

FERNANDA PEREIRA DE SOUZA ROSA DE MELO

**IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES QUÍMICOS POR METABOLÔMICA E
POR REDE DE MOLÉCULAS RELACIONADOS A RESISTÊNCIA CONSTITUTIVA
À *Xanthomonas citri* subsp. *citri* EM FOLHAS DE *Citrus* spp.**

BAURU, SP

2022

FERNANDA PEREIRA DE SOUZA ROSA DE MELO

**IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES QUÍMICOS POR METABOLÔMICA E
POR REDE DE MOLÉCULAS RELACIONADOS A RESISTÊNCIA CONSTITUTIVA
À *Xanthomonas citri* subsp. *citri* EM FOLHAS DE *Citrus* spp.**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências, Bauru, para a obtenção do título de Mestra em Biociências (Área de Conhecimento: Aplicação da Diversidade Biológica)

Orientador: Dr. Luiz Leonardo Saldanha

BAURU, SP

2022

M528i

Melo, Fernanda Pereira de Souza Rosa de

Identificação de marcadores químicos por metabolômica e por rede de moléculas relacionados a resistência constitutiva à *Xanthomonas citri* subsp. *citri* em folhas de *Citrus* spp. /

Fernanda Pereira de Souza Rosa de Melo. -- Bauru, 2022

90 f. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências, Bauru

Orientador: Luiz Leonardo Saldanha

1. Cancro cítrico. 2. *Citrus sinensis*. 3. Flavonoides. 4. Marcadores químicos. 5. Resistência à patógenos. I. Título.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE FERNANDA PEREIRA DE SOUZA ROSA DE MELO, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS, DA FACULDADE DE CIÊNCIAS - CÂMPUS DE BAURU.

Aos 14 dias do mês de março do ano de 2022, às 09:00 horas, por meio de Videoconferência, realizou-se a defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de FERNANDA PEREIRA DE SOUZA ROSA DE MELO, intitulada **Identificação de marcadores químicos por metabolômica e por rede de moléculas relacionados a resistência constitutiva à *Xanthomonas citri* subsp. *citri* em folhas de *Citrus* spp**. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. LUIZ LEONARDO SALDANHA (Orientador(a) - Participação Virtual) do(a) Agroscope – Conthey (VS), Prof. Dr. LUIS OCTÁVIO REGASINI (Participação Virtual) do(a) Departamento de Química e Ciências Ambientais / UNESP/Câmpus de São José do Rio Preto, Profa. Dra. CLAUDIA MARIA FURLAN (Participação Virtual) do(a) Departamento de Botânica / Instituto de Biociências - USP São Paulo. Após a exposição pela mestranda e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, a discente recebeu o conceito final: APROVADO . Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.

Prof. Dr. LUIZ LEONARDO SALDANHA



AGRADECIMENTOS

Aos Professores Jean-Luc Wolfender e Emerson Ferreira Queiroz, Universidade de Genebra, Suíça, pela disponibilidade do equipamento UHPLC-HRMS.

Ao professor Jesus Aparecido Ferro, da Unesp de Jaboticabal, pela doação do material vegetal.

Em especial, ao Prof. Dr. Luiz Leonardo Saldanha, a quem devo meu ingresso na pesquisa, que me abriu as portas para esse mundo científico. Obrigada pelos ensinamentos, por continuar me ajudando e se fazendo o mais presente possível mesmo de longe e, principalmente, por acreditar no meu potencial ao longo de todos esses anos trabalhando juntos. Toda minha admiração e carinho.

Em especial, a Prof^a.Dra. Anne Ligia Dokkedal, por ter me recebido, ainda em 2016, em seu laboratório, por ter me acompanhado e orientado junto com o Leonardo durante a graduação. Obrigada pelos ensinamentos e pelo incentivo para que eu continuasse nesse meio, terá sempre meu respeito, admiração pela mulher e cientista que é, e carinho.

As minhas colegas e ex-colegas de laboratório Beatriz Alborgheti Soares e Ana Julia Borim de Souza, pelas conversas, por toda a ajuda e por deixar mais leve os momentos de trabalho.

Ao Luiz Henrique da Silva, por entender minhas ausências, por me apoiar, por não me deixar desistir, e por todo o amor e carinho ao longo desses anos. Obrigada por ser luz na minha vida.

À minha família, em especial a minha avó Maria de Lourdes da Silva Souza, a minha mãe Marina Pereira de Souza, a minha tia Marcia Pereira de Souza Zenatti e a minha irmã Yara Pereira de Souza. Vocês acreditaram em mim, me incentivaram,

abriram mão da minha presença nos últimos anos, respeitaram meus momentos de estresse e foram toda a minha rede de apoio. Amo muito vocês.

E por último a Deus, a quem deposito toda minha fé.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho às mulheres da minha vida: A minha mãe Marina, a minha avó Maria de Lourdes, a minha tia Marcia e a minha irmã Yara. Vocês são minha
inspiração!
Dedico também ao meu avô Alfredo (*in memoriam*).

MELO, Fernanda Pereira de Souza Rosa de. **Identificação de marcadores químicos por metabolômica e por rede de moléculas relacionados a resistência constitutiva à *Xanthomonas citri* subsp. *citri* em folhas de *Citrus* spp.** 2022. 90f. DISSERTAÇÃO (Mestrado Acadêmico em Biociências). - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências, Bauru, 2022.

RESUMO

Citrus compõem um dos maiores produtos agrícolas de valor agregado no Brasil, movimentando bilhões de dólares por ano, fomentando a economia do país e causando grande impacto social. No entanto, os pomares de *Citrus* são vulneráveis a patógenos, como por exemplo a bactéria gram-negativa *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*Xcc*), agente causador do cancro cítrico. Algumas espécies são consideradas resistentes, todavia, estudos que associam metabólitos especializados à resistência, são escassos. Neste estudo, para identificar marcadores químicos relacionados à resistência, investigamos o metaboloma foliar de 17 variedades comerciais de *Citrus* com diferentes graus de suscetibilidade e resistência. Preparamos extratos foliares e analisamos por cromatografia líquida de ultra-eficiência acoplada a espectrometria de alta-resolução (UHPLC-HRMS/MS) utilizando um método genérico para se obter uma visão ampla do metaboloma. Variações no *fingerprint* químico foram investigadas através de análises multivariadas utilizando os dados de LC-MS1. Os dados de MS/MS foram organizados na forma de rede de moléculas evidenciando as famílias estruturais. Os compostos foram anotados na rede por meio de comparação dos espectros experimentais com uma base de espectros *in silico* de produtos naturais seguido de ponderação taxonômica dos candidatos. Marcadores químicos da resistência foram selecionados a partir de uma rede de moléculas multi-informativa, após a integração dos resultados estatísticos da metabolômica. Isto nos deu uma análise complementar à estatística clássica para a visualização de dados de metabolômica e seleção de marcadores químicos. Seguindo esta abordagem, anotamos 1618 compostos de *Citrus*, pertencentes a 112 classes químicas normalizadas via *ClassyFire*. Selecionamos 12 metabólitos como potenciais marcadores químicos de resistência para duas espécies: *Citrus reticulata* (Ponkan e Satsuma) e *Citrus japonica* (Kumquat), majoritariamente da classe dos flavonoides, sendo eles: 5,3'-dihidroxi-6,7,8,4'-tetrametoxiflavona, Isoscutelareína 7,8-dimetil éter, 4-O- (beta-D-glucopiranosil) -D-ribitol, Hesperetina 7- (2,6-diramnosilglucosídeo), Ácido 1,4-Dicafeoilquínico, 4,7-Dimetil-6,7-dihidro-5H-2-pirindina, 5,7,3'-trihydroxiflavona, Herclavina, Apigenina 7-O-neohesperidosídeo, 3,7 (11) - Eudesmadien-2-ona, Digicitrina, 2- (1,3-Benzodioxol-5-il) -5,7-di-hidroxi-4H-1-benzopiran-4-ona. Nosso fluxo de trabalho possibilitou verificar variações do metaboloma de várias espécies que puderam ser correlacionadas com a resistência à patógenos. Tais metabólitos podem ser utilizados como marcadores químicos para direcionar a seleção de novas variedades mais resistentes e como alvo de estudos para o desenvolvimento de novos produtos naturais para o controle do cancro cítrico.

Palavras-chave: Cancro cítrico. *Citrus sinensis*. Flavonoides. Marcadores químicos. Resistência à patógenos.

MELO, Fernanda Pereira de Souza Rosa de. **Literature on screen:** Identification of chemical markers by metabolomics and molecular networking related to constitutive resistance to *Xanthomonas citri* subsp. *citri* in leaves of *Citrus* spp. 2022. 90 p. Dissertation (Masters in biosciences). São Paulo State University (UNESP), School of Sciences, Bauru, 2022.

ABSTRACT

Citrus makes up one of the largest value-added agricultural products in Brazil, moving billions of dollars per year, fostering the country's economy and causing great social impact. However, *Citrus* orchards are vulnerable to pathogens, such as the gram-negative bacterium *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xcc), the causative agent of citrus canker. Some species are considered resistant, however, studies associating specialized metabolites with resistance are scarce. In this study, to identify chemical markers related to resistance, we investigated the leaf metabolome of 17 commercial *Citrus* varieties with different degrees of susceptibility and resistance. We prepared leaf extracts and analyzed them by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to high-resolution spectrometry (UHPLC-HRMS/MS) using a generic method to obtain a broad view of the metabolome. Variations in chemical fingerprinting were investigated by multivariate analysis using LC-MS1 data. The MS/MS data were organized in the form of a molecule network highlighting the structural families. Compounds were annotated in the network by comparing the experimental spectra with a base of in silico spectra of natural products followed by taxonomic weighting of candidates. Chemical markers of resistance were selected from a multi-informative molecule network after integration of statistical results from metabolomics. This gave us a complementary analysis to classical statistics for metabolomics data visualization and chemical marker selection. Following this approach, we annotated 1618 *Citrus* compounds, belonging to 112 chemical classes normalized via ClassyFire. We selected 12 metabolites as potential chemical markers of resistance for two species: *Citrus reticulata* (Ponkan and Satsuma) and *Citrus japonica* (Kumquat), mostly from the flavonoid class, being: 5,3'-dihydroxy-6,7,8,4'-tetramethoxyflavone, Isoscutellarein 7,8-dimethyl ether, 4-O- (beta-D-glucopyranosyl)-D-ribitol, Hesperetin 7- (2,6-diramnosylglucoside), 1,4-Dicaffeoylquinic acid, 4,7-Dimethyl-6, 7-dihydro-5H-2-pyrimidine, 5,7,3'-trihydroxyflavone, Herclavine, Apigenin 7-O-neohesperidoside, 3,7 (11)-Eudesmadien-2-one, Digicitrin, 2- (1,3-Benzodioxol-5-yl)-5,7-dihydroxy-4H-1-benzopyran-4-one. Our workflow made it possible to verify variations in the metabolome of several species that could be correlated with pathogen resistance. Such metabolites can be used as chemical markers to direct the selection of new, more resistant varieties and as a target for studies to develop new natural products for the control of citrus canker.

Keywords: Citrus canker. *Citrus sinensis*. Flavonoids. Chemical markers. Pathogen resistance.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 <i>Citrus</i> L. (Rutaceae): aspectos botânicos, econômicos e patológicos ..	11
1.2 <i>Citrus</i> : composição química e propriedades medicinais.....	19
1.3 Ferramentas em estudo de metabolômica.....	24
2 OBJETIVO	28
2.1 Objetivos específicos	28
3 MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1 Coleta e preparação das amostras.....	29
3.2 Classificação da suscetibilidade das variedades.....	30
3.3 Análise por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas de alta resolução (UHPLC-HRMS)	31
3.4 Processamentos dos dados de UHPLC-HRMS	32
3.5 Construção da rede de moléculas (MN) através do GNPS.....	33
3.6 Anotação computacional <i>in silico</i> dos compostos	34
3.7 Ponderação taxonômica dos compostos candidatos	35
3.8 Análise estatística multivariada (MVA)	35
3.9 Cálculo da Resistência Constitutiva (RC).....	36
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1 Planejamento experimental	37
4.2 Perfil químico por UHPLC-HRMS	40
4.3 Processamento dos dados de LC-HRMS	42
4.4 Análise multivariada dos dados	43
4.5 Análise por rede de moléculas.....	48
4.6 Anotação <i>in silico</i> dos compostos e ponderação taxonômica	50
4.7 Integração de metadados na rede de moléculas para identificação de marcadores químicos	66
5 CONCLUSÃO	77
REFERÊNCIAS	78
APÊNDICE A	88

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Citrus* L. (Rutaceae): aspectos botânicos, econômicos e patológicos

Citrus L. se destaca como um dos principais gêneros dentro de Rutaceae englobando as espécies conhecidas como laranjas, limões, limas, pumelos e tangerinas. Estas espécies apresentam-se na forma de árvores ou arbustos, cujas folhas de suas espécies são geralmente ovoides ou elípticas e podem, algumas vezes, apresentar espinhos, enquanto as flores pentâmeras são brancas (Figura 01) (MABBERLEY, 2004).

O fruto que pode apresentar formas variadas, é considerado uma baga modificada em hesperídio, oriundo do pistilo sincárpico, cujo interior é macio e carregado de pequenas vesículas contendo suco (LADANIYA, 2008), característica esta marcante para os citrinos, subtribo ao qual pertence o gênero.



Figura 01. Foto representativa de um espécime do gênero *Citrus* spp. A imagem retrata as folhas coriáceas que podem ser uni ou trifoliadas, bem como a passagem para o estágio fenológico da frutificação. A Flor de *Citrus* spp. desenvolvidas na axila foliar, também são retratadas. Foto: Muñoz (2020).

Embora algumas características morfológicas permaneçam inalteradas nas espécies e variedades do gênero, segundo Penjor *et al.* (2013), a reprodução assexuada, a mutação e a compatibilidade cruzada, pode explicar as variações morfológicas encontradas nos citros. Estas variações podem surgir através da geração de híbridos dentro do próprio gênero ou com seus gêneros relacionados, ou ainda através dos inúmeros cultivares comerciais o que dificulta a classificação botânica (KLIMEK-SZCZYKUTOWICZ; SZOPA; EKIERT, 2020).

Podemos analisar as dubiedades na classificação realizando uma busca rápida na plataforma *The plant list* (2013), em que, utilizando como dados de entrada as palavras-chaves "Rutaceae - *Citrus*", podemos encontrar um total de 577 espécies, incluindo nomes infra-específicos para o gênero, sendo que apenas 33 são considerados aceitos, enquanto os demais categorizados como sinônimos.

Os sistemas adotados, quando se trata de compreender as espécies pertencentes aos *Citrus* são dois, de acordo com Sun *et al.* (2015): (i) atribuído a Swingle e Reece (1967 *apud* SUN *et al.*, 2015), e (ii) o de Tanaka (1977 *apud* SUN *et al.*, 2015). Os sistemas não apresentam grandes divergências, opondo-se de forma mais enfática na aceitação ou não de híbridos, cultivares, variantes, como espécies verdadeiras, características essas todas consideradas no sistema de Tanaka, que por isso, inclui mais espécies.

Como explicado ainda por Sun *et al.* (2015), em seu estudo baseado em filogenia, os dados por eles encontrados parecem corroborar os já apontados no sistema de classificação de Swingle e Reece, em relação às "verdadeiras árvores cítricas", com seis subgêneros, no entanto, para Barrett e Rhoades (1976) as espécies denominadas *Citrus reticulata*, do grupamento tangerina, *Citrus grandis*, pomelo e *Citrus medica*, citron, seriam as verdadeiras espécies biológicas, sendo as demais

Citrus aurantifolia, *C. aurantium*, *C. limon*, *C. paradisi* e *C. sinensis* de provável origem híbrida apomítica.

A origem filogenética de limões e limas, pertencentes a duas espécies diferentes segundo a classificação de Swingle e Reece, foi pauta do estudo desenvolvido por Curk *et al.* (2016). Os autores relatam que a origem das limas e limões é contraditória, mas revela relação com as cidras - *Citrus medica*.

O trabalho também demonstrou que o grupo apresenta alto poliformismo, são altamente heterozigotos e podem conter misturas de até quatro dos táxons ancestrais, sendo que limas e limões provavelmente surgiram de inúmeros eventos de recombinação sexual, enquanto demais espécies, como de laranja doce, podem ter surgido de mutações ou variações somáticas (CURK *et al.*, 2016).

A fim de auxiliar no esclarecimento desse emaranhado que é a classificação dos citros, Wu *et al.* (2018), realizaram estudos genômicos de diversos citros para avaliar a diversidade e evolução do grupo, além de identificar os híbridos existentes. Em seus dados, os pesquisadores apontaram como centro de origem das espécies a região sudeste do Himalaia, abrangendo Assam, Mianmar e Yunnan, além de demonstrar que alguns gêneros de citrinos estão fortemente acomodados dentro de *Citrus*, e, portanto, seriam espécies dentro do gênero, em paridade com as já referidas espécies verdadeiras (Figura 02).

existentes possam ter surgido de um processo de domesticação visando aumentar as características desejáveis (WU *et al.*, 2018).

Os resultados, embora esclarecedores, conflitam com estudos anteriores e reforçam a complexidade e necessidade de novos estudos para confirmar a classificação dos citros, frente aos dados filogenéticos.

Ainda que a classificação seja heterogênea, os usos e aplicações das espécies permeiam pelas ciências, envolvendo desde alimentação humana e animal, extração de compostos de interesse farmacêutico, e aplicações na indústria de cosméticos e derivados.

A produção de sucos e venda *in natura*, a extração de vitamina C, fibras e carotenóides, e as incontáveis aplicações de seus óleos essenciais e flavonoides, colocam os cítricos como uma das frutas mais cultivadas e exploradas no mundo.

No Brasil, a exploração de *Citrus* é responsável por movimentar aproximadamente 14 bilhões de dólares por ano, arrecadando 190 bilhões de dólares anuais em impostos no cinturão citrícola, que engloba 350 municípios de São Paulo e Minas Gerais (FUNDECITRUS, 2021). Destaca-se também os investimentos na produção, que permitiu nos últimos 30 anos, um aumento da capacidade produtiva por área, o que diminuiu a área de ocupação das plantações.

Em uma análise comparativa, o Brasil movimentou cerca de 1×10^6 t em exportação do suco concentrado, com um aumento de 17% entre as safras 2018/2019 e 2019/2020, sendo a maior parte destinada aos mercados Europeus e dos Estados Unidos, como apontou o relatório da CitrusBR (2020) que destaca ainda o estado de São Paulo como o maior produtor mundial.

Em contrapartida, a safra 2020/2021, cujos dados foram reportados no relatório de fechamento da safra de laranjas, pela Fundecitrus (2021), resultou na produção de

268 milhões de caixas de laranja, uma queda de 30,55% em relação à safra anterior, explicada pelas restrições impostas pela Pandemia do Covid-19 e pelas mudanças no clima que levou a perda de produtos (FUNDECITRUS, 2021).

A safra 2021/2022 também foi menor do que a esperada, devido a seca e a geada que levou a queda prematura dos frutos e menor produtividade, fechando em 262, 97 milhões de caixas (FUNDECITRUS, 2022).

No livro “O retrato da citricultura brasileira”, Neves *et al.* (2010) destacaram que o Brasil detinha 50% da produção mundial de suco, exportando 98% da produção e detendo 85% de participação no mercado mundial, o que levou a arrecadação em 189 milhões de dólares em impostos. Atualmente, levando em consideração as safras recentes, São Paulo e Minas Gerais movimentam sozinhos cerca de 614 milhões de dólares, com as exportações de suco de laranja, representando 550 mil toneladas na safra 2019/2020 (HORTIFRUTI BRASIL, 2020). Os dados do livro, embora de 2010, último ano de lançamento, em contraponto com os dados atuais, mostram a relevância dos citros no país para o comércio mundial.

O relatório de fechamento de safra 2020/2021 e 2021/2022 também apontaram um dado interessante sobre os motivos da queda da produção em relação as safras anteriores. O relatório apontou as principais causas da queda dos frutos, em relação às suas principais pragas e doenças e constatou uma queda no impacto do cancro cítrico para a perda dos frutos, detectado em 0,37% e 0,21% respectivamente para as safras 2020/2021 e 2021/2022 (FUNDECITRUS, 2021; FUNDECITRUS, 2022).

O cancro cítrico é uma patologia causada pela presença da bactéria gram-negativa *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*Xcc*) que acomete as folhas, frutos e caules causando lesões necróticas e erupções amareladas, típicas da formação de colônias das bactérias (Figura 03). Este fitopatógeno é de difícil manejo, tem alta taxa de

agressividade e de transmissão, ao ser disseminado através da chuva e dos ventos e por impacto manual, tendo como principal porta de entrada a abertura estomática (GRAHAM, 2003; PRUVOST *et al.*, 2014).

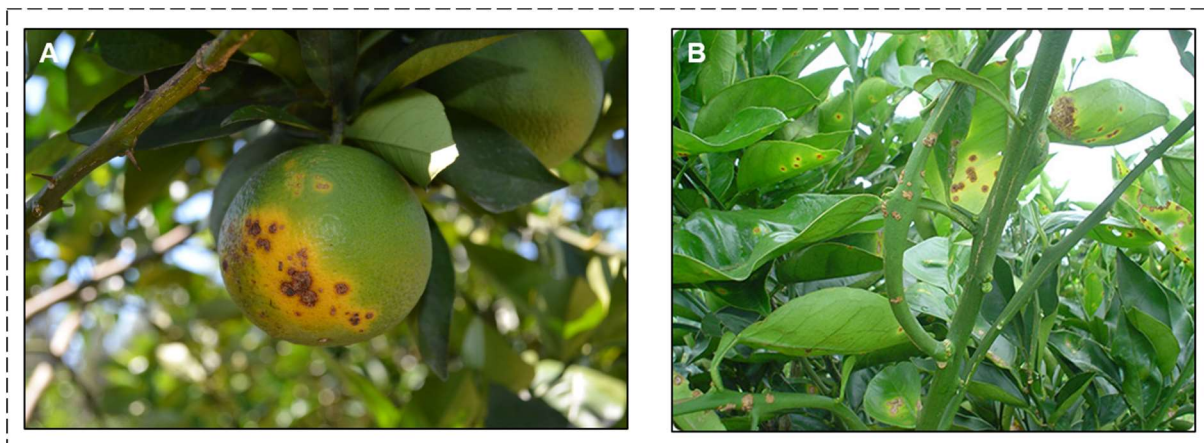


Figura 03. Exemplar de citros com sintomas de cancro cítrico causado pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **A)** Exemplar de fruto apresentando as lesões necróticas características da infecção. **B)** Exemplar de folhas e ramos lesionados. Fundecitrus (2021).

O cancro cítrico tem forte impacto na economia. A contaminação dos pomares pela bactéria leva à desfolha das plantas, à mancha nos frutos e queda prematura, à queda da produção e qualidade dos frutos e à restrição da comercialização. Isso porque, o cancro é uma doença quarentenária, impondo as regiões em que são identificados a uma série de restrições e levando, muitas vezes, ao corte dos pomares infectados (FUNDECITRUS, 2021; PRUVOST *et al.*, 2014).

Somente no relatório de Safra 2019/2020 (FUNDECITRUS, 2021), foram detectados 34 milhões de árvores, das principais variedades de laranja, contaminadas com o cancro cítrico, confirmando o aumento da incidência da doença no cinturão cítrícola – São Paulo e triângulo Mineiro.

Não há relatos de espécies e/ou variedades imunes ao desenvolvimento da patologia, mas a resistência e suscetibilidade é variável entre elas, sendo este um dos mecanismos de controle da praga agrícola de menor custo.

Estudos genéticos, de transcriptoma, interactoma, e análises de lesões/genótipos foram desenvolvidos, permitindo uma classificação frente à resistência ao cancro cítrico. Muitos dados de pesquisas neste tópico foram compilados em um levantamento de Gottwald (2002).

Os dados experimentais (DE CARVALHO *et al.*, 2015) e as análises de redes e de genes diferencialmente expressos (FERRASA *et al.*, 2020) em inúmeras variedades, permitiu um ranqueamento das espécies, e conseqüentemente de variedades, categorizando-as em altamente resistente; resistente; baixa suscetibilidade; suscetível e altamente suscetível, seguindo Gottwald (2002), o que permite certo manejo em campo. No entanto, não há relatos que aliem a composição química da planta a resistência.

Sabe-se, entretanto, que em decorrência do ataque do patógeno, a planta produz metabólitos que podem atuar como barreira física, como antimicrobiano ou como sinalizadores, fazendo toda uma reprogramação metabólica que também envolve expressão gênica. Esses metabólitos podem ser produzidos antes da infecção, na chamada resistência constitutiva da planta, durante ou após o ataque do patógeno. Além disso, o sistema imune vegetal responde aos patógenos tanto através de reconhecimento de moléculas comuns a muitos patógenos, quanto através de fatores de virulência (JONES; DANGL, 2006; KRONER *et al.*, 2012).

Mesmo com as intempéries climáticas e as doenças e pragas associadas, a exportação e mesmo utilização interna dos produtos encontra-se em elevado patamar e ultrapassam o consumo tradicional (fruta, sucos, geleias), uma vez que as indústrias de processamento geram enormes quantidades de resíduos cítricos. Tais subprodutos são considerados recursos valiosos economicamente, além de sustentáveis, pela abundância de produtos que podem ser extraídos, isolados, purificados, identificados

e posteriormente aplicados em alimentos, cosméticos e medicamentos (MAHATO *et al.*, 2018; SHARMA *et al.*, 2017).

Dentre os subprodutos, podemos destacar flavonoides, ácidos e óleos essenciais, açúcares e fibras alimentares, celulose, vitaminas, minerais, encontrados em várias partes do fruto. Esses derivados têm sido fortemente estudados a fim de esclarecer os benefícios nutricionais e farmacológicos, foco do nosso próximo capítulo (MAHATO *et al.*, 2018).

1.2 *Citrus*: composição química e propriedades medicinais

Aliado aos robustos dados econômicos, o gênero se destaca mundialmente pelos seus inúmeros benefícios à saúde, que remontam épocas antigas e conhecimentos tradicionais, que foram sendo confirmados ao relacionar a composição química das espécies à inúmeros testes farmacológicos.

Embora todos os órgãos vegetais das espécies possuam relatos de aplicações e usos, como em cerimônias, devido ao ato de presentear noivas com flor de laranjeiras como sinal da Virgem Maria e associação à virgindade, em regiões da Europa (GOODY, 1993), ou o uso para extração de óleos essenciais para a perfumaria, nenhum outro órgão possui enfoque e estudos como os frutos, deixando uma área em potencial fora do foco da ciência, a química foliar.

Os frutos e seus diferentes tecidos foram estudados utilizando inúmeras técnicas de isolamento e identificação de substâncias, como HPLC e UHPLC (Cromatografia Líquida de Alta e Ultra eficiência, respectivamente), HRMS (Espectrometria de massas de alta resolução), MR (Ressonância magnética) e técnicas mais atuais, partindo do conceito da metabolômica direcionada e não

direcionada (BRITO *et al.*, 2014; TSUJIMOTO *et al.*, 2019; ZANDALINAS *et al.*, 2017; ZHENG *et al.*, 2020).

O enfoque principal dos estudos envolvendo o gênero concentraram-se na geração de um perfil químico dos frutos, restringindo a alguma espécie ou a um conjunto de espécies, visando a identificação de óleos essenciais, flavonoides, ácidos fenólicos, de potencial aplicação nas indústrias farmacêuticas e de cosméticos.

Este direcionamento gerou um volumoso número de compostos identificados, mas uma grande lacuna em relação aos demais órgãos vegetais, principalmente as folhas que possuem ampla aplicabilidade.

Com grande destaque no grupo dos citrinos, os óleos essenciais (Figura 04) são uma das classes de compostos melhor compreendidas dentro do grupo. Esses óleos, são uma mistura complexa de compostos voláteis, que, no caso de *Citrus* são geralmente hidrocarbonetos ou mono e sesquiterpenos (GONZÁLEZ-MAS *et al.*, 2019).

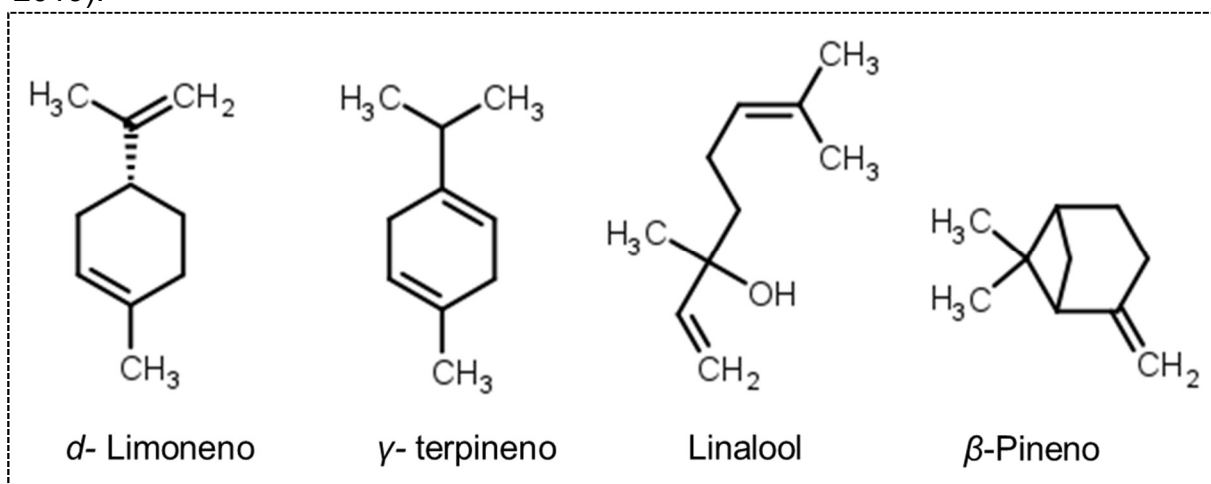


Figura 04. Estruturas químicas de óleos essenciais tipicamente encontrados em *Citrus*. Adaptado de Dosoky; Setzer (2018).

Os óleos essenciais são relevantes na indústria de cosméticos e farmacêuticos. Dentre suas inúmeras propriedades, podemos citar sua ação antioxidante (ASJAD *et al.*, 2013; LV *et al.*, 2012), ansiolítica (FATURI *et al.*, 2010; GOES *et al.*, 2012;

LEHRNER *et al.*, 2000), anti-inflamatória (AMORIM *et al.*, 2016; KUMMER *et al.*, 2013); larvívica (EL-AKHAL; LAMANIA; GUEMMOUH, 2015; GALVÃO *et al.*, 2015), insetívica (BADAWY; TAKTAK; EL-ASWAD, 2018; RAINA *et al.*, 2007; ROSSI; PALACIOS, 2013), antifúngica (SHARMA; TRIPATHI, 2008; VIUDA-MARTOS *et al.*, 2008), gastroprotetora (MORAES *et al.*, 2009), conservante alimentar, além de aromatizantes para uma gama de produtos.

Os citros também possuem abundante teor de flavonoides. Os flavonoides são uma das maiores classes de metabólitos especializados, sendo caracterizados pela presença de dois anéis aromáticos (A e B), que podem se ligar a um terceiro anel (C). Nos *Citrus* podemos encontrar principalmente polimetoxiflavonas, flavonas e flavononas (BALLISTRERI *et al.*, 2019).

Esses flavonoides podem existir com variadas modificações, devido à hidroxilação, metilação e a glicosilação, que é a mais importante nos frutos, cuja maior parte inclui as flavononas-O-glicosídeos e as flavonas-O-glicosídeos ou flavonas-C-glicosídeos (ABAD-GARCIA *et al.*, 2009; ABAD-GARCIA *et al.*, 2014; BARRECA *et al.*, 2011; LI; LO; HO, 2006). A presença de diferentes tipos de açúcares ligados aos flavonoides, como rutinosídeos e neohesperidosídeos, faz com que as variedades apresentem variações no sabor (BALLISTRERI *et al.*, 2019).

Dentre os flavonoides (Figura 05), podemos incluir a Naringina, Hesperidina, Hesperitina, Neohesperidina, Poncirina, Sinensetina, Tetra, Penta, Hexa e Heptametoxiflavonas, Tangeritina, Quercetina, Apigenina, Luteolina, Vitexina, Diosmina, Eriocitrina, Eriodictiol, Scoparina, muitos deles na forma glicosídica, além de outros inúmeros compostos detectados em estudos principalmente do suco e tecidos dos frutos (BALLISTRERI *et al.*, 2019; BRITO *et al.*, 2014; KLIMEK-

SZCZYKUTOWICZ; SZOPA; EKIERT, 2020; TSUJIMOTO *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2019; ZHENG *et al.*, 2020).

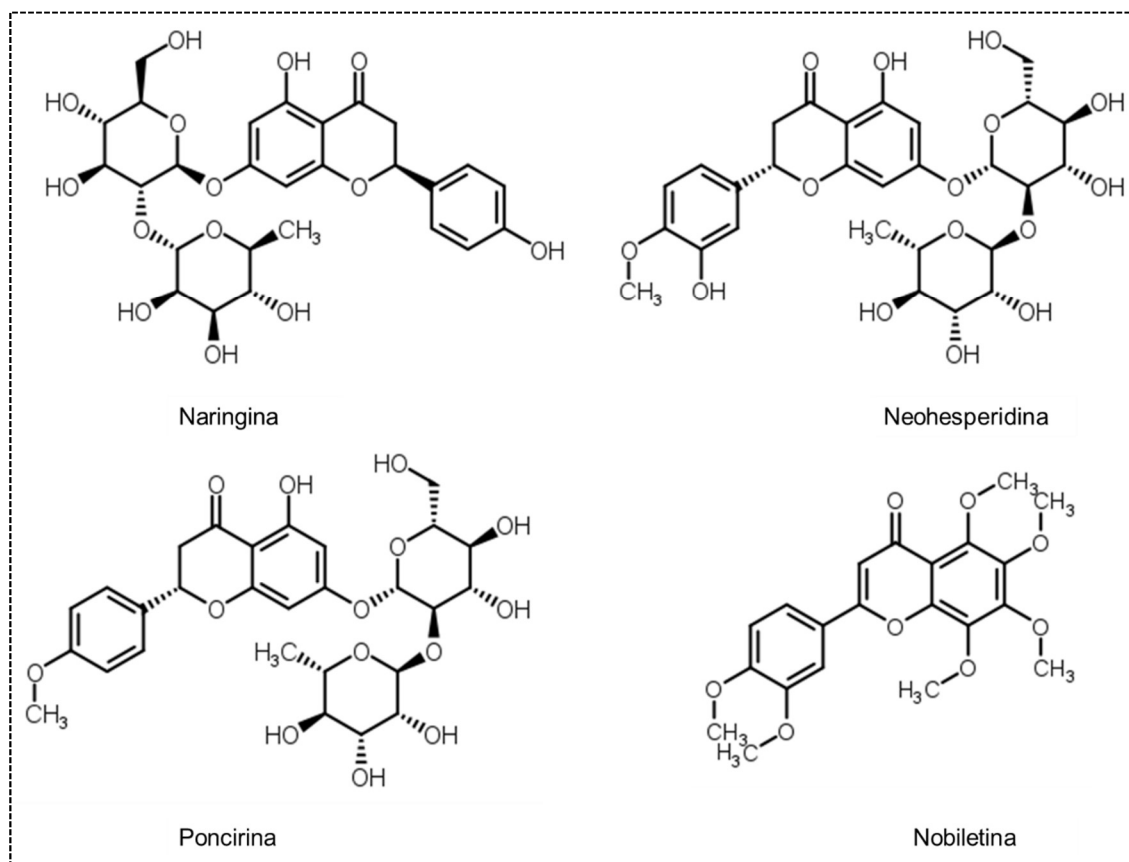


Figura 05. Estruturas químicas de alguns flavonoides tipicamente encontrados em *Citrus*. Adaptado de Tsujimoto *et al.*, 2019.

Assim como os óleos essenciais, os flavonoides cítricos possuem inúmeros relatos de aplicações na área da saúde, como efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios, citoprotetor, hipolipidêmico, anti-hipertensivo (LI; SCHLUESENER, 2017; MAHMOUD *et al.*, 2019; MILLAR; DUCLOS; BLESSO, 2017; Z Aidun; Thent; Latiff, 2018).

A Naringenina, flavonoide tipicamente acumulado de *Citrus* possui comprovada ação na supressão da peroxidação lipídica, diminuindo o acúmulo de ácidos graxos no fígado (HERNÁNDEZ-AQUINO; MURIEL, 2018; Zobeiri *et al.*; 2018), com principal ação antioxidante.

A Hesperidina, por exemplo, destaca-se em estudos relacionados a ação anticarcinogênica, anti-hipertensiva, antiviral, anti-inflamatória (MAHMOUD, 2014;

MAHMOUD *et al.*, 2017; ZOBEIRI *et al.*, 2018;), enquanto a Diosmina parece aumentar a ação das células β -pancreáticas (PARI; SRINIVASAN, 2010).

Além dos flavonoides, os ácidos fenólicos, cumarinas, ácidos carboxílicos também são encontrados, com destaque para os ácidos ferúlico, sináptico, ácido cítrico, ácido málico, citropteno e escopoletina (KLIMEK-SZCZYKUTOWICZ; SZOPA; EKIERT, 2020).

Em estudo com variedades de toranja e pomelo, por exemplo, Xi *et al.* (2015), avaliando a composição fenólica, demonstraram que as variedades de toranja possuíam maior composição fenólica, sendo rica em ácidos como o gálico, clorogênico, cafeico e ferúlico, além de identificarem polimetoxiflavonas.

As cumarinas, como a escopoletina, são derivados do 1,2 benzopirano e pertencem a via dos fenilpropanoides (HARBORNE, 1999) e em *Citrus* são encontrados em maior quantidade na casca dos frutos (DUGRAND-JUDEK *et al.*, 2015).

As cumarinas são compostos relacionados a defesa das plantas, mas que foram citadas com possíveis funções hormonais e moléculas de sinalização (BOURGAUD *et al.*, 2006).

A rica composição de metabólitos em *Citrus* permitiu ampla aplicação farmacêutica e alimentícia, mas os estudos também deixam claro a variação da composição dos metabólitos nas diferentes espécies e o foco maior em compostos de maior impacto econômico.

Klimek-Szczykutowicz, Szopa e Ekiert (2020) enfatizam que os estudos têm focado principalmente nos óleos essenciais bioativos. Wang *et al.* (2017), também apontam que existem diferenças significativas no teor e na composição química entre

espécies e tecidos dos *Citrus*, mas ressalta que tal diferença foi demonstrada, até o momento, nos frutos estudados.

Tais considerações abrem hipóteses para novos estudos, visando a obtenção de uma química foliar mais precisa e uma análise comparativa deste órgão vegetal nas diferentes espécies e variedades comerciais, principalmente com um enfoque agrônomo, buscando esclarecer a provável relação entre a química foliar e a potencial resistência ou suscetibilidade a patógenos, ainda não demonstrada.

1.3 Ferramentas em estudo de metabolômica

Chamamos metabolismo o resultado de todos os processos celulares/bioquímicos dos organismos e estudá-lo em sua totalidade é uma tarefa complexa em termos analíticos. Não há, atualmente, técnicas que permitam identificar e elucidar toda a gama metabólica de um organismo em experimentos isolados, sendo necessário o acoplamento de técnicas, técnicas hífenadas, para um melhor entendimento metabólico, sendo a principal delas a cromatografia líquida ou gasosa e a espectrometria de massas (PILON *et al.*, 2020).

O desenvolvimento de técnicas mais recentes e integrativas, auxiliaram o entendimento do metabolismo/funcionamento do organismo e sua relação com o meio. A metabolômica, é uma dessas aliadas.

Concebida no final dos anos 90, a metabolômica hoje pode ser entendida não apenas como o estudo do metabolismo primário e secundário, mas também da comparação de perfis entre indivíduos, associados as condições ambientais e patologias, por exemplo (OLIVER *et al.*, 1998; PILON *et al.*, 2020).

Avanços marcantes em ferramentas de bioinformática e de química analítica, especialmente em espectrometria de massas, também aceleraram significativamente

o processo de identificação de produtos naturais em amostras com misturas complexas, podendo auxiliar fortemente no estabelecimento do mapa químico das espécies e na identificação de marcadores moleculares (HENKE; KELLEHER, 2016; MEDEMA; FISCHBACH, 2015).

Entre essas técnicas, destaca-se a rede de moléculas (MN) como uma abordagem promissora (FOX RAMOS *et al.*, 2019), onde os espectros de MS/MS são organizados em agrupamentos de acordo com a similaridade espectral, fornecida pela pontuação de cosseno. Outra abordagem importante para a Biologia foi o desenvolvimento de protocolos de metabolômica, que possibilitam gerar dados quanti- e qualitativos sobre os metabólitos presentes em amostras de plantas submetidas à diferentes condições de estresse (BRUNETTI *et al.*, 2013; FUNARI *et al.*, 2013; VILLAS-BOAS; NIELSEN; SMEDSGAARD, 2007).

Sob uma perspectiva mais ampla e filosófica, a MN representa um mapa espectral que pode ser enriquecido com múltiplas anotações sobrepostas (ALLARD *et al.*, 2016; FOX RAMOS *et al.*, 2019). Os espectros que compõem a rede de moléculas podem ser comparados de forma automatizada com bancos de espectros de fragmentação *in silico* (MS/MS), possibilitando a correspondência entre subestruturas de moléculas candidatas (ALLARD *et al.*, 2016).

Uma das bases de dados de espectros de fragmentação é o ISDB-UNPD, a Base de Dados *in silico* do Dicionário Universal de Produtos Naturais (ALLARD *et al.*, 2016). A base conta com espectros teóricos de fragmentação (MS/MS), em modo positivo, para 170.602 produtos naturais, gerados por ferramentas computacionais. O ISDB-DNP permite a dereplicação rápida de compostos, além de possibilitar a visualização na rede de moléculas da anotação e suas estruturas químicas.

A anotação computacional *in silico* retorna 50 possíveis estruturas químicas, que, aliada a ponderação taxonômica (RUTZ *et al.*, 2019), permitem anotar com grande confiabilidade os *features*, íons detectados, pela espectrometria de massas.

A ponderação taxonômica é também uma técnica recente de bioinformática, desenvolvida como uma forma de aumentar a confiabilidade na anotação computacional, visto a ampla diversidade química das espécies vegetais. A partir da inclusão da posição taxonômica da amostra, a ponderação recalcula e fornece uma nova pontuação baseada na taxonomia, dos compostos candidatos obtidos pela anotação (RUTZ *et al.*, 2019).

O grande volume de dados metabolômicos, demandando protocolos robustos para a extração de informações, tornou as análises multivariadas uma importante ferramenta para a compreensão dos dados, que pode ser feita a partir de uma visão global ou a partir do direcionamento da análise em relação a variáveis de influência (PILON *et al.*, 2020), assim, a característica multivariada dos dados metabolômicos podem ser entendidos mediante análises não-supervisionadas (como a PCA e o HCA) e supervisionadas (como a OPLS-DA).

As análises multivariadas possibilitam o maior entendimento do objeto de estudo, ao permitir obter relações entre um grande número de variáveis que podem interferir no metabolismo vegetal, explicando as diferenças, além de direcionar para metabólitos diferenciais nas amostras, que podem auxiliar na quimiotaxonomia e no entendimento da defesa contra patógenos (PILON *et al.*, 2020).

Adicionalmente, o uso de ferramentas abertas e gratuitas (*Open Source*) que garantem a fácil Localização, Acessibilidade, Interoperabilidade e Reutilização (*FAIR principles*) (WILKINSON *et al.*, 2016) dos dados obtidos e gerados permitem uma maior integração no estudo metabolômico. Isso porque, ao tornar os protocolos

desenvolvidos em cada pesquisa facilmente localizados e acessados por outros cientistas ou computadores, através de protocolos abertos e gratuitos, permitem que cientistas os integrem em suas pesquisas e reutilizem para novas análises (por ex. *machine learning*) por serem dados liberados por licença de uso de dados (WILKINSON *et al.*, 2016).

A metabolômica é uma área em constante desenvolvimento, e todas essas técnicas contribuem para o estudo de produtos naturais, permitindo, na temática deste trabalho, estudar como a química foliar pode estar atrelada a resistência contra patógenos.

2 OBJETIVO

Investigar o perfil químico foliar de variedades comerciais de *Citrus*, por meio de métodos de metabolômica não direcionada e análises multivariadas, visando identificar marcadores químicos associados a resistência constitutiva à *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.

2.1 Objetivos específicos

Para viabilizar o desenvolvimento e cumprimento do objetivo central do projeto, os seguintes passos foram executados:

- Analisar o perfil químico através de metabolômica a partir de UHPLC-HRMS;
- Realizar análises multivariadas (PCA, OPLS-DA, HCA);
- Gerar rede de moléculas utilizando o fluxo de trabalho do GNPS;
- Realizar a Anotação computacional *in silico* dos compostos;
- Construir rede de moléculas multi-informativa a partir da integração de análises estatísticas e anotação computacional;
- Identificar marcadores químicos relacionados à resistência constitutiva a *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta e preparação das amostras

As amostras de folhas foram obtidas de espécimes pertencentes à coleção da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária – UNESP, Campus de Jaboticabal, sob coordenação do Prof. Jesus Aparecido Ferro. As plantas foram mantidas em casa de vegetação (21°14'34.0"S 48°17'02.4"W) sob irrigação controlada, fotoperíodo de 12h e temperatura controlada, 28°C.

Foram coletadas folhas de três semanas, de diferentes posições da planta, totalmente expandida e saudável de 17 variedades de *Citrus* (Tabela 1). As amostras de folhas foram obtidas através de um corte no pecíolo e submetidas à secagem por liofilização (Genevac HT-4SII & HT4X Series II).

Uma alíquota de cerca de 50 mg de folhas liofilizadas foi moída usando um moinho de esferas (esfera de vidro de 2 mm; frequência de 30 Hz; 4 min) usando 5 ml de MeOH-H₂O 85:15 (v/v) com 0,1% de ácido fórmico (Retsch MM200, Schieritz & Hauenstein AG, Arlesheim, Suíça). As amostras foram centrifugadas, e os sobrenadantes coletados e submetidos à extração em fase sólida utilizando cartuchos de sílica C18 para a remoção de compostos lipofílicos.

A escolha do método de extração partiu de revisão de literatura em relação aos citros (BRITO *et al.*, 2014; TSUJIMOTO *et al.*, 2019; ZHENG *et al.*, 2020), visando a otimização e maximização da extração dos compostos.

A remoção do solvente foi realizada por um sistema de evaporação rotativo rápido sob pressão reduzida. As amostras foram ressuspensas em MeOH 85% a uma concentração final de 5 mg/ml e foram armazenadas a -20 °C antes da análise metabolômica.

3.2 Classificação da suscetibilidade das variedades

Para classificar as variedades perante a suscetibilidade ou potencial resistência ao Cancro cítrico, foi realizado o cruzamento dos dados de diferentes trabalhos (De CARVALHO *et al.*, 2015; FERRASA *et al.*, 2020; GOTTWALD; GRAHAM e SCHUBERT, 2002) e atribuídos apenas dois estratos de classificação no estudo: (i) potencialmente resistentes, que incluiu todas as espécies listadas como altamente resistente e resistentes; (ii) suscetível, englobando as espécies com baixa e alta suscetibilidade e as suscetíveis. O enquadramento de cada espécie pode ser verificado na Tabela 1.

Tabela 1: Relação das espécies e variedades de *Citrus* utilizadas neste estudo. Os códigos foram atribuídos para fins de análise e as variedades referidas por eles. A potencial resistência e suscetibilidade descritas referem-se ao Cancro cítrico (*Xanthomonas citri* subsp. *citri*).

Variedades	Número de espécimes	Código	Espécie*	Potencial Resistência/ Suscetibilidade**
Kumquat	3	KUM	<i>Citrus japonica</i> Thunb.	Resistente
Satsuma	4	SAT	<i>Citrus reticulata</i> Blanco	Resistente
Ponkan	4	PON	<i>Citrus reticulata</i> Blanco	Resistente
Lima Ácida Galego	4	LAG	<i>Citrus aurantifolia</i> (Christm.) Swingle	Suscetível
Limão Tahiti	1	LTA	<i>Citrus aurantifolia</i> (Christm.) Swingle	Suscetível
Limão Cravo	4	LCR	<i>Citrus limon</i> (L) Osbeck	Suscetível
Limão Siciliano	2	LSI	<i>Citrus limon</i> (L) Osbeck	Suscetível
Clementina	2	CLE	<i>Citrus clementina</i> hort.ex Tanaka	Suscetível
Citrumelo	4	CMO	<i>Citrus paradisi</i> x <i>Citrus trifoliata</i> ***	Suscetível
Swingle	4	SWI	<i>Citrus paradisi</i> x <i>Citrus trifoliata</i> ***	Suscetível
Citrango	2	CNG	<i>Citrus sinensis</i> x <i>Citrus trifoliata</i> ***	Suscetível
Pera Rio	4	PER	<i>Citrus sinensis</i> L.Osbeck	Suscetível
Valência	4	VAL	<i>Citrus sinensis</i> L.Osbeck	Suscetível
Hamlin	4	HAM	<i>Citrus sinensis</i> L.Osbec	Suscetível
Bahia	4	BAH	<i>Citrus sinensis</i> L.Osbeck	Suscetível

Natal	4	NAT	<i>Citrus sinensis</i> L.Osbeck	Suscetível
Folha Murcha	4	FOL	<i>Citrus sinensis</i> L.Osbeck	Suscetível

*Identificação obtida em “*Citrus Variety Collection*” (<https://citrusvariety.ucr.edu/varieties.html>) e *The plant List* (2013). Atualizado por WFO - World Flora Online (2022)

** Resistência/ suscetibilidade atribuída segundo De CARVALHO *et al.* (2015) FERRASA *et al.* (2020) e GOTTWALD; GRAHAM e SCHUBERT (2002).

***Híbridos conhecidos como Citroncirus.

3.3 Análise por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas de alta resolução (UHPLC-HRMS)

As análises por cromatografia líquida foram realizadas em parceria com o Laboratório de Química de Produtos Naturais Bioativos da Universidade de Genebra, Suíça, coordenado pelos Professores Dr. Emerson Ferreira Queiroz e Dr. Jean-Luc Wolfender.

O sistema consistiu em um Cromatógrafo Líquido de Ultra eficiência (UHPLC) Thermo Dionex Ultimate 3000 acoplado a Espectrômetro de Massas de Alta Resolução (HRMS) Q-Exacte Plus (Thermo Scientific, Bremen, Alemanha) com ionização por electrospray (HESI-III).

As separações cromatográficas foram realizadas em coluna Acquity BEH C18 130 Å, 1,7 µm, 2,1 mm por 150 mm mantida a 60°C, com fase móvel de água ultrapura (solvente A) e Acetonitrila (solvente B) ambos acidificados com 0,1% de ácido fórmico, vazão em 600 µL/min; volume de injeção: 1µL e gradiente de 2-98% de B em 5 min.

Os parâmetros da fonte de ionização (tensão, vazão do gás de revestimento, taxa de fluxo de gás e gás de reposição, temperatura capilar e nível de RF da lente) foram otimizados e o analisador calibrado por injeção direta usando uma mistura de cafeína, acetato de metionina, arginina, fenilalanina (MRFA), sulfato de dodecil de sódio, taurocolato de sódio e Ultramark 1621 em solução de acetonitrila/metanol/água com 1% de ácido fórmico (ALLARD *et al.*, 2016).

Os dados de MS/MS foram realizados nos três íons mais intensos detectados na verificação completa da espectrometria de massas (Experimento top3). A largura da janela de isolamento MS/MS foi de 1 m/z e a energia de colisão normalizada (NCE) ajustada para 20, 35, 50 eV. Os experimentos MS/MS dependentes de dados tiveram suas varreduras completas obtidas com resolução de 35.000 FWHM, e varreduras MS/MS em 17.500 FWHM, com tempo máximo de 50ms.

Os íons adquiridos foram colocados posteriormente em uma lista de exclusão dinâmica por 2 s (ALLARD *et al.*, 2016).

Para reduzir o efeito de possível viés analítico nos resultados, as amostras foram injetadas no sistema UHPLC-HRMS em um único lote de forma randomizada e intercaladas sistematicamente com amostras de controle de qualidade (QC) para monitorar o desempenho do cromatógrafo (tempo de retenção) e do espectrômetro de massa (intensidade e precisão do sinal). A amostra de QC consistiu em um *pool* de todas as amostras experimentais e foi preparada através da coleta de uma alíquota de 1 μL de cada amostra.

3.4 Processamentos dos dados de UHPLC-HRMS

Os dados brutos (.raw) obtidos por UHPLC-HRMS foram convertidos para .mzXML usando o software MS converter (Proteowizard) e processados no software MZmine (PLUSKAL *et al.*, 2010). Os parâmetros usados para processamento dos dados foram: nível de ruído a 1×10^6 para MS¹ e 0 para MS².

As etapas de detecção e filtragem dos picos permitiu gerar uma lista contendo a massa de todos os íons detectados. Em seguida, os cromatogramas foram

construídos com base no módulo ADAP seguindo os parâmetros: tamanho mínimo de grupo de 5, altura mínima igual a 1×10^6 e tolerância de 0,001 Da (ou 10 ppm).

O processo de deconvolução também utilizou o modelo wavelets (ADAP) como algoritmo para reconhecimento de picos, m/z e faixa de tempo de retenção para emparelhamento de varredura, MS^2 de 0,3 Da e 0,1 min, cujo limite S/N foi de 50, altura mínima do recurso de 5×10^5 , limite de coeficiente/área 90, intervalo de duração de pico de 0,02-1,5min e intervalo de RT wavelets de 0,02-0,05; o que permitiu separar todos os íons que co-eluíram. Os cromatogramas foram então de-isotopados por algoritmo de agrupamento de picos isotópicos com tolerância de 0,001 Da e RT de 0,05 min.

A lista de picos foi então alinhada de acordo com os íons e a intensidade detectada em cada amostra com tolerância de m/z ajustada a 0,001 Da e tolerância absoluta RT a 0,05 min.

A lista de picos ausentes pós-alinhamento foi preenchida pelo preenchimento de lacuna do mesmo módulo de preenchimento de intervalo RT e m/z com tolerância de 0,001 Da. Após o preenchimento, uma lista de picos foi gerada, contendo a identificação de adultos e cálculo de suas fórmulas moleculares, gerando resultados de espectros MS^2 dependentes. A lista foi então exportada e pré-tratada com base em coeficientes de variação das amostras e controle de qualidade, resultando em uma lista final de picos (.mgf) que foi então utilizada como entrada para a geração da rede de moléculas e análises multivariadas.

3.5 Construção da rede de moléculas (MN) através do GNPS

A rede de moléculas foi gerada a partir dos espectros de segunda ordem (MS^2) das 17 variedades de *Citrus*. O arquivo (.mgf), gerado pelo programa MZmine,

contendo os espectros representativos de cada íon detectado, foi processado primeiramente no software Filezilla e em seguida submetido ao GNPS (*Global Natural Products Social Molecular Networking* – Rede molecular global de produtos naturais) (WANG *et al.*, 2016) para a geração da rede.

Os espectros MS² foram então agrupados com o *MS-Cluster* com uma tolerância de massa original em 0,02 Da, e 0,02 Da para tolerância de massa de íons fragmentos, para criar espectros de consenso e espectros de consenso com menos de dois espectros descartados. A rede foi criada após as arestas serem filtradas para uma pontuação de cosseno acima de 0,7 e mais de seis picos correspondentes. O programa Cytoscape (3.7.2) (SHANNON *et al.*, 2003) foi utilizado para a visualização da rede (ALLARD *et al.*, 2016) e os espectros identificados inicialmente com base na biblioteca espectral do GNPS.

3.6 Anotação computacional *in silico* dos compostos

Os espectros de MS/MS foram anotados em segundo nível (SCHYMANSKI *et al.*, 2014) a partir de uma comparação automatizada entre espectros teóricos e experimentais, de acordo com a similaridade espectral. A comparação foi feita com os espectros disponíveis (aproximadamente 177 mil espectros) na base de dados espectrais *in silico* (teóricos) da *Universal Natural Products Database* (ISDB-UNPD), conforme descrito em Allard *et al.* (2016).

A comparação automática foi desenvolvida no Tremolo em ambiente Linux, uma ferramenta de busca de biblioteca espectral (WANG; BANDEIRA, 2013). Os parâmetros usados para processar a análise do conjunto de dados foram os seguintes: tolerância da massa dos íons parentais em 0,05 Da; pontuação mínima de cosseno 0,7, retornando os 50 principais candidatos para cada espectro.

3.7 Ponderação taxonômica dos compostos candidatos

A etapa de ponderação taxonômica foi realizada em ambiente R, seguindo a metodologia descrita por Rutz *et al.* (2019). Após a anotação por ISDB-DNP, a lista com os 50 compostos anotados primeiramente por similaridade espectral (cosseno), foi submetida a uma nova ponderação com base na distância taxonômica das fontes biológicas dos compostos e das amostras analisadas. A ponderação taxonômica acrescentou uma pontuação com base na distância taxonômica e foi realizada em nível de gênero (Rutaceae < *Citrus* < *Citrus* spp).

As cinco principais estruturas candidatas, com maior meta-pontuação, foram recuperadas e as estruturas químicas do primeiro hit de cada nó visualizadas na rede de moléculas no Cytoscape usando o plug-in ChemViz.

3.8 Análise estatística multivariada (MVA)

A análise multivariada dos dados obtidos por LC-MS foi realizada através do software R, sendo os dados submetidos à análise multivariada não supervisionada e supervisionada.

A análise dos componentes principais (PCA) foi utilizada para avaliar os padrões de metaboloma das variedades estudadas e a variabilidade entre as amostras, enquanto a análise hierárquica de agrupamentos (HCA) foi efetuada para identificação de *clusters* e determinar a acumulação e diversidade metabólica.

Após a identificação e determinação dos grupos de amostras pelo PCA e HCA, a análise supervisionada OPLS-DA (análise ortogonal de mínimos quadrados parciais-discriminativa) foi realizada para rastrear metabólitos diferenciais, ao ampliar as diferenças entre os grupos. Através do OPLS-DA, foi possível obter o valor de

importância (VIP), de cada íon. Tal valor expressa o quanto a substância implica na diferença entre as amostras analisadas, e ao ser plotado na rede de moléculas, direciona para possíveis marcadores químicos.

Adicionalmente, um *HeatMap* (package Heatmap3) foi gerado através do mesmo software para demonstrar o teor de cada metabólito nas amostras analisadas, utilizando como entrada apenas o conjunto de metabólitos identificados através da anotação computacional *in silico* e seus respectivos nodos da rede de moléculas. O percentual relacionado às classes de metabólitos identificadas foi expresso em forma de *Treemap*, obtido também através do package Treemap utilizando o software R.

3. 9 Cálculo da Resistência Constitutiva (RC)

Os dados de abundância de todos os íons detectados, foram utilizados para determinar a razão entre as espécies consideradas potencialmente resistentes e suscetíveis, seguindo metodologia descrita por Massana-Codina *et al.* (2020).

Resumidamente, investigamos na literatura as variedades de *Citrus* consideradas suscetíveis ou potencialmente resistentes à *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, causadora do cancro cítrico. Em seguida, os valores relacionados à resistência (VRR) foram obtidos através da razão entre a média da abundância dos íons nas plantas resistentes (MPR), pelas plantas suscetíveis (MPS), seguindo a equação: $VRR = (MPR / MPS)$, cujo resultado foi expresso em Log_2 . A razão obtida permitiu uma estimativa da contribuição de cada composto para a resistência, cujos metabólitos específicos foram destacados na rede através do tamanho do nó.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Planejamento experimental

A fim de selecionar metabólitos presentes nas folhas de *Citrus* que possam ser utilizados como marcadores químicos da resistência ao Cancro cítrico, realizamos uma seleção de variedades segundo a resistência à doença. Isto nos permitiu obter uma coleção de amostras de variedades com diferentes graus de suscetibilidade a serem comparadas.

De modo a gerar resultados que possam ser explorados em nível estatístico e ajudar na identificação de compostos, um plano de extração compatível com abordagem metabolômica foi aplicada (Figura 6). O perfil metabólico das amostras foi realizado aplicando métodos não direcionados de metabolômica (LC-HRMS/MS), o que nos permitiu gerar dados de LC-MS¹ associados a dados MS/MSⁿ. Esta estratégia nos permite de um lado, explorar o *set* de dados de HRMS1 através de análises multivariadas e identificar *features* com diferença estatística entre as variedades. Por outro lado, o *set* de dados de MS/MS foi organizado para evidenciar as famílias de estruturas químicas em uma única rede de moléculas (MN) seguindo o fluxo de trabalho disponível no *Global Natural Products Social Networking* (GNPS) (WANG *et al.*, 2016).

A identificação dos compostos na MN foi realizada por meio de comparação automática dos dados de MS/MS com uma base de espectros *in silico* de produtos naturais e complementado com abordagem taxonômica para aumentar a confiabilidade das anotações (RUTZ *et al.*, 2019). As famílias químicas dos compostos anotados foram identificadas via *ClassyFire* (DJOUIMBOU *et al.*, 2016). Tal estratégia

permitted to identify the chemical families and the compounds in an automatic and comprehensive way in MN for all samples.

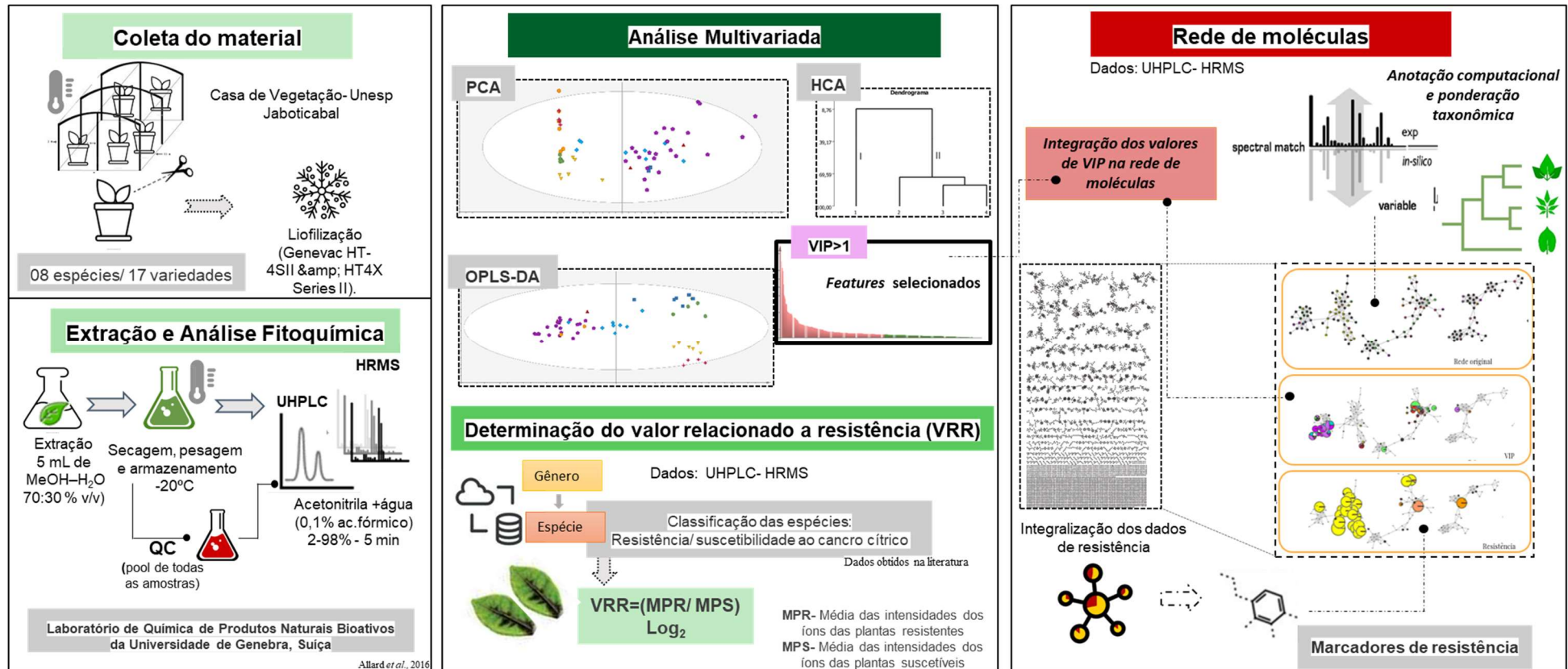


Figura 06. Mapa global da estratégia metabolômica empregada neste estudo. **Coleta do material** em casa de vegetação a partir de corte no pecíolo. **Extração e análise fitoquímica**, a partir do preparo do extrato hidroalcoólico e análise por UHPLC-HRMS. **Análise multivariada** utilizando os dados químicos obtidos para a determinação de compostos com alto valor de importância (VIP). **Determinação do valor relacionado a resistência** a partir dos dados de intensidade dos íons detectados, e cruzamento dos dados obtidos na literatura das espécies consideradas potencialmente resistentes e suscetíveis. **Rede de moléculas** multi-informativa a partir da interpolação dos dados obtidos da anotação computacional, VIP e valores de resistência, para determinação de biomarcadores.

Para facilitar a visualização dos resultados e destacar os marcadores químicos, os resultados da análise metabolômica (LC-HRMS1) foram utilizados para o cálculo da resistência constitutiva ao Cancro cítrico e inseridos na rede de moléculas contendo as anotações dos compostos. Esta abordagem, permitiu aliar os resultados estatísticos da metabolômica com a identificação estrutural e destacar metabólitos que podem estar associados à resistência constitutiva de maneira sistemática e rápida. Isto nos gerou uma análise complementar a estatística multivariada clássica e visualização de dados de metabolômica.

A sequência de resultados obtidos seguindo esta abordagem é detalhada nos tópicos seguintes.

4.2 Perfil químico por UHPLC-HRMS

Um gradiente cromatográfico genérico foi aplicado para analisar todas as amostras em único lote a fim de se obter resolução satisfatória e baixo nível de supressão de íons. Desta maneira, as 58 amostras foram analisadas neste método para obter o *fingerprint* dos extratos em modo positivo e negativo.

Os espectros apresentados e os resultados analisados partem do modo positivo, por apresentar o maior número de íons detectados pela varredura. Os cromatogramas analíticos de todas as 17 variedades podem ser vistos nos apêndices.

Como um esforço para eliminar vieses devido a possíveis instabilidades na plataforma de LC-MS, seguimos uma abordagem utilizando amostras de controle de qualidade (QC) (MICHPOULOS *et al.*, 2009; ZELENA *et al.*, 2009). As amostras experimentais foram randomizadas e intercaladas regularmente com amostras de controle de qualidade (QC).

Este procedimento é realizado para monitorar a estabilidade dos equipamentos, pois, embora o UHPLC-HRMS seja um equipamento preciso e de análises fidedignas, o alto número de amostras exige análises em tempo prolongado, podendo levar a alterações graduais no tempo de retenção e na intensidade e acurácia dos valores de m/z detectados, por exemplo (MICHPOULOS *et al.*, 2009; ZELENA *et al.*, 2009).

Neste trabalho, as amostras de QC foram preparadas a partir de um *pool* de todas as amostras experimentais e injetadas de maneira regular em intervalos definidos do lote de análise. Seguindo esta estratégia, amostras de QC foram analisadas a cada cinco injeções. Portanto, a estabilidade do cromatógrafo foi avaliada através da análise do tempo de retenção, e do espectrômetro de massas através da intensidade da área dos picos e valor de m/z , no decorrer das 75 injeções (Figura 07).

Em um primeiro passo, pode ser feita a análise da forma dos picos observados nas amostras de QC no início, meio e fim das injeções. Esta primeira análise demonstrou que os dados são satisfatórios e indicam boa estabilidade dos instrumentos no decorrer da aquisição dos dados, embora possa ter apresentado pequenas quedas na intensidade dos picos.

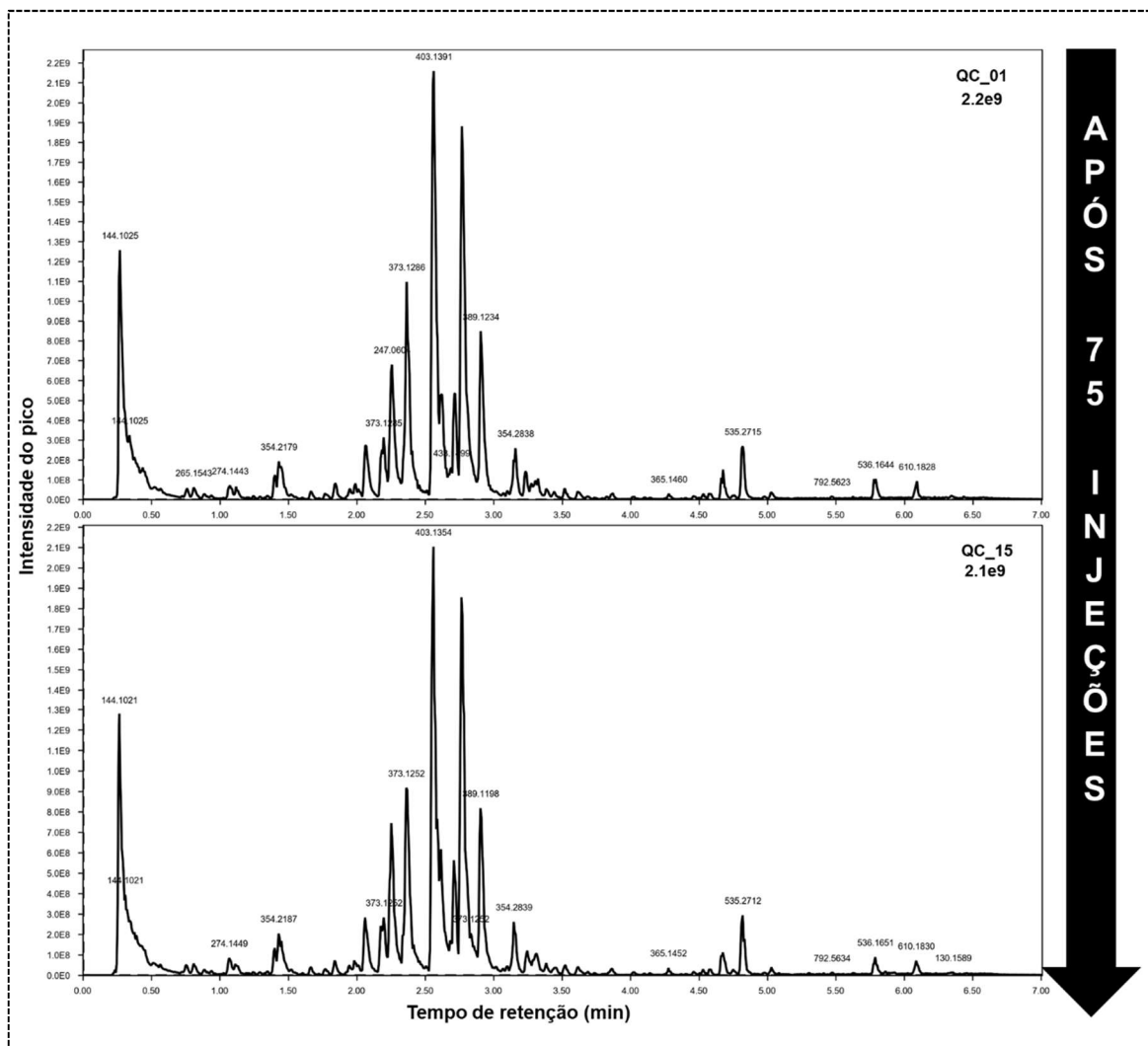


Figura 07. Cromatogramas analíticos representativos das amostras de controle de qualidade obtidas a partir de um *pool* de todas as amostras experimentais dos extratos foliares de espécies de *Citrus*, obtidos por UHPLC-HRMS. Os dados mostram estabilidade satisfatória da plataforma através da análise da intensidade do sinal. QC-01 (2.9e9); QC-15 (2.1e9).

Uma vez que os dados apresentaram qualidade satisfatória, prosseguiu-se com o processamento dos dados de UHPLC-HRMS/MS para análises estatísticas e identificação dos compostos.

4.3 Processamento dos dados de LC-HRMS

O processamento dos cromatogramas obtidos do UHPLC-HRMS/MS (ver seção 3.4 do Material e Métodos) resultou em uma primeira lista de picos contendo dados de R_t , m/z e intensidade do sinal para cada íon detectado. A análise de

variabilidade de íons foi realizada utilizando os dados das amostras de QC e utilizada para filtrar *features* não instáveis analiticamente como artefatos nas amostras experimentais (THEODORIDIS; GIKA; WILSON, 2011). Os *features* com coeficiente de variação (CV) abaixo de 25% em QCs foram filtrados para se obter um conjunto de dados finais. Em seguida, somente os *features* contendo dados de HRMS/MS associados foram mantidos na lista. A comparação dos dados obtidos para os modos positivo e negativo, revelou que o modo positivo mostrou mais íons e foi complementar ao modo negativo. Portanto, apenas os resultados em modo positivo foram usados como base para análises de variação metabólica.

Desta forma, uma lista final foi obtida contendo 5975 *features* que foi utilizada como entrada para análise multivariada e geração de rede de moléculas.

4.4 Análise multivariada dos dados

Em uma primeira etapa, para se obter uma visão compreensível dos dados de metabolômica, realizamos uma análise estatística não supervisionada, a análise de componentes principais (PCA). A análise por PCA nos permite avaliar as amostras de modo amplo e identificar padrões e diferenças entre as amostras. Para reduzir a importância de valores de *features* muito elevados, sem alterar a estrutura geral dos dados (WORLEY; POWERS, 2013), utilizamos a escala Pareto e transformação em Log. A transformação em Log diminuiu a variação dos dados aproximando-os de uma distribuição normal.

Oito componentes principais foram calculados, com boa qualidade indicados pelos valores de R^2 cumulativo e Q^2 cumulativo em 0,91 e em 0,70 respectivamente. Os dois primeiros componentes principais (Figura 08) explicaram juntos 73% ($R^2X1=$

63%, $R^2X^2 = 10\%$) da variação nos dados espectrais. A distribuição das amostras também revelou alguns *outliers* fora dos limites do modelo (T2 de Hotelling de 95%).

A qualidade dos dados obtidos pôde ser também avaliada com base na análise das amostras de controle de qualidade (QC). As quinze amostras de QC formaram um grupo conciso e próximo do centro da PCA (Figura 08-A). Esse padrão, de agrupamento, indica qualidade satisfatória dos dados

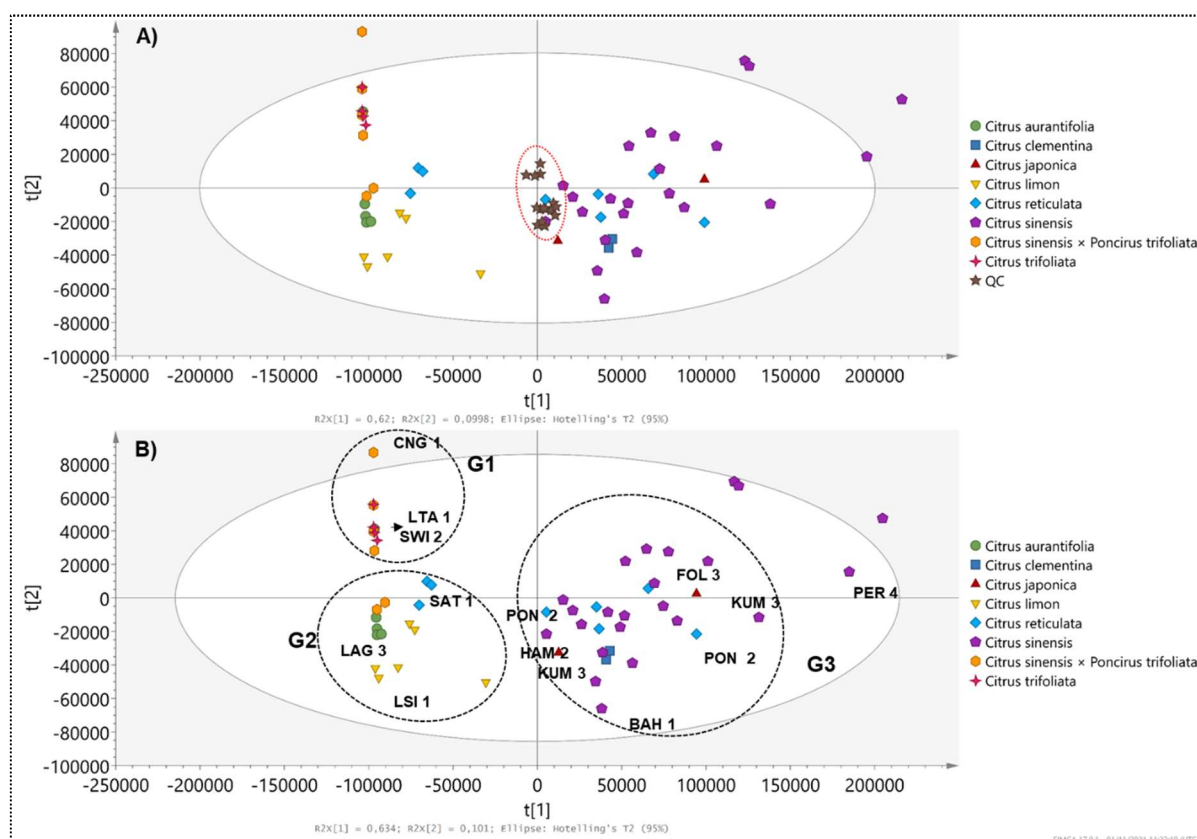


Figura 08. Análise multivariada dos dados de LC-HRMS (+) obtidos em modo positivo de 17 variedades de *Citrus*. **A)** Análise dos componentes principais (PCA) contendo as amostras de controle de qualidade (QC) agrupadas na origem dos eixos, o que sugere qualidade satisfatória dos dados obtidos. **B)** PCA destacando os agrupamentos químicos das variedades revelando padrões no metaboloma. Legenda: CNG = Citrange (híbrido); LTA = Limão Tahiti; SWI = Swingle (híbrido); SAT = Satsuma; LAG = Lima Ácida Galego; LSI = Limão Siciliano; PON = Ponkan; HAM = Hamlin; KUM = Kumquat; BAH = Bahia; FOL = Folha Murcha; PER = Pera Rio.

Através da PCA (Figura 08-B), foi possível distinguir alguns grupos de amostras o que sugere diferenças no *fingerpint*. De modo geral, as amostras das 17 variedades foram reunidas em três grupos, G1-G3.

O grupo G1 reuniu as variedades CNG (Híbrido), LTA (*Citrus aurantifolia*) e SWI (Híbrido), positivamente correlacionadas entre si. O grupo G2 reuniu as variedades SAT (*Citrus reticulata*), LAG (*Citrus aurantifolia*) e LSI e LCR (*Citrus limon*).

As demais variedades - PON (*Citrus reticulata*), KUM (*Citrus japonica*), CLE (*Citrus clementina*) e todas as variedades de *Citrus sinensis*, formaram um outro grupo (G3).

A PCA permitiu identificar padrões no metaboloma das variedades estudadas de acordo com a resistência. A análise em detalhe de cada grupo, demonstrou que PON e KUM, variedades consideradas resistentes ao Cancro cítrico, compartilham compostos com as variedades de *Citrus sinensis* (Grupo 3) e são positivamente correlacionadas entre si, enquanto apresentam-se negativamente correlacionadas com o Grupo 1. Por sua vez, as variedades de limões encontram-se fortemente agrupadas.

Uma análise supervisionada (ortogonal de mínimos quadrados parciais discriminativas – OPLS-DA), foi realizada para destacar metabólitos com potencial uso como marcadores da resistência. O modelo OPLS-DA foi então construído utilizando 56 observações (exclusão de três valores atípicos e QC).

Este modelo apresentou boa qualidade visto pelos dados de $R^2X_{cum}=0,89$; $R^2Y_{cum}=0,54$ e $Q^2_{cum}=0,33$. A variação ortogonal foi explicada em 58% e mostrou separação nítida entre as amostras, mantendo os três grupos observados, cujo mapeamento encontra-se na Figura 09-A. Além da manutenção dos grupos obtidos na PCA, a OPLS-DA agrupou melhor as variedades de uma mesma espécie, principalmente *C. reticulata*, separada na PCA.

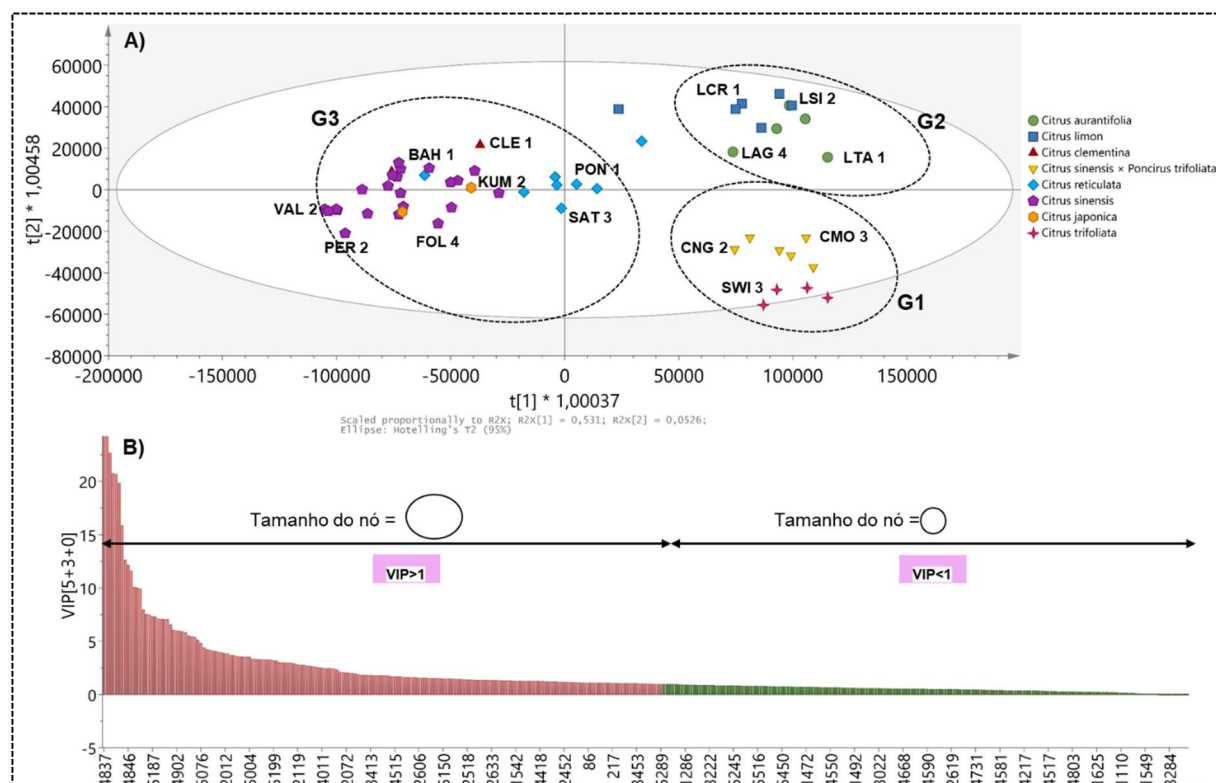


Figura 09. Análise multivariada supervisionada dos dados de LC-HRMS (+) obtidos em modo positivo de 56 extratos foliares de 17 variedades de *Citrus*. **A)** Ortogonal de mínimos quadrados parciais discriminativas (OPLS-DA) com a separação das amostras em três grupos. **B)** Plot do valor de importância (VIP) de cada *feature* (composto) obtido do OPLS-DA. As barras em vermelho destacam compostos com $VIP > 1$.

O compartilhamento de compostos entre as variedades de *Citrus sinensis* e as variedade Ponkan e Satsuma (*Citrus reticulata*), observadas na PCA e mantidas na análise OPLS-DA de forma mais intrincada, encontra respaldo nos estudos de filogenia desenvolvidos por Wu *et al.* (2018), que estabelece relações de parentesco entre as laranjas doces e tangerinas.

A relação entre essas variedades também é apontada em estudos anteriores, como de Luro *et al.* (2017) que aponta que a laranja doce (*Citrus sinensis*) é mais próxima filogeneticamente de *Citrus reticulata*.

Citrus clementina (variedade Clementina- CLE) também permaneceu agrupada com *Citrus sinensis*. Segundo Luro *et al.* (2017), a espécie provavelmente teve origem de *C. sinensis*, sendo a laranja doce doadora do pólen.

Os agrupamentos da OPLS-DA, também reuniu melhor as variedades híbridas (CNG, CMO e SWI) e confirmou o agrupamento fechado das variedades de limões (*Citrus limon*) e limas (*Citrus aurantifolia*), uma vez que ambas as espécies têm provável origem em *Citrus medica* (CURK *et al.*, 2016).

O valor de importância (VIP) dos compostos foi obtido a partir da análise de OPLS-DA (Figura 09-B). Uma lista contendo os valores de VIP foi exportada permitindo destacar 2633 *features* com VIPs > 1.

Compostos com valores de VIP>1 são tipicamente encontrados em grupos específicos de amostras. A Figura 10-A demonstra a quantidade relativa de um composto tipicamente com VIP>1.

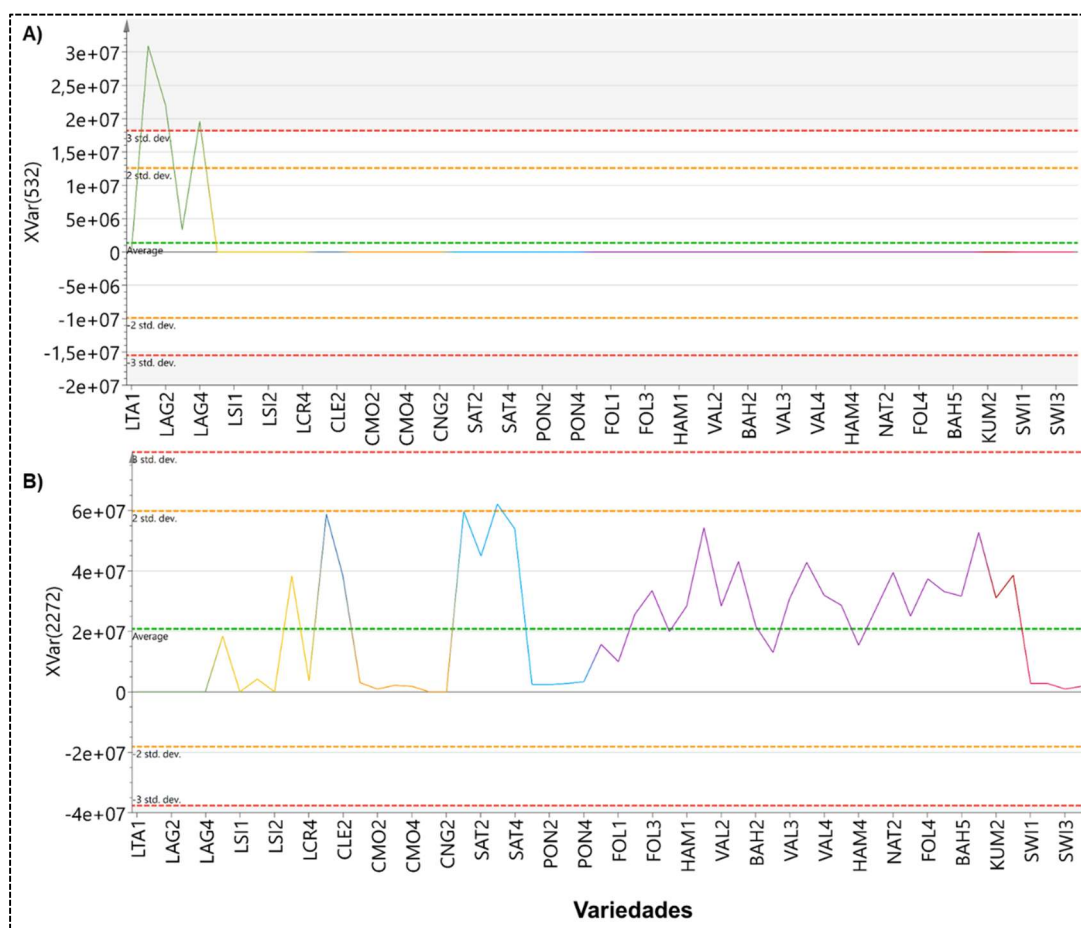


Figura 10. Plot da intensidade de alguns *features* representativos. **A)** *Feature* 532- contendo VIP>1, detectado em LAG e LTA (*Citrus aurantifolia*). **B)** *Feature* 2272- contendo VIP<1, detectado em todas as variedades exceto SWI (híbrido), PON (Ponkan- *Citrus reticulata*) e CMO (híbrido).

O VIP foi desenvolvido como forma de melhorar a interpretação dos modelos em análises ortogonais em 2014 (GALINDO-PRIETO; ERIKSSON; TRYGG, 2014). Ele permite classificar as variáveis por importância, verificando a influência de determinada variável na projeção, e assim, auxiliando na visualização de metabólitos diferenciais que podem ser exclusivos de determinadas amostras (GALINDO-PRIETO; TRYGG; GELADI, 2017). Segundo o algoritmo de desenvolvimento, VIPs > 1 apontam variáveis mais relevantes, enquanto VIPs < 1 as variáveis com pouca contribuição para a formação dos grupos.

Ao selecionarmos *features* com valores de VIP > 1, podemos verificar que quanto maior o valor, maior a probabilidade do *feature* estar presente em um pequeno número de amostras, destacando possíveis candidatos que possam ser utilizados como marcadores químicos.

Como podemos ver na figura 10-A o *feature* 532 encontra-se exclusivo nas amostras LTA e LAG (10-A), enquanto o *feature* 2272 (10-B) está presente em praticamente todas as variedades.

Os resultados das análises multivariadas foram integrados na rede de moléculas, cujos resultados são discutidos a seguir.

4.5 Análise por rede de moléculas

A utilização da rede de moléculas (MN) como estratégia para a organização dos espectros de fragmentação, abriu um leque de oportunidades para visualização deste tipo de dados e identificação de compostos de modo mais eficiente que os métodos tradicionais (FOX-RAMOS *et al.*, 2019).

A MN organiza os espectros em *clusters* (grupos), baseado na similaridade espectral fornecida pela pontuação de cosseno, que parte de vetores para comparar

e revelar espectros quase iguais. Tal metodologia foi recentemente atualizada com a inserção do Spec2Vec, que, ao invés de utilizar um vetor, baseia-se em linguagens naturais, em que o algoritmo processa e aprende as relações dos picos dos espectros baseado na frequência em que ocorrem (HUBER *et al.*, 2021).

Em uma MN, cada nó é um espectro e cada aresta, liga os espectros baseado na similaridade, permitindo a visualização de classes de estruturas químicas e também identificar analogias entre os íons detectados.

A organização dos espectros por similaridade revelando as famílias estruturais nas MNs, têm se mostrado uma ferramenta mais eficiente para a propagação da identificação de compostos já conhecidos e destacando possíveis novos produtos naturais, quando comparada com métodos tradicionais para identificação de estruturas químicas (PILON *et al.*, 2021). A partir da identificação da estrutura química localizada em um nodo, a propagação da identificação das estruturas nos nodos vizinhos pode ser feita no cluster.

A anotação de compostos na MN pode ser realizada por várias estratégias (FOX-RAMOS *et al.*, 2019). Atualmente, a comparação de espectros com bases espectrais, possibilita a anotação rápida de compostos e a obtenção de um perfil preliminar do objeto de estudo compatível com abordagens metabolômicas. Além disso, a anotação automática dos compostos, permite analisar dados que antes eram subutilizados ou descartados devido à complexidade de analisar o grande volume de espectros obtidos (ALLARD *et al.*, 2016; QUINN *et al.*, 2017).

Desta forma, neste trabalho, tomou-se vantagem da geração de uma MN seguida de comparação dos espectros contra uma base de espectros simulados *in silico* para se obter de maneira rápida, um panorama geral dos compostos presentes nos extratos foliares das espécies selecionadas.

A lista contendo 5975 *features* (compostos), com dados de MS/MS associados foi utilizada como entrada na plataforma GNPS para criação da MN seguindo o fluxo de trabalho da “*Feature-Based Molecular Networking*” (FBMN) (NOTHIAS *et al.*, 2020).

A MN resultante agrupou os 5975 nodos (*features*) em 723 *clusters*. Em seguida, prosseguimos com a anotação dos compostos na MN. Para isso, o arquivo (.mgf) contendo os dados de MS/MS, foi utilizado como entrada para a anotação computacional *in silico* dos compostos.

4.6 Anotação *in silico* dos compostos e ponderação taxonômica

Uma estratégia de anotação de produtos naturais foi realizada para identificar os compostos na MN, a partir da comparação dos espectros, obtidos das amostras de *Citrus*, com uma base de dados espectrais.

Os dados de MS/MS experimentais foram comparados automaticamente com a base de espectros de fragmentação (MS/MS) simulados *in silico*, gerada a partir do Dicionário de Produtos Naturais (ISDB-DNP) (ALLARD *et al.*, 2016). A comparação dos espectros gerou uma lista de 50 candidatos (top 50) para cada espectro experimental, ranqueados de acordo com o valor de cosseno (ALLARD *et al.*, 2016).

O valor de cosseno permite comparar espectros quase idênticos, possibilitando a anotação do composto sem a necessidade de pesquisa manual em bases de dados e o isolamento de compostos.

A figura 11-A e 11-B, demonstra o processo de anotação. Os espectros teóricos e experimentais são comparados em ambiente automatizado e uma série de informações são fornecidas, como a pontuação de cosseno e o nº de picos compartilhados, fornecendo confiabilidade na anotação.

Quanto maior o valor de cosseno, maior a chance de os espectros pertencerem a mesma molécula, devido a sobreposição dos vetores resultantes dos espectros de fragmentação utilizados na comparação, sendo assim, o valor mínimo de confiabilidade adotado é a pontuação de cosseno igual ou superior a 0,7.

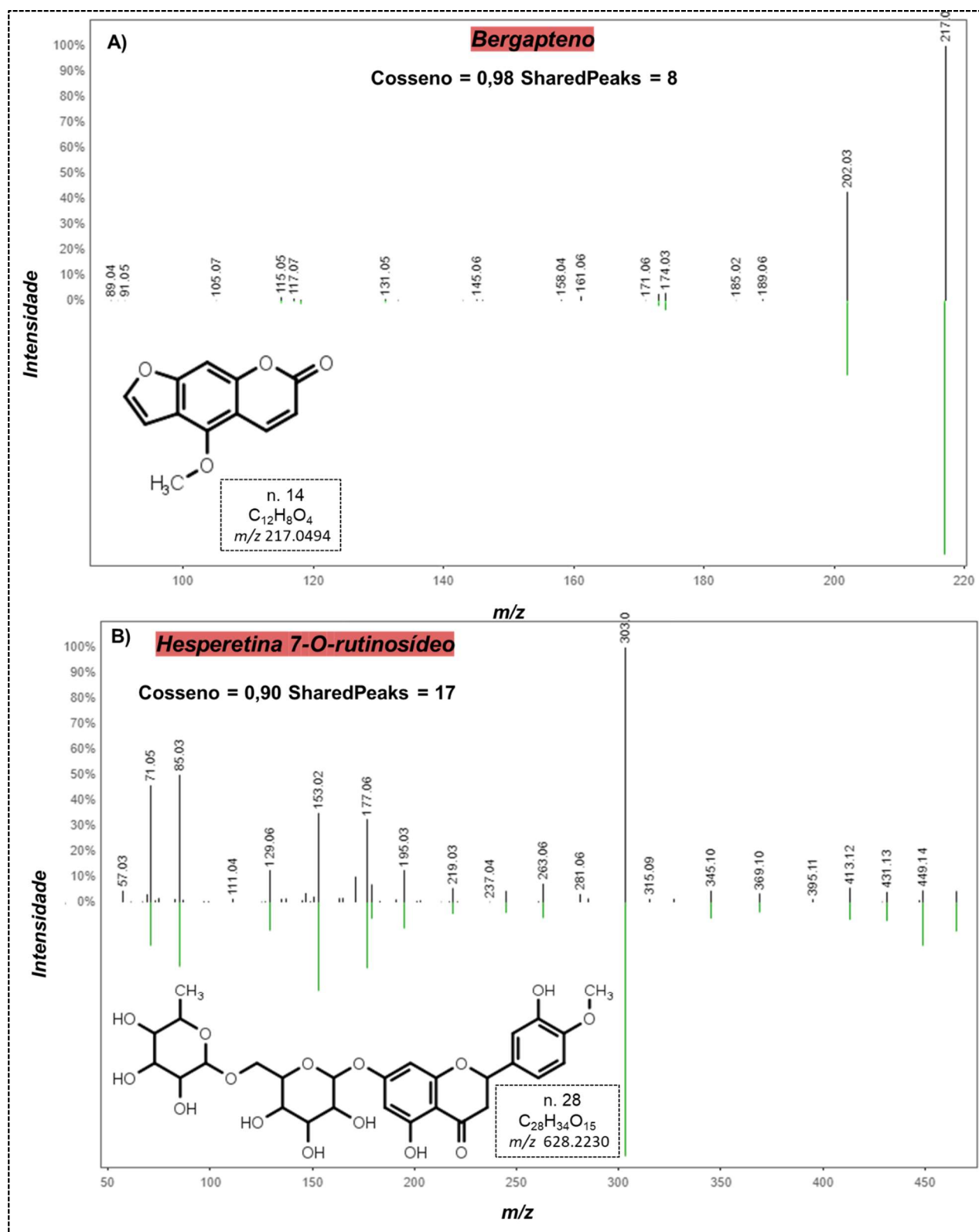


Figura 11. Comparação dos espectros representativos de similaridade estrutural obtida para dois compostos, a partir do valor de cosseno, para a anotação computacional *in silico* via ISDB-DNP. Em preto, espectro experimental obtido via análise de UHPLC-HRMS. Em verde, espectro teórico presente na base de dados do ISDB-DNP. **A)** composto anotado como Bergapteno. **B)** composto anotado como Hesperetina- 7-O-rutinosídeo. Os valores de cosseno que permitiram a anotação dos compostos, o nº de picos compartilhados entre os espectros teóricos e experimentais, as fórmulas moleculares, estruturais, valor de m/z e o nº do composto na lista de compostos anotados na tabela 02 são apresentados.

Em um segundo passo, para aumentar a confiança das anotações, seguimos uma abordagem taxonômica (RUTZ *et al.*, 2019). As anotações (50 candidatos para cada espectro) obtidas da ISDB-DNP, foram reclassificadas com base na distância taxonômica entre a fonte biológica das amostras analisadas e biológica de ocorrência dos candidatos. Esse método permitiu ordenar os compostos já identificados em Rutaceae em nível de família e *Citrus* em nível de gênero, e também retornou resultados condizentes com identificações já relatadas para cinco das espécies consideradas neste estudo.

O infográfico abaixo (Figura 12) representa a análise quantitativa dos resultados retornados a partir da anotação *in silico* seguida de ponderação taxonômica dos compostos.



Figura 12. Análise dos resultados obtidos na etapa de anotação pelo ISDB-DNP seguida de ponderação taxonômica dos compostos candidatos. A anotação *in silico* retornou candidatos para 29% dos *features* detectados. Destes, a ponderação taxonômica reordenou 428 compostos candidatos compatíveis à nível de família - Rutaceae- (26,45%) e 181 à nível de gênero- *Citrus*- (11,18%). A ponderação retornou também resultados compatíveis à nível de

espécie, incluindo cinco espécies (expressas na imagem), dentre as oito consideradas neste estudo.

As classificações das estruturas das entidades químicas anotadas foram padronizadas utilizando o *ClassyFire* (DJOUIMBOU *et al.*, 2016). O *ClassyFire* é um site/aplicativo disponível gratuitamente no endereço <http://classyfire.wishartlab.com>. Este aplicativo permite a classificação automatizada das famílias químicas e é compatível com dados grandes. O *ClassyFire* fornece informações relacionadas a mais de 4.800 classes químicas, ao entregar uma classificação hierárquica dos compostos químicos orgânicos e inorgânicos conhecidos.

Utilizando este método, os compostos anotados em *Citrus* foram classificados em 112 classes químicas.

As classes mais representativas incluíram prenol lipídios (terpenos - 11,6%), ácidos graxos (10,19%), flavonoides (9,82%), ácidos carboxílicos e derivados (9,14%), benzenos e derivados (6,67%), cumarinas (6,67%), compostos orgânicos oxigenados (5,93%) e compostos organonitrogenados (3,21%).

Os dados referentes às classes de metabólitos podem ser observados no *Treemap* (Figura 13). Um *treemap* (mapa de árvore) permite visualizar o conjunto de dados como retângulos aninhados, em que o tamanho do retângulo é determinado pelo valor a ser representado graficamente. O gráfico abaixo foi construído a partir das primeiras 41 classes de compostos identificadas, por apresentarem mais de seis compostos representantes.

No *Treemap*, cada classe é representada por um retângulo perfeitamente alinhado com aqueles de maior similaridade no percentual de compostos, sendo que

a área de cada retângulo é proporcional ao percentual de compostos pertencentes àquela classe.

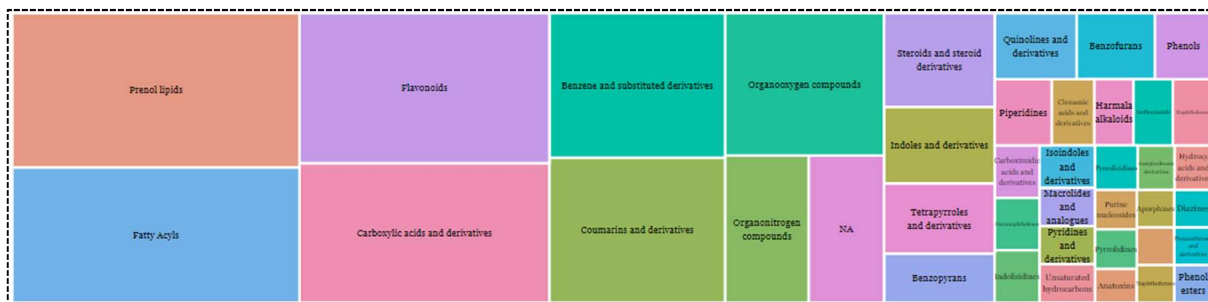


Figura 13. *Treemap* do percentual de compostos anotados por classe de substâncias. O gráfico foi ordenado de modo que as classes com o maior número de representantes fossem localizadas à esquerda do gráfico e diminuíssem gradativamente. O percentual foi obtido a partir do cálculo em relação ao total de compostos identificados pelo ISDN-DNP, e as classes determinadas através de confirmação pelo *ClassyFire*.

Vale destacar que o *script* utilizado para a elaboração do *Treemap*, determina que o nome das classes de compostos com percentual muito baixo, e que, portanto, terão área do retângulo mínima, são suprimidas para permitir melhor visualização do conjunto de dados.

As famílias químicas identificadas foram integradas na Rede de moléculas e podem ser visualizadas através da coloração da borda dos nós (Figura 14). Na rede preliminar, destacamos os *clusters* das respectivas classes químicas, baseados em padrões de coloração que refletissem as famílias químicas que obtiveram altos valores percentuais como destacado no *treemap*.

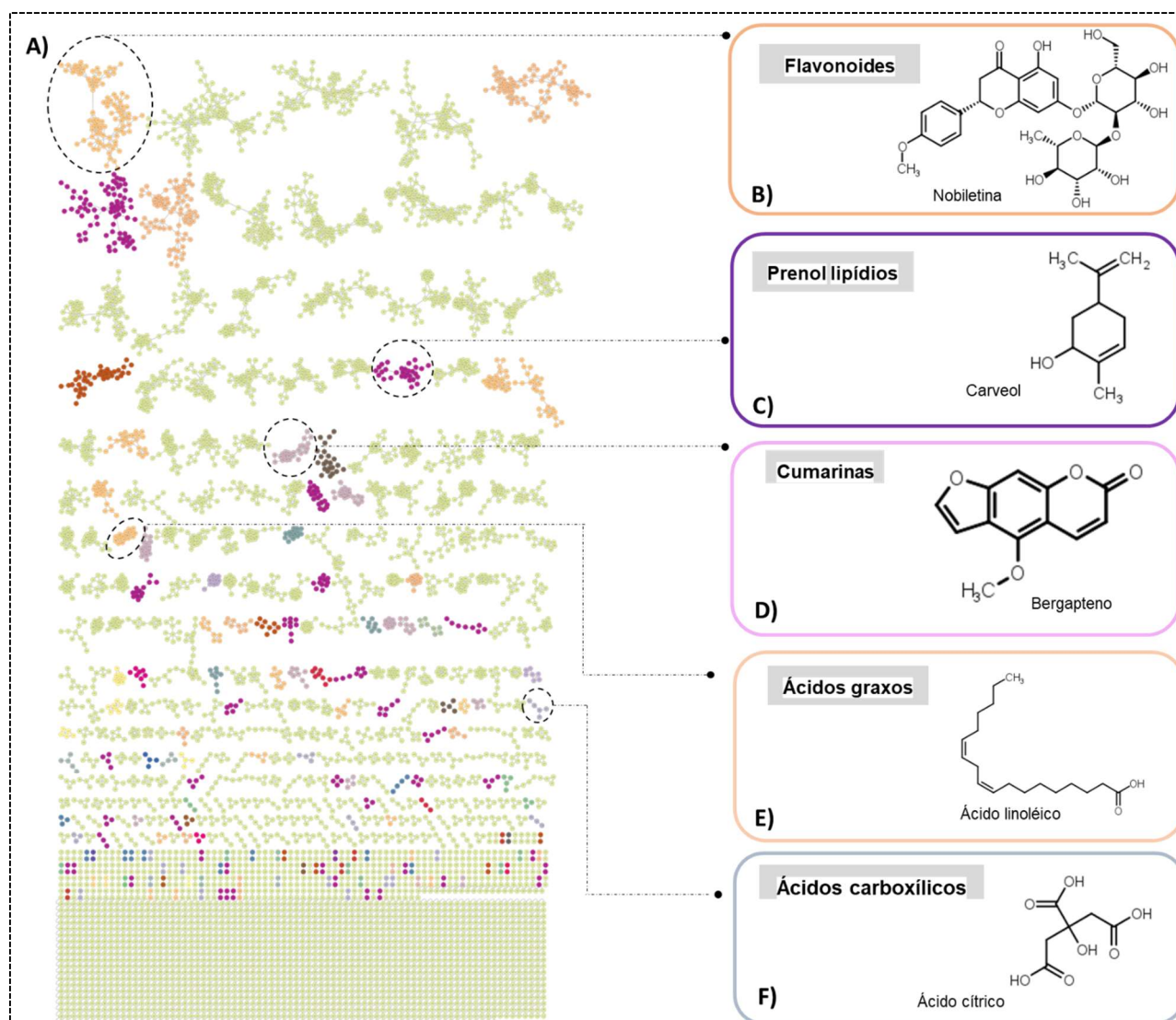


Figura 14. Rede de moléculas dos compostos identificados em *Citrus*, gerada pelo GNPS (5975 *features* e 737 *clusters*), representando as classes de compostos previamente identificadas. Cada nodo representa um composto. Cada composto está ligado pelas arestas ao composto mais próximo com similaridade estrutural, formando os *clusters* de classes químicas. A) Estrutura completa da rede de moléculas gerada pelo GNPS. À direita da imagem estão destacados alguns *clusters* de classes de compostos químicos identificados na rede, bem como a estrutura química correspondente ao composto de cada nó, dentro de cada *cluster* destacado. B) Flavonoides. C) Prenol Lipídios (conhecidos como terpenos). D) Cumarinas. E) Ácidos graxos. F) Ácidos carboxílicos. Nodos em verde = não identificados.

As classes de compostos identificadas vão ao encontro de estudos anteriores com espécies isoladas de *Citrus* ou em estudos combinados. A principal mudança é o percentual representativo de cada classe, tendo em vista as divergências metabólicas nas diferentes partes dos vegetais, e sabendo que a maioria dos estudos desenvolvidos se concentrava nos frutos - seus tecidos e suco.

Em estudos com *Citrus limon*, com foco à química dos frutos, é possível encontrar resultados similares aos encontrados nas folhas das variedades deste trabalho, relatando a presença de flavonoides, cumarinas, ácidos fenólicos, ácidos carboxílicos e ácidos graxos, além de outros compostos quase exclusivamente dos frutos e sementes (KLIMEK-SZCZYKUTOWICZ; SZOPA; EKIERT, 2020). O mesmo foi relatado por LV *et al.* (2015), que incluiu ainda terpenoides e alcaloides, e entre os metabólitos especializados mais comumente encontrados nos citrinos, por Liu *et al.* (2021), em revisão sobre os constituintes químicos de citros e saúde humana.

Dos 1618 compostos identificados pelo ISDB-DNP, a ponderação taxonômica devolveu 181 compostos presentes no gênero *Citrus*.

Os 181 compostos anotados e retornados pela ponderação taxonômica em nível de gênero foram organizados em uma lista (Tabela 2), inicialmente filtrada e revisada de modo a destacar os compostos identificados, primeiramente em nível de gênero, excluindo aqueles com grande variação em Rt.

Tabela 2. Identificação dos compostos previamente identificados em *Citrus* e presentes nos extratos foliares de variedades selecionadas. Os dados foram obtidos por UHPLC-HRMS em modo positivo. Os compostos foram anotados em comparação com o ISDB-DNP e reordenados pela ponderação taxonômica, de modo a refletir apenas os reconhecidos em nível de gênero.

Nº	<i>m/z</i>	RT (min)	Classe	Fórmula Molecular Neutra (ISDB-DNP)	Anotação dos compostos (ISDB-DNP ou GNPS) Nome do Produto Natural	<i>InChiKey</i> (parcial) *
1	166.0862	0.6839	BZ	C ₉ H ₁₁ NO ₂	Metil 2- (metilamino) benzoato	GVOWHGSUZUUUDR
2	150.0913	6.4943	BZ	C ₉ H ₁₁ NO	Fenilacetaldéido O-metiloxima	NICHQMGWVYWONX
3	289.0803	1.1972	CH	C ₁₅ H ₁₂ O ₆	2', 3,4,4', 6'-Pentahidroxichalcona	CRBYNQCDRNZCNX
4	165.0546	1.1569	CI	C ₉ H ₈ O ₃	Ácido 3-hidroxicinâmico	KKSDGJDHHZEWEP
5	247.0974	2.6047	CM	C ₁₄ H ₁₄ O ₄	(S) –Marmesina	FWYSBEAFFPBAQU
6	205.1952	4.0383	CM	C ₁₅ H ₂₄	α-bergamoteno	YMBFCQPIMVLNIU
7	307.1179	2.3017	CM	C ₁₆ H ₁₈ O ₆	Trans-O-metilgrandmarina	NACAFQOYZHTCHZ
8	259.0974	2.5861	CM	C ₁₅ H ₁₄ O ₄	5-metoxisseselina	ZNMRQYJUVCXNGK
9	287.0918	2.3716	CM	C ₁₆ H ₁₄ O ₅	Heraclenina	CTJZWFCPUPLME
10	331.1543	2.2624	CM	C ₁₉ H ₂₂ O ₅	Poncimarina	ICRMRGFEHCUSRS
11	345.1696	2.3713	CM	C ₂₀ H ₂₄ O ₅	Isoschininallylol	XBYZRQVQYHWAFL
12	203.0339	3.8656	CM	C ₁₁ H ₆ O ₄	Xantotoxol	JWVYQQGERKEAHW
13	261.1114	2.3275	CM	C ₁₅ H ₁₆ O ₄	Citrusal	VCYVDHAWDPDCKW
14	217.0494	3.7116	CM	C ₁₂ H ₈ O ₄	Bergapteno	BGEBZHIAGXMEMV
15	203.0339	4.1016	CM	C ₁₁ H ₆ O ₄	Bergaptol	GIJHDGJRTUSBJR
16	163.0390	0.6712	CM	C ₉ H ₆ O ₃	7-Hidroxicumarina (Umbeliferona)	ORHBXUUXSCNDEV
17	261.1179	3.2178	CM	C ₁₅ H ₁₆ O ₄	7-O-Prenilescopoletina	ZLPLFUBVEZVYDX
18	231.1050	2.3912	CM	C ₁₄ H ₁₄ O ₃	Ostenol	RAKJVIPCCGXHHS
19	247.0605	3.4094	CM	C ₁₃ H ₁₀ O ₅	Isopimpineline	DFMAXQKDIGCMTL
20	318.1380	3.0698	CM	C ₁₇ H ₁₆ O ₅	Felopterina	BMLZFLQMBMYVHG
21	247.0941	2.9958	CM	C ₁₄ H ₁₄ O ₄	Colombianetina	YRAQEMCYCSSHJG
22	287.0903	2.2009	CM	C ₁₆ H ₁₄ O ₅	Trichoclin	SYEZZRGTJNNHEL
23	193.0495	3.1732	CM	C ₁₀ H ₈ O ₄	Isoscopoletina	SYTYLPHCLSSCOJ

24	168.1024	2.1105	AL	$C_9H_{13}NO_2$	Sinefrina	YRCWQPVGYLYSOX
25	288.0875	2.1258	AL	$C_{15}H_{13}NO_5$	Grandisine III	QNXGBYOUHGRJCI
26	373.1291	3.0266	FL	$C_{20}H_{20}O_7$	Tangeretina	ULSUXBXHSYSGDT
27	597.1777	1.1942	FL	$C_{27}H_{32}O_{15}$	Neoeriocitrina	OBKKEZLIABHSGY
28	628.2230	1.4418	FL	$C_{28}H_{34}O_{15}$	Hesperetina 7-O-rutinósido	QUQPHWDTPGMPEX
29	287.0902	1.7993	FL	$C_{16}H_{14}O_5$	Isosacuranetina/4'-Metilnaringenina	HMUJXQRRKBLVOO
30	343.1177	2.3875	FL	$C_{19}H_{18}O_6$	5,6,2', 6'-tetrametoxiflavona	PBQMALAAFQMDSP
31	625.1765	1.3237	FL	$C_{28}H_{32}O_{16}$	Isorhamnetin-3-O-rutinosídeo	UIDGLYUNOUKLBM
32	375.1083	2.5432	FL	$C_{19}H_{18}O_8$	5,2'-Diidroxi-6,7,8,6'-tetrametoxiflavona	GMQFOKBGMKVUQZ
33	313.1070	2.5110	FL	$C_{18}H_{16}O_5$	4', 5,7-Trimetoxiflavona	ZXJBDHPUHUUHD
34	359.1136	2.7108	FL	$C_{19}H_{18}O_7$	3'-Hidroxi-5,6,7,4'-tetrametoxiflavona	LYLDPYNWDVVPIQ
35	403.1390	2.3081	FL	$C_{21}H_{22}O_8$	Nobiletina	MRIAQLRQZPPDS
36	345.0974	2.3899	FL	$C_{18}H_{16}O_7$	Eupatorina	KLAOKWJLUQKWIF
37	433.1129	1.2016	FL	$C_{21}H_{20}O_{10}$	Isovitexina	MYXNWGACZJSMBT
38	329.1025	2.9472	FL	$C_{18}H_{16}O_6$	5-hidroxi-7,8,4'-trimetoxiflavona	RRZRJBICWWNHRB
39	609.1807	1.6742	FL	$C_{28}H_{32}O_{15}$	Diosmetin-7-O-rutinosídeo	GZSOSUNBTXMUFQ
40	315.0855	1.6596	FL	$C_{17}H_{14}O_6$	4', 5-Dihidroxi-6,7-dimetoxiflavona	ZIIAJIWLQUVGHB
41	579.1702	1.1826	FL	$C_{27}H_{30}O_{14}$	Vitexin-2-O-rhamnosídeo	LYGPBZVKGHHTIE
42	611.1960	1.4459	FL	$C_{28}H_{34}O_{15}$	Hesperidina	QUQPHWDTPGMPEX
43	579.1708	1.3574	FL	$C_{27}H_{30}O_{14}$	Apigenina 7-O-neohesperidosídeo	RPMNUQRUHXIGHK
44	595.1663	0.9522	FL	$C_{27}H_{30}O_{15}$	Apigenina 6,8-di-C-glucosídeo	FIAAVMJLAGNUKW
45	315.0868	2.3278	FL	$C_{17}H_{14}O_6$	4', 5-Dihidroxi-7,8-dimetoxiflavona	FTFPXINQVCVDEY
46	433.1500	2.8597	FL	$C_{22}H_{24}O_9$	3', 4', 5', 3,5,7,8-Heptametoxiflavona	AFQWYRUBZJYCIF
47	625.1762	1.1577	FL	$C_{28}H_{32}O_{16}$	3, 8-Diglucosildiosmetina	OZSVEJFZRCNON
48	359.1123	2.0660	FL	$C_{19}H_{18}O_7$	2- (3,4-dimetoxifenil) -7-hidroxi-5,6-dimetoxicromen-4-ona	QZNYGJAJWILZLF
49	391.1387	2.5242	FL	$C_{20}H_{22}O_8$	5-Desmetilcitromitina	XRMJVHGTNXEOHH
50	303.0857	1.4456	FL	$C_{16}H_{14}O_6$	Homoeriodictiol	FTODBIPDTRIGS

51	373.1285	2.3670	FL	C ₂₀ H ₂₀ O ₇	3,7,3',4',5'-pentametoxiflavanona	VECLBJNEVVVACD
52	375.1151	2.2087	FL	C ₁₉ H ₁₈ O ₈	3', 5-dihidroxi-3,4', 5', 7-tetrametoxiflavona	LLDTYMGZAXZDDU
53	403.1393	5.3045	FL	C ₂₁ H ₂₂ O ₈	3,3', 4', 5,6,8-Hexametoxiflavona	FONKMEBARQKMEH
54	389.1238	2.9084	FL	C ₂₀ H ₂₀ O ₈	5-Demetilnobiletina	XGOWVPRWNRKCSL
55	509.1292	1.3700	FL	C ₂₃ H ₂₄ O ₁₃	Seringetina-3-O-glucosídeo	JMFWYRWPJVEZPV
56	595.1655	1.2160	FL	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	Kaempferol-3-glucosídeo-3'' - Rhamnosídeo	YFPYXTNSQOUHPS
57	419.1342	3.0290	FL	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	6-hidroxi-3,3', 4', 5,7,8-hexametoxiflavona	VCOWIXWIOZUOJS
58	419.1336	2.3815	FL	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	5-hidroxi-3,6,7,8,3', 4'-hexametoxiflavona	JDVPHCLYMGBZLE
59	361.0924	2.4188	FL	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	Acerosina	BTMNGQCCCWUQH
60	271.0725	1.3847	FL	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	6,7,4'-trihidroxiisoflavona	GYLUFQJZYAJQDI
61	373.1288	2.3656	FL	C ₂₀ H ₂₀ O ₇	Isosinensetina	UYCWETIUOAGWIL
62	593.1845	1.4406	FL	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₄	2-O-ramnosil-swertisina	UINZSMIFSIOGBZ
63	625.1768	1.2006	FL	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	3, 8-Diglucosildiosmetina	OZSVEJFZRCNON
64	329.1020	2.0322	FL	C ₁₈ H ₁₆ O ₆	5-hidroxi-7,8,4'-trimetoxiflavona	RRZRJBICWWNHRB
65	449.1439	1.4409	FL	C ₂₂ H ₂₄ O ₁₀	Poncirenina	KEEWIHDTSNESJZ
66	595.2006	1.7860	FL	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₄	Poncirina	NLAWPKPYBMEWIR
67	315.0866	2.6518	FL	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	4', 5-Dihidroxi-7,8-dimetoxiflavona	FTFPXINQVCVDEY
68	331.0812	2.0456	FL	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	3,5,6-Trihidroxi-7,4'-dimetoxiflavona	JLFOFYBNCNKHOL
69	391.1386	2.2849	FL	C ₂₀ H ₂₂ O ₈	5-Demetilcitromitina	XRMJVHGTNXEOHH
70	301.0706	1.9925	FL	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	Diosmetina	MBNGWHIJMBWFHU
71	493.1330	1.5005	FL	C ₂₃ H ₂₄ O ₁₂	Jaceosídeo	YFZSQPRYLBGYKE
72	565.1547	1.1645	FL	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	Isovitexina 2'' - O-arabinósido	ACRIYYKEWCXQOS
73	347.0759	1.1456	FL	C ₁₇ H ₁₄ O ₈	3', 4', 5,7-Tetrahidroxi-6,8-dimetoxiflavona	WTGSDFFJZUGAHBH
74	595.1655	1.1244	FL	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	8- [4,5-di-hidroxi-6- (hidroximetil) -3- [3,4,5-tri- hidroxi-6- (hidroximetil) oxan-2-il] oxioxan-2-il] -5, 7- dihidroxi-2- (4-hidroxifenil) cromen-4-ona	FYTOTHFWELWOCG-
75	339.1075	0.8443		C ₁₆ H ₁₈ O ₈	Ácido p-coumaroilquínico	BMRSEYFENKXDIS
76	517.1335	1.4252	AF	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	Ácido 1,4-Dicafeoilquínico	IYXQRCXQQWUFQV
77	369.1209	0.8903	AF	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	Ácido 4-O-feruloil-D-quínico	VTMFDSJJVNQXLT
78	225.0757	1.4321		C ₁₁ H ₁₂ O ₅	Ácido sináptico	PCMORTLOPMLEFB

79	375.1441	2.7958	DP	C ₂₀ H ₂₂ O ₇	2'-Hidroxi-3,3', 4,4', 6'-pentametoxi-trans-chalcona	HJEVKPPOPFNTMA
80	377.1021	2.2044	NF	C ₂₂ H ₁₆ O ₆	Pummeloquinona	GPGGGLOHXPWGDO
81	153.1274	1.1134	LP/TE	C ₁₀ H ₁₆ O	Limoneno-4-ol	OVKDFILSBMEKLT
82	153.1274	1.4023	LP/TE	C ₁₀ H ₁₆ O	Carveol	BAVONGHXFVOKBV
83	339.1599	3.8678	LP/TE	C ₂₁ H ₂₂ O ₄	Éter geranílico de bergaptol	DBMJZOMNXBSRED
84	151.1107	1.8703	LP/TE	C ₁₀ H ₁₄ O	3-hidroxi-p-menta-1,8-dien-7-al	CGYLWHVYZDSTDR
85	219.1743	1.1672	LP/TE	C ₁₅ H ₂₂ O	3,7 (11) -Eudesmadien-2-ona	SVQMAXHCMOZBSF
86	217.1580	2.5270	LP/TE	C ₁₅ H ₂₀ O	1(10),8,11-Eremophilatrien-2-one	PHRADXUJOZKVDN
87	219.1745	3.9452	LP/TE	C ₁₅ H ₂₂ O	3,7 (11) -Eudesmadien-2-ona	SVQMAXHCMOZBSF
88	151.1111	2.7012	LP/TE	C ₁₀ H ₁₄ O	3-hidroxi-p-menta-1,8-dien-7-al	CGYLWHVYZDSTDR
89	432.1886	1.3379	LP/TE	C ₁₉ H ₂₆ O ₁₀	Beta-D-Glucopiranosídeo	VJVGTGQETNCOEX
90	370.1653	3.0771	PI	C ₂₁ H ₂₃ NO ₅	3-metil-éter-Prenylcitpressine	NA
91	318.0974	2.1707	QU	C ₁₆ H ₁₅ NO ₆	1,2,3,4,5-Pentahydroxyacridone2,4-Di-Me éter	GGFAVDAJPCNMKS
92	302.1026	2.5975	QU	C ₁₆ H ₁₅ NO ₅	Grandisine I	VPMIRWSZFAXDKP
93	549.2860	5.1834	TP	C ₃₄ H ₃₆ N ₄ O ₃	Éster de pirofeoforbide-a-monometil	YMBZVJAREAJWOI
94	535.2708	4.8182	TP	C ₃₃ H ₃₄ N ₄ O ₃	Pirofeoforbídeo a	FDKRLXBXYZKWRZ
95	367.1556	0.6971	TR	C ₁₇ H ₂₂ N ₂ O ₇	1-beta-D-glucopiranosil-L-Triptofano	ZHBHZDMTVVJASV
96	174.0904	0.9977	TR	C ₁₁ H ₁₄ N ₂ O	5-Metoxitriptamina	JTEJPPKMYBDEMY

Lista de abreviações: **DNP** = dicionário de produtos naturais; **BZ** = benzeno e derivados; **CA**= ácidos carboxílicos e derivados; **CI**= ácido cinâmico e derivados; **CH**= chalcona; **CM** = cumarinas e derivados; **FL**= flavonoides; **NF** = naftalenos; **LP/TE**= prenol lipídeos/terpenos; **QU**= quinolinas e derivados; **TP**= tetrapirroles e derivados; **DP**= diarilpropanoides; **PI**= piridinas e derivados; **AL**= alcaloides; **TR**= triptaminas e derivados; **AF**= ácido fenólico. * **InChiKey**= Internacional Chemical Identifier.

Os compostos anotados em nível de gênero encontram correspondência em estudos atuais sobre os diferentes tecidos de *Citrus*, e estudos voltados à quimiotaxonomia.

Os compostos **09, 10, 12, 14, 15, 16, 19 e 23**, todos cumarinas são compatíveis aos já detectados em estudos de distribuição associado à filogenia, desenvolvidos por Dugrand-Judek *et al.* (2015) e estudos associados à atividade contra patógenos, por Ramirez-Pelayo *et al.* (2019). Esses compostos têm ação de defesa contra insetos herbívoros e patógenos, como a Umbeliferona e a Escopoletina, contra o mofo verde - *Penicillium digitatum* (AFEK *et al.*, 1999; SANZANI; SCHENA; IPPOLITO, 2014) e que podem agir também como fotossensibilizantes em humanos.

O composto **24** foi anotado como sendo a Sinefrina. A Sinefrina é um alcaloide similar à Efedrina, e que vem sendo muito explorado em *Citrus* desde a proibição do uso da Efedrina em suplementos alimentares, pela agência regulatória americana, inclusive sendo este um biomarcador da autenticidade dos sucos de laranja e potencial biomarcador para o mel da laranja (KAEFER *et al.*, 2015; TETTE *et al.*, 2017).

A Sinefrina é uma amina bioativa relacionada à vasoconstrição, aumento da pressão arterial e da perda de peso em obesos pela ação termogênica (TSUJITA; TAKAKU, 2007), o que enfatiza seu uso como suplemento.

O composto **25** foi relatado como Grandisine III, um alcaloide de acridona, cujos estudos são escassos, mas relacionados à atividade anti-herpética (YAMAMOTO *et al.*, 1989).

Os compostos **26-74**, pertencem aos flavonoides, incluindo as polimetoxiflavonas. Os flavonoides são abundantes em *Citrus*, sendo os compostos

27, 28, 29, 31, 39, 41, 42 e 43 os mais comumente detectados nas espécies cítricas (TRIPOLI *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 2017; ZANDALINAS *et al.*, 2017).

A Tangeritina e Nobiletina, respectivamente compostos **26** e **35**, além dos compostos **32, 33, 34, 46 e 57**, todos PMFs (polimetoxiflavonas), também se destacam em outros estudos (PENG *et al.*, 2021; XI *et al.*, 2015).

Como discutido por LV *et al.* (2015), os flavonoides possuem ampla aplicabilidade farmacêutica, com estudos envolvendo atividades anti-inflamatórias, antioxidantes, redutoras do colesterol e de glicose sérica, neuroprotetora e anti aterosclerose.

Com os dados das identificações e abundância dos 1618 compostos, também foi possível obter um *HeatMap* (Figura 15). Um *Heatmap*, ou mapa de calor, é uma ferramenta de visualização de dados que parte de cores para facilitar o entendimento das informações, seguindo de guia para a identificação de como os dados estão agrupados.

O *Heatmap* foi construído para apresentar a abundância dos compostos identificados em relação às variedades estudadas.

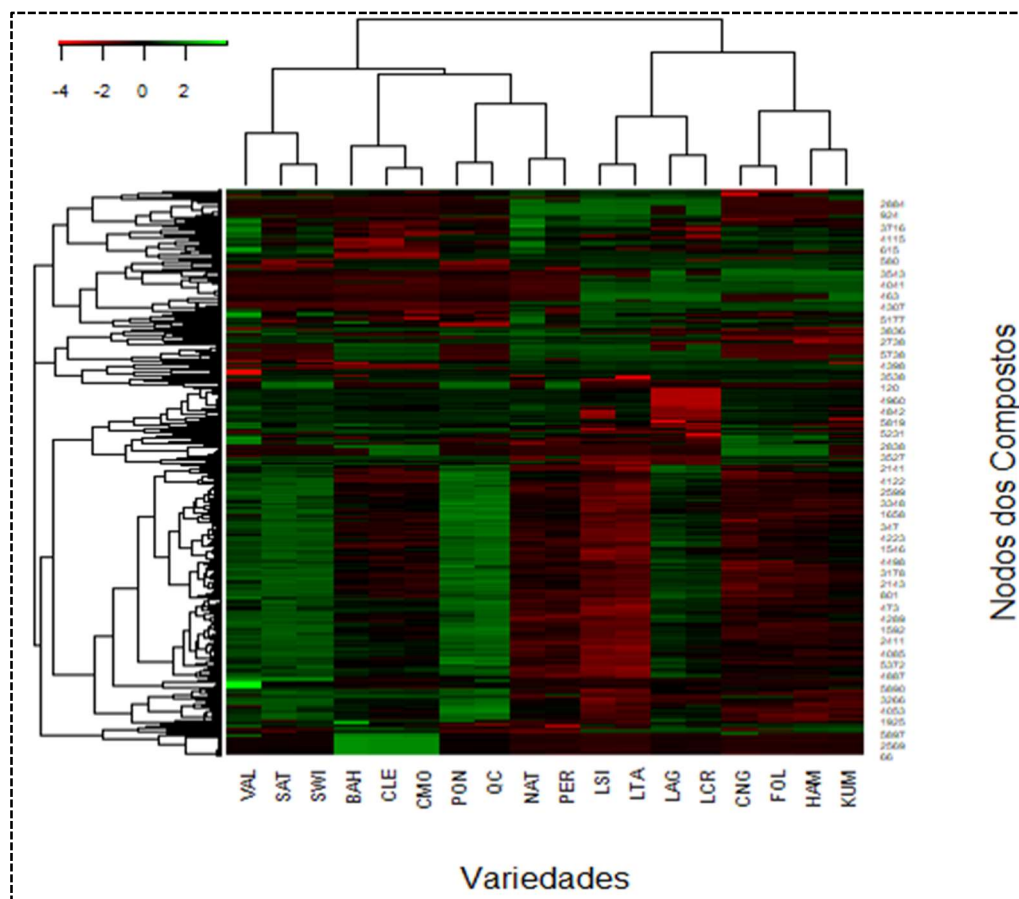


Figura 15. *Heatmap* apresentando a frequência de cada composto em cada uma das variedades de *Citrus*. Os dados representam a abundância e presença de cada composto, detectado a partir da análise por UHPL-HRMS dos extratos foliares. A direita estão representados os nodos da rede de moléculas em que cada composto está localizado. Abaixo, encontram-se as abreviações de cada variedade seguindo a tabela fornecida em materiais e métodos. A esquerda, no topo da imagem, encontra-se a legenda do padrão de coloração (vermelho= pouco abundante/ausente; verde= abundante). A análise hierárquica de *clusters* fornecida no pacote *heatmap3* foi construída com base no método de Spearman.

Através do *script* de obtenção do *Heatmap*, foi possível extrair os dados da Análise Hierárquica de *Cluster* (HCA) separadamente. O HCA (Figura 16), baseado no método de Spearman, refletiu melhor as relações entre a composição química das variedades obtidas, em função dos compostos identificados.

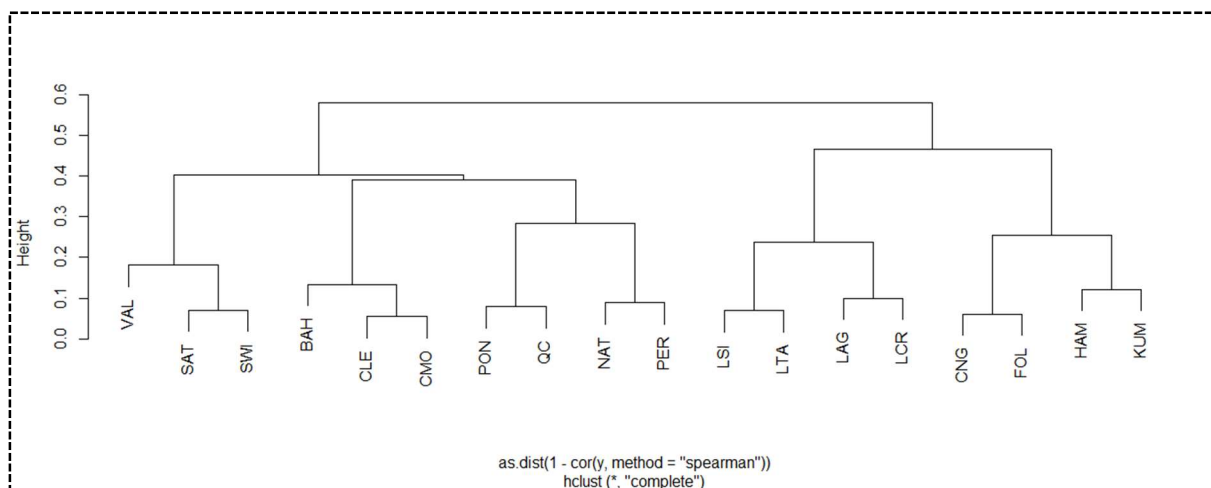


Figura 16. Análise Hierárquica de *Cluster* obtida das dezessete variedades de *Citrus* estudadas. O HCA foi construído através do programa R Studio, baseado no *script* conjunto do *Heatmap*, e utilizando o método de Spearman.

O HCA refletiu dois *clusters* principais. O primeiro *cluster* reuniu variedades de *Citrus reticulata* (SAT, PON), *Citrus clementina* (CLE), os híbridos. (CMO, CNG, SWI) e *Citrus sinensis* (PER, VAL, BAH, NAT, FOL).

O segundo *cluster*, por sua vez, reuniu as espécies das variedades de limas, *Citrus aurantifolia* (LAG, LTA), e limões- *Citrus limon* (LCR, LSI), bem como *Citrus japonica* (KUM) e a variedade HAM de *Citrus sinensis*.

Embora consideradas espécies resistentes ao cancro cítrico, as variedades SAT e PON, de *C. reticulata*, foram distribuídas separadamente da variedade Kumquat, também resistente e que apresentou composição química mais relacionada a variedade Hamlin.

Importante ressaltar que as três variedades resistentes apresentaram ser mais relacionadas com alguma, dentro das variedades de *Citrus sinensis* consideradas no trabalho, do que em relação às variedades de *C. limon* e *C. aurantifolia*, e que se encontram com composição química de maior compatibilidade.

Os dados de composição química até o momento determinados, refletem novamente a filogenia e a confirma. Os dados de PCA, OPLSA-DA e HCA corroboram a proximidade de *Citrus sinensis*, *Citrus reticulata* e *Citrus clementina* vistas por Luro

et al. (2017) e *WU et al.* (2018), tendo em vista sua provável origem durante os possíveis cruzamentos e retrocruzamentos no início da dispersão dos citros. Além de confirmarem que, quimicamente, as espécies de limas e limões, também são mais similares, como já apontado em estudos genéticos por *Curk et al.* (2016).

4.7 Integração de metadados na rede de moléculas para identificação de marcadores químicos

Para destacar marcadores químicos específicos, os resultados das análises multivariadas (MVA) e dos valores relacionados à resistência constitutiva (RC) à *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*Xcc*) foram combinados em uma única rede multi-informativa.

A rede de moléculas é uma ferramenta que auxilia na interpretação e visualização dos dados químicos obtidos por MS, facilitando a identificação de compostos relevantes, quimiomarcadores e potenciais medicamentos, dentro do grande volume de moléculas obtidas pela metabolômica não direcionada (NOTHIAS *et al.*, 2020; QUINN *et al.*, 2017).

Ademais, após a rede ter sido gerada, ela pode ser enriquecida com múltiplos dados de entrada, análises multivariadas, análises de micronutrientes do solo, análises de resistência à patógenos, análises de DNA, RNA, que integralizados na rede permitem uma melhor compreensão dos resultados obtidos e que podem ser explorados a partir de sua visualização na ampliação dos nodos da rede (QUINN *et al.*, 2017).

Neste estudo, a rede de moléculas foi utilizada em quatro instâncias: i) para organizar o conjunto de dados espectrais, obtidos através da metabolômica não direcionada e agrupar as famílias de compostos detectados nos extratos foliares das variedades cítricas; ii) para adicionar a anotação dos compostos seguindo estratégia

computacional *in silico* aliada à ponderação taxonômica, possibilitando a identificação dos nodos na rede; iii) para integração dos resultados das análises multivariadas, OPLS, e destacar compostos com alto valor de importância, a partir do VIP; iv) para integração dos valores obtidos da resistência constitutiva à *Xcc* em cada variedade.

Para melhor compreensão do conjunto de dados integrados na rede, inicialmente cada rede de moléculas obtida foi exportada, de modo a representar os dados integrados em cada uma das etapas e refletidos nos tamanhos dos respectivos nodos (Figura 17).

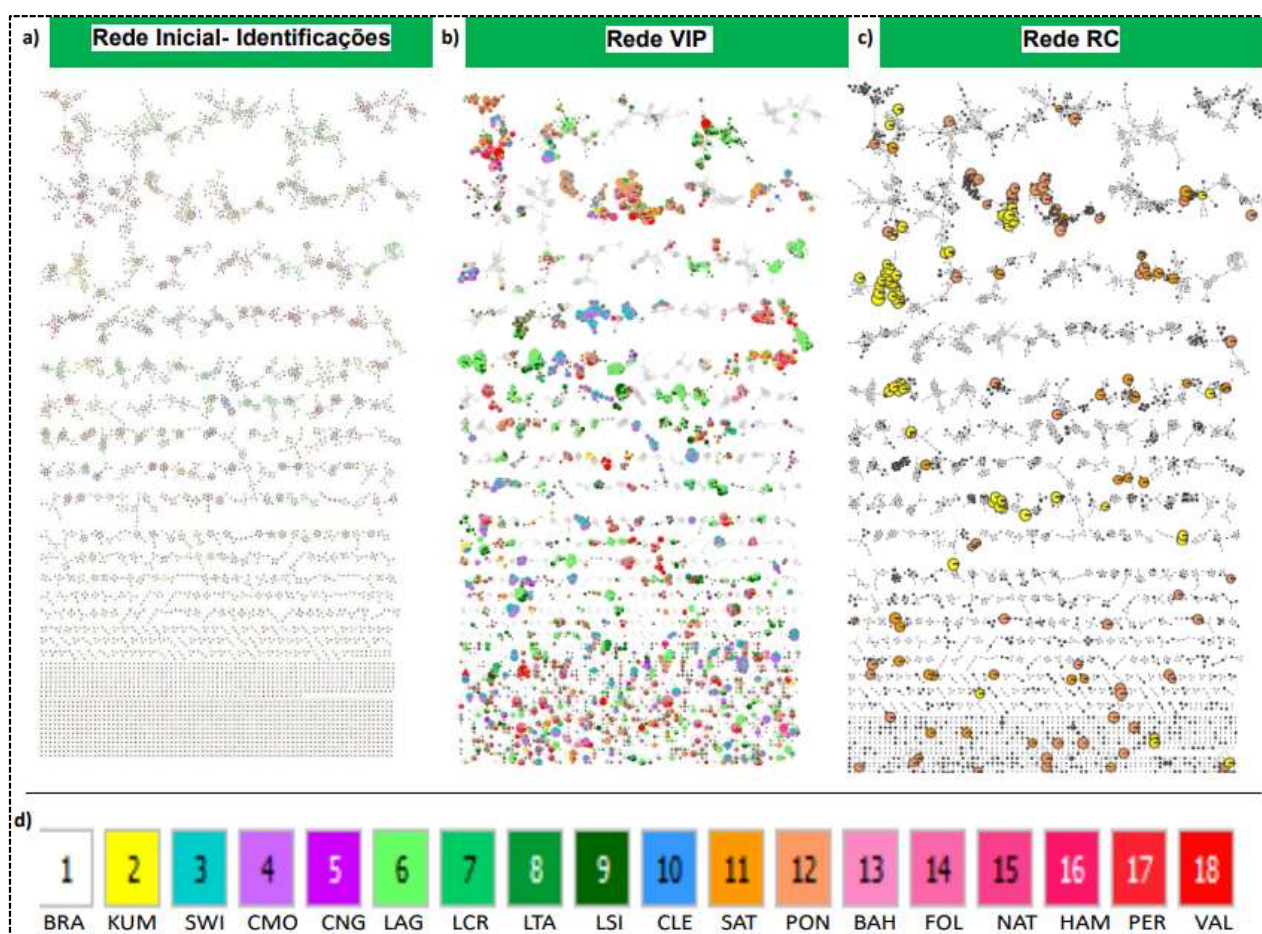


Figura 17. Redes de moléculas individuais dos *features* detectados na análise do extrato foliar de *Citrus*, por UHPLC-HRMS. **a) Rede inicial- identificações.** Rede de moléculas inicialmente gerada após a anotação computacional *in silico*, baseado no ISDB-DNP. **b) Rede VIP.** Rede de moléculas contendo o valor de importância (VIP), obtido através da análise multivariada OPLS-DA. **c) Rede RC.** Rede relacionada a Resistência Constitutiva a *Xcc*, obtida a partir do cálculo da abundância dos íons nas variedades resistentes e suscetíveis. Em cada uma das redes, os valores são apresentados nos tamanhos dos seus respectivos nodos, enquanto a coloração dos nodos é determinada pelas variedades de cada uma das espécies **d)**, variedades da mesma espécie apresentam tonalidades diferentes da mesma cor.

A MN inicial (Figura 17-a), permitiu obter uma visão global dos *features* identificados em cada variedade. Esta rede apresenta todos os nodos (5975) com seus respectivos tamanhos originais, refletindo apenas na coloração, os compostos identificados em cada variedade.

As redes posteriores (17-b e 17-c), cujos dados de análises estatísticas e resistência foram integrados, refletem os tamanhos dos nodos a partir de valores pré-estabelecidos. A rede VIP (Figura 17-b) fornece os valores de importância obtidos nas análises por OPLS-DA para cada *feature*. Deste modo, 2633 *features*, com VIP >1 foram visualizados na rede, e os demais, mantidos em seus tamanhos originais.

A rede RC (resistência constitutiva- Figura 17-c), seguindo o mesmo padrão para identificação de marcadores químicos, foi construída a partir dos valores de abundância dos íons das variedades consideradas potencialmente resistentes (*Citrus japonica* e *Citrus reticulata*) e suscetíveis, seguindo a metodologia já descrita. Os valores de RC foram convertidos em Log2, e todos os *features* com valores de RC > 0,225 foram ampliados na rede, totalizando 1631 nodos.

Para detectar marcadores químicos que poderiam estar relacionados à resistência constitutiva, uma análise minuciosa foi realizada na rede RC. Observamos os nodos com compostos identificados, que haviam sido destacados na rede por apresentarem os valores de RC > 0,225 e aliamos a análise do VIP, fornecida pela OPLS-DA.

A rede RC permitiu observar a discrepância na presença de alguns compostos nas variedades potencialmente resistentes, possibilitando a elevação desses compostos ao nível de possíveis marcadores químicos.

A rede apresentou em sua maioria, nodos ressaltados pertencentes às variedades KUM (*C. japonica*), PON e SAT (*C. reticulata*), variedades já classificadas

como potencialmente resistentes, mas que não possuíam dados vinculando a resistência a química foliar.

A partir da averiguação dos dados, foi possível obter 12 marcadores químicos possivelmente relacionados a maior resistência à *Xcc* por apresentarem-se mais abundantes nas variedades consideradas resistentes - Satsuma, Ponkan e Kumquat, do que nas suscetíveis.

Dos 12 biomarcadores detectados, sete foram para a variedade PON (Ponkan- *Citrus reticulata*), um para a variedade SAT (Satsuma- *Citrus reticulata*) três para a variedade KUM (Kumquat- *Citrus japonica*) além de um composto comum para as variedades KUM e SAT (Tabela 03). O compartilhamento de apenas um composto, demonstra a diversidade de substâncias relacionadas a resistência.

Dentre os marcadores de resistência, sete pertencem à classe dos flavonoides (I, II, IV, VII, IX, XI e XII), um à ácido fenólico (V), um à piridina (VI), um à ácido cinâmico (VIII) e um prenol lipídio/terpeno (X).

Com base nos valores de RC e VIP, foi possível identificar compostos como potenciais marcadores químicos de maneira sistemática utilizando a rede de moléculas (Figura 18).

Tabela 03. Dados cromatográficos e espectrométricos dos marcadores químicos selecionados na rede de moléculas potencialmente relacionados à resistência constitutiva a *Xanthomonas citri* subs. *citri* em variedades de *Citrus*, obtidos por HPLC-HRMS em modo positivo. A anotação dos compostos foi obtida pelo ISDB-DNP. A chave parcial InChiKey (Internacional Chemical Identifier) é fornecida.

Nº	<i>m/z</i>	<i>RT</i> (min)	Classe	Fórmula Molecular (ISDB- DNP)	Anotação dos compostos (ISDB-DNP) Nome do Produto Natural	IK_DNP (parcial)	Variedade
I	377.1229	1.9683	FL	C ₁₉ H ₂₀ O ₈	5,3'-dihidroxi-6,7,8,4'- tetrametoxiflavona	WBTIDXJSMUSRJQ	PON
II	315.0866	2.6518	FL	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	Isoscutelareina 7,8-dimetil éter	FTFPXINQVCVDEY	PON
III	315.1278	2.6246	-	C ₁₁ H ₂₂ O ₁₀	4-O- (beta-D-glucopiranosil) -D- ribitol	LKUUMZAPLBFPMK	PON
IV	757.2548	1.4410	FL	C ₃₄ H ₄₄ O ₁₉	Hesperetina 7- (2,6- diramnosilglucosídeo)	LMWHBZYEUQWDBE	KUM
V	517.1335	1.4252	AF	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	Ácido 1,4-Dicafeoilquínico	IYXQRCXQQWUFQV	PON
VI	148.1116	0.5485	PI	C ₂₀ H ₁₃ N	4,7-Dimetil-6,7-dihidro-5H-2- pirindina	ZHQQRUIUYLMXDPP	KUM; SAT
VII	271.0602	1.9471	FL	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	5,7,3'-trihidroxiflavona	BEXPKGWBRBLIIC	PON
VIII	296.1658	2.8100	CI	C ₁₉ H ₂₁ NO ₂	Herclavina	VANLAWLPWTVXIB	SAT
IX	579.1702	1.1826	FL	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	Apigenina 7-O-neohesperidosídeo	RPMNUQRUHXIGHK	KUM
X	219.1745	2.6349	LP/TE	C ₁₅ H ₂₂ O	3,7 (11) -Eudesmadien-2-ona	SVQMAXHCMOZBSF	KUM
XI	435.1280	2.1727	FL	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₀	Digicitrina	GIEYELPGDHOPHM	PON
XII	299.0549	1.9519	FL	C ₁₆ H ₁₀ O ₆	2- (1,3-Benzodioxol-5-il) -5,7-di- hidroxi-4H-1-benzopiran-4-ona	LHUUGUDSYBWEPEF	PON

CM = cumarinas e derivados; **FL**= flavonoides; **AF** = ácido fenólico; **PI**= piridinas e derivados; **CI**= ácido cinâmico e derivados; **LP/TE**= prenol lipídios/ terpenos.

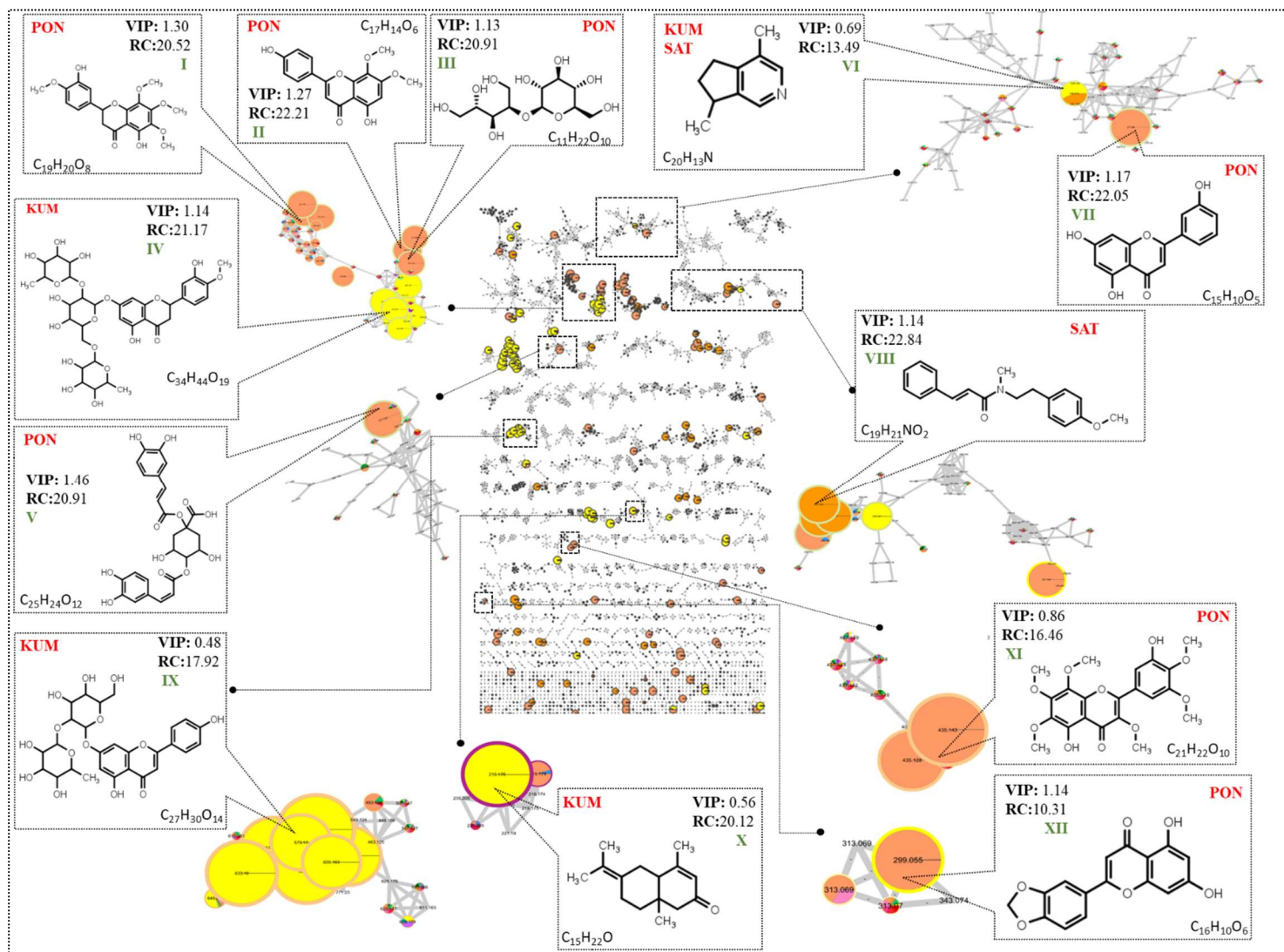


Figura 18. Clusters selecionados através da rede de moléculas relacionada à resistência constitutiva a *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. Os valores de RC foram integrados na rede, de modo que nodos destacados representam valores de RC acima de 0,225. Amarelo, laranja claro e laranja escuro indicam as variedades de *Citrus* Kumquat (KUM), Ponkan (PON) e Satsuma (SAT), respectivamente. As caixas em destaque apresentam as variedades, valores de VIP e RC, obtidos nas análises estatísticas, além da fórmula molecular e a estrutura química do composto.

Os biomarcadores **I**, **VII** e **XI** são polimetoxiflavonas (PMFs) encontradas em PON e SAT, ambas variedades de *Citrus reticulata*. Não foram detectados PMFs em *Citrus japonica*, em concordância com estudos de Peng *et al.* (2021), que ressalta a inexistência desses compostos ao analisar o germoplasma de *Citrus*.

O composto **IV**, foi identificado como Hesperetina 7- (2,6-diramnosilglucosídeo), também encontrado como 5,7,3'-Trihidroxi-4'-metoxiflavanona 7- (2,6-diramnosilglucosídeo).

A busca pelo composto não retornou resultados condizentes com outras espécies cítricas. No entanto, a Hesperetina é um composto comumente encontrado em *Citrus*, e um similar (3,5,7-trihidroxiflavanona 7-ramnoglucosídeo) foi encontrado em *Citrus sinensis* e *Citrus reticulata*, tendo maior abundância em *C. reticulata*, considerada resistente (PETERSON *et al.*, 2006).

O composto **IX**, foi identificado como sendo a Apigenina-7-O-neohesperidosídeo, biomarcador de *Citrus japonica*. O composto também foi identificado na variedade Kumquat em estudo de perfil químico e atividade antioxidante por Lou *et al.* (2016).

A identificação de flavonoides como quimiomarcadores potencialmente relacionados à resistência, está de acordo com o desempenhado pelos flavonoides como umas das principais classes de metabólitos envolvida na defesa das plantas.

Os flavonoides são formados a partir da via dos fenilpropanoides pela transformação da fenilalanina. Devido a ação de diferentes transferases, a estrutura do flavonoide passa por alterações que modificam também seus alvos celulares. Isso implica, diretamente, nas inúmeras ações biológicas da classe, que incluem fotoproteção, reprodução, regulação, comunicação e proteção contra herbívoros e

patógenos (uma revisão completa é fornecida em Falcone-Ferreyra, Rius, Casati; 2012).

Devido a imobilidade dos vegetais, a produção de substâncias que as tornem resistentes é um dos mecanismos que possibilita sua sobrevivência no ambiente, e os flavonoides estão altamente envolvidos no processo. Segundo Treutter (2006), flavonoides podem ser “pré-formados” ou “induzidos”, sendo que os pré-formados fazem parte da imunidade inata do vegetal (resistência constitutiva) e, mesmo os induzidos, podem já ser compostos da imunidade inata, porém, aumentam a sua produção durante o ataque (TREUTTER, 2006).

Ainda segundo Treutter (2006), esses flavonoides “pré-formados” atuam na relação planta-patógeno de modo a agirem como sinalizadores da infecção ou diretamente na defesa, podendo caracterizar a resistência de espécies, como no caso da resistência da banana (COLLINGBORN *et al.*, 2000), ou da doença da murcha (BECKMAN, 2000), ou ainda na germinação de esporos de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. O autor ainda considera aumentar a produção de flavonoides “pré-formados” como forma de ampliar a resistência.

Os flavonoides também podem ser considerados fitoantecipinas (compostos de defesa produzidos constitutivamente), e há relatos da ação de epicatequinas e isoflavonas como aliados antimicrobianos (DAO; LINTHORST; VERPOORTE, 2011), além de flavonoides como fator de resistência de planta de feijão a pulgões (LATTANZIO *et al.*, 2000).

A anotação de polimetoxiflavonas como quimiomarcadores obtém também amparo de alguns estudos que inconcluem os flavonoides metoxilados, como alguns dos marcadores químicos anotados e com ação antimicrobiana (WIDMER; MONTANARI, 1995).

Como ressaltado, nenhum estudo até o momento havia relacionado a composição química das folhas com a resistência à *Xcc* em espécies de *Citrus reticulata* e *Citrus japonica*. No entanto, os resultados indicam a presença de flavonoides como possíveis aliados à resistência.

Outros estudos, porém, embora não tenham buscado quimiomarcadores, avaliaram modificações nas rotas biossintéticas e alterações nas produções de metabólitos após indução do patógeno, revelando alterações em algumas vias importantes do metabolismo especializado, como a dos fenilpropanoides, em relação a invasão, além de elucidar a relação de flavonoides e alguns fitohormônios na resistência.

Giraldo-González *et al.* (2021), demonstraram em seus estudos com a variedade Kumquat, que genes relacionados ao reconhecimento de patógenos, reforço de parede celular e síntese e efluxo de metabólitos especializados, com ênfase na rota biossintética dos fenilpropanoides, foram superregulados no início da infecção por *Xcc*. Os autores ainda ressaltam que os flavonoides, cumarinas, ácidos fenólicos podem desempenhar papel importante na defesa da variedade.

Em um estudo sobre a resistência induzida por uma variedade de *Xcc* em *Citrus limon*, Roeschlin *et al.* (2017) demonstraram que a resistência da espécie envolveu uma reprogramação da transcrição, além de reforço da parede celular e acúmulo de ácido salicílico (SA) e compostos fenólicos, principalmente flavonoides, que, em conjunto ao SA, regulam mecanismos de autofagia controlando a infecção. Os genes relacionados à biossíntese de flavonoides também foram superregulados, bem como do ácido salicílico, e análises histológicas confirmaram o acúmulo de flavonoides em resposta à infecção.

Os incrementos na via do ácido salicílico nas respostas à resistência são importantes, visto que o composto é reconhecido como eliciador de metabólitos especializados, principalmente da via dos fenilpropanoides, como os flavonoides, embora não tenha sido encontrado estudos diretos sobre a ação de ácido salicílico na biossíntese de flavonoides em *Citrus*.

Ainda que não tenha sido testado em *X.citri*, Johann (2003) demonstrou que as flavonas 6,7,8,4'-pentametoxi-flavona e 5,6,7,8,3',4'-hexametoxi-flavona, isoladas de *Citrus reticulata*, possuem atividade inibitória contra bactérias patogênicas, o que permite sugerir o mesmo papel endógeno na planta.

Isoflavonas também desencadearam a nodulação e a defesa da planta da soja contra *Xanthomonas axonopodis* pv *glycina*, em situação anterior ao desafio do patógeno e durante o ataque (ALGAR *et al.*, 2014).

Xanthomonas axonopodis é um sinônimo de *Xcc*, sendo que as espécies de *Xanthomonas* podem infectar uma ampla variedade de plantas, embora cada hospedeiro tenha uma espécie individual associada e responsável pela infecção, mesmo apresentando sintomas parecidos (FARIA, 2020).

Os resultados do trabalho, determinados através de redes de moléculas e dados estatísticos, permitiu a elaboração de um mapa químico dos compostos presentes nas folhas das 17 variedades de *Citrus* utilizadas no estudo, possibilitando a anotação de potenciais compostos relacionados a resistência constitutiva a bactéria patogênica *Xanthomonas citri* subsp *citri* (*Xcc*).

O estudo não estabeleceu limitações às substâncias, uma vez que se baseou em metabolômica não-alvo, ampliando assim o rol de compostos anotados, um contraponto aos estudos que partem da metabolômica direcionada. Buscou-se também explorar diversas variedades para estabelecer sua composição foliar, dando

primazia aos estudos deste órgão vegetal, realizando assim um segundo contraponto com os estudos atuais focados nos frutos, cujos compostos puderam parcialmente serem visualizados na tabela 02.

O confronto dos dados, permitiu a visualização das substâncias presentes nas amostras das dezessete variedades cítricas, evidenciando as relações entre estruturas químicas e as variedades estudadas, que, atrelado a significância estatística, para tais relações, permitiu a identificação de marcadores químicos potencialmente relacionados à resistência contra *Xcc*.

5 CONCLUSÃO

Com o alto valor agregado nas plantas cítricas brasileiras, entender a química foliar em busca de alterações metabólicas passíveis de fornecerem resistência ao ataque de patógenos, pode ajudar na seleção de variedades resistentes reduzindo o impacto do ataque na produção, rentabilidade e uso de agroquímicos.

Neste trabalho, buscou-se anotar marcadores químicos que pudessem estar atrelados a resistência constitutiva a *Xcc* a partir de metabolômica não direcionada, rede de moléculas e análises estatísticas.

A partir da integralização dos dados obtidos, foi possível concluir que o metabolismo especializado das variedades de *Citrus* estão atrelados a resistência constitutiva a bactérias patogênicas, como a *Xcc*, e a identificar doze biomarcadores que podem estar relacionados à resistência constitutiva em duas espécies, *Citrus reticulata* e suas variedades Ponkan e Satsuma; e *Citrus japonica* e sua variedade Kumquat, sendo majoritariamente da classe dos flavonoides.

Tais resultados abrem novas ferramentas no controle de patógenos ao possibilitar:

- i) novos estudos de desenvolvimento de produtos naturais para o controle do Cancro cítrico;
- ii) a seleção de variedades mais resistentes, conduzidas pelo biomarcador;
- iii) ou o desenvolvimento de eliciadores da via de flavonoides para aumentar a produção de compostos relacionados à resistência, tendo em vista que os biomarcadores foram determinados por apresentarem-se mais abundantes nas variedades consideradas resistentes do que nas suscetíveis.

REFERÊNCIAS

- ABAD-GARCÍA, B. *et al.* A general analytical strategy for the characterization of phenolic compounds in fruit juices by high-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray ionization and triple quadrupole mass spectrometry. **Journal of Chromatography**, v. 1216, n. 28, p. 5398-5415, 2009.
- ABAD-GARCÍA, B. *et al.* Polyphenolic contents in Citrus fruit juices: Authenticity assessment. **European Food Research and Technology**, v. 238, n. 5, p. 803-818, 2014.
- AFEK, U. *et al.* Umbelliferone, a phytoalexin associated with resistance of immature Marsh grapefruit to *Penicillium digitatum*. **Phytochemistry**, v. 50, n. 7, p. 1129-1132, 1999.
- ALGAR, E. *et al.* The role of isoflavone metabolism in plant protection depends on the rhizobacterial MAMP that triggers systemic resistance against *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* in *Glycine max* (L.) Merr. cv. Osumi. **Plant physiology and biochemistry**, v. 82, p. 9-16, 2014.
- ALLARD, P.M. *et al.* Integration of molecular networking and In-Silico MS/MS fragmentation for natural products dereplication. **Analytical Chemistry**, v. 88, n. 6, p. 3317-3323, 2016.
- AMORIM, J.L. *et al.* Anti-inflammatory properties and chemical characterization of the essential oils of four citrus species. **PLoS one**, v. 11, n. 4, p. e0153643, 2016.
- ASJAD, H.M.M. *et al.* Phenol, flavonoid contents and antioxidant activity of six common citrus plants in Pakistan. **Journal of Pharmaceutical and Cosmetic Sciences**, v. 1, n. 1, p. 1-5, 2013.
- BADAWY, M.E.I.; TAKTAK, N.E.M.; EL-ASWAD, A. F. Chemical composition of the essential oils isolated from peel of three citrus species and their mosquitocidal activity against *Culex pipiens*. **Natural product research**, v. 32, n. 23, p. 2829-2834, 2018.
- BALLISTRERI, G. *et al.* **Antocianinas e outros polifenóis no gênero cítrico: biossíntese, perfil químico e atividade biológica.** In: Polifenóis em plantas. Academic Press, 2019. p. 191-215.
- BARRECA, D. *et al.* Flavonoid profile and radical-scavenging activity of Mediterranean sweet lemon (*Citrus limetta* Risso) juice. **Food Chemistry**, v. 129, n. 2, p. 417-422, 2011.
- BARRETT, H. C.; RHODES, A. M. A numerical taxonomic study of affinity relationships in cultivated *Citrus* and its close relatives. **Systematic Botany**, p. 105-136, 1976.
- BECKMAN, C. H. Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants?. **Physiological and molecular plant pathology**, v. 57, n. 3, p. 101-110, 2000.

BOURGAUD, F. *et al.* Biosynthesis of coumarins in plants: a major pathway still to be unravelled for cytochrome P450 enzymes. **Phytochemistry Reviews**, v. 5, p. 293–308, 2006.

BRITO, A. *et al.* HPLC-UV-MS profiles of phenolic compounds and antioxidant activity of fruits from three citrus species consumed in Northern Chile. **Molecules**, v. 19, n. 11, p. 17400-17421, 2014.

BRUNETTI, C. *et al.* Metabolomics in plant environmental physiology. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, n. 13, p. 4011-4020, 2013.

CITRUSBR, 2020. **Associação Nacional dos exportadores de sucos cítricos**. Disponível em: www.citrusbr.com. Acesso em 05 de jan. 2021.

COLLINGBORN *et al.* Investigations into the biochemical basis for nematode resistance in roots of three musa cultivars in response to *Radopholus similis* infection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 11, p. 5297-5301, 2000.

CURK, F. *et al.* Phylogenetic origin of limes and lemons revealed by cytoplasmic and nuclear markers. **Annals of botany**, v. 117, n. 4, p. 565-583, 2016.

DAO; LINTHORST; VERPOORTE. Chalcone synthase and its functions in plant resistance. **Phytochemistry Reviews**, v. 10, n. 3, p. 397-412, 2011.

DJOUMBOU F.Y. *et al.* ClassyFire: Classificação química automatizada com uma taxonomia computável abrangente. **Journal of Cheminformatics**, v.8, n. 61, 2016.

DOSOKY, N.S.; SETZER, W.N. Biological activities and safety of *Citrus* spp. essential oils. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 7, p. 1966, 2018.

DE CARVALHO, S.A. *et al.* Comparison of resistance to asiatic citrus canker among different genotypes of citrus in a long-term canker-resistance field screening experiment in Brazil. **Plant Disease**, v. 99, n. 2, p. 207-218, 2015.

DUGRAND-JUDEK, A. *et al.* The distribution of coumarins and furanocoumarins in *Citrus* species closely matches *Citrus* phylogeny and reflects the organization of biosynthetic pathways. **PLOS one**, v. 10, n. 11, p. e0142757, 2015.

EL-AKHAL, F. *et al.* Larvicidal activity of essential oils of *Citrus sinensis* and *Citrus aurantium* (Rutaceae) cultivated in Morocco against the malaria vector *Anopheles labranchiae* (Diptera: Culicidae). **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 5, n. 6, p. 458-462, 2015.

FALCONE-FERREYRA, M. L; RIUS, S.; CASATI, P. Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. **Frontiers in plant science**, v. 3, p. 222, 2012.

FARIA, A.R.G. **Análise comparativa e funcional do genoma de *Xanthomonas citri* pv. *viticola*: aplicação sobre virulência, patogenicidade e posicionamento taxonômico**. p.174. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Pernambuco, Recife (PE), 2020.

FATURI, C. B. *et al.* Anxiolytic-like effect of sweet orange aroma in Wistar rats. **Progress in NeuroPsychopharmacology and Biological Psychiatry**, v.34, n.4, p.605-609, 2010.

FERRASA, A. *et al.* CitrusKB: a comprehensive knowledge base for transcriptome and interactome of *Citrus* spp. infected by *Xanthomonas citri* subsp. *citri* at different infection stages. **Database (Oxford)**. 2020. doi: 10.1093/database/baaa081. PMID: 33181825.

FOX RAMOS, A.E *et al.* Natural products targeting strategies involving molecular networking: different manners, one goal. **Natural product reports**, v. 36, n. 7, p. 960-980, 2019.

FUNDECITRUS, 2021. Fundo de defesa da citricultura. Disponível em: <https://www.fundecitrus.com.br/>. Acesso em 28 de abril.2021.

FUNDECITRUS, 2021. Fundo de defesa da citricultura. **Cancro cítrico**. Disponível em : <https://www.fundecitrus.com.br/doencas/cancro> . Acesso em 28 de abril. 2021. Fotografia color, 789x523 px.

FUNDECITRUS, 2022. Fundo de defesa da citricultura. **Estimativa da Safra de Laranja Parque Citrícola de São Paulo e Triângulo/ Sudoeste Mineiro**. Disponível em <https://www.fundecitrus.com.br/pes/estimativa>. Acesso em 18 de abril de 2022.

FUNARI, C. S.; *et al.* Metabolômica, uma abordagem otimizada para exploração da biodiversidade brasileira: estado da arte, perspectivas e desafios, **Química Nova**, v. 36, n. 10, p.1605-1609,2013.

GALINDO-PRIETO, B.; ERIKSSON, L.; TRYGG, J. Variable influence on projection (VIP) for orthogonal projections to latent structures (OPLS). **Journal of Chemometrics**, v. 28, n. 8, p. 623-632, 2014.

GALINDO-PRIETO, B.; TRYGG, J.; GELADI, P. A new approach for variable influence on projection (VIP) in O2PLS models. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 160, p. 110-124, 2017.

GALVÃO, J. G. *et al.* β -cyclodextrin inclusion complexes containing *Citrus sinensis* (L.) Osbeck essential oil: An alternative to control *Aedes aegypti* larvae. **Thermochimica Acta**, v. 608, p. 14-19,2015.

GIRALDO-GONZÁLEZ, J.J. *et al.* Transcriptional changes involved in kumquat (*Fortunella* spp) defense response to *Xanthomonas citri* subsp. *citri* in early stages of infection. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 116, p. 101729, 2021.

GOES, T.C. *et al.* Effect of sweet orange aroma on experimental anxiety in humans. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 18, n. 8, p. 798-804, 2012.

GONZÁLEZ-MAS *et al.* Volatile compounds in *Citrus* essential oils: A comprehensive review. **Frontiers in Plant Science**, v.10, 2019.

- GOODY, J. The culture of flowers. **Cambridge University Press**, Cambridge, 1993.
- GOTTWALD, T. R.; GRAHAM, J.H.; Schubert, T.S. Citrus Canker: The pathogen and its impact. **Plant Health Progress**, 2002. doi:10.1094/PHP-2002-0812-01-RV. <http://www.plantmanagementnet.org/pub/php/review/citruscanker/>
- GRAHAM, J.H. *et al.* *Xanthomonas axonopodis* pv.*citri*: factors affecting successful eradication of citrus canker. **Molecular Plant Pathology**, v.5, n. 1, p. 1-15, 2004.
- HARBORNE, J.B. **Chemicals from plants: Classes and functions of secondary products from plants.** Imperial College Press. Londres, v. 26, p. 1-25, 1999.
- HENKE, M.T.; KELLEHER, N. L. Modern mass spectrometry for synthetic biology and structure-based discovery of natural products. **Natural Product Reports**, v. 33, n. 8, p. 942-950, 2016.
- HERNÁNDEZ-AQUINO, E.; MURIEL, P. Beneficial effects of naringenin in liver diseases: Molecular mechanisms. **World journal of gastroenterology**, v. 24, n. 16, p. 1679, 2018.
- HOMBURGER, F.; TREGGER, A.; BOGER, E. Inhibition of murine subcutaneous and intravenous benzo (rst) pentaphene carcinogenesis by sweet orange oils and d-limonene. **Oncology**, v. 25, n. 1, p. 1-10, 1971.
- HORTIFRUTI BRASIL, 2020. **Anuário 2020/2021- Retrospectiva 2020 e Perspectiva 2021.** ISSN 1981-183, Cepea, ESALQ/USP, Piracicaba, São Paulo, Brasil. Disponível em < <https://www.hfbrasil.org.br/br/revista/retrospectiva-2020-perspectivas-2021.aspx>> Acesso em 06 de jan. 2021.
- HUBER, F. *et al.* Spec2Vec: Improved mass spectral similarity scoring through learning of structural relationships. **PLoS computational biology**, v. 17, n. 2, p. e1008724, 2021.
- JOHANN, S. **Atividade antimicrobiana de flavonoides polimetoxilados isolados de frutos cítricos.**p.97.Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis (SC),2003.
- JONES, J. D.G; DANGL, J. L. The plant immune system. **Nature**, v. 444, n. 7117, p. 323-329, 2006.
- KAEFER, C.L. *et al.* Development and validation of a HPLC-PDA method and preliminary stability study of synephrine in *Citrus aurantium* L. dry extract. **Química Nova**, v. 38, n. 5, p. 709-714, 2015.
- KLIMEK-SZCZYKUTOWICZ, M.; SZOPA, A.; EKIERT, H. *Citrus limon* (Lemon) Phenomenon—A Review of the Chemistry, Pharmacological Properties, Applications in the Modern Pharmaceutical, Food, and Cosmetics Industries, and Biotechnological Studies. **Plants**, v. 9, n. 1, p. 119, 2020.

KRÖNER, A. *et al.* Nicotiflorin, rutin and chlorogenic acid: phenylpropanoids involved differently in quantitative resistance of potato tubers to biotrophic and necrotrophic pathogens. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 57, p. 23-31, 2012.

KUMMER, R. *et al.* Evaluation of anti-inflammatory activity of *Citrus latifolia* Tanaka essential oil and limonene in experimental mouse models. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 2013.

LADANIYA, M. S. Fruit morphology, anatomy, and physiology, In: **Citrus Fruit: Biology, Technology and Evaluation**. Academic Press, San Diego, p. 13-65, 2008.

LATTANZIO, V. *et al.* Role of endogenous flavonoids in resistance mechanism of *Vigna* to aphids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 11, p. 5316-5320, 2000.

LEHRNER, J. *et al.* Ambient odor of orange in a dental office reduces anxiety and improves mood in female patients. **Physiology & behavior**, v. 71, n. 1-2, p. 83-86, 2000.

LI, C.; SCHLUESENER, H. Health-promoting effects of the citrus flavanone hesperidin. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 57, n. 3, p. 613-631, 2017.

LI, S.; LO, C.; HO, C. Hydroxylated polymethoxyflavones and methylated flavonoids in sweet orange (*Citrus sinensis*) peel. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 54, n. 12, p. 4176-4185, 2006.

LIU, Na. *et al.* A review of chemical constituents and health-promoting effects of citrus peels. **Food Chemistry**, p. 130585, 2021.

LOU, S.N. *et al.* Phenolic content, antioxidant activity and effective compounds of kumquat extracted by different solvents. **Food Chemistry**, v.197, 2016.

LURO, F. *et al.* **Recent insights on Citrus diversity and phylogeny. Agrumed. Archaeology and history of citrus fruit in the Mediterranean**: acclimatization, diversifications, uses. Publications du Centre Jean Bérard, Naples, p. 16-28, 2017. Available on the Internet: <<http://books.openedition.org/pcjb/2169>>. ISBN: 9782918887775. DOI: 10.4000/books.pcjb.2169.

LV, X., *et al.* Citrus fruits as a treasure trove of active natural metabolites that potentially provide benefits for human health. **Chemistry Central Journal**, v.9, n.68, 2015.

LV, Yun-Xia *et al.* Effect of orange peel essential oil on oxidative stress in AOM animals. **International journal of biological macromolecules**, v. 50, n. 4, p. 1144-1150, 2012.

MABBERLEY, D. J. *Citrus* (Rutaceae): a review of recent advances in etymology, systematics and medical applications. **Blumea-Biodiversity, Evolution and Biogeography of Plants**, v. 49, n. 2-3, p. 481-498, 2004.

MAHATO, N. *et al.* Citrus waste derived nutra-/pharmaceuticals for health benefits: Current trends and future perspectives. **Journal of Functional Foods**, v. 40, p. 307-316, 2018.

MAHMOUD, A.M. *et al.* Beneficial effects of citrus flavonoids on cardiovascular and metabolic health. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2019, 2019.

MAHMOUD, AM. *et al.* Hesperidin protects against chemically induced hepatocarcinogenesis via modulation of Nrf2/ARE/HO-1, PPAR γ and TGF- β 1/Smad3 signaling, and amelioration of oxidative stress and inflammation. **Chemico-Biological Interactions**, v. 277, p. 146-158, 2017.

MAHMOUD, A.M. Hesperidin protects against cyclophosphamide-induced hepatotoxicity by upregulation of PPAR γ and abrogation of oxidative stress and inflammation. **Canadian journal of physiology and pharmacology**, v. 92, n. 9, p. 717-724, 2014.

MASSANA-CODINA, J. *et al.* Insights on the Structural and Metabolic Resistance of Potato (*Solanum tuberosum*) Cultivars to Tuber Black Dot (*Colletotrichum coccodes*). **Frontiers in plant science**, v. 11, p. 1287, 2020.

MEDEMA, M., FISCHBACH, M. Computational approaches to natural product discovery. **Nature Chemical Biology** v. 11, p. 639–648, 2015.

MICHOPOULOS, F. *et al.* UPLC-MS based analysis of human plasma for metabolomics using solvent precipitation or solid phase extraction. **Journal of Proteome Research**, v. 8, p. 2114–2121, 2009.

MILLAR, C. L.; DUCLOS, Q.; BLESSO, C.N. Effects of dietary flavonoids on reverse cholesterol transport, HDL metabolism, and HDL function. **Advances in Nutrition**, v. 8, n. 2, p. 226-239, 2017.

MORAES, T.M. *et al.* Effects of limonene and essential oil from *Citrus aurantium* on gastric mucosa: role of prostaglandins and gastric mucus secretion. **Chemico-Biological Interactions**, v. 180, n. 3, p. 499-505, 2009.

MUÑOZ, J.P. **Flor de laranjeira**. Espanha, 2020. Fotografia color, 1920x1980. Disponível em: <https://pixabay.com/pt/photos/flor-flor-de-laranjeira-flores-4909695/>. Acesso em 05 de jan, 2022.Licença por Pixabay.

NEVES, M.F. *et al.* **O retrato da citricultura brasileira**. Ribeirão Preto: FEA/USP, CitrusBR, 2010.

NOTHIAS, L-F *et al.* Feature-based molecular networking in the GNPS analysis environment. **Nature methods**, v. 17, n. 9, p. 905-908, 2020.

OLIVER, S.G. *et al.* Systematic functional analysis of the yeast genome. **Trends in biotechnology**, v. 16, n. 9, p. 373-378, 1998.

PARI, L.; SRINIVASAN, S. Antihyperglycemic effect of diosmin on hepatic key enzymes of carbohydrate metabolism in streptozotocin-nicotinamide-induced diabetic rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 64, n. 7, p. 477-481, 2010.

PENG, Z. *et al.* Comparative profiling and natural variation of polymethoxylated flavones in various *citrus* germplasms. **Food Chemistry**, v.354, p.129499, 2021.

PENJOR, T. *et al.* Phylogenetic relationships of *Citrus* and its relatives based on matK gene sequences. **PloS one**, v. 8, n. 4, p. e62574, 2013.

PETERSON *et al.* Flavanones in oranges, tangerines (mandarins), tangors, and tangelos: a compilation and review of the data from the analytical literature.. **Journal of Food Composition and Analysis** , v.19 , S66-S73, 2006.

PILON, A.C. *et al.* Metabolômica de plantas: métodos e desafios. **Química Nova**, v.43, n. 3, p.329-354, 2020.

PILON, A.C. *et al.* Redes moleculares: uma análise sobre anotações e descoberta de novos ativos. **Química Nova**, v. 44, p. 1168-1179, 2021.

PLUSKAL, T. *et al.* Mzmine 2: Modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry based molecular profile data. **BMC Bioinformatics**, v.11, n.385, 2010.

PRUVOST, O. *et al.* A MLVA genotyping scheme for global surveillance of the citrus pathogen *Xanthomonas citri* pv. *citri* suggests a worldwide geographical expansion of a single genetic lineage. **PloS one**, v. 9, n. 6, p. e98129, 2014.

QUINN, R. A. *et al.* Molecular networking as a drug discovery, drug metabolism, and precision medicine strategy. **Trends in pharmacological sciences**, v. 38, n. 2, p. 143-154, 2017.

RAINA, A. *et al.* Effect of orange oil extract on the Formosan subterranean termite (Isoptera: Rhinotermitidae). **Journal of economic entomology**, v. 100, n. 3, p. 880-885, 2007.

RAMÍREZ-PELAYO, C. *et al.* Coumarins from the peel of citrus grown in Colombia: composition, elicitation and antifungal activity. **Heliyon**, v. 5, n. 6, p. e01937, 2019.

ROESCHLIN, R. A. *et al.* Resistance to citrus canker induced by a variant of *Xanthomonas citri* ssp. *citri* is associated with a hypersensitive cell death response involving autophagy-associated vacuolar processes. **Molecular plant pathology**, v. 18, n. 9, p. 1267-1281, 2017.

ROSSI, Y.E.; PALACIOS, S.M. Fumigant toxicity of *Citrus sinensis* essential oil on *Musca domestica* L. adults in the absence and presence of a P450 inhibitor. **Acta tropica**, v. 127, n. 1, p. 33-37, 2013.

RUTZ, A. *et al.* Taxonomically informed scoring enhances confidence in natural products annotation. **Frontiers in plant science**, v. 10, p. 1329, 2019.

SALDANHA, L.L. *et al.* Metabolomics of *Myrcia bella* Populations in Brazilian Savanna Reveals Strong Influence of Environmental Factors on Its Specialized Metabolism. **Molecules**, v.25, p.2954, 2020.

SANZANI, S.M. ; SCHEANA, L.; IPPOLITO, A. Effectiveness of phenolic compounds against citrus green mould. **Molecules**, v. 19, n. 8, p. 12500-12508, 2014.

SHANNON P., *et al.* Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. **Genome Research**, v.13, n.11, p.2498-2504, 2003.

SHARMA, K. *et al.* Converting citrus wastes into value-added products: Economic and environmentally friendly approaches. **Nutrition**, v. 34, p. 29-46, 2017.

SHARMA, N.; TRIPATHI, A. Effects of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck epicarp essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger* (L.) Van Tieghem. **Microbiological research**, v. 163, n. 3, p. 337-344, 2008.

SUN, Y-L. *et al.* Taxonomy and phylogeny of the genus citrus based on the nuclear ribosomal DNA its region sequence. **Pakistan Journal of Botany**, v. 47, n. 1, p. 95-101, 2015.

SCHYMANSKI, E.L. *et al.* Identifying small molecules via high-resolution mass spectrometry: communicating confidence. **Environmental Science & Technology**, v.48, n.4, p.2097-2098, 2014.

TETTE, P.A.S *et al.* Synephrine—A potential biomarker for orange honey authenticity. **Food chemistry**, v. 229, p. 527-533, 2017.

The Plant List (2013). Versão 1.1. Publicado na Internet; <http://www.theplantlist.org/>. Acesso em 1º de janeiro, 2020.

THEODORIDIS, G.; GIKA, H.G.; WILSON, I.D. Mass spectrometry-based holistic analytical approaches for metabolite profiling in systems biology studies. **Mass spectrometry reviews**, v. 30, n. 5, p. 884-906, 2011.

TRIPOLI, E. *et al.* Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. **Food chemistry**, v. 104, n. 2, p. 466-479, 2007.

TROTTER, D. Significance of flavonoids in plant resistance: a review. **Environmental Chemistry Letters** v.04, n.147, 2006.

TSUJIMOTO, T. *et al.* High-Resolution Liquid Chromatography–Mass Spectrometry-Based Metabolomic Discrimination of Citrus-Type Crude Drugs and Comparison with Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy-Based Metabolomics. **Journal of natural products**, v. 82, n. 8, p. 2116-2123, 2019.

TSUJITA, T.; TAKAKU, T.i. Lipolysis induced by segment wall extract from Satsuma mandarin orange (*Citrus unshu* Mark). **Journal of nutritional science and vitaminology**, v. 53, n. 6, p. 547-551, 2007.

VILLAS-BOAS, S. G. *et al.* **Metabolome analysis**: an introduction. John Wiley & Sons, 2007.

VIUDA-MARTOS, M. *et al.* Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils. **Food control**, v. 19, n. 12, p. 1130-1138, 2008.

WANG, F. *et al.* Analysis of flavonoid metabolites in citrus peels (*Citrus reticulata* "Dahongpao") using UPLC-ESI-MS/MS. **Molecules**, v. 24, n. 15, p. 2680, 2019.

WANG, M.; BANDEIRA, N. Spectral library generating function for assessing spectrum-spectrum match significance. **Journal of proteome research**, v. 12, n. 9, p. 3944-3951, 2013.

WANG, M. *et al.* Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. **Nature biotechnology**, v. 34, n. 8, 828, 2016. PMID: 27504778

WANG, S. *et al.* Characterization and metabolic diversity of flavonoids in citrus species. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1-10, 2017.

WFO (2022): **World Flora Online**. Publicado na Internet: <http://www.worldfloraonline.org>. Acessado em: 15 de abril de 2022'

WIDMER, W. W.; MONTANARI, A. M. **Citrus waste streams as a source for phytochemicals**. In: Florida State Horticultural Society. Meeting (USA). 1995.

WILKINSON, M. *et al.* The FAIR Guiding Principles for scientific data management and stewardship. **Scientific Data** 3, n.160018, 2016.

WORLEY, B.; PODERES, R. Multivariate analysis in metabolomics. **Current Metabolomics**, v. 1, n. 1, p. 92-107, 2013.

WU, G. *et al.* Genomics of the origin and evolution of *Citrus*. **Nature**, v. 554, p.311–316, 2018.

XI, W. *et al.* Phenolic compositions and antioxidant activities of grapefruit (*Citrus paradisi* Macfadyen) varieties cultivated in China. **International journal of food sciences and nutrition**, v. 66, n. 8, p. 858-866, 2015.

YAMAMOTO, N. *et al.* Anti-herpesvirus activity of citrussinine-a new acridone alkaloid, related compounds, and I. **Antiviral research**, v. 12, n. 1, p. 21-36, 1989.

Z Aidun, N.H; Thent, Z.C; Abd Latiff, A. Combating oxidative stress disorders with citrus flavonoid: Naringenin. **Life sciences**, v. 208, p. 111-122, 2018.

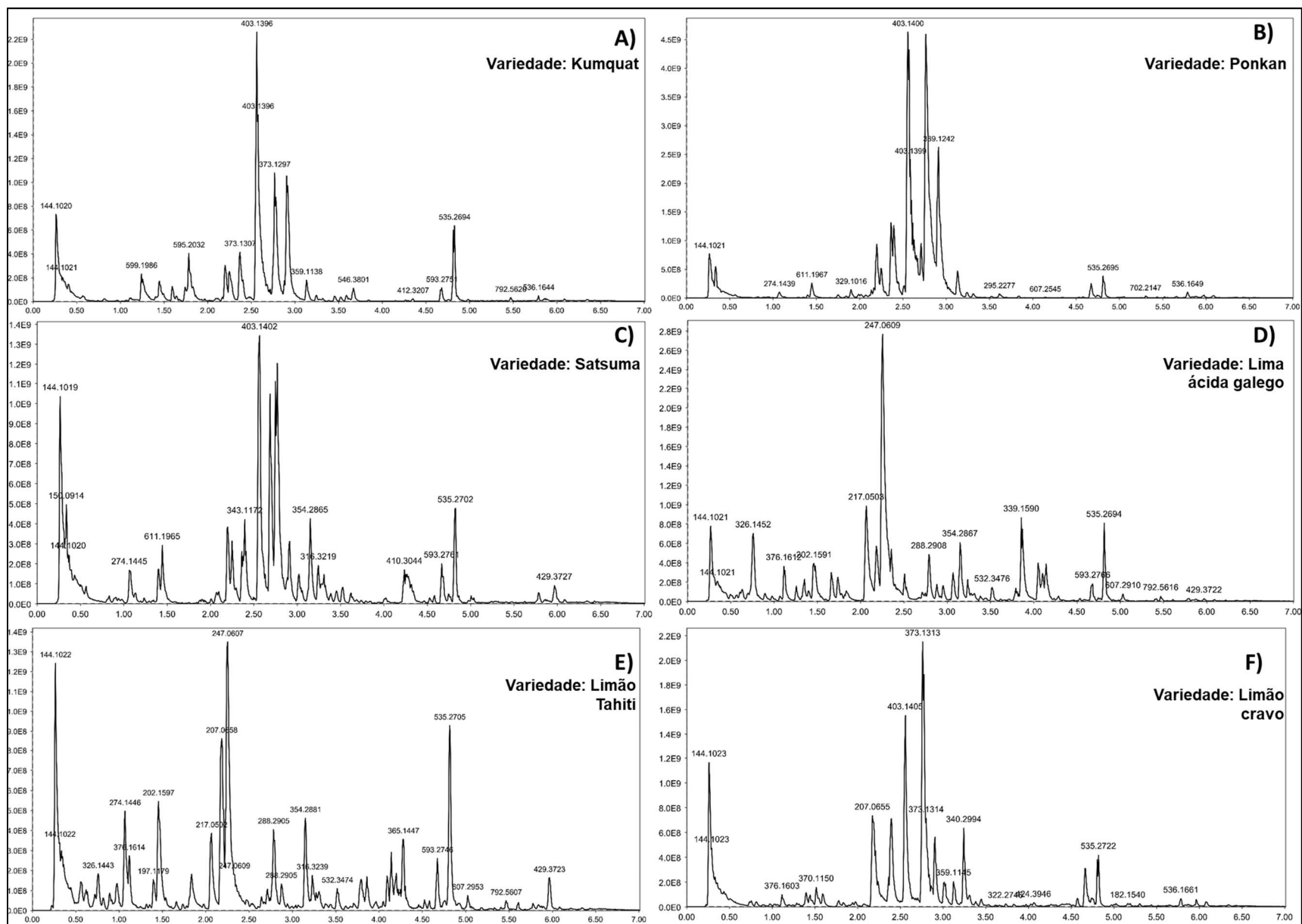
ZANDALINAS, S. I. *et al.* Activation of secondary metabolism in citrus plants is associated to sensitivity to combined drought and high temperatures. **Frontiers in plant science**, v. 7, p. 1954, 2017.

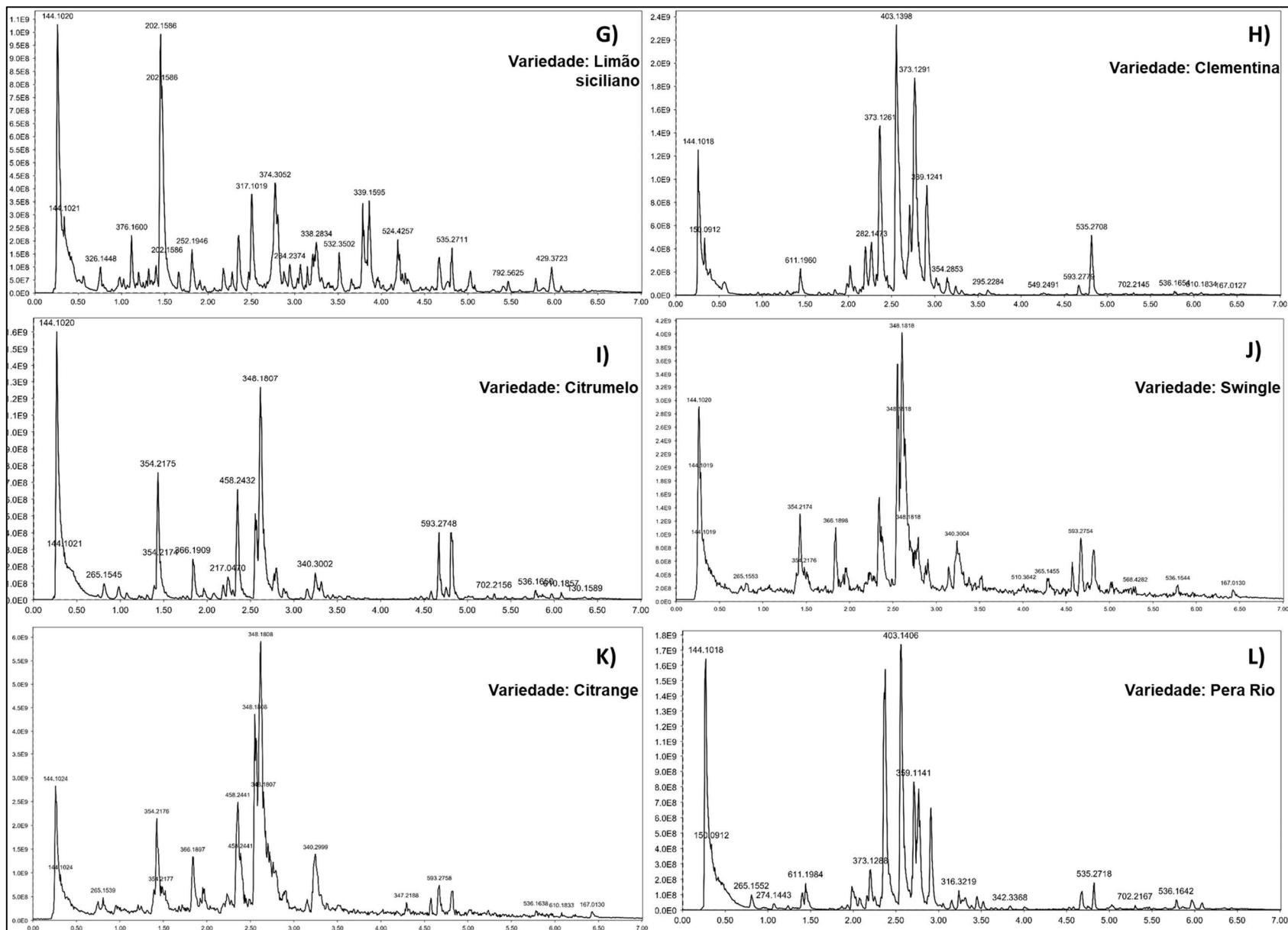
ZELENA, E. *et al.* Development of a robust and repeatable UPLC-MS method for the longterm metabolomic study of human serum. **Analytical Chemistry**, v. 8, p. 1357–1364, 2009.

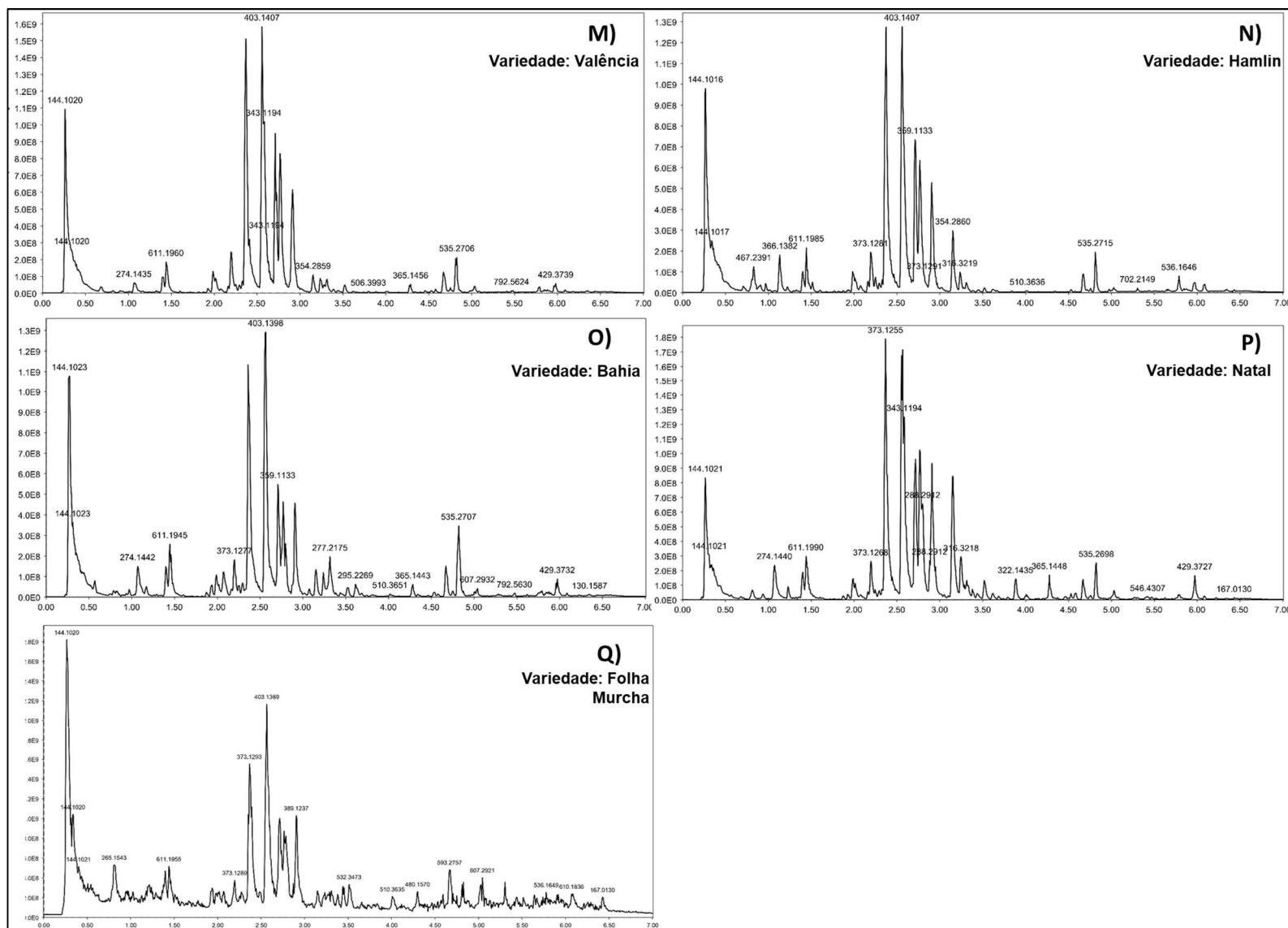
ZHENG, G. *et al.* Construction and Chemical Profile on “Activity Fingerprint” of Citri Reticulatae Pericarpium from Different Cultivars Based on HPLC-UV, LC/MS-IT-TOF, and Principal Component Analysis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2020, 2020.

ZOBEIRI, M. *et al.* Naringenin and its nano-formulations for fatty liver: cellular modes of action and clinical perspective. **Current pharmaceutical biotechnology**, v. 19, n. 3, p. 196-205, 2018.

APÊNDICE A







APÊNDICE A: Cromatogramas analíticos representativos dos extratos foliares das 17 variedades comerciais de *Citrus*, obtidos por UHPLC-HRMS.