. l.*, v. 143, p. 346–352, 30 jun. 2016.

SINDELAR, M.; PATTI, G. J. Chemical discovery in the Era of Metabolomics. **Journal of the American Chemical Society**, *s. l.*, v. 142, n. 20, p. 9097–9105, 20 maio 2020.

SOARES, E. L. et al. Proteome analysis of the inner integument from developing *Jatropha curcas* L. seeds. **Journal of Proteome Research**, *s. l.*, v. 13, n. 8, p. 3562–3570, 1 ago. 2014.

SOARES, Emanoella Lima. L. **Ontogenia da semente e análise proteômica do integumento interno de *Jatropha curcas* L (Euphorbiaceae)**, CE. 2015. 140 f. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia) – Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade Federal do Ceará, 2015.

SOARES, E. L. et al. Seed development of *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae): integrating anatomical, ultrastructural and molecular studies. **Plant Cell Reports**, *s. l.*, v. 36, n. 11, p. 1707–1716, 1 nov. 2017.

SU, G. et al. Biological network exploration with Cytoscape 3. **Current Protocols in Bioinformatics**, *s. l.*, v. 47, n. 1, p. 8.13.1-8.13.24, 1 set. 2014.

SUDHEER PAMIDIMARRI, D. V. N. et al. Molecular characterization and identification of markers for toxic and non-toxic varieties of *Jatropha curcas* L. using RAPD, AFLP and SSR markers. **Molecular Biology Reports**, *s. l.*, v. 36, n. 6, p. 1357–1364, 19 jul. 2009.

SUJATHA, M.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Shoot bud proliferation from axillary nodes and leaf sections of non-toxic *Jatropha curcas* L. **Plant Growth Regulation**, *s. l.*, v. 47, n. 1, p. 83–90, set. 2005.

SUZUKI, T. et al. Antioxidative catechol lignans/neolignans isolated from defatted kernel of *Jatropha curcas*. **Journal of Wood Science**, *s. l.*, v. 62, n. 4, p. 339–348, 1 ago. 2016.

SYMONS, G. M.; REID, J. B. Brassinosteroids do not undergo long-distance transport in Pea. Implications for the regulation of endogenous brassinosteroid levels. **Plant Physiology**, *s. l.*, v. 135, n. 4, p. 2196–2206, 1 ago. 2004.

TANYA, P. et al. New microsatellite markers classifying nontoxic and toxic *Jatropha curcas*. **Journal of genetics**, *s. l.*, p. 1-3, 2011.

TAUTENHAHN, R. et al. XCMS online: A web-based platform to process untargeted metabolomic data. **Analytical Chemistry**, *s. l.*, v. 84, n. 11, p. 5035–5039, 5 jun. 2012.

TISSIER, A.; ZIEGLER, J.; VOGT, T. Specialized plant metabolites: diversity and biosynthesis. **Ecological Biochemistry: Environmental and Interspecies Interactions**, *s. l.*, p. 14–37, 12 jan. 2015.

TREBBI, D. et al. Assessment of genetic diversity in different accessions of *Jatropha curcas*. **Industrial Crops and Products**, *s. l.*, v. 75, p. 35–39, 30 nov. 2015.

TREBBI, D. et al. Identification and validation of SNP markers linked to seed toxicity in *Jatropha curcas* L. **Scientific Reports**, *s. l.*, v. 9, n. 1, p. 1–7, 15 jul. 2019.

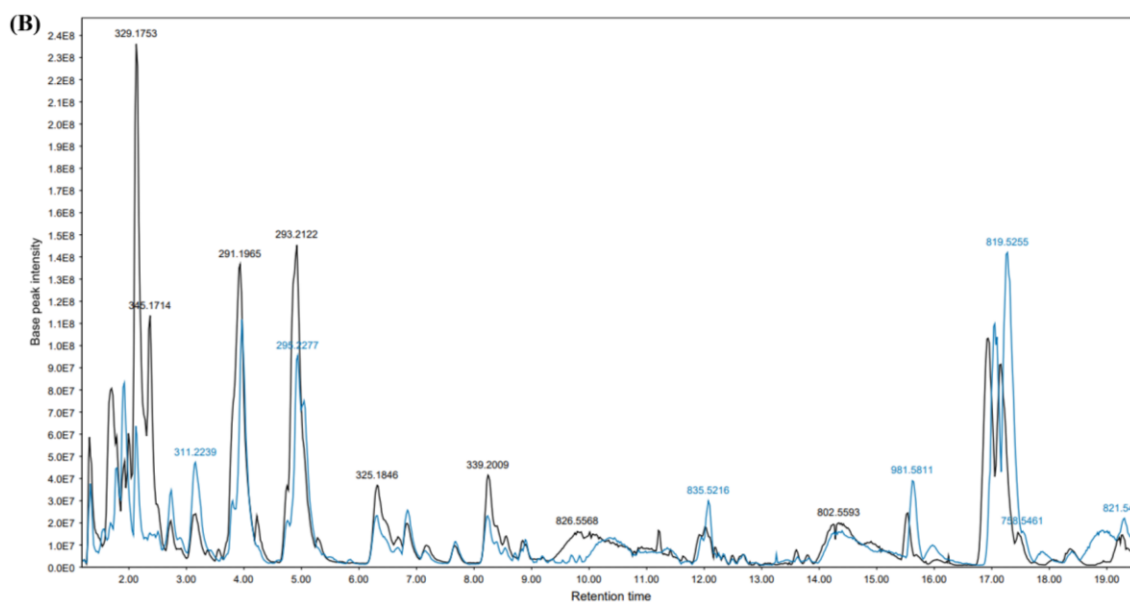
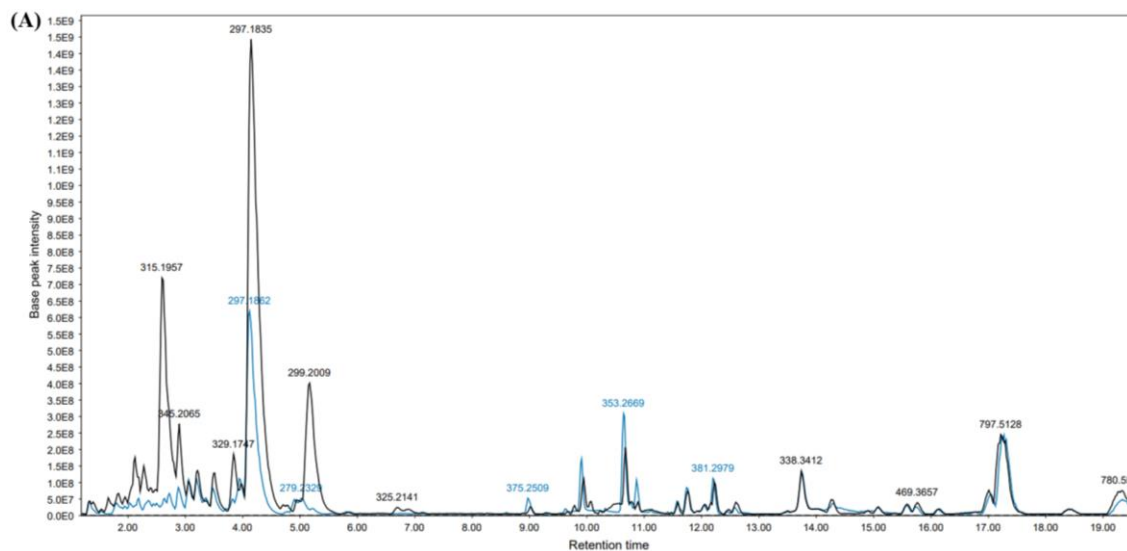
TSUGAWA, H. et al. MS-DIAL: data-independent MS/MS deconvolution for comprehensive metabolome analysis. **Nature Methods**, *s. l.*, v. 12, n. 6, p. 523–526, 4 maio 2015.

- TSUGAWA, H. et al. Hydrogen rearrangement rules: computational MS/MS fragmentation and structure elucidation using MS-FINDER software. **Analytical Chemistry**, *s. l.*, v. 88, n. 16, p. 7946–7958, 16 ago. 2016.
- TYANOVA, S. et al. The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. **Nature Methods**, *s. l.*, v. 13, n. 9, p. 731–740, 27 jun. 2016.
- VEGA-QUIRÓS, N. et al. Single nucleotide polymorphism (SNP) of *Jatropha curcas* associated with the content of phorbol ester. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, *s. l.*, v. 31, n. 2, p. 446–452, 1 jun. 2021.
- VERARDO, G. et al. Rapid and selective screening for toxic phorbol esters in *Jatropha curcas* seed oil using high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, *s. l.*, v. 1597, p. 63–75, 19 jul. 2019.
- VISCHI, M. et al. Study on genetic control for phorbol esters accumulation in *Jatropha curcas* genotypes. **Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology**, *s. l.*, p. 1–10, 25 jun. 2014.
- VISCHI, M.; RARANCIUC, S.; BALDINI, M. Evaluation of genetic diversity between toxic and non toxic *Jatropha curcas* L. accessions using a set of simple sequence repeat (SSR) markers. **African Journal of Biotechnology**, *s. l.*, v. 12, n. 3, p. 265–274, 28 nov. 2015.
- VISWANATH, K. K. et al. Plant lipoxygenases and their role in plant physiology. **Journal of Plant Biology**, *s. l.*, v. 63, n. 2, p. 83–95, 1 abr. 2020.
- WANG, C. J. et al. Ent-abietane and tiglane diterpenoids from the roots of *Euphorbia fischeriana* and their inhibitory effects against *Mycobacterium smegmatis*. **Journal of Natural Products**, *s. l.*, v. 80, n. 5, p. 1248–1254, 26 maio 2017.
- WANG, M. et al. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. **Nature Biotechnology**, *s. l.*, v. 34, n. 8, p. 828–837, 9 ago. 2016.
- WANG, X. C. et al. Jatrothalactam, a novel diterpenoid lactam isolated from *Jatropha curcas*. **Organic Letters**, *s. l.*, v. 11, n. 23, p. 5522–5524, 3 dez. 2009.
- WANG, X. H. et al. Hydroxy-octadecenoic acids instead of phorbol esters are responsible for the *Jatropha curcas* kernel cake's toxicity. **Communications Biology**, *s. l.*, v. 3, n. 1, p. 1–14, 8 maio 2020.
- WOLFENDER, J. L. et al. Accelerating metabolite identification in natural product research: toward an ideal combination of liquid chromatography-high-resolution tandem mass spectrometry and NMR profiling, in silico databases, and chemometrics. **Analytical Chemistry**, *s. l.*, v. 91, n. 1, p. 704–742, 2 jan. 2019.
- XU, J. J. et al. A New tetracyclic diterpene from *Jatropha curcas*. **Helvetica Chimica Acta**, *s. l.*, v. 94, n. 5, p. 842–846, 1 maio 2011.

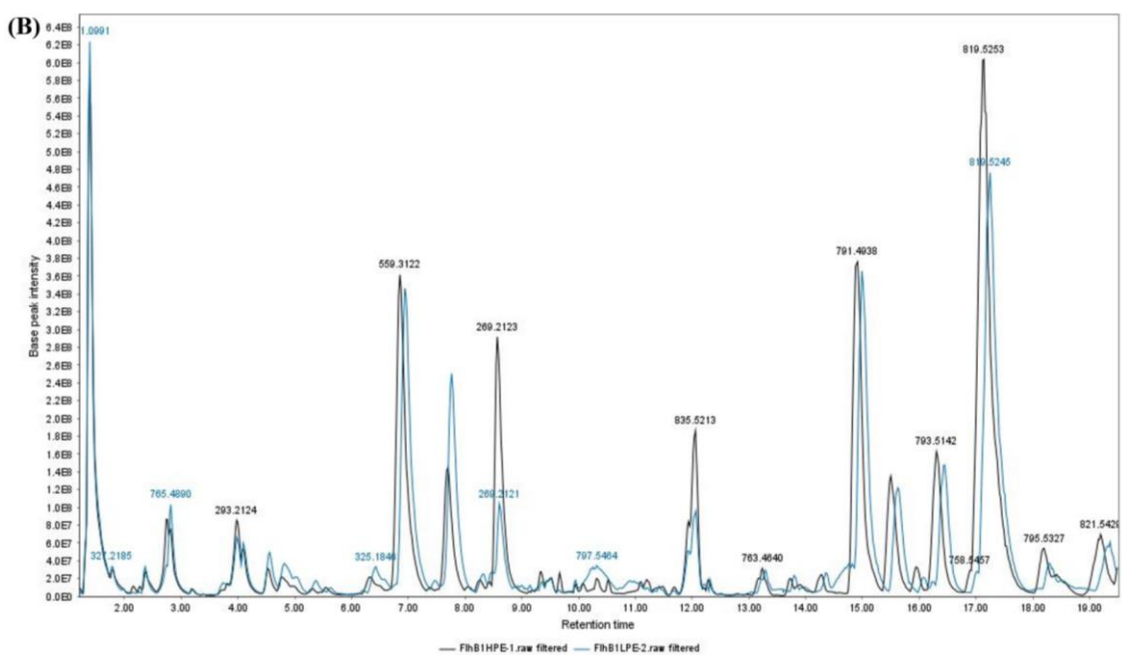
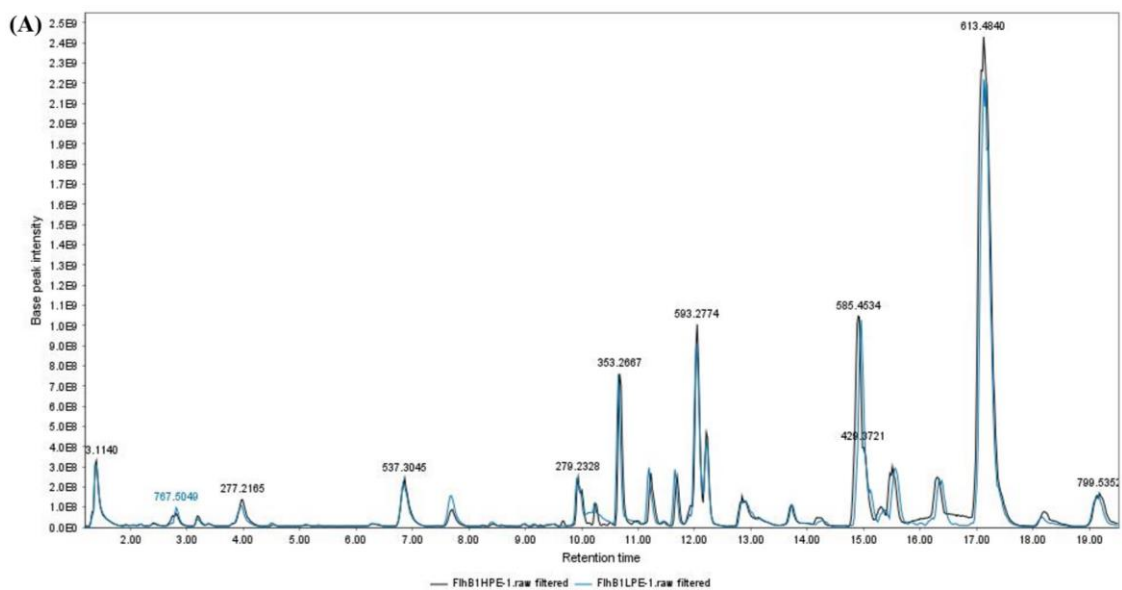
- YAMADA, M. et al. Differential physiological responses and tolerance to potentially toxic elements in biodiesel tree *Jatropha curcas*. **Scientific Reports**, *s. l.*, v. 8, n. 1, p. 1–10, 26 jan. 2018.
- YANG, Y. F. et al. New terpenoids from the roots of *Jatropha curcas*. **Chinese Science Bulletin**, *s. l.*, v. 58, n. 10, p. 1115–1119, 1 abr. 2013.
- YUAN, F.-Y. et al. Tigliane and rhamnofolane glycosides from *Euphorbia wallichii* prevent oxidative stress-induced neuronal death in PC-12 cells. **Bioorganic Chemistry**, *s. l.*, v. 128, p. 106103, 1 nov. 2022.
- YUNPING, B. et al. Light induced degradation of phorbol esters. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, *s. l.*, v. 84, p. 268–273, 1 out. 2012.
- ZÁLEŠÁK, F.; BON, D. J. Y. D.; POSPÍŠIL, J. Lignans and neolignans: plant secondary metabolites as a reservoir of biologically active substances. **Pharmacological Research**, *s. l.*, v. 146, p. 104284, 1 ago. 2019.
- ZERBE, P.; BOHLMANN, J. Plant diterpene synthases: exploring modularity and metabolic diversity for bioengineering. **Trends in Biotechnology**, *s. l.*, v. 33, n. 7, p. 419–428, 1 jul. 2015.
- ZHANG, J. et al. Characterization of phenolic chemotypes, anatomy, and histochemistry of *Zanthoxylum bungeanum* Maxim. **Industrial Crops and Products**, *s. l.*, v. 193, p. 116149, 1 mar. 2023.
- ZHANG, M. et al. Rapid detoxification of *Jatropha curcas* seed cake by hydrogen peroxide oxidation and acute toxicity evaluation of detoxified product. **Agricultural Research**, *s. l.*, v. 3, n. 4, p. 302–307, 19 nov. 2014.
- ZHANG, X. Q. et al. Diterpenoids from the root bark of *Jatropha curcas* and their cytotoxic activities. **Phytochemistry Letters**, *s. l.*, v. 5, n. 4, p. 721–724, 1 dez. 2012.
- ZHAO, W. et al. Integrating metabolomics and transcriptomics to unveil the spatiotemporal distribution of macrocyclic diterpenoids and candidate genes involved in ingenol biosynthesis in the medicinal plant *Euphorbia lathyris* L. **Industrial Crops and Products**, *s. l.*, v. 184, p. 115096, 15 set. 2022.



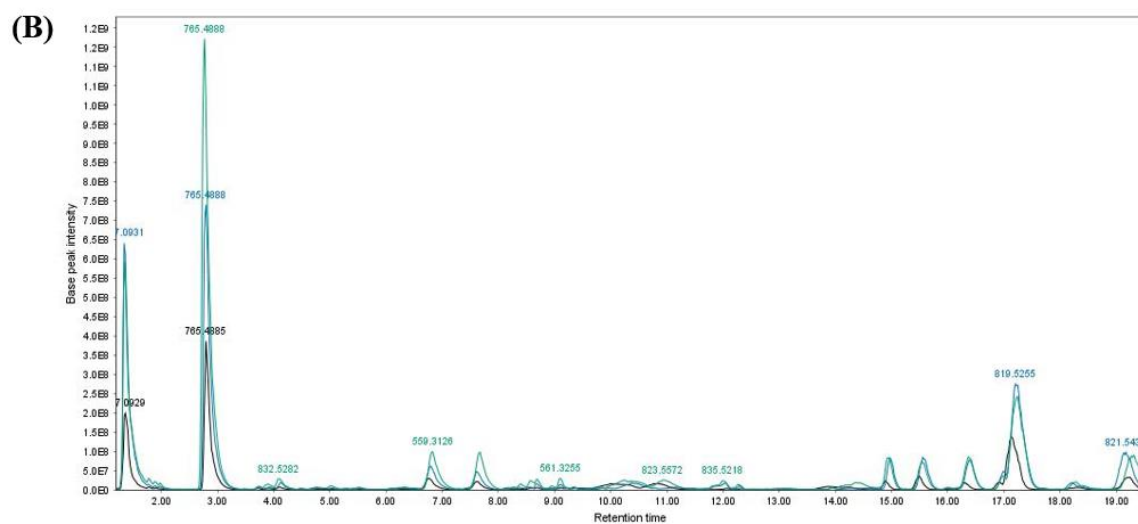
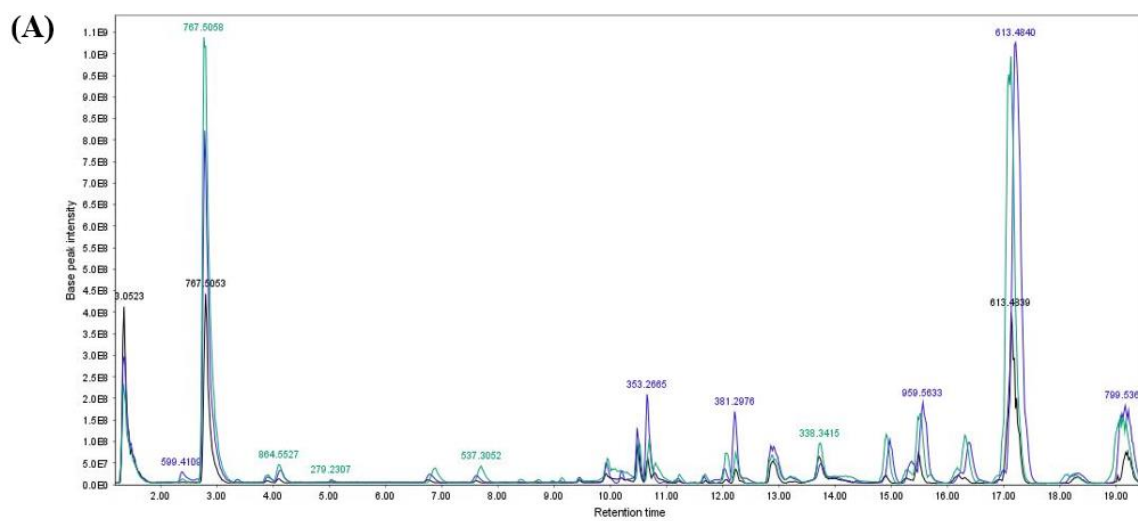
**APÊNDICE A - CROMATOGRAMAS REPRESENTATIVOS DAS AMOSTRAS DE RAIZ - (A) modo de ionização positivo; (B) modo de ionização negativo**



**APÊNDICE B - CROMATOGRAMAS REPRESENTATIVOS DAS AMOSTRAS DE FOLHA - (A) Modo de ionização positivo. (B) Modo de ionização negativo**



**APÊNDICE C - CROMATOGRAMAS REPRESENTATIVOS DAS AMOSTRAS DE PERICARPO - (A) modo de ionização positivo. (B) Modo de ionização negativo**

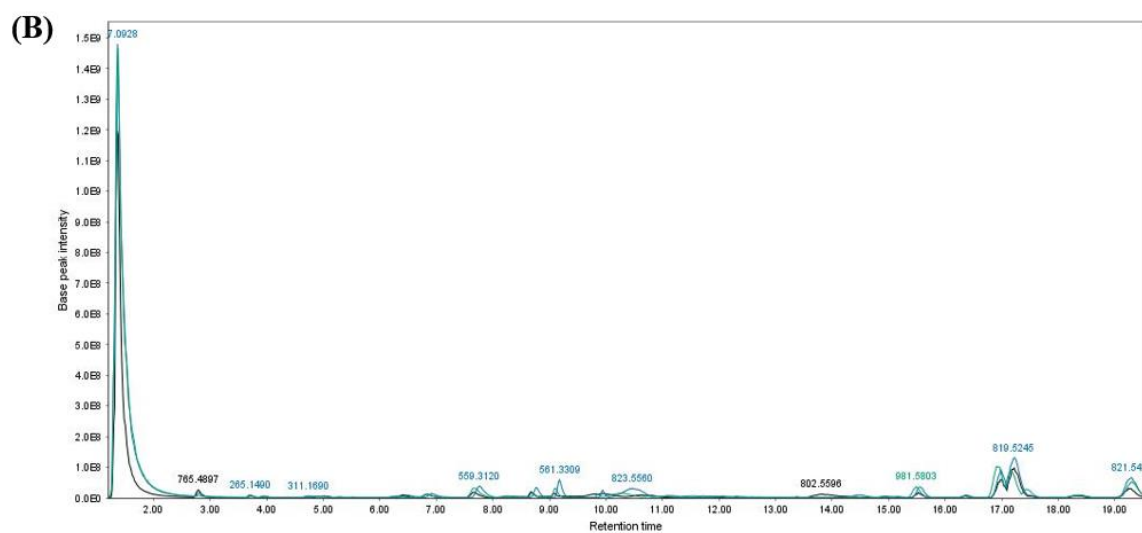
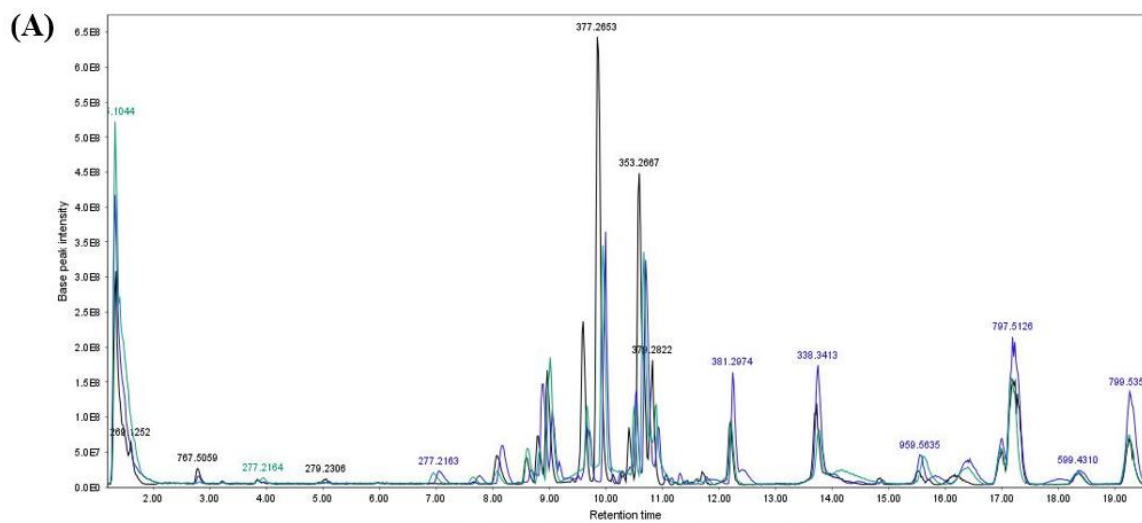


— Estágio E1

— Estágio E2

— Estágio E3

**APÊNDICE D - CROMATOGRAMAS REPRESENTATIVOS DAS AMOSTRAS DA TESTA - (A) Modo de ionização positivo. (B) Modo de ionização negativo**

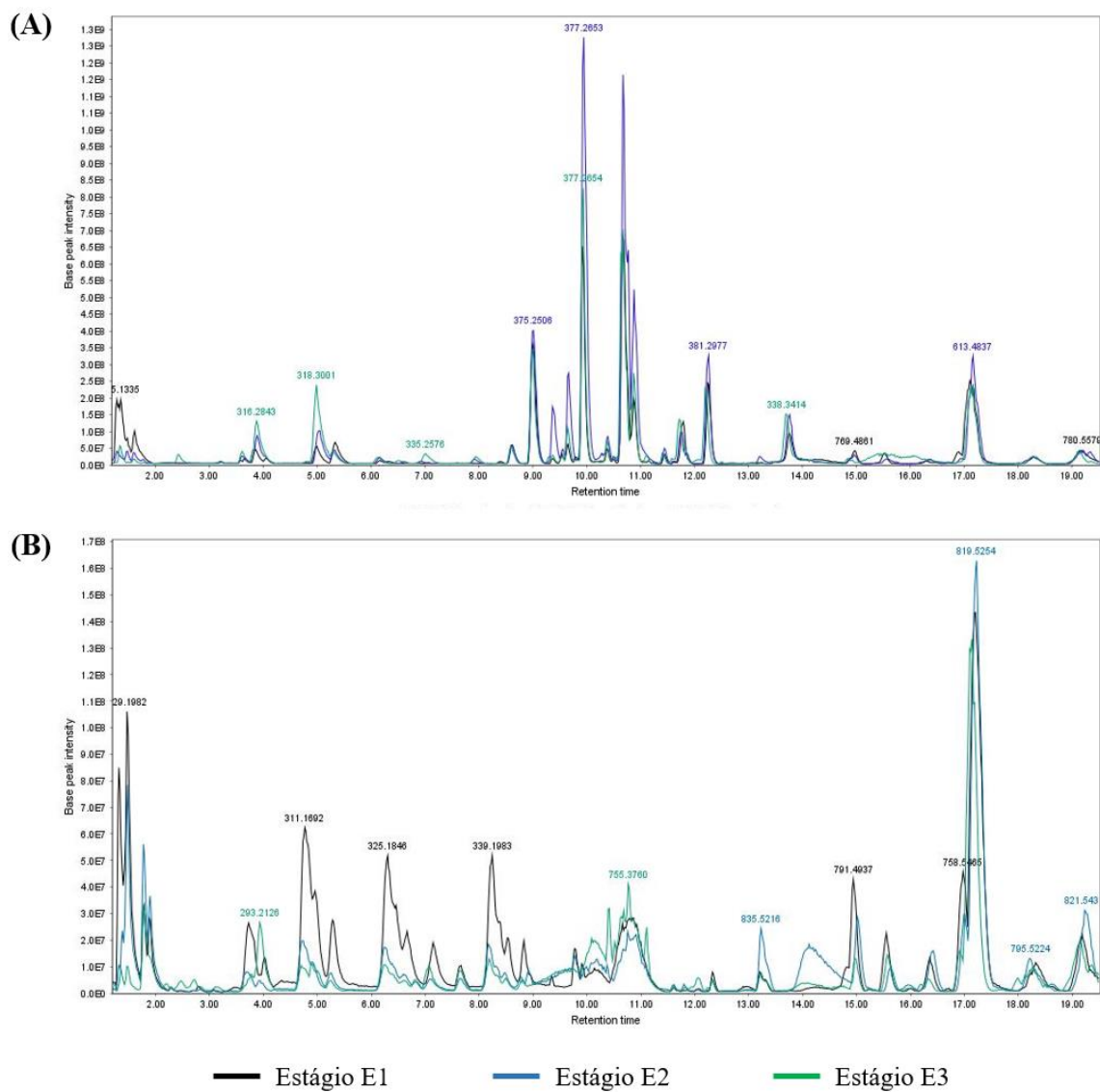


— Estágio E1

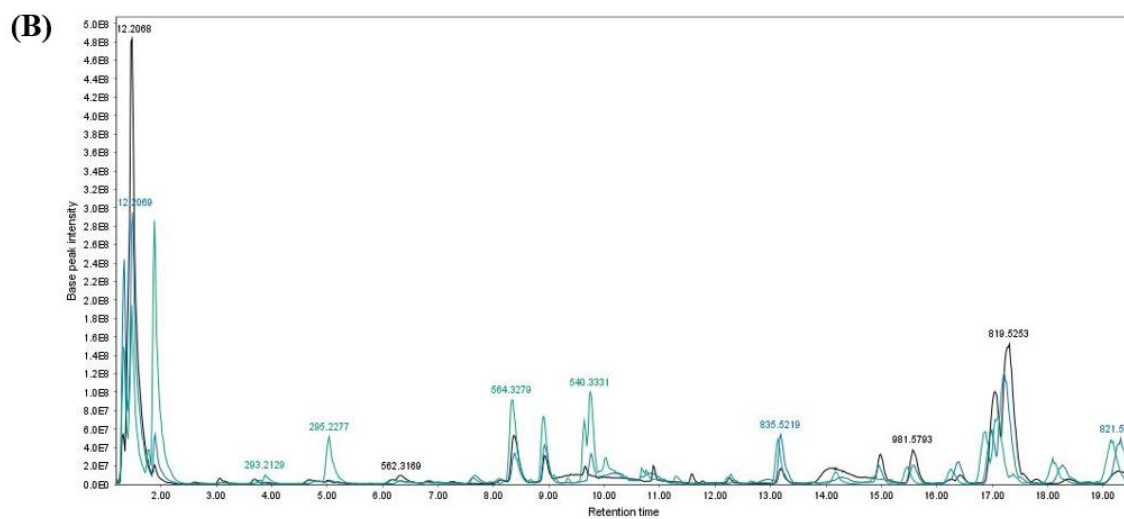
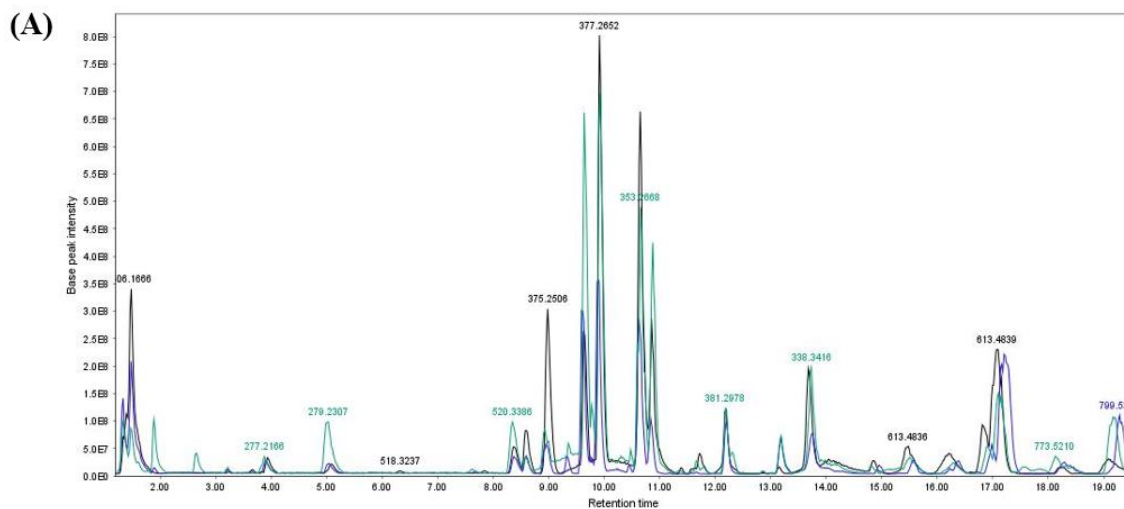
— Estágio E2

— Estágio E3

**APÊNDICE E - CROMATOGRAMAS REPRESENTATIVOS DAS AMOSTRAS DA TEGMA - (A) Modo de ionização positivo. (B) Modo de ionização negativo**



**APÊNDICE F - CROMATOGRAMAS REPRESENTATIVOS DAS AMOSTRAS DO ENDOSPERMA - (A) Modo de ionização positivo (B). Modo de ionização negativo**



— Estágio E1

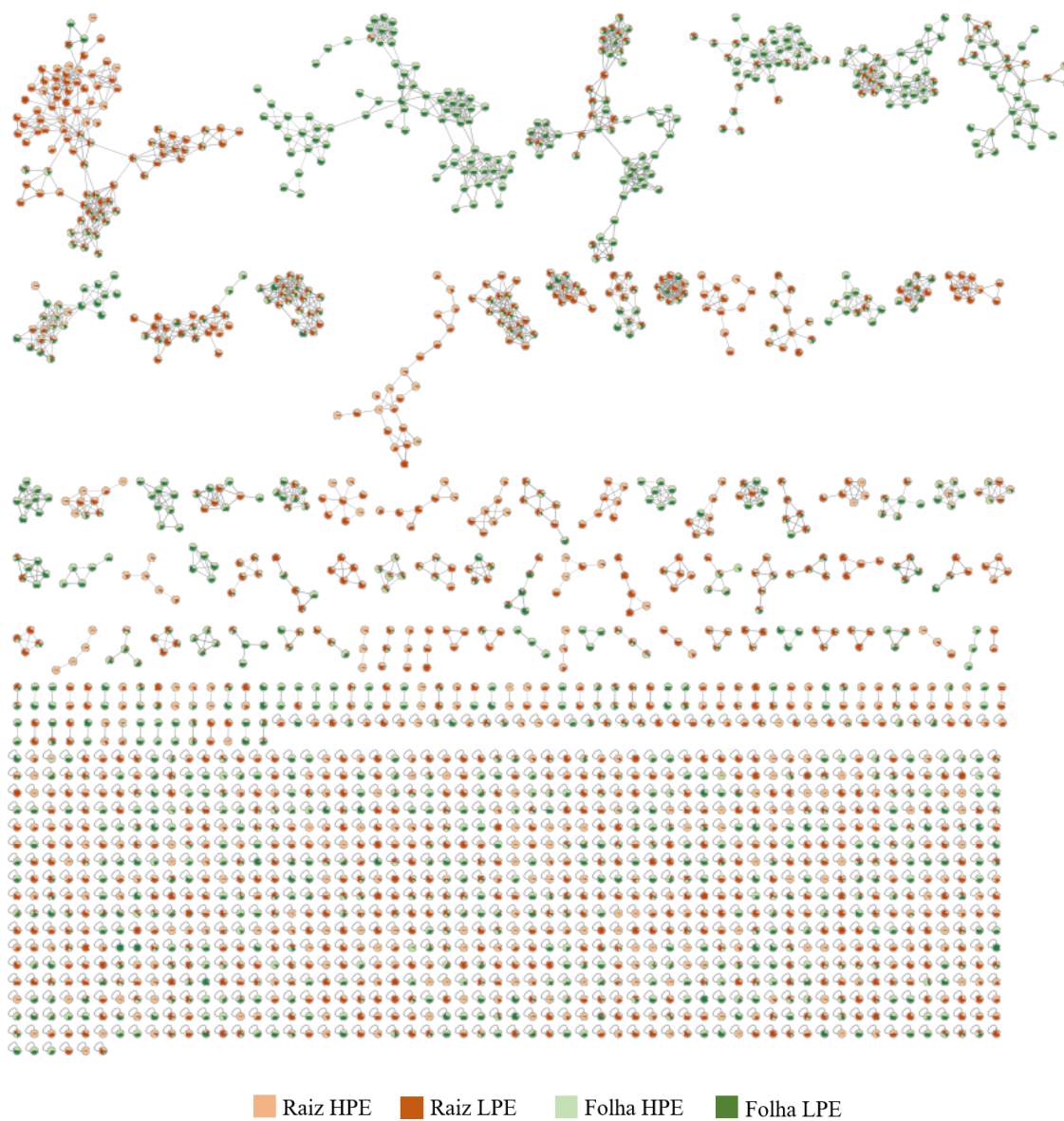
— Estágio E2

— Estágio E3

**APÊNDICE G - LISTA DE TABELAS SUPLEMENTARES**

- Tabela Suplementar I - Lista de *features* totais detectadas em pelo menos duas réplicas biológicas de pelo menos um grupo em extratos de raiz e folha de *J. curcas* usando ionização positiva ..... Em arquivo suplementar
- Tabela Suplementar II - Lista de *features* totais detectadas em pelo menos duas réplicas biológicas de pelo menos um grupo em extratos de raiz e folha de *J. curcas* usando ionização negativa ..... Em arquivo suplementar
- Tabela Suplementar III - Lista de *features* totais detectadas em pelo menos duas réplicas biológicas de pelo menos um grupo em extratos de pericarpo, testa, tegma e endosperma de frutos em desenvolvimento de *J. curcas* usando ionização positiva ..... Em arquivo suplementar
- Tabela Suplementar IV - Lista de *features* totais detectadas em pelo menos duas réplicas biológicas de pelo menos um grupo em extratos de pericarpo, testa, tegma e endosperma de frutos em desenvolvimento de *J. curcas* usando ionização negativa ..... Em arquivo suplementar

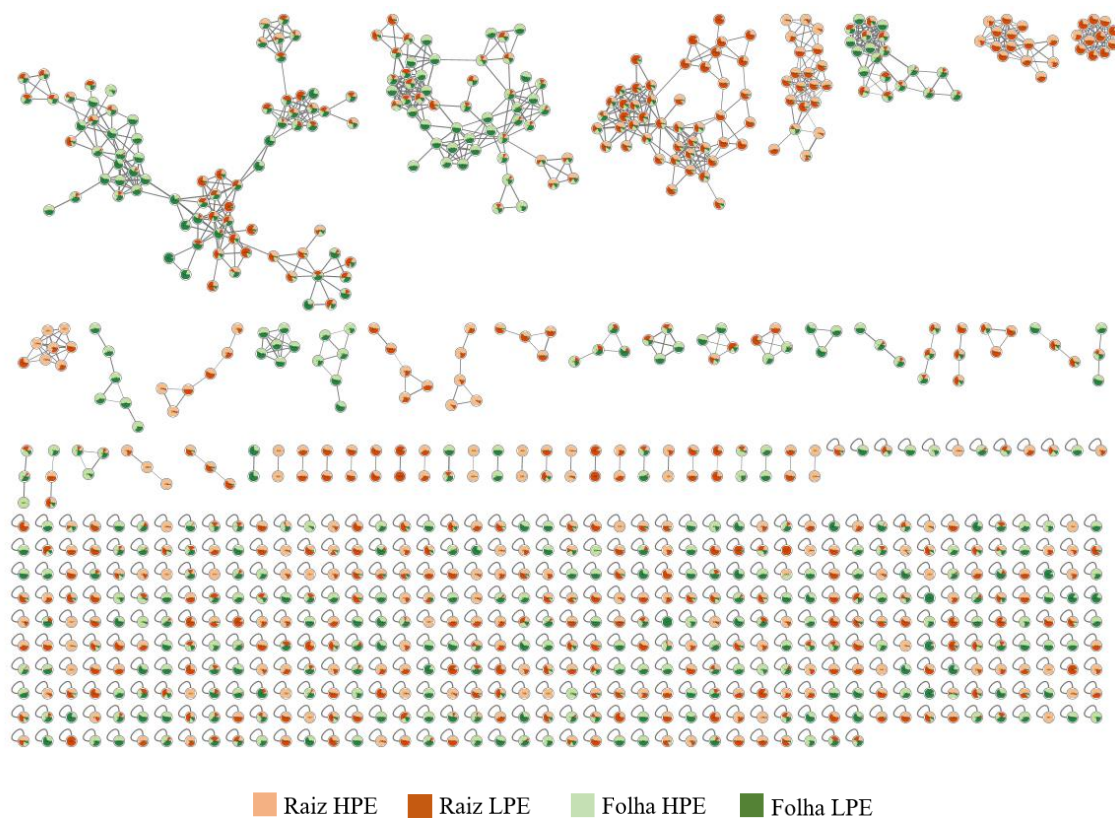
**APÊNDICE H - FBMN DOS DADOS DE FOLHA E RAIZ DETECTADOS SOB IONIZAÇÃO POSITIVA.** O link de acesso desta rede na plataforma do GNPS encontra-se abaixo



[UCSD Computational Mass Spectrometry Website](#)

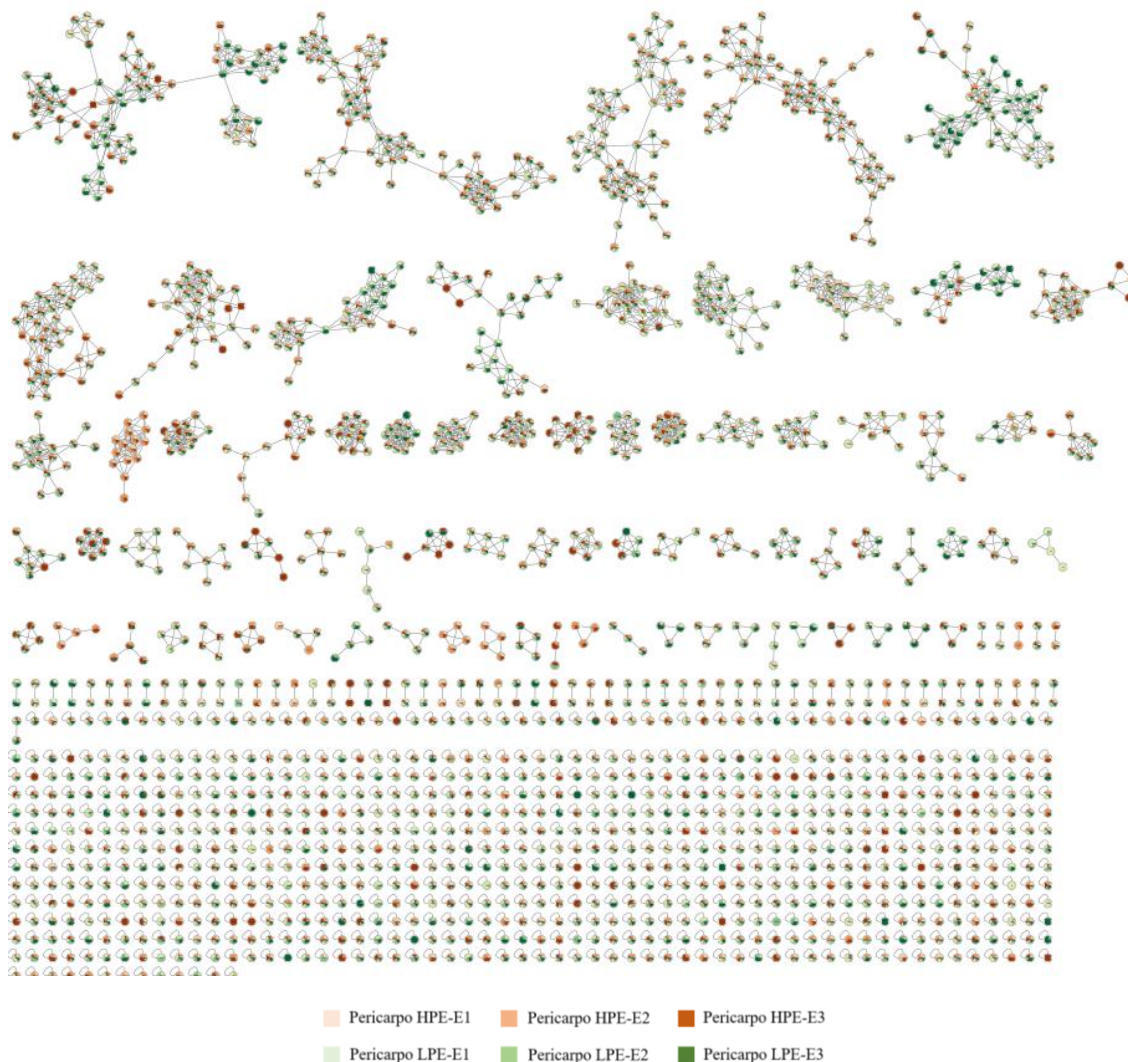


**APÊNDICE I - FBMN DOS DADOS DE FOLHA E RAIZ DETECTADOS SOB IONIZAÇÃO NEGATIVA.** O link de acesso desta rede na plataforma do GNPS encontra-se abaixo



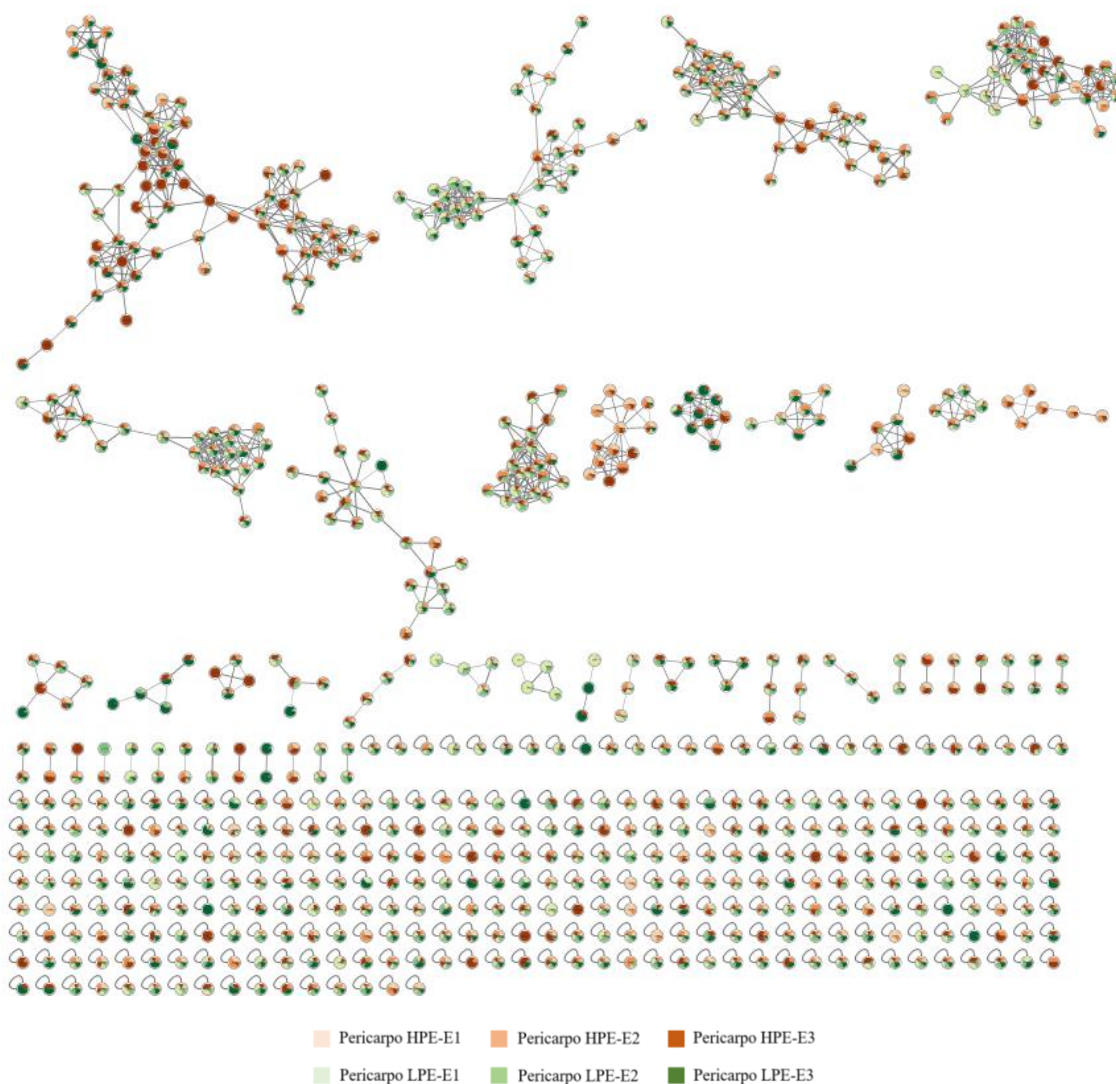
[UCSD Computational Mass Spectrometry Website](#)

**APÊNDICE J - FBMN DOS DADOS DE PERICARPO EM DESENVOLVIMENTO SOB IONIZAÇÃO POSITIVA.** O link de acesso desta rede na plataforma do GNPS encontra-se abaixo



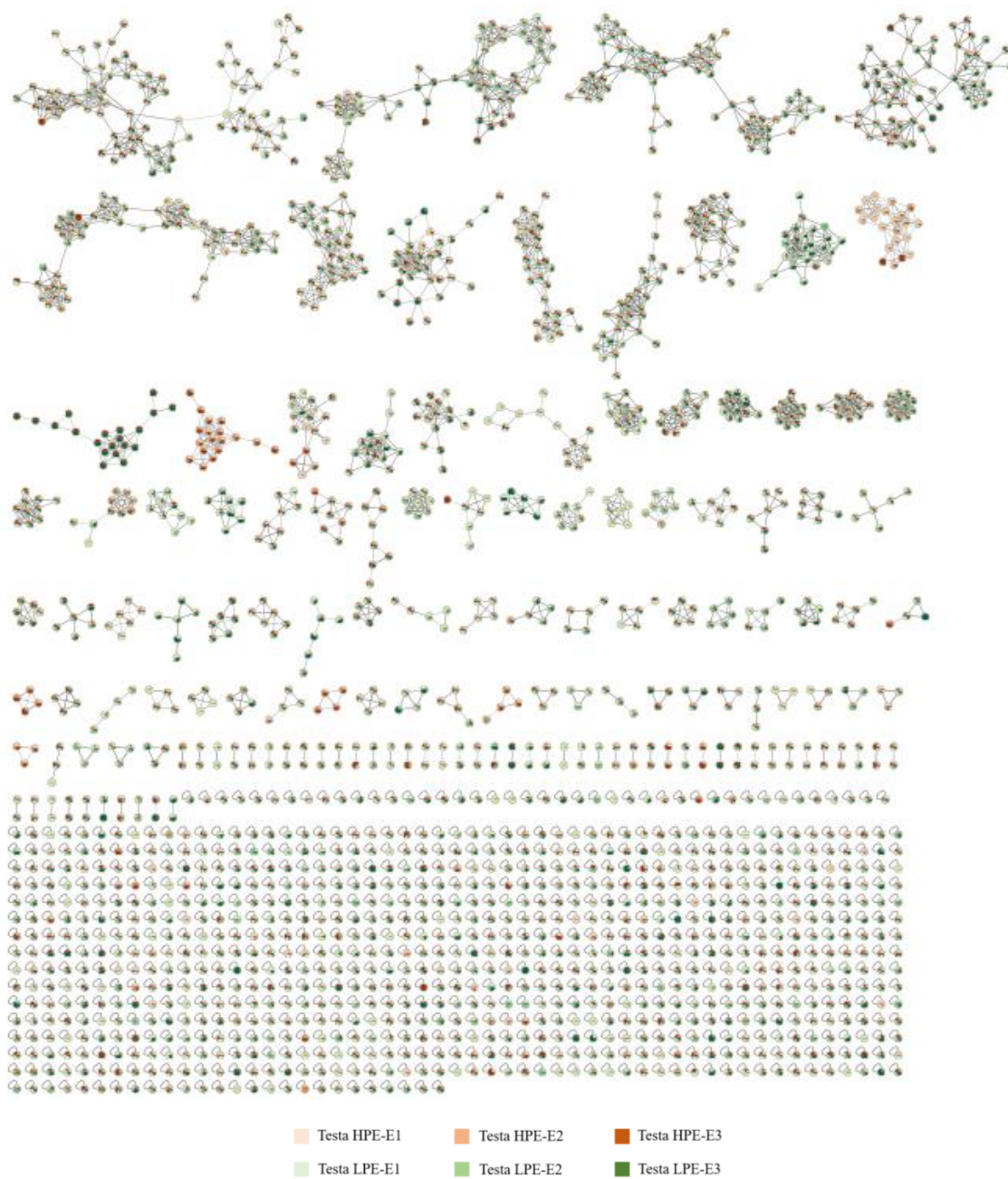
[UCSD Computational Mass Spectrometry Website](https://www.gnps.org/)

**APÊNDICE K - FBMN DOS DADOS DE PERICARPO EM DESENVOLVIMENTO SOB IONIZAÇÃO NEGATIVA. O link de acesso desta rede na plataforma do GNPS encontra-se abaixo**



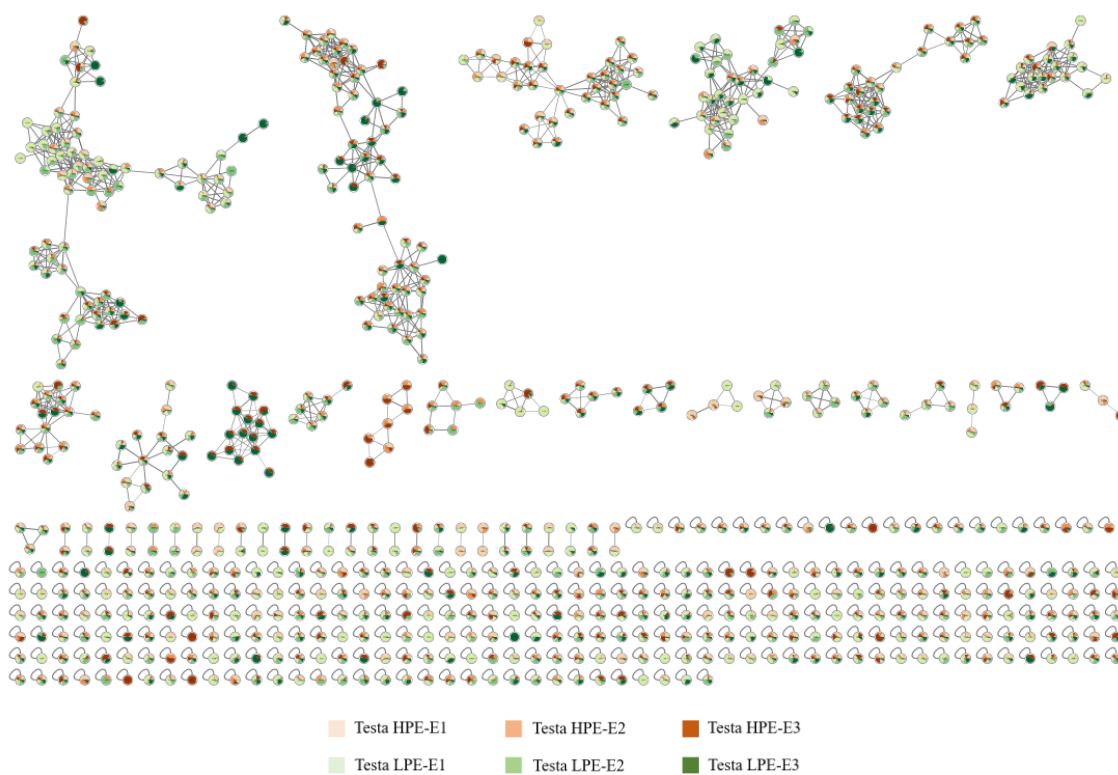
[UCSD Computational Mass Spectrometry Website](#)

**APÊNDICE L - FBMN DOS DADOS DE TESTA EM DESENVOLVIMENTO SOB IONIZAÇÃO POSITIVA.** O link de acesso desta rede na plataforma do GNPS encontra-se abaixo



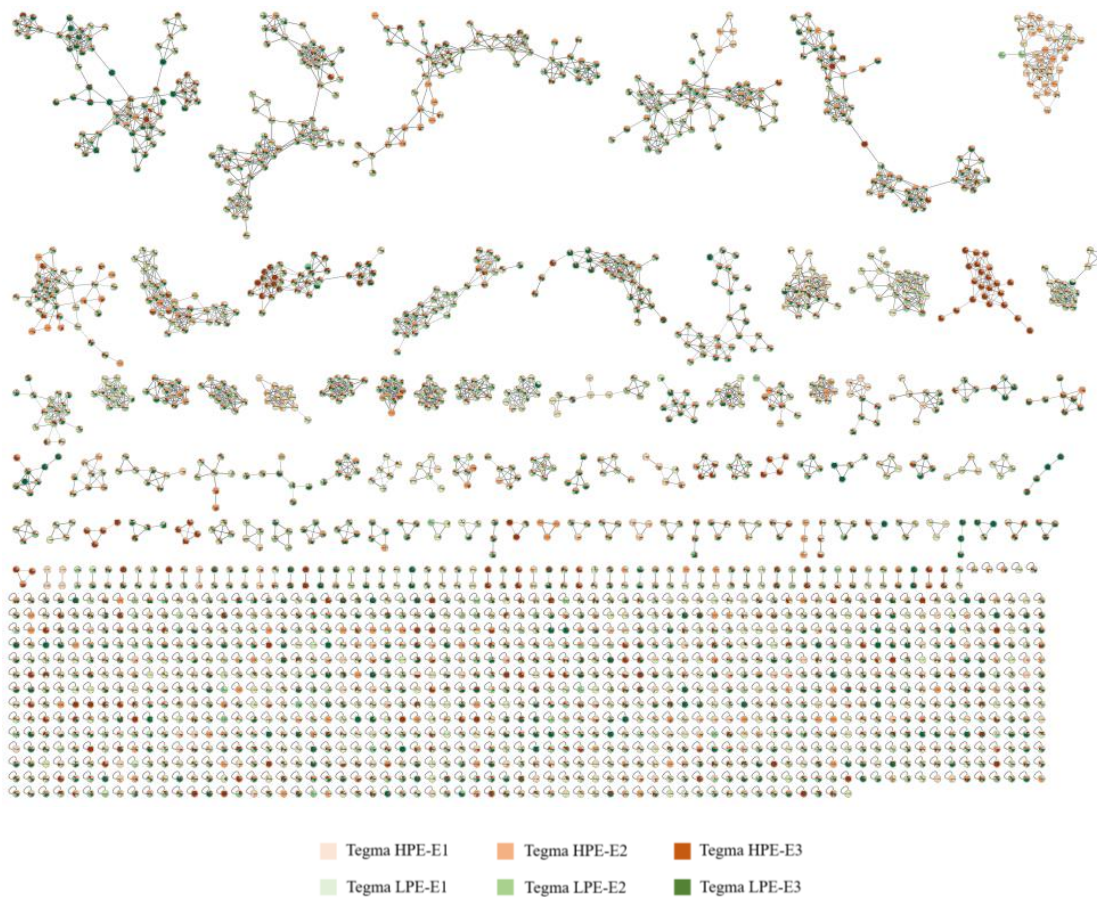
[UCSD Computational Mass Spectrometry Website](https://www.gnps.org/)

**APÊNDICE M - FBMN DOS DADOS DE TESTA EM DESENVOLVIMENTO SOB IONIZAÇÃO NEGATIVA. O link de acesso desta rede na plataforma do GNPS encontra-se abaixo**



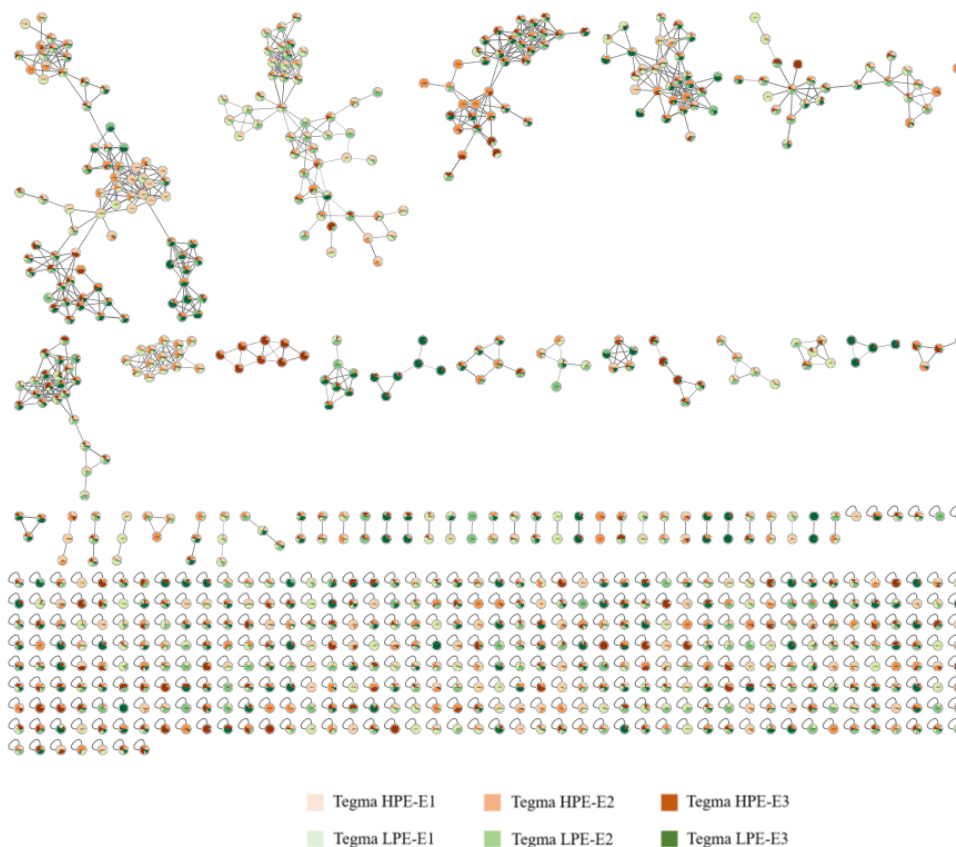
[UCSD Computational Mass Spectrometry Website](#)

**APÊNDICE N - FBMN DOS DADOS DE TEGMA EM DESENVOLVIMENTO SOB IONIZAÇÃO POSITIVA.** O link de acesso desta rede na plataforma do GNPS encontra-se abaixo



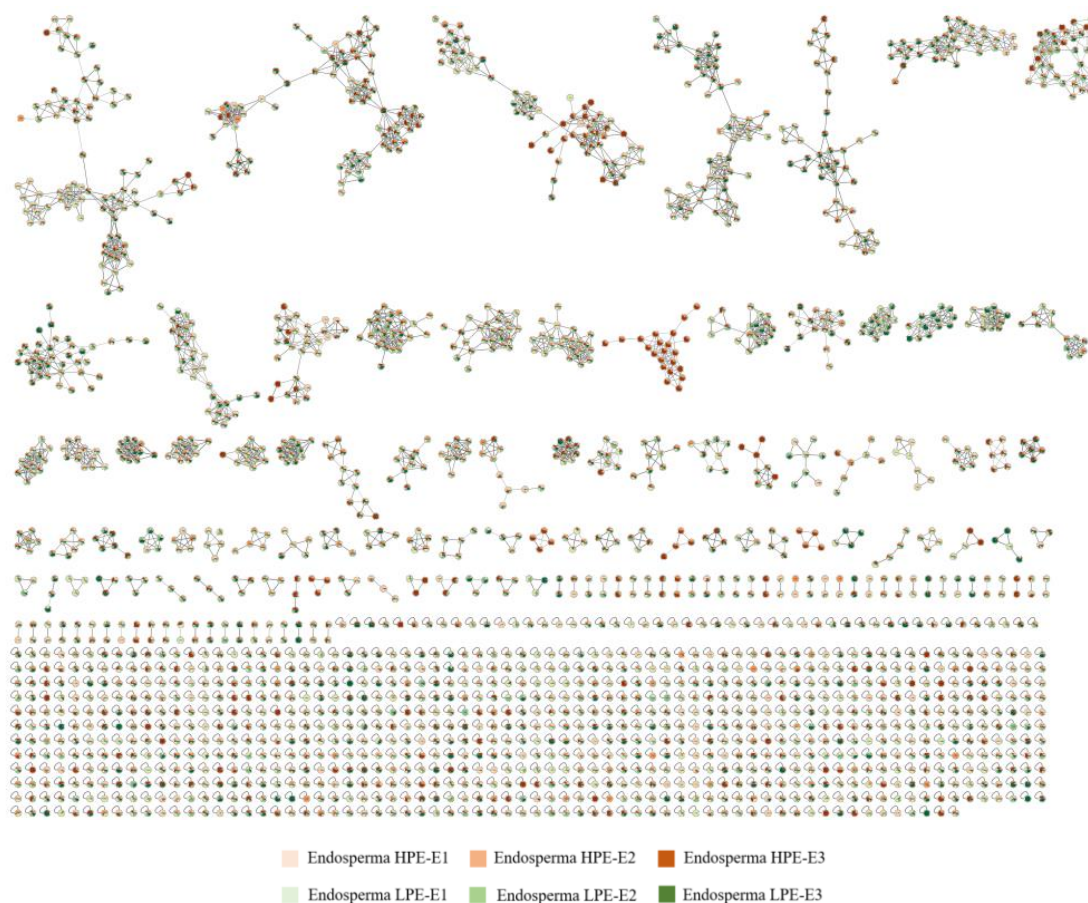
[UCSD Computational Mass Spectrometry Website](#)

**APÊNDICE O - FBMN DOS DADOS DE TEGMA EM DESENVOLVIMENTO SOB IONIZAÇÃO NEGATIVA.** O link de acesso desta rede na plataforma do GNPS encontra-se abaixo



[UCSD Computational Mass Spectrometry Website](#)

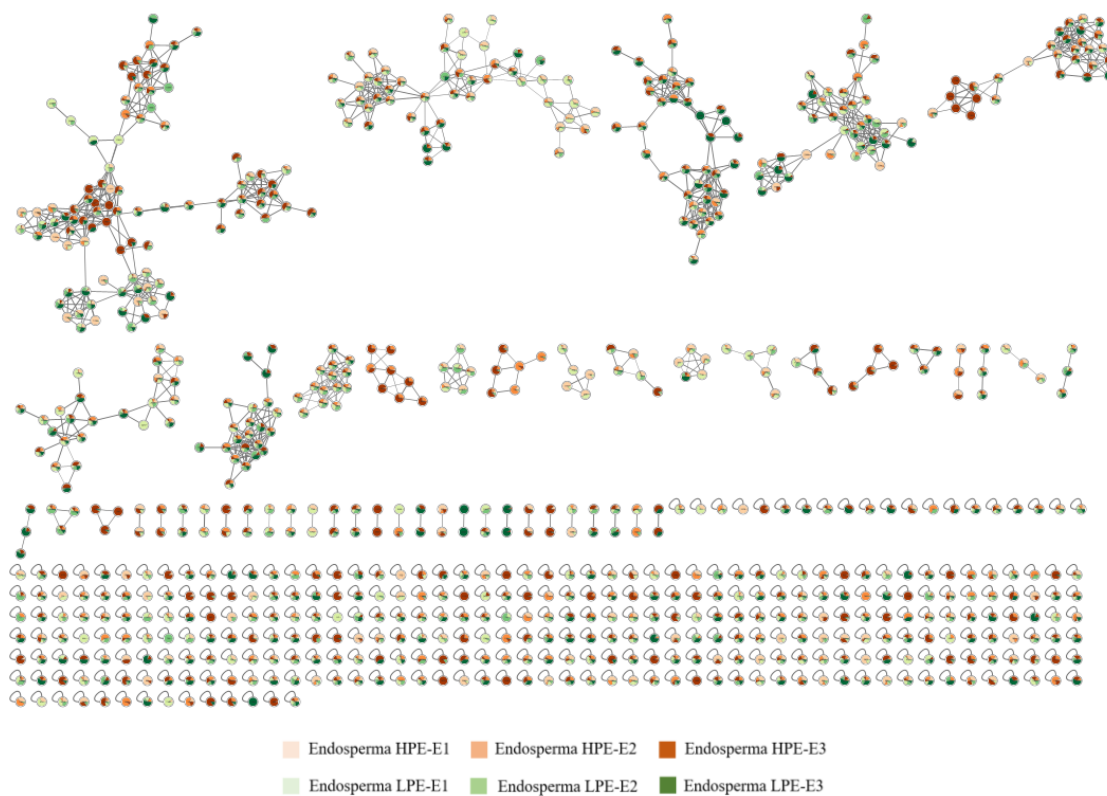
**APÊNDICE P - FBMN DOS DADOS DE ENDOSPERMA EM DESENVOLVIMENTO SOB IONIZAÇÃO POSITIVA.** O link de acesso desta rede na plataforma do GNPS encontra-se abaixo



[UCSD Computational Mass Spectrometry Website](#)



**APÊNDICE Q - FBMN DOS DADOS DE ENDOSPERMA EM DESENVOLVIMENTO SOB IONIZAÇÃO NEGATIVA. O link de acesso desta rede na plataforma do GNPS encontra-se abaixo**



[UCSD Computational Mass Spectrometry Website](#)

**ANEXO A - PROPOSTAS PARA FORMAÇÃO DO DITERPERNÓIDE JOLKINOL C EM ESPÉCIES DE EUPHORBIACEAE. (A)** Proposta da via de biossíntese de Jolkinol C em *J. curcas* segundo King et. al,(2016). **(B)** Proposta da via de biossíntese de Jolkinol C em *Euphorbia latyris* segundo Luo et. al., (2016)

