



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CATALÃO (UFCAT)
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

MARCOS HENRIQUE FALEIROS SANTOS

**ESTUDO DO PERFIL QUÍMICO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS PRODUZIDOS
POR VARIEDADES DE TOMATES COM DIFERENTES RESISTÊNCIAS AO
ATAQUE DE MOSCA-BRANCA (*Bemisia tabaci*)**

CATALÃO – GO

2022



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
UNIDADE ACADÊMICA ESPECIAL DE QUÍMICA

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

Dissertação Tese Outro*: _____

*No caso de mestrado/doutorado profissional, indique o formato do Trabalho de Conclusão de Curso, permitido no documento de área, correspondente ao programa de pós-graduação, orientado pela legislação vigente da CAPES.

Exemplos: Estudo de caso ou Revisão sistemática ou outros formatos.

2. Nome completo do autor

Marcos Henrique Faleiros Santos

3. Título do trabalho

ESTUDO DO PERFIL QUÍMICO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS PRODUZIDOS POR VARIEDADES DE TOMATES COM DIFERENTES RESISTÊNCIAS AO ATAQUE DE MOSCA-BRANCA (*Bemisia tabaci*)

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

a) consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);

b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.

O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;

- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por **Richele Priscila Severino, Professora do Magistério Superior**, em 02/02/2023, às 14:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **MARCOS HENRIQUE FALEIROS SANTOS, Discente**, em 06/02/2023, às 15:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3398746** e o código CRC **DB320448**.

Referência: Processo nº 23070.064831/2022-03

SEI nº 3398746

MARCOS HENRIQUE FALEIROS SANTOS

**ESTUDO DO PERFIL QUÍMICO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS PRODUZIDOS
POR VARIEDADES DE TOMATES COM DIFERENTES RESISTÊNCIAS AO
ATAQUE DE MOSCA-BRANCA (*Bemisia tabaci*)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, da Unidade Instituto de Química, da Universidade Federal de Catalão (UFCAT), como requisito para obtenção do título de Doutor Em Química. Área de Concentração: Química Orgânica. Linha de Pesquisa: Química de Produtos Naturais.

Orientadora: Profa. Dra. Richele Priscila Severino.

Bolsista CAPES/FAPEG

CATALÃO – GO

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFCAT.

Santos, Marcos Henrique Faleiros
ESTUDO DO PERFIL QUÍMICO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS
PRODUZIDOS POR VARIEDADES DE TOMATES COM
DIFERENTES RESISTÊNCIAS AO ATAQUE DE MOSCA-BRANCA
(*Bemisia tabaci*) / Marcos Henrique Faleiros Santos. - 2022.
148, CXLVIII f.: il.

Orientadora: Profa. Dra. Richele Priscila Severino.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Catalão, Instituto de
Química, Catalão, Programa de Pós-Graduação em Química, Catalão,
2022.

Bibliografia. Anexos.

Inclui siglas, abreviaturas, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de
tabelas.

1. semioquímicos. 2. tomates. 3. mosca-branca. 4. análise
estatística. I. Severino, Richele Priscila, orient. II. Título.

CDU 54



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
UNIDADE ACADÊMICA ESPECIAL DE QUÍMICA

ATA DE DEFESA DE TESE

Ata Nº **10** da sessão de Defesa de Tese de **Marcos Henrique Faleiros Santos** que confere o título de Doutor(a) em Química, estudante de doutorado no Programa de Pós-graduação em Química em Associação entre UFCAT//UEG//UFGD.

Aos seis dias do mês de dezembro de dois mil e vinte e dois, a partir da(s) **13:30 horas**, por videoconferência do google meet (meet.google.com/atr-xpke-rmp), realizou-se a sessão pública de Defesa de Tese intitulada “**Estudo do perfil de compostos orgânicos produzidos por tomateiros com diferentes níveis de resistência ao ataque de mosca-branca**”, na área de concentração em Química Orgânica. Os trabalhos foram instalados pelo(a) Orientador(a), Professor(a) Doutor(a) Richele Priscila Severino (PPGQ-Doutorado UFCAT) com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Professor(a) Doutor(a) Vanessa Giselle Pasqualotto Severino (UFG), membro titular externo; Professor(a) Doutor(a) Lorena Ramos Freitas de Souza (IQ-UFCAT), membro titular externo; Professor(a) Doutor(a) Marcio Pozzobon Pedroso (UFLA), membro titular externo; Professor(a) Doutor(a) Cristiane de Melo Cazal (IF Sudeste MG), membro titular externo. Durante a arguição os membros da banca fizeram sugestões de pequenas alterações e complementações que deverão ser realizadas para a versão final da tese. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Tese tendo sido(a) o(a) candidato(a) **aprovado(a)** pelos seus membros. Proclamados os resultados pelo(a) Professor(a) Doutor(a) Richele Priscila Severino, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos às 18:20h e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA

ESTUDO DO PERFIL QUÍMICO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS PRODUZIDOS POR
VARIEDADES DE TOMATES COM DIFERENTES RESISTÊNCIAS AO ATAQUE DE
MOSCA-BRANCA (*Bemisia tabaci*)



Documento assinado eletronicamente por **Richele Priscila Severino, Professora do Magistério Superior**, em 06/12/2022, às 18:24, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marcio Pozzobon Pedroso, Usuário Externo**, em 07/12/2022, às 14:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de](#)



Documento assinado eletronicamente por **Cristiane de Melo Cazal, Usuário Externo**, em 07/12/2022, às 22:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Lorena Ramos Freitas De Sousa, Professor do Magistério Superior**, em 11/12/2022, às 15:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luciana Melo Coelho, Coordenadora de Pós-Graduação**, em 14/12/2022, às 08:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3367153** e o código CRC **C35E68BF**.

NOTA NAS TESES/DISSERTAÇÕES

Os Programas de Pós-Graduação stricto sensu em funcionamento na Universidade Federal de Catalão (UFCAT), em virtude de procedimentos técnicos relacionados à CAPES, continuam provisoriamente vinculados à Universidade Federal de Goiás (UFG), por isso, todos os elementos pré-textuais do trabalho apresentado estão identificados como Universidade Federal de Goiás/Universidade Federal de Catalão em implantação, em função da migração da BDTD ter ocorrido a partir de 16 de agosto de 2021, assim como pelo fato das pesquisas e produtos serem realizados na UFCAT.

Dedico esse trabalho aos meus pais, Aparecida Quintino Faleiros e Alcil Pires dos Santos, e ao meu sobrinho Gustavo Henrique Santos Vilela... que um dia você possa ser inspirado por essa longa caminhada de formação profissional.

Dedico também a todos aqueles que acreditaram em mim e sempre me incentivaram na realização desse sonho!

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profa. Dra. Richele Priscila Severino, a qual me inspira ser um profissional ético e dedicado. Agradeço por todos os ensinamentos transmitidos durante esses treze anos de convivência. Obrigado pelo carinho, por acreditar em meu trabalho; e, principalmente por toda sua luta quando eu contraí a COVID-19.

Aos demais professores do Instituto de Química da UFCAT, em especial à Dra. Elaine Rosechrer Carbonero e à Dra. Lorena Ramos Freitas de Sousa pela convivência e ensinamentos durante minha formação profissional.

Aos membros da banca de qualificação e defesa da tese por todas as contribuições na confecção desse trabalho.

Aos agricultores da “Horta dos Baianos”, por ajudarem na execução dos experimentos com os tomateiros. Obrigado pelo zelo com cada muda de tomate!

Ao Prof. Dr. Paulo Cezar Vieira (USP - Ribeirão Preto) por todas suas contribuições em minha formação profissional e por inspirar tantos jovens cientistas na pesquisa em Química de Produtos Naturais.

Ao Prof. Dr. Antônio Gilberto Ferreira (UFSCar) pela colaboração na realização dos experimentos de Ressonância Magnética Nuclear.

Às professoras Dra. Quezia Bezerra Cass e Profa. Dra. Regina Vincenzi Oliveira (UFSCar) pela realização dos experimentos de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas sequencial.

Aos professores Dr. Marcelo Braga Bueno Guerra (UFLA) e Dr. Elenilson de Godoy Alves Filho (UFC) por todos os ensinamentos e auxílio na execução das análises estatísticas.

Aos funcionários e técnicos do Instituto de Química da UFCAT, em especial à Tec. Me. Márcia Mendes, pelo seu apoio e dedicação profissional, e acima de tudo por sua amizade constante.

Aos meus amigos do Laboratório de Bioquímica e Química Orgânica (LaBiOrg) e demais laboratórios da UFCAT, por todos os momentos de estudos, troca de conhecimentos e descontração. Em especial à aluna de iniciação científica, Jéssica Silva Oliveira, por todas as suas contribuições na execução desse trabalho.

À toda minha família e amigos pelo apoio, amor, carinho, compreensão, orações e por entenderem minha ausência. Em especial aos meus pais, Alcil e Aparecida, e minha irmã, Doriene, que com toda humildade e simplicidade, nunca mediram esforços para me ver chegar até aqui. Mesmo não tendo reais conhecimentos do que seria o doutorado, sempre me deram

forças para concluir esta etapa. Ao meu sobrinho, Gustavo Henrique, que mesmo ainda não sabendo do que se trata esse título, é um grande motivador de todas as minhas batalhas e conquistas. Ao meu namorado Leandro Hall, que nas formas mais simples buscou me incentivar na conclusão desse trabalho.

Às empresas Clause e Sakata pela doação das sementes utilizadas no desenvolvimento desse trabalho.

À CAPES pela concessão da bolsa, e FAPEG e CNPQ pelo suporte financeiro.

A Deus por me proporcionar saúde para vivenciar essa experiência incrível e a realizar um sonho.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

Madre Teresa de Calcuta

RESUMO

ESTUDO DO PERFIL QUÍMICO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS PRODUZIDOS POR VARIEDADES DE TOMATES COM DIFERENTES RESISTÊNCIAS AO ATAQUE DE MOSCA-BRANCA (*Bemisia tabaci*). O tomate (*Solanum lycopersicum* L.) é uma das hortaliças mais cultivadas no mundo. Entretanto, os produtores enfrentam grandes riscos no cultivo devido ao ataque de pragas, como a mosca-branca (*Bemisia tabaci*). Para tentar contornar esses problemas, as empresas têm desenvolvido variedades de tomates resistentes à diversas pragas. Este trabalho teve como objetivo analisar o perfil químico de Compostos Orgânicos Voláteis (COVs) e Não Voláteis (CONVs) produzidos por duas variedades de tomateiros, com diferentes resistências à mosca-branca [Dylla (TD) - resistente e Norty (TN) - não resistente], quando submetidas ou não a herbivoria. Os COVs foram coletados através de fibras por Microextração em Fase Sólida e analisados por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM). Os CONVs foram obtidos a partir do extrato etanólico das folhas frescas trituradas com etanol e submetidos às análises de CG-EM, e Cromatografia Líquida de Ultra-Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas sequencial (CLUE-EM/EM) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Os resultados obtidos nas análises de identificação dos compostos químicos presentes nas folhas dos tomateiros foram avaliados estatisticamente. As análises estatísticas confirmaram a diferença de metabólitos produzidos pelas variedades de tomateiros e mostrou que TD produziu o óxido de *trans*-carvenona (**43**), não identificado para a variedade TN. Ao serem infestados por mosca-branca, os tomateiros Dylla produziram grandes quantidades de δ -2-careno (**4**); e a variedade Norty apresentou maior quantidade de α -humuleno (**70**) e o composto não identificado **65**. A análise dos extratos etanólicos por CG-EM mostrou que os tomateiros produziram, majoritariamente, ácidos e ésteres graxos nas duas condições experimentais (submetidas à herbivoria/horta e sob condições controladas/estufa). Os dados das análises por CLUE-EM/EM foram processados na plataforma *GNPS*, resultando na anotação de 21 compostos (majoritariamente flavonoides, terpenoides e fenilpropanoides). Por RMN de ^1H , ^{13}C e mapas de contorno *HSQC* e *HMBC* foi possível confirmar a estrutura do composto fitol (**94**) e dos flavonoides quercetina-3-*O*-rutinosídeo (**98**) e quercetina (**118**). Desta forma, conclui-se que as variedades de tomateiros TD e TN produzem compostos diferentes, os quais podem ser candidatos a semioquímicos e aplicados em ensaios controlados para determinação da eficiência bioerbicida no combate a mosca-branca.

Palavras-chave: semioquímicos; tomates; mosca-branca, análise estatística.

ABSTRACT

PROFILE STUDY OF ORGANIC COMPOUNDS PRODUCED BY TOMATOES VARIETIES WITH DIFFERENT RESISTANCE TO THE WHITEFLY (*Bemisia tabaci*) ATTACK. Tomato (*Solanum lycopersicum*) is one of the most cultivated vegetables around the world. However, producers face great risks in cultivation due to the attack of pests such as the whitefly (*Bemisia tabaci*). To overcoming these problems, companies have developed resistant tomato varieties to several pests. This work aims to analyze the chemical profile of Volatile Organic Compounds (VOCs) and Non-Volatile Organic Compounds (CONVs) produced by two tomato varieties, with different resistance against whitefly [Dylla (TD) - resistant and Norta (TN) - non-resistant], when exposed or not to herbivory. VOCs were collected through fibers by Solid Phase Microextraction and analyzed by Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (GC-MS). CONVs were obtained from the ethanolic extract of fresh leaves crushed with ethanol and subjected to GC-MS, Ultra-Performance Liquid Chromatography coupled with Sequential Mass Spectrometry (UPLC-MS/MS) and Nuclear Magnetic Resonance (NMR) analyses. The results obtained in the identification chemical compounds present in tomato leaves were statistically evaluated. The statistical analysis confirmed the difference in tomato varieties metabolites and showed that TD produced *trans*-carvenone oxide (**43**), a VOC not identified for TN variety. When infested with whitefly, Dylla tomato plants produced large amounts of δ -2-carene (**4**); and the Norta variety showed the highest amount of α -humulene (**70**) and the unidentified compound **65**. The analysis of the extracts by GC-MS showed that the tomato plants produced mainly fatty acids and esters in the two experimental conditions (exposed/garden and not exposed to herbivory/greenhouse). The data from the analyzes by CLUE-MS/MS were processed on the GNPS platform, resulting in the annotation of 21 compounds (mainly flavonoids, terpenoids and phenylpropanoids). By ^1H , ^{13}C NMR and *HSQC* and *HMBC* contour maps it was possible to confirm the phytol compound structure (**94**) and the flavonoids quercetin-3-*O*-rutinoside (**98**) and quercetin (**118**). Thus, concluded that the TD and TN tomato varieties produce different compounds, which can be candidates for semiochemicals and applied in controlled trials to determine the bioerbicide efficiency in combating the whitefly.

Keywords: semiochemicals; tomatos; whitefly, chemometrics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Principais estados brasileiros produtores de tomate em 2021.....	2
Figura 2 - Relação de área plantada por produtos (hectares) em Goiás durante o ano de 2021.....	3
Figura 3 - Ilustração dos tomeiros <i>Solanum lycopersicum</i> nas variedades: A) Dylla e B) Norty.....	3
Figura 4 - Ilustração das principais pragas associadas à tomaticultura.....	4
Figura 5 - Representação do ataque de moscas-brancas (<i>B. tabaci</i>) em uma folha vegetal.	6
Figura 6 - Sintomas apresentados por tomateiros infestados por mosca-branca: A) amarelamento das folhas; B) nanismo e rugosidade foliar; C) manchas cloróticas e necrose foliar; e, D) amadurecimento desuniforme e isoporização.....	7
Figura 7 - Compostos Orgânicos Voláteis identificados em plantas (semioquímicos).....	11
Figura 8 - Efeitos e interações plantas-insetos envolvendo COVs e NEF.....	12
Figura 9 - Semioquímicos responsáveis por comunicações intra e interespecíficas.....	14
Figura 10 - Classificação dos semioquímicos e respectivos comportamentos.....	14
Figura 11 - Esquema geral da aplicação da <i>PCA</i> em um conjunto de dados químicos (matriz $n \times m$).....	17
Figura 12 - Ilustração da transformação da <i>PCA</i> com redução do número de variáveis.....	18
Figura 13 - Transformação espacial 2D em unidimensional (1D).....	18
Figura 14 - Representação da formação de uma rede molecular a partir dos dados de EM.	20
Figura 15 - Representação do procedimento experimental realizado na execução do trabalho, contemplando as etapas de germinação, cultivo dos tomateiros, coleta dos compostos orgânicos voláteis e obtenção dos extratos etanólicos.....	28
Figura 16 - Cromatogramas de adsorção para os diferentes tipos de fibras <i>SPME</i>	34
Figura 17 - Cromatogramas para a fibra DVB/CAR/PDMS nos diferentes tempos de adsorção.....	35
Figura 18 - Compostos Orgânicos Voláteis identificados nos tomateiros TN e TD, cultivadas na horta (condição de herbivoria) e estufa (condição normal).....	41
Figura 19 - a) Gráfico de <i>scores</i> das variáveis latentes LV1 \times LV2 obtida pela avaliação das folhas de tomates resistentes (azul) e suscetíveis (vermelho) à mosca-branca cultivada na estufa, b) com os <i>loadings</i> de LV1 plotados em linhas. c) Gráfico de <i>scores</i> das variáveis latentes LV1 \times LV2 a partir da avaliação das folhas de tomates resistentes	

(azul) e suscetíveis (vermelho) à mosca-branca cultivada na horta, com os <i>loadings</i> LV1 plotados em linhas (d). <i>Loadings</i> plotados na mesma intensidade com números de compostos correspondentes à Tabela 6.....	45
Figura 20 - a) Gráfico de <i>scores</i> das variáveis latentes LV1 × LV2 obtido pela avaliação dos extratos etanólicos das folhas de tomates resistente à mosca-branca cultivadas na estufa (verde) e cultivadas na horta (laranja), b) com os <i>loadings</i> de LV1 plotados em linhas. c) Gráfico de <i>scores</i> das variáveis latentes de LV1 × LV2 a partir da avaliação dos extratos etanólicos da variedade de tomateiro suscetível à mosca-branca cultivadas na estufa (verde) e cultivadas na horta (laranja), com os <i>loadings</i> LV1 plotados em linhas (d). <i>Loadings</i> plotados na mesma intensidade com números de compostos correspondentes à Tabela 6.....	47
Figura 21 - Diagrama de Venn para ilustração das semelhanças e diferenças de compostos voláteis produzidos por TD e TN nas duas condições de cultivo (horta e estufa).....	48
Figura 22 - Compostos Orgânicos Não Voláteis (CONVs) identificados nos tomateiros TN e TD, cultivadas na horta e estufa.....	51
Figura 23 - a) Sistema de coordenadas de <i>scores</i> PC1 × PC2 a partir da avaliação das folhas de tomates resistentes (azul) e suscetíveis (vermelho) à mosca-branca cultivada na estufa, b) com as <i>loadings</i> de PC1 plotadas em linhas. c) Sistema de coordenadas de <i>scores</i> PC1 × PC2 a partir da avaliação das folhas de tomates resistentes (azul) e suscetíveis (vermelho) à mosca-branca cultivada na horta d) com as <i>loadings</i> PC1 plotadas em linhas. <i>Loadings</i> plotados na mesma intensidade com números de compostos correspondentes à Tabela 7.....	54
Figura 24 - a) Sistema de coordenadas de <i>scores</i> PC1 × PC2 a partir da avaliação das folhas de tomates resistentes a mosca-branca cultivadas em casa de vegetação (verde) e horta (laranja), b) com os <i>loadings</i> de PC1 plotados em linhas. c) Sistema de coordenadas de <i>scores</i> PC1 × PC2 de tomates suscetíveis a mosca-branca cultivada em estufa (verde) e horta (laranja), d) com os <i>loadings</i> PC1 plotados em linhas. <i>Loadings</i> plotados na mesma intensidade com números de compostos correspondentes à Tabela 7...	56
Figura 25 - Diagrama de Venn para ilustração das semelhanças e diferenças de compostos não voláteis (CONVs) produzidos por TD e TN nas duas condições de cultivo (horta e estufa).....	57
Figura 26 - Rede molecular com os dados de CLUE-IES-QqTOF-EM/EM para os	59

extratos de tomateiros no modo negativo através do <i>feature-based molecular networking</i> .	
Figura 27 - Rede molecular com os dados de CLUE-IES-QqTOF-EM/EM para os extratos de tomateiros no modo positivo através do <i>feature-based molecular networking</i> ..	60
Figura 28 - Estruturas químicas dos metabólitos anotados nas redes de interações moleculares para os extratos etanólicos de tomateiros.....	63
Figura 29 - Família molecular de íons de flavonoides com e sem glicosídeos anotados na rede molecular (modo negativo) para as variedades de tomateiros Dylla e Norty.....	65
Figura 30 - Espectro de EM/EM representativo do íon precursor de m/z 463,0870 referente ao metabólito quercetina-3- <i>O</i> -glucosídeo (101).....	66
Figura 31 - Proposta de fragmentação para a molécula de quercetina-3- <i>O</i> -glucosídeo ($[M-H]^-$).....	68
Figura 32 - Família molecular de íons de fenilpropanóides anotados na rede molecular (modo negativo) para a variedade de tomateiro Dylla.....	69
Figura 33 - Espectro de EM/EM representativo do ácido clorogênico (99).....	70
Figura 34 - Proposta de fragmentação para a molécula de ácido clorogênico ($[M-H]^-$).....	70
Figura 35 - Famílias moleculares de íons de triterpenos anotados na rede molecular dos tomateiros.....	71
Figura 36 - Espectro de EM/EM representativo do íon precursor de m/z 471,3420 referente ao composto 116	71
Figura 37 - Proposta de fragmentação para o composto 116 ($[M+H]^+$).....	72
Figura 38 - Nodo do alcaloide 111 anotado na rede molecular (modo negativo) para TD.	73
Figura 39 - Comparação entre os espectros de RMN de 1H (DMSO, 600 MHz) dos extratos de TN e TD, cultivados em horta e estufa.....	75
Figura 40 - a) Gráfico de <i>scores</i> das variáveis latentes LV1 \times LV2 obtida pela avaliação das folhas de tomates resistentes (azul) e suscetíveis (vermelho) à mosca-branca cultivada na estufa, b) com os <i>loadings</i> de LV1 plotados em linhas. c) Gráfico de <i>scores</i> das variáveis latentes LV1 \times LV2 a partir da avaliação das folhas de tomates resistentes (azul) e suscetíveis (vermelho) à mosca-branca cultivada na horta, com os <i>loadings</i> LV1 plotados em linhas (d).....	76
Figura 41 - a) Sistema <i>scores</i> de coordenadas de LV1 \times LV2 a partir da avaliação das folhas de tomates resistentes a mosca-branca cultivadas na horta (verde) e estufa (laranja), b) com os <i>loadings</i> de LV1 plotados em linhas. c) Sistema <i>scores</i> de coordenadas de LV1 \times LV2 de tomates suscetíveis a mosca-branca cultivada em estufa	

(verde) e horta (laranja), d) com os <i>loadings</i> PC1 plotados em linhas.....	78
Figura 42 - Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 150 MHz) para a amostra EH-TD.....	81
Figura 43 - Mapa de contorno <i>HSQC</i> para a amostra EH-TD, mostrando as correlações do composto fitol (94).....	82
Figura 44 - Ampliação (0,5 a 3,0 ppm) do mapa de contorno <i>HSQC</i> para a amostra EH-TD, mostrando as correlações dos átomos de H e C do composto fitol (94).....	82
Figura 45 - Esquema de algumas correlações observadas no mapa de contorno de <i>HMBC</i>	84
Figura 46 - Mapa de contorno <i>HMBC</i> para a amostra EH-TD.....	85
Figura 47 - Espectro de RMN de ^1H (DMSO, 400 MHz) para a amostra EH-TN.....	86
Figura 48 - Mapa de contorno <i>HSQC</i> para a amostra EH-TN, mostrando as correlações do flavonoide quercetina (118).....	89
Figura 49 - Esquema de algumas correlações observadas no mapa de contorno de <i>HMBC</i> para o flavonoide quercetina.....	88
Figura 50 - Mapa de contorno <i>HMBC</i> para a amostra EH-TN, mostrando as correlações do flavonoide quercetina (118).....	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Modelos de Fibras <i>SPME</i>	15
Tabela 2 - Amostras coletadas por fibras <i>SPME</i> em variedades de tomateiros cultivadas em estufa e na horta.....	24
Tabela 3 - Amostras dos extratos etanólicos produzidos a partir de variedades de tomateiros cultivadas em estufa e na horta.....	26
Tabela 4 - Resultados para avaliação da eficiência de adsorções por tipos de fibras <i>SPME</i>	33
Tabela 5 - Resultados para avaliação de tempos de adsorções com fibra DVB/CAR/PDMS.....	33
Tabela 6 - COVs identificados nas variedades de tomateiros TD e TN, cultivadas na horta (condição de herbivoria) e estufa (condição normal).....	37
Tabela 7 - CONVs identificados nas variedades de tomateiros TD e TN cultivadas na horta e estufa.....	50
Tabela 8 - Metabólitos anotados nas redes de interações moleculares para os extratos de tomateiros.....	61
Tabela 9 - Dados de RMN de ¹ H obtidos para os compostos palmitato de etila (90), <i>trans</i> -9-hexadecenol (91) e linolenato de etila (96).....	80
Tabela 10 - Dados de RMN de ¹ H, ¹³ C, <i>HSQC</i> , <i>HMBC</i> obtidos para o fitol (94) a partir da amostra EH-TD.....	83
Tabela 11 - Dados de RMN de ¹ H, ¹³ C, <i>HSQC</i> , <i>HMBC</i> obtidos para a quercetina (118) a partir da amostra EH-TN.....	87

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

°C	graus Celsius
µm	micrometro
<i>ASCII</i>	<i>American Standard Code for Information Interchange</i>
C20	Hidrocarboneto com 20 carbonos (eicosano)
C3	Hidrocarboneto com 3 carbonos (propano)
C34	Hidrocarboneto com 34 carbonos (tetratriacontano)
C6	Hidrocarboneto com 6 carbonos (hexano)
<i>CAR</i>	<i>Carboxen</i>
CG	Cromatógrafo a Gás
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas
CLUE-EM/EM	Cromatografia Líquida de Ultra-Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas sequencial
cm	centímetros
CONVs	Compostos Orgânicos Não Voláteis
COVs	Compostos Orgânicos Voláteis
<i>COW</i>	<i>Correlation Optimized Warping</i>
<i>CW</i>	<i>Carbowax</i>
df	coeficiente de difusão do soluto
DMAPP	dimetilalil-difosfato
DMSO	dimetilsulfóxido
DVB	divinilbenzeno
DXP	desoxixilulose-5-fosfato
EAG	Eletroantenografia
EE-TD	Extrato Etanólico do Tomate Dylla – Cultivado na Estufa
EE-TN	Extrato Etanólico do Tomate Norty – Cultivado na Estufa
EH-TD	Extrato Etanólico do Tomate Dylla – Cultivado na Horta
EH-TN	Extrato Etanólico do Tomate Norty – Cultivado na Horta
EM	Espectrômetro de Massas
E-TD	Tomate Dylla – Cultivado na Estufa
E-TN	Tomate Norty – Cultivado na Estufa
eV	Elétrons-Volts
g	grama
<i>HPLC</i>	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
H-TD	Tomate Dylla – Cultivado na Horta
H-TN	Tomate Norty – Cultivado na Horta
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IE	Impacto por Elétrons
IPP	isopentenil difosfato
<i>m/z</i>	Razão massa/carga

MeJA	jasmonato de metila
MEP	metileritritol-fosfato
MeSA	salicilato de metila
mg	Miligrama
MHz	MegaHertz
mi.	Milhões
min	minutos
mL	mililitros
MVA	mevalonato
NEF	Néctar Extrafloral
NIST	<i>National Institute of Standards and Technology</i>
NPK	Fertilizante a base de Nitrogênio-Fósforo-Potássio
OPLS-DA	<i>Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis</i>
PA	Poliacrilato
PCA	<i>Principal Component Analysis</i>
PCs	<i>Principal Component Analysis</i>
PDMS	Polidimetilsiloxano
ppm	Partes por milhão
RMN de ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de ¹ H
rpm	Rotações por minutos
SIMPLS	Algoritmo PLS Simplificado
SPME	<i>Solid Phase Microextraction</i>
spp.	Abreviatura de espécies ainda não identificadas
SVD	<i>Singular Value Decomposition</i>
TD	Tomate Dylla
TMS	tetrametilsilano
TMTT	4,8,12-trimetil-1,3,7,11-tridecatetraeno
TN	Tomate Norty
TPR	<i>templated resin</i>
δ	Deslocamento químico em partes por milhão
ΔT	variação de temperatura

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Produção Mundial de Tomate.....	1
1.2. Ataque de pragas na tomaticultura	4
1.2.1. <i>Mosca-branca</i>	5
1.3. Mecanismo de defesa das plantas.....	7
1.4. Importância dos Semioquímicos	12
1.5. Modelos Experimentais para Análises de Semioquímicos.....	15
1.5.1. Análise Estatística Multivariada.....	16
1.5.2. Plataforma GNPS	19
2. OBJETIVO GERAL	22
2.1. Objetivos Específicos	22
3. PARTE EXPERIMENTAL.....	23
3.1. Cultivo do Material Vegetal	23
3.2. Coleta e Análise dos Compostos Orgânicos Voláteis (COVs).....	23
3.3. Coleta e Análise dos Compostos Orgânicos Não Voláteis (CONVs)	25
3.4. Medidas Espectroscópicas por Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (RMN de ^1H) ..	26
3.5. Análise por Cromatografia Líquida de Ultra-Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas sequencial	26
3.6. Análise quimiométrica dos dados cromatográficos.....	29
3.7. Análise quimiométrica dos dados de RMN de ^1H	29
3.8. Anotação dos compostos orgânicos das folhas dos tomateiros por rede molecular e espectrometria de massas.....	30
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1 Estudo do perfil de compostos orgânicos voláteis por CG-EM	32

4.1.1 Otimização do método de investigação dos COVs	32
4.1.2 Análise dos compostos orgânicos voláteis por CG-EM.....	36
4.1.3 Análise estatística multivariada dos compostos orgânicos voláteis por CG-EM	44
4.2 Estudo do perfil de compostos orgânicos não-voláteis por CG-EM	48
4.2.1 Análise dos compostos orgânicos não-voláteis por CG-EM.....	48
4.2.2 Análise quimiométrica dos compostos orgânicos não-voláteis por GC-EM.....	53
4.3 Anotação dos compostos orgânicos através da espectrometria de massas e de redes moleculares.....	57
4.4 Análise dos compostos orgânicos não-voláteis por RMN de ¹ H.....	74
4.4.1 Variabilidade de compostos orgânicos não-voláteis por RMN de ¹ H.....	74
4.4.2 Análise dos espectros de RMN de ¹ H.....	79
5. CONCLUSÃO.....	90
6. REFERÊNCIAS	92
ANEXO 1.....	109
ANEXO 2.....	122

1. INTRODUÇÃO

Com o crescente aumento populacional, tem-se a necessidade da ampliação de produtividade de alimentos (PINTO, *et al.*, 2013). De acordo com a Organização das Nações Unidas (ONU - 2012) até o ano de 2050 a população mundial será superior a 9,5 bilhões de habitantes (SAATH E FACHINELLO, 2018). Segundo os estudos da *Food and Agriculture Organization* (FAO), isso implica diretamente no aumento de mais de 60% da produção alimentar (ASBRAN, 2020; AGROSMART, 2020). No entanto, tem-se problemas relacionados à expansão territorial agrícola, pois dos 3 bilhões de hectares disponíveis em diversos países para tal expansão, mais de 1,5 bilhões já são utilizados na produção agrícola mundial (SAATH E FACHINELLO, 2018).

Nesse panorama, o Brasil apresenta-se como um grande produtor mundial de alimentos e possui um enorme potencial para contribuir com a expansão de oferta. Atualmente, a estratégia é aumentar a produção agrícola no mesmo espaço físico, visando uma agricultura ecologicamente correta e preservação da biodiversidade (SAATH E FACHINELLO, 2018).

Desta forma, a Química juntamente com a Ecologia e Biologia Molecular, têm desenvolvido novas tecnologias para contribuir significativamente com a elevação da produção mundial de alimentos. Essas contribuições permeiam desde o controle biológico de pragas (uso de pesticidas sintéticos e biopesticidas) até a obtenção de produtos geneticamente modificados (AGROSMART, 2020). No entanto, fatores ambientais (tempestades, secas, inundações) ou atividades antropogênicas, exercem fortes influências no cultivo agrícola, os quais estão associados à atração de pragas, doenças e ervas daninhas (WAR, *et al.*, 2016).

1.1. Produção Mundial de Tomate

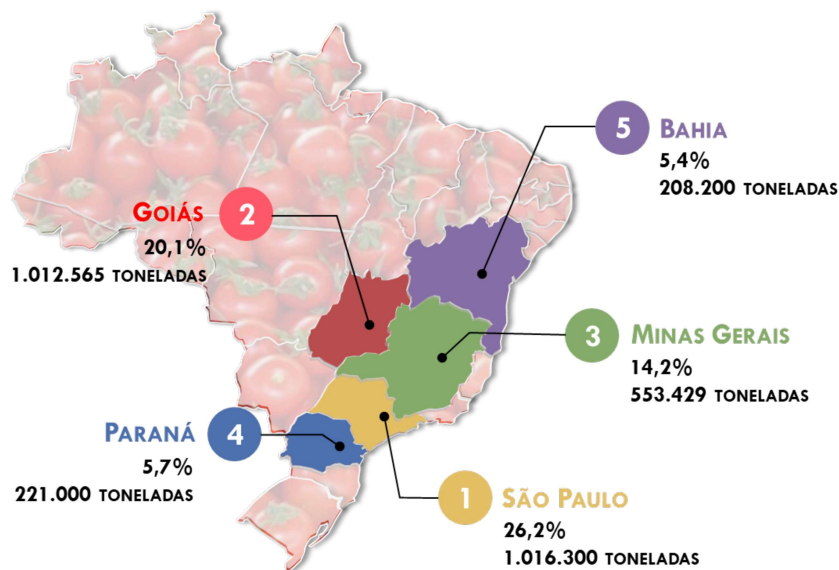
Dentre os maiores cultivares no mundo destaca-se o tomate (*Solanum lycopersicum* L., sin. *Lycopersicon esculentum*, pertencente à família Solanaceae), um fruto distribuído pela maioria dos países em praticamente todos os continentes (SCHMIDT, *et al.*, 2017). Trata-se de uma fonte importante de vitaminas, sais minerais, ácido fólico, frutose e licopeno, além de antioxidante. Esse fruto possui uma grande adaptabilidade climática, o que o torna cultivável em climas tropicais, subtropicais e temperados, considerando-o como a hortaliça universal (ABCSEM, 2020).

Por oferecer várias opções de industrialização e produzir diversos tipos de derivados, o tomate apresenta importância socioeconômica elevada, tanto na geração de renda quanto de empregos. De acordo com a FAO, o Brasil está entre os 10 maiores produtores mundiais de tomate,

com aproximadamente 3% da produção mundial, sendo o *ranking* liderado pela China com produção de 35% (FAO, 2022).

No ano de 2021, de acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a produção brasileira de tomates foi de 3,8 milhões de toneladas, referente a 54,5 mil hectares de área plantada e colhida. Dentre os estados brasileiros, destaca-se Goiás como o segundo maior produtor (26,1% - 1,01 milhões toneladas), ficando atrás apenas de São Paulo (26,2% - 1,02 milhões toneladas), seguido por Minas Gerais (14,2% - 553 mil toneladas), Paraná (5,7% - 221 mil toneladas) e Bahia (5,4% - 208 mil toneladas) (Figura 1).

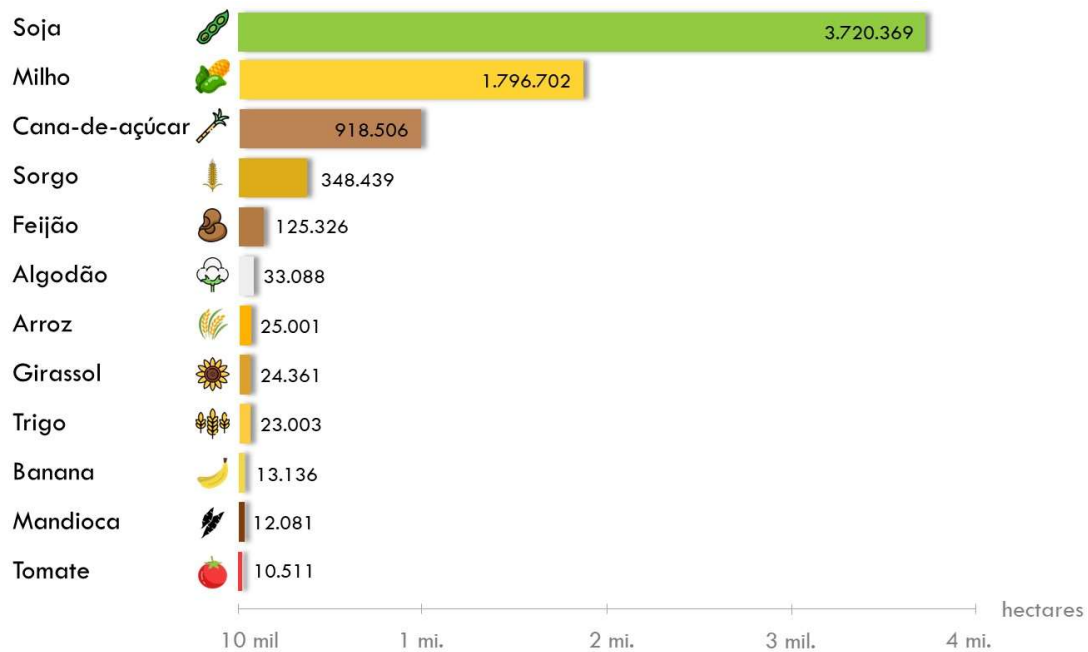
Figura 1 – Principais estados brasileiros produtores de tomate em 2021.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Dos 7,07 milhões de hectares destinados à produção agrícola em Goiás (Figura 2), 3,72 milhões se destinam à produção de soja (52,6%), milho (25,4%) e cana-de-açúcar (13,0%). Já a produção de tomates ocupa uma área de aproximadamente 10,5 mil hectares (3%), tornando-o destaque na produção nacional (IBGE, 2022). Uma das justificativas pode estar relacionada a presença da EMBRAPA Hortaliça no estado, a qual já desenvolveu variedades de tomateiros resistentes ao solo e clima da região (GUIMARÃES, *et al.*, 2015).

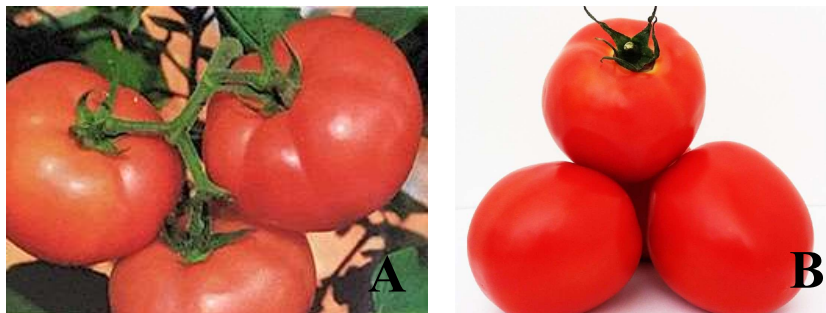
Figura 2 – Relação de área plantada por produtos (hectares) em Goiás durante o ano de 2021.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Apesar da produção de tomate elevada no Brasil, os produtores enfrentam vários riscos no cultivo, sendo um deles a possibilidade do ataque de pragas que podem acabar com todo o plantio, como é o caso da mosca-branca que é responsável por prejuízos econômicos que podem variar entre 30 e 100% de perda da produtividade (SILVA, *et al.*, 2017). Diante dessa problemática, diversas empresas estão investindo no desenvolvimento de variedades resistentes a diversos tipos de pragas e variações climáticas. Como exemplo, tem-se o tomate Dylla (*S. lycopersicum*), variedade produzida pela empresa Syngenta®, um híbrido do tipo salada (Figura 3) e destinado ao cultivo em áreas infestadas com o geminivírus, Vira-Cabeça e *Fusarium* raça 3 (SYNGENTA, 2022). Os tomates Norty são híbridos do tipo Santa Cruz, desenvolvidos pelo grupo HM Clause® e apresentam tolerância ao Vira-Cabeça e geminivírus (CLAUSE, 2022).

Figura 3 - Ilustração dos tomeiros *Solanum lycopersicum* nas variedades: A) Dylla e B) Norty.



Fonte: SYNGENTA, 2002; CLAUSE, 2002.

1.2. Ataque de pragas na tomaticultura

O tomate é alvo de ataques de inúmeras pragas, gerando perdas severas na produção. Para tentar contornar esse problema, o mercado tem desenvolvido novos cultivares e híbridos, os quais apresentam melhoramento genético com características de resistência às pragas, alta produtividade, precocidade e adaptação ao ambiente. Nos últimos anos, buscando melhorias na produção brasileira, a Embrapa lançou diversas variedades de tomates e realizou a importação de diferentes tipos de sementes (CARVALHO E PAGLIUCA, 2007).

Dentre as principais pragas associadas à tomaticultura (Figura 4), destacam-se a traça do tomateiro (*Tuta absoluta*), a mosca-branca (*Bemisia tabaci* e *Trialeurodes vaporariorum*), os ácaros (*Tetranychus* spp. e *Aculops lycopersici*), larvas minadoras (*Liriomyza* spp.), tripses (*Frankliniella* spp. e *Thrips* spp.), pulgões (*Myzus persicae* e *Macrosiphum euphorbiae*), lagarta-rosca (*Agrotis ipsilon*), broca grande (*Helicoverpa zea*), broca pequena (*Neuleocinodes elegantalis*) e lagartas do complexo *Spodoptera*. O ataque por esses artrópodes-pragas causa danos em todas as fases de desenvolvimento da planta (HAJI, *et al.*, 1998; SOUZA E REIS, 2003; MOURA, *et al.*, 2014; GUIMARAES, *et al.*, 2015).

Figura 4 - Ilustração das principais pragas associadas à tomaticultura.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Uma espécie de inseto torna-se praga agrícola quando sua população cresce sem limites. Este crescimento desenfreado, ou sem fatores limitantes, é basicamente decorrente de quatro componentes: oferta de alimento, alta taxa reprodutiva, hábito alimentar polífago e ausência de inimigos naturais. A palavra-chave para a compreensão desta situação é diversidade. Na floresta não há insetos-praga porque existe muita diversidade, o que impede o crescimento desenfreado de uma determinada espécie. No ambiente agrícola ou agroecossistema a diversidade é reduzida, o monocultivo em grandes extensões favorece o desaparecimento de muitas espécies de insetos, principalmente os herbívoros monófagos ou especializados, insetos que se alimentam somente de uma fonte de alimento vegetal. Com a diminuição da diversidade de insetos herbívoros também diminui a diversidade de inimigos naturais. Neste momento se estabelece o inseto-praga; geralmente uma espécie polífaga, que passa a se alimentar da espécie vegetal que está sendo cultivada, que possui uma alta taxa de reprodução e que é favorecida pela quase total ausência de predadores. Neste cenário de grande oferta de alimento e ausência de fatores limitantes, o crescimento populacional deste inseto é quase incontrolável (ZARBIN, *et al.*, 2009).

O controle das pragas depende do sucesso no manejo dos insetos vetores (transmissores) em escala regional. O controle químico, quando adotado de forma equivocada, apresenta eficiência muito limitada sobre o inseto vetor e conseqüentemente a transmissão de doenças, uma vez que já há confirmação da resistência de populações de pragas a determinados inseticidas. Além disso, o uso inadequado e indiscriminado de produtos químicos, podem colocar em risco a vida dos aplicadores e consumidores, comprometendo as condições do ecossistema envolvido (PEREIRA, *et al.*, 2015).

1.2.1. Mosca-branca

Algumas das pragas mais conhecidas mundialmente são as moscas-brancas do complexo *Bemisia tabaci*, as quais representam um dos grupos de pragas que atuam como vetores de centenas de espécies de vírus de plantas, destacando-se os vírus do gênero *Geminivirus* (também chamado *Begomovirus*), família Geminiviridae (EMBRAPA, 2020; ROJAS, *et al.*, 2018). Os insetos são sugadores muito pequenos (2 mm), pertencentes a família Aleyrodidae (Figura 5). Quando adultos possuem dorso de coloração amarelo palha, e asas membranosas recobertas com pulverulência branca. O grupo de *B. tabaci* abrange uma grande diversidade genética e similaridade morfológica, dividido nos biótipos A, B (anteriormente denominado *B. argentifolii*) e Q. No Brasil há relatos da existência de todos os biótipos (BOAVENTURA, *et al.*, 2021; QUINTELA, *et al.*, 2016;

BARBOSA, *et al.*, 2016), sendo o biótipo B disperso nas regiões de Goiás (CZEPAK, *et al.*, 2017; BÔAS E BRANCO, 2009).

Figura 5 – Representação do ataque de moscas-brancas (*B. tabaci*) em uma folha vegetal.



Fonte: alavoura.com.br

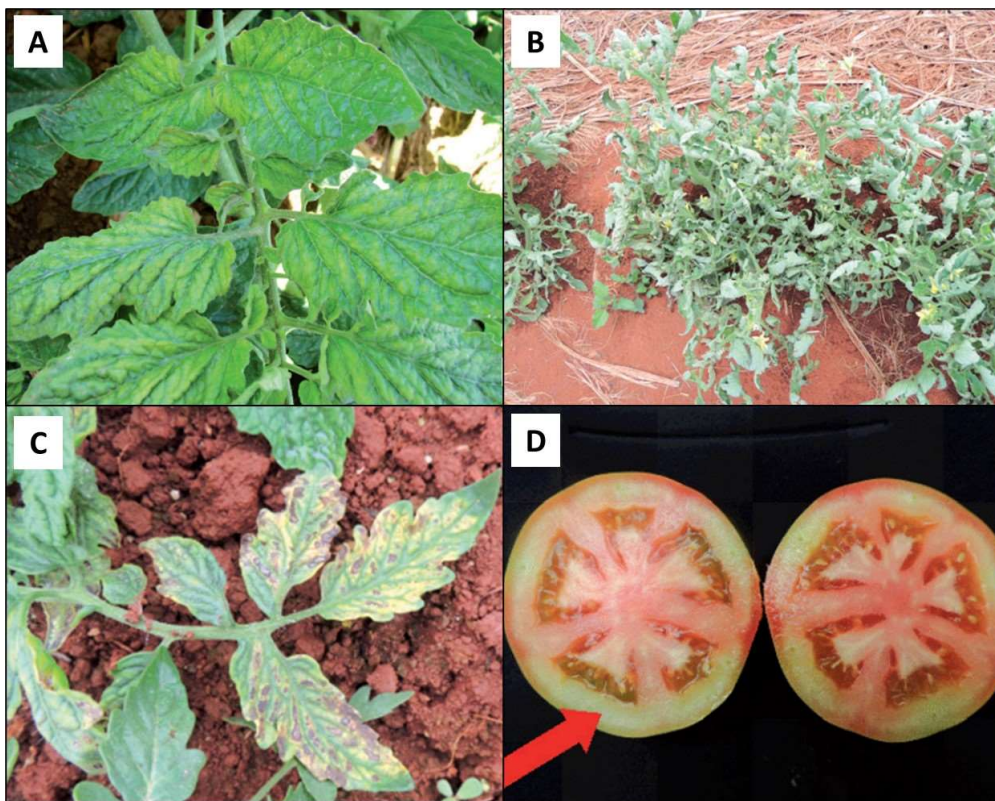
Em tomateiros brasileiros, vários *Geminivirus* são transmitidos por moscas-brancas. Entretanto, os sintomas são bem semelhantes e dificultam a distinção de qual vírus causa a doença baseando simplesmente nos sintomas produzidos pelas plantas infectadas (GOUVÊA, *et al.*, 2017). Os sintomas iniciam com o amarelamento das folhas (mosaico dourado), deformação e pouco desenvolvimento delas, rugosidade, nanismo e, ocasionalmente, necrose (Figura 6). Os sintomas podem ser severos em casos de infecção precoce, diminuindo a produtividade devido à produção de menor número e tamanho de frutos, além de amadurecimento desuniforme e isoporização (BLEEKER, 2009).

Quando a infecção por *Geminivirus* ou *Crinivirus* ocorre em plantas novas (entre 0 e 14 dias do transplante), o tomateiro não se desenvolve bem e a produção de frutos é reduzida drasticamente. Em infecções um pouco mais tardias, até um mês após o transplante, os sintomas são nítidos, mas os prejuízos são menores. Portanto, é importante acompanhar todo o processo produtivo dos tomateiros, de forma preventiva, evitando assim perdas maiores (EMBRAPA, 2020).

Diversas espécies de tomates silvestres apresentam resistência à mosca-branca, o que desperta perspectivas na produção de frutos resistentes (FIRDAUS, *et al.*, 2012; FARIÑA, *et al.*,

2019). O desenvolvimento de tomateiros com altos níveis de resistência é de grande importância no manejo integrado de pragas, pois contribui para a redução das aplicações de inseticidas, custos de produção, vantagens associadas à redução nos riscos à saúde do agricultor, além de reduzir presença de resíduos (provenientes do uso abusivo de pesticidas) no produto final (FIRDAUS, *et al.*, 2012; GOUVÊA, *et al.*, 2017; FARIÑA, *et al.*, 2019).

Figura 6 – Sintomas apresentados por tomateiros infestados por mosca-branca: A) amarelamento das folhas; B) nanismo e rugosidade foliar; C) manchas cloróticas e necrose foliar; e, D) amadurecimento desuniforme e isoporização.



Fonte: FILHO E INOUE-NAGATA, 2015 (Adaptado).

1.3. Mecanismo de defesa das plantas

Naturalmente as plantas estão expostas a diferentes fatores de estresse bióticos (patógenos e insetos) e abióticos (seca radiação ultravioleta, temperaturas elevadas ou reduzidas, salinidade), afetando diretamente o rendimento, crescimento, qualidade e desempenho do vegetal (VÁZQUEZ-HERNÁNDEZ, *et al.*, 2019). As práticas agrícolas e horticoltura para a produção de alimentos visam o cultivo com diferentes tipos de produção, minimizando o estresse produtivo (WAR, *et al.*, 2011).

Entretanto, quando um inseto herbívoro inicia o processo de alimentação de uma planta, ela desenvolve mecanismos sofisticados de defesa que induz produção de diversos sinais, levando a diferentes respostas. Antes de ativar essa sinalização, as plantas possuem a capacidade de reconhecer a alimentação de um inseto herbívoro, sendo capazes de distinguir entre os danos produzidos por um inseto ou força mecânica (granizo, vento). Isso se faz necessário para evitar desperdícios de recursos de defesa, uma vez que há consumo energético metabólico (MAFFEI, 2010; FÜRSTENBERG-HÄGG, *et al.*, 2013).

Em plantas atacadas por herbívoros, em poucos minutos a expressão de sinais de defesa é induzida em folhas não danificadas (FÜRSTENBERG-HÄGG, *et al.*, 2013). A sinalização sistêmica da indução de inibidores de proteínas em *S. lycopersicum* (Solanaceae) foi descoberta há mais de 40 anos, sendo base para estudos de modelos de defesa em outras plantas. Dentre os componentes identificados na indução de respostas à defesa, têm-se peptídeos derivados de proteínas por processamento proteolítico (RYAN E PEARCE, 2002), jasmonatos (PEARCE, *et al.*, 1991; RYAN E PEARCE, 2003) e oligogalacturonídeos, classificados como DAMPs (*Damage-Associated Molecular Patterns*, que significa Padrões Moleculares Associados ao Dano) (ACEVEDO, *et al.*, 2015).

O sistema de defesa por indução desencadeia a ativação das vias octa e hexadecanoide, resultando na produção de hormônios jasmonatos, como ácido jasmônico (**I**), jasmonato de metila (**II**) (FARMER E RYAN, 1990) e (+)-7-epi-jasmonil-L-isoleucina (**III**) (MAFFEI, 2010; FARMER E RYAN, 1992) (Figura 5). No entanto, o ácido jasmônico não induz diretamente a atividade gênica. A resposta se dá frente a ação de importantes proteínas de regulação de genes sensíveis ao jasmonato, as quais ativam a expressão gênica, assemelhando ao aumento transitório do próprio ácido jasmônico, um dos compostos encontrados em plantas após ferimento ou alimentação de insetos a curto prazo (HEIL, 2008). Tais hormônios podem ser encontrados em monocotiledôneas e dicotiledôneas, e estão envolvidos em outras atividades fisiológicas, como germinação das sementes, desenvolvimento reprodutivo e senescência (FÜRSTENBERG-HÄGG, *et al.*, 2013).

Os fitopatógenos podem induzir a produção de Compostos Orgânicos Voláteis (COVs) que apresentam atividades antimicrobianas, podendo estes, inibir a disseminação de patógenos nos tecidos vegetais. Uma espécie de tomate mutante, suscetível a ácaros e tripses por apresentar deficiência na biossíntese da via octadecanoide, demonstra restauração à resistência após tratamento com jasmonato de metila (MeJA). Em tomateiros, vários metabólitos secundários produzidos pelas folhas, como salicilato de metila (**IV**) e 2-hexenal (**XXV**), ativam genes de defesa (MAFFEI, 2010). Alguns desses são lipofílicos de baixo peso molecular e alta pressão de vapor, volatilizando facilmente na atmosfera normal, formando misturas complexas denominadas de COVs

(PICHERSKY, *et al.*, 2006; DUDAREVA, *et al.*, 2013), os quais desempenham papéis importantes nas interações planta-ambiente e planta-inseto (SHRIVASTAVA, *et al.*, 2010). Estes compostos são classificados como semioquímicos e despertam interesse no aumento da perspectiva de manipulação da emissão de COVs para potencializar a proteção das culturas (SOBHY, *et al.*, 2017).

Atualmente, centenas de plantas já possuem compostos voláteis identificados, sendo esses compostos pertencentes aos grupos dos terpenoides, compostos fenólicos e derivados de ácidos graxos (Figura 7). Os compostos voláteis aromáticos são produzidos a partir da via do chiquimato, destacando o salicilato de metila (**IV**) que é um derivado do ácido salicílico e importante metabólito associado ao sinal de defesa. Dentre os terpenos voláteis, têm-se os monoterpenos, sesquiterpenos e diterpenos, sintetizados a partir da via do mevalonato e não-mevalonato. Os isoprenoides são produzidos a partir dos precursores dimetilalil-difosfato (DMAPP) e seu isômero isopentenil difosfato (IPP), que são sintetizados pela via da desoxixilulose-5-fosfato nos cloroplastos (DXP – também conhecida como via MEP – metileritritol-fosfato) e pelo mevalonato (MVA) no citoplasma. Acredita-se que há uma cooperação entre as duas vias, implicando-as em não ser totalmente autônomas. Há sugestões de que precursores de monoterpenos são sintetizados via MEP, enquanto, sesquiterpenos sejam sintetizados via MVA. Os COVs derivados de ácidos graxos são sintetizados pela via da lipoxigenase, como ácido linolênico (**V**) e linoleico (**VI**), além de aldeídos e álcoois conhecidos também por Voláteis de Folhas Verdes – VFVs (GLVs – *Green Leaves Volatile*). (PICHERSKY, *et al.*, 2006; MAFFEI, 2010; SHRIVASTAVA, *et al.*, 2010; DUDAREVA, *et al.*, 2013).

Os COVs podem atuar de diversas formas na defesa contra insetos, como defesa direta e defesa indireta. Dentre as principais funções desses compostos facilmente transportados pelo ar, destacam-se as defesas das plantas contra herbívoros e patógenos, a atração por polinizadores, dispersores de sementes e microrganismos benéficos, ou ainda, para servir como sinalizadores na comunicação planta-planta.

Quando esses compostos atuam como toxinas para herbívoros ou reduzem a digestibilidade das plantas, são chamados de defesa direta (MAFFEI, 2010; ERB E REYMOND, 2019). Linalol (**VII**) e ácido jasmônico (**I**) são exemplos de Voláteis Produzidos em Indução por Herbívoros – VPIH (HIPVs – *Herbivore-Induced Plant Volatiles*). Na defesa indireta, as plantas podem produzir compostos que realizarão interações tróficas, atraindo predadores carnívoros, parasitoides e inimigos naturais, prevenindo ou reduzindo os danos. Esses compostos também podem sinalizar plantas vizinhas sobre uma ameaça de perigo (KESSLER E BALDWIN, 2001; MAFFEI, 2010; PICKETT E KHAN, 2016).

Na Figura 8 são demonstradas como ocorrem essas interações planta-ambiente e planta-inseto e as substâncias químicas (Figura 7) produzidas a partir dessas interações. Sob condições de herbivoria (**A**), as membranas fosfolipídicas vegetais ativam a cascata octadecanoide que inicia as atividades com a liberação de ácido linolênico (**V**) e através de várias etapas enzimáticas, sintetiza ácido jasmônico (**I**) (**B**). Tal produção induz a liberação de COVs e Néctar Extrafloral (NEF) em folhas danificadas (**C**) e intactas (MAFFEI, 2010). Muitos desses voláteis, como o acetato de Z-3-hexenila (**D**), induzem defesas indiretas, atraindo vespas parasitas (**E**) que parasitam lagartas herbívoras (**F**) ou besouros, e atraem ácaros predadores (**G**), os quais se alimentam de herbívoros menores (WAR, *et al.*, 2011). As formigas (**H**) também se alimentam de NEF e podem ser alojadas no vegetal. Para a resposta de herbivoria, há liberação de compostos como TMTT (4,8,12-trimetil-1,3,7,11-tridecatetraeno) e MeSA (salicilato de metila – **IV**), ocorrendo atração (**I**) ou efeitos repelentes (**J**) pelos COVs. Esses compostos voláteis também podem ser percebidos por outras plantas da mesma espécie ou de espécie diferente (**K**), que podem ser iniciadas ou induzidas diretamente, dependendo da concentração de voláteis no espaço livre. As mesmas interações podem ocorrer por baixo do solo, através de sinais sistêmicos para as raízes, provocando a síntese de compostos defensivos, como a nicotina, enquanto larvas de besouros se alimentam das raízes (**L**). Nessa etapa, por exemplo, a planta pode induzir a liberação de COVs (**M**), como β -cariofileno (**XIV**), que também provocam sinais sistêmicos e levam à produção induzida de NEF ou liberação de COVs nas partes acima do solo (**N**) (HEIL, 2008).

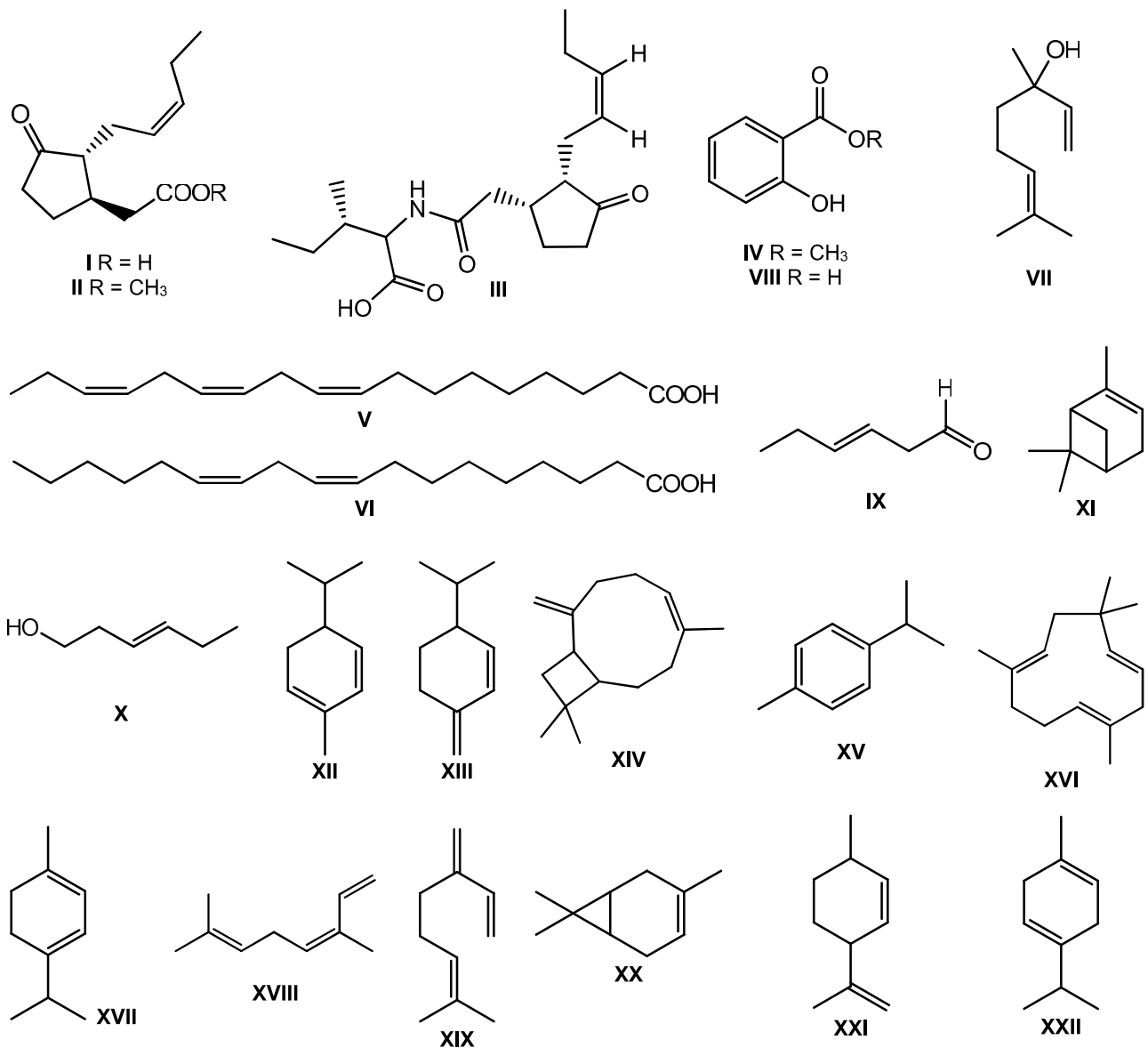
Os tomateiros, quando atacados por mosca-branca liberam diversos COVs que preparam as plantas vizinhas contra o ataque de patógenos. Após a infestação, as defesas mediadas pelo ácido salicílico (**VIII**), podem gradualmente suprimirem as vias metabólicas do ácido jasmônico (**I**), deixando assim as plantas mais suscetíveis ao ataque de insetos, incluindo moscas-brancas (ROWEN, *et al.*, 2017; ERB E REYMOND, 2019). Os herbívoros podem montar contra-ataques mediados pela secreção de efetores produzidos pelo próprio organismo ou simbiontes associados, e suprimirem as defesas da planta. Essas secreções e salivas dos insetos contêm substâncias denominadas de Padrões Moleculares Associados a Herbívoros – PMAHs (HAMPs – *Herbivore-Associated Molecular Patterns*) os quais são responsáveis por tal supressão (ACEVEDO, *et al.*, 2015).

Alguns testes realizados envolvendo a aplicação de ácido jasmônico (**I**) exógeno estimulam também a produção endógena do mesmo, o que afeta diretamente as quantidades e identidades dos voláteis liberados pelo tomateiro. Voláteis de folha verde, como 3-hexenal (**IX**), 3-hexen-1-ol (**X**), e terpenoides (do tipo monoterpênicos e sesquiterpênicos) como α -pineno (**XI**), α e β -felandreno (**XII** e **XIII**), β -cariofileno (**XIV**), ρ -cimeno (**XV**) e α -humuleno (**XVI**) são metabolizados em

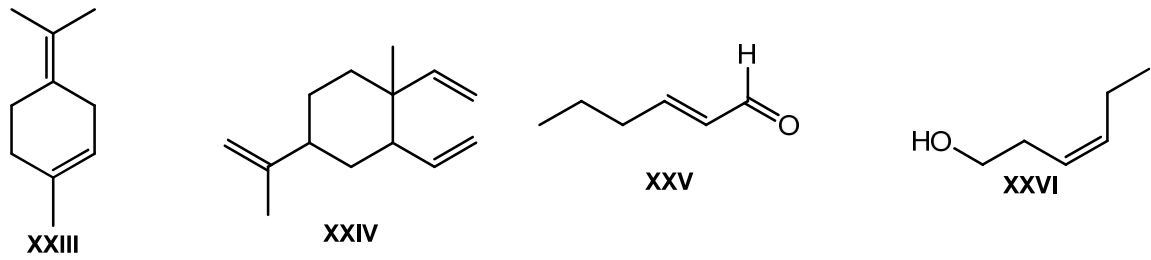
concentrações significativamente mais altas por plantas tratadas com **I** do que pelas plantas sem aplicação (SHI, *et al.*, 2016). Outros compostos, como α -terpineno (**XVII**) e β -ocimeno (**XVIII**), substâncias químicas voláteis que as plantas liberam em resposta à herbivoria, só são encontrados em plantas tratadas com **I** (MAFFEI, 2010).

Estudos com semioquímicos repelentes, β -felandreno (**XIII**) e α -terpineno (**XVII**), diminuem significativamente a atratividade do tomate para moscas-brancas, comprovado através de experimentos de Eletroantenografia (EAG), em que as antenas do inseto acopladas a um Cromatógrafo a Gás (CG) são capazes de detectar estes compostos, mesmo em concentrações baixas (ZHANG, *et al.*, 2019).

Figura 7 – Compostos Orgânicos Voláteis identificados em plantas (semioquímicos).

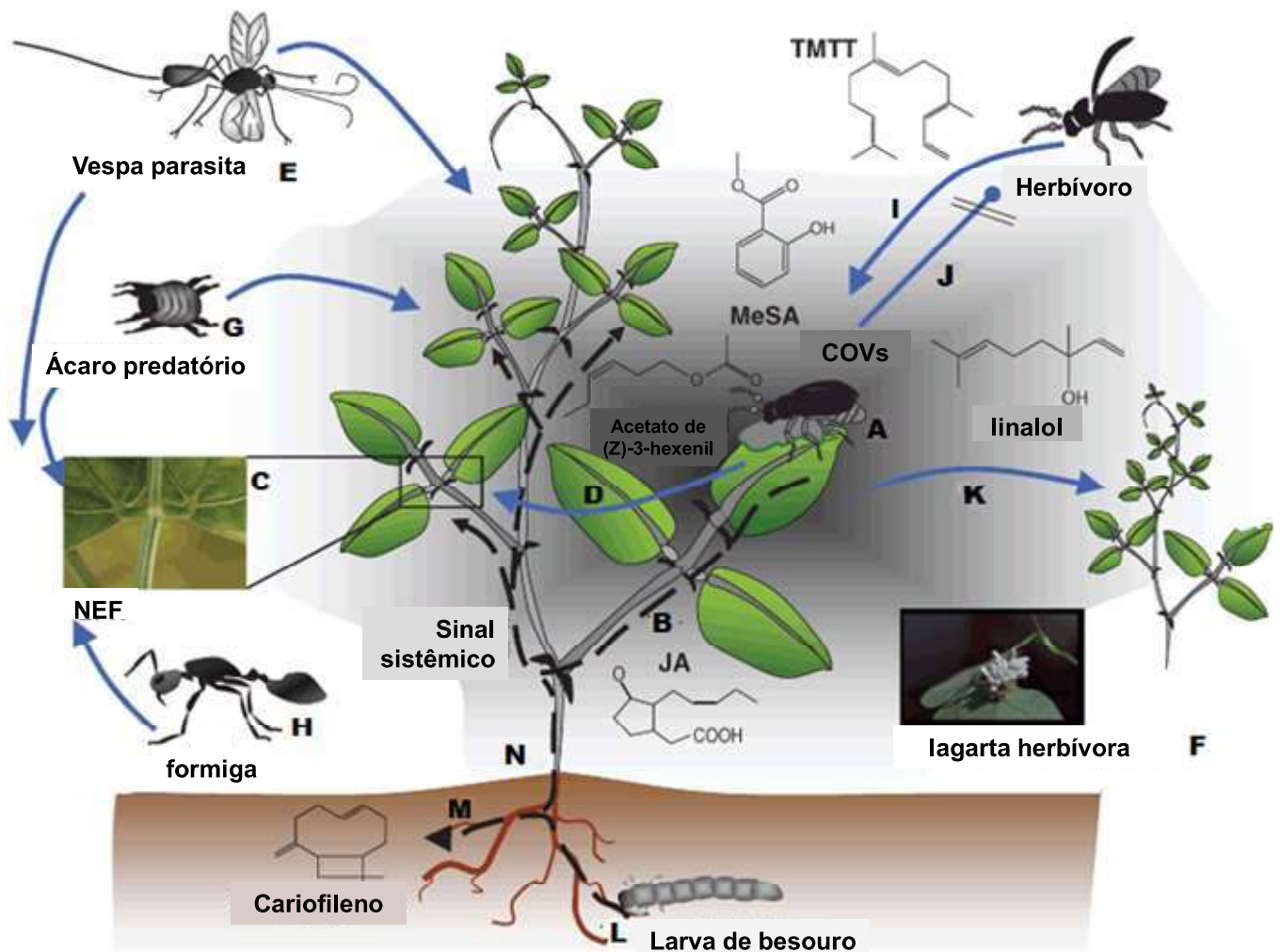


Continuação figura 7



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 8 – Efeitos e interações plantas-insetos envolvendo COVs e NEF.



Fonte: HEIL, 2008 (Adaptado).

1.4. Importância dos Semioquímicos

Os insetos exercem suas relações ecológicas com o ambiente e com os outros organismos de várias maneiras, sendo a comunicação por meio de compostos químicos, uma das relações mais importantes. As substâncias envolvidas nesse processo são denominadas de semioquímicos, os

quais agem como gatilhos fisiológicos de reações comportamentais específicas. Esses compostos químicos são os principais responsáveis pelo acasalamento, alimentação ou captura de presa, escolha de local para oviposição, defesa contra predadores e organização de suas comunidades, no caso dos insetos sociais (ZARBIN, *et al.*, 2009).

A palavra semioquímico está relacionada com a palavra grega *seméion*, que significa sinal, sendo assim, designada semioquímicos (sinais químicos) relacionados nas intermediações dos seres vivos. As substâncias descritas na Figura 9 podem exercer ações entre indivíduos da mesma espécie, intraespecífica (feromônios), ou em indivíduos de espécies distintas, interespecíficas (aleloquímicos). A Figura 10 mostra a classificação e comportamento desses compostos (CORRÊA E SANT'ANNA, 2007).

Os feromônios podem desempenhar diversas funções entre os indivíduos de uma mesma espécie. O primeiro feromônio sexual isolado de um inseto foi o bombicol (**XXVII**), substância produzida pela mariposa do bicho-da-seda (*Bombyx mori* L.) e que após 20 anos de pesquisa, esse estudo consagrou o Nobel de Química ao alemão Adolf Friedrich Johann Butenandt em 1939 (ZARBIN, *et al.*, 2009). Em 1996, Berger identificou o acetato *cis*-7-dodecen-1-ol (**XXVIII**), primeiro feromônio sexual das mariposas *Trichoplusia ni*, um inseto-praga também encontrado na agricultura brasileira.

Os aleloquímicos se diferenciam de acordo com o tipo de organismo que será beneficiado durante o processo de comunicação. Se somente o agente receptor for beneficiado no processo de comunicação através dos sinais químicos liberados, essas substâncias são denominadas de cairomônios. O pinheiro amarelo (*Pinus ponderosa*), quando atacado pelo besouro *Dendroctonus brevicomis*, produz grandes quantidades de mirceno (**XIX**), um terpeno que age sinergicamente com o feromônio de agregação do inseto, atraindo ainda mais insetos para a planta (BEDARD, *et al.*, 1969).

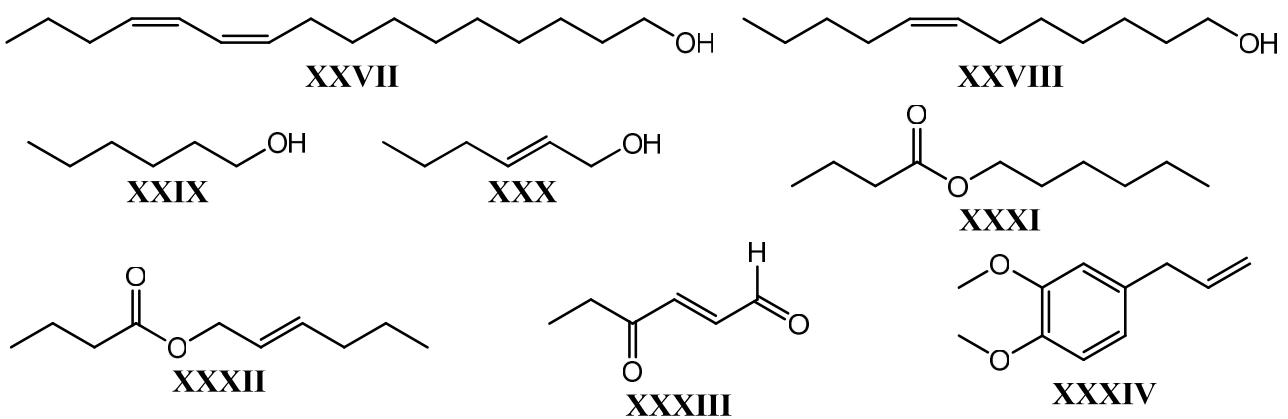
Ao contrário, quando os sinais químicos beneficiam apenas a espécie emissora do sinal, são denominados alomônios e são utilizados como mecanismos de defesa por diversos insetos. O percevejo *Lygus lineolaris* é uma praga encontrada em diversas plantações e sob situações de perigo produz uma mistura de compostos [(*E*)-2-hexenal (**XXV**), hexanol (**XXIX**), (*E*)-2-hexenol (**XXX**), hexil butirato (**XXXI**), (*E*)-2-hexenil butirato (**XXXII**) e (*E*)-2,4-oxoexenal (**XXXIII**)] usada na defesa contra predadores (WARDLE, *et al.*, 2003).

Em outros casos, os sinais liberados podem beneficiar a espécie do emissor e receptor do sinal, denominados de sinomônios (CORRÊA, 2007). Diversas espécies de flores produzem voláteis responsáveis por seus odores florais, os quais atraem insetos para auxiliarem no processo de polinização, beneficiando-os na alimentação e acasalamento. A orquídea *Bulbophyllum cheiri*

produz metil-eugenol (**XXXIV**), responsável pela atração de moscas da fruta do gênero *Bactrocera* (*B. carambolae*, *B. papayae* e *B. umbrosa*) (TAN, *et al.*, 2002).

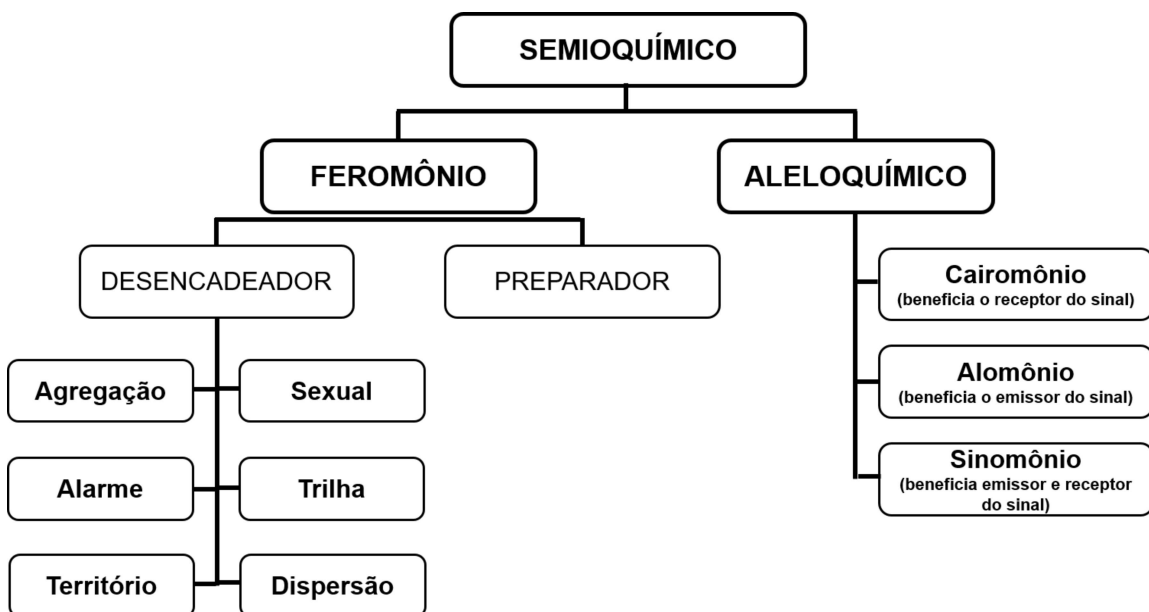
Embora exista uma ampla variedade de opções de controle de pragas agrícolas, a eficácia no manejo desses vetores na agricultura orgânica continua desafiadora. Ao desenvolver novos métodos é importante levar em consideração os mecanismos de defesa natural da planta, bem como os mecanismos de interações da planta hospedeira com seu ambiente. Atualmente, há um enorme interesse acadêmico e comercial em elucidar tais mecanismos, pois estão diretamente ligados ao aumento da resistência de insetos, tornando os semioquímicos um método alternativo no controle de pragas (SHRIVASTAVA, *et al.*, 2010; WAR, *et al.*, 2011; ROWEN, *et al.*, 2017).

Figura 9 – Semioquímicos responsáveis por comunicações intra e interespecíficas.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 10 - Classificação dos semioquímicos e respectivos comportamentos.



Fonte: CÔRREA & SANT'ANA, 2007, adaptado.

1.5. Modelos Experimentais para Análises de Semioquímicos

Existe uma variedade de métodos utilizados na extração e identificação dos semioquímicos produzidos por seres vivos. A metodologia mais adequada dependerá do tipo de material em estudo e da disponibilidade de equipamentos adequados. Em análises que possuem como objetivo a identificação de semioquímicos por métodos cromatográficos, a amostra deve ser obtida no estado líquido ou gasoso.

Uma técnica bastante utilizada na extração dessas substâncias químicas é a Microextração em Fase Sólida (*SPME – Solid Phase Microextraction*), na qual se utiliza uma fibra de sílica fundida, revestida com uma fase estacionária de cromatografia em fase gasosa. Desta forma, os voláteis produzidos pelos organismos podem ser coletados e posteriormente analisados pelo método de cromatografia gasosa (EL-SHAFIE E FALEIRO, 2017). A seleção da fibra para coleta dos voláteis deve levar em consideração a seletividade do recobrimento para os analitos-alvo, sua compatibilidade com a matriz e espessura do filme extrator, visando maximizar a seletividade e sensibilidade do método (AUGUSTO, *et al.*, 2015). Na Tabela 1 são apresentados alguns dos modelos de fibras *SPME* disponíveis comercialmente.

Tabela 1 – Modelos de Fibras *SPME*.

Recobrimento	µm	ΔT (°C)	Aplicação típica
Polidimetilsiloxano (PDMS)	100	200-270	Apolar, volátil
	30	200-270	Apolar, volátil e semivolátil
	7	220-320	Apolar, semivolátil e não volátil
Poliacrilato (PA)	85	220-310	Polar, uso geral
Carbowax/divinilbenzeno** (CW/DVB)	65	200-260	Polar, volátil
PDMS/DVB**	65	200-270	Polar (HPLC)
	60	---	
Carboxen/PDMS** (CAR/PDMS)	75	240-300	Volátil, gasosos, análise de traços
Carbowax/templated resin (CW/TPR)	50	---	Polar (HPLC)
PDMS/DVB/CAR	50/30	---	Ampla faixa de polaridade (C3 a C20)

µm: espessura de recobrimento; **mecanismo de extração predominante: sorção.

Fonte: AUGUSTO, *et al.*, 2015

Outras técnicas de coleta de substâncias voláteis também são utilizadas, como é o caso do método de extração por *headspace*, onde materiais poliméricos como Porapak Q® (copolímero de *p*-divinilbenzeno-vinilbenzeno) ou Tenax® (polifenileno na base de 2,6-difenilfenol), são utilizados na produção de tubos para coleta dos compostos (SANT'ANNA E STEIN, 2007). Os voláteis podem ser desorvidos por meio de extração com solventes, podendo ser isolados e purificados, dependendo da quantidade de material que for obtido.

Com a finalidade de quantificar e qualificar a resposta motora dos organismos frente ao estímulo dos voláteis coletados, são utilizados bioensaios comportamentais. Existe uma variedade de bioensaios que podem ser utilizados para medir essa resposta frente a determinado estímulo. A escolha mais adequada depende da biologia e do comportamento do organismo em estudo, bem como das características das amostras a serem testadas (BATISTA-PEREIRA, 2007). A olfatiometria em tubo-Y, produz uma corrente de ar que entra em contato com um material de estímulo, formando uma pluma de odor retilínea em direção ao inseto. Essa pluma tem a função de guiar ou repelir o inseto até a fonte de estímulo. O método eletroantenográfico (EAG) é uma técnica que mede a soma das mudanças dos potenciais de ação de neurônios receptores, que uma vez estimulados, desencadeiam uma série de respostas simultâneas de várias células olfativas receptivas a um determinado odor, ao longo de toda antena (EL-SHAFIE E FALEIRO, 2017).

Os estudos experimentais para coleta dos COVs e técnicas de análises utilizadas, determinaram a confiabilidade das respostas encontradas. A técnica de *headspace* em conjunto com tubos com adsorventes apresenta menor custo e uma boa aplicabilidade, justificando assim, a elevada aplicação. Embora o uso de fibras *SPME* apresente resultados experimentais com alta resolução, as mesmas possuem custo elevado e não permitem extração da amostra para utilização em estudos posteriores, reduzindo assim o seu uso (DYER, *et al.*, 2018). A Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM) é a técnica mais utilizada para análise de voláteis, pois apresenta alta resolução e exatidão para tais análises (CHIARADIA, *et al.*, 2008).

1.5.1. Análise Estatística Multivariada

A análise cromatográfica gera dados complexos, os quais, por vezes, são de difícil tratamento. O uso de ferramentas estatísticas reduz o número de dados e aumenta a confiabilidade dos resultados obtidos pelo analista, fomentando conclusões inequívocas com a natureza dos dados (BRO E SMILDE, 2014). Segundo Svante Wold, *et al.*, “*a quimiometria é uma disciplina que utiliza ferramentas matemáticas e estatísticas para auxiliar na interpretação de dados e extração*

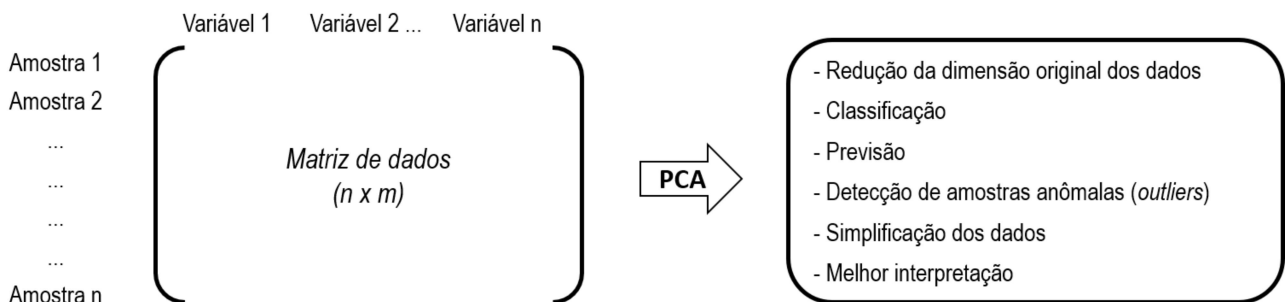
de informações relevantes, possibilitando o melhor entendimento da natureza dos dados avaliados”.

A Análise de Componentes Principais (*PCA – Principal Component Analysis*) é uma das maiores ferramentas quimiométricas para interpretação de conjuntos diversificados de dados com maior êxito (MARTINS, *et al.*, 2015). O conjunto de dados originais (matriz X) é decomposto em duas novas matrizes denominadas de *scores* ou escores (matriz T) e a outra *loadings* ou pesos (matriz P), conforme a Equação I, em que E representa uma matriz de erros (VALDERRAMA, *et al.*, 2016). Essas matrizes são convertidas em gráficos informativos, em que *scores* contemplam informações relacionadas às amostras e *loadings* informam sobre as variáveis responsáveis por determinadas configurações de dados. Juntos, os dois gráficos permitem identificar as similaridades entre amostras, classificação não supervisionada e detecção de amostras anômalas (*outliers*). Na Figura 11 é demonstrado um esquema geral da aplicação da *PCA* em um conjunto de dados químicos.

$$\mathbf{X} = \mathbf{T} \mathbf{P}^T + \mathbf{E}$$

Equação (I)

Figura 11 – Esquema geral da aplicação da *PCA* em um conjunto de dados químicos (matriz $n \times m$).

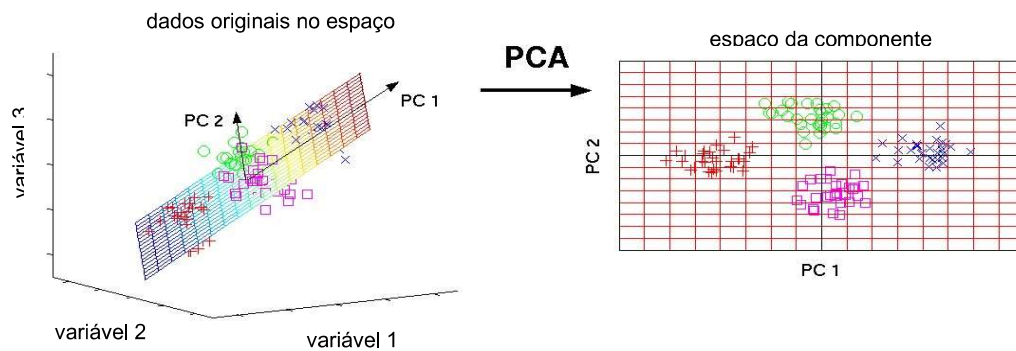


Fonte: MARTINS, *et al.*, 2015

Essa nova projeção gera eixos que são projetados no espaço multidimensional dos dados, onde as componentes principais (*PCs*) são traçadas de modo que consigam explicar a maior porcentagem de variância em uma dada dimensão, sendo estas, ortogonais entre si (VALDERRAMA, *et al.*, 2016). Desta forma, uma *PC* agrupa informações correlacionadas entre si, reduzindo a dimensionalidade dos dados experimentais de maneira interpretável, preservando informações dos dados (Figura 12) (JOLLIFFE E CADIMA, 2016). Essa simplificação mantém as

tendências e padrões, reduz o número de variáveis preditoras em um conjunto de dados em componentes mais importantes e descritivas (LEVER, *et al.*, 2017).

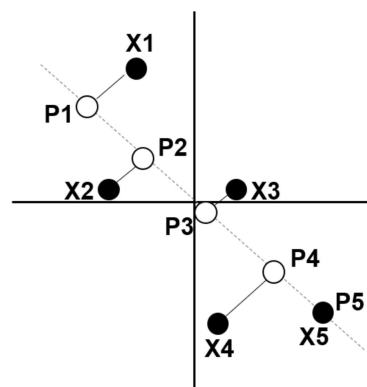
Figura 12 – Ilustração da transformação da *PCA* com redução do número de variáveis.



Fonte: SCHOLZ, 2006 (Adaptado)

Originalmente este método está ligado à álgebra linear, o qual cria combinações (lineares ponderadas) das variáveis originais em um conjunto de dados, com a intenção de que as novas combinações capturem o máximo possível de variação (ou seja, a separação entre pontos) no conjunto de dados, enquanto elimina as correlações, ou seja, redundância (VALDERRAMA, *et al.*, 2016). As variáveis da *PCA* são transformadas em novos valores, centralizados na média, que são funções lineares (vetores ortogonais) daquelas no conjunto de dados originais (JOLLIFFE E CADIMA, 2016). Na Figura 13 é representada essa nova projeção que ocorre com os valores do espaço multidimensional, em que X1, X2, X3, X4 e X5 são pontos pertencentes a um espaço 2D, que são mapeados no novo espaço unidimensional, (P1, P2, P3, P4 e P5) dispersos pela linha cinza pontilhada.

Figura 13 – Transformação espacial 2D em unidimensional (1D).



Fonte: Elaborado pelo autor.

Nos casos onde há informações específicas da amostra, a análise por mínimos quadrados parciais (PLS) gera uma decomposição dos dados facilitando a interpretação e aumentando a eficiência. O PLS maximiza a covariância entre as variáveis explicativas (x) e a variável resposta (y), que por sua vez, também formam vetores *score* e *loading*. Quando a técnica é usada para análises discriminatórias (PLS-DA), há a maximização para avaliar a matriz de covariância entre as classes (LILAND, 2011).

O OPLS-DA (Análise Discriminatória por Mínimos Quadrados Parciais Ortogonais) é um método supervisionado introduzido como uma melhoria do método PLS-DA (Análises Discriminantes por Mínimos Quadrados Parciais). Trata-se de uma metodologia empregada para discriminar duas ou mais classes com variáveis que afetam diretamente a separação (WESTERHUIS et al., 2010). A partir do método de análise, torna-se possível a obtenção de gráficos capazes de informar a relação entre duas variáveis. O método OPLS e OPLS-DA são variações do PLS e PLS-DA, respectivamente, que separam as variáveis respostas ortogonais em componentes (x) por meio de rotações no PLS e PLSDA originais. A principal vantagem das variações do método é a facilidade de interpretação, pois tais rotações são benéficas para o gráfico de componentes e suas direções. Desta forma, as análises metabolômicas têm empregado cada vez mais o uso das análises OPLS e OPLS-DA (WESTERHUIS et al., 2010; TRYGG E WOLD, 2002).

1.5.2. Plataforma GNPS

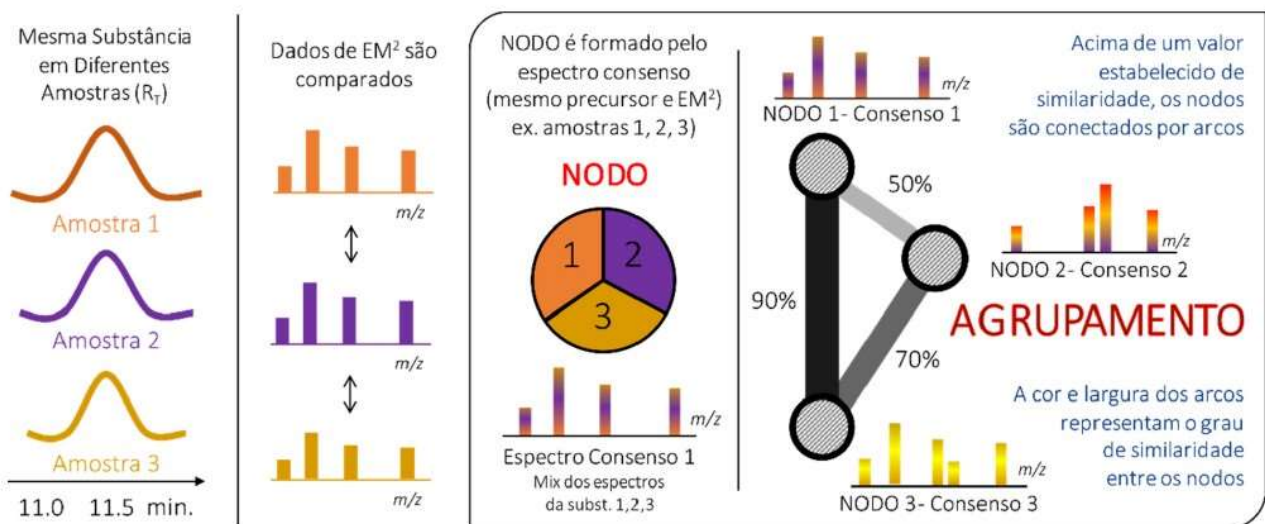
Os estudos metabolômicos têm buscado formas alternativas que acelerem e aumentem a confiança dos dados obtidos experimentalmente diante da interpretação, armazenamento, organização, mapeamento e análise conjunta de resultados. A análise por redes moleculares (*Molecular Networking*) vem despertando atenção e expandindo a aplicação diante dos estudos de classes metabólicas, funções orgânicas e substituintes em estruturas complexas de produtos naturais. Com os dados espectrais aplicados às redes moleculares, torna-se possível a identificação de padrões de semelhanças ou diferenças entre as amostras (PILON, et al., 2021).

A plataforma online *Global Natural Products Social Networking*, conhecida como GNPS, é uma ferramenta com livre acesso para obtenção das redes moleculares a partir de dados de espectrometria de massas (WANG, et al., 2016). Inicialmente o intuito da plataforma era auxiliar nos estudos proteômicos, que por sua vez, foi adaptada para estudos metabólicos de organismos marinhos e atualmente têm se difundido na comunidade de química de produtos naturais (FOX RAMOS, et al., 2017; BANDEIRA, et al., 2007). Devido a eficiência e facilidade na organização de grandes conjuntos de dados de EM, a plataforma sofreu expansão de seu protótipo de aplicação,

tornando-se uma ferramenta com interface simples e sem necessidade de conhecimentos avançados de programação. O uso do repositório de dados comunitários MassIVE (*Mass spectrometry Virtual Interactive Environment*) é um suporte da plataforma *GNPS*, levando-a para aplicações e uso internacional de tratamento e visualização de grandes conjuntos de dados (PILON, *et al.*, 2021).

A primeira ferramenta desenvolvida dentro da rede molecular ficou conhecida como *Classic Molecular Networking*, que dispensa etapas de pré processamento avançado dos dados, como por exemplo, a quantificação dos *features*. Esse modo de análise permite utilizar dados de CLAE ou CLUE-EM/EM e MALDI-EM. O processo inicia-se pela remoção de ruídos dos espectros de fragmentação (EM), no qual o usuário pode selecionar o número de picos mais intensos em janelas de +/- 50 unidades de m/z ao longo do espectro. Na sequência, o *GNPS* irá utilizar o algoritmo *MSCluster* para criar os espectros consenso, que são os espectros pertencentes a um único sinal cromatográfico. Dentro dessa etapa é possível delinear os parâmetros de agrupamento dos espectros com ajuste da tolerância de massa referentes ao íon precursor e aos íons produto. A escolha desse parâmetro dependerá da performance do equipamento de massas. Para equipamentos de baixa resolução, o valor recomendado é de 1.0 Da, no entanto, equipamento com alta resolução podem utilizar tolerâncias menores que 1.0 Da (PILON, *et al.*, 2021).

Figura 14 - Representação da formação de uma rede molecular a partir dos dados de EM.



Fonte: PILON, *et al.*, 2021.

Na Figura 14 é ilustrado como ocorre a formação das redes moleculares. Inicialmente os dados da amostra são comparados e aqueles EM que apresentarem consenso (mesmo íon precursor) serão agrupados, formando um nodo. As redes moleculares irão se formar a partir do agrupamento

desses nodos, o qual ocorrerá de acordo com a similaridade. Os nodos representam os espectros de EM/EM e os íons moleculares, e as arestas das redes representam a similaridade entre os nós, as quais serão distintas de acordo com os valores de cosseno, em que 0 representa espectros totalmente diferentes e 1 iguais (WANG et al., 2016).

2. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi analisar o perfil químico de Compostos Orgânicos Voláteis (COVs) e Não Voláteis (CONVs) produzidos por duas variedades de tomateiros, Tomate Dylla (TD) e Tomate Norty (TN), com diferentes resistências à mosca-branca (TD - resistente e TN - não resistente), quando submetidas ou não a herbivoria.

2.1. Objetivos Específicos

Dentro dos objetivos específicos deste trabalho os principais foram:

1. Avaliar o perfil de compostos orgânicos voláteis (COVs) liberados pelas variedades de tomateiros, Norty e Dylla, quando infestadas pela mosca-branca utilizando Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM);
2. Avaliar o perfil de compostos orgânicos não-voláteis (CONVs) produzidos pelas duas variedades de tomateiros (TD e TN) na presença de mosca-branca utilizando Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM), Cromatografia Líquida de Ultra-Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas sequencial (CLUE-EM/EM), Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e Carbono (RMN de ^1H e ^{13}C) uni e bidimensional (2D);
3. Realizar a comparação do perfil químico de COVs e CONVs das variedades resistente (Dylla) e não resistente (Norty) por análise estatística multivariada (Análise de Componentes Principais e Análise Discriminante de Mínimos Quadrados Ortogonais Parciais);
4. Realizar o estudo dos CONVs através da plataforma *GNPS* para anotação dos compostos identificados por Cromatografia Líquida de Ultra-Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas sequencial (CLUE-EM/EM).

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Cultivo do Material Vegetal

As sementes de tomateiros (*Solanum lycopersicum*) das variedades Dylla (TD) e Norty (TN), foram doadas pelas empresas Syngenta© e HM. Clause©, respectivamente (Figura 15). As escolhas das sementes foram de acordo com os diferentes níveis de resistência à mosca-branca, apresentados pelos catálogos dos produtores, sendo TD uma variedade descrita como resistente ao inseto. As sementes foram germinadas durante 30 dias (durante o mês de abril de 2019), em parceria com a casa de vegetação “Horta dos Baianos” na cidade de Catalão – GO. As condições de cultivo foram, luminosidade natural e irrigação manual diariamente.

Depois de germinadas, as 20 mudas de tomateiros foram divididas em dois grupos:

a) HORTA DOS BAIANOS: 5 indivíduos de cada variedade (TD e TN) foram transplantados (mês de maio de 2019) no campo (horta) em um mesmo canteiro de cultivo, com distanciamento aproximado de 30 cm cada;

b) ESTUFAS: 5 indivíduos de cada variedade (TD e TN) foram transplantados (mês de maio) para vasos e armazenados em estufas com acesso controlado localizadas no *campus* I da Universidade Federal de Catalão. As variedades foram cultivadas separadas em duas diferentes estufas para serem utilizadas como controle positivo, isolando assim os tomateiros de contato com qualquer tipo de inseto. As estufas (100 cm x 100 cm x 200 cm) foram recobertas com tela de sombreamento e o solo utilizado nos vasos foi coletado da horta, garantindo as mesmas condições de nutrientes para todos os vegetais.

A cada 15 dias, os cultivares da horta e estufa, foram adubados com fertilizante 00-25-20 (NPK) para garantir quantidades necessárias de nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio (K), conforme apresentado na Figura 15. Vale ressaltar que a distância entre as estufas e a horta foi de aproximadamente 2,2 Km.

3.2. Coleta e Análise dos Compostos Orgânicos Voláteis (COVs)

Com 45 dias de transplântio, realizou-se a otimização do método de coleta de compostos orgânicos voláteis (COVs) baseado em um planejamento experimental univariado com microextração em fase sólida (SPME). Inicialmente, o experimento foi realizado com três fibras SPME (Supelco): DVB/CAR/PDMS (50/30 µm), PDMS (100 µm) e PA (85 µm), sendo todos os kits compostos por fibras em triplicatas. Utilizaram-se para a otimização, os indivíduos da

variedade resistente cultivados na estufa. Três cultivares TD foram selecionados aleatoriamente e submetidos à técnica de *headspace, in vivo*, utilizando-se embalagens de polímero celofane (marca Wyda), para retenção dos COVs, com 60 min de adsorção para cada fibra. Após determinação da fibra com melhor sorção, submeteu-se o planejamento às variações de tempos de adsorção, sendo testados 20, 40 e 60 min em *headspace, in vivo* (Figura 15).

Após determinadas as condições de análise para o método de extração dos COVs, foram escolhidos aleatoriamente três indivíduos de cada uma das variedades estudadas (TD e TN): a) cultivadas na estufa (controle sem herbivoria de insetos); b) cultivadas na horta, as quais foram atacadas por mosca-branca. Decorrido o tempo de adsorção, a fibra *SPME* foi cuidadosamente retirada, inserida em tubo de ensaio com tampa e armazenada no refrigerador a 5 °C (Tabela 2).

Tabela 2 – Amostras coletadas por fibras *SPME* em variedades de tomateiros cultivadas em estufa e na horta.

Local de Cultivo	Variedade	Código
Estufa	Dylla	E-TD1
		E-TD2
		E-TD3
	Norty	E-TN1
		E-TN2
		E-TN3
Horta	Dylla	H-TD1
		H-TD2
		H-TD3
	Norty	H-TN1
		H-TN2
		H-TN3

Fonte: Elaborada pelo autor.

Para análise dos constituintes adsorvidos nas fibras, estas foram rosqueadas em um aplicador (*holder*) e injetadas em um Cromatógrafo a Gás acoplado a um Espectrômetro de Massas (CG-EM) para dessorção dos COVs. Para separação dos constituintes químicos voláteis utilizou-se um CG 7820 A (Agilent Technologies) equipado a uma coluna capilar HP-5MS (30 m x 250 µm e filme 0,25 µm). O método de injeção foi otimizado até chegar nas condições de análise, citadas a seguir. As injeções foram realizadas no modo *splitless*, com condições de temperatura do forno em 40 °C

por 2 min, com rampa de 5 °C/min até 200 °C, mantendo uma isoterma por 2 min. Utilizou-se hélio como gás de arraste num fluxo constante de 1,0 mL/min. A detecção e identificação foram realizadas por um EM Series MSD 5975 (Agilent) com operação em modo impacto por elétrons (IE, energia de ionização, 70 eV, temperatura da fonte 230 °C). A aquisição dos dados foi realizada no modo de varredura (faixa de m/z 35-250; seis varreduras por segundo). Os cromatogramas e espectros de massas foram processados pelo *software Enhanced ChemStation (MSD ChemStation E.02.02.1431, Agilent Technologies)*.

A identificação dos compostos voláteis foi realizada comparando-se os espectros de massas experimentais com os da biblioteca *NIST Mass Spectral 2.0* e determinação dos Índices de Retenção de Kovats com padrões de hidrocarbonetos (C6-C34) injetados nas mesmas condições de análise por CG-EM. Todos os padrões comerciais foram adquiridos da Sigma – Aldrich.

3.3. Coleta e Análise dos Compostos Orgânicos Não Voláteis (CONVs)

Para determinação de possíveis compostos orgânicos não voláteis (CONVs) com possível atividade tóxica para insetos, realizou-se a análise do perfil químico dos extratos etanólicos que foram produzidos logo após a coleta dos COVs. Coletou-se 50 g de folhas frescas de cada indivíduo utilizado na metodologia descrita no item 3.2 e o material vegetal foi submetido à trituração com 500 mL de etanol ultrapuro (Merck) utilizando um Homogeneizador ULTRA TURRAX T18 digital (IKA), sob agitação de 15000 rpm, durante 10 min (Figura 15). Em seguida, o solvente foi evaporado em evaporador rotativo de baixa pressão com banho de aquecimento (Fisatom 802) e bomba de vácuo (Vacuubrand, modelo ME-1C), obtendo o extrato etanólico bruto de cada uma das variedades de tomate cultivadas na horta e na estufa (Tabela 3).

Para análise dos constituintes químicos dos extratos etanólicos, foram preparadas amostras utilizando-se 5 mg de extrato seco, dissolvidos em 1 mL de acetona ultrapura. Para cada indivíduo estudado as amostras foram preparadas em triplicata totalizando 36 amostras, as quais foram analisadas por CG-EM, conforme descrito na metodologia item 3.2. As injeções foram realizadas automaticamente no modo *splitless*, com tempo *delay* de 2 min. Após otimizações do método de injeção, adotou-se as seguintes condições: temperatura do forno 50 °C por 2 min, com gradiente de 4°C/min até 70 °C, 25 °C/min até 200 °C, 4 °C até 300 °C, mantendo uma isoterma por 3 min.

Tabela 3 – Amostras dos extratos etanólicos produzidos a partir de variedades de tomateiros cultivadas em estufa e na horta.

Cultivo	Variedade	Código
Estufa	Dylla	EE-TD1
		EE-TD2
		EE-TD3
	Norty	EE-TN1
		EE-TN2
		EE-TN3
Horta	Dylla	EH-TD1
		EH-TD2
		EH-TD3
	Norty	EH-TN1
		EH-TN2
		EH-TN3

Fonte: Elaborada pelo autor.

3.4. Medidas Espectroscópicas por Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (RMN de ^1H)

As medidas espectroscópicas de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de ^1H) para os extratos etanólicos contendo os CONVs foram realizadas em colaboração com o Prof. Dr. Antônio Gilberto Ferreira do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos/SP. Nestes experimentos, 5 mg de cada amostra de extrato, conforme Tabela 3, foram dissolvidas em 500 μL de DMSO deuterado ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$), com TMS como referência interna (δ 0,0 ppm). As amostras foram analisadas em um equipamento Bruker AVANCE III de 9,4 Tesla (400 MHz para frequência do hidrogênio). Os espectros de RMN ^1H foram processados no *software* ACD/Labs, Versão 12.1 e os dados comparados com os dados da literatura.

3.5. Análise por Cromatografia Líquida de Ultra-Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas sequencial

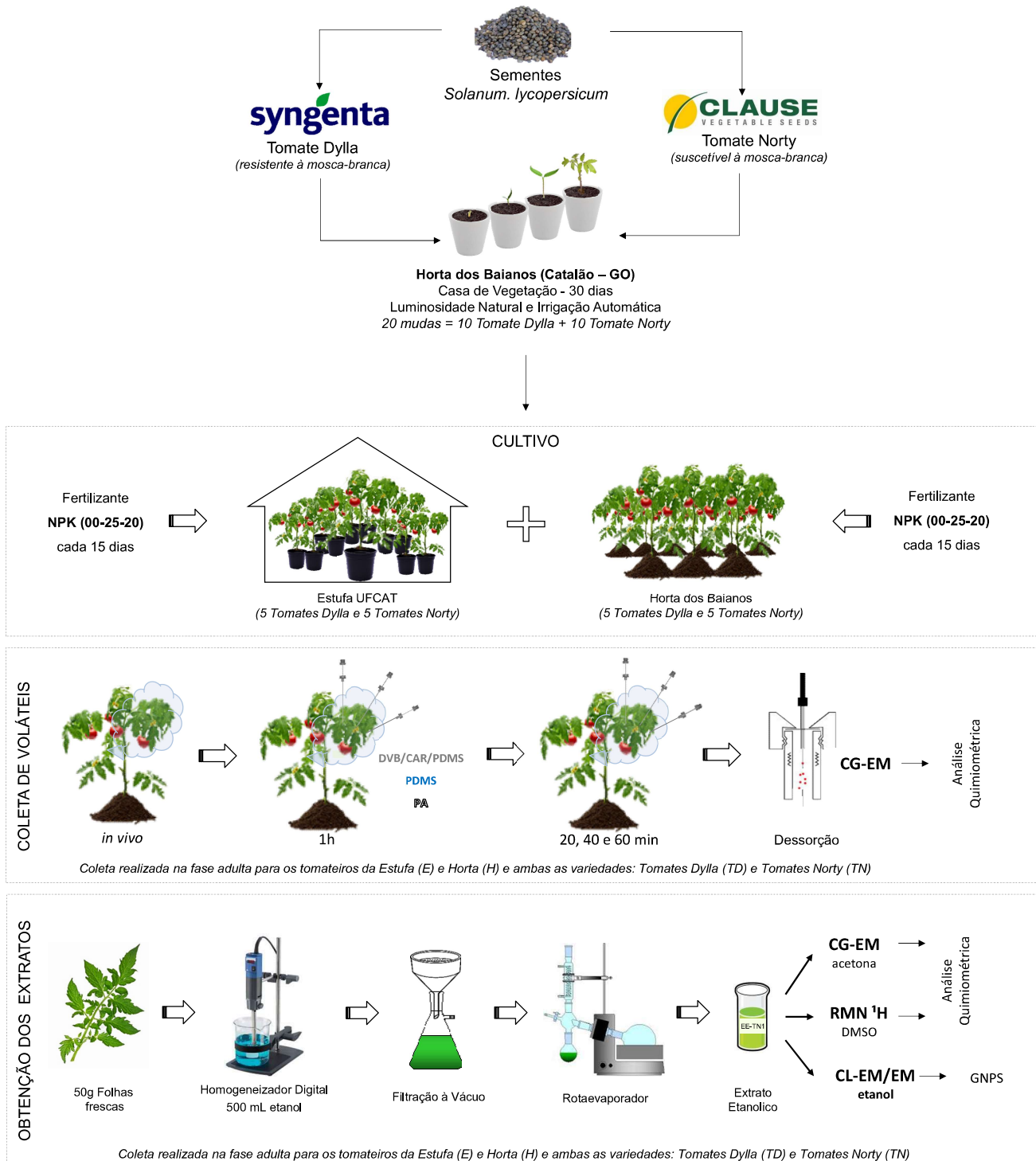
Para determinação do perfil químico de compostos não-voláteis, realizou-se também análises por Cromatografia Líquida de Ultra-Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas sequencial, realizadas em colaboração com a Profa. Dra. Quezia Bezerra Cass e Profa. Dra. Regina

Vincenzi Oliveira, do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos/SP. As análises foram realizadas em uma coluna Ascentis® Express C18 (2,7 μm , 2,1x100mm) e modo gradiente de eluição, empregando-se como fase móvel água acidificada com 0,1% ácido fórmico (A) e acetonitrila (B), variando-se de 5 a 95% B em 20 min, de 95% a 100% em 1 min e mantido por mais 1 min, seguido de uma etapa de reequilíbrio da coluna (5% B) por 3 min (tempo total de 25 min); vazão de 0,4 mL/min e temperatura de 40 °C. As amostras foram solubilizadas em MeOH grau HPLC, contendo concentração igual a 1mg/mL. Os estoques das 36 amostras foram homogeneizados em ultrassom por 15 min, seguido de centrifugação por 5 min 24 °C a 12.000 rpm. O volume de amostra injetado foi de 10 μL , com concentração igual a 500 $\mu\text{g/mL}$.

As análises foram realizadas utilizando-se um cromatógrafo líquido de ultra eficiência Agilent 1290 Infinity II (Agilent Technologies), equipado com uma bomba binária G7120A, autoamostrador e compartimento de colunas G7129B e detector de ultravioleta de comprimento de onda variável G7114B, acoplado a um espectrômetro de massas de alta resolução com analisador híbrido tipo Q-ToF (Impact HD, Bruker Daltonics) equipado com fonte de eletrospray (IES).

A detecção foi realizada por meio do espectrômetro de massas operando em modo positivo e negativo de ionização, em uma faixa de m/z de 100 a 1100 Da e empregando-se as condições que seguem: voltagem do capilar, 3600 V; pressão do nebulizador (N_2), 4,0 bar; energia do quadrupolo 5 eV, gás de secagem (N_2), 8,0 L/min a 180 °C; tempo de transferência de 90 μs e pré-pulso de 6,0 μs . A calibração do EM foi realizada com uma solução de formiato de sódio 1 mM com massas de referências de 100-1100 Da. Após a corrida cromatográfica os dados de EM foram recalibrados com o mesmo calibrante, na mesma faixa de massas (100-1100 Da). O espectrômetro de massas foi programado para aquisição em modo auto EM/EM (ciclo de tempo de 3 segundos) em experimentos com diferentes energias de colisões (de 20 a 50 eV) para todas as faixas de razão m/z .

Figura 15 – Representação do procedimento experimental deste trabalho, contemplando as etapas de germinação, cultivo dos tomateiros, coleta dos compostos orgânicos voláteis, e compostos não voláteis via obtenção dos extratos etanólicos.



NPK: Fertilizante a base de nitrogênio, fósforo e potássio.

DVB/CAR/PDMS: fibra de microextração em fase sólida revestida com adsorvente do tipo divinilbenzeno/carboxen/polidimetilsiloxano.

PDMS: fibra de microextração em fase sólida revestida com adsorvente do tipo polidimetilsiloxano.

PA: fibra de microextração em fase sólida revestida com adsorvente do tipo poliácrilato.

CG-EM: Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas.

RMN: Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio.

CL-EM-EM: Cromatografia Líquida de Ultra-Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas sequencial.

DMSO: solvente dimetilsulfóxido.

3.6. Análise quimiométrica dos dados cromatográficos

O método estatístico multivariado não supervisionado por análise de componentes principais (*PCA*) foi realizado para investigar a variabilidade de COVs produzidos pelas folhas das duas variedades de tomate, Dylla (resistente) e Norty (não resistente) à mosca-branca, cada uma avaliada na estufa (ambiente controlado, sem mosca-branca) e na horta (sob influência da mosca-branca). Portanto, uma matriz numérica contendo 36 cromatogramas (quatro tipos de amostras adquiridas em nove réplicas) foi criada pela conversão dos cromatogramas em arquivos *American Standard Code for Information Interchange* (ASCII), utilizando-se os tempos de retenção entre 9 e 23 min (SARAIVA, *et al.*, 2022). Para reduzir a dimensionalidade dos dados originais e observar as tendências de composição das amostras, a matriz numérica foi exportada para avaliação da *PCA* usando o *software* PLS-Toolbox™ (versão 8.6.2, Eigenvector Research Incorporated).

Após a aplicação de uma correção de linha de base e alinhamento de sinais pelo algoritmo *Correlation Optimized Warping* (COW) sob flutuação de sinais 5 e tamanho dos espaços 50, a área dos sinais foi normalizada. As amostras foram centradas na média e o algoritmo *Singular Value Decomposition* (SVD) foi aplicado para decompor a matriz original em *scores* e *loadings*, com nível de confiança de 95%. As informações relevantes da variabilidade dos dados com base no objetivo do estudo foram obtidas nas duas primeiras componentes principais (*PCs*).

3.7. Análise quimiométrica dos dados de RMN de ¹H

A matriz numérica foi criada conforme descrito no item 3.5, que continha um total de 36 espectros de RMN de ¹H usando os deslocamentos químicos entre δ 0,4 e 10,0 ppm. Com a finalidade de melhorar a identificação da variabilidade química e maximizar a discriminação das amostras de extratos etanólicos das folhas dos tomateiros (resistente ou suscetível à mosca-branca) e em resposta à infestação (estufa ou horta), utilizou-se o método estatístico multivariado supervisionado por análise discriminante de mínimos quadrados ortogonais parciais (*OPLS-DA*). A análise foi desenvolvida usando o mesmo *software* PLS-Toolbox™, considerando os quatro tipos de amostras (resistente na estufa, resistente na horta, suscetível na estufa e suscetível na horta) como classes categóricas.

Conforme desenvolvido para o conjunto de dados CG-EM, aplicou-se ao conjunto de dados de RMN de ¹H: correção de linha de base, alinhamento de sinais pelo algoritmo COW (flutuação de sinais 5 e tamanho dos espaços 50), normalização da área dos sinais e centralização na média. O algoritmo PLS Simplificado (SIMPLS) foi aplicado para construir os modelos de classificação. O

número de variáveis latentes (LV) foi selecionado de acordo com os parâmetros estatísticos: variância total capturada; Erro quadrático médio de calibração (RMSEC); Erro quadrático médio da validação cruzada (RMSECV), valores de viés de validação cruzada (viés CV); e sensibilidade e especificidade do modelo. O método Venetian Blinds foi aplicado para validação cruzada de modelos com nível de confiança de 95%.

3.8. Anotação dos compostos orgânicos das folhas dos tomateiros por rede molecular e espectrometria de massas

Os dados obtidos por CLUE-IES-QqTOF-EM/EM foram analisados através da metodologia de rede molecular de acordo com a WANG *et al.*, (2016), seguindo as especificações padrão estabelecidas pela plataforma *Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS)*. Inicialmente os dados cromatográficos/espectrométricos, tanto para modo positivo quanto negativo, foram convertidos para o formato mzXML através do *software* MSConvert (KESSNER *et al.*, 2008) e a conversão dos dados avaliada pelo *software* SeeMS. Posteriormente, os arquivos convertidos foram submetidos aos procedimentos padrões da plataforma, descritos no link a seguir: <https://GNPS.ucsd.edu/ProteoSAFe/static/GNPS-splash.jsp>. Para cada modo de ionização (positivo e negativo) gerou-se uma rede molecular de compostos. Os arquivos foram inseridos na plataforma através do *software* WinSCP.

Para construção das redes moleculares (modo positivo e negativo) foi utilizada a metodologia aplicando os seguintes parâmetros:

- i) aplicação de filtro nos dados removendo os picos EM/EM dentro de +/- 17 u do íon precursor m/z ;
- ii) filtrou-se os espectros EM/EM por janela, escolhendo 6 picos na janela de +/- 50 u em todo o espectro;
- iii) admitiu-se tolerância de massa do íon precursor e do íon do fragmento EM/EM de 0,02 Da, por serem dados obtidos em EM de alta resolução;
- iv) para as opções de rede, foi adotado valor de cosseno igual ou maior que 0,7; com no mínimo 6 espectros correspondentes. As arestas entre dois nós foram mantidas na rede se, e somente se, cada um dos nós tivesse aparecido nos respectivos 10 principais nós mais comuns.
- v) os espectros obtidos na rede foram comparados com as bibliotecas espectrais do *GNPS*, adotando a mesma configuração para os dados de entrada. As bibliotecas utilizadas foram: *Sam Sik Kang Legacy*, *CASMI Spectral*, *GNPS Sciex*, *NIH Clinical Collection 2*,

FDA 1 e 2, Pesticides, LDB Lichen Database, NIH Natural Products 1 e 2, Berkeley Lab MS/MS, Pacific Northwest National Lab (PNNL) Lipids, GNPS Matches to NIST14 e IQAMDB IsoQuinoline and Annonaceous Metabolites Database.

Após obtidas as redes moleculares no *GNPS* (através da aplicação do algoritmo computacional com o *software* MScCluster), os dados foram importados para o *software* Cytoscape 3.9.1 para visualização das redes. Na visualização, os grupos (*clusters*) são constituídos de nós (*node*), os quais se unem por arestas (*edge*) para os compostos com íons produtos semelhantes. A rede molecular é então analisada, onde a organização das substâncias semelhantes nesses grupos, facilita a identificação de novos compostos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo dos compostos orgânicos voláteis e não-voláteis das variedades de tomateiros foi realizado com o propósito de determinar quais compostos são produzidos pela variedade resistente (TD) que, por sua vez, não são produzidos pela variedade não resistente (TN), em condição normal e de herbivoria. Para isso, o trabalho foi dividido em três partes: primeiramente, utilizando a técnica de CG-EM, em que realizou-se a identificação dos compostos voláteis produzidos pelas folhas (*in vivo*) das duas variedades de tomateiros assim como a análise dos compostos presentes no extrato etanólico das folhas; posteriormente foi realizada a análise estatística dos dados cromatográficos obtidos para determinação dos compostos responsáveis pela variabilidade da composição química das duas variedades de tomateiros; e, por fim, a identificação de outros metabólitos através da combinação de dados de EM/EM associados às redes moleculares obtidas pelo *GNPS* e análise dos extratos por RMN de ^1H acompanhado da análise estatística.

Sendo assim, para facilitar a compreensão dos resultados, a discussão foi dividida em quatro etapas: (1) identificação dos compostos orgânicos voláteis analisados por CG-EM; (2) identificação dos compostos orgânicos não-voláteis analisados por CG-EM; (3) anotação dos compostos presentes nas folhas dos tomateiros utilizando-se as redes moleculares e (4) identificação dos compostos majoritários e responsáveis pelas diferenças de perfil químico das variedades de tomateiros através de RMN de ^1H .

4.1 Estudo do perfil de compostos orgânicos voláteis por CG-EM

4.1.1 Otimização do método de investigação dos COVs

Para determinação dos COVs, iniciou-se com a otimização do método de coleta dos compostos utilizando a variedade resistente (TD). No planejamento experimental univariado, foi analisado primeiramente qual dos polímeros teria maior eficiência na sorção dos voláteis, baseado nos diferentes tipos de fibras de microextração em fase sólida (*SPME*) com tempo fixo de análise em *headspace*. Conforme mostrado na Tabela 4, o maior desempenho de adsorção foi observado pela fibra revestida com divinilbenzeno, carboxen e polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS). O resultado da eficiência adsorptiva é corroborado com Augusto, *et al.* (2015), o qual descreve a ampla capacidade de tal recobrimento para adsorver efetivamente analitos em faixas de ampla polaridades e volatilidade, sendo amplamente indicada para análises de varredura de amostras complexas. Na

Figura 16 é possível observar o maior desempenho da fibra DVB/CAR/PDMS, baseado na quantidade de compostos orgânicos voláteis adsorvidos.

Tabela 4 – Resultados para avaliação da eficiência de extração por tipos de fibras *SPME*

Recobrimento	Quociente de área do pico			Nº picos*
	Fibra 1	Fibra 2	Fibra 3	
PA	$4,15 \times 10^7$	$6,20 \times 10^7$	$1,94 \times 10^7$	$16 \pm 2,2$
DVB/CAR/PDMS	$1,85 \times 10^9$	$1,60 \times 10^9$	$1,95 \times 10^9$	$131 \pm 2,9$
PDMS	$3,42 \times 10^8$	$3,03 \times 10^8$	$2,51 \times 10^8$	$47 \pm 2,1$

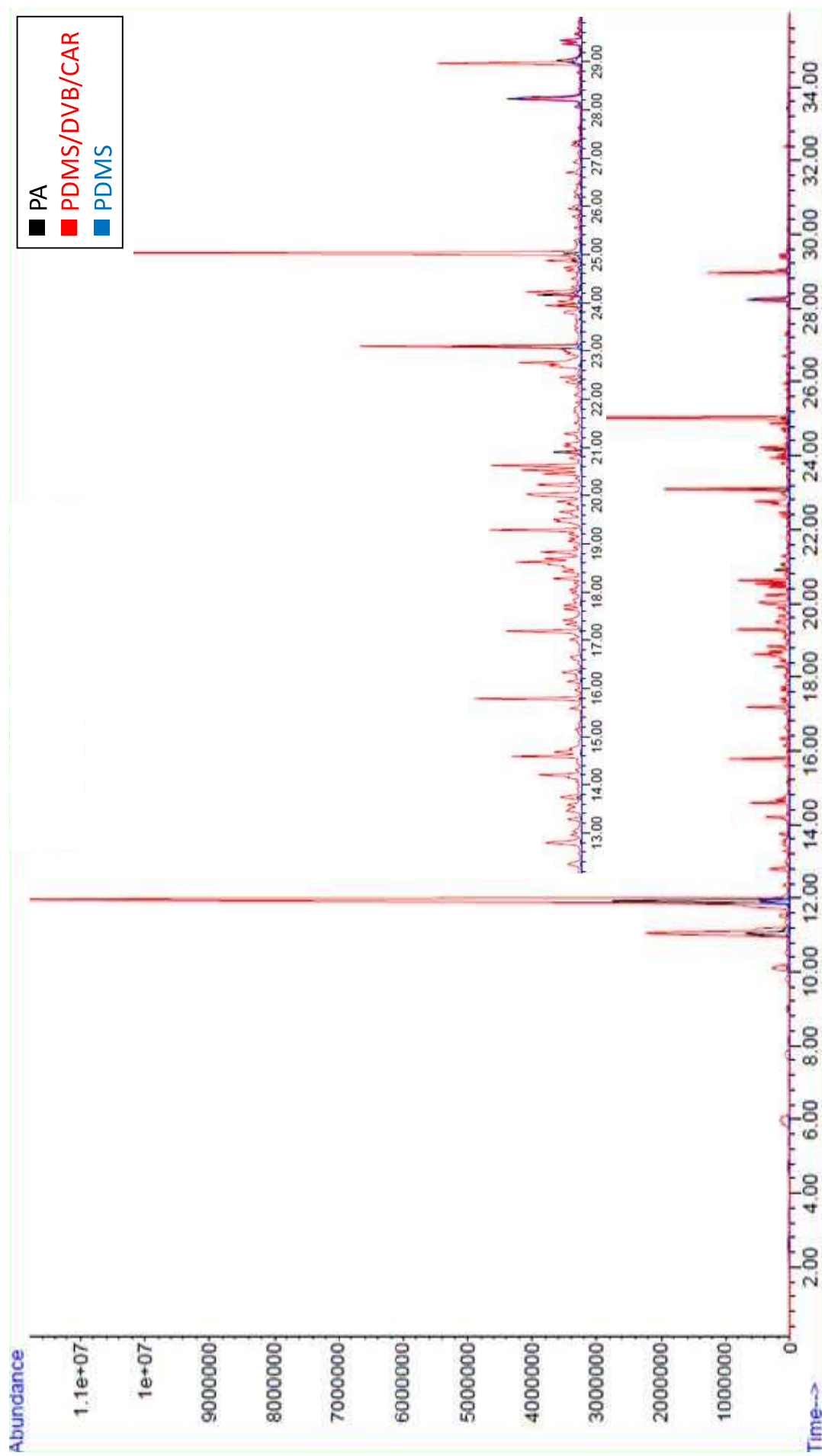
*Números médio de picos com respectivos desvios padrões obtidos nas adsorções em triplicatas.

Após determinar a fibra com maior sorção em *headspace* (DVB/CAR/PDMS), realizou-se o estudo da influência do tempo de contato do material adsorvente (20, 40 e 60 min) com o meio em estudo, buscando maior adsorção em menor tempo possível. As análises com 40 e 60 minutos não apresentaram diferença de eficiência quanto à adsorção dos COVs majoritários, no entanto, o tempo de 60 min foi mais eficiente na adsorção dos COVs minoritários (Tabela 5 e Figura 17), sendo este tempo de análise adotado para o método otimizado.

Tabela 5 – Resultados para avaliação de tempos de adsorções com fibra DVB/CAR/PDMS.

Recobrimento	Tempo de Adsorção (min)	Quociente Área dos picos	Nº picos
DVB/CAR/PDMS	20	$3,49 \times 10^8$	25
	40	$1,63 \times 10^9$	46
	60	$1,71 \times 10^9$	52

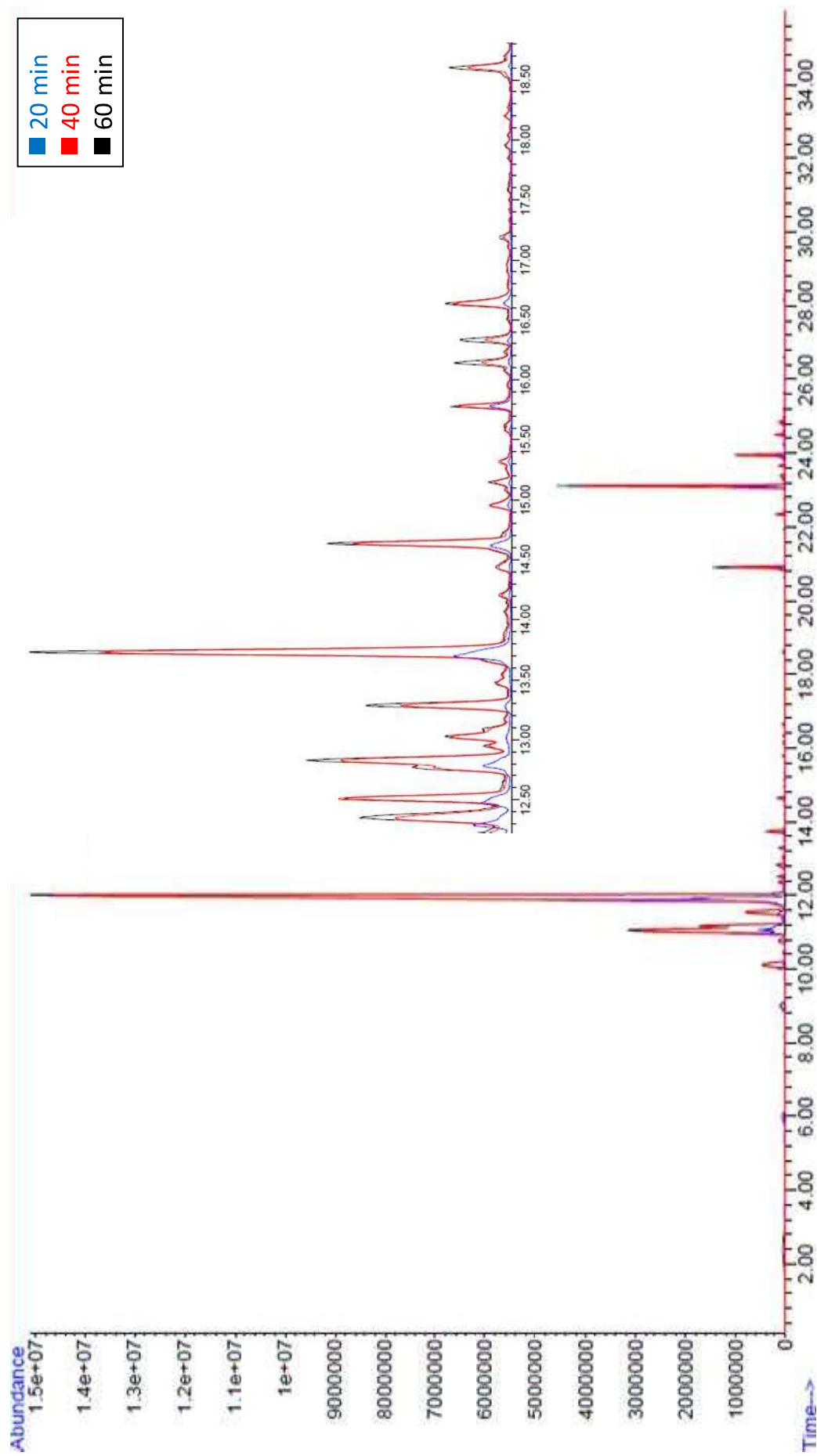
Figura 16 - Cromatogramas de adsorção para os diferentes tipos de fibras SPME.



DVB/CAR/PDMS: fibra de microextração em fase sólida revestida com adsorvente do tipo divinilbenzeno/carboxen/polidimetilsiloxano.

PDMS: fibra de microextração em fase sólida revestida com adsorvente do tipo polidimetilsiloxano.

PA: fibra de microextração em fase sólida revestida com adsorvente do tipo poliacrilato.

Figura 17 - Cromatogramas para a fibra DVB/CAR/PDMS nos diferentes tempos de adsorção

DVB/CAR/PDMS: fibra de microextração em fase sólida revestida com adsorvente do tipo divinilbenzeno/carboxen/polidimetilsiloxano.

PDMS: fibra de microextração em fase sólida revestida com adsorvente do tipo polidimetilsiloxano.

PA: fibra de microextração em fase sólida revestida com adsorvente do tipo poliacrilato.

4.1.2 Análise dos compostos orgânicos voláteis por CG-EM

Para identificação dos compostos voláteis envolvidos nas interações inseto-planta, foram cultivadas duas variedades de tomateiros em dois locais distintos: na horta (ponto de exposição dos cultivares à mosca-branca) e nas estufas (sem sofrerem herbivoria). Na Tabela 6 são apresentados os COVs detectados por análise *headspace* com *SPME* recoberta com DVB/CAR/PDMS e analisadas por CG-EM, para as variedades de tomateiros resistentes (TD – Dylla) e não resistente (TN – Norty). Ao todo foram identificados 65 compostos, classificados como aldeídos, álcoois, cetonas, diterpenos, sesquiterpenos e hidrocarbonetos aromáticos, cujas fórmulas estruturais estão descritas na Figura 18. As identificações foram baseadas nos Índice de Retenção (IR) e similaridade de espectros de massa experimentais confrontados à biblioteca NIST (correspondência > 850). Quinze compostos não apresentaram IR conhecido (descrito na literatura) e os espectros de massas obtidos experimentalmente encontram-se no ANEXO 1. Onze compostos não puderam ser identificados e estão descritos na tabela como N/D.

Os compostos α -pineno (1), verbeneno (2), mirceno (3), δ -2-careno (4), α -felandreno (5), α -terpineno (6), β -felandreno (7), *cis*- β -ocimeno (8), *o*-cimeno (9), *trans*- β -ocimeno (10), γ -terpineno (11), 1,3,8-*p*-mentatrieno (12), γ -terpinoleno (16), δ -elemeno (57), α -copaeno (62), β -elemene (63), β -cariofileno (67), α -humuleno (70) e (*E,E*)-TMTT (73) já foram relatados em estudos de identificação de COV presentes em *S. lycopersicum* (SILVA, *et al.*, 2018; LÓPEZ-GRESA, *et al.*, 2017; MAS, *et al.* 2014; TAKAYAMA, *et al.*, 2012; BLEEKER, *et al.*, 2011; RAGHAVA, *et al.*, 2010; XU E BARRINGER, 2010; BESSER, *et al.*, 2009). Tomateiros infestados por mosca-branca mostraram diferenças quantitativas nas emissões de α -humuleno, (*E*)- β -cariofileno quando comparados com suas variedades de plantas intactas (DARSHANEE, *et al.*, 2017). Entretanto, a infestação de *B. tabacci* pode regular a expressão de genes de defesa da planta, resultando em um perfil variado de metabólitos secundários (KEMPEMA, *et al.*, 2007).

Tabela 6 - COVs identificados nas variedades de tomates TD e TN, cultivadas na horta (condição de herbivoria) e estufa (condição normal).

Nº	T _R (min)	FM	Pico Íon Molecular (<i>m/z</i>)	Composto Orgânico	LRI _{EXP}	LRI _{LIT}	Referências
1	8,985	C ₁₀ H ₁₆	136	<i>α</i> -pineno	930	932	ADAMS, 2017
2	10,106	C ₁₀ H ₁₄	134	verbeneno	967	967	ADAMS, 2017
3	10,781	C ₁₀ H ₁₆	136	myrceno	990	988	CHOI, 2003
4	11,048	C ₁₀ H ₁₆	136	<i>δ</i> -2-careno	999	1001	FLAMINI, <i>et al.</i> , 2002
5	11,159	C ₁₀ H ₁₆	136	<i>α</i> -felandreno	1002	1002	ADAMS, 2017
6	11,553	C ₁₀ H ₁₆	136	<i>α</i> -terpineno	1016	1014	ADAMS, 2017
7	12,033	C ₁₀ H ₁₆	136	<i>β</i> -felandreno	1032	1031	ADAMS, 2017
8	12,204	C ₁₀ H ₁₆	136	<i>cis-β</i> -ocimeno	1037	1037	ADAMS, 2017
9	12,357	C ₁₀ H ₁₄	134	<i>o</i> -cimeno	1043	1039	NIST, EM
10	12,515	C ₁₀ H ₁₆	136	<i>trans-β</i> -ocimeno	1048	1047	FLAMINI, <i>et al.</i> , 2002
11	12,768	C ₁₀ H ₁₄	134	<i>γ</i> -terpineno	1056	1054	ADAMS, 2017
12	12,832	C ₁₀ H ₁₆ O	136	1,3,8- <i>p</i> -mentatrieno	1059	1111	NIST, EM
13	13,027	C ₁₀ H ₁₄	134	2-etil- <i>p</i> -xileno	1065	1088	LACALLE-BERGERON, <i>et al.</i> , 2021
14	13,291	C ₁₀ H ₁₄	134	dureno	1074	1121	ZAID, 2022
15	13,549	C ₁₀ H ₁₂	132	<i>m</i> -cimeneno	1083	1082	ADAMS, 2017
16	13,751	C ₁₀ H ₁₆	136	<i>γ</i> -terpinoleno	1089	1089	FLAMINI, <i>et al.</i> , 2002
17	13,884	--	220	<i>p</i> -cimeneno	1094	1089	ADAMS, 2017
18	14,004	C ₁₀ H ₁₄ O	150	(<i>E,Z</i>)-2-etilideno-6-metil-3,5-heptadienal	1098	--	NIST, EM
19	14,435	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	196	<i>trans</i> -carveol (<i>p</i> -mentia-6,8-dien-2-ol)	1112	1108	ADAMS, 2017
20	14,769	C ₈ H ₁₄ O	126	N/D	1124	--	

Continuação Tabela 6

21	14,961	C ₁₀ H ₁₆	136	allo-ocimeno (4 <i>E</i> ,6 <i>Z</i>)-allicimeno	1130	1128	ADAMS, 2017
22	15,150	C ₁₀ H ₁₄	134	cosmeno	1136	1134	FLAMINI, <i>et al.</i> , 2002
23	15,301	C ₁₀ H ₁₆	136	1,5,5-trimetil-6-metileno-ciclohexeno	1141	--	NIST, EM
24	15,636	C ₁₂ H ₂₀	164	<i>cis</i> -1-etilidenocitahidro-7 ^a -metil-1 <i>H</i> -indeno	1153	--	NIST, EM
25	16,142	C ₁₀ H ₁₆ O	152	dihidroumbelulona	1170	--	NIST, EM
26	16,238	C ₁₀ H ₁₆ O	152	<i>trans</i> -2-carene-4-ol	1173	1178	YUSEFZADI, <i>et al.</i> , 2011
27	16,370	C ₁₀ H ₁₆ O	152	<i>trans</i> -isocarveol	1177	1187	ADAMS, 2017
28	16,525	C ₁₀ H ₁₄ O	150	<i>p</i> -cimen-8-ol	1183	1179	ADAMS, 2017
29	16,650	C ₉ H ₁₄ O	138	cripton	1187	1188	LE QUERE E LATRASSE, 1990
30	16,841	C ₁₀ H ₁₆ O	152	<i>cis</i> -verbenol	1193	1188	SOTOMAYOR, <i>et al.</i> , 2004
31	16,972	C ₁₀ H ₁₆ O ₂	168	ascaridol (estereoisômero)	1198	--	NIST, EM
32	17,109	C ₁₀ H ₁₆ O	152	<i>cis</i> -sabinol (estereoisômero)	1202	--	NIST, EM
33	17,377	C ₁₀ H ₁₄	150	verbenona	1212	1218	HÖGNADÓTTIR E ROUSEFF, 2003
34	17,503	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	196	N/D	1217	--	
35	17,594	C ₁₀ H ₁₆ O	152	<i>cis</i> -carveol	1220	1226	ADAMS, 2017
36	17,698	C ₁₂ H ₁₈ O ₂	194	acetato de <i>trans</i> -crisantenil	1224	1235	ADAMS, 2017
37	17,839	C ₁₀ H ₁₄ O	150	N/D	1229	--	
38	18,113	C ₁₀ H ₁₆ O	152	4(10)-tujen-3-ol (estereoisômero)	1239	--	NIST, EM
39	18,191	C ₁₀ H ₁₂ O	148	cuminal <i>p</i> -isopropil-benzaldeido	1242	1238	ADAMS, 2017
40	18,304	C ₁₀ H ₁₄ O	150	(<i>S</i>)-carvona	1246	1243	TELLEZ, <i>et al.</i> , 1999
41	18,534	C ₁₀ H ₁₄ O	150	car-3-en-2-ona	1255	1244	ADAMS, 2017
42	18,625	C ₁₀ H ₁₆ O ₂	168	<i>cis</i> -piperitone epóxido	1258	1252	ADAMS, 2017

Continuação Tabela 6

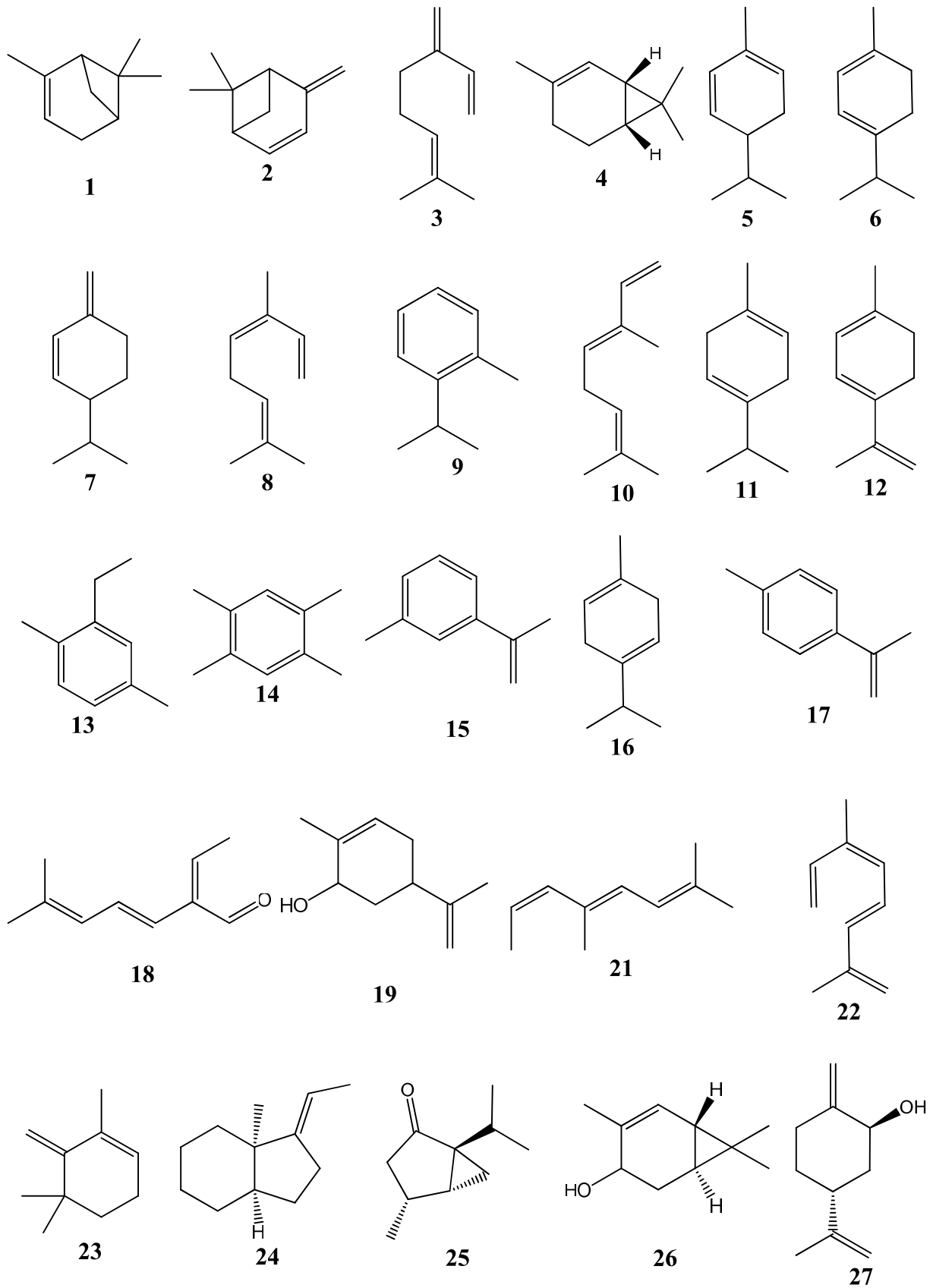
43	18,715	C ₁₀ H ₁₆ O ₂	168	óxido de <i>trans</i> -carvenona	1261	1261	BADER, <i>et al.</i> , 2003
44	18,947	C ₁₀ H ₁₆ O ₂	168	<i>trans</i> -piperitona epóxido	1270	1250	ADAMS, 2017
45	19,056	C ₁₀ H ₁₆ O	152	felandranal <i>p</i> -ment-1-en-7-al	1274	1273	ADAMS, 2017
46	19,206	C ₁₀ H ₁₄ O	150	ascaridol epóxido	1279	1269	NIST, EM
47	19,223	C ₁₀ H ₁₆ O	152	felandral	1280	1275	BABUSHOK, <i>et al.</i> , 2011
48	19,441	C ₁₀ H ₁₄ O	150	2-careen-10-al	1288	1289	HAJLAOUI, <i>et al.</i> , 2010
49	19,623	C ₁₀ H ₁₄ O	150	<i>p</i> -cimen-7-ol cuminol	1294	1289	ADAMS, 2017
50	19,758	C ₁₀ H ₁₄ O	150	N/D	1299		
51	19,839	C ₁₀ H ₁₆ O ₂	168	<i>trans</i> -isoascaridol	1302	1303	BERTOLI, <i>et al.</i> , 2011
52	19,915	C ₁₀ H ₁₄ O	150	carvacrol	1305	1300	BABUSHOK, <i>et al.</i> , 2011
53	20,051	C ₁₀ H ₁₆ O ₂	168	N/D	1310	--	
54	20,570	C ₁₀ H ₁₆ O ₂	168	N/D	1329	--	
55	20,630	C ₁₀ H ₁₆ O ₂	168	N/D	1331	--	
56	20,799	C ₁₀ H ₁₄ O ₂	165	N/D	1337	--	
57	20,905	C ₁₅ H ₂₄	204	δ -elemeno	1341	1335	ADAMS, 2017
58	21,095	C ₁₀ H ₁₆ O ₂	168	N/D	1348	--	
59	21,308	C ₁₀ H ₁₆ O ₂	168	N/D	1356	--	
60	21,587	C ₁₀ H ₁₆ O ₂	168	1-acetil-2-(1-hidroxietil)-ciclohexeno	1366	--	NIST, EM
61	21,714	C ₁₈ H ₂₀ O	168	α -limonene diepóxido	1371	--	NIST, EM
62	21,937	C ₁₅ H ₂₄	204	α -copaeno	1379	1380	KANT, <i>et al.</i> , 2004
63	22,347	C ₁₅ H ₂₆ O	236	β -elemeno	1394	1394	KANT, <i>et al.</i> , 2004
64	22,459	C ₁₅ H ₂₄ O ₂	236	tetradecano	1398	1400	ADAMS, 2017

Continuação Tabela 6

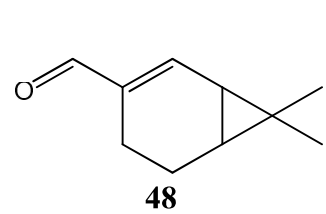
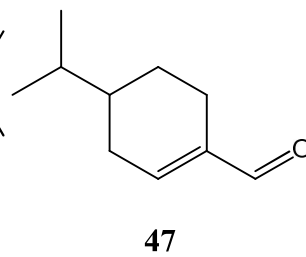
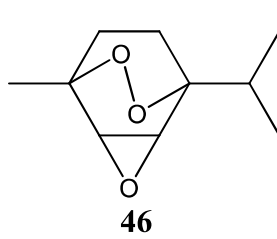
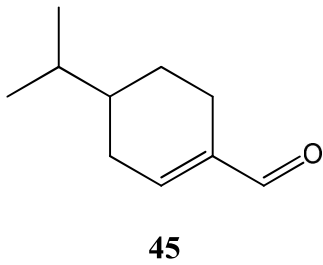
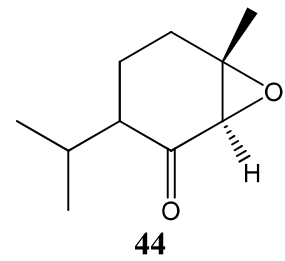
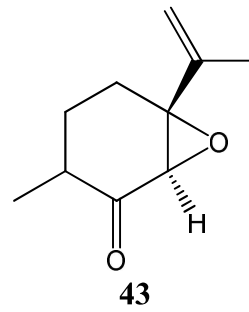
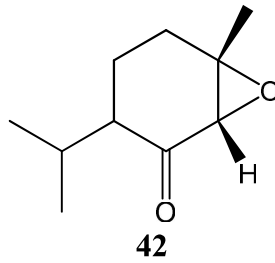
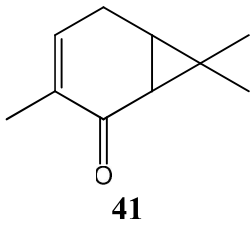
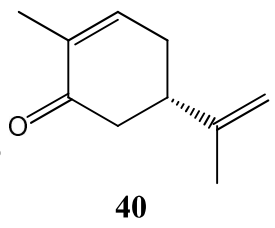
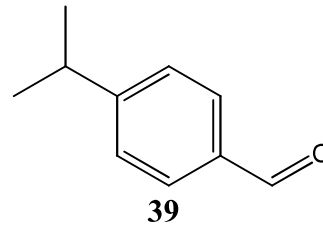
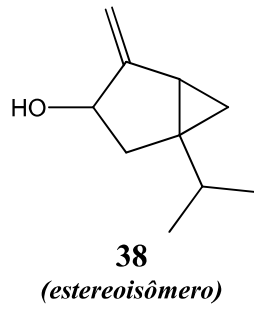
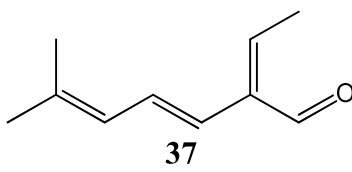
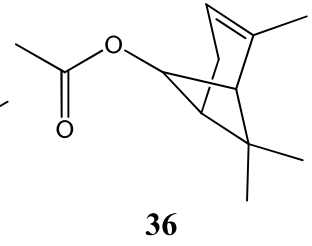
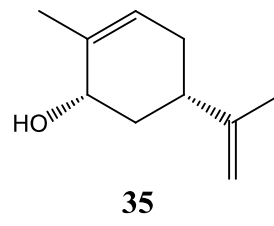
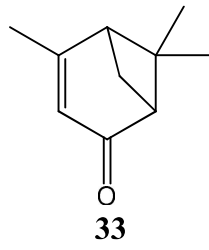
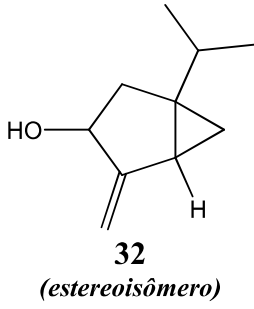
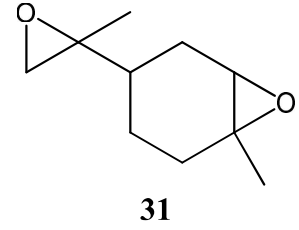
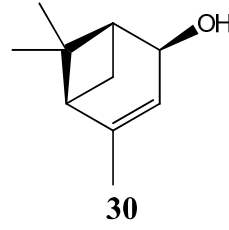
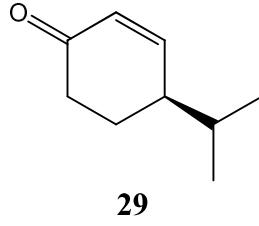
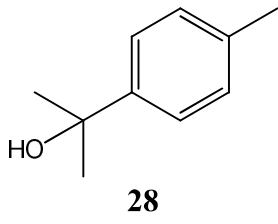
65	22,799	C ₁₀ H ₁₆ O ₂	168	N/D	1412	--	ADAMS, 2017
66	22,951	C ₁₀ H ₁₆ O ₂	168	isopiperitona	1419	1493	ADAMS, 2017
67	23,102	C ₁₅ H ₂₄	204	β -cariofileno	1426	1428	CHOI, 2003
68	23,187	C ₁₀ H ₁₆ O ₂	168	4-hidroxi-6-isopropil-3-metilciclohex-2-enona	1430	--	NIST, EM
69	23,535	C ₁₀ H ₁₆ O ₂	168	N/D	1445	--	
70	23,949	C ₁₅ H ₂₄	204	α -humuleno	1463	1463	KANT, <i>et al.</i> , 2004
71	24,590	C ₁₅ H ₂₂	202	4,4-dimetil-3-(3-metilbut-3-enilideno)-2-metilenebicyclo[4.1.0]heptano	1492	--	NIST, EM
72	24,958	C ₁₅ H ₃₂	212	pentadecano	1507	1500	ADAMS, 2017
73	26,919	C ₁₅ H ₂₂ O	218	((<i>E,E</i>)-4,8,12-trimetiltrideca-1,3,7,11-tetraeno) (<i>E,E</i>)-TMTT	1581	1582	ADAMS, 2017
74	27,322	C ₁₇ H ₃₆	240	2,6,10-trimetil-tetradecano	1597	--	NIST, EM
75	28,310	C ₁₅ H ₂₄ O	220	4,4-dimetil-tetracyclo[6.3.2.0(2,5).0(1,8)]tridecan-9-ol	1643	--	NIST, EM
76	28,775	C ₁₅ H ₂₄ O	220	<i>allo</i> -aromadendreno epóxido	1666	1639	ADAMS, 2017
77	29,070	C ₁₅ H ₂₄ O	220	14-hidroxi-9-epi-(<i>E</i>)-cariofileno	1680	1668	ADAMS, 2017

TR_{EXP}: Tempo de Retenção Experimental, FM: Fórmula Molecular; LR_{EXP}: Índice de Retenção Linear Experimental; LR_{LIT}: Índice de Retenção Linear obtido da literatura. N/D: Estrutura ainda não determinada. As estruturas dos COV's estão representadas na Figura 14.

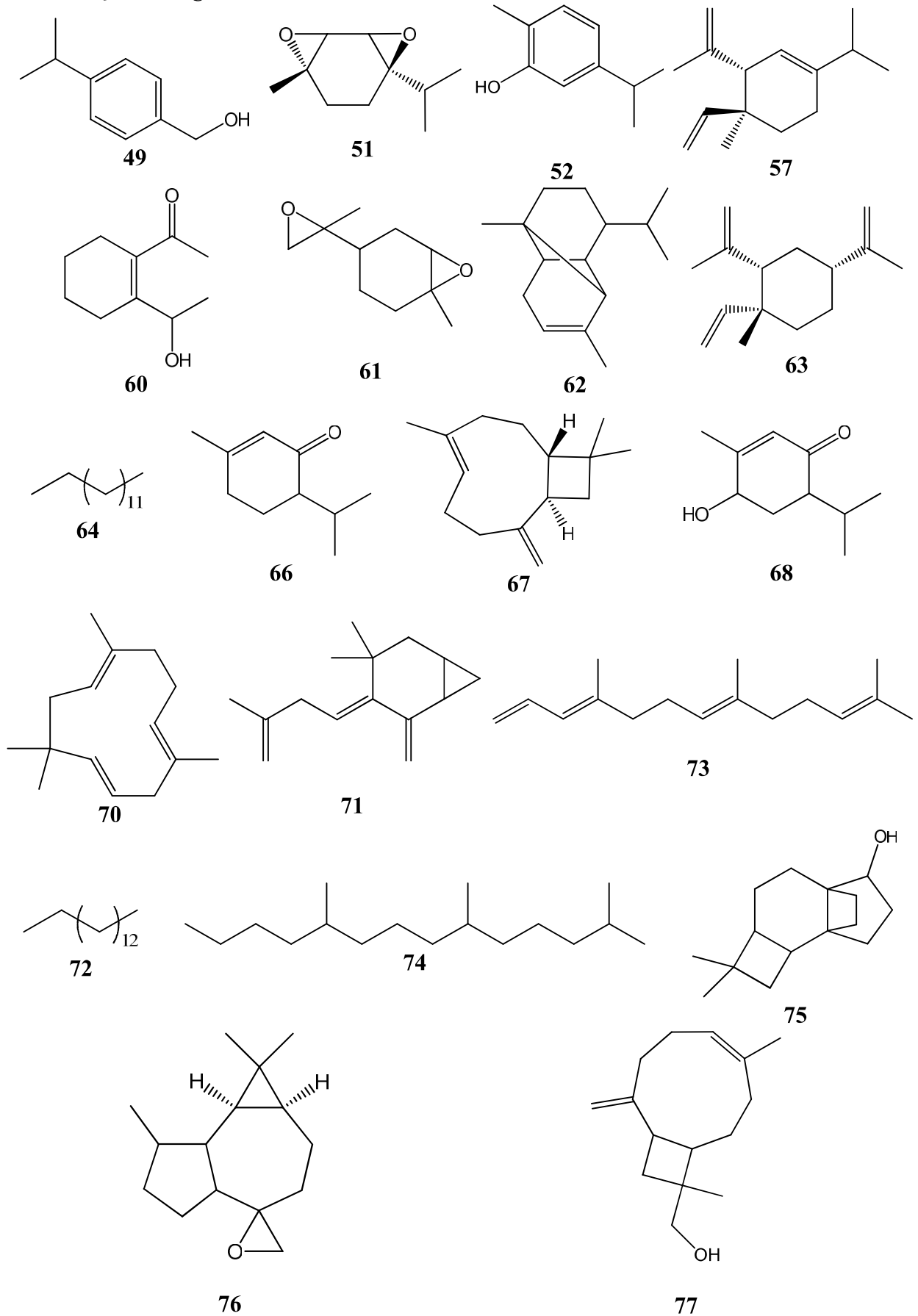
Figura 18 - Compostos Orgânicos Voláteis identificados nos tomateiros TN e TD, cultivadas na horta (condição de herbivoria) e estufa (condição normal).



Continuação da Figura 18



Continuação da Figura 18



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.1.3 Análise estatística multivariada dos compostos orgânicos voláteis por CG-EM

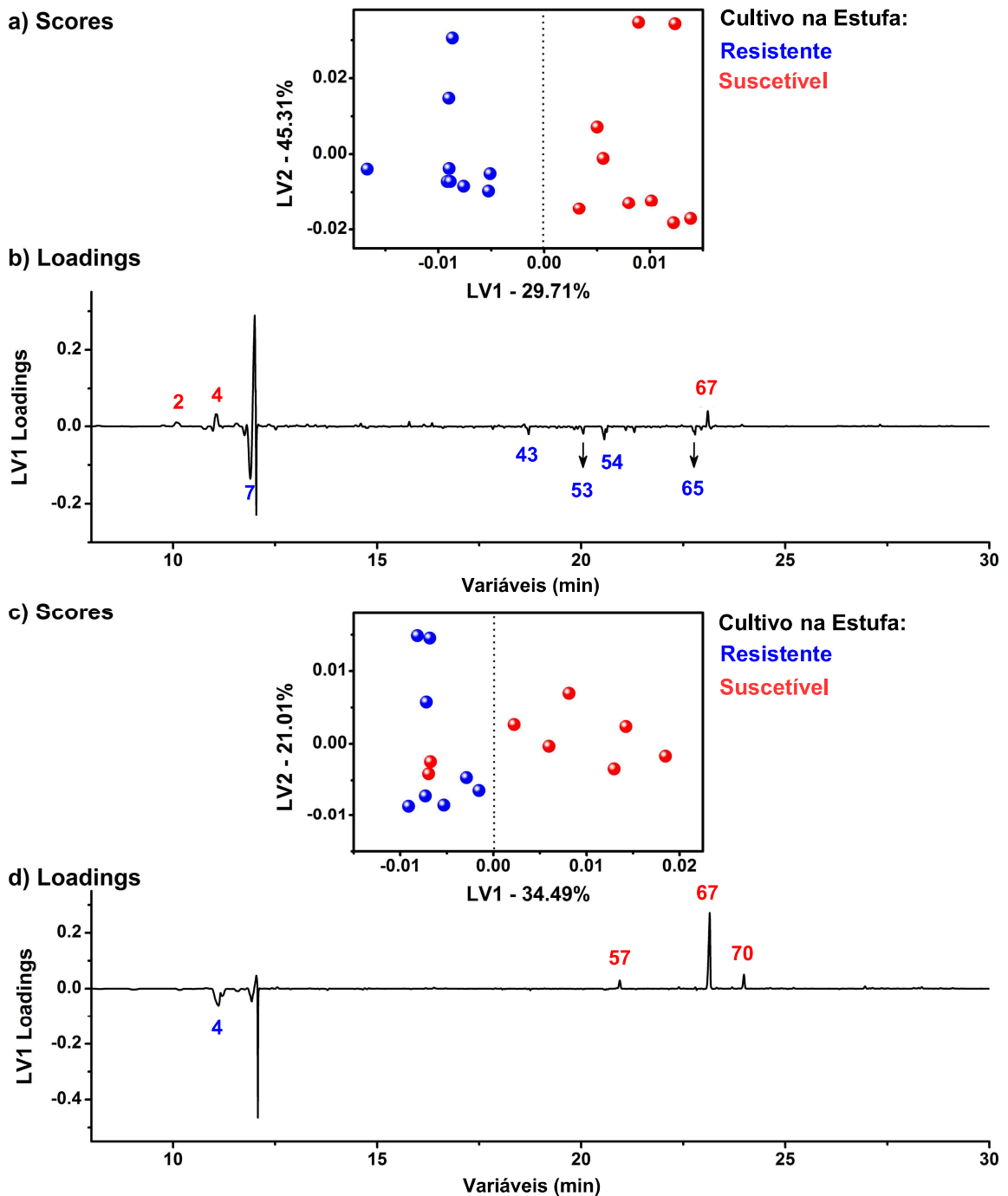
Como o conjunto de amostras analisadas por *SPME* apresenta um número expressivo de variáveis espectrais obtidas por CG-EM, torna-se útil a aplicação de tratamentos estatístico dos dados. Desta forma, empregou-se o método estatístico multivariado supervisionado por análise discriminante de mínimos quadrados ortogonais parciais (*OPLS-DA*) para exploração das regiões espectrais mais significativas a partir de métodos de redução de dimensão.

O modelo de estatística de *OPLS-DA* utilizado foi aplicado a partir de uma matriz (tabela) contendo 36 cromatogramas obtidos a partir de três amostras de cada indivíduo das variedades analisadas (em triplicata) para os tomateiros (TD – Dylla/Resistente à mosca-branca e TN – Norty/suscetível à mosca-branca) nas diferentes condições de cultivo (horta – condição de herbivoria e estufa – condição normal). Os dados dos cromatogramas foram centrados na média e aplicado o ajuste *OPLS-DA*. As amostras que apresentaram significância inferior a 90% foram descartadas por não interferir no resultado da análise.

Na Figura 19a e 19b é ilustrado o gráfico de *scores* referentes as amostras de tomateiro resistente - TD (azul) e suscetíveis - TN (vermelho) à mosca-branca cultivados na estufa (controle negativo, sem mosca-branca). Como pode ser observado, LV2 foi a principal variável latente de discriminação das amostras. A variedade resistente (Dylla – TD) apresentou compostos voláteis que não foram identificados na variedade suscetível (Norty – TN), sendo estes β -felandreno (7), óxido de *trans*-carvenona (43) e os compostos não identificados 53, 54 e 65. Já a variedade não resistente manteve altas quantidades dos compostos verbeneno (2), δ -2-careno (4) e β -cariofileno (67).

Na horta (Figura 19c e 169d), os *scores* azuis (TD) e vermelhos (TN) mostram a separação das amostras sob condições de exposição ao vetor mosca-branca. A variedade resistente mostrou aumento na produção do composto 4, enquanto a variedade suscetível apresentou concentrações superiores de δ -elemeno (57), β -cariofileno (67) e α -humuleno (70). Além disso, observa-se no gráfico *loadings* que 4 teve produção invertida nas condições de exposição à praga em estudo.

Figura 19 - a) Gráfico de *scores* das variáveis latentes LV1 × LV2 obtida pela avaliação das folhas de tomates resistentes (azul) e suscetíveis (vermelho) à mosca-branca cultivada na estufa, b) com os *loadings* de LV1 plotados em linhas. c) Gráfico de *scores* das variáveis latentes LV1 × LV2 a partir da avaliação das folhas de tomates resistentes - TD (azul) e suscetíveis - TN (vermelho) à mosca-branca cultivada na horta, com os *loadings* LV1 plotados em linhas (d). *Loadings* plotados na mesma intensidade com números de compostos correspondentes à Tabela 6.



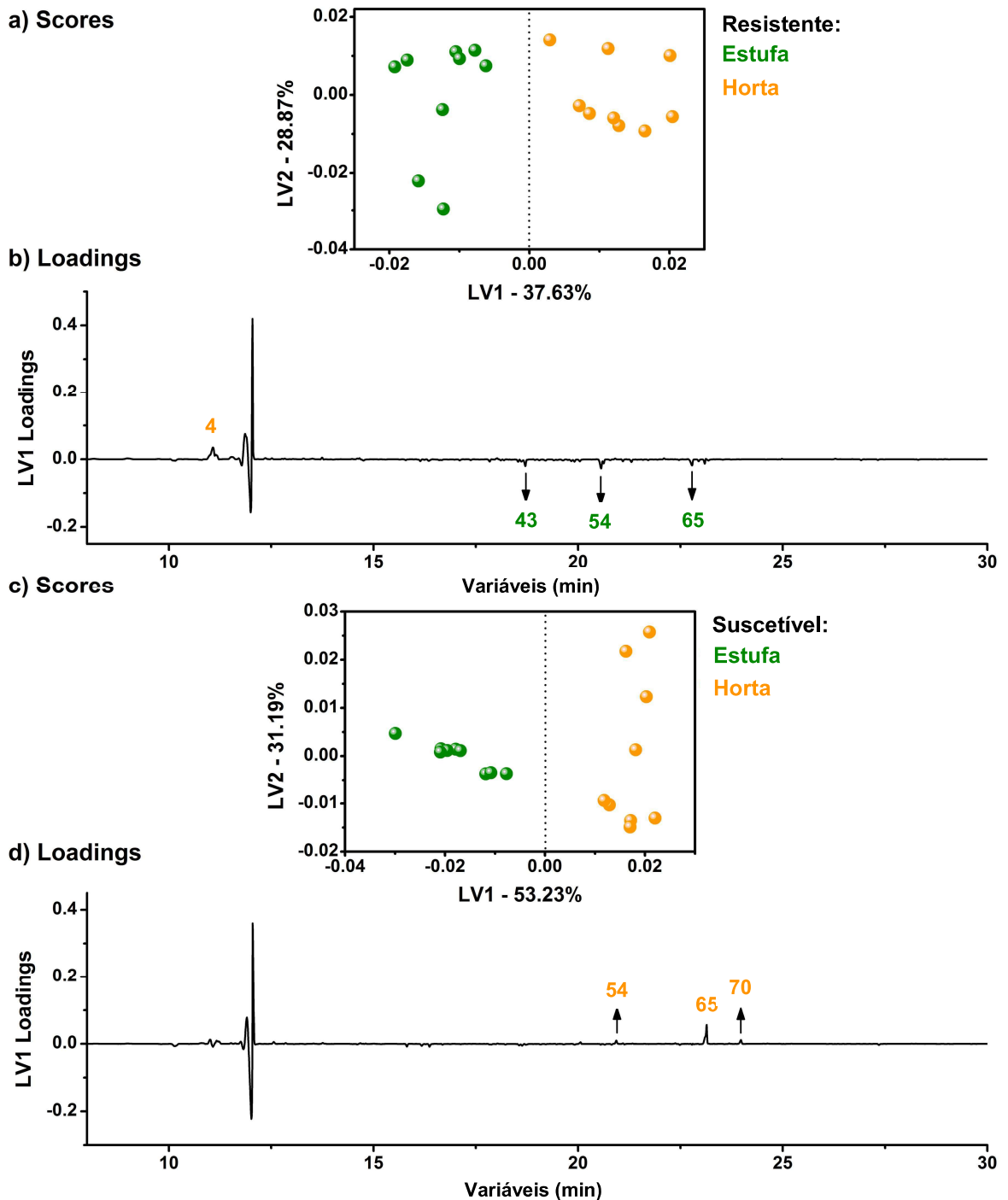
Fonte: Elaborada pelo autor.

Após compreender a variabilidade geral dos compostos voláteis entre as variedades de tomateiros Dylla (TD) e Norty (TN) frente às influências da exposição à mosca-branca, realizou-se a avaliação do perfil de COVs produzidos por TD e TN isoladamente sob influência do inseto praga. As Figuras 20a e 20b apresentam os gráficos de *scores* e *loadings*, respectivamente, para a variedade Dylla (resistente) cultivadas na estufa (verde) e na horta (laranja). Como pode ser observado, os resultados detalhados da *OPLS-DA* revelaram a forte correlação do composto óxido de *trans*-carvenona (**43**) com a variedade resistente cultivada na estufa e δ -2-careno (**4**) quando a mesma variedade foi exposta à mosca-branca. A variedade suscetível (TN) apresentou maior quantidade de α -humuleno (**70**), enquanto, os compostos não identificados **54** e **65**, foram observados para variedade resistente na estufa e suscetível na horta. Observa-se ainda, que o composto não identificado **65** foi produzido em maior quantidade por TN cultivada na horta, já que o composto não foi observado na variedade da estufa.

Um estudo avaliou a infestação de tomateiros *Solanum lycopersicon* L. (variedade Santa Clara) por *B. tabaci*, a qual induz a produção de uma mistura composta por concentrações elevadas de terpenos, como α -pineno (**1**), mirceno (**3**), α -terpineno (**6**), β -felandreno (**7**), β -ocimeno (**8**), γ -terpineno (**11**), terpinoleno (**16**), β -elemeno (**63**), β -cariofileno (**67**), α -humuleno (**70**) (SILVA, *et al.*, 2018). A emissão de α -felandreno, α -terpineno e *p*-cimeno foram identificados positivamente como compostos repelentes da mosca-branca em bioensaios de olfatométrica (BLEEKER, *et al.*, 2009).

O uso de compostos voláteis pode ser uma alternativa promissora no controle de pragas, visto que, os agrotóxicos sintéticos utilizados no controle da mosca-branca podem resultar na evolução de genótipos resistentes e na redução de inimigos naturais. Desta forma, a escolha de estratégias de controle ambientalmente corretas tem se mostrado uma grande preocupação no setor agroindustrial. Os COVs atuam como repelentes de insetos e elicitores de defesa de plantas, controlando a infestação de moscas-brancas em tomateiros. Conboy, *et al.*, (2020) avaliaram a eficácia do limoneno como método de proteção contra mosca-branca em cultivos de tomates, oferecendo método de controle barato, seguro e ambientalmente correto.

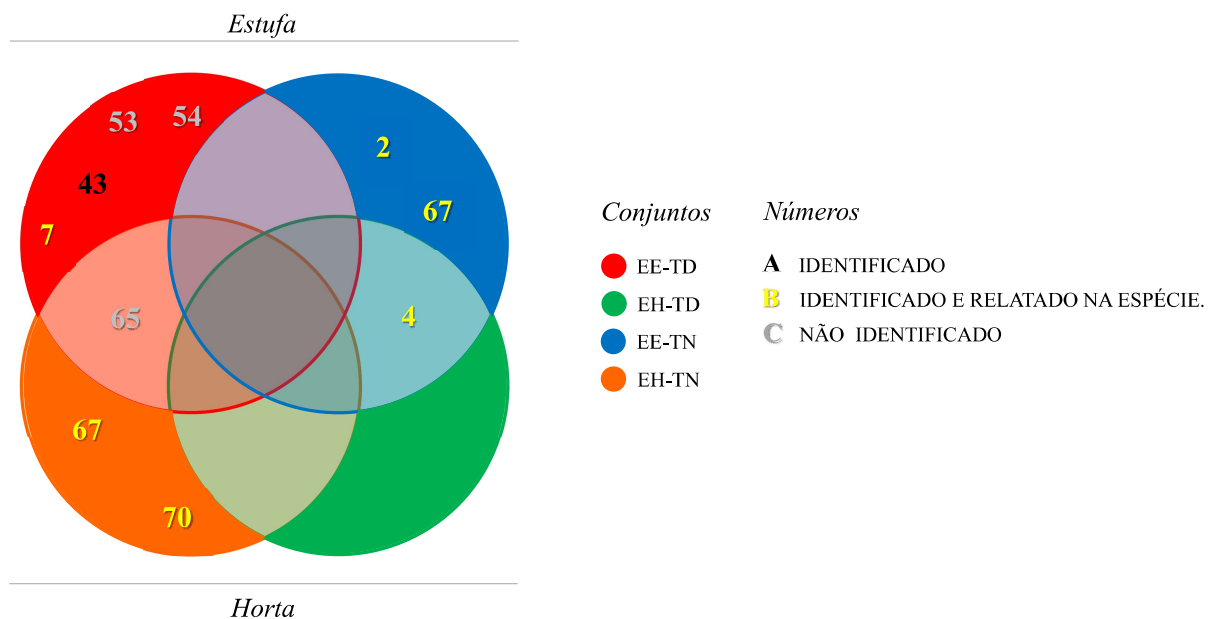
Figura 20 - a) Gráfico de *scores* das variáveis latentes LV1 × LV2 obtido pela avaliação dos extratos etanólicos das folhas de tomates resistente à mosca-branca cultivadas na estufa (verde) e cultivadas na horta (laranja), b) com os *loadings* de LV1 plotados em linhas. c) Gráfico de *scores* das variáveis latentes de LV1 × LV2 a partir da avaliação dos extratos etanólicos da variedade de tomateiro suscetível à mosca-branca cultivadas na estufa (verde) e cultivadas na horta (laranja), com os *loadings* LV1 plotados em linhas (d). *Loadings* plotados na mesma intensidade com números de compostos correspondentes à Tabela 6.



Fonte: Elaborada pelo autor.

O diagrama de Venn a seguir (Figura 21) ilustra a variação do perfil de compostos voláteis identificados nas variedades de tomateiros resistente (TD) e não resistente (suscetível) (TN), sob as condições de cultivo de herbivoria (horta – EH) e não herbivoria (estufa – EE) a partir da análise quimiométrica. Como é possível observar, os compostos **2**, **4**, **7**, **67** e **70** foram identificados neste trabalho e já foram relatados em outros estudos envolvendo tomates da espécie *S. lycopersicum*. Não há relatos da presença do composto *trans*-carvenona (**43**) em tomateiros e os compostos **53**, **54** e **65** não foram identificados. As interseções dos conjuntos que contêm números, indicam que tais compostos foram identificados nas duas amostras.

Figura 21 - Diagrama de Venn para ilustração das semelhanças e diferenças de compostos voláteis destacados na análise estatística multivariada por TD e TN nas duas condições de cultivo (horta e estufa).



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2 Estudo do perfil de compostos orgânicos não-voláteis por CG-EM

4.2.1 Análise dos compostos orgânicos não-voláteis por CG-EM

Com a finalidade de determinar o perfil de compostos orgânicos não-voláteis (CONVs) com possíveis atividade citotóxica para a mosca-branca, foram preparados os extratos etanólicos das duas variedades de tomateiros (TN e TD) cultivadas na horta e nas

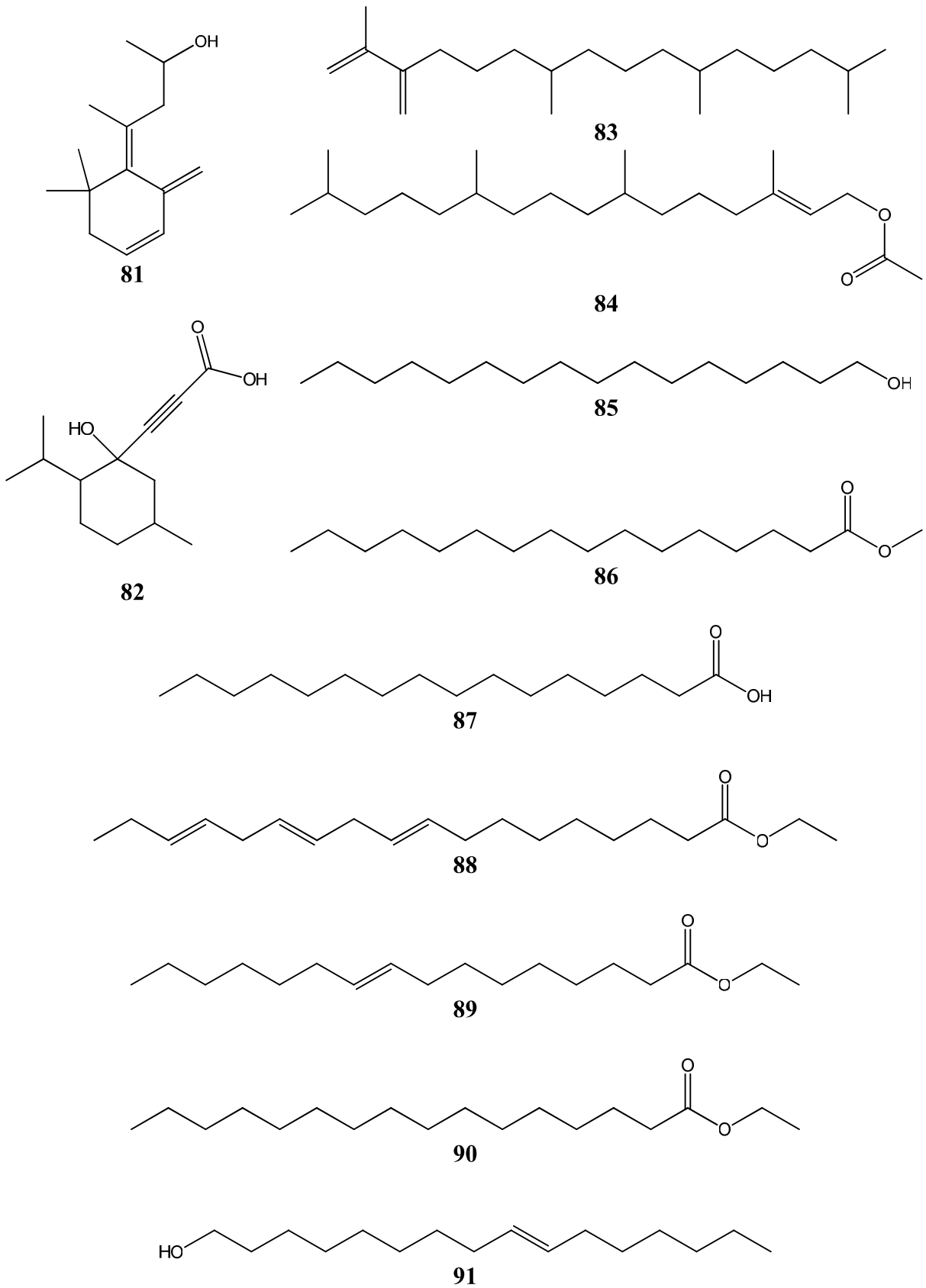
estufas. Na Tabela 7 são apresentados os CONVs separados e detectados por CG-EM (Figura 22), sendo possível identificar 17 destes compostos utilizando-se o Índice de Retenção (IR) e a similaridade de espectros de massa experimentais confrontados à biblioteca NIST (correspondência > 850). Os espectros de massa dos compostos identificados que não apresentaram IR conhecidos estão no ANEXO 2. Os compostos majoritários são pertencentes à classe dos ésteres de cadeia longa. Três (03) compostos não foram identificados e estão representados na tabela por N/D.

Tabela 7 - CONVs identificados nas variedades de tomates TD e TN cultivadas na horta e estufa.

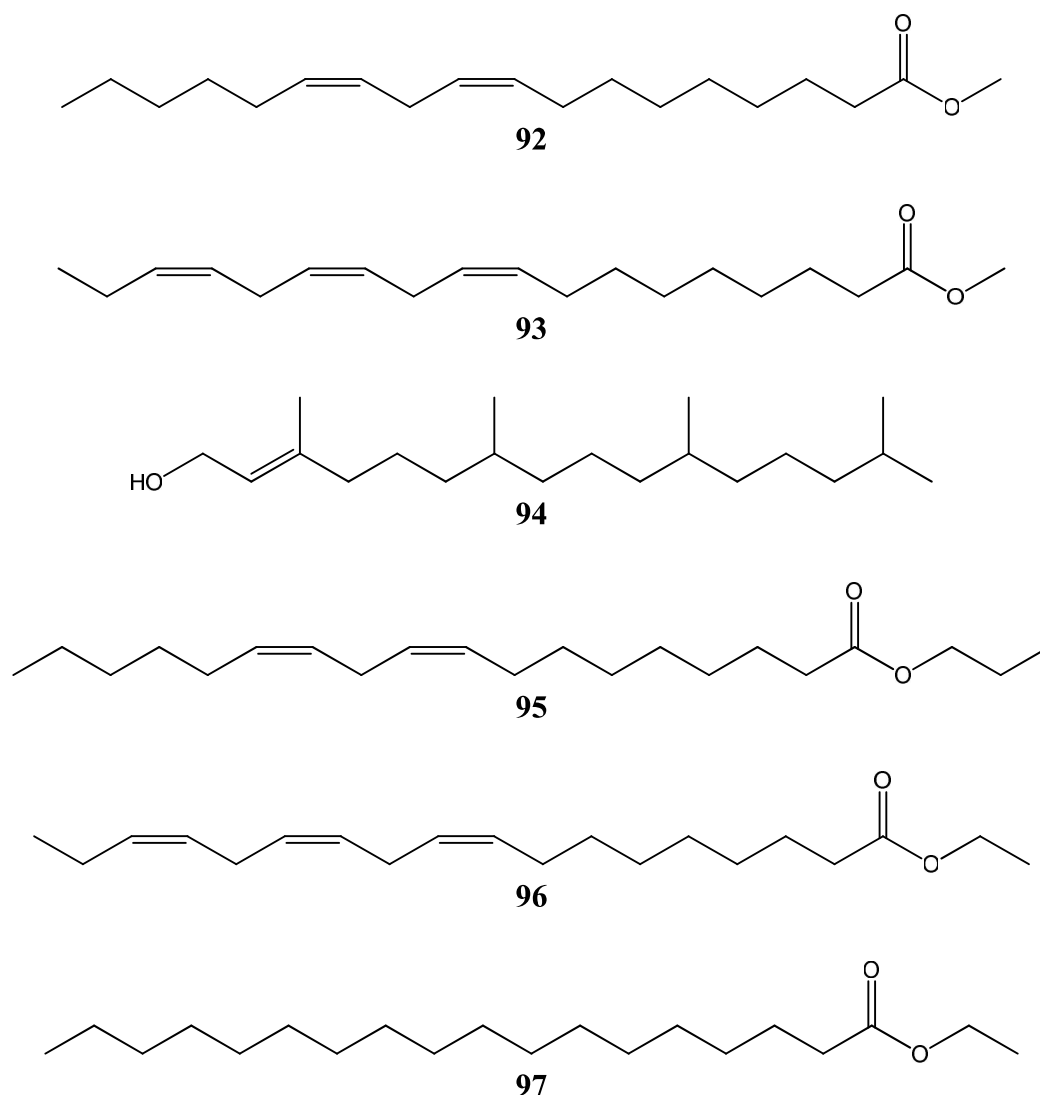
Nº	T _R (min)	FM	Pico Íon Molecular (m/z)	Composto Orgânico Não-Volátil	LR _{EXP}	LR _{LIT}	Referências
78	10.379	C ₁₄ H ₁₂ Cl ₂ O ₂	282	N/D	1515	--	
79	10.522	C ₁₅ H ₂₀ O	216	N/D	1533	--	
80	10.859	C ₂₄ H ₃₆ O ₂	356	N/D	1575	--	
81	11.602	C ₁₄ H ₂₂ O	206	4-(6,6-dimetil-2-metillencicloex-3-enilideno)pentan-2-ol	1665	--	
82	12.750	C ₁₄ H ₂₂ O ₃	238	ácido 3-(1-hidroxi-2-isopropil-5-metilcicloexil)-propiólico	1801	--	
83	13.293	C ₂₀ H ₄₀ O	296	neoftadieno	1836	1830	PALIC, <i>et al.</i> , 2002
84	13.630	C ₂₂ H ₄₂ O ₂	338	acetato de fitol	1858	--	
85	13.899	C ₂₀ H ₄₀ O	296	hexadecanol	1875	1874	ADAMS, 2017
86	14.555	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	270	palmitato de metila	1918	1921	ADAMS, 2017
87	15.150	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256	ácido hexadecanoico (ácido palmítico)	1956	1959	ADAMS, 2017
88	15.368	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	306	9,12,15-octadecatrienoato de etila	1970	--	
89	15.722	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	282	9-hexadecenoato de etila (<i>E</i>)-9-palmitoleato de etila	1993	1977	ADAMS, 2017
90	15.858	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	284	palmitato de etila	2001	1992	ADAMS, 2017
91	18.052	C ₁₆ H ₃₄ O	242	<i>trans</i> -9-hexadecen-1-ol	2086	--	
92	18.429	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	294	linoleato de metila	2100	2095	ADAMS, 2017
93	18.639	C ₁₉ H ₃₂ O ₂	292	linolenato de metila	2114	2098	TELLEZ, <i>et al.</i> , 1999
94	18.988	C ₂₀ H ₄₀ O	296	fitol	2137	2116	BABUSHOK, <i>et al.</i> , 2011
95	20.668	C ₂₀ H ₃₆ O ₂	322	linoleato de propila	2249	--	
96	20.925	C ₂₀ H ₃₄ O ₂	306	linolenato de etila	2266	2171	GÖĞÜŞ LEWIS E ÖZEL, 2011
97	21.916	C ₂₀ H ₄₀ O ₂	312	estearato de etila	2331	2194	ADAMS, 2017

TR_{EXP}: Tempo de Retenção Experimental, FM: Fórmula Molecular, LR_{EXP}: Índice de Retenção Linear Experimental; LR_{LIT}: Índice de retenção Linear obtido da literatura.
N/D: Estrutura ainda não determinada. As estruturas dos CONVs estão representadas na Figura 18.

Figura 22 - Compostos Orgânicos Não Voláteis (CONVs) identificados nos tomateiros TN e TD, cultivadas na horta e estufa.



Continuação da Figura 22



Fonte: Elaborado pelo autor.

Conforme visto na Tabela 7, a maioria dos compostos identificados nos extratos etanólicos das folhas dos tomateiros e são pertencentes à classe dos lipídeos. O mecanismo de defesa de *S. lycopersicum*, através da chamada via octadecanoide, comprova que o ferimento leva à regulação positiva de vários genes derivados de tal processo (WASTERACK, *et al.*, 1998). No entanto, os estudos sobre compostos não-voláteis associados ao mecanismo de defesa de tomateiros ainda são escassos. De acordo com os dados da literatura, há relatos de identificação para os compostos neofitadieno (83), palmitato de metila (86), ácido hexadecanoico (87), linoleato de metila (92), linolenato de metila (93) e fitol (94) (CÁCERES, *et al.*, 2015; SOLABERRIETA, *et al.*, 2012; HORI, *et al.*, 2011).

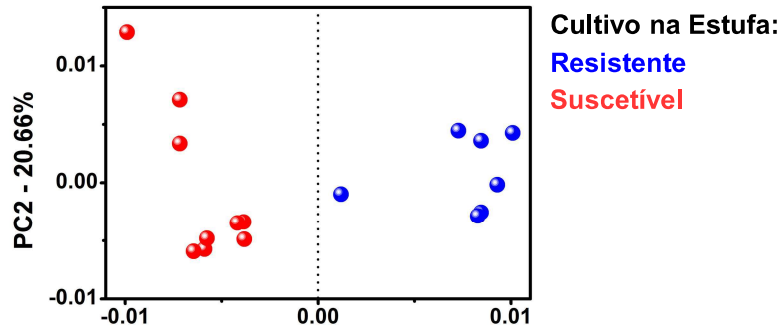
4.2.2 Análise quimiométrica dos compostos orgânicos não-voláteis por GC-EM

Inicialmente, desenvolveu-se a identificação dos principais compostos orgânicos não-voláteis (CONVs) nos extratos de folhas de tomateiro, os quais estão descritos na Tabela 7 com seus respectivos parâmetros de caracterização. Devido à complexidade do conjunto de dados advindos da CG-EM pelo elevado número de CONVs e variabilidade experimental (variedades resistentes e suscetíveis, com e sem influência da mosca-branca), foi executada uma análise estatística exploratória multivariada por *PCA* para avaliação da variabilidade da composição das folhas sob influência da mosca-branca. Nas Figuras 23a e 23b ilustram os gráficos de *scores* e *loadings*, respectivamente, para a análise dos extratos etanólicos de folhas de tomates resistentes - TD (azul) e suscetíveis - TN (vermelho) à mosca-branca cultivada na estufa (ambiente controlado, sem mosca-branca); e nas Figuras 23c e 23d são apresentados os gráficos de *scores* e *loadings*, respectivamente, para os extratos das folhas de tomates resistentes (azul) e suscetíveis (vermelho) à mosca-branca cultivada na horta (com influência da mosca-branca).

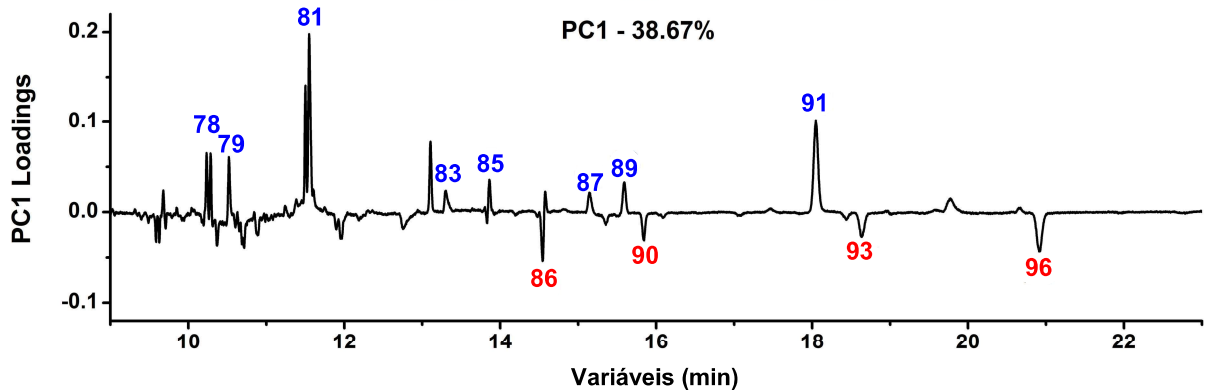
Com base nos *scores* e *loadings*, a avaliação das espécies suscetíveis e resistentes à mosca-branca na estufa (Fig. 23a e 23b, respectivamente), *PC1* foi o principal eixo de discriminação das amostras. Naturalmente a variedade resistente (Dylla – TD) apresentou maiores quantidades dos compostos não identificados **78**, **79**, 4-(6,6-dimetil-2-metilenociclohex-3-enilideno)pentan-2-ol (**81**), neofitadieno (**83**), hexadecanol (**85**), ácido hexadecanoico (**87**), 9-hexadecenoato de etila (**89**) e *trans*-9-hexadecen-1-ol (**91**); e a variedade suscetível (Norty – TN) maiores quantidades de palmitato de metila (**86**), palmitato de etila (**90**), linolenato de metila (**93**) e linolenato de etila (**96**). Na horta, sob influência da mosca-branca (Figura 23c e 23d), a variedade TD manteve quantidades elevadas de **81**, **83**, **85**, **87** e **91**, além de produzir o novo composto numerado como **94** (fitol). Além disso, a alta quantidade do composto não identificado **79** foi invertida para a variedade suscetível, juntamente com altas produção dos metabólitos **86** e **90**. Houve ainda, aumento na produção de linoleato de metila (**92**), linolenato de metila (**93**), linoleato de propila (**95**) e linolenato de etila (**96**) pela mesma variedade quando cultivada na horta.

Figura 23 - a) Sistema de coordenadas de *scores* PC1 × PC2 a partir da avaliação das folhas de tomates resistentes (azul) e suscetíveis (vermelho) à mosca-branca cultivada na estufa, b) com as *loadings* de PC1 plotadas em linhas. c) Sistema de coordenadas de *scores* PC1 × PC2 a partir da avaliação das folhas de tomates resistentes (azul) e suscetíveis (vermelho) à mosca-branca cultivada na horta d) com as *loadings* PC1 plotadas em linhas. *Loadings* plotados na mesma intensidade com números de compostos correspondentes à Tabela 7.

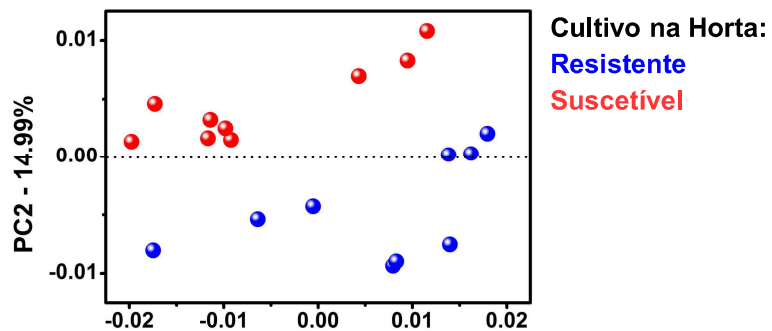
a) Scores



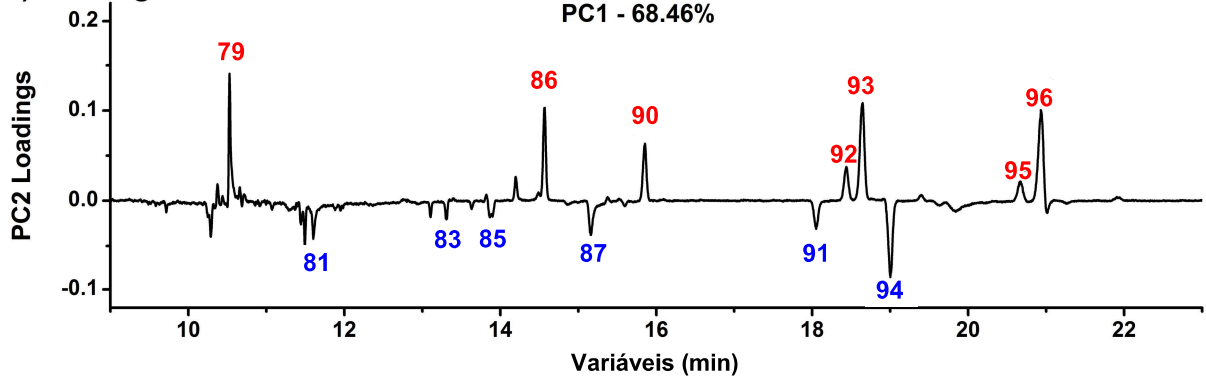
b) Loadings



c) Scores



d) Loadings



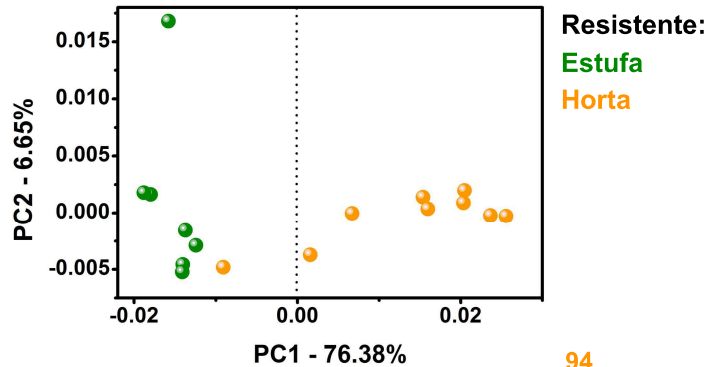
Fonte: Elaborada pelo autor.

Após a compreensão geral da variabilidade natural de CONVs entre as variedades resistentes e suscetíveis à *B. tabacci*, e o aumento de CONVs com base na influência da mosca-branca (horta), avaliações adicionais de *PCA* foram desenvolvidas para detalhar a variabilidade da composição dos extratos etanólicos das folhas das variedades de tomate (resistente e suscetível) pela influência da mosca-branca. Nas Figuras 24a e 24b são apresentados os gráficos de *scores* e *loadings*, respectivamente, para tomates resistentes à mosca-branca cultivada na estufa (verde) e horta (laranja); e nas Figuras 24c e 24d são ilustrados os *scores* e *loadings*, respectivamente, dos tomates não resistentes cultivados na estufa (verde) e horta (laranja).

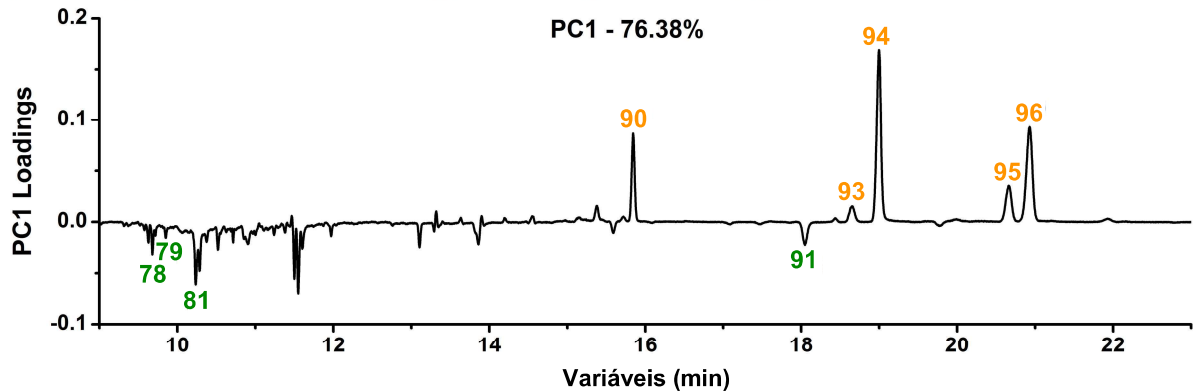
Os resultados detalhados da *PCA* revelaram que a produção dos compostos palmitato de etila (**90**), linolenato de metila (**93**), fitol (**94**), linolenato de proprila (**95**), linolenato de etila (**96**) estão fortemente correlacionado com a influência da mosca-branca em ambas as variedades (resistente e suscetível). No entanto, a maior intensidade no pico do composto **94**, sugere o aumento na variedade resistente comparada à suscetível, quando cultivada na horta, sendo claramente verificada pela comparação do gráfico de *loadings*.

Figura 24 - a) Sistema de coordenadas de *scores* PC1 × PC2 a partir da avaliação das folhas de tomates resistentes a mosca-branca cultivadas em casa de vegetação (verde) e horta (laranja), b) com os *loadings* de PC1 plotados em linhas. c) Sistema de coordenadas de *scores* PC1 × PC2 de tomates suscetíveis a mosca-branca cultivada em estufa (verde) e horta (laranja), d) com os *loadings* PC1 plotados em linhas. *Loadings* plotados na mesma intensidade com números de compostos correspondentes à Tabela 7.

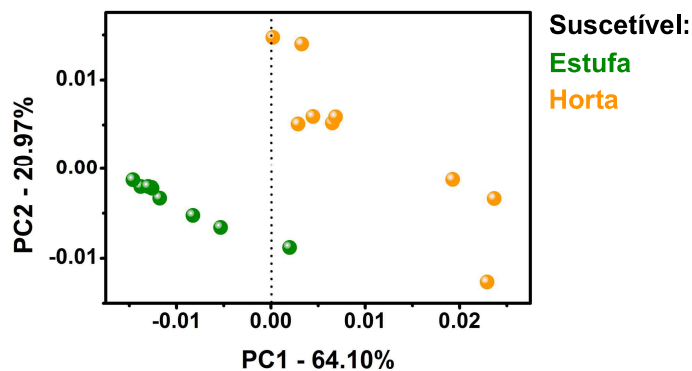
a) Scores



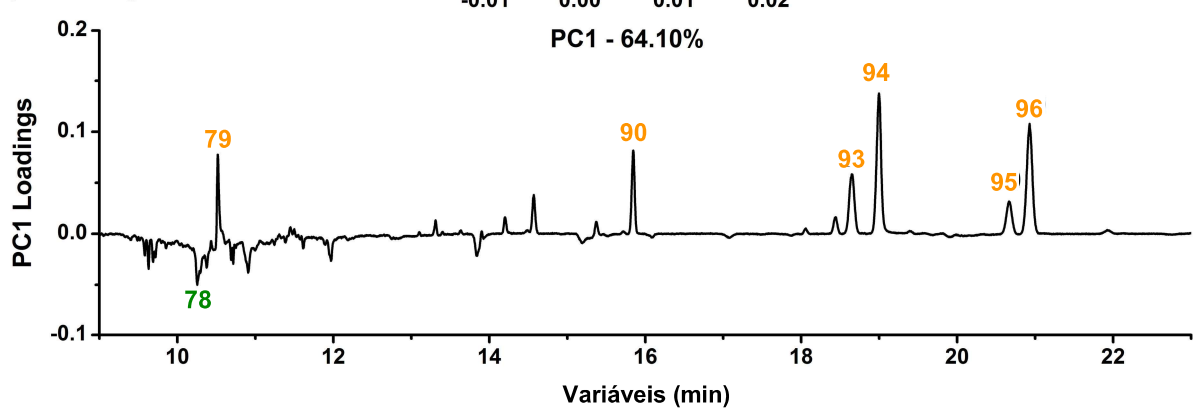
b) Loadings



c) Scores



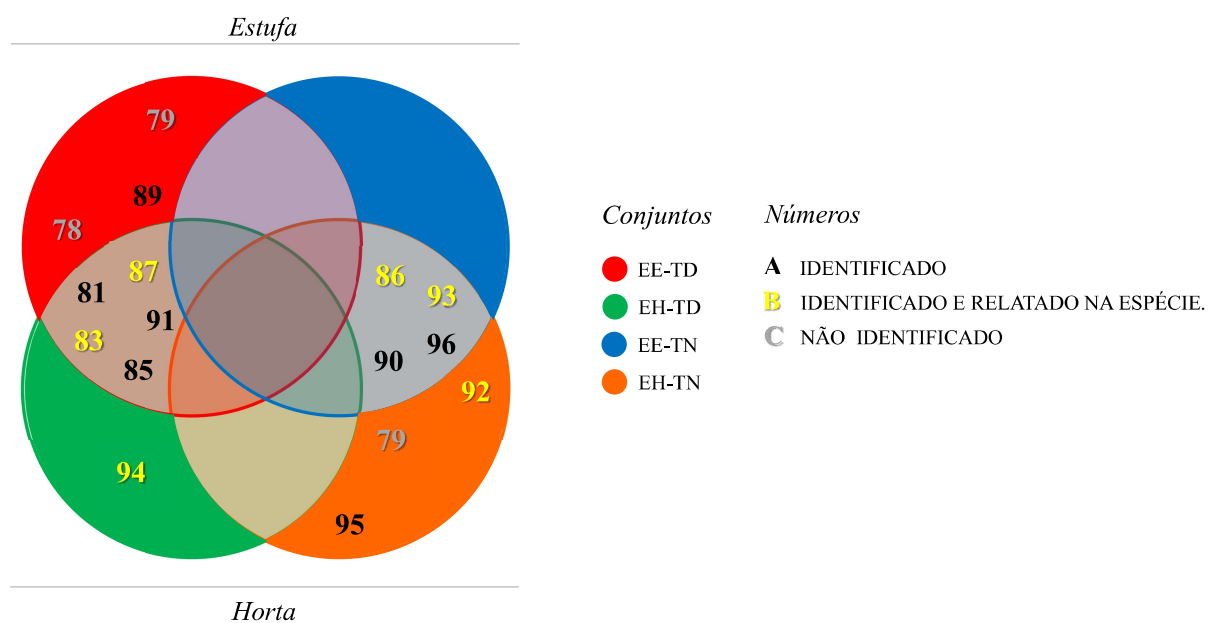
d) Loadings



Fonte: Elaborada pelo autor.

O diagrama de Venn (Figura 25) ilustra a variação do perfil de compostos não-voláteis identificados nas variedades de tomateiros (resistente – TD e suscetível – TN), sob as duas condições de cultivo (horta – EH e estufa – EE). Os compostos **83, 86, 87, 92, 93 e 94** foram identificados neste trabalho por análise CG-EM e há relatos na literatura da presença desses compostos em tomateiros da espécie *S. lycopersicum*. No entanto, para os compostos **81, 85, 89, 90, 91, 95 e 96** não há dados sobre a presença em tomateiros. Os compostos **78 e 79** não puderam ser identificados. As interseções dos conjuntos que contém números, indicam que tais compostos foram identificados nos dois grupos de amostras.

Figura 25 - Diagrama de Venn para ilustração das semelhanças e diferenças de compostos não voláteis (CONVs) destacados na análise estatística multivariada por TD e TN nas duas condições de cultivo (horta e estufa).



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.3 Anotação dos compostos orgânicos através da espectrometria de massas e de redes moleculares.

A identificação dos metabólitos presentes nos tomateiros, provenientes das análises por CLUE-EM/EM, foi realizada utilizando-se a estratégia de análises de dados que permitem a organização e interpretação dos mesmos de forma mais rápida e simplificada. A plataforma *online*, *GNPS*, foi utilizada por ser uma ferramenta gratuita, de armazenamento, análise e divulgação de conhecimento de espectros EM/EM. Com *GNPS* é possível compartilhar

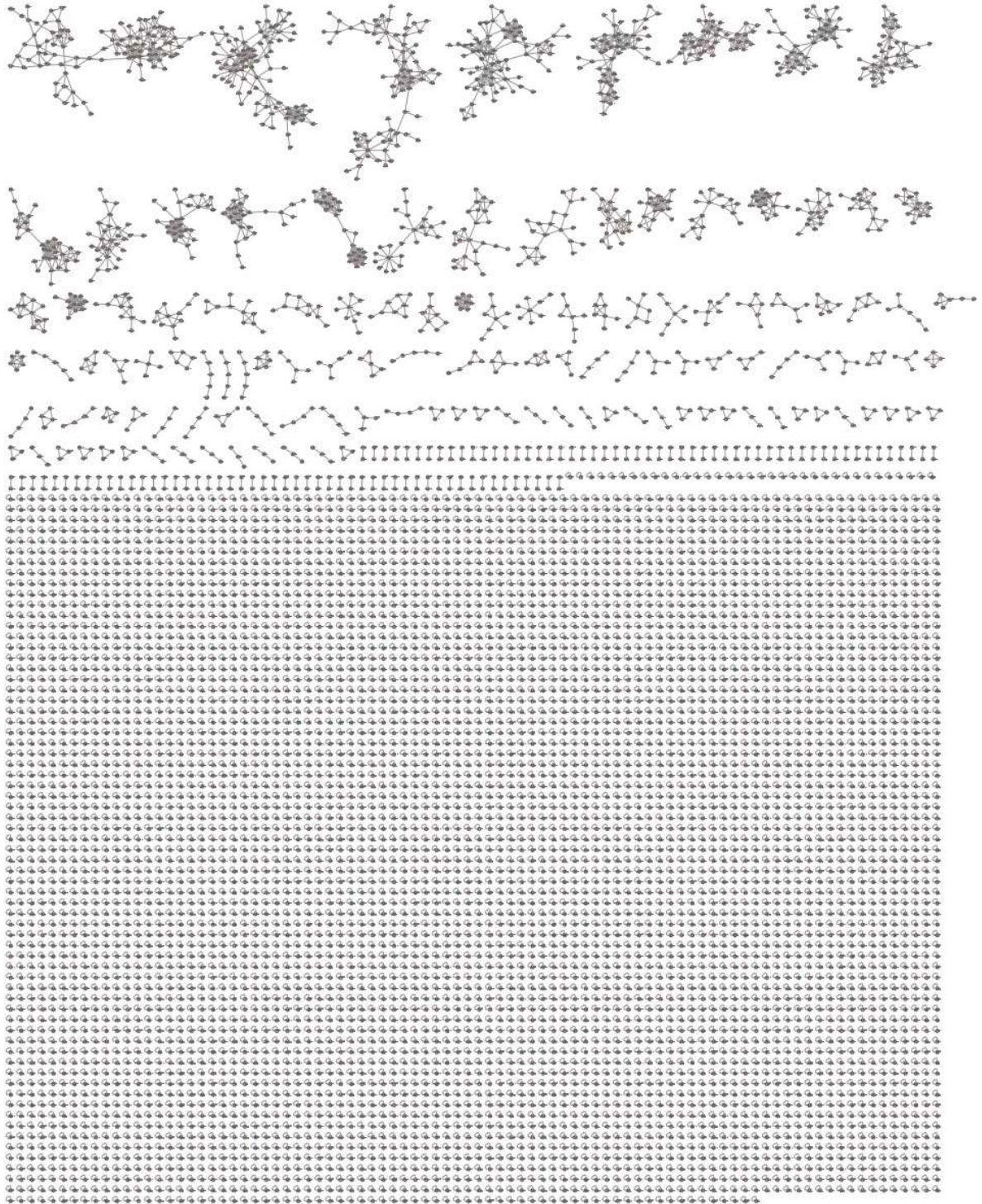
espectros brutos, anotações contínuas de dados depositados, espectros de referência, agrupamento e organização de conjuntos de dados por meio da criação de redes moleculares (*Molecular Networking*) (WANG *et al.*, 2016).

Numa abordagem geral, dentro das redes moleculares cada nodo representa uma molécula, que por sua vez, ao aglomerarem formam os *clusters* (aglomerados de moléculas correlacionadas estruturalmente). Os *clusters* são formados de acordo com a similaridade dos seus espectros (cosseno) e padrões de fragmentação, constituindo famílias moleculares (CARABALLO-RODRÍGUEZ, *et al.*, 2017).

A aplicação dos dados cromatográficos na obtenção das redes moleculares resultou na formação de 160 agrupamentos moleculares no modo de ionização negativo (Figura 26) e 72 agrupamentos moleculares no modo de ionização positivo (Figura 27). A análise manual dos *clusters*, através dos perfis dos espectros (nível 2) resultou na anotação de 21 compostos, os quais estão descritos na Tabela 10 (Figura 28). Os metabólitos são pertencentes, majoritariamente, às classes dos flavonoides, fenilpropanoides e terpenoides. Na análise da rede molecular, os compostos que apresentaram erro superior a 5 ppm e espectros de massa não correspondentes foram descartados.

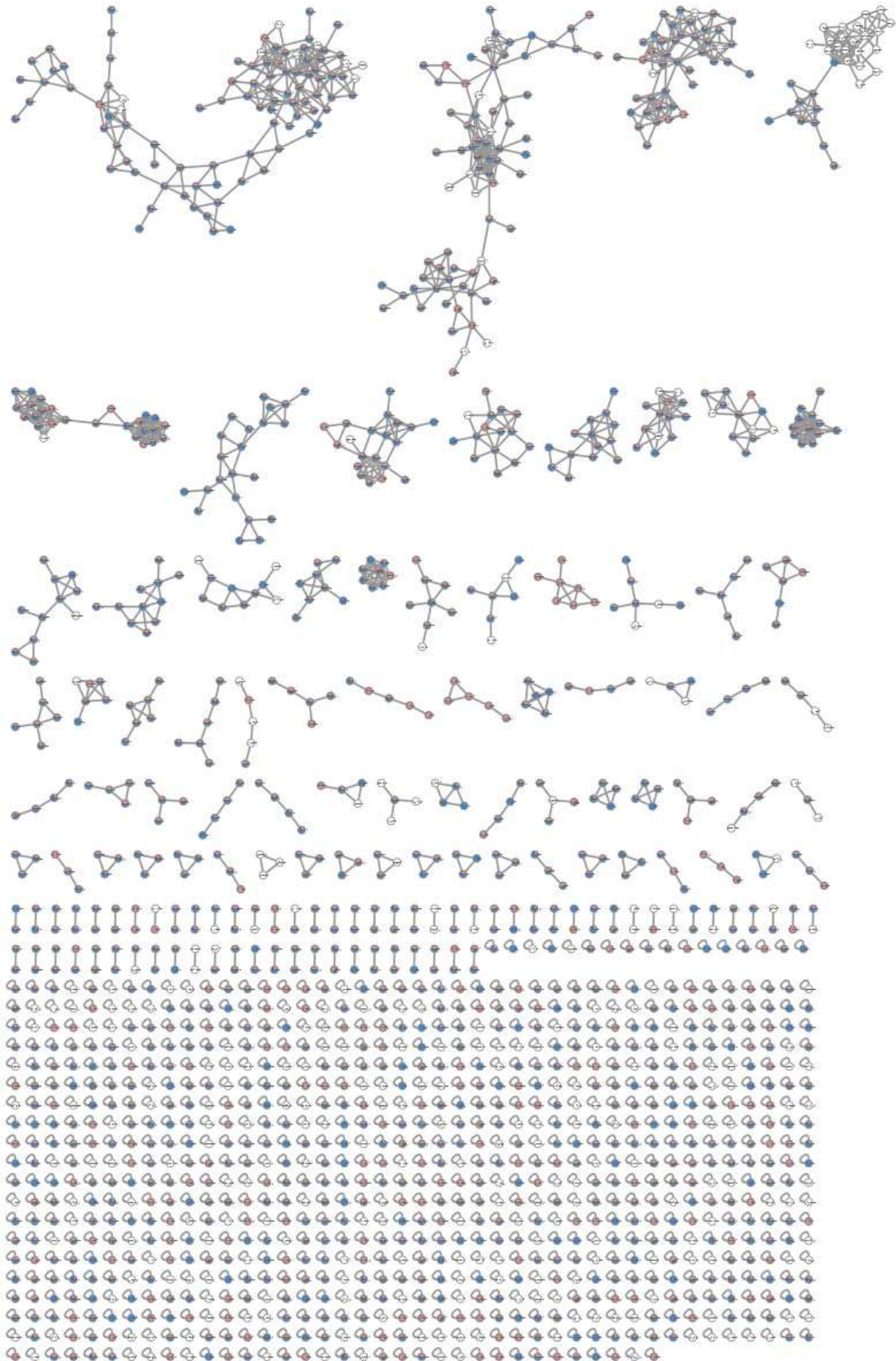
Inicialmente, analisou-se as redes moleculares e compostos anotados provenientes da ionização no modo negativo. Dentre as duas substâncias anotadas a partir da ionização no modo positivo, todas já haviam sido encontradas no modo de ionização negativo.

Figura 26 - Rede molecular com os dados de CLUE-IES-QqTOF-EM/EM para os extratos de tomatesiros no modo negativo através do *classical molecular networking*.



Fonte: Elaborada pelo autor na plataforma *GNPS*.

Figura 27 - Rede molecular com os dados de CLUE-IES-QqTOF-EM/EM para os extratos de tomatesiros no modo positivo através do *classical molecular networking*.



Fonte: Elaborada pelo autor na plataforma *GNPS*.

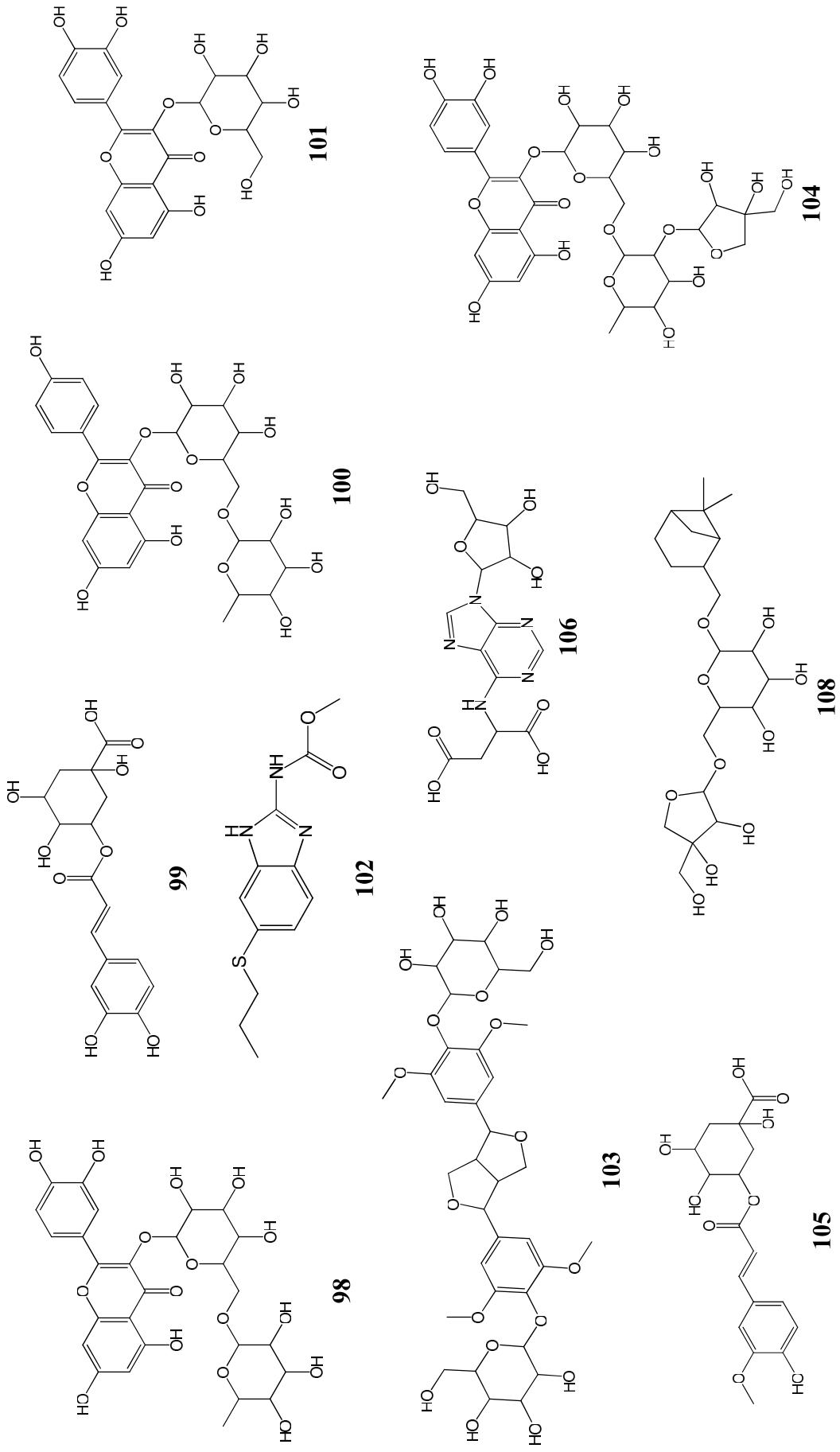
Tabela 8 - Metabólitos anotados nas redes de interações moleculares para os extratos de tomates de TD e TN.

Nº	Nome	FM	Classe	cos	Erro (ppm)	Modo Ionização	m/z obs	m/z bib	Amostras
98	quercetina-3-O-rutinoside	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	flavonoide	0,98	3	[M-H] ⁻	609,15	609,15	Todas
99	ácido clorogénico	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	fenilpropanoide	0,94	2	[M-H] ⁻	353,09	353,09	Todas
100	kaemferol-3-O- hexosídeo	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	flavonoide	0,97	3	[M-H] ⁻	593,15	593,15	Todas
101	quercetina-3-O-hexosídeo	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	flavonoide	0,96	2	[M-H] ⁻	463,09	463,09	Todas
102	albendazol	C ₁₂ H ₁₅ N ₃ O ₂ S	-	0,93	0	[M-H] ⁻ [M+H] ⁺	266,10	266,10	Todas
103	eleuterosídeo E	C ₃₄ H ₄₆ O ₁₈	lignana	0,90	0	[M-H] ⁻	787,27	787,27	Todas
104	3,4-dihidroxi-4-(hidroximetil)oxolan-2-il]oxi-4,5-dihidroxi-6-metioxan-2-il]oximethyl]-3,4,5-trihidroxioxan-2-il]oxi-2-(3,4-dihidroxifenil)-5,7-dihidroxicromen-4-ona	C ₃₂ H ₃₈ O ₂₀	flavonoide	0,89	0	[M-H] ⁻	741,19	741,19	Todas
105	ácido 3-O-Feruloiquinico	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	fenilpropanoide	0,88	5	[M-H] ⁻	367,11	367,10	Todas
106	succinoadenosina	C ₁₄ H ₁₇ N ₅ O ₈	-	0,84	2	[M-H] ⁻	384,12	384,12	Todas
107	nicotiflorina	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	flavonoide	0,84	1	[M-H] ⁻ [M+H] ⁺	593,15	593,15	EH-TN
108	(6,6-dimetilbicyclo[3.1.1]hept-2-il)metil-3,4-dihidroxi-4-(hidroximetil)tetrahydro-2-furanil]-hexopiranosídeo	C ₂₁ H ₃₆ O ₁₀	terpenoide	0,84	2	[M-H] ⁻	493,23	493,23	Todas
109	2,3,6,19-tetrahidroxi-28-oxoolean-12-en-28-il]-hexapiranosídeo	C ₃₆ H ₅₈ O ₁₁	terpenoide	0,82	4	[M-H] ⁻	711,40	711,40	EE-TD
110	1-O-[(2 α ,3 β ,5 α ,9 α ,18 α)-2,3,19-trihidroxi-28-oxours-12-en-28-il]- β -D-hexopiranosídeo	C ₃₆ H ₅₈ O ₁₀	terpenoide	0,82	5	[M-H] ⁻	695,40	695,40	EE-TD
111	riboflavina	C ₁₇ H ₂₀ N ₄ O ₆	alcaloide	0,79	5	[M-H] ⁻	377,15	377,15	EE-TD

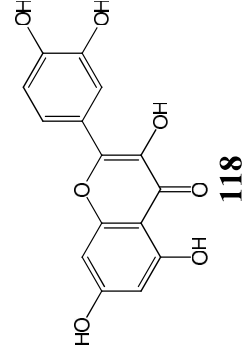
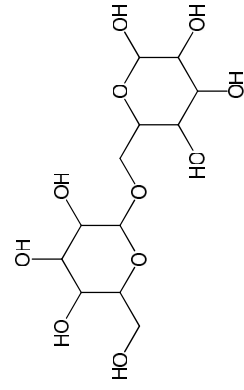
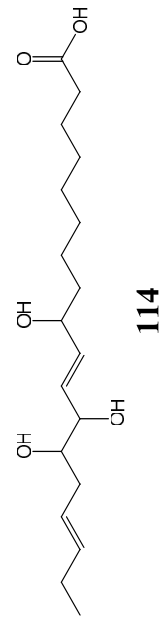
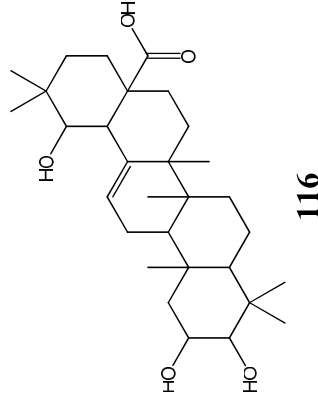
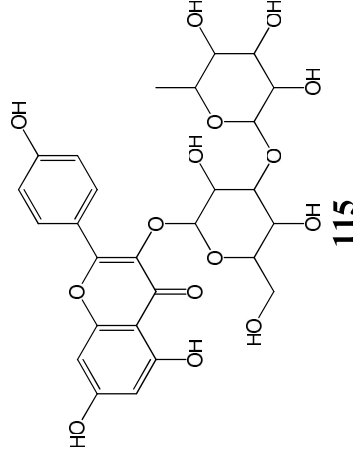
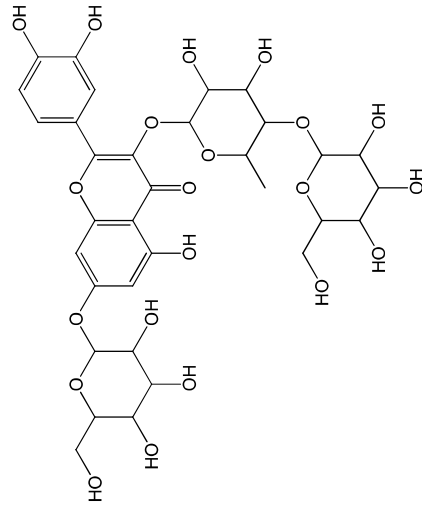
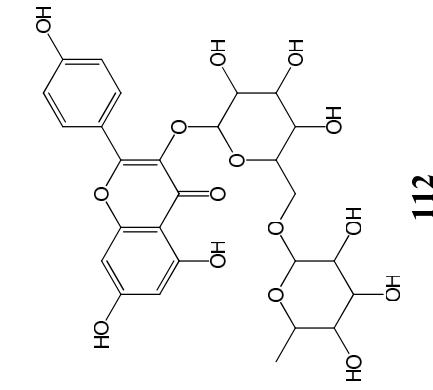
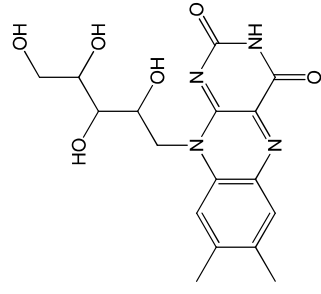
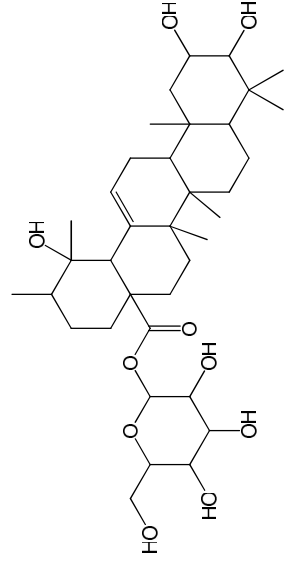
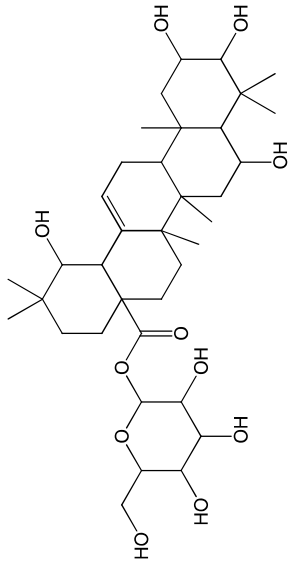
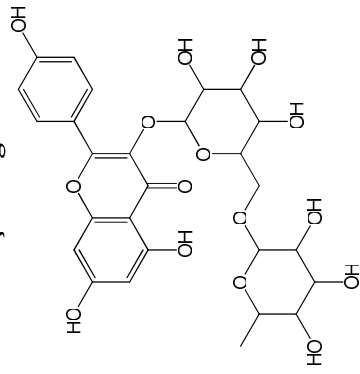
Continuação Tabela 8

112	nicotiflorine	$C_{27}H_{30}O_{15}$	flavonoide	0,79	5	$[M-H]^-$	593,15	593,15	EE-TD
113	3,4-dihidroxi-6-metil-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)oxan-2-il]oxioxan-2-il]oxi-2-(3,4-dihidroxifenil)-5-hidroxi-7-[3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)oxan-2-il]oxicromen-4-ona	$C_{33}H_{40}O_{21}$	flavonoide	0,76	0	$[M-H]^-$	771,20	771,20	Todas
114	ácido 9,12,13-trihidroxiocetadeca-10,15-dienoico	$C_{18}H_{32}O_5$	ácido graxo	0,76	0	$[M-H]^-$	655,44	655,44	EH-TD
115	kaemferol-3-O-dihexanosídeo	$C_{27}H_{30}O_{15}$	flavonoide	0,73	0	$[M-H]^-$	593,15	593,15	EE-TN
116	ácido 2,3,19-trihidroxi-olean-12-en-28-oico	$C_{30}H_{48}O_5$	oleanane triterpenoids	0,83	5	$[M-H]^-$ $[M+H]^+$	471,35	471,35	EE-TD
117	melibiose	$C_{12}H_{22}O_{11}$	dissacarídeo	0,70	3	$[M-H]^-$	387,12	387,12	EE-TD, EE-TN e EH-TN
118	quercetina	$C_{15}H_{10}O_7$	flavonoide	0,92	5	$[M-H]^-$ $[M+H]^+$	301,04	301,04	Todas

Figura 28 - Estruturas químicas dos metabólitos anotados nas redes de interações moleculares para os extratos etanólicos de tomateiros.



Continuação Figura 28

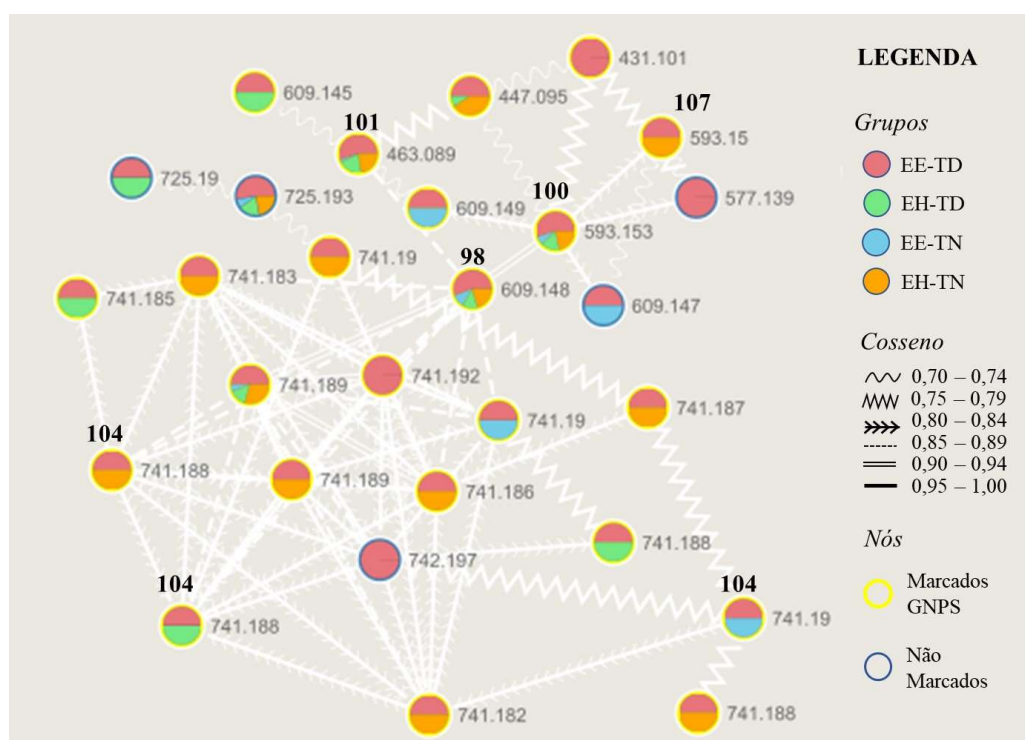


Fonte: Elaborado pelo autor.

Para melhor visualização das redes moleculares, foram atribuídas cores aos nodos, no Cytoscape, para diferenciar a presença dos metabólitos em cada condição de cultivo (estufa-EE e horta - EH) e tipo de tomateiros (Norty - TN e Dylla - TD), sendo: vermelho (EE-TD), verde (EH-TD), azul (EE-TN) e amarelo (EH-TN).

Dentre os *clusters* observados, um mostrou agrupamento de íons correspondentes à flavonoides com e sem unidades glicosídicas (Figura 29), incluindo as estruturas dos compostos **98**, **100**, **101**, **104** e **107**. Como pode ser observado, o composto kaemferol-3-*O*-rutinosídeo (**100**) se difere de quercetina-3-*O*-rutinosídeo (**98**), pela ausência de uma hidroxila na posição 5' do anel B dos flavonoides. Essa diferença pode ser visualizada nos nodos, sendo os íons precursores iguais a m/z 609,148 e m/z 593,153 [M – OH]. Desta forma, nota-se um cosseno próximo de 1,0 para os nodos citados na rede molecular. A mesma análise pode ser evidenciada ao comparar **98** com quercetina-3-*O*-glucosídeo (**101**), se diferindo por uma unidade glicosídica de massa menor igual a 146 ua. A confirmação das estruturas foi realizada pela anotação na plataforma GNPS pela comparação dos dados dos íons produtos obtidos com dados na literatura. Na Figura 30 é mostrado o EM/EM da substância quercetina-3-*O*-glucosídeo (**101**) e a proposta de fragmentação (Figura 31).

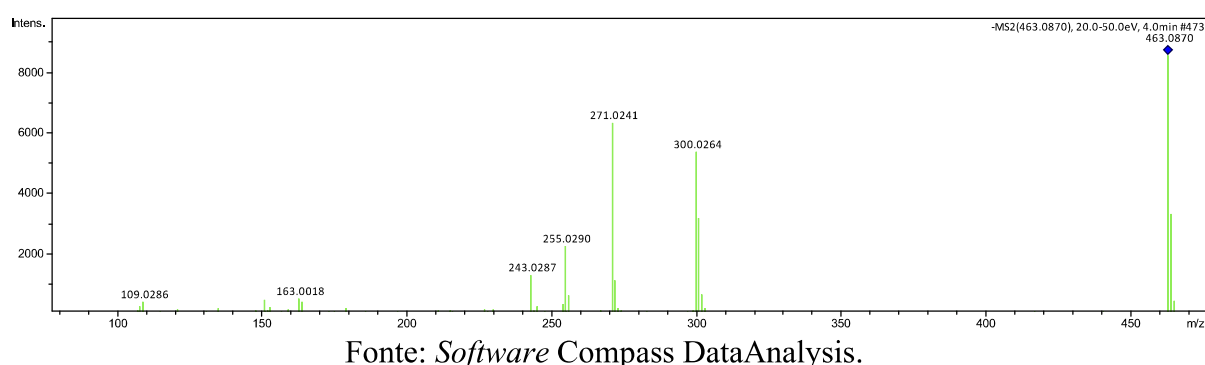
Figura 29 - Família de íons de fenilpropanoides anotados pela plataforma GNPS em rede molecular (modo negativo) para as variedades de tomateiros Dylla e Norty.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A fragmentação inicial de flavonoides glicosilados é demonstrada pela perda da unidade glicosídica a partir de uma fragmentação na ligação O-C (carbono anomérico). Para a molécula de quercetina-3-*O*-glucosídeo, confirma-se a perda de uma hexose (162 ua) e formação da aglicona quercetina (m/z 301). Os mecanismos de retro Diels-Alder (RDA) também desempenham papel importante nas fragmentações de flavonoides. A fragmentação no anel C pode ocorrer em todas as subclasses de flavonoides, e o mecanismo RDA pode variar de acordo com a subclasse estrutural (DEMARQUE, *et al.*, 2015; DUEÑAS, *et al.*, 2013). A partir dos íons m/z 301,0316, o mecanismo de RDA leva a formação do íon m/z 151,0033, com a carga localizada no anel A. O fragmento observado com m/z 271,0241 refere-se à quebra do anel pirano e liberação de CO (CAMPIDELI, 2017).

Figura 30 - Espectro de EM/EM representativo do íon precursor de m/z 463,0870 referente ao metabólito quercetina-3-*O*-glucosídeo (**101**).

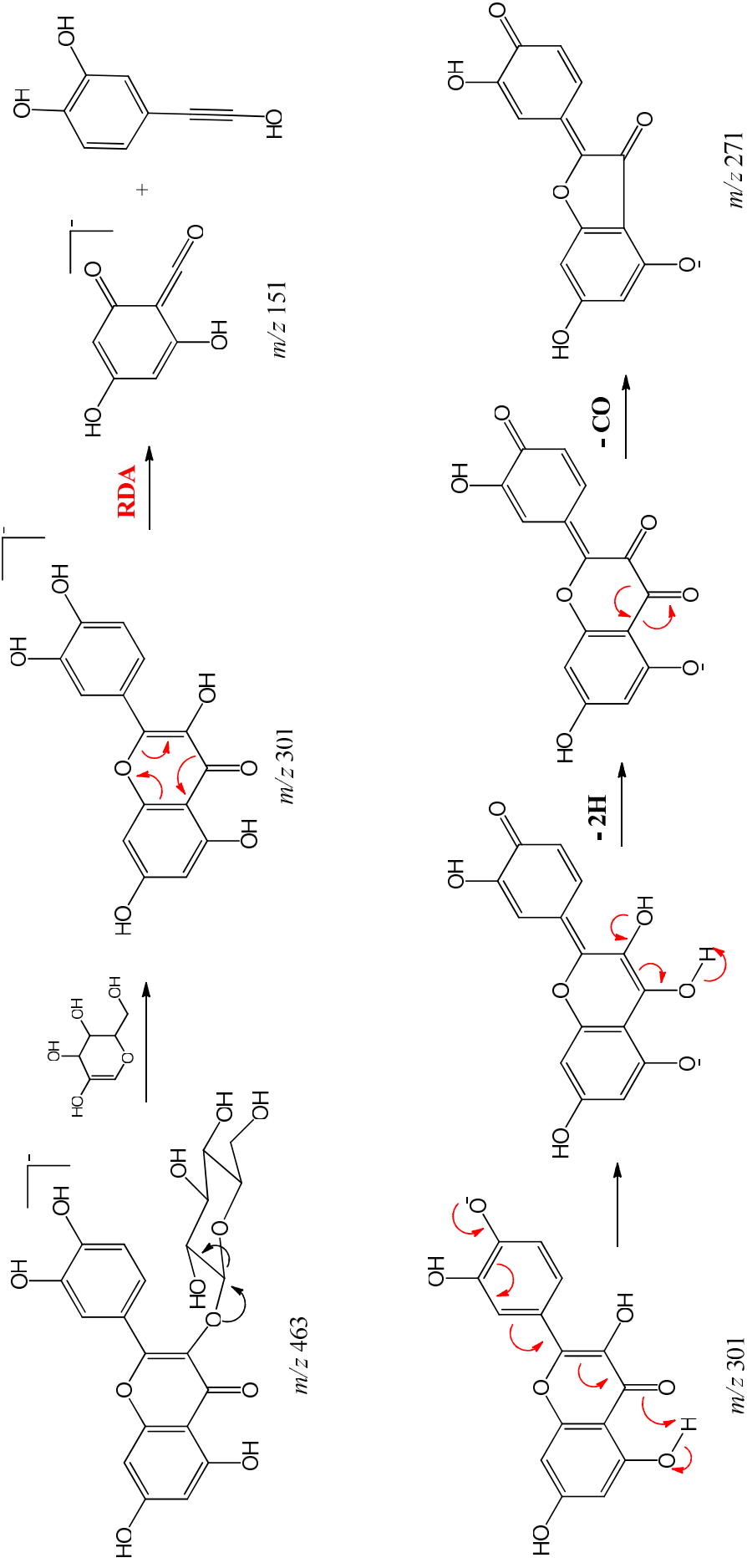


A qualidade dos espectros obtidos pela análise EM/EM é de fundamental importância para formação das redes moleculares. Durante a aquisição dos dados espectrais, podem ocorrer a geração de espectros com diferentes qualidades, desde o início ao fim da aquisição, obtendo-se assim, espectros de qualidade inferior (OLIVA, *et al.*, 2017). Em muitas das redes obtidas pela análise no *GNPS*, tanto para modo positivo quanto negativo, foi possível observar o agrupamento de espectros relativos à mesma substância em diferentes nós (Figura 29). Entretanto, essa observação não interferiu na qualidade e interpretação das redes geradas.

Os flavonoides apresentam papel importante na defesa das plantas contra patógenos, herbívoros e estresse ambiental (TREUTTER, 2005). O alto nível de flavonoides produzidos por tomateiros confere resistência à infestação por adultos de *B. tabaci* e reduz a disseminação de TYLCV (*Tomato yellow leaf curl virus*), doença que enraquele e amarela as folhas da planta (YAO, *et al.*, 2019). Estudos metabolômicos de tomates infectados por fungos

mostraram maiores concentrações de flavonoides, como rutina e quercetina-3-galactosídeo (GARCIA, *et al.*, 2018).

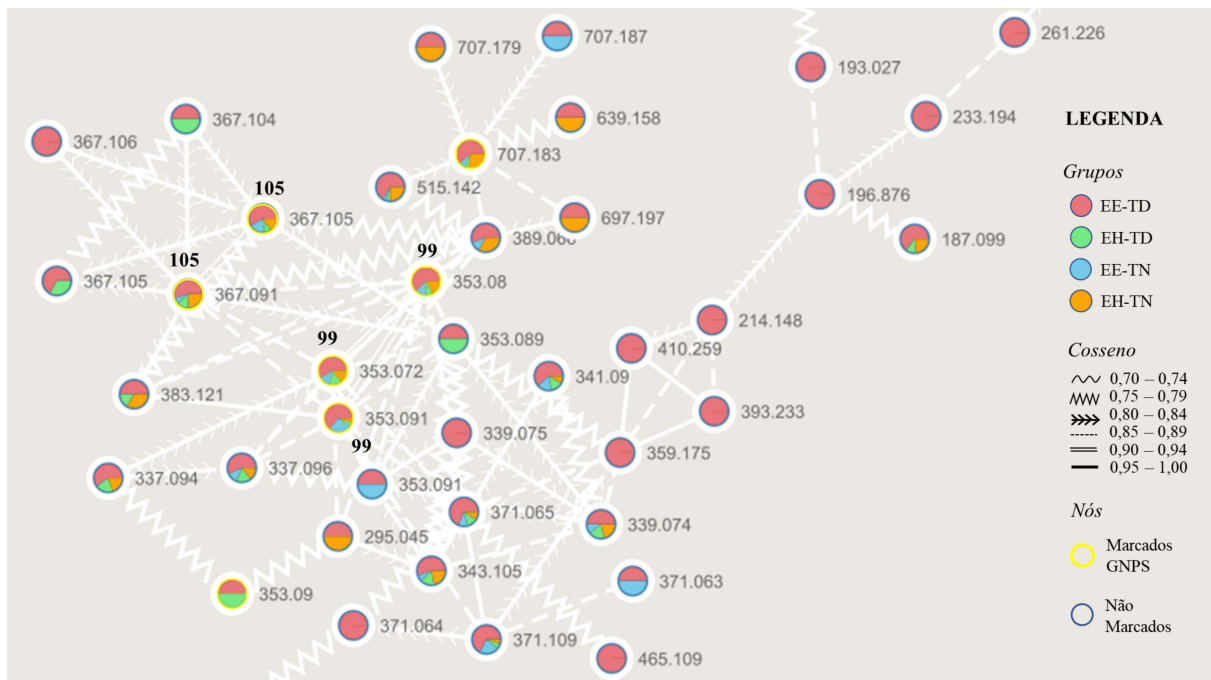
Figura 31 - Proposta de fragmentação para a molécula de quercetina-3-O-glucosídeo ($[M-H]^-$).



Fonte: Elaborado pelo autor.

Os compostos químicos da classe dos fenilpropanoides compreendem uma importante classe de metabólitos secundários de plantas. O metabolismo dessa classe de compostos é ativado sob condições de estresse, como fermentos, ataques de patógenos ou radiação UV (OLIVA, *et al.*, 2020). Concentrações expressivas de fenilpropanoides foram encontradas em folhas de tomateiros, associando-os ao papel defensivo da planta. A maior concentração em folhas de plantas “jovens” reflete a necessidade desses tecidos em aumentarem o seu potencial de defesa (LÓPEZ-GRESA, *et al.*, 2012). O *cluster* representado na Figura 32 ilustra o agrupamento de íons fenilpropanoides anotados na rede molecular via ionização no modo negativo. Como pode ser observado, os compostos anotados nesse *cluster* foram **99** e **105**.

Figura 32 - Família molecular de íons de fenilpropanoides anotados na rede molecular (modo negativo) para os tomateiros.

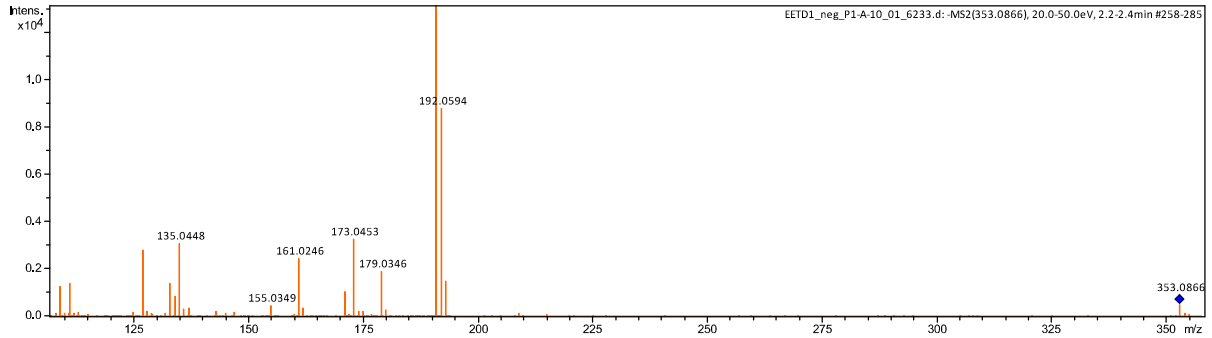


Fonte: Elaborado pelo autor.

Na Figura 33 é apresentado o espectro de massas do ácido clorogênico (**99**), composto da classe dos fenilpropanoides anotado para os tomateiros. A fragmentação (Figura 34) do ácido clorogênico correlaciona-se com o espectro de massas obtido experimentalmente. O pico com m/z 353,0866 ($[M-H]^-$), após clivagem da ligação éster entre o ácido quínico e ácido cafeico, produz o íon m/z 191,0561 $[M-H-162]^-$. A fragmentação da unidade do ácido cafeico e quínico produzem o íon cafeoil (m/z 179,0346) e o íon quinato com m/z 173,0453, que após

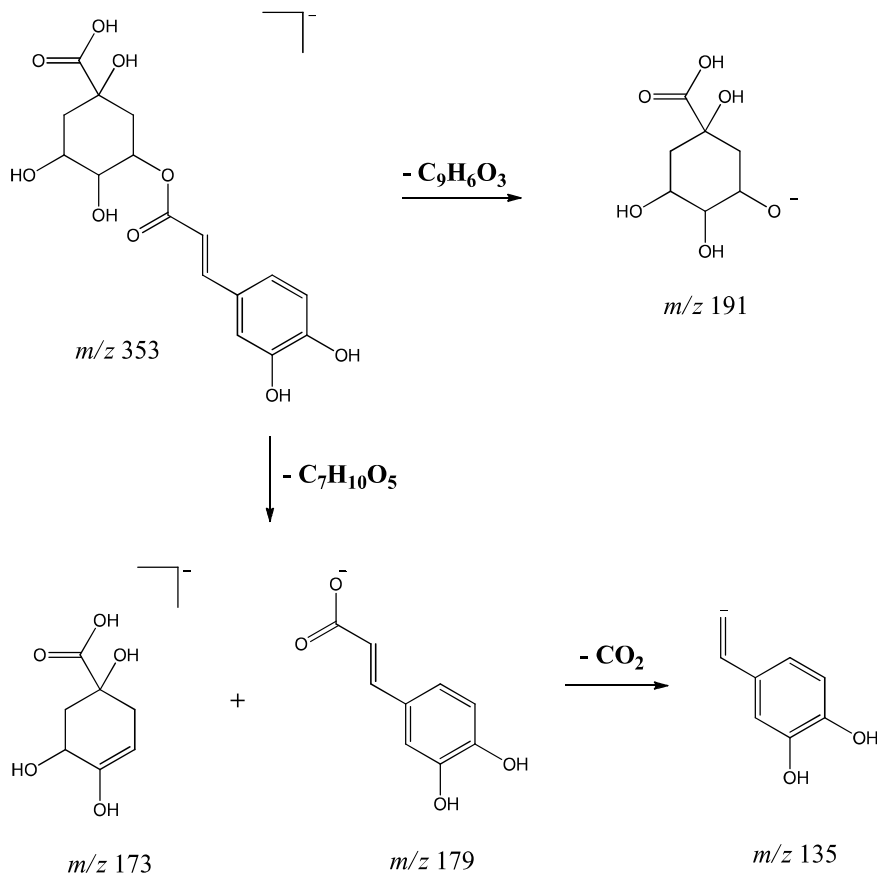
perder uma unidade de dióxido de carbono produz o íon m/z 135,0448 (WILLEMS *et al.*, 2016).

Figura 33 - Espectro de EM/EM representativo do ácido clorogênico (**99**).



Fonte: *Software* Compass DataAnalysis.

Figura 34 - Proposta de fragmentação para a molécula de ácido clorogênico ($[M-H]^-$).

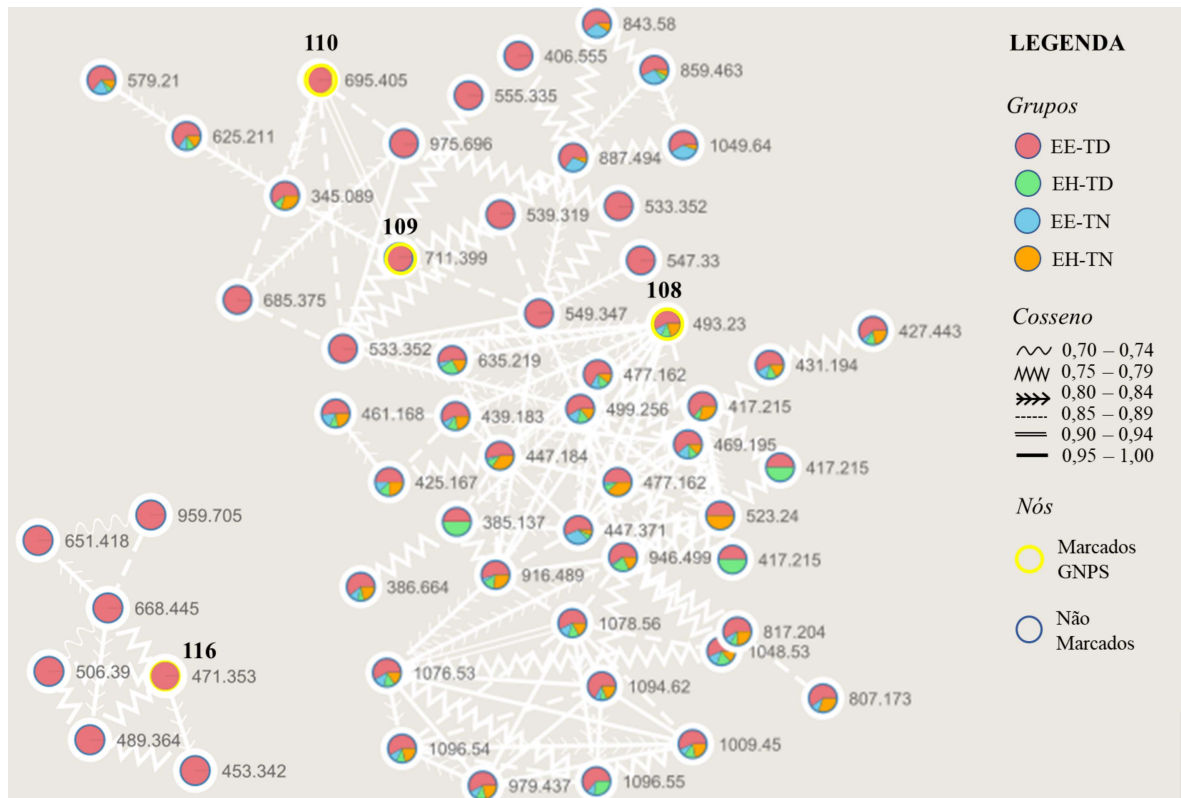


Fonte: WILLEMS, 2016 (Adaptada).

Alguns triterpenoides da classe ursano e oleano foram anotados em um único cluster no modo negativo (Figura 35). Na rede molecular foram encontrados os compostos **108**, **109**, **110** e **116**, sendo que os três últimos estavam presentes somente na variedade TD

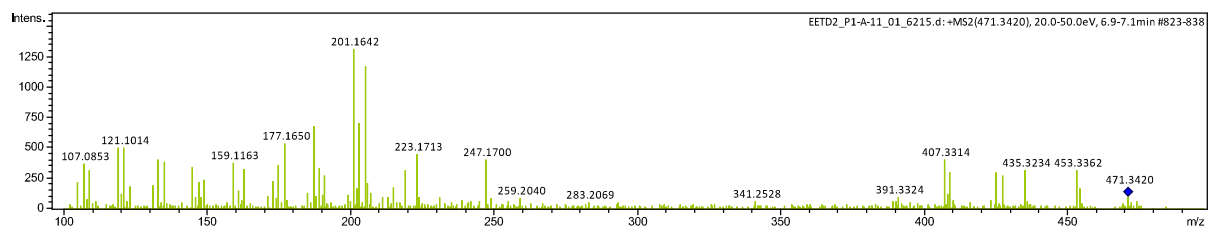
cultivada na estufa. Quando comparadas as estruturas de **109** e **110**, observa-se que a única diferença entre os dois compostos é a presença de uma hidroxila na posição 6 do triterpeno, sendo observada a diferença de 16 ua entre os dois nodos. As estruturas podem ser confirmadas a partir da análise do espectro representativo de EM/EM em comparação com dados da literatura e biblioteca da plataforma *GNPS*. Na Figura 36 é mostrado o EM/EM da substância ácido ($2\alpha,3\beta,5\alpha,9\alpha,19\alpha$)-2,3,19-triidroxi-olean-12-en-28-oico (**116**) e a proposta de fragmentação (Figura 37).

Figura 35 - Famílias moleculares de íons de triterpenos anotados na rede molecular dos tomateiros.



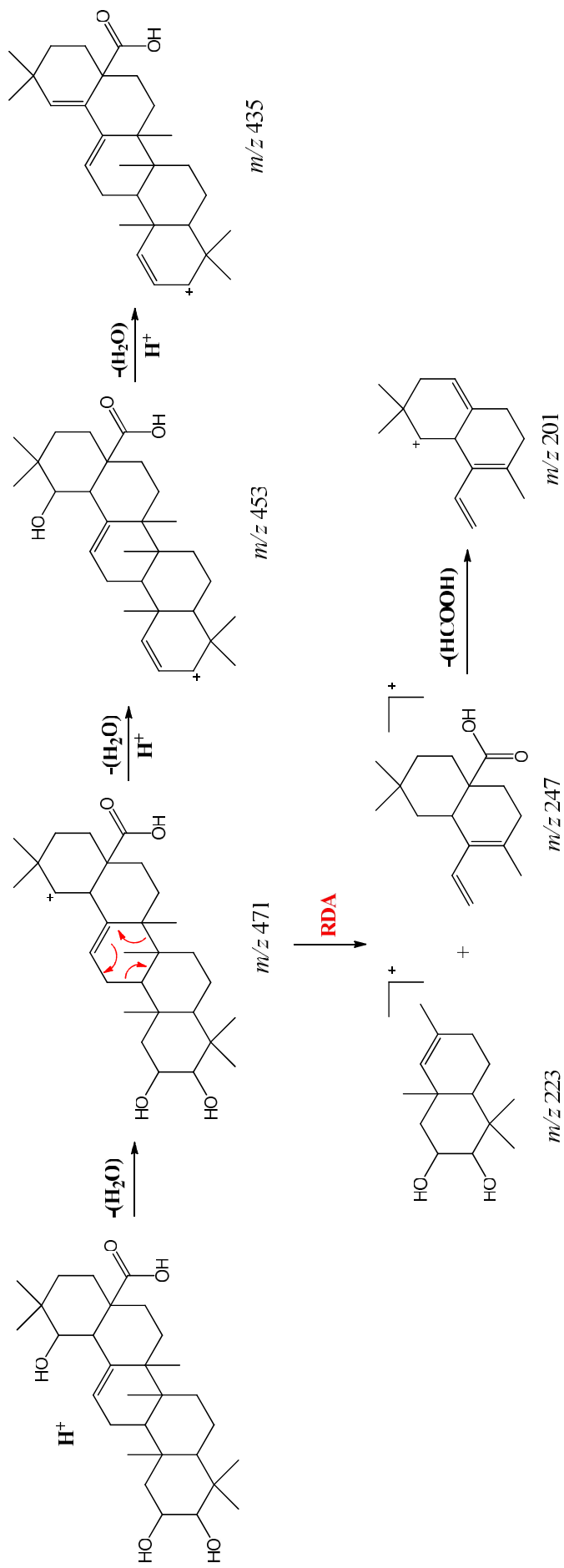
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 36 - Espectro de EM/EM representativo do íon precursor de m/z 471,3420 referente ao composto **116**.



Fonte: *Software* Compass DataAnalysis.

Figura 37 - Proposta de fragmentação para o composto 116 ($[M+H]^+$).



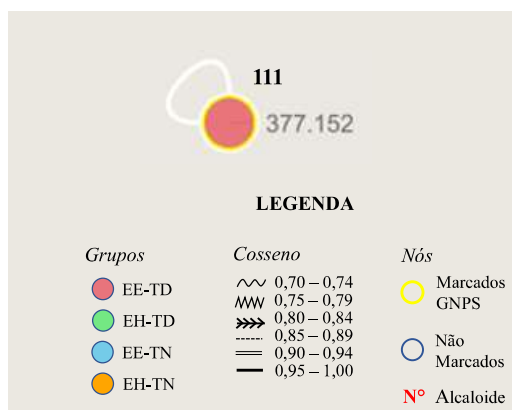
Fonte: Elaborado pelo autor.

A proposta de fragmentação do ácido ($2\alpha,3\beta,5\alpha,9\alpha,19\alpha$)-2,3,19-triidroxi-olean-12-en-28-oico (**116**) corrobora com o espectro de massas obtido no modo positivo. O composto apresenta massa molecular aproximada de 488 g/mol. No entanto, ao sofrer ionização em modo positivo, os grupos hidroxila da molécula podem sofrer desidratação e perder facilmente uma molécula de água, gerando no espectro EM/EM o íon precursor com m/z 471,3420 ($[M+H-H_2O]^+$). A partir desse íon, sucessivas desidratações ($[M+H-H_2O]^+$) produzem os íons com m/z 453,3362 e m/z 435,3234. Pelo mecanismo de retro Diels-Alder (RDA), fragmentação típica no anel C de olean-12-enos e ursan-12-enos (RADOSEVICH, *et al.*, 1985), o espectro revela a formação dos íons m/z 223,1713 e m/z 247,1700, dependendo da localização da carga no processo de desidratação.

Os triterpenos estão associados às funções fisiológicas nas plantas e fazem parte dos sistemas de defesa, aumentando a resistência contra a invasão de patógenos, defesa contra o estresse e produção de mecanismos de reparo para feridas e lesões (DOMINGO, *et al.*, 2009). Testes com o ácido ursólico, aplicado de forma exógena, mostraram aumento na indução de mecanismos de resposta à resistência em grãos de sorgo, associando ao aumento na produção de ácido salicílico. Desta forma, por apresentar baixa toxicidade e efeitos antifúngicos contra patógenos, o estudo mostrou o grande potencial do triterpeno para aplicação como fungicida pós-colheita (SHAIK, *et al.*, 2016).

Um metabólito secundário da classe dos alcaloides (Figura 38) foi anotado na rede molecular obtidas pela ionização em modo negativo, sendo denominado de riboflavina (**111**). O nodo não foi agrupado com nenhum dos outros nós, formando um nodo isolado. O composto foi encontrado apenas no extrato etanólico da estufa para a variedade resistente (EE-TD).

Figura 38 - Nodo do alcaloide **111** anotado na rede molecular (modo negativo) para TD.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Os alcaloides são metabólitos já conhecidos por atuarem na proteção de plantas contra insetos, fungos, bactérias e vírus (FUKUHARA, *et al.*, 2004; FRIEDMAN, 2002). A riboflavina (vitamina B2) pode atuar como um ativador da resistência das plantas contra o estresse de patógenos (AZAMI-SARDOOEI, *et al.*, 2010; DONG E BEER, 2000).

4.4 Análise dos compostos orgânicos não-voláteis por RMN de ¹H

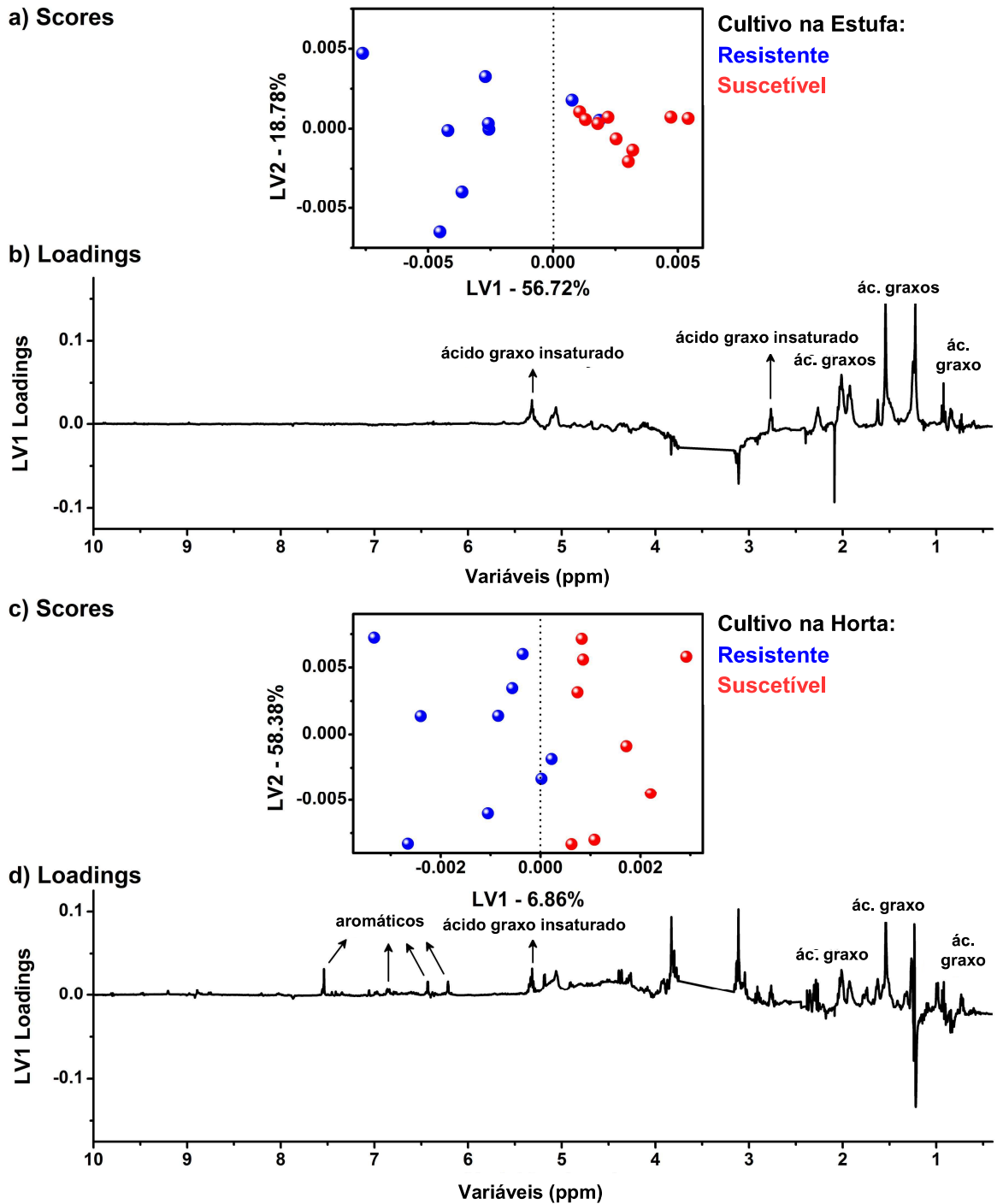
4.4.1 Variabilidade de compostos orgânicos não-voláteis por RMN de ¹H

Os extratos etanólicos das variedades TN e TD, pertencentes à espécie *Solanum lycopersicum*, foram obtidos a partir das folhas dos vegetais cultivados na horta (em condições de herbivoria) e estufa (controle). Com o objetivo de melhorar a identificação da variabilidade química das amostras. Ainda na forma bruta, os extratos foram submetidos à análise de RMN de ¹H e seus espectros (Figura 39) apresentaram bastante similaridade, embora os sinais sejam bastante heterogêneos. Em função da complexidade química dos extratos e das similaridades espectrais, realizou-se as análises estatísticas multivariadas que se fizeram necessárias para melhor compreensão dos resultados. Para isso, foi desenvolvida a análise de *OPLS-DA*, que consiste na ortogonalização da modelagem para melhoraria na identificação de alterações químicas, removendo a variância sistemática não relacionada de acordo com as classes de amostras (TRYGG E WOLD, 2002; DA SILVA, *et al.*, 2021).

Nas Figuras 40a e 40b são ilustrados os gráficos de *scores* e *loadings*, respectivamente, para a análise dos extratos etanólicos de folhas de tomates resistentes (azul) e suscetíveis (vermelho) à mosca-branca cultivada na estufa (ambiente controlado, sem mosca-branca); e nas Figuras 40c e 40d são apresentados os gráficos de *scores* e *loadings*, respectivamente, para os extratos das folhas de tomates resistentes (azul) e suscetíveis (vermelho) à mosca-branca cultivada na horta (com influência da mosca-branca).

De acordo com os dados de *scores* e *loadings*, LV1 foi a principal variável latente de discriminação das amostras. A variedade TN, cultivada na estufa apresentou maior variação de sinais referentes aos ácidos graxos insaturados, quando comparada à TD (Figura 40a e 40b). Na análise dos dados obtidos a partir dos extratos das folhas com as duas variedades cultivadas na horta, observa-se a presença de sinais na região dos aromáticos (Figura 40c e 40d) para a variedade não resistente (TN). É possível observar que os sinais dos espectros têm maior variabilidade quando comparadas as amostras de variedades cultivadas na estufa (controle) com aquelas que tiveram expostas à mosca-branca (horta).

Figura 40 - a) Gráfico de *scores* das variáveis latentes LV1 × LV2 obtida pela avaliação das folhas de tomates resistentes (azul) e suscetíveis (vermelho) à mosca-branca cultivada na estufa, b) com os *loadings* de LV1 plotados em linhas. c) Gráfico de *scores* das variáveis latentes LV1 × LV2 a partir da avaliação das folhas de tomates resistentes (azul) e suscetíveis (vermelho) à mosca-branca cultivada na horta, com os *loadings* LV1 plotados em linhas (d).



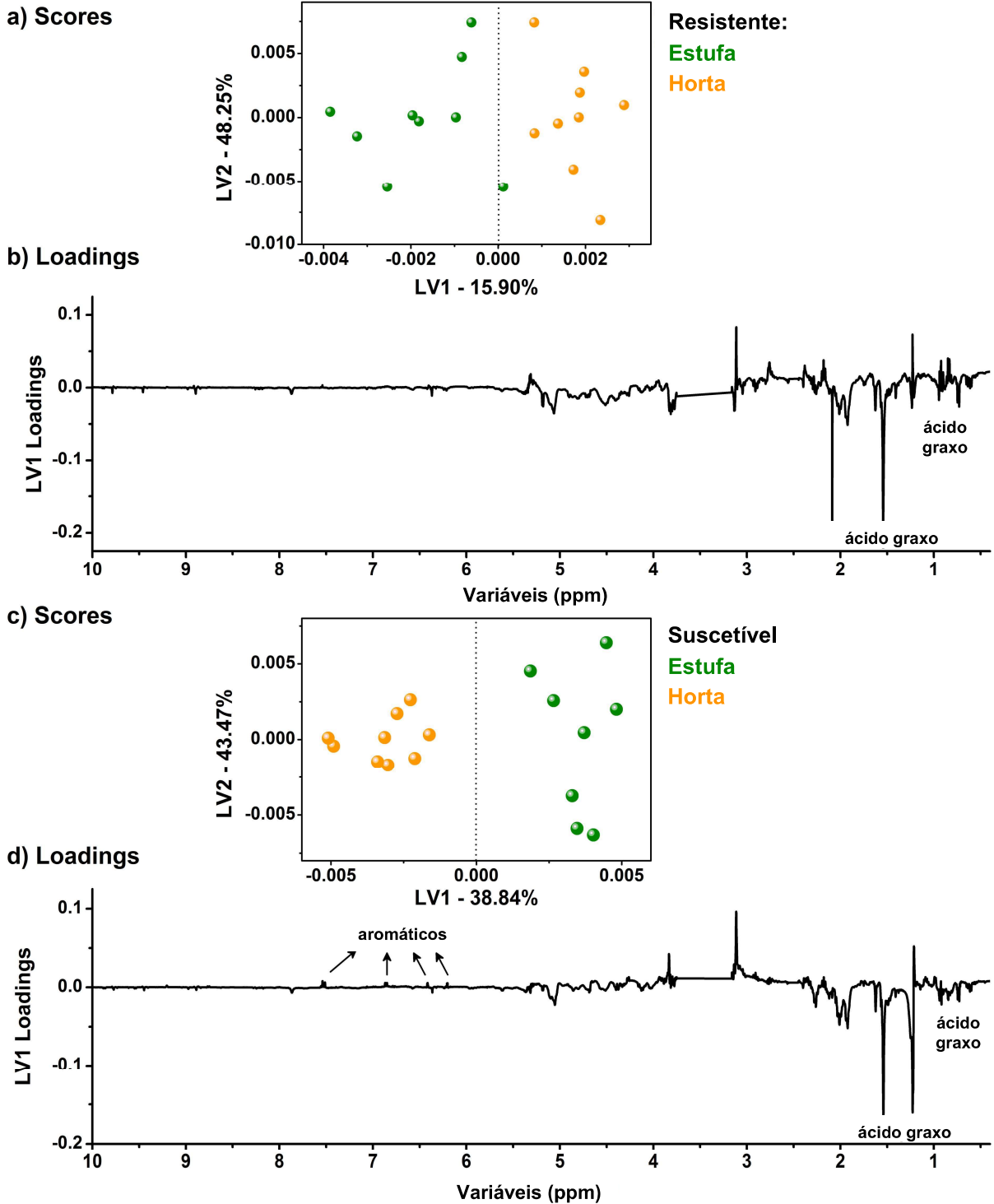
Fonte: Elaborado pelo autor.

Depois de compreendida a variabilidade dos sinais de RMN de ^1H para os extratos de tomateiros resistentes e suscetíveis à *B. tabacci*, bem como a influência do vetor transmissor de geminivírus, novas avaliações de *OPLS-DA* foram desenvolvidas para compreender essa variação. Nas figuras 41a e 41b são apresentados os gráficos de *scores* e *loadings*, respectivamente, para tomateiros resistentes à mosca-branca cultivadas na estufa (verde) e horta (laranja); e nas Figuras 41c e 41d são ilustrados os gráficos de *scores* e *loadings*, respectivamente, para tomateiros suscetíveis cultivados na estufa (verde) e horta (laranja).

A partir da análise detalhada, observou-se que a variedade resistente produziu maior quantidade de compostos graxos ao ser cultivada na estufa, quando comparado com o cultivo na horta. Tais os dados sugerem que os tomateiros, por apresentarem resistência à praga em estudo, não produziram grandes quantidades dos metabólitos graxos. Esses compostos são produzidos a partir da cascata octadecanoide quando as plantas são expostas em condições de estresse (PICHERSKY, *et al.*, 2006).

Os dados apresentados nas Figuras 41c e 41d representam a variabilidade de compostos produzidos pela variedade não resistente, os quais evidenciam a presença de compostos aromáticos nas amostras de tomateiros cultivados na estufa em quantidades superiores aos cultivados na horta. Nota-se também, que os tomateiros não resistentes cultivados na horta produziram maiores quantidades de compostos graxos, sugerindo uma possível via metabólica de defesa ao sofrerem herbivoria pela mosca-branca.

Figura 41 - a) Sistema *scores* de coordenadas de LV1 × LV2 a partir da avaliação das folhas de tomates resistentes a mosca-branca cultivadas na horta (verde) e estufa (laranja), b) com os *loadings* de LV1 plotados em linhas. c) Sistema *scores* de coordenadas de LV1 × LV2 de tomates suscetíveis a mosca-branca cultivada em estufa (verde) e horta (laranja), d) com os *loadings* PC1 plotados em linhas.






Fonte: Elaborado pelo autor.

4.4.2 Análise dos espectros de RMN de ^1H

A análise visual dos dados de RMN de ^1H obtidos a partir dos extratos etanólicos das folhas dos tomateiros Dylla (TD) e Norty (TN), nas duas condições de análise (cultivados na horta e estufa) mostram deslocamentos químicos característicos de regiões conhecidas no espectro como alifática (0 a 1,5 ppm), acíclica (2,0 a 2,5 ppm), metoxílica (3,5 a 3,8 ppm), olefínica (4,5 a 7,0 ppm), aromática (6,8 a 8,0 ppm) e carbonílica (9,0 a 12,0 ppm). Conforme observado na Figura 39 e em conjunto com os dados de CG-EM (Figura 22, Tabela 7), nota-se majoritariamente sinais característicos de compostos orgânicos pertencentes à classe dos ésteres graxos saturados e insaturados. Entretanto, é possível observar alguns sinais na região dos compostos aromáticos, condizentes com os dados obtidos na análise de CLUE-EM/EM (Figura 28, Tabela 8).

Baseado na comparação dos dados experimentais confrontados com os da literatura (HEYDARI, 2020; IBRAHIM, *et al.*, 2018; OLIVEIRA, 2018; SIMÕES, 2007; ARIGONI, *et al.*, 1999), os sinais dos ésteres e álcoois graxos podem ser reconhecidos. Em δ 0,85 foi observado a presença de sinais referentes aos grupos metilas das extensas cadeias dos ésteres e álcoois. Como o éster linolenato possui uma metila próxima a uma ligação dupla, esta encontra-se mais desblindada que as demais, apresentando sinal em δ 0,93. O sinal em δ 1,23 foi atribuído aos grupos metilênicos, com exceção dos grupos α e β carbonílicos e α olefínicos dos ésteres graxos. Estes, por último descritos, foram atribuídos aos deslocamentos em δ 1,55 (β carbonílicos), δ 2,02 (α olefínicos) e δ 2,24 (α carbonílicos). Os hidrogênios α de ésteres são mais desblindados que os alifáticos, devido ao efeito gerado pelo campo anisotrópico do grupo carbonila. Os hidrogênios α hidroxila foram atribuídos aos sinais em δ 3,40, com maior deslocamento químico devido ao efeito de desblindagem provocado pela eletronegatividade do oxigênio, que está ligado no mesmo carbono (PAVIA, 2015). Os hidrogênios dos grupos metilênicos localizados entre as olefinas (linoleatos e linolenatos), foram atribuídos aos sinais em δ 2,77. Os hidrogênios ligados a carbonos hibridizados em sp^2 dos grupos olefinas de ésteres insaturados estão localizados próximo de δ 5,32. Alguns dos compostos associados às diferenças entre os cultivares de tomates, conforme observado na análise de CG-EM, estão descritos na Tabela 9 e foram caracterizados através dos deslocamentos químicos de RMN de ^1H em comparação com os dados da literatura.

Tabela 9 - Dados de RMN de ^1H obtidos para os compostos palmitato de etila (90), *trans*-9-hexadecenol (91) e linolenato de etila (96).

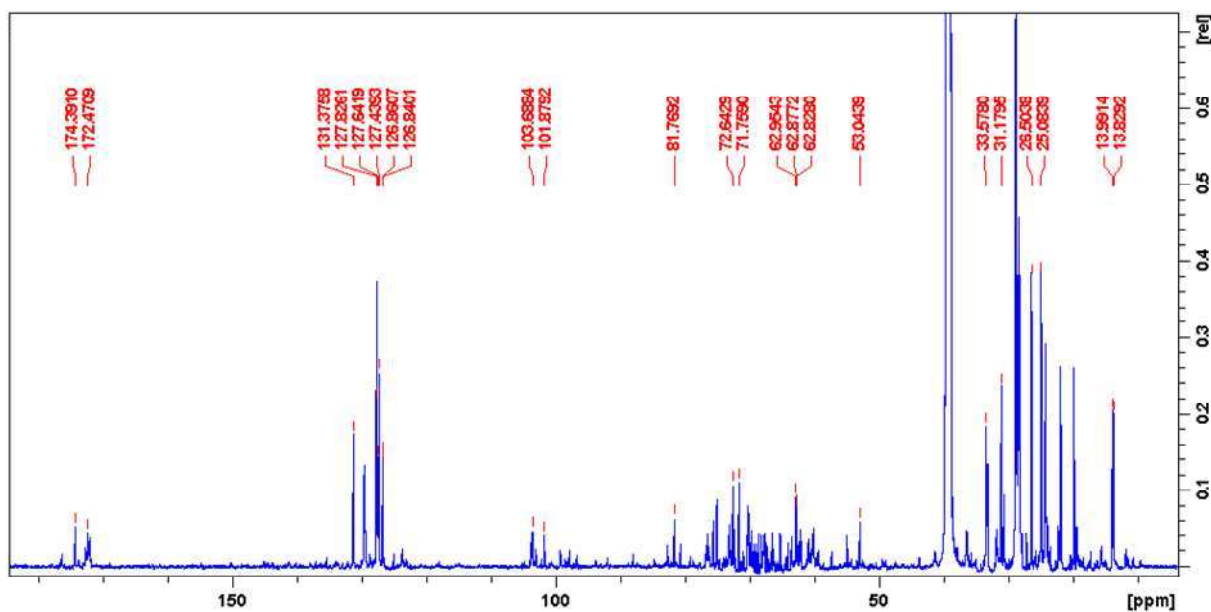
 <i>trans</i> -9-hexadecenol (91)		 palmitato de etila (90)		 linolenato de etila (96)	
N	δ_{H} (ppm) (600 MHz, DMSO)	δ_{H} (ppm) (400 MHz, CDCl ₃)	δ_{H} (ppm) (600 MHz, DMSO)	δ_{H} (ppm) (300 MHz, CDCl ₃)	δ_{H} (ppm) (600 MHz, DMSO)
1	3,7 (m)	3,7 (t, J = 6,7 Hz, 2H)			
2			2,26 (m)	2,37 - 2,22 (t, 2H)	2,26 (tl)
3	1,4 - 1,8 (m)	1,5 - 1,6 (m, 2H)	1,4 - 1,8 (m)	1,91 - 1,39 (m, 2H)	1,62 (m)
4					1,30 (m)
5				1,36 - 1,20 (m, 27H)	
6					
7					
8		2,0 - 2,1 (m, 4H)			
9	5,31 (t, J = 13,4 Hz)	5,37 (t, J = 5,6 Hz, 2H)			5,32 (m)
10	5,31 (t, J = 13,4 Hz)	5,37 (t, J = 5,6 Hz, 2H)			5,32 (m)
11		2,0 - 2,1 (m, 4H)			2,76 (tl)
12					5,32 (m)
13		1,3 - 1,4 (m, 18H)			5,32 (m)
14					2,76 (tl)
15					5,32 (m)
16	0,85 (t, J = 6,2 Hz)	0,9 (t, J = 6,7 Hz, 3H)	0,93 (dt)	0,95 - 0,83 (t, 3H)	5,32 (m)
17	-	-			0,93 (t)
18	-	-			4,08 (m)
1'	-	-	4,1 (m)	4,24 - 4,04 (q, 2H)	1,22 (dl)
2'	-	-			1,30 (m)

Fonte: Elaborado pelo autor.

Pela análise estatística multivariada foi possível verificar que a variedade resistente (TD), quando infestada pela mosca-branca, produziu quantidade significativa de fitol (**94**). Estudos evidenciaram que espécies de plantas supridas com fitol exógeno aumentaram a produção de tocoferóis e ésteres de fitol, compostos igualmente induzidos sob condições de estresses (ISCHEBECK, *et al.*, 2006). Para confirmar a presença e caracterização do composto **94**, realizou-se experimentos de ^{13}C , *HSQC* e *HMBC* para as amostras de extratos das folhas de tomates Dylla (TD) e Norty (TN), nas condições de herbivoria pela mosca-branca na horta (EH) e estufa (EE).

Ao analisar o espectro de RMN de ^{13}C (Figura 42, Tabela 10), obtido a partir da amostra EH-TD, verificou-se em δ 59,38 um deslocamento característico de grupamento álcool (C-OH), além dos sinais em δ 123,22 e 141,42 referentes aos deslocamentos de carbonos hidrizados sp^2 . Na região de δ 13,8 – 53,04 é possível observar sinais com deslocamentos de carbonos metílicos, metínicos e metilênicos.

Figura 42 - Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 150 MHz) para a amostra EH-TD.

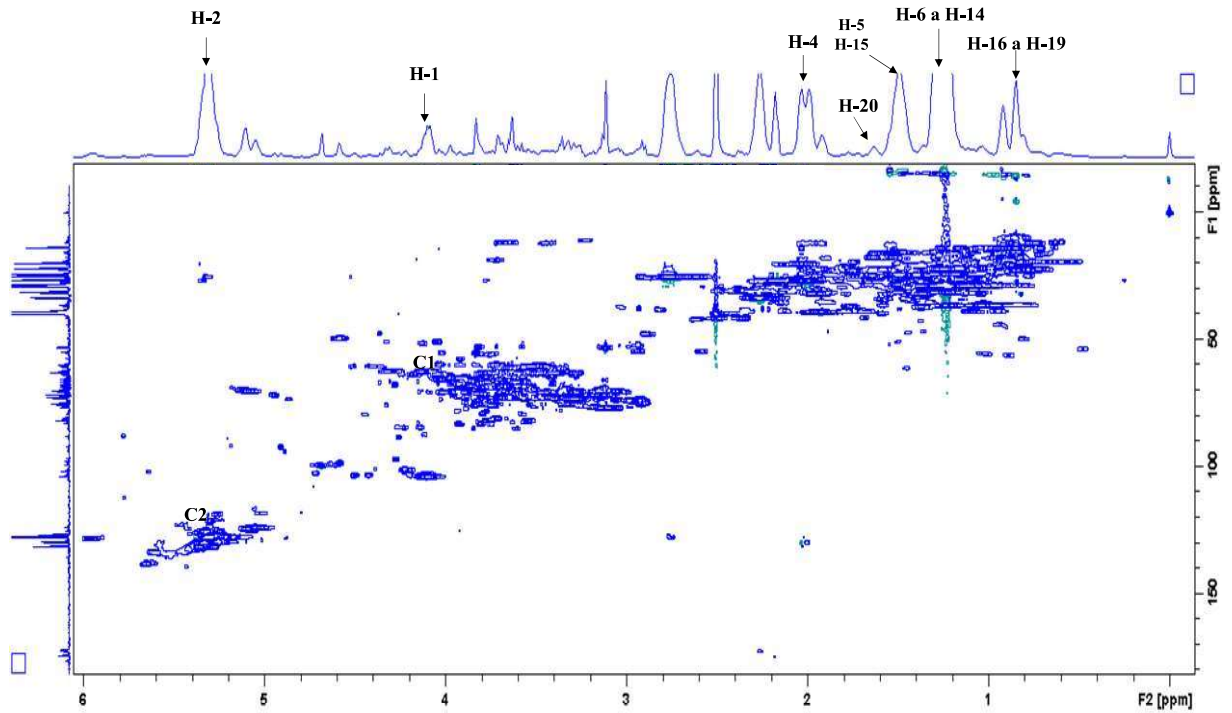


Fonte: Elaborado pelo autor.

Pelo mapa de contorno de *HSQC* (Tabela 10; Figuras 43 e 44) foi possível correlacionar hidrogênios e carbonos diretamente ligados ($^1J_{\text{CH}}$). Desta forma, foi observada a correlação dos H-1 com o carbono em δ 62,2 atribuindo este sinal ao C-1. Um sinal referente à C_{sp^2} em δ 125,3 foi atribuído ao C-2. O sinal em δ 140,0 referente ao C-3, não foi observado por ser carbono quaternário e não possuir hidrogênio diretamente ligado. Também foi possível verificar que os sinais referentes aos hidrogênios das metilas (H-16 a H-20) fazem correlação

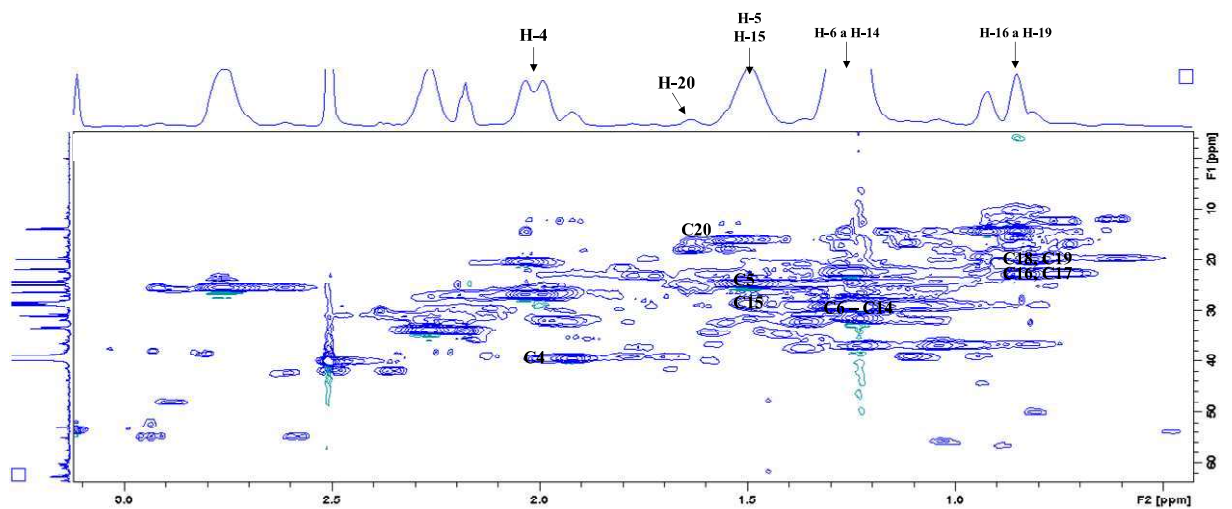
direta com os carbonos em δ 22,9 (16-CH₃ e 17-CH₃) e δ 20,1 (18-CH₃ e 19-CH₃) e δ 17,3 (20-CH₃).

Figura 43 - Mapa de contorno *HSQC* para a amostra EH-TD, mostrando as correlações do composto fitol (**94**).



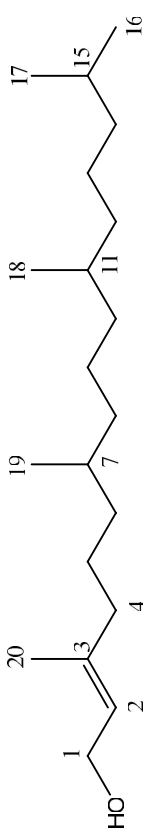
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 44 - Ampliação (0,5 a 3,0 ppm) do mapa de contorno *HSQC* para a amostra EH-TD, mostrando as correlações dos átomos de H e C do composto fitol (**94**).



Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 10 - Dados de RMN de ^1H , ^{13}C , *HSQC*, *HMBC* obtidos para o fitol (94) a partir da amostra EH-TD.



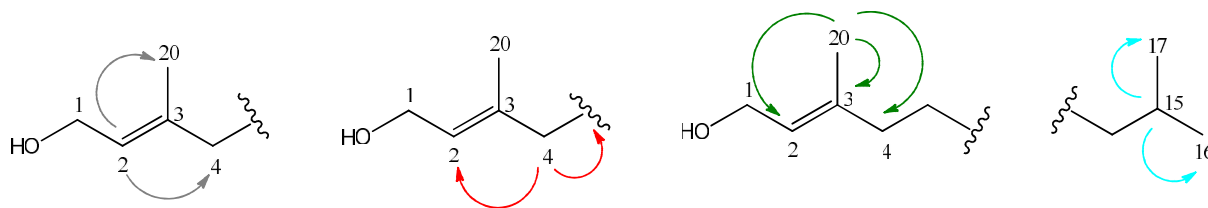
N	δ_{H} (ppm) (600 MHz, DMSO)	δ_{H} (ppm) Ibrahim, 2018 (600 MHz, CDCl ₃)	δ_{H} (ppm) Arigoni, 1999 (400 MHz, CDCl ₃)	δ_{C} (ppm) (150 MHz, DMSO)	δ_{C} (ppm) Ibrahim, 2018 (100 MHz, CDCl ₃)	δ_{C} (ppm) Arigoni, 1999 (100 MHz, CDCl ₃)	Correlações	
							<i>HSQC</i>	<i>HMBC</i>
1	4,13 (m)	4,11 (d, J = 6,88 Hz)	4,14 (d)*	62,2	59,3	59,39	C-1	
2	5,32 (tl)	5,37 (ddd, J = 6,76; 0,92 Hz)	5,39 (t)*	125,3	123,2	123,09	C-2	C-4 e C-20
3				141,4	140,0	140,00		
4	2,01 (m)	1,96 (t, J = 15,16; 7,48 Hz)*	1,97 (m)	39,3	39,3	39,85	C-4	C-5 e C-2
5	1,49 (sl)		1,40 (m)	24,8	25,1	25,12	C-5	C-3, C-4 e C-5
6	1,23 (sl)		1,24 (m); 1,05 (m)	36,4	36,7	36,65	C-6	C-5 e C-7
7	1,23 (sl)		1,36 (m)	31,7	32,7	32,67	C-7	
8	1,23 (sl)		1,23 (m), 1,03 (m)	37,8	37,4	37,35	C-8	
9	1,23 (sl)		1,29, 1,15 (m)	22,9	24,5	24,45	C-9	
10	1,23 (sl)		1,23 (m), 1,03 (m)	37,1	37,4	37,41	C-10	
11	1,23 (sl)		1,35 (m)	31,7	32,8	32,77	C-11	
12	1,23 (sl)		1,23 (m), 1,03 (m)	37,1	37,3	37,28	C-12	
13	1,23 (sl)		1,25 (m)	24,8	24,8	24,79	C-13	
14	1,23 (sl)		1,11, 1,03 (m)	28,4	39,4	39,35	C-14	
15	1,49 (sl)		1,50 (m)	28,4	28,0	27,95	C-15	C-17 e C-16
16	0,85 (sl)		0,84 (d)*	22,9	22,6	22,60	C-16	C-17
17	0,85 (sl)		0,84 (d)*	22,9	22,7	22,69	C-17	C-16
18	0,85 (sl)		0,83 (d)*	20,1	19,7	19,69	C-18	C-11
19	0,85 (sl)		0,82 (d)*	20,1	19,7	19,72	C-19	C-7 e C-8
20	1,63 (s)		1,65 (s)	17,3	16,1	16,14	C-20	C-2, C-3 e C-4

* Dados com inconcistências relatados no artigo.

Fonte: Elaborado pelo autor.

No experimento de *HMBC* (Tabela 10, Figura 45 e 46), em que as correlações H-C podem ser observadas a uma distância maior de ligação (${}^2J_{CH}$, ${}^3J_{CH}$ ou até ${}^4J_{CH}$), o hidrogênio ligado a Csp² δ 5,32 (H-2) mostrou correlação com o sinal da Me-20 (δ 17,3) e com C-4 (δ 39,3). O sinal em δ 1,49 (H-5 e H-15) mostrou correlações para H-5 com δ 141,4 (C-3), δ 39,3 (C-4) e 24,8 (C-5); e, para H-15 com δ 22,9 (C-16 e C-17). Observa-se ainda as correlações das metilas Me-18 e Me-19 com seus respectivos carbonos em δ 31,7 (C-11 e C-7).

Figura 45 - Esquema de algumas correlações observadas no mapa de contorno de *HMBC*.

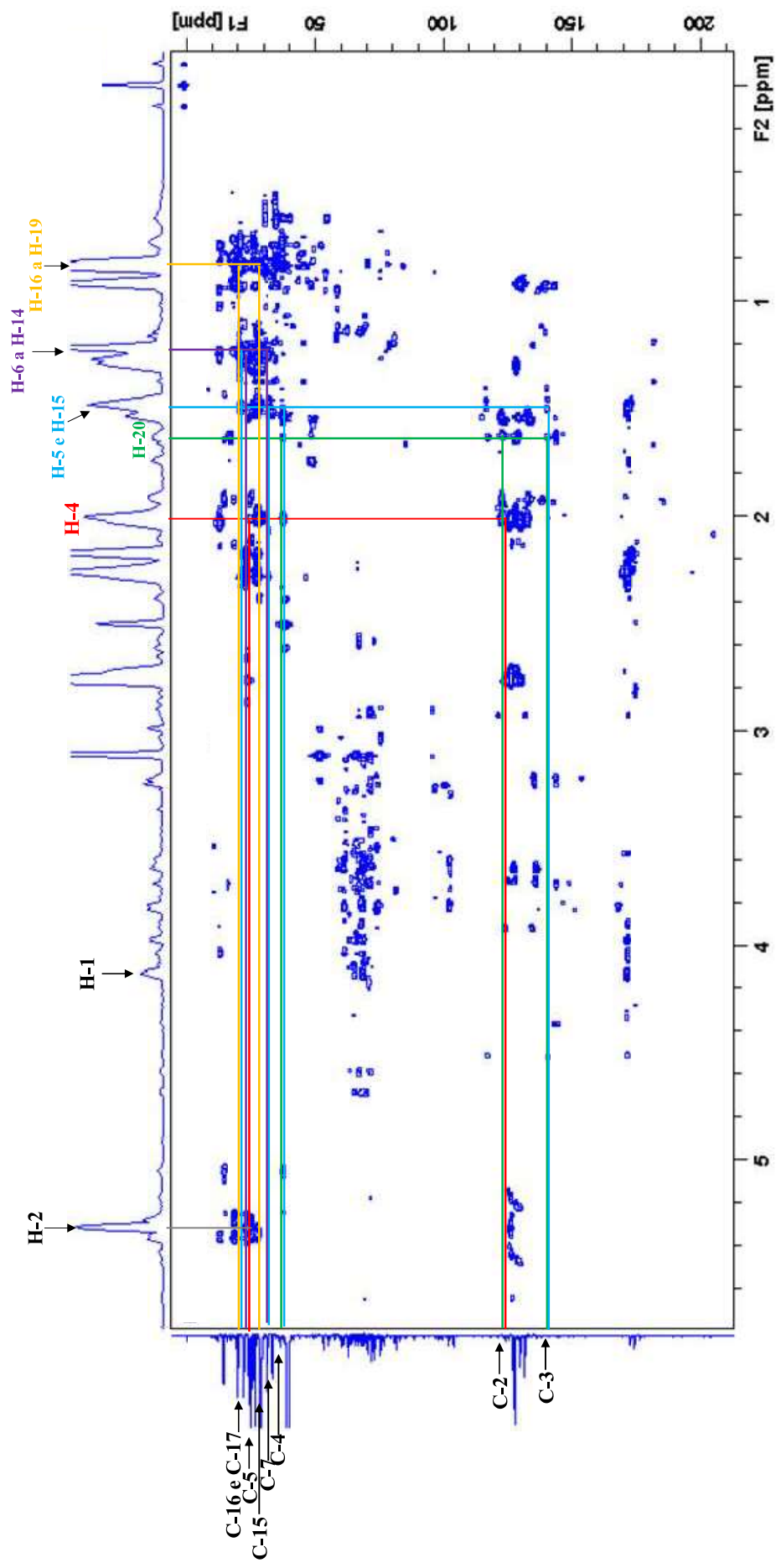


Fonte: Elaborado pelo autor.

Portanto, as análises conjuntas dos espectros de RMN de ${}^1\text{H}$ e ${}^{13}\text{C}$, dos mapas de contorno de *HSQC* e *HMBC*, em comparação com dados da literatura (IBRAHIM, 2018; ARIGONI, 1999), permitiram definir a substância **94** como sendo o fitol.

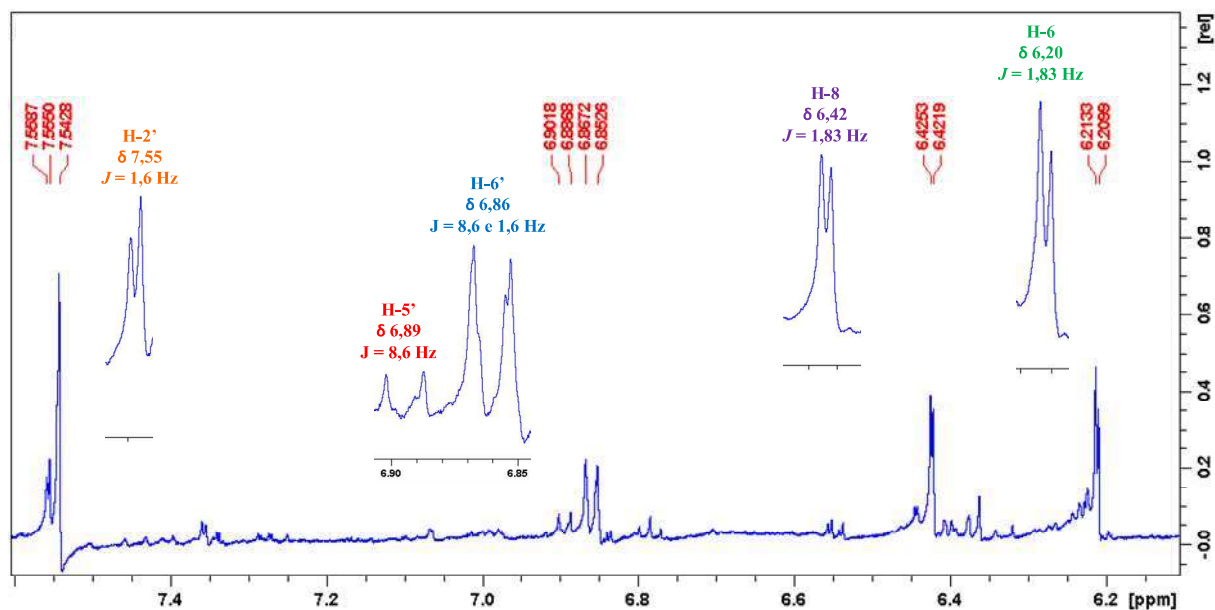
Ao analisar a região mais desblindada do espectro de RMN de ${}^1\text{H}$, foi possível observar sinais característicos de compostos aromáticos, podendo estes serem atribuídos a presença de flavonoides. Na Figura 47 é apresentado o espectro de RMN de ${}^1\text{H}$ da amostra EH-TN, que quando confrontado com os dados da literatura sugere a presença da quercetina (SANTOS, *et al.*, 2017) e seus derivados glicosilados, substâncias estas encontradas em todas as amostras de extratos das folhas de tomates quando também analisadas por CLUE-EM/EM (Tabela 10). Os sinais referentes aos glicosídeos estão localizados na região com deslocamento próximo de 3,5-4,0 ppm (Figura 47), sugerindo também a presença da quercetina-3-*O*-rutinosídeo (**101**), de acordo com os dados de quimiometria (Figuras 41 e 42) e *GNPS*. A Tabela 11 apresenta os dados RMN de ${}^1\text{H}$, ${}^{13}\text{C}$, *HSQC*, *HMBC* obtidos para a quercetina (**118**) na forma aglicona, a partir da amostra EH-TN.

Figura 46 - Mapa de contorno *HMBC* para a amostra EH-TD.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 47 - Espectro de RMN de ^1H (DMSO, 400 MHz) para a amostra EH-TN.



Fonte: Elaborado pelo autor.

O espectro de RMN de ^1H mostra sinais característicos de acoplamento do tipo meta entre os sinais de H-6 e H-8, com deslocamentos em 6,20 ppm (d , $J = 1,8$ Hz) e δ 6,42 (d , $J = 1,8$ Hz), ambos os hidrogênios pertencentes ao anel A dos flavonoides. Também foi observada a presença de três sinais sendo um duplete em δ 7,55 ($J = 1,6$ Hz, H-2'), um duplete em δ 6,89 ($J = 8,6$ Hz, H-5') e um duplo duplete em δ 6,88 ($J = 8,6, 1,6$ Hz, H-6'), atribuídos aos hidrogênios do anel B. As constantes evidenciam acoplamento em *meta* e *orto* (PAVIA, *et al.*, 2015), condizentes com o padrão de substituição do anel B para quercetina.

Por meio do mapa de contorno de *HSQC* (Figura 48) são ilustradas as correlações de hidrogênios e carbonos diretamente ligados ($^1J_{\text{CH}}$). É possível observar as correlações de H-6 e H-8 com seus respectivos carbonos δ 99,1 e δ 93,6. Os hidrogênios do anel B do flavonoide mostram correlações de H-2' com C-2' (δ 115,4), H-5' com C-5' (δ 115,9) e H-6' com C-6' (δ 121,2) (Tabela 11).

Tabela 11 - Dados de RMN de ^1H , ^{13}C , HSQC , HMBC obtidos para a quercetina (**118**) a partir da amostra EH-TN.

N	δ_{H} (ppm) (600 MHz, DMSO)	δ_{C} (ppm) (150 MHz, DMSO)	δ_{H} (ppm) (400 MHz, DMSO)	δ_{C} (ppm) (100 MHz, DMSO)	HSQC	HMBC
2		156,0		156,3		
3		136,0		135,9		
4		176,3		176,1		
5		160,8		160,9		
6	6,20 (<i>d</i> , $J = 1,9$ Hz)	99,1	6,18 (<i>d</i> , $J = 1,9$ Hz)	99,1	C-6	C-5, C-7, C-8 e C-10
7		163,9		164,1		
8	6,42 (<i>d</i> , $J = 1,9$ Hz)	93,6	6,40 (<i>d</i> , $J = 1,9$ Hz)	94,4	C-8	C-2, C-6, C-7 e C-10
9		157,4		157,4		
10		103,3		103,3		
1'		123,0		122,2		
2'	7,55 (<i>d</i> , $J = 1,6$ Hz)	115,4	7,67 (<i>d</i> , $J = 2,1$ Hz)	115,2	C-2'	C-2, C-3', C-4' e C-6'
3'		145,6		145,3		
4'		148,1		147,9		
5'	6,89 (<i>d</i> , $J = 8,6$ Hz)	115,9	6,88 (<i>d</i> , $J = 8,5$ Hz)	116,6	C-5'	C-3', C-4' e C-6'
6'	6,86 (<i>dd</i> , $J = 8,6$ e $1,6$ Hz)	121,2	6,88 (<i>dd</i> , $J = 8,2$ e $2,1$ Hz)	122,4	C-6'	C-3', C-4' e C-6'

Fonte: Elaborado pelo autor.

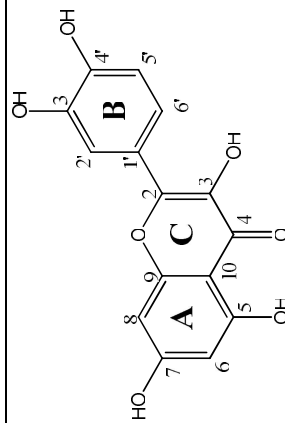
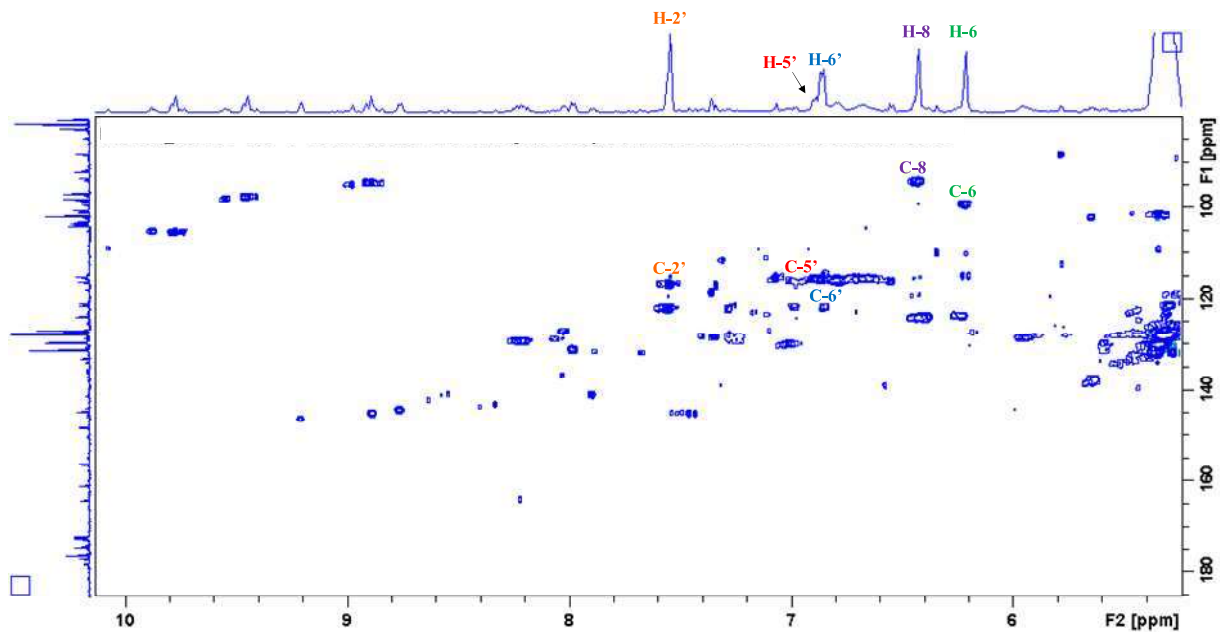


Figura 48 - Mapa de contorno *HSQC* para a amostra EH-TN, mostrando as correlações do flavonoide quercetina (**118**).



Fonte: Elaborado pelo autor.

O mapa de contorno *HMBC* (Figura 50) mostra as correlações dos hidrogênios a múltiplas ligações, sendo possível destacar as principais correlações (Figura 49) para os hidrogênios do anel A (H-6 e H-8, com C-2, C-5, C-6, C-7, C-8 e C-10) e para o anel B (H5' e H-6', com C-3', C-4' e C-6'). Além disso, H-2' correlaciona com três carbonos do anel B (C-3', C-4' e C-6'), e ainda com C-2 do anel C (Tabela 13).

Sendo assim, a associação das análises dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , dos mapas de contorno de *HSQC* e *HMBC*, em comparação com dados da literatura (SANTOS, *et al.*, 2017), permitiram definir a substância **118** como sendo a quercetina.

Figura 49 - Esquema de algumas correlações observadas no mapa de contorno de *HMBC* para o flavonoide quercetina.

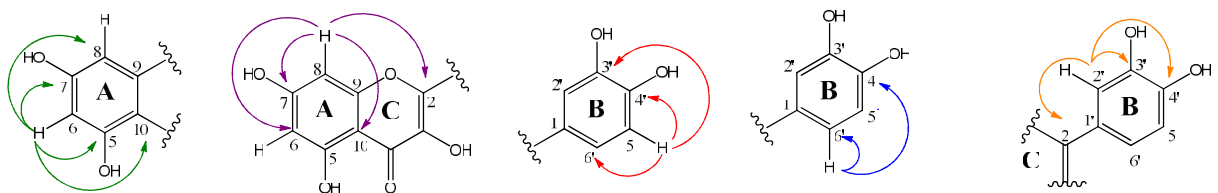
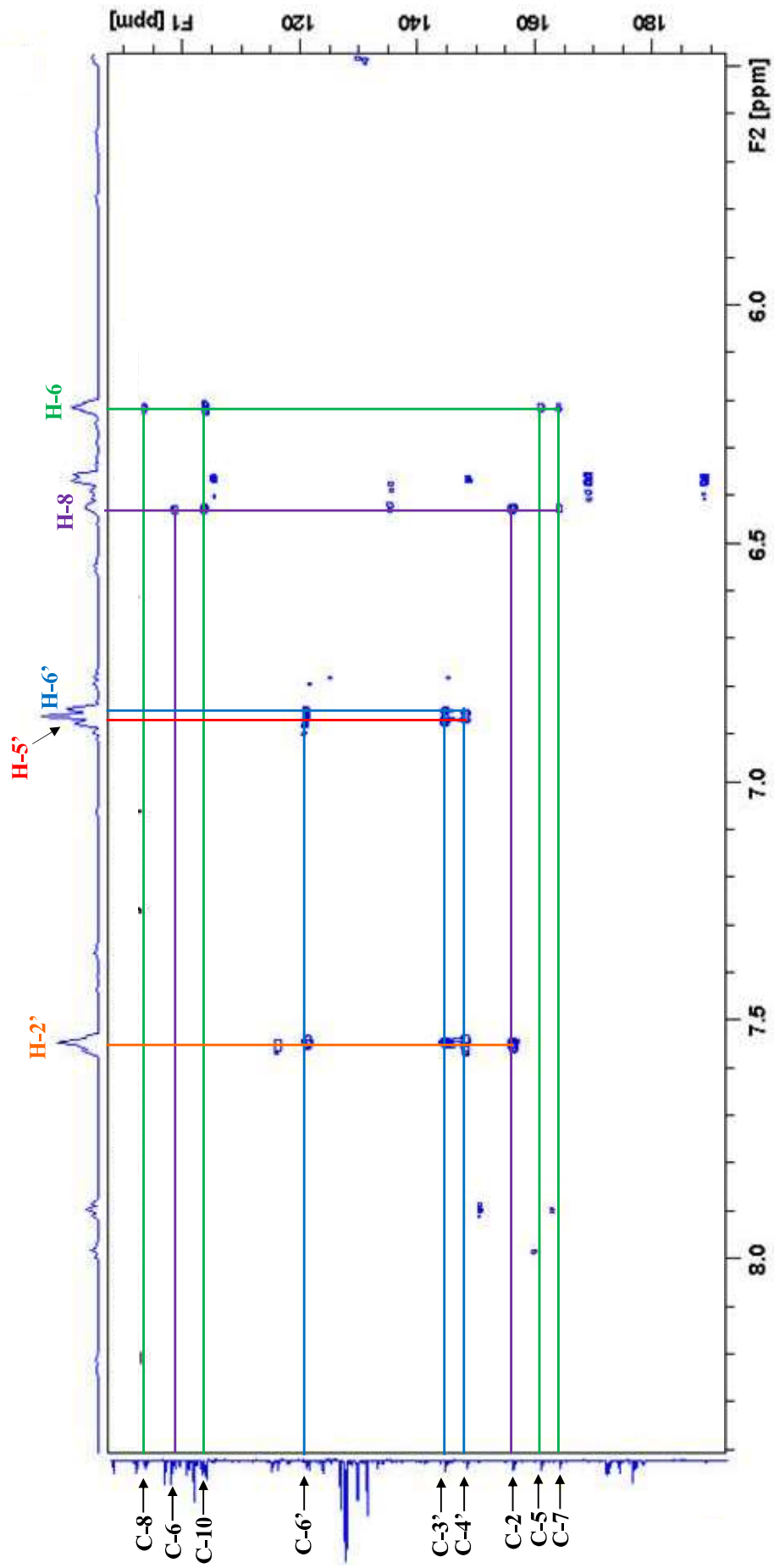


Figura 50 - Mapa de contorno *HMBC* para a amostra EH-TN, mostrando as correlações do flavonoide quercetina (118).



Fonte: Elaborado pelo autor.

5. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho contribuem para o conhecimento químico das variedades de tomateiros pertencentes à espécie *Solanum lycopersicum*, além da identificação de possíveis candidatos a semioquímicos frente às interações com a mosca-branca. As análises quimiométricas das duas variedades de tomateiros mostraram diferenças e semelhanças no perfil de compostos orgânicos voláteis e não voláteis produzidos sob condições naturais e estresse por herbivoria.

Na análise por CG-EM foi possível identificar 82 compostos químicos, sendo 65 COVs e 17 CONVs. Através do estudo quimiométrico, as análises estatísticas *OPLS-DA* aplicadas para os dados obtidos no estudo dos COVs confirmaram a diferença de metabólitos produzidos pelas variedades de tomateiros e mostrou que a variedade de tomate resistente (Dylla - TD) produziu o óxido de *trans*-carvenona (**43**). Este composto não foi identificado para a variedade não resistente (Norty - TN). Ao serem infestados por mosca-branca, os tomateiros Dylla produziram grandes quantidades de δ -2-careno (**4**); e a variedade Norty apresentou maior quantidade de α -humuleno (**70**) e o composto não identificado **65**. Os resultados de *PCA*, realizados com os dados cromatográficos obtidos a partir dos extratos etanólicos analisados por CG-EM, mostraram fortes correlações de TD e TN com a produção dos compostos palmitato de etila (**90**), linolenato de metila (**93**), fitol (**94**), linolenato de proprila (**95**), linolenato de etila (**96**). No entanto, o fitol (**94**) foi produzido em maiores quantidades por TD.

Na análise por CLUE-EM/EM, os dados obtidos foram processados na plataforma *GNPS*, levando na na anotação de 20 compostos. Dentre estes, nenhum dos compostos foram identificados por CG-EM. Majoritariamente, os metabólitos anotados pertencem as classes dos flavonoides, terpenoides, fenilpropanoides e alcaloides. Através da análise no *GNPS* foi possível observar a formação de *clusters* com agrupamentos de classes de metabólitos, tanto para modo positivo como negativo, demonstrando as fortes correlações entre os espectros de massas obtidos. Alguns compostos estavam presentes em ambas as variedades, no entanto, outros se destacaram apenas na variedade TD, formando *clusters* agrupados de terpenos, alcaloides e fenilpropanoides. Dentre os compostos anotados, foi proposta a análise e identificação do flavonoide, quercetina-3-*O*-glucosídeo (**101**); do fenilpropanoide, ácido clorogênico (**99**) e do triterpenoide, ácido ($2\alpha,3\beta,5\text{xi},9\text{xi},19\alpha$)-2,3,19-trihidroxi-olean-12-en-28-oico (**116**).

A análise por RMN de ^1H foi condizente com o perfil de compostos identificados por CG-EM e CLUE-EM/EM, sendo evidenciado sinais no espectro de RMN de ^1H para álcoois, ésteres e ácidos graxos e alguns sinais na região dos aromáticos. Após identificação das principais diferenças entre as variedades de tomateiros, as análises complementares de ^{13}C , mapas de contorno *HSQC* e *HMBC* permitiram a caracterização da estrutura do fitol (**94**) e dos flavonides quercetina (**118**) e quercetina-3-O-rutinosideo (**98**).

Sendo assim, é possível concluir que as variedades de tomateiros produziram compostos diferentes nas duas situações da análise, sob condições de herbivoria e na estufa isolados de qualquer tipo de praga. Portanto, a partir desse conhecimento é possível iniciar estudos de confirmação dos compostos como possíveis semioquímicos e a partir daí realizar aplicações em ensaios controlados para verificar a eficiência dos compostos químicos na repelência da mosca-branca.

6. REFERÊNCIAS

- ABCSEM. Tomate industrial: o Brasil está entre os dez maiores produtores da hortaliça no mundo. Disponível em: <https://www.abcsem.com.br/noticias/1926/tomate-industrial-o-brasil-esta-entre-os-dez-maiores-produtores-da-hortalica-no-mundo>. Acesso em: 15 mar. 2020.
- ACEVEDO, F. E.; RIVERA-VEJA, L. J.; CHUNG, S. H.; RAY, S.; FELTON, G. W. Cues from chewing insects - the intersection of DAMPs, HAMPs, MAMPs and effectors. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 26, p. 80 – 86, 2015.
- ADAMS, R. P. Identification of Essential oil components by Gas chromatography/Mass spectrometry, ed. 4.1. Allured Publishing Corporation: Illinois, Jan. 2017.
- AGROSMART. Para alimentar o mundo, é preciso trazer inovação para a agricultura. Disponível em: <https://agrosmart.com.br/blog/alimentar-o-mundo-trazer-inovacao-para-agricultura/>. Acesso em: 15 mar. 2020.
- ASBRAN. FAO revê demanda estimada por alimentos no mundo até 2050. Disponível em: <https://www.asbran.org.br/noticias/fao-reve-demanda-estimada-por-alimentos-no-mundo-ate-2050>. Acesso em: 15 mar. 2020.
- AUGUSTO, F.; SAMPAIO, B. R. DE T.; RIBEIRO, F. DE A. L.; ALEME, H. G.; HANTAO, L. W.; NOROSKA, M. F. F.; MOGOLLON, G. A.; PRATA, P. S.; LIMA, P. F.; BRAGA, S. C. G. N. IN: Preparo de amostras para análises de compostos orgânicos. FIGUEIREDO, E. C.; BORGES, K. B.; QUEIROZ, M. E. C., EDS.; LTC: Preparo de amostras para análises de compostos orgânicos. Rio de Janeiro, 2015, cap. 16.
- AZAMI-SARDOOEI, Z.; FRANÇA, S. C.; VLEESSCHAUWER, D. DE.; HÖFTE, M. Riboflavin induces resistance against *Botrytis cinerea* in bean, but not in tomato, by priming for a hydrogen peroxide-fueled resistance response. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 75, n. 1–2, p. 23-29, 2010.

BABUSHOK, V. I.; LINSTROM, P. J.; ZENKEVICH, I. G. Retention Indices for Frequently Reported Compounds of Plant Essential Oils. **Journal of Physical and Chemical Reference Data**, v. 40, n. 4, 043101, 2011.

BEDARD, W. D.; TILDEN, P. E.; WOOD, D. L.; SILVERSTEIN, R. M.; BROWNLEE, R. G.; RODIN, J. O. Western pine beetle: field response to its sex pheromone and a synergistic host terpene, Myrcene. **Science**, v. 164, p. 1284, 1969.

BADER, A.; FLAMINI, G.; CIONI, P. L.; MORELLI, I. 2003a. Essential oil composition of *Achillea santolina* L. and *Achillea biebersteinii* Afan. collected in Jordan. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 18, n. 1, p. 36-38, 2003.

BANDEIRA, N.; TSUR, D.; FRANK, A.; PEVZNER, P.A. Protein identification by spectral networks analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 104, n. 15, p. 6140-6145, 2007.

BARBOSA, J. C.; REZENDE, J. A. M.; AMORIM, L.; FILHO, A. B. Temporal Dynamics of Tomato Severe Rugose Virus and *Bemisia tabaci* in Tomato Fields in São Paulo, Brazil. **Journal of Phytopathology**, v. 164, p. 1, 2016.

BATISTA-PEREIRA, L. G. IN: *Produtos Naturais no Controle de Insetos*; CORRÊA, A. G.; VIEIRA, P. C., eds.; EdUFSCar: São Carlos, 2007, cap. 5.

BERGER, R. S. Isolation, Identification, and Synthesis of the Sex Attractant of the Cabbage Looper, *Trichoplusia ni*. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 59, n. 4, p. 767-771, 1966.

BERTOLI, A.; LEPNARDI, M.; KRZYŻANOWSKA, J.; OLESZEK, W.; PISTELLI, L. *Mentha longifolia* in vitro cultures as safe source of flavouring ingredients. **Acta Biochem. Polonica**, v. 58, p. 581-587, 2011.

BLEEKER, P. M.; DIERGAARDE, P. J.; AMENT K.; SCHÜTZ, S.; JOHNE B.; DIJKINK, J.; HIEMSTRA, H.; GELDER, R. DE.; DE BOTH, M. T. J.; SABELIS, M. W.;

SCHUURINK, R. C. Tomato-produced 7-epizingiberene and R-curcumene act as repellents to whiteflies. **Phytochemistry**, v. 72, p. 68–73, 2011.

BLEEKER, P. M.; DIERGAARDE, P. J.; AMENT, K.; GUERRA, J.; WEIDNER, M.; SCHÜTZ, S.; BOTH, M. T. J. DE; HARING, M. A.; SCHUURINK, R. C. The Role of Specific Tomato Volatiles in Tomato-Whitefly Interaction. **Plant Physiology**, v. 151, n. 2, p. 925–935, 2009.

BÔAS, G. L. V.; BRANCO, M. C. Manejo Integrado da Mosca-Branca (*Bemisia tabaci* biótipo B) em Sistema de Produção Integrada de Tomate Indústria (PITI). EMBRAPA, Circular Técnica 70, Nov. 2009. ISSN 1415-3033

BOAVENTURA, H. A.; QUINTELA, E. D.; SANTOS, E. N.; SILVA J. F. A.; HUMBER, R. A. Susceptibility of All Nymphal Stages of *Bemisia tabaci* Biotype B (Hemiptera: Aleyrodidae) to Three Brazilian Isolates of *Cordyceps* sp. (Hypocreales: Cordycipitaceae) in a Screenhouse Under Variable Temperature and Moisture Conditions. **Neotropical Entomology**, v. 50, p. 100–113, 2021.

BRO, R.; SMILDE, A. K. Principal component analysis. **Analytical Methods**, v. 6, p. 2812–2831, 2014.

BESSER, K.; HARPER, A.; WELSBY, N.; SCHAUVINHOLD, I.; SLOCOMBE, S.; LI, Y.; DIXON, R. A.; BROUN, P. Divergent Regulation of Terpenoid Metabolism in the *Trichomes* of Wild and Cultivated Tomato Species. **Plant Physiology**, v. 149, p. 499–514, 2009.

CÁCERES, L. A.; MCGARVEY, B. D.; BRIENS, C.; BERRUTI, F.; YEUNG, K. K. C.; SCOTT, I. M. Insecticidal properties of pyrolysis bio-oil from greenhouse tomato residue biomass. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 112, p. 333–340, 2015.

CAMPIDELI, M. B. Avaliação do perfil químico de folhas de espécies de *Eugenia* (Myrtaceae) por CLAE, RMN e IES-EM com vistas ao desenvolvimento de cosméticos e alimentos funcionais. Dissertação. Universidade Estadual Paulista - Instituto de Química. 2017.

CARVALHO, J. L. DE.; PAGLIUCA, L. G. Tomate, um mercado que não para de crescer globalmente. **Hortifruti Brasil**, v. 58, n. 6, 2007.

CARABALLO-RODRÍGUEZ, A. M.; DORRESTEIN, P. C.; PUPO, M. T. Molecular interkingdom interactions of endophytes isolated from *Lychnophora ericoides*. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 5373, 2017.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à Espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, v. 31, n.3, p. 623-636, 2008.

CHOI, H. S. Character impact odorants of *Citrus Hallabong* [(*C. unshiu* Marcov x *C. sinensis* Osbeck) x *C. reticulata* Blanco] cold-pressed peel oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 9, p. 2687-2692, 2003.

CLAUSE. Tomate da Variedade Norty. Disponível em: <https://hmclause.com/gama-de-produtos/?lang=pt-br>. Acesso em: 12 nov. 2022.

CORRÊA, A.; SANT'ANA, J. IN: Produtos Naturais no Controle de Insetos; Corrêa, A. G.; Vieira, P. C., eds.; EdUFSCar: São Carlos, 2007, cap. 1.

CORRÊA, A. "Feromônios: Conceitos e aplicação no controle de pragas". IN: *Produtos Naturais no Controle de Insetos*; CORRÊA, A. G.; VIEIRA, P. C., eds.; EdUFSCar: São Carlos, 2007, cap. 2.

CZEPAK, C.; LE SENECHAL, M.; GODINHO, K. C. A.; GUIMARÃES, H. O.; BARBOSA, M. F. J.; LIMA, M. R. M.; SILVÉRIO, R. F.; WEBER I. D. E COELHO, A. S. G. Mosca Branca: Pequena devastadora. **Revista de Defesa Vegetal**, v. 221, 2017.

DARSHANEE, H. L. C.; REN, H.; AHMED, N.; ZHAN-FENG Z.; YAN-HONG L.; TONG-XIAN, L. Volatile-Mediated Attraction of Greenhouse Whitefly *Trialeurodes vaporariorum* to Tomato and Eggplant. **Frontier Plant Science**, v. 20, 2017.

DASTMALCHI, K.; RODRIGUEZ, M. P.; LIN, J.; YOO, B.; STARK, R. E. Temporal resistance of potato tubers: Antibacterial assays and metabolite profiling of wound-healing tissue extracts from contrasting cultivars. **Phytochemistry**, v. 159, p. 75-89, 2019.

DA SILVA, A. L. D.; ALVES FILHO, E. G.; SILVA, L. M. A.; TAVARES, O. C. H.; PEREIRA, M. G.; DE CAMPOS, T. E.; DA SILVA, L. M. Near infrared spectroscopy to rapid assess the rubber tree clone and the influence of maturation and disease at the leaves. **Microchemical Journal**, v. 168, p. 106478, 2021.

DEMARQUE, D. P.; CROTTI, A. E. M.; B, VESSECCHI, R.; LOPES, J. L. C.; LOPES, N. P. Fragmentation reactions using electrospray ionization mass spectrometry: an important tool for the structural elucidation and characterization of synthetic and natural products. **Natural Product Reports**, v. 33, p. 432-455, 2016.

DOMINGO, V.; ARTEAGA, J. F.; QUÍLEZ DEL MORAL, J. F.; BARRERO, A. F. Unusually cyclized triterpenes: occurrence, biosynthesis and chemical synthesis. **Natural Product Reports**, v. 26, p. 115-134, 2009.

DONG H.; BEER, S. V. Riboflavin Induces Disease Resistance in Plants by Activating a Novel Signal Transduction Pathway. **Phitopathology**, v. 90, n. 8, p. 801-811, 2000.

DUDAREVA, N.; KLEMPIEN, A.; MUHLEMANN, J. K.; KAPLAN, I. Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds. **New Phytologist**, v. 198, p. 16, 2013.

DUEÑAS, M.; SURCO-LAOS, F.; GONZÁLEZ-MANZANO, S.; GONZÁLEZ-PARAMÁS, A. M.; GÓMEZ-ORTE, E.; CABELLO, J.; SANTOS-BUELGA, C. Deglycosylation is a key step in biotransformation and lifespan effects of quercetin-3-O-glucoside in *Caenorhabditis elegans*. **Pharmacological Research**, v. 76, p. 41-48, 2013.

DYER, L. A.; PHILBIN, C. S.; OCHSENTRIDER, K. M.; RICHARDS, L. A.; MASSAD, T. J.; SMILANICH, A. M.; FORISTER, M. L.; PARCHMAN, T. L.; GALLAND, L. M.; HURTADO, P. J.; ESPESET, A. E.; GLASSMIRE, A. E.; HARRISON, J. G.; MO, C.; YOON, S.; PARDIKES, N. A.; MUCHONEY, N. D.; JAHNER, J. P.; SLINN, H. L.;

SHELEF, O.; DODSON, C. D.; KATO, M. J.; YAMAGUCHI, L. F.; JEFFREY, C. F. Modern approaches to study plant–insect interactions in chemical ecology. **Nature Reviews Chemistry**, v. 2, p. 50-64, 2018.

EMBRAPA. Hortaliças. Brasília, 2015. Disponível em:

<https://www.embrapa.br/hortalicas/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1021765/guia-para-o-reconhecimento-e-manejo-da-mosca-branca-da-geminivirose-e-da-crinivirose-na-cultura-do-tomateiro>. Acesso em: 23 Março 2020.

ERB, M.; REYMOND, P. Molecular Interactions Between Plants and Insect Herbivores. **Annual Review of Plant Biology**, v. 70, p. 527-557, 2019.

EL-SHAFIE, H. A. F.; FALEIRO, J. R.; IN: Biological Control of Pest and Vector Insects; Shields, V. D. C., eds.; IntechOpen Limited: London, 2017, cap. 1.

FAO. Produtos agrícolas e pecuários 2021. Disponível em:

<https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>. Acesso em: 20 out. 2022.

FARIÑA, A. E.; REZENDE, J. A. M.; WINTERMANTEL, W. M. Expanding Knowledge of the Host Range of Tomato chlorosis virus and Host Plant Preference of *Bemisia tabaci* MEAM1. **Plant Disease**, v. 106, p. 1, 2019.

FARMER, E. E.; RYAN, C. A. Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. **Plant Cell**, v. 4, p. 129, 1992.

FARMER, E. E.; RYAN, C. A. Interplant communication: Airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. **Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)**, v. 87, p. 7713, 1990.

FILHO, A. B.; INOUE-NAGATA, A. K.; BASSANEZI, R. B.; BELASQUE JR, J.; AMORIM, L.; MACEDO, M. A.; BARBOSA, J. C.; WILLOCQUET, L.; SAVARY, S. The importance of primary inoculum and area-wide disease management to crop health and food security. **Food Security**, v. 8, p. 221, 2016.

FILHO, M. M.; INOUE-NAGATA, A. K. Guia para o Reconhecimento e Manejo da Mosca-branca, da Geminivirose e da Crinivirose na Cultura do Tomateiro, Circular Técnica, 142. Brasília, DF, Maio, 2015. ISSN 1415-3033

FIRDAUS, S.; HEUSDEN, A. W. VAN.; HIDAYATI, N.; SUPENA, E. D. J.; VISSER, R. G. F.; VOSMAN, B. Resistance to *Bemisia tabaci* in tomato wild relatives. **Euphytica**, v. 187, p. 31, 2012.

FLAMINI, G.; CIONI, P. L.; MORELLI, I. 2002. Differences in the fragrances of pollen and different floral parts of male and female flowers of *Laurus nobilis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 16, p. 4647–4652, 2002.

FOX RAMOS, A. E.; ALCOVER, C.; EVANNO, L.; MACIUK, A.; LITAUDON, M.; DUPLAIS, C.; BERNADAT, G.; GALLARD, J.F.; JULLIAN, J.C.; MOURAY, E.; GRELLIER, P.; LOISEAU, P. M.; POMEL, S.; POUPON, E.; CHAMPY, P.; BENIDDIR, M. A. Revisiting Previously Investigated Plants: A Molecular Networking-Based Study of *Geissospermum laeve*. **Journal of Natural Products**, v. 80, n. 4, p. 1007-1014, 2017.

FRIEDMAN, M. Tomato Glycoalkaloids: Role in the Plant and in the Diet. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 21, p. 5751-5780, 2002.

FUKUHARA, K.; SHIMIZU, K.; KUBO, I. Arudonine, an allelopathic steroidal glycoalkaloid from the root bark of *Solanum arundo* Mattei. **Phytochemistry**, v. 65, n. 9, p. 1283-1286, 2004.

FÜRSTENBERG-HÄGG, J.; ZAGROBELNY M.; BAK, S. Plant Defense against Insect Herbivores. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 5, p. 10242-10297, 2013. <https://doi.org/10.3390/ijms140510242>

GARCIA, P. G.; SANTOS, F. N.; ZANOTTA, S.; EBERLIN, M. N.; CARAZZONE, C. Metabolomics of *Solanum lycopersicum* Infected with *Phytophthora infestans* Leads to Early Detection of Late Blight in Asymptomatic Plants. **Molecules**, v. 23, n. 12, p. 3330, 2018.

- GOUVÊA, M. M.; FREITAS, D. M. S.; REZENDE, J. A. M.; WATANABE, L. F. M.; LOURENÇÃO, A. L. Bioassay of insecticides on mortality of *Bemisia tabaci* biotype B and transmission of Tomato severe rugose virus (ToSRV) on tomatoes. **Phytoparasitica**, v. 45, p. 95, 2017.
- GUIMARAES, J. A.; ZANDONADI, D. B.; MOURA, A. P. DE. Levantamento de insetos associados ao tomateiro BRS Montese em cultivo protegido de base ecológica no Distrito Federal. EMBRAPA Hortaliças: Brasília, 2015.
- HAJI, F. N. P.; ALENCAR, J. A.; PREZOTTI, L. Principais pragas do tomateiro e alternativas de controle, EMBRAPA – CPATSA: Petrolina, 1998.
- HAJLAOUI, H.; MIGHRI, H.; NOUMI, E.; SNOUSSI, M.; TRABELSI, N.; KSOURI, R.; BAKHROUF, A. Chemical composition and biological activities of Tunisian *Cuminum cyminum* L. essential oil: a high effectiveness against *Vibrio* spp. strains. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 8-9, p. 2186-2192, 2010.
- HEIL, M. Indirect defence via tritrophic interactions. **New Phytologist**, v. 178, p. 41, 2008.
- HÖGNADÓTTIR, A.; ROUSEFF, R. L. Identification of aroma active compounds in orange essence oil using gas chromatography-olfactometry and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 998, n. 1-2, p. 201-211, 2003.
- HORI, M.; NAKAMURA, H.; FUJII, Y.; SUZUKI, Y.; MATSUDA, K. Chemicals affecting the feeding preference of the Solanaceae-feeding lady beetle *Henosepilachna vigintioctomaculata* (Coleoptera: Coccinellidae). **Journal of Applied Entomology**, v. 135, p. 121–131, 2011.
- HUH, S.; KIM, Y. S.; JUNG, E.; LIM, J.; JUNG, K. S.; KIM, M. LEE, J.; PARK, D. Sageretia thea fruit extracts rich in methyl linoleate and methyl linolenate downregulate melanogenesis via the Akt/GSK3 β signaling pathway. *Nutr Res Pract*, v. 12, n. 1, p. 3–12, 2018.

IBGE. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola Estatística da Produção Agrícola em 2021. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/home/lspa/brasil>. Acesso em: 20 out. 2022.

ISCHEBECK, T.; ZBIERZAK, A. M.; KANWISCHER, M.; DÖRMANN, P. A salvage pathway for phytol metabolism in Arabidopsis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, p. 2470-2477, 2006.

JOLLIFFE, I. T.; CADIMA, J. Principal component analysis: a review and recent developments. **Philosophical Transactions: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v. 13; p. 374, 2016.

KANT, M. R.; AMENT, K.; SABELIS, M. W.; HARING, M. A.; SCHUURINK, R. C. Differential Timing of Spider Mite-Induced Direct and Indirect Defenses in Tomato Plants. **Plant Physiology**, v. 135, n. 1, p. 483-495, 2004.

KEMPEMA, L. A.; CUI, X.; HOLZER, F. M.; WALLING, L. L. Arabidopsis transcriptome changes in response to phloem-feeding silverleaf whitefly nymphs. Similarities and distinctions in responses to aphids. **Plant Physiology**, v. 143, p. 849-865, 2007.

KESSLER, A.; BALDWIN, I. T. Defensive Function of Herbivore-Induced Plant Volatile Emissions in Nature. **Science**, v.291, n. 5511, p. 2141-2144, 2001.

KESSNER, D.; CHAMBERS, M.; BURKE, R.; AGUS, D.; MALLICK, P. ProteoWizard: open source *software* for rapid proteomics tools development. **Bioinformatics**, v. 24, n. 21, p. 2534-2536, 2008.

LACALLE-BERGERON, L.; GOTERRIS-CERISUELO, R.; PORTOLÉS, T.; BELTRAN, J.; SANCHO, J. V.; NAVARRO-MORENO, C.; MARTINEZ-GARCIA, F. Novel sampling strategy for alive animal volatolome extraction combined with GC-MS based untargeted metabolomics: Identifying mouse pup pheromones. **Talanta**, v. 235, 2021.

LEVER, J.; KRZYWINSKI, M.; Altman, N. Points of Significance: Principal component analysis. **Nature Methods**, v. 14, p. 641, 2017.

LE QUERE, J. L.; LATRASSE, A. Composition of the essential oils of black currant buds (*Ribes nigrum* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 38, n. 1, p. 3-10, 1990.

LILAND, K. H. Multivariate methods in metabolomics – from preprocessing to dimensions reduction and statistical analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 30, p. 827-841, 2011.

LÓPEZ-GRESA P.; LISÓN, P.; KIM, H. K.; CHOI, Y. H.; VERPOORTE, R.; RODRIGO, I.; CONEJERO, V. BÉLLES, J. M. Metabolic fingerprinting of Tomato Mosaic Virus infected *Solanum lycopersicum*. **Journal of Plant Physiology**, v. 169, 16, p. 1586-1596, 2012.

LÓPEZ-GRESA, M. P.; LISÓN, P.; CAMPOS, L.; RODRIGO, I.; RAMBLA, J. L.; GRANELL, A.; CONEJERO, V.; BELLÉS, J. M. A Non-targeted Metabolomics Approach Unravels the VOCs Associated with the Tomato Immune Response against *Pseudomonas syringae*. **Frontier Plant Science**, v. 4, 2017.

MAFFEI, M. E. Sites of synthesis, biochemistry and functional role of plant volatiles. **South African Journal of Botany**, v. 76, n. 4, p. 612-631, 2010.

MARTINS, L. R. R.; FILHO, E. R. P.; CARNEIRO, R. L. Análise multivariada de dados cromatográficos: conceitos e aplicações. IN: Cromatografia Líquida: Novas Tendências e Aplicações; CASS, Q. B.; CASSIANO, N., eds.; Elsevier: Rio de Janeiro, 2015, cap. 10.

MAS, F.; VEREIJSEN, J.; SUCKLING, D. M. Influence of the Pathogen *Candidatus Liberibacter Solanacearum* on Tomato Host Plant Volatiles and Psyllid Vector Settlement. **Journal of Chemical Ecology**, v. 40, p. 1197–1202, 2014.

MICHEREFF-FILHO, M.; SILVA, K. F. A. DE S.; BOITEUX, L. S.; BOITEUX, M. E. N. F.; TEXEIRA, A. C. DE A.; MOITA, A. W. Resistência de genótipos de tomateiros a *Bemisia tabaci* (Genn.) (Hemiptera: Aleyrodidae) biótipo B. Boletim Pesquisa e Desenvolvimento, 1ª ed., Embrapa Hortaliças, 2014. ISSN 1677-2229; 118).

MOURA, A. P. DE.; FILHO, M. M.; GUIMARÃES, J. A.; LIZ, R. S DE. Manejo integrado de pragas do tomateiro para processamento industrial. Circular Técnica, 1ª ed., Brasília, 2014. ISSN 1415-3033.

NIST. NIST Chemistry WebBook. Disponível em: <https://webbook.nist.gov/chemistry/name-ser/>. Acesso em: 10 set. 2022.

OLIVA, M.; HATAN, E.; KUMAR, V.; GALSURKER, O.; NISIM-LEVI, A.; OVADIA, R.; GALILI, G.; LEWINSOHN, E.; ELAD, Y.; ALKAN, N.; OREN-SHAMIR, M. Increased phenylalanine levels in plant leaves reduces susceptibility to *Botrytis cinerea*. **Plant Science**, v. 290, 2020.

PALIC, R.; STOJANOVIC, G.; ALAGIC, S.; NIKOLIC, M.; LEPOJEVIC, Z. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil and CO₂ extracts of the oriental tobacco, Prilep. **Flavor and Fragrance Journal**, v. 17, n. 5, p. 323-326, 2002.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. Em Introdução à Espectroscopia. Tradução da 4ª edição norte-americana. Cengage Learning, 2015.

PEARCE, G.; STRYDOM, D.; JOHNSON, S.; RYAN, C. A. A polypeptide from tomato leaves induces wound-inducible proteinase inhibitor proteins. **Science**, v. 253, n. 5022, p. 895-897, 1991.

PEREIRA, R. B.; MOURA, A. P. DE; PINHEIRO, J. B. Tecnologia de Aplicação de Agrotóxicos em Cultivo Protegido de Tomate e Pimentão. Circular Técnica, 1ª ed., Brasília, 2015. ISSN 1415-3033.

PHEROBASE. Disponível em: <http://www.pherobase.com/database/kovats/kovats-index.php>. Acesso em: 15 abr. 2020.

PICHERSKY, E.; NOEL, J. P.; DUDAREVA, N. Biosynthesis of Plant Volatiles: Nature's Diversity and Ingenuity. **Science**, v. 311, 808 – 811, 2006.

PICKETT, J. A.; KHAN, Z. R. Plant volatile-mediated signalling and its application in agriculture: successes and challenges. **New Phytologist**, v. 212, n. 4, p. 856-870, 2016.

PILON, A. C.; VIEIRA, N. C.; AMARAL, J. G.; MONTEIRO, A. F.; DA SILVA, R. R.; SPÍNDOLA, L. S.; CASTRO-GAMBOA, I.; LOPES, N. P. Redes moleculares: uma análise sobre anotações e descoberta de novos ativos. **Química Nova**, v. 44, n. 9, p. 1168-1179, 2021.

PINTO-ZEVALLOS, D. M.; MARTINS, C. B. C.; PELLEGRINO, A. C.; ZARBIN, P. H. G. Compostos Orgânicos Voláteis na Defesa Induzida das Plantas contra Insetos Herbívoros. **Química Nova**, v. 36, n. 9, p. 1395-1405, 2013.

QUINTELA, E. D.; ABREU, A. G.; LIMA, J. F. D. S.; MASCARIN, G. M.; DOS SANTOS, J. B.; BROWN, J. K. Reproduction of the whitefly *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) B biotype in maize fields (*Zea mays* L.) in Brazil. **Pest Management Science**, v. 72, n. 11, p. 2181-2187, 2016.

RAGHAVA, T.; RAVIKUMAR, P.; HEGDE, R.; KUSH, A. Spatial and temporal volatile organic compound response of select tomato cultivars to herbivory and mechanical injury. **Plant Science**, v. 179, p. 520–526, 2010.

ROJAS, M. R.; MACEDO, M. A.; MALIANO, M. R.; SOTO-AGUILAR, M.; SOUZA, J. O.; BRIDDON, R. W.; KENYON, L.; BUSTAMANTE, R. F. R.; ZERBINI, F. M.; ADKINS, S.; LEGG, J. P.; KVARNHEDEN, A.; WINTERMANTEL, W. M.; SUDARSHANA, M. R.; PETERSCHMITT, M.; LAPIDOT, M.; MARTIN, D. P.; MORIONES, E.; INOUE-NAGATA, A. K.; GILBERTSON, R. L. World Management of Geminiviruses. **Annual Review of Phytopathology**, v. 56, p. 637, 2018.

ROWEN, E.; GUTENSOHN, M.; DUDAREVA, N.; KAPLAN, I. Carnivore Attractant or Plant Elicitor? Multifunctional Roles of Methyl Salicylate Lures in Tomato Defense. **Journal of Chemical Ecology**, v. 43, n. 6, p. 573-585, 2017.

RYAN, C. A.; PEARCE, G. Polypeptide hormones. **Plant Cell**, v. 14, p. 251-264, 2002.

RYAN, C. A.; PEARCE, G.; Systemins: A functionally defined family of peptide signal that regulate defensive genes in solanaceae species. **Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)**, v. 100, n. 2, 14577–14580, 2003.

SAATH, K. C. O; FACHINELLO, A. L.; Crescimento da demanda mundial de alimentos e restrições do fator terra no Brasil. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 56, p. 195, 2018.

SANT'ANA, J.; STEIN, K. IN: Produtos Naturais no Controle de Insetos; CORRÊA, A. G.; VIEIRA, P. C., eds.; EdUFSCar: São Carlos, 2007, cap. 3.

SANTOS, A. E.; BARRETO JUNIOR, C. B.; KUSTER, R. M. Flavonoides e Atividade Antioxidante das Folhas de *Bauhinia longifolia* (Bong.) Steud. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 3, p. 1303-1317, 2017.

SARAIVA, W.V., N.S. DIAS-PINI, E.G. ALVES FILHO, J.W. MELO, M. FANCELLI, C.R. COUTINHO, G.J. ZOCCOLO, T.H. RODRIGUES, P.M. DUARTE, AND V.H. MACEDO. Attraction of whitefly *Aleurodicus cocois* mediated by cashew volatiles. **Phytoparasitica**, v. 50, p. 399-410, 2022.

SCHMIDT, D.; ZAMBAN, D. T.; PROCHNOW, D.; CARON, B. O.; SOUZA, V. Q.; PAULA, G. M.; COCCO. Caracterização fenológica, filocrono e requerimento térmico de tomateiro italiano em dois ciclos de cultivo. *Horticultura Brasileira*, v. 35, p. 89, 2017.

SCHOLZ, M. Approaches to analyse and interpret biological profile data. Tese de Doutorado, University of Potsdam, Germany, 2006.

SHAIK, A. B.; AHIL, S. B.; GOVARDHANAM, R.; SENTHI, M.; KHAN, R.; SOJITRA, R.; KUMAR, S.; SRINIVAS, A. Antifungal effect and protective role of ursolic acid and three phenolic derivatives in the management of sorghum grain mold under field conditions. **Chemistry & Biodiversity**, v. 13, p. 1158-1164, 2016.

SHI, X.; CHEN, G.; TIAN, L.; PENG, Z.; XIE, W.; WU, Q.; WANG, S.; ZHOU, X.; ZHANG, Y. The Salicylic Acid-Mediated Release of Plant Volatiles Affects the Host Choice of *Bemisia tabaci*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 7, p. 1048, 2016.

SHINYA, T.; HOJO, Y.; DESAKI, Y.; CHRISTELLER, J. T.; OKADA, K.; SHIBUYA, N.; GALIS, I. Modulation of plant defense responses to herbivores by simultaneous recognition of different herbivore-associated elicitors in rice. **Scientific Reports**, v. 6, n. 32537, 2016.

SHRIVASTAVA, G.; ROGERS, M.; WSZELAKI, A.; PANTHEE, D. R.; Chen, F. Plant Volatiles-based Insect Pest Management in Organic Farming. **Journal Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 29, n. 2, p. 123-133, 2010.

SILVA, D. B.; WELDEGERGIS, B. T.; VAN LOON, J. J. A.; BUENO, V. H. P. Qualitative and Quantitative Differences in Herbivore-Induced Plant Volatile Blends from Tomato Plants Infested by Either *Tuta absoluta* or *Bemisia tabaci*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 43, p. 53, 2017.

SILVA, D. B.; BUENO, V. H. P.; LOON, J. J. A. VAN; PEÑAFLORES, M. F. G. V.; BENTO, J. M. S.; LENTEREN, J. C. VAN. Attraction of Three Mirid Predators to Tomato Infested by Both the Tomato Leaf Mining Moth *Tuta absoluta* and the Whitefly *Bemisia tabaci*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 44, n. 1, p. 29-39, 2018.

SOBHY, I. S.; WOODCOCK, C. M.; POWERS, S. J.; CAULFIELD, J. C.; PICKETT, J. A.; BIRKETT, M. A. cis-Jasmone Elicits Aphid-Induced Stress Signalling in Potatoes. **Journal of Chemical Ecology**, v. 43, p. 39–52, 2017.

SOLABERRIETA, I.; MELLINAS, A. C.; ESPAGNOL, J.; HAMZAOU, M.; JIMÉNEZ, A.; GARRIGÓS, M. C. Valorization of Tomato Seed By-Products as a Source of Fatty Acids and Bioactive Compounds by Using Advanced Extraction Techniques. **Foods**, v. 11, n. 16, p. 2408, 2022.

SOTOMAYOR, J. A.; MARTINEZ, R. M.; GARCIA, A. J.; JORDAN, M. J. *Thymus zygis* subsp. *gracilis*: watering level effect on phytomass production and essential oil quality. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 17, p. 5418-5424, 2004.

SOUZA, J. C. DE; REIS, P. R.. Principais pragas do tomate para mesa bioecologia, dano e controle. **Informe Agropecuário**, v. 24, p. 79, 2003.

SYNGENTA. Variedade de Tomateiro Dylla. Disponível em:

<https://www.syngenta.com.br/print/11881>. Acesso em: 12 nov. 2022

TAKAYAMA, K.; JANSEN, R. M. C.; VAN HENTEN, E. J.; VERSTAPPEN, F. W. A.; BOUWMEESTER, H. J.; NISHINA, H. Emission index for evaluation of volatile organic compounds emitted from tomato plants in greenhouses. **Biosystems Engineering**, v. 113, n. 2, p. 220-228, 2012.

TAN, K., NISHIDA, R., TOONG, Y. Floral synomone of a wild orchid, *Bulbophyllum cheiri*, lures Bactrocera fruit flies for pollination. **Journal of Chemical Ecology**, v. 28, p. 1161, 2002.

TELLEZ, M. R.; CANEL, C.; RIMANDO, A. M.; DUKE, S. O. Differential accumulation of isoprenoids in glanded and glandless *Artemisia annua* L. **Phytochemistry**, v. 52, p. 1035-1040, 1999.

TREUTTER, D. Significance of Flavonoids in Plant Resistance and Enhancement of Their Biosynthesis. **Plant Biology**, v. 7, n. 6, p. 581-591, 2005.

TRYGG, J.; S. WOLD. Orthogonal projections to latent structures (O-PLS). **Journal of Chemometrics: A Journal of the Chemometrics Society**, v. 16, n. 3, p. 119-128, 2002.

VÁZQUEZ-HERNÁNDEZ, M.C.; PAROLA-CONTRERAS, I.; MONTOYA-GÓMEZ, L. M.; TORRES-PACHECO, I.; SCHWARZ, D.; GUEVARA-GONZÁLEZ, R.G. Eustressors: Chemical and physical stress factors used to enhance vegetables production. **Scientia Horticulturae**, v. 250, p. 223, 2019.

VALDERRAMA, L.; PAIVA, V. B.; MARÇO, P. H.; Valderrama, P. Proposta experimental didática para o ensino de análise de componentes principais. **Química Nova**, v. 39, p. 245, 2016.

XU, Y.; BARRINGER, S. Comparison of Tomatillo and Tomato Volatile Compounds in the Headspace by Selected Ion Flow Tube Mass Spectrometry (SIFT-MS). **Journal of Food Science**, v. 75, n. 3, 2010.

YAO, Q.; PENG, Z.; TONG, H.; YANG, F.; XING, G.; WANG, L.; ZHENG, J.; ZHANG, Y.; SU, Q. Tomato Plant Flavonoids Increase Whitefly Resistance and Reduce Spread of Tomato yellow leaf curl virus. **Journal of Economic Entomology**, v. 112, n. 6, p. 2790-2796, 2019.

YOUSEFZADI, M.; HEIDARI, M.; AKBARPOUR, M.; MIRJALILI, M.H.; ZAINALI, A.; PARSA, M. *In vitro* cytotoxic activity of the essential oil of *Dorema ammoniacum* D. Don. **Middle-East Journal of Scientific Research**, v. 7, n. 4, p. 511-514, 2011.

WANG, M.; CARVER, J. J.; PHELAN, V. V.; SANCHEZ, L. M.; GARG, N.; PENG, Y.; NGUYEN, D. D.; *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, 2016.

WAR, A. R.; TAGGAR, G. K.; WAR, M. Y.; HUSSAIN, B. Impact of climate change on insect pests, plant chemical ecology, tritrophic interactions and food production. **International Journal of Biological Sciences**, v. 1, p. 16, 2016.

WAR, A. R.; SHARMA, H. C.; PAULRAJ, M. G.; WAR, M. Y.; IGNACIMUTHU, S. Herbivore induced plant volatiles: Their role in plant defense for pest management. **Plant Signaling & Behavior**, v. 6, n. 12, p. 1973, 2011.

WARDLE, A. R.; BORDEN, J. H.; PIERCE JR., H. D.; GRIES, R. Volatile Compounds Released by Disturbed and Calm Adults of the Tarnished Plant Bug, *Lygus lineolaris*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 29, n. 4, p. 931-944, 2003.

WASTERNAK, C.; ORTEL, B.; MIERSCH, O.; KRAMELL, R.; BEALE, M.; GREULICH, F.; FEUSSNER, I.; HAUSE, B.; KRUMM, T.; BOLAND, W.; PARTHIER, B. Diversity in octadecanoid-induced gene expression of tomato. **Journal of Plant Physiology**, v. 152, n. 2-3, p. 345-352, 1998.

WESTERHUIS, J. A.; VAN VELZEN, E. J. J.; HOEFSLOOT, H. C. J.; SMILDE, A. K. Multivariate paired analysis: multilevel PLSDA versus OPLSDA. **Metabolomics**, v. 6, n. 1, p. 119-128, 2010.

WILLEMS, J. L.; KHAMIS, M. M.; SAEID, W. M.; PURVES, R. W.; KATSELIS, G.; LOW, N. H.; EL-ANEED, A. Analysis of a series of chlorogenic acid isomers using differential ion mobility and tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 933, p. 164–174, 2016.

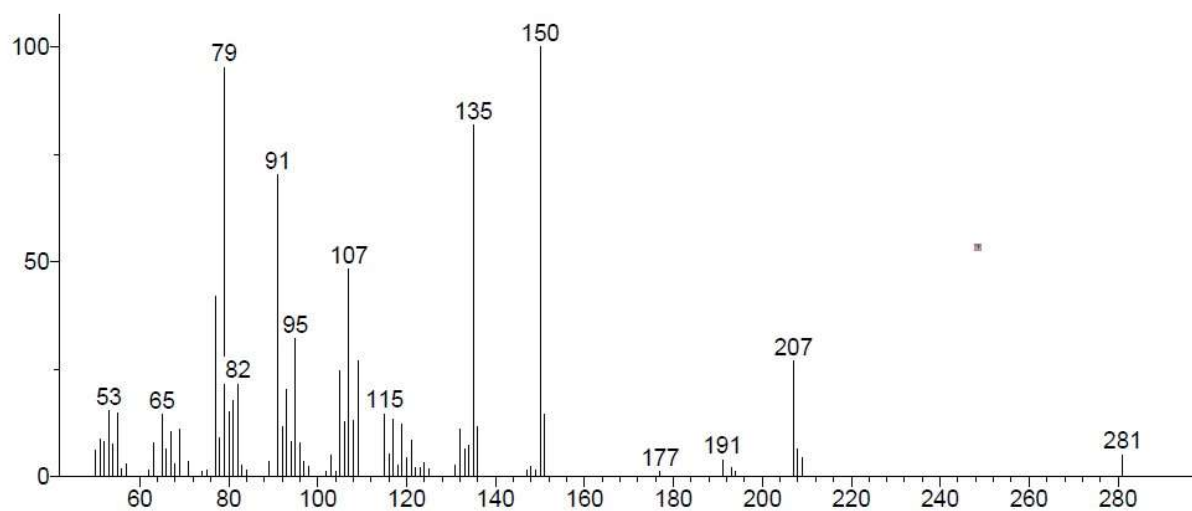
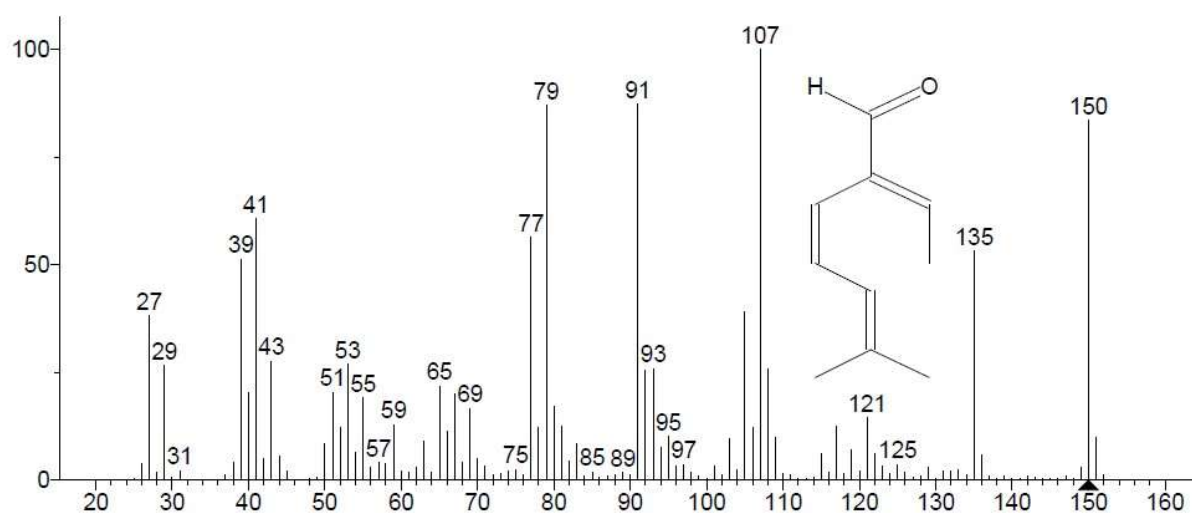
WOLD, S.; ESBENSEN, K.; GELADI, P. Principal component analysis. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 2, n. 1–3, p. 37-52, 1987.

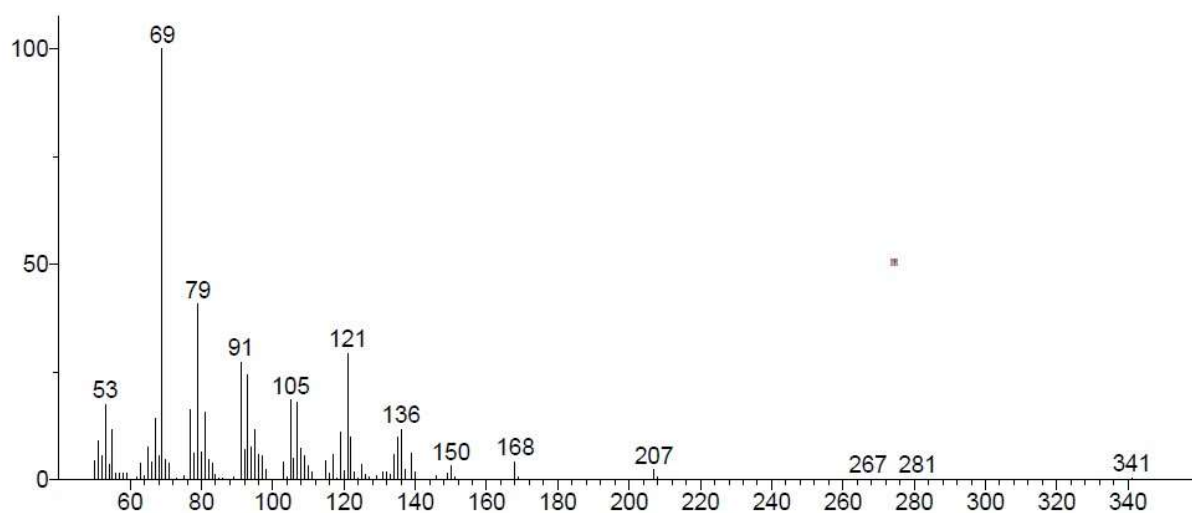
ZAID, R.; CANELA-GARAYOA, R.; ORTEGA-CHACÓN, N. M.; MOUHOUCHE, F. Phytochemical analyses and toxicity of *Nerium oleander* (Apocynaceae) leaf extracts against *Chaitophorus leucomelas* Koch, 1854 (Homoptera: Aphididae). **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**, 21, n. 5, p. 310-317, 2022.

ZARBIN, P. H. G.; RODRIGUES, M. A. C. M.; LIMA, E. R. Feromônios de insetos: tecnologia e desafios para uma agricultura competitiva no Brasil. **Química Nova**, v. 32, p. 722, 2009.

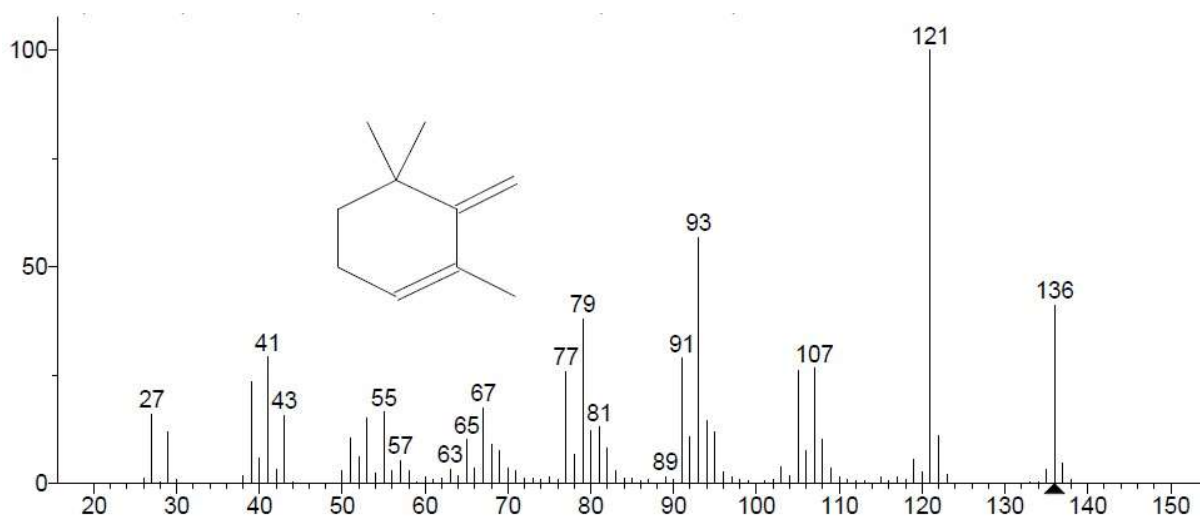
ZHANG, P. J.; WEI, J. N.; ZHAO, C.; ZHANG, Y. F.; LI, C. Y.; LIU, S. S.; DICKE, M.; YU, X. P.; TURLINGS, T. C. J. Airborne host–plant manipulation by whiteflies via an inducible blend of plant volatiles. **Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)**, v. 116, n. 15, p. 7387-7396, 2019.

ANEXO 1

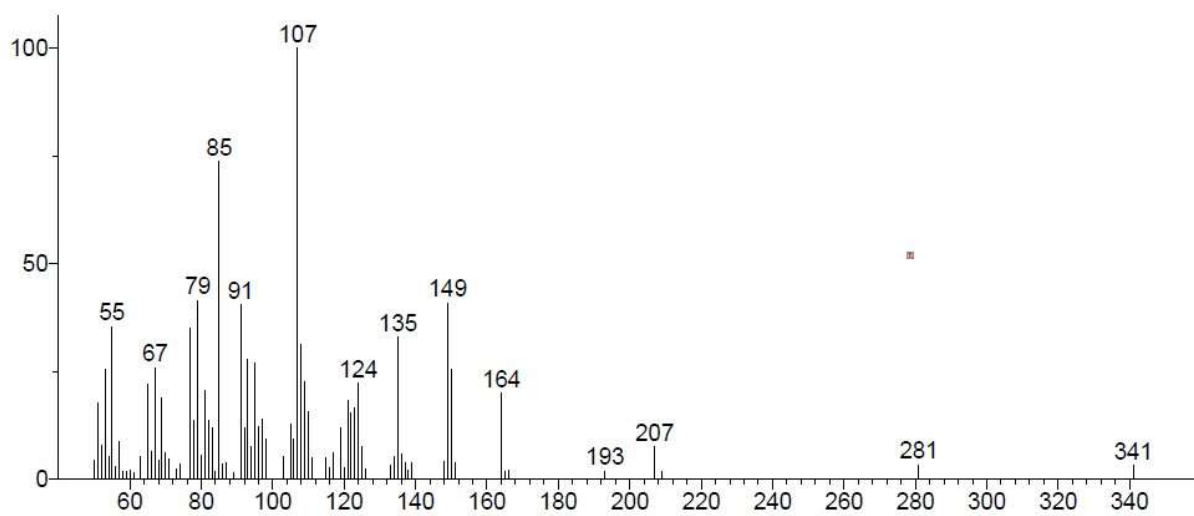
ESPECTROS DE MASSA E PROPOSTAS DE FRAGMENTAÇÃO PARA OS
COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS18. (*E,Z*)-2-etilideno-6-metil-3,5-heptadienal*Espectro de massas obtido experimentalmente para 18.**Espectro de massas sugerido pela biblioteca NIST para composto 18.*

23. 1,5,5-trimetil-6-metileno-ciclohexeno

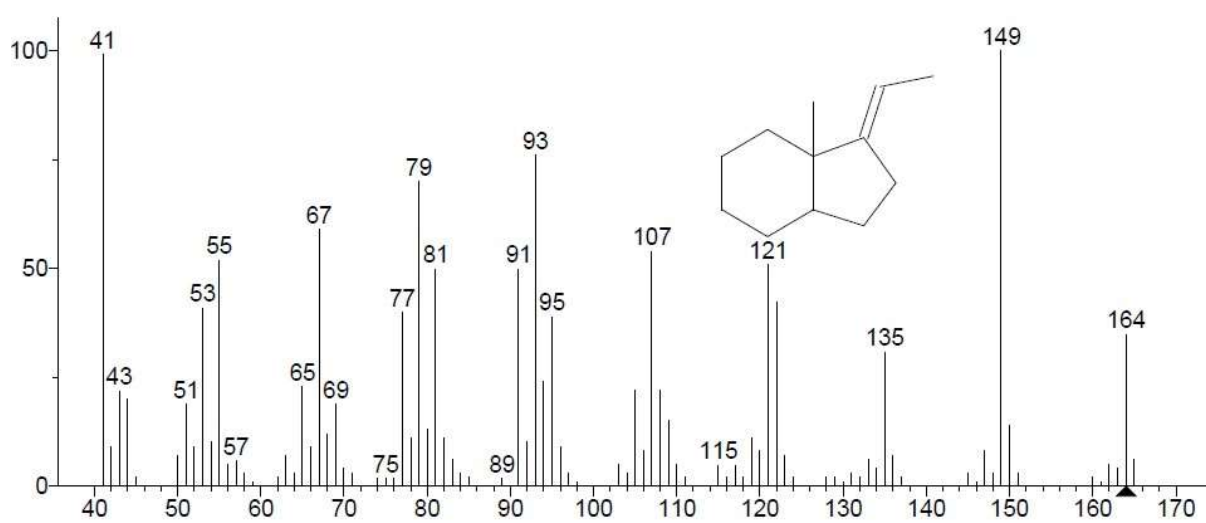
Espectro de massas obtido experimentalmente para 23.



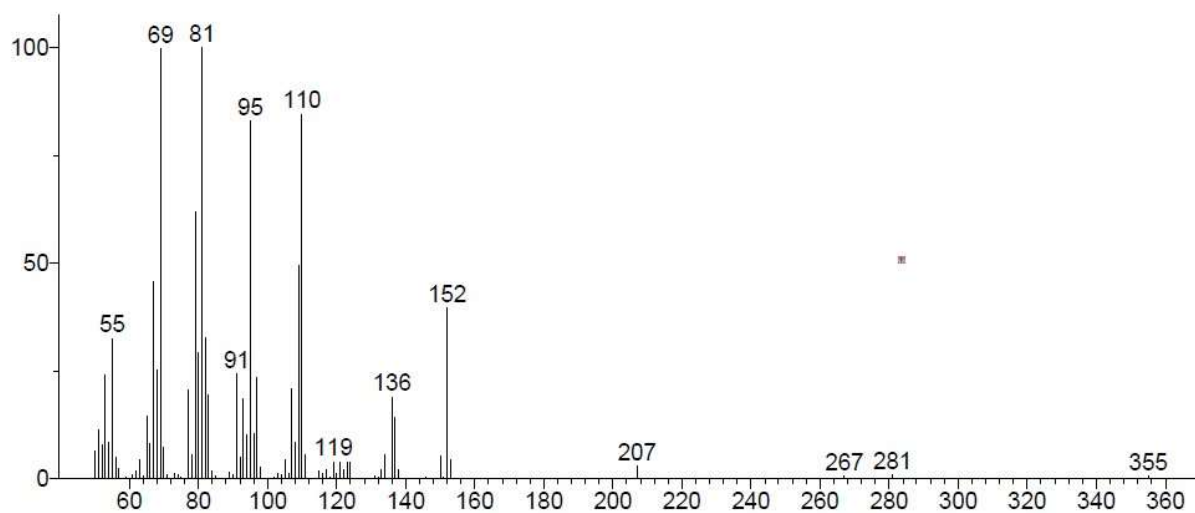
Espectro de massas sugerido pela biblioteca NIST para composto 23.

24. *cis*-1-etilidenoctahidro-7a-metil-1H-indeno

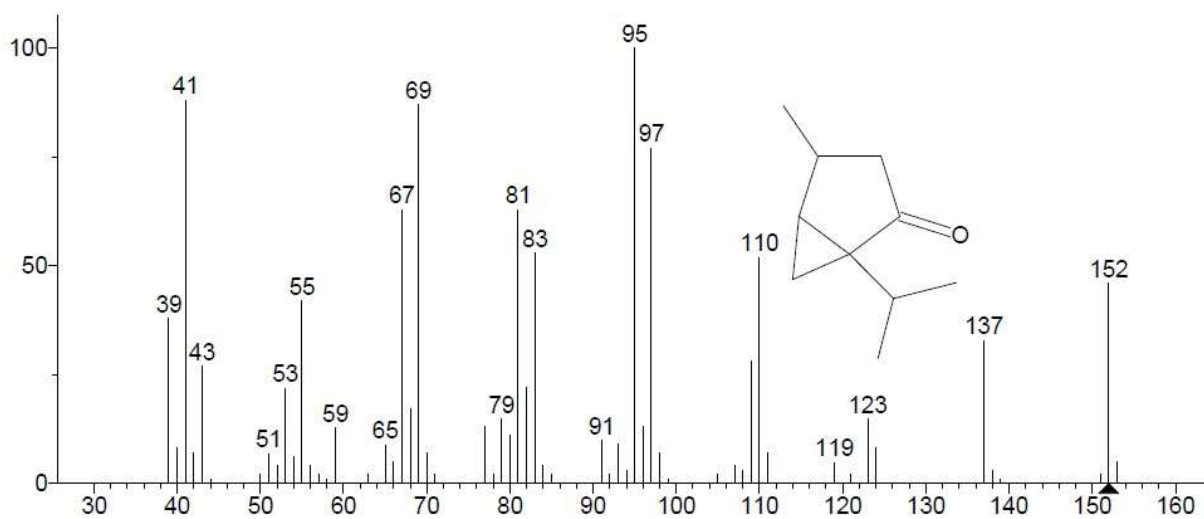
Espectro de massas obtido experimentalmente para 24.



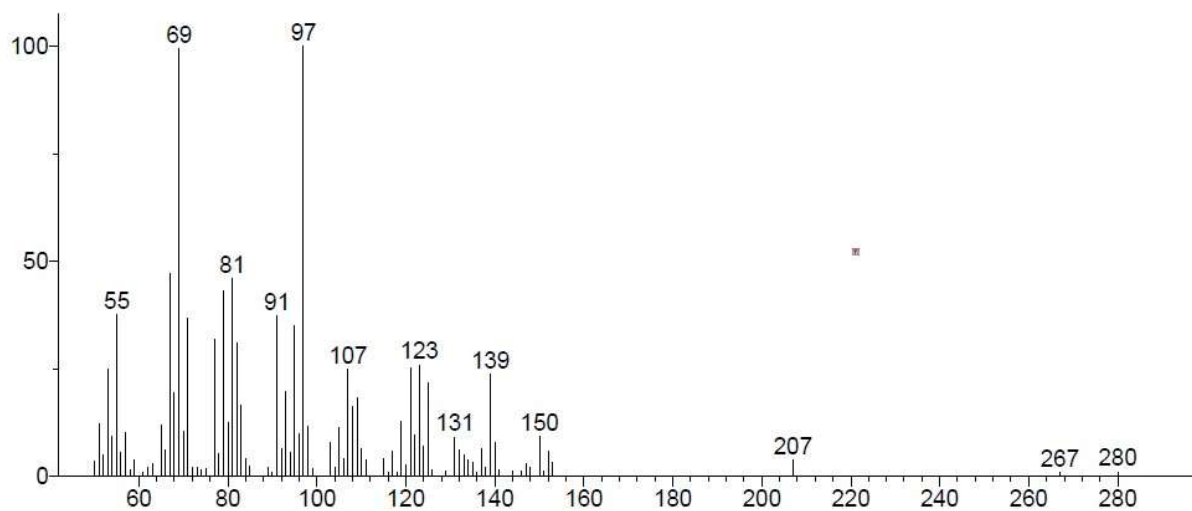
Espectro de massas sugerido pela biblioteca NIST para composto 24.

25. dihidroumbelulona

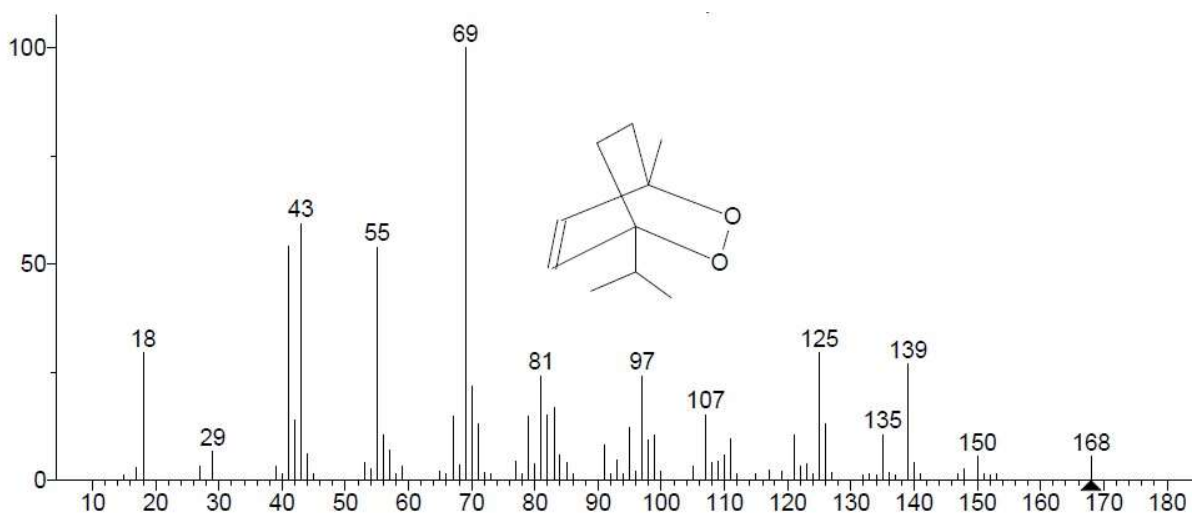
Espectro de massas obtido experimentalmente para 25.



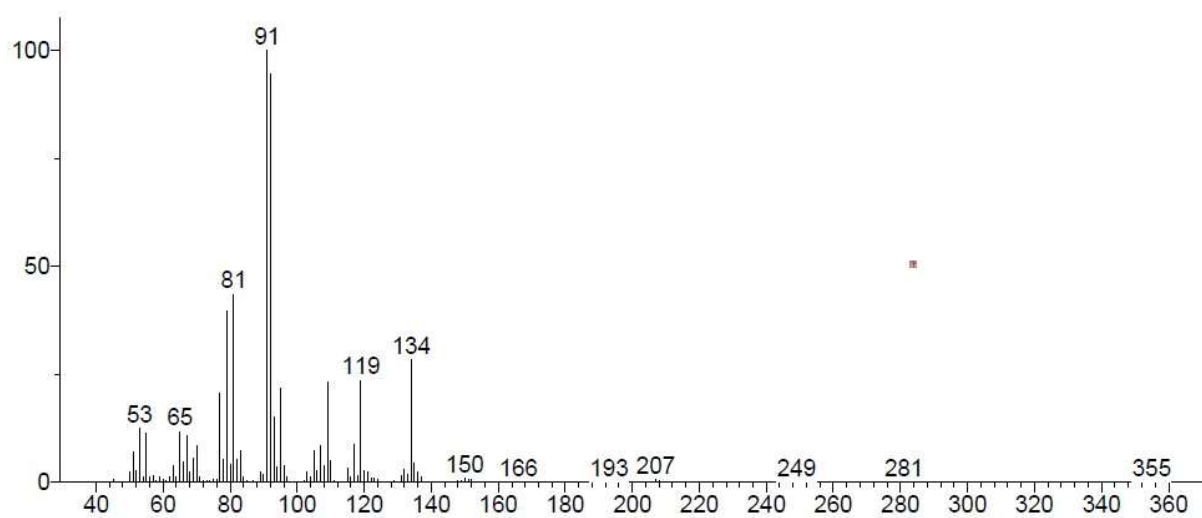
Espectro de massas sugerido pela biblioteca NIST para composto 25.

31. ascaridol (estereoisômero)

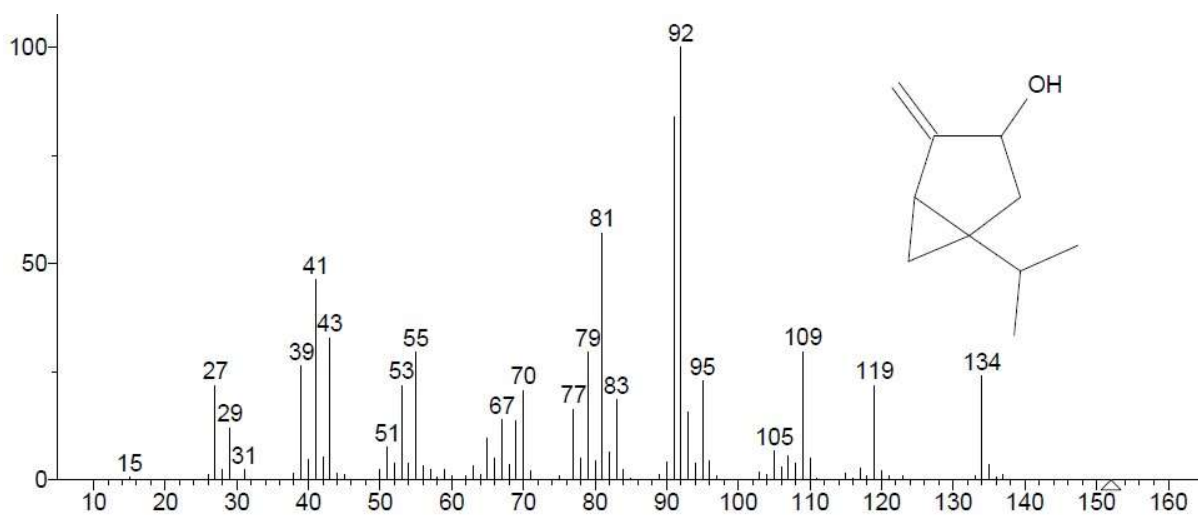
Espectro de massas obtido experimentalmente para 31.



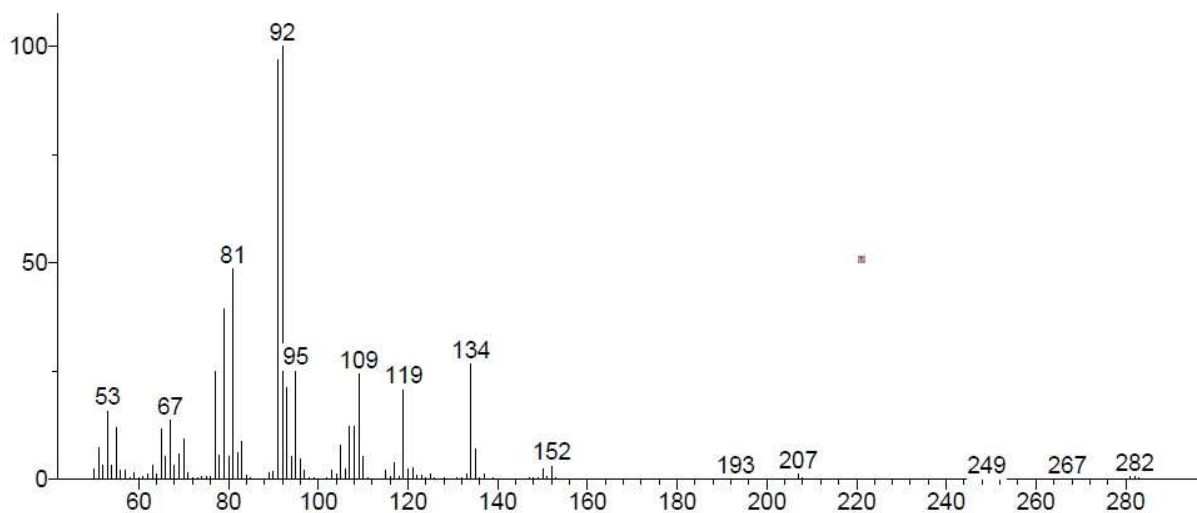
Espectro de massas sugerido pela biblioteca NIST para composto 31.

32. *cis*-sabinol (estereoisômero)

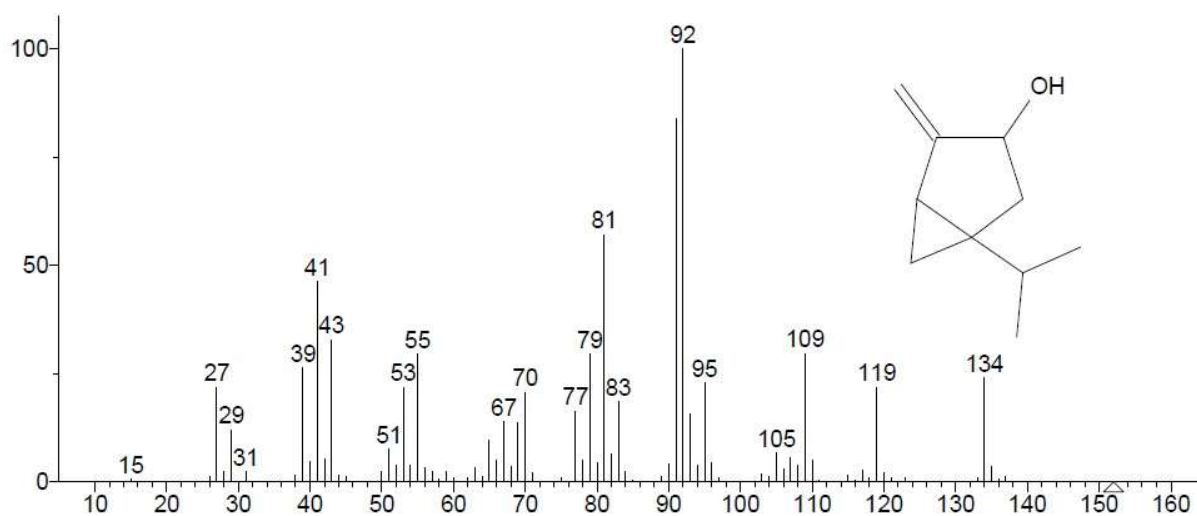
Espectro de massas obtido experimentalmente para 32.



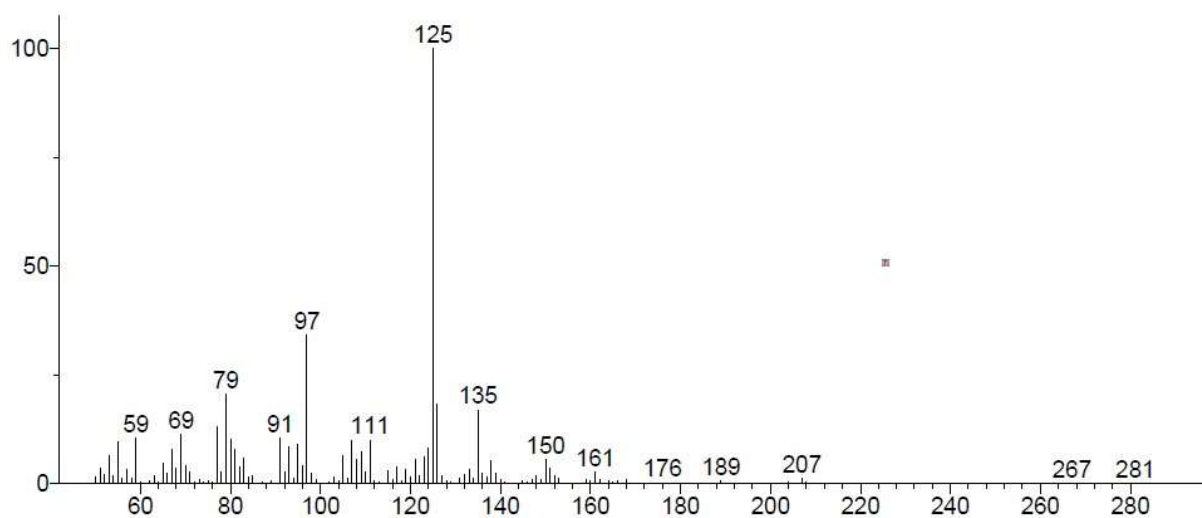
Espectro de massas sugerido pela biblioteca NIST para composto 32.

38. 4(10)-tujen-3-ol (estereoisômero)

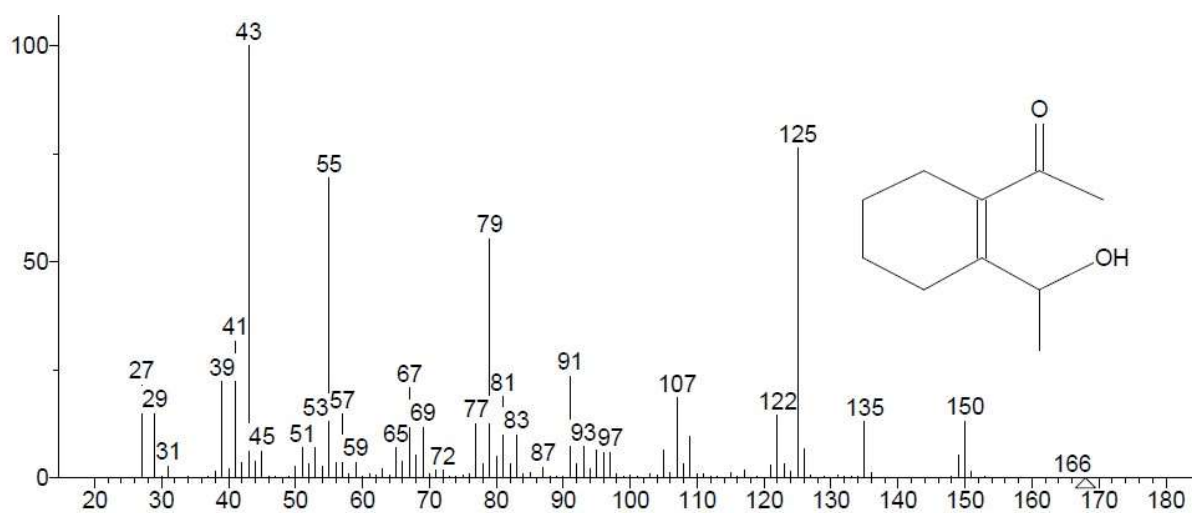
Espectro de massas obtido experimentalmente para 38.



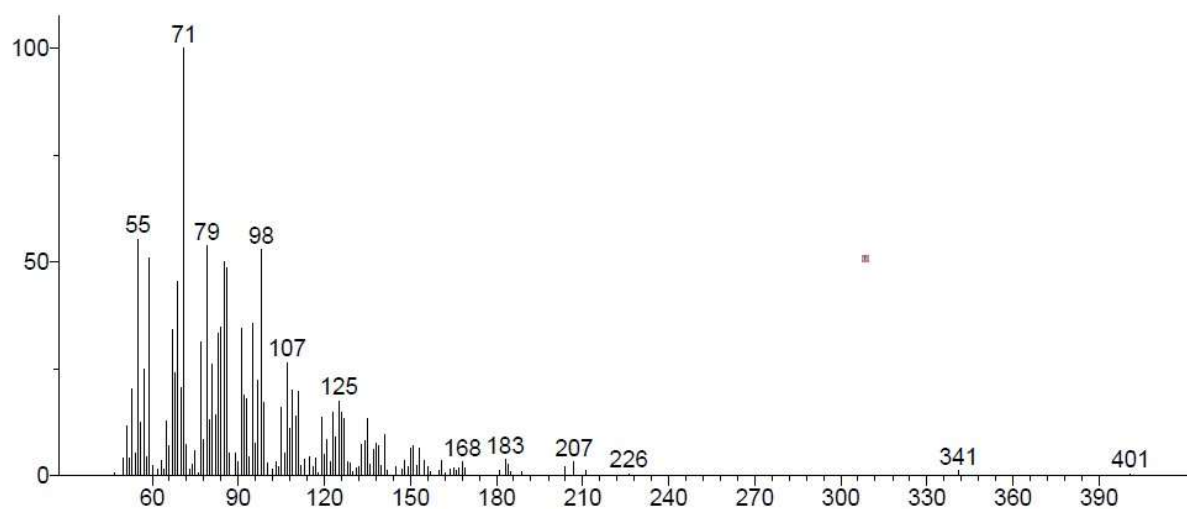
Espectro de massas sugerido pela biblioteca NIST para composto 38.

60. 1-acetil-2-(1-hidroxietil)-ciclohexeno

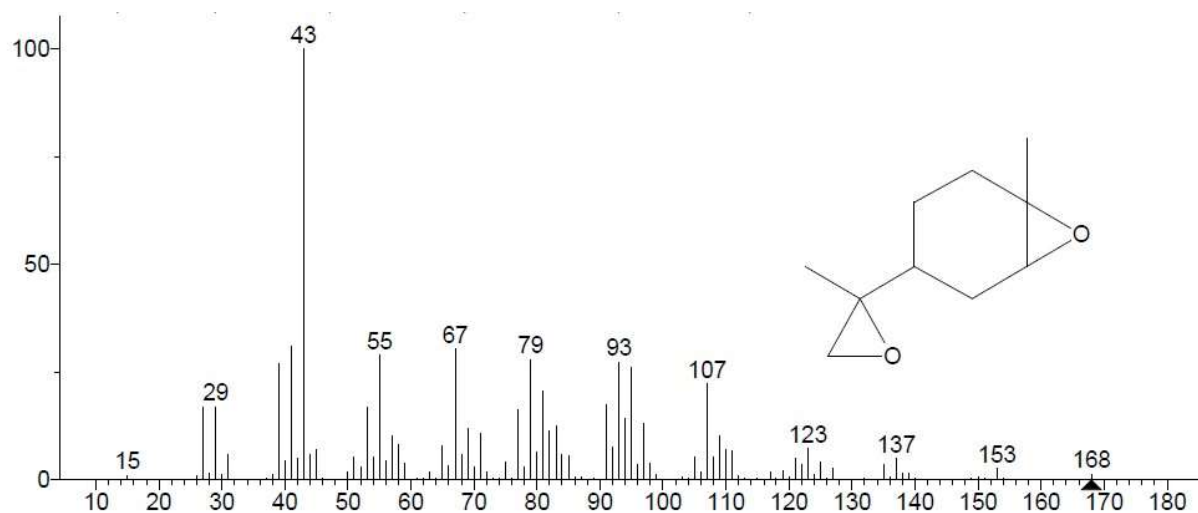
Espectro de massas obtido experimentalmente para 60.



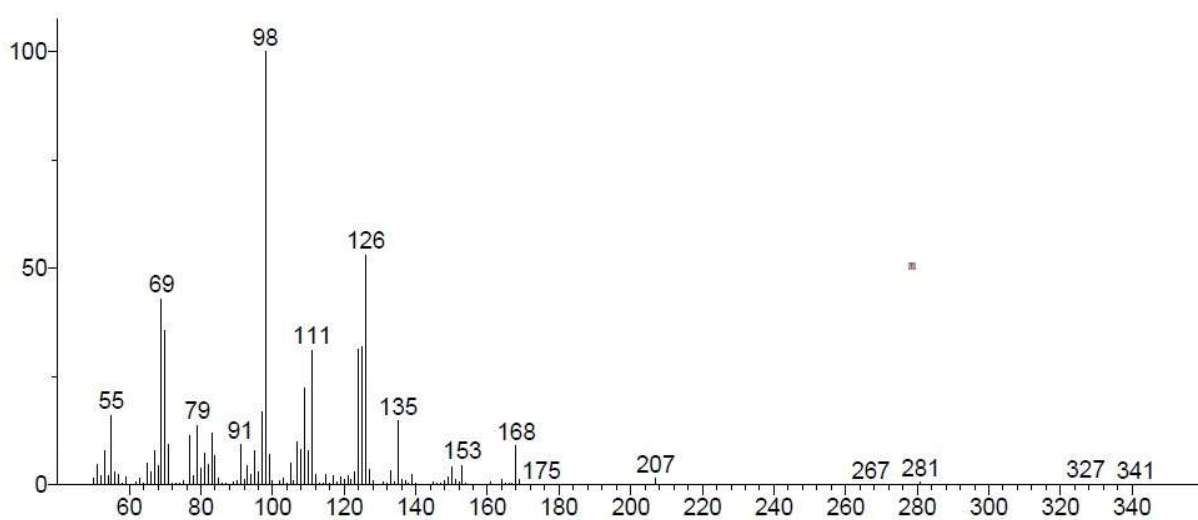
Espectro de massas sugerido pela biblioteca NIST para composto 60.

61. α -limonene diepóxido

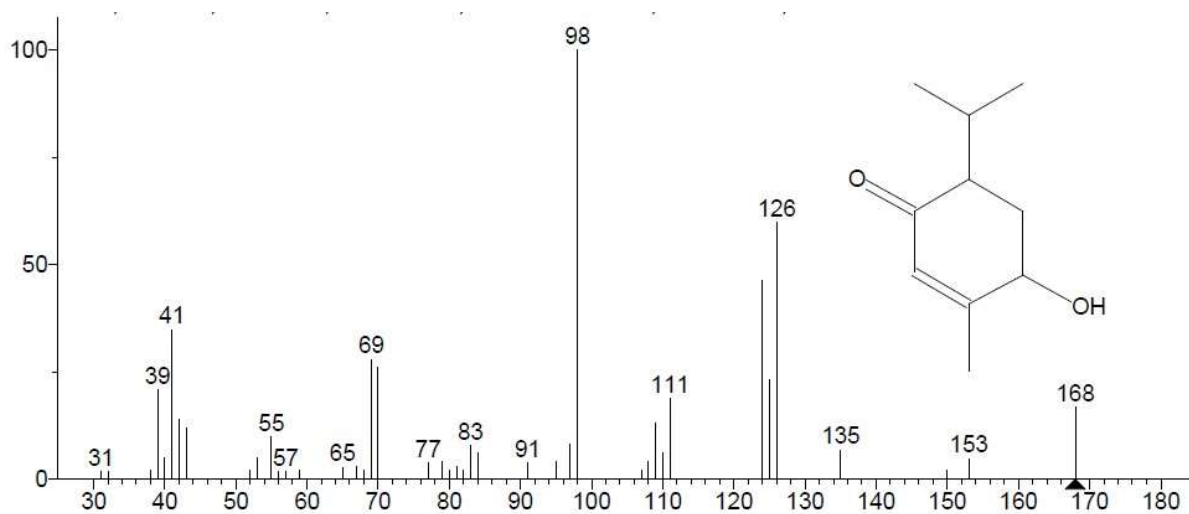
Espectro de massas obtido experimentalmente para 61.



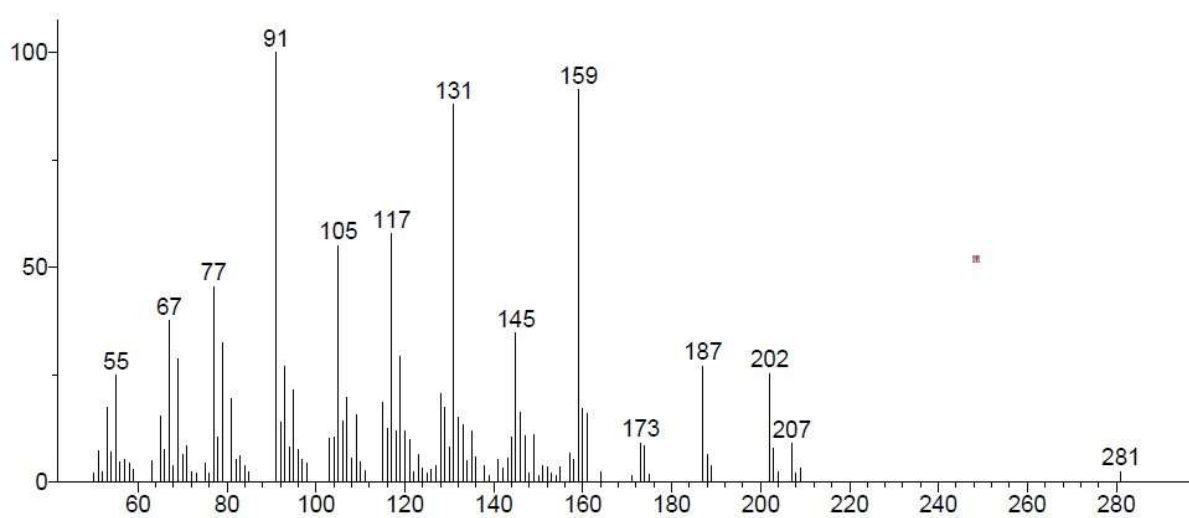
Espectro de massas sugerido pela biblioteca NIST para composto 61.

68. 4-hidroxi-6-isopropil-3-metilciclohex-2-enona

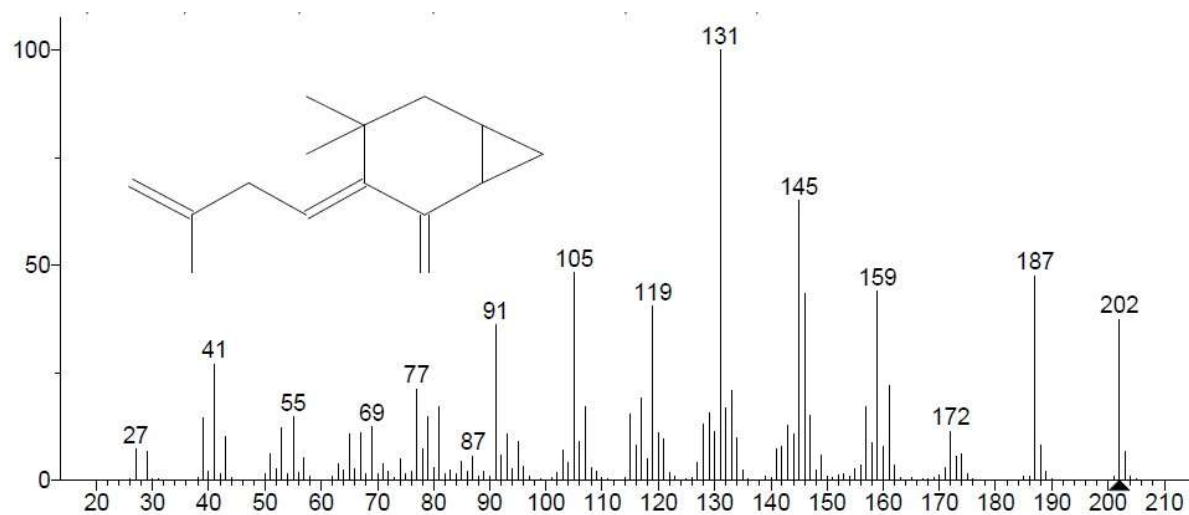
Espectro de massas obtido experimentalmente para 68.



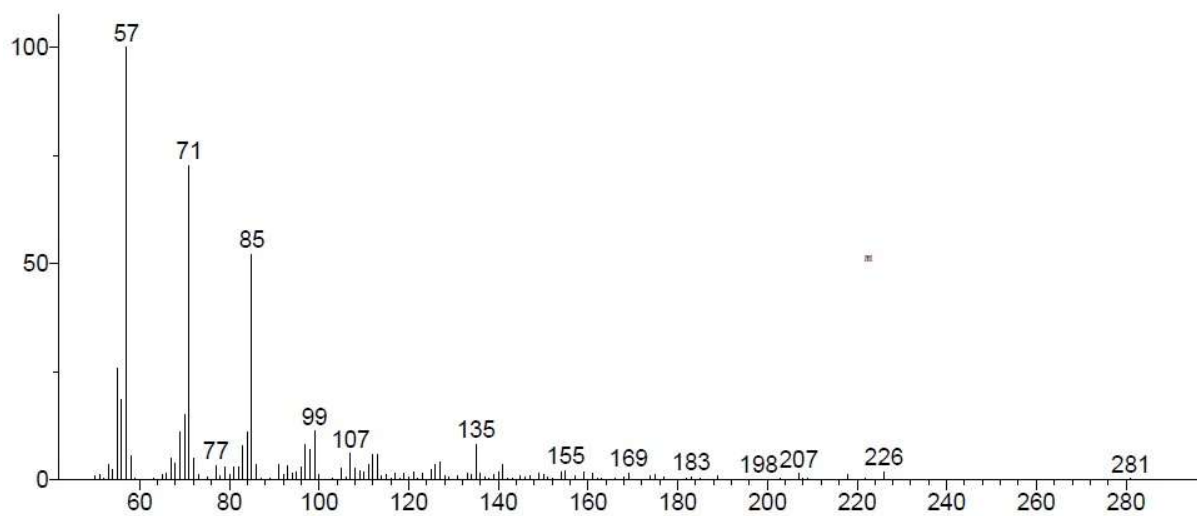
Espectro de massas sugerido pela biblioteca NIST para composto 68.

71. 4,4-dimetil-3-(3-metilbut-3-enilideno)-2-metilenebicyclo[4.1.0]heptano

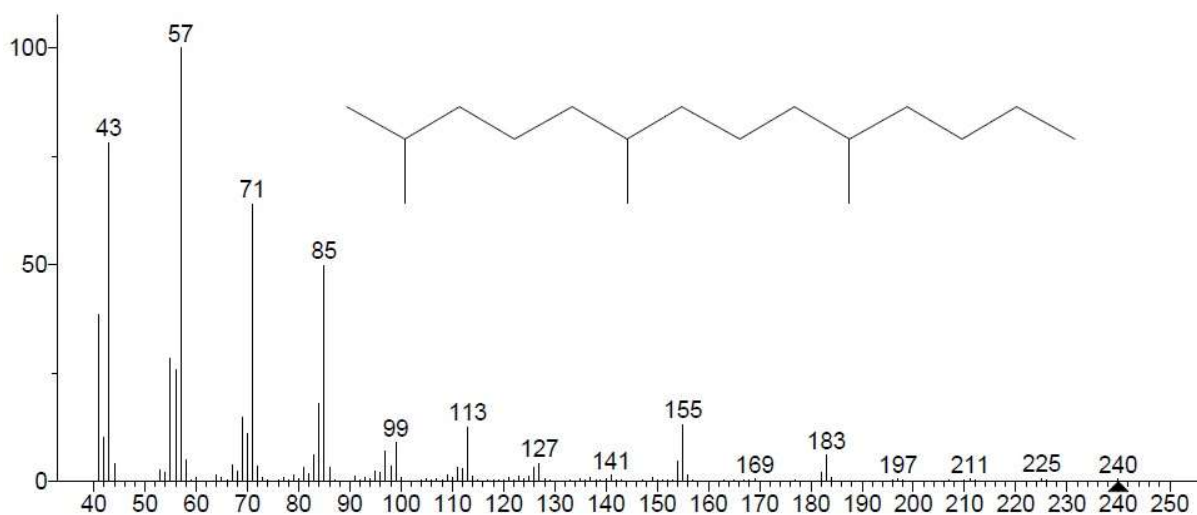
Espectro de massas obtido experimentalmente para 71.



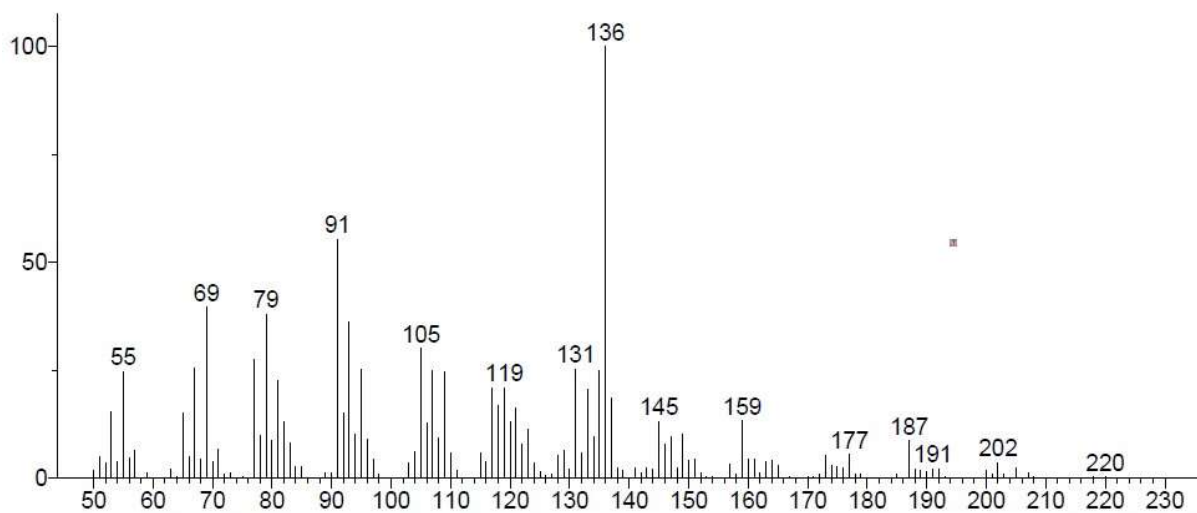
Espectro de massas sugerido pela biblioteca NIST para composto 71.

74. 2,6,10-trimetil-tetradecano

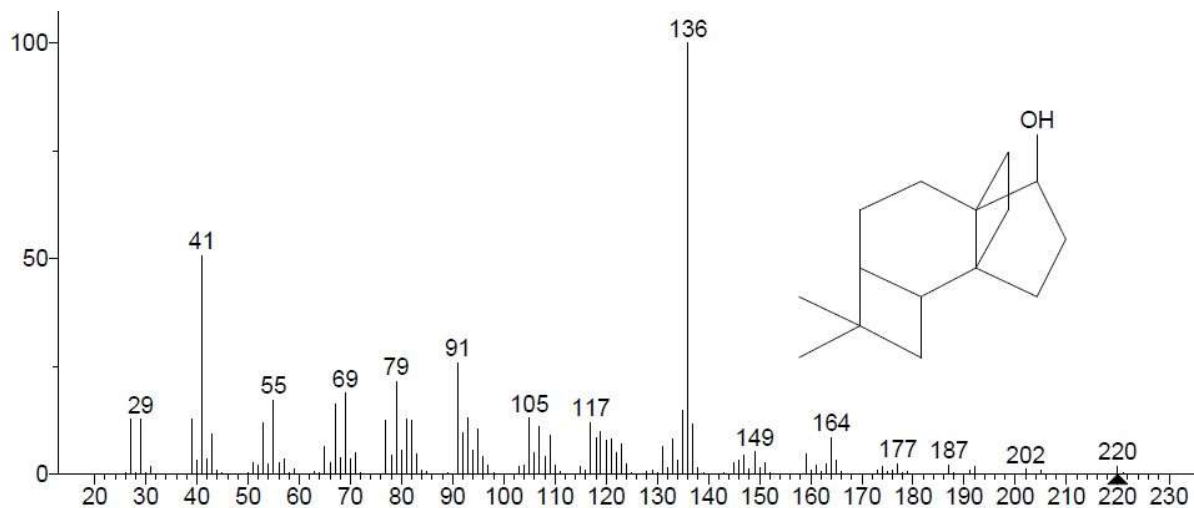
Espectro de massas obtido experimentalmente para 74.



Espectro de massas sugerido pela biblioteca NIST para composto 74.

75. 4,4-dimetil-tetraciclo[6.3.2.0(2,5).0(1,8)]tridecan-9-ol

Espectro de massas obtido experimentalmente para 75.

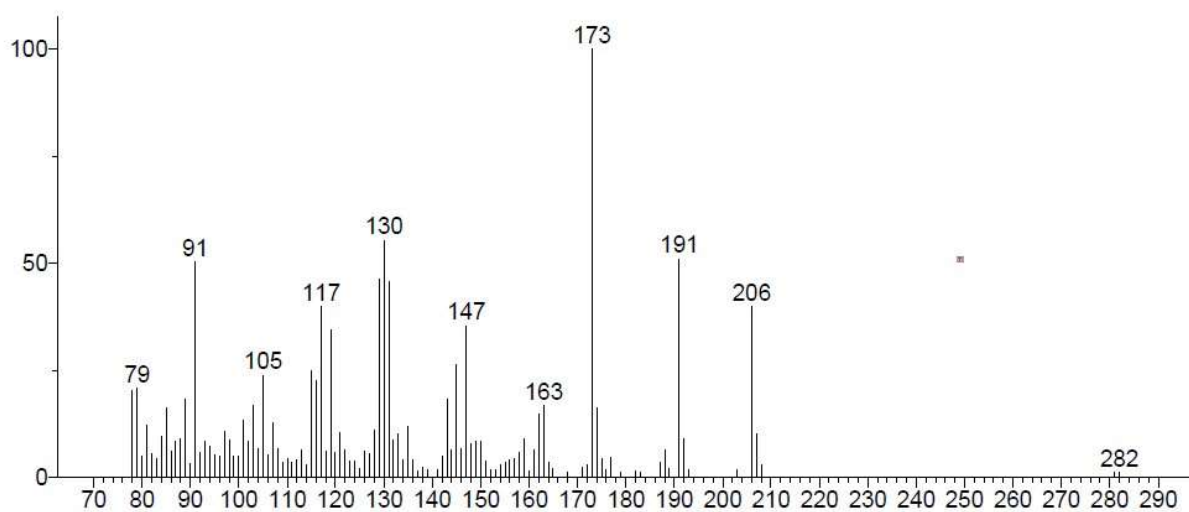
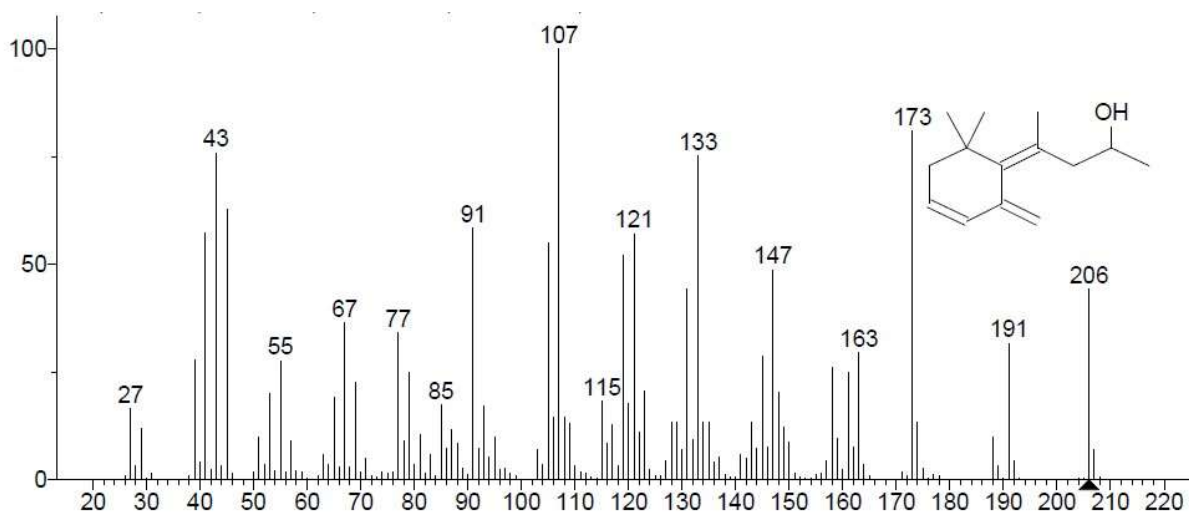


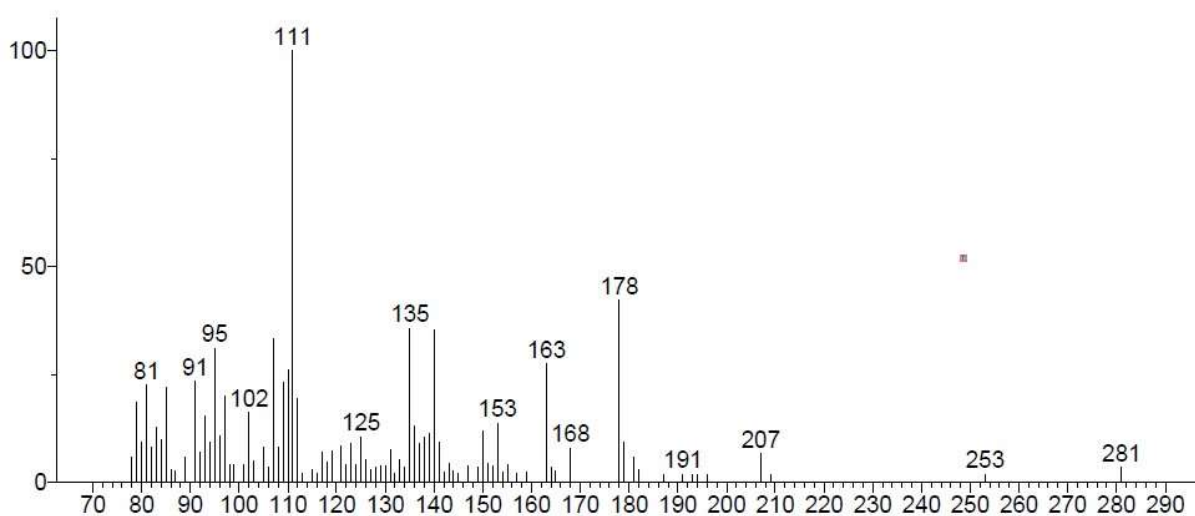
Espectro de massas sugerido pela biblioteca NIST para composto 75.

ANEXO 2

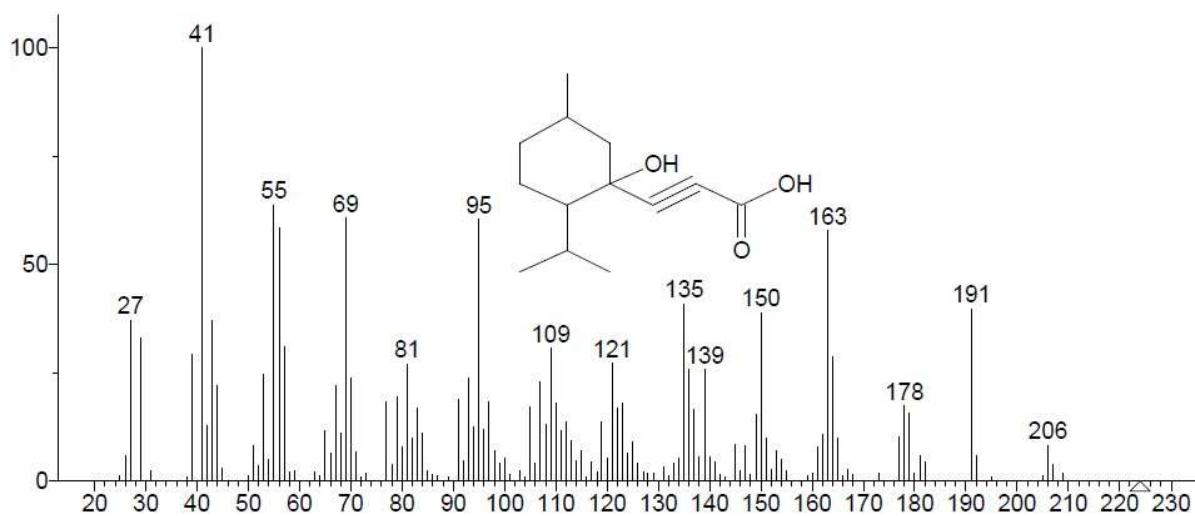
ESPECTROS DE MASSA E PROPOSTAS DE FRAGMENTAÇÃO PARA OS
COMPOSTOS ORGÂNICOS NÃO VOLÁTEIS

81. 4-(6,6-dimetil-2-metilnecicloex-3-enilideno)pentan-2-ol

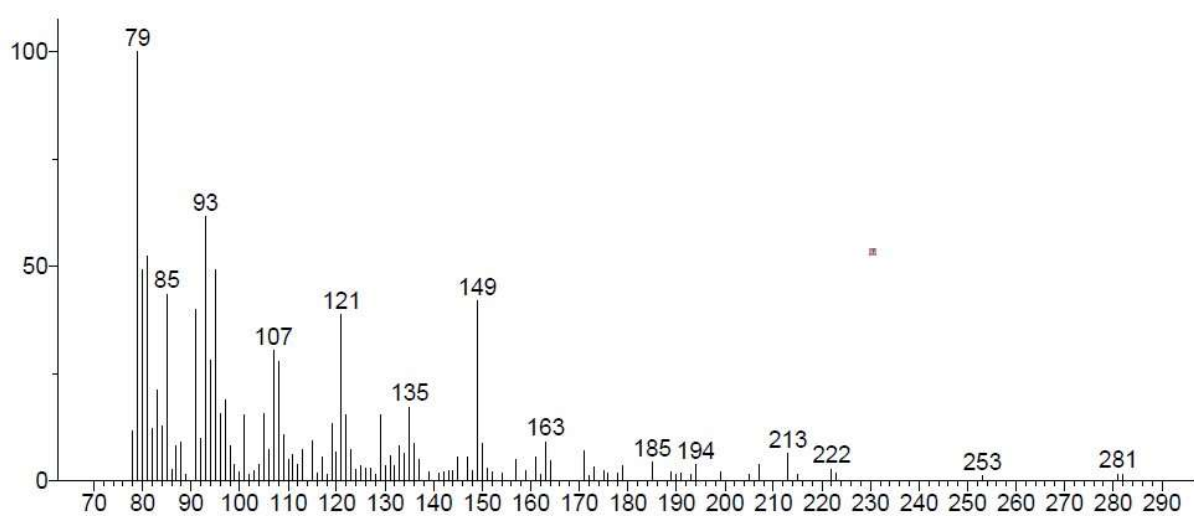
*Espectro de massas obtido experimentalmente para 81.**Espectro de massas sugerido pela biblioteca NIST para composto 81.*

82. ácido 3-(1-hidroxi-2-isopropil-5-metilcicloexil)-propíico

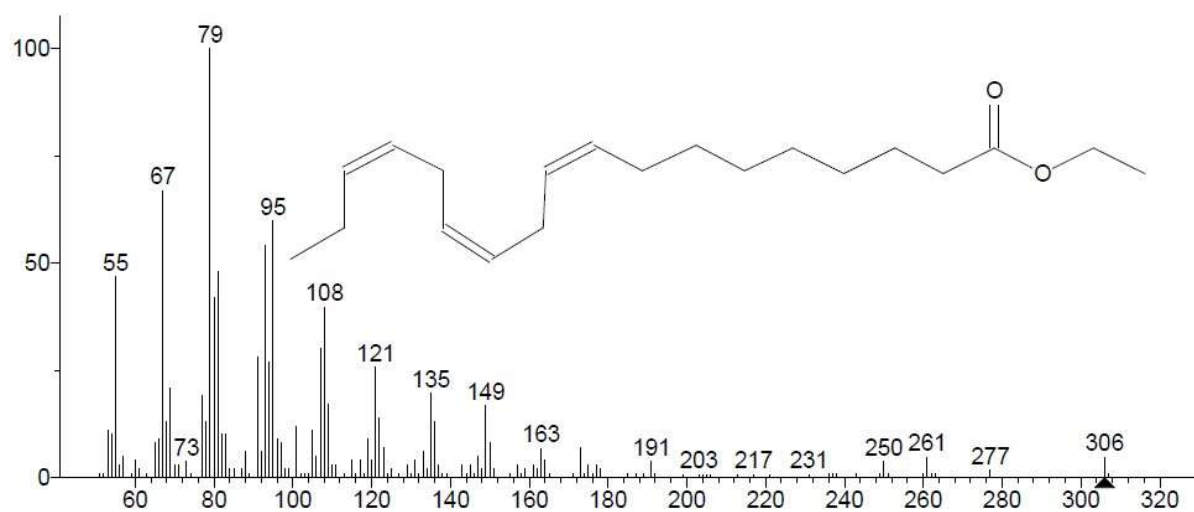
Espectro de massas obtido experimentalmente para 82.



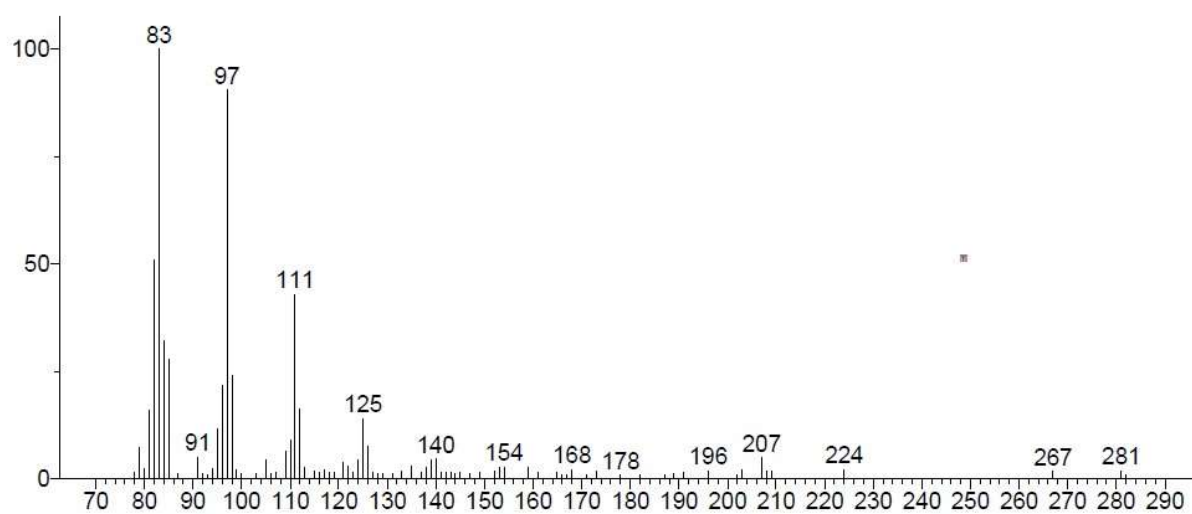
Espectro de massas sugerido pela biblioteca NIST para composto 82.

88. 9,12,15-octadecatrienoato de etila

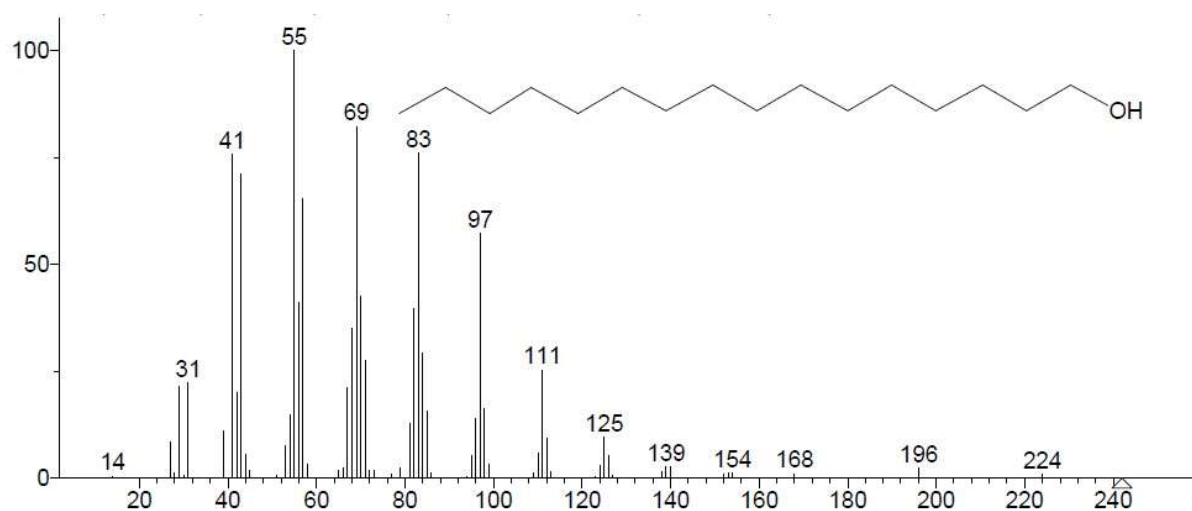
Espectro de massas obtido experimentalmente para 88.



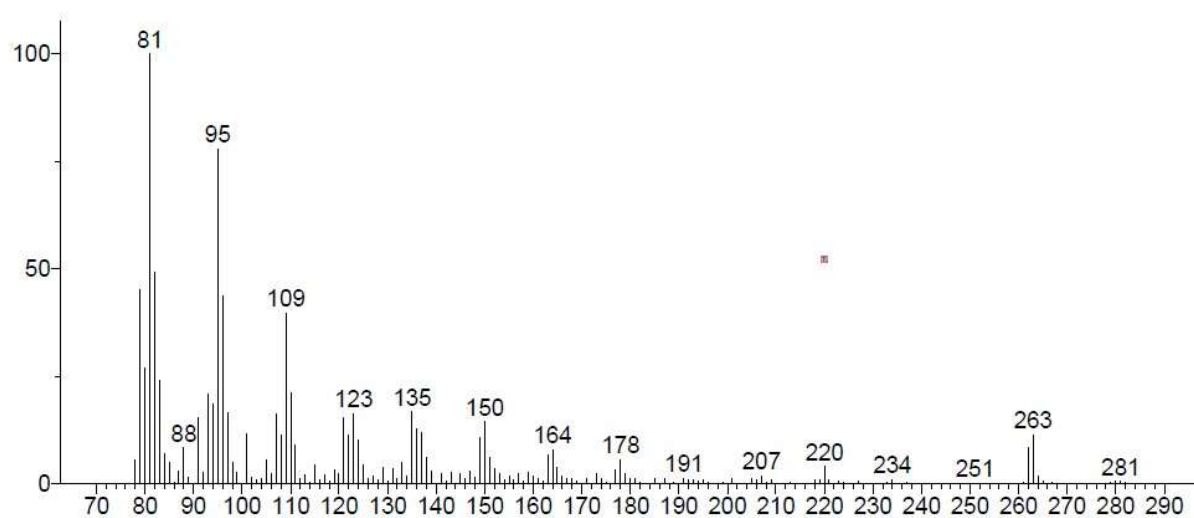
Espectro de massas sugerido pela biblioteca NIST para composto 88.

91. *trans*-9-hexadecen-1-ol

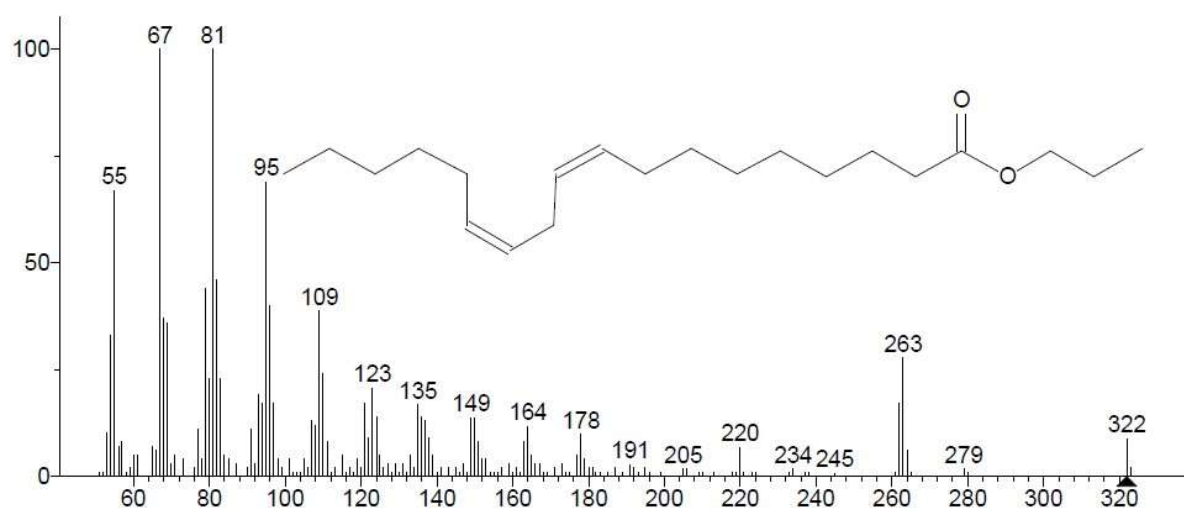
Espectro de massas obtido experimentalmente para 91.



Espectro de massas sugerido pela biblioteca NIST para composto 91.

95. linoleato de propila

Espectro de massas obtido experimentalmente para 95.



Espectro de massas sugerido pela biblioteca NIST para composto 95.