



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

**ANDREZA RAQUEL BARBOSA DE FARIAS**

**ANÁLISE PROTEÔMICA QUANTITATIVA DE FOLHAS, RAÍZES E SEMENTES  
DE PINHÃO MANSO (*Jatropha curcas* L.) COM TEORES CONTRASTANTES DE  
ÉSTERES DE FORBOL**

**FORTALEZA**

**2019**

ANDREZA RAQUEL BARBOSA DE FARIAS

ANÁLISE PROTEÔMICA QUANTITATIVA DE FOLHAS, RAÍZES E SEMENTES DE  
PINHÃO MANSO (*Jatropha curcas* L.) COM TEORES CONTRASTANTES DE ÉSTERES  
DE FORBOL

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Agronomia/Fitotecnia. Área de concentração: Proteômica de Plantas.

Orientador: Professor Francisco A. P. Campos.  
Coorientador: Professor Fábio César S. Nogueira.

FORTALEZA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

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

---

- F238a Farias, Andreza Raquel Barbosa de.  
Análise Proteômica quantitativa de folhas, raízes e sementes de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) com teores contrastantes de ésteres de forbol / Andreza Raquel Barbosa de Farias. – 2019.  
123 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Fitotecnia), Fortaleza, 2019.  
Orientação: Prof. Dr. Francisco de Assis de Paiva Campos .  
Coorientação: Prof. Dr. Fábio César Sousa Nogueira .
1. Biossíntese. 2. Casbeno sintase. 3. Sementes oleaginosas . 4. Proteômica. 5. Terpenóides. I. Título.  
CDD 630
-

ANDREZA RAQUEL BARBOSA DE FARIAS

ANÁLISE PROTEÔMICA QUANTITATIVA DE FOLHAS, RAÍZES E SEMENTES DE  
PINHÃO MANSO (*Jatropha curcas* L.) COM TEORES CONTRASTANTES DE ÉSTERES  
DE FORBOL

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Agronomia/Fitotecnia. Área de concentração: Proteômica de Plantas.

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_.

BANCA EXAMINADORA

---

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

---

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

---

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

---

Emanoella Lima Soares  
University of Liège, Belgium

---

Professora Rosilene Oliveira Mesquita  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Aqueles que me amam incondicionalmente e que se fazem presentes em cada conquista, me apoiando e me incentivando: **Luís Claudio de Farias, Maria Salete Barbosa de Farias e Andriele Renata Barbosa de Farias**. Minha família.

## AGRADECIMENTOS

A **Deus** todo poderoso e a **Nossa Senhora**, pela sabedoria e pela paciência na realização deste trabalho, pois foram nas mãos deles que em oração entreguei cada etapa e foram eles que me deram forças para realizá-las.

Aos meus pais e a minha irmã, (**Luís Claudio de Farias; Maria Salete Barbosa de Farias** e **Andriele Renata Barbosa de Farias**). Ao meu pai, por ser meu maior incentivador nos estudos; a minha mãe, por ser meu exemplo; a minha, irmã pelo apoio.

A toda a minha família, pelo apoio e amor a mim dedicados, em especial a minha segunda mãe (**Tia Kika**); minha afilhada, **Júlia**, e meu primo, irmão e grande amor (**Filho**).

A todos os educadores que passaram por todas as etapas da minha formação, contribuindo de alguma forma, sem citar nomes, mas com a mente cheia de lembranças e o coração cheio de saudades. Minha eterna gratidão.

Ao **Professor Francisco de Assis de Paiva Campos** (Prof. Chico Campos), pela oportunidade e pela confiança na realização deste trabalho. Por ter aberto as portas de seu laboratório e me proporcionado a experiência única de aperfeiçoamento em análises proteômicas. Cresci profissionalmente em seu laboratório e o agradeço imensamente por isso.

Ao **Professor Fábio César Sousa Nogueira**, pela paciência, disponibilidade de tempo, incentivo e confiança com a qual fui tão bem recepcionada em sua instituição e em seu laboratório. Seus conselhos e exemplo serão levados para a vida.

Ao **Professor Gilberto Barbosa Domont**, pela acolhida em seu laboratório, as boas conversas em sua sala e seus conselhos acompanhados de experiência de vida. O agradeço, principalmente, por seu amor contagiante pela ciência.

Aos amigos pesquisadores, **Dra. Emanoella Lima Soares, Dr. Mohibullah Shah, Dra. Magda Laiara Bezerra de Lima** e **Dr. Fabiano de Moura Teixeira**, por terem me apresentado à literatura, às técnicas e me ajudado no desenvolvimento deste trabalho, em especial a Manu, por sua ajuda em todo processo, desde a parte experimental até a escrita. Meu muito obrigada.

Aos amigos do **Laboratório de Biologia Molecular de Plantas, Arlene, Camila, Claudiane, Daniel, Domingos João, Roberto, Moab, Vitor**, todos contribuíram de alguma forma na realização deste trabalho. Agradeço especialmente aos doutores, **Fabiano de Moura Teixeira** e **Magda Laiara Bezerra de Lima**, por serem amigos, conselheiros, incentivadores e ombros amigos em todas as horas.

Aos meus amigos da **Unidade Proteômica, Beatriz, Clarissa, Diogo, Érika, Gabriel, Ísis, Igor, Larissa, Lidiane, Luis, Mariana Queiroz, Mariana, Michele, Natália, Professor Magno Junqueira, Rafael, Renata, Vinícius e Yara**. Vocês foram muito mais que companheiros de laboratório, foram uma segunda família, amigos de todas as horas. Obrigada.

As meninas do apartamento 3 (304), (**Jéssica, Jenyffer, Magda, Viviane, Moacília, Paloma e Tati**), pela paciência durante o convívio e pela amizade.

Aos amigos de sempre do Laboratório de Genética e Biotecnologia Microbiana, na pessoa da **Professora Júlia K. Sobral**, a minha maior incentivadora e exemplo acadêmico.

A **Júnior Mário Baltazar de Oliveira**, pela força, incentivo e dedicação. Por acreditar em mim quando nem eu mesma acreditei. Você foi indispensável na realização deste trabalho. Meu muito obrigada.

Ao amigo da graduação para a vida, **João Alves**, pela amizade, apoio, conversas, boas risadas, companheirismo de sempre e por, nessa reta final, ter sido um suporte, ajudando-me a superar os contratempos que apareceram. Obrigada.

As minhas queridas amigas, **Dra. Magda Laiara e Dra. Tatiana Silva**, por terem sido minha família, me apoiando, me aconselhando e me ajudando a não desistir. Devo muito a vocês. **Tati**, obrigada por me incentivar a fazer a seleção, por me convencer de que eu era capaz, e pelas orações o tempo inteiro. **Magda**, obrigada pelo exemplo de garra e força, pelos incentivos em todo percurso. Eu amo vocês!

As minhas amigas de sempre, independente da distância, **Andreza, Analu, Ângela, Cristiane, Francielly, Jéssica, Lianna, Lucineide, Marília, Mércia e Raiana**, pela amizade incondicional, por estarem comigo de alguma forma nos bons e maus momentos. Obrigada por tudo!

As amigas que a Fitotecnia me deu, **Ariana, Bruna e Caris**, pelo apoio, por partilhar momentos dessa jornada e, principalmente, pela amizade. Obrigada, meninas!

A **Yangye He (何杨焯)**, por ter sido minha família durante minha estadia no Rio de Janeiro e ter se tornado uma verdadeira irmã. Pela troca de experiências, pela amizade, ajuda e companheirismo. 谢谢.

A **Yara Martins (Yarinha) e Michele Martins (Mih)**, amigas, confidentes, ouvidos e ombros amigos, aquelas dispostas a tudo para me ajudar, me fazer rir e às vezes chorar. Aquelas que me apresentaram ao fundão e me deram broncas (desnecessárias), que mesmo com tão pouca idade, mostraram o quanto são maduras e responsáveis. Sou fã de vocês! Obrigada por tornarem a distância de casa e da família suportável. Amo vocês!

A minha querida amiga, **Luciana Herculano** por todo companheirismo e apoio nesta reta final, Obrigada Lu.

Aos amigos, **Domingos** (Dominguinhos), o chato mais legal e prestativo que conheço; a **Moab** (Moabito), aquele cuja fé pode mover montanhas e que está sempre disposto a ajudar e a **Roberto** (Betinho), por sempre saber algo sobre tudo. Meninos, obrigada pela força nos experimentos, pelos fins de semana na bancada, pela ajuda nas análises e na parte escrita. Obrigada por tudo!

Ao **Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular** da Universidade Federal do Ceará, seus técnicos, funcionários e professores, pelo suporte durante a realização deste trabalho.

A Embrapa Agroenergia, localizada em Brasília – DF, na pessoa no **Dr. Bruno Galveas Laviola**, por ter nos cedido as estacas para reprodução das plantas de baixo teor de ésteres de forbol.

Ao Laboratório de Proteômica (LabProt) e seu responsável, **Prof. Fábio César Sousa Nogueira**, aos Doutores, **Joseph Evaristo**, **Geyza Caprini** e ao técnico **Gabriel Reis**, pela disponibilidade dos equipamentos para realização das análises proteômicas, bem como toda ajuda necessária para realização dos mesmos.

Ao **Núcleo de Ensino e Pesquisa de Agricultura Urbana (Nepau)**, na pessoa do **Prof. Antônio Marcos Esmeraldo Bezerra**, por ceder a área para plantio das plantas de *J. curcas* e ao seu **Mazinho**, pela ajuda na implantação e manejo da área.

Ao **Laboratório de Fisiologia Vegetal**, na pessoa do **Prof. Enéas Gomes Filho**, por ceder espaço em sua casa de vegetação para plantio das sementes.

Ao Laboratório de Metabolismo e Estresse de Plantas, ao seu responsável Prof. **Joaquim Albenísio Gomes da Silveira**, por ceder à casa de vegetação para realização do cultivo hidropônico e a **Dra. Ana Karla**, pelo auxílio na montagem e manejo do mesmo.

A todos os responsáveis e funcionários da **Fazenda Vale do Curu**, por todo suporte durante as coletas dos frutos de *J. curcas*.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia** da Universidade Federal do Ceará, seus coordenadores, professores, técnicos e funcionários, pela oportunidade na realização deste trabalho.

A **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pela concessão da bolsa durante todo o doutorado.

Meu muito **OBRIGADA** a TODOS!

**“E guardemos a certeza pelas próprias  
dificuldades já superadas que não há mal  
que dure para sempre”**

Chico Xavier

## RESUMO

O pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) merece destaque dentre as espécies oleaginosas potenciais para produção de biocombustíveis. A planta apresenta alto teor de óleo em suas sementes, e o resíduo gerado a partir da extração do óleo, sua torta, possui características que podem aumentar o valor econômico da cultura. No entanto, o uso da torta é limitado devido a compostos tóxicos, os ésteres de forbol (EF). Apesar de bem definida a toxicidade e suas desvantagens, o melhoramento da espécie, a fim de reduzir esses compostos, ainda não é eficiente devido à falta de informações sobre sua biossíntese. Este trabalho objetivou o estudo proteômico de endosperma, folhas e raízes de pinhão manso, de dois acessos com teores contrastantes de EF, visando identificar proteínas envolvidas na biossíntese dos EF e estabelecer o tecido onde o mesmo é sintetizado. Para tanto, endosperma, folhas e raízes de pinhão manso tiveram suas proteínas extraídas em tampão piridina/SDS, passaram por hidrólise enzimática fazendo uso de tripsina, e os peptídeos obtidos após a digestão foram submetidas a análises quantitativas por espectrometria de massas. Utilizaram-se a marcação isobárica com o reagente iTRAQ e estratégias livres de marcação. A análise proteômica dos três tecidos resultou na identificação de um total de 5068 proteínas. Destas, apenas 283 são compartilhadas entre os três tecidos, o que corresponde a 5,6% do total de identificações; 115 proteínas são exclusivas de endosperma, 403 exclusivas de folha e 3091 proteínas apareceram exclusivamente em raízes, considerando os parâmetros estabelecidos neste estudo. As vias metabólicas de interesse foram analisadas, a biossíntese de lipídeos em endosperma revelou proteínas como oleosinas e lipases em ambos os acessos, e apesar de algumas proteínas relacionadas ao armazenamento de óleo terem sido identificadas apenas no acesso de alto teor de ésteres de forbol, a relação entre a toxicidade e a produção de óleo não pode ser bem estabelecida sem testes adicionais. Nas folhas, as proteínas relacionadas a biossíntese de proteínas foram as mais abundantes, seguidas daquelas relacionadas a fotossíntese, com destaque para o acesso de alto teor de ésteres de forbol. Quando verificada a síntese de terpenos, a maior parte das proteínas identificadas estava localizada nas raízes de pinhão manso, dentre elas identificamos proteínas como o geranyl geranyl difosfato sintase e a enzima casbeno sintase, ambas envolvidas na biossíntese de precursores de diterpenos, ressaltando que a casbeno sintase não havia sido verificada em análises proteômicas nesta espécie até o momento. Ainda nas raízes também foram identificados transportadores de terpenos. Os resultados obtidos nesse estudo sugerem que os ésteres de forbol apesar de acumulados nas sementes de pinhão manso, são sintetizados em suas

raízes e transportados para as demais partes da planta. Sendo assim, tais resultados servem como subsídios para estudos posteriores que visem à redução dos componentes tóxicos na cultura, o que garantirá o melhor aproveitamento de seu potencial.

**Palavras-chave:** Biossíntese. Casbeno sintase. Sementes oleaginosas. Proteômica. Terpenóides.

## ABSTRACT

*Jatropha curcas* L. is worth mentioning among the oleaginous species potential for the production of biofuels. The plant presents high oil content in its seeds, and the residue generated from the extraction of the oil, its pie, has characteristics that can increase the economic value of the crop. However, the pie use is limited due to toxic compounds, phorbol esters (PE). Although the toxicity and its disadvantages are well defined, the breeding of the species in order to reduce these compounds is still not efficient due to the lack of information about its biosynthesis. This work aimed at the proteomic study of endosperm, leaves and roots of *Jatropha*, of two accessions with contrasting levels of PE, in order to identify proteins involved in the biosynthesis of such compounds and establish the tissue where it is synthesized. For this purpose, endosperm, leaves and roots of physic nut had their proteins extracted in pyridine / SDS buffer, underwent enzymatic trypsin hydrolysis, and the peptides obtained after the digestion were submitted to quantitative analysis by mass spectrometry using isobaric labeling with the iTRAQ reagent as well as free labeling strategies. Proteomic analysis of the three tissues resulted in the identification of a total of 5068 proteins. Of these, only 283 are shared between the three tissues, corresponding to 5.6% of the total identifications; 115 proteins are endosperm exclusive, 403 leaf exclusive and 3091 proteins appeared exclusively in roots, considering the parameters established in this study. Metabolic pathways of interest were analyzed, liposome biosynthesis in endosperm revealed proteins such as oleosins and lipases in both accesses, and although some oil storage related proteins were only identified in the high-content access of phorbol esters, the correlation between toxicity and oil production can not be well established without additional testing. In the leaves the proteins related to protein biosynthesis were the most abundant, followed by those related to photosynthesis, with emphasis on the high content of phorbol esters. When the synthesis of terpenes was verified, most of the identified proteins were located in the *Jatropha* roots, among them we identified proteins such as geranyl geranyl diphosphate synthase and the casbene synthase (CS), both involved in the biosynthesis of diterpene precursors, emphasizing that the CS has not been verified in proteomic analyzes in this species until the moment. Also, in the roots, terpene transporters were also identified. The results obtained in this study suggest that the phorbol esters, although accumulated in *Jatropha* seeds, are synthesized in their roots and transported to the other parts of the plant. Therefore, these results serve as subsidies for further studies, aimed at reducing the toxic components in the crop, which guarantees the best use of its potential.

**Keywords:** Biosynthesis. Casbene synthase. Oil seeds. Proteomics. Terpenoids.

## LISTA DE FIGURAS

|          |   |    |
|----------|---|----|
| Figura 1 | - Estruturas químicas dos ésteres de forbol encontrados no óleo de sementes de <i>J. curcas</i> (Adaptado de Gomes <i>et al.</i> , 2018 e Haas <i>et al.</i> , 2002.....  | 35 |
| Figura 2 | - Via dos produtos formados a partir do geranyl geranyl difosfato e possíveis enzimas envolvidas (Adaptado de King <i>et al.</i> , 2016; Luo, <i>et al.</i> , 2016; Nakano <i>et al.</i> , 2012).....   | 36 |
| Figura 3 | - Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida com SDS das replicatas biológicas dos diferentes tecidos de <i>Jatropha curcas</i> com alto teor de ésteres de forbol (ATEF) e baixo teor de ésteres de forbol (BTEF). (A), (B) e (C) correspondem a endosperma, folhas e raízes respectivamente, foram aplicados 20 µg de proteínas em cada poço.....   | 54 |
| Figura 4 | - Cromatogramas obtidos pelo fracionamento em coluna de fase reversa dos peptídeos obtidos por hidrólise de amostras isoladas de endosperma de acessos de pinhão manso. (A) amostras de acesso de alto teor de ésteres de forbol, replicatas biológicas 1, 2 e 3. (B) amostras de acesso de baixo teor de ésteres de forbol, replicatas biológicas 1, 2 e 3. Os numerais na parte inferior de cada figura, referem-se frações que foram reunidas após a cromatografia e posteriormente submetidas a análise por espectrometria de massas..... | 56 |
| Figura 5 | - Cromatograma obtido pelo fracionamento em coluna HILIC dos peptídeos obtidos pela digestão trípica de proteínas extraídas de raízes de acessos com alto teor de ésteres de forbol (ATEF) e baixo teor de ésteres de forbol (BTEF) e marcados com iTRAQ. Os numerais da parte inferior da figura indicam as frações que foram reunidas após a cromatografia e posteriormente injetados em espectrômetro de massas.....   | 58 |
| Figura 6 | - (A) Cromatograma total de íons da fração 2 obtido no fracionamento em coluna de fase reversa das três replicatas biológicas (endosperma) dos acessos ATEF de pinhão manso ( <i>Jatropha curcas</i> ). (B) Cromatogramas representativos da reprodutibilidade entre as replicatas técnicas das três  | 60 |

|           |   |    |
|-----------|---|----|
|           | replicatas biológicas, tomando como exemplo as replicatas técnicas da fração 3 da replicata biológica 3.....  |    |
| Figura 7  | - (A) Cromatograma total de íons da fração 2 obtida no fracionamento em coluna de fase reversa das três replicatas biológicas (endosperma) do acesso BTEF de pinhão manso ( <i>Jatropha curcas</i> ). (B) Cromatogramas representativos da reprodutibilidade entre as réplicas técnicas das três replicatas biológicas, tomando como exemplo as replicatas técnicas da fração 2 da replicata biológica 2..... | 61 |
| Figura 8  | - Cromatograma total de íons dos hidrolisados trípticos das três replicatas biológicas e técnicas 1, 2 e 3 de folhas do acesso ATEF de pinhão manso ( <i>Jatropha curcas</i> ).....   | 63 |
| Figura 9  | - Cromatograma total de íons dos hidrolisados trípticos das três replicatas biológicas e técnicas 1, 2 e 3 de folhas do acesso BTEF de pinhão manso ( <i>Jatropha curcas</i> ).....   | 64 |
| Figura 10 | - (A) Cromatogramas total de íons da fração 6 obtido no fracionamento em coluna HILIC das duas replicatas biológicas (raízes) dos acessos ATEF e BTEF de pinhão manso ( <i>Jatropha curcas</i> ). (B) Espectro de MS2 mostrando a detecção dos íons repórteres (m/z: 114, 115, 116 e 117).....  | 66 |
| Figura 11 | - A. Proteínas identificadas em endosperma, folhas e raízes dos acessos ATEF e BTEF de <i>Jatropha curcas</i> . B. Diagrama de Venn representando as proteínas identificadas na análise proteômica nos diferentes acessos de <i>Jatropha curcas</i> .....   | 68 |
| Figura 12 | - (A) Proteínas identificadas e quantificadas em raízes dos acessos ATEF e BTEF de <i>Jatropha curcas</i> . (B) Diagrama de Venn representando as proteínas identificadas na análise proteômica de raízes nos diferentes acessos de pinhão manso. (C) Análise de componente principal do proteoma de raízes de <i>Jatropha curcas</i> .....   | 70 |
| Figura 13 | - (A). Proteínas identificadas e quantificadas em folhas de acessos ATEF e BTEF de <i>Jatropha curcas</i> . (B) Diagrama de Venn representando as proteínas identificadas na análise proteômica de folhas nos diferentes acessos de pinhão manso. (C) Análise de componente principal do proteoma de folhas de <i>Jatropha curcas</i> .....   | 72 |

|           |  |    |
|-----------|--|----|
| Figura 14 | - (A) Proteínas identificadas e quantificadas em acessos ATEF e BTEF de endosperma de <i>Jatropha curcas</i> . (B) Diagrama de Venn representando as proteínas identificadas na análise proteômica nos diferentes acessos de pinhão manso. (C) Análise de componente principal do proteoma de endosperma de <i>Jatropha curcas</i> ..... | 74 |
| Figura 15 | - Classificação funcional das proteínas identificadas em amostras de raízes, folhas e endosperma de diferentes acessos de <i>Jatropha curcas</i> com base na classificação do MapMan.....  | 76 |
| Figura 16 | - Classificação funcional das proteínas identificadas em amostras de raízes de acessos ATEF e BTEF de <i>Jatropha curcas</i> com base na classificação do MapMan.....  | 78 |
| Figura 17 | - Classificação funcional das proteínas identificadas em amostras de folhas de acessos ATEF e BTEF de <i>Jatropha curcas</i> com base na classificação do MapMan.....  | 80 |
| Figura 18 | - Classificação funcional das proteínas identificadas no endosperma de acessos ATEF e BTEF de <i>Jatropha curcas</i> com base na classificação do MapMan.....  | 82 |
| Figura 19 | - Heat Map das proteínas diferencialmente expressas de amostras de endosperma de <i>Jatropha curcas</i> , pelo test-T de Student's ( $p < 0,05$ ). Comparando as proteínas presentes na amostra ATEF contra a amostra BTEF, a cor laranja representa proteínas com maior abundância e a cor amarela proteínas com menor abundância.....  | 96 |

## LISTA DE TABELAS

|          |  |     |
|----------|--|-----|
| Tabela 1 | - Diterpenóides descritos em <i>J. curcas</i> (Adaptado de Sabandar <i>et al.</i> , 2013).....   | 30  |
| Tabela 2 | - Solução nutritiva usada no cultivo hidropônico de plantas de pinhão manso.....   | 43  |
| Tabela 3 | - Esquema de marcação isobárica com iTRAQ® 4-plex de amostras de raízes de <i>J. curcas</i> . BTEF – baixo teor de ésteres de forbol; ATEF – alto teor de ésteres de forbol.....                               | 47  |
| Tabela 4 | - Proteínas diferencialmente abundantes em amostras de raízes de <i>Jatropha curcas</i> , relação de abundância e processos biológicos onde foram alocadas. (+) mais abundante; (-) menos abundante.....       | 84  |
| Tabela 5 | - Proteínas diferencialmente abundantes em amostras de folhas de <i>Jatropha curcas</i> , relação de abundância e processos biológicos onde foram alocadas. (+) mais abundante; (-) menos abundante.....       | 92  |
| Tabela 6 | - Proteínas diferencialmente expressas em amostras de endosperma de <i>Jatropha curcas</i> , relação de abundância e processos biológicos onde foram alocadas. (+) maior abundância; (-) menor abundância..... | 97  |
| Tabela 7 | - Proteínas relacionadas à síntese de terpenos identificadas em acessos ATEF e BTEF de endosperma, folhas e raízes de <i>Jatropha curcas</i> .....   | 100 |
| Tabela 8 | - Proteínas relacionadas a síntese e degradação de ácidos graxos e proteínas associadas a corpos lipídicos identificadas em endosperma de acessos ATEF e BTEF de <i>Jatropha curcas</i> .....                  | 107 |

## SUMÁRIO

|            |  |    |
|------------|--|----|
| <b>1</b>   | <b>INTRODUÇÃO</b> .....  | 21 |
| <b>2</b>   | <b>OBJETIVOS</b> .....   | 24 |
| <b>2.1</b> | <b>Objetivo geral</b> .....  | 24 |
| <b>2.2</b> | <b>Objetivos específicos</b> .....   | 24 |
| <b>3</b>   | <b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....   | 25 |
| <b>3.1</b> | <b><i>Jatropha curcas</i> L.</b> .....   | 25 |
| 3.1.1      | Características da planta.....   | 25 |
| 3.1.2      | Importância econômica.....   | 26 |
| 3.1.3      | Toxicidade do Pinhão manso.....  | 28 |
| 3.1.4      | Ésteres de forbol.....   | 29 |
| 3.1.5      | Acessos de alto e baixo teor de ésteres de forbol.....   | 37 |
| 3.1.6      | Proteômica de <i>J. curcas</i> .....   | 38 |
| <b>4</b>   | <b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....  | 41 |
| <b>4.1</b> | <b>Obtenção e propagação de acessos contrastantes quanto ao teor de ésteres de forbol</b> .....      | 41 |
| <b>4.2</b> | <b>Processamento de endosperma</b> .....   | 42 |
| <b>4.3</b> | <b>Processamento de folhas e raízes</b> .....  | 42 |
| <b>4.4</b> | <b>Extração de proteínas</b> .....   | 44 |
| <b>4.5</b> | <b>Hidrólise enzimática das amostras, concentração e limpeza dos peptídeos</b> ....                  | 44 |
| <b>4.6</b> | <b>Fracionamento off-line em coluna de Fase Reversa (pH básico) das amostras de endosperma</b> ..... | 45 |
| <b>4.7</b> | <b>Marcação com iTRAQ e fracionamento off-line HILIC das amostras de raiz</b> .....                  | 46 |
| <b>4.8</b> | <b>Análise por espectrometria de massas – LC-MS/MS</b> .....   | 48 |
| <b>4.9</b> | <b>Análise de dados</b> .....  | 50 |
| 4.9.1      | Identificação de proteínas.....  | 50 |
| 4.9.2      | Classificação funcional das proteínas identificadas.....   | 51 |
| 4.9.3      | Análises quantitativas.....  | 52 |
| <b>5</b>   | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....  | 53 |
| <b>5.1</b> | <b>Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)</b> .....  | 53 |
| <b>5.2</b> | <b>Fracionamento off-line de amostras de endosperma e raízes de <i>J. curcas</i></b> .....           | 55 |

|            |  |            |
|------------|--|------------|
| 5.2.1      | Fracionamento off-line em coluna de fase reversa das amostras de endosperma..  | 55         |
| 5.2.2      | Fracionamento off-line em coluna HILIC das amostras de raízes de <i>J. curcas</i> .....  | 57         |
| <b>5.3</b> | <b>Análise por espectrometria de massas – LC-MS/MS de amostras de endosperma, folhas e raízes de acessos ATEF e BTEF de <i>J. curcas</i>.....</b>                    | <b>59</b>  |
| 5.3.1      | Análise por espectrometria de massas – LC-MS/MS de proteínas extraídas do endosperma de acessos ATEF e BTEF de <i>J. curcas</i> .....                                | 59         |
| 5.3.2      | Análise por espectrometria de massas – LC-MS/MS de proteínas extraídas de folhas dos acessos ATEF e BTEF de <i>J. curcas</i> .....                                   | 62         |
| 5.3.3      | Análise por espectrometria de massas – LC-MS/MS de proteínas extraídas de raízes dos acessos ATEF e BTEF de <i>J. curcas</i> .....                                   | 65         |
| <b>5.4</b> | <b>Identificação das proteínas de endosperma, folhas e raízes de <i>J. curcas</i>.....</b>   | <b>67</b>  |
| 5.4.1      | Identificação das proteínas em amostras de raízes de <i>J. curcas</i> .....  | 70         |
| 5.4.2      | Identificação das proteínas em amostras de folhas de <i>J. curcas</i> .....  | 72         |
| 5.4.3      | Identificação das proteínas em amostras de endosperma de <i>J. curcas</i> .....  | 74         |
| <b>5.5</b> | <b>Classificação funcional das proteínas identificadas em raízes, folhas e endosperma de <i>J. curcas</i>.....</b>   | <b>76</b>  |
| 5.5.1      | Classificação funcional das proteínas identificadas em raízes de <i>J. curcas</i> .....  | 78         |
| 5.5.2      | Classificação funcional das proteínas identificadas em folhas de <i>J. curcas</i> .....  | 80         |
| 5.5.3      | Classificação funcional das proteínas identificadas em endosperma de <i>J. curcas</i> .  | 82         |
| <b>5.6</b> | <b>Proteínas diferencialmente abundantes entre acessos contrastantes quanto ao teor de ésteres de forbol em raízes, folhas e endosperma de <i>J. curcas</i>.....</b> | <b>84</b>  |
| 5.6.1      | Proteínas diferencialmente abundantes entre acessos contrastantes quanto ao teor de ésteres de forbol em raízes de <i>J. curcas</i> .....                            | 84         |
| 5.6.2      | Proteínas diferencialmente abundantes entre os acessos contrastantes em folhas de <i>J. curcas</i> .....   | 92         |
| 5.6.3      | Proteínas diferencialmente abundantes entre os acessos contrastantes em endosperma de <i>J. curcas</i> .....   | 97         |
| <b>5.7</b> | <b>Principais proteínas identificadas e classes funcionais relacionadas nos diferentes tecidos e entre acessos ATEF e BTEF de <i>J. curcas</i>.....</b>              | <b>100</b> |
| 5.7.1      | Proteínas relacionadas ao metabolismo secundário identificadas em diferentes tecidos de acessos contrastantes de <i>J. curcas</i> .....                              | 100        |
| 5.7.2      | Proteínas relacionadas a síntese de terpenos identificadas em diferentes tecidos de acessos contrastantes de <i>J. curcas</i> .....                                  | 100        |

|          |  |            |
|----------|--|------------|
| 5.7.3    | Proteínas relacionadas ao transporte de terpenos identificadas em diferentes tecidos de acessos contrastantes de <i>J. curcas</i> .....  | 106        |
| 5.7.4    | Proteínas identificadas, classificadas funcionalmente e estatisticamente diferentes relacionadas ao metabolismo de lipídeos em amostras de endosperma de <i>J. curcas</i> .....          | 107        |
| 5.7.5    | Proteínas identificadas, classificadas funcionalmente e estatisticamente diferentes relacionadas a fotossíntese em diferentes tecidos de acessos contrastantes de <i>J. curcas</i> ..... | 113        |
| <b>6</b> | <b>PERSPECTIVAS FUTURAS</b> .....  | <b>114</b> |
| <b>7</b> | <b>CONCLUSÃO</b> .....   | <b>115</b> |
|          | <b>REFERÊNCIAS</b> .....   | <b>116</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

O uso de tecnologias como a gaseificação, pirólise, fermentação, dentre outras, para obtenção de biocombustíveis está em evidência desde a constatação da escassez de reservas de combustíveis fósseis, aliada à conscientização da necessidade da manutenção de recursos naturais. Os combustíveis oriundos de fontes renováveis, além de garantir a manutenção da demanda energética no setor, minimizam os efeitos prejudiciais ao meio ambiente, resultantes da utilização de combustíveis derivados do petróleo.

É cada vez maior o número de pesquisas que objetivam o uso dos biocombustíveis em substituição e/ou adição aos combustíveis de origem fóssil. O Brasil aparece com grande potencial devido a sua ampla gama de culturas agrícolas, fontes de matéria prima para produção de biocombustíveis. Além disso, possui posição geográfica privilegiada em relação a outros países, que lhe garante sol o ano inteiro e alta disponibilidade de terras para uso agrícola (ZANETTI; MONTI e BERTI, 2013).

Espécies como a soja (*Glycine max* (L.) Merrill), canola (*Brassica napus* L.), dendê (*Elaeis guineensis* L.), pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.), (LONG et al., 2015), além do algodão (*Gossypium hirsutum* L.), coco (*Cocos nucifera* L.) (LAFONT et al., 2015) e ainda a mamoneira (*Ricinus communis* L.) (IJAZ et al., 2016), amendoim (*Arachis hypogea* L.) e girassol (*Helianthus annuus* L.) (KUMAR; SHARMA, 2016), estão entre as principais culturas com potencial para produção de biodiesel.

Dentre essas culturas, aquelas que não são usadas ou pouco são usadas para fins alimentícios, merecem atenção especial por não apresentarem conflito de interesses no seu cultivo. Isso deve-se a preocupação quanto a utilização de óleos vegetais alimentícios na produção de biocombustíveis vir a acarretar a escassez desses óleos, além da elevação de seus preços (ARAÚJO et al., 2014). Neste cenário, o pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) tem se destacado em relação a outras culturas (FASSINOU et al., 2010).

Pertencente à família das euforbiáceas, a mesma da mamoneira, mandioca e seringueira, o pinhão manso possui sementes com teor de óleo em torno de 40-50%, que pode ser misturado diretamente com petro-diesel ou transesterificado para uso como biodiesel. O óleo de suas sementes apresenta características desejáveis para a produção de biodiesel, como baixa acidez, baixa viscosidade e boa estabilidade. Dentre os subprodutos resultantes de sua extração, a casca pode ser utilizada como fonte de energia calorífica para a fabricação do biodiesel e produção de biocombustível de segunda geração. Já a torta, devido ao seu alto teor proteico, é fonte potencial na alimentação animal, podendo inclusive, substituir a soja, agregando, assim, valor

econômico à cultura (MAKKAR, BECKER, 2009; MANURUNG *et al.*, 2009; MARAVI *et al.*, 2015).

Além do alto teor de óleo, diversas características fazem do pinhão manso a oleaginosa mais procurada para produção de biodiesel, dentre aquelas não comestíveis. São elas: seu curto período de desenvolvimento, maior resistência à seca e doenças em relação a outras culturas, baixo custo de sementes e fácil adaptação em solos degradados considerados inaptos para uso com culturas alimentícias (FAIRLESS, 2007; TATIKONDA *et al.*, 2009; MARAVI *et al.*, 2015). No entanto, a presença de compostos tóxicos, como os ésteres de forbol (diterpenos policíclicos, em que dois grupos hidroxila sobre átomos de carbono vizinhos são esterificados a ácidos graxos), limitam o uso de sua torta na alimentação animal (GOEL *et al.*, 2007; GOMES *et al.*, 2018).

Estão disponíveis na literatura, estudos que objetivam a redução dos componentes tóxicos em *J. curcas* a níveis toleráveis. Alguns estudos usam microrganismos para fermentação e degradação dos ésteres (PHENGNUAM & SUNTORNSUK 2013; SHARATH *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2016; a). Outros apostam na atividade hidrolítica de enzimas como a lipase (HIDAYAT *et al.*, 2014) e a esterase (NAKAO *et al.*, 2015). Todas essas abordagens são promissoras, mas ainda não são aplicadas em larga escala por demandarem tempo e apresentarem custos elevados.

Ciências como genômica, transcriptômica, metabolômica, proteômica, dentre outras, buscam o entendimento do funcionamento celular dos organismos e suas alterações biológicas. Em especial a proteômica, lida com a identificação e quantificação de todas as proteínas de um proteoma, incluindo as suas modificações pós-traducionais, isoformas, proteoformas e localização subcelular (RAMPITSCH; BYKOVA 2012). Esta ciência consiste no estudo do proteoma utilizando técnicas de separação e identificação, tais como: eletroforese, cromatografia, espectrometria de massas e bioinformática (HEIN *et al.*, 2013; EMIDIO *et al.*, 2015). Os avanços obtidos fazendo uso da proteômica, aliada a espectrometria de massas, podem ser a chave na obtenção de respostas quanto às rotas biossintéticas dos compostos tóxicos do pinhão manso.

Nesse estudo, fizemos uso da proteômica baseada em espectrometria de massas em endosperma, folhas e raízes de pinhão manso de diferentes acessos, sendo uma com alto teor de ésteres de forbol e outra de baixo teor de ésteres de forbol. Foi feito uso de cromatografia bidimensional, onde inicialmente as amostras passavam por cromatografia líquida em coluna de fase reversa em pH básico e eram posteriormente submetidas a uma nano cromatografia em coluna de fase reversa em pH ácido acoplado ao espectrômetro de massas. Diferentes

equipamentos e abordagens foram aplicadas, dependendo do tecido em estudo e do nosso objetivo quanto ao mesmo, além de análises que garantiram respostas tanto qualitativas quanto quantitativas de nossos dados. Estudos anteriores desenvolvidos por nosso grupo foram tomados como suporte para o desenvolvimento deste trabalho, os mesmos apontam que a síntese dos ésteres de forbol é realizada em tecidos como folhas e raízes e então direcionados para as demais partes da planta, como os frutos.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Obter o proteoma de endosperma, folhas e raízes de dois acessos de pinhão manso (*J. curcas*) com teores contrastantes de ésteres de forbol e a partir disso identificar o tecido/órgão no qual os ésteres de forbol são sintetizados.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Comparar os proteomas de endosperma, folhas e raízes de acessos de pinhão manso com teores contrastantes de ésteres de forbol;
- Quantificar relativamente as proteínas observadas simultaneamente em ambos os acessos;
- Identificar o órgão/tecido onde as proteínas relacionadas à síntese dos ésteres de forbol são expressas;
- Auxiliar na identificação do local de síntese dos ésteres de forbol gerando o entendimento das vias biossintéticas de síntese desses compostos na espécie em questão.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 *Jatropha curcas* L.

##### 3.1.1 Características da planta

O pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) é pertencente à família das euforbiáceas, uma espécie perene, que apesar de sua origem não estar bem esclarecida, acredita-se que seja originária do México e da América Central e distribuída na África, América Latina, Índia e Sudeste Asiático (EDRISI *et al.*, 2015; PANDEY *et al.*, 2012). Arbusto de crescimento rápido, caducifólio e sua altura normal é de dois a três metros, podendo alcançar até cinco metros em condições especiais (DOMERGUE e PIROT, 2008).

Seus frutos são do tipo cápsula ovoide, com diâmetro de 1,5 a 3,0 cm, trilocular, contendo, por via de regra, três sementes, sendo uma semente por lóculo, formada por um pericarpo ou casca dura e lenhosa indeiscente. Apresentam inicialmente coloração verde, passando a amarelo, castanho e por fim preto, quando atinge o estado de maturação. As sementes apresentam apreciáveis teores de óleo, em torno de 40 a 50%, que representam entre 53 e 79 % do peso do fruto (DIAS *et al.*, 2007). O tegumento é rijo e quebradiço, de fratura resinosa. Debaxo do involúcro da semente existe uma película branca cobrindo a amêndoa, o albúmen é abundante, branco, oleaginoso, contendo o embrião provido de dois largos cotilédones (DOMERGUE e PIROT, 2008).

A planta possui tronco com diâmetro aproximado de 20 cm, este é dividido desde a base em compridos ramos, com inúmeras cicatrizes causadas pela queda das folhas na estação seca, que ressurgem logo após as primeiras chuvas. Suas raízes são curtas e apresentam pouca ramificação (uma raiz principal e quatro raízes laterais), caule liso, de lenho mole e medula desenvolvida, mas pouco resistente. As folhas apresentam coloração esverdeada, esparsas e brilhantes, largas e alternas, em forma de palma com três a cinco lóbulos e pecioladas, com nervuras esbranquiçadas e salientes na face adaxial (DOMERGUE e PIROT, 2008; OPENSHAW, 2000).

Espécie monoica, ou seja, apresenta na mesma planta sexos separados. As flores masculinas ocorrem em maior número, ocupam as extremidades das ramificações e são largamente pedunculadas. As flores femininas são ligeiramente maiores que as masculinas, de coloração amarelo-esverdeadas, ocupam o centro das ramificações e possuem pedúnculo mais curto em relação as flores masculinas (DOMERGUE e PIROT, 2008).

A produtividade do pinhão manso vai variar de acordo com a região de plantio, o método de cultivo, a irrigação e a fertilidade do solo. Com produtividade máxima ocorrendo aos cinco anos de cultivo, a planta pode sobreviver por até 50 anos. A maturação de seus frutos ocorre em média de 30 a 45 dias, observando-se as alterações na cor, do verde ao amarelo, ao marrom e, por fim, para o preto (DRANSKI *et al.* 2010). Mesmo sendo considerada uma planta rústica, condições desfavoráveis ao seu cultivo, como necessidades hídricas e nutricionais afetam diretamente sua produtividade (ABHILASH *et al.*, 2011; EDRISI *et al.*, 2015).

Apesar de seus benefícios, o pinhão-manso ainda está em fase de domesticação e sua margem de lucro observada a partir do cultivo dessa cultura ainda é pequena (LONG *et al.*, 2015). Não há cultivares e sistemas de cultivo validados para diferentes regiões produtoras do país; assim, o desenvolvimento de cultivares é necessário para que a espécie se consolide como alternativa para a produção de biodiesel em um futuro próximo (LAVIOLA *et al.*, 2014).

### 3.1.2 Importância econômica

Diversas atividades farmacológicas são atribuídas a muitas espécies pertencentes a família das euforbiáceas (SALATINO *et al.*, 2007;). Dentre as diferentes espécies, o pinhão manso merece destaque especial, uma vez que várias partes da planta podem ser usadas para fins medicinais em seres humanos e animais domésticos, além dos usos fitossanitários na agricultura, exercendo grande importância entomobotânica, econômica e ecológica (KUMAR e TEWARI, 2015; RAHMAM *et al.*, 2014).

Os subprodutos do pinhão manso podem ser usados para fins diversos: extratos de folhas de pinhão manso apresentam características inseticidas e larvicidas contra *Culex quinquefasciatus*, *Anopheles stephensi* e *Aedes aegypti* (CANTRELL *et al.*, 2011; SAKTHIVADIVEL e DANIEL, 2008), o óleo extraído de seus frutos é usado na produção de sabão e biodiesel (KOH e GHAZI, 2011; OPENSHAW, 2000; ), efeitos anti-inflamatórios foram obtidos a partir de extratos de raízes e folhas (GUBITZ *et al.*, 1999; MUJUMDAR; MISAR., 2004; OLUKUNLE *et al.*, 2011; OTHMAN *et al.*, 2015), e ainda efeito anti-helmíntico a partir de extrato de sementes (MONTEIRO *et al.* 2011). De interesse agrícola, são os extratos produzidos a partir do óleo extraído dos frutos de pinhão-manso que podem ser aplicados no controle de fitopatógenos e pragas, tendo ação pesticida (RATNADASS; WINK, 2012), inseticida (ALONSO; SANTOS, 2013).

O pinhão manso é apontado também como importante fitorremediador e bioacumulador. Estudos relatam que a espécie foi capaz de extrair metais pesados como *Al*, *Fe*, *Cr*, *Mn*, *Ar*, *Zn*,

*Cd* e *Pb* de solos contaminados (JUWARKAR *et al.*, 2008; KUMAR *et al.*, 2008; MANGKOEDIHARDJO *et al.*, 2008; YADAV *et al.*, 2009). Foi observada sua atuação indireta na remoção de hidrocarbonetos de solos contaminados por resíduos de petróleo, quando seus exsudados radiculares favoreceram a proliferação de microrganismos que degradam hidrocarbonetos (AGAMUTHU *et al.*, 2010). Há relatos também de que seu potencial extrator de metais pesados pode ser aumentado muitas vezes, se adicionados ao solo agentes quelantes como o EDTA (JAMIL *et al.*, 2009).

O alto teor de óleo das sementes, que caracteriza a cultura como potencial na produção de biocombustíveis, é sem dúvida, o atributo que gerou interesse mundial no pinhão manso, e é a principal característica de importância econômica para a cultura. São vários países apostando em pesquisas para o aproveitamento da cultura: o Reino Unido (JANAUN e ELLIS, 2010), a China (YE *et al.*, 2009; LIU *et al.*, 2012), a Malásia (KOH e GHAZI, 2011), a Suécia (ARVIDSSON *et al.*, 2011), a Tailândia (SIRIWARDHANA *et al.*, 2009), a Índia (BORA e BARUAH, 2012) e o Brasil (LAVIOLA *et al.*, 2014).

O processamento das sementes de pinhão manso para extração do óleo, matéria prima na produção de biocombustíveis, gera subprodutos que agregam valor à cultura, à casca e à torta. A torta pode substituir a soja na alimentação animal, se for submetida a um processo de desintoxicação, por exemplo. Considerando a importância da soja na alimentação humana e seu valor no mercado, principalmente a níveis de importação, essa substituição é vantajosa em todos os setores da cadeia (MAKKAR; BECKER, 2009; DUBEY *et al.*, 2011).

A torta é gerada no momento da prensagem para obtenção do óleo e é rica em nitrogênio, fósforo e potássio. Essas propriedades proporcionam seu uso como fertilizante direto em folhas, frutas, vegetais de tubérculos (MOHAPATRA E PANDA, 2011; SRINOPHAKUN *et al.*, 2012) e um adubo verde para arroz (KUMAR; SHARMA, 2008; GUEDES *et al.*, 2014). A casca ainda pode ser usada na geração de energia, por meio da combustão das mesmas para secagem de amêndoas de *J. curcas* e ainda durante o processo de produção do biodiesel. Além disso, a casca é alvo de estudos para produção de biocombustível de segunda geração, o bio-óleo de pirólise rápida (MANURUNG *et al.*, 2009; KRATZEISEN *et al.*, 2013).

### **3.1.3 Toxicidade do Pinhão manso**

A toxicidade das sementes de *J. curcas* deve-se à presença de fatores proteicos e não proteicos que causam danos à saúde animal e humana. A presença de diterpenos (ésteres de

forbol), proteínas inativadoras de ribossomos (RIP; curcinas), saponinas, inibidor de tripsina, inibidores de protease, curcaina, jatroidina, fitatos, alcaloides, lectinas, lignanas, taninos, látex e peptídeos cíclicos são componentes tóxicos, alergênicos e antinutricionais, esses limitam o aproveitamento do pinhão manso, principalmente da torta resultante da extração do seu óleo (GOMES *et al.*, 2018; MAKKAR *et al.*, 1997; SABANDAR *et al.*, 2013).

A curcina pertence ao grupo das lectinas e é uma proteína com ação semelhante à da ricina da mamona, exibindo, *in vitro*, efeito inibitório na síntese proteica. A curcina é considerada proteína de inativação de ribossomos (RIPs) do tipo I, e foi isolada de endosperma de *J. curcas* e possui uma cadeia simples, com massa molecular de 28,1 kDa. Em estudos realizados em sementes de *J. curcas*, onde a curcina foi isolada, a mesma foi caracterizada como uma proteína básica importante, que constitui cerca de 20% do total de proteínas solúveis em sementes. A ação tóxica da curcina está associada à sua ingestão, atuando na inibição da síntese proteica (BARBIERI *et al.*, 1993; LIN *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2017).

Os antinutrientes são definidos por MAKKAR, (MAKKAR, 1993) como substâncias que, sozinhas ou devido à geração de seus produtos metabólicos nos seres vivos interferem na utilização de alimentos ou rações, afetam a saúde e reprodução dos animais e levam a morte quando ingeridos em altos níveis. Os fitatos e saponinas se ligam a minerais essenciais como o cálcio, magnésio, ferro e zinco, impedindo que sejam absorvidos pelo organismo e por isso considerados antinutricionais (DEVAPPA, MAKKAR, BECKER 2010).

Os inibidores de protease são substâncias antinutrientes generalizadas, presentes em muitos ingredientes nutricionais derivados de plantas, em especial os inibidores de tripsina que causam a redução na digestibilidade das proteínas (DEVAPPA, MAKKAR, BECKER 2010). As lectinas podem localmente, interferir na digestão e absorção de nutrientes, estimular mudanças na flora bacteriana e modular o estado imunológico do trato digestivo. Sistemáticamente, eles podem interromper o metabolismo de lipídios, carboidratos e proteínas, promover o aumento e / ou a atrofia dos principais órgãos e tecidos internos e alterar o status hormonal e imunológico (VASCONCELOS; OLIVEIRA, 2004).

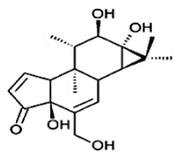
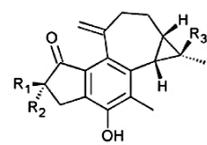
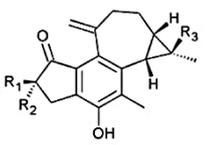
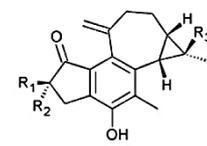
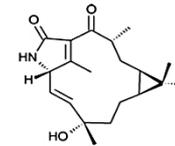
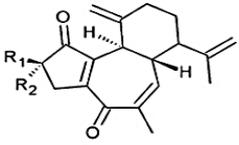
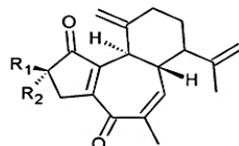
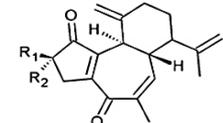
Os ésteres de forbol daqui por diante denominados com a sigla (EF), são considerados os principais componentes tóxicos presentes nas sementes de *J. curcas*. Estudos demonstraram que os EF apresentam diferenças significativas quando comparado o seu teor entre espécies tóxicas e não tóxicas. Em contrapartida, curcinas, inibidores de tripsina e lectinas apresentaram teores semelhantes em ambas as espécies (HE *et al.*, 2011; MAKKAR; ADERIBIGBE; BECKER, 1998).

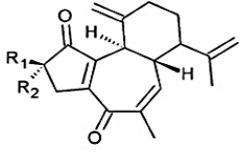
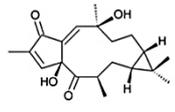
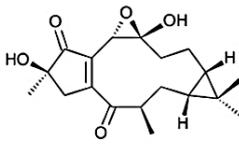
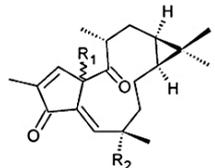
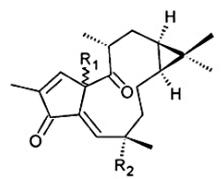
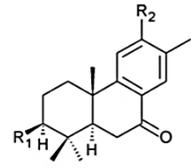
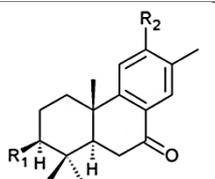
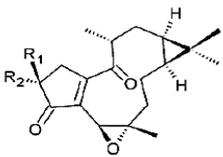
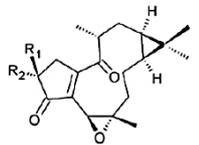
### 3.1.4 Ésteres de forbol

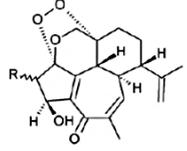
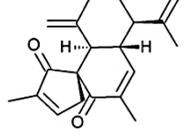
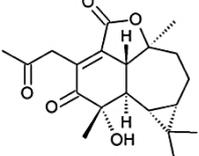
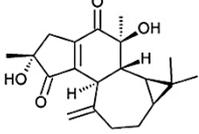
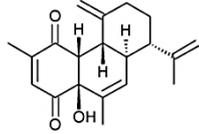
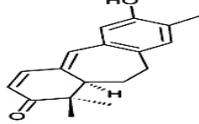
As plantas produzem numerosos compostos, estes são classificados como metabólitos primários e secundários ou produtos naturais (CROTEAU; KUTCAHN; LEWIS, 2000). A síntese química, biossíntese e atividades biológicas dos metabólitos secundários de plantas tem sido alvo de estudos devido a aplicação destes na medicina, agricultura e nas indústrias. No entanto ainda se sabe relativamente pouco sobre seus reais papéis na natureza (GERSHENZON; DUDAREVA, 2007). Os metabólitos secundários das plantas podem ser divididos em 3 grandes categorias: (a) terpenos ou terpenóides, (b) alcalóides e (c) compostos fenólicos. Sendo os compostos classificados como terpenos a maior e mais diversificada classe de produtos naturais, tendo em torno de 25000 estruturas já relatadas (MAKKAR, 2016).

Alguns terpenos possuem função fisiológica bem determinada, como por exemplo, esteróis (componentes da membrana, hormônios) e os carotenóides (pigmentos fotossintéticos e antioxidantes). Muitos terpenos atuam como toxinas, inibidores do crescimento ou impedimentos para microrganismos e animais. O ataque de insetos herbívoros em plantas, podem causar a liberação de terpenos e também induzir a liberação de sinais que atraem espécies predadoras (KESSLER; BALDWIN, 2001). A atuação de terpenos como mensageiros químicos foi demonstrada por Cheng e colaboradores, que relatam a influência dos terpenos na expressão de genes envolvidos em funções defensivas de plantas ou influenciando a expressão gênica de plantas vizinhas (CHENG *et al.*, 2007). Entre os terpenos, os compostos diterpenóides dominaram a área de pesquisa nas espécies de pinhão manso com relação a suas novas estruturas químicas e valores medicinais. Plantas de pinhão-manso contêm uma rica fonte de diterpenos cíclicos com esqueletos de tigliano, casbeno, dafanano, latirano, jatrofano, podocarpano e rhamnfolano. Os diterpenos verificados em *J. curcas* estão descritos na Tabela 1.

**Tabela 1.** Diterpenóides descritos em *J. curcas* (Adaptado de Sabandar *et al.*, 2013)

| Nome                         | Tipo de diterpeno | Tecido na planta | Referência                            | Estrutura  |
|------------------------------|-------------------|------------------|---------------------------------------|--|
| Jatropherol I                | Tigliano          | Sementes         | Jing <i>et al.</i> , 2005             |   |
| Jatropholone B               | Casbeno           | Raiz             | Naengchomnong <i>et al.</i> , (1994)  | <br>R <sub>1</sub> =CH <sub>3</sub> ; R <sub>2</sub> =H; R <sub>3</sub> =CH <sub>3</sub>      |
| 2 α -<br>Hydroxyjatropholone | Casbeno           | Raiz             | Naengchomnong <i>et al.</i> , (1994)  | <br>R <sub>1</sub> =CH <sub>3</sub> ; R <sub>2</sub> =OH; R <sub>3</sub> =CH <sub>3</sub>    |
| Jatrophol                    | Casbeno           | Raiz             | Naengchomnong <i>et al.</i> , (1994)  | <br>R <sub>1</sub> =CH <sub>3</sub> ; R <sub>2</sub> =H; R <sub>3</sub> =CH <sub>2</sub> OH |
| Jatrophalactam               | Casbeno           | Raiz             | Wang <i>et al.</i> , 2009             |   |
| Curcusones A                 | Dafanano          | Raiz             | Naengchomnong <i>et al.</i> , (1986a) | <br>R <sub>1</sub> =CH <sub>3</sub> ; R <sub>2</sub> =H                                     |
| Curcusones B                 | Dafanano          | Raiz             | Naengchomnong <i>et al.</i> , (1986a) | <br>R <sub>1</sub> =H; R <sub>2</sub> =CH <sub>3</sub>                                      |
| Curcusones C                 | Dafanano          | Raiz             | Naengchomnong <i>et al.</i> , (1986a) |   |

|  |              |             |  |   |   |
|--|--------------|-------------|--|---|---|
|  |              |             |  |   | R <sub>1</sub> = CH <sub>3</sub> ; R <sub>2</sub> = OH  |
| Curcusones D   | Dafanano     | Raiz        | Naengchomnong<br><i>et al.</i> , (1986a) |    |   |
|  |              |             |  |   | R <sub>1</sub> = OH; R <sub>2</sub> = CH <sub>3</sub>   |
| Curculathyrane A   | Latirano     | Raiz        | Naengchomnong<br><i>et al.</i> , (1986b) |    |   |
| Curculathyrane B   | Latirano     | Raiz        | Naengchomnong<br><i>et al.</i> , (1986b) |    |   |
| 15-O-acetyl-15-epi-(4E)-jatrogrossidentadi one                 | Latirano     | Parte aérea | Ravindranath <i>et al.</i> , (2004)      |    | R <sub>1</sub> = α-OAc; R <sub>2</sub> = OH             |
| (14E)-14-O-5,6-epoxyjatrogrossidentadione                      | Latirano     | Parte aérea | Ravindranath <i>et al.</i> , (2004)      |  | R <sub>1</sub> = α-OH; R <sub>2</sub> = OAc             |
| 3b-Acetoxy-12-methoxy-13-methyl-podocarpa-8,11,13-triene-7-one | Podocarpano  | Parte aérea | Ravindranath <i>et al.</i> , (2004)      |  | R <sub>1</sub> = OH; R <sub>2</sub> = OH                |
| 3b,12-Hydroxy-13-methyl-podocarpa-8,10,13-triene               | Podocarpano  | Parte aérea | Ravindranath <i>et al.</i> , (2004)      |  | R <sub>1</sub> = OAc; R <sub>2</sub> = OCH <sub>3</sub> |
| epi-Isojatrogrossidione  | Rhamnofolane | Parte aérea | Ravindranath <i>et al.</i> , (2004)      |  | R <sub>1</sub> =H; R <sub>2</sub> = CH <sub>3</sub>     |
| 2-epi-Hydroxyisijatrogrossidione                               | Rhamnofolane | Parte aérea | Ravindranath <i>et al.</i> , (2004)      |  | R <sub>1</sub> = CH <sub>3</sub> ; R <sub>2</sub> = OH  |

|                  |                 |             |                                     |  |
|------------------|-----------------|-------------|-------------------------------------|--|
| Caniojane        | Rhamnofolane    | Raiz        | Ling-yi <i>et al.</i> ,<br>(1996)   |  <p><math>R_1 = \alpha \text{CH}_3</math></p> |
| Spirocucarcasone | Rhamnofolane    | Raiz        | Chianese <i>et al.</i> ,<br>(2011)  |   |
| Jatrophalactone  | Rhamnofolane    | Raiz        | Liu <i>et al.</i> , (2012)          |   |
| Jatrophalone     | Rhamnofolane    | Raiz        | Liu <i>et al.</i> , (2012)          |   |
| Jatrophadiketone | Rhamnofolane    | Raiz        | Liu <i>et al.</i> , (2012)          |    |
| Heudelatinone    | Dinorditerpenos | Parte aérea | Ravindranath <i>et al.</i> , (2003) |   |

Os ésteres de forbol (EF) são substâncias naturais comumente encontradas em espécies de plantas das famílias Euforbiaceae e Timelaeaceae. Podem atuar como análogos do diacilglicerol (DAG), um potente ativador da proteína quinase C (PKC), para amplificar a eficácia dos carcinógenos (GOEL *et al.*, 2007; DEVAPPA *et al.*, 2010). A toxicidade dos EF é em geral alta, mesmo em baixas concentrações, podendo ativar vias celulares diferentes em cada espécie animal afetada, levando a sintomas específicos em tecidos animais que variam de tumor à inflamação, à diferenciação celular e à apoptose (GOEL *et al.*, 2007; GOMES *et al.*, 2018; OSKOUETIAN *et al.*, 2012).

Os ésteres de forbol são compostos de um diterpeno tetracíclico, denominado tigliano (12-deoxi-16-hidroxi-forbol), e dois ácidos graxos, que são esterificados nas posições C13 e C16 do esqueleto tigliano (GOMES *et al.*, 2018; HAAS; STERK; MITTELBAACH, 2002; OHTANI *et al.*, 2017). O tigliano é o radical álcool fundamental do EF (forbol-12-miristato-13-acetato), contém quatro anéis (A – D), é pouco abundante, extremamente instável e susceptível à oxidação, hidrólise e transesterificação (HAAS; STERK; MITTELBAACH, 2002;).

Em *J. curcas*, até o momento foram encontrados seis derivados de éster de forbol de esqueleto tigliano (Figura 1), todos com a mesma estrutura primária de um 12-desoxi-16-hidroxi-forbol. São referidos como fatores C1-C6 de *Jatropha*, de acordo com a distribuição de carbono em suas cadeias laterais (GOMES *et al.*, 2018 HAAS; STERK; MITTELBAACH, 2002).

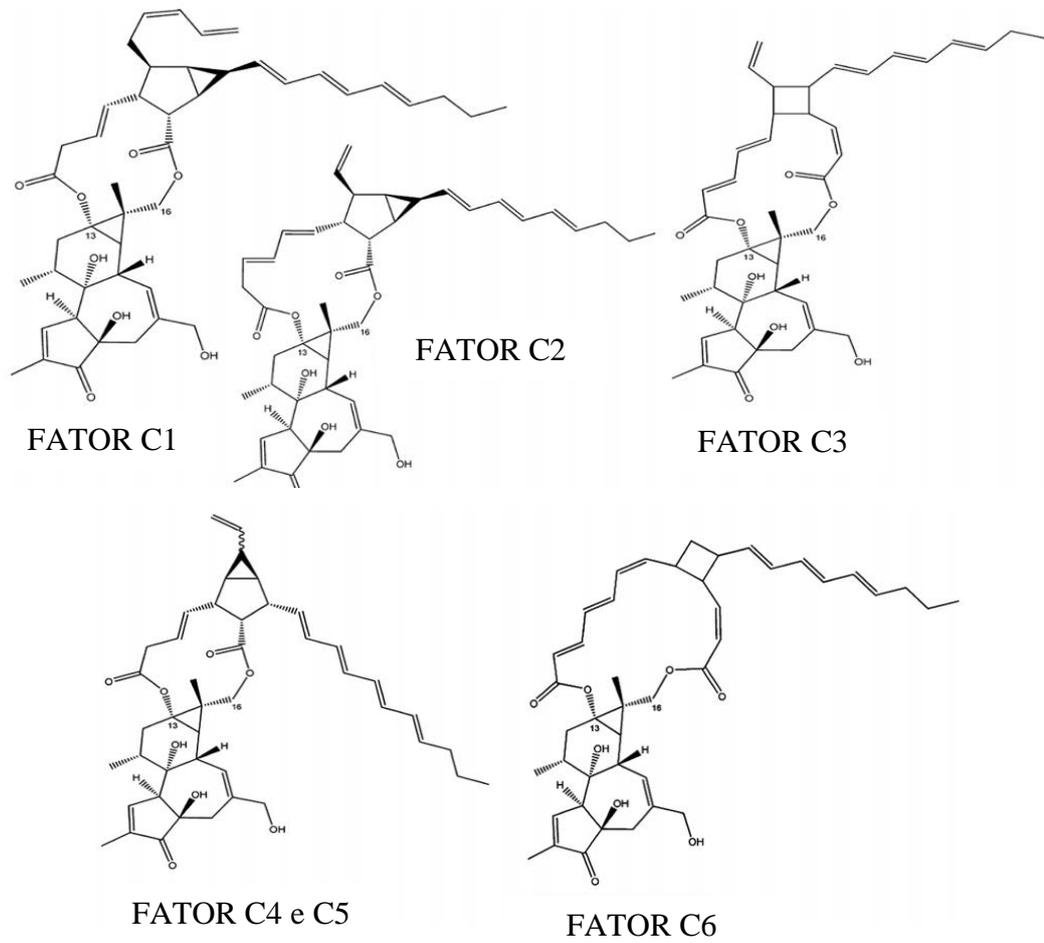
A via biossintética desses EF ainda é mal compreendida. A análise da expressão diferencial de genes envolvidos no desenvolvimento e germinação de sementes em *J. curcas* levou a identificação de genes potencialmente envolvidos na biossíntese de EF, dentre eles estão incluídos genes que codificam para a síntese de terpenos como o farnesil-difosfato sintase (FPS2) e a geranil geranil difosfato sintase (GGDP) (COSTA *et al.*, 2010). Estudos recentes evidenciaram os terpenóides com esqueletos tigliano, jatrofano, latirano e ingenano tem sua síntese iniciada através da enzima casbeno sintase convertendo o geranil geranil difosfato (GPP) nestes diterpenos (Figura 2) (KING *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2015).

Os genes da casbeno sintase JcCASA163 e seu homólogo JcCASD168 foram identificados em *Jatropha*, com análises de transcriptoma relatando a expressão de JcCASD168 exclusivamente em sementes, enquanto JcCASA163 pode ser expresso em sementes, folhas e inflorescências. Quando regulado negativamente, o gene JcCASA163 sozinho ou ambos os genes, resulta na redução acentuada do conteúdo de EF nas sementes. Tais resultados sugerem o casbeno como precursor de ésteres de forbol e a casbeno sintase como um ponto de

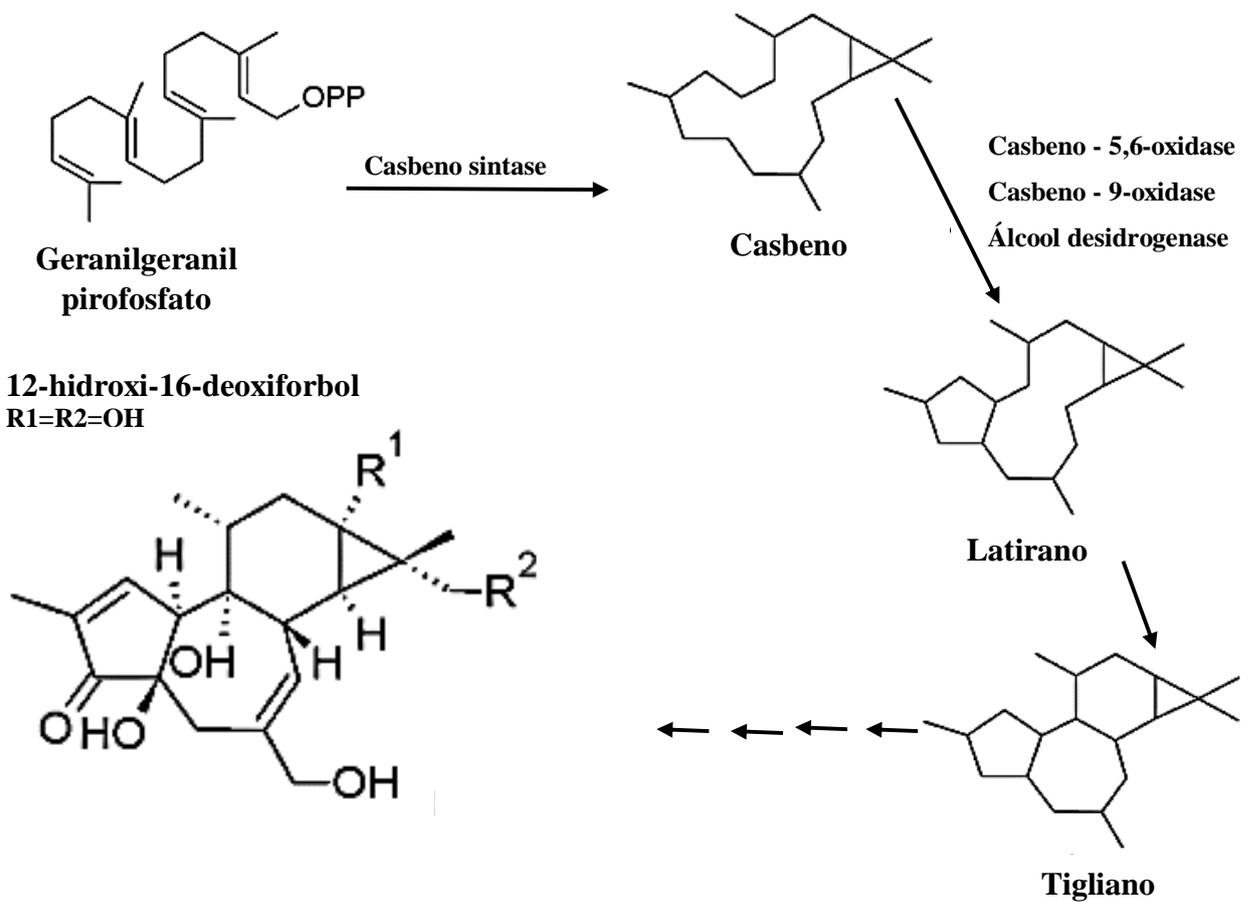
intercepção adequado para gerar plantas transgênicas com baixo ou nenhum conteúdo de EF (LI *et al.*,2016).

Apesar dos primeiros estudos com a casbeno sintase terem sido realizados em *Ricinus communis*, estudos de uma proteína de *J. curcas* homóloga a CS (JcCSH), que apresenta alta identidade de sequência com CS de *R. communis*, demonstraram que esta proteína está localizada no cloroplasto e que possui o motivo DDXXD conservado entre terpeno ciclases (NAKANO *et al.*, 2012).

**Figura 1.** Estruturas químicas dos ésteres de forbol encontrados no óleo de sementes de *J. curcas* (Adaptado de Gomes *et al.*, 2018 e Haas *et al.*, 2002)



**Figura 2.** Via dos produtos formados a partir do geranyl geranyl difosfato e possíveis enzimas envolvidas (Adaptado de King *et al.*, 2016; Luo, *et al.* 2016; Nakano *et al.*, 2012)



Estudos demonstraram que duas enzimas pertencentes ao complexo citocromo P450, casbeno-5-oxidase e casbeno-9-oxidase, e a álcool desidrogenase são responsáveis pela síntese do composto diterpenóide latirano jolkinol. Essas enzimas catalisam a oxidação do casbeno nas posições 5 e 9, o que é conservado em diversos diterpenóides, inclusive no EF (KING *et al.*, 2016; KING *et al.*, 2014; LUO *et al.*, 2016).

A biossíntese dos ésteres de forbol foi relatada em tecidos maternais como o tégma ou integumento interno, nos estágios finais do desenvolvimento de sementes. Análises sobre a distribuição de EF em sementes de *J. curcas*, demonstraram que embora a maior parte do EF estivesse presente dentro do endosperma de sementes maduras, a maior concentração desses diterpenóides estava presente na camada interna do revestimento da semente, derivada da mãe, denominada tégma. O tégma que contém em torno de 26 a 30 células de espessura, é reduzido a uma camada de células paliçadas nas sementes maduras, o que dificulta a separação dos tecidos. Esta redução na camada de células que formam o tégma pode fazer com que os EF hidrofóbicos se difundam no endosperma, o que justificaria a maior parte dos EF serem encontrados neste tecido. A constatação desses fatos levou os autores a indicar que a biossíntese dos ésteres de forbol em *J. curcas* é uma característica monogênica dominante maternalmente controlada (HE *et al.*, 2011; KING *et al.*, 2013). No entanto, análises recentes do proteoma de *J. curcas* indicaram que essa síntese pode estar ocorrendo em outros tecidos, como folhas ou raízes, e daí sendo translocados para as sementes em desenvolvimento (NAKANO *et al.*, 2012; SHAH *et al.*, 2015; SOARES *et al.*, 2014).

### **3.1.5 Acessos com alto e baixo teor de ésteres de forbol**

O teor de ésteres de forbol é variável em sementes de genótipos diferentes de *J. curcas*, podendo ser categorizados como tóxicos e não tóxicos (comestíveis), as sementes consideradas comestíveis foram evidenciadas apenas no México (HE *et al.*, 2011; MAKKAR *et al.*, 1998). Em sementes tóxicas os teores vão variar de menos de 1mg / g até mais de 7 mg / g dependendo do método quantitativo utilizado (DEVAPPA *et al.*, 2010; MAKKAR *et al.*, 1997; MAKKAR *et al.*, 2008).

Foram descritas no México variedades livres de ésteres de forbol ou com quantidades mínimas (0,11 mg / g). No estado mexicano de Veracruz é comum o consumo humano de sementes, torradas ou como pastas e ainda usadas na alimentação animal. No entanto, essas variedades são em geral inadequadas para uso na produção de biodiesel, por apresentarem rendimento baixo de frutos e alta susceptibilidade a estresses bióticos quando comparadas as

variedades de alto teor de EF (HE *et al.*, 2011; MAKKAR *et al.*, 1997; MAKKAR; ADERIBIGBE; BECKER, 1998; MAKKAR; MARTINEZ-HERRERA; BECKER, 2008).

Um estudo avaliando a toxicidade em relação ao teor de óleo demonstrou que dentre as três variedades estudadas: Malásia, Índia e Indonésia com 0,23%, 0,58% e 1,58% teor de ésteres respectivamente, apresentaram concentrações de óleo de 33,73%, 30,5% e 32,7% o que demonstra que essa relação toxicidade - teor de óleo, ainda não está bem estabelecida e necessita de maiores estudos (AHMED; SALIMON, 2009).

A análise proteômica em genótipos oriundos de seis regiões da China, demonstrou que os derivados de EF (fatores C1-C6) podem ter sua concentração diferenciada dependendo da região de cultivo, (1,098 a 2,417 mg / g). Ainda na China quando avaliadas plantas de *J. curcas* de 18 regiões diferentes as concentrações apresentaram variação de 0,87 a 3,32 mg / g (LIU *et al.*, 2013; MAKKAR; MARTINEZ-HERRERA; BECKER, 2008; MAKKAR *et al.*, 1997).

Para as variedades tóxicas métodos físicos, químicos e biológicos foram estabelecidos para extração (DEVAPPA *et al.*, 2010) e desintoxicação (GUEDES *et al.*, 2014; HE *et al.*, 2017; KUMAR; MAKKAR; BECKER, 2010).

Um estudo proteômico quantitativo de variedades com teores contrastantes de ésteres de forbol é de fundamental importância. Tal estudo pode levar a identificação de proteínas que estejam envolvidas na síntese de ésteres de forbol, assim como o nível de expressão das proteínas nas variedades contrastantes e identificar o órgão/tecido de sua expressão. O que pode resultar na identificação de genes alvo para estudos de biologia molecular que objetivem reduzir os níveis de EF em variedades tóxicas.

### **3.1.6 Proteômica de *J. curcas***

O termo proteômica passou a ser utilizado na década de 90, a partir dos avanços na química de proteínas, que permitiram a realização de estudos em larga escala das proteínas expressas pelos genomas. O proteoma de um organismo, tecido ou célula é altamente dinâmico e vai depender inclusive de mudanças ambientais, portanto num dado estudo serão apresentadas as proteínas que refletem a expressão gênica naquele momento (RUEBELT, LEIMGRUBER, *et al.*, 2006).

Estudos proteômicos em plantas têm apresentado significativos avanços na identificação de proteínas em *Arabidopsis* (REICHEL *et al.*, 2016), milho (YU *et al.*, 2017), soja (JHON *et al.*, 2017); arroz (YE *et al.*, 2015), pinhão manso (PINHEIRO *et al.*, 2013; SHAH *et al.*, 2015; SOARES *et al.*, 2014), mamona (TEIXEIRA *et al.*, 2018; NOGUEIRA *et al.*, 2018), na

quantificação de proteínas em algodão (ZHANG *et al.*, 2016b), milho (DAHAL *et al.*, 2016), mamão (SOARES *et al.*, 2017), em estudos comparativos, de respostas a diferentes tipos de estresse e de ação de patógenos em plantas (MUNNER, JEONG, 2015; NAWROT *et al.*, 2017; LIMA *et al.*, 2016), e em modificações pós-traducionais que atuam controlando a atividade e localização de determinadas proteínas (GUERRA *et al.*, 2015; FRISO *et al.*, 2015).

Em *J. curcas*, os primeiros estudos proteômicos datam de 2007, onde Liang e colaboradores fazendo uso de eletroforese bidimensional e LC-MS/MS verificaram a resposta de plântulas de pinhão-manso ao estresse pelo frio (LIANG *et al.*, 2007). Desde então foram realizados diversos estudos a fim de obter mais informações sobre a cultura. Tecidos como embrião e endosperma foram estudados comparativamente, foi verificado que as proteínas do endosperma eram predominantemente enzimas relacionadas ao catabolismo e reservas que forneciam nutrição para o embrião em crescimento, enquanto as proteínas específicas do embrião estavam relacionadas ao anabolismo e utilizavam a nutrição do endosperma para crescimento adicional (LIU *et al.*, 2009; LIU *et al.*, 2011).

O estudo de mobilização do óleo durante a germinação de sementes de *J. curcas* mostraram que o início da mobilização de óleo ocorre durante a germinação e, subsequentemente, o óleo é consumido durante o desenvolvimento inicial das plântulas. (YANG *et al.*, 2009). Diversas vias tiveram seu envolvimento determinado na mobilização de óleo em *J. curcas*, como o ciclo de beta-oxidação, ciclo glioxilato, glicólise, ciclo do ácido tricloroacético (TCA), gliconeogênese e vias de pentoses fosfato (YANG *et al.*, 2009; NDIMBA *et al.*, 2013). Em estudos da composição proteômica dos corpos oleosos de *J. curcas* e espécies relacionadas, as oleosinas foram determinadas como os componentes principais dos corpos oleosos (organelas responsáveis pelo armazenamento de óleo). Neste estudo três oleosinas (JcOle1, JcOle2, JcOle3) foram isoladas e caracterizadas ao nível do gene, transcrito e proteína (POPLUECHAI *et al.*, 2011).

Em 2013, Liu e colaboradores identificaram as proteínas envolvidas no fluxo de carbono para o acúmulo de lipídios em *J. curcas* (LIU *et al.*, 2013). Investigações sobre a fotossíntese C3 / C4 em *J. curcas* mostraram que fosfoenol piruvato carboxilase, conhecido por contribuir para o metabolismo dos ácidos graxos e fotossíntese, era único, pois continha apenas seis exons, enquanto quase todas as plantas contêm 10 exons (RAORANE *et al.*, 2013).

Estudos em diferentes áreas resultaram em avanços significativos sobre a cultura do pinhão manso, seu uso medicinal, aproveitamento de seu óleo na produção de biodiesel, os efeitos e as causas de sua toxicidade. No entanto, a via biossintética dos diterpenos ainda não foi elucidada. Estudos proteômicos em plantas de *J. curcas* realizados pelo nosso grupo em

plastídeos do endosperma de sementes em desenvolvimento, endosperma em diferentes estágios de desenvolvimento e integumento, identificaram 923, 1760 e 1770 proteínas respectivamente; contudo, proteínas envolvidas na síntese de ésteres de forbol não foram identificadas (PINHEIRO *et al.*, 2013; SHAH *et al.*, 2015; SOARES *et al.*, 2014). Todavia, quando realizamos estudos de expressão gênica foi demonstrada a expressão de genes como a casbeno sintase, enzima chave na síntese desses ésteres, especialmente em raízes e folhas (SOARES, 2014). Dessa forma, observa-se a importância de um estudo proteômico em raízes e folhas, na tentativa de encontrar o órgão de síntese das enzimas chaves para a biossíntese dos EF. O trabalho que segue apresenta avanços no estudo proteômico de *J. curcas* e gera subsídios para estudos que visem à redução de componentes tóxicos na cultura.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Obtenção e propagação de acessos contrastantes quanto ao teor de ésteres de forbol

No intuito de avaliar os proteomas de acessos contrastantes quanto ao teor de ésteres de forbol, foram usados dois acessos de pinhão manso provenientes de locais distintos. Exsiccatas destes dois acessos foram depositadas no Herbário Prisco Bezerra da Universidade Federal do Ceará, onde foram identificadas como *J. curcas* e receberam os números EAC 62156 e EAC 62157 para o acesso de alto teor de ésteres de forbol e baixo teor de ésteres de forbol respectivamente. O primeiro acesso (EAC 62156), com alto teor de ésteres de forbol é oriundo da Fazenda Experimental Vale do Curu. A fazenda é localizada na CE-020 Km 80, município de Pentecoste – CE, distante cerca de 90 km da capital Fortaleza. Para obtenção das sementes de baixo teor de ésteres de forbol, estacas do acesso CNPAE-1002, depositada no Herbário Prisco Bezerra (EAC 62157), prontas para o plantio foram cedidas pela Embrapa Agroenergia localizada em Brasília – DF, as mesmas são pertencentes ao Banco de Germoplasma que está implantado na Embrapa Cerrados, em Planaltina-DF. Foi realizado o plantio das mesmas em maio de 2015 na Universidade Federal do Ceará em área experimental localizada no Núcleo de Ensino e Pesquisa de Agricultura Urbana (Nepau). As estacas foram acondicionadas inicialmente em sacos de polietileno contendo substrato padrão, onde foram mantidas durante 30 dias. Em seguida transplantadas para a área do plantio.

No caso das plantas com alto teor de EF, daqui por diante denominadas com a abreviatura (ATEF) foi realizada coleta de frutos maduros entre os meses de novembro de 2015 e abril de 2016. Para o acesso de baixo teor, daqui por diante denominadas (BTEF) a coleta de frutos foi feita entre os meses de março e junho de 2016, cerca de oito meses após o plantio. No ato da coleta era verificada a coloração marrom dos frutos, que é indicativo de maturação, bem como verificação visual de frutos saudáveis; ou seja, sem ocorrência de pragas, doenças ou deficiência nutricional. Os frutos maduros foram mantidos em casa de vegetação para secagem por um período aproximado de 72h, e quando secos apresentavam deiscência espontânea dos frutos. As sementes foram separadas dos frutos e levadas ao laboratório para pesagem e armazenamento. No ato da pesagem, eram selecionadas sementes com peso igual ou superior a 0,6g, e as mesmas eram armazenadas a 4°C.

## 4.2 Processamento de endosperma

A casca da semente foi retirada e foi feita a separação de endosperma, descartando o embrião e cotilédones. O experimento foi dividido em três amostras biológicas e para cada biológica foram selecionadas uma quantidade de endosperma com peso total de 6g. Os endospermas foram seccionados e submetidos à deslipidação em acetona sob agitação constante de 30rpm durante 24h. Após a deslipidação, as amostras foram liofilizadas e posteriormente trituradas em moinho elétrico até a obtenção de um pó fino, que foi armazenado a -20 °C até ser usado para extração de proteínas.

## 4.3 Processamento de folhas e raízes

Folhas e raízes das plantas ATEF e BTEF foram obtidas de plantas cultivadas hidroponicamente. Sementes foram germinadas em bandejas contendo areia lavada e após 15 dias de cultivo as plântulas foram transplantadas para vasos de polietileno com capacidade de 4L, contendo solução nutritiva (Tabela 2). Foram colocadas duas plantas por vaso, em um total de 10 vasos, mantidas durante quinze dias em casa de vegetação. A solução nutritiva estava inicialmente numa concentração  $\frac{1}{4}$  de força na primeira semana, aumentada para  $\frac{1}{2}$  força na semana seguinte. O pH da solução foi verificado a cada dois dias, sendo corrigido para 6,0 quando necessário. Passados oito dias de cultivo foi necessário tutoramento das mudas para evitar tombamento das mesmas, devido ao seu rápido crescimento. Nesse período de quinze dias, as plantas já apresentavam em torno de quatro a cinco folhas verdadeiras – parâmetro utilizado para coleta.

Dez plantas foram selecionadas para cada tecido, sendo uma planta por vaso para coleta de folhas e uma para coleta de raízes. Para coleta das folhas, quatro eram selecionadas; no caso das raízes, toda área radicular era coletada. Os tecidos eram imediatamente pesados após a coleta. Uma média de 25g de raízes e 30g de folhas (peso fresco) foram obtidas em cada replicata biológica. Após a pesagem, as amostras foram lavadas em água bidestilada, maceradas em nitrogênio líquido e colocadas em acetona, temperatura ambiente, por um período de 72h com trocas de acetona a cada 12h e agitação constante de 60 rpm para retirada de pigmentos. O material foi liofilizado por um período mínimo de 24h ou até que estivesse completamente seco. Após isso, triturado em moedor elétrico, pesado e armazenado em alíquotas de 0,5g a -20°C até o momento de extração das proteínas.

**Tabela 2.** Solução nutritiva usada no cultivo hidropônico de plantas de pinhão manso.

\*s/d = sem diluição

| Sais                              |   | Massa molecular | Concentração (M) | mL/L (s/d)* | 1/2 força | 1/4 força |
|-----------------------------------|---|-----------------|------------------|-------------|-----------|-----------|
| Nitrato de Cálcio                 | Ca (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub><br>4H <sub>2</sub> O | 236,15          | 1                | 3           | 1,5       | 0,75      |
| Cloreto de Amônio                 | NH <sub>4</sub> Cl                                      | 53,49           | 1                | 4           | 2         | 1         |
| Potássio fosfato                  | K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                         | 174,18          | 1                | 1           | 0,5       | 0,25      |
| Sulfato de Magnésio               | MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O                    | 246,48          | 1                | 1           | 0,5       | 0,25      |
| Nitrato de Potássio               | KNO <sub>3</sub>  | 101,1           | 1                | 2           | 1         | 0,5       |
| Cloreto de Potássio               | KCl   | 74,56           | 1                | 2           | 1         | 0,5       |
| Ferro EDTA                        | FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O<br>ou              | 278,02          | 1                | 1           | 0,5       | 0,25      |
|                                   | FeCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O                    | 372,24          | 1                |             |           |           |
| <b>Solução de micronutrientes</b> |   |                 |                  |             |           |           |
| Ácido Bórico                      | H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                          | 61,83           | 0,04             | 1           | 0,5       | 0,25      |
| Cloreto de Manganês               | MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O                    | 197,9           | 0,009            |             |           |           |
| Sulfato de Cobre                  | CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O                    | 249,68          | 0,003            |             |           |           |
| Sulfato de Zinco                  | ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O                    | 287,54          | 0,007            |             |           |           |
| Molibdato de sódio                | NaMoO <sub>4</sub> .2h <sub>2</sub><br>O                | 241,95          | 0,0001           |             |           |           |

#### 4.4 Extração de proteínas

A extração de proteínas foi realizada pelo método descrito por Vasconcelos *et al.* (VASCONCELOS, NOGUEIRA *et al.* 2005). Pesou-se 100mg de tecido liofilizado de cada uma das amostras armazenadas a -20°C. A extração foi realizada em tampão piridina/SDS (piridina 50 mM, tiouréia 10 mM, SDS 1%, pH 5,0) na presença de polivinil-pirilrolidona (PVPP) em uma proporção de 1:40:2 (amostra/tampão/PVPP).

Com a mistura homogeneizada fazendo uso de vortex, a mesma foi agitada constantemente por um período de 2h a 4°C, seguida de centrifugação a 10000g por 30min. O sobrenadante foi coletado e ao precipitado foi adicionado o mesmo volume inicial de tampão para reextração seguindo o mesmo procedimento. Os sobrenadantes de ambas as extrações foram misturados e homogeneizados. Sendo então adicionado em quatro vezes o volume de ácido tricloroacético (TCA) 10% em acetona gelada e mantidos overnight a -20°C para precipitação das proteínas.

No dia seguinte o material foi centrifugado a 10000g por 30min, o sobrenadante descartado e o precipitado, adicionado de 1 mL de acetona gelada, foi agitado em vortex até que o pellet ficasse em suspensão para então prosseguir com centrifugação do material a 10000g por 10min. O procedimento foi repetido quatro vezes sempre descartando o sobrenadante e ressuspendendo o precipitado até que ele estivesse totalmente solto, evidenciando assim a retirada de todo o TCA da amostra. O precipitado com as proteínas extraídas foi seco a 30°C por 30min em concentrador (Eppendorf). As amostras foram solubilizadas em uréia 7M / tiouréia 2M. Foi realizada eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5% com SDS (SDS-PAGE) para análise do resultado da extração, utilizando 20 µg de proteínas, dosadas com base em ensaio de quantificação com reagente Bradford (BRADFORD, 1976).

#### 4.5 Hidrólise enzimática das amostras, concentração e limpeza dos peptídeos

Para realização da hidrólise, as concentrações das proteínas foram determinadas por ensaio fluorimétrico (Qubit® Quantitation Kit – Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante. Para a hidrólise das amostras de endosperma e folha, 100 µg de proteínas de cada amostra tiveram suas pontes de enxofre reduzidas com ditioneitol (DTT) 10 mM durante 1h a 30°C e alquiladas com iodoacetamida (IAA) 40 mM durante 30min a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Em seguida a concentração de uréia foi reduzida para 0,6M adicionando bicarbonato de amônio (BA) 50 mM, pH 8. A hidrólise foi feita adicionando tripsina (Promega,

Madison, WI, EUA) às amostras na proporção de 1:50 (tripsina:proteína) mantidas em incubação a 35° C por 18 horas. A reação foi interrompida com ácido fórmico 0,1% (concentração final).

Para as amostras de raiz, seguiu-se o protocolo de Velásquez et al. (2017) com algumas modificações. Cem microgramas de proteínas tiveram suas pontes de enxofre reduzidas com 10 mM de tris (2-carboxietil) fosfina (TCEP) durante 1h a 30°C, seguida de alquilação com 50 mM de iodoacetamida (30 min à temperatura ambiente), na ausência de luz e diluídas 1:10 com 50 mM de bicarbonato de trietilamônio (TEAB) pH 8, e digeridas com tripsina (1:50) por um período de 18 horas a 35° C. A reação da tripsina foi interrompida com ácido fórmico 0,1% (concentração final).

Para dessalinização e concentração dos peptídeos, o sobrenadante foi aplicado em colunas *stage tips* confeccionadas manualmente em resina Poros R2 (Applied Biosystems). Inicialmente foi feita lavagem da coluna em acetonitrila 100%, seguida de equilíbrio em ácido trifluoroacético 0,1% (TFA), adição dos peptídeos a coluna pré-equilibrada, adição de TFA 0,1% e por fim eluição por meio de dois passos de acetonitrila (ACN, 50 e 70%). Os peptídeos eluídos foram colocados no concentrador a vácuo (Eppendorf) por aproximadamente 3 horas a 40° C até que estivessem totalmente secos. As amostras de folha foram ressuspensas em 20 µL de ácido fórmico 0,1% e quantificados com Qubit®, após a determinação da concentração dos peptídeos um total de 6µg foi acondicionado em vials e injetados em espectrômetro de massas. As amostras de endosperma e raiz foram processadas de diferentes formas, como descrito a seguir.

#### **4.6 Fracionamento off-line em coluna de Fase Reversa (pH básico) das amostras de endosperma**

As amostras de endosperma foram ressuspensas em 20mM de bicarbonato de amônio (BA) e as concentrações dos peptídeos determinadas por ensaio fluorimétrico (Qubit® Quantitation Kit – Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante. Oitenta µg de peptídeos já ressuspensos em solução A (BA 20 mM) foram submetidos a fracionamento em HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Performance), objetivando um fracionamento maior dos peptídeos e aumento no número de identificações.

Foi usado o cromatógrafo UFLC Shimadzu, equipado com coluna de fase reversa C18 em pH básico (Phenomenex/Gemini, 250 x 4,6 mm, 5 µ). Para cada replicata biológica, os 80 µg de peptídeos foram aplicados em coluna através de gradiente de fase móvel entre solução

aquosa A e solução orgânica B (ACN 90%, 20mM de BA). O tempo total de corrida foi de 45min, com fluxo de 0,5 mL min<sup>-1</sup>, onde com o passar do tempo aumentava progressivamente a concentração de solvente B passando na coluna. Iniciando com 100% de solvente A, aumentando gradativamente até atingir 20% de B aos 20min, 60% aos 35min e a partir de 40 min até o término da corrida em 100% de B, finalizando com limpeza da coluna em solvente C (ACN 65%, H<sub>2</sub>O 35%). Sob leituras de 216 e 280 nm de absorbância foi acompanhada a eluição dos peptídeos. Após o fracionamento foi feito agrupamento de frações de modo a abranger todo o cromatograma, totalizando cinco frações. Cada uma das frações foi composta de 9 tubos, o volume dos tubos foi concentrado em Speed Vac até um volume em torno de 20 µL, os volumes foram transferidos para um mesmo tubo e foi realizada secagem total da fração. Cada uma das cinco frações foi ressuspensa em 16µl de ácido fórmico 0,1%, centrifugadas a 12000g e transferidas para os tubos (vials) para posterior injeção no espectrômetro de massas.

#### **4.7 Marcação com iTRAQ e fracionamento off-line HILIC das amostras de raiz**

Os peptídeos resultantes da digestão proteica das amostras de raiz foram ressuspensos em 20 mM de bicarbonato de trietilamônio (TEAB), quantificados com Qubit® e uma fração correspondente a 33 µg de cada replicata biológica foi submetida a marcação isobárica com o reagente iTRAQ® (AB Sciex, 4-plex), seguindo as recomendações do fabricante. A marcação com os reagentes 114, 115, 116 e 117 está detalhada na Tabela 3. Os reagentes foram distribuídos em replicatas biológicas diferentes, permanecendo incubados durante 1h à temperatura ambiente, a reação foi parada com adição de 60 µL de ácido fórmico 1%, e em seguida as soluções foram agrupadas, por fim o volume da mistura foi reduzido sob vácuo em concentrador até aproximadamente 10 µL.

**Tabela 3.** Esquema de marcação isobárica com iTRAQ® 4-plex de amostras de raízes de *J. curcas*. BTEF – baixo teor de ésteres de forbol; ATEF – alto teor de ésteres de forbol.

| <b>Amostra</b> | <b>Replicata biológica</b> | <b>Reagentes</b> |
|----------------|----------------------------|------------------|
| BTEF           | 1                          | 114              |
| BTEF           | 2                          | 115              |
| ATEF           | 1                          | 116              |
| ATEF           | 2                          | 117              |

As misturas concentradas foram diluídas em 90  $\mu\text{L}$  de solução A (ACN 90%, TFA 0,1%), centrifugadas à 10000 g e o sobrenadante coletado e fracionado usando cromatografia líquida de alta performance (HPLC), objetivando um maior fracionamento dos peptídeos, aumento no número de identificações, além da eliminação do excesso de reagente iTRAQ. Para tanto, foi usado cromatógrafo UFLC Shimadzu, equipado com coluna de interação hidrofílica HILIC (*Hydrophilic interaction liquid chromatography*; Cromatec, 2,0 mm x 15 cm, 3  $\mu\text{m}$ , TKSgel Amide-80). O grupo de peptídeos marcados foi aplicada na coluna e eluídos, por meio de gradiente de fase móvel entre solução A e solução aquosa B (TFA 0,1%), sob fluxo de 0,2 mL min<sup>-1</sup>, o gradiente consistiu em 100% de solução A por 5 min, aumentando progressivamente a concentração de solução B até alcançar 10% aos 10 min, 20% aos 55 min, 100% aos 60 min e reduzindo à 0% aos 65 min, sob fluxo de 0,2 mL.min<sup>-1</sup>. A eluição dos peptídeos foi monitorada por meio de leituras de absorvância nos comprimentos de onda de 216 e 280 nm. Após o fracionamento, as frações foram agrupadas com o cuidado para manter separados os picos de maior intensidade, resultando em sete frações para cada replicata biológica. Essas frações foram secas sob vácuo, ressuspensas em 16  $\mu\text{L}$  ácido fórmico 0,1%, centrifugadas à 12000 g e transferidas para os tubos (vials) para injeção no espectrômetro de massas.

#### 4.8 Análise por espectrometria de massas – LC-MS/MS

Para as amostras de endosperma as cinco frações obtidas da cromatografia em fase reversa em alto pH foram analisadas em três replicatas técnicas cada, sendo 2  $\mu\text{g}$  de peptídeos em 4  $\mu\text{L}$  de ácido fórmico 0,1% resultando uma concentração final de 0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Cada replicata técnica foi injetada em sistema nanoLC-EASY II (Proxeon Biosystems) acoplado a um espectrômetro de massas LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific). Inicialmente os peptídeos eram carregados em pré-coluna (3 cm x 100  $\mu\text{m}$  de diâmetro interno, resina ReproSil-Pur C18, 5  $\mu\text{m}$ , Dr. Maisch GmbH; Ammerbuch, Germany) e coluna PicoFrit-NewObjective (25 cm x 75  $\mu\text{m}$  diâmetro interno, resina ReproSil-Pur C18, 3  $\mu\text{m}$  Dr. Maisch GmbH; Ammerbuch, Germany). O gradiente aplicado foi de 120 min, partindo de 98 % de fase A (0,1% ácido fórmico, 5% ACN) até 20 % da fase B (0,1% ácido fórmico, 95% ACN) até os 77 min, chegando a 40% de fase B aos 107 min, passando de 40 a 95% até os 112 min e mantido em 95% de fase B até o fim da corrida, durante 8 min. Ao final, as colunas foram reequilibradas com fase A para uma nova corrida.

A ionização e transferência dos íons foi feita utilizando fonte de nano-electrospray (Thermo Scientific), em polaridade positiva, com potencial de 2.3 kV e aquecimento de 200 °C.

Ao eluírem da coluna, os peptídeos eram ionizados por eletronebulização (Electrospray Ionization, ESI) e tinham então suas massas/carga ( $m/z$ ) analisadas pelo LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific). Os espectros MS1 foram adquiridos em modo positivo, e os espectros MS/MS por *data dependent acquisition* (DDA). Cada evento de *full scan* compreendeu um intervalo de 350-1800  $m/z$ , resolução de 60.000 FWHM (para  $m/z$  400) e intensidade mínima de  $1 \times 10^5$ . Para obtenção dos MS2, os seis íons mais intensos eram selecionados e fragmentados usando dissociação induzida por colisão (CID) com energia de colisão normalizada de 30, janela de isolamento de  $m/z$  2 e exclusão dinâmica de 45 s. Os cromatogramas e espectros foram visualizados pelo software Xcalibur v.2.1, nos quais foi verificado o padrão cromatográfico quanto à complexidade de cada fração e a reprodutibilidade entre as replicatas biológicas.

As amostras de folha e as sete frações de amostras de raiz obtidas no fracionamento por HILIC foram analisadas em triplicata técnica, também em concentração final de 0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  e injetadas 4  $\mu\text{L}$  por replicata técnica em um sistema de nano-cromatografia líquida (Easy-nLC 1000, Thermo Scientific) acoplada a espectrômetro de massas híbrido Quadrupolo-Orbitrap (Q Exactive Plus, Thermo Scientific). Para ambas as amostras inicialmente os peptídeos eram carregados inicialmente em uma pré-coluna (2cm x 100  $\mu\text{m}$ , ReproSil-Pur C18-AQ, resina de 5  $\mu\text{m}$ ; Dr. Maisch, Germany) e na sequência por uma coluna PicoFrit-NewObjective (28 cm x 75  $\mu\text{m}$  diâmetro interno, resina ReproSil-Pur C18, 3  $\mu\text{m}$  Dr. Maisch GmbH; Ammerbuch, Germany).

Para as amostras de folha, os peptídeos foram eluídos utilizando um gradiente de 180 min partindo 95% de fase A (0,1% ácido fórmico, 5% ACN), e 5% de fase B (0,1% ácido fórmico, 95% ACN) aumentando gradativamente até atingir 45% aos 160 min, 95% aos 167 min e mantendo os 95% até o final da corrida. No caso das amostras de raiz, um gradiente de 120 min começando de 100% da fase A (0,1% ácido fórmico, 5% ACN) até 45% da fase B (0,1% ácido fórmico, 95% ACN) em 100 min, de 45 a 95% da fase B em 7 min e 13 min com 95% da fase B foi aplicado. Ao final, as colunas foram reequilibradas para uma nova corrida.

O espectrômetro de massas operou no modo de aquisição análise dependente de dados (*Data dependent acquisition* - DDA), com *full scan* no MS1 na faixa de 375 – 2000  $m/z$ , resolução de 70.000 (para  $m/z$  200), AGC (*Automatic Gain Control*) definido em  $1 \times 10^5$  e tempo máximo de injeção de 50 ms. Os 20 íons mais abundantes foram selecionados para as amostras de folha e os 15 no caso de raiz e fragmentados em célula de colisão HCD (*Higher-energy collisional dissociation*), com energia de colisão normalizada em 30 (NCE) e os fragmentos analisados no MS2 usando resolução de 17.500 (para  $m/z$  200), com tempo máximo de injeção

de 100 ms, AGC de  $1 \times 10^5$ , janela de isolamento de  $m/z$  2,0 para amostras de raiz e  $m/z$  1.2 para amostras de folha e exclusão dinâmica de 45 s. Para os íons sem determinação de carga e com apenas uma carga não foram adquiridos espectros de MS2. Os cromatogramas e espectros foram visualizados pelo software Xcalibur v.2.1., nos quais foi verificado o padrão cromatográfico quanto à complexidade de cada fração e a reprodutibilidade entre as replicatas biológicas para folhas e raízes.

## 4.9 Análise de dados

### 4.9.1 Identificação de proteínas

Os dados oriundos da espectrometria foram submetidos a análise no software Proteome Discoverer 2.1 (Thermo Fisher Scientific). A identificação dos peptídeos por *Peptide Spectrum Match - PSM* foi realizada com o algoritmo Sequest HT, contra uma base de dados de *Jatropha curcas*, disponível em Uniprot (<http://www.uniprot.org/>), em março de 2017 combinado com contaminantes mais comuns em espectrometria de massas.

O parâmetro de busca está sujeito ao equipamento utilizado e modo de aquisição de cada uma das amostras. Para endosperma foi usado: hidrólise trípica total, número de clivagens perdidas igual a dois, tolerância de massa do íon precursor de 10 ppm e íons fragmento de 0,5 Da, oxidação da metionina como modificação variável e carbamidometilação de cisteína como modificação fixa. Para as amostras de folha os parâmetros de endosperma foram mantidos, diferenciando a tolerância de massa dos íons fragmentos que foi de 0,1 Da.

Para as amostras de raiz os seguintes critérios foram adotados: tolerância de massa do peptídeo de 10 ppm; tolerância de massa dos fragmentos 0,1 Da; clivagem por tripsina total, com limite máximo de duas clivagens perdidas; como modificações variáveis a oxidação da metionina (+ 15,995 Da), marcação por iTRAQ 4plex (+ 144,102 Da em lisina, tirosina e extremidade N-terminal) e modificação fixa a carbamidometilação da cisteína (+ 57,021 Da). Em todos os casos, foi utilizada a ferramenta Target Decoy PSM Validator que processa os dados contra uma base de dados reversa e estima a taxa de falsa descoberta ou FDR (*False Discovery Rate*). As proteínas foram agrupadas usando o princípio da máxima parcimônia.

Os resultados da busca foram submetidos a um filtro, onde foram consideradas as proteínas caracterizadas como: *master proteins*, identificadas por ao menos um peptídeo único, e que estivessem presentes em no mínimo duas replicatas biológicas. Para aquelas proteínas identificadas como *Uncharacterized* foi realizado Blastp usando como parâmetros: e-value

1.0E-10, com número de *Blast hits* igual a 20, sendo considerado o de maior alinhamento, para o corte de comprimento HSP (High-scoring Segment Pair) foi usado o padrão do software de 33, este é usado para evitar ocorrências em que o comprimento da região correspondente é menor que 100 nucleotídeos, a sensibilidade do Blast na busca pelo comprimento da palavra inicial do alinhamento local foi igual a 3 (valor padrão do software para Blastp). O Blastp foi realizado contra o banco de dados não redundante de *Ricinus communis* e *Arabidopsis thaliana* do Uniprot utilizando a ferramenta de anotação Blast2GO (CONESA; GOTZ, 2008). As proteínas dos diferentes acessos em cada tecido e entre os tecidos, foram agrupadas usando o diagrama de Venn, através do software Venny 2.1 disponível em: (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/Venny/>).

#### 4.9.2 Classificação funcional das proteínas identificadas

As proteínas identificadas em cada tecido foram classificadas em diferentes categorias funcionais de ontologia MapMan BIN (THIMM *et al.*, 2004) usando pipeline Mercator (<https://plabipd.de/portal/mercator4>). O pipeline Mercator atribui automaticamente termos funcionais às sequências de proteínas ou nucleotídeos, ele usa a ontologia MapMan 'BIN', que é adaptada para a anotação funcional dos dados 'ômicos' de plantas. O procedimento de classificação executa pesquisas de sequência paralela em bancos de dados de referência, compila os resultados e calcula os BINs do MapMan mais prováveis para cada consulta. As anotações funcionais previstas pela Mercator alcançam precisões acima de 90% quando comparadas com a anotação manual (LOHSE *et al.*, 2014). Para obter informações mais detalhadas das funções das proteínas identificadas, as mesmas foram classificadas e agrupadas manualmente em rotas de interesse nos bancos de dados do *Kegg Pathway Database* ([www.genome.jp/kegg/](http://www.genome.jp/kegg/)). Foi usado ainda o Transporter Classification Database (<http://www.tcdb.org/progs/blast.php>) para análise dos transportadores identificados em nosso estudo.

#### 4.9.3 Análises quantitativas

Os valores quantitativos para cada proteína foram obtidos pelo programa Proteome Discoverer 2.1 (Thermo Fisher Scientific) usando os módulos *Precursor Ion Area Detection* (endosperma e folha) e *Reporter Ion Quantification* (raízes). No primeiro caso foram produzidos médias da intensidade dos peptídeos identificados e os valores quantitativos para as

proteínas são calculados através do valor médio de até três peptídeos únicos mais intensos para cada proteína. Para quantificação usando o iTRAQ-4plex, o módulo *Reporter Ion Quantification* suporta a identificação e quantificação dos íons repórteres nos espectros de MS/MS. A quantificação das proteínas é estimada através da abundância relativa dos peptídeos nas amostras, obtida pela comparação da intensidade do pico dos íons repórteres nos espectros de MS/MS.

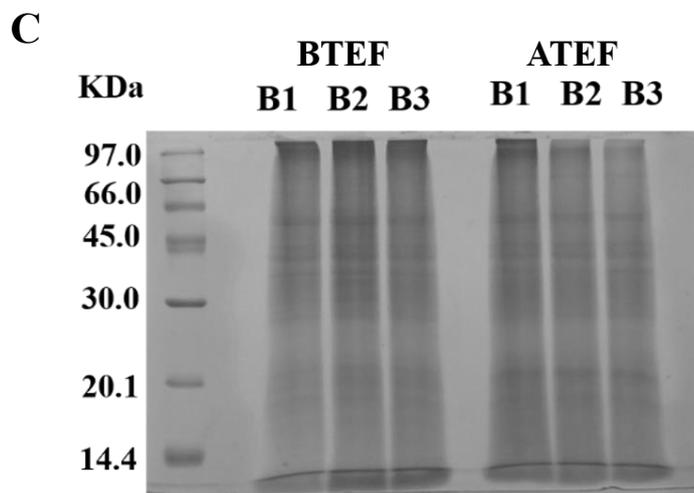
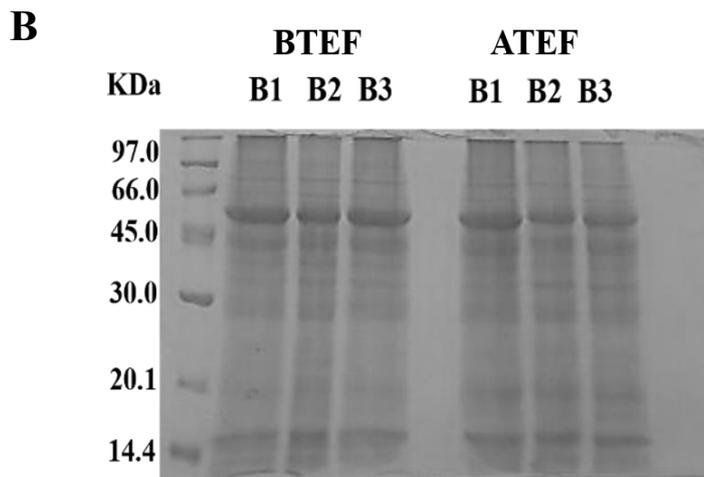
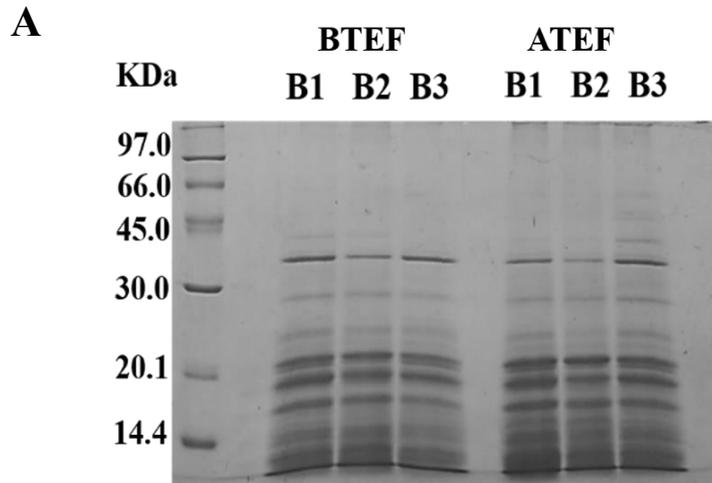
Os dados quantitativos foram tratados usando o software Perseus versão 1.6.0.2. (TYANOVA *et al.*, 2016). Para a análise estatística, inicialmente o valor quantitativo das proteínas foram transformados em  $\log_2$  e normalizados subtraindo-se pela mediana da distribuição da amostra. A seguir, proteínas com menos de 50% de valores válidos em cada grupo (ATEF/BTEF) foram removidas da análise e procedeu-se à imputação de *missing values* utilizando-se a ferramenta de imputação disponível no programa Perseus (substituição randômica a partir da distribuição normal de cada amostra, usando-se apenas valores baixos que mimetizam medidas pouco abundantes). Para verificação de proteínas diferencialmente expressas entre os diferentes acessos foi aplicado test-T de Student's ( $p < 0,05$  sob o p - value). As análises de clusterização hierárquica também foram realizadas no programa Perseus (correlação de Pearson) após normalização dos dados por Z-score, a partir deste teste foram identificadas as proteínas diferencialmente abundantes.

## **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)**

A eletroforese em gel de poliacrilamida realizada a cada extração de proteínas para verificação das mesmas, demonstra a qualidade das extrações de proteínas para as replicatas biológicas (Figura 3), das amostras de endosperma (A), folhas (B) e raízes (C). A qualidade e homogeneidade entre as extrações das diferentes replicatas biológicas é fundamental para garantir análises com a menor variabilidade possível. Pode-se verificar algumas sutis diferenças nos perfis eletroforéticos dos diferentes acessos e grande diferença entre os perfis dos diferentes tecidos, no entanto entre as replicatas técnicas de cada tecido e acesso não houve diferenças.

**Figura 3.** Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida com SDS das replicatas biológicas dos diferentes tecidos de *Jatropha curcas* com alto teor de ésteres de forbol (ATEF) e baixo teor de ésteres de forbol (BTEF). (A), (B) e (C) correspondem a endosperma, folhas e raízes respectivamente, foram aplicados 20 µg de proteínas em cada poço.



## **5.2 Fracionamento off-line de amostras de endosperma e raízes de *J. curcas***

### **5.2.1 Fracionamento off-line em coluna de fase reversa das amostras de endosperma**

Nas amostras de endosperma, após o fracionamento dos peptídeos em coluna de fase reversa foram obtidos os cromatogramas observados na Figura 4. Pode-se verificar a reprodutibilidade entre as replicatas biológicas de cada acesso (Figura 4A e Figura 4B). Em cada fracionamento foram coletados 45 tubos, estes foram agrupados em 5 frações formadas de 9 tubos cada. O modo como foram selecionadas as frações para injeção em espectrômetro de massas é apresentado na Figura 4B, e a junção das frações foi realizada de modo a abranger todo o cromatograma.



### **5.2.2 Fracionamento off-line em coluna HILIC das amostras de raízes de *J. curcas***

As amostras de raízes de pinhão manso foram marcadas isobaricamente com reagente iTRAQ® 4-plex (AB Sciex), agrupadas e fracionadas em coluna de interação hidrofílica (HILIC). O cromatograma apresentado na Figura 5 foi obtido no fracionamento das amostras de raízes, no qual, foram obtidos 25 tubos e estes foram agrupados em 7 frações distribuídas de modo a reduzir a complexidade da amostra visando o aumento de identificações, as mesmas estão representadas na Figura 5.

**Figura 5.** Cromatograma obtido pelo fracionamento em coluna HILIC dos peptídeos obtidos pela digestão triptica de proteínas extraídas de raízes de acessos com alto teor de ésteres de forbol (ATEF) e baixo teor de ésteres de forbol (BTEF) e marcados com iTRAQ. Os numerals da parte inferior da figura indicam as frações que foram reunidas após a cromatografia e posteriormente injetados em espectrômetro de massas.



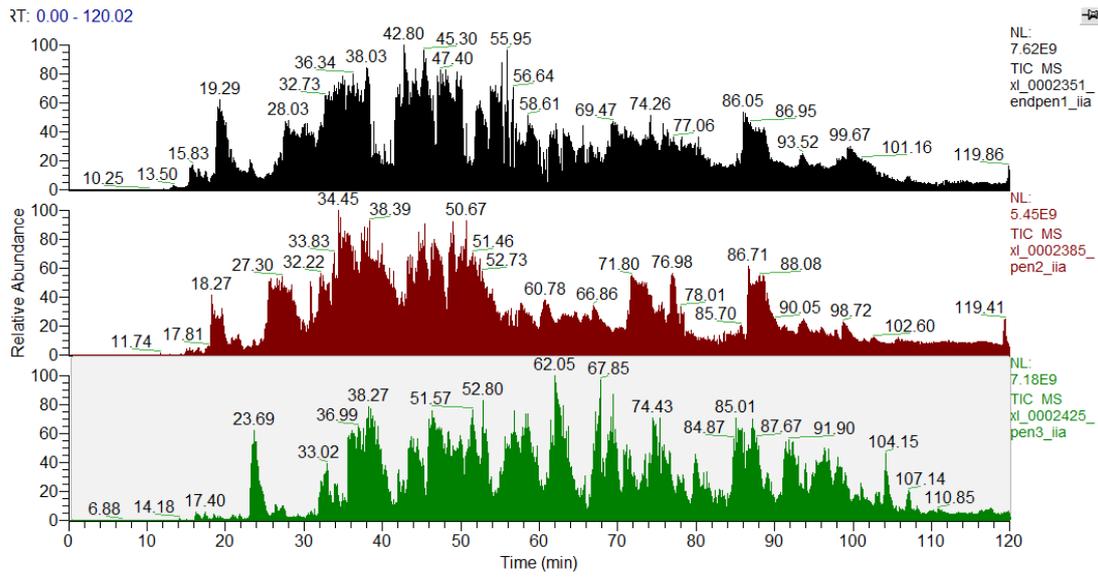
### **5.3 Análise por espectrometria de massas – LC-MS/MS de amostras de endosperma, folhas e raízes de acessos ATEF e BTEF de *J. curcas***

#### **5.3.1 Análise por espectrometria de massas – LC-MS/MS de proteínas extraídas do endosperma de acessos ATEF e BTEF de *J. curcas***

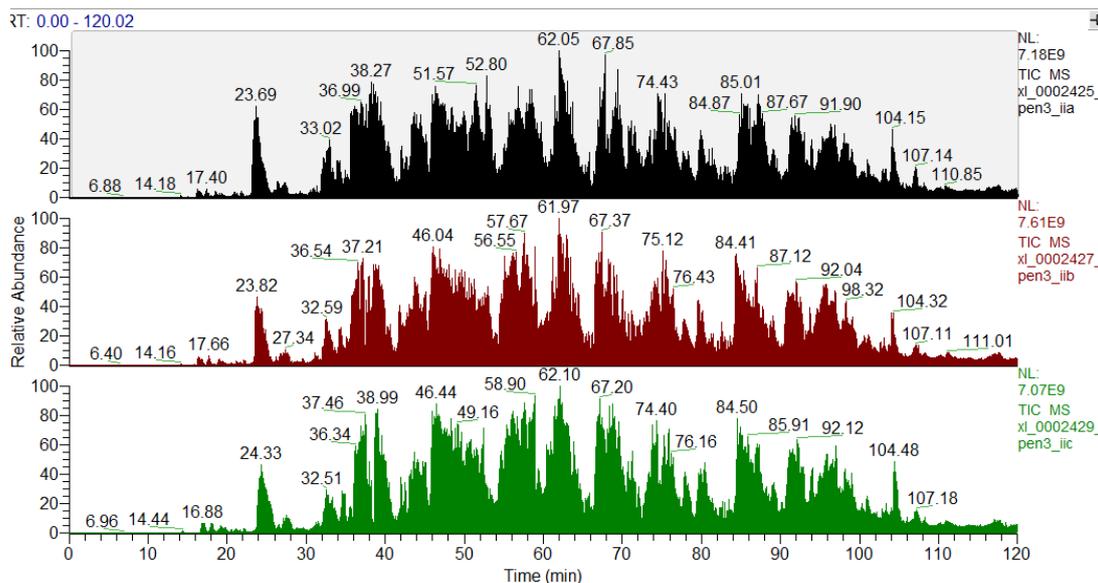
Cada uma das cinco frações obtidas em fracionamento em coluna de fase reversa, foram analisadas em triplicata técnica em espectrômetro de massas do tipo LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific). Um cromatograma representativo das 5 frações para cada replicata biológica, e um cromatograma demonstrativo da reprodutibilidade das replicatas técnicas são mostrados nas Figuras 6 e 7 A e B, para as amostras de acessos ATEF e BTEF respectivamente.

**Figura 6. (A)** Cromatograma total de íons da fração 2 obtido no fracionamento em coluna de fase reversa das três replicatas biológicas (endosperma) dos acessos ATEF de pinhão manso (*Jatropha curcas*). **(B)** Cromatogramas representativos da reprodutibilidade entre as replicatas técnicas das três replicatas biológicas, tomando como exemplo as replicatas técnicas da fração 3 da replicata biológica 3.

**A**

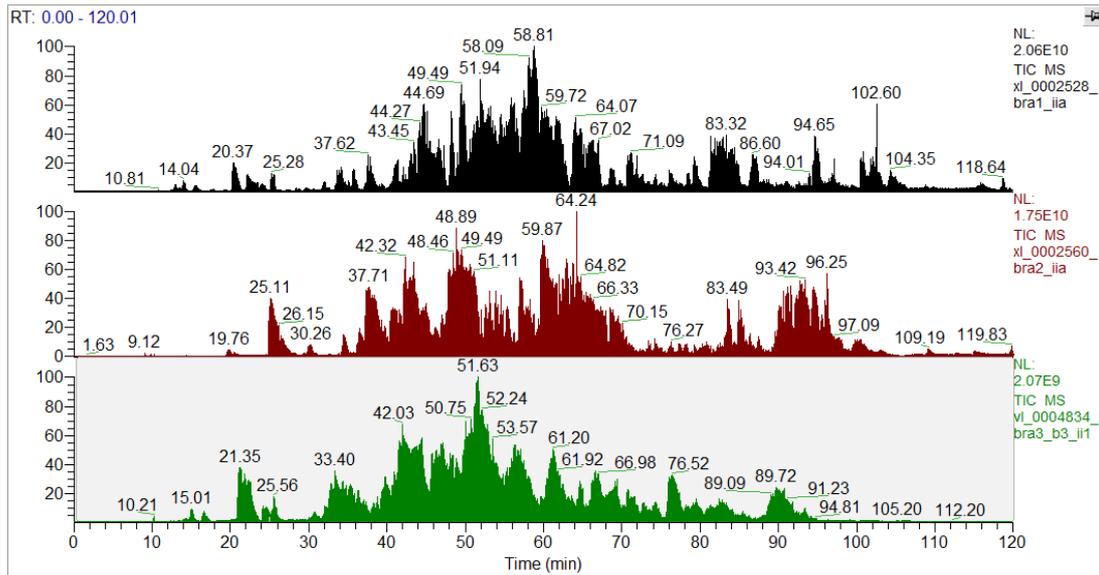


**B**

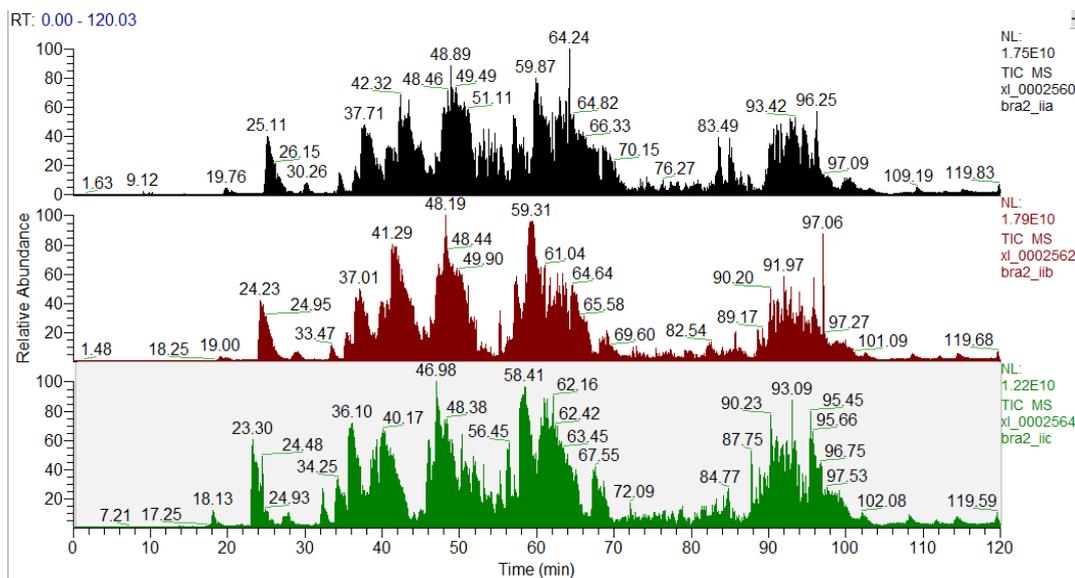


**Figura 7. (A)** Cromatograma total de íons da fração 2 obtida no fracionamento em coluna de fase reversa das três replicatas biológicas (endosperma) do acesso BTEF de pinhão manso (*Jatropha curcas*). **(B)** Cromatogramas representativos da reprodutibilidade entre as réplicas técnicas das três replicatas biológicas, tomando como exemplo as replicatas técnicas da fração 2 da replicata biológica 2.

**A**



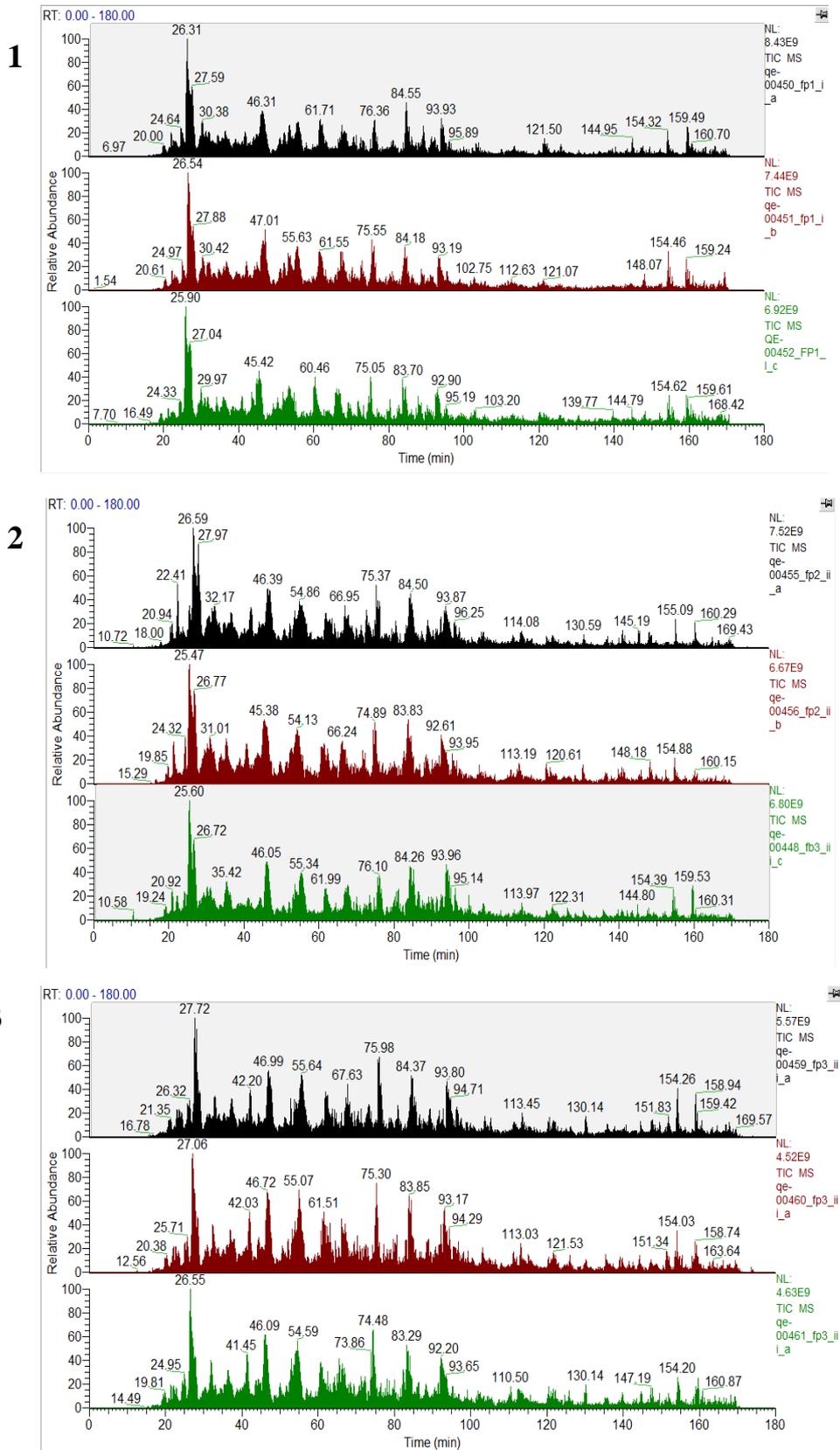
**B**



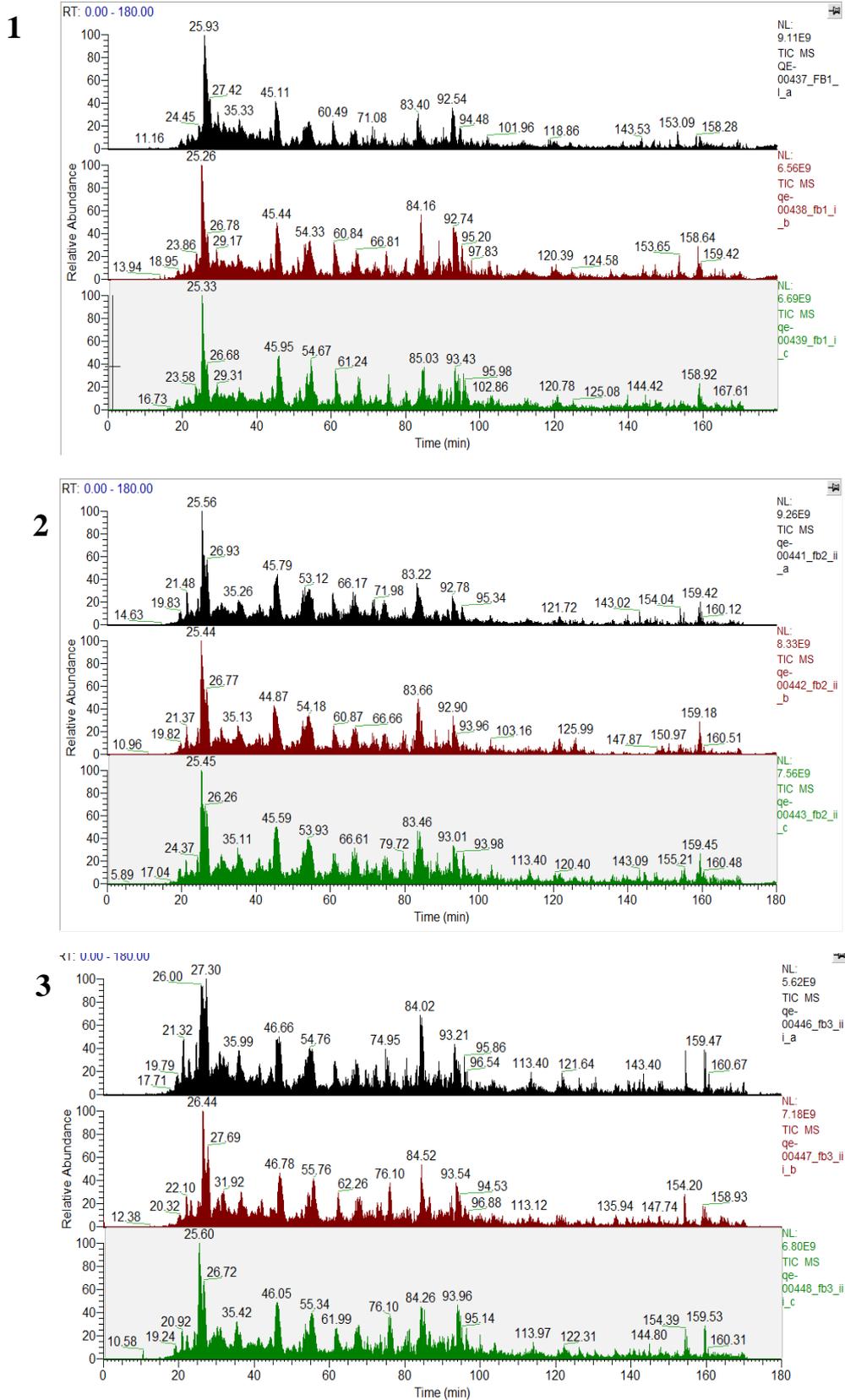
### **5.3.2 Análise por espectrometria de massas – LC-MS/MS de proteínas extraídas de folhas dos acessos ATEF e BTEF de *J. curcas***

A análise das amostras de folha obtidas em corrida no espectrômetro de massas híbrido Quadrupolo-Orbitrap (Q Exactive Plus, Thermo Scientific) estão representadas nas Figuras 8 e 9, onde são mostrados os cromatogramas com a reprodutibilidade entre as replicatas técnicas e biológicas de ambos os acessos de pinhão manso.

**Figura 8.** Cromatograma total de íons dos hidrolisados tríplicos das três replicatas biológicas e técnicas 1, 2 e 3 de folhas do acesso ATEF de pinhão manso (*Jatropha curcas*).



**Figura 9.** Cromatograma total de íons dos hidrolisados tríplicos das três replicatas biológicas e técnicas 1, 2 e 3 de folhas do acesso BTEF de pinhão manso (*Jatropha curcas*).

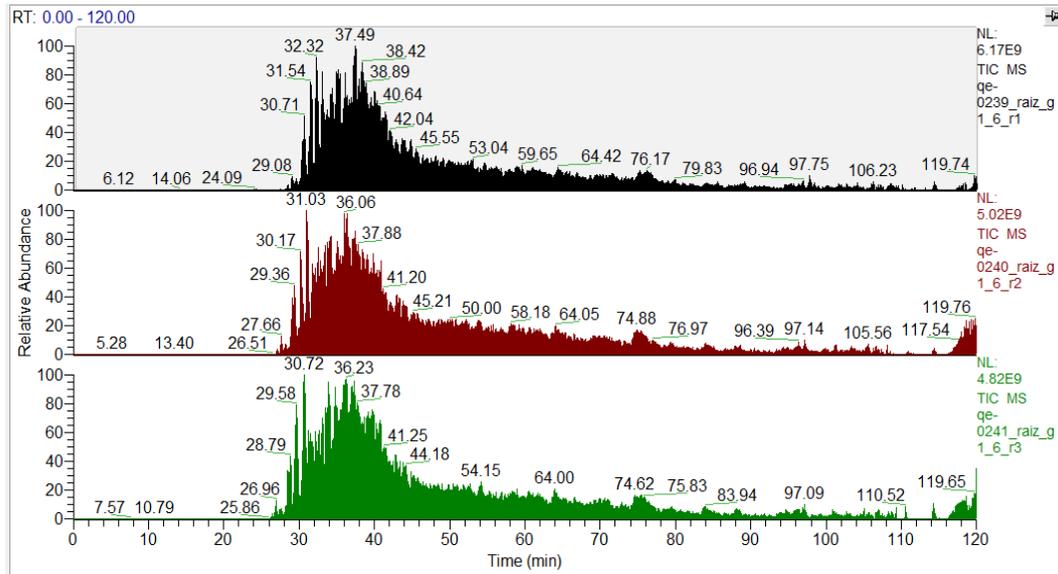


### **5.3.3 Análise por espectrometria de massas – LC-MS/MS de proteínas extraídas de raízes dos acessos ATEF e BTEF de *J. curcas***

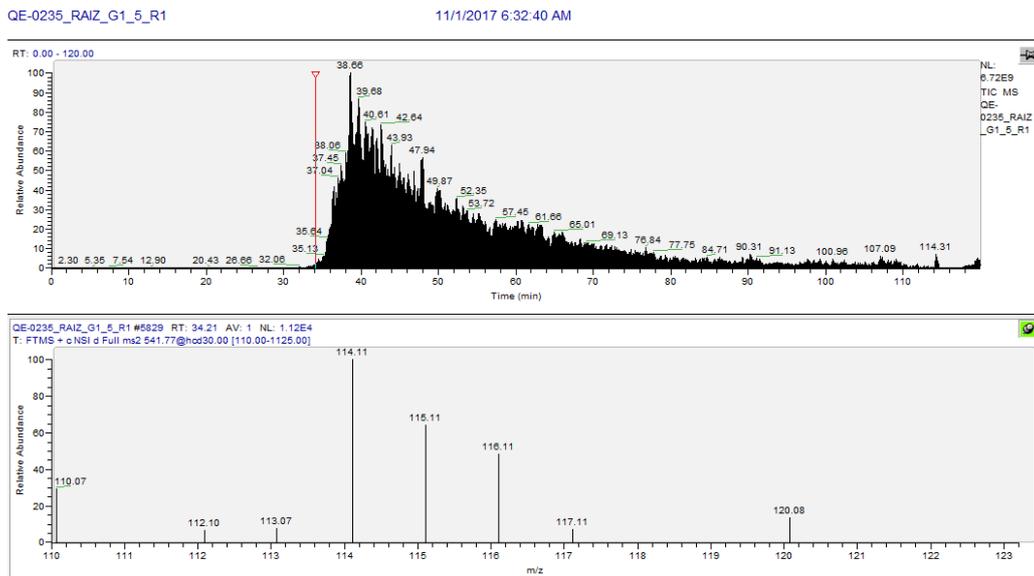
As sete frações obtidas no fracionamento em coluna HILIC das amostras de raízes de pinhão manso marcadas isobaricamente foram injetadas em espectrômetro de massas híbrido Quadrupolo-Orbitrap (Q Exactive Plus, Thermo Scientific). Um exemplo dos cromatogramas totais obtidos na corrida das amostras de raízes de pinhão manso e um cromatograma mostrando a detecção dos íons repórteres ( $m/z$ : 114, 115, 116 e 117) são mostrados na Figura 10A e B respectivamente.

**Figura 10.** (A) Cromatogramas total de íons da fração 6 obtido no fracionamento em coluna HILIC das duas replicatas biológicas (raízes) dos acessos ATEF e BTEF de pinhão manso (*Jatropha curcas*). (B) Espectro de MS2 mostrando a detecção dos íons repórteres (m/z: 114, 115, 116 e 117).

**A**



**B**



#### 5.4 Identificação das proteínas de endosperma, folhas e raízes de *J. curcas*

Neste estudo, foram identificadas um total de 5068 proteínas, com apenas 283 proteínas compartilhadas entre os tecidos, o que corresponde a 5,6% do total de identificações. Ao comparar as análises das proteínas identificadas em endosperma, folhas e raízes de *J. curcas*, as raízes foram o tecido com maior número de identificações (4532), seguido de folhas (1775) e endosperma (503). Avaliando os tecidos, 115 proteínas são exclusivas de endosperma, 403 proteínas são exclusivas de folha e 3091 proteínas apareceram exclusivamente em raízes, considerando os filtros estabelecidos neste estudo. As proteínas identificadas exclusivamente em raízes corresponderam a mais de 61% do total de identificações. Considerando o fato de diferentes estratégias e equipamentos terem sido usados para cada tecido a realização do comparativo entre as identificações é passível de falhas na exatidão das comparações e os dados quantitativos dos mesmos não podem ser comparados. Portanto, foram realizadas análises qualitativas e quantitativas para cada tecido e entre acessos e análises qualitativas verificando as proteínas presentes entre tecidos e acessos diferentes. A Figura 11 mostra os dados gerais obtidos (11A), e o diagrama de Venn do comparativo das identificações entre os tecidos (11B).

O estudo de diferentes tecidos (endosperma, folhas e raízes) de acessos de pinhão manso com teores de ésteres de forbol contrastantes revelou proteínas exclusivas de cada tecido, algumas envolvidas em rotas de interesse como a síntese dos diterpenos. Estes resultados podem auxiliar na elucidação de rotas ainda pouco conhecidas bem como dar embasamento para estudos mais aprofundados e direcionados na busca por respostas quanto a produção e possível transporte de compostos como os terpenos para outras partes da planta. Os resultados obtidos para cada tecido, bem como um comparativo entre os tecidos, são descritos a seguir.

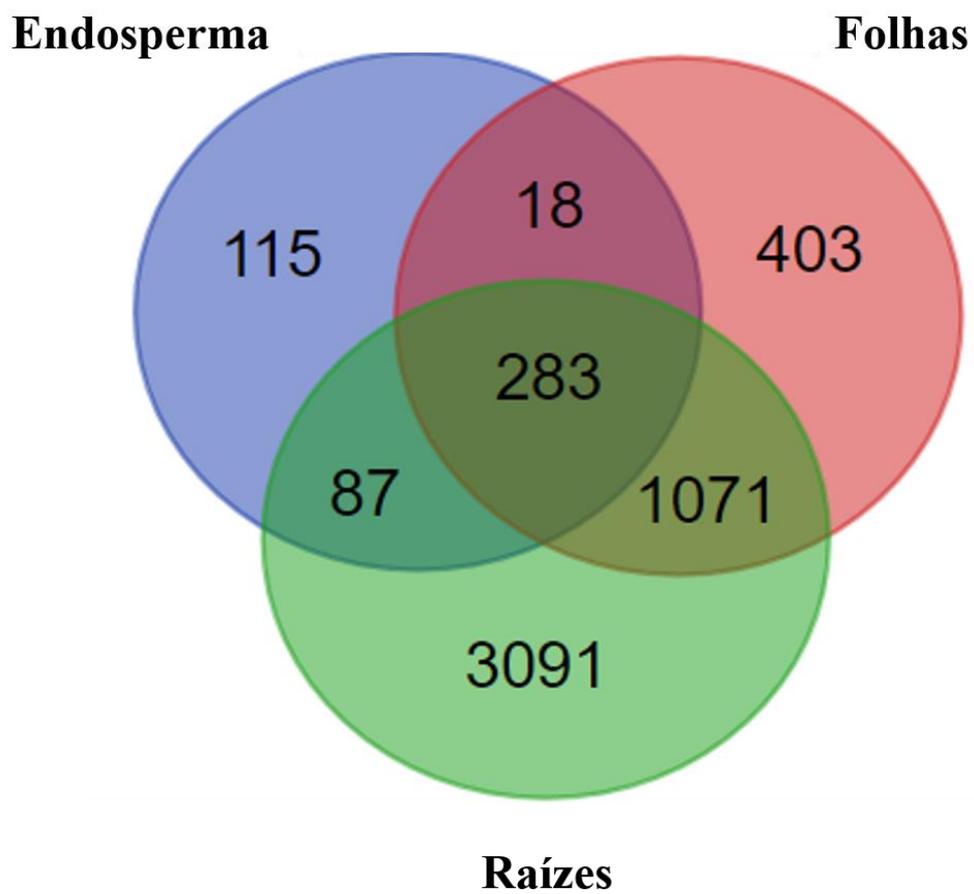
O genoma de *J. curcas* ainda não foi totalmente anotado, mesmo já tendo sido sequenciado, o que resultou num elevado número de proteínas identificadas como não caracterizadas. Para dar continuidade as análises o passo inicial foi a realização de um Blastp usando os bancos de dados de *R. communis* e *A. thaliana*, o que possibilitou a identificação destas proteínas inicialmente classificadas como não caracterizadas. A partir da descrição adequada de todas as proteínas identificadas foi possível a realização da classificação funcional das mesmas usando o MapMan BIN com pipeline Mercator (<https://plabipd.de/portal/mercator4>) e o enriquecimento da classificação das rotas de interesse foi feito usando o KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), (<https://www.genome.jp/kegg/>).

**Figura 11.** A. Proteínas identificadas em endosperma, folhas e raízes dos acessos ATEF e BTEF de *Jatropha curcas*. B. Diagrama de Venn representando as proteínas identificadas na análise proteômica nos diferentes acessos de *Jatropha curcas*.

**A**

| Amostra | Endosperma | Folhas | Raízes |
|---------|------------|--------|--------|
| ATEF    | 435        | 1415   | 3001   |
| BTEF    | 339        | 1645   | 4521   |

**B**



#### 5.4.1 Identificação das proteínas em amostras de raízes de *J. curcas*

Foram identificadas um total de 4850 proteínas, destas 4532 se enquadraram no filtro de ao menos um peptídeo único e de estar presente nas duas replicatas biológicas, os dados gerais da análise são apresentados na Figura 12 A. Deste total 2990 proteínas o que corresponde a 66% do total são comuns a ambos os acessos, 1531 são exclusivas do acesso de baixo teor de teor de ésteres de forbol mediante o filtro estabelecido e apenas 11 são exclusivas do acesso de alto teor de ésteres como é mostrado no diagrama de Venn Figura 12B. O fato do maior número de identificações exclusivas no acesso de baixo teor de ésteres de forbol não significa que as proteínas não estejam também presentes nas amostras de alto teor de ésteres de forbol, muitas apareceram em apenas uma replicata biológica, não se enquadrando no filtro estabelecido e tal fato pode ser explicado também por estas proteínas estarem pouco abundantes e não terem sido detectadas nas análises, conforme pode ser verificado na Figura 10B durante toda a análise os espectros das amostras de alto teor de ésteres de forbol apresentaram menor intensidade em relação as amostras de baixo teor de ésteres de forbol.

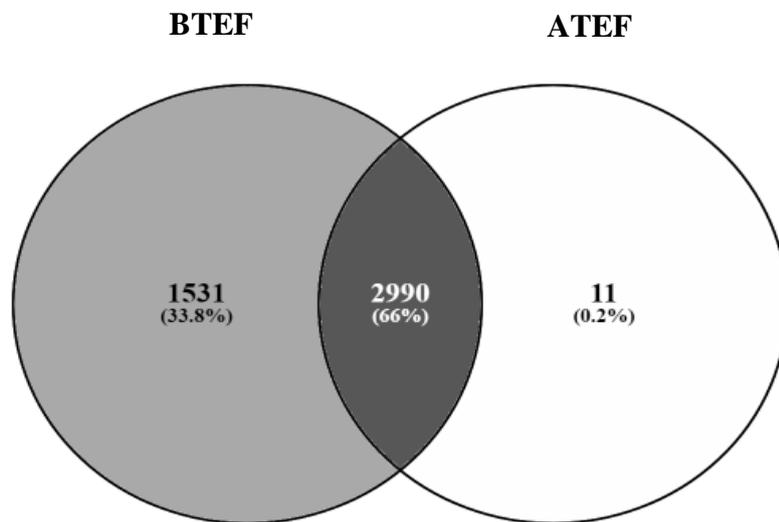
Das 4532 proteínas identificadas em raízes de pinhão manso, 2347 não foram classificadas, e por este fato submetidas a Blastp usando os bancos de dados de *R. communis* e *A. thaliana* através da ferramenta Blast2GO. Todas as proteínas identificadas, o resultado do Blastp realizado e o número de peptídeos únicos de cada proteína podem ser observados na Tabela Suplementar 1. A análise de componente principal (PCA) mostrou dois componentes estatisticamente diferentes e identificou distinção entre os perfis proteicos dos acessos de alto e baixo teor (Figura 12C). As raízes foram o tecido com maior número de identificações, e também o tecido onde foi realizada o maior número de identificações de proteínas de interesse quanto a síntese de terpenos e diterpenos.

**Figura 12.** (A) Proteínas identificadas e quantificadas em raízes dos acessos ATEF e BTEF de *Jatropha curcas*. (B) Diagrama de Venn representando as proteínas identificadas na análise proteômica de raízes nos diferentes acessos de pinhão manso. (C) Análise de componente principal do proteoma de raízes de *Jatropha curcas*.

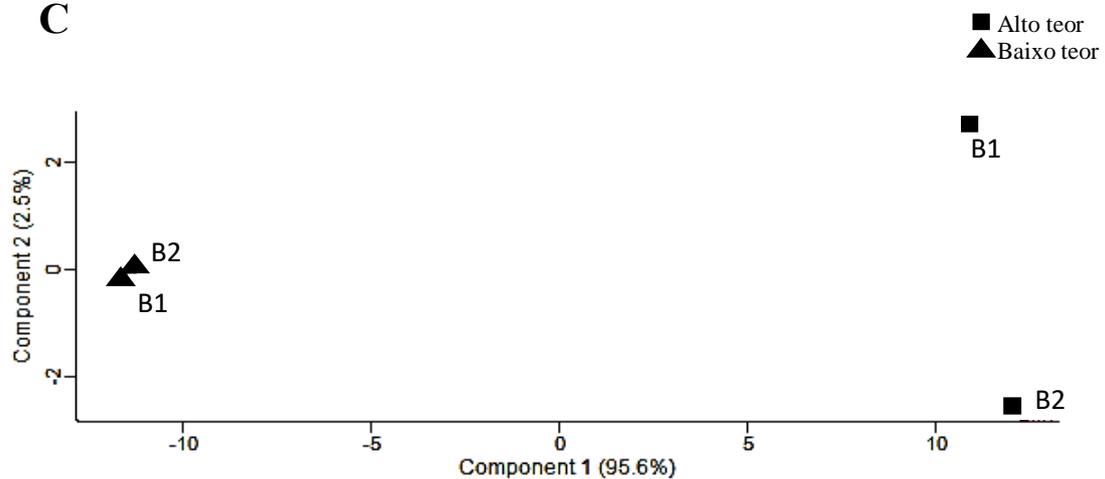
**A**

|             | Peptídeos únicos | Grupos de proteínas | Proteínas quantificadas | Proteínas diferencialmente abundantes (p-valor < 0.05) |
|-------------|------------------|---------------------|-------------------------|--|
| <b>ATEF</b> | 16400            | 3001                | 2515                    | 185  |
| <b>BTEF</b> | 19045            | 4521                |                         |  |

**B**



**C**



#### 5.4.2 Identificação das proteínas em amostras de folhas de *J. curcas*

A análise proteômica de amostras de folha de *J. curcas* resultou na identificação de 2308 proteínas, destas 1775 proteínas apareciam em no mínimo duas replicatas biológicas essas foram consideradas neste estudo. A Figura 13A mostra o número de proteínas identificadas, número de peptídeos únicos, número de proteínas usadas nas análises qualitativas e número de proteínas diferencialmente expressas. Do total de proteínas identificadas 1285 eram comuns a ambos os acessos, o que corresponde a 72,4% do total, 360 (20,3%) apareceram apenas no acesso de baixo teor e 130 (7,3%) no acesso de alto teor de ésteres de forbol de acordo com o filtro utilizado como mostra o diagrama de Venn (Figura 13B) mostra a distribuição destas proteínas para cada acesso.

Das 1775 proteínas encontradas, 1323 foram identificadas como não caracterizadas e tiveram de ser submetidas a um Blastp usando os bancos de dados de *Ricinus communis* e *Arabidopsis thaliana*. Todas as proteínas identificadas, o resultado do Blast realizado e o número de peptídeos únicos estão descritos na Tabela Suplementar 1. A análise de componente principal (PCA) mostrou dois componentes estatisticamente diferentes e identificou distinção entre os perfis proteicos dos acessos ATEF e BTEF (Figura 13C).

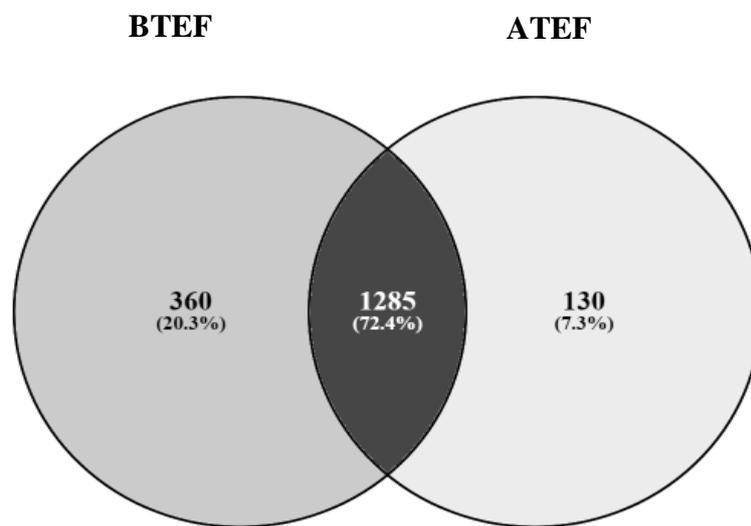
As folhas do pinhão manso têm sido vastamente estudadas quanto ao seu potencial medicinal como anti-inflamatório (GUBITZ *et al.*, 1999), além de ser de interesse agrícola atuando no controle de patógenos de plantas (RATNADASS e WINK, 2012). O único estudo proteômico realizado em folhas de pinhão manso verificou os efeitos do estresse por frio, usando a técnica de digestão *in gel* de proteínas, neste estudo foram identificadas apenas 8 proteínas, desde então a maioria dos estudos na área tem focado na proteômica de seus frutos (LIANG *et al.*, 2007). Este é o primeiro estudo proteômico abrangente de folhas de *J. curcas*.

**Figura 13.** (A). Proteínas identificadas e quantificadas em folhas de acessos ATEF e BTEF de *Jatropha curcas*. (B) Diagrama de Venn representando as proteínas identificadas na análise proteômica de folhas nos diferentes acessos de pinhão manso. (C) Análise de componente principal do proteoma de folhas de *Jatropha curcas*.

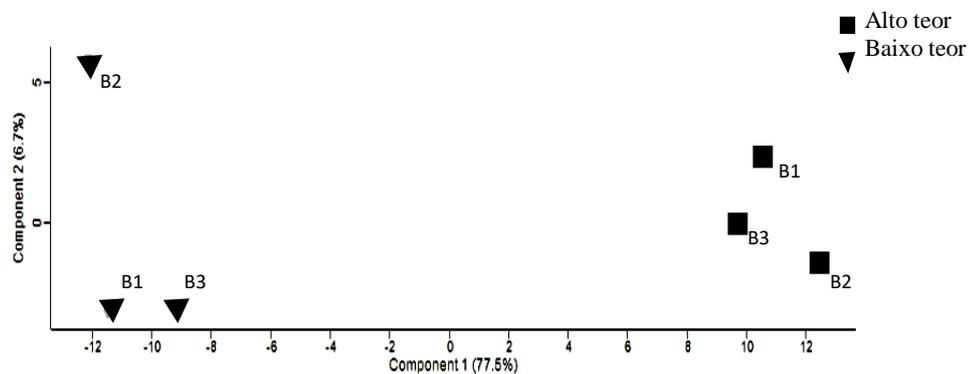
**A**

| Amostra | Peptídeos únicos | Grupos de proteínas | Proteínas quantificadas | Proteínas diferencialmente abundantes (p-valor < 0.05) |
|---------|------------------|---------------------|-------------------------|--|
| ATEF    | 5596             | 1415                | 1082                    | 72   |
| BTEF    | 6017             | 1645                |                         |  |

**B**



**C**



### 5.4.3 Identificação das proteínas em amostras de endosperma de *J. curcas*

Foram identificadas um total de 1386 proteínas, por no mínimo um peptídeo único. Estas foram submetidas a um filtro, onde se considerou apenas aquelas que apareciam em no mínimo duas replicatas biológicas, objetivando aumentar a confiabilidade das identificações. A Figura 14A mostra o número de proteínas identificadas, o número de peptídeos únicos, o número de proteínas usadas nas análises qualitativas e o número de proteínas diferencialmente expressas.

Considerado o filtro, este estudo identificou 503 proteínas no endosperma de diferentes acessos de pinhão manso. O diagrama de Venn (Figura 14B) mostra a distribuição destas proteínas para cada acesso. Das 503 proteínas, 68 proteínas foram observadas exclusivamente no acesso de baixo teor, 164 proteínas no acesso de alto teor e mais da metade, 271 proteínas, o que corresponde a 53,9%, são comuns em ambos os acessos. Das 503 proteínas encontradas, 357 foram identificadas como “*Uncharacterized*” e foram submetidas a um BLAST contra os bancos de dados de *Riccinus communis* e *Arabidopsis thaliana*. Assim, todas as proteínas identificadas no endosperma, os resultados do Blast e o número de peptídeos únicos de cada proteína estão disponíveis na Tabela Suplementar 1.

Como estratégia estatística e visual para obter uma visão geral dos proteomas dos diferentes acessos, utilizou-se a análise de componente principal (PCA). Tal análise foi realizada no software Perseus 1.6.0.2. A análise identificou dois componentes estatisticamente diferentes e mostrou que os perfis proteicos dos acessos de ATEF e BTEF são distintos (Figura 14C).

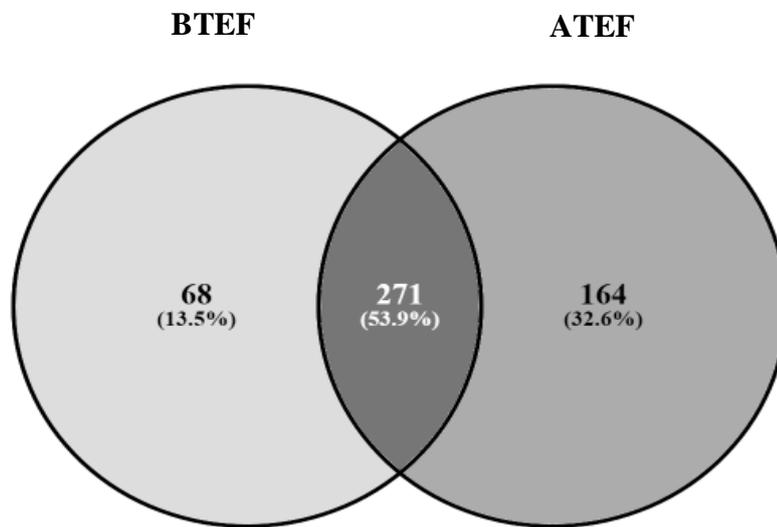
O endosperma foi o tecido com o menor número de identificações dentre os tecidos estudados, tal fato pode estar relacionado com o estágio de desenvolvimento do mesmo, resultado semelhante já foi verificado em estudo semelhante e será discutido em seguida.

**Figura 14.** (A) Proteínas identificadas e quantificadas em acessos ATEF e BTEF de endosperma de *Jatropha curcas*. (B) Diagrama de Venn representando as proteínas identificadas na análise proteômica nos diferentes acessos de pinhão manso. (C) Análise de componente principal do proteoma de endosperma de *Jatropha curcas*.

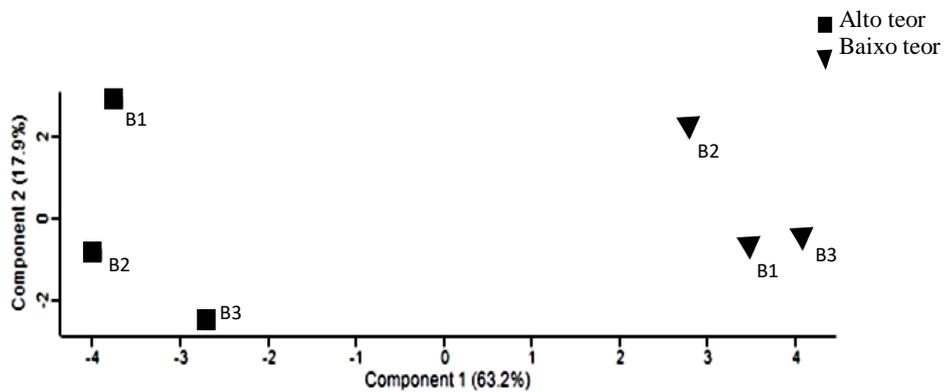
**A**

| Amostra | Peptídeos únicos | Grupos de proteínas | Proteínas quantificadas | Proteínas diferencialmente abundantes (p-valor < 0.05) |
|---------|------------------|---------------------|-------------------------|--|
| ATEF    | 1790             | 435                 | 262                     | 20   |
| BTEF    | 1590             | 339                 |                         |  |

**B**



**C**

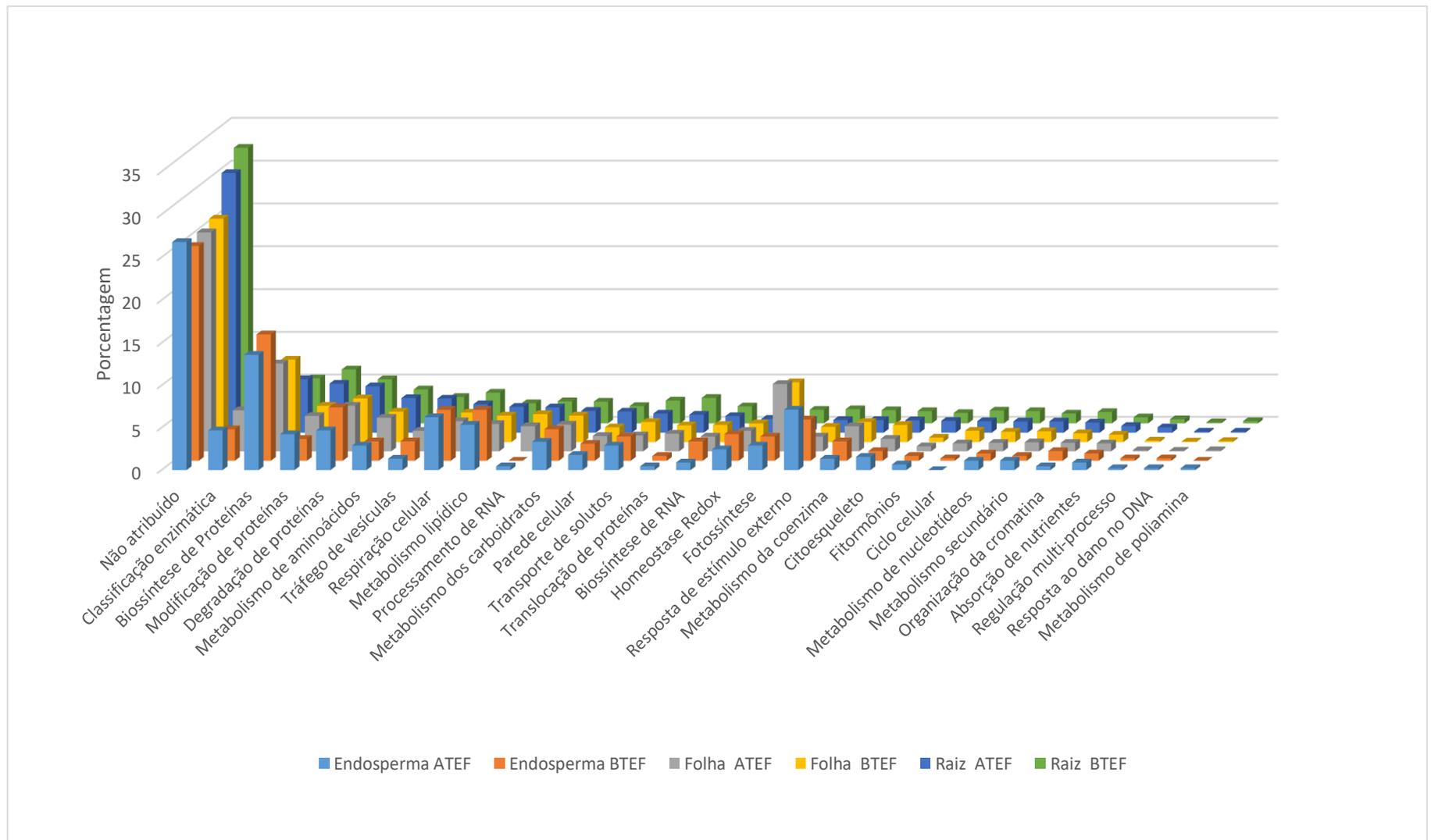


### **5.5 Classificação funcional das proteínas identificadas em raízes, folhas e endosperma de *J. curcas***

A classificação funcional das proteínas identificadas foi feita usando o pipeline Mercator com ontologia MapMan “BIN”, que é adaptada para a anotação funcional dos dados ‘ômicos’ de plantas, as anotações funcionais previstas pela Mercator alcançam precisões acima de 90% quando comparadas com a anotação manual. A pipeline Mercator classifica as proteínas em 28 classes principais (Fotossíntese; Respiração celular; Metabolismo de carboidratos; Metabolismo de aminoácidos; Metabolismo de lipídeos; Metabolismo de nucleotídeos; Metabolismo de coenzimas; Metabolismo de poliaminas; Metabolismo secundário; Homeostase redox; Fitormônios; Organização da cromatina; Ciclo celular; Resposta ao dano no DNA; Biossíntese de RNA; Processamento de RNA; Biossíntese de proteínas; Modificação de proteínas; Degradação de proteínas; Citoesqueleto; Parede Celular; Tráfego de vesículas; Translocação de proteínas; Transporte de solutos; Absorção de nutrientes; Resposta a estímulos externos; Regulação de multi-processos e Classificação de enzimas), e a cada classe ele atribui subclasses, como por exemplo para a classe 1-Fotossíntese são atribuídas as quatro subclasses: 1.1 - Fotofosforilação, 1.2 - Ciclo de Calvin, 1.3 - Fotorrespiração e 1.4 - Fotossíntese em C4/CAM. As proteínas que não se enquadram nestas classes, como por exemplo transportadores, nenhuma classificação é atribuída.

Feita a comparação entre as classificações funcionais para cada tecido e acessos ATEF e BTEF (Figura 15), foi verificado que em algumas classes, a abundância das proteínas foi equivalente em todos os tecidos em ambos os acessos, principalmente naquelas de funcionamento celular básico, como por exemplo as proteínas de parede celular. Outras classes apresentaram destaque para proteínas relacionadas ao tecido específico e sua função nas plantas, como foi o caso de fotossíntese em folhas e metabolismo de lipídeos em endosperma, degradação e modificação de proteínas foram mais evidentes nas proteínas identificadas em raízes.

**Figura 15.** Classificação funcional das proteínas identificadas em amostras de raízes, folhas e endosperma de diferentes acessos de *Jatropha curcas* com base na classificação do MapMan.

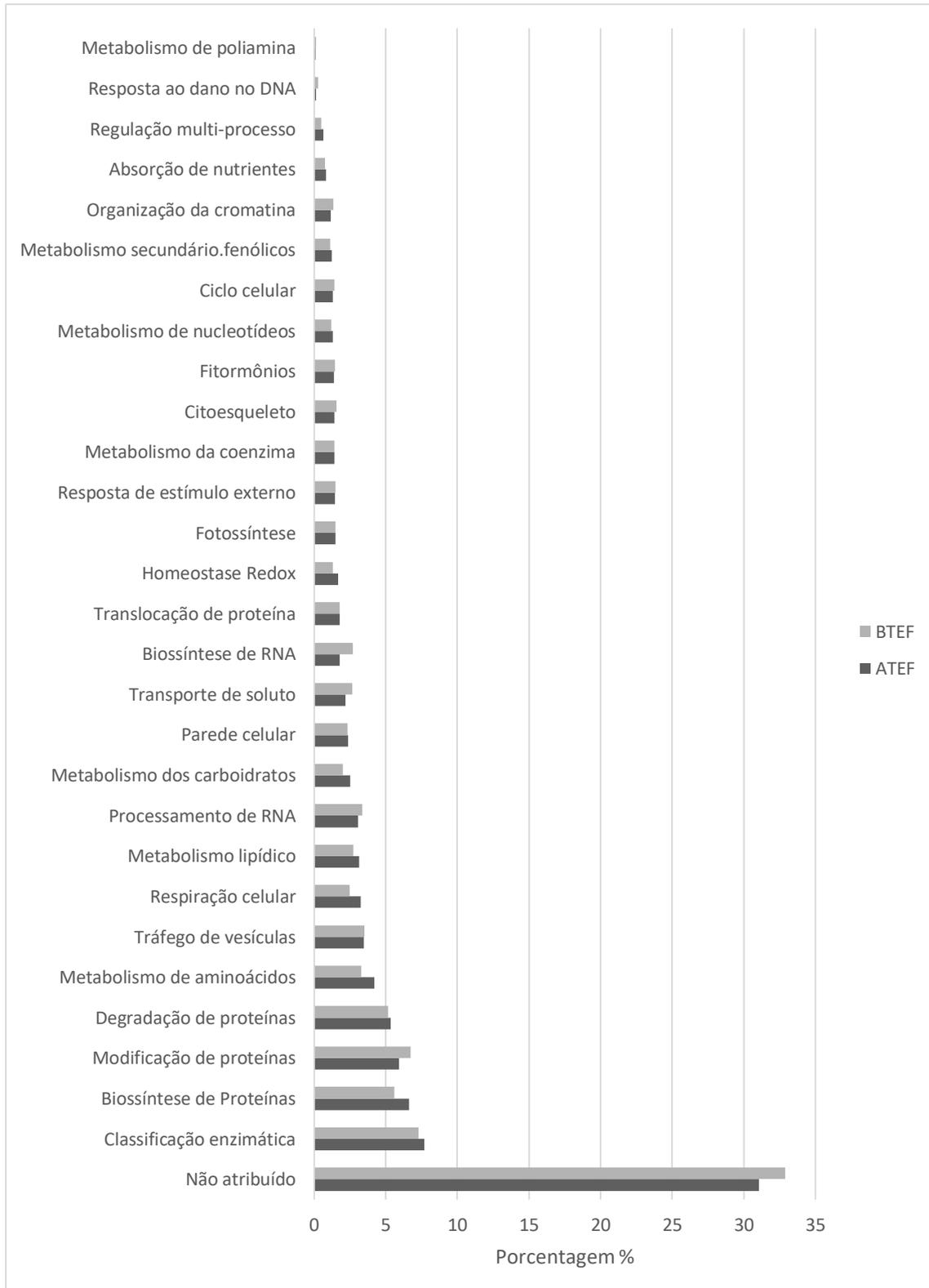


### **5.5.1 Classificação funcional das proteínas identificadas em raízes de *J. curcas***

Em amostras de raízes, a classificação funcional das proteínas identificadas mostrou que a maioria das proteínas está ligada a classificação de enzimas (oxireduases, hidrolases, isomerases, transferases, liases, ligases), seguida de biossíntese, modificação e degradação de proteínas respectivamente, a Figura 16 mostra a distribuição de todas as proteínas identificadas nas diferentes classes usando a ferramenta MapMan com pipeline Mercator.

Além das raízes serem o tecido mais abundante em número de identificações, nas mesmas também foram identificados o maior número de proteínas envolvidos no metabolismo de terpenos, objetivo principal do nosso trabalho. A enzima casbeno sintase que ainda não havia sido identificada por análises proteômicas de *J. curcas* foi encontrada exclusivamente neste tecido independente de filtros, além da casbeno sintase foi verificado também neste tecido a geranil geranil difosfato sintase, a casbeno 5,6 oxidase dentre outras.

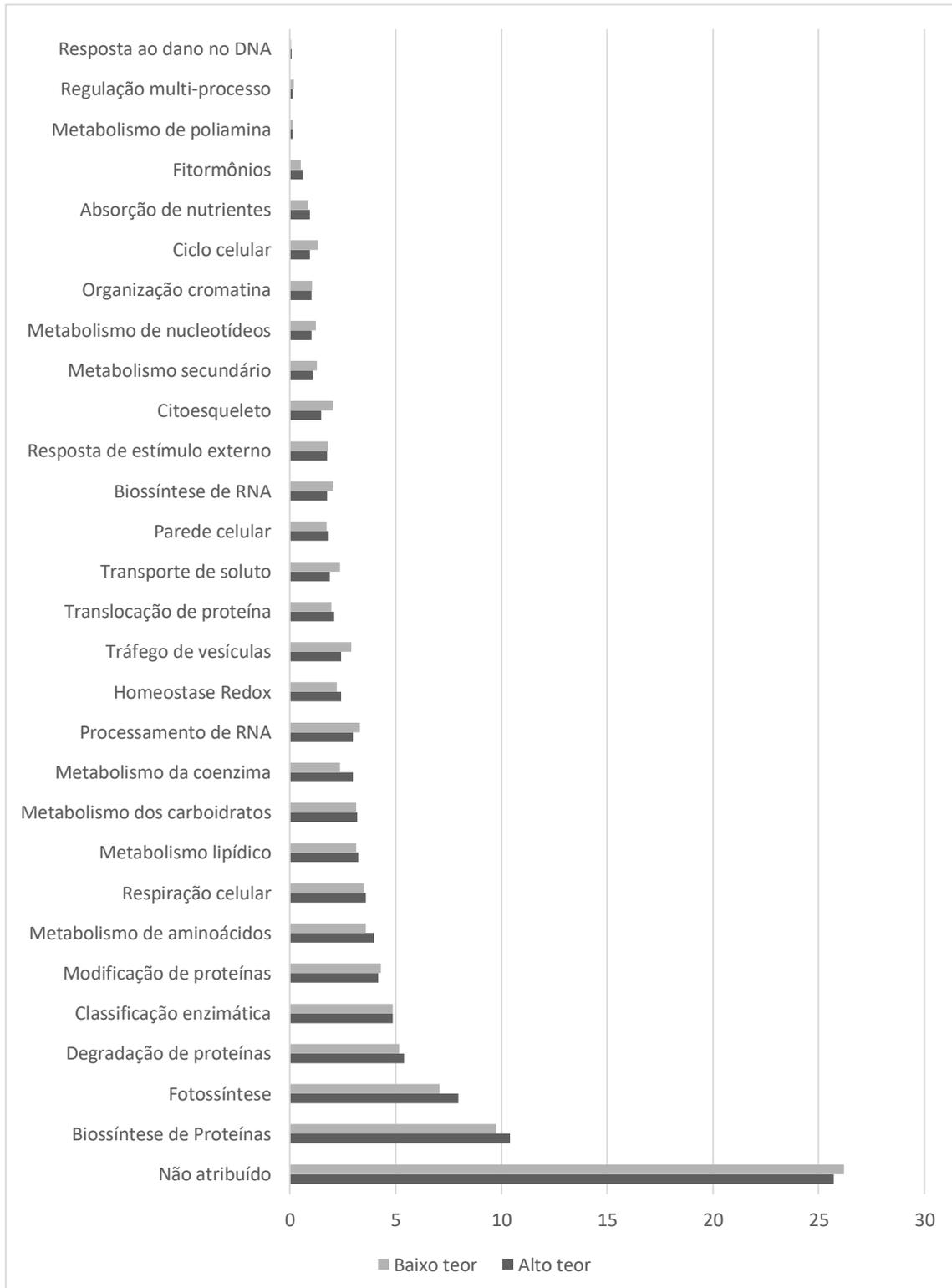
**Figura 16.** Classificação funcional das proteínas identificadas em amostras de raízes de acessos ATEF e BTEF de *Jatropha curcas* com base na classificação do MapMan.



### **5.5.2 Classificação funcional das proteínas identificadas em folhas de *J. curcas***

A classificação funcional usando MapMan das proteínas identificadas em amostras de folhas de pinhão manso (Figura 17) mostrou que a classe mais evidente é a de biossíntese de proteínas, seguida de proteínas ligadas a fotossíntese e degradação de proteínas respectivamente.

**Figura 17.** Classificação funcional das proteínas identificadas em amostras de folhas de acessos ATEF e BTEF de *Jatropha curcas* com base na classificação do MapMan.



### 5.5.3 Classificação funcional das proteínas identificadas em endosperma de *J. curcas*

A classificação funcional das proteínas identificadas demonstrou que elas estão envolvidas em várias rotas metabólicas, tais como metabolismo de lipídeos, respiração celular, síntese de proteínas, etc. As rotas biossintéticas observadas e sua abundância nos diferentes acessos são mostradas na Figura 18. Verificou-se também que a principal classe funcional é a biossíntese de proteínas, seguida de respostas a estímulos externos e equiparados, estão a respiração celular, metabolismo de lipídeos e a degradação de proteínas, seguido de classes menos expressivas como a translocação de proteínas.

Quando visualizado de forma geral, não houve diferença significativa entre os diferentes acessos, quanto ao número de proteínas presentes em diferentes rotas metabólicas. Pode-se verificar apenas alguma superioridade no número de proteínas de acesso ATEF nas respostas a estímulos externos, o que é representado principalmente por proteínas de choque térmico em resposta a mudanças de temperatura, classificação de enzimas, representada principalmente por oxirredutases e hidrolases e modificação de proteínas. A síntese e a degradação de proteínas estão mais evidentes em acessos BTEF, assim como a biossíntese de RNA e metabolismo de coenzimas. Classes como a fotossíntese, o transporte de solutos e a absorção de nutrientes, se mostraram equivalentes nas proteínas encontradas em ambos os acessos.

**Figura 18.** Classificação funcional das proteínas identificadas no endosperma de acessos ATEF e BTEF de *Jatropha curcas* com base na classificação do MapMan.



## **5.6 Proteínas diferencialmente abundantes entre acessos contrastantes quanto ao teor de ésteres de forbol em raízes, folhas e endosperma de *J. curcas***

### **5.6.1 Proteínas diferencialmente abundantes entre acessos contrastantes quanto ao teor de ésteres de forbol em raízes de *J. curcas***

Das 4532 proteínas submetidas a análises quantitativas, 185 foram diferencialmente abundantes entre os acessos pelo teste *t*-Student ( $p < 0,05$ ). Deste total 122 proteínas estão reguladas positivamente no acesso de baixo teor de ésteres de forbol (BTEF). Dentre as proteínas reguladas positivamente em BTEF a 14 delas se enquadra na classe denominada de classificação de enzimas que inclui as subclasses hidrolases, liases, transferases, oxirredutases, dentre outras, 9 delas pertencem a biossíntese de proteínas e 8 estão relacionadas a degradação de proteínas. Quando avaliadas as proteínas reguladas positivamente em amostras ATEF as proteínas relacionadas a classificação de enzimas também foram as mais bem representadas, seguida de degradação de proteínas e fotossíntese. Duas proteínas relacionadas a resposta a estímulos externos estavam mais abundantes em amostras ATEF, dentre elas uma proteína de choque térmico (D6BR57). As proteínas de choque térmico têm sua expressão aumentada quando a planta é submetida a estresses por aumento de temperatura e outras formas de estresse, o fato dessa proteína se mostrar mais abundante em amostras ATEF deve estar relacionada ao fato desse acesso ser considerado tolerante quando comparado ao acesso de BTEF. Duas proteínas relacionadas a síntese de terpenos foram mais abundantes em acessos ATEF são elas a 2-methoxy-6-polyprenyl-1,4-benzoquinol methylase, mitochondrial (EC 2.1.1.201) que está envolvida na biossíntese de ubiquinonas e a Farnesyl pyrophosphate synthase 1, mitochondrial (EC 2.5.1.10).

A descrição das proteínas diferencialmente expressas, a forma como as mesmas foram reguladas neste tecido e o processo biológico em que foram alocadas através da análise pelo MapMan, TCDB e ou Kegg são apresentadas na Tabela 4.

**Tabela 4.** Proteínas diferencialmente abundantes em amostras de raízes de *Jatropha curcas*, relação de abundância e processos biológicos onde foram alocadas. (+) mais abundante; (-) menos abundante.

| Acesso     | Descrição   | Abundância ATEF/BTEF | Processo Biológico          |
|------------|---|----------------------|-----------------------------|
| B9T4X3     | 14 kDa proline-rich protein DC2.15, putative                    | -                    | Não atribuído               |
| B9RVT9     | 26S proteasome regulatory subunit rpn1, putative                | -                    | Degradação de proteínas     |
| A0A067KH13 | 2-methoxy-6-polyprenyl-1,4-benzoquinol methylase, mitochondrial | -                    | Metabolismo de coenzimas    |
| B9SQH3     | 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase, putative                       | +                    | Não atribuído               |
| B9RKN5     | 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase, putative                       | -                    | Metabolismo de lipídeos     |
| B9SQS5     | 3-isopropylmalate dehydratase, putative                         | -                    | Metabolismo de aminoácidos  |
| B9S966     | 3'-N-debenzoyl-2'-deoxytaxol N-benzoyltransferase, putative     | +                    | Transferases                |
| B9S120     | 40S ribosomal protein S14, putative                             | -                    | Biossíntese de proteínas    |
| B9SJC5     | 40S ribosomal protein S19, putative                             | +                    | Biossíntese de proteínas    |
| A0A067JVS5 | 40S ribosomal protein S24                                       | -                    | Biossíntese de proteínas    |
| B9RT70     | 60S ribosomal protein L22, putative                             | -                    | Biossíntese de proteínas    |
| B9SH02     | 60S ribosomal protein L26, putative                             | +                    | Biossíntese de proteínas    |
| B9SKF7     | 60S ribosomal protein L37a, putative                            | -                    | Biossíntese de proteínas    |
| B9RM38     | 60S ribosomal protein L38, putative                             | -                    | Biossíntese de proteínas    |
| B9RVQ0     | Actin, putative   | -                    | Organização da cromatina    |
| B9SGK0     | Adaptin ear-binding coat-associated protein, putative           | -                    | Não atribuído               |
| B9R714     | Adenine phosphoribosyltransferase, putative                     | -                    | Metabolismo de nucleotídeos |
| B9R8J1     | Alcohol dehydrogenase, putative                                 | -                    | Metabolismo secundário      |
| B9RQ25     | Aldehyde oxidase, putative                                      | -                    | Fitormônios                 |
| B9T066     | Alpha-glucosidase, putative                                     | -                    | Parede celular              |
| A0A067LQJ4 | Annexin   | +                    | Não atribuído               |
| A0A067KBD5 | Aspartate aminotransferase                                      | -                    | Absorção de nutrientes      |
| A0A067KPI2 | Aspartate aminotransferase                                      | -                    | Absorção de nutrientes      |
| Q8LEJ7     | At1g55265   | -                    | Não atribuído               |
| O23339     | At4g14840   | -                    | Não atribuído               |

|            |   |   |                             |
|------------|---|---|-----------------------------|
| Q944S8     | At4g21108/At4g21108   | - | Não atribuído               |
| Q94JT5     | AT4g35220/F23E12 220  | - | Não atribuído               |
| Q9FL37     | At5g46230   | - | Não atribuído               |
| B9S667     | ATP binding protein, putative   | - | Metabolismo de carboidratos |
| B9RM51     | ATP binding protein, putative   | - | Não atribuído               |
| COLE59     | ATP synthase subunit alpha, chloroplastic                               | + | Fotossíntese                |
| A0A067JWN2 | ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit                          | - | Degradação de proteínas     |
| D6BQP0     | Auxin-repressed protein-like protein ARP1                               | - | Não atribuído               |
| Q9FHT3     | CAB69840.1  | - | Não atribuído               |
| B9R8B6     | Calcium lipid binding protein, putative                                 | - | Não atribuído               |
| A0A067KRK0 | Carboxypeptidase  | - | Degradação de proteínas     |
| A0A067L687 | CASP-like protein   | - | Não atribuído               |
| B9R8X2     | Chaperone protein dnaJ, putative  | - | Não atribuído               |
| B9RSN1     | Chaperonin containing t-complex protein 1, zeta subunit, tcpz, putative | + | Citoesqueleto               |
| A0A067KU07 | Coatomer subunit delta  | - | Tráfego de vesículas        |
| B9R7R6     | Cop9 complex subunit, putative  | - | Degradação de proteínas     |
| B9RXC7     | Coproporphyrinogen III oxidase, putative                                | - | Metabolismo de coenzimas    |
| B9R7A3     | Cucumisin, putative   | + | Degradação de proteínas     |
| A0A067KD26 | Cyanate hydratase   | - | Liasas                      |
| A0A067L699 | Cyclin-dependent kinases regulatory subunit                             | - | Ciclo celular               |
| D6BQN1     | Cysteine proteínase inhibitor   | + | Não atribuído               |
| B9RBM7     | Cytochrome C1, putative   | - | Respiração celular          |
| B9T2D3     | Cytochrome P450, putative   | - | Oxirredutases               |
| B9S9U3     | Cytochrome P450, putative   | + | Oxirredutases               |
| B9RK89     | Dead box ATP-dependent RNA helicase, putative                           | - | Processamento de RNA        |
| B9RVX9     | Dihydroorotase, mitochondrial, putative                                 | + | Metabolismo de nucleotídeos |
| B9T668     | Dihydroxyacetone kinase, putative                                       | - | Transferases                |
| B9STJ6     | DNA binding protein, putative   | - | Não atribuído               |
| B9T5D7     | Enoyl-ACP reductase (EAR)   | + | Metabolismo de lipídeos     |
| B9SKX9     | Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial, putative                            | - | Hidrolases                  |

|            |  |   |                               |
|------------|--|---|-------------------------------|
| B9RW25     | Epoxide hydrolase, putative                                  | - | Não atribuído                 |
| B9SAT9     | Epoxide hydrolase, putative                                  | - | Não atribuído                 |
| A0A067L8I3 | Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit D         | + | Biossíntese de proteínas      |
| B9S1A2     | Eukaryotic translation initiation factor 4e, putative        | - | Biossíntese de proteínas      |
| B9SQU9     | Eukaryotic translation initiation factor 4e, putative        | - | Biossíntese de proteínas      |
| Q09152     | Farnesyl pyrophosphate synthase 1, mitochondrial             | - | Metabolismo secundário        |
| Q9SNC3     | Fasciclin-like arabinogalactan protein 11                    | + | Resposta a estímulos externos |
| B9SX77     | Filamin-A-interacting protein, putative                      | - | Citoesqueleto                 |
| B9T600     | Flavonol synthase/flavanone 3-hydroxylase, putative          | - | Oxirredutases                 |
| B9SXY3     | Glucan endo-1,3-beta-glucosidase, putative                   | - | Hidrolases                    |
| B9RBE5     | Glucan endo-1,3-beta-glucosidase, putative                   | - | Hidrolases                    |
| A0A067KYM1 | Glutamine synthetase   | + | Absorção de nutrientes        |
| B9S4S9     | Glutathione reductase, putative                              | + | Homeostase redox              |
| A0A067JVF6 | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase                     | + | Respiração celular            |
| B9RVB2     | Glycerol kinase, putative                                    | - | Metabolismo de lipídeos       |
| Q9LFT3     | Glycosyl hydrolase family 81 protein                         | + | Não atribuído                 |
| B9RYP6     | Heat shock protein, putative                                 | + | Modificação de proteínas      |
| D6BR57     | Heat-shock protein   | + | Resposta a estímulos externos |
| Q9FGS5     | High-affinity nitrate transporter 3.1                        | + | Absorção de nutrientes        |
| B9RKC6     | Histone acetyltransferase type B catalytic subunit, putative | + | Não atribuído                 |
| A0A067LHZ5 | Histone H2B  | - | Organização da cromatina      |
| B9RJG2     | Homomeric Acetyl-CoA Carboxylase (Hom-ACCase)                | + | Metabolismo de lipídeos       |
| B9SWJ3     | Hsp90 co-chaperone AHA1, putative                            | + | Não atribuído                 |
| B9SU05     | Hydroxyacylglutathione hydrolase, putative                   | - | Respiração celular            |
| B9SKY7     | Importin beta-1, putative                                    | + | Translocação de proteínas     |
| B9S6D8     | Inorganic pyrophosphatase, putative                          | - | Não atribuído                 |
| E6NU26     | JHL05D22.7 protein   | - | Organização da cromatina      |
| E6NUB3     | JHL06P13.2 protein   | + | Não atribuído                 |
| A0A067KC00 | Lactoylglutathione lyase                                     | - | Respiração celular            |
| Q9M4Q8     | Legumin B, putative  | - | Não atribuído                 |

|            |   |   |                             |
|------------|---|---|-----------------------------|
| B9S2P8     | Leucoanthocyanidin dioxygenase, putative                                | - | Oxirredutases               |
| A0A067L4M8 | Lipoxygenase  | - | Fitormônios                 |
| D2D960     | Major allergen Pru ar 1-like protein                                    | - | Não atribuído               |
| B9RTC5     | Major allergen Pru ar, putative   | + | Não atribuído               |
| A0A067JYF0 | Malic enzyme  | + | Respiração celular          |
| B9SE08     | Mannose-1-phosphate guanyltransferase, putative                         | - | Metabolismo de carboidratos |
| A0A067L0Y5 | Methionine S-methyltransferase  | + | Metabolismo de aminoácidos  |
| B9RKH3     | Mitochondrial import inner membrane translocase subunit tim17, putative | + | Translocação de proteínas   |
| B9S1W8     | Mta/sah nucleosidase, putative  | - | Não atribuído               |
| B9S217     | Mta/sah nucleosidase, putative  | - | Não atribuído               |
| B9S8L8     | Multicopper oxidase, putative   | + | Oxirredutases               |
| B9S765     | N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase, putative                   | + | Metabolismo de aminoácidos  |
| A0A067KGX0 | NEDD8-activating enzyme E1 regulatory subunit                           | - | Degradação de proteínas     |
| B9S1M1     | Neutral alpha-glucosidase ab, putative                                  | - | Hidrolases                  |
| A0A067JXM8 | Nicalin   | - | Não atribuído               |
| Q9CAF4     | Nuclear pore complex protein NUP1                                       | - | Translocação de proteínas   |
| B9RMD1     | Nuclear transport factor, putative                                      | + | Não atribuído               |
| B9SRC6     | Nucleic acid binding protein, putative                                  | + | Não atribuído               |
| B9RQ14     | Nucleic acid binding protein, putative                                  | - | Processamento de RNA        |
| B9RK80     | Nucleosome assembly protein, putative                                   | - | Organização da cromatina    |
| B9RGI7     | Oligopeptidase B, putative  | - | Não atribuído               |
| B9R8X1     | Organic anion transporter, putative                                     | + | Transporte de solutos       |
| B9T5E8     | Oxidoreductase, putative  | - | Não atribuído               |
| B9SL24     | Patellin-6, putative  | - | Não atribuído               |
| G9IBP2     | Pathogenesis-related protein 10 <sup>a</sup>                            | + | Não atribuído               |
| A0A067JVS1 | Pectin acetylsterase  | + | Parede celular              |
| A0A067L073 | Pectinesterase  | - | Parede celular              |
| B9RKX2     | Pentatricopeptide repeat-containing protein, putative                   | - | Não atribuído               |
| A0A067LA05 | Peptidylprolyl isomerase  | - | Modificação de proteínas    |
| B9RL34     | Periplasmic beta-glucosidase, putative                                  | + | Hidrolases                  |

|            |   |   |                          |
|------------|---|---|--------------------------|
| A0A067L780 | Peroxidase  | + | Não atribuído            |
| Q9SHJ6     | Peroxisomal and mitochondrial division factor 2                     | + | Ciclo celular            |
| B9RBF3     | Phenylalanyl-tRNA synthetase beta chain, putative                   | - | Biossíntese de proteínas |
| Q8GVE8     | Phosphoenolpyruvate carboxylase 4                                   | + | Fotossíntese             |
| A0A067JM51 | Phosphoglycerate kinase   | - | Respiração celular       |
| B9SDD8     | Phospholipase C 3, putative   | - | Metabolismo de lipídeos  |
| B9SCA3     | Phospholipase C, putative   | - | Não atribuído            |
| D2E4A5     | Phospholipase D   | - | Metabolismo de lipídeos  |
| A0A067KWS1 | Plasma membrane ATPase  | + | Transporte de solutos    |
| Q8L793     | Polyadenylate-binding protein-interacting protein 3                 | - | Não atribuído            |
| B9RTB3     | Polygalacturonase, putative   | + | Hidrolases               |
| Q9SFT9     | PPPDE putative thiol peptidase family protein                       | + | Degradação de proteínas  |
| B9RV85     | Pre-mRNA-processing-splicing factor, putative                       | - | Processamento de RNA     |
| Q9FKR0     | Probable S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase At5g38780 | - | Transferases             |
| A0A067L355 | Proteasome subunit alpha type                                       | - | Degradação de proteínas  |
| Q9SA16     | Protein PHLOEM PROTEIN 2-LIKE A9                                    | - | Não atribuído            |
| B9T4B6     | Protein phosphatase 2c, putative                                    | + | Modificação de proteínas |
| B9S2B7     | Protein PPLZ12, putative  | - | Não atribuído            |
| B9RS40     | Protein transporter, putative                                       | - | Tráfego de vesículas     |
| A0A067KSY6 | Protein yippee-like   | - | Não atribuído            |
| B9R7W8     | Protein yrdA, putative  | - | Respiração celular       |
| Q8GYZ3     | Putative uncharacterized protein At1g19130/F14D16 18                | - | Não atribuído            |
| Q9FE79     | Ras-related protein RABA4c  | - | Tráfego de vesículas     |
| B9SAY8     | Reticuline oxidase, putative  | - | Oxirredutases            |
| B9SAY9     | Reticuline oxidase, putative  | - | Oxirredutases            |
| B9SAZ7     | Reticuline oxidase, putative  | - | Oxirredutases            |
| B9S8X4     | Ribonuclease t2, putative   | - | Não atribuído            |
| B9RI44     | Ribonucleic acid binding protein S1, putative                       | + | Processamento de RNA     |
| B9S0K6     | Ribonucleoprotein, chloroplast, putative                            | + | Não atribuído            |
| B9REQ4     | Ribose-5-phosphate isomerase, putative                              | + | Fotossíntese             |

|            |   |   |                             |
|------------|---|---|-----------------------------|
| COLE82     | Ribulose biphosphate carboxylase large chain          | + | Fotossíntese                |
| B9RBK5     | Ribulose-phosphate 3-epimerase                        | - | Metabolismo de carboidratos |
| B9SZV1     | RNA binding protein, putative                         | + | Não atribuído               |
| B9T3B3     | RNA binding protein, putative                         | + | Não atribuído               |
| B9S815     | Serine carboxypeptidase, putative                     | - | Degradação de proteínas     |
| B9RHZ4     | Serine/threonine protein kinase, putative             | + | Modificação de proteínas    |
| B9RUQ6     | Serine/threonine-protein kinase SAPK3, putative       | - | Modificação de proteínas    |
| Q84XU2     | Serine/threonine-protein phosphatase 5                | - | Modificação de proteínas    |
| A0A067L3F3 | Serine/threonine-protein phosphatase                  | + | Fitormônios                 |
| B9RYC5     | Serine-threonine protein kinase, plant-type, putative | + | Não atribuído               |
| F4IL68     | SH3 domain-containing protein                         | - | Tráfego de vesículas        |
| B9RHX5     | Short chain alcohol dehydrogenase, putative           | + | Não atribuído               |
| B9ST91     | Signalosome subunit, putative                         | - | Degradação de proteínas     |
| B9SAP2     | Small nuclear ribonucleoprotein SM D3, putative       | - | Processamento de RNA        |
| B9RME8     | Small rubber particle protein, putative               | - | Metabolismo de lipídeos     |
| B9RD41     | Structural constituent of nuclear pore, putative      | - | Translocação de proteínas   |
| A0A067KGY0 | Structural maintenance of chromosomes protein         | + | Ciclo celular               |
| B9S3F0     | Sugar transporter, putative                           | - | Transporte de solutos       |
| B9RPA3     | Syntaxin, putative                                    | - | Tráfego de vesículas        |
| B9RUL3     | Thioredoxin H-type, putative                          | + | Homeostase redox            |
| B9S4M4     | Threonyl-tRNA synthetase, putative                    | - | Biossíntese de proteínas    |
| B9SPA7     | Tip120, putative                                      | + | Degradação de proteínas     |
| B9RG20     | Transferase, transferring glycosyl groups, putative   | - | Não atribuído               |
| A0A067KUH1 | Transmembrane 9 superfamily member                    | - | Não atribuído               |
| B9SKZ1     | Ubiquitin-activating enzyme E1, putative              | + | Degradação de proteínas     |
| B9T3S8     | Ubiquitin-protein ligase, putative                    | - | Não atribuído               |
| B9SKK1     | Uclacyanin-2, putative                                | - | Não atribuído               |
| B9RLH4     | UDP-glucosyltransferase, putative                     | - | Metabolismo secundário      |
| O64765     | UDP-N-acetylglucosamine diphosphorylase 1             | - | Metabolismo de carboidratos |
| Q9SUC9     | Uncharacterized GPI-anchored protein At4g28100        | - | Não atribuído               |

|            |  |   |                          |
|------------|--|---|--------------------------|
| A0A067LLM0 | Uncharacterized protein                                    | + | Não atribuído            |
| A0A067LQN5 | Uncharacterized protein                                    | - | Processamento de RNA     |
| B9SCR4     | Vacuolar protein sorting-associated protein VPS4, putative | + | Tráfego de vesículas     |
| B9SRT1     | Vacuolar sorting receptor 1, putative                      | - | Tráfego de vesículas     |
| B9R705     | Voltage-dependent anion-selective channel, putative        | - | Transporte de solutos    |
| B9RK69     | WD-repeat protein, putative                                | + | Organização da cromatina |
| B9SMF9     | WD-repeat protein, putative                                | - | Fitormônios              |
| B9SHW1     | Xylem serine proteínase 1, putative                        | + | Degradação de proteínas  |
| A0A067L370 | Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase                  | - | Transferases             |
| B9SZE5     | Zeamin, putative   | - | Não atribuído            |

### **5.6.2 Proteínas diferencialmente abundantes entre os acessos contrastantes em folhas de *J. curcas***

As proteínas presentes em ambos os acessos foram submetidas a análise estatística pelo teste test-T de Student's ( $p < 0,05$ ). Das 1082 proteínas quantificadas, 72 apresentaram diferença estatística e foram submetidas a clusterização hierárquica (correlação de Pearson). A descrição das proteínas diferencialmente expressas, a forma como as mesmas foram reguladas neste tecido e o processo biológico em que foram alocadas através da análise pelo MapMan são apresentadas na Tabela 5. Das 72 proteínas, 30 estavam estatisticamente mais abundantes no acesso de alto teor de ésteres de forbol (ATEF) e pertenciam a diferentes processos biológicos.

**Tabela 5.** Proteínas diferencialmente abundantes em amostras de folhas de *Jatropha curcas*, relação de abundância e processos biológicos onde foram alocadas. (+) mais abundante; (-) menos abundante.

| Acesso     | Descrição  | Abundância<br>ATEF/BTEF | Processo Biológico         |
|------------|--|-------------------------|----------------------------|
| B9R960     | 1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase, putative                      | -                       | Metabolismo de aminoácidos |
| A0A067KL83 | 3-isopropylmalate dehydrogenase  | -                       | Metabolismo de aminoácidos |
| Q41135     | 50 kDa ketoavyl-ACP synthase   | +                       | Metabolismo de lipídeos    |
| C0LEB6     | 50S ribosomal protein L23, chloroplastic                               | +                       | Biossíntese de proteínas   |
| B9S8W0     | 60S ribosomal protein L34, putative                                    | -                       | Biossíntese de proteínas   |
| A0A067JT58 | Adenylosuccinate synthetase, chloroplastic                             | +                       | Fotossíntese               |
| A0A067JS15 | Alpha-galactosidase  | -                       | Não atribuído              |
| B9SCH9     | AMP dependent CoA ligase, putative                                     | +                       | Não atribuído              |
| B9RNP5     | Arginine/serine-rich splicing factor, putative                         | +                       | Processamento de RNA       |
| A0A067K542 | ATP synthase subunit gamma   | +                       | Respiração celular         |
| B9RDG1     | Calcium lipid binding protein, putative                                | -                       | Não atribuído              |
| A0A1P8B1M4 | Calcium/calcium/calmodulin-dependent Serine/Threonine-kinase           | -                       | Não atribuído              |
| B9SS69     | Casein kinase, putative  | -                       | Modificação de proteínas   |
| B9SS36     | Chaperonin containing t-complex protein 1, eta subunit, tcph, putative | -                       | Citoesqueleto              |
| A0A067KRU9 | Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic                         | +                       | Fotossíntese               |
| A0A067JPE2 | Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic                         | -                       | Fotossíntese               |
| D6BRD6     | Chloroplast photosystem II 10 kDa polypeptide                          | +                       | Fotossíntese               |
| B9SKV5     | Cinnamoyl-CoA reductase, putative                                      | +                       | Não atribuído              |
| A0A067L3H5 | Coatomer subunit alpha   | +                       | Tráfego de vesículas       |
| B9R7A2     | Cucumisin, putative  | +                       | Degradação de proteínas    |
| B9T5D7     | Enoyl-ACP reductase (EAR)  | -                       | Metabolismo de lipídeos    |
| A0A067KLP9 | Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit C                   | -                       | Biossíntese de proteínas   |
| B9SX58     | Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit, putative           | -                       | Biossíntese de proteínas   |
| B9T2G4     | Exocyst complex component, putative                                    | -                       | Tráfego de vesículas       |

|            |   |   |                            |
|------------|---|---|----------------------------|
| A0A067L2U1 | Ferredoxin  | - | Fotossíntese               |
| B9RYH9     | Ferredoxin--nitrite reductase, chloroplast, putative            | + | Absorção de nutrientes     |
| B9RQ36     | Fk506 binding protein, putative                                 | - | Translocação de proteínas  |
| A0A067KWZ0 | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase                        | + | Fotossíntese               |
| B9RYP6     | Heat shock protein, putative                                    | - | Modificação de proteínas   |
| A0A1I9LT48 | Hydroxyproline-rich glycoprotein family protein                 | - | Citoesqueleto              |
| B9SVA2     | Imidazole glycerol phosphate synthase subunit hisf, putative    | + | Metabolismo de aminoácidos |
| E6NU13     | JHL07K02.13 protein   | - | Processamento de RNA       |
| B9RMM7     | Ketoacyl-ACP Reductase (KAR)                                    | + | Metabolismo de lipídeos    |
| B9SGG2     | Leukocyte receptor cluster (Lrc) member, putative               | - | Processamento de RNA       |
| B9SYS2     | Lupus la ribonucleoprotein, putative                            | - | Não atribuído              |
| A0A067L8H7 | Methyltransferase   | + | Metabolismo de lipídeos    |
| A0A067JE82 | Mg-protoporphyrin IX chelatase                                  | - | Metabolismo de coenzimas   |
| B9RMF2     | Mitochondrial import receptor subunit TOM20, putative           | - | Translocação de proteínas  |
| B9T1E7     | Mitochondrial oxoglutarate/malate carrier protein, putative     | + | Metabolismo de lipídeos    |
| Q93VR4     | MLP-like protein 423  | + | Não atribuído              |
| B9SDQ6     | Myo inositol monophosphatase, putative                          | + | Hidrolases                 |
| B9S5M4     | Nascent polypeptide associated complex alpha subunit, putative  | - | Modificação de proteínas   |
| B9RN87     | Nitrogen regulatory protein P-II, putative                      | + | Não atribuído              |
| A0A067JQQ4 | Non-specific lipid-transfer protein                             | - | Não atribuído              |
| A0A067KNW6 | Pectinesterase  | + | Parede celular             |
| A0A067L7E7 | Phosphoribulokinase   | + | Fotossíntese               |
| B9S592     | Photosystem I reaction center subunit IV A, chloroplast         | + | Fotossíntese               |
| B9T0K9     | Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein, putative | - | Não atribuído              |
| B9S2Z0     | Porphobilinogen deaminase, putative                             | - | Metabolismo de coenzimas   |
| Q84W43     | Proline-tRNA ligase (DUF1680)                                   | + | Não atribuído              |
| B9RAB2     | Protein DEK, putative   | - | Não atribuído              |
| B9RXM8     | Protein sufB, putative  | - | Metabolismo de coenzimas   |
| B9RW80     | Protein THYLAKOID FORMATION1, chloroplast, putative             | + | Fotossíntese               |
| A0A067KZP4 | Pyruvate kinase   | - | Respiração celular         |

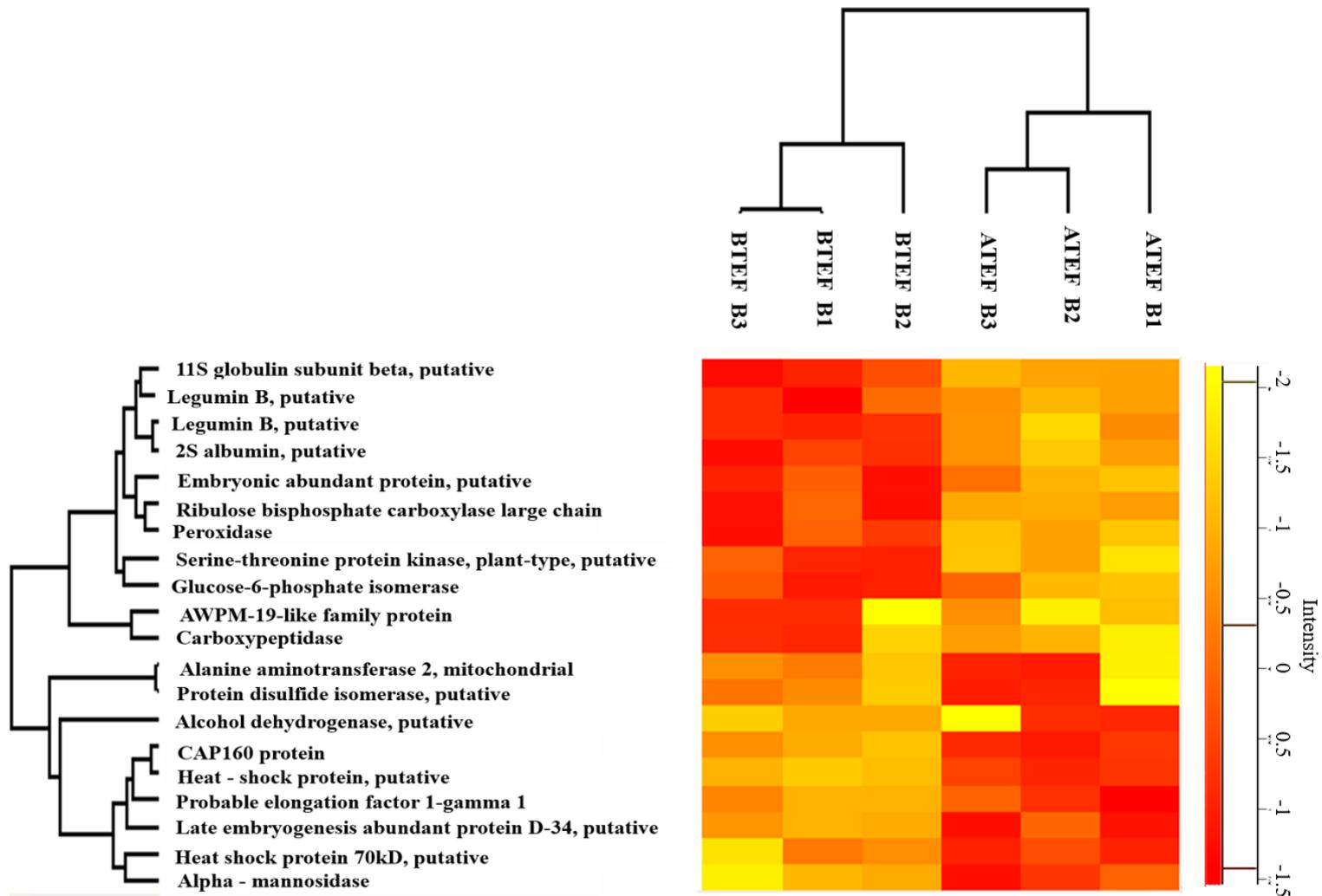
|            |  |   |                          |
|------------|--|---|--------------------------|
| P92963     | Ras-related protein RABB1c                                   | - | Tráfego de vesículas     |
| F4J9G2     | Rhodanese/Cell cycle control phosphatase superfamily protein | - | Não atribuído            |
| B9SFU0     | Ribosomal protein L5, putative                               | - | Biossíntese de proteínas |
| B9SZV1     | RNA binding protein, putative                                | - | Não atribuído            |
| A0A1P8BDE0 | Rubisco methyltransferase family protein                     | + | Não atribuído            |
| B9RVH3     | Small nuclear ribonucleoprotein U1a,U2b, putative            | - | Processamento de RNA     |
| B9RRL9     | Splicing factor, putative                                    | - | Não atribuído            |
| B9RT21     | Spo0B-associated GTP-binding protein, putative               | + | Não atribuído            |
| B9SGV5     | Stachyose synthase, putative                                 | - | Não atribuído            |
| B9R9D3     | Steroid binding protein, putative                            | - | Fitormônios              |
| F4JLQ2     | Transmembrane protein  | - | Não atribuído            |
| B9SJ18     | Ubiquitin-conjugating enzyme, putative                       | + | Degradação de proteínas  |
| A0A067KPW0 | UBX domain-containing protein                                | - | Não atribuído            |
| A0A067KV11 | Uncharacterized protein                                      | + | Não atribuído            |
| A0A067KXQ9 | Vegetative storage protein 2                                 | - | Não atribuído            |
| B9S2B6     | Voltage-dependent anion-selective channel, putative          | + | Transporte de solutos    |
| B9S8H8     | Xylem serine proteinase 1, putative                          | - | Degradação de proteínas  |
| Q941Q3     | Zinc finger CCCH domain-containing protein 37                | - | Biossíntese de RNA       |

### 5.6.3 Proteínas diferencialmente abundantes entre os acessos contrastantes em endosperma de *J. curcas*

A análise estatística realizada no software Perseus demonstrou 20 proteínas diferencialmente expressas entre os diferentes acessos quando aplicado o test-T de Student's ( $p < 0,05$ ), as mesmas foram submetidas a clusterização hierárquica (correlação de Pearson) como é mostrado na Figura 19. A descrição das proteínas diferencialmente expressas comparando a forma como as mesmas foram reguladas neste tecido em acessos de alto teor de ésteres de forbol, e o processo biológico em que foram alocadas através da análise pelo MapMan são apresentadas na Tabela 6.

Das 20 proteínas diferencialmente expressas, nove foram reguladas positivamente no acesso de alto teor de ésteres de forbol (ATEF), e pertenciam a classe de biossíntese de proteínas, metabolismo de aminoácidos, classificação de enzimas (oxirredutase e hidrolase) e respostas a estímulos externos. Entre as 11 reguladas de forma negativa, ou seja, menos expressas no acesso ATEF em relação ao acesso de baixo teor de ésteres de forbol (BTEF) estão as proteínas das classes de degradação de proteínas, metabolismo de carboidratos e fotossíntese.

**Figura 19.** Heat Map das proteínas diferencialmente expressas de amostras de endosperma de *Jatropha curcas*, pelo test-T de Student's ( $p < 0,05$ ). Comparando as proteínas presentes na amostra ATEF contra a amostra BTEF, a cor laranja representa proteínas com maior abundância e a cor amarela proteínas com menor abundância.



**Tabela 6.** Proteínas diferencialmente expressas em amostras de endosperma de *Jatropha curcas*, relação de abundância e processos biológicos onde foram alocadas. (+) maior abundância; (-) menor abundância.

| Acesso     | Descrição   | Abundância<br>ATEF/BTEF | Processo Biológico            |
|------------|---|-------------------------|-------------------------------|
| B9SW16     | 11S globulin subunit beta, putative                   | -                       | Não atribuído                 |
| B9SA28     | 2S albumin, putative                                  | -                       | Não atribuído                 |
| Q9LDV4     | Alanine aminotransferase 2, mitochondrial             | +                       | Metabolismo de aminoácidos    |
| B9SUZ4     | Alcohol dehydrogenase, putative                       | +                       | Oxirredutases                 |
| A0A067LBI4 | Alpha-mannosidase                                     | +                       | Hidrolases                    |
| O23029     | AWPM-19-like family protein                           | -                       | Não atribuído                 |
| F4KG52     | CAP160 protein  | +                       | Não atribuído                 |
| A0A067KPH9 | Carboxypeptidase                                      | -                       | Degradação de proteínas       |
| B9SQP0     | Embryonic abundant protein, putative                  | -                       | Não atribuído                 |
| A0A067KZ28 | Glucose-6-phosphate isomerase                         | -                       | Metabolismo de carboidratos   |
| B9RSR4     | Heat shock protein 70kD, putative                     | +                       | Resposta a estímulos externos |
| B9SWN0     | Heat-shock protein, putative                          | +                       | Resposta a estímulos externos |
| B9S3Z6     | Late embryogenesis abundant protein D-34, putative    | +                       | Não atribuído                 |
| B9SDX6     | Legumin B, putative                                   | -                       | Não atribuído                 |
| Q9M4Q8     | Legumin B, putative                                   | -                       | Não atribuído                 |
| A0A067KK07 | Peroxidase  | -                       | Não atribuído                 |
| O04487     | Probable elongation factor 1-gamma 1                  | +                       | Biossíntese de proteínas      |
| B9RNH0     | Protein disulfide isomerase, putative                 | +                       | Não atribuído                 |
| C0LE82     | Ribulose biphosphate carboxylase large chain          | -                       | Fotossíntese                  |
| B9T2C7     | Serine-threonine protein kinase, plant-type, putative | -                       | Não atribuído                 |

## **5.7 Principais proteínas identificadas e classes funcionais relacionadas nos diferentes tecidos e entre acessos ATEF e BTEF de *J. curcas***

### **5.7.1 Proteínas relacionadas ao metabolismo secundário identificadas em diferentes tecidos de acessos contrastantes de *J. curcas***

Avaliando as proteínas identificadas nos três tecidos, várias delas pertencem ao metabolismo secundário (Tabela suplementar 2), e a maioria foi identificada exclusivamente em raízes. Treze enzimas do tipo cinnamol-Coa redutases (EC 1.2.1.44) que possui papel crítico na formação de lignina sendo fundamental no desenvolvimento estrutural e atua na defesa de plantas foram identificadas, 4 delas exclusivamente em raízes BTEF, para aquelas encontradas em ambos os acessos não houve diferença estatística quanto a abundância. Várias enzimas envolvidas na biossíntese de flavonoides como: Flavonol synthase/flavanone 3-hydroxylase, putative (EC 1.14.11.9), Leucoanthocyanidin dioxygenase, putative (EC 1.14.11.19), Chalcone synthase (EC 2.3.1.74), Chalcone-flavonone isomerase family protein (EC 5.5.1.6) também foram identificadas, duas delas foram estatisticamente diferentes (B9S2P8 e B9T600), ambas foram expressas duas vezes mais em amostras BTEF (Tabela 4), ambas atuam na proteção de plantas contra danos oxidativos. Cinco Anthocyanin 5-aromatic acyltransferase, putative (EC 2.3.1.153) foram encontradas, do total 4 estão presentes apenas em raízes, sendo 3 delas exclusivas de raízes BTEF, e uma delas identificada em endosperma do acesso ATEF, nenhuma delas apresentou diferença estatística. Foram verificadas também cinco Phenylalanine ammonia-lyase (EC 4.3.1.24) em amostras raízes e folhas, estas atuam na biossíntese de compostos fenólicos (flavonoides, fenilpropanóides e lignina em plantas), atuam na defesa das plantas contra o ataque de patógenos. As proteínas do metabolismo secundário atuantes diretamente na síntese de terpenos foram analisadas separadamente e serão discutidas no tópico seguinte.

### **5.7.2 Proteínas relacionadas a síntese de terpenos identificadas em diferentes tecidos de acessos contrastantes de *J. curcas***

Objetivando o entendimento da via de síntese dos diterpenos, grupo que inclui os ésteres de forbol, principal composto tóxico da cultura do pinhão manso, as proteínas observadas na via dos terpenos foram verificadas (Tabela 7). Foram identificadas 37 proteínas em diferentes

vias como síntese de terpenos, monoterpenos e diterpenos, os detalhes das identificações podem ser verificados na Tabela Suplementar 3.

**Tabela 7.** Proteínas relacionadas à síntese de terpenos identificadas em acessos ATEF e BTEF de endosperma, folhas e raízes de *Jatropha curcas*.

| Endosperma |      | Folhas |      | Raízes |      | Acesso     | Descrição   |
|------------|------|--------|------|--------|------|------------|---|
| ATEF       | BTEF | ATEF   | BTEF | ATEF   | BTEF |            |   |
| -          | -    | +      | +    | +      | +    | W8NXM5     | 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase                       |
| -          | -    | -      | +    | +      | +    | A0A067JRE1 | 2-C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase                 |
| -          | -    | -      | -    | +      | +    | A0A067KH13 | 2-methoxy-6-polyprenyl-1,4-benzoquinol methylase, mitochondrial       |
| -          | -    | -      | -    | +      | +    | A0A067KY47 | 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase                       |
| -          | -    | -      | -    | +      | +    | A0A067L1K9 | Casbene 5,6-oxidase   |
| -          | -    | -      | -    | +      | +    | A0A088FR32 | Casbene synthase 1  |
| -          | -    | -      | -    | +      | +    | S4S388     | Ent-kaurene oxidase   |
| -          | -    | -      | -    | +      | +    | D4P8I4     | Geranylgeranyl diphosphate synthase                                   |
| -          | -    | +      | +    | +      | +    | B9RZD3     | 4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase, putative          |
| -          | -    | +      | +    | +      | +    | B9SB47     | 4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-d-erythritol kinase, putative           |
| -          | -    | +      | +    | +      | +    | P69834     | 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate cytidyltransferase, chloroplastic |
| -          | -    | -      | -    | +      | +    | B9S414     | Ent-kaurene synthase A, chloroplast, putative                         |
| -          | -    | -      | -    | +      | +    | B9T2B5     | 1-deoxyxylulose-5-phosphate synthase, putative                        |
| -          | -    | -      | -    | +      | +    | B9T619     | 1-deoxyxylulose-5-phosphate synthase, putative                        |
| -          | -    | +      | +    | +      | +    | B9SWB7     | 4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl diphosphate synthase, putative        |
| -          | -    | -      | -    | +      | +    | B9RI00     | Probable terpene synthase 6   |
| -          | -    | -      | -    | +      | +    | Q8VYB7     | Geranylgeranyl transferase type-2 subunit alpha 1                     |
| -          | -    | +      | +    | +      | +    | P57681     | Farnesylcysteine lyase  |
| -          | -    | -      | -    | +      | +    | B9S1N2     | Probable terpene synthase 8   |
| -          | -    | -      | -    | +      | +    | B9RUX9     | Gibberellin 20 oxidase, putative                                      |
| -          | -    | -      | -    | +      | +    | B9RUX8     | Gibberellin 20 oxidase, putative                                      |
| -          | -    | -      | -    | +      | +    | B9RUX2     | Gibberellin 20 oxidase, putative                                      |
| -          | -    | -      | -    | +      | +    | B9RUX7     | Gibberellin 20 oxidase, putative                                      |
| -          | -    | -      | -    | +      | +    | A0A067KVC6 | Diphosphomevalonate decarboxylase                                     |
| -          | -    | -      | +    | +      | +    | A0A067K3N5 | Isopentenyl diphosphate isomerase                                     |

|   |   |   |   |   |   |            |  |
|---|---|---|---|---|---|------------|--|
| + | + | - | - | + | + | B9SA57     | Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial, putative    |
| - | - | - | - | + | + | Q09152     | Farnesyl pyrophosphate synthase 1, mitochondrial         |
| - | - | - | + | + | + | B9RDW8     | Caax prenyl protease ste24, putative                     |
| + | + | - | - | + | + | Q8S4Y1     | Acetyl-CoA acetyltransferase, cytosolic 1                |
| - | - | - | - | + | + | B9RC08     | Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, putative             |
| - | - | - | - | - | + | A0A0B4KE70 | Casbene synthase (Fragment)                              |
| - | - | - | - | - | + | Q93WB8     | 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate cytidylyltransferase |
| - | - | - | - | - | + | B9SIM2     | Ent-kaurene synthase B, chloroplast, putative            |
| - | - | - | - | - | + | B9RVQ5     | 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, putative              |
| - | - | - | - | - | + | B9RH09     | (R)-limonene synthase, putative                          |
| - | - | + | + | - | + | B9RS29     | Tocopherol cyclase, chloroplast, putative                |
| - | - | - | - | - | + | B9RZI6     | Gibberellin 20 oxidase, putative                         |
| - | - | - | - | - | + | B9SRB9     | Gibberellin 3-beta-dioxygenase, putative                 |
| - | - | - | - | - | + | A0A067JVG6 | Mevalonate kinase  |

Do total de proteínas identificadas 27 foram encontradas somente em raízes de *J. curcas*, correspondendo a 72% do total de identificações, 20 proteínas pertencem a síntese de terpenos, 13 pertencem a síntese de diterpenóides dentre estas o geranyl geranyl difosfato sintase (EC 2.5.1.29), a enzima casbeno sintase (EC 4.2.3.8) e a enzima casbeno 5,6 oxidase, ressaltando que todas as proteínas relacionadas a síntese de diterpenos foram encontradas exclusivamente em raízes.

Os terpenos são essenciais para o crescimento, desenvolvimento e para o metabolismo geral das plantas. Alguns terpenóides especializados ocorrem com padrões distintos de distribuição taxonômica, em que compostos ou grupos de compostos relacionados são encontrados apenas em algumas espécies de plantas ou famílias, como ocorre com os ésteres de forbol, que são mais comumente encontradas em espécies de plantas das famílias Euforbiaceae e Timelaeaceae. (BOHLMANN; KEELING, 2008; CROTEAU; KUTCAHN; LEWIS, 2000).

Todas as vias metabólicas dos terpenóides vegetais partem da formação de apenas dois precursores isoméricos de cinco carbonos (C5), dimetilalil difosfato (DMADP) e isopentenil difosfato (IDP). DMADP e IDP são formados na via do ácido mevalônico (MEV) e na via 2C-metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP). Os terpenóides vegetais menores, os hemiterpenóides (C5), podem ser formados diretamente a partir da DMADP pela atividade da terpenóides sintase (TPS) (BOHLMANN; KEELING, 2008; MILLER *et al.*, 2001). Alternativamente, a montagem de duas, três ou quatro unidades C5 por preniltransferases (PT), produz o geranyl difosfato (GDP; C10), farnesil difosfato (FDP; C15) e geranylgeranyl difosfato (GGDP; C20) (TAKAHASHI; KOYAMA, 2006).

Para serem formados os terpenóides vegetais necessitam de vários compartimentos subcelulares, o que por consequência requer o transporte intra e intercelular de intermediários (CROTEAU *et al.*, 2000). Os passos iniciais da biossíntese terpenóides das vias MEV (ácido mevalônico) e MEP (2C-metil-D-eritritol-4-fosfato) ocorrem no retículo endoplasmático/citosol e nos plastídeos, respectivamente. Enzimas do tipo terpenoide sintases (TPS) e preniltransferases (PT) da via terpenóide central também são encontradas no citosol e nos plastídeos. O conhecimento da localização celular e subcelular de todas as enzimas de uma via terpenóide específica é importante para direcionar esforços na engenharia de vias e redirecionar estrategicamente o fluxo metabólico (WU *et al.*, 2006).

Os ésteres de forbol (EF) são considerados os principais componentes tóxicos presentes nas sementes de *J. curcas* e são compostos de um diterpeno tetracíclico, denominado tigliano

(12-hidroxi-16-deoxiforbol), dois ácidos graxos, que são esterificados nas posições C13 e C16 do esqueleto tigliano (GOMES *et al.*, 2018; HE *et al.*, 2011). A síntese dos ésteres de forbol tem como precursor geral o intermediário do metabolismo de diterpenos geranyl geranyl difosfato, este é convertido em casbeno pela enzima casbeno sintase, o casbeno é um diterpeno bicíclico simples que tem sido sugerido como o primeiro intermediário comprometido com os diterpenóides multicíclicos mais complexos encontrados nas espécies de *Euphorbia* (KIRBY *et al.*, 2010; LUO *et al.*, 2016). A casbeno sintase foi identificada inicialmente em *Ricinus communis* (DUEBER *et al.*, 1978, citado por LUO *et al.*, 2016), a mesma foi identificada em nosso estudo exclusivamente em raízes de ambas as variedades, o mesmo ocorreu com o geranyl geranyl difosfato sintase.

Análises de vasta complexidade estrutural, de muitos tipos de diterpenóides macrocíclicos encontrados na natureza indicam que os diterpenos multicíclicos possuem um grau mais alto de oxigenação em comparação com os casbenos bicíclicos. Esta relação entre os estágios de ciclização e oxigenação pode fornecer a chave para a formação de diterpenóides multicíclicos nos quais ciclizações intramoleculares são prováveis de ocorrer em uma via combinada controlada por monoxigenases do citocromo P450 (P450s) (LUO *et al.*, 2016; ZERBE *et al.*, 2013).

Alguns trabalhos recentes mostraram que duas enzimas pertencentes ao complexo citocromo P450 (casbeno-5-oxidase e casbeno-9-oxidase) e a álcool desidrogenase são responsáveis pela síntese de um composto que é conservado em vários diterpenóides, incluindo os ésteres de forbol, o composto diterpenóide latirano jolkinol (KING *et al.*, 2016; LUO *et al.*, 2016). A proteínas do tipo álcool desidrogenase foram encontradas nos três tecidos (endosperma, folhas e raízes), já a proteína casbeno-5,6-oxidase foi encontrada exclusivamente em amostras de raiz em ambos os acessos. A Tabela 7 mostra as proteínas relacionadas à biossíntese dos diterpenos.

Todas as proteínas identificadas neste estudo que estão relacionadas à síntese de diterpenos, com exceção proteínas álcool desidrogenases, foram encontradas exclusivamente em raízes de pinhão manso. Esta descoberta reforça os trabalhos de Nakano, Shah, Soares e seus colaboradores, que acreditam que síntese dos ésteres acontece em tecidos como folhas e raízes e são transportados para tecidos como as sementes de pinhão manso (NAKANO *et al.*, 2012; SHAH *et al.*, 2015; SOARES *et al.*, 2014).

### 5.7.3 Proteínas relacionadas ao transporte de terpenos identificadas em diferentes tecidos de acessos contrastantes de *J. curcas*

A partir das identificações das proteínas relacionadas a síntese de terpenos estarem presentes em sua grande maioria em raízes, foi feita uma análise pelo banco de dados de transportadores (TCDB), no intuito de identificar transportadores específicos de terpenos, a fim de esclarecer a hipótese da síntese em raízes e transporte para outras partes da planta. Nossa análise classificou 611 proteínas como transportadores (Tabela Suplementar 4). Apesar do transporte de diterpenos não está bem evidenciado, ao verificar os transportadores do tipo ABC envolvidos no transporte de metabólitos secundários, Jasinski e colaboradores identificaram uma família ABC tipo pleiotropic drug resistance, como sendo a responsável pelo transporte do diterpeno esclareol (JASINSKI *et al.*, 2001).

A família de transportadores do tipo ABC completos podem ser subdivididos em quatro subfamílias principais - MDR (multirresistência a drogas), MRP (proteína associada ao MDR), ABCA e PDR (resistência a drogas pleiotrópicas) (BRÛLE, SMART 2002). A superfamília (ABC) de transportadores de membrana é encontrada em todas as espécies procarióticas e eucarióticas. Todos os membros desta família estão envolvidos no transporte ativo de muitos compostos quimicamente e estruturalmente não relacionados e usam a hidrólise do ATP como fonte de energia (HIGGINS, 1992, citado por JASINSKI *et al.*, 2011). Em nosso estudo 22 transportadores do tipo ABC foram encontrados, sendo dois deles do tipo PDR (B9SMW1 e B9RQF2), identificados exclusivamente em ambos os acessos de raízes, e igualmente abundantes em ambos os acessos.

O fato de um componente ser sintetizado num tecido e transportado para outro já foi observado em outro membro da família Euphorbiaceae, a mandioca. Essa cultura tem como componente tóxico o ácido cianídrico (HCN), esse ácido está ligado a carboidratos denominados de glicosídeos cianogênicos, sendo liberado após sua hidrólise. Estudos com essa cultura demonstraram que apesar de acumulados em suas raízes, estes componentes tóxicos são sintetizados em suas folhas, para então serem transportados e acumulados em suas raízes (SELMAR, 1994).

Os trabalhos proteômicos que levantaram a hipótese do transporte de terpenos fizeram estudos de tecidos específicos, este é o primeiro estudo na área que abrange diferentes tecidos de *J. curcas*. Soares e colaboradores através da análise proteômica do integumento interno de sementes de *J. curcas*, identificaram proteínas envolvidas no metabolismo secundário, mas nenhuma proteína que possa estar envolvida na biossíntese de ésteres de forbol, como é o caso da sintase de casbene que foi identificada (SOARES *et al.*, 2014). SHAH e colaboradores na

análise proteômica de endosperma de pinhão manso em diferentes estágios de desenvolvimento, identificou um total 1760 proteínas e dentre estas diversas enzimas envolvidas biossíntese de precursores de diterpenóides, mas nenhuma envolvida diretamente na sua síntese (SHAH *et al.*, 2015). O mesmo ocorreu na análise de plastídeos de sementes em desenvolvimento, onde dentre as 923 proteínas identificadas várias enzimas envolvidas na biossíntese de vários precursores de diterpenóides foram identificadas, mas nenhuma casbeno sintase (Pinheiro *et al.*, 2013). A evidência da expressão gênica da sintase de casbeno em plântulas, folhas maduras e em polpa de frutos, demonstra que esses compostos tóxicos estão distribuídos por toda a planta (NAKANO *et al.*, 2012). Os resultados obtidos pelos autores acima citados levam a conclusão da não síntese desses componentes tóxicos nas sementes de *J. curcas*, mas da presença destes por toda a planta. O que os leva a levantar a hipótese de que eles têm sua síntese realizada em outro tecido da planta e são posteriormente direcionados a suas sementes. Até então não havia suporte experimental para esta teoria, a identificação em raízes de *J. curcas* de enzimas como casbeno sintase, e ainda a evidência de transportadores do tipo ABC da subfamília PDR em suas raízes realizada por nosso estudo, dão suporte para investigações direcionadas a confirmação de tal teoria.

#### **5.7.4 Proteínas identificadas, classificadas funcionalmente e estatisticamente diferentes relacionadas ao metabolismo de lipídeos em amostras de endosperma de *J. curcas***

Estudos proteômicos de endosperma de pinhão podem ser encontrados em literatura, foram realizados estudos comparativos entre endosperma e embrião de pinhão manso em diferentes estágios do desenvolvimento do fruto (LIU *et al.*, 2009; LIU *et al.*, 2011), o proteoma do endosperma foi também investigado com objetivo de compreender a mobilização de óleo na germinação de sementes de pinhão-manso (YANG *et al.*, 2009), e o proteoma de endosperma em diferente estágios de desenvolvimento foi comparado (SHAH *et al.*, 2015). Mas até então não há relatos de estudo comparativo de endosperma de variedades contrastantes quanto ao teor de ésteres de forbol.

O óleo das sementes oleaginosas são os lipídeos armazenados como triacilgliceróis nos chamados corpos oleaginosos. Em *J. curcas* estudos proteômicos de corpos oleaginosos revelaram as oleosinas como seus principais componentes (POPLUECHAI *et al.*, 2011). Devido ao alto teor de óleo nas sementes de pinhão manso, o que justifica seu potencial como matéria prima para produção de biocombustíveis, a rota do metabolismo dos lipídeos merece atenção. Assim, a análise do metabolismo de lipídeos no endosperma é de interesse e as

proteínas envolvidas na biossíntese dos ácidos graxos, em ambos os acessos foram analisadas. O objetivo foi verificar se o teor de ésteres de forbol pode estar relacionado com a produção de óleo na espécie. Das 503 proteínas identificadas em endosperma (Tabela Suplementar 1), 36 estão envolvidas no metabolismo de lipídeos (Tabela 8), deste total 33 estão presentes em acessos ATEF, sendo 8 destas exclusivas deste acesso.

**Tabela 8.** Proteínas relacionadas a síntese e degradação de ácidos graxos e proteínas associadas a corpos lipídicos identificadas em endosperma de acessos ATEF e BTEF de *Jatropha curcas*.

| Acesso     | Descrição  | ATEF | BTEF | Metabolismo de lipídeos                  |
|------------|--|------|------|--|
| A8WE55     | 16.6 kDa oleosin   | X    | X    | Atividades associadas a corpos lipídicos |
| Q56WD9     | 3-ketoacyl-CoA thiolase 2, peroxisomal   | X    | X    | Degradação de lipídeos                   |
| Q41135     | 50 kDa ketoavyl-ACP synthase   | X    | X    | Síntese de lipídeos                      |
| A0A067JFR1 | Aconitate hydratase  | X    | X    | Degradação de lipídeos                   |
| A0A067JMA6 | Aconitate hydratase  |      | X    | Degradação de lipídeos                   |
| A0A067JUC8 | Acyl carrier protein   |      | X    | Síntese de lipídeos                      |
| B9SJJ8     | Alcohol dehydrogenase, putative  | X    | X    | Degradação de lipídeos                   |
| B9SHB0     | Alcohol dehydrogenase, putative  | X    |      | Degradação de lipídeos                   |
| B9SUZ9     | Alcohol dehydrogenase, putative  | X    |      | Degradação de lipídeos                   |
| B9R9I0     | Alcohol dehydrogenase, putative  | X    | X    | Degradação de lipídeos                   |
| B9RB49     | Aldehyde dehydrogenase, putative   | X    |      | Degradação de lipídeos                   |
| B9RB49     | Aldehyde dehydrogenase, putative   | X    | X    | Degradação de lipídeos                   |
| Q000L2     | Beta-ketoacyl-ACP synthase II  | X    |      | Síntese de lipídeos                      |
| B9SQU8     | Calcium ion binding protein, putative  | X    | X    | Atividades associadas a corpos lipídicos |
| B9SPX3     | Corticosteroid 11-beta-dehydrogenase, putative                                 | X    | X    | Atividades associadas a corpos lipídicos |
| A0A067LI89 | Dihydrolipoamide acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex | X    |      | Síntese de lipídeos                      |
| A0A067KC33 | Dihydrolipoamide acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex | X    |      | Síntese de lipídeos                      |
| B9RZN2     | Dihydrolipoamide dehydrogenase, putative                                       | X    | X    | Síntese de lipídeos                      |
| C5ILA9     | Heteromeric acetyl-CoA biotin carboxylase                                      | X    |      | Síntese de lipídeos                      |
| B9SDU7     | Hydroxyacyl-ACP Dehydrase  | X    | X    | Síntese de lipídeos                      |
| B9SUS2     | Isocitrate lyase   | X    | X    | Degradação de lipídeos                   |
| B9RMM7     | Ketoacyl-ACP Reductase (KAR)   | X    | X    | Síntese de lipídeos                      |
| D2CGD5     | Lipase   | X    |      | Degradação de lipídeos                   |
| B9T1U3     | Long-chain-fatty-acid CoA ligase, putative                                     | X    |      | Síntese de lipídeos                      |

|            |  |   |   |  |
|------------|--|---|---|--|
| B9T1U3     | Long-chain-fatty-acid CoA ligase, putative                         | X |   | Degradação de lipídeos                   |
| A0A067KZE2 | Malate dehydrogenase   | X | X | Síntese de lipídeos                      |
| A0A067KFB5 | Malate synthase  | X | X | Degradação de lipídeos                   |
| A0A067KNF4 | Malic enzyme   |   | X | Síntese de lipídeos                      |
| B9T1E7     | Mitochondrial oxoglutarate/malate carrier protein, putative        | X | X | Síntese de lipídeos                      |
| B9RAW7     | Oleosin 18.2 kDa, putative   | X | X | Atividades associadas a corpos lipídicos |
| A0A067KGL5 | Oleosin  | X | X | Atividades associadas a corpos lipídicos |
| I7F877     | Oleosin  | X | X | Atividades associadas a corpos lipídicos |
| Q9ZPI5     | Peroxisomal fatty acid beta-oxidation multifunctional protein MFP2 | X | X | Degradação de lipídeos                   |
| D2E4A5     | Phospholipase D  | X | X | Degradação de lipídeos                   |
| A0A067JEA2 | Pyruvate kinase  | X |   | Síntese de lipídeos                      |
| A0A067JRD2 | S-(hydroxymethyl)glutathione dehydrogenase                         | X | X | Degradação de lipídeos                   |

Verificadas as proteínas envolvidas na síntese de ácidos graxos, algumas estão presentes apenas no acesso de alto teor de ésteres de forbol como é o caso da Beta-ketoacyl-ACP synthase II, enzima que catalisa a reação no metabolismo do ácido palmítico ao ácido esteárico e a subsequente formação de ácido oleico. As Dihydrolipoamide acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex, Heteromeric acetyl-CoA biotin carboxylase e Long-chain-fatty-acid CoA ligase, putative também apareceram somente no acesso de alto teor de ésteres de forbol. As sintetases de acil-coenzima A (CoA) grupo ao qual pertence a Long-chain-fatty-acid CoA ligase (ACSs, EC 6.2.1.3) catalisam a formação de um composto tioéster a partir de ácidos graxos livres, ATP e CoA (KORNBERG; PRICER, 1953 citado por SCHNURR *et al.*, 2002). A biossíntese dos ácidos graxos, em plantas, ocorre em sua maior parte em dois compartimentos subcelulares, nos plastídeos e no retículo endoplasmático. Nos plastídeos, ocorre a síntese a partir do acetil-CoA até a formação dos ácidos graxos palmítico (16:0) ou esteárico (18:0) e a desaturação do ácido esteárico para oleico (18:1), no retículo endoplasmático ocorrem as conversões adicionais de ácido oleico em linoleico (18:2) e posteriormente ácido linolênico (18:3) (SOMERVILLE *et al.*, 2000).

Quando verificadas as proteínas relacionadas a degradação de ácidos graxos, uma lipase foi identificada somente no acesso ATEF. Em plantas oleaginosas como a *J. curcas* as lipases atuam na mobilização dos triglicerídeos de armazenamento através da hidrólise para ácidos graxos. Os ácidos graxos liberados pelas lipases são canalizados para as vias produtoras de energia, fornecendo energia para o crescimento do embrião e da plântula (STAUBMANN *et al.*, 1999). Analisando as proteínas relativas a corpos lipídicos, foram verificadas oleosinas, principais componentes de corpos oleaginosos em *J. curcas*, em ambos os acessos (POPLUECHAI *et al.*, 2011). A análise das proteínas envolvidas no metabolismo de lipídeos de endosperma de *J. curcas* entre acessos com teores de ésteres de forbol contrastantes identificou maior número de proteínas relacionadas a produção e armazenamento de óleo em sementes de alto teor de ésteres de forbol sendo necessários testes adicionais específicos para tal comprovação.

Estudos anteriores realizando a proteômica de endosperma de acessos ATEF com objetivo de compreender a mobilização de óleo na germinação de sementes de pinhão-manso demonstraram que o teor de óleo é estável até o momento em que se inicia a germinação. As proteínas do tipo oleosinas foram reguladas negativamente no início da germinação de sementes indicando que a mobilização de óleo das sementes é iniciada no momento da germinação (YANG *et al.*, 2009). Em um estudo anterior com sementes em desenvolvimento realizado por nosso grupo, foi mostrado que o endosperma maduro foi o estágio com menor número de

identificações (307 proteínas) quando comparado a endosperma em estágios mais jovens, em análise realizada a partir da digestão de spots proteicos de eletroforese bidimensional (SHAH *et al.*, 2015). O nosso trabalho partindo de digestão de proteínas em solução e uso de fracionamento em coluna de fase reversa aumentou o número de identificações em aproximadamente 64%.

A análise quantitativa não mostrou diferença estatística entre as proteínas relacionadas ao metabolismo de lipídeos que foram encontradas em ambos os acessos. O fato das proteínas relacionadas a respostas a estímulos externos (proteínas de choque térmico) estarem reguladas positivamente em acessos ATEF é relacionada a sua alta susceptibilidade a estresses bióticos e abióticos. As proteínas de choque térmico (Hsp – Heat Shock Proteins) são uma classe conservada de proteínas indutíveis pelo estresse que atuam principalmente como chaperonas moleculares nas respostas primárias de proteção celular, (LI; BUCHNER, 2013; LINDQUIST; GRAIG, 1988). Dentre os genes da família de resposta ao choque térmico, o HSP70 é um dos genes altamente conservados e o primeiro a ser induzido em resposta a diversos fatores estressantes (MUKHOPADHYAY *et al.*, 2003).

Dado a importância econômica de *J. curcas* estar relacionada com a produção de óleo por suas sementes, estabelecer a relação entre o teor de óleo e a toxicidade da planta é de extrema importância. A literatura já disponível confirma que tal relação ainda não está bem estabelecida, estudos onde foram quantificados teor de óleo e concentração de ésteres mostraram variações entre os resultados que não permitiram o estabelecimento concreto de tal relação (AHMED; SALIMON, 2009). Pesquisas com acessos de baixo teor de ésteres de forbol apontam menor rendimento deste, no entanto o baixo rendimento é atribuído a fatores secundários como menor rendimento dos frutos e alta susceptibilidade a estresses bióticos quando comparados aos acessos de alto teor de EF (HE *et al.*, 2011; MAKKAR *et al.*, 1997; MAKKAR; ADERIBIGBE; BECKER, 1998; MAKKAR; MARTINEZ-HERRERA; BECKER, 2008). Os resultados obtidos neste estudo e a bibliografia consultada sugerem que o melhoramento da cultura deve reduzir a toxicidade da planta, mas ao mesmo tempo manter sua resistência para assim garantir a produção de óleo.

### **5.7.5 Proteínas identificadas, classificadas funcionalmente e estatisticamente diferentes relacionadas a fotossíntese em diferentes tecidos de acessos contrastantes de *J. curcas***

Foram identificadas 122 proteínas relacionadas a fotossíntese (Tabela suplementar 4), todas presentes em folhas, 15 destas também estavam presentes em endosperma e 75 também foram identificadas em raízes de *J. curcas*. Das 9 proteínas relacionadas a fotossíntese que apresentaram diferença estatística em amostras de folha, 7 delas foram mais abundantes de amostras de folhas de ATEF (Tabela 5). Dentre as proteínas mais abundantes em ATEF estão as subunidades de ligação a clorofila (Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic) estas atuam na absorção mais eficiente da energia. A enzima fotossintética Phosphoribulokinase (2.7.1.19) que tem por principal função regenerar o RuBP, que é o substrato inicial e a molécula receptora de CO<sub>2</sub> do ciclo de Calvin, também estava regulada positivamente em amostras ATEF, a mesma é essencial e atua catalisando a fosforilação dependente de ATP da ribulose 5-fosfato na ribulose 1,5-bisfosfato, ambos intermediários no Ciclo de Calvin.

## 6 PERSPECTIVAS FUTURAS

O objetivo principal do nosso trabalho foi ao analisar os diferentes tecidos de *J. curcas* identificar o possível órgão/tecido onde os ésteres de forbol são sintetizados. A evidência de enzimas envolvidas na síntese de diterpenos nos leva a sugerir as raízes como sendo o local de síntese desses compostos que são posteriormente transportados para as demais partes da planta. Até então a enzima casbeno sintase não havia sido encontrada em análises proteômicas nesta cultura, tal achado é fundamentalmente importante para programas que visem o melhoramento da cultura. No entanto análises adicionais são necessárias para que possamos comprovar esta teoria.

A aplicação da proteômica alvo direcionada como SRM (Selected Reaction Monitoring) e PRM (Parallel reaction monitoring) nos tecidos estudados usando padrões para as proteínas de interesse pode confirmar a raiz como órgão de síntese e ainda determinar se há ou não diferença quanto a abundância dessas proteínas entre os diferentes acessos. Uma análise mais cuidadosa dos transportadores de terpenos, e a forma como os ésteres de forbol ou seus intermediários são transportados também seria interessante. A identificação de ésteres de forbol nos diferentes tecidos usando HPLC também seria de fundamental importância. Em literatura diversos trabalhos evidenciam os ésteres de forbol em frutos, um trabalho demonstra os mesmos em folhas, mas ainda não há evidências dos ésteres de forbol em raízes por análises deste tipo. A realização de experimentos em casa de vegetação que objetivem a verificação do transporte dos ésteres de forbol das raízes para as demais partes da planta também podem ser realizados. A partir da confirmação do órgão de síntese e o modo como o mesmo é transportado pode-se lançar mão do melhoramento genético a fim de reduzir os teores dos ésteres de forbol em plantas de pinhão manso e garantir o maior aproveitamento da cultura.

## 7 CONCLUSÃO

A análise proteômica dos diferentes tecidos de acessos contrastantes quanto aos teores de ésteres de forbol de *J. curcas* é o primeiro estudo proteômico abrangente de folhas e raízes nesta cultura. A identificação de enzimas envolvidas na biossíntese de ésteres de forbol como: casbeno sintase, casbeno 5,6 oxidase e geranil geranil difosfato sintase, e de transportadores de terpenos terem sido identificadas exclusivamente em raízes, e com base em dados de literatura, os resultados aqui obtidos indicam ser as raízes o local de síntese dos ésteres de forbol. A análise proteômica de diferentes tecidos de *J. curcas* levou a indícios importantes quanto a biossíntese dos ésteres de forbol, necessitando de análises complementares para comprovação desta teoria. Os resultados aqui obtidos geram subsídios para o melhoramento da cultura e o melhor aproveitamento do seu potencial econômico.

## REFERÊNCIAS

- ABHILASH, P. C., SRIVASTAVA, P., JAMIL, S., & SINGH, N. Revisited *Jatropha curcas* as an oil plant of multiple benefits: critical research needs and prospects for the future. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 18, n. 1, p. 127-131, 2011.
- AGAMUTHU, P., ABIOYE, O. P., e AZIZ, A. A. Phytoremediation of soil contaminated with used lubricating oil using *Jatropha curcas*. **Journal of hazardous materials**, v. 179, n. 1, p. 891-894, 2010.
- AHMED, W. A., & SALIMON, J. Phorbol éster as toxic constituents of tropical *Jatropha curcas* seed oil. **Eur. J. Sci. Res**, v. 31, n. 3, p. 429-436, 2009.
- ALONSO, E. C.; SANTOS, D. Y. A. C. *Ricinus communis* and *Jatropha curcas* (Euphorbiaceae) Seed Oil Toxicity Against *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 106, n. 2, p. 742-746. 2013.
- ARAÚJO, F. D. da S.; ARAÚJO, I. C.; COSTA, I. C. G.; DE MOURA, C. V. R.; CHAVES, M. H.; ARAÚJO, E. C. E. Study of degumming process and evaluation of oxidative stability of methyl and ethyl biodiesel of *Jatropha curcas* L. oil from three different Brazilian states. **Renewable Energy**, v. 71, p. 495-501, 2014.
- ARVIDSSON, R., PERSSON, S., FRÖLING, M., e SVANSTRÖM, M. Life cycle assessment of hydrotreated vegetable oil from rape, oil palm and *Jatropha*. **Journal of Cleaner Production**, v. 19, n. 2, p. 129-137, 2011.
- BARBIERI, L.; BATTELLI, M. G.; STIRPE, F. Ribosome-inactivating proteins from plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, **Reviews on Biomembranes**, Italy, v. 1154, n. 3, p. 237-282, 1993.
- BOHLMANN, J., & KEELING, C. I. Terpenoid biomaterials. **The Plant Journal**, v. 54, n. 4, p. 656-669, 2008.
- BORA, D. K., e BARUAH, D. C. Assessment of tree seed oil biodiesel: A comparative review based on biodiesel of a locally available tree seed. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, n. 3, p. 1616-1629, 2012.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem.** 72, 248-54, 1976.
- CANTRELL, C. L.; ALI, A.; DUKE, S. O.; KHAN, I. Identification of mosquito biting deterrent constituents from the Indian folk remedy plant *Jatropha curcas*. **Journal of Medical Entomology**, v. 48, n. 4, p. 836-845. 2011.
- CHENG, A. X., LOU, Y. G., MAO, Y. B., LU, S., WANG, L. J., & CHEN, X. Y. Plant terpenoids: biosynthesis and ecological functions. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 49, n. 2, p. 179-186, 2007.

CHIANESE, G., FATTORUSSO, E., AIYELAAGBE, O.O., LUCIANO, P., SCHRDER, H.C., MLLER, W.E.G., TAGLIALATELA-SCAFATI, O., SpiroCurcasone, a diterpenoid with a novel carbon skeleton from *Jatropha curcas*. **Organic Letters**, v.13, n. 2, p. 316–319, 2011.

CONESA, A., & GÖTZ, S. Blast2GO: A comprehensive suite for functional analysis in plant genomics. **International journal of plant genomics**, 2008.

CROTEAU, R., KUTCAHN, T.M. LEWIS, N.G. Natural products. In **Biochemistry and Molecular Biology of Plants** (Buchanan, B., Gruissem, W. and Jones, R., eds). Rockville, MD: American Society of Plant Physiologists, pp. 1250–1318, 2000.

DAHAL, D., NEWTON, K. J., & MOONEY, B. P. Quantitative proteomics of *Zea mays* hybrids exhibiting different levels of heterosis. **Journal of proteome research**, v. 15, n. 8, p. 2445-2454, 2016.

DEVAPPA, R. K., MAKKAR, H. P., & BECKER, K. *Jatropha* toxicity—a review. **Journal of toxicology and environmental health**, Part B, v. 13, n. 6, p. 476-507, 2010.

DIAS, L.A.S.; LEME, L.P.; LAVIOLA, B.G.; PALLINI FILHO, A.; PEREIRA, O.L.; CARVALHO, M.; MANFIO, C.E.; SANTOS, A.S.; SOUSA, L.C.A.; OLIVEIRA, T.S. & DIAS, D.C.F.S. Cultivo de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) para produção de óleo combustível. Viçosa, MG, v.1. 40p, 2007.

DOMERGUE, M., & PIROT, R. *Jatropha curcas* L. **Rapport de synthèse bibliographique**, 111p, 2008.

DRANSKI, J. A. L.; JÚNIOR, A. S. P.; STEINER, F.; ZOZ, T.; MALAVASI, U. C.; MALAVASI, M. M.; GUIMARÃES, V. F. Physiological maturity of seeds and colorimetry of fruits of *Jatropha curcas* L. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, n. 4, p. 158-165, 2010.

DUBEY<sup>1</sup>, A. K., SARVIYA, R. M., & REHMAN, A. Characterization of processed *Jatropha* oil for use as engine fuel, 2011.

EDRISI, S. A., DUBEY, R. K., TRIPATHI, V., BAKSHI, M., SRIVASTAVA, P., JAMIL, S., ... & ABHILASH, P. C. *Jatropha curcas* L.: a crucified plant waiting for resurgence. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 41, p. 855-862, 2015.

EMIDIO, N. B., CARPANEZ, A. G., QUELLIS, L. R., FARANI, P. S., VASCONCELOS, E. G., & FARIA-PINTO, P. Proteômica: uma introdução aos métodos e aplicações. **HU Revista**, v, 41, p. 3 e 4, 2015.

FAIRLESS, D. Biofuel: the little shrub that could-maybe. **Nature News**, 449(7163), p. 652-655, 2007.

FASSINO, W. F.; SAKO, A.; FOFANA, A.; KOUA, K. B.; TOURE, S. Fatty acid composition as a means to estimate the high heating value (HHV) of vegetable oils and biodiesel fuels. **Energy**, v. 35, p. 4949-4954, 2010.

FRISO, G., & VAN WIJK, K. J. Posttranslational protein modifications in plant metabolism. **Plant physiology**, v. 169, n. 3, p. 1469-1487, 2015.

GERSHENZON, J., & DUDAREVA, N. The function of terpene natural products in the natural world. **Nature chemical biology**, v. 3, n. 7, p. 408-414, 2007.

GOEL, G., MAKKAR, H. P., FRANCIS, G., & BECKER, K. Phorbol ésters: structure, biological activity, and toxicity in animals. **International journal of toxicology**, v. 26, n. 4, p. 279-288, 2007.

GOMES, T. G., HADI, S. I., COSTA ALVES, G. S., MENDONÇA, S., DE SIQUEIRA, F. G., & MILLER, R. Current Strategies for the Detoxification of *Jatropha curcas* Seed Cake: A Review. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 66, n. 11, p. 2510-2522, 2018.

GUEDES, R. E., DE ALMEIDA CRUZ, F., DE LIMA, M. C., LUIZA, D., CASTRO, R. N., & MENDES, M. F. Detoxification of *Jatropha curcas* seed cake using chemical treatment: analysis with a central composite rotatable design. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 537-543, 2014.

GUERRA, D., CROSATTI, C., KHOSHRO, H. H., MASTRANGELO, A. M., MICA, E., & MAZZUCOTELLI, E. Post-transcriptional and post-translational regulations of drought and heat response in plants: a spider's web of mechanisms. **Frontiers in plant science**, v. 6, n. 57, 2015.

GUBITZ, G. M.; MITTELBAACH, M.; TRABI, M. Exploitation of the tropical oil seed plant *Jatropha curcas* L. **Bioresource Technology**, v. 67, p. 73-82. 1999.

HAAS, W., STERK, H., MITTELBAACH, M. Novel 12-Deoxy-16-hydroxyphorbol Diésters Isolated from the Seed Oil of *Jatropha curcas*. **Journal of Natural Products**, v. 65, n. 10, p. 1434-1440, 2002.

HA, J., SHIM, S., LEE, T., KANG, Y. J., HWANG, W. J., JEONG, H., & LESTARI, P. Genome sequence of *Jatropha curcas* L., a non-edible biodiesel plant, provides a resource to improve seed-related traits. **Plant biotechnology journal**, v. 17, n. 2, p. 517-530, 2019.

HE, W.; KING, A. J.; KHAN, M. A.; CUEVAS, J. A.; RAMIARAMANANA, D.; GRAHAM, I. A. Analysis of seed phorbol-éster and curcín content together with genetic diversity in multiple provenances of *Jatropha curcas* L. from Madagascar and Mexico. **Plant Physiol. Biochem.** v. 49, p. 1183-1190, 2011.

HE, Y., PENG, T., GUO, Y., LI, S., GUO, Y., TANG, L., & CHEN, F. Nontoxic oil preparation from *Jatropha curcas* L. seeds by an optimized methanol/n-hexane sequential extraction method. **Industrial crops and products**, v. 97, n. 308-315, 2017.

HEIN, M. Y., SHARMA, K., COX, J., & MANN, M. Proteomic analysis of cellular systems. In **Handbook of Systems Biology** (pp. 3-25), 2013.

HIDAYAT, C., HASTUTI, P., WARDHANI, A. K., & NADIA, L. S. Method of phorbol éster degradation in *Jatropha curcas* L. seed cake using rice bran lipase. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 117, n. 3, p. 372-374, 2014.

JAMIL, S., ABHILASH, P.C., SINGH, N. e SHARMA, P.N. *Jatropha curcas*: a potential crop

for phytoremediation of coal fly ash. **Journal of hazardous materials**, v. 172, n. 1, p. 269-275, 2009.p

JANAUN, J. e ELLIS, N. Perspectives on biodiesel as a sustainable fuel. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 4, p. 1312-1320, 2010.

JASIŃSKI, M., STUKKENS, Y., DEGAND, H., PURNELLE, B., MARCHAND-BRYNAERT, J., & BOUTRY, M. A plant plasma membrane ATP binding cassette-type transporter is involved in antifungal terpenoid secretion. **The Plant Cell**, v. 13, n. 5, p. 1095-1107, 2001.

JING, L., FANG, Y., YING, X., WENXING, H., MENG, X., SYED, M.N., FANG, C. Toxic impact of ingested Jatropherol-1 on selected enzymatic activities and the ultrastructure of midgut cells in silkworm, *Bombyx mori* L. **Journal of Applied Entymology** v. 129, p. 98–104, 2005.

JOHN, K. M., KHAN, F., LUTHRIA, D. L., GARRETT, W., & NATARAJAN, S. Proteomic analysis of anti-nutritional factors (ANF's) in soybean seeds as affected by environmental and genetic factors. **Food chemistry**, v. 218, p. 321-329, 2017.

JUWARKAR, A.A, YADAV, S.K, KUMAR, P. e SINGH, S.K. Effect of biosludge and biofertilizer amendment on growth of *Jatropha curcas* in heavy metal contaminated soils. **Environmental monitoring and assessment**, v. 145, n. 1-3, p. 7-15, 2008.

KESSLER, A., & BALDWIN, I. T. Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature. **Science**, v. 291, n. 5511, p. 2141-2144, 2001.

KING, A. J., MONTES, L. R., CLARKE, J. G., AFFLECK, J., LI, Y., WITSENBOER, H., VAN DER VOSSSEN, E., VAN DER LINDE, P., TRIPATHI, Y., TAVARES, E., SHUKLA, P., RAJASEKARAN, T., VAN LOO, E., GRAHAM, I. A. Linkage mapping in the oilseed crop *Jatropha Curcas* L. reveals a locus controlling the biosynthesis of phorbol ésters which cause seed toxicity. **Plant biotechnology journal**, v. 11, n. 8, p. 986-996, 2013.

KING, A. J., BROWN, G. D., GILDAY, A. D., LARSON, T. R., & GRAHAM, I. A. Production of bioactive diterpenoids in the Euphorbiaceae depends on evolutionarily conserved gene clusters. **The Plant Cell**, v. 26, p. 3286-3298, 2014.

KING, A. J., BROWN, G. D., GILDAY, A. D., FORESTIER, E., LARSON, T. R., GRAHAM, I. A. A Cytochrome P450-Mediated Intramolecular Carbon–Carbon Ring Closure in the Biosynthesis of Multidrug-Resistance-Reversing Lathyrane Diterpenoids. **ChemBioChem**, v. 17, n. 17, p. 1593-1597, 2016.

KIRBY, J., NISHIMOTO, M., PARK, J. G., WITHERS, S. T., NOWROOZI, F., BEHRENDT, D., RUTLEDGE, E. J. G., FORTMAN, J. L., JOHNSON, H. E., ANDERSON, J. V., KEASLING, J. D. Cloning of casbene and neocembrene synthases from Euphorbiaceae plants and expression in *Saccharomyces cerevisiae*. **Phytochemistry**, v. 71, n. 13, p. 1466-1473, 2010.

KOH, M.Y. e GHAZI, T.I. M. A review of biodiesel production from *Jatropha curcas* L. oil. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, n. 5, p. 2240-2251, 2011.

KRATZEISEN, M.; MULLER, J. Suitability of *Jatropha* seed shells as fuel for small-scale combustion units. **Renew Energ**, 51, 46-52, 2013.

KUMAR, A., SHARMA, S. An evaluation of multipurpose oil seed crop for industrial uses (*Jatropha curcas* L.): a review. **Ind. Crop. Prod.** v. 28, p. 1–10, 2008.

KUMAR, A., SHARMA, M. P. Selection of potential oils for biodiesel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 56, p. 1129-1138, 2016.

KUMAR, G. P., YADAV, S. K., THAWALE, P.R., SINGH, S.K. e JUWARKAR, A. A. Growth of *Jatropha curcas* on heavy metal contaminated soil amended with industrial wastes and Azotobacter—A greenhouse study. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 6, p. 2078-2082, 2008.

KUMAR, V., MAKKAR, H.P.S., BECKER, K. Dietary inclusion of detoxified *JatrophaCurcas* kernel meal: effects on growth performance and metabolic efficiency in common carp *Cyprinus carpio* L. **Fish Physiol. Biochem.** v. 36, p. 1159–1170, 2010.

KUMAR, A.; TEWARI, S. K. Origin, distribution, ethnobotany and pharmacology of *Jatropha curcas*. **Research Journal of Medicinal Plant**, v. 9, n. 2, p. 48-59. 2015.

LAFONT, J. J., ESPITIA, A. A., & SODRÉ, J. R. Potential vegetable sources for biodiesel production: cashew, coconut and cotton. **Materials for Renewable and Sustainable Energy**, v. 4, n. 1, p. 1-7, 2015.

LAVIOLA, B. G., DOS ANJOS, S. D., JUHÁSZ, A. C. P., ROCHA, R. B., DE OLIVEIRA, R. J. P., ALBRECHT, J. C., ... & ROSADO, T. B. Desempenho agrônômico e ganho genético pela seleção de pinhão-mansô em três regiões do Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 49, n. 5, p. 356-363, 2014.

IJAZ, M., BAHTTI, K. H., ANWAR, Z., DOGAR, U. F., & IRSHAD, M. Production, optimization and quality assessment of biodiesel from *Ricinus communis* L. oil. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v. 9, n. 2, p. 180-184, 2016.

LIANG, Y., CHEN, H., TANG, M. J., YANG, P. F., & SHEN, S. H. Responses of *Jatropha curcas* seedlings to cold stress: photosynthesis-related proteins and chlorophyll fluorescence characteristics. **Physiologia Plantarum**, v. 131, n. 3, p. 508-517, 2007.

LI, C., NG, A., XIE, L., MAO, H., QIU, C., SRINIVASAN, R., ... & HONG, Y. Engineering low phorbol ester *Jatropha curcas* seed by intercepting casbene biosynthesis. **Plant cell reports**, v. 35, n. 1, p. 103-114, 2015.

LI, J., & BUCHNER, J. Structure, function and regulation of the hsp90 machinery. **Biomedical journal**, v. 36, n. 3, 2013.

LIN, J., ZHOU, X., WANG, J., JIANG, P., & TANG, K. Purification and characterization of curcin, a toxic lectin from the seed of *Jatropha curcas*. **Preparative biochemistry & biotechnology**, v. 40, n. 2, p. 107-118, 2010.

- LINDQUIST, S., CRAIG, E A. The heat-shock proteins. **Annual Review of Genetics**. v. 22, p. 631-677, 1988.
- LING-YI, K., ZHI-DA, M., JIAN-XIA, S., RUI, F. Chemical constituents from roots of *Jatropha curcas*. **Acta Botanica Sinica**, v. 38, n. 2, p. 161–166, 1996.
- LIU, H., LIU, Y. J., YANG, M. F., & SHEN, S. H. A comparative analysis of embryo and endosperm proteome from seeds of *Jatropha curcas*. **Journal of integrative plant biology**, v. 51, n. 9, p. 850-857, 2009.
- LIU, H., YANG, Z., YANG, M., & SHEN, S. The differential proteome of endosperm and embryo from mature seed of *Jatropha curcas*. **Plant science**, v. 181, n. 6, p. 660-666, 2011.
- LIU, J.Q., YANG, Y.F., WANG, C.F., LI, Y., QIU, M.H. Three new diterpenes from *Jatropha curcas*. **Tetrahedron**, v. 68, p. 972–976, 2012.
- LIU, H., WANG, C., KOMATSU, S., HE, M., LIU, G., SHEN, S. Proteomic analysis of the seed development in *Jatropha curcas*: from carbon flux to the lipid accumulation. **Journal of proteomics**, v. 91, p. 23-40, 2013.
- LIANG, Y., CHEN, H., TANG, M. J., YANG, P. F., & SHEN, S. H. Responses of *Jatropha curcas* seedlings to cold stress: photosynthesis-related proteins and chlorophyll fluorescence characteristics. **Physiologia Plantarum**, v. 131, n. 3, p. 508-517, 2007.
- LIMA, D. C., DUARTE, F. T., MEDEIROS, V. K. S., CARVALHO, P. C., NOGUEIRA, F. C. S., ARAUJO, G. D. T., DOMONT, G. B., DE MEDEIROS, S. B. GeLC-MS-based proteomics of *Chromobacterium violaceum*: comparison of proteome changes elicited by hydrogen peroxide. **Scientific Reports**, v. 6, 2016.
- LIN, J., ZHOU, X., WANG, J., JIANG, P., & TANG, K. Purification and characterization of curcin, a toxic lectin from the seed of *Jatropha curcas*. **Preparative biochemistry & biotechnology**, v. 40, n. 2, p. 107-118, 2010.
- LIU, X., YE, M., PU, B. e TANG, Z. Risk management for *Jatropha curcas* based biodiesel industry of Panzihua Prefecture in Southwest China. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, n. 3, p. 1721-1734, 2012.
- LIU, X.; LI, L.; LI, W.; LU, D.; CHEN, F.; LI, J. Quantitative determination of phorbol éster derivatives in Chinese *Jatropha curcas* seeds by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. **Ind. Crops Prod.** v. 47, p. 29–32, 2013.
- LOHSE, M., NAGEL, A., HERTER, T., MAY, P., SCHRODA, M., ZRENNER, R., TOYGE, T., FERNIE, A. R., STITT, M., USADEL, B. Mercator: a fast and simple web server for genome scale functional annotation of plant sequence data. **Plant, cell & environment**, v. 37, n. 5, p. 1250-1258, 2014.
- LONG, S. P., KARP, A., BUCKERIDGE, M. S., DAVIS, S. C., JAISWAL, D., MOORE, P. H., & VONSHAKH, A. MOOSEA, S. P., MURPHY, D. J., ONWONA-AGYEMANG, S., VONSHAKH, A. **Feedstocks for biofuels and bioenergy. Bioenergy & Sustainability: bridging the gaps**, p. 302-347, 2015.

LUO, D., CALLARI, R., HAMBERGER, B., WUBSHET, S. G., NIELSEN, M. T., ANDERSEN-RANBERG, J. & STAERK, D. 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**, v. 113, n. 34, p. E5082-E5089, 2016.

MAKKAR, H.P.S. Antinutritional factors in foods for livestock M. Gill, E. Owen, G.E. Pollott, T.L.J. Lawrence (Eds.), *Animal Production in Developing Countries*. Occasional Publication, **British Society of Animal Production**. pp.n. 16, p.69-85, 1993.

MAKKAR, H. P. S., BECKER, K., SPORER, F., WINK, M. Studies on nutritive potential and toxic constituents of different provenances of *Jatropha curcas*. **J. Agric. Food Chem.** v. 45, p. 3152–3157, 1997.

MAKKAR, H. P. S.; ADERIBIGBE, A. O.; BECKER, K. Comparative evaluation of non-toxic and toxic varieties of *Jatropha curcas* for chemical composition, digestibility, protein degradability, and toxic factors. **Food Chemistry, London**, v. 62, n. 2, p. 207-215, 1998.

MAKKAR, H. P.; MARTINEZ-HERRERA, J.; BECKER, K. Variations in seed number per fruit, seed physical parameters and contents of oil, protein and phorbol éster in toxic and non-toxic genotypes of *Jatropha curcas*. **J. Plant Sci.**, v. 3, p. 260–265, 2008.

MAKKAR, H. R. S.; BECKER, K. *Jatropha curcas*, a promising crop for the generation of biodiesel and value-added coproducts. **Eur J Lipid Sci Tech**, 111, 773-787, 2009.

MAKKAR, H. P. State-of-the-art on detoxification of *Jatropha curcas* products aimed for use as animal and fish feed: a review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 222, p. 87-99, 2016.

MANGKOEDIHARDJO, S., RATNAWATI, R. e ALFIANTI, N. Phytoremediation of hexavalent chromium polluted soil using *Pterocarpus indicus* and *Jatropha curcas* L. **World Applied Sciences Journal**, v. 4, n. 3, p. 338-342, 2008.

MANURUNG, R. *et al.* Valorisation of *Jatropha curcas* L. plant parts: Nut shell conversion to fast pyrolysis oil. **Food Bioprod Process**, 87, 187-196, 2009.

MARAVI, D. K., MAZUMDAR, P., ALAM, S., GOUD, V. V., & SAHOO, L. *Jatropha* (*Jatropha curcas* L.). In **Agrobacterium protocols** (pp. 25-35). Springer, New York, NY. 2015.

MILLER, B., OSCHINSKI, C. ZIMMER, W. First isolation of an isoprene synthase gene from poplar and successful expression of the gene in *Escherichia coli*. **Planta**, v. 213, p. 483–487, 2001.

MOHAPATRA, S., PANDA, P.K. Effects of fertilizer application on growth and yield of *Jatropha curcas* L. in an aeric tropaquet of Eastern India. **Not. Sci. Biol.** v. 3, p. 95–100, 2011.

MONTEIRO, M. V. B.; BEVILAQUA, C. M. L.; MORAIS, S. M.; MACHADO, L. K. A.; CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F.; CAMPELLO, C. C.; RIBEIRO, W. L. C.; MESQUITA, M. A. Anthelmintic activity of *Jatropha curcas* L. seeds on *Haemonchus*

contortus. **Veterinary Parasitology**, v. 182, p. 259-263, 2011.

MUJUMDAR, A. M., & MISAR, A. V. Anti-inflammatory activity of *Jatropha curcas* roots in mice and rats. **Journal of ethnopharmacology**, v. 90, n. 1, p. 11-15, 2004.

MUNEER, S., & JEONG, B. R. Proteomic analysis of salt-stress responsive proteins in roots of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) plants towards silicon efficiency. **Plant growth regulation**, v. 77, v. 2, p. 133-146, 2015.

MUKHOPADHYAY I., SAXENA D K., CHOWDHURI D K. Hazardous effects of effluent from the chrome plating industry: 70 kDa heat shock protein expression as a marker of cellular damage in transgenic *Drosophila melanogaster* (Hsp70-lacZ). **Environmental Health Perspectives**. v. 111, n. 16, p. 1926-1932, 2003.

NAENGCHOMNONG, W., TARNCHOMPOO, B., THEBTARANONTH, Y. (+)- Jatrochol, (+)- marmesin, propacin and jatrophin from the roots of *Jatropha curcas* (Euphorbiaceae). **Journal of Science Society Thailand**, v. 20, p. 73–83, 1994.

NAENGCHOMNONG, W., THEBTARANONTH, Y., WIRIYACHITRA, P., OKAMOTO, K.T., CLARDY, J. Isolation and structure determination of four novel diterpenes from *Jatropha curcus*. **Tetrahedron Letters**, v. 27, p. 2439–2442, 1986a.

NAENGCHOMNONG, W., THEBTARANONTH, Y., WIRIYACHITRA, P., OKAMOTO, K.T., CLARDY, J. Isolation and structure determination of two novel Lathyrenes from *Jatropha curcus*. **Tetrahedron Letters**, v. 27, p. 5675–5678, 1986b.

NAKAO, M., HASEGAWA, G., YASUHARA, T., & ISHIHARA, Y. Degradation of *Jatropha curcas* phorbol esters derived from *Jatropha* oil cake and their tumor-promoting activity. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 114, p. 357-364, 2015.

NAKANO, Y., OHTANI, M., POLSRI, W., USAMI, T., SAMBONGI, K., & DEMURA, T. Characterization of the casbene synthase homolog from *Jatropha* (*Jatropha curcas* L.). **Plant Biotechnology**, v. 29, n. 2, p. 185-189, 2012.

NAWROT, R., LIPPMANN, R., MATROS, A., MUSIDLAK, O., NOWICKI, G., & MOCK, H. P. Proteomic comparison of *Chelidonium majus* L. latex in different phases of plant development. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 112, p. 312-325, 2017.

NDIMBA, B. K., NDIMBA, R. J., JOHNSON, T. S., WADITEE-SIRISATTHA, R., BABA, M., SIRISATTHA, S., & RAKWAL, R. Biofuels as a sustainable energy source: an update of the applications of proteomics in bioenergy crops and algae. **Journal of proteomics**, v. 93, p. 234-244, 2013.

NOGUEIRA, F., FARIAS, A. R., TEIXEIRA, F. M., DOMONT, G. B., & CAMPOS, F. A. Common Features Between the Proteomes of Floral and Extrafloral Nectar from the Castor Plant (*Ricinus communis*) and the Proteomes of Exudates from Carnivorous Plants. **Frontiers in plant science**, v. 9, n. 549, 2018.

OHTANI, M., NAKANO, Y., SANO, R., KURATA, T., & DEMURA, T. Toxic Substances in *Jatropha* Seeds: Biosynthesis of the Most Problematic Compounds, Phorbol Ésters. **In The**

**Jatropha Genome**, p. 97-111, 2017.

OLUKUNLE, J. O., ADENUBI, O. T., OLADELE, G. M., SOGEBI, E. A., & OGUNTOKE, P. C. Studies on the anti-inflammatory and analgesic properties of *Jatropha curcas* leaf extract. **Acta Veterinaria Brno**, v. 80, n. 3, p. 259-262, 2011.

OPENSHAW, K. A review of *Jatropha curcas*: an oil plant of unfulfilled promise. **Biomass and bioenergy**, v. 19, n 1, p. 1-15, 2000.

OSKOUÉIAN, E.; ABDULLAH, N.; AHMAD, S. Phorbol ésters isolated from *Jatropha* meal induced apoptosis-mediated inhibition in proliferation of Chang and Vero cell lines. **Int. J. Mol. Sci.** v. 13, p. 13816–13829, 2012.

PANDEY VC, SINGH K, SINGH JS, KUMAR A, SINGH B, SINGH RP. *Jatropha curcas*: a potential biofuel plant for sustainable environmental development. **Renew Sustain Energy Rev**, v. 16, n. 5, p. 2870–83, 2012.

PHENGNUAM, T., & SUNTORNSUK, W. Detoxification and anti-nutrients reduction of *Jatropha curcas* seed cake by *Bacillus* fermentation. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 115, n. 2, p. 168-172, 2013.

PINHEIRO, C. B., SHAH, M., SOARES, E. L., NOGUEIRA, F. C., CARVALHO, P. C., JUNQUEIRA, M., ARAÚJO, G. D. T., SOARES, A. A., DOMONT, G. B., CAMPOS, F. A. Proteome analysis of plastids from developing seeds of *Jatropha curcas* L. **Journal of proteome research**, v. 12, n. 11, p. 5137-5145, 2013.

POPLUECHAI, S., FROISSARD, M., JOLIVET, P., BREVIARIO, D., GATEHOUSE, A. M., O'DONNELL, A. G., CHARDOT, T., KOHLI, A. *Jatropha curcas* oil body proteome and oleosins: L-form JcOle3 as a potential phylogenetic marker. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 49, n. 3, p. 352-356, 2011.

RAHMAM, M.; AHMAD, S. H.; MOHAMED, M. T. M.; RAHMAM, M. Z. A. Antimicrobial compounds from leaf extracts of *Jatropha curcas*, *Psidium guajava*, and *Andrographis paniculata*. **The Scientific World Journal**, p. 1-8. 2014.

RAMPITSCH, C., & BYKOVA, N. V. Proteomics and plant disease: advances in combating a major threat to the global food supply. **Proteomics**, v. 12, n. 4-5, p. 673-690, 2012.

RAORANE, M., POPULECHAI, S., GATEHOUSE, A. M. R., KOHLI A. Proteomic perspectives on understanding and improving *Jatropha curcas* L. In: Bahadur, B., Sujatha, M., Carels, N. (Eds), *Jatropha, Challenges for a New Energy Crop*, vol. 2. Springer, New York 2013, pp. 375–391.

RATNADASS, A.; WINK, M. The phorbol éster fraction from *Jatropha curcas* seed oil: potential and limits for crop protection against insect pests. **International Journal of Molecular Science**, v. 13, p. 16157-16171. 2012.

RAVINDRANATH, N., VENKATAIAH, B., RAMESH, C., JAYAPRAKASH, P., DAS, B. Jatrophenone, a novel macrocyclic bioactive diterpene from *Jatropha gossypifolia*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin** v. 1, n. 7, p. 870–971, 2003.

RAVINDRANATH, N., REDDY, M.R., MAHENDER, G., RAMU, R., KUMAR, K.R. DAS, B. Deoxypreussomerins from *Jatropha curcas*: are they also plant metabolites.

**Phytochemistry**, v. 65, p. 2387–2390, 2004.

RUEBELT, M. C.; LEIMGRUBER, N. K.; LIPP, M.; REYNOLDS, T. L.; NEMETH, M. A.; ASTWOOD, J. D.; ENGEK, K. H.; JANY, K. D. Application of two-dimensional gel electrophoresis to interrogate alterations in the proteome of genetically modified crops. 1. Assessing analytical validation. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 54, n. 6, p. 2154-2161, 2006.

SABANDAR, C. W., AHMAT, N., JAAFAR, F. M., & SAHIDIN, I. Medicinal property, phytochemistry and pharmacology of several *Jatropha* species (Euphorbiaceae): a review.

**Phytochemistry**, v. 85, p. 7-29, 2013.

SCHNURR, J. A., SHOCKEY, J. M., DE BOER, G. J., BROWSE, J. A. Fatty acid export from the chloroplast. Molecular characterization of a major plastidial acyl-coenzyme A synthetase from *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 129, n. 4, p. 1700-1709, 2002.

SELMAR, D. Translocation of cyanogenic glucosides in cassava. **Acta Horticulturae**, v. 375, p. 61-68, 1994.

SHAH, M., SOARES, E. L., CARVALHO, P. C., SOARES, A. A., DOMONT, G. B., NOGUEIRA, F. C., & CAMPOS, F. A. Proteomic analysis of the endosperm ontogeny of *Jatropha curcas* L. seeds. **Journal of proteome research**, v. 14, n. 6, p. 2557-2568, 2015.

SHARATH, B. S., MOHANKUMAR, B. V., & SOMASHEKAR, D. Bio-detoxification of phorbol ésters and other anti-nutrients of *Jatropha curcas* seed cake by fungal cultures using solid-state fermentation. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 172, n. 5, p. 2747-2757, 2014.

SAKTHIVADIVEL, M.; DANIEL, T. Evaluation of certain insecticidal plants for the control of vector mosquitos viz. *Culex quinquefasciatus*, *Anopheles stephensi* and *Aedes aegypti*. **Applied Entomology Zoology**, v. 43, n. 1, p. 57 - 63. 2008.

SALATINO, A., SALATINO, M. L. F., & NEGRI, G. Traditional uses, chemistry and pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 1, p. 11-33, 2007.

SILVA, P.R.F. e FREITAS, T.F.S. Biodiesel: o ônus e o bônus de produzir combustível. **Ciência Rural**, v. 38, p. 843-851. 2008.

SOARES, E. L., SHAH, M., SOARES, A. A., COSTA, J. H., CARVALHO, P., DOMONT, G. B., NOGUEIRA, F. C. S., CAMPOS, F. A. Proteome analysis of the inner integument from developing *Jatropha curcas* L. seeds. **Journal of proteome research**, v. 13, n. 8, p. 3562-3570, 2014.

SOARES, E. D. A., WERTH, E. G., MADROÑERO, L. J., VENTURA, J. A., RODRIGUES, S. P., HICKS, L. M., & FERNANDES, P. M. Label-free quantitative proteomic analysis of pre-flowering PMeV-infected *Carica papaya* L. **Journal of proteomics**, v. 151, p. 275-283, 2017.

- SRINOPHAKUN, P., TITAPIWATANAKUN, B., SOOKSATHAN, I., PUNSUVON, V.. Prospect of deoiled *Jatropha curcas* seedcake as fertilizer for vegetables crops – a case study. **Journal Agric. Scienci** v. 4, p. 211–226, 2012.
- SIRIWARDHANA, M., OPATHELLA, G.K.C., JHA, M.K. Initiatives, potential and prospects in Thailand: A review. **Energy Policy**, v. 37, n. 2, p. 554-559, 2009.
- SOMERVILLE, C. J. Browse, JG Jaworski, JB Ohlrogge, Lipids. **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**, American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland, p. 507-512, 2000.
- STAUBMANN, R., NCUBE, I., GÜBITZ, G. M., STEINER, W., & READ, J. S. Esterase and lipase activity in *Jatropha curcas* L. seeds. **Journal of Biotechnology**, v. 75, n. 2-3, p. 117-126, 1999.
- TAKAHASHI, S., & KOYAMA, T. Structure and function of cis-prenyl chain elongating enzymes. **The Chemical Record**, v. 6, n. 4, p. 194-205, 2006.
- TATIKONDA, L., WANI, S. P., KANNAN, S., BEERELLI, N., SREEDEVI, T. K., HOISINGTON, D. A., VARSHNEY, R. K. AFLP-based molecular characterization of an elite germplasm collection of *Jatropha curcas* L., a biofuel plant. **Plant Science**, v. 176, n. 4, p. 505-513, 2009.
- TEIXEIRA, F. M., SHAH, M., DOMONT, G. B., NOGUEIRA, F. C., CAMPOS, F. A. In-Depth Proteome Analysis of *Ricinus communis* Pollens. **Proteomics**, v. 19, n. 3, p. 1800347, 2019.
- THIMM, O., BLÄSING, O., GIBON, Y., NAGEL, A., MEYER, S., KRÜGER, P., SELBIG, J., MULLER, L. A., RHEE, S. Y., STITT, M. MAPMAN: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. **The Plant Journal**, v. 37, n. 6, p. 914-939, 2004.
- TYANOVA, S., TEMU, T., SINITCYN, P., CARLSON, A., HEIN, M. Y., GEIGER, T., MANN, M. COX, J. The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote) omics data. **Nature methods**, v. 13, n. 9, p. 731, 2016.
- VASCONCELOS, I. M., & OLIVEIRA, J. T. A. Antinutritional properties of plant lectins. **Toxicon**, v. 44, n. 4, p. 385-403, 2004.
- VASCONCELOS, É. A., NOGUEIRA, F. C. S., ABREU, E. F. M., GONÇALVES, E. F., SOUZA, P. A. S., & CAMPOS, F. A. P. Protein extraction from cowpea tissues for 2-D gel electrophoresis and MS analysis. **Chromatographia**, v. 62, n. 7-8, p. 447-450, 2005.
- VELÁSQUEZ, E., NOGUEIRA, F. C., VELÁSQUEZ, I., SCHMITT, A., FALKAI, P., DOMONT, G. B., & MARTINS-DE-SOUZA, D. Synaptosomal proteome of the orbitofrontal cortex from schizophrenia patients using quantitative label-free and iTRAQ-based shotgun proteomics. **Journal of proteome research**, v. 16, n. 12, p. 4481-4494, 2017.
- WANG, X.-C., ZHENG, Z.-P., GAN, X.-W., HU, L.-H. Jatrothalactam, a novel diterpenoid

lactam isolated from *Jatropha curcas*. **Organic Letters**, v. 11, n. 23, p. 5522– 5524, 2009.

WANG, X., CAI, X., XU, C., WANG, Q., & DAI, S. Drought-responsive mechanisms in plant leaves revealed by proteomics. *International journal of molecular sciences*, v. 17, n. 10, p.1706, 2016.

WU, S., SCHALK, M., CLARK, A., MILES, R. B., COATES, R., & CHAPPELL, J. Redirection of cytosolic or plastidic isoprenoid precursors elevates terpene production in plants. **Nature biotechnology**, v. 24, n. 11, p. 1441, 2006.

YADAV, S.K., JUWARKAR, A.A., KUMAR, G.P., THAWALE, P.R., SINGH, S.K. e CHAKRABARTI, T. Bioaccumulation and phyto-translocation of arsenic, chromium and zinc by *Jatropha curcas* L.: impact of dairy sludge and biofertilizer. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 20, p. 4616-4622, 2009.

YANG, M. F., LIU, Y. J., LIU, Y., CHEN, H., CHEN, F., & SHEN, S. H. Proteomic analysis of oil mobilization in seed germination and postgermination development of *Jatropha curcas*. **Journal of proteome research**, v. 8, n. 3, 1441-1451, 2009.

YE, M., LI, C., FRANCIS, G. e MAKKAR, H.P.S. Current situation and prospects of *Jatropha curcas* as a multipurpose tree in China. **Agroforestry systems**, v. 76, n. 2, p. 487-497, 2009.

YU, T., LI, G., LIU, P., DONG, S., ZHANG, J., & ZHAO, B. Proteomics analysis of maize (*Zea mays* L.) grain based on iTRAQ reveals molecular mechanisms of poor grain filling in inferior grains. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 115, p. 83-96, 2017.

ZANETTI, F.; MONTI, A.; BERTI, M. T. Challenges and opportunities for new industrial oilseed crops in EU-27: A review. **Industrial Crops and Products**, v. 50, p. 580-595, 2013.

ZERBE, P., HAMBERGER, B., YUEN, M. M., CHIANG, A., SANDHU, H. K., MADILAO, L. M., & BOHLMANN, J. Gene discovery of modular diterpene metabolism in non-model systems. **Plant physiology**, v. 162, p. 1073-1091, 2013.

ZHANG, X., YANG, Z., LIANG, J., TANG, L., & CHEN, F. Detoxification of *Jatropha curcas* seed cake in solid-state fermentation of newly isolated endophytic strain and nutrition assessment for its potential utilizations. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 109, p. 202-210, 2016. (a)

ZHANG, Z., CHAO, M., WANG, S., BU, J., TANG, J., LI, F., WANG, Q., ZHANG, B. Proteome quantification of cotton xylem sap suggests the mechanisms of potassium-deficiency-induced changes in plant resistance to environmental stresses. **Scientific reports**, v. 6, 2016. (b)

ZHANG, Y., YANG, Q., LI, C., DING, M., LV, X., TAO, C., YU, H., CHEN, F., XU, Y. Curcin C, a novel type I ribosome-inactivating protein from the post-germinating cotyledons of *Jatropha curcas*. **Amino acids**, v. 49, n. 9, p. 1619-1631, 2017.