

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

FABRICIO HENRIQUE DE SOUZA

ESTUDO METABOLÔMICO DA CINÉTICA DA INFECÇÃO POR *Phakopsora pachyrhizi* EM SOJA UTILIZANDO ESPECTROMETRIA DE MASSAS, MOLECULAR NETWORKING E ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS

Maringá

2023

FABRICIO HENRIQUE DE SOUZA

ESTUDO METABOLÔMICO DA CINÉTICA DA INFECÇÃO POR *Phakopsora pachyrhizi* EM SOJA UTILIZANDO ESPECTROMETRIA DE MASSAS, MOLECULAR NETWORKING E ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Jorge Pilau

Maringá

2023

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

S729e

Souza, Fabricio Henrique de

Estudo metabolômico da cinética da infecção por *Phakopsora pachyrhizi* em soja utilizando espectrometria de massas, *molecular network* e análise de componentes principais / Fabricio Henrique de Souza. -- Maringá, PR, 2023.

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

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Jorge Pilau.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Bioquímica, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular), 2023.

1. Fungicidas - Controle da ferrugem asiática da soja. 2. Soja - Doenças e pragas - Controle. 3. Ferrugem asiática (*Phkopsora pachyrhizi*) - Soja . 4. Estudo metabolômico. I. Pilau, Eduardo Jorge, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Biológicas. Departamento de Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular). III. Título.

CDD 23.ed. 572.7

Jane Lessa Monção - CRB 9/1173

FOLHA DE APROVAÇÃO

FABRICIO HENRIQUE DE SOUZA

ESTUDO METABOLÔMICO DA CINÉTICA DA INFECÇÃO POR *Phakopsora pachyrhizi* EM SOJA UTILIZANDO ESPECTROMETRIA DE MASSAS, MOLECULAR NETWORKING E ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas pela Banca Examinadora composta pelos membros: Dr. Eduardo Jorge Pilau, Dra. Gislaine Cristiane Mantovanelli e Dr. Evandro Aparecido Silva.

Aprovado em: 03 de julho de 2023.

COMISSÃO JULGADORA

Prof. Dr. Eduardo Jorge Pilau
Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Prof. Dra. Gislaine Cristiane Mantovanelli
Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dr. Evandro Aparecido Silva
Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo

*“Nesses tempos de céus cinzas e chumbos,
nós precisamos de árvores desesperadamente
verdes.”*

Mário Quintana

AGRADECIMENTOS

Minha eterna gratidão à minha mãe Fátima (*in memoriam*), que desde muito cedo não mediu esforços para que eu tivesse a melhor educação. Infelizmente, ela não teve a oportunidade de vivenciar essa experiência comigo, mas eu sinto o seu amor, proteção e cuidado me guiando sempre, o que sem dúvidas me trouxe até aqui.

Meus agradecimentos à minha avó Clotilde e à minha irmã Fabíola, que sempre se fizeram presente durante toda essa jornada tão desejada por mim, pelas palavras de carinho nas horas mais difíceis, acreditando em meu potencial além do apoio incondicional que sempre me deram. Sou muito feliz por ter vocês em minha vida, tenho muito orgulho. Amo muito vocês.

Ao meu orientador, Dr. Eduardo Pilau, minha mais sincera gratidão. Foram 7 anos de muitos aprendizados, parceria, erros, acertos e oportunidades. Obrigado pela amizade, pela confiança depositada em mim e pela paciência nos dias difíceis e por isso sou extremamente grato. Obrigado por acreditar no meu potencial e por me incentivar a seguir nessa área acadêmica.

Agradeço à Dra. Carla Porto, a qual conheci no final de 2015 durante uma aula de Química Geral e me deu uma oportunidade que se estendeu por todos esses anos. Mesmo não fazendo parte da minha jornada no mestrado, você fez parte de toda minha trajetória acadêmica desde quando comecei minha iniciação científica sendo uma grande mentora, contribuindo para minha formação. Muito obrigado pelos ensinamentos e orientação.

À Dra. Francismar Corrêa Marcelino-Guimarães pela contribuição na realização desse trabalho.

Agradeço também aos meus amigos do grupo de pesquisa LaBioMass: Britney, Daniele, Felipe, Leticia, Onéssimo, Makoto e Vitor. Vocês fizeram toda a diferença nessa fase difícil que se tornou muito mais divertida com a amizade de vocês.

O meu muito obrigado à minhas grandes amigas Carol Parcerro, Diany Reis e Rafaela Takako pelos incentivos e pelas boas conversas durante esta caminhada desde a graduação.

À Dra. Luiza Mariano Leme, pela contribuição nesse trabalho com as análises estatísticas. Você não tem ideia do quão importante sua amizade e sua presença durante esses anos foram essenciais para o meu desenvolvimento pessoal e profissional. Obrigado pelos muitos cafés, almoços, treinos, noites não dormidas, pelos finais de semana no laboratório. Muito obrigado por ouvir meus desabafos, pelo apoio, por estar sempre de prontidão quando mais preciso e, principalmente, por me ajudar com seus conselhos até aqui.

À Embrapa Soja, pelo apoio institucional e pela excelente estrutura concedida para a realização deste trabalho.

Ao Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa (COMCAP-UEM) e ao PBC-UEM pelo auxílio.

Aos órgãos de fomento FINEP, Fundação Araucária, CNPQ e em especial a Capes pela bolsa concedida.

O presente trabalho foi realizado com apoio da coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior - Brasil (CAPES) - código de financiamento 001.

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram com a realização deste trabalho e para que eu chegasse até aqui.

Amo vocês!

RESUMO

A soja é uma das principais fontes de proteína vegetal sendo conhecida por sua ampla gama em aplicações agrícolas, alimentícias e industriais, bem como por seus benefícios à saúde. Entretanto, a cultura de soja pode sofrer severas perdas na produtividade e rendimento com o surgimento de doenças como a ferrugem asiática (FAS), causada pelo fungo patógeno *Phakopsora pachyrhizi*. Este estudo propõe a abordagem metabolômica não direcionada utilizando cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplada a espectrometria de massas sequencial de alta resolução (UHPLC-MS/MS), utilizando a plataforma *Global Natural Products Social Molecular Networking* (GNPS) para identificação de substâncias químicas com o objetivo de investigar possíveis candidatos a biomarcadores da doença e entender melhor o mecanismo envolvido entre planta-patógeno e análise de componentes principais (PCA). O experimento foi realizado com os genótipos de soja suscetíveis (BRS184) e um genótipo resistente com Rpp5. O ensaio foi feito com três repetições e o isolado de ferrugem foi inoculado na primeira e na segunda folha trifoliolada de cada planta. Por fim, estas folhas foram coletadas em intervalos de 0, 6, 12, e 24 horas após a inoculação. Foi possível identificar e classificar putativamente os metabólitos em aminoácidos, fenilpropanoides, lipídeos, cumarinas e terpenos. Dentre esses, podemos destacar os compostos putativamente identificados como Proline, Pipecolic Acid, Phenylalanine, Linoleic acid, Soyasaponin I, Genistein, Daidzein, 6"-O-Malonyldaidzin, 6"-O-Malonylgenistin, Kaempferol 3-O-rhamnoside-7-O-glucoside, Kaempferol 3-O-beta-D-sophoroside, Biochanin A O-glucoside malonylated. A maioria dos metabólitos identificados pertence às vias sintéticas de metabólitos intermediários e secundários de defesa de plantas. A Análise de Componentes Principais forneceu a separação das amostras em grupos plantas controle e inoculadas. Assim, os dados obtidos podem proporcionar um maior entendimento sobre o papel potencial de alguns metabólitos na resistência de plantas a FAS

Palavras-chave: metabolômica; ferrugem-asiática; soja; GNPS; interação planta-patógeno; espectrometria de massas.

ABSTRACT

Soybean is one of the main sources of vegetable protein and is known for its wide range of agricultural, food and industrial applications, as well as its health benefits. However, the soybean crop can suffer several losses in productivity and yield with the entry of diseases, such as Asian Soybean Rust (ASR), caused by the pathogenic fungus *Phakopsora pachyrhizi*. Despite being among the main diseases with greater virulence, not much is known about the metabolism of the plant invaded by the pathogen. Thus, in this study, we propose an untargeted metabolomics approach using ultra-high-performance liquid chromatography coupled with high-resolution sequential mass spectrometry (UHPLC-MS/MS), using the Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS) platform to identify chemical substances in order to investigate possible candidates for disease biomarkers and better understand the mechanism involved between plant-pathogen and principal component analysis (PCA). The experiment was carried out with similar soybean genotypes (BRS184) and a resistant genotype with Rpp5. The test was performed with three replicates and the rust isolate was inoculated on the first and second trifoliolate leaves of each plant. Finally, these leaves were collected at intervals of 0, 6, 12 and 24 hours after inoculation (hpi). It was possible to identify and classify the metabolites putatively into amino acids, phenylpropanoids, lipids, coumarins and terpenes. Among these, we can highlight the compounds putatively identified as Proline, Pipecolic Acid, Phenylalanine, Linoleic acid, Soyasaponin I, Genistein, Daidzein, 6''-O-Malonyldaidzin, 6''-O-Malonylgenistin, Kaempferol 3-O-rhamnoside- 7-O-glucoside, Kaempferol 3-O-beta-D-sophoroside, Biochanin A malonilated O-glucoside, among others. Most of the identified metabolites belong to the synthetic pathways of intermediate and secondary plant defense metabolites. PCA analysis provided a group separation of control and inoculated plant samples. Thus, the data obtained may provide a greater understanding of the potential role of some metabolites in plant resistance to ASR.

Keywords: metabolomics; Asian rust; soy; GNPS; plant-pathogen interaction; mass spectrometry.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classes químicas dos compostos putativamente atribuídas.....	46
Tabela 2. Classes químicas dos compostos importantes para diferenciação entre os grupos Controle e Inoculado com <i>P. pachyrhizi</i>	57
Tabela 3. Metabólitos putativamente identificados em folhas de soja não inoculadas e inoculadas com <i>P. pachyrhizi</i>	62

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. A - Reação de suscetibilidade à FAS do tipo TAN, lesão marrom clara. B - Reação de resistência à FAS tipo RB, lesão marrom-avermelhada.....	16
Figura 2. Modelo esquemático de respostas imunes em interações planta-patógeno. O sistema imunológico inato de uma planta consiste em PTI e ETI. A PTI induzida pelo reconhecimento de PAMPs por PRRs pode inibir o crescimento da maioria dos patógenos. Em seguida, as vias de sinalização de canais Ca^{2+} , a cascata MAPK e a sinalização de ROS, são ativadas. Alguns patógenos podem liberar efetores patogênicos para interferir no PTI, causando suscetibilidade desencadeada por efetores. As proteínas R da doença com NB-LRR podem identificar direta ou indiretamente efetores específicos para desencadear ETI, que muitas vezes causa uma HR no local da infecção do patógeno e, em seguida, inibe o crescimento dos patógenos novamente. As vias de sinalização SA e JA/ET também estão envolvidas na ativação de PTI e ETI e na resposta de resistência a infecções por patógenos.	19
Figura 3. Componentes de um espectrômetro de massas.	22
Figura 4. . Decomposição da matriz X em 'A' componentes principais pelo método PCA	24
Figura 5. Representação esquemática do processo de criação do <i>molecular network</i> a partir de espectros de massa em <i>tandem</i>	27
Figura 6. Sobreposição dos cromatogramas de pico base (BPC) dos extratos de folhas de soja do sistema solvente (3:1:1 v/v/v clorofórmio/metanol/água), após análise por UHPLC-ESI(+)-MS/MS no tempo 0 hora. (A) Amostra de folhas controle. (B) Amostra de folhas inoculadas.....	37
Figura 7. Sobreposição dos cromatogramas de pico base (BPC) dos extratos de folhas de soja do sistema solvente (3:1:1 v/v/v clorofórmio/metanol/água), após análise por UHPLC-ESI(+)-MS/MS no tempo 6 horas. (A) Amostra de folhas controle. (B) Amostra de folhas inoculadas.....	37
Figura 8. Sobreposição dos cromatogramas de pico base (BPC) dos extratos de folhas de soja do sistema solvente (3:1:1 v/v/v clorofórmio/metanol/água), após análise por UHPLC-ESI(+)-MS/MS no tempo 12 horas. (A) Amostra de folhas controle. (B) Amostra de folhas inoculadas.....	38
Figura 9. Sobreposição dos cromatogramas de pico base (BPC) dos extratos de folhas de soja do sistema solvente (3:1:1 v/v/v clorofórmio/metanol/água), após análise por UHPLC-ESI(+)-MS/MS no tempo 12 horas. (A) Amostra de folhas controle. (B) Amostra de folhas inoculadas.....	38
Figura 10. Q residuals versus Hotelling T2. (●) Grupo C. (●) Grupo I. (---) Limite de confiança de 95%.....	40
Figura 11. Scores de PCA (PC1 vs PC2) dos espectros de massas obtidos por UHPLC-ESI-MS/MS dos extratos de folhas de soja não inoculadas (●) e inoculadas (●) com <i>P. pachyrhizi</i> . Amostras coletadas (○) 0 horas, () 6 horas, (□) 12 horas, (Δ) 24 horas após inoculação de <i>P. pachyrhizi</i>	42

Figura 12. Loadings de PC1 e (●) íons de maior influência sobre a separação.	43
Figura 13. Rede molecular dos espectros de fragmentação obtidos através da análise UHPLC-ESI-MS/MS de folhas de soja não inoculadas e inoculadas com <i>P. pachyrhizi</i> . (●) Nodes de espectros de consenso observados exclusivamente em amostras não inoculadas (●) nodes de espectros de consenso observados exclusivamente em amostras inoculadas com <i>P. pachyrhizi</i> . (○) nodes de espectros de consenso compartilhados entre ambos os grupos de amostras. (△) Nodes de espectros de consenso que apresentaram correspondência aos espectros de fragmentação encontrados nas bibliotecas espectrais da plataforma GNPS.....	45
Figura 14. Rede molecular por classes dos espectros de fragmentação obtidos através da análise UHPLC-ESI-MS/MS de folhas de soja não inoculadas e inoculadas com <i>P. pachyrhizi</i> . (●) Lipídeos (●) Aminoácidos e peptídeos (●) Terpenos. (●) Flavonoides. (●) Isoflavonoides (●) Cumarinas (○) Sem correspondência de classes (△) Nodes de espectros de consenso que apresentaram correspondência aos espectros de fragmentação encontrados nas bibliotecas espectrais da plataforma GNPS.	47
Figura 15. Rede molecular por classes dos espectros de fragmentação obtidos através da análise UHPLC-ESI-MS/MS de folhas de soja não inoculadas e inoculadas com <i>P. pachyrhizi</i> coletadas após 0 horas . (●) Lipídeos (●) Aminoácidos e peptídeos (●) Terpenos. (●) Flavonoides. (●) Isoflavonoides (●) Cumarinas. (○) Sem correspondência de classes. (□) Nodes de compostos encontrados exclusivamente em amostras do grupo não inoculado (▽) Nodes de compostos encontrados exclusivamente em amostras do grupo inoculado. (○) Nodes de compostos encontrados exclusivamente em amostras coletadas após 0 horas.	49
Figura 16. Rede molecular por classes dos espectros de fragmentação obtidos através da análise UHPLC-ESI-MS/MS de folhas de soja não inoculadas e inoculadas com <i>P. pachyrhizi</i> coletadas após 6 horas	50
Figura 17. Rede molecular por classes dos espectros de fragmentação obtidos através da análise UHPLC-ESI-MS/MS de folhas de soja não inoculadas e inoculadas com <i>P. pachyrhizi</i> coletadas após 12 horas	51
Figura 18. Rede molecular por classes dos espectros de fragmentação obtidos através da análise UHPLC-ESI-MS/MS de folhas de soja não inoculadas e inoculadas com <i>P. pachyrhizi</i> coletadas após 24 horas	52
Figura 19. Compostos produzidos pela planta de soja frente ao ataque de <i>P. pachyrhizi</i> em 0, 6, 12 e 24 horas. (●) Lipídeos (●) Aminoácidos e peptídeos (●) Fenilpropanoides (●) Terpenos (○) Ácidos graxos.....	55
Figura 20. Superfície de resposta dos compostos importantes para diferenciação entre as amostras Controle e Inoculado com <i>P. pachyrhizi</i>	56
Figura 21. Via resumida da biossíntese de flavonoides.	61

SUMÁRIO

1	Revisão Bibliográfica	12
1.1	Soja	12
1.2	<i>Phakopsora pachyrhizi</i> e FAS	13
1.3	Tratamento e Resistencia Genética de Plantas à Doenças	14
1.4	Genes de resistência à <i>Phakopsora pachyrhizi</i> (<i>Rpp</i>).....	15
1.5	Interação Planta – Patógeno: mecanismos de reconhecimento e defesa	16
1.6	Metabolômica	20
1.7	Espectrometria de massas no contexto da metabolômica	20
1.8	Processamento de dados em metabolômica.....	23
1.9	Quimiometria	23
1.10	Análise de Componentes Principais	23
1.11	Molecular Networking	25
2	Objetivo.....	29
2.1	Objetivos Específicos	29
3	MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1	Materiais e Reagentes.....	30
3.2	Plantas de soja	30
3.3	Obtenção e preparo do inóculo de <i>Phakopsora pachyrhizi</i>	30
3.4	Extração de Metabólitos	31
3.5	Análises por UHPLC-ESI-MS/MS.....	31
3.6	Molecular Networking	33
3.7	Processamento de dados.....	33
3.8	Análises quimiométricas.....	34
3.9	Análise de Componentes Principais	34
4	Resultados e discussão	36
4.1	Análise de impressão digital metabólica.....	36
4.2	Análise de Componentes Principais dos dados UHPLC-ESI-MS/MS.....	39
4.3	<i>Molecular Networking</i> e identificação de metabólitos.....	43
5	Conclusão.....	65
	REFERENCIAS.....	66

1 Revisão Bibliográfica

1.1 Soja

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) representa uma das culturas de maior importância econômica mundial e sua produção está aumentando cada vez mais (BOEHM et al., 2018). Durante a safra de 2022/23, o Brasil se destacou como o maior produtor de soja (34%), seguido dos EUA (29%) e Argentina (16%). Dentre os mais de 370 milhões de toneladas produzidas mundialmente, o Brasil contribuiu com mais de 154 milhões de toneladas, com uma área cultivada de 43,834 milhões de hectares e produtividade de 3,532 kg/ha. Além disso, o total exportado pelo país corresponde a mais de US\$ 50 bilhões incluindo a soja em grãos, farelo e óleo. (DESTA et al., 2022, CONAB, Agrosat).

Além da sua importância econômica, devido a sua composição, principalmente como fonte de proteínas (40%), lipídeos (20%) e carboidratos (12%), a soja possui características nutricionais importantes tanto para alimentação humana e animal como na saúde (PADALKAR et al., 2022). Assim, desempenha um papel importante nas indústrias alimentícias e de biocombustíveis (KUMAR et al., 2021; HILL et al., 2006).

Segundo a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), até 2031, a região latina continuará sendo a maior produtora de soja do mundo, respondendo por 53% da produção global. Além disso, estudos recentes indicam que a população mundial deve atingir a marca de 9,8 bilhões de pessoas em 2050, fazendo com que a produção de alimentos aumente em até 70% (FAO, RAY et al., 2013).

Apesar do aumento crescente na demanda e da produtividade da soja ao longo dos anos, as doenças de plantas causadas por patógenos como fungos, bactérias, vírus e nematóides representam um dos cenários mais desafiadores sofridos pelos produtores de soja. Neste contexto, podemos destacar a ferrugem asiática da soja (FAS) (SCHERM et al., 2009; YORINORI et al., 2005).

Desde sua invasão nas lavouras brasileiras em 2001, a FAS tem se tornado uma das mais graves doenças da cultura de soja, podendo levar a perdas de até 80%, se não controlada (SCHERM et al., 2009; YORINORI et al., 2005).

Além disso, a doença está presente nas principais áreas de cultivo de soja de toda a América e os prejuízos causados pela doença podem extrapolar US\$ 2 bilhões por safra

somente no Brasil, levando em consideração a aquisição/aplicação de fungicidas e as perdas de produtividade que ela provoca (AKAMATSU et al., 2013; GUPTA et al., 2023).

1.2 *Phakopsora pachyrhizi* e FAS

A ferrugem asiática da soja é causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi* (SAVARY et al., 2019). Tal microrganismo (MO) foi primeiramente identificado no Japão em 1902 e posteriormente se espalhou pela África nos anos 90 e em 2000 na América do Norte e Sul (MEIRA, et al., 2019; PRETORIUS et al., 2001; MURITHI et al., 2016; YORINORI et al., 2005).

Os fungos da ferrugem são necessariamente patógenos obrigatórios e, portanto, apenas se desenvolvem em organismos celulares vivos, de onde extraem suprimentos essenciais às suas atividades vitais. Além disso, seu desenvolvimento se dá sobre determinadas condições específicas, como temperatura entre 18 a 26° C, sendo a temperatura ótima 23° C e período de molhamento foliar mínimo de seis horas por água livre ou orvalho (BERGAMIN-FILHO, 2006; HENNING et al., 2014; HARTMAN et al., 2015;; ROSA et al., 2015).

O ciclo de vida do *P. pachyrhizi* inicia-se a partir do contato das folhas do hospedeiro com os uredósporos, que por sua vez, germinam, formando um tubo germinativo, onde há a formação de um apressório, que auxilia a penetração das hifas no hospedeiro. As hifas se estendem pela epiderme atingindo os espaços intercelulares com a formação de haustórios, responsáveis pela absorção de nutrientes. Com isso, tem-se o desenvolvimento das primeiras estruturas denominadas urédias através da junção das hifas. Nessa etapa, enzimas degradantes da parede celular atuam para penetrar diretamente na epiderme da planta. Tal fato pode diminuir o tempo necessário para a infecção e, finalmente, minimizar a exposição dos tubos germinativos a diversos fatores abióticos e bióticos (REIS et al., 2006; GOELLNER et al., 2010; EL-HASAN et al., 2022; Leonard et al., 2005; EDWARDS et al., 2011; KOCH et al., 1983).

Dessa forma, os sintomas da doença na soja podem ser constatados desde estádios vegetativos até os reprodutivos da cultura. Os primeiros sinais são observados na parte inferior da folha, que é o local de produção dos uredósporos do fungo; estes apresentam pequenos pontos (\emptyset máximo =1 mm), mais escuros do que o tecido sadio

da folha, de coloração esverdeada a cinza-esverdeada, com presença das urédias (HENNING et al., 2014).

Com o avanço da doença as urédias se rompem e liberam os uredósporos, causando a disseminação do microrganismo (KASHIWA; MURAKI; YAMANAKA, 2020). A extensão dos danos causados pela FAS depende dos estádios fenológicos bem como pode ocorrer em todos os estádios de desenvolvimento da planta. Com o aumento da gravidade da doença, o amarelecimento das folhas e a senescência precoce comprometem a produtividade da cultura de soja (DE PAULA et al., 2022).

Assim, a ferrugem asiática da soja (FAS) pode causar grandes perdas na produtividade além de acarretar elevados custos para o seu controle. Nesse cenário, diversos estudos têm sido feitos por pesquisadores para a obtenção de genótipos resistentes. Porém, o desenvolvimento desses genótipos é um processo complexo visto que o patógeno possui uma grande variabilidade, o que faz com que as estratégias adotadas atualmente para combater o microrganismo não são capazes de manter a sustentabilidade da cultura por um longo período de tempo (DARBEN et al., 2020).

1.3 Tratamento e Resistência Genética de Plantas à Doenças

Atualmente, o uso de fungicidas é o meio mais eficaz para controlar a FAS. No Brasil, ao menos três aplicações de fungicidas por safra são necessárias, aumentando os custos em torno de US\$ 2 bilhões para o controle da doença anualmente (LANGENBACH et al., 2016). Contudo, a eficácia dos fungicidas depende de alguns fatores como a detecção precoce da FAS e a aplicação de doses corretas destas substâncias químicas (DELANEY et al., 2018).

O uso constante e desenfreado de fungicidas como estratégia de combate à doença tem contribuído para resistência do *P. pachyrhizi* frente a estes defensivos. Além disso, essa insensibilidade associada a uma crescente conscientização social sobre as desvantagens desses agentes sintéticos de proteção de plantas com o intuito de reduzir os riscos à saúde humana e animal bem como os impactos ambientais, vem estimulando a pesquisa de diversas estratégias alternativas baseadas em ferramentas biológicas ou novas moléculas ativas. (GODOY 2012; NICOLOPOULOU-STAMATI et al., 2016;

FURLAN et al., 2018; ZUBROD et al., 2019; EL-SHARKAWY; RASHAD; IBRAHIM, 2018; KHAN et al., 2020; EL-HASAN et al., 2022).

Dessa maneira, o cultivo de soja com genes de resistência associada ao uso de fungicidas é uma opção promissora para diminuir perdas da cultura e aumentar a durabilidade da resistência genética (GODOY et al., 2018).

1.4 Genes de resistência à *Phakopsora pachyrhizi* (*Rpp*)

A resistência genética apresenta como característica a competência em que o hospedeiro dificulta ou atrasa o ataque do patógeno em seu organismo (GARCIA et al., 2008). Dessa forma, o hospedeiro dispõe de genes de resistência com a capacidade de desencadear e ativar mecanismos de defesa contra os patógenos, impedindo o desenvolvimento dos mesmos. Desse modo, o emprego de cultivos resistentes para a FAS pode diminuir os custos associados ao controle químico, tornando-os mais eficientes, reduzindo a pressão de seleção para a resistência a fungicidas (TAIZ et al., 2017).

Os Genes de Resistência à *P. pachyrhizi* (*Rpp*) são guiados por genes de resistência específicos que se comunicam com genes de avirulência (*Avr*) presentes no patógeno, promovendo uma interação genética específica. Este tipo de interação resulta no desenvolvimento de isolados de *P. pachyrhizi* que diferem em genes de *Avr* para um determinado gene de resistência às plantas (DODDS; RATHJEN; 2010).

Sete loci (*Rpp1* – *Rpp7*) foram descritos e considerados capazes de conferir imunidade ou resistência a *P. pachyrhizi*. (BROMFIELD; MELCHING, 1982; HARTWIG; BROMFIELD, HARTWIG, 1986; 1983; HYTEN et al., 2007; GARCIA et al., 2008; LI et al. al., 2012; YU et al., 2015; CHILDS et al., 2018b;). Cada gene resistente promove diferentes reações fenotípicas ao patógeno isolado (CHAKRABORTY et al., 2009; AKAMATSU et al., 2017; STEWART et al., 2019). Entretanto, tais patógenos isolados apresentam uma grande diversidade, muitas vezes agregado à presença de mais de um isolado em condições de campo, dificultando respostas de imunidade à FAS por um único gene de resistência (AKAMATSU et al., 2013, 2017; DARBEN et al., 2020).

Sendo assim, a resistência à FAS é classificada como específica de cada variabilidade (raça). Nesse tipo de resistência, a interação planta-patógeno é baseada na

teoria “gene-a-gene”, ou seja, para cada gene de resistência identificado na planta, existe um gene complementar no patógeno conferindo avirulência (*Avr*) (FLOR, 1971). Contudo, esses genes usualmente perdem sua efetividade devido à evolução do patógeno ao longo do tempo (TWIZEYIMANA et al., 2011; MURITHI et al.; 2021; MEIRA et al., 2022).

1.5 Interação Planta – Patógeno: mecanismos de reconhecimento e defesa

A interação soja - *P. pachyrhizi* apresenta três possíveis fenótipos de infecção que podem ser identificados como: imune (IM do inglês *immune response*), lesões do tipo RB (do inglês *Reddish Brown*) e lesões do tipo TAN (do inglês *tan-colored lesions*). A conferência de resistência completa ocorre quando não há sinais de infecção pelo patógeno, sendo a planta caracterizada IM. Já a resistência incompleta ocorre quando há lesões com ou sem a presença de urédias esporulantes (RB). A suscetibilidade é definida pela presença de lesões castanho-claro com expressivo número de urédias com esporulação (TAN) (MILES et al., 2011; BROMFIELD, 1984). Sob condições favoráveis, as primeiras lesões podem ser visíveis 4-5 dias após a inoculação com o patógeno e as primeiras frutificações (urédias) e esporulações aparecem aos 6-7 dias após a inoculação (YORINORI et al., 2005).

Figura 1. **A** - Reação de suscetibilidade à FAS do tipo TAN, lesão marrom clara. **B** - Reação de resistência à FAS tipo RB, lesão marrom-avermelhada.



Fonte: Silva, E. A (2022).

Plantas são uma fonte potencial de açúcares e nutrientes para microrganismos no meio ambiente. Dessa forma, bactérias e fungos desenvolveram mecanismos para combater as barreiras estruturais e químicas pré-formadas, as quais as plantas usam

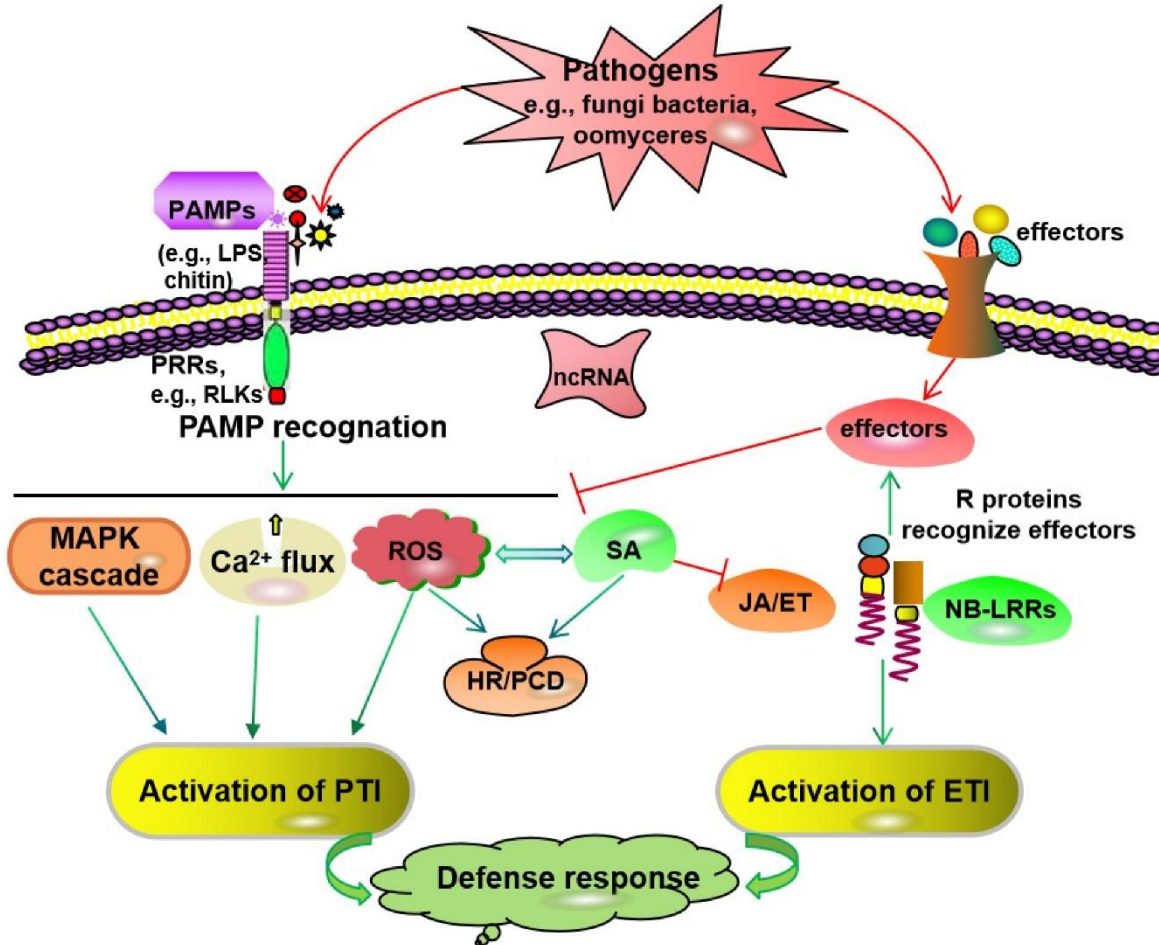
como proteção. Contudo, ao longo da evolução, as mesmas desenvolveram mecanismos de defesa que possibilitaram reconhecer os patógenos e evitar a sua colonização (JONES; DANGL, 2006).

Nesse contexto, além de um sofisticado mecanismo de defesa basal, as plantas dispõem de dois mecanismos de reconhecimentos de patógenos. O primeiro deles é mediado por receptores transmembranares chamados receptores de reconhecimento de padrões (PRR, do inglês *pattern-recognition receptor*), que reconhecem microrganismos no meio extracelular. O segundo mecanismo diz respeito à percepção dependente de receptores citoplasmáticos (NRLs, do inglês *nucleotide binding–leucine-rich repeat*), que são responsáveis pelo reconhecimento de moléculas efetoras no interior da célula vegetal (JONES; DANGL, 2006). Tal reconhecimento pode ser indireto, onde os receptores reconhecem a presença de patógenos por meio da atividade enzimática de moléculas efetoras capaz de modificar proteínas alvo na célula hospedeira, ou direto, em que as moléculas efetoras são reconhecidas por sua estrutura através da interação com o receptor (SAUR et al., 2021).

A primeira camada de PRR é capaz de reconhecer padrões moleculares associado a patógenos (MAMPs/PAMPs, do inglês, *microbe/pathogen-associated molecular pattern*). Em geral, são moléculas altamente conservadas em classes inteiras de microrganismos por desempenharem papéis indispensáveis, por exemplo a quitina da parede celular dos fungos (JONES; DANGL, 2006). O reconhecimento dessas moléculas pelos PRRs estimula uma resposta imunológica (PTI, do inglês *PAMP-triggered immunity*), a qual é eficaz contra a maioria dos microrganismos não adaptados. A PTI engloba uma ampla gama de respostas de defesa, como a ativação do fluxo de íons cálcio (Ca^{2+}), a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS do inglês *reactive oxygen species*), e a ativação de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK). Esta cascata de sinais é mediada por hormônios vegetais como o ácido salicílico (SA) ou ácido jasmônico (JA)/etileno (ET), que leva à biossíntese de fatores relacionados à defesa e à ativação da resistência a doenças nas plantas bem como a expressão de genes codificadores de proteínas antimicrobianas (MACHO; ZIPFEL, 2014; SCHREIBER; CHAU-LY; LEWIS, 2021; NICAISE; CANDRESSE, 2017; SPOEL; DONG, 2012; DING et al., 2022). (Figura 2).

Em contrapartida, patógenos adaptados utilizam moléculas chamadas efetores que ajudam na colonização do tecido vegetal através da supressão da PTI. Nesse processo, conhecido como susceptibilidade desencadeada por efector (ETS, do inglês *effector-triggered susceptibility*), a célula hospedeira reconhece os efetores do microrganismo por receptores NLRs. Tais receptores citoplasmáticos serão capazes de reconhecer moléculas efectoras provenientes de patógenos e irão desencadear uma resposta imunológica desencadeada por efetores (ETI, do inglês *effector-triggered immunity*) induzida pelas interações de proteínas de resistência de plantas (R). Essa resposta é muito mais forte que a PTI, o que pode resultar em morte do tecido vegetal infectado, onde os efetores de patógenos podem iniciar a segunda linha de respostas de defesa induzidas pelo hospedeiro, como resposta de hipersensibilidade (HR), morte celular programada (PCD, do inglês *programmed cell death*) e resistência sistêmica adquirida (SAR, do inglês *systemic acquired resistance*), impedindo que o patógeno se espalhe por uma área maior. (DING et al., 2022; WANG et al., 2022). (Figura 2).

Figura 2. Modelo esquemático de respostas imunes em interações planta-patógeno. O sistema imunológico inato de uma planta consiste em PTI e ETI. A PTI induzida pelo reconhecimento de PAMPs por PRRs pode inibir o crescimento da maioria dos patógenos. Em seguida, as vias de sinalização de canais Ca^{2+} , a cascata MAPK e a sinalização de ROS, são ativadas. Alguns patógenos podem liberar efetores patogênicos para interferir no PTI, causando suscetibilidade desencadeada por efetores. As proteínas R da doença com NB-LRR podem identificar direta ou indiretamente efetores específicos para desencadear ETI, que muitas vezes causa uma HR no local da infecção do patógeno e, em seguida, inibe o crescimento dos patógenos novamente. As vias de sinalização SA e JA/ET também estão envolvidas na ativação de PTI e ETI e na resposta de resistência a infecções por patógenos.



Fonte: DING et al. (2022).

O conhecimento acerca da ativação da resposta imune em plantas susceptíveis a algum estresse é bem descrito. Contudo, no que se refere a natureza química e identificação das moléculas derivadas da comunicação planta-patógeno ainda carece de investigação (CHEN et al., 2018). Por consequência, há uma demanda constante de se buscar alternativas e ferramentas que possam contribuir para melhor entendimento sobre o manejo da doença.

1.6 Metabolômica

A metabolômica pode ser compreendida como o estudo em larga escala de pequenas moléculas geralmente conhecidas como metabólitos que participam de um sistema biológico. Pode-se dividir em duas categorias principais: as análises direcionadas (orientados por hipóteses) e não direcionadas (orientados por dados). As análises não direcionadas ou como relatado na literatura como impressão digital metabólica (do inglês, “*metabolic fingerprint*”) descreve, de modo abrangente, o perfil completo de um conjunto de moléculas em uma amostra. Por outro lado, as abordagens direcionadas focam-se na quantificação de grupos de moléculas, uma vez que é possível a pré-seleção de metabólitos (HALL et al., 2022).

Embora seja uma abordagem complexa, a metabolômica fornece informações importantes sobre o fenótipo químico de um genótipo submetido a condições ambientais específicas bem como a interação entre os sistemas biológicos e seu ambiente e todas as perturbações relacionadas (KUMAR et al., 2017; VILLATE et al., 2021).

Nesse contexto, essa técnica se destaca por explorar as características de vários metabólitos presentes em diferentes plantas bem como avaliar a atividade biológica de extratos específicos, identificando possíveis compostos bioativos com potenciais benefícios para tratamento de patógenos. Tal fato pode auxiliar as pesquisas voltadas ao reconhecimento de patógenos pelo hospedeiro e na produção de genes de culturas resistentes onde se possa modular a produção de tais metabólitos, auxiliando no combate da doença e conseqüentemente, na melhoria da produtividade agrícola (SHEN et al., 2023).

1.7 Espectrometria de massas no contexto da metabolômica

As plantas são uma fonte inestimável de compostos ativos. Sendo assim, elas possuem uma grande quantidade de moléculas produzidas durante o metabolismo vegetal que são caracterizadas por amplas faixas de concentração, alta diversidade química e isomerismo (CALABRESE et al., 2022; BAUERMEISTER et al., 2022).

A espectrometria de massas (MS, do inglês *Mass Spectrometry*) é frequentemente utilizada para análises metabolômicas, principalmente por sua sensibilidade e capacidade de detectar e quantificar uma grande diversidade de moléculas em amostras

biológicas complexas. Além disso, análise por MS pode ser realizada por injeção direta ou associada a técnicas cromatográficas (CALABRESE et al., 2022; BAUERMEISTER et al., 2022).

Dentre as mais diversas combinações tais como cromatografia líquida de alta performance (UPLC), cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS), ressonância magnética nuclear (NRM), espectroscopia no ultravioleta visível (UV-VIS), espectroscopia no infravermelho (IR), pode-se destacar a cromatografia líquida de ultra alta performance (UHPLC, do inglês *Ultra High Performance Liquid Chromatography*). Dentre estas, a UHPLC se sobressai, pois, possibilita separar os constituintes da amostra em um período de tempo mais curto com uma maior eficiência de cromatografia, devido ao uso de colunas de LC de partículas menores (1,7–3 µm). Os picos cromatográficos UHPLC são mais estreitos e o rendimento da amostra é maior (FORCISI et al., 2013).

Essas características tornam o acoplamento entre UHPLC e MS, uma técnica adequada para estudos metabolômicos não direcionados, pois permite a investigação de uma ampla gama de compostos (FORCISI et al., 2013).

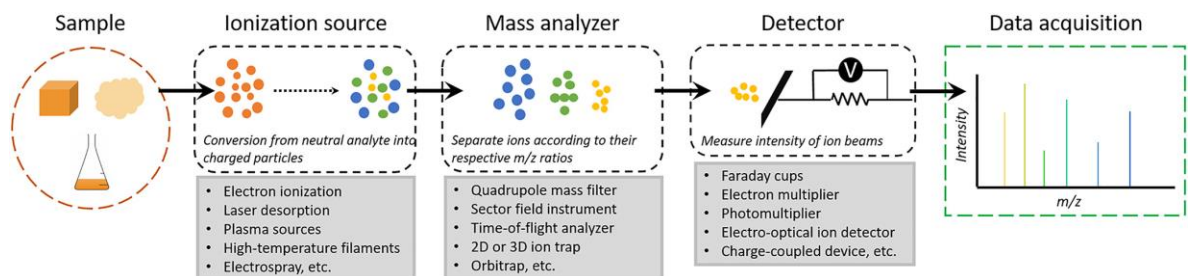
Os espectrômetros de massas podem ser divididos em três partes principais: fonte de ionização; analisador de massa e detector (Figura 3). Sendo assim, os analitos são detectados de acordo com sua razão massa-carga (m/z) gerados através da ionização de uma amostra. Tal etapa é fundamental, pois apenas espécies moleculares ionizadas podem ser transportadas para o espectrômetro de massas para posterior medição de massa. Nesse contexto, a ionização por *electrospray* (ESI, do inglês *electrospray ionization*) é comumente empregada e é particularmente adequada para a ionização de um grande conjunto de metabólitos (MATTOLI; GIANNI; BURICO, 2022).

Durante a ionização por *electrospray*, uma forte voltagem é aplicada sobre a amostras dissolvida, que passa por um capilar. O campo elétrico gerado induz à acumulação de cargas na superfície do líquido localizado no final do capilar, que ao emergir à pressão atmosférica, é aspergido formando uma pluma de gotículas altamente carregadas (HOFFMANN; STROOTBANT, 2007). Essas gotículas são sucessivamente dessolvatadas, provocando um acúmulo da densidade de carga em sua superfície, o que causa a quebra da tensão superficial das gotas graças às forças Coulômbicas repulsivas,

formando gotículas cada vez menores (BHARDWAJ; HANLEY, 2014). Esse processo ocorre sucessivamente até que sejam formados íons em fase gasosa livres de solvente, que serão conduzidos ao MS devido ao potencial aplicado, seguindo para o analisador de massas (BHARDWAJ; HANLEY, 2014).

Dentre os mais diversos analisadores, o tipo quadrupolo-tempo de voo (Q-TOF, do inglês *Quadrupole-Time of Flight*) permite a análise de substâncias com alta resolução e precisão. Isso possibilita a geração de dados com melhor exatidão de massas, garantindo a identificação mais assertiva de compostos. A análise dos íons é baseada na medida da massa de acordo com o tempo em que levam para atravessar um espaço definido, isto é, os íons que possuem menor m/z levarão menos tempo para alcançar o detector (BORCHERS et al., 2000). Além da alta resolução e precisão, o Q-TOF possibilita análises de espectrometria de massas sequencial (MS/MS ou MS2) onde os íons de interesse podem ser fragmentados e analisados quanto à m/z destes fragmentos, fornecendo dados mais discriminantes e informativos quando comparado com aqueles adquiridos a partir dos analitos precursores (ALLARD et al., 2016; KARAS; HILLENKAMP, 1988).

Figura 3. Componentes de um espectrômetro de massas.



Fonte: AREVALO JR; NI; DANELL, 2020.

1.8 Processamento de dados em metabolômica

A abordagem metabolômica fornece uma imensa quantidade de dados de alta dimensionalidade bem como diversas variáveis que podem ser analisadas simultaneamente. Por essa razão, o uso de estratégias que viabilizem e auxiliem a interpretação destes dados são necessárias. Sendo assim, métodos multivariados provenientes da quimiometria e a ferramenta *Molecular Networking* se destacam como mecanismos extremamente importantes para esse tipo de estudo (BELINATO et al., 2019a; GORROCHATEGUI et al., 2016; PIASECKA; KACHLICKI; STOBIECKI, 2019).

1.9 Quimiometria

A quimiometria é a ciência que se dispõe de métodos matemáticos, estatísticos e computacionais com o objetivo de extrair o máximo de informações químicas relevantes presente em um conjunto de dados, abrangendo conceitos de pré-processamentos, planejamento experimental e análises multivariadas voltadas para qualificação e quantificação de substâncias. Assim, é possível investigar, interpretar, classificar e fazer a previsão de conjuntos de dados de interesse (BRUNS; FAIGLE, 1985; FERREIRA, 2015; SOUZA; POPPI, 2012).

Em razão da sua interdisciplinaridade, a quimiometria vem sendo empregada para reconhecimento de padrões, além do desenvolvimento de métodos de calibração multivariada e na análise exploratória de dados. O reconhecimento de padrões permite a obtenção de mais informações quando comparado aos métodos univariados. Assim, levando em consideração um conjunto multivariado de informações extraídos de uma série de amostras, pode-se observar semelhanças e tendências entre estas, o que auxilia na interpretação dos resultados (CORREIA; FERREIRA, 2007; FERREIRA, 2015; GELADI, 2003).

1.10 Análise de Componentes Principais

Dentre os métodos de reconhecimento de padrões, a Análise de Componentes Principais (PCA, do inglês *Principal Components Analysis*) se caracteriza pela análise da relação entre as características extraídas de um conjunto de dados através da redução da dimensão destes, desprezando informações redundantes e, conseqüentemente, fornecendo formas mais específicas dos dados. Para essa finalidade, os dados

multivariados são projetados em um espaço de menor dimensão sem que as relações entre as amostras sejam afetadas. Dessa forma, as informações relevantes são separadas e ampliadas, tornando mais perceptível as diferenças entre as variáveis e similaridades entre as amostras (FERREIRA, 2015).

No espaço original, as amostras são representadas por pontos em um espaço n -dimensional, sendo “ n ” o número de variáveis. A partir da PCA, as amostras passam a ser pontos localizados em espaços de dimensões reduzidas definidas por novos eixos, chamados Componentes Principais (PCs, do inglês *Principal Components*). Tais PCs são não correlacionadas, ou seja, denota que a informação contida em uma PC não está presente na outra quando os dados são centrados na média, ortogonais entre si. O modo com que estes novos eixos são definidos retrata quase toda a informação inclusa nos dados originais em apenas poucas PCs (CORREIA; FERREIRA, 2007; FERREIRA, 2015).

Matematicamente, os dados são ordenados em formato matricial, em que cada amostra corresponde a um vetor-linha e cada variável a um vetor-coluna. Esta matriz (\mathbf{X}) é decomposta em um produto de duas matrizes, sendo a matriz (\mathbf{T}) relativa aos escores (*scores*) e (\mathbf{L}) aos pesos (*loadings*), mais uma matriz de resíduos (\mathbf{E}), como mostra a Equação 1 (FERREIRA, 2015; SOUZA; POPPI, 2012).

$$\mathbf{X} = \mathbf{T} \mathbf{L}^T + \mathbf{E} \quad (1)$$

O conjunto de *scores* e *loadings* é denominado Componente Principal (PCs, do inglês *Principal Component*) e a Figura 4 ilustra a decomposição da matriz \mathbf{X} em *scores* e *loadings* até ‘ A ’ PCs.

Figura 4. . Decomposição da matriz \mathbf{X} em ‘ A ’ componentes principais pelo método PCA

$$\begin{matrix} & & m \\ & & \boxed{} \\ n & & \end{matrix} = \begin{matrix} & & l & & m \\ & & \boxed{t_1} & & \boxed{p_1^T} \\ n & & & & \end{matrix} + \begin{matrix} & & l & & m \\ & & \boxed{t_2} & & \boxed{p_2^T} \\ n & & & & \end{matrix} + \dots + \begin{matrix} & & l & & m \\ & & \boxed{t_A} & & \boxed{p_A^T} \\ n & & & & \end{matrix}$$

Fonte: Otto (1999).

Os *scores* expressam as relações entre as amostras, uma vez que representam suas coordenadas no sistema de eixos formados pelas PCs, as quais são combinações lineares das variáveis originais. Os *loadings* representam quanto cada variável original contribuiu na formação de uma determinada PC. A primeira PC (PC1) é traçada no sentido da maior variação do conjunto de dados, sendo esta sua visão mais representativa. A PC2 é traçada ortogonalmente a primeira, descrevendo a maior porcentagem da variação não explicada por PC1, e assim por diante (FERREIRA, 2015; SOUZA; POPPI, 2012).

Havendo correlação entre as variáveis originais, apenas um subconjunto das PCs é necessário para representar o comportamento dos dados, sendo as demais referentes a informações irrelevantes. Essa compressão dos dados ocorre porque as variações sistemáticas dos dados originais foram concentradas em um número reduzido de novos eixos, o que significa que as últimas PCs, representadas pela matriz **E**, contêm informações aleatórias como erros experimentais. Dessa forma, a estrutura inerente aos dados é separada do ruído experimental (FERREIRA, 2015). Essas Componentes Principais descrevem as interações multivariadas entre as variáveis e possibilitada o reconhecimento de padrões e diferenciação entre amostras (ALMEIDA et al., 2013; BRO; SMILDE, 2014; LEME et al., 2019; RODRIGUES et al., 2022; WOLD; ESBENSEN; GELADI, 1987).

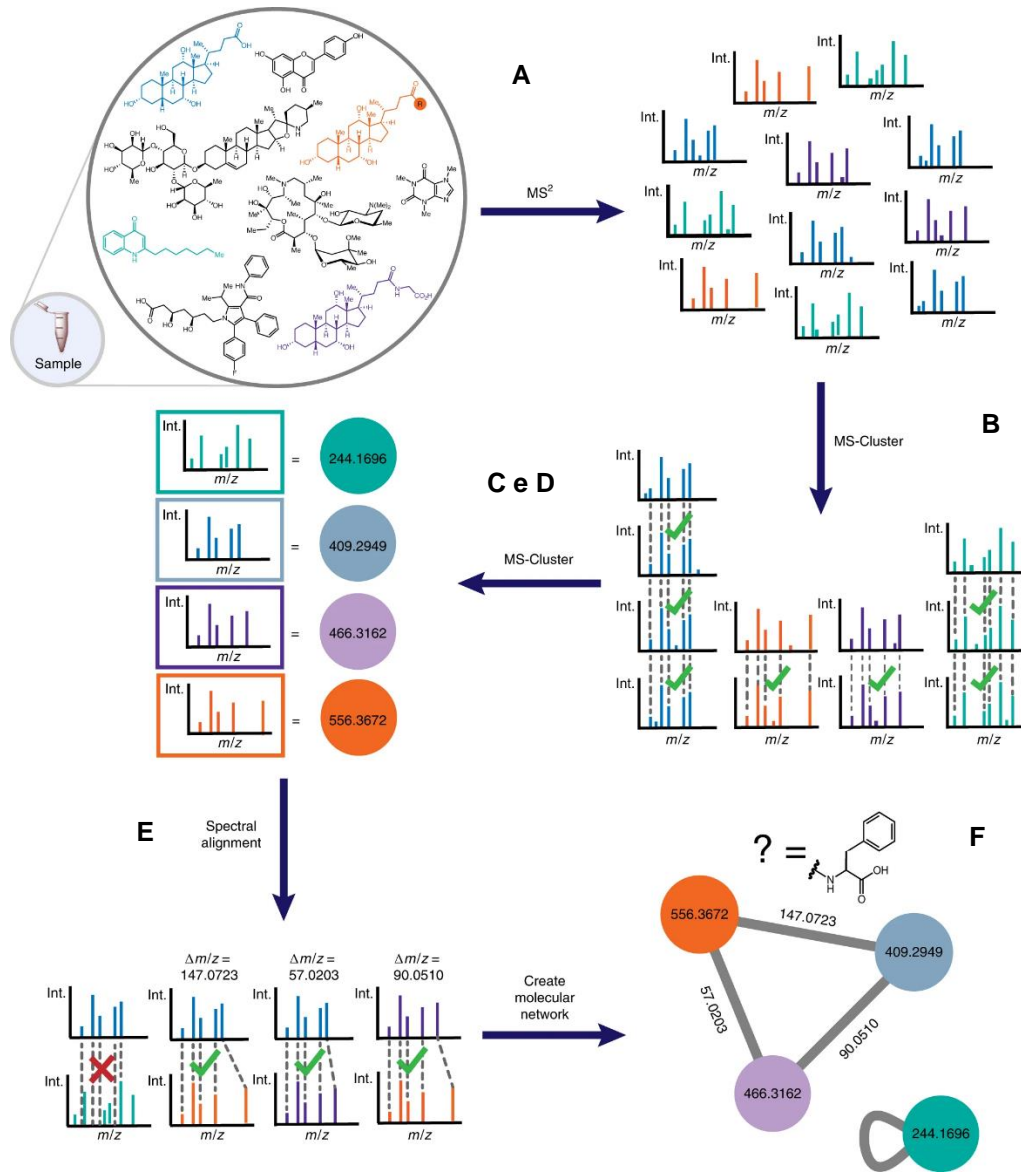
1.11 Molecular Networking

O *Molecular Network* (MN) é uma ferramenta de bioinformática, que se baseia em algoritmos matemáticos e tem como objetivo comparar espectros de fragmentação através de um mapa de similaridade espectral e agrupá-los (*cluster*) de acordo com sua semelhança de fragmentação (YANG et al., 2013).

Assim, o MN gerado a partir dos dados de MS (**A**) visa a organização dos mesmos a partir da semelhança espectral entre os padrões de fragmentação de íons precursores diferentes, mas que são estruturalmente correlacionados (**B**). Os espectros de íons precursores de mesma *m/z* e que possuem espectros de fragmentação semelhantes são incorporados em um único espectro de consenso (**C** e **D**). Assim, moléculas estruturalmente relacionadas produzem espectros de MS/MS semelhantes (**E**) que são

representados por um *cluster* visualizado em uma rede molecular. A espessura da linha que liga os *nodes* representa o escore de semelhança do cosseno, quanto mais próximo o valor de cosseno de 1, maior a semelhança no espectro de fragmentação sugerindo que os compostos possuem uma relação química, podendo constituir uma família de compostos da mesma classe química (**F**), conforme representado na Figura 5. (WATROUS et al., 2012; ARON et al., 2020).

Figura 5. Representação esquemática do processo de criação do *molecular network* a partir de espectros de massa em *tandem*.



Fonte: ARON et al. (2020).

Desta forma, a ferramenta MN tem como principal vantagem a exploração de milhares de dados de fragmentação sem qualquer informação prévia sobre a composição química das amostras, sendo uma poderosa ferramenta para estudos de metabolômica na qual as amostras possuem um alto grau de complexidade (QUINN et al., 2017).

Diversas plataformas *online* foram desenvolvidas para a identificação de compostos de matrizes biológicas complexas, como o GNPS (do inglês, *Global Natural Products*

Social Molecular Networking). O GNPS tem a capacidade de analisar um conjunto de dados e compará-lo com todos os dados disponíveis publicamente. Para isso, a plataforma permite o acesso a um conjunto de dados públicos depositados por pesquisadores do mundo todo através do repositório de dados denominado Ambiente Interativo Virtual de Espectrometria de Massas (MassIVE, do inglês *Mass Spectrometry Interactive Virtual Environment*). Cada uma dessas dezenas de milhões de espectros em conjuntos de dados GNPS é combinada com bibliotecas espectrais de referência para anotar moléculas e descobrir análogos putativos (WANG et al., 2016).

A análise em conjunto do íon precursor e de seus fragmentos podem auxiliar ainda mais para a dereplicação de metabólitos secundários de plantas. Como os espectros de MS/MS estão ligados à estrutura química das moléculas fragmentadas, o *molecular network* permite o agrupamento de moléculas de acordo com suas similaridades estruturais. O uso de dados MS/MS em para a construção de *molecular network* permite identificar compostos estruturalmente relacionados, desde que sejam comparados com dados de fragmentação em bancos de dados integrados. A plataforma GNPS contém um conjunto de bibliotecas com um grande banco de dados de espectros de MS/MS de produtos naturais conhecidos, além de ser possível buscar informações em outros bancos de dados gratuitos disponíveis como LipidMaps, MassBank, NIST, entre outros (ABBAS-MOHAMMADI et al., 2018).

A partir dos espectros de MS/MS, o *molecular network* é gerado utilizando os “escores de cossenos”, que medem a relação entre os espectros de MS/MS e podem ser observadas através do software Cytoscape®. Com o *molecular network* construído, é possível visualizar a relação molecular a partir da semelhança química entre as amostras e observar em quais conjuntos de amostras estão presentes os compostos analisados. Além disso, a identificação putativa de alguns compostos a partir da comparação dos espectros de massas adquiridos com aqueles disponíveis nos bancos de dados é obtida. (YANG et al., 2013).

2 Objetivo

Compreender a comunicação química que ocorre na interação planta-patógeno no patossistema soja- *P. pachyrhizi* através da abordagem metabolômica não direcionada através de espectrometria de massas de alta resolução (UHPLC-MS/MS), *softwares* metabolômicos (*molecular networking*) e Análises de Componentes Principais na investigação de metabólitos que auxiliem na resistência da planta.

2.1 Objetivos Específicos

- Analisar folhas de soja controle e inoculadas com *P. pachyrhizi* por UHPLC-ESI-QTOF-MS/MS em diferentes tempos após a inoculação;
- Construir um *molecular network* através dos dados de estudos de íons/fragmentos (MS/MS) obtidos dos extratos da folha controle e inoculada por *P. pachyrhizi*;
- Identificar/classificar química e putativamente os metabólitos produzidos envolvidas na resistência sistêmica induzida contra a infecção por *P. pachyrhizi*, em plantas de soja contendo gene de resistência (*Rpp*).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos biológicos com plantas de soja foram conduzidos na Embrapa Soja, Londrina-PR.

3.1 Materiais e Reagentes

Água com 0,1% ácido fórmico (v:v; grau MS), ácido fórmico ($\geq 96\%$ pureza) foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Acetonitrila, metanol e isopropanol de grau HPLC foram adquiridos da J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, EUA). Clorofórmio e etanol foram obtidos da Dinâmica (Diadema, SP, Brasil). Água ultra-pura foi produzida utilizando um sistema EMD Millipore Direct-Q™3 (Merck Millipore; Burlington, MA, EUA). Filtros de seringa (0.22 μm , PVDF, 33 mm) foram obtidos da Merck Millipore (Burlington, MA, EUA).

3.2 Plantas de soja

O experimento foi realizado com os genótipos de soja suscetíveis (BRS184) e um genótipo resistente com Rpp5. O isolado puro LPF16.1M foi usado para inocular ambos os genótipos. O ensaio foi feito com três repetições, cada uma com 3 plantas. Em seguida, as plantas de soja foram cultivadas em vasos plásticos de 0,5 L e mantidas em câmara climática de crescimento (Fitotron®). Quando as plantas atingiram o estágio V₃, o isolado de ferrugem foi inoculado na primeira e na segunda folha trifoliolada de cada planta. Por fim, estas folhas foram coletadas em intervalos de 0, 6, 12, e 24, horas após a inoculação (hpi).

3.3 Obtenção e preparo do inóculo de *Phakopsora pachyrhizi*

Os esporos de *Phakopsora pachyrhizi* foram fornecidos pelo Laboratório de Fitopatologia da Embrapa-Soja, obtidos a partir do cultivo de BRS 184 (padrão de suscetibilidade), com 92% de viabilidade de germinação. Posteriormente, o inóculo foi preparado em 500 mL de uma suspensão de esporos com concentração de $3,6 \times 10^4$ U mL⁻¹, em H₂O potável. Em seguida, a esta suspensão, foram adicionados 250 μL de EtOH 70% como agente dispersor. Por fim, para as plantas controle (falso-inoculadas) foi realizada a inoculação com os mesmos excipientes, porém, sem a presença de esporos.

3.4 Extração de Metabólitos

Para a realização do estudo do perfil metabólico das folhas de soja controle e inoculadas com *Phakopsora pachyrhizi* (*metabolic fingerprint*), a mistura ternária composta por clorofórmio/metanol/água 3:1:1 (v:v:v) foi utilizada como solvente extrator. As folhas de soja controle e inoculadas foram maceradas, separadamente, para aumento da superfície de contato do material vegetal, utilizando nitrogênio líquido para evitar alterações metabólicas.

Após, cerca de 100 mg do *pool* de tecido vegetal foram transferidos para frascos de vidro de 2 mL com posterior adição de 1,5 mL do sistema solvente, agitados por 10 s em vortex até a completa homogeneização. Posteriormente, foram submetidos a banho ultrassônico por 25 min em banho de gelo. Após, foi realizada centrifugação a 12.000 rpm por 10 minutos a 4 °C, onde o sobrenadante foi coletado e filtrado em filtro de seringa Milipore® ($\varnothing = 0,22 \mu\text{m}$).

O procedimento de extração foi realizado em três repetições para cada tipo de amostra de folha (controle e inoculada). Por fim, as amostras foram concentradas em fluxo de nitrogênio e armazenadas em freezer -20 °C para posterior análise.

3.5 Análises por UHPLC-ESI-MS/MS

Os extratos foram ressuspensos em 600 μL de água/acetonitrila (1:1 v/v) e 10 μL de cada extrato serão injetados e analisados utilizando um cromatógrafo líquido de ultra alta eficiência (Shimadzu, Nexera X2, Japão). A separação cromatográfica foi realizada utilizando uma coluna Acquity UPLC® HSS T3 C18 (Waters, EUA, 1,7 μm , com 2.1x100 mm) com vazão de 0,250 mL min^{-1} . A composição da fase móvel foi composta de fase A (H₂O) e fase B acetonitrila (ACN), ambas acidificadas com 0,1% de ácido fórmico. A temperatura da coluna foi mantida por 40 °C durante toda corrida. Por fim, foram realizadas corridas cromatográficas de 20 min, sendo os 4 minutos finais destinados à regeneração da coluna para a próxima análise.

Os experimentos de fragmentação MS/MS foram realizados em um espectrômetro de massas de alta resolução Impact II® (Bruker Daltonics Corporation, Alemanha) de geometria Q-TOF, equipado com uma fonte de ionização do tipo *electrospray*. O instrumento foi calibrado utilizando uma solução de formiato de sódio (solução de NaOH

10 mmol L⁻¹ em solução de isopropanol:água 1:1 (v/v) contendo ácido fórmico concentrado). A fonte de ionização foi operada no modo positivo de ionização e ajustado para 4500 V, com um potencial de *end plate offset* -500 V. Os parâmetros do gás secante foram ajustados para 8 L min⁻¹ a 180 °C e pressão do gás de nebulização a 4 bar. Os dados foram adquiridos na faixa de *m/z* 50 a 1800 com uma taxa de aquisição de 5 Hz. Por fim, os 5 (cinco) íons mais intensos foram selecionados para fragmentação automática (Auto MS/MS). Os dados foram adquiridos pelo software Hystar Aplication® versão 3.2 e Otof Control®(Bruker Daltonics Corporation, Alemanha) e foram convertidos para o formato de arquivo mzXML.

3.6 Molecular Networking

Os dados de MS/MS foram transferidos para o servidor da plataforma virtual GNPS para gerar os mapas químicos, de acordo com a documentação da plataforma (WANG et al., 2016). A rede molecular foi gerada de modo que a tolerância de massa dos íons precursores fosse 0,02 Da, uma vez que, este valor influencia no agrupamento de espectros de fragmentação (MS/MS) quase idênticos. Para cada grupo de espectros de MS/MS adquirido, foi considerado para agrupamento (criação de espectro consenso) a variação de massa dos íons fragmentos, que podem ser deslocados de seus valores m/z esperados foi estipulada como $\pm 0,02$ Da.

As linhas (relações entre os nodes) serão formadas somente se a pontuação de cosseno for acima de 0,7 e, com uma correspondência mínima de 4 picos no espectro de fragmentação. Os espectros do MN foram então comparados com os espectros das bibliotecas espectrais do GNPS, como ReSpect, Massbank, NIST14 e HMDB (FORSYTHE; WISHART, 2009; HORAI et al., 2010; SAWADA et al., 2012; STEIN, 2014; WANG et al., 2016). Além disso, foram aplicados os mesmos parâmetros dos dados para os espectros das amostras. Os dados da rede molecular foram visualizados no software Cytoscape® (SHANNON et al., 2003), onde os espectros de fragmentação dos íons que apresentaram similaridade (HIT) com os espectros das bibliotecas foram confrontados manualmente com os espectros de fragmentação dos compostos propostos, sendo seus erros de massas calculados e somente aceitos se inferiores a 10 ppm.

3.7 Processamento de dados

Os dados obtidos após as análises por UHPLC-ESI(+)-MS/MS foram processados no software ProfileAnalysis®, versão 2.1 (Bruker Daltonics, Alemanha) para a construção de matrizes de variável (*bucket table*) que representam as intensidades dos sinais em uma respectiva janela de tempo de retenção, contemplando as corridas cromatográficas de 0,1 a 18 min (onde os picos cromatográficos de interesse se apresentaram), na faixa de m/z 50 a 1800.

Em seguida, os compostos foram relacionados às respectivas massas utilizando-se o algoritmo de busca de características moleculares (FMF, do inglês *find molecular features*). O algoritmo SmartFormula® (DataAnalysis versão 4.2, Bruker Daltonics,

Alemanha) foi utilizado para a atribuição da fórmula molecular dos íons detectados, e a identificação dos metabólitos foi feita utilizando bancos de dados públicos KEGG, ChEBI, MetFrag, METLIN, GNPS e dados da literatura obtidas em *sites* indexados.

3.8 Análises quimiométricas

Os arquivos de dados brutos do UHPLC-ESI-MS/MS foram carregados no *software* ProfileAnalysis (Bruker Daltonics Corporation, Alemanha) para correção do tempo de retenção, alinhamento, integração automática e intensidade. Além disso, o *software* organiza os dados em formato matricial, em que as linhas correspondem aos espectros de massas de cada amostra e as colunas correspondem aos valores de tempo de retenção e massa/carga (tr: m/z).

Estudos metabolômicos são caracterizados por conjuntos complexos de dados multivariados, em que geralmente há ruído e menos amostras do que características moleculares (RUIZ-PEREZ et al., 2020). PCA é uma ferramenta quimiométrica importante para visualização e melhor interpretação de conjuntos de dados multivariados (RUIZ-PEREZ et al., 2020). Antes das análises quimiométricas, foram aplicadas técnicas de pré-processamento ao conjunto de dados brutos para remover variações sistemáticas indesejáveis, compensar quaisquer alterações nas condições experimentais e aprimorar os resultados (ALMEIDA et al., 2013; BAQUETA et al., 2021). A escolha das técnicas de pré-processamento foi baseada no erro do modelo. Nesse sentido, os dados foram centrados na média e dimensionados pela escala de Pareto.

O pré-processamento e análises quimiométricas foram realizados utilizando o *software* Matlab® R2022b e PLS_Toolbox 9.2 (Eigenvector Research, Inc.).

3.9 Análise de Componentes Principais

A Análise de Componentes Principais foi realizada para investigar tendências entre as amostras do conjunto de dados. PCA é um método não supervisionado que extrai as componentes mais importantes do conjunto de dados, auxiliando na interpretação (ALMEIDA et al., 2013; LEME et al., 2019).

O número de PCs utilizadas para a construção do modelo foi determinado baseando-se na variância total explicada, considerando como limite a PC necessária para

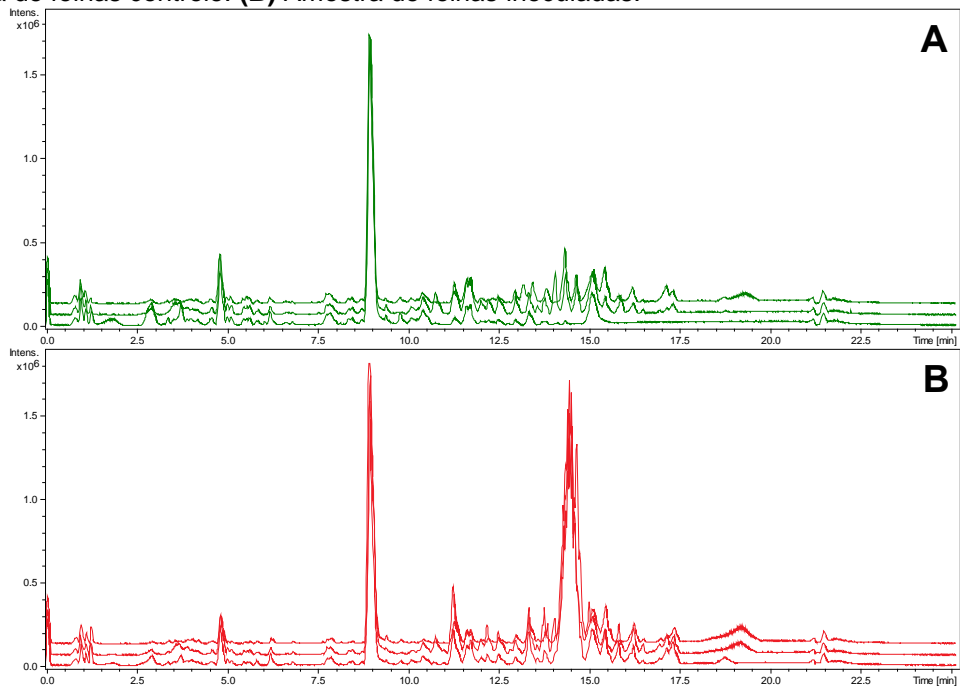
capturar a primeira variância total acima de 90%. As PCs que acumulam grande parte da variância explicada são importantes, enquanto aquelas que explicam as menores variâncias geralmente explicam artefatos e ruído (ALMEIDA et al., 2013). Similaridades e diferenças entre amostras podem ser observadas nos *scores* das PCs, enquanto as variáveis que explicam essas diferenças são indicadas nos *loadings* (ALMEIDA et al., 2013; LEME et al., 2019).

4 Resultados e discussão

4.1 Análise de impressão digital metabólica

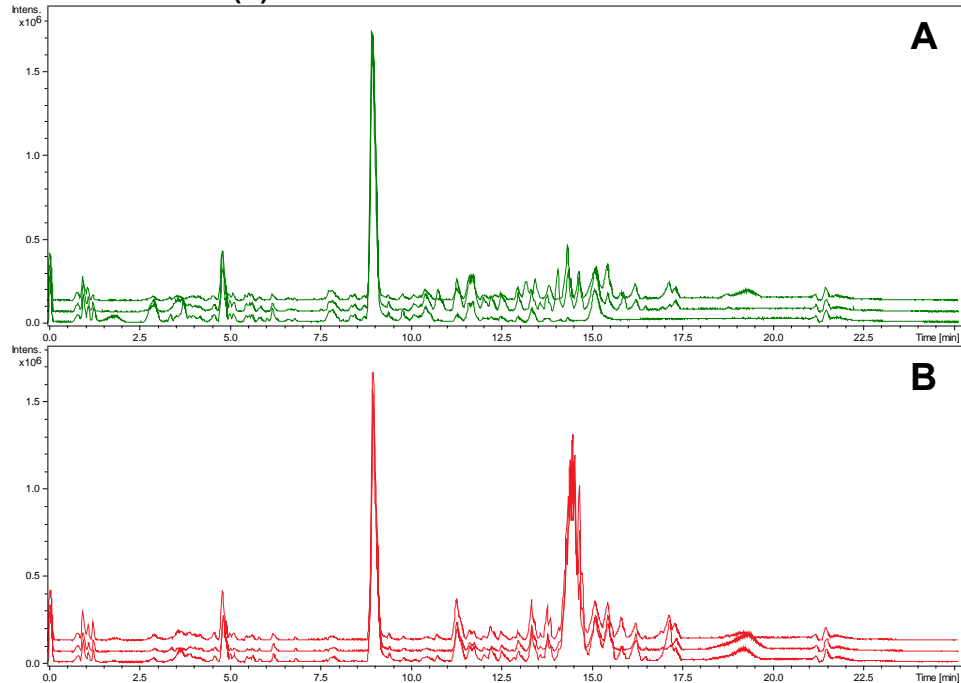
O perfil metabólico compreensivo de folhas de soja controle (C/falso-inoculadas) e inoculadas (I) com *P. pachyrhizi* foram extraídas após 0, 6, 12 e 24 horas de inoculação. A averiguação visual dos dados de UHPLC-ESI-MS/MS revelou diferenças entre os perfis metabólicos dos grupos C e I, tanto na presença e ausência de picos cromatográficos quanto em suas intensidades, apresentadas nas Figuras 6, 7, 8 e 9. Para as amostras analisadas nos tempos 0 e 6 horas após a inoculação com *P. pachyrhizi*, as divergências mais evidentes se concentram nos tempos de retenção 11 min e 12,5 – 15 min; para as amostras do tempo 12 horas após a inoculação com *P. pachyrhizi*, foram observadas diferenças nos tempos de retenção 2,5 – 5 min e 11 – 16,5 min; por fim, para as amostras do tempo 24 horas após a inoculação, as principais diferenças se dão nos tempos de retenção, 11 – 15,5 min e 16 – 20 min.

Figura 6. Sobreposição dos cromatogramas de pico base (BPC) dos extratos de folhas de soja do sistema solvente (3:1:1 v/v/v clorofórmio/metanol/água), após análise por UHPLC-ESI(+)-MS/MS no tempo 0 hora. **(A)** Amostra de folhas controle. **(B)** Amostra de folhas inoculadas.



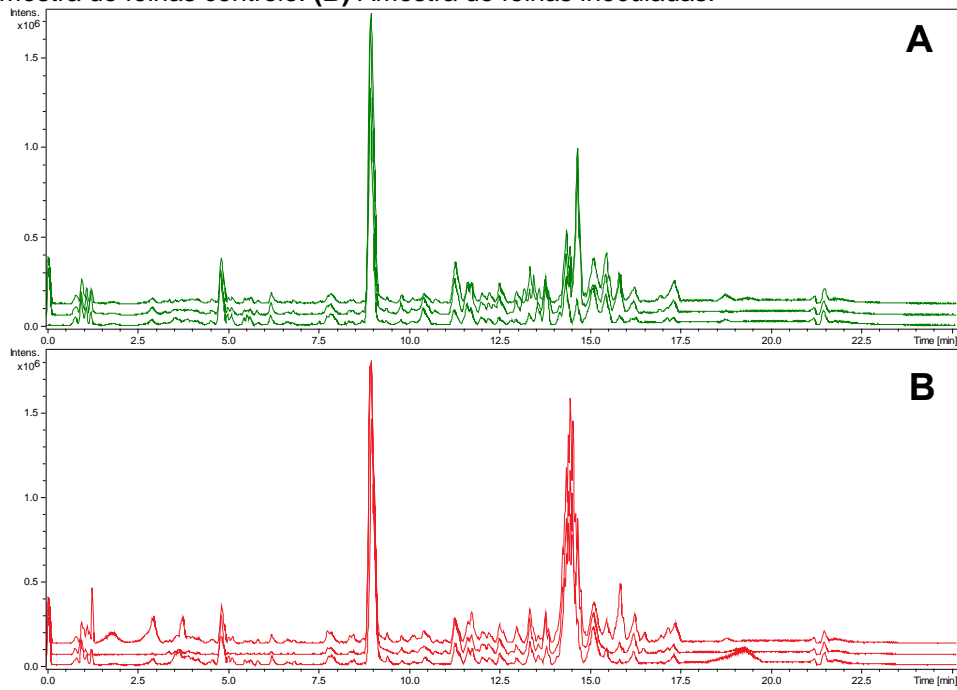
Fonte: Autoria própria (2023).

Figura 7. Sobreposição dos cromatogramas de pico base (BPC) dos extratos de folhas de soja do sistema solvente (3:1:1 v/v/v clorofórmio/metanol/água), após análise por UHPLC-ESI(+)-MS/MS no tempo 6 horas. **(A)** Amostra de folhas controle. **(B)** Amostra de folhas inoculadas.



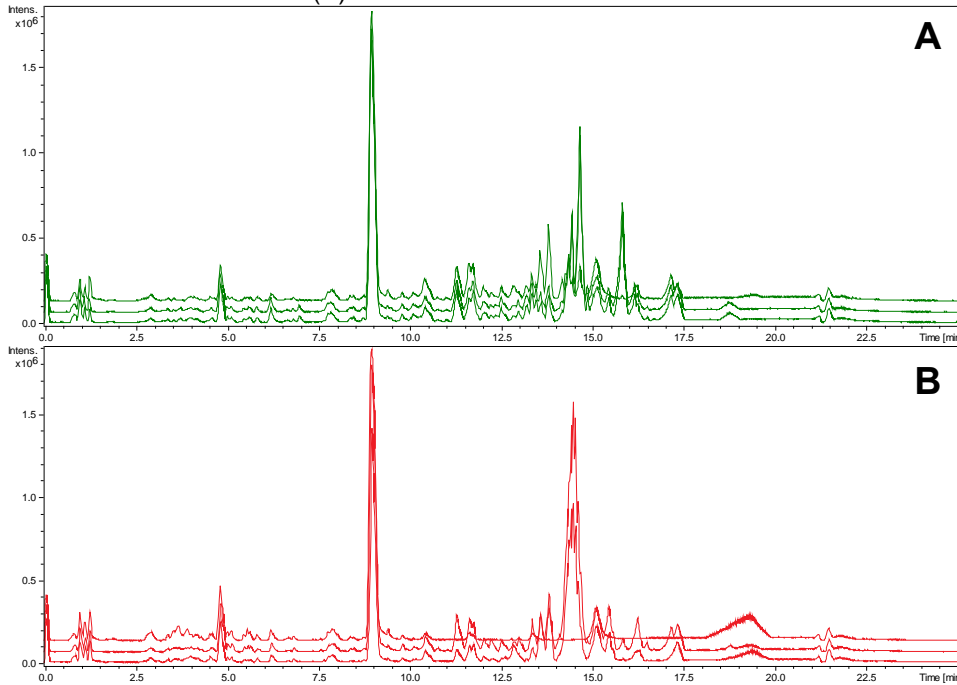
Fonte: Autoria própria (2023).

Figura 8. Sobreposição dos cromatogramas de pico base (BPC) dos extratos de folhas de soja do sistema solvente (3:1:1 v/v/v clorofórmio/metanol/água), após análise por UHPLC-ESI(+)-MS/MS no tempo 12 horas. **(A)** Amostra de folhas controle. **(B)** Amostra de folhas inoculadas.



Fonte: Autoria própria (2023).

Figura 9. Sobreposição dos cromatogramas de pico base (BPC) dos extratos de folhas de soja do sistema solvente (3:1:1 v/v/v clorofórmio/metanol/água), após análise por UHPLC-ESI(+)-MS/MS no tempo 12 horas. **(A)** Amostra de folhas controle. **(B)** Amostra de folhas inoculadas.



Fonte: Autoria própria (2023)

Foram extraídos e analisados os espectros de massas e seus respectivos espectros de fragmentação obtidos a partir dos cromatogramas das Figuras 6, 7, 8 e 9. Apesar de muito informativos, a grande quantidade e complexidade desses espectros de massas dificulta a interpretação e comparação exploratória acerca das similaridades e diferenças entre as amostras.

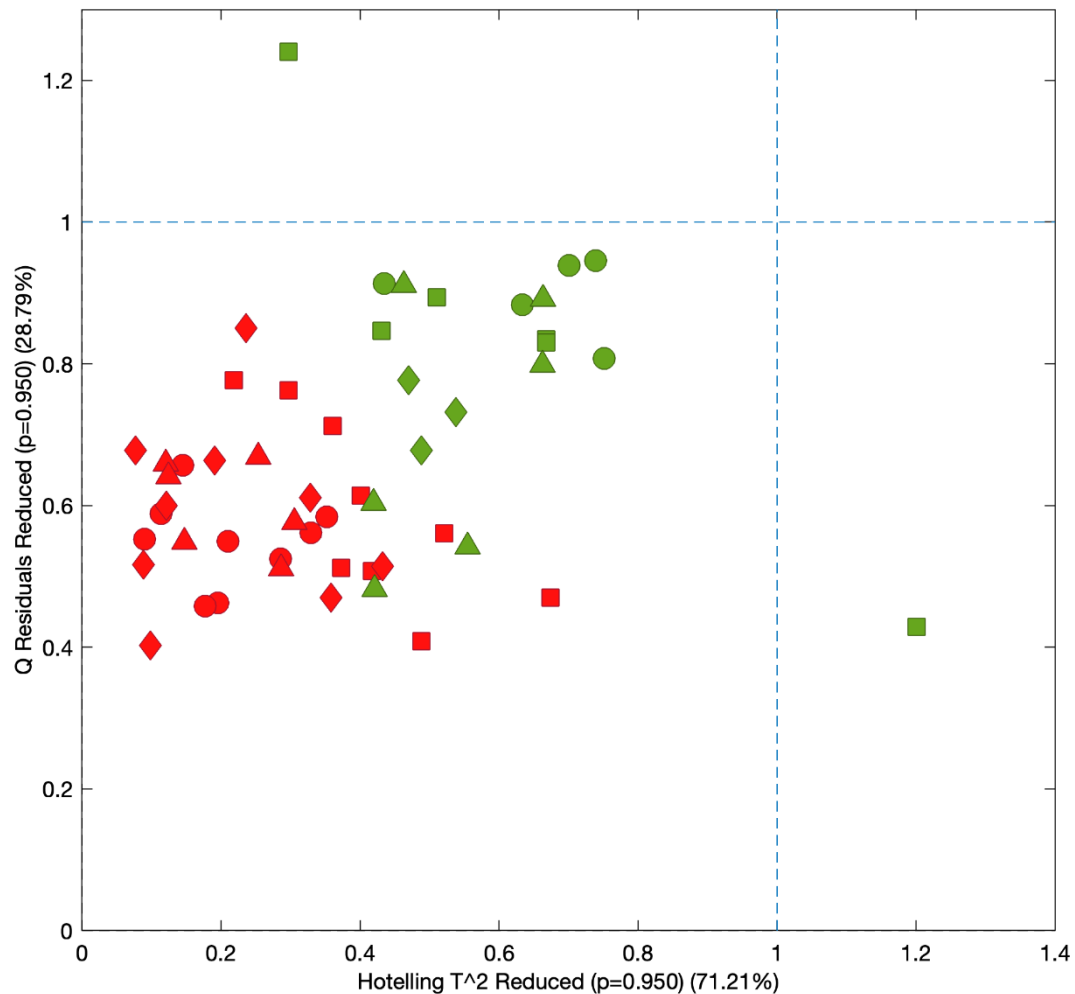
Dessa forma, métodos quimiométricos e *molecular networking* foram empregados em conjunto para análise de padrões e discriminação de amostras para identificação dos compostos importantes nas diferenças metabólicas causadas pela infecção de *P. pachyrhizi*.

4.2 Análise de Componentes Principais dos dados UHPLC-ESI-MS/MS

A Análise de Componente Principais dos espectros de massas dos extratos das folhas de soja coletadas nos tempos 0, 6, 12 e 24 horas dos grupos controle e inoculado demandou 12 PCs para explicar 71.21% da variância total dos dados.

Para investigar a presença de amostras de comportamento anômalo foi realizada a análise de identificação de *outliers* através da relação entre *Hotelling T²* e *Q Residuals*. Esses parâmetros sintetizam quão bem o modelo descreve determinada amostra e porque essa amostra tem seus *scores* observados em cada modelo (BELINATO et al., 2019b). *Hotelling T²* representa a variação de cada amostra dentro do modelo e *Q Residuals* estão relacionados à sua falta de ajuste (BELINATO et al., 2019b; PEREIRA et al., 2018). Se a amostra apresentar alto *Hotelling T²* e *Q Residuals*, simultaneamente, sugere-se que seja uma amostra anômala (*outlier*), ou seja, muito diferente das demais (PEREIRA et al., 2018). A avaliação de *outlier* foi realizada a partir da contraposição de *Hotelling T² versus Q residuals*, apresentada na Figura 10.

Figura 10. Q residuals versus Hotelling T². (●) Grupo C. (●) Grupo I. (---) Limite de confiança de 95%.



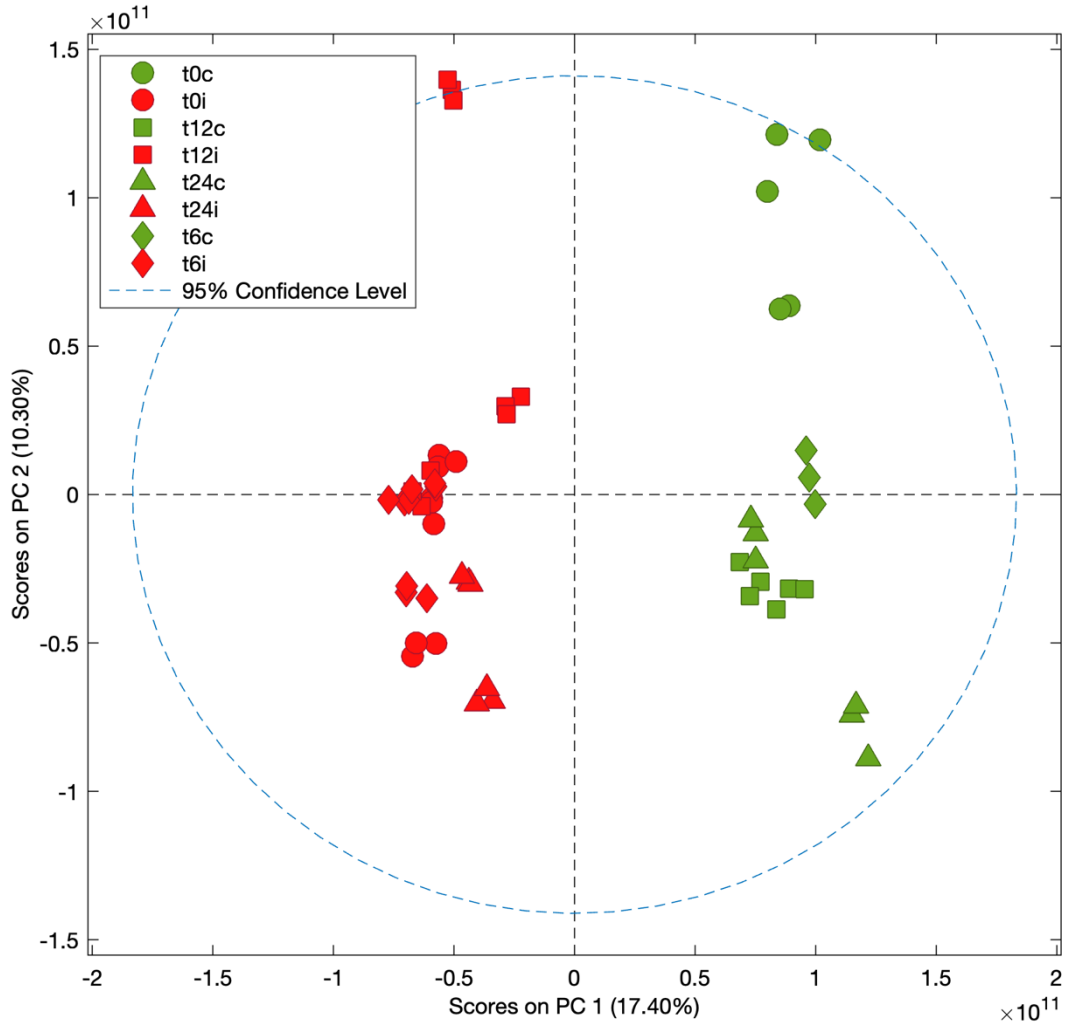
Fonte: Autoria própria (2023).

Através da análise da Figura 10, verifica-se que uma amostra da coleta no tempo 12 horas do grupo controle apresentou valor de *Hotelling T²* acima do limite de confiança de 95%, entretanto, estava dentro do limite de confiança de 95% para *Q Residuals*. Isso indica que o perfil dessa amostra apresenta grande variação em relação às demais, entretanto, o modelo é capaz de descrevê-la bem. Por outro lado, outra amostra da coleta no tempo 12 horas do grupo controle apresentou valores de *Q Residuals* acima do limite de confiança de 95%, mas manteve-se dentro do limite de confiança 95% para *Hotelling T²*. Dessa forma, é possível afirmar que há falta de ajuste do modelo em relação a essa

amostra, mesmo que o perfil seja parecido com as demais. Entretanto, não foram identificados *outliers*, visto que nenhuma das amostras apresentou, simultaneamente, valores de *Hotelling T²* e *Q residuals* acima do limite de confiança de 95%.

Os *scores* das 12 PCs e suas contraposições foram investigadas, sendo escolhidas para discussão aquelas que apresentassem padrões que permitissem examinar a diferenciação entre os tempos de coleta e os grupos controle e inoculado. Os *scores* de PC1 versus PC2 acumulou a maior variância explicada do modelo, totalizando 27.7%. Esta contraposição mostra a separação das amostras em relação à PC1 explicada pela inoculação de *P. pachyrrhizi*, como pode ser observado na Figura 11, em que foram atribuídos valores positivos para as amostras Controle e negativos para as amostras Inoculadas.

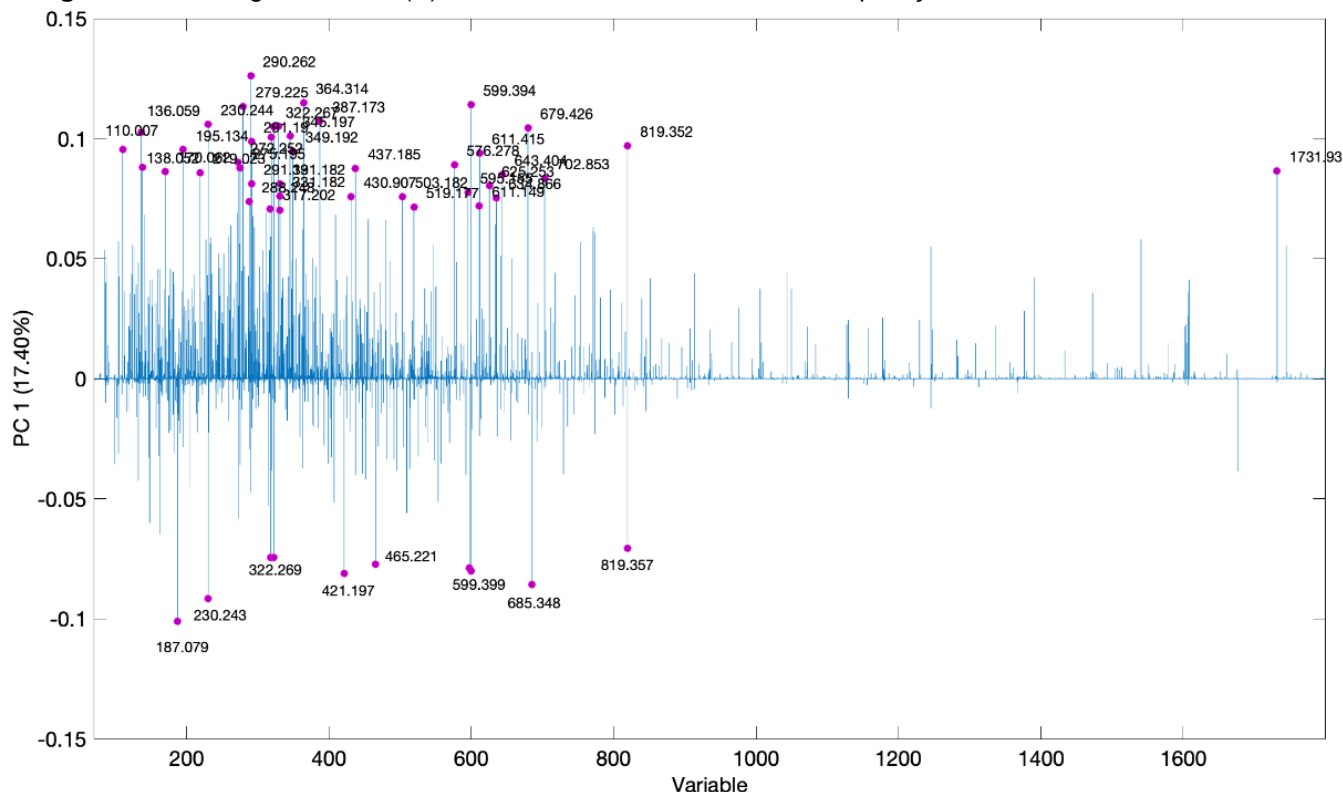
Figura 11. Scores de PCA (PC1 vs PC2) dos espectros de massas obtidos por UHPLC-ESI-MS/MS dos extratos de folhas de soja não inoculadas (●) e inoculadas (●) com *P. pachyrhizi*. Amostras coletadas (○) 0 horas, (◇) 6 horas, (□) 12 horas, (△) 24 horas após inoculação de *P. pachyrhizi*.



Fonte: Autoria própria (2023).

A separação das amostras em decorrência da infecção por *P. pachyrhizi* observada na Figura 11 é explicada pelos *loadings* apresentados na Figura 12. O agrupamento do grupo controle é explicado pelas similaridades das amostras quanto à abundância dos íons com valores positivos em PC1, enquanto para o grupo inoculado, o agrupamento é explicado pelos íons com valores negativos em PC1. Estes íons foram destacados na Figura 11 e serão melhor discutidos posteriormente.

Figura 12. Loadings de PC1 e (●) íons de maior influência sobre a separação.



Fonte: Autoria própria (2023).

4.3 *Molecular Networking* e identificação de metabólitos

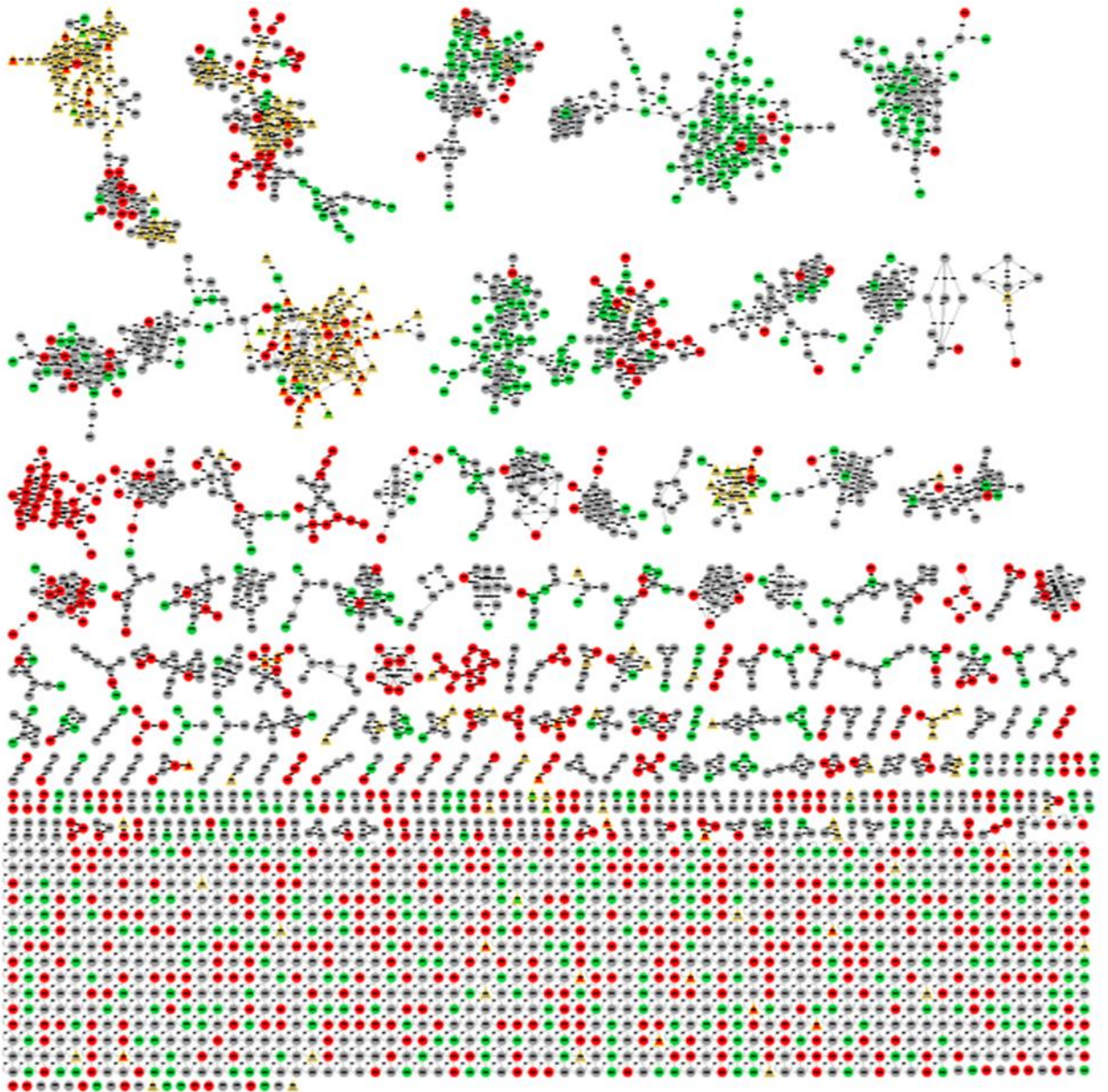
A plataforma GNPS foi utilizada para organizar os dados de UHPLC-ESI(+)-MS/MS e obter informações sobre as características moleculares selecionadas a partir da análise estática e multivariada por meio de classificação química putativa.

A ferramenta MN correlaciona os espectros de MS/MS de acordo com a semelhança dos padrões de fragmentação de íons precursores relacionados. Dessa forma, os compostos relacionados através de seus perfis de fragmentação são agrupados em *clusters* representados por um node, proporcionando melhor visualização dos dados e diminuindo o tempo de mineração de dados de estudos metabolômicos não direcionados. A análise do mapa químico destaca compostos estruturalmente relacionados e, ao comparar os espectros de MS/MS com as bases de dados da plataforma, facilita o processo de classificação química e identificação putativa dos compostos.

Os dados de UHPLC-ESI-MS/MS das folhas de soja não inoculadas e inoculadas com *P. pachyrhizi* foram organizados em um MN que pode ser observada na Figura 13.

Os espectros de MS/MS detectados nas análises das plantas controle e inoculadas com *P. pachyrhizi* foram combinados na rede molecular e um total de 2841 nodes (espectros de consenso) foram obtidos. Do total, 725 (25,52%) espectros de consenso foram obtidos exclusivamente quando *P. pachyrhizi* foi inoculado em plantas de soja (nodes vermelhos); 590 (20,77%) espectros de consenso foram obtidos para plantas do grupo controle (nodes verdes) e 1526 (53,71%) espectros de consenso obtidos para ambos os grupos (nodes cinzas). Além disso, 212 espectros de consenso (7,46%) foram compatíveis com a biblioteca do GNPS (nodes bordas amarelas) e estão apresentados na Tabela 3. As correspondências foram confirmadas manualmente através da comparação entre os espectros de fragmentação obtidos e aqueles encontrados na literatura e em bancos de dados públicos e pelo cálculo de erro de massas.

Figura 13. Rede molecular dos espectros de fragmentação obtidos através da análise UHPLC-ESI-MS/MS de folhas de soja não inoculadas e inoculadas com *P. pachyrhizi*. (●) Nodes de espectros de consenso observados exclusivamente em amostras não inoculadas (●) nodes de espectros de consenso observados exclusivamente em amostras inoculadas com *P. pachyrhizi*. (○) nodes de espectros de consenso compartilhados entre ambos os grupos de amostras. (△) Nodes de espectros de consenso que apresentaram correspondência aos espectros de fragmentação encontrados nas bibliotecas espectrais da plataforma GNPS.



Fonte: Autoria própria (2023).

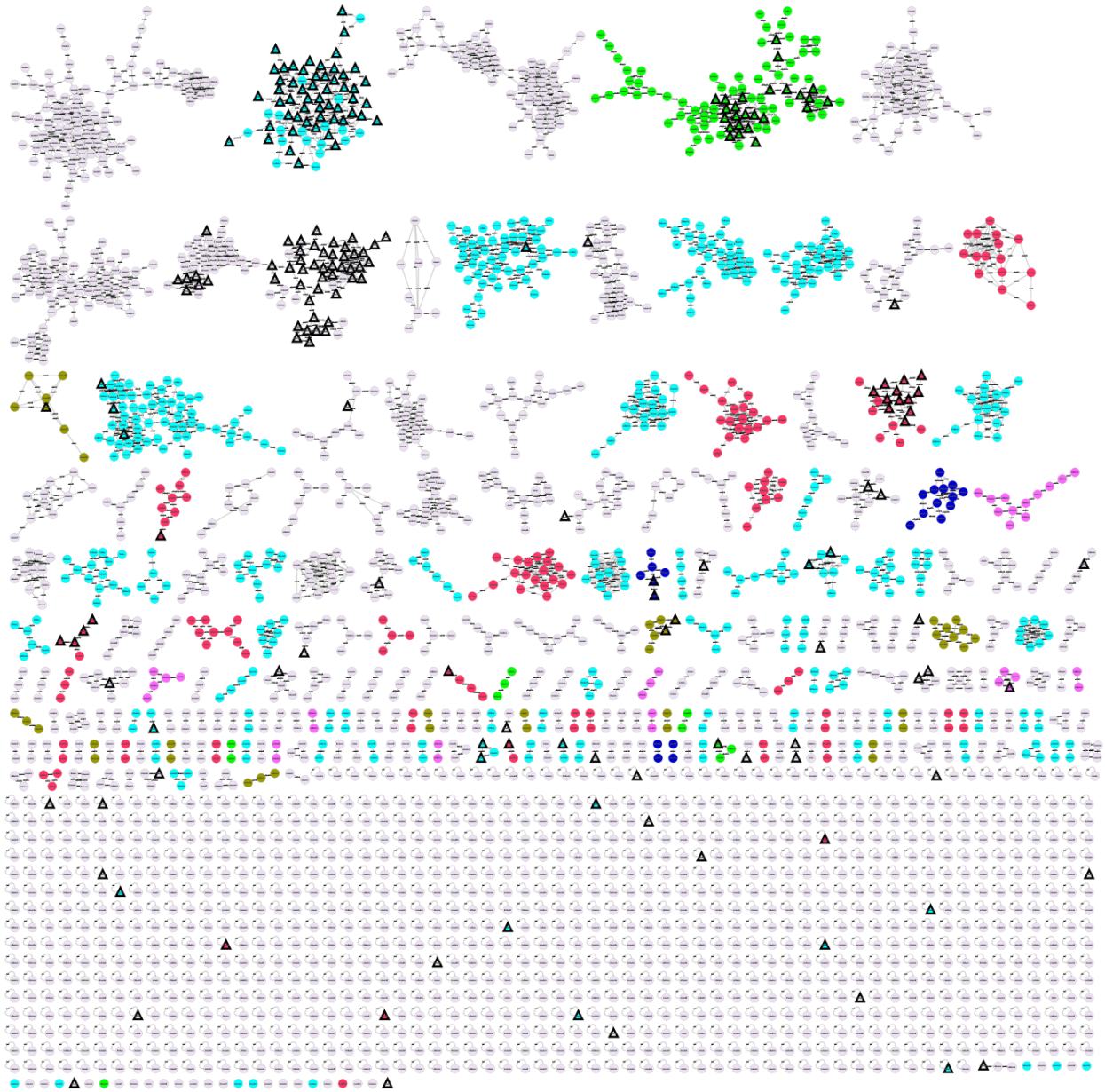
A ferramenta MolNetEnhancer foi aplicada ao MN clássico para aprimorar as informações estruturais químicas e anotar putativamente as classes químicas dos compostos detectados nas amostras controle e inoculadas com *P. pachyrhizi*. Essa análise revelou as diferentes classes a que os metabólitos detectados pertencem, como flavonoides, isoflavonoides, lipídeos, terpenos, aminoácidos e peptídeos, entre outras classes, como pode ser visto na Figura 14

Como apresentado na Tabela 1, foram putativamente atribuídas a classe de 880 compostos, representando 30,98% do total. A classe de lipídeos e análogos foi predominante, cabendo destaque também às classes de aminoácidos e peptídeos (149 compostos) e flavonoides (99 compostos).

Tabela 1. Classes químicas dos compostos putativamente atribuídas.

Classe química	Nº de compostos
Lipídeos	557
Aminoácidos e peptídeos	149
Terpenos e saponinas	19
Flavonoides	99
Isoflavonoides	22
Cumarinas	34
Desconhecidos	1961

Figura 14. Rede molecular por classes dos espectros de fragmentação obtidos através da análise UHPLC-ESI-MS/MS de folhas de soja não inoculadas e inoculadas com *P. pachyrhizi*. (●) Lipídeos (●) Aminoácidos e peptídeos (●) Terpenos. (●) Flavonoides. (●) Isoflavonoides (●) Cumarinas (○) Sem correspondência de classes (▲) Nodes de espectros de consenso que apresentaram correspondência aos espectros de fragmentação encontrados nas bibliotecas espectrais da plataforma GNPS.



Fonte: Autoria própria (2023).

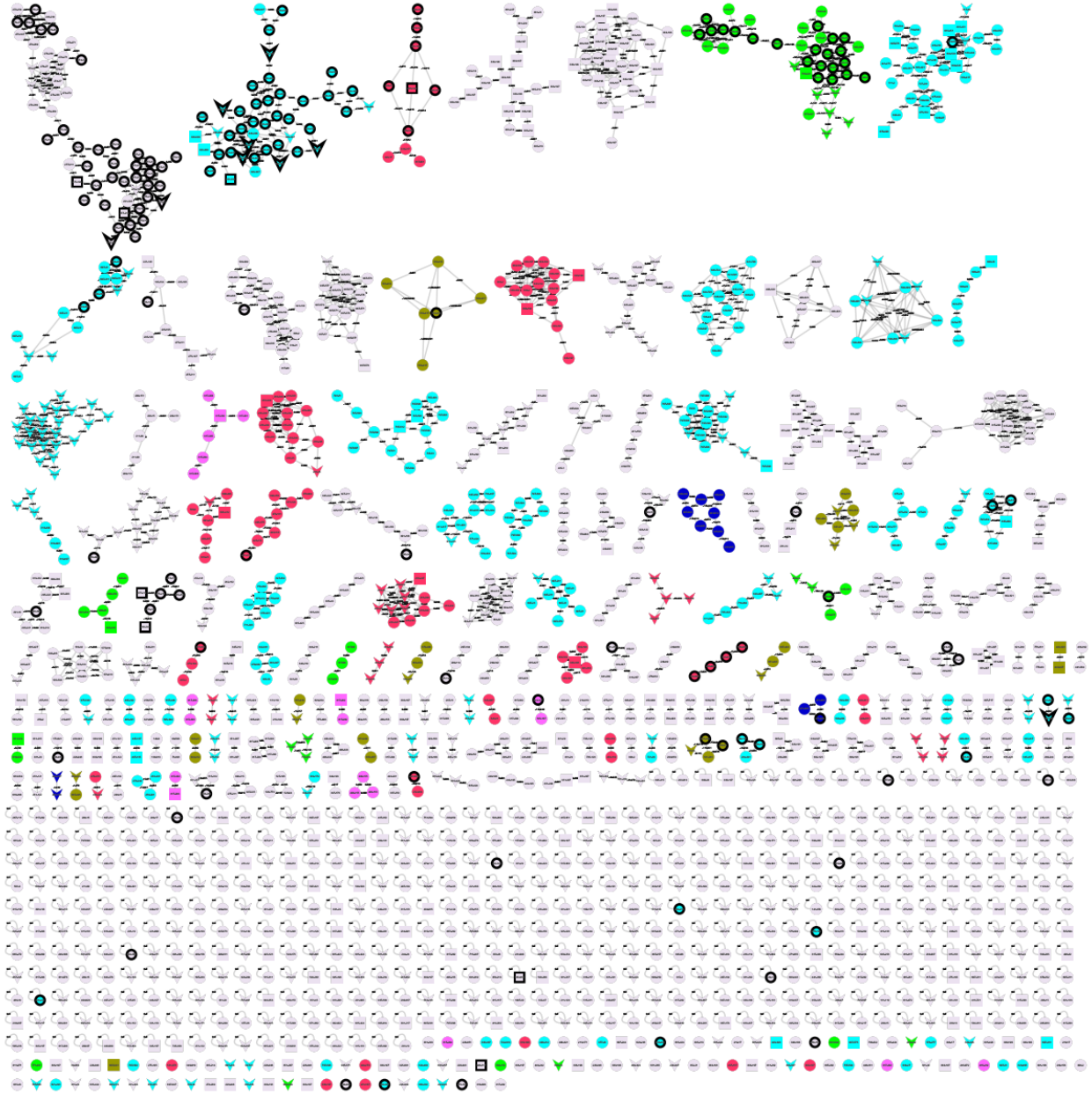
Na figura 15, estão apresentados 1661 compostos encontrados nas amostras coletadas 0 horas após a inoculação com *P. pachyrhizi*, sendo 113 encontrados exclusivamente nesse tempo (9,73%). Do total, 212 compostos (12,76%) foram encontrados apenas no grupo C, 328 (19,74%) no grupo I e 1121 em ambos os grupos (73,51%). Foram putativamente atribuídas as classes de 1053 compostos, dos quais foi possível observar a predominância de lipídeos e análogos (351 compostos), além de aminoácidos e peptídeos (106 compostos).

A coleta das amostras após 6 horas de inoculação com *P. pachyrhizi* indicou um total de 278 (14,99%) compostos encontrados exclusivamente nesse tempo. Na figura 16, estão mostrados os 1854 compostos encontrados, sendo 316 (17,04%) exclusivos do grupo C, 443 (23,89%) do grupo I e 1095 compostos em ambos os grupos (59,06%). Do total de 1166 compostos que tiveram suas classes atribuídas, é possível perceber uma predominância de lipídeos e análogos (384 compostos) bem como aminoácidos e peptídeos (101 compostos).

Após 12 horas de inoculação com *P. pachyrhizi*, foram encontrados um total de 106 (5,93%) de compostos exclusivos desse tempo. Na figura 17, estão apresentados os 1789 compostos encontrados, sendo que, destes, 209 (11,68%) pertencem exclusivamente ao grupo C, 312 (17,44%) ao grupo I e 1174 (65,62%) presentes nos dois grupos. Foi possível atribuir as classes de 1152 compostos, onde tem-se uma predominância de lipídeos e análogos (373 compostos) e aminoácidos e peptídeos (99 compostos).

Após 24 horas de inoculação com o fungo, foram encontrados um total de 141 compostos exclusivos desse tempo. Na figura 18, estão apresentados os 1713 compostos encontrados, sendo 297 (17,34%) presentes exclusivamente no grupo C, 297 (17,34%) exclusivamente no grupo I e 1119 (65,32%) em ambos os grupos. As classes químicas atribuídas representam um total de 1085 compostos, com uma predominância de lipídeos e análogos (327 compostos) e aminoácidos e peptídeos (112 compostos).

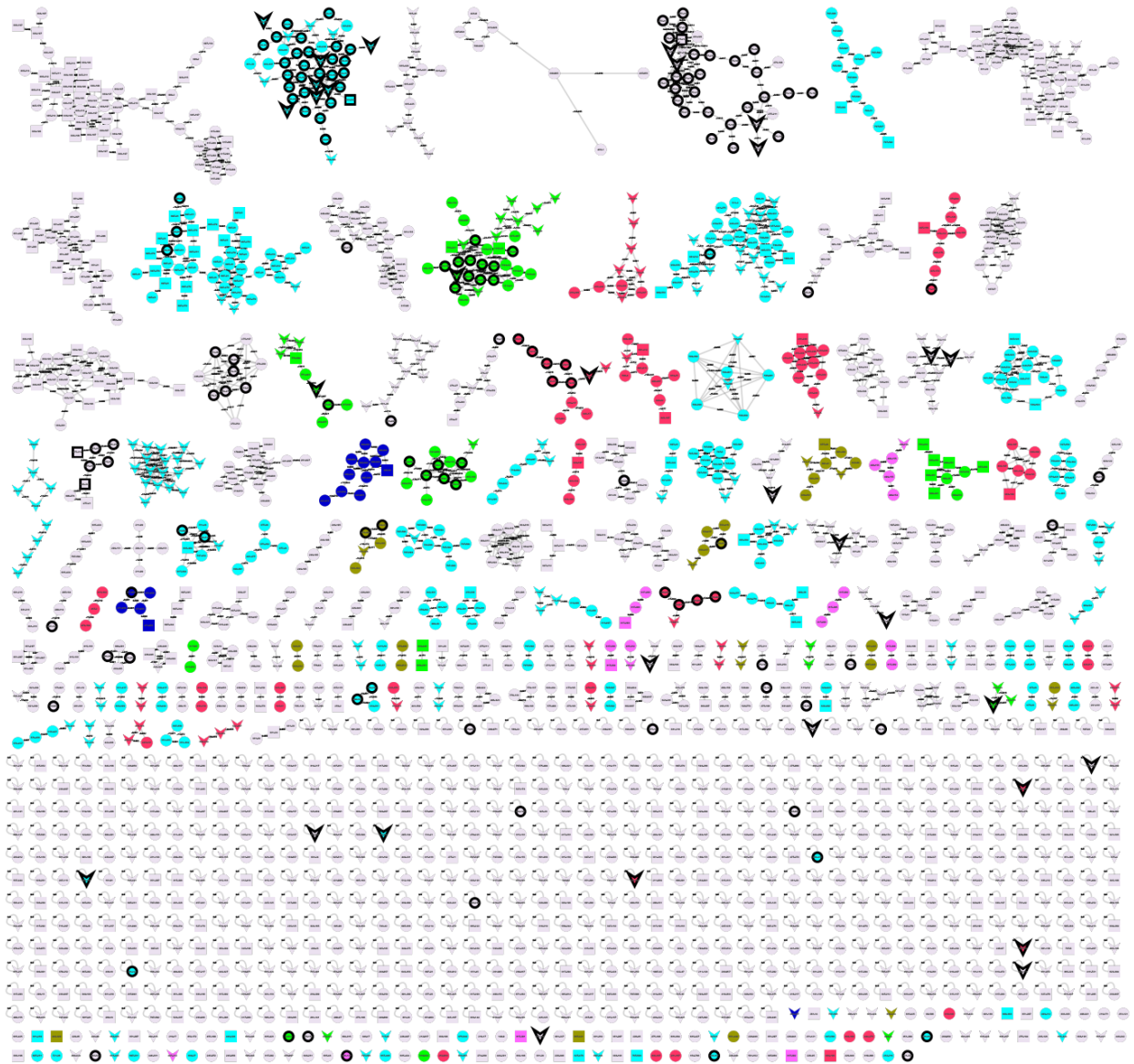
Figura 15. Rede molecular por classes dos espectros de fragmentação obtidos através da análise UHPLC-ESI-MS/MS de folhas de soja não inoculadas e inoculadas com *P. pachyrhizi* coletadas após **0 horas**. (●) Lipídeos (●) Aminoácidos e peptídeos (●) Terpenos. (●) Flavonoides. (●) Isoflavonoides (●) Cumarinas. (○) Sem correspondência de classes. (□) Nodes de compostos encontrados exclusivamente em amostras do grupo não inoculado (▽) Nodes de compostos encontrados exclusivamente em amostras do grupo inoculado. (○) Nodes de compostos encontrados exclusivamente em amostras coletadas após 0 horas.



Fonte: Autoria própria (2023).

Figura 16. Rede molecular por classes dos espectros de fragmentação obtidos através da análise UHPLC-ESI-MS/MS de folhas de soja não inoculadas e inoculadas com *P. pachyrhizi* coletadas após 6 horas.

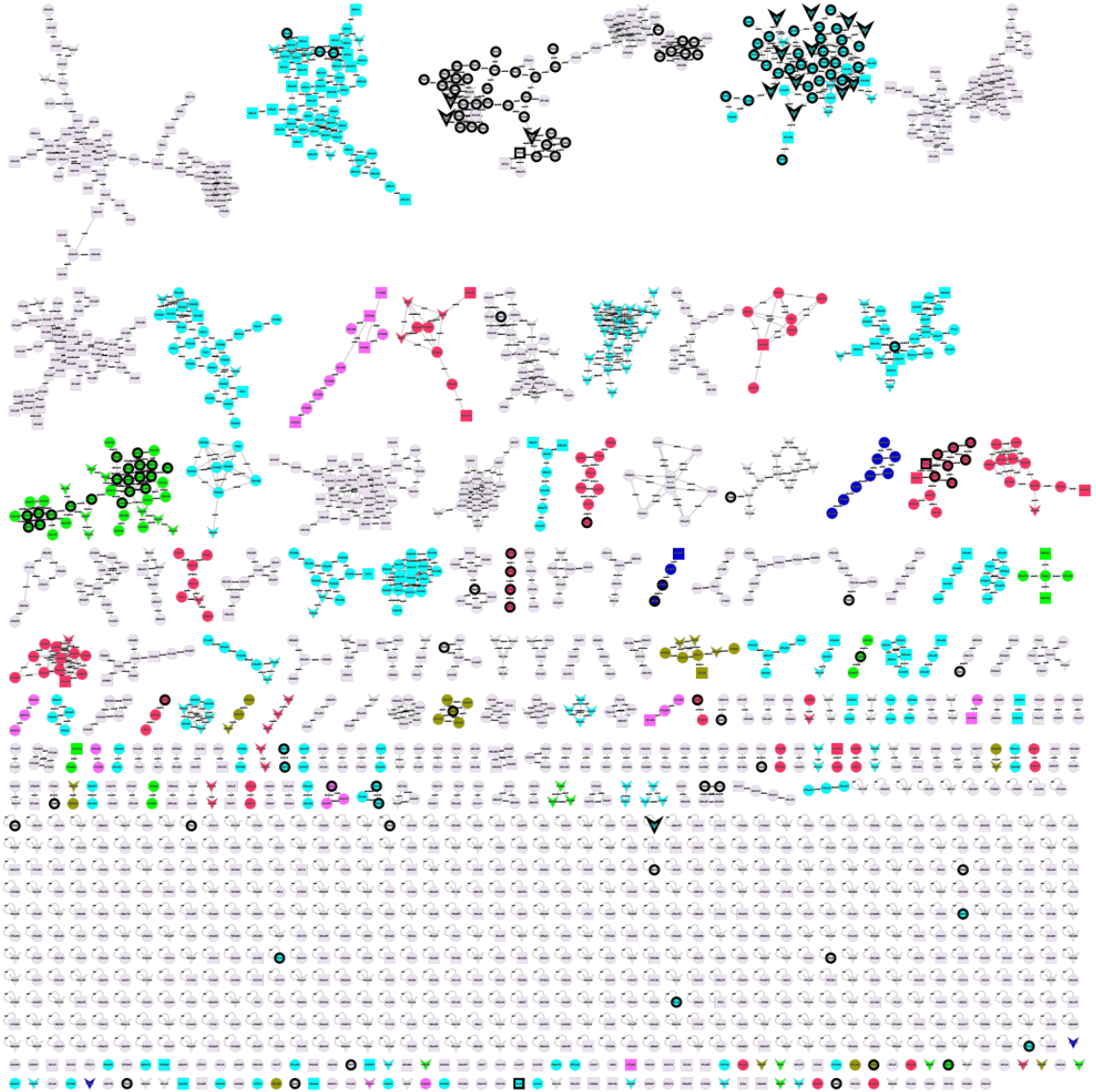
(●) Lipídeos (●) Aminoácidos e peptídeos (●) Terpenos. (●) Flavonoides. (●) Isoflavonoides (●) Cumarinas (○) Sem correspondência de classes. (□) Nodes de compostos encontrados exclusivamente em amostras do grupo não inoculado (▽) Nodes de compostos encontrados exclusivamente em amostras do grupo inoculado. (○) Nodes de compostos encontrados exclusivamente em amostras coletadas após 6 horas.



Fonte: Autoria própria (2023).

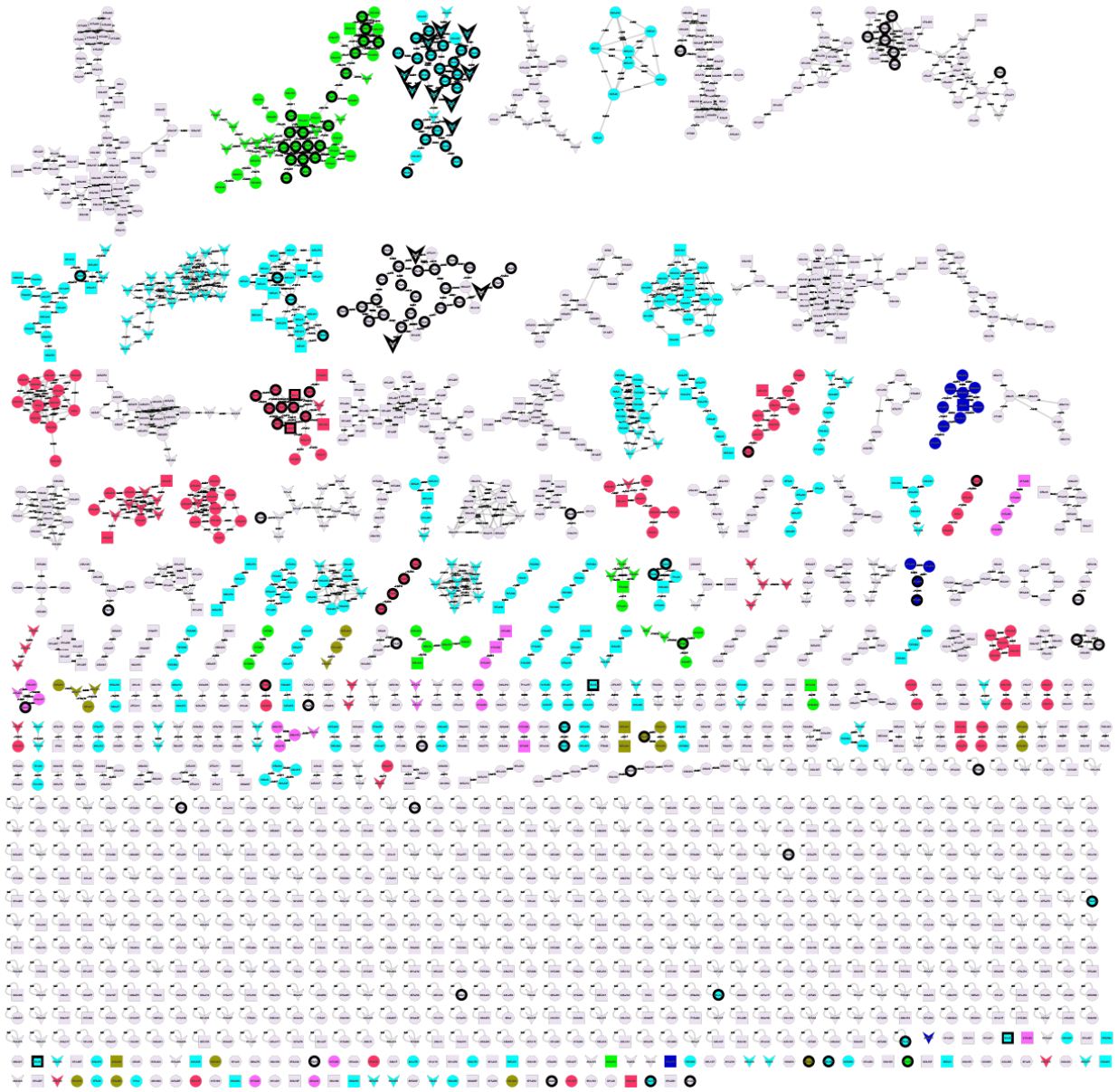
Figura 17. Rede molecular por classes dos espectros de fragmentação obtidos através da análise UHPLC-ESI-MS/MS de folhas de soja não inoculadas e inoculadas com *P. pachyrhizi* coletadas após **12 horas**.

(●) Lipídeos (●) Aminoácidos e peptídeos (●) Terpenos. (●) Flavonoides. (●) Isoflavonoides (●) Cumarinas (○) Sem correspondência de classes. (□) Nodes de compostos encontrados exclusivamente em amostras do grupo não inoculado (▽) Nodes de compostos encontrados exclusivamente em amostras do grupo inoculado. (○) Nodes de compostos encontrados exclusivamente em amostras coletadas após 12 horas



Fonte: Autoria própria (2023).

Figura 18. Rede molecular por classes dos espectros de fragmentação obtidos através da análise UHPLC-ESI-MS/MS de folhas de soja não inoculadas e inoculadas com *P. pachyrhizi* coletadas após **24 horas**. (●) Lipídeos (●) Aminoácidos e peptídeos (●) Terpenos. (●) Flavonoides. (●) Isoflavonoides (●) Cumarinas (○) Sem correspondência de classes. (□) Nodes de compostos encontrados exclusivamente em amostras do grupo não inoculado (▽) Nodes de compostos encontrados exclusivamente em amostras do grupo inoculado. (○) Nodes de compostos encontrados exclusivamente em amostras coletadas após 24 horas



Fonte: Autoria própria (2023).

A figura 19 apresenta o total de compostos indicados por classes pelo tempo de análise. É possível observar que a quantidade de compostos pertencentes às classes de Lipídeos e análogos e Aminoácidos e Peptídeos tendem a permanecer constantes ao longo do tempo. Para os compostos da classe de Fenilpropanoides observa-se um aumento relevante em 6 horas após a inoculação de *P. pachyrhizi*. Para a classe de terpenos houve um aumento na produção de compostos entre 0 e 6 horas após a inoculação com posterior decaimento para os tempos 12 e 24 horas. Enquanto que, para ácidos graxos, foi observado um expressivo aumento em 6 horas e progressivo decaimento nos tempos 12 e 24 horas.

Na Figura 20, está apresentado a superfície de resposta dos 24 compostos indicados pela análise de *loadings* como mais importantes para diferenciação entre os grupos C e I, em que são comparadas a concentração relativa de cada composto em relação ao tratamento e ao tempo de coleta.

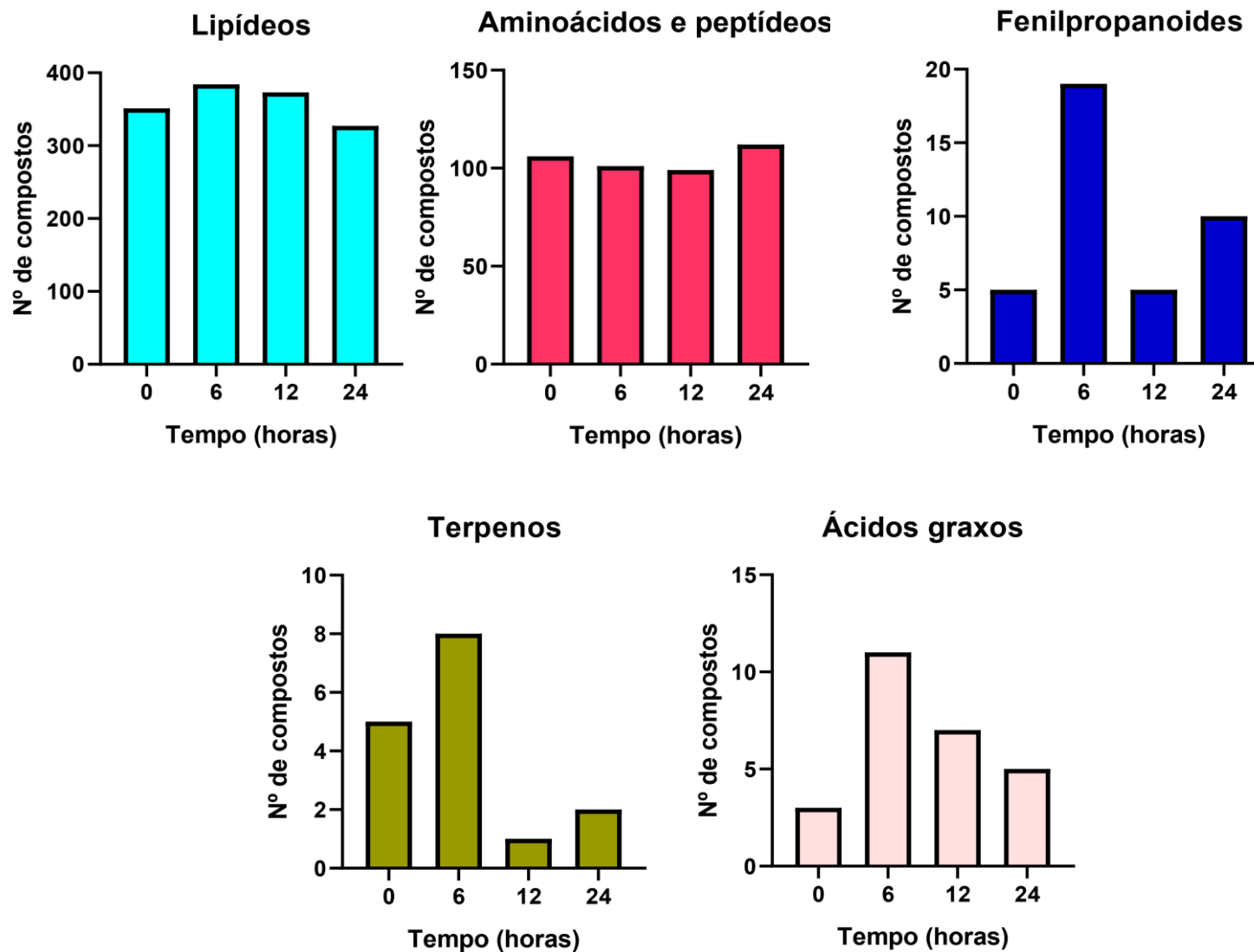
Como apresentado na Figura 12, os compostos de $[M+H]^+$ m/z 110.007, $[M+H]^+$ m/z 136.059, $[M+H]^+$ m/z 195.134, $[M+H]^+$ m/z 277.211, $[M+H]^+$ m/z 279.225, $[M+H]^+$ m/z 290.262, $[M+H]^+$ m/z 291.190, $[M+H]^+$ m/z 345.196, $[M+H]^+$ m/z 364.314, $[M+H]^+$ m/z 387.173, $[M+H]^+$ m/z 415.204, $[M+H]^+$ m/z 503.182, $[M+H]^+$ m/z 595.155, $[M+H]^+$ m/z 611.149, $[M+H]^+$ m/z 679.426 e $[M+H]^+$ m/z 943.208 foram os mais influentes no agrupamento das amostras do grupo C, enquanto que para as amostras do grupo I, os compostos mais importantes foram $[M+H]^+$ m/z 187.079, $[M+H]^+$ m/z 230.243, $[M+H]^+$ m/z 322.269, $[M+H]^+$ m/z 421.197, $[M+H]^+$ m/z 465.221, $[M+H]^+$ m/z 599.399, $[M+H]^+$ m/z 685.348 e $[M+H]^+$ m/z 819.357.

Quando comparada a abundância do composto de $[M+H]^+$ m/z 277.211 nas amostras C, é possível observar o decaimento da concentração relativa em razão do tempo de coleta. Para o composto de $[M+H]^+$ m/z 364.314, observa-se que para as amostras do grupo I houve um decaimento da concentração relativa do início para o fim das coletas, enquanto as amostras do grupo C apresentaram concentração relativa constante nos tempos 0 h, 6h e 24 h e aumento expressivo em 12 h. Além disso, é possível observar uma maior abundância dos compostos de $[M+H]^+$ m/z 110.007, $[M+H]^+$ m/z 136.059, $[M+H]^+$ m/z 291.190, $[M+H]^+$ m/z 387.173, $[M+H]^+$ m/z 415.204, $[M+H]^+$ m/z 503.182, $[M+H]^+$ m/z 595.155, $[M+H]^+$ m/z 611.149, $[M+H]^+$ m/z 679.426 e $[M+H]^+$ m/z

943.508 nas amostras do grupo C quando comparados ao grupo I. Por outro lado, para as amostras do grupo I, foi observado o expressivo acúmulo dos compostos $[M+H]^+$ m/z 187.079, $[M+H]^+$ m/z 230.243, $[M+H]^+$ m/z 322.269, $[M+H]^+$ m/z 421.197, $[M+H]^+$ m/z 465.221, $[M+H]^+$ m/z 599.399, $[M+H]^+$ m/z 685.348 e $[M+H]^+$ m/z 819.357 visto que a abundância destes no grupo C é próxima a zero.

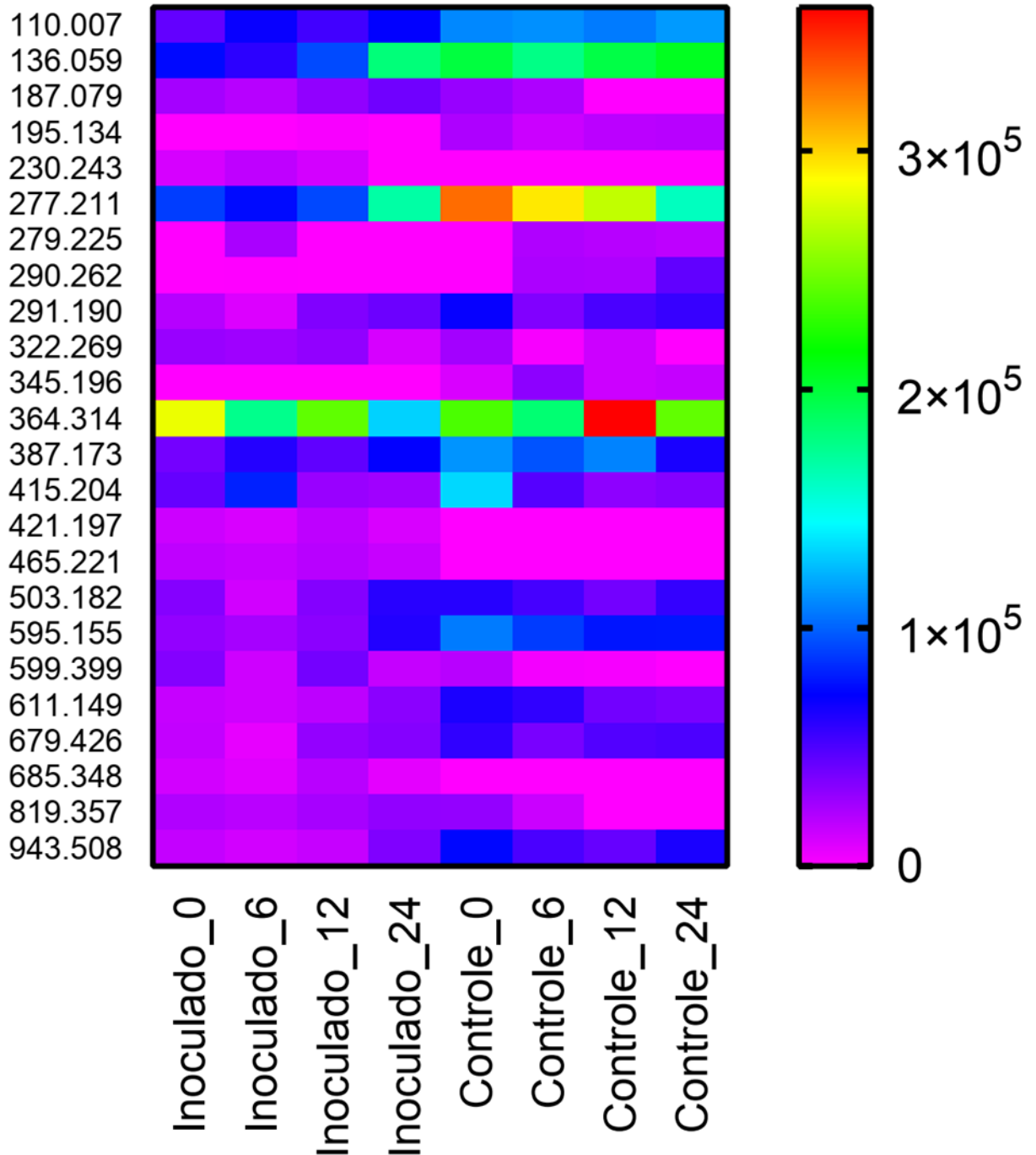
Na Tabela 2, estão apresentadas as classes e abundância médias dos compostos importantes para diferenciação entre os grupos C e I.

Figura 19. Compostos produzidos pela planta de soja frente ao ataque de *P. pachyrhizi*. em 0, 6, 12 e 24 horas. (●) Lipídeos (●) Aminoácidos e peptídeos (●) Fenilpropanoides (●) Terpenos (●) Ácidos graxos



Fonte: Autoria própria (2023).

Figura 20. Superfície de resposta dos compostos importantes para diferenciação entre as amostras Controle e Inoculado com *P. pachyrhizi*.



Fonte: Autoria própria (2023).

Tabela 2. Classes químicas dos compostos importantes para diferenciação entre os grupos Controle e Inoculado com *P. pachyrhizi*.

tr	m/z	Classe química	Médias							
			Inoculado_0	Inoculado_6	Inoculado_12	Inoculado_24	Controle_0	Controle_6	Controle_12	Controle_24
0.86	110.007	Não identificado	44012	69243	53190	71368	110691	112536	106983	115642
1.15	136.059	Não identificado	74341	59259	92787	181632	197989	177953	195921	206674
0.86	187.079	Não identificado	25095	20323	31051	40119	28902	22540	0	0
7.9	195.134	Não identificado	0	0	1415	0	22388	14631	18681	19753
9.19	230.243	Não identificado	11396	17583	11983	0	0	0	0	0
11.66	277.211	Não identificado	89053	74586	92427	169155	329419	294292	270897	161808
12.3	279.225	Não identificado	0	24010	0	0	0	22234	20103	18139
9.16	290.262	Não identificado	0	103	0	0	0	23205	22453	44217
9.31	291.190	Não identificado	20481	9780	35112	41149	70014	35031	51083	56284
10.77	322.269	Não identificado	28746	26907	30689	11447	25972	1998	13843	0
11.68	345.196	Não identificado	0	0	0	0	10409	31668	13910	15992
11.32	364.314	Não identificado	282809	176429	242825	131418	236783	183578	360170	243767
9.83	387.173	Não identificado	38930	61829	44462	71007	113880	95587	108786	64863
10.8	415.204	Triterpeno	43448	81242	28778	26473	132849	47734	31457	34710
10.47	421.197	Não identificado	13983	10558	18202	10493	0	0	0	0
10.43	465.221	Fenilpropanoides e policetídeos	17923	15596	19644	15346	0	0	0	0
5.86	503.182	Fenilpropanoides e policetídeos	33924	12954	34516	60190	60935	52347	39243	56899
5.54	595.155	Fenilpropanoides e policetídeos	30205	24610	32622	61946	107006	88856	77826	78102
12.05	599.399	Lipídeos e Análogos	34511	13476	38707	16119	19595	3075	2445	0
5.12	611.149	Fenilpropanoides e policetídeos	15549	13442	18417	32500	64091	58246	39641	36837
7.88	679.426	Lipídeos e Análogos	16820	6492	29915	34398	58412	37817	48664	50116
10.3	685.348	Não identificado	12527	8998	19319	7569	0	0	0	0
7.7	819.357	Não identificado	21774	19123	24478	30643	29693	14873	0	0
8.98	943.508	Lipídeos e Análogos	16479	12277	15750	35551	73550	50877	43087	64358

Dentre as principais classes de compostos identificados putativamente neste estudo, pode-se destacar a classe dos lipídeos, que exercem importantes papéis estruturais e de regulação durante o crescimento e desenvolvimento de plantas. Além disso, fornece energia para processos metabólicos, comunicação na interação planta-patógeno, e na ativação e implementação de mecanismos de defesa da planta (KANG et al., 2008; KILARU et al., 2011; MARKHAM et al., 2013; NARAYANAN et al., 2016; WANG, 2004; WANG et al., 2006). Algumas subclasses de lipídeos atuam de forma específica na manutenção do crescimento e função das plantas sob a ação de agentes estressores (NARAYANAN et al., 2020). Dessa forma, os lipídeos podem ser utilizados pelas plantas como sinalizadores intracelulares ou de longo alcance (Taiz et al., 2017).

Aminoácidos são importantes precursores das vias de produção de metabólitos secundários relevantes que participam dos mecanismos de defesa de plantas, como ácido salicílico, poliaminas, alcalóides, compostos fenólicos, fenilpropanóides (GAMIR; SÁNCHEZ-BEL; FLORS, 2014). Dentre os diversos aminoácidos identificados, destaca-se a fenilalanina $[M+H]^+$ m/z 166.862 que é um dos principais aminoácidos precursores da síntese de metabólitos de defesa de plantas e é precursor na síntese de fenilpropanóides. (SINGH et al., 2021). A rota metabólica dos fenilpropanóides é iniciada pela ação da enzima fenilalanina amônia-liase (PAL, do inglês *Phenylalanine ammonia-lyase*), que converte fenilalanina em amônia ácido e trans-cinâmico que, por sua vez, pode ser incorporado em diversos compostos fenólicos como ácido p-cumárico, ácido cafeico, ácido ferúlico e ácido sinápico, que estão presentes em diversos mecanismos de defesa contra patógenos (SILVA et al., 2020, 2021; SINGH et al., 2021).

Além disso, diversos estudos têm apontado para o papel importante da prolina $[M+H]^+$ m/z 116.0706 (Tabela 3) no metabolismo primário, devido ao seu acúmulo em plantas sob condições de estresse abiótico e biótico, incluindo ataques de patógenos como *P. pachyrhizi* (FABRO et al., 2004; GHOSH et al., 2022; HAUDECOEUR et al., 2009; HOSSEINIFARD et al., 2022; LIANG et al., 2013; SZABADOS; SAVOURÉ, 2010). Tal acúmulo em células vegetais é estimulado por injúrias osmóticas e interações planta-patógeno incompatíveis, que desencadeiam respostas hipersensíveis. Entretanto, a função do acúmulo de prolina em relações planta-patógeno ainda não foram elucidadas (FABRO et al., 2004; GHOSH et al., 2022). Ademais, neste trabalho foi possível identificar

o ácido pipecólico [M+H]⁺ *m/z* 130.0862 (Tabela 3), um aminoácido não-proteico derivado da lisina com importantes funções fisiológicas e de regulação de imunidade em plantas (VOGEL-ADGHOUGH et al., 2013; WANG et al., 2018). Assim, após a infecção por patógenos, pode ocorrer o acúmulo desse aminoácido e esse processo tem sido associado à SAR (WANG et al., 2018). No entanto, os mecanismos inerentes à SAR mediada pelo ácido pipecólico e sua relação com outros sinais químicos ainda não são totalmente conhecidos (NÁVAROVÁ et al., 2013; WANG et al., 2018).

Os fenilpropanóides representam uma vasta classe de metabólitos secundários de plantas derivados de aminoácidos aromáticos. Diversas análises de transcriptoma de genótipos susceptíveis e resistentes de soja mostram a indução dos genes da via metabólica dos fenilpropanóides, flavonóides e isoflavonóides como resposta de defesa a *P. pachyrhizi* (AOYAGI et al., 2014; ISHIGA et al., 2015; HOSSAIN et al., 2018).

Flavonóides e isoflavonóides são fitoalexinas, compostos antimicrobianos de baixo peso molecular, produzidos pelas plantas em resposta a estresses bióticos. A daidzeína [M+H]⁺ *m/z* 255,0651 e seu conjugado malonil daidzeína [M+H]⁺ *m/z* 503, são os principais flavonóides observados em grãos e folhas de soja. A daidzeína é um precursor na via metabólica que resulta na produção de flavonóides da soja. O acúmulo de flavonóides e isoflavonóides foi descrito anteriormente em soja em resposta de defesa da planta contra o ataque de patógenos (MORALES et al., 2013; RODRIGUES-NETO et al., 2018).

Além disso, os íons [M+H]⁺ *m/z* 449.1063, [M+H]⁺ *m/z* 611.1582 e [M+H]⁺ *m/z* 771.2315 foram putativamente identificados como Astragalin/Kaempferol 3-O-glucoside, Kaempferol 3-O-beta-D-sophoroside, Kaempferol 3-sophorotrioside, respectivamente. São compostos pertencentes às classes de flavonóides e derivados do composto Kaempferol através de reações de glicosilação conduzidas pelas enzimas glicosiltransferases (GTs). A glicosilação de pequenas moléculas é catalisada principalmente por glicosiltransferases (UGTs) dependentes de difosfato de uridina (UDP).

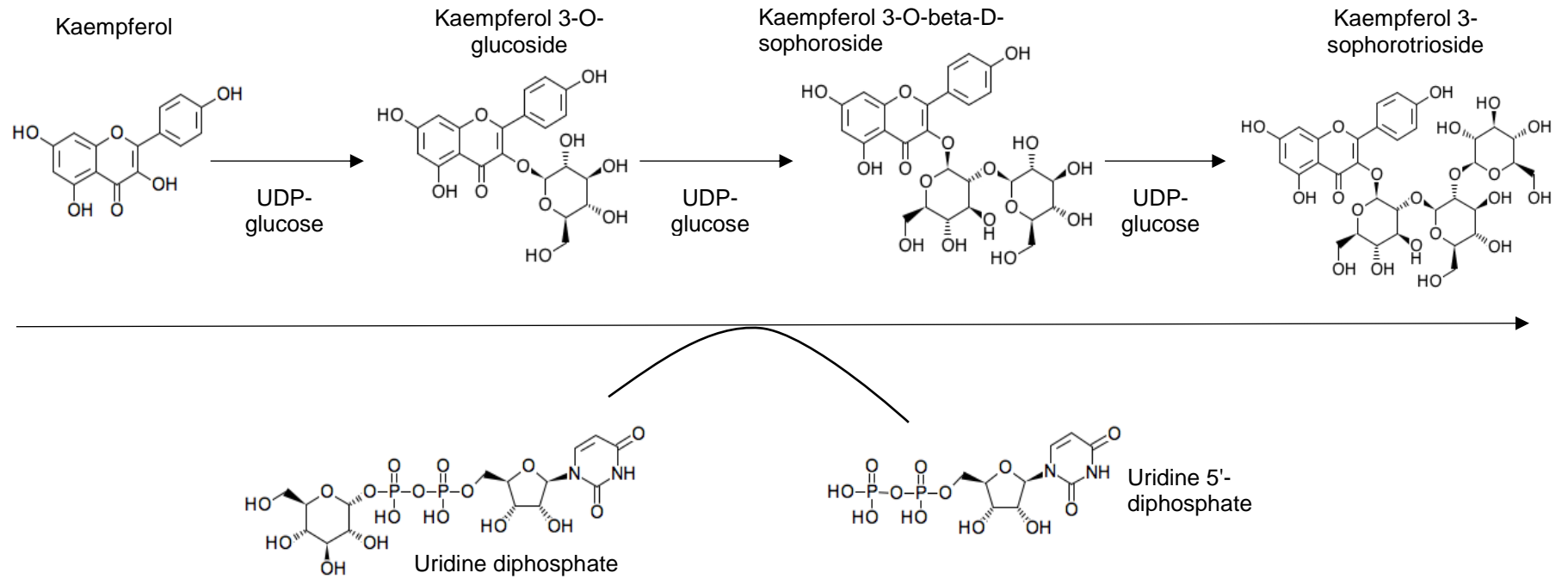
Estudos recentes têm relatado que UGTs estão envolvidos nas reações e atividade dos metabólitos secundários. Langenbach e colaboradores (2013) identificaram uma UGT envolvida na resistência a *P. pachyrhizi* através da comparação do perfil

transcricional de genes ativados pela infecção por *P. pachyrhizi* em um mutante de *A. thaliana*, uma planta não hospedeira da FAS, com resistência intacta. Como resultado, a UGT identificada, codificada por UGT84A2, já havia demonstrado estar presente no metabolismo de fenilpropanóides. O silenciamento da UGT84A2 diminuiu a resistência do mutante *A. thaliana* à infecção por *P. pachyrhizi*, indicando um papel importante de UGT84A2 no combate contra patógenos. Dessa forma, observa-se que as UGTs desempenham vários papéis na defesa natural das plantas contra estresses bióticos e abióticos através da glicosilação de metabólitos secundários.

No entanto, o mecanismo molecular ainda não foi totalmente elucidado (GHARABLI, DELLA GALA, WELNER, 2023; GLASENAPP, HAMAWAKI, 2022; LIM et al., 2001). A Figura 21 apresenta a via resumida da biossíntese de flavonoides, onde o Kaempferol é convertido em outros compostos através das reações de glicosilação. Isso sugere uma biotransformação dos compostos precursores ao longo da via metabólica devido à resposta de defesa de plantas de soja infectadas por *P. pachyrhizi*.

Outra classe putativamente identificada foram os terpenos, que são uma ampla classe de compostos encontrados nas plantas e desempenham um papel de defesa das plantas contra o estresse biótico e abiótico. As saponinas triterpênicas putativamente identificadas são um grupo de fitoanticipinas, compostos antimicrobianos pré-formados, que atuam como barreiras químicas contra o ataque de patógenos. Outros estudos já relataram atividade antifúngica de saponinas contra patógenos de plantas. Nesse contexto, diversas plantas vêm sendo investigadas para a elucidação da ação das terpeno sintases, enzimas-chave na biossíntese de terpenoides (HUANG et al., 2021).

Figura 21. Via resumida da biossíntese de flavonoides.



Fonte: Adaptado de KEGG.

Tabela 3. Metabólitos putativamente identificados em folhas de soja não inoculadas e inoculadas com *P. pachyrhizi*.

Metabólito	Fórmula Molecular	[M+H] ⁺ (medido)	[M+H] ⁺ (teórico)	Erro de massa (ppm)	Controle	Inoculado
Lipídeos						
12-Hydroxyjasmonic acid	C12H18O4	227.1277	227.1277	0.00	X	X
Palmitamide	C16H33NO	256.2625	256.2634	-3.51	X	X
SN-GLYCERO-3-PHOSPHOCHOLINE	C8H20NO6P	258.1094	258.1101	-2.71		X
Stearidonic acid	C18H28O2	277.2154	277.2162	-2.89	X	X
Linoleic acid	C18H32O2	281.2467	281.2475	-2.84		X
9-OxoOTrE	C18H28O3	293.2113	293.2111	0.68	X	X
9-Oxo-10E,12Z-octadecadienoic acid	C18H30O3	295.2261	295.2267	-2.03	X	X
1-Hexadecanoyl-sn-glycerol	C19H38O4	331.2828	331.2842	-4.23	X	X
13- Docosenamide	C22H43NO	338.3417	338.3417	0.00		X
2-Monolinolenin	C21H36O4	353.2674	353.2686	-3.40	X	X
Phytosphingosine-1-P	C18H40NO6P	398.2661	398.2666	-1.26		X
Austinoneol	C24H30O6	415.2092	415.2115	-5.54	X	X
Acuminoside	C21H36O10	449.2365	449.2381	-3.56	X	X
Lysophosphatidylcholine	C26H48NO7P	518.3242	518.3241	0.19		X
Aminoácidos						
Proline	C5H9NO2	116.0704	116.0706	-1.72	X	X
Pipecolic acid	C6H11NO2	130.0860	130.0862	-1.54	X	X
L-Aspartic acid	C4H7NO4	134.0444	134.0447	-2.24	X	X
Glutamic Acid	C5H9NO4	148.0601	148.0604	-2.03	X	X
Histidine	C6H9N3O2	156.0760	156.0767	-4.48		X
2-Aminoadipic acid	C6H11NO4	162.0761	162.0760	0.62	X	
L-Carnitine	C7H15NO3	162.1121	162.1124	-1.85	X	
Phenylalanine	C9H11NO2	166.0855	166.0862	-4.21	X	X
Arginine	C6H14N4O2	175.1188	175.1189	-0.57	X	X
Tyrosine	C9H11NO3	182.0808	182.0811	-1.65	X	X
N6,N6,N6-Trimethyl-L-lysine	C9H20N2O2	189.1594	189.1597	-1.59		X

Tryptophan	C11H12N2O2	205.0976	205.0971	2.44	X	X
Serylleucine	C9H18N2O4	219.1331	219.1339	-3.65	X	X
L(+)-Ergothioneine	C9H15N3O2S	230.0951	230.0957	-2.61		X
N-Malonyltryptophan	C14H14N2O5	291.0966	291.0975	-3.09	X	X
Rhodotorulic acid	C14H24N4O6	345.1755	345.1768	-3.77		X
NCGC00169491-02!(4S)-4-hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-[(E)-3-[(2R,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxybut-1-enyl]cyclohex-2-en-1-one	C19H30O8	387.2001	387.2013	-3.10	X	X
Peptides						
L-Alanyl-L-norleucine	C9H18N2O3	203.1386	203.1390	-1.97	X	X
Ile-Pro	C11H20N2O3	229.1540	229.1546	-2.62	X	X
Leu-Val	C11H22N2O3	231.1699	231.1703	-1.73	X	X
Thr-Leu	C10H20N2O4	233.1490	233.1495	-2.14	X	X
Ala-Phe	C12H16N2O3	237.1226	237.1233	-2.95	X	
Leu-Leu	C12H24N2O3	245.1856	245.1859	-1.22	X	X
Ile-Leu	C12H24N2O2	245.1852	245.1859	-2.85	X	X
Ser-Phe	C12H16N2O4	253.1174	253.1182	-3.16	X	X
Phe-Val	C14H20N2O3	265.1535	265.1546	-4.15	X	
PyroGlu-Phe	C14H16N2O22	277.1181	277.1182	-0.36		X
Leu-Phe	C15H22N2O3	279.1700	279.1703	-1.07	X	X
Glutathione	C10H17N3O6S	308.0898	308.0910	-3.89		X
Flavonoides						
Citric Acid	C6H8O7	193.0337	193.0342	-2.59	X	X
Daidzein	C15H10O4	255.0647	255.0651	-1.57	X	X
Genistein	C15H10O5	271.0607	271.0601	2.21		X
Genistin	C21H20O10	433.1117	433.1129	-2.77	X	
Astragalin	C21H20O11	449.1063	449.1078	-3.34	X	X
Isorhamnetin 3-galactoside	C22H22O12	479.1171	479.1184	-2.71	X	X
6"-O-Malonyldaidzin	C24H22O12	503.1168	503.1184	-3.18		X
6"-O-Malonylgenistin	C24H22O13	519.1131	519.1133	-0.39	X	X

Biochanin A O-glucoside malonylated	C25H24O13	533.1269	533.1289	-3.75	X	X
2-(21-Amino-3,20-dihydroxydocosan-2-yl)oxy-6-(hydroxymethyl)oxane-3,4,5-triol	C28H57NO8	536.4152	536.4156	-0.75	X	X
6"-O-Malonylwistin	C26H26O13	547.1423	547.1446	-4.20	X	X
Kaempferol 3-O-rhamnoside-7-O-glucoside	C27H30O15	595.1636	595.1657	-3.53		X
Kaempferol 3-O-beta-D-sophoroside	C27H30O16	611.1582	611.1606	-3.93	X	X
Oxidized Glutathione	C20H32N6O12S2	613.1576	613.1592	-2.61	X	X
7-Methylquercetin-3-Galactoside-6"-Rhamnoside-3"-Rhamnoside	C34H42O20	771.2315	771.2342	-3.50	X	X
Quercetin 3-rutinoside 7-galactoside	C33H40O21	773.2103	773.2134	-4.01	X	X
Terpenos						
Saikosaponin D	C42H68O13	781.4696	781.4732	-4.61	X	X
Soyasapogenol B	C47H76O17	913.5130	913.5155	-2.74	X	X
Soyasaponin I	C48H78O18	943.5254	943.5260	-0.64	X	X
Outros compostos						
Cytosine	C4H5N3O	112.0502	112.0505	-2.68	X	X
Adenine	C5H5N5	136.0612	136.0617	-3.67	X	X
Riboflavin	C17H20N4O6	377.1442	377.1455	-3.45	X	X
N6-Succinyl Adenosine	C14H17N5O8	384.1139	384.1149	-2.60		X

5 Conclusão

Phakopsora pachyrhizi é um dos patógenos mais desafiadores que atacam as lavouras de soja, sua alta variabilidade genética dificulta o controle da doença, necessitando de pesquisas extensas e contínuas para controlá-la e combatê-la. Assim, com os resultados obtidos neste estudo, sugere-se uma nova abordagem para a compreensão dessa fitopatologia, bem como outras doenças causadas por patógenos em plantas agrícolas.

Nesse contexto, a combinação das ferramentas de UHPLC-ESI-MS/MS e a rede *Global Natural Products Social Molecular Networking* mostrou-se uma poderosa combinação para melhor identificação do metaboloma de plantas de soja inoculadas com *P. pachyrhizi*. A análise de componentes principais possibilitou a separação de grupos entre folhas de soja controle e inoculadas com *P. pachyrhizi*. Além disso, o conhecimento dos metabólitos envolvidos na interação, associados à defesa de plantas poderá auxiliar na pesquisa sobre o desenvolvimento de genes de plantas mais resistentes a *P. pachyrhizi*, bem como no desenvolvimento de produtos mais eficazes e específicos contra a doença.

REFERENCIAS

ABBAS-MOHAMMADI, Mahdi et al. Acetylcholinesterase-inhibitory activity of Iranian plants: Combined HPLC/bioassay-guided fractionation, molecular networking and docking strategies for the dereplication of active compounds. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 158, p. 471-479, 2018.

Agrosat. Estatísticas de Comércio Exterior do Agronegócio Brasileiro. Indicadores Gerais Agrosat. Disponível em: <https://indicadores.agricultura.gov.br/agrostat/index.htm>. Acesso em: 04 jun. 2023.

AKAMATSU, Hajime et al. Pathogenic diversity of soybean rust in Argentina, Brazil, and Paraguay. **Journal of General Plant Pathology**, v. 79, p. 28-40, 2013.

AKAMATSU, Hajime et al. Pathogenic variation of South American *Phakopsora pachyrhizi* populations isolated from soybeans from 2010 to 2015. **Japan Agricultural Research Quarterly: JARQ**, v. 51, n. 3, p. 221-232, 2017.

ALLARD, Pierre-Marie 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.

ALMEIDA, M. R. et al. Classification of Amazonian rosewood essential oil by Raman spectroscopy and PLS-DA with reliability estimation. **Talanta**, v. 117, p. 305–311, 2013.

AREVALO JR, Ricardo; NI, Ziqin; DANELL, Ryan M. Mass spectrometry and planetary exploration: A brief review and future projection. **Journal of mass spectrometry**, v. 55, n. 1, p. e4454, 2020.

ARON, Allegra T. et al. Reproducible molecular networking of untargeted mass spectrometry data using GNPS. **Nature protocols**, v. 15, n. 6, p. 1954-1991, 2020.

BAQUETA, M. R. et al. Multivariate classification for the direct determination of cup profile in coffee blends via handheld near-infrared spectroscopy. **Talanta**, v. 222, n. June 2020, 2021.

BAUERMEISTER, Anelize et al. Mass spectrometry-based metabolomics in microbiome investigations. **Nature Reviews Microbiology**, v. 20, n. 3, p. 143-160, 2022.

BELINATO, J. R. et al. Rapid discrimination of fungal strains isolated from human skin based on microbial volatile organic profiles. **Journal of Chromatography B: Analytical**

Technologies in the Biomedical and Life Sciences, v. 1110–1111, n. October 2018, p. 9–14, 2019b.

BERGAMIN FILHO, A. Epidemiologia comparativa: ferrugem da soja e outras doenças. **Ferrugem asiática da soja**, p. 15-31, 2006.

BHARDWAJ, Chhavi; HANLEY, Luke. Ion sources for mass spectrometric identification and imaging of molecular species. **Natural product reports**, v. 31, n. 6, p. 756-767, 2014.

BORCHERS, Christoph et al. Identification of in-gel digested proteins by complementary peptide mass fingerprinting and tandem mass spectrometry data obtained on an electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometer. **Analytical chemistry**, v. 72, n. 6, p. 1163-1168, 2000.

BROMFIELD, K. R.; MELCHING, J. S. (Orgs.). Sources of specific resistance to soybean rust. **Phytopathology**, [s. d.].

BRUNS, R. E.; FAIGLE, J. F. G. Quimiometria. **Química Nova**, v. 8, n. 2, p. 84–99, 1985.

CALABRESE, Valentina et al. Molecular networking and collision cross section prediction for structural isomer and unknown compound identification in plant metabolomics: a case study applied to *Zanthoxylum heitzii* extracts. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 414, n. 14, p. 4103-4118, 2022.

CHAKRABORTY, Nanda et al. Mapping and confirmation of a new allele at Rpp1 from soybean PI 594538A conferring RB lesion–type resistance to soybean rust. **Crop science**, v. 49, n. 3, p. 783-790, 2009.

CHILDS, Silas P. et al. Discovery of a seventh Rpp soybean rust resistance locus in soybean accession PI 605823. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 131, p. 27-41, 2018.

CONAB. Boletim da safra de grãos. Oitavo levantamento, safra 2022/23. Acompanhamento da Safra Brasileira. Conab: Brasília, DF, 2022. Disponível em: www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos. Acesso em: 04 jun. 2023.

CORREIA, P. R. M.; FERREIRA, M. M. C. Reconhecimento de padrões por métodos não supervisionados: Explorando procedimentos quimiométricos para tratamento de dados analíticos. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 481–487, 2007.

- DARBEN, Luana Mieko et al. Characterization of genetic diversity and pathogenicity of *Phakopsora pachyrhizi* mono-uredinial isolates collected in Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, v. 156, p. 355-372, 2020.
- DE HOFFMANN, Edmond; STROOBANT, Vincent. **Mass spectrometry: principles and applications**. John Wiley & Sons, 2007.
- DE PAULA, Samuel et al. Potential of thaxtomin A for the control of the Asian soybean rust. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 44, n. 1, p. 56-65, 2022.
- DELANEY, Mary et al. Effectiveness of fungicide on soybean rust in the southeastern united states: a meta-analysis. **Sustainability**, v. 10, n. 6, p. 1784, 2018.
- DESTA, Kebede Taye et al. Origin and seed coat color differently affect the concentrations of metabolites and antioxidant activities in soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) seeds. **Food Chemistry**, v. 381, p. 132249, 2022.
- DING, Li-Na et al. Plant Disease Resistance-Related Signaling Pathways: Recent Progress and Future Prospects. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 24, p. 16200, 2022.
- DODDS, Peter N.; RATHJEN, John P. Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. **Nature Reviews Genetics**, v. 11, n. 8, p. 539-548, 2010.
- EDWARDS, H. H.; BONDE, M. R. Penetration and establishment of *Phakopsora pachyrhizi* in soybean leaves as observed by transmission electron microscopy. **Phytopathology**, v. 101, n. 7, p. 894-900, 2011.
- EL-HASAN, Abbas et al. New approaches to manage Asian soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) using *Trichoderma* spp. or their antifungal secondary metabolites. **Metabolites**, v. 12, n. 6, p. 507, 2022.
- EL-SHARKAWY, Hany HA; RASHAD, Younes M.; IBRAHIM, Seham A. Biocontrol of stem rust disease of wheat using arbuscular mycorrhizal fungi and *Trichoderma* spp. **Physiological and molecular plant pathology**, v. 103, p. 84-91, 2018.
- FAO (2019) FAOSTAT. Food and agriculture organization of the United Nations, Rome, Italy. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> (accessed in 27 February 2023)
- FERREIRA, M. M. C. **Quimiometria - Conceitos, Métodos e Aplicações**. Campinas: Editora Unicamp, 2015.

- FLOR, Harold H. Current status of the gene-for-gene concept. **Annual review of phytopathology**, v. 9, n. 1, p. 275-296, 1971.
- FORCISI, Sara et al. Liquid chromatography–mass spectrometry in metabolomics research: Mass analyzers in ultra high pressure liquid chromatography coupling. **Journal of Chromatography A**, v. 1292, p. 51-65, 2013.
- FORSYTHE, Ian J.; WISHART, David S. Exploring human metabolites using the human metabolome database. **Current protocols in bioinformatics**, v. 25, n. 1, p. 14.8. 1-14.8. 45, 2009.
- FURLAN, Silvânia H.; CARVALHO, Fernando K.; ANTUNIASSI, Ulisses R. Strategies for the control of Asian soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in Brazil: fungicide resistance and application efficacy. **Outlooks on Pest Management**, v. 29, n. 3, p. 120-123, 2018.
- GARCIA, Alexandre et al. Molecular mapping of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) resistance genes: discovery of a novel locus and alleles. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 117, n. 4, p. 545-553, 2008.
- GARCIA, Alexandre et al. Molecular mapping of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) resistance genes: discovery of a novel locus and alleles. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 117, n. 4, p. 545-553, 2008.
- GELADI, Paul. Chemometrics in spectroscopy. Part 1. Classical chemometrics. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 58, n. 5, p. 767-782, 2003.
- GHARABLI, Hani; DELLA GALA, Valeria; WELNER, Ditte Hededam. The function of UDP-glycosyltransferases in plants and their possible use in crop protection. **Biotechnology Advances**, p. 108182, 2023.
- GLASENAPP, Jacqueline Siqueira; HAMAWAKI, Osvaldo Toshiyuki. Soybean Breeding for Rust Resistance. In: **Soybean Improvement: Physiological, Molecular and Genetic Perspectives**. Cham: Springer International Publishing, 2022. p. 137-151.
- GODOY, C. V.; et al. Eficiência de fungicidas para o controle da ferrugem-asiática da soja, *Phakopsora pachyrhizi*, na safra 2017/2018: Resultados sumarizados dos ensaios cooperativos. Londrina, PR: Embrapa Soja. Retrieved on May, v. 10, p. 2018, 2018.

- GODOY, Cláudia Vieira. Risk and management of fungicide resistance in the Asian soybean rust fungus *Phakopsora pachyrhizi*. In: **Fungicide resistance in crop protection: risk and management**. Wallingford UK: CABI, 2012. p. 87-95.
- GOELLNER, Katharina et al. *Phakopsora pachyrhizi*, the causal agent of Asian soybean rust. **Molecular plant pathology**, v. 11, n. 2, p. 169-177, 2010.
- GORROCHATEGUI, Eva et al. Data analysis strategies for targeted and untargeted LC-MS metabolomic studies: Overview and workflow. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 82, p. 425-442, 2016.
- GUPTA, Yogesh K. et al. Major proliferation of transposable elements shaped the genome of the soybean rust pathogen *Phakopsora pachyrhizi*. **Nature communications**, v. 14, n. 1, p. 1-16, 2023.
- HALL, Robert D. et al. High-throughput plant phenotyping: a role for metabolomics?. **Trends in Plant Science**, 2022.
- HARTMAN, Glen Lee et al. (Ed.). **Compendium of soybean diseases and pests**. St. Paul, MN: American Phytopathological Society, 2015.
- HARTWIG, E. E.; BROMFIELD, K. R. Relationships among three genes conferring specific resistance to rust in soybeans 1. **Crop Science**, v. 23, n. 2, p. 237-239, 1983.
- HARTWIG, Edgar E. Identification of a fourth major gene conferring resistance to soybean rust 1. **Crop Science**, v. 26, n. 6, p. 1135-1136, 1986.
- HENNING, A. A et al. Manual de identificação de doenças de soja. **Série Documentos**, v. 256, 2014.
- HILL, J.; NELSON, E.; TILMAN, D.; POLASKY, S.; TIFFANY, D. Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels. **Proceedings of the National Academy of sciences**, v.103, n.30, p.11206-11210, 2006.
- HORAI, Hisayuki et al. MassBank: a public repository for sharing mass spectral data for life sciences. **Journal of mass spectrometry**, v. 45, n. 7, p. 703-714, 2010.
- HYTEN, D. L. et al. Map location of the *Rpp1* locus that confers resistance to soybean rust in soybean. **Crop Science**, v. 47, n. 2, p. 837-838, 2007.
- JONES, Jonathan DG; DANGL, Jeffery L. The plant immune system. **nature**, v. 444, n. 7117, p. 323-329, 2006.

- KARAS, Michael; HILLENKAMP, Franz. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. **Analytical chemistry**, v. 60, n. 20, p. 2299-2301, 1988.
- KASHIWA, Takeshi; MURAKI, Yukie; YAMANAKA, Naoki. Near-isogenic soybean lines carrying Asian soybean rust resistance genes for practical pathogenicity validation. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 13270, 2020.
- KHAN, Raja Asad Ali et al. Bioactive secondary metabolites from *Trichoderma* spp. against phytopathogenic fungi. **Microorganisms**, v. 8, n. 6, p. 817, 2020.
- KOCH, E.; EBRAHIM-NESBAT, F.; HOPPE, H. H. Light and electron microscopic studies on the development of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi* Syd.) in susceptible soybean leaves. **Journal of Phytopathology**, v. 106, n. 4, p. 302-320, 1983.
- KUMAR, Rakesh et al. Metabolomics for plant improvement: status and prospects. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 1302, 2017.
- KUMAR, Virender et al. Omics advances and integrative approaches for the simultaneous improvement of seed oil and protein content in soybean (*Glycine max* L.). **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 40, n. 5, p. 398-421, 2021.
- LANGENBACH, Caspar et al. Fighting Asian soybean rust. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 797, 2016.
- LANGENBACH, Caspar et al. UDP-glucosyltransferase UGT 84A2/BRT 1 is required for Arabidopsis nonhost resistance to the Asian soybean rust pathogen *Phakopsora pachyrhizi*. **New phytologist**, v. 198, n. 2, p. 536-545, 2013.
- LEME, L. M. et al. **Estudo das alterações no metabolismo da soja em decorrência da infecção por *Aphelenchoides besseyi***. Caldas NovasXXXVI Congresso Brasileiro de Nematologia, , 2019.
- LEONARD, Kurt J.; SZABO, Les J. Stem rust of small grains and grasses caused by *Puccinia graminis*. **Molecular plant pathology**, v. 6, n. 2, p. 99-111, 2005.
- LI, Shuxian et al. Identification of a new soybean rust resistance gene in PI 567102B. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 125, p. 133-142, 2012.
- LIM, Eng-Kiat et al. Identification of glucosyltransferase genes involved in sinapate metabolism and lignin synthesis in Arabidopsis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 6, p. 4344-4349, 2001.

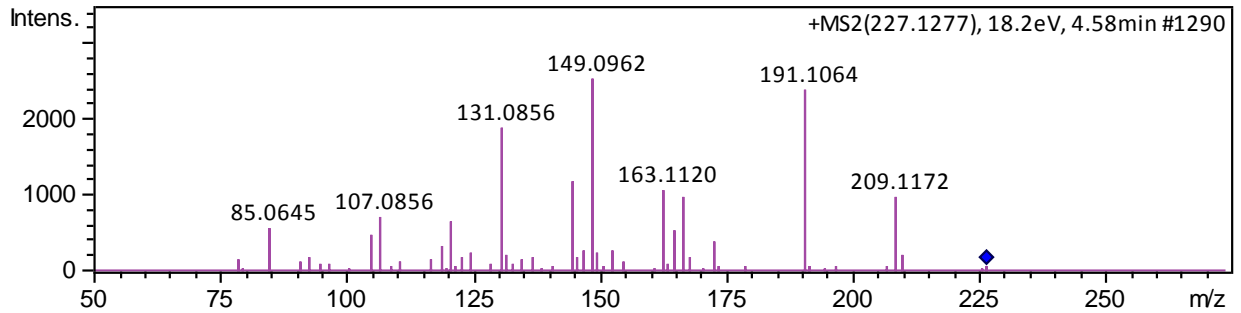
- MACHO, Alberto P.; ZIPFEL, Cyril. Plant PRRs and the activation of innate immune signaling. **Molecular cell**, v. 54, n. 2, p. 263-272, 2014.
- MATTOLI, Luisa; GIANNI, Mattia; BURICO, Michela. Mass spectrometry-based metabolomic analysis as a tool for quality control of natural complex products. **Mass Spectrometry Reviews**, p. e21773, 2022.
- MEIRA, Daniela et al. Asian soybean rust: a scientometric approach of *Phakopsora pachyrhizi* studies. **Euphytica**, v. 216, p. 1-12, 2020.
- MILES, M. R. et al. Characterizing resistance to *Phakopsora pachyrhizi* in soybean. **Plant Disease**, v. 95, n. 5, p. 577-581, 2011.
- MURITHI, H. M. et al. Soybean production in eastern and southern Africa and threat of yield loss due to soybean rust caused by *Phakopsora pachyrhizi*. **Plant pathology**, v. 65, n. 2, p. 176-188, 2016.
- NICAISE, Valerie; CANDRESSE, Thierry. Plum pox virus capsid protein suppresses plant pathogen-associated molecular pattern (PAMP)-triggered immunity. **Molecular plant pathology**, v. 18, n. 6, p. 878-886, 2017.
- NICOLOPOULOU-STAMATI, Polyxeni et al. Chemical pesticides and human health: the urgent need for a new concept in agriculture. **Frontiers in public health**, v. 4, p. 148, 2016.
- PADALKAR, Gunashri et al. Necessity and challenges for exploration of nutritional potential of staple-food grade soybean. **Journal of Food Composition and Analysis**, p. 105093, 2022.
- PEREIRA, J. M. et al. Fast Discrimination of Milk Contaminated with *Salmonella* sp. Via Near-Infrared Spectroscopy. **Food Analytical Methods**, v. 11, n. 7, 2018.
- PIASECKA, A.; KACHLICKI, P.; STOBIECKI, M. Analytical Methods for Detection of Plant Metabolomes Changes in Response to Biotic and Abiotic Stresses. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 2, p. 379, 2019.
- PRETORIUS, Z. A.; KLOPPERS, F. J.; FREDERICK, R. D. First report of soybean rust in South Africa. **Plant Disease**, v. 85, n. 12, p. 1288-1288, 2001.
- QUINN, Robert 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.

- RAY, Deepak K. et al. Yield trends are insufficient to double global crop production by 2050. **PLoS one**, v. 8, n. 6, p. e66428, 2013.
- REIS, E. M.; BRESOLIN, A. C. R.; CARMONA, M. Doenças da soja I: Ferrugem asiática. **Passo Fundo: Universidade de Passo Fundo**, 2006.
- RODRIGUES-NETO, J. C. et al. Metabolic fingerprinting analysis of oil palm reveals a set of differentially expressed metabolites in fatal yellowing symptomatic and non-symptomatic plants. **Metabolomics**, v. 14, n. 10, 1 out. 2018.
- ROSA, C. R. E.; SPEHAR, C. R.; LIU, J. Q. Asian soybean rust resistance: an overview. **Journal of Plant Pathology and Microbiology**, v. 6, n. 307, p. 2, 2015.
- SAUR, Isabel ML; PANSTRUGA, Ralph; SCHULZE-LEFERT, Paul. NOD-like receptor-mediated plant immunity: from structure to cell death. **Nature Reviews Immunology**, v. 21, n. 5, p. 305-318, 2021.
- SAVARY, Serge et al. The global burden of pathogens and pests on major food crops. **Nature ecology & evolution**, v. 3, n. 3, p. 430-439, 2019.
- SAWADA, Yuji et al. RIKEN tandem mass spectral database (ReSpect) for phytochemicals: a plant-specific MS/MS-based data resource and database. **Phytochemistry**, v. 82, p. 38-45, 2012.
- SCHERM, H. et al. Quantitative review of fungicide efficacy trials for managing soybean rust in Brazil. **Crop Protection**, v. 28, n. 9, p. 774-782, 2009.
- SCHREIBER, Karl J.; CHAU-LY, Ilea J.; LEWIS, Jennifer D. What the wild things do: mechanisms of plant host manipulation by bacterial type III-secreted effector proteins. **Microorganisms**, v. 9, n. 5, p. 1029, 2021.
- SHANNON, Paul et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. **Genome research**, v. 13, n. 11, p. 2498-2504, 2003.
- SHEN, Shuangqian et al. Metabolomics-centered mining of plant metabolic diversity and function: Past decade and future perspectives. **Molecular Plant**, v. 16, n. 1, p. 43-63, 2023.
- SOUZA, A. M. DE; POPPI, R. J. EXPERIMENTO DIDÁTICO DE QUIMIOMETRIA PARA ANÁLISE EXPLORATÓRIA DE ÓLEOS VEGETAIS COMESTÍVEIS POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO MÉDIO E ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS: UM TUTORIAL, PARTE I. **Química Nova**, v. 35, n. 1, p. 223–229, 2012.

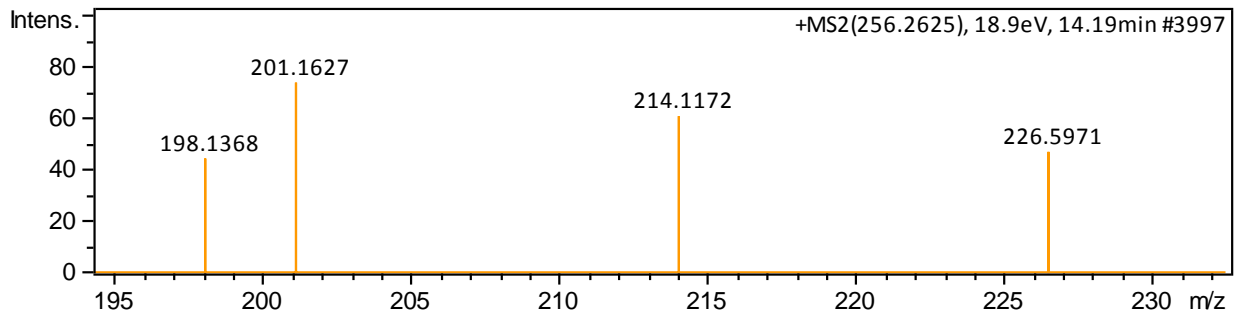
- SPOEL, Steven H.; DONG, Xinnian. How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. **Nature reviews immunology**, v. 12, n. 2, p. 89-100, 2012.
- STEIN, S. The NIST 14 mass spectral library. **Gaithersburg, MD: National Institute of Standards and Technology**, 2014.
- STEWART-BROWN, Benjamin B. et al. Genomic selection for yield and seed composition traits within an applied soybean breeding program. **G3: Genes, Genomes, Genetics**, v. 9, n. 7, p. 2253-2265, 2019.
- TAIZ, Lincoln et al. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. Artmed Editora, 2017.
- TWIZEYIMANA, M. et al. Genetic structure and diversity of *Phakopsora pachyrhizi* isolates from soybean. **Plant Pathology**, v. 60, n. 4, p. 719-729, 2011.
- VILLATE, Aitor et al. Metabolomics as a prediction tool for plants performance under environmental stress. **Plant Science**, v. 303, p. 110789, 2021.
- WANG, Jinhui et al. Effector-Dependent and-Independent Molecular Mechanisms of Soybean–Microbe Interaction. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 22, p. 14184, 2022.
- WANG, Mingxun et al. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. **Nature biotechnology**, v. 34, n. 8, p. 828-837, 2016.
- WATROUS, Jeramie et al. Mass spectral molecular networking of living microbial colonies. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 26, p. E1743-E1752, 2012.
- YANG, Jane Y. et al. Molecular networking as a dereplication strategy. **Journal of natural products**, v. 76, n. 9, p. 1686-1699, 2013.
- YORINORI, J. T. et al. Epidemics of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in Brazil and Paraguay from 2001 to 2003. **Plant Disease**, v. 89, n. 6, p. 675-677, 2005.
- YU, Neil et al. Fine mapping of the Asian soybean rust resistance gene *Rpp2* from soybean PI 230970. **Theoretical and applied genetics**, v. 128, p. 387-396, 2015.
- ZUBROD, Jochen P. et al. Fungicides: an overlooked pesticide class? **Environmental science & technology**, v. 53, n. 7, p. 3347-3365, 2019.

Anexo A

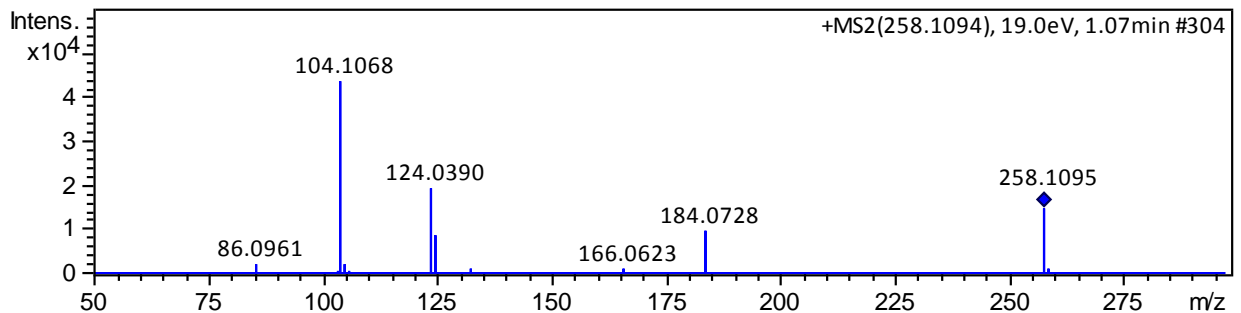
Anexo A.1: Espectro de MS/MS do metabólito 12-Hidroxyjasmonic acid

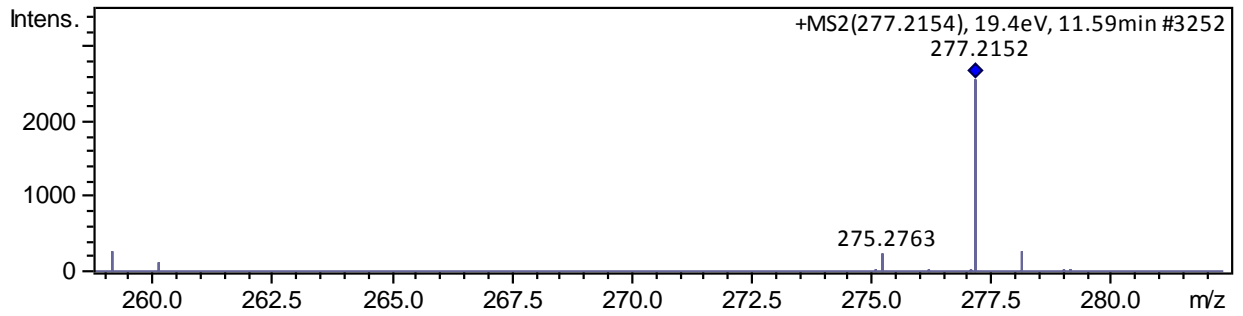
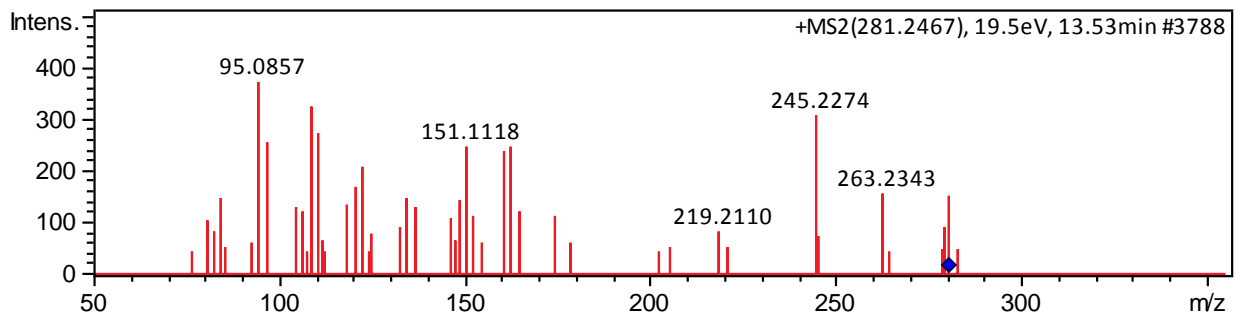
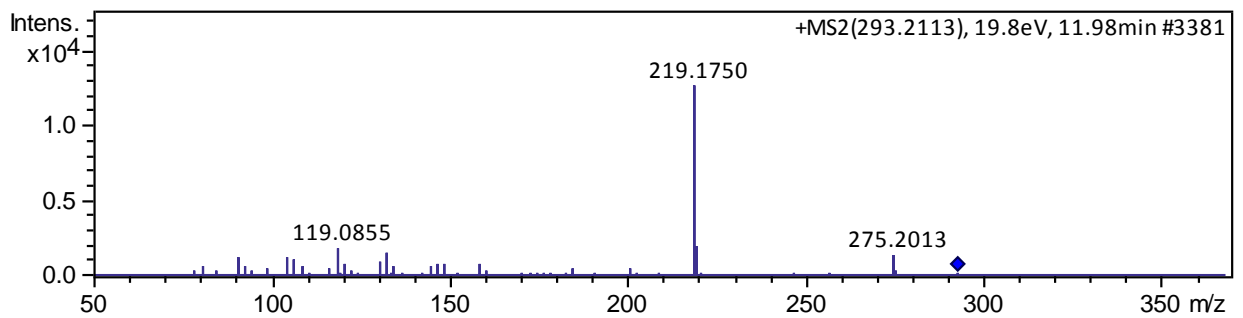


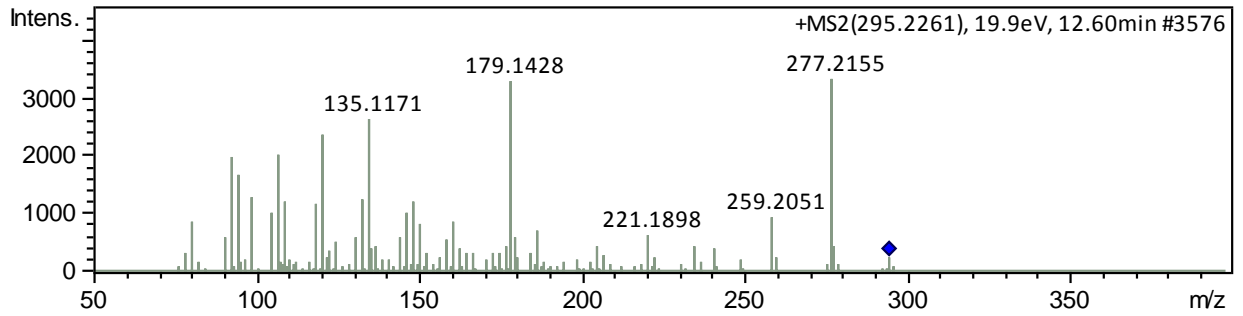
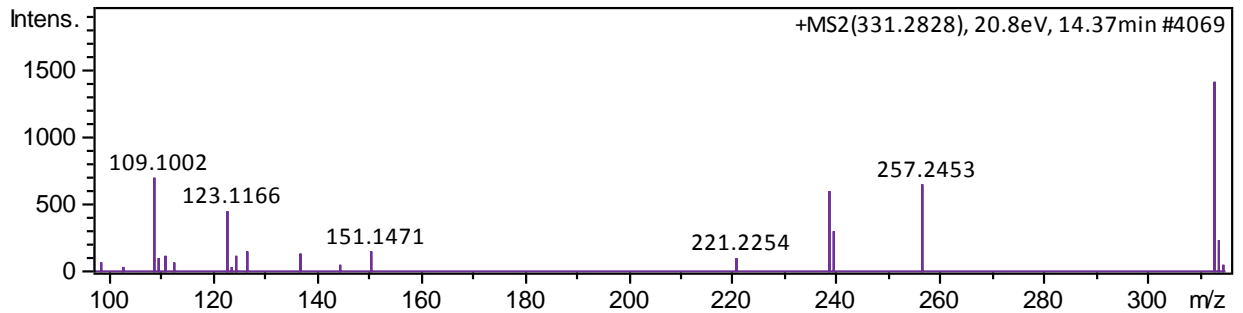
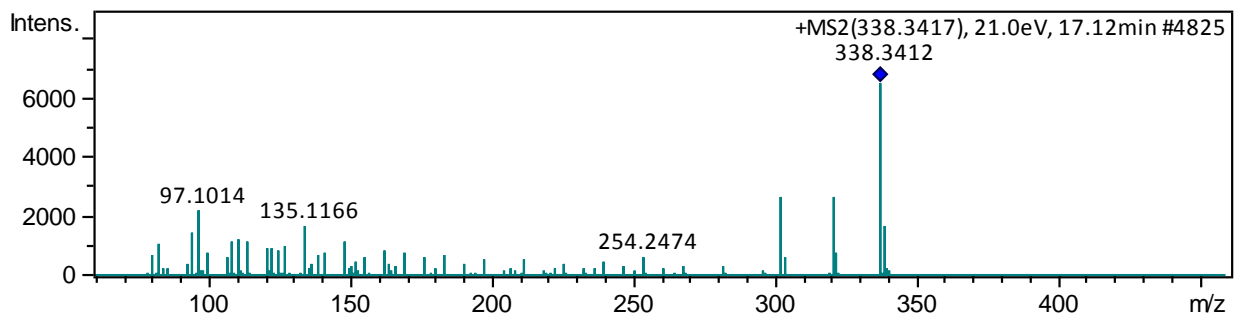
Anexo A.2: Espectro de MS/MS do metabólito Palmitamide



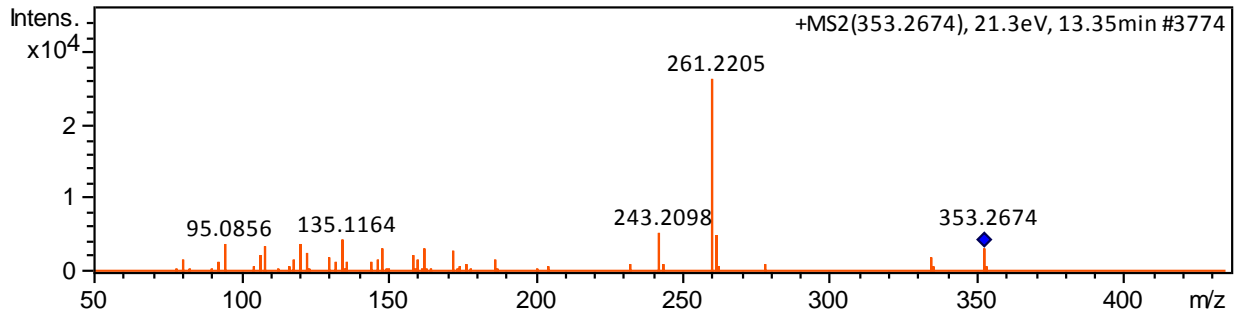
Anexo A.3: Espectro de MS/MS do metabólito SN-GLYCERO-3-PHOSPHOCHOLINE



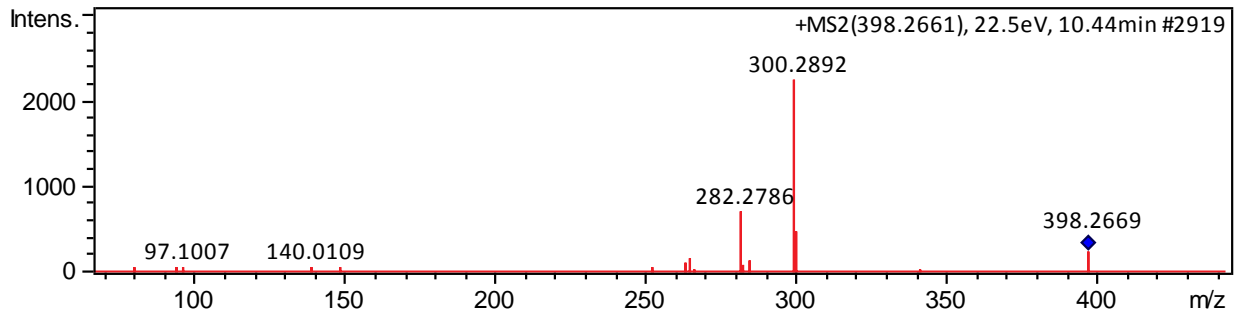
Anexo A.4: Espectro de MS/MS do metabólito Stearidonic acid**Anexo A.5: Espectro de MS/MS do metabólito Linoleic acid****Anexo A.6: Espectro de MS/MS do metabólito 9-OxoOTrE**

Anexo A.7: Espectro de MS/MS do metabólito 9-Oxo-10E,12Z-octadecadienoic acid**Anexo A.8: Espectro de MS/MS do metabólito 1-Hexadecanoyl-sn-glycerol****Anexo A.9: Espectro de MS/MS do metabólito 13-Docosenamide**

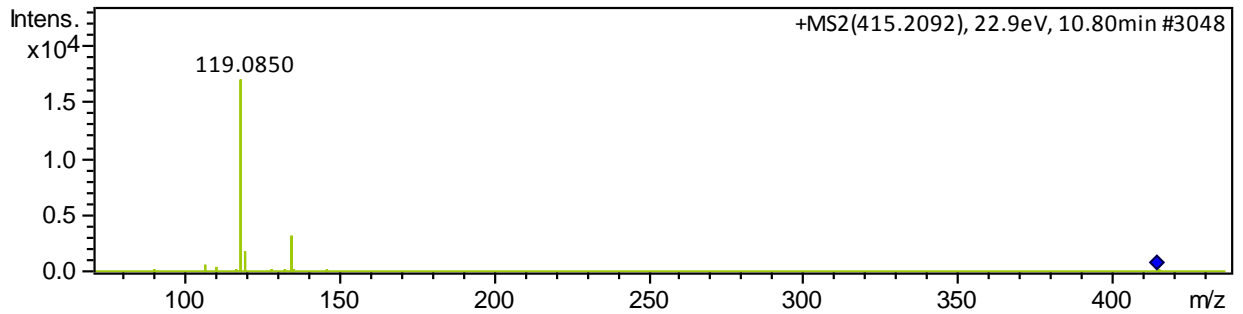
Anexo A.10: Espectro de MS/MS do metabólito 2-Monolinolenin



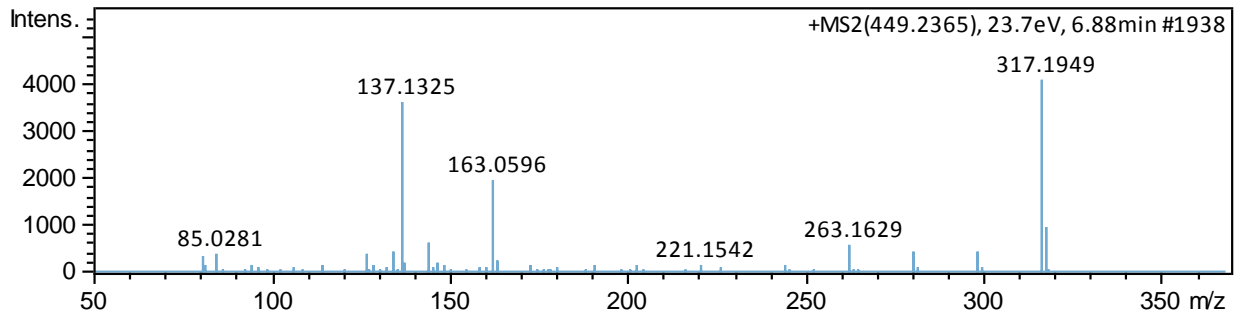
Anexo A.11: Espectro de MS/MS do metabólito Phytosphingosine-1-P



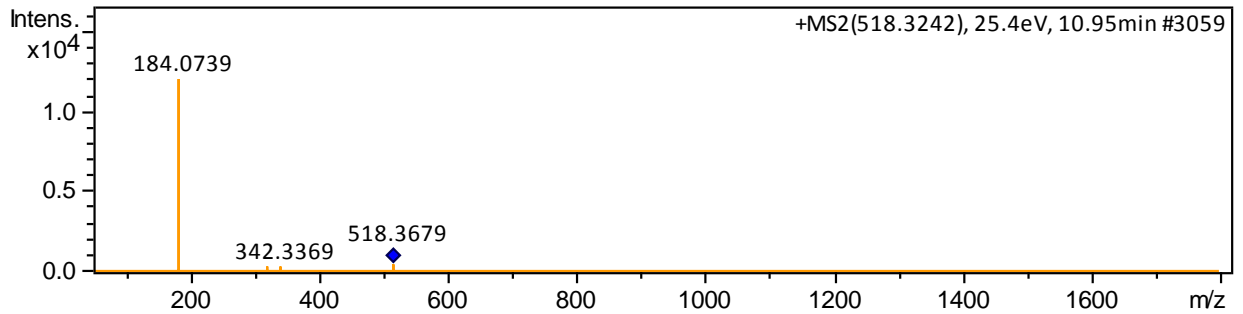
Anexo A.12: Espectro de MS/MS do metabólito Austinoneol



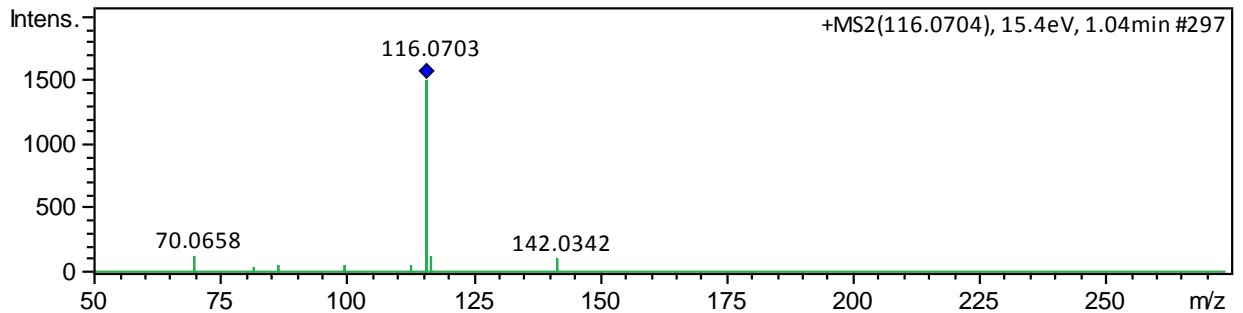
Anexo A.13: Espectro de MS/MS do metabólito Acuminoside



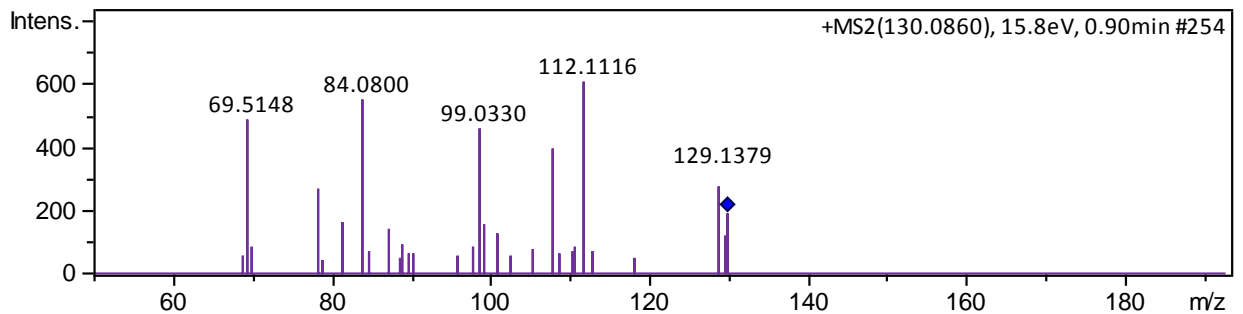
Anexo A.14: Espectro de MS/MS do metabólito Lysophosphatidylcholine



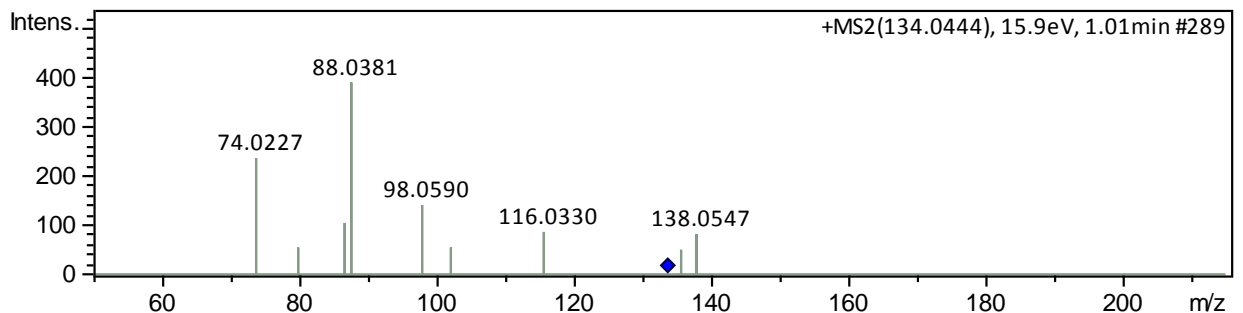
Anexo A.15: Espectro de MS/MS do metabólito Proline

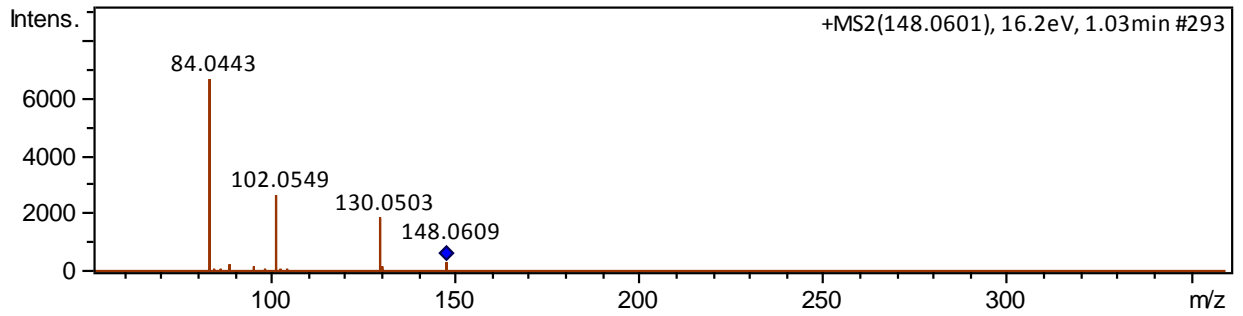
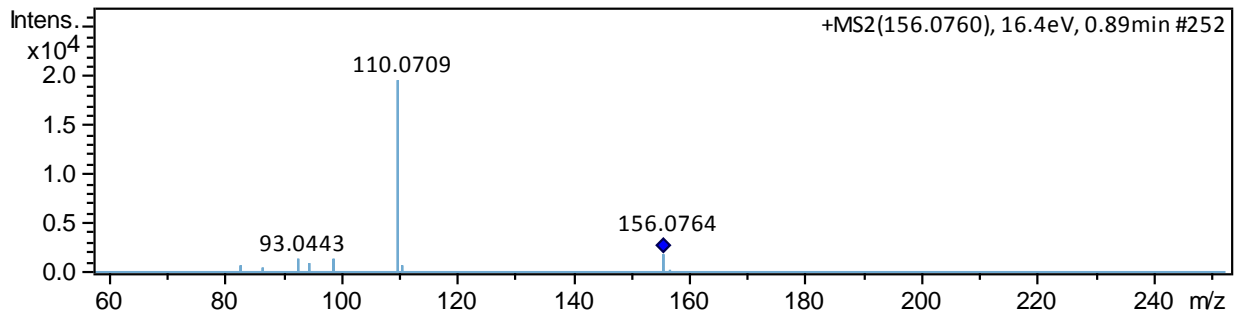
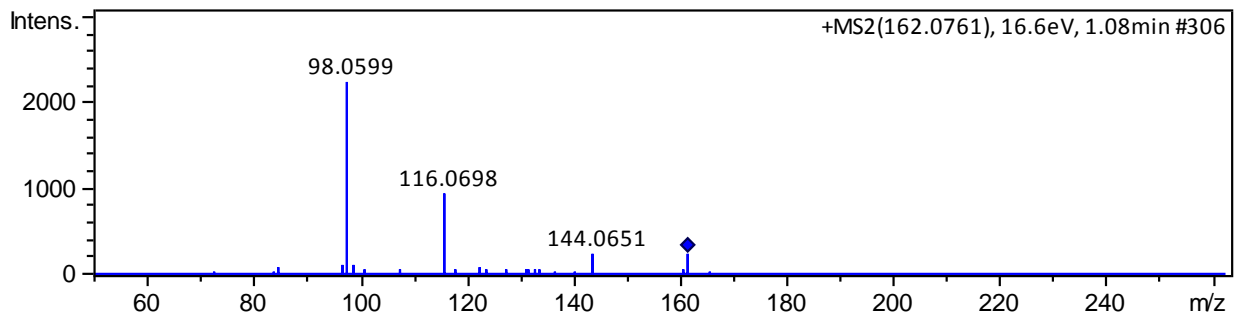


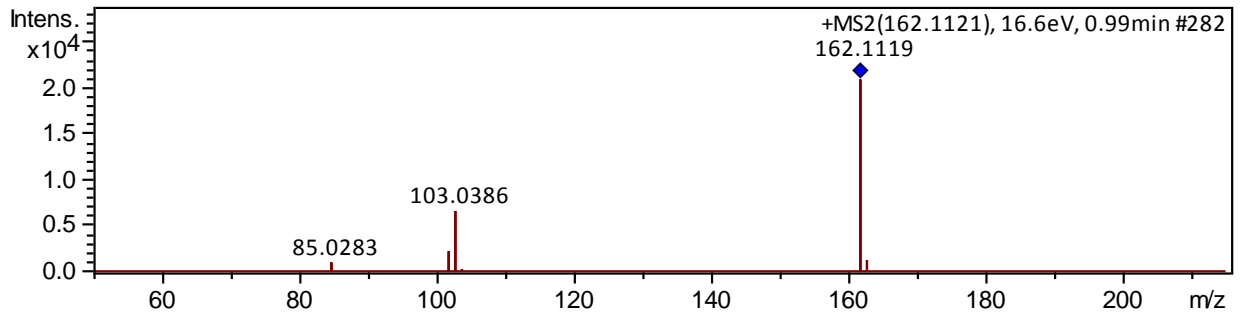
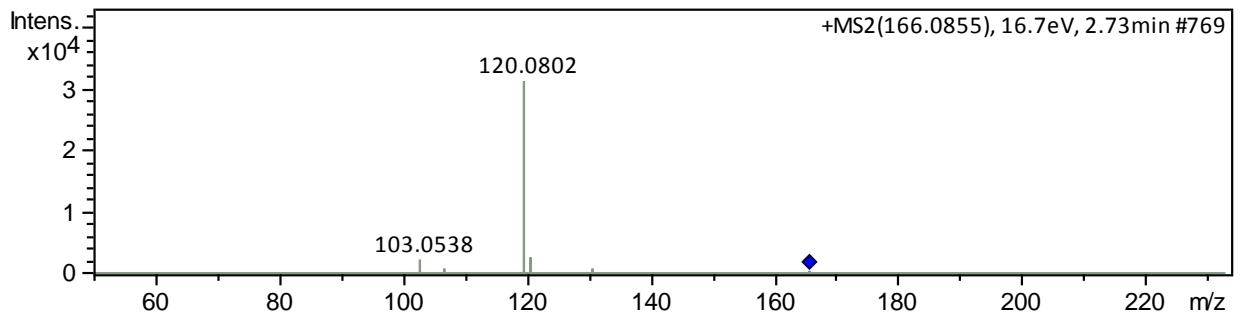
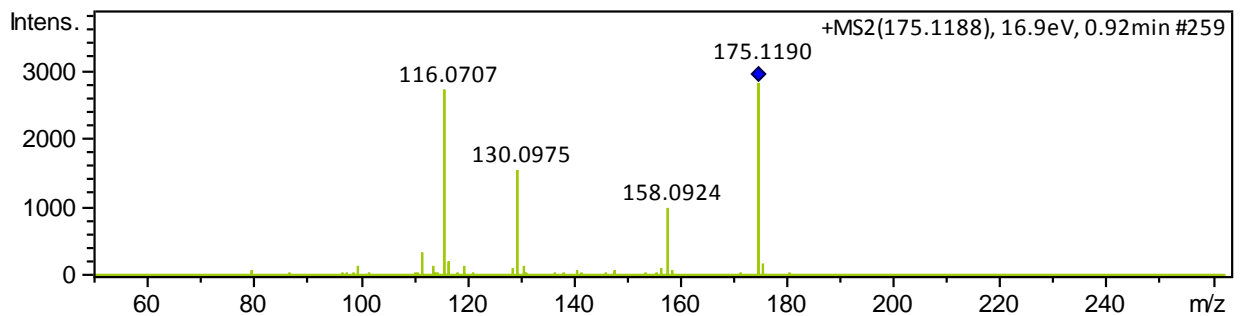
Anexo A.16: Espectro de MS/MS do metabólito Pipecolic acid

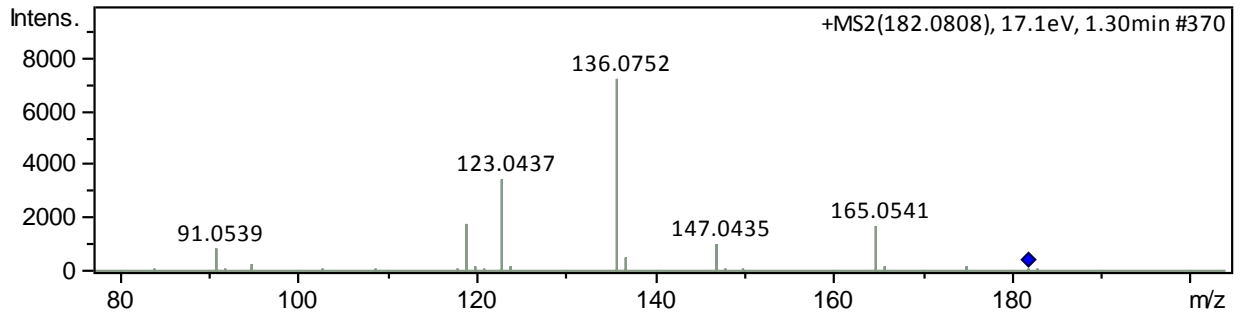
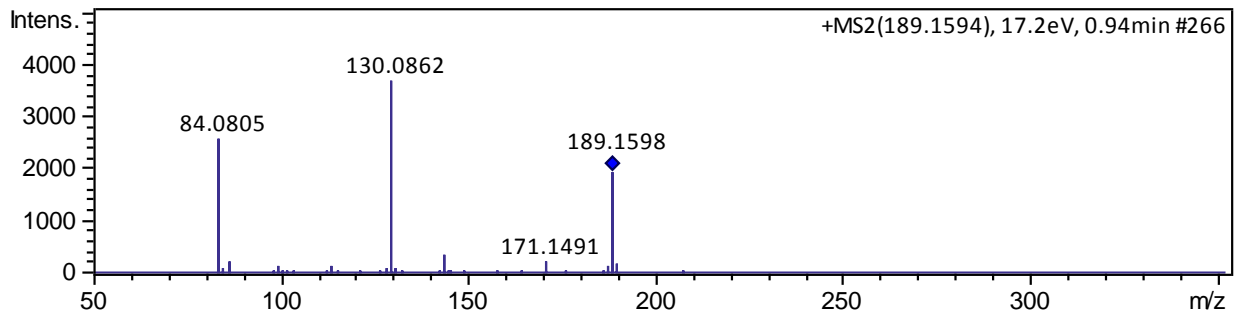
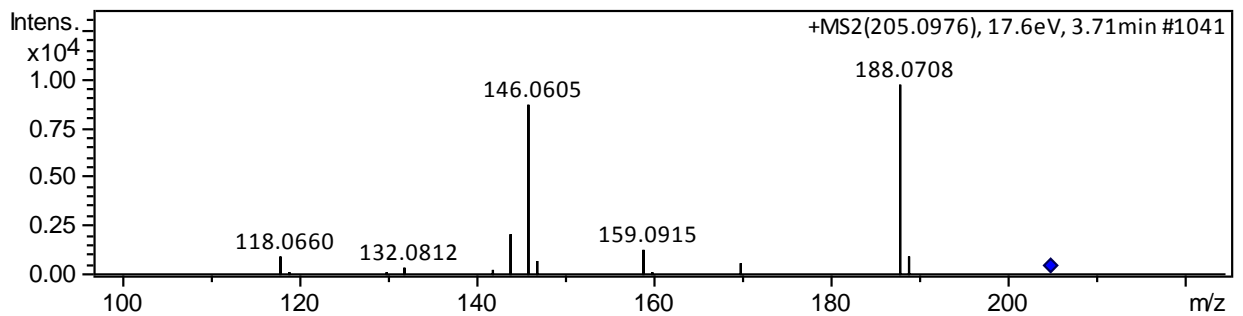


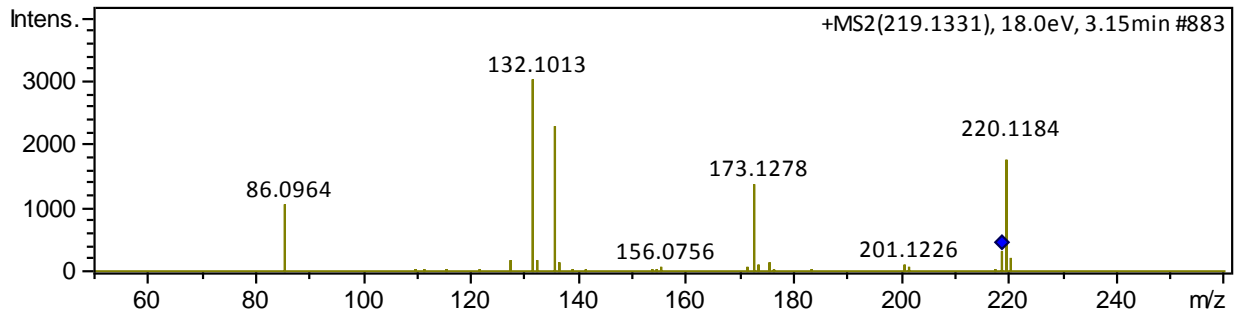
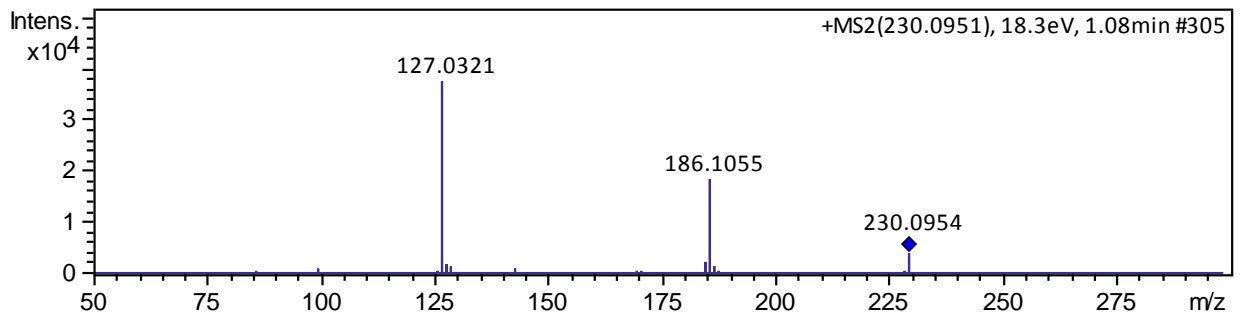
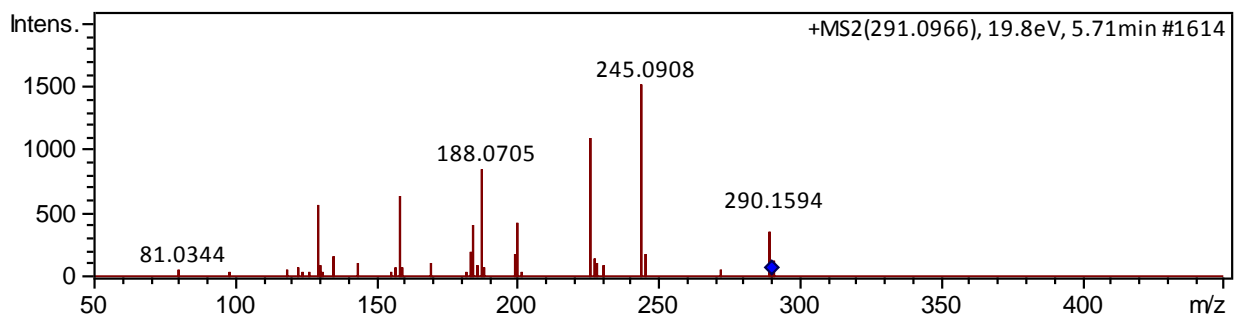
Anexo A.17: Espectro de MS/MS do metabólito L-Aspartic acid

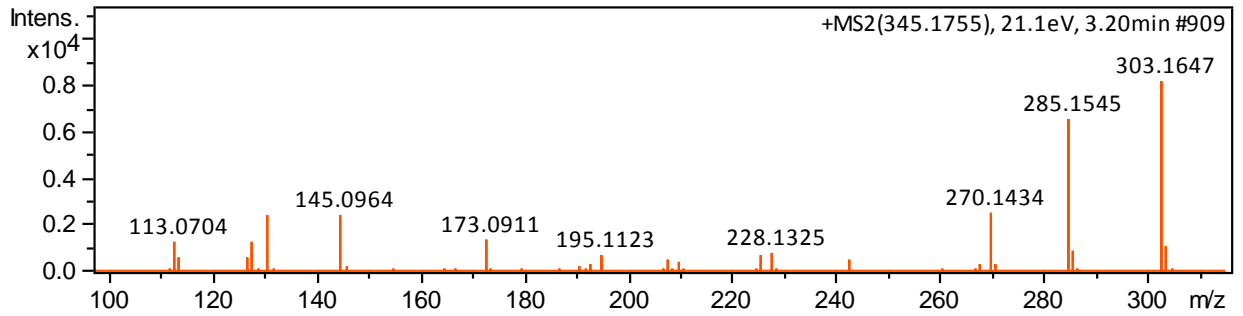
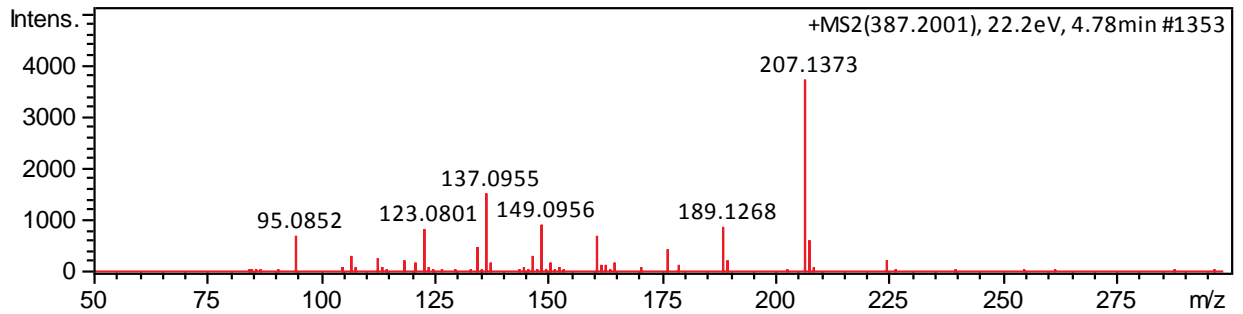
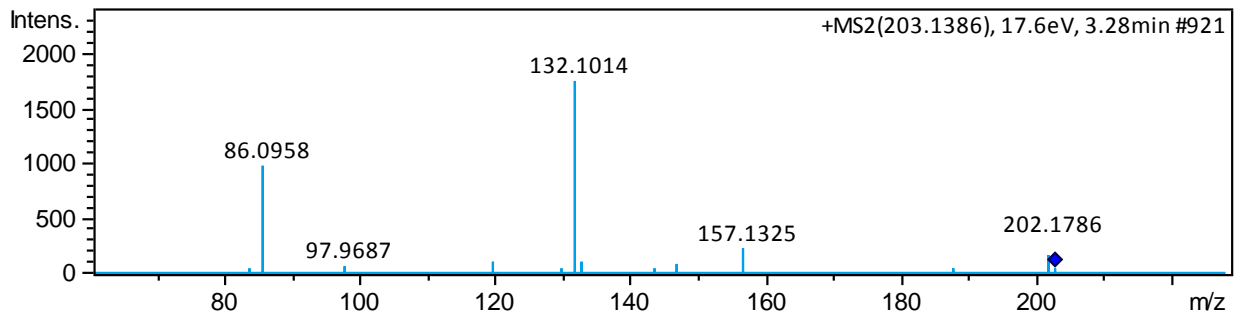


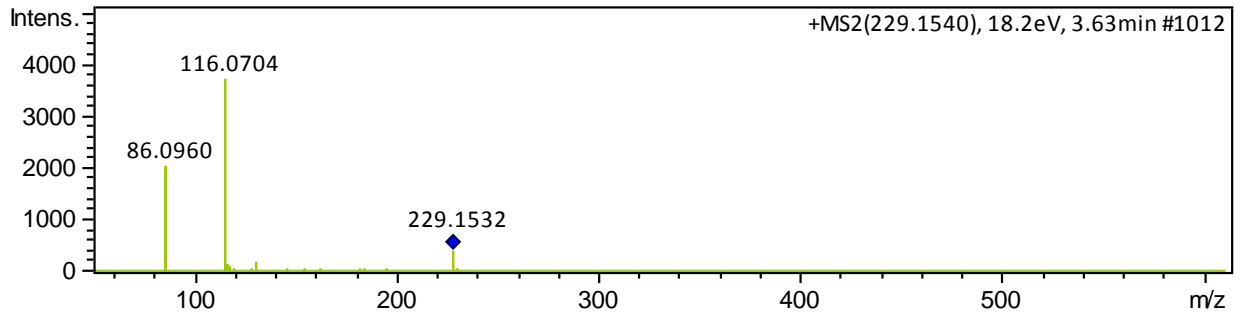
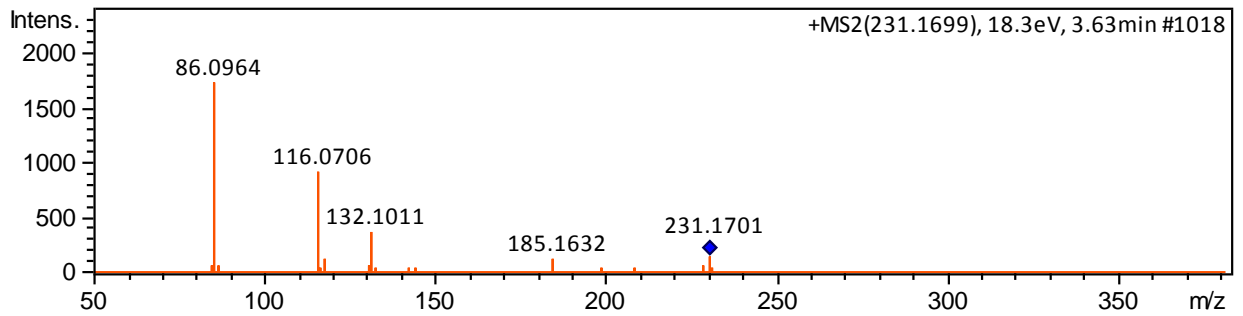
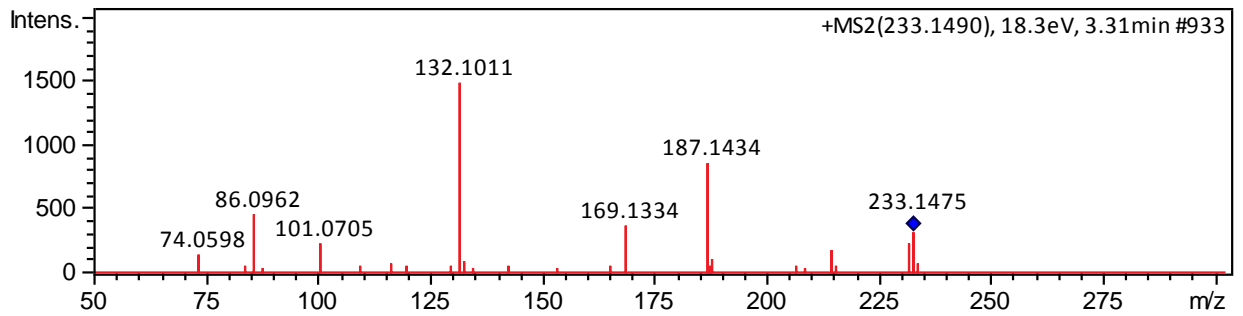
Anexo A.18: Espectro de MS/MS do metabólito Glutamic Acid**Anexo A.19: Espectro de MS/MS do metabólito Histidine****Anexo A.20: Espectro de MS/MS do metabólito 2-Amino adipic acid**

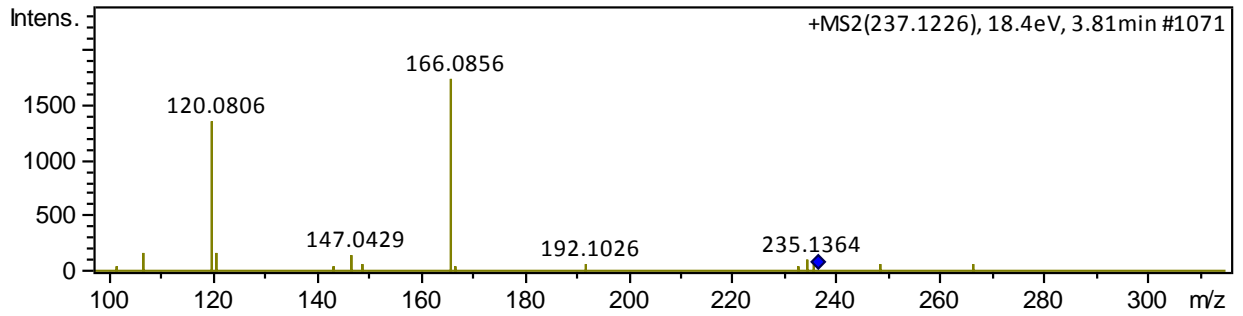
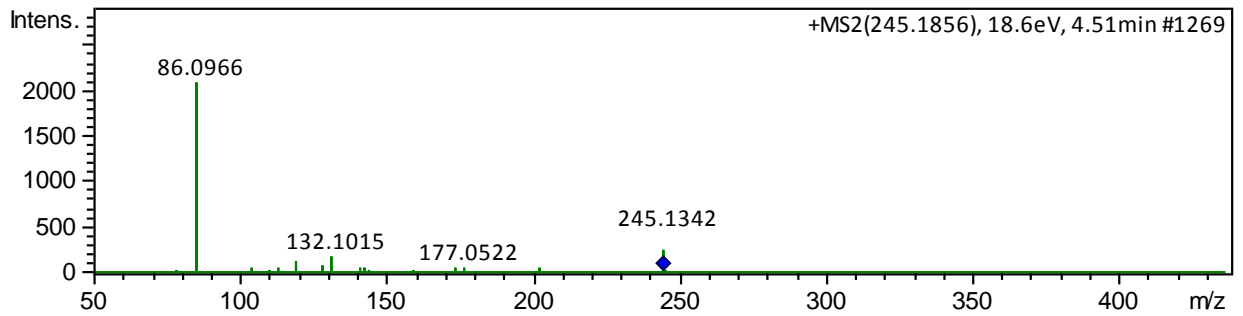
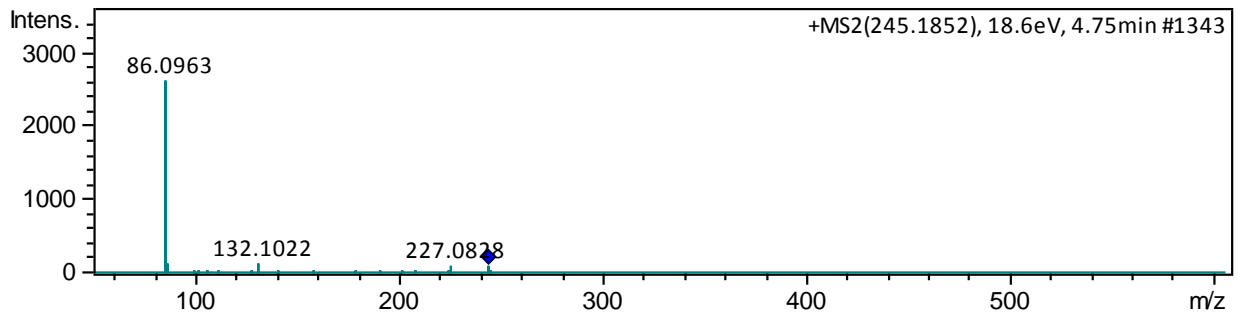
Anexo A.20: Espectro de MS/MS do metabólito L-Carnitine**Anexo A.21: Espectro de MS/MS do metabólito Phenylalanine****Anexo A.22: Espectro de MS/MS do metabólito Arginine**

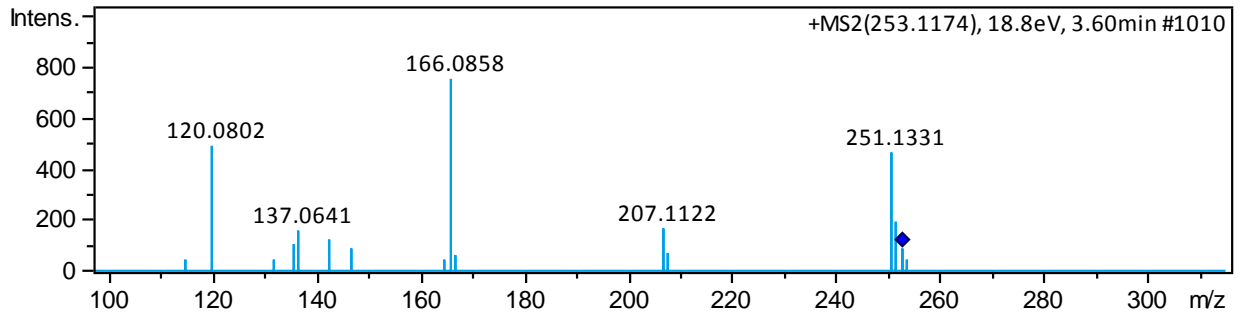
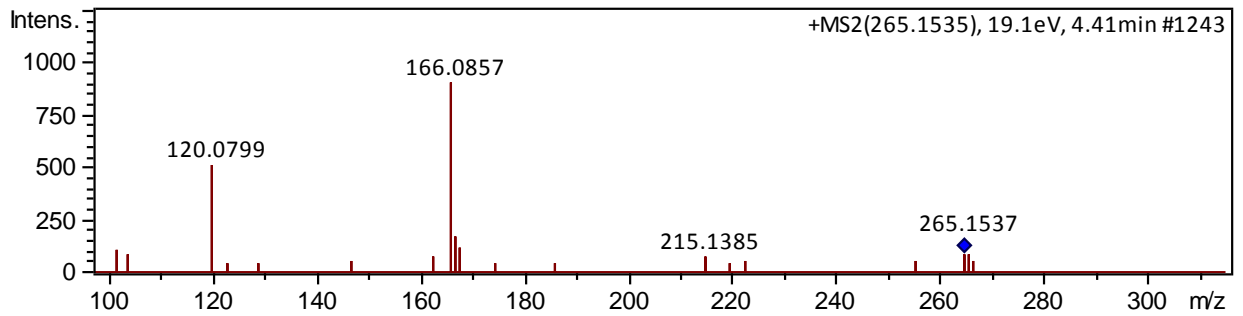
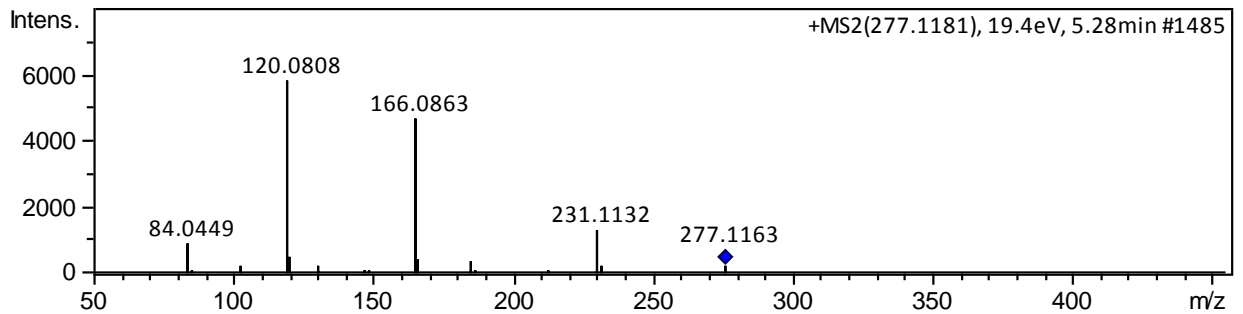
Anexo A.23: Espectro de MS/MS do metabólito Tyrosine**Anexo A.24: Espectro de MS/MS do metabólito N6,N6,N6-Trimethyl-L-lysine****Anexo A.25: Espectro de MS/MS do metabólito Tryptophan**

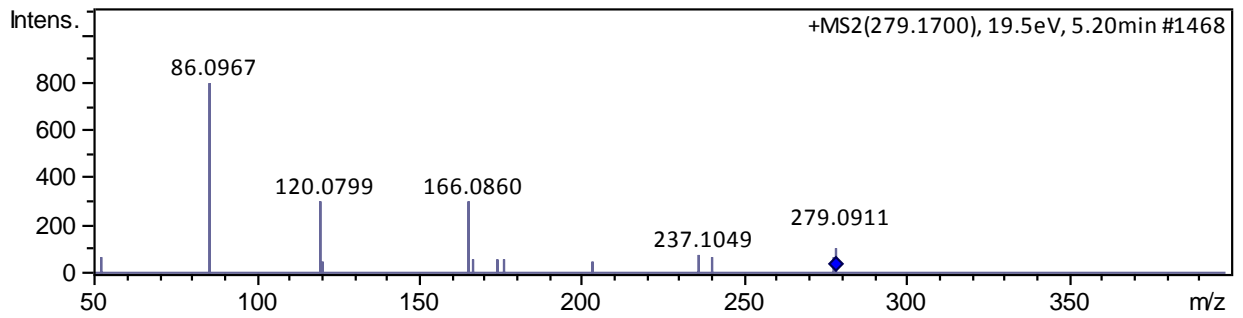
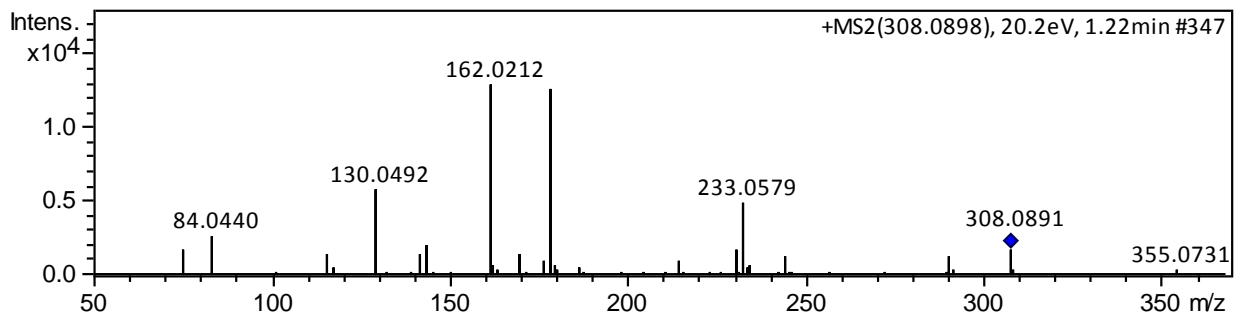
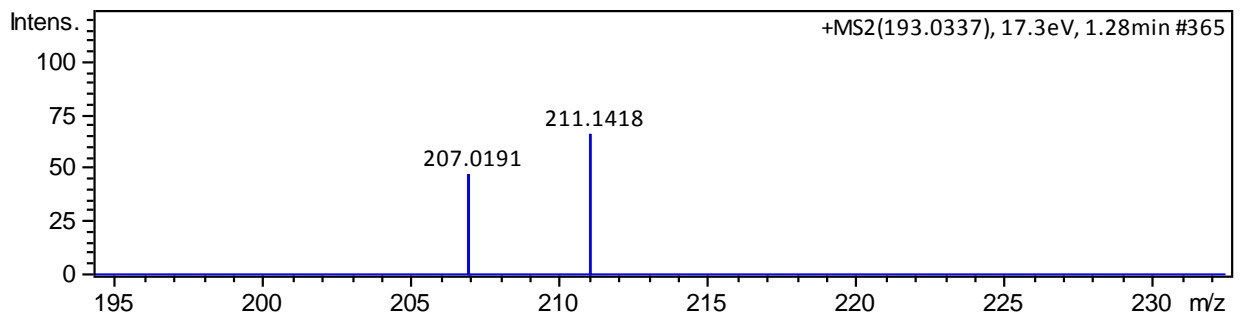
Anexo A.26: Espectro de MS/MS do metabólito Serylleucine**Anexo A.27: Espectro de MS/MS do metabólito L(+)-Ergothioneine****Anexo A.28: Espectro de MS/MS do metabólito N-Malonyltryptophan**

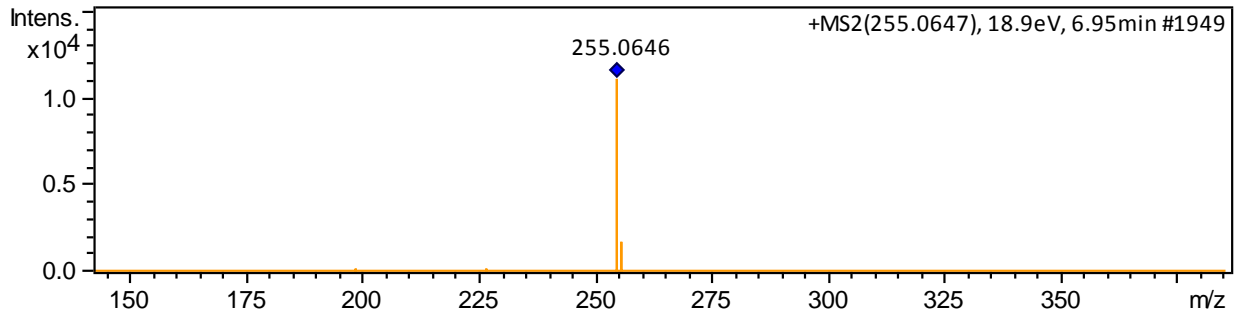
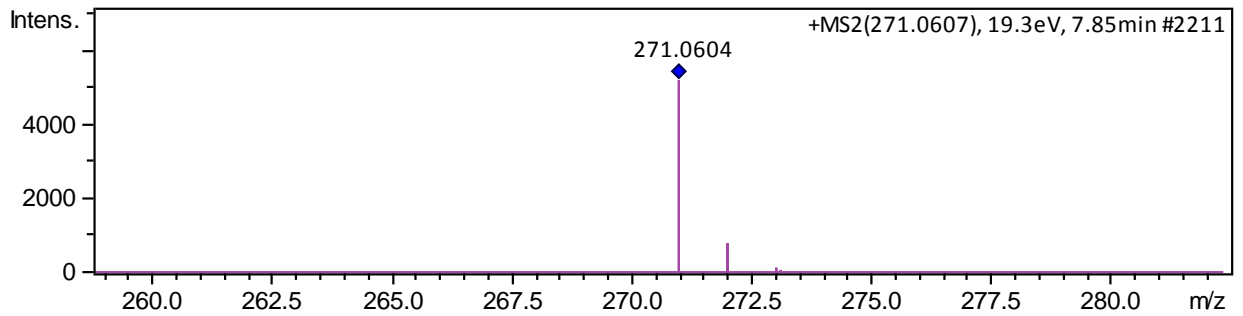
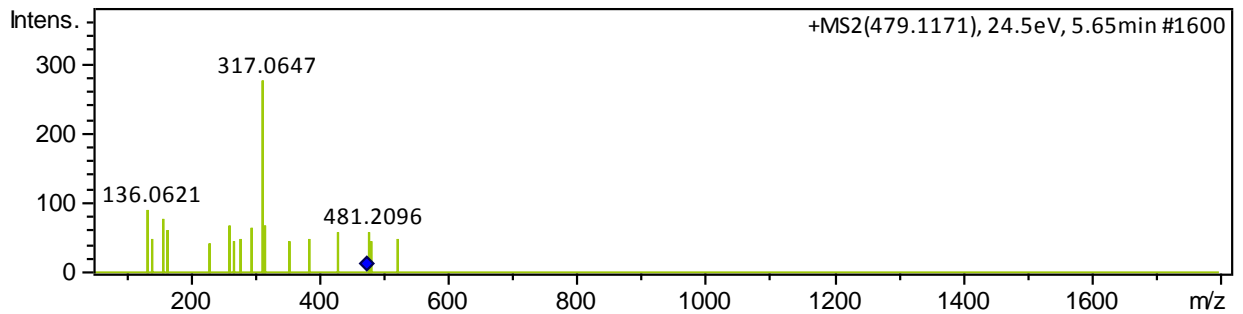
Anexo A.29: Espectro de MS/MS do metabólito Rhodotorulic acid**Anexo A.30: Espectro de MS/MS do metabólito NCGC00169491-02!(4S)-4-hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-[(E)-3-[(2R,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxybut-1-enyl]cyclohex-2-en-1-one****Anexo A.31: Espectro de MS/MS do metabólito L-Alanyl-L-norleucine**

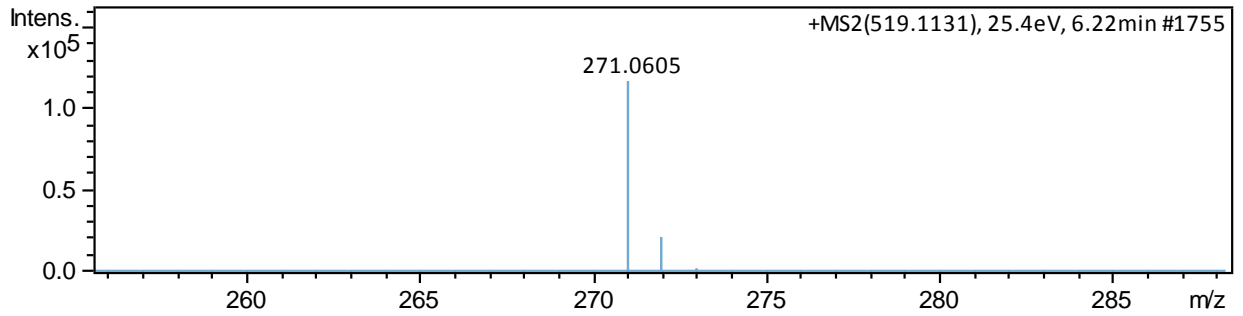
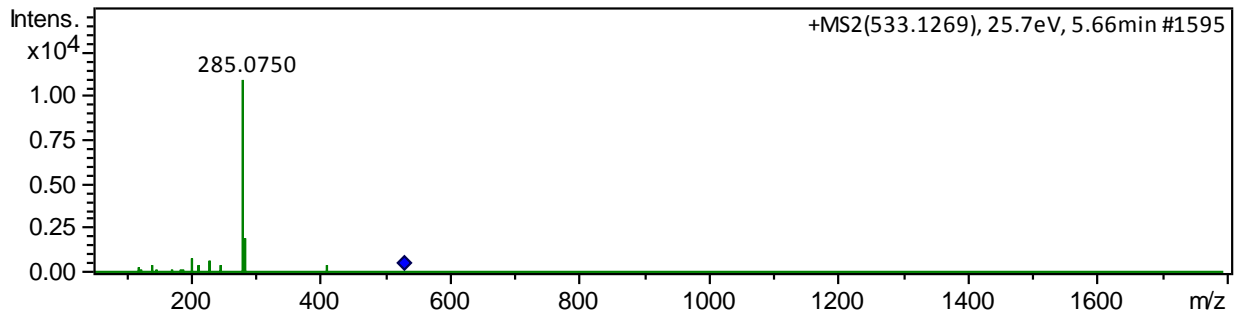
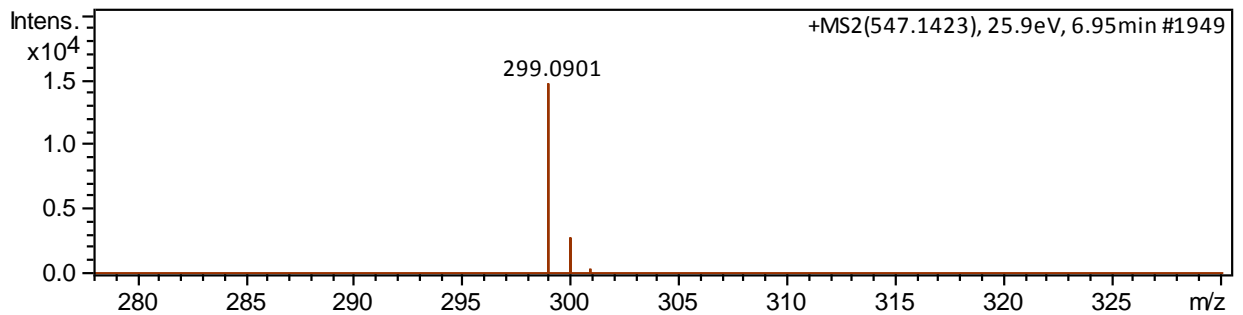
Anexo A.32: Espectro de MS/MS do metabólito Ile-Pro**Anexo A.33: Espectro de MS/MS do metabólito Leu-Val****Anexo A.34: Espectro de MS/MS do metabólito Thr-Leu**

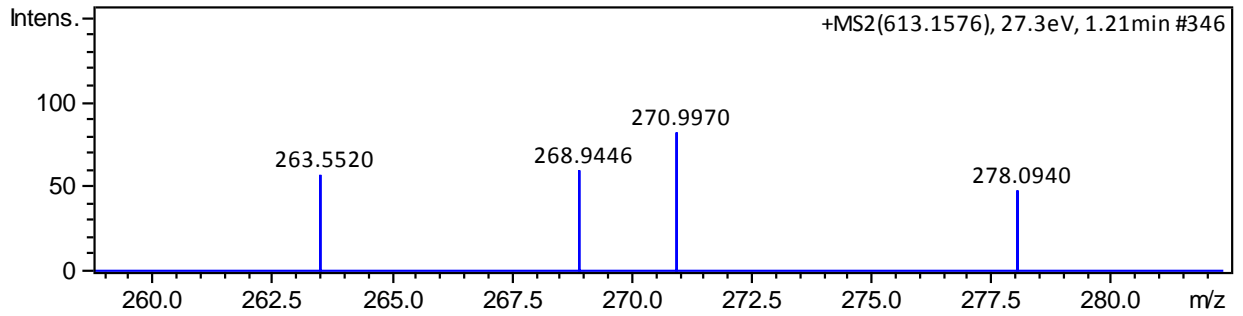
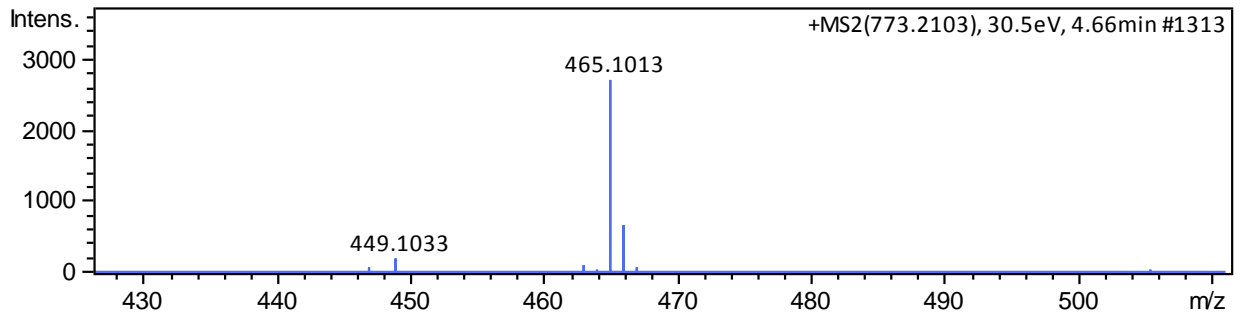
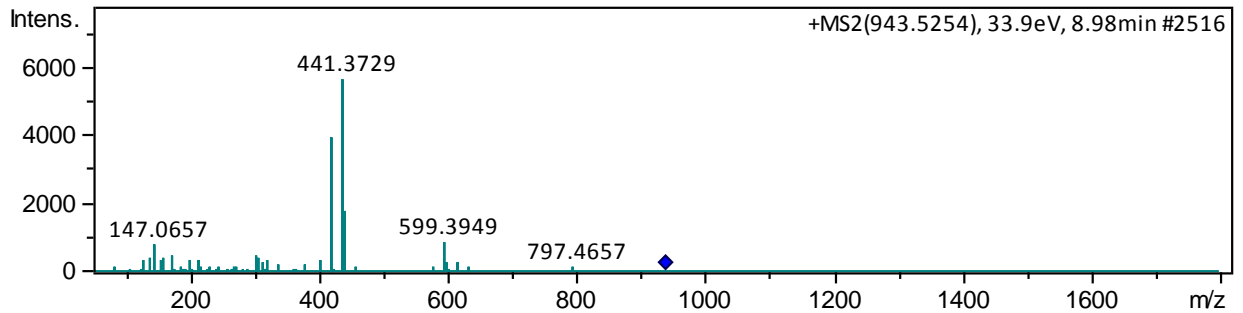
Anexo A.35: Espectro de MS/MS do metabólito Ala-Phe**Anexo A.36: Espectro de MS/MS do metabólito Leu-Leu****Anexo A.37: Espectro de MS/MS do metabólito Ile-Leu**

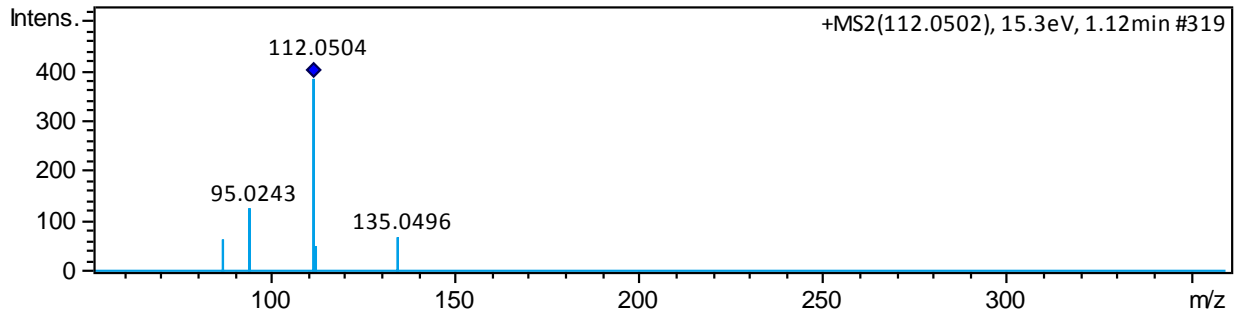
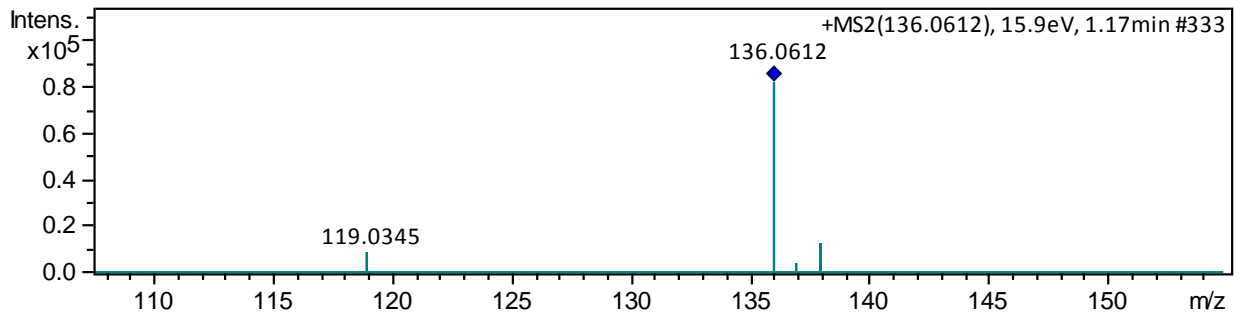
Anexo A.38: Espectro de MS/MS do metabólito Ser-Phe**Anexo A.39: Espectro de MS/MS do metabólito Phe-Val****Anexo A.40: Espectro de MS/MS do metabólito PyroGlu-Phe**

Anexo A.41: Espectro de MS/MS do metabólito Leu-Phe**Anexo A.42: Espectro de MS/MS do metabólito Glutathione****Anexo A.43: Espectro de MS/MS do metabólito Citric Acid**

Anexo A.44: Espectro de MS/MS do metabólito Daidzein**Anexo A.45: Espectro de MS/MS do metabólito Genistein****Anexo A.46: Espectro de MS/MS do metabólito Isorhamnetin 3-galactoside**

Anexo A.47: Espectro de MS/MS do metabólito 6"-O-Malonylgenistin**Anexo A.48: Espectro de MS/MS do metabólito Biochanin A O-glucoside malonylated****Anexo A.49: Espectro de MS/MS do metabólito 6"-O-Malonylwistin**

Anexo A.50: Espectro de MS/MS do metabólito Oxidized Glutathione**Anexo A.51: Espectro de MS/MS do metabólito Quercetin 3-rutinoside 7-galactoside****Anexo A.52: Espectro de MS/MS do metabólito Soyasaponin I**

Anexo A.53: Espectro de MS/MS do metabólito Cytosine**Anexo A.54: Espectro de MS/MS do metabólito Adenine****Anexo A.55: Espectro de MS/MS Riboflavin**