



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Paulo Roberto Ribeiro de Mesquita

**METABOLÔMICA APLICADA À IDENTIFICAÇÃO DE
BIOMARCADORES NAS ESPÉCIES FRUTÍFERAS *Eugenia uniflora* L.
E *Passiflora* spp.**

Salvador

2016

Paulo Roberto Ribeiro de Mesquita

**METABOLÔMICA APLICADA À IDENTIFICAÇÃO DE
BIOMARCADORES NAS ESPÉCIES FRUTÍFERAS *Eugenia uniflora* L.
E *Passiflora* spp.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Química da Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção do grau de Doutor em Química.

Orientador: Prof. Dr. Jailson Bittencourt de Andrade

Salvador

2016

Sistema de Bibliotecas – UFBA

Mesquita, Paulo Roberto Ribeiro de
Metabolômica aplicada à identificação de biomarcadores nas
espécies frutíferas *Eugenia uniflora* L. e *Passiflora* spp. / Paulo Roberto
Ribeiro de Mesquita – Salvador, 2016.
163 f. : il

Orientador: Jailson Bittencourt de Andrade.
Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Química) –
Universidade Federal da Bahia, Instituto de Química, 2016.

1. Metabólitos. 2. Maracujá. 3. Pitangueira. I. Andrade, Jailson
Bittencourt de. II. Título.

TERMO DE APROVAÇÃO


PAULO ROBERTO RIBEIRO DE MESQUITA

“Metabolômica aplicada à identificação de biomarcadores nas espécies frutíferas *Eugenia Uniflora* L. E *Passiflora* spp.”


Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Química, Universidade Federal da Bahia, pela seguinte banca examinadora:

Prof. Dr. Jailson Bittencourt de Andrade 
Doutorado em Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC-Rio)
Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Jorge Maurício David 
Doutorado em Química, Universidade de São Paulo (USP)
Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Vânia Palmeira Campos 
Doutorado em Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA)
Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Fábio Santos de Oliveira 
Doutorado em Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA)
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

Prof. Dr. Onildo Nunes de Jesus 
Doutorado em Agronomia, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ)
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa

Salvador, 30 de setembro de 2016.

*À minha tia Maroca e
Minha bisavó Hilda,
Por lutarem pelo meu futuro desde o começo...
(in memoriam)*

Ao Prof. Antônio Celso Spinola Costa,

*Pelo grande exemplo de uma vida dedicada à Ciência e que
Acabou por influenciar várias gerações de químicos.
E por me mostrar que uma única pessoa pode
Fazer toda a diferença...*

AGRADECIMENTOS

Inicialmente a Deus, por ter me dado a oportunidade de trilhar o honroso caminho da Ciência e de aprender com grandes mestres.

Aos meus familiares, por toda a ajuda nos momentos difíceis e por sempre acreditarem no meu potencial, são os verdadeiros responsáveis por todas as minhas conquistas.

À minha namorada Pamyra Melo, pelo apoio e companheirismo nos momentos difíceis.

Ao Prof. Jailson Bittencourt de Andrade, pelos valiosos ensinamentos que carregarei por toda a vida, pelo exemplo, confiança, estímulo e, acima de tudo, por me ensinar que é possível transformar grandes sonhos em realidade...

Ao Prof. Frederico M. Rodrigues (Fred), por todo apoio, confiança e orientação ao longo de todo este caminho para me tornar um grande químico, cientista e, antes de tudo, um ser humano melhor.

Aos pesquisadores da Embrapa, Cristiane de Jesus Barbosa, Antônio Nascimento, Marilene Fancelli e Onildo Nunes pelas enriquecedoras colaborações científicas realizadas nos últimos anos.

Aos pesquisadores da EBDA, Ana Rita Bautista, Marilídio Jacobina e Lucimário Bastos pela amizade e colaborações.

Aos professores Pedro Afonso, Wilson Lopes, Luciana Almeida, Sérgio Ferreira, Jorge David, Maurício Victor, Silvio Cunha, Adelaide Viveiro, Maria das Graças Korn, Vânia Campos, Iara Bravo, Roberto Rivelino e Leonardo Teixeira, com os quais pude aprender muito durante todos esses anos.

Aos meus amigos e parceiros de muitas batalhas científicas, Fábio Neves dos Santos e Jairo Torres Magalhães Júnior, pelo companheirismo e constante motivação ao longo dos últimos anos.

Aos amigos da FAMAM, especialmente Tânia Sousa, Odailson Paz, José Jorge, Antonio Anderson, Carlos Danilo, Marcos Passos, André Reis e Tatiane Couto pela convivência e aprendizado proporcionado nos últimos anos.

Por último, e não menos importante, a todos os meus amigos que me acompanharam de perto ou de longe, mas que nunca deixaram de torcer e acreditar que eu pudesse realizar meus sonhos...

*“Hoje eu estou certo de que nós somos os senhores do nosso destino;
de que a tarefa que foi colocada diante de nós não está acima das
nossas forças; de que suas dores e provações não estão acima da nossa
resistência. Enquanto tivermos fé na nossa causa e um desejo
indestrutível de vencer, a vitória não nos será negada.”*

Winston Churchill

MESQUITA, Paulo Roberto Ribeiro de. Metabolômica aplicada à identificação de biomarcadores nas espécies frutíferas *Eugenia uniflora* L. e *Passiflora* spp. 163 f. il. 2016. Tese (Doutorado) - Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2016.

RESUMO

O comércio de frutas tropicais, principalmente das regionais e exóticas, apresenta-se como uma grande oportunidade para produtores e outros profissionais brasileiros. No entanto, a sua comercialização tem crescido aquém das expectativas devido, em certa parte, à necessidade de maior fomento a pesquisas relacionadas a estas espécies frutíferas e seus possíveis produtos derivados. Entre as diversas abordagens que estão sendo estudadas na área agrícola, se destacam a caracterização dos metabólitos presentes nas diferentes espécies de plantas de interesse econômico, o entendimento do papel biológico dos mesmos e possíveis alterações neste metaboloma gerados por ataques de diferentes tipos de patógenos. Este trabalho teve como objetivo caracterizar os metabólitos presentes na pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) e diferentes tipos de maracujazeiros (*Passiflora* spp.), e avaliar possíveis mudanças no perfil destes compostos. Foram determinados os perfis de compostos orgânicos voláteis (COVs), extraídos de folhas de *E. uniflora* de plantas que apresentavam diferentes biotipos de cor dos seus frutos (laranja, vermelho ou roxo), coletadas em diferentes regiões da Bahia. Os compostos foram extraídos e identificados através da técnica HS-SPME/GC-MS e o perfil das amostras foi avaliado através de técnicas de análise multivariada (PCA e HCA). Através das técnicas aplicadas foi possível identificar 33 compostos nas plantas com cada biotipo de cor de fruto e discriminar entre os três grupos de amostras com base neste perfil de metabólitos. Também foram extraídos e caracterizados, utilizando a técnica HS-SPME/GC-MS, os perfis de COVs de cinco espécies do gênero *Passiflora*: *P. edulis*, *P. cincinnata*, *P. maliformis*, *P. gibertii* e *P. setacea*. Em seguida avaliou-se alterações no perfil de COVs destas espécies após infecção pelo *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV). Blocos de 4 plantas sadias e inoculadas com o CABMV foram mantidas em casa de vegetação e fitotron, sob condições controladas. Também foram avaliadas mudanças no perfil de compostos em *P. cincinnata* até o 28º dia após a inoculação com o CABMV. Foram identificados 43 COVs nas cinco espécies de *Passiflora* e a utilização das técnicas de análise multivariada (PCA, PLS-DA e HCA) permitiu discriminar entre as amostras sadias e infectadas pelo CABMV nas diferentes espécies, através do seu perfil de metabólitos. Além disso, foi possível identificar potenciais biomarcadores de infecção ao CABMV comuns e específicos para cada uma das cinco espécies. Ao avaliar a infecção de plantas da espécie *P. cincinnata* em diferentes períodos, se verificou que a partir de 3 dias de inoculação já é possível distinguir claramente o perfil das amostras infectadas comparado ao das amostras sadias. A abordagem metabolômica utilizada neste trabalho possibilitou identificar diferentes tipos de biomarcadores, tanto de espécies de *Passiflora* quanto prováveis variedades de *E. uniflora* para estudos de quimiotaxonomia, além de metabólitos sinalizadores de infecção pelo CABMV em *Passiflora* spp.

Palavras-chave: Metabólitos. HS-SPME/GC-MS. *Passiflora* spp. *Eugenia uniflora*.

MESQUITA, Paulo Roberto Ribeiro de. Metabolomics applied to the identification of biomarkers in fruit of species *Eugenia uniflora* L. and *Passiflora spp.* 163 f. il. 2016. Doctoral thesis- Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2016.

ABSTRACT

The trading of regional and exotic tropical fruits can be presented as a great opportunity for producers and other Brazilian professionals. However, their marketing has grown short of expectations due to some part to the need for higher encouragement of research related to these fruit species and its possible derivatives. Among the various approaches being studied in agriculture, stand characterization of metabolites present in different plant species of economic interest, understanding of the biological role of these and possible changes in the metabolome of different types generated by pathogen attacks. This study aimed to characterize the metabolites present in the species *Eugenia uniflora* L. and species of *Passiflora*, and evaluate possible changes in the profile of these compounds. It was determined the profiles of VOCs extracted from *E. uniflora* leaves of plants showing different color biotypes of its fruits (orange, red or purple), collected in different regions of Bahia. The compounds were extracted by HS-SPME/GC-MS technique and the profile of the samples was evaluated using multivariate analysis (PCA and HCA). Through the techniques applied were identified 33 compounds in plants with each fruit color biotype and discriminate between the three groups of samples based on this metabolite profile. Also were characterized using the HS-SPME/GC-MS technique, the VOC profiles of five species of the genus *Passiflora*: *P. edulis*, *P. cincinnata*, *P. maliformis*, *P. gibertii* and *P. setacea*. Then we evaluated changes in VOC profile of these species after infection by Cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV). Blocks of four healthy and inoculated plants with CABMV were kept in a greenhouse and phytotron, under controlled conditions. They evaluated changes in compounds profile in *P. cincinnata* until the 28th day after inoculation with CABMV. Were identified 43 VOCs in five species of *Passiflora spp.* and use of multivariate analysis (PCA, PLS-DA and HCA) allowed the discrimination between healthy and infected with CABMV samples in different species, through its metabolite profile. Moreover, it was possible to identify potential biomarkers of infection CABMV the common and specific to each of the five species. When evaluating infection of plants of the species *P. cincinnata* at different times, it was found that from 3 days of inoculation is already possible to distinguish the profile of the infected sample compared to the healthy samples. The metabolomic approach used in this study enabled us to identify different types of biomarkers, both species of *Passiflora spp.* as likely varieties of *E. uniflora* for chemotaxonomy studies, besides flags metabolites of infection by CABMV in *Passiflora spp.*

Keywords: Metabolites. HS-SPME/GC-MS. *Passiflora spp.* *Eugenia uniflora*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Fluxo de informação genética que ocorre na célula dos organismos.	25
Figura 2	Complexidade das diferentes ômicas quanto à sua dimensão quantitativa e a escala de tempo de processos dentro de um organismo.	26
Figura 3	Publicações envolvendo os termos “ <i>metabolomics</i> ” e “ <i>plants</i> ” contidas na base <i>Web of Science</i> no período 2000-2016: a) quantidade de publicações b) quantidade de citações.	28
Figura 4	Rotas metabólicas na produção de metabólitos secundários das plantas.	30
Figura 5	Modificações moleculares e fisiológicas que podem ocorrer durante uma interação planta-patógeno.	31
Figura 6	Etapas da pesquisa envolvendo metabolômica de plantas.	34
Figura 7	Método de extração por LLE para obtenção de metabólitos nas fases aquosa e orgânica, além da remoção de proteínas.	43
Figura 8	Levantamento bibliográfico de artigos de pesquisa publicados em metabolômica usando uma consulta de pesquisa com as palavras-chave “ <i>metabolom *</i> ou <i>metabonom*</i> ” no título entre 1998-2012 via <i>Web of Knowledge</i> 5.8, excluindo revisões e resumos de trabalhos.	45
Figura 9	Aplicabilidade das técnicas hífenadas com MS em função da polaridade e massa molecular dos compostos, com diferentes fontes de ionização (EI, APCI, APPI, ESI, MALDI).	49
Figura 10	Estratégias de análise e interpretação de dados metabolômicos.	50
Figura 11	Árvore da espécie <i>Eugenia uniflora</i> L.	60
Figura 12	Principais formatos das folhas de <i>E. uniflora</i> a) ovalada b) lanceolada c) elíptica.	61
Figura 13	Plantas de <i>E. uniflora</i> com diferentes biotipos de frutos (A) laranja (B) vermelho (C) roxo.	65
Figura 14	Cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas (GC-MS).	67
Figura 15	Influência do tipo de revestimento da fibra de SPME na eficiência de extração considerando: (A) área total dos picos e (B) número de picos detectados.	69
Figura 16	Gráfico de Pareto para avaliação da significância dos fatores no planejamento factorial completo 2 ² .	70
Figura 17	Superfície de resposta obtida através do planejamento composto central utilizando o seguinte modelo quadrático: $R = 29861t^2 - 761889T^2 + 5130743t + 82481475T - 1812109508$ na otimização das condições (temperatura (T), °C e tempo (t), min) para extração dos voláteis de folhas de <i>E. uniflora</i> por HS-SPME.	71
Figura 18	Cromatogramas característicos da análise HS-SPME/GC-MS de COVs de folhas de <i>E. uniflora</i> com biotipos de cores de frutos (A) laranja (B) vermelha e (C) roxa (para identificação dos picos ver Tabela 6).	73
Figura 19	Variação percentual (%) dos COVs identificados nas amostras de folhas dos biotipos de cores de frutos distribuídos por classes de compostos.	75
Figura 20	Gráfico de <i>scores</i> 3D do PCA obtido através do perfil de COVs das amostras de folhas de <i>E. uniflora</i> dos biotipos vermelho, laranja e roxo.	77
Figura 21	Gráfico de <i>loadings</i> 3D do PCA obtido através do perfil de COVs das	78

	amostras de folhas de <i>E. uniflora</i> dos biotipos vermelho, laranja e roxo (para identificação dos compostos ver Tabela 6).	
Figura 22	Dendograma do HCA associado ao mapa de calor para o perfil de COVs presentes nas amostras de <i>E. uniflora</i> dos biotipos vermelho, laranja e roxo.	79
Figura 23	Planta de maracujá-amarelo (<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> Deg).	82
Figura 24	Sintomas do endurecimento dos frutos em <i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> : a e b) folhas exibindo mosaico, bolhosidades e deformações; c e d) frutos endurecidos e com manchas na casca.	85
Figura 25	Fitotron utilizado durante a avaliação da infecção pelo CABMV em <i>P. cincinnata</i> a) visão geral b) controle de condições climáticas e c) plantas acondicionadas.	88
Figura 26	Delineamento experimental do ensaio biológico, com representação esquemática a) do bloco contendo plantas sadias (CN.) e inoculadas com o CABMV (Inoc.) b) par de folha inoculado com o vírus e o retirado para análise.	89
Figura 27	Sistema LC-Q-TOF/MS utilizado para identificação dos metabólitos em amostras de <i>P. cincinnata</i> .	92
Figura 28	Influência do tipo de revestimento da fibra de SPME na eficiência de extração considerando: (A) número de picos detectados e (B) área total dos picos.	94
Figura 29	Gráfico de Pareto para o planejamento fatorial completo 2 ³ .	96
Figura 30	Superfície de resposta obtida através do planejamento composto central para otimização das condições de extração dos compostos voláteis em folhas de <i>P. edulis</i> por HS-SPME.	98
Figura 31	Cromatogramas característicos da análise HS-SPME/GC-MS de COVs de folhas das espécies sadias (SAD) e infectadas pelo CABMV (INF) a) <i>P. edulis</i> (SAD) b) <i>P. edulis</i> (INF) c) <i>P. cincinnata</i> (SAD) d) <i>P. cincinnata</i> (INF) e) <i>P. maliforme</i> (SAD) f) <i>P. maliforme</i> (INF) g) <i>P. gilberti</i> (SAD) h) <i>P. gilberti</i> (INF) i) <i>P. setacea</i> (SAD) j) <i>P. setacea</i> (INF).	101
Figura 32	Gráfico de <i>scores</i> 3D por PCA obtido através do perfil de COVs das amostras de folhas das cinco espécies de <i>Passiflora</i> spp. sadias.	104
Figura 33	Gráfico de <i>loadings</i> 2D por PCA obtido através do perfil de COVs das amostras de folhas das cinco espécies de <i>Passiflora</i> spp. sadias.	105
Figura 34	Mapa de calor associado ao dendograma PCA obtido através do perfil de COVs das amostras de folhas das cinco espécies de <i>Passiflora</i> spp. sadias.	106
Figura 35	Gráfico de <i>scores</i> 3D por PCA obtido através do perfil de COVs das amostras de folhas das cinco espécies de <i>Passiflora</i> spp. sadias e infectadas pelo CABMV.	108
Figura 36	Gráfico de <i>scores</i> VIP (<i>variable importance in projection</i>) obtido através do perfil de COVs das amostras de folhas das cinco espécies de <i>Passiflora</i> spp. sadias e infectadas pelo CABMV.	109
Figura 37	Box-plot das amostras de folhas das cinco espécies de <i>Passiflora</i> spp. sadias e infectadas pelo CABMV para os compostos a) 1-octen-3-ol b) decanal e c) β -ciclocitral (teste T com $p \leq 0,05$).	11
Figura 38	Mapa de calor associado ao dendograma PCA obtido através do perfil de COVs das amostras de folhas das cinco espécies de <i>Passiflora</i> spp. infectadas pelo CABMV.	111

Figura 39	Gráfico de <i>scores</i> por OPLS-DA obtido através do perfil de COVs das amostras de folhas de <i>P. edulis</i> sadias e infectadas pelo CABMV.	112
Figura 40	Gráfico de <i>scores</i> VIP (<i>variable importance in projection</i>) obtido através do perfil de COVs das amostras de <i>P. edulis</i> sadias e infectadas pelo CABMV.	113
Figura 41	Box-plot das amostras de folhas das cinco espécies de <i>P. edulis</i> sadias e infectadas pelo CABMV para os compostos a) salicilato de metila b) tetradecano e c) (E)-2-nonenal (teste T com $p \leq 0,05$).	114
Figura 42	Gráfico de <i>scores</i> por OPLS-DA obtido através do perfil de COVs das amostras de folhas de <i>P. cincinnata</i> sadias e infectadas pelo CABMV.	115
Figura 43	Gráfico de <i>scores</i> VIP (<i>variable importance in projection</i>) obtido através do perfil de COVs das amostras de <i>P. cincinnata</i> sadias e infectadas pelo CABMV.	116
Figura 44	Box-plot das amostras de folhas das cinco espécies de <i>P. cincinnata</i> sadias e infectadas pelo CABMV para os compostos a) undecanal b) 1-nonanol e c) 1-octanol (teste T com $p \leq 0,05$).	116
Figura 45	Gráfico de <i>scores</i> por OPLS-DA obtido através do perfil de COVs das amostras de folhas de <i>P. gilberti</i> sadias e infectadas pelo CABMV.	116
Figura 46	Gráfico de <i>scores</i> VIP (<i>variable importance in projection</i>) obtido através do perfil de COVs das amostras de <i>P. gilberti</i> sadias e infectadas pelo CABMV.	118
Figura 47	Box-plot das amostras de folhas das cinco espécies de <i>P. gilberti</i> sadias e infectadas pelo CABMV para os compostos a) 2-etil-1-hexanol b) octil éter e c) benzenoacetaldeído (teste T com $p \leq 0,05$).	119
Figura 48	Gráfico de <i>scores</i> por OPLS-DA obtido através do perfil de COVs das amostras de folhas de <i>P. maliforme</i> sadias e infectadas pelo CABMV.	119
Figura 49	Gráfico de <i>scores</i> VIP (<i>variable importance in projection</i>) obtido através do perfil de COVs das amostras de <i>P. maliforme</i> sadias e infectadas pelo CABMV.	120
Figura 50	Box-plot das amostras de folhas das cinco espécies de <i>P. gilberti</i> sadias e infectadas pelo CABMV para os compostos a) benzaldeído b) (E)-2-hexenal e c) (E)-2-octenal (teste T com $p \leq 0,05$).	121
Figura 51	Gráfico de <i>scores</i> por OPLS-DA obtido através do perfil de COVs das amostras de folhas de <i>P. setacea</i> sadias e infectadas pelo CABMV.	121
Figura 52	Gráfico de <i>scores</i> VIP (<i>variable importance in projection</i>) obtido através do perfil de COVs das amostras de <i>P. setacea</i> sadias e infectadas pelo CABMV.	122
Figura 53	Box-plot das amostras de folhas das cinco espécies de <i>P. setacea</i> sadias e infectadas pelo CABMV para os compostos a) decana b) 1-octanol e c) 1-heptanol (teste T com $p \leq 0,05$).	123
Figura 54	Gráfico de <i>scores</i> por OPLS-DA obtido através do perfil de compostos das amostras de folhas de <i>P. cincinnata</i> inoculadas com CABMV e avaliadas nos tempos de 0, 3, 5 e 8 dias.	124
Figura 55	Gráfico de <i>scores</i> VIP (<i>variable importance in projection</i>) obtido através do perfil de COVs das amostras de <i>P. setacea</i> sadias e infectadas pelo CABMV.	124
Figura 56	Box-plot das amostras de folhas das de <i>P. cincinnata</i> inoculada com CABMV e avaliadas no tempo, para os compostos de <i>m/z</i> a) 274,2759 b)	126

- 275,2787 c) 318,3014 e d) 338,3437 (ANOVA com $p \leq 0,05$).
- Figura 57 Box-plot das amostras de folhas das de *P. cincinnata* inoculada com CABMV e avaliadas no tempo, para os compostos de *m/z* a) 437,1956 b) 416,2168 c) 387,1819 e d) 415,2134 (ANOVA com $p \leq 0,05$). 127
- Figura 58 Gráfico de *scores* por OPLS-DA obtido através do perfil de compostos das amostras de folhas de *P. cincinnata* inoculadas com CABMV e avaliadas nos tempos de 0, 3, 5, 8, 12, 20 e 28 dias. 128
- Figura 59 Gráfico de *scores* por OPLS-DA obtido através do perfil de compostos das amostras de folhas de *P. cincinnata* após 3 dias de inoculação com CABMV e tampão fosfato. 129

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Diferentes técnicas de <i>quenching</i> de acordo com o tipo de amostra.	37
Tabela 2	Solventes orgânicos utilizados para extração de metabólitos em amostras de planta.	42
Tabela 3	Níveis experimentais das variáveis avaliadas no planejamento fatorial completo 2^2 para otimização do método de extração de COVs por HS-SPME em folhas de <i>E. uniflora</i> .	65
Tabela 4	Níveis experimentais das variáveis avaliadas no desenho composto central para otimização do método de extração de COVs por HS-SPME em folhas de <i>E. uniflora</i> .	66
Tabela 5	Experimentos realizados para confirmar as condições ótimas de extração pelo método SPME estimadas através da metodologia de superfície de resposta, em condições de extrapolação.	71
Tabela 6	Composição relativa dos compostos identificados nas folhas de <i>E. uniflora</i> com diferentes biotipos de frutos através de HS-SPME/GC-MS.	74
Tabela 7	Fatores e níveis do planejamento fatorial completo 2^3 para otimização do método de extração de COVs por HS-SPME.	90
Tabela 8	Fatores e níveis avaliados na metodologia de superfície de resposta por composto central, para otimização do método de extração de COVs por HS-SPME.	91
Tabela 9	Resultados do planejamento fatorial completo 2^3 .	95
Tabela 10	Resultados do planejamento composto central.	97
Tabela 11	Avaliação da condição ótima de extração indicada pelo planejamento composto central.	99
Tabela 12	Composição relativa (%) dos COVs identificados nas espécies de <i>Passiflora spp.</i> sadias e infectadas pelo CABMV.	102
Tabela 13	Compostos identificados que mais discriminam os grupos dos diferentes tempos de inoculação.	130

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Vantagens e desvantagens associadas às técnicas analíticas empregadas em metabolômica.	46
Quadro 2	Alguns métodos quimiométricos utilizados para análise multivariada de um conjunto de dados.	51
Quadro 3	Metabólitos identificados na interação de plantas com patógenos.	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CABMV	<i>Cowpea aphid-borne mosaic virus</i>
CAR-PDMS	Carboxen-Polidimetilsiloxano
CE	Eletroforese Capilar
COV	Composto Orgânico Volátil
GC	Gas Chromatography
FMASE	Extração Soxhlet assistida por microondas focalizado
HCA	Análise de agrupamento hierárquico
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
MAE	Extração por microondas
MALDI	<i>Matrix-assisted laser desorption/ionization</i>
MS	Mass Spectrometry
OPLS-DA	Análise discriminante pelo método dos mínimos quadrados parciais ortogonais
PA	Poliacrilato
PCA	<i>Principal Component Analysis</i>
PDMS	Polidimetilsiloxano
PDMS-DVB	Polidimetilsiloxano-Divinilbenzeno
PLS-DA	Análise discriminante pelo método dos mínimos quadrados parciais
PWV	<i>Passion fruit woodiness vírus</i>
SFE	Fluido Supercrítico
SPE	Extração em Fase Sólida
SPME	Microextração em Fase Sólida
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
UPLC	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1 – Introdução	20
1	INTRODUÇÃO	21
	CAPÍTULO 2 - Fundamentação Teórica	24
2	REVISÃO DE LITERATURA	25
2.1	FUNDAMENTOS DA METABOLÔMICA	25
2.2	METABOLÔMICA DE PLANTAS	28
2.3	TÉCNICAS ANALÍTICAS EMPREGADAS NA METABOLÔMICA	33
2.3.1	Preparo de amostra	34
2.3.2	Métodos de extração	38
2.3.3	Métodos de análise	44
2.3.4	Métodos de tratamento de dados	50
2.4	APLICAÇÕES DAS TÉCNICAS ANALÍTICAS NA DETECÇÃO E MONITORAMENTO DE DOENÇAS EM PLANTAS	55
	CAPÍTULO 3 - Discriminação de biotipos de plantas da espécie <i>Eugenia uniflora</i> L. através do perfil de compostos orgânicos voláteis extraídos das folhas utilizando HS-SPME/GC-MS e análise quimiométrica	59
3.1	INTRODUÇÃO	60
3.2	OBJETIVO GERAL	63
3.2.1	Objetivos específicos	63
3.3	METODOLOGIA	64
3.3.1	Materiais e reagentes	64
3.3.2	Coletas das amostras de <i>E. uniflora</i>	64
3.3.3	Otimização do método de microextração em fase sólida (SPME)	65
3.3.4	Condições do método de extração SPME otimizado	66
3.3.5	Análise por GC-MS	66
3.3.6	Análise multivariada dos dados	67
3.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
3.4.1	Otimização da técnica de extração HS-SPME	68
3.4.2	Caracterização dos compostos voláteis de <i>Eugenia uniflora</i>	72
3.4.3	Análise multivariada	76

3.5	CONCLUSÕES	80
	CAPÍTULO 4 - Metabolômica aplicada na identificação de biomarcadores de infecção pelo Cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV) em plantas do gênero Passiflora (Passifloraceae L.)	81
4.1	INTRODUÇÃO	82
4.2	OBJETIVO GERAL	86
4.2.1	Objetivos específicos	86
4.3	METODOLOGIA	87
4.3.1	Materiais e reagentes	87
4.3.2	Ensaio biológicos e amostragem	87
4.3.2.1	<i>Ensaio biológico para determinação dos COVs</i>	87
4.3.2.2	<i>Ensaio biológico para avaliação da infecção ao longo do tempo</i>	88
4.3.3	Otimização do método de extração dos COVs por HS-SPME	89
4.3.3.1	<i>Seleção do tipo de adsorvente</i>	89
4.3.3.2	<i>Planejamento multivariado</i>	90
4.3.4	Análise por GC-MS	91
4.3.5	Extração dos metabólitos em amostras de <i>P.cincinnata</i>	92
4.3.6	Análise por LC-QTOF-MS	92
4.3.7	Análise multivariada	93
4.4	RESULTADOS	93
4.4.1	Otimização do método de extração por HS-SPME	93
4.4.2	Caracterização dos compostos voláteis de espécies do gênero <i>Passiflora</i> spp.	99
4.4.3	Análise multivariada das amostras de <i>Passiflora</i> spp.	104
4.4.4	Análise multivariada das amostras de <i>Passiflora</i> spp. infectadas pelo CABMV	107
4.4.4.1	<i>Análise multivariada das amostras de <i>P. edulis</i> sadias infectadas pelo CABMV</i>	112
4.4.4.2	<i>Análise multivariada das amostras de <i>P. cincinnata</i> sadias infectadas pelo CABMV</i>	114
4.4.4.3	<i>Análise multivariada das amostras de <i>P. gilberti</i> sadias infectadas pelo CABMV</i>	117
4.4.4.4	<i>Análise multivariada das amostras de <i>P. maliforme</i> sadias</i>	119

	<i>infectadas pelo CABMV</i>	
4.4.4.5	<i>Análise multivariada das amostras de P. setacea sadias infectadas pelo CABMV</i>	121
4.4.5	Avaliação do processo de infecção pelo CABMV em amostras de P. cincinnata	123
4.5	DISCUSSÃO	130
4.6	CONCLUSÕES	134
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	135
6	ARTIGOS PUBLICADOS NOS ÚLTIMOS 4 ANOS	136
7	CAPÍTULOS DE LIVROS PUBLICADOS NOS ÚLTIMOS 4 ANOS	137
8	RESUMOS PUBLICADOS EM ANAIS DE CONGRESSO NOS ÚLTIMOS 4 ANOS	137
9	PREMIAÇÕES CONQUISTADAS NOS ÚLTIMOS 4 ANOS	141
	REFERÊNCIAS	142

CAPÍTULO 1

Introdução

1. INTRODUÇÃO

O Brasil se coloca no cenário mundial como um dos principais países produtores e fornecedores de produtos agrícolas. Algumas características colocam o país em destaque na área de produção de alimentos, tais como possuir grande potencial de área, água e clima; aliados a investimentos realizados nas últimas décadas em tecnologia, aumento de produtividade, pesquisas aplicadas e políticas agrícolas apropriadas, o que possibilitou o crescimento anual da sua produção.

No entanto, o crescente aumento da população mundial, que deve ultrapassar 9 bilhões em 2050 segundo a ONU, traz o desafio crescente de aumentar a produção mundial de alimentos. No caso do Brasil, para evitar que o agronegócio avance sobre as florestas e biomas nativos, gerando uma perda irreparável de biodiversidade, além do elevado consumo de água, agrotóxicos e fertilizantes, é necessário aumentar ainda mais a produtividade agrícola.

Neste cenário, o comércio internacional de frutas tropicais, principalmente das exóticas, apresenta-se como uma grande oportunidade para produtores e outros profissionais brasileiros. No entanto, a sua comercialização tem crescido aquém das expectativas devido, em certa parte, à necessidade de maior fomento a pesquisas relacionadas a estas espécies frutíferas e seus possíveis produtos derivados, assim como a falta de divulgação do domínio científico e tecnológico produzido.

A ampliação do conhecimento científico e tecnologias envolvendo espécies frutíferas regionais e exóticas possibilitará a criação de novas cadeias frutícolas, enriquecidas pela agregação de valor, representada pela novidade e pelas qualidades intrínsecas de cada fruta, em termos de aparência e sabor, bem como pelo valor funcional de alimentos disputados por consumidores cada vez mais exigentes.

Além disso, o manejo de doenças e pragas que atacam as áreas produtivas agrícolas é fundamental. Existem centenas de doenças causadas por bactérias, fungos e vírus que causam grandes prejuízos à agricultura brasileira. Apesar dos grandes esforços em pesquisa e tecnologia realizados nas últimas décadas no

Brasil, principalmente pela Embrapa, ainda há muito que se avançar. Atualmente existe uma constante pressão da sociedade para aumentar a sustentabilidade de atividades produtivas, o que requer a criação de inovações e tecnologias menos agressivas ao meio ambiente e à saúde humana. Desse modo, o desenvolvimento de métodos de manejo de pragas e doenças que sejam eficientes e ao mesmo tempo mais seguros à saúde humana e ao meio ambiente se colocam como um grande desafio.

Entre as diversas abordagens que estão sendo estudadas na área agrícola, se destacam a caracterização dos metabólitos presentes nas diferentes espécies de plantas de interesse econômico, o entendimento do papel biológico dos mesmos e possíveis alterações neste metaboloma gerados por ataques de diferentes tipos de patógenos. Estas pesquisas poderão ajudar no desenvolvimento de métodos precoces de diagnóstico da infecção na planta; além do entendimento dos seus mecanismos bioquímicos de defesa, o que poderá auxiliar na seleção de genótipos mais resistentes a determinados patógenos.

Após a grande expectativa depositada nos estudos envolvendo genômica, transcriptômica e proteômica, houve de certa forma uma frustração com as limitações apresentadas por estas áreas no entendimento biológico-molecular dos organismos vivos e na real possibilidade de interferir nos mesmos (para diagnosticar e tratar doenças, por exemplo).

Neste contexto, emergiu nos últimos quinze anos a área de pesquisa chamada metabolômica, que estuda o conjunto de metabólitos produzidos em determinado organismo vivo e o entendimento de sua função biológica. O perfil de metabólitos de um organismo é o resultado final dos processos envolvendo os genes (DNA), os transcritos (RNA) e proteínas, e pode sofrer alterações em função de interferências no sistema biológico (como no aparecimento de doenças, por exemplo).

O entendimento do papel destes metabólitos nos mecanismos bioquímicos de defesa da planta e na sua interação com diferentes patógenos se apresenta como uma abordagem promissora para o manejo de doenças, e consequente aumento de produtividade da agricultura brasileira.

Desse modo, neste trabalho serão apresentados resultados de pesquisa envolvendo a aplicação da química analítica na área de metabolômica de plantas, visando a caracterização dos metabólitos das espécies frutíferas *Eugenia uniflora* L. e do gênero *Passiflora*: *P. edulis*, *P. cincinnata*, *P. maliformis*, *P. gibertii* e *P. setacea*.

A caracterização destes compostos irá fornecer informações inéditas sobre estas espécies de plantas, que poderão subsidiar estudos de quimiotaxonomia para caracterização de espécies e variedades em programas de melhoramento genético, além da elucidação do papel biológico destes metabólitos nas plantas.

Também serão avaliadas as mudanças que ocorrem no perfil de metabólitos das espécies de *Passiflora spp.* após infecção das mesmas pelo *Cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV)*, patógeno causador da doença do endurecimento dos frutos. Este estudo permitirá obter maiores informações a cerca dos diferentes mecanismos de resposta das espécies de *Passiflora spp.*, consideradas susceptíveis ou resistentes, à infecção pelo CABMV. Desse modo, o conhecimento produzido poderá auxiliar na seleção de genótipos resistentes a este patógeno, bem como embasar o desenvolvimento de métodos alternativos de diagnóstico do vírus nestas plantas.

CAPÍTULO 2

Fundamentação Teórica

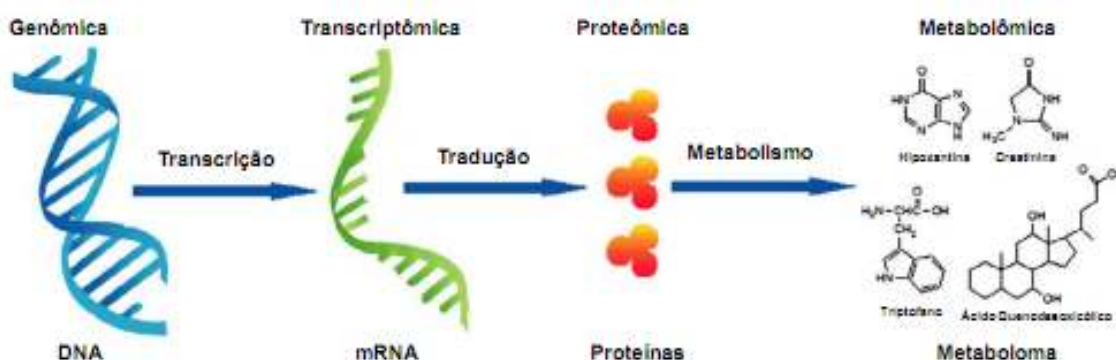
2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 FUNDAMENTOS DA METABOLÔMICA

Em 1990 o Departamento de Energia do Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos iniciou o projeto Genoma Humano, que impulsionou o desenvolvimento da genômica, e como consequência, transcriptômica e proteômica. Na era genômica visava-se conhecer os mecanismos de funcionamento celular em nível molecular pelo sequenciamento do DNA.

Apesar dos avanços, o conhecimento das sequências de todos os genes de muitos organismos não foi suficiente para compreender suas funções, sendo necessária a análise do nível de expressão dos genes (transcriptoma), tradução de proteínas (proteoma) e metabólitos, sendo a análise desse último processo conhecida hoje como metabolômica (GOODACRE, 2005). Os processos até então citados, de fluxo de informação genética de uma célula, encontram-se ilustrados na Figura 1.

Figura 1. Fluxo de informação genética que ocorre na célula dos organismos.

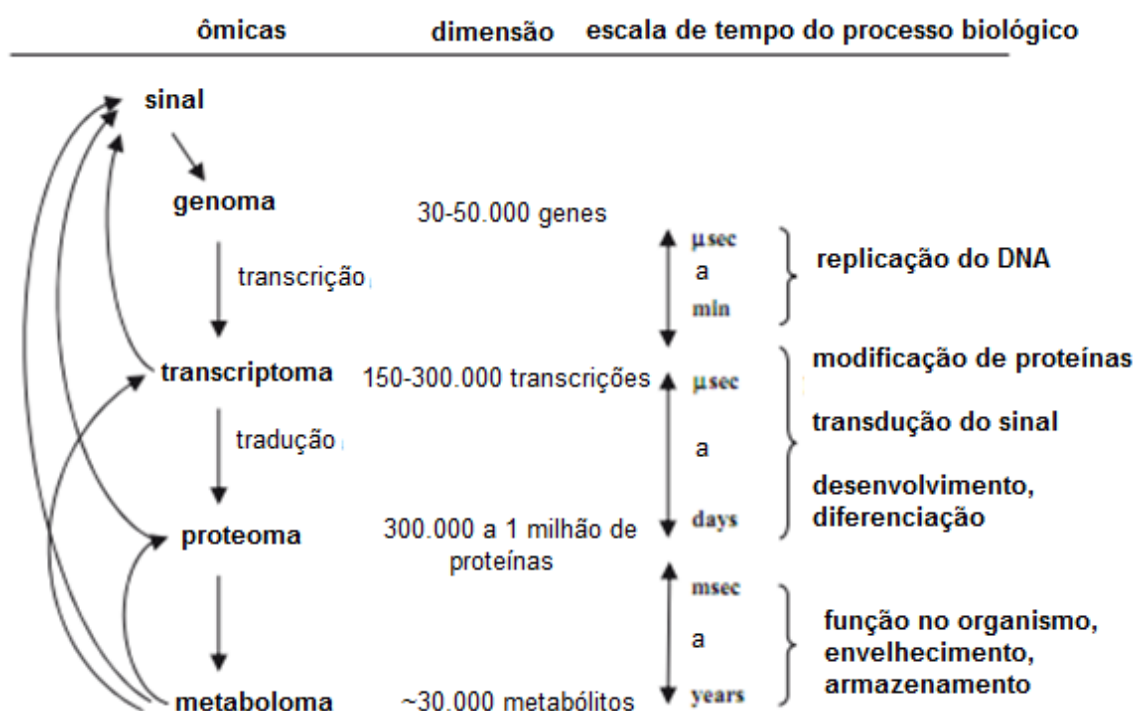


Fonte: Adaptado de Patti et al. (2012).

O genoma representa o conjunto completo de genes de um organismo ou de suas organelas (mitocôndria e cloroplasto), que pode ser analisado pelo sequenciamento sistemático de DNA. O transcriptoma é todo RNA mensageiro presente em uma célula; o proteoma constitui todas as proteínas presentes em uma célula, tecido ou órgão; enquanto que o metaboloma é o conjunto completo de metabólitos de um

organismo (FIEHN, 2002; RYAN; ROBARDS, 2006). As pesquisas envolvendo as ciências ômicas (genômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica) têm como objetivo principal obter uma compreensão abrangente e integrada da biologia. A Figura 2 mostra a quantidade de informação possível de ser explorada através das ômicas e a relação entre as mesmas.

Figura 2. Complexidade das diferentes ômicas quanto à sua dimensão quantitativa e a escala de tempo de processos dentro de um organismo.



Fonte: Adaptado de Lai et al. (2006).

A metabolômica desempenha importante papel na análise da função dos genes e contribui com informações sobre os sistemas biológicos, na medida em que ela é o resultado dos processos bioquímicos do organismo que são influenciados por fatores abióticos (ambiente e estágio de desenvolvimento) e fatores bióticos (transcrição, degradação de RNAm, modificação pós-tradução, dinâmica protéica, concentrações e fluxos de metabólitos) (GOODACRE, 2005; FIEHN, 2002).

Neste contexto, a metabolômica se destaca como uma ciência emergente e em pleno desenvolvimento. Uma evidência disso é que são encontrados vários conceitos e definições para o termo “metabolômica” na literatura científica. Por exemplo, segundo Fiehn (2002) metabolômica é a análise abrangente em que todos

os metabólitos de um sistema biológico são identificados e quantificados, enquanto que Goodacre et al. (2005) define a metabolômica como a identificação e quantificação abrangente de todas as moléculas de baixo peso molecular (< 3000 m/z) presente numa célula ou tecido sob dado conjunto de condições; e Dieter et al. (2011) como a análise qualitativa e quantitativa (relativa ou absoluta) de todo o metaboloma endógeno (metabólitos com massas inferiores a 1500 Da). Já Ryan et al. (2011) utilizam uma definição que engloba a caracterização e quantificação de todos os metabólitos dentro de uma amostra, mas levando em consideração também a resolução espacial (devido à compartimentalização celular do metabolismo) e mudanças temporais em resposta a estímulos externos.

As abordagens mais utilizadas na metabolômica envolvem: a) Perfil metabólico, que é focada em um conjunto de metabólitos pré-definidos, geralmente associados a uma via metabólica específica; b) *Fingerprinting* metabólico, uma análise rápida e de alto rendimento utilizada para classificar as amostras (geralmente com base na sua proveniência ou origem) e c) Análise de metabólitos alvos, que é restrita a um ou dois metabólitos relacionados a uma reação metabólica específica e que seriam afetados por uma perturbação biótica ou abiótica.

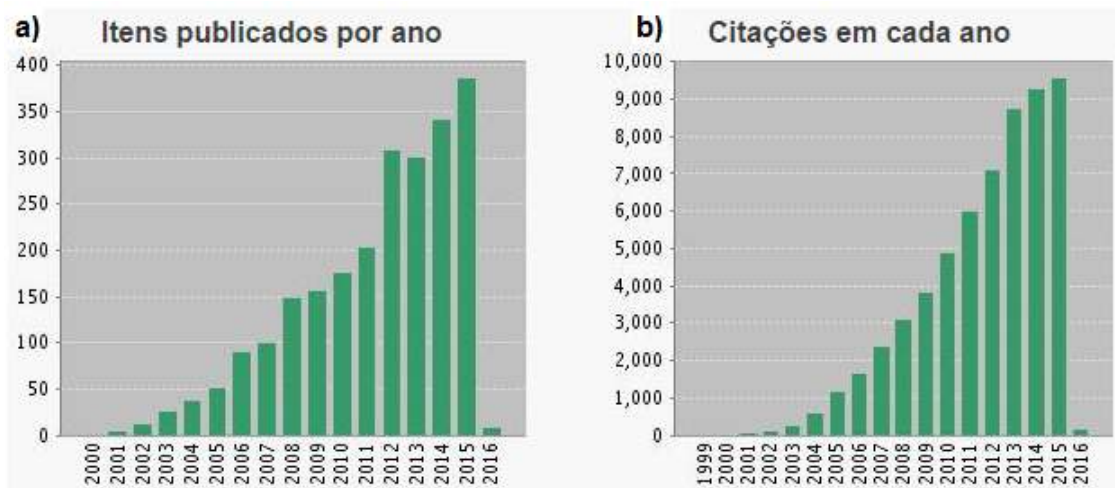
No contexto dos sistemas biológicos, o potencial da metabolômica apenas começou a ser explorado. Ao nível metabolômico, a concentração dos diferentes metabólitos em tecidos ou fluidos corporais está intimamente ligada às variações no fenótipo, podendo ser relacionados com o crescimento, desenvolvimento e a saúde humana (WATKINS; GERMAN, 2002). Em farmacologia, a metabolômica já começou a ser aplicada na toxicologia, descoberta de medicamentos e avaliação da saúde humana. Além disso, se destacam as pesquisas para identificação de biomarcadores de doenças visando o desenvolvimento de métodos de diagnóstico precoce (GOODACRE, 2007).

A título de exemplificação, os conceitos da metabolômica têm sido utilizados na detecção do aparecimento de células tumorais que são utilizadas no diagnóstico de câncer de pulmão (CARROLA et al., 2011), câncer de rim e colorretal (KIM et al., 2011a) e carcinoma de células renais (XU et al., 2012); doença de Alzheimer (XU et al., 2012; TRUSHINA et al., 2013); doenças respiratórias em crianças (CARRARO

et al., 2007; DE LAURENTIS et al., 2008) e infertilidade masculina (KOVAC et al., 2013; HAMAMAH et al., 1993). Outras áreas de aplicação são biotecnologia microbiana, tecnologia de alimentos, farmacologia, toxicologia e biotecnologia de plantas (GOMEZ-CASATI et al., 2013; MOCO et al., 2007).

Também merecem destaque os trabalhos envolvendo a metabolômica de plantas, uma área de pesquisa emergente que estuda os metabólitos das plantas e sua relação com a susceptibilidade/resistência a doenças, atração/repelência de pragas, identificação de espécies e variedades, seleção de genótipos com características específicas, entre outras abordagens. A Figura 3 mostra o crescente número de publicações e citações envolvendo a metabolômica de plantas nos últimos 16 anos. Nesta monografia será dada ênfase na metabolômica aplicada à interação planta-patógeno e o desenvolvimento de métodos analíticos de diagnóstico de doenças.

Figura 3. Publicações envolvendo os termos “*metabolomics*” e “*plants*” contidas na base *Web of Science* no período 2000-2016: a) quantidade de publicações b) quantidade de citações.



2.2 METABOLÔMICA DE PLANTAS

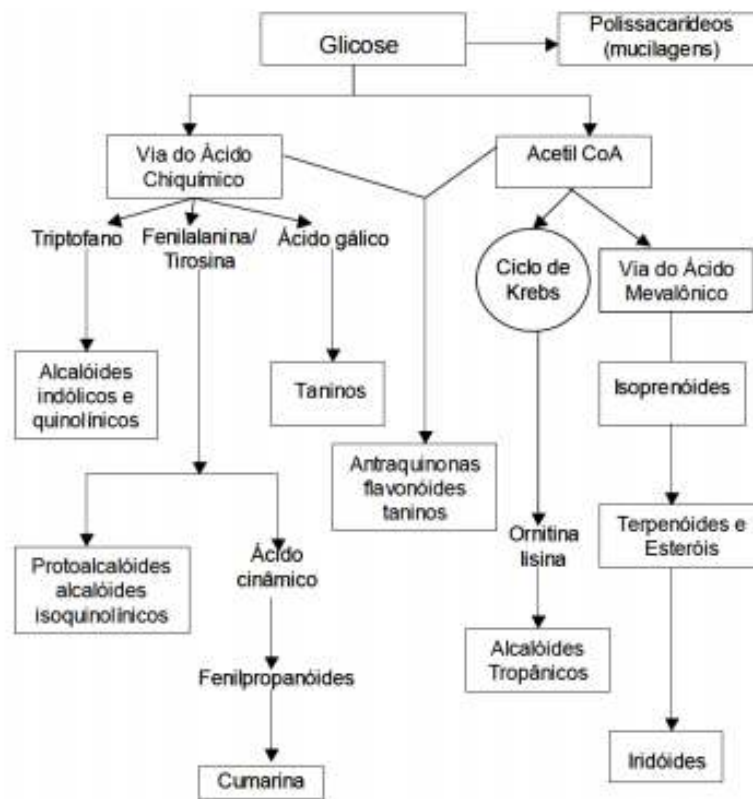
A metabolômica tem como objeto de estudo os produtos do metabolismo de um organismo, o qual é o resultado de todas as reações químicas que continuamente estão ocorrendo em uma célula. Nesse processo, enzimas específicas direcionam as reações, estabelecendo o que se denominam rotas metabólicas. Os compostos químicos formados, degradados ou transformados nessas rotas são chamados de

metabólitos. No caso das plantas, esses compostos bioquímicos podem ser divididos em dois grandes grupos, metabólitos primários e secundários (FILHO, 2010).

O metabolismo primário das plantas envolve as reações vitais para o seu crescimento, desenvolvimento e manutenção, incluindo os processos fotossintéticos, a respiração celular e as biossínteses de aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, polissacarídeos e lipídeos. Os metabólitos primários são comuns a todos os organismos. Os produtos do metabolismo primário, através de rotas biossintéticas diversas, originam os metabólitos secundários que apresentam diversas estruturas e importantes atividades biológicas (MOCO et al., 2007).

Os metabólitos secundários de plantas participam das interações intra e intercelular do próprio organismo ou com células de outros organismos, atuando, por exemplo, em processos de polinização pela produção de substâncias que atraem os agentes polinizadores, e também contribui para a defesa da planta contra patógenos. Assim, o metabolismo primário assume importância principal no crescimento e desenvolvimento da planta e o metabolismo secundário contribui com os aromas, as cores dos alimentos e com a resistência contra patógenos, mantendo a sobrevivência nas condições ambientais favoráveis (FILHO, 2010). Como exemplo de produção de metabólitos secundários dos vegetais, duas rotas metabólicas são mostradas na Figura 4.

Figura 4. Rotas metabólicas na produção de metabólitos secundários das plantas.

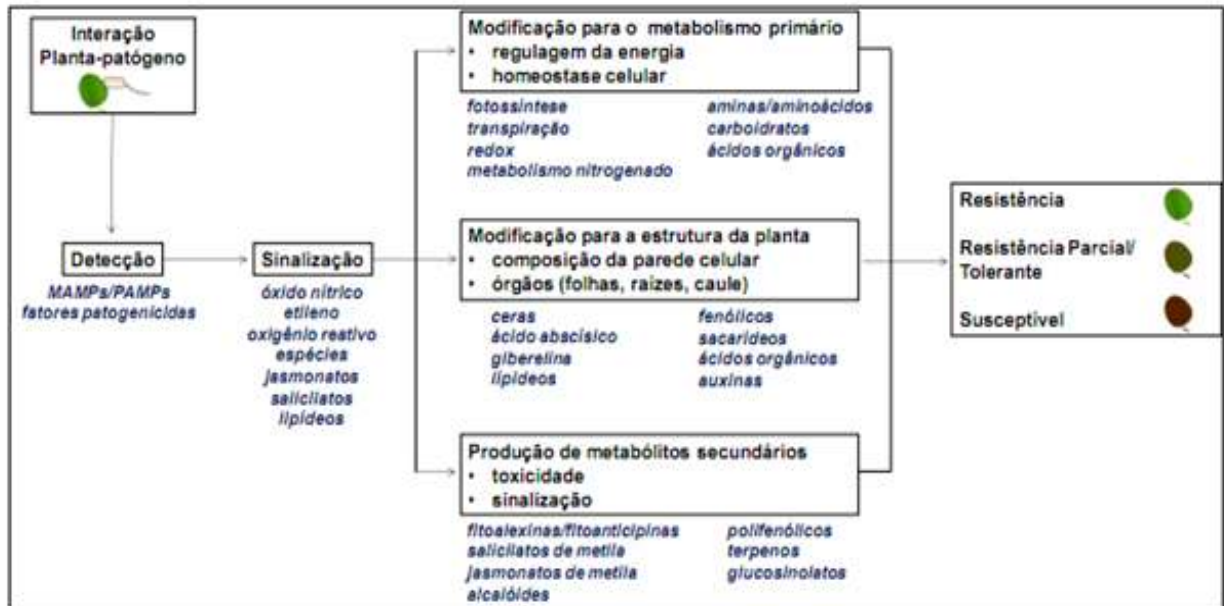


Fonte: Adaptado de Simões et al. (1999).

Quando a planta é submetida a situações de estresse, tais como variações de temperatura e umidade do ambiente, condições de salinidade, umidade, pH do solo, poluentes e lesões mecânicas, ocorrem modificações nos metabólitos da mesma, bem como alterações fisiológicas.

Além dos fatores físico-químicos citados, os biológicos, tais como a ação predatória de insetos, parasitária de nematóides e infecções por microrganismos patogênicos (fungos, bactérias ou vírus) também desencadeiam alterações fisiológicas nas células vegetais. As alterações que constituem a resposta de defesa das plantas, frente ao estresse causado por patógenos, têm sido intensamente estudadas visando o melhoramento vegetal. A Figura 5 mostra algumas classes de metabólitos e processos fisiológicos relacionados à defesa das plantas em uma situação de infecção por patógeno.

Figura 5. Modificações moleculares e fisiológicas que podem ocorrer durante uma interação planta-patógeno.



Fonte: Adaptado de Pascholati et al. (2008).

A interação planta-patógeno pode ser dividida basicamente em dois tipos: a interação compatível e a interação incompatível. Na interação compatível o patógeno invade o tecido vegetal, se multiplica e provoca a doença na planta. Na interação incompatível, o patógeno, ao penetrar no tecido vegetal, encontra a resistência da planta, impedindo sua multiplicação. A diferença básica entre as interações compatível e a incompatível está relacionada à presença ou ausência de um gene de resistência na planta, e de um gene de virulência ou avirulência no patógeno.

O mecanismo de indução e amplificação da resposta de defesa em plantas é chamado de eliciação. As moléculas que induzem ou amplificam a resposta de defesa são chamadas de eliciadoras e podem ser de origem peptídica, lipídica ou polissacarídica. O estudo destas moléculas é utilizado, atualmente, como uma das ferramentas para induzir a resistência em plantas. A análise dos perfis metabólicos em plantas tem demonstrado que estes estão diretamente relacionados com os estágios de desenvolvimento dos organismos, fornecendo dados importantes sobre as alterações metabólicas ao longo do tempo (PALAMA et al., 2010). A

metabolômica aplicada ao estudo de doenças causadas por patógenos em plantas tem possibilitado a compreensão sobre o desenvolvimento de infecções, bem como sobre os mecanismos de respostas frente às condições do ambiente. As variações nos teores dos metabólitos de um organismo em relação aos teores basais, sob determinadas condições, podem indicar padrões de comportamento em função dos fatores ambientais (PARK et al., 2007).

O primeiro evento de sinalização molecular de uma infecção causada por patógeno é o aumento na abundância de compostos específicos, não voláteis (por exemplo, salicilato) e voláteis (por exemplo, etileno) emitidos pelas plantas. Compostos voláteis tais como óxido nítrico, etileno, metil jasmonato e metil salicilato são reconhecidos como mediadores de resistência sistêmica adquirida, ou seja, as plantas infectadas utilizam esses compostos para se comunicar com as plantas saudáveis indicando que estão sendo atacadas por patógenos (PARK et al., 2007). Espécies reativas de oxigênio tais como peróxidos e superóxidos de hidrogênio podem atuar na sinalização da infecção do patógeno (TORRES et al., 2006). Muitos outros compostos de plantas podem atuar como metabólitos sinalizadores de infecções, tais como os aminoácidos, homoserinas e asparaginas, e os esfingolipídios (YANG et al., 2005; VICENTE et al., 2013).

As sinalizações que constituem a resposta das plantas contra o estresse causado por patógenos têm sido intensamente investigadas. Por exemplo, os estudos sobre os efeitos provocados pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* em folhas e frutos de citros tem demonstrado alterações significativas causadas pela doença nos teores de algumas classes de metabólitos (PETROCELLI, 2012). A metabolômica aplicada ao estudo da doença mais agressiva ao citrus, o HLB (Huanglongbing), tem mostrado significativas alterações metabólicas nos sucos de frutas de citros sintomáticos em comparação com plantas saudáveis, e tais informações fornecem indícios de como a doença se desenvolve nos frutos (SLISZ et al., 2012). Além disso, as análises do metaboloma tem demonstrado a susceptibilidade de citros frente ao HLB indicando comportamentos distintos para várias espécies, sendo verificado que as respostas metabólicas variam para espécies em função dos graus de susceptibilidade (CEVALLOS-CEVALLOS et al., 2008).

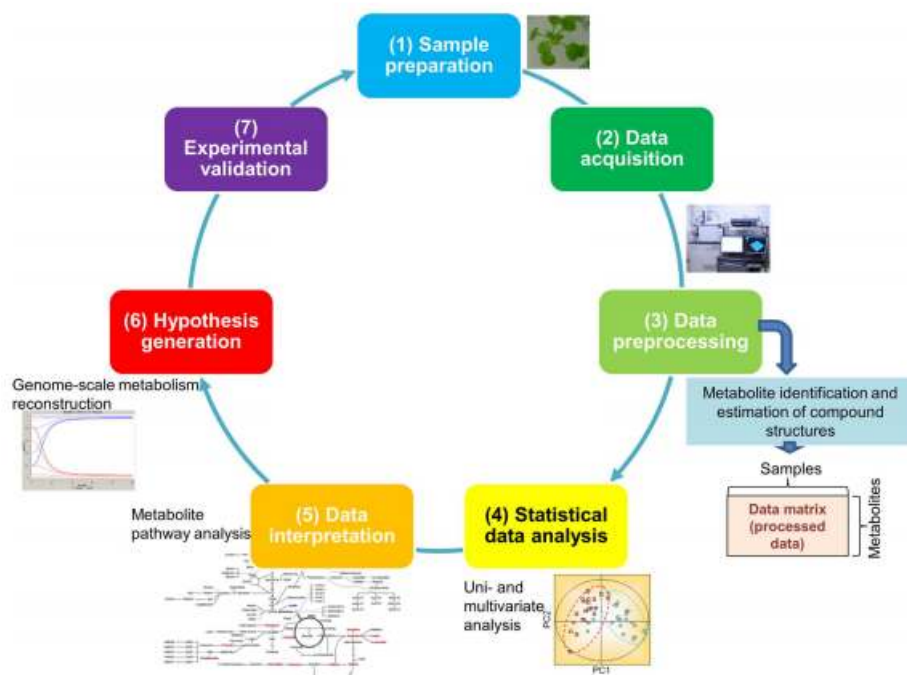
A análise do metaboloma tem sido recentemente utilizada nos estudos de plantas infectadas por patógenos a fim de investigar de forma bastante abrangente as mudanças metabólicas frente aos patógenos. Através de uma comparação entre os níveis basais de metabólitos e aqueles produzidos após uma infecção do patógeno, as informações sobre a interação planta-patógeno podem ser obtidas, melhorando significativamente o diagnóstico da doença e a identificação de biomarcadores da infecção.

2.3 TÉCNICAS ANALÍTICAS EMPREGADAS NA METABOLÔMICA

Estima-se que aproximadamente 200 mil metabólitos sejam produzidos no reino vegetal (FEIHN, 2002). E atualmente não há nenhuma técnica individual adequada para a medição de todos os metabólitos devido a sua diversidade química e ampla faixa de concentração encontrada em plantas (LEI et al., 2011; WECKWERTH, 2011).

Dados metabolômicos são tipicamente gerados por meio dos seguintes processos (Figura 6): (1) Preparação das amostras; (2) Aquisição de dados e (3) pré-processamento de dados. Então os dados resultantes são submetidos a várias etapas de processamento e análise, incluindo (4) análise dos dados utilizando ferramentas estatísticas uni e multivariadas, seguido da (5) interpretação dos dados usando métodos tais como análise de vias metabólicas, que facilitam (6) a geração de hipóteses testáveis e a construção de modelos que representam melhor o fenômeno biológico. Por fim, (7) a validação experimental de hipóteses e modelos é necessária para fechar o ciclo de investigação do sistema biológico (FUKUSHIMA; KUSANO, 2013).

Figura 6. Etapas da pesquisa envolvendo metabolômica de plantas.



Fonte: Adaptado de Fukushima e Kusano (2013).

A seguir serão discutidas as etapas de a) preparo de amostra, b) métodos de extração, c) métodos de análise e d) tratamento de dados em metabolômica.

2.3.1 Preparo de amostra

A preparação da amostra é um passo crítico para que se consiga analisar um conjunto robusto e representativo de metabólitos de diferentes classes químicas. Esta etapa envolve uma série de diferentes fases experimentais, tais como: seleção e coleta de amostras; secagem ou procedimentos de inibição enzimática; extração dos metabólitos e preparação das amostras para análise.

A seleção do material vegetal depende principalmente da questão biológica que se pretende investigar. Na etapa de amostragem deve se tomar o cuidado de evitar a introdução de qualquer forma de variabilidade indesejada que afetaria significativamente o resultado da análise. A degradação da amostra (seja térmica, oxidativa ou enzimática) e a sua contaminação são os principais fatores que levam a variações durante esta etapa (XU et al., 2010).

Em muitos casos, como os que envolvem células e tecidos, as técnicas de amostragem precisam ser suficientemente rápidas para garantir que o perfil metabólico obtido reflita as condições *in vivo*. Desse modo, a janela de tempo entre a amostragem e análise deve ser tão rápida quanto possível. Em alguns casos, a inativação rápida do metabolismo (processo conhecido como *quenching*) é realizada para que não haja alteração das condições metabólicas durante a amostragem. No entanto, em algumas ocasiões é impossível a análise imediata das amostras e a armazenagem se torna necessária (por exemplo, em bancos de amostras biológicas para futuras investigações). Estratégias de *quenching* devem apresentar os seguintes requisitos (MASHEGO et al., 2007):

- i) A inativação do metabolismo deve ser mais rápida do que as alterações metabólicas que ocorram na amostra. A efetividade do *quenching* é crucial, uma vez que as taxas de *turnover* de muitos metabólitos primários são geralmente na ordem de 1 mM/s;
- ii) A integridade da amostra deve ser cuidadosamente preservada durante o processo, em particular no caso das células (ou seja, a preservação da membrana celular das mesmas), onde a fuga de metabólitos intracelulares deve ser minimizada;
- iii) Não deve induzir variações significativas nas propriedades químicas e físicas ou na concentração dos metabólitos;
- iv) Após a etapa de *quenching* a amostra deve ser passível de ser submetida aos passos subsequentes do processo analítico.

As estratégias mais comuns de *quenching* são baseadas na rápida modificação das amostras através de variações no pH ou temperatura. Quando se utiliza o pH para realizar o *quenching*, induz-se instantaneamente um meio altamente alcalino (por exemplo, pela adição de KOH ou NaOH) ou altamente ácido (por exemplo, pela adição de HClO₄, HCl ou CCl₃COOH) (MASHEGO et al., 2007). Ao modificar a temperatura, o *quenching* é realizado principalmente por arrefecimento em valores geralmente menores que - 20 °C, assumindo que a integridade da amostra não é ameaçada pelo choque frio (WITTMANN et al., 2004).

O método mais popular de *quenching* utiliza metanol a frio, o que permite uma rápida interrupção do metabolismo na escala de sub-segundos (BOLTEN;

WITTMANN, 2008) e pode ser implementado em protocolos destinados à discriminação entre metabólitos intra e extracelulares (WINDER et al., 2008). Esta abordagem tem sido aplicada em estudos com leveduras (LORET et al., 2007;), bactérias (HALOUSKA et al., 2013) e fungos (MEINERT et al., 2013).

A solução de *quenching* é normalmente realizada utilizando uma mistura aquosa com metanol a baixa temperatura (- 40 °C ou menos). Metanol é considerado o solvente perfeito para inibir o metabolismo da amostra, uma vez que é miscível em água, possui um ponto de congelamento bem baixo (- 97,6 °C, menor do que etanol ou glicerol, por exemplo) e não apresenta soluções muito viscosas (CANELAS et al., 2008).

No entanto, uma das principais limitações do método com metanol é a possibilidade de perda de metabólitos devido a influencia desse solvente nas membranas celulares. Alguns tipos de células, tais como as bacterianas, são conhecidas por serem altamente sensíveis às mudanças osmóticas do meio circundante, gerando alterações na concentração de metabólitos intracelulares por ruptura da membrana celular (VILLAS-BÔAS; BRUHEIM, 2007). Para evitar isto, muitos protocolos incluem um tampão (por exemplo, tricina ou carbonato de amônio) a fim de controlar a força iônica e assim evitar os danos na membrana celular (FAIJES et al., 2007).

Outra abordagem de *quenching* baseada na mudança de temperatura utiliza nitrogênio líquido (ponto de congelamento de - 196 °C), sendo bastante aplicada em células de bactérias, animais e plantas (WU et al., 2008). Ao aplicar este método é possível obter resultados semelhantes ao com metanol a frio, no entanto as membranas celulares também podem ser danificadas devido a formação de cristais de gelo durante os ciclos de congelamento/descongelamento (HAJJAJ et al., 1998). Também foram desenvolvidos métodos automáticos de *quenching*, que são baseados no acoplamento em linha de um dispositivo de amostragem rápida para um biorreator, onde o metabolismo é parado (WIENDAHL et al., 2007; HILLER et al., 2007).

As significativas diferenças físico-químicas entre as membranas de células de organismos procariotos e eucariotos explicam por que a perda de metabólitos

causadas por *quenching* com solventes orgânicos são menos severas para células eucarióticas do que para as células procarióticas (NASUTION et al., 2006). Por esta razão, os protocolos de *quenching* não podem ser transferidos entre organismos diferentes e requerem uma validação e otimização adequada em função do organismo alvo (VILLAS-BOAS et al., 2005). A Tabela 1 mostra diferentes técnicas de *quenching* utilizadas de acordo com o tipo de organismo alvo.

Tabela 1. Diferentes técnicas de *quenching* de acordo com o tipo de amostra.

Organismo	Método de <i>quenching</i>	Vazamento Celular	Separação do meio	Referências
Micróbios, culturas de células	N ₂ líquido	Não	Não	Tiziani et al., 2009
	Metanol a frio	Sim	Sim	Koek et al., 2006
	Etanol a frio	Sim	Sim	Ewald et al., 2009
Leveduras	Ácido perclórico	Sim	Sim	Koek et al., 2006
	Metanol a frio	Sim	Sim	Koning and Dam, 1992
	Metanol e tampão básico	Sim	Sim	Castrillo et al., 2003
	N ₂ líquido	Não	Não	Mashego et al., 2003
	Esferas de aço em baixa temperatura	Não	Sim	Theobald et al., 1997
Fungos	Água gelada	Sim	Sim	Matsuzaki et al., 2008
	N ₂ líquido	Não	Não	Hajjaj et al., 1998
	Metanol a frio	Sim	Sim	Mashego et al., 2007
Insetos	Metanol a frio	Sim	NA	Bratty et al., 2011
	N ₂ líquido	Não	NA	Williams et al., 2010
	Acetonitrila a frio	Sim	NA	Pedersen et al., 2008
Plantas	N ₂ líquido	Não	Não	Kim et al., 2009
Animais	N ₂ líquido	Não	NA	Wang et al., 2011
	Metanol a frio	Sim	NA	Stentiford et al., 2005

NA: Não se aplica.

Com relação às amostras sólidas, logo após a etapa de *quenching*, o primeiro passo é a etapa de moagem para obtenção de um pó homogêneo. Esta etapa é fundamental, especialmente para tecidos de plantas, em que as células são cercadas por uma parede espessa que precisa ser quebrada antes da extração dos metabólitos. Os procedimentos mais comuns para a quebra da parede nas amostras de plantas e homogeneização das mesmas utilizam almofariz e pilão (ERBAN et al., 2007), moinho de bolas (WECKWERTH et al., 2004), moinho vibratório (JONSSON et al., 2004) e ultrassom (CARRERA et al., 2012). Quando possível esta etapa é realizada sob nitrogênio líquido para evitar descongelamento da amostra. Por fim, o pó deve ser liofilizado e armazenado a baixas temperaturas até a análise.

O armazenamento da amostra é outra razão fundamental para erros na análise metabolômica. A maioria dos metabólitos são preservados se as amostras são imediatamente congeladas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (por exemplo, utilizando nitrogênio líquido). No entanto, é importante notar que diferenças no tempo de armazenamento ou na frequência dos ciclos de congelamento/descongelamento podem ter uma forte influência sobre o desenvolvimento de modelos metabolômicos. Como um exemplo, Lauridsen et al. (2007) descobriram que as amostras de urina humana podem ser armazenadas a $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 26 semanas sem nenhuma mudança nos *fingerprints* de ^1H RMN, enquanto que a formação de acetatos, possivelmente devido à contaminação microbiana, foi observada em algumas amostras armazenadas a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, sem adição de conservante.

As estratégias de amostragem e armazenamento de amostras biológicas para estudos de metabolômica são especialmente importantes, em comparação com proteômica e transcriptômica, pois a escala de tempo da atividade metabólica muitas vezes pode ser menor que 1s (ÁLVAREZ-SÁNCHEZ et al., 2010). Por isso, é necessário interromper a atividade metabólica o quanto possível durante a amostragem e armazenamento. Além disso, para amostras que contêm umidade elevada, um processo de liofilização é recomendado para melhorar a estabilidade da amostra (WITTMANN et al., 2004).

2.3.2 Métodos de extração

Após a amostra de planta ser coletada, tratada e armazenada, a mesma deve ser extraída para obtenção dos metabólitos. Para este fim diversos métodos de extração são utilizados, dependendo principalmente das características dos compostos que se deseja obter e da amostra utilizada, entre outros fatores. Idealmente, o método de extração dos metabólitos deve apresentar as seguintes características:

- i) Retirar eficientemente os metabólitos da amostra;
- ii) Remover interferentes que possam dificultar a análise (por exemplo, sais e proteínas);
- iii) Tornar o extrato compatível com a técnica de análise;
- iv) Pré-concentrar os analitos antes da análise.

A seletividade requerida na etapa de extração depende do tipo de estudo. Enquanto análises metabolômicas do tipo *targeted* devem ser altamente seletivas e fornecer extratos limpos e concentrados, análises do tipo *untargeted* são não-seletivas por natureza e consideram apenas sais e macromoléculas como potenciais interferentes que devem ser removidos nesta etapa.

O protocolo de extração depende principalmente do tipo de amostra biológica utilizada (AZMIR et al., 2013). No caso de sólidos, os metabólitos são retirados da amostra através de extração sólido-líquido (por exemplo, utilizando maceração, extração por Soxhlet, fluido supercrítico (SFE), extração assistida por ultrassom ou microondas). Se os metabólitos estão na fase líquida, são utilizados principalmente os métodos de extração líquido-líquido (LLE), extração em fase sólida (SPE) ou microextração em fase sólida (SPME).

Protocolos de extração por Soxhlet são bastante utilizados e estão bem estabelecidos para obtenção de metabólitos a partir de amostras sólidas (SCHAFER, 1998; IVERSON et al., 2001). O tempo de extração pode variar de minutos a horas, dependendo das características da amostra, ou utilização de técnicas associadas tais como microondas, ultrassom ou fluidos supercríticos (HUIE, 2002; WECKWERTH, 2003). Por exemplo, a extração Soxhlet assistida por microondas focalizado (FMASE) provou ser altamente eficiente na extração de metabólitos fracamente polares e não-polares em amostras biológicas sólidas (LUQUE-GARCÍA; LUQUE DE CASTRO, 2004). Enquanto a extração Soxhlet convencional requer várias horas para a extração quantitativa dos metabólitos, FMASE é eficientemente realizado em poucos minutos.

Contudo, quando comparado a outros métodos disponíveis, a extração por Soxhlet é considerada a menos adequada para estudos metabolômicos (KIM; VERPOORTE, 2010), sendo os principais inconvenientes os tempos de extração mais longos e o contínuo aquecimento do extrato. Embora o maior tempo de extração possa resultar em rendimentos mais elevados, também pode aumentar a possibilidade de formação de artefatos (MALTESE et al., 2009).

Outra técnica aplicada a amostras sólidas é a extração por fluidos supercríticos (SFE), que tem como principais características ser rápida e confiável. Tem a vantagem de ser capaz de extrair compostos com alguns ajustes no sistema em linha, que de outra forma seriam difíceis de alcançar usando técnicas de extração metabolômica convencionais. Como exemplo de aplicação da FSE no campo da metabolômica, Hou et al. (2010) utilizou CO₂-SFE para extrair alcamidas e compostos fenólicos de plantas de *Echinacea* com o intuito de aplicar estudos comparativos para controle de qualidade e avaliação da bioatividade.

Já a extração por microondas (MAE) é bastante utilizada em estudos envolvendo metabolômica de plantas. Em comparação com métodos convencionais para extração de diferentes classes de compostos, tais como fenóis e flavonóides, a utilização de MAE reduz significativamente o tempo de extração. Proestos e Komaitis (2008) compararam as técnicas de refluxo convencional e MAE na extração de compostos fenólicos, utilizando diferentes sistemas de solventes, e relataram que além de reduzir o tempo, a eficiência de extração utilizando MAE foi a maior entre os dois métodos.

Além disso, à medida que tem aumentado a consciência dos danos causados por resíduos de solventes tóxicos, cientistas no campo da metabolômica também têm buscado utilizar solventes “verdes” nos métodos de extração. O uso de tais solventes, como líquidos iônicos e água, tem demonstrado serem eficientes e seguros em comparação com outros solventes convencionais utilizados na extração de metabólitos secundários de plantas. Du et al. (2009) aplicaram com sucesso MAE utilizando líquidos iônicos como solvente para a extração de compostos fenólicos de folhas de *Psidium guajava* e *Smilax china*, sendo obtidos resultados que mostram ser possível substituir o método de refluxo convencional com metanol pelo método desenvolvido.

Outro método que recentemente passou a ser utilizado na metabolômica é baseado na utilização de ondas ultrassônicas (20-40 kHz) para extração de metabólitos (LUQUE DE CASTRO; DELGADO-POVEDANO, 2014). Esta tem como vantagem requerer menores tempos de extração e apresentar maior eficiência na quebra das paredes celulares das amostras de plantas (CHUA et al., 2009). Trabalhos recentes

utilizaram o ultrassom para pesquisas metabolômicas envolvendo extração de lipídios (DA PORTO et al., 2013), ácidos graxos (DANESHVAND et al., 2012), óleos essenciais (GOULA, 2013) e flavonoides (SUN et al., 2011) em amostras vegetais.

No caso de amostras líquidas, a técnica mais utilizada é a extração líquido-líquido (LLE), pois permite a extração dos metabólitos em duas frações (fase aquosa e fase orgânica) que contêm separadamente compostos polares e apolares, podendo estas fases serem analisadas independentemente. As misturas metanol/água são as combinações mais utilizadas em estudos metabolômicos, pois permitem extrair uma grande variedade de metabólitos tais como açúcares, aminoácidos, ácidos orgânicos, alcaloides e compostos fenólicos. Sua não-seletividade os torna especialmente adequados para aplicações em metabolômica e a maioria dos metabólitos de plantas pode ser extraída nestes solventes.

Os diferentes solventes utilizados em métodos LLE para extração de metabólitos em amostras de planta estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Solventes orgânicos utilizados para extração de metabólitos em amostras de planta.

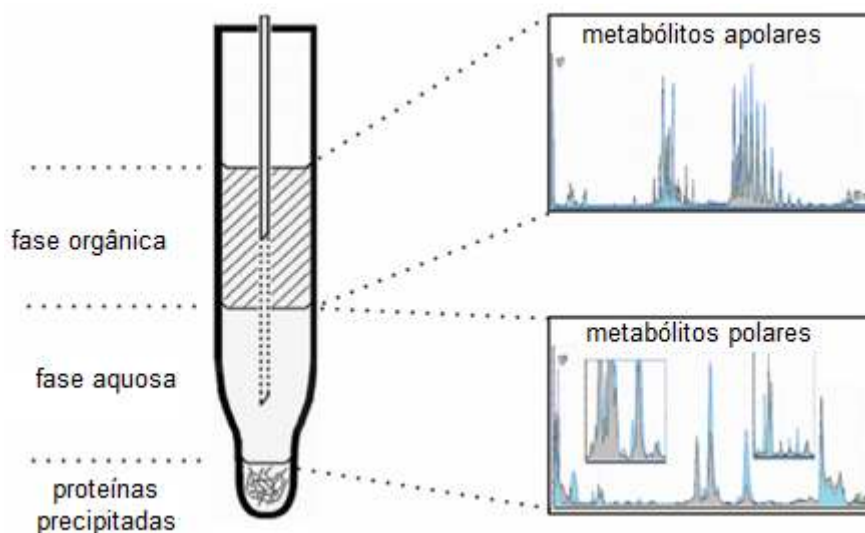
Planta	Solvente	Compostos extraídos	Técnica de análise	Referência
<i>Solanum lycopersicum</i>	75% metanol	Antocianinas	LC-MS	Moco et al., 2006
<i>Solanum tuberosum</i>	62,5% metanol 0,1% ácido fórmico, metanol, água	Ácidos hidroxicinâmicos, Catecolaminas	LC-MS GC-MS	Szopa et al., 2001 Vorst et al., 2005
<i>Brassica oleraceae</i>	60% metanol	Glucosinolatos	HPLC	Robbins et al., 2005
	70% metanol a quente	ácidos fenólicos	CE, HPLC	Gratacos-Cubarsi et al., 2009
	Metanol a frio	Flavonóides	UPLC/ DAD-MS/MS	Lee et al., 2010
<i>Brassica rapa</i>	CD ₃ OD:D ₂ O (1:1)	Glucosinolatos, aminoácidos, açúcares	RMN	Jahangir et al., 2008
<i>Maytenus aquifolium</i> <i>Maytenus ilicifolia</i>	Acetato de etila a 40 °C	Terpenóides	GC-MS	Cordeiro et al., 1999
<i>Origanum dictamnus</i> <i>Teucrium polium</i> <i>Lavandeula vera</i>	62,5% metanol Acetato de etila	Compostos fenólicos	HPLC, GC-MS	Proestos et al., 2006
<i>Cataranthus roseus</i>	MeOD, D ₂ O	Compostos fenólicos, ácidos orgânicos	RMN	Choi et al., 2004

Geralmente se utiliza métodos por LLE para limpeza da amostra e remoção de interferentes. Por exemplo, para extração de lipídios da amostra são utilizados principalmente clorofórmio e diclorometano como solvente (BLIGH; DYER, 1959; CEQUIER-SÁNCHEZ et al., 2008). Recentemente foi relatada a substituição de clorofórmio por éter metil-terc-butílico (MTBE), um solvente que recupera as principais classes de lipídios com a mesma, ou melhor, eficiência de extração, mas com reduzidos riscos à saúde e ao ambiente (MATYASH et al., 2008).

Também foram desenvolvidos métodos por LLE que permitem a remoção de proteínas da amostra e a análise das frações aquosa e orgânica (WHILEY et al., 2012; SEN et al., 2013; GODZIEN et al., 2013), como mostrado na Figura 7. É preferível utilizar um solvente orgânico para precipitação de proteínas, uma vez que

a desnaturação das proteínas utilizando calor ou ácidos orgânicos resulta em baixa recuperação dos metabólitos, além de que o solvente orgânico ajuda na quebra das interações entre proteínas e diversos metabólitos (WANT et al., 2006).

Figura 7. Método de extração por LLE para obtenção de metabólitos nas fases aquosa e orgânica, além da remoção de proteínas.



Fonte: Adaptado de Godzien et al. (2013).

A extração em fase sólida (SPE) é outro método utilizado em amostras líquidas, utilizado principalmente para remoção de interferentes ou enriquecimento de analitos. Esta técnica utiliza diferentes tipos de fases sólidas, tais como fases reversas, de troca iônica e mistas. A depender das características moleculares dos analitos o método por SPE pode ser mais seletivo do que LLE (VOGESER; KIRCHHOFF, 2011). A maioria das aplicações com SPE em metabolômica referem-se a extração de metabólitos de fluidos biológicos ou eliminação de proteínas antes da análise por LC-MS. Idborg-Bjorkman et al. (2003) utilizaram um copolímero funcionalizado com divinilbenzeno e N-vinilpirrolidona para extração dos metabólitos em amostras de urina e análise por LC-ESI-MS. Em outro estudo envolvendo culturas de células da planta *Passiflora garckeii*, SPE foi utilizado para retirar os interferentes da amostra antes da análise por RMN, permitindo a identificação clara de compostos aromáticos e açúcares (FRACCAROLI et al., 2008).

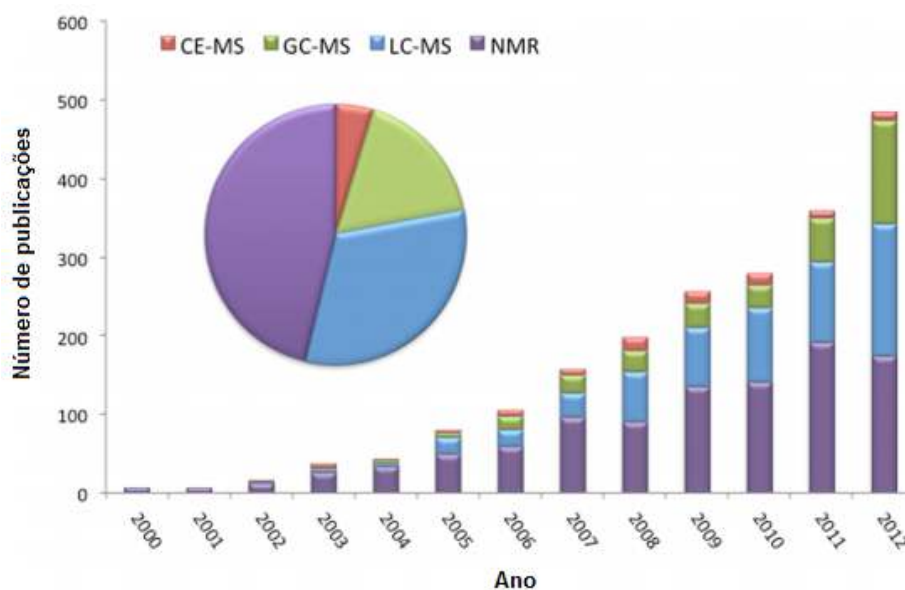
Uma técnica especial de SPE é a microextração em fase sólida (SPME), desenvolvida por Arthur e Pawliszyn (1990), que tem sido considerada como uma das invenções mais inovadoras no campo de extração de compostos orgânicos voláteis (COVs) (ZHANG; LI, 2010). SPME integra as etapas de extração, concentração e introdução para análise, com redução do tempo de amostragem e aumento da sensibilidade, quando comparado aos outros métodos de extração. Nos últimos anos a SPME tem sido aplicada para o monitoramento de compostos em sistemas vivos (SILVA et al., 2013). Esta aplicação tem como vantagens a possibilidade de amostragem de compostos sem alterar a condição real do sistema e a realização de estudos temporais, como a progressão de uma doença em um indivíduo no decorrer do tempo, sem ter que sacrificar o indivíduo a cada ponto de amostragem (OUYANG et al., 2011).

2.3.3 Métodos de análise

Existem basicamente duas estratégias mais empregadas para a análise metabolômica, denominadas por “*targeted*” e “*untargeted*”. A análise “*targeted*” é direcionada para determinadas classes de compostos relacionados a rotas metabólicas conhecidas e específicas visando sua quantificação. Por outro lado a análise “*untargeted*” é direcionada para o perfil (*fingerprinting*) dos metabólitos presentes em uma amostra, sendo qualitativa (ALMSTETTER et al., 2012).

As principais técnicas analíticas empregadas em metabolômica recentemente são ressonância magnética nuclear (RMN), cromatografia gasosa unidimensional e bidimensional abrangente acoplada à espectrometria de massas (GC-MS e GC×GC-MS, respectivamente) e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS), embora outras técnicas como a eletroforese capilar acoplada à espectrometria de massa (CE-MS) também tem sido empregada. Kuehnbaum e Britz-McKibbin (2013) analisaram quais técnicas analíticas foram utilizadas nos trabalhos envolvendo metabolômica publicados entre 1998 e 2012 (Figura 8), sendo que nos últimos cinco anos as principais técnicas utilizadas foram RMN (46%), LC-MS (32%), GC-MS (17%), e CE-MS (5%).

Figura 8. Levantamento bibliográfico de artigos de pesquisa publicados em metabolômica usando uma consulta de pesquisa com as palavras-chave "*metabolom* * ou *metabonom**" no título entre 1998-2012 via *Web of Knowledge* 5.8, excluindo revisões e resumos de trabalhos.



Fonte: Adaptado de Kuehnbaum e Britz-Mckibbin (2013).

Todas estas técnicas e métodos podem ser aplicados a uma grande variedade de metabólitos, porém cada um deles apresenta diferentes vantagens e desvantagens em relação aos limites de detecção e quantificação, a sensibilidade, interferências, resolução, repetibilidade, reprodutibilidade e características físico-químicas dos compostos, como pode ser sumarizado no Quadro 1 (MONDELLO et al., 2008; ALMSTETTER et al., 2009).

Quadro 1. Vantagens e desvantagens associadas às técnicas analíticas empregadas em metabolômica.

Técnica	Vantagens	Desvantagens
LC-MS	<p>Separações rápidas com alta resolução (UHPLC);</p> <p>Detecção de moléculas termolábeis e termooestáveis;</p> <p>Alta sensibilidade, resolução e repetibilidade</p>	<p>Alto consumo de solvente e baixa capacidade de separação do HPLC comparado ao UHPLC.</p>
CE-MS	<p>Alta sensibilidade (picograma), capacidade de pico, poder de resolução dos analitos;</p> <p>Baixo consumo de solvente e amostra;</p>	<p>Apenas analitos iônicos;</p> <p>Tampões incompatíveis com MS;</p> <p>Baixa repetibilidade e reprodutibilidade;</p>
GC-MS	<p>Alta sensibilidade, capacidade de pico, poder de resolução dos analitos e repetibilidade;</p> <p>Compostos voláteis e semivoláteis;</p>	<p>Não aplicável a moléculas não voláteis ou termolábeis;</p> <p>Preparo de amostra (extração, derivatização).</p>
CG×GC-MS	<p>Alta sensibilidade e repetibilidade;</p> <p>Altíssima capacidade de pico e poder de resolução dos analitos;</p> <p>Compostos voláteis e semivoláteis;</p>	<p>Não voláteis;</p> <p>Preparo de amostra (extração, derivatização).</p>
MS	<p>Diferentes tipos de fontes de ionização para compostos apolares e polares (APPI, APCI, ESI e fontes combinadas APPI/APCI);</p> <p>Diferentes tipos de analisadores de massas (íon trap, quadrupolo, triplo-quadrupolo, transformada de Fourier, Orbitrap)</p>	<p>Efeito de supressão iônica da matriz;</p> <p>Só distingue moléculas isobáricas com alta ou altíssima resolução;</p> <p>Preparo de amostra (extração);</p> <p>Alto custo de instrumentação;</p>
RMN	<p>Completa elucidção estrutural de moléculas desconhecidas;</p> <p>Não destrutiva;</p> <p>Análise de sólidos e líquidos;</p> <p>Quantificação absoluta</p>	<p>Baixa sensibilidade e resolução;</p> <p>Difícil acoplamento com técnicas de separação;</p> <p>Análises lentas; amostras concentradas;</p>

Fonte: Forcisi et al. (2013), Xu et al. (2010), Khakimov et al. (2014), Beckera et al. (2012).

No que se refere às técnicas cromatográficas, a cromatografia em fase gasosa bidimensional abrangente (GC×GC) comparada a unidimensional (GC) tem o poder de resolução cromatográfica superior, que é particularmente adequado para a separação de analitos de baixo peso molecular em amostras complexas

(ALMSTETTER et al., 2009). O efeito de focalização da segunda coluna (segunda dimensão) possibilita o aumento de resolução, da altura do pico e da sensibilidade de detecção. A técnica GC×GC é geralmente acoplada com sistemas de detecção de ionização por elétrons (EI) e tempo de voo (TOF) (KOEK et al., 2008).

Com relação ao emprego da cromatografia líquida, LC-MS é uma técnica aplicada a uma grande variedade de metabólitos de alto a baixo peso molecular, polares e apolares, mediante a utilização de colunas cromatográficas e fases móveis adequadas. Para essas análises, a fonte de ionização por electrospray (ESI) é geralmente utilizada para ionização dos compostos, no entanto, as fontes de ionização química a pressão atmosférica (APCI, do inglês *atmospheric pressure chemical ionization*) e fotoionização a pressão atmosférica (APPI, do inglês *atmospheric pressure photoionization*) também podem ser utilizadas para compostos apolares, além da fonte de ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI, do inglês *matrix-assisted laser desorption/ionization*) (IZUMI et al., 2009). Vale ressaltar que a LC-MS era uma técnica insatisfatória para a análise de metabólitos hidrofílicos (aminoácidos, ácidos orgânicos, ácidos nucleicos, etc), porém a utilização de fases estacionárias baseadas em pentafluorofenilpropil com cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) solucionou essa limitação, sem a necessidade de derivatização (YOSHIDA et al., 2007).

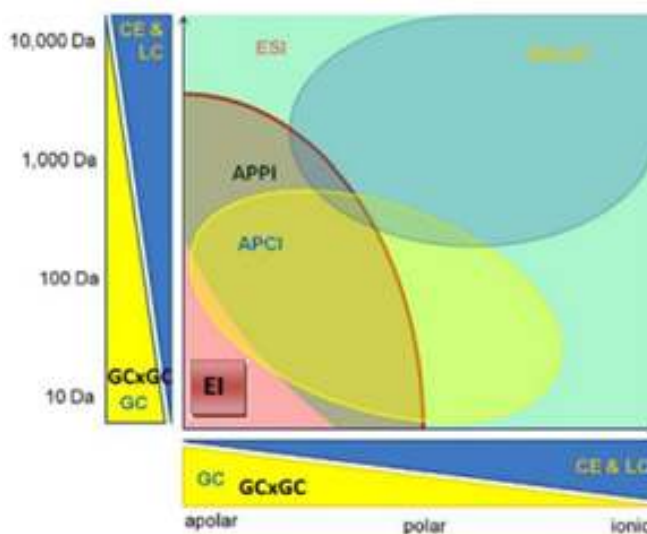
Outro avanço que pode ser citado foi a utilização da cromatografia líquida de ultra-eficiência (UPLC) que, a partir de 2004, desempenhou um papel importante no avanço da metabolômica baseada em LC-MS. Melhorias significativas fornecidas pelo sistema UPLC incluem o uso de coluna resistente a alta pressão, fases estacionárias com partículas de 1,7 µm e uma bomba com uma pressão máxima de 100 MPa. Isso resultou em menor tempo de análise, maior sensibilidade e capacidade de resolução do pico (PLUMB et al., 2004).

A eletroforese capilar (CE) também vem ocupando um espaço crescente nas aplicações envolvendo metabolômica, visto que apresenta alta resolução e eficiência na separação de uma ampla gama de moléculas. Outra vantagem é o baixo custo instrumental e operacional, pois mesmo nas condições em que se empregam solventes orgânicos, os volumes consumidos de amostra e eletrólito são

desprezíveis comparados à cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Porém a maior contribuição que a CE oferece é sua complementaridade aos métodos já estabelecidos, devido à variedade de modos de separação existentes, os quais permitem a análise de várias classes de compostos. Outro importante avanço foi o desenvolvimento da CE acoplada à espectrometria de massas (CE-MS) que alia o alto poder de resolução e eficiência da CE com a universalidade e sensibilidade que a MS oferece frente a outros sistemas de detecção como, por exemplo, espectrofotometria na região do UV-Visível, bem como fluorescência induzida a laser (LIF - *laser induced fluorescence*), que são pouco informativos em relação à estrutura do analito (CEVALLOS-CEVALLOS et al., 2009).

A técnica de RMN se destaca por ser versátil, não destrutiva e possibilitar a caracterização estrutural de metabólitos, além da sua identificação e quantificação. As amostras podem ser analisadas em solução ou no estado sólido, dependendo da sua solubilidade. A ^1H RMN unidimensional é uma das metodologias que atende estes pré-requisitos, embora as metodologias de análise dos núcleos de ^{13}C e ^{15}N também possam ser utilizadas para obter informação estrutural (KIM et al., 2011b; SCHRIPSEMA, 2010). A RMN também é empregada para análise de misturas, no entanto a sobreposição de sinais dos compostos dificulta a identificação, sobretudo quando a mistura possui grande quantidade de substâncias. Porém, essa dificuldade pode ser superada pela utilização das técnicas bidimensionais (RMN 2D). Vale ressaltar que RMN não é limitada pela polaridade e massa molar dos compostos, podendo ser aplicada a compostos apolares e polares. Analisando comparativamente as técnicas analíticas citadas na Figura 9, pode-se observar, em termos de polaridade e massa molar dos compostos, quais são as limitações e possibilidades de aplicações das técnicas analíticas hífenadas, GC-MS, GC×GC-MS, LC-MS e CE-MS considerando as diferentes fontes de ionização utilizadas no acoplamento com MS.

Figura 9. Aplicabilidade das técnicas hífenadas com MS em função da polaridade e massa molar dos compostos, com diferentes fontes de ionização (EI, APCI, APPI, ESI, MALDI).



Fonte: Adaptado de Forcisi et al. (2013).

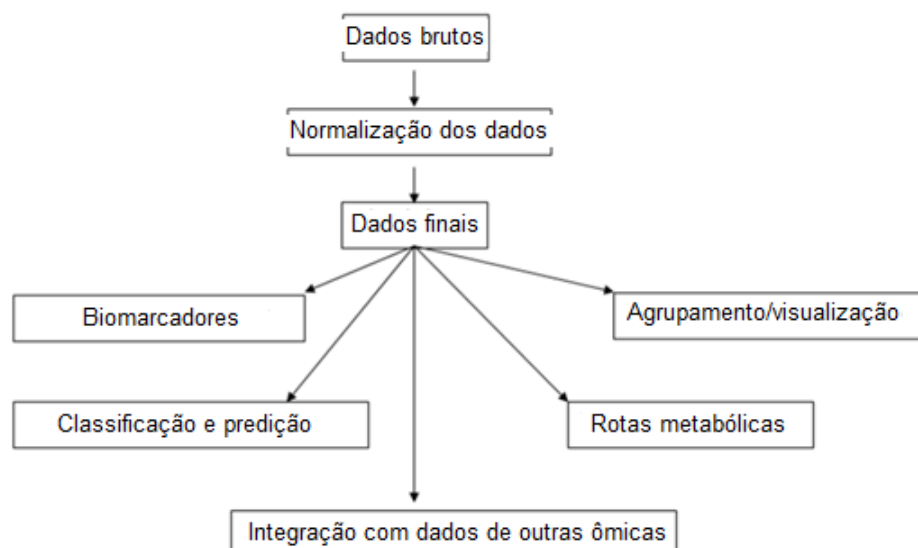
A técnica de espectrometria de massas também pode ser utilizada nas aplicações envolvendo metabolômica sem a necessidade de acoplamento às técnicas de cromatografia ou eletroforese capilar. A infusão direta das amostras no espectrômetro de massas (DIMS) é utilizada principalmente para obtenção de *fingerprints* e identificação abrangente dos metabólitos presentes. DIMS utiliza fontes de ionização à pressão atmosférica (API) tais como ESI ou APCI, enquanto os analisadores de massa de alta resolução mais utilizados são o TOF (resolução de 50.000, acurácia de 1ppm), Orbitrap (resolução de 100.000, acurácia < 1ppm) e a ressonância ciclôtrônica de íons por transformada de Fourier-FTICR (resolução de 500.000, acurácia < 1ppm) (WOLFENDER et al., 2015).

Também têm sido realizados importantes estudos em metabolômica através do acoplamento da espectrometria de massas com a fonte de ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI) para a obtenção de *fingerprints*. Esta técnica permite identificar e gerar uma imagem (também chamada de *MS imaging* ou MSI) contendo a distribuição dos metabólitos dentro de diferentes tecidos e células (LEE et al., 2012).

2.3.4 Métodos de tratamento de dados

A grande quantidade de dados metabolômicos gerados no processo de análise requer a utilização de métodos computacionais para que os mesmos sejam pré-processados e interpretados. Os métodos de pré-processamento dizem respeito à melhoria dos sinais brutos, que geralmente incluem redução do ruído, detecção de picos, correção da linha de base, alinhamento e normalização do pico (ENOT et al., 2008; ENOT et al., 2011). Aqui será dada ênfase nos métodos de análise e interpretação dos dados metabolômicos, conforme Figura 10.

Figura 10. Estratégias de análise e interpretação de dados metabolômicos.



Fonte: Adaptado de Li et al. (2012).

A utilização de métodos multivariados de análise podem extrair informações significativas a partir de uma grande quantidade de dados e fornecer modelos que sejam capazes de avaliar padrões de covariância entre as variáveis, o que está além da capacidade dos métodos estatísticos univariados tradicionais. O Quadro 2 lista os principais métodos quimiométricos utilizados para análise multivariada de dados.

Os métodos quimiométricos para interpretar os dados metabolômicos devem ser selecionados de acordo com o objetivo do estudo. Se o objetivo é a classificação da amostra e informações prévias sobre a mesma são desconhecidas, métodos não supervisionados como análise de agrupamento hierárquico (HCA) e análise dos componentes principais (PCA) são geralmente utilizados.

Quadro 2. Alguns métodos quimiométricos utilizados para análise multivariada de um conjunto de dados.

Tipo de modelo	Abreviação	Termo	Linear/ não-linear
Métodos não supervisionados	CCA	Análise de correlação canônica	Linear
	CD-PCA	Agrupamento e análise dos componentes principais pelo método Disjoint	Linear
	HCA	Análise de agrupamento hierárquico	Linear
	K-CCA	Análise de correlação canônica do Kernel	Não-linear
	K-PCA	Análise dos componentes principais do Kernel	Não-linear
	KANN	Redes neurais artificiais de Kohonen	Não-linear
	MSCA	Análise multinível de componentes simultâneos	Linear
	PCA	Análise dos componentes principais	Linear
	SCA	Análise dos componentes simultâneos	Linear
	W-PCA	Análise dos componentes principais de Weighted	Linear
Métodos supervisionados	BANN	Redes neurais artificiais com algoritmo retro-propagação	Não-linear
	ASCA	Análise de componentes simultâneos- análise de variância	Linear
	DA	Análise discriminante	Linear
	K-OPLS-DA	DA pelo método dos mínimos quadrados parciais ortogonais de Kernel	Não-linear
	K-PLS-DA	DA pelo método dos mínimos quadrados parciais de Kernel	Não-linear
	N-PLS-DA	DA pelo método dos mínimos quadrados parciais N-way	Linear
	OPLS-DA	DA pelo método dos mínimos quadrados parciais ortogonais	Linear
	O2PLS-DA	PLS-DA bidirecional ortogonal	Linear
	OSC	Correção de sinal ortogonal	Linear
	PCDA	Análise dos componentes principais discriminantes	Linear
	PLS	Mínimos quadrados parciais	Linear
	SIMCA	Modelagem Independente Flexível por Analogia de Classe	Linear
	PLS-DA	Análise discriminante pelo método dos mínimos quadrados parciais	Linear

Fonte: Bylesjo et al. (2008), Trygg et al. (2007) e Fonville et al. (2011).

Por outro lado, nos casos em que a identidade da amostra é conhecida e o objetivo do estudo é descobrir biomarcadores característicos (por exemplo, comparando amostras de indivíduos saudáveis e doentes), são utilizados métodos supervisionados como análise discriminante pelo método de quadrados mínimos

parciais (PLS-DA) e o método dos k-ésimos vizinhos mais próximos (k-NN). Os métodos supervisionados utilizam a informação prévia sobre a classe da amostra para otimizar a descoberta de biomarcadores.

Como em outros estudos da área das ômicas, o objetivo principal de muitos estudos metabolômicos é encontrar biomarcadores que discriminem entre determinado caso clínico e amostras controle, ou seja, encontrar metabólitos que são alterados sob diferentes condições fisiológicas. No entanto, devido ao grande número de metabólitos estudados simultaneamente numa pequena quantidade de amostras, é comum encontrar metabólitos que aparentam ser biomarcadores, mas na verdade não são. Desse modo, é de importância crucial controlar a taxa de falsos positivos (BROADHURST; KELL, 2006). Para resolver este problema, muitos métodos estatísticos foram desenvolvidos para realizar teste de hipóteses em grande escala (STOREY; TIBSHIRANI, 2003; REINER et al., 2003; XIE et al., 2005; EFRON 2004).

Já nos estudos envolvendo a visualização de agrupamento de dados, os métodos não supervisionados são úteis para a descoberta da classe das amostras e fornecer informações sobre a similaridade dos dados. A análise de componentes principais (PCA) é provavelmente a abordagem não-supervisionada mais amplamente utilizada para exploração e visualização dos dados.

PCA é uma técnica multivariada que transforma os dados para um sistema de coordenadas em que cada nova projeção (também chamada de componente principal, PC) é uma combinação linear das variáveis originais (BRO; SMILDE, 2014). Os PCs são ortogonais, de modo que cada dimensão está relacionada com características diferentes de dados e fonte de variabilidade no sentido matemático (ENOT et al., 2008). Alguns exemplos de trabalhos recentes que utilizaram a técnica PCA na área de metabolômica de plantas estão listados a seguir: a discriminação do perfil químico de diferentes variedades de plantas (PETRETTO et al., 2016); alterações no perfil de metabólitos secundários em folhas de plantas submetidas a radiação *gamma* (RAMABULANA et al., 2015); alterações na produção de metabólitos primários devido ao stress hídrico (GRIESSER et al., 2015); discriminação do grau de maturação de frutos (HURTADO-FERNÁNDEZ et al.,

2015) e avaliação do perfil de metabólitos de plantas sob crescimento *in vitro* (KHAN et al., 2015).

Outro método não supervisionado bastante popular é a análise de agrupamento hierárquico (HCA), que agrupa os dados para formar um diagrama em formato de árvore ou dendograma que mostra as relações entre as amostras (EBBELS et al., 2006). Este método utiliza um algoritmo para calcular as distâncias entre todos os pares de amostras, sendo que as amostras mais similares entre si são agrupadas juntas e formam um *cluster*. Na área de metabolômica, por exemplo, Madala et al. (2014) utilizaram com sucesso as técnicas HCA e PCA para avaliar a distribuição de metabólitos pelas células das plantas *Nicotiana tabacum* e *Sorghum bicolor* quando expostas a um indutor de ativação da defesa das plantas. De forma análoga, Jing et al. (2015) utilizaram HCA para discriminar o perfil de COVs de 20 diferentes espécies e variedades de *Citrus*, possibilitando a utilização de um novo método de classificação taxonômica de espécies de plantas.

O agrupamento de dados em metabolômica pode ser prejudicado pelo ruído proveniente da variabilidade biológica, erros de amostragem e erros analíticos. Na prática, é comum combinar métodos de redução de dimensionalidade e de agrupamento. Por exemplo, primeiramente é realizada uma PCA das amostras para calcular um subconjunto de componentes principais. Em seguida, os metabólitos identificados nos *loadings* destes PCs específicos são utilizados para o agrupamento das amostras através de métodos hierárquicos (POHJANEN et al., 2006).

Enquanto o propósito das técnicas aglomerativas é agrupar dados semelhantes juntos, as técnicas de classificação visam encontrar uma regra para discriminar as diferentes classes de forma otimizada, bem como selecionar o subconjunto de fatores que são mais discriminativos ou preditivos. É utilizado um subconjunto de dados, chamados de amostras de treinamento, para estabelecimento de um modelo que discrimine as diferentes classes de amostras. Então são utilizadas novas amostras para prever o rótulo de sua classe (como doente ou sadia, por exemplo) e desta forma testar a eficiência do modelo.

O método k-NN é tido como o método mais simples de todas as abordagens de classificação supervisionadas (EBBELS, 2006). Uma vez definido o conjunto de treinamento, a próxima etapa é a construção propriamente dita do modelo de classificação k-NN. Durante a construção do modelo, cada amostra do conjunto de treinamento é excluída uma única vez e então classificada utilizando as amostras restantes. São calculadas as distâncias entre a amostra excluída e todas as outras amostras do conjunto de treinamento, sendo estas distâncias colocadas em ordem crescente para facilitar a identificação dos seus k vizinhos mais próximos. Essa amostra é então classificada de acordo com a maioria dos “votos” de seus vizinhos mais próximos. Se a classe designada pelos votos dos vizinhos mais próximos coincidir com a sua classe verdadeira, a classificação foi bem sucedida.

O método k-NN apresenta uma série de vantagens sobre os outros métodos. Primeiramente, ele é computacionalmente muito simples; além de funcionar bem com qualquer número de variáveis e também quando o número de amostras em uma das classes é pequeno. Outra vantagem desse método é que ele é praticamente o único que funciona bem quando as classes no conjunto de treinamento estão fortemente subgrupadas ou parcialmente superpostas, como, por exemplo, no caso de os dados apresentarem um comportamento assimétrico (FERREIRA, 2015). Como exemplo, Japón-Luján et al. (2006) utilizaram a técnica k-NN associada à HCA e PCA para classificar três diferentes variedades de oliveiras (*Olea europaea*) através do seu perfil de fenóis.

Já a análise discriminante pelo método dos quadrados mínimos parciais (PLS-DA) emprega lógica similar à de uma regressão do PCA que tira proveito de informações dos rótulos das diferentes classes para maximizar a separação entre grupos de amostras. O gráfico de *loadings* do PLS-DA permite a obtenção dos metabólitos estatisticamente significativos nas amostras avaliadas, tanto aqueles que sejam comuns aos diferentes grupos quanto os compostos que sejam exclusivos de um único grupo (WIKLUND et al., 2008). Este é o método quimiométrico supervisionado mais utilizado atualmente em metabolômica (WORLEY; POWERS, 2013; JUNG et al., 2011). Por exemplo, Grata et al. (2008) desenvolveram um método por UPLC-TOF-MS e PLS-DA para determinação do perfil metabólico da planta *Arabidopsis thaliana*, enquanto que Kim et al. (2011c) aplicaram PLS-DA para discriminar entre

as sementes desta planta com mutação genética ou não através da análise do seu perfil metabólico utilizando a técnica DART-MS.

2.4 APLICAÇÕES DAS TÉCNICAS ANALÍTICAS NA DETECÇÃO E MONITORAMENTO DE DOENÇAS EM PLANTAS

Estão em rápida expansão os trabalhos envolvendo a identificação de metabólitos relacionados à infecção de plantas por diferentes tipos de patógenos causadores de doenças. Uma relação dos trabalhos mais recentes que estudam as interações planta-patógeno com abordagem metabolômica é mostrada no Quadro 3. Os artigos foram recuperados do banco de dados da *Web of Science* e ScinFinder utilizando os termos de busca “*plant*”, “*pathogen*” e “*metabolomics*” como palavras-chave.

Por exemplo, foi desenvolvido um método baseado em HS-SPME e GC×GC-qMS para análise dos metabólitos voláteis de eucalipto (*Eucalyptus globulus*) sadios e infectados pelo fungo *Teratosphaeria nubilosae* e obtenção dos perfis para a identificação de biomarcadores da doença (HANTAO et al., 2013). Os autores identificaram 48 metabólitos e verificaram, após a utilização de PLS-DA, que a infecção por *T. nubilosa* conduz ao aumento da produção de compostos semivoláteis, tais como sesquiterpenos, quando comparado aos compostos mais voláteis, como terpenos. Além disso, ocorreu aumento na produção de flavonoides, e sabe-se que os terpenóides desempenham um papel importante na síntese biológica de flavonóides e no mecanismo de defesa de plantas. Neste trabalho, a utilização da técnica de cromatografia bidimensional permitiu um maior poder de separação e a identificação de uma quantidade de compostos superior à GC unidimensional.

Quadro 3. Metabólitos identificados na interação de plantas com patógenos.

Patógeno	Planta	Metabólitos	Referência
Bactéria	<i>Arapidopsis</i>	Salicilato, ácido azeláico	JUNG et al., 2009
	<i>Citrus</i>	Açúcares, ácido ascórbico, compostos voláteis	BALDWIN et al., 2010
	<i>Arapidopsis</i>	Camalexina	BEETS et al., 2012
	<i>Arapidopsis</i>	Salicilatos, jasmonas, camalexina	MISHINA & ZEIER, 2007
	<i>Arapidopsis</i>	Salicilatos, glucosinolatos, camalexinas, auxinas, aminoácidos	TRUMAN et al., 2010
	<i>Arapidopsis</i>	Glicerol, glicerol-3-fosfato, salicilatos, jasmonatos, ácido azeláico, lipídios	CHANDA et al., 2011
	<i>Arapidopsis</i>	Ácidos orgânicos	O'BRIEN et al., 2012
	<i>Citrus</i>	Aminoácidos, ácidos orgânicos, açúcares	CEVALLOS-CEVALLOS et al., 2012
Fungo	<i>Arapidopsis</i>	Aminoácidos, ácidos orgânicos, açúcares	BOTANGA et al., 2012
	<i>Arapidopsis</i>	Ácido 3-indole carboxílico	GAMIR et al., 2012
	<i>Brachypodium distachyon</i>	Lipídios	ALLWOOD et al., 2006
	<i>Citrus unshiu</i>	Aminoácidos, ácidos orgânicos, açúcares, lipídios	YUN et al., 2013
	<i>Eucalyptus globulus</i>	Compostos orgânicos voláteis	HANTAO et al., 2013
	<i>Helianthus annuus</i>	Aminoácidos, ácidos orgânicos, açúcares, ácido clorogênico	PELUFFO et al., 2010
	<i>Hordeum vulgare</i>	Fenilpropanoides	BOLLINA et al., 2011
	<i>Lupinus angustifolius</i>	Flavonoides	WOJAKOWSKA et al., 2013
	<i>Nicotiana tabacum</i>	Terpenoides, cumarinas, jasmonatos	TAUTENHAHN et al., 2007
	<i>Nicotiana tabacum</i>	Fenilpropanoides	MADALA et al., 2013
	<i>Oryza sativa</i>	Diterpenoides, hidroxicinamaldeídos	KISHI-KABOSHI et al., 2010
<i>Solanum tuberosum</i>	Aminoácidos, ácidos orgânicos, açúcares, lipídios, alcaloides	ALIFERIS & JABAJI, 2012	
Vírus	<i>Gracilaria chilensis</i>	Oxilipinas, jasmonatos	WEINBERGER et al., 2011
	<i>Nicotiana tabacum</i>	Capsidiol	MATROS et al., 2006
	<i>Oryza sativa</i>	Salicilato e benzoato metílicos	ZHAO et al., 2010

Outro trabalho utilizou a técnica HS-SPME associada à GC-MS para identificação de biomarcadores de infecção pela bactéria *Candidatus liberibacter* em folhas de citrus, que causa a doença mais devastadora para estas plantas, chamada HLB (CEVALLOS-CEVALLOS, 2011). As análises de folhas sadias e infectadas

possibilitaram a identificação dos compostos prolina, β -elemeno, trans-cariofileno e α -humuleno como possíveis biomarcadores voláteis para o HLB. No entanto, ainda são necessários estudos de validação envolvendo diferentes cultivares, variações climáticas e presença de diferentes doenças para confirmar se estes biomarcadores são específicos ao HLB.

Recentemente tem sido aplicada a técnica MSI (*MS imaging*) para visualização da distribuição espacial de metabólitos de plantas infectadas por patógenos. Por exemplo, utilizou-se a técnica DESI-MS *imaging* para monitorar a resposta metabólica de batatas inoculadas com o fitopatógeno *Pythium ultimum* (TATA et al., 2015). Os autores verificaram que após oito dias de inoculação a abundância relativa dos glicoalcalóides α -solanina (m/z 706) e α -chaconina (m/z 722) diminuía, enquanto que a abundância relativa dos compostos solanidina (m/z 398), solasodenona (m/z 412), solanaviol (m/z 430), solasodieno (m/z 396), solaspiralidina (m/z 428), γ -solanina (m/z 560), β -solanina (m/z 706) e β -chaconina aumentaram.

Outro estudo utilizou uma análise metabolômica *untargeted* através de uma plataforma analítica abrangente por UPLC-MS e GC-MS para determinar e comparar os níveis dos metabólitos presentes na planta do tomateiro (*Solanum lycopersicum*) infectado pelos patógenos *Botrytis cinerea* (Bot) e *Pseudomonas syringae* (Pst) (CAMANES et al., 2015). Os dados mostraram alterações significativas nos níveis de aminoácidos, açúcares e ácidos graxos livres. A comparação dos perfis metabólicos referentes à infecção com cada patógeno também mostrou claras diferenças, refletindo o fato de que estes patógenos utilizam mecanismos de infecção diferentes e, portanto, a planta utiliza mecanismos de defesa específicos. Esta abordagem permitiu verificar alterações nos níveis dos metabólitos presentes em rotas biossintéticas importantes.

Em um estudo semelhante ao anterior, foram avaliadas alterações metabólicas em folhas de *Arabidopsis thaliana* associadas com o estabelecimento da infecção por *Pseudomonas syringae* através das técnicas de H^1 RMN e GC-TOF-MS (WARD et al., 2010). Foram observadas diferenças significativas no metaboloma das folhas desta planta após 8 h de infecção, principalmente nos compostos fenólicos, indólicos, aminoácidos, glucosinolatos e outros. Também foi feito um estudo da

dinâmica metabólica associada com a infecção bacteriana e uma integração com resultados de transcriptoma para distinguir quais vias metabólicas estavam transcricionalmente ativadas.

Outro estudo com a *Arabidopsis thaliana* identificou o metabólito 4-OH-ICN como responsável pela indução de defesa a patógenos na planta (RAJNIAK et al., 2015). Nos testes em que as enzimas biossintéticas do 4-OH-ICN foram desativadas, as plantas mostraram um aumento de susceptibilidade ao agente patogênico *Pseudomonas syringae*. Estes resultados identificaram pela primeira vez a importância desta rota biossintética no mecanismo de defesa da *Arabidopsis*.

Este tipo de abordagem metabolômica *untargeted* permite não só a identificação de possíveis biomarcadores de infecção na planta, mas também possibilita a avaliação do papel fisiológico dos compostos identificados assim como sua influência nas diferentes rotas biossintéticas. Neste contexto, a integração de dados da metabolômica com dados de proteômica, transcriptômica e genômica é crucial para uma avaliação abrangente da influência destes metabólitos nos mecanismos de defesa e resistência da planta.

CAPÍTULO 3

Discriminação de biotipos de plantas da espécie *Eugenia uniflora* L. através do perfil de compostos orgânicos voláteis extraídos das folhas utilizando HS-SPME/GC-MS e análise quimiométrica

3.1 INTRODUÇÃO

A pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) é uma árvore frutífera pertencente ao gênero *Eugenia*, um dos maiores da família Myrtaceae, nativa de regiões tropicais e subtropicais da América do Sul (FAQUETI et al., 2013). Esta planta produz frutos comestíveis do tamanho de cerejas com gosto ao mesmo tempo doce e azedo (COSTA, 2013), que são comumente utilizados na produção de sucos, polpas, sorvetes, geleias, licores e vinhos (SILVA, 2006; SOARES et al., 2014).

Encontra-se distribuída por todo o território nacional, principalmente nos biomas do Cerrado e Mata Atlântica (DONADIO et al., 2002) ao longo das margens dos córregos e próximo a matas (LOPES et al., 2013). É descrita como uma árvore de pequeno porte, com altura variando de 2 a 9 metros, ramificada e de copa densa com 3 a 5 metros de diâmetro (Figura 11) (LORENZI, 1998). Em geral, é uma espécie adaptável a todas as condições de solo, desde que não estejam sujeitos a inundações (BEZERRA et al., 2002).

Figura 11. Árvore da espécie *Eugenia uniflora* L.



Foto: Lucimário Pereira Bastos (2013).

A única cultivar de pitangueira disponível no Brasil é a Tropicana, lançada pelo Instituto Pernambucano Agrônomo (IPA). Os seus frutos apresentam coloração vermelho-escuro, brilhoso, com peso médio variando entre 3,0 a 4,5 gramas, com duas a três sementes (IPA, 2000).

Suas folhas são simples, com variações de formatos, coloração verde, castanhas em estágio juvenil e avermelhadas quando maduras e de consistência membranácea com pecíolo medindo aproximadamente 2 mm (LORENZI, 1998; ROMAGNOLO; SOUZA, 2006).

Suas folhas apresentam variações de formatos (Figura 12), coloração verde, que em estágio juvenil apresentam uma coloração rosada, que se torna verde escuro brilhante com o seu envelhecimento. Ao esmagar as folhas é liberado um odor característico muito agradável, com fortes notas frescas e amadeiradas.

Figura 12. Principais formatos das folhas de *E. uniflora* a) ovalada b) lanceolada c) elíptica.

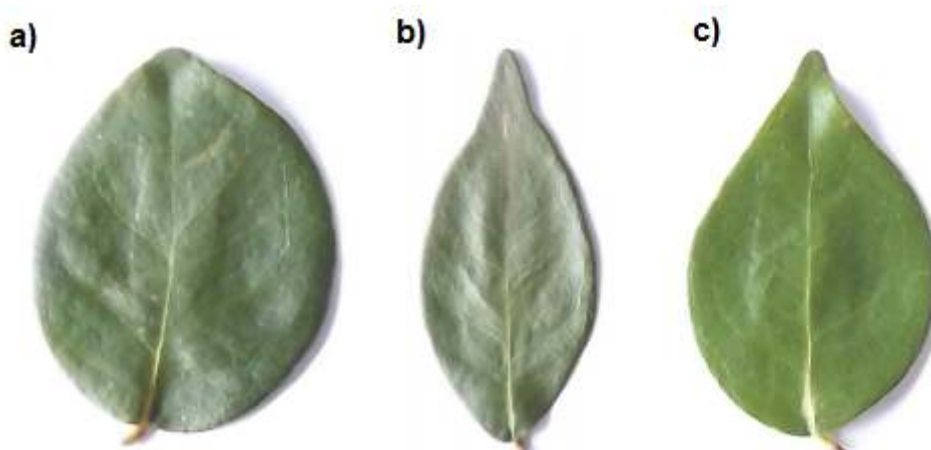


Foto: Lucimário Pereira Bastos (2013).

O nome pitangueira vem do tupi “pi’tãg”, que significa vermelho e se refere à coloração dos frutos. Estes frutos são do tipo baga, globoso, deprimido nos polos com sete a dez sulcos longitudinais, possuindo um tamanho variando de 1,75 a 5,0 cm de diâmetro, coroados com sépalas persistentes e aroma característico da espécie (BEZERRA et al., 2000; LIRA JUNIOR et al., 2007; ALMEIDA et al., 2012). O aroma do fruto é intenso com sabor doce e ácido. No processo de maturação, os frutos passam de verde para amarelo, alaranjado, podendo chegar a vermelho, roxo ou até quase negro (BEZERRA et al., 2002b).

A ocorrência de plantas que produzem biotipos de frutos com diferentes cores, tais como o amarelo, laranja, vermelho e roxo pode ser um indicativo da existência de

diferentes variedades de *E. uniflora* (LIMA, 2002; BAGETTI, 2011). Estudos mostraram que existe diferença na composição do óleo essencial extraído de folhas de *E. uniflora* com biotipos de frutos amarelo, vermelho e roxo, o que também pode indicar a presença de diferentes quimiotipos para esta espécie (COSTA, 2010). No entanto, não se tem definido quantos biotipos de *E. uniflora* existem para essa espécie.

A caracterização de *E. uniflora* através da quimiotaxonomia dos diferentes biotipos (ou variedades) pode ajudar no estudo da correlação entre a composição química dos biotipos e as suas propriedades farmacológicas. Por exemplo, Celli et al. (2011) estudaram os frutos de *E. uniflora* e verificaram que o teor de fenólicos totais das amostras com biotipo roxo era maior que o das amostras com biotipo vermelho. Além disso, os compostos fenólicos são considerados determinantes para o estabelecimento da capacidade antioxidante da planta.

Os estudos da pitangueira, em sua maioria, tem sido voltados para a análise química do óleo essencial extraído das folhas de *E. uniflora*. Monoterpenos, sesquiterpenos e terpenóides oxigenados são os principais compostos presentes no óleo essencial (MAIA, 1999; MELO, 2007). As folhas de *E. uniflora* têm sido utilizadas na medicina popular para o tratamento de uma série de enfermidades, tais como diarreia (SCHAPOVAL, 1994; ALMEIDA, 1995), inflamação (SCHAPOVAL, 1994), hiperglicemia, hiperlipidemia, hipertriglicemia (FERRO, 1988; ARAI, 1999; MATSUMURA, 2000) e hipertensão (AURICCHIO, 2003). Além disso, estas têm sido testadas como antimalárico (MORIOKA, 2000), anti-*Leishmania* (RODRIGUES, 2013), agente espasmolítico (WAZLAWIK, 1997) e como inibidor de polimerase do DNA, maltase, sacarase e α -glicosidase (LEE, 1997; LEE, 2000).

A extração dos óleos voláteis das folhas de *E. uniflora* é realizada através de hidrodestilação, Soxhlet ou fluido supercrítico (GALHIANE, 2006; MELO, 2007; LAGO, 2011). No entanto, estes métodos são laboriosos, demorados e podem produzir artefatos que levarão a uma interpretação errônea sobre a composição do aroma da *E. uniflora* (MAZIDA, 2005). Neste contexto, a microextração em fase sólida no modo headspace (HS-SPME) se apresenta como uma técnica mais eficiente para análise de compostos orgânicos voláteis (COVs) de folhas de *E. uniflora*, devido à sua simplicidade, ausência de solventes, pouca manipulação da

amostras, alta pré-concentração dos COVs, menor tempo de extração e facilidade de automação (BICCHI, 2000). Por exemplo, está técnica já foi utilizada para a extração de COVs de pimenta (*Capsicum chinense* sp.) (SOUSA, 2006), calos de *Plectranthus ornatus* (PASSINHO-SOARES, 2013), folhas de *Mentha×piperita* L. e *Mentha spicata* L. (SILVA, 2013), e diferentes tecidos de *Polygonum minus* (AHMAD, 2014).

A discriminação das variedades de *E. uniflora* baseada nos perfis de COVs requer o emprego de técnicas de análise multivariada de dados para considerar o grande número de compostos detectados neste tipo de amostras. As técnicas multivariadas de reconhecimento de padrões (BRERETON, 2003; BRO, 2014), como *Principal Component Analysis* (PCA) e *Hierarchical Cluster Analysis* (HCA), são ferramentas poderosas para identificar, respectivamente, diferenças e semelhanças entre agrupamentos de amostras complexas.

3.2 OBJETIVO GERAL

Desenvolver uma metodologia analítica por HS-SPME/GC-MS para identificar os compostos orgânicos voláteis extraídos de folhas de *E. uniflora* e discriminar as plantas que produzem diferentes biotipos de frutos (laranja, vermelho e roxo) através de técnicas de análise multivariada.

3.2.1 Objetivos específicos

- a) Desenvolver um método analítico por HS-SPME/GC-MS para determinação de COVs em amostras de plantas da espécie *Eugenia uniflora* L.;
- b) Discriminar amostras de plantas da espécie *Eugenia uniflora* L. com diferentes biotipos de cor dos frutos com base no seu perfil de COVs e utilização de técnicas de análise multivariada;

- c) Identificar COVs que sejam potenciais biomarcadores de plantas da espécie *Eugenia uniflora* L. com diferentes biotipos de cor dos frutos (laranja, vermelho ou roxo).

3.3 METODOLOGIA

3.3.1 Materiais e reagentes

Os solventes e padrões analíticos de n-alcenos C₈–C₄₀, (E)-2-hexenal, 1-hexanol, (Z)-3-hexen-1-ol, β-mirceno, α-felandreno, 3-careno, (Z)-β-ocimeno, (E)-β-ocimeno, terpinoleno, linalool, (Z)-3-hexenil butirato e β-cariofileno foram adquiridos da Sigma-Aldrich (EUA).

As fibras de SPME polidimetilsiloxano/divinilbenzeno (PDMS/ DVB, 50/30 μm); divinilbenzeno/carboxen/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS, 65 μm); carboxen/polidimetilsiloxano (CAR/PDMS, 75 μm); poliacrilato (PA, 85 μm) e polidimetilsiloxano (PDMS, 100 μm), utilizadas em amostrador manual de SPME, foram compradas da Supelco (Bellefonte, PA, EUA).

3.3.2 Coletas das amostras de *E. uniflora*

As folhas frescas de *E. uniflora* com biotipos de cor de frutos laranja, vermelho e roxos (Figura 13) foram coletadas entre julho e setembro de 2014, nas vizinhanças das cidades Cruz das Almas (S 12° 39' 40"; W 039° 04' 11") e Conceição do Almeida (S 12° 46' 32"; W 039° 09' 50"), ambas localizadas na Bahia. Os biotipos de cor do fruto foram determinados quando os mesmos estavam completamente maduros. As folhas de três plantas de cada biotipo foram coletadas, colocadas em sacos plásticos fechados e transportados em recipiente com gelo para o laboratório, onde foram armazenados em freezer a -18 °C até análise.

Figura 13. Plantas de *E. uniflora* com diferentes biotipos de frutos (A) laranja (B) vermelho (C) roxo.

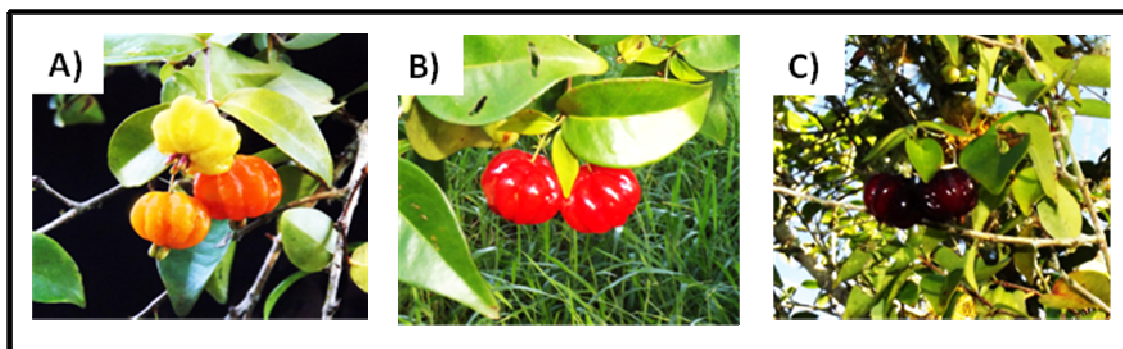


Foto: Lucimário Pereira Bastos (2014).

3.3.3 Otimização do método de microextração em fase sólida (SPME)

Para otimizar o método de extração por SPME foi utilizado uma amostra de folhas de *E. uniflora* com biotipo de frutos vermelho. Para escolha da melhor fibra extratora, cinco tipos de fase de revestimento da fibra (PDMS/DVB, DVB/CAR/PDMS, CAR/PDMS, PDMS e PA) foram expostas ao headspace de 0,2g de amostra, na temperatura de 50 °C e tempo de extração de 20min. Em seguida, foi realizado um planejamento fatorial completo 2^2 (ARAÚJO; BRERETON, 1996; BRERETON, 2003) para avaliar variáveis que influenciem significativamente na técnica de extração SPME. Foram realizadas três repetições no ponto central do planejamento fatorial, a fim de estimar o erro experimental. As variáveis avaliadas neste planejamento experimental foram: *i*) temperatura de extração e *ii*) tempo de extração. Os níveis utilizados nestes experimentos estão listados na Tabela 3. A resposta avaliada durante todos os experimentos foi a soma total das áreas dos picos cromatográficos, obtida na análise por GC-MS.

Tabela 3. Níveis experimentais das variáveis avaliadas no planejamento fatorial completo 2^2 para otimização do método de extração de COVs por HS-SPME em folhas de *E. uniflora*.

Variável	Níveis codificados		
	(-1)	(0)	(+1)
Temperatura de extração, °C	40	50	60
Tempo de extração, min	10	20	30

Uma vez que foram determinadas as variáveis significativas, foi realizado um desenho composto central com 3 repetições no ponto central e metodologia de superfície de resposta (ARAÚJO; BRERETON, 1996; BRERETON, 2003), a fim de localizar os valores ideais de temperatura e tempo de extração para que se tenha uma maior eficiência do método de extração. Os níveis experimentais envolvidos na otimização do planejamento composto central estão listados na Tabela 4. Os cálculos estatísticos dos planejamentos experimentais multivariados utilizados foram realizados utilizando o software Statistica 7.0 (Statsoft, EUA).

Tabela 4. Níveis experimentais das variáveis avaliadas no desenho composto central para otimização do método de extração de COVs por HS-SPME em folhas de *E. uniflora*.

Variáveis	Níveis codificados				
	(-1.414)	(-1)	(0)	(+1)	(+1.414)
Temperatura de extração, °C	36	40	50	60	64
Tempo de extração, min	16	20	30	40	44

3.3.4 Condições do método de extração SPME otimizado

Uma massa de 0,1 g de folhas de *E. uniflora* foi colocada em frascos de vidro de 20 mL e triturada para posterior extração dos COVs através da técnica SPME no modo *headspace* (HS), que é o espaço gasoso acima da amostra dentro do recipiente fechado. A extração foi realizada colocando-se o frasco em um bloco de aquecimento de alumínio (4 cm de altura por 14 cm de diâmetro), sobre uma placa de aquecimento de temperatura controlada. As extrações de HS-SPME foram realizadas, após otimização, de acordo com as seguintes condições: fibra CAR-PDMS (75 µm), tempo de extração de 60 min; temperatura de extração de 54 °C. Após a extração e pré-concentração dos COVs, a fibra foi então inserida diretamente no injetor do cromatógrafo a gás (GC) por 5 min. As extrações foram realizadas em triplicata para cada planta.

3.3.5 Análise por GC-MS

As análises foram realizadas utilizando um sistema de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS) (Figura 14), Modelo GCMS-QP2010

(Shimadzu, Kyoto, Japão), com detector do tipo quadrupolo e equipado com um injetor no modo splitless na temperatura de 250 °C. Os COVs foram separados numa coluna capilar (Rxi-1 MS 100%, dimetilpolissiloxano; 30 m x 0,25 mm ID x 0,25 um, Restek, Bellefonte, EUA), utilizando hélio (99,99%) como um gás de arraste com fluxo de 0,80 mL min⁻¹. A temperatura do forno variou como se segue: 50 °C (3 min), em seguida aquecida a 80 °C a uma taxa de 2 °C min⁻¹, depois 3 °C min⁻¹ até 110 °C (mantido por 3 min), em seguida, 2 °C min⁻¹ para 145 °C, em seguida, 5 °C min⁻¹ até 220 °C (tempo total de 63,5 min). As condições do detector de massa quadrupolo foram: temperatura de transferência de linha de 220 °C, temperatura da fonte de íons de 220 °C e com o modo de ionização de impacto de elétrons a 70 eV.

Figura 14. Cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas (GC-MS).



Foto: Wyllian Franz dos Santos Oliveira (2015).

3.3.6 Análise multivariada dos dados

Foi avaliado um conjunto de 33 COVs que foram detectados na maioria das amostras de folhas analisadas. A matriz de dados que contém as áreas dos picos de 33 COVs e 27 amostras de folhas de *E. uniflora* com três biotipos (laranja, vermelho e roxo) foi submetida à análise de componentes principais (PCA) e análise de agrupamento hierárquico (HCA) com o pré-tratamento auto-escalado dos dados (ARAÚJO; BRERETON, 1996; BRERETON, 2003). Considerando que a PCA é uma técnica quimiometria bem conhecida de análise multivariada, que torna mais fácil visualizar as tendências de agrupamento entre as amostras, usando toda a

informação contida em um grande número de variáveis, esta ferramenta foi utilizada para avaliar tendências de agrupamento de amostras de *E. uniflora* com diferentes biotipos de cores de frutos, com base nos seus perfis de COVs. Enquanto que a HCA é uma ferramenta estatística de determinação de agrupamentos de amostras com base na similaridade das mesmas, medindo distâncias entre todos os pares possíveis de amostras no espaço dimensional. O *software* Pirouette 3.11 (Infometrix, Woodinville, WA) foi utilizado para os cálculos de PCA e HCA e o Origin 8.1 (OriginLab Corp.) foi usado para gerar os gráficos de PCA 3D através dos valores dos vetores calculados utilizando o Pirouette. O mapa de calor foi gerado através do pacote estatístico MetaboAnalyst 3.0 (XIA et al., 2015).

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

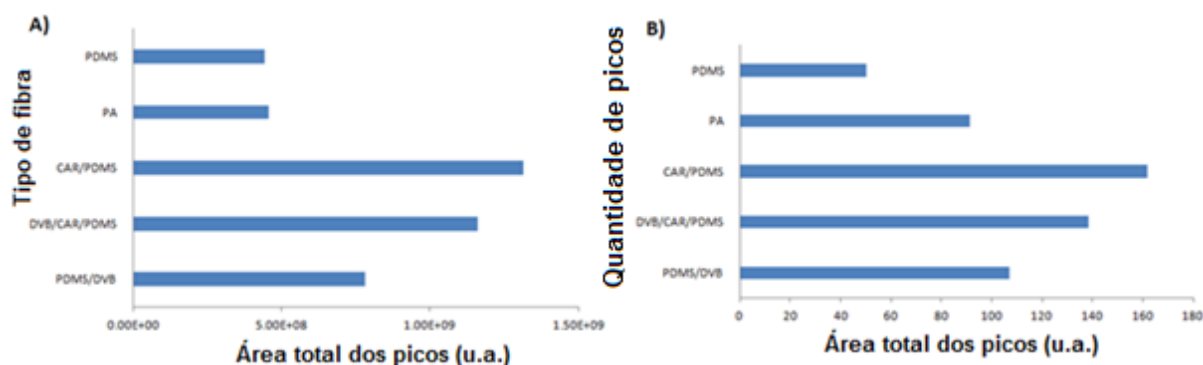
3.4.1 Otimização da técnica de extração HS-SPME

O tipo de fase de revestimento da fibra que possui maior afinidade pelos compostos voláteis extraídos de folhas de *E. uniflora* foi o primeiro parâmetro a ser avaliado nesse estudo através do método univariado. Cinco tipos de fase de revestimento da fibra foram expostas ao headspace proveniente da mesma quantidade de amostra (0.2 g), temperatura (50 °C) e tempo de extração (20 min).

A comparação entre os cinco tipos de revestimentos de fibras foi realizada com base na área total dos picos (eficiência de extração) e número de picos detectados. Cada extração foi feita em triplicata e a repetibilidade (RSD%) apresentou valores menores que 20% em todos os casos. De acordo com os resultados obtidos, o uso da fibra CAR/PDMS resultou em maior área total de picos (Figura 15A) e um maior número de compostos detectados (Figura 15B). A eficiência de extração das cinco fibras testadas apresentou a seguinte ordem: CAR/PDMS > DVB/CAR/PDMS > PDMS/DVB > PA > PDMS. Notou-se que na ordem de eficiência de extração aparecem primeiro as fibras de fase mistas e por último as de fase monofásicas. Um total de 162 COVs foram detectados com a fibra CAR/PDMS, enquanto que com as fibras DVB/CAR/PDMS, PDMS/DVB, PA e PDMS foram detectados 138, 107, 91 e 50 COVs, respectivamente. Desse modo, a fibra CAR/PDMS foi selecionada para os

ensaios de otimização seguintes e para a determinação do perfil de voláteis de folhas de *E. uniflora*.

Figura 15. Influência do tipo de revestimento da fibra de SPME na eficiência de extração considerando: (A) área total dos picos e (B) número de picos detectados.

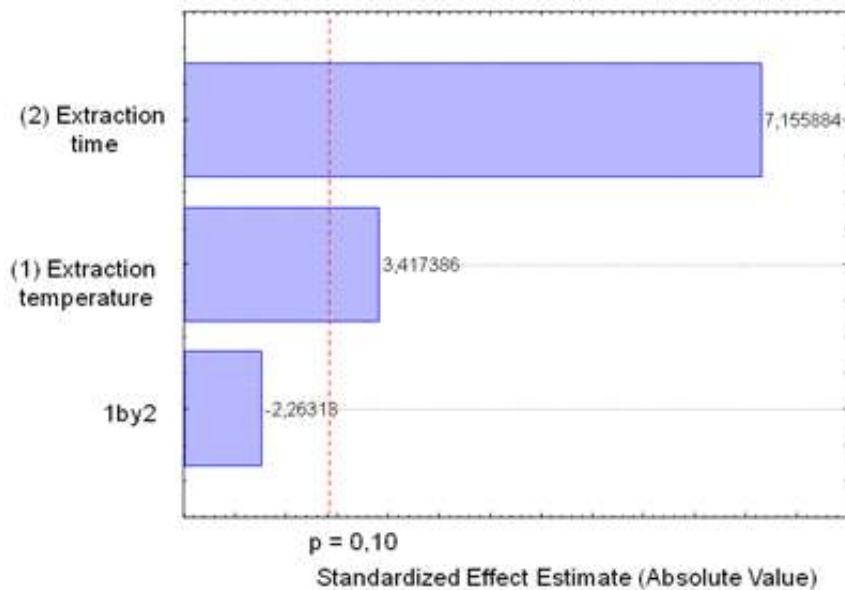


Após a seleção do tipo de revestimento da fibra, a influência dos fatores temperatura e tempo na extração por SPME foi avaliada através de um planejamento fatorial completo 2^2 , conforme os níveis experimentais mostrados na Tabela 3. Nesse estudo, o emprego da otimização multivariada permitiu avaliar as variáveis e suas interações simultaneamente, com uma quantidade reduzida de experimentos quando comparado à otimização univariada (BEZERRA, 2008). Os resultados obtidos com o planejamento fatorial estão mostrados no diagrama de Pareto da Figura 16. Nota-se que tanto o tempo de extração quanto a temperatura de extração foram significativos ao nível de confiança de 90%. Por fim, foi utilizado um planejamento composto central para se determinar os valores ótimos de temperatura e tempo de extração que permitem a maior eficiência de extração por SPME.

A eficiência de extração de um método SPME pode ser afetada pelo tipo e a espessura da fase extratora utilizada, o tempo e a temperatura de extração, e quantidade de amostra (MA, 2013). Estas variáveis de extração podem ser otimizadas a partir de uma abordagem univariada, em que cada fator é modificado separadamente, ou através de design experimental multivariado (ARAÚJO, 1996; BRERETON, 2003), na qual é feita a variação simultânea de todos os fatores avaliados, tornando possível distinguir as interações entre fatores, que não poderiam ser detectadas através de um delineamento experimental univariado. Além disso,

geralmente, a otimização multivariada requer menor número de experimentos para se obter a informação completa sobre os fatores e suas interações.

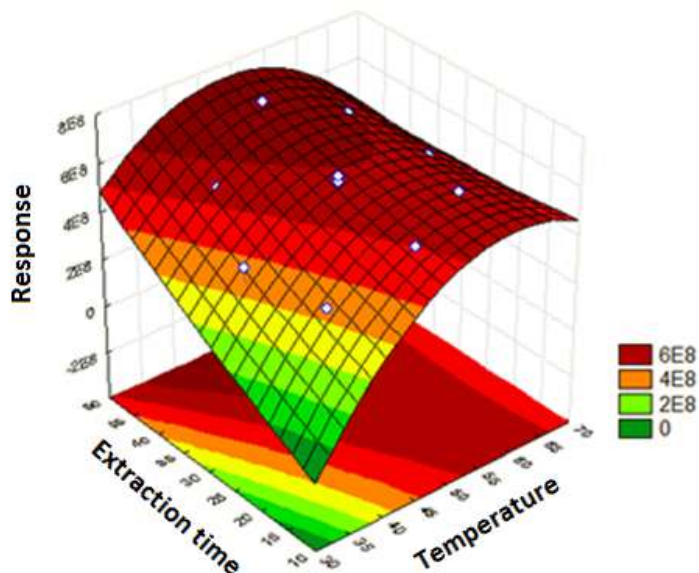
Figura 16. Gráfico de Pareto para avaliação da significância dos fatores no planejamento factorial completo 2^2 .



Considerando que o planejamento em dois níveis não define os valores críticos das variáveis, um planejamento composto central (BEZERRA, 2008) foi construído utilizando como ponto central os níveis experimentais que deram a melhor resposta no planejamento fatorial. Foram realizadas três repetições no ponto central para estimar o erro experimental e para detectar alguma falta de ajuste. O domínio experimental do planejamento composto central está mostrado na Tabela 4.

A superfície de resposta obtida pelo planejamento composto central está ilustrada na Figura 17. Os valores otimizados segundo a superfície de resposta foram $54\text{ }^{\circ}\text{C}$ para a temperatura e 60 min para o tempo de extração. No entanto, o ponto ótimo do tempo de extração estaria fora do limite superior (44 min) do domínio experimental estabelecido.

Figura 17. Superfície de resposta obtida através do planejamento composto central utilizando o seguinte modelo quadrático: $R = -29861t^2 - 761889T^2 + 5130743t + 82481475T - 1812109508$ na otimização das condições (temperatura (T), °C e tempo (t), min) para extração dos voláteis de folhas de *E. uniflora* por HS-SPME.



Então, a fim de avaliar a resposta analítica das condições ótimas estabelecidas pela metodologia de superfície de resposta, experimentos foram realizados nos valores de temperatura e tempo de extração mostrados na Tabela 5.

Tabela 5. Experimentos realizados para confirmar as condições ótimas de extração pelo método SPME estimadas através da metodologia de superfície de resposta, em condições de extrapolação.

Temperatura de extração/ °C	Tempo de extração/min	Resposta/Área total
54	60	$6,31 \times 10^8$
54	44	$5,99 \times 10^8$
64	44	$6,27 \times 10^8$
64	60	$6,20 \times 10^8$

Os dados da Tabela 5 mostram que os valores ótimos de temperatura e tempo de extração obtidos através do planejamento composto central forneceram a melhor resposta analítica quando comparado a valores próximos. Desse modo, foram estabelecidas as condições de temperatura de extração (54 °C) e tempo de extração (60 min) para o método SPME otimizado.

3.4.2 Caracterização dos compostos voláteis de *Eugenia uniflora*

O método HS-SPME otimizado (i.e.: fibra CAR/PDMS; tempo de extração de 60 min; temperatura de extração de 54 °C) foi aplicado à análise do perfil de compostos voláteis extraídos de folhas de plantas de *E. uniflora* com três diferentes biotipos de cores de frutos: laranja, vermelho e roxo. A Figura 18 ilustra os cromatogramas característicos do perfil de voláteis de cada biotipo.

A Tabela 6 mostra todos os COVs identificados, seus respectivos índices de retenção (IR) na coluna capilar Rxi-1 MS e a média de composição relativa (n=9) de cada composto nas amostras de cada biotipo. A identificação dos COVs detectados foi feita tentativamente através da comparação dos espectros de massas experimentais com os espectros de referência da NIST. A confirmação dos COVs foi feita através dos padrões analíticos disponíveis. O IR de cada composto foi calculado nas mesmas condições cromatográficas utilizadas nas análises das amostras e comparados com a literatura, a fim de confirmar a identidade do composto. A composição relativa dos COVs foi calculada através da razão percentual da área do respectivo pico em relação à área total do cromatograma.

Foram identificados 33 compostos voláteis, contendo 54.89%, 58.97% e 64.66% da área total dos picos detectados nas folhas de *E. uniflora* com os biotipos de frutos vermelho, roxo e laranja, respectivamente. A maioria dos constituintes voláteis identificados pertencem a classe dos sesquiterpenos não-oxigenados (Figura 19) como relatado por COSTA et al. (2010). No entanto, outros trabalhos relatam também os monoterpenos não-oxigenados (MORENO, 2007) e sesquiterpenos oxigenados (COSTA, 2009; GALLUCCI, 2010; COSTA, 2010; LAGO, 2011; RODRIGUES, 2013) como os mais abundantes no óleo essencial extraído. Estas diferenças podem estar relacionadas as variações climáticas entre os locais de coleta das plantas, influência de polinizadores e herbívoros, disponibilidade de nutrientes no solo, existência de diferentes variedades da mesma espécie, além da técnica de extração utilizada (LANGENHEIM, 1994; EL-SAWI, 2002; COSTA, 2009; COSTA, 2010).

Figura 18. Cromatogramas característicos da análise HS-SPME/GC-MS de COVs de folhas de *E. uniflora* com biotipos de cores de frutos (A) laranja (B) vermelha e (C) roxa (para identificação dos picos ver Tabela 6).

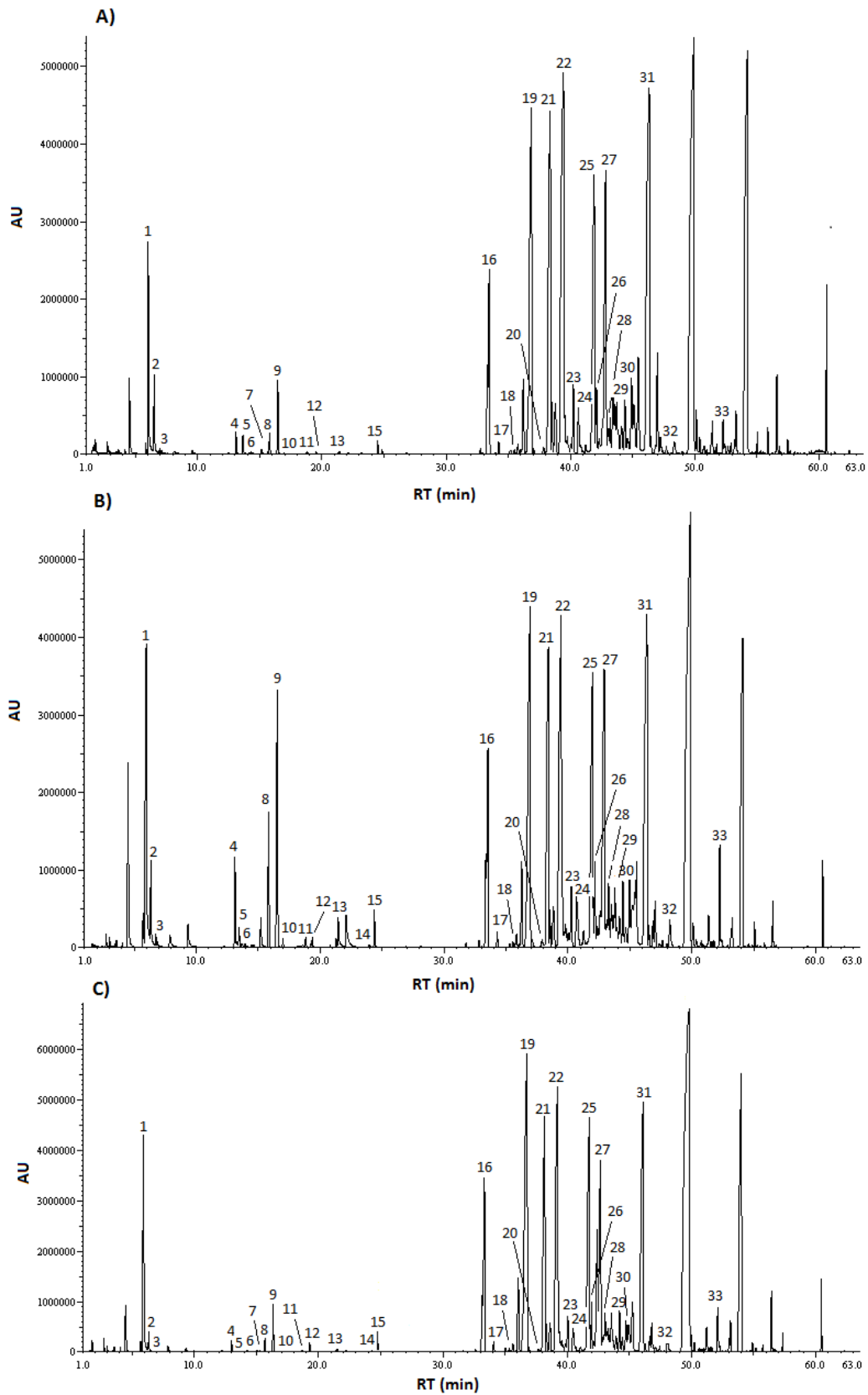


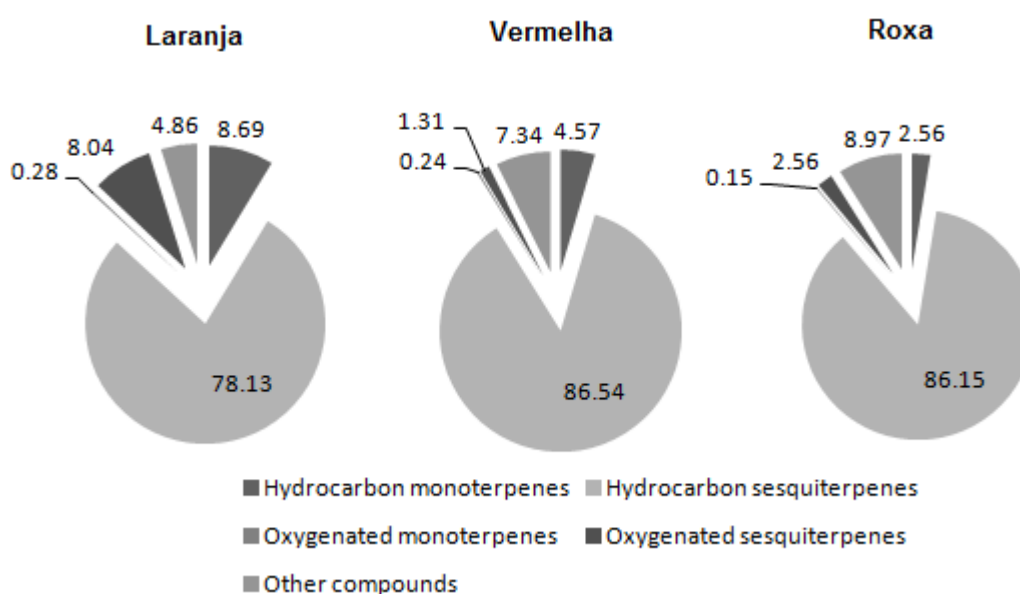
Tabela 6. Composição relativa dos compostos identificados nas folhas de *E. uniflora* com diferentes biotipos de frutos através de HS-SPME/GC-MS.

No.	Composto	KI ^b _{CAL}	KI ^c _{LIT}	Laranja	Vermelho	Roxa
1	(E)-2-hexenal ^a	826	827	2,36	2,87	3,23
2	(Z)-3-hexen-1-ol ^a	838	839	0,65	0,88	1,15
3	1-hexanol ^a	853	853	0,03	0,04	0,08
4	β-mirceno ^a	983	983	0,62	0,27	0,18
5	acetato de 3-hexen-1-ila	989	994	0,04	0,06	0,11
6	α-felandreno ^a	993	992	0,30	0,02	0,01
7	ortho-cimeno	1004	1010	0,04	-	0,01
8	3-careno ^a	1026	1028	1,03	0,52	0,16
9	(Z)-β-ocimeno ^a	1038	1035	2,78	1,56	1,09
10	(E)-β-ocimeno ^a	1046	1045	0,34	0,03	0,01
11	terpinoleno ^a	1076	1078	0,34	0,04	0,03
12	linalool ^a	1084	1084	0,18	0,13	0,09
13	allo-ocimeno	1119	1121	0,16	0,07	0,02
14	salicilato de metila	1164	1165	-	0,07	0,53
15	butirato de (Z)-3-hexenila ^a	1178	1173	0,06	0,10	0,20
16	δ-elemeno	1329	1331	2,53	2,21	2,73
17	α-cubebeno	1342	1346	0,12	0,18	0,15
18	α-copaeno	1361	1362	0,05	0,04	0,05
19	β-elemeno	1382	1383	7,37	4,99	9,26
20	α-gurjuneno	1397	1400	0,14	0,21	0,07
21	β-cariofileno ^a	1405	1408	7,09	3,44	5,17
22	γ-elemeno	1422	1423	8,55	8,14	7,97
23	α-humuleno	1437	1438	0,87	0,62	0,64
24	allo-aromadendreno	1444	1445	1,08	1,31	0,60
25	germacreno D	1464	1461	5,48	6,08	6,46
26	β-selineno	1468	1466	0,67	1,27	0,88
27	γ-muuroleno	1480	1482	5,28	7,67	5,02
28	α-amorfeno	1483	1477	0,62	0,47	0,29
29	β-guaieno	1489	1490	0,53	0,79	1,11
30	δ-cadineno	1504	1503	0,60	1,03	0,82
31	germacreno B	1539	1540	9,55	9,04	9,60
32	ledol	1561	1551	0,12	0,10	0,11
33	(E,E)-germacrona	1659	1669	5,08	0,62	1,18

^aIdentificação confirmada por comparação do espectro de massas e tempo de retenção com o de padrões analíticos injetados nas mesmas condições. ^bKI_{CAL} = índice de retenção relativo a n-alcenos (C₈ a C₄₀) em uma coluna capilar Rxi-1 MS. ^cKI_{LIT} = índice de retenção publicado na literatura.

Note que plantas de biotipo laranja apresentaram percentual de monoterpenos (8.69%) relativamente maior do que plantas de biotipo vermelho (4.57%) e roxo (2.56%), e a mesma tendência foi observada para os sesquiterpenos oxigenados para os quais as plantas do biotipo laranja (8.04%) também apresentaram percentual relativamente maior do que as plantas do biotipo vermelho (1.31%) e roxo (2.17%).

Figura 19. Variação percentual (%) dos COVs identificados nas amostras de folhas dos biotipos de cores de frutos distribuídos por classes de compostos.



Os compostos encontrados em maior abundância relativa nas amostras de folhas com os biotipos de frutos laranja, vermelho e roxo foram, respectivamente: germacreno B (9,55; 9,04 e 9,60%), γ -elemeno (8,55; 8,14 e 7,97%), β -elemeno (7,37; 4,99 e 9,26%), germacreno D (5,48; 6,08 e 6,46%), γ -muuroleno (5,28; 7,67 e 5,02%) e β -cariofileno (7,09; 3,44 e 5,17%).

Os compostos extraídos através da técnica HS-SPME também foram identificados em outros trabalhos com *E. uniflora*, que utilizaram a técnica de hidrodestilação (MELO, 2007; COSTA, 2010; LAGO, 2011, RODRIGUES, 2013). No entanto, os COVs (E)-2-hexenal, (Z)-3-hexen-1-ol, 1-hexanol, 3-hexen-1-ol acetato, 3-careno, salicilato de metila, α -gurjuneno e β -guaieno extraídos por HS-SPME não foram relatados nestes trabalhos que utilizaram a hidrodestilação. Esta diferença pode estar relacionada à baixa concentração relativa desses compostos na fase vapor. Entretanto, como a extração por HS-SPME envolve adsorção e os compostos tem

afinidade química pela fase extratora CAR/PDMS, os compostos foram concentrados na fibra e conseqüentemente detectados por GC-MS. Portanto, HS-SPME apresenta como vantagem em relação à hidrodestilação a maior quantidade de compostos extraídos por afinidade química pela fase extratora. Por outro lado, HS-SPME não representa fielmente a concentração relativa dos compostos na mistura.

3.4.3 Análise multivariada

Para avaliar o desempenho da técnica HS-SPME/GC-MS para discriminar diferentes biotipos de plantas da espécie *E. uniflora* através dos perfis de compostos voláteis extraídos de suas folhas, foram aplicadas as técnicas de análise de componentes principais (PCA) e análise de agrupamento hierárquico (HCA) aos dados relacionados aos compostos identificados. A Figura 20 mostra o gráfico de *scores* do PCA para os três primeiros componentes principais. As variâncias de PC1, PC2 e PC3 foram 34,07%, 15,84% e 14,89%, respectivamente, o que representa 64,80% da variabilidade total dos dados. Este gráfico de PCA fornece a visualização de três grupos bem definidos e distintos de amostras, referindo-se ao biotipo vermelho, laranja e roxo. A Figura 21 mostra também o gráfico de *loadings* do PCA dos três primeiros componentes principais que proporcionam a visualização dos compostos que são responsáveis para a discriminação dos agrupamentos de amostra.

O gráfico de *scores* em PC1, que explica 34,07% da variabilidade total, mostra que o grupo com o biotipo laranja está projetado em PC1 positivo, enquanto os grupos com biotipos vermelho e roxo estão projetados em PC1 negativo. O gráfico de *loadings* mostra que os compostos da classe dos hidrocarbonetos monoterpênicos, sendo eles β -mirceno (4), α -felandreno (6), o-cimeno (7), 3-careno (8), (Z)- β -ocimeno (9), (E)- β -ocimeno (10), terpinoleno (11) e allo-ocimeno (13), apresentam valores positivos em PC1 e são os principais responsáveis pela discriminação das amostras do biotipo laranja das amostras dos biotipos vermelha e roxa, cujos compostos (Z)-3-hexen-1-ol (2), 1-hexanol (3), (Z)-3-hexenil butirato (15), α -cubebeno (17), γ -elemeno (22), β -selineno (26), β -guaieno (29) e δ -cadineno (30) apresentam valores negativos em PC1.

Além disso, PC2 que explica 15.84% da variabilidade total mostra que o grupo com o biotipo roxo está projetado em PC2 negativo, enquanto que o grupo com biotipo vermelho está projetado em PC2 positivo. O gráfico de *loadings* mostra que os compostos α -gurjuneno (20), allo-aromadendreno (24), β -selineno (26), γ -muuroleno (27) e δ -cadineno (30) apresentam valores positivos em PC2, enquanto que os compostos δ -elemeno (16), β -elemeno (19), β -cariofileno (21), γ -elemeno (22), germacreno B (31) e (E,E)-germacrona (33) apresentam valores negativos em PC2.

Figura 20. Gráfico de scores 3D do PCA obtido através do perfil de COVs das amostras de folhas de *E. uniflora* dos biotipos vermelho, laranja e roxo.

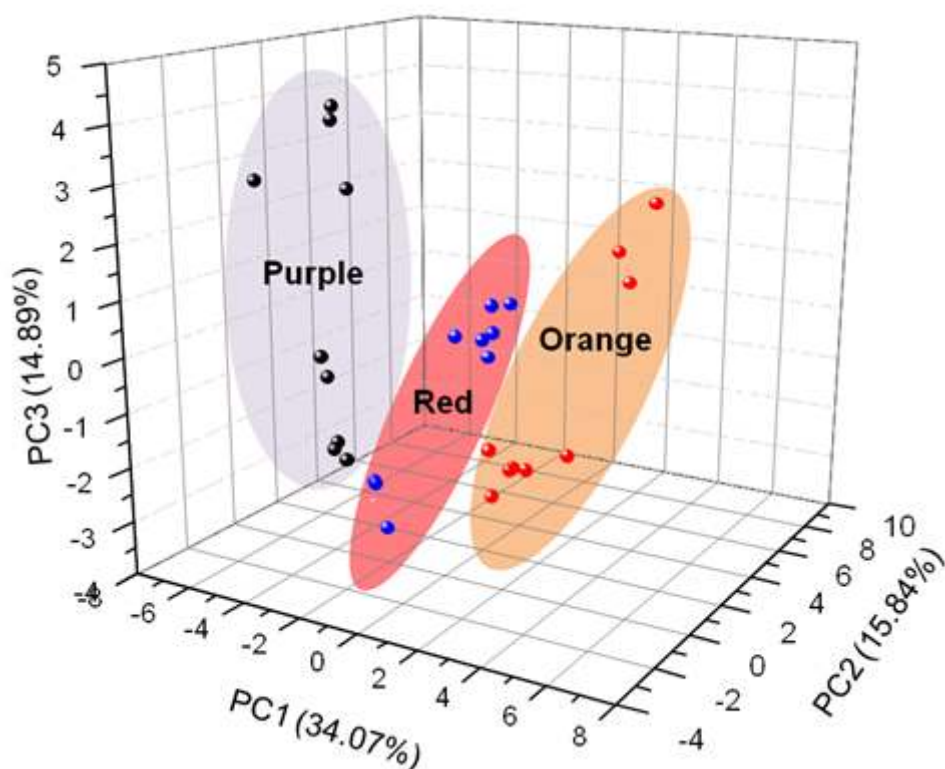
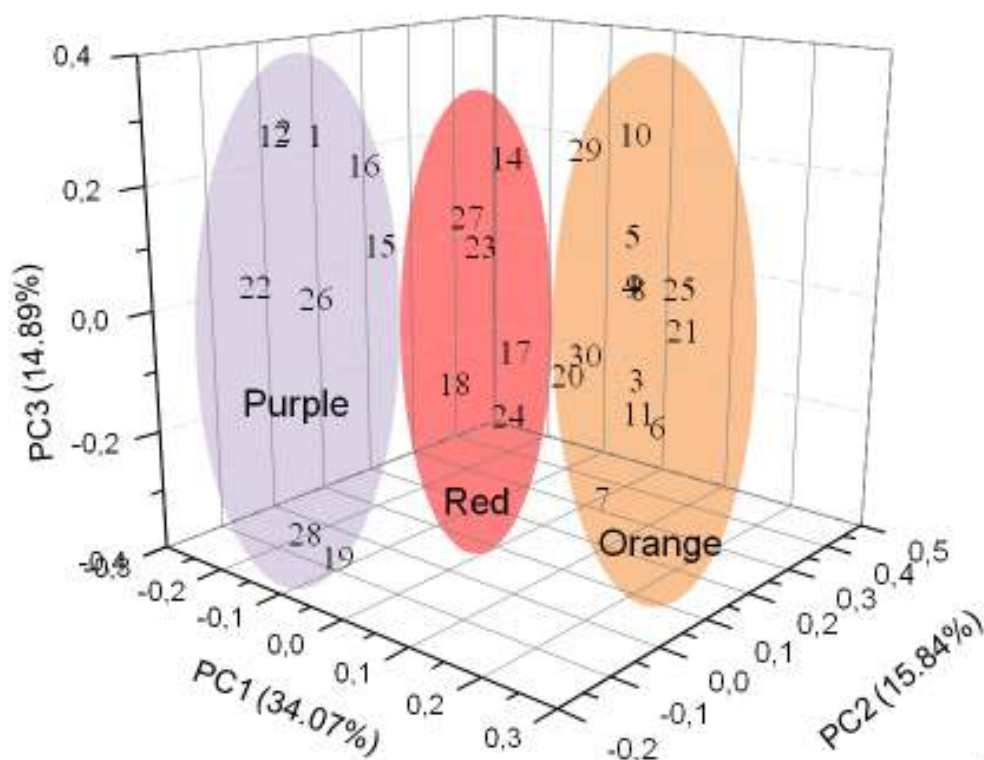
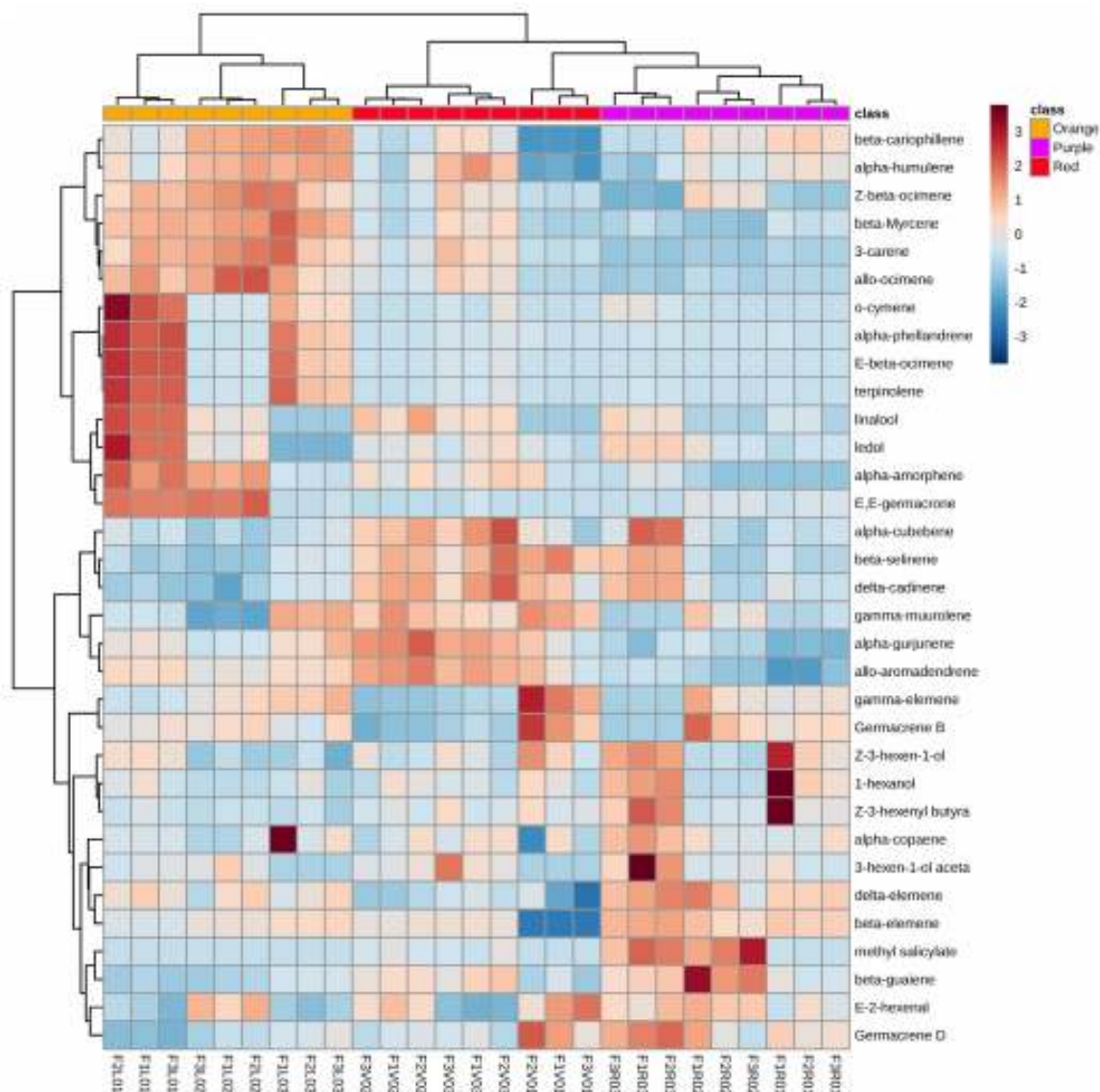


Figura 21. Gráfico de *loadings* 3D do PCA obtido através do perfil de COVs das amostras de folhas de *E. uniflora* dos biotipos vermelho, laranja e roxo (para identificação dos compostos ver Tabela 6).



O gráfico de *scores* do PCA mostra três PCs, no entanto eles juntos correspondem a menos de 70% da variação dos dados e fornece pouca informação sobre a proximidade entre grupos e entre as amostras. Portanto, para isso foi aplicada a análise de agrupamento hierárquico (HCA) e a Figura 22 mostra o dendrograma resultante, associada com o mapa de calor. Neste dendrograma as amostras foram agrupadas em termos da sua proximidade ou semelhança. O grupo de amostra com o biotipo laranja foi claramente discernível dos grupos vermelhos e roxos que têm alguns compostos em comum. O agrupamento do biotipo laranja consiste em amostras com valores mais elevados de todos os monoterpenos hidrocarbonetos e (E, E)-germacrona (sesquiterpeno oxigenado), quando comparado com os grupos vermelho e roxo. O dendrograma mostra que as amostras dos grupos roxo e vermelho são misturadas para formar um conjunto maior, o que pode ocorrer devido à grande semelhança no perfil de COVs apresentada nas amostras desses biotipos.

Figura 22. Dendograma do HCA associado ao mapa de calor para o perfil de COVs presentes nas amostras de *E. uniflora* dos biotipos vermelho, laranja e roxo.



Apesar de variações nas cores dos frutos de *E. uniflora* já estarem bem descritas, variedades desta espécie classificadas de acordo com a cor dos frutos não são biotipos facilmente distinguíveis. Alguns trabalhos sugerem que estas diferenças nos perfis de COVs nas amostras de folhas de plantas com diferentes biotipos de frutos podem ser utilizadas para a caracterização de diferentes variedades de *E. uniflora* (COSTA, 2010). Por exemplo, o óleo essencial extraído de folhas e frutos de *Eugenia brasiliensis* com dois diferentes biotipos de cores de frutos pode indicar a presença de duas variedades/quimiotipos para esta espécie (MORENO, 2007).

Outros trabalhos relatam um quimiotipo existente no nordeste brasileiro e na Nigéria, caracterizado pelo biotipo de fruto vermelho-alaranjado, que pode ser discriminado através dos compostos selina-1,3,7(11)-trien-8-ona e o epóxido de selina-1,3,7(11)-trien-8-ona (MORAES, 1996; COSTA, 2010). Diferenças na composição dos óleos voláteis extraídos das folhas de *E. uniflora* também podem ocorrer devido a variações sazonais no ambiente. Por exemplo, existem relatos de composições de óleo essencial características de quimiotipos de plantas cultivadas no sul do Brasil devido aos teores de α e β -selineno e nerolidol (HENRIQUES, 1993); enquanto que o quimiotipo cultivado na Argentina apresentou teores característicos de alguns monoterpenos e nerolidol (UBIERGO, 1987). A confirmação desses diferentes quimiotipos de *E. uniflora* poderia ser feita através de análises genéticas com base em marcadores de DNA.

3.5 CONCLUSÕES

Foi desenvolvido um método por HS-SPME/GC-MS para análise do perfil de compostos orgânicos voláteis de folhas de *E. uniflora*. O método foi otimizado através de uma estratégia de planejamento de experimentos multivariada que possibilitou maior eficiência de extração de compostos com baixa concentração relativa na mistura volátil.

Foram identificados 33 COVs em amostras de folhas provenientes de plantas de *E. uniflora* com biotipos laranja, vermelho e roxo. A utilização das ferramentas quimiométricas PCA e HCA permitiu a visualização de tendências de agrupamento entre as amostras dos biotipos laranja, vermelho e roxo, assim como os compostos voláteis responsáveis por discriminar cada grupo. Portanto, os biotipos de plantas que produzem frutos de cor laranja, vermelho e roxo podem ser discriminados pelo método HS-SPME-GC/MS e análise quimiométrica (PCA e HCA). Finalmente, este estudo mostrou que existe diferença na composição química volátil de folhas de *E. uniflora* que produzem diferentes biotipos de frutos, apontando a necessidade de mais estudos para a avaliação da existência de diferentes variedades para esta espécie de planta.

CAPÍTULO 4

Metabolômica aplicada na identificação de biomarcadores de infecção pelo *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) em plantas do gênero *Passiflora* (Passifloraceae L.)

4.1 INTRODUÇÃO

Os maracujás (*Passiflora* spp.) pertencem à família Passifloraceae, que possui diversas espécies de grande potencial ornamental e alimentício (SOUZA; LORENZI, 2012). O Brasil é um dos principais centros de diversidade genética da família Passifloraceae, com 465 espécies, estando presente no estado da Bahia cerca de 29 destas (CERVI, 2006; NUNES, 2002).

O Brasil é o principal produtor mundial de maracujá (IBGE, 2014), que é plantado em quase todos os estados brasileiros e proporciona economia e renda a centenas de famílias (FERREIRA, 2005). Se destaca a produção de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg) (Figura 23), também chamado de maracujá-doce, que é a espécie de maior valor econômico dentro da família Passifloraceae (BERNACCI et al., 2003). Isto se deve à qualidade dos frutos, a possibilidade de uma receita distribuída pela maior parte do ano, à divulgação junto aos consumidores e ao incentivo da agroindústria (MELLETTI, 2011).

Figura 23. Planta de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg).



Fonte: <https://www.embrapa.br/mandioca-e-fruticultura/cultivos/maracuja>

O maracujá amarelo é uma cultura que vem se expandindo nos últimos 30 anos e ocupando um lugar de destaque na fruticultura tropical (MELETTI, 2011). A maior

parte da produção nacional concentra-se na região Nordeste, que em 2014 foi responsável por 70,9% da produção brasileira (IBGE, 2014). Neste mesmo ano, o estado da Bahia foi responsável por 46,3% da produção nacional, seguido pelo Ceará com 17,5% (IBGE, 2014).

O fruto é consumido principalmente na forma *in natura* no mercado interno, enquanto que os sucos concentrados representam a maior parcela da exportação (MELETTI, 2011). O incremento da área plantada aliada a abertura de novos mercados e fomento a pesquisas nos últimos dez anos, têm diminuído o risco desta atividade produtiva e a tornado mais previsível (GRECO, 2014).

No entanto, os problemas fitossanitários relacionados a pragas e doenças são os principais fatores limitantes da produtividade e expansão dos cultivos de maracujá, se destacando como as principais doenças: o endurecimento dos frutos, causada pelos vírus "*Passion fruit woodiness virus*" (PWV) e *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV); a bacteriose, causada pela *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*; a murcha de *Fusarium*, causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f.sp. *passiflorae*; e a antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (JUNQUEIRA et al., 2005).

Destas, a doença do endurecimento dos frutos, que é causada no Brasil pelos vírus *Passion fruit woodiness virus* (PWV) e *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV), é considerada uma das mais importantes economicamente devido aos enormes prejuízos causados à produção do maracujá (LEÃO et al., 2006; PINTO et al., 2008). Estes vírus são transmitidos mecanicamente ou por afídeos, não se conhecendo até o momento nenhuma medida efetiva de controle (MELETTI et al., 2005).

Esta doença afeta severamente tanto a cultura quanto a sua produtividade, valor comercial dos frutos e período economicamente produtivo da planta (PIO-RIBEIRO; MARIANO, 1997). Atualmente é considerada uma doença limitante em regiões produtoras dos estados de São Paulo, Minas Gerais, Goiás, Distrito Federal e Pará e da Região Nordeste (JUNQUEIRA et al., 2010).

Acreditava-se que o PWV (*Passion fruit woodiness virus*) era a única espécie de *Potyvirus* causadora de endurecimento dos frutos em maracujazeiros (NASCIMENTO et al., 2004). Contudo, através de análises moleculares se identificou em amostras de maracujazeiros, diagnosticados com a doença do endurecimento do fruto, a presença do vírus CABMV. Atualmente, esta é considerada como a principal espécie de *Potyvirus* causadora da doença no Brasil (BRAZ et al., 1998; NASCIMENTO et al., 2004).

O CABMV é um vírus de RNA de fita simples (BERGER, 2001), pertencente ao gênero *Potyvirus*, família Potyviridae (MINK; SILBERNAGEL, 1992), que é a principal família de vírus que infecta plantas (BERGER, 2001). Este vírus apresenta como principais hospedeiros espécies das famílias Fabaceae e Passifloraceae, já tendo sido relatado sua ocorrência em feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) (LOVISOLO; CONTI, 1966), amendoim (*Arachis hypogaea*) (PIO-RIBEIRO et al., 2000), feijão-da-praia (*Canavalia rosea*) (KITAJIMA et al., 2008), *Crotalaria juncea* (NICOLINI et al., 2012), e em *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* (NASCIMENTO et al., 2006).

O CABMV é transmitido por várias espécies de afídeos, tais como *Myzus persicae* (Sulzer, 1776) (CHAGAS et al., 1981; NOVAES; REZENDE, 2003) e *Aphis gossypii* (Glover, 1877) (CHAGAS et al., 1981; DI PIERO et al., 2006). No entanto, também pode ocorrer transmissão mecânica do vírus, através de instrumentos de poda ou no processo de enxertia (PIO-RIBEIRO; MARIANO, 1997; MELLETTI, 2005).

Os principais sintomas nas folhas das plantas infectadas pelo CABMV são mosaico, bolhosidades e enrugamento (VIANA; COSTA, 2003; FISCHER et al., 2005). Enquanto que seus frutos apresentam redução de tamanho, espessamento e endurecimento do pericarpo, com redução do espaço interno e consequente diminuição da quantidade de polpa (NASCIMENTO et al., 2006; CAVICHIOLE et al., 2011). A Figura 24 mostra os sintomas da virose do endurecimento dos frutos na espécie *P. edulis*.

Figura 24. Sintomas da virose causadora do endurecimento dos frutos em *P. edulis* f. *flavicarpa*: a e b) folhas exibindo mosaico, bolhosidades e deformações; c e d) frutos endurecidos e com manchas na casca.



Fotos: Cristiane de Jesus Barbosa (2015).

Considerando que ainda não se conhece nenhuma medida efetiva de controle para o CABMV após sua instalação no pomar, a obtenção de cultivares resistentes a partir de programas de melhoramento genético se coloca como uma estratégia promissora (FISCHER et al., 2005; JUNQUEIRA et al., 2010).

O gênero *Passiflora* apresenta grande variabilidade no grau de resistência ao vírus do endurecimento do fruto (JUNQUEIRA et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2013a). Muitas espécies silvestres de *Passiflora* podem oferecer contribuições importantes ao melhoramento genético do maracujazeiro por apresentarem maior resistência a doenças, maior longevidade, maior adaptação a condições climáticas adversas e período de florescimento ampliado, entre outras potencialidades (MELETTI et al., 2005).

Desse modo, caracterizar a diversidade genética das espécies é muito importante no planejamento das estratégias de melhoramento. Além disso, são necessárias pesquisas para se avaliar como estas espécies respondem à infecção pelo CABMV.

A caracterização dos metabólitos produzidos pela planta pode auxiliar na identificação de biomarcadores de infecção ao CABMV, assim como sinalizar características químicas destes genótipos resistentes. Ressalta-se que até o presente momento existe pouca informação na literatura científica sobre os metabólitos de espécies do gênero *Passiflora*, principalmente para as espécies silvestres, e sobre alterações neste metaboloma devido à infecção pelo CABMV.

4.2 OBJETIVO GERAL

Desenvolver métodos analíticos para a identificação de potenciais biomarcadores de infecção pelo *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) em plantas do gênero *Passiflora* spp. (Passifloraceae L.).

4.2.1 Objetivos específicos

- a) Desenvolver um método analítico por HS-SPME/GC-MS para determinação de compostos orgânicos voláteis em amostras de plantas do gênero *Passiflora* spp.;
- b) Identificar COVs que sejam potenciais biomarcadores de infecção pelo CABMV em plantas das espécies *P. edulis*, *P. maliformis*, *P. cincinnata*, *P. gibertii* e *P. setacea*;
- c) Avaliar no tempo possíveis mudanças no perfil dos compostos presentes em plantas da espécie *P. cincinnata* após inoculação com o CABMV.

4.3 METODOLOGIA

4.3.1 Materiais e reagentes

Os solventes e padrões analíticos de tetradecano, 1-octen-3-ol, 1-pentanol, 1-hexanol, 1-heptanol, 1-octanol, 1-nonanol, 1-decanol, (E)-3-hexen-1-ol, hexanal, heptanal, octanal, nonanal, decanal, benzaldeído, trans,trans-2,4-nonadienal e mistura de n-alcanos C₈–C₄₀ foram adquiridos da Sigma-Aldrich (EUA).

As fibras de SPME polidimetilsiloxano/divinilbenzeno (PDMS/ DVB, 50/30 µm); divinilbenzeno/carboxen/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS, 65 µm); carboxen/polidimetilsiloxano (CAR/PDMS, 75 µm); poliacrilato (PA, 85 µm) e polidimetilsiloxano (PDMS, 100 µm), utilizadas em amostrador manual de SPME, foram compradas da Supelco (Bellefonte, PA, EUA).

4.3.2 Ensaios biológicos e amostragem

4.3.2.1 *Ensaio biológico para determinação dos COVs*

O ensaio biológico foi estabelecido em casa de vegetação na Embrapa Mandioca e Fruticultura em novembro de 2013. Foram obtidas seis plantas de cada espécie, das quais a metade foi inoculada mecanicamente com o CABMV e a outra metade inoculada somente com tampão de inoculação.

As plantas foram inoculadas quando atingiram o tamanho médio de 20 cm, a partir de extrato de folhas de plantas com mosaico foliar e infectadas com um isolado do CABMV, previamente identificado via RT-PCR (FRÓES et al., 2014). O extrato foi preparado a partir de 1 g de amostras de folhas com mosaico em 5 mL de solução tampão (fosfato de potássio 0,1 M e sulfito de sódio 0,1 M, com pH 7,0), acrescido do abrasivo “celite”. O vírus foi inoculado friccionando as partes superiores (superfície adaxial) da folha com os dedos contendo o inóculo. Em seguida, as plantas foram lavadas para retirar o excesso do abrasivo de forma a evitar a queima das folhas.

Realizou-se, semanalmente, a avaliação da presença de sintomas de mosaico nas folhas de cada planta do ensaio. Após 60 dias da inoculação, quando todas as plantas inoculadas já apresentam sintomas de mosaico, foram coletadas amostras para a determinação do seu perfil de COVs, através da técnica HS-SPME/GC-MS. Foi considerada como amostra para as análises, a quinta folha, do ápice para a base, de cada planta.

4.3.2.2 Ensaio biológico para avaliação da infecção ao longo do tempo

As plantas de *P. cincinnata* foram cultivadas em casa de vegetação, durante cerca de 60 dias, e depois transferidas para fitotron com temperatura, umidade e luminosidade controladas (Figura 25), para estabelecimento do ensaio biológico em maio de 2015.

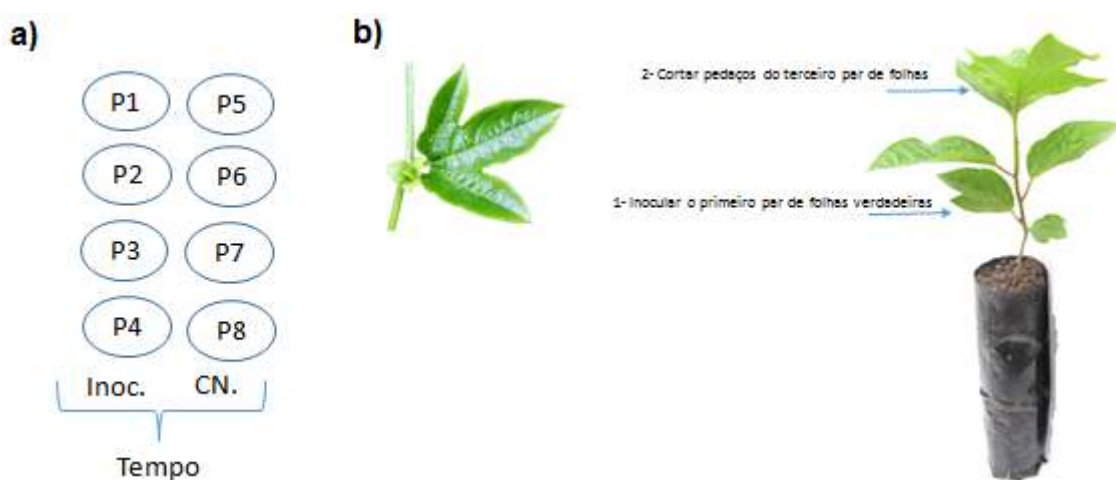
Figura 25. Fitotron utilizado durante a avaliação da infecção pelo CABMV em *P. cincinnata* a) visão geral b) controle de condições climáticas e c) plantas acondicionadas.



Fotos: Cristiane de Jesus Barbosa (2015).

O delineamento experimental consistiu de 7 blocos contendo 8 plantas cada, sendo 4 plantas sadias, inoculadas apenas com o tampão fosfato, e 4 plantas infectadas mecanicamente pelo CABMV. Cada bloco de plantas correspondeu a um tratamento de tempo após à infecção: 0, 3, 5, 8, 12, 20 e 28 dias. Em cada tratamento foi coletada para análise o terceiro par de folhas (ao invés do quinto par, como foi feito para análise dos voláteis, por motivos práticos), a partir da base de cada planta (Figura 26).

Figura 26. Delineamento experimental do ensaio biológico, com representação esquemática a) do bloco contendo plantas sadias (CN.) e inoculadas com o CABMV (Inoc.) b) par de folha inoculado com o vírus e o retirado para análise.



4.3.3 Otimização do método de extração dos COVs por HS-SPME

4.3.3.1 Seleção do tipo de adsorvente

A primeira etapa da otimização consistiu em selecionar o melhor tipo de fibra adsorvente utilizado na técnica HS-SPME que extraísse uma maior quantidade de COVs da amostra. Para isso foram avaliadas os cinco tipos de fibras a seguir: i) poldimetilsiloxano/divinilbenzeno (PDMS/ DVB, 50/30 μm); ii) divinilbenzeno/carboxen/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS, 65 μm); iii) carboxen/polidimetilsiloxano (CAR/PDMS, 75 μm); iv) poliacrilato (PA, 85 μm) e v) poldimetilsiloxano (PDMS, 100 μm).

Nesta etapa foram mantidas fixas as condições de extração e variou-se apenas o tipo de fibra adsorvente, utilizando o valor da área total e o número dos picos do cromatograma como resposta analítica para se definir qual o tipo de fibra mais eficiente. As condições fixadas para a extração foram 1,0g de folha triturada (da espécie *Passiflora edulis*), temperatura de 60 °C e tempo de extração de 20 min. Cada fibra foi avaliada em triplicata.

4.3.3.2 Planejamento multivariado

Após a escolha do tubo adsorvente, foi realizado um planejamento fatorial completo de dois níveis 2^3 para avaliar os fatores que afetam o processo de extração dos compostos orgânicos voláteis em folhas de *P. edulis*. Foram avaliados os seguintes fatores: *i*) tempo de equilíbrio *ii*) temperatura de extração e *iii*) tempo de extração. Sendo que a variável resposta considerada foi a área total dos picos do cromatograma. Os níveis analisados estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Fatores e níveis do planejamento fatorial completo 2^3 para otimização do método de extração de COVs por HS-SPME.

Fator	(-1)	(0)	(+1)
Tempo de equilíbrio, min	0	10	20
Temperatura de extração, °C	60	80	100
Tempo de extração, min	10	20	30

O estabelecimento do planejamento fatorial completo resultou em um total de 11 ensaios, dos quais três se referem à triplicata do ponto central.

Após a identificação de quais fatores exercem influencia na extração de COVs, foi utilizada uma metodologia de superfície de resposta (MSR) com o objetivo de encontrar as condições em que o procedimento adotado resulta na melhor resposta possível, neste caso, um valor máximo da área total do cromatograma. Para a metodologia de superfície de resposta, foi escolhido o planejamento composto central, haja vista que este é o planejamento mais utilizado para o desenvolvimento de procedimento analíticos (BEZERRA et al., 2008). A Tabela 8 apresenta os fatores e níveis investigados.

Tabela 8. Fatores e níveis avaliados na metodologia de superfície de resposta por composto central, para otimização do método de extração de COVs por HS-SPME.

Fator	(-1)	(0)	(+1)	(- α)	(+ α)
Tempo de equilíbrio, min	0	10	20	0	27
Temperatura de extração, °C	50	60	70	43,2	76,8
Tempo de extração, min	30	45	60	20	70,2

O planejamento composto central requer $N = k^2 + 2k + C_p$ experimentos, onde k é o número de fatores e C_p é o número de replicatas do ponto central. Como visto na Tabela X, entre os experimentos realizados no composto central também estão os pontos axiais, também conhecidos como pontos estrela, cujos valores para o sistema com dois fatores são $\alpha = \pm 1,682$ (FERREIRA et al., 2015).

4.3.4 Análise por GC-MS

As análises foram realizadas utilizando um sistema de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa, (GC-MS), Modelo GCMS-QP2010 (Shimadzu, Kyoto, Japão), com detector do tipo quadrupolo e equipado com um injetor no modo splitless na temperatura de 250 °C. Os COVs foram separados numa coluna capilar (Rxi-1 MS 100%, dimetilpolissiloxano; 30 m x 0,25 mm ID x 0,25 μ m, Restek, Bellefonte, EUA), utilizando hélio (99,99%) como um gás de arraste com fluxo de 0,80 mL min⁻¹. A temperatura do forno variou como se segue: 40 °C (10 min), em seguida aquecida a 50 °C a uma taxa de 2 °C min⁻¹, permanecendo por 2 min e depois 2,5 °C min⁻¹ até 100 °C (mantido por 2 min), em seguida, 3 °C min⁻¹ para 160 °C, em seguida, 5 °C min⁻¹ até 200 °C, permanecendo por 2 min (tempo total de 69,0 min). As condições do detector de massa quadrupolo foram: temperatura de transferência de linha de 220 °C, temperatura da fonte de íons de 220 °C e com o modo de ionização de impacto de elétrons a 70 eV.

A identificação dos compostos orgânicos voláteis foi realizada das seguintes formas: (i) comparando os tempos de retenção de GC e espectros de massa com os dos compostos padrão puros, quando disponíveis, (ii) todos os espectros de massa foram também comparadas com a biblioteca do equipamento (NIST 147 Database), e (iii) índices de retenção de Kovats (KI), que foram determinados utilizando uma série homóloga de n-alcenos C₈-C₄₀ e os valores foram comparados com os valores

relatados na literatura para colunas cromatográficas similares. A percentagem dos picos individuais foi obtida através da normalização da área do pico em relação ao somatório das áreas de todos os picos presentes no cromatograma.

4.3.5 Extração dos metabólitos em amostras de *P.cinnata*

As folhas de plantas de *P. cinnata* sadias e inoculadas com CABMV foram trituradas com nitrogênio líquido. Dessa amostra triturada 100 mg foram pesados e colocados em tubos de microcentrífuga. Os metabólitos foram extraídos com 1 mL de metanol auxiliado por agitação vortex durante 5 min, e em seguida, centrifugados durante 5 min a 13.000g. O sobrenadante foi filtrado através de um filtro de 0,45 µm e acondicionado em frasco tipo âmbar.

4.3.6 Análise por LC-QTOF-MS

Os metabólitos foram analisados usando um sistema LC-MS Agilent 1290 Infinit acoplado com um espectrômetro de massas Agilent 6550 Q-TOF/MS equipado com uma fonte de eletrospray (ESI) (Figura 27).

Figura 27. Sistema LC-Q-TOF/MS utilizado para identificação dos metabólitos em amostras de *P. cinnata*.



Foto: Fábio Neves dos Santos (2016)

Uma alíquota de 1 mL dos extratos das amostras foi injetado automaticamente usando um amostrador automático. Os metabólitos foram separados através de uma

coluna UHPLC Kinetex XB-C18 150 x 2,1mm, de partículas 1,7 μm . A fase móvel de eluição foi constituída de água (A) e acetonitrila (B), em modo gradiente, no qual B variou de 5 a 95% com gradiente constante de 5%/min, e permaneceu em 95% de B por 10 min, com vazão de 0,30 mL min⁻¹, totalizando 35 min de corrida. O espectrômetro de massas Q-TOF operou nas seguintes condições: faixa de aquisição m/z 100 – 1000 e 1 espectro/s; Fonte de ionização eletrospray Dual AJS ESI nos modos positivo e negativo com vazão do gás de secagem 12 L min⁻¹, temperatura do gás de secagem 350°C, gás de nebulização 45 psig, vazão do gás de nebulização 12 L/min e temperatura de 290°C; voltagem do capilar 3,5 kV ou -4,5 kV, Nozzle Voltage 320 V, fragmentor 100 V, Skimmer 65 V, Octapolo RF 750. A confirmação dos metabolitos foi realizada pela comparação com bancos de espectros de massa (METLIN *data base*).

4.3.7 Análise multivariada

O pacote estatístico MetaboAnalyst 3.0 (XIA et al., 2015) foi utilizado para os cálculos de PCA, PLS-DA, OPLS-DA, HCA e mapa de calor, utilizando os dados auto-escalados na etapa de pré-tratamento dos mesmos.

4.4 RESULTADOS

4.4.1 Otimização do método de extração por HS-SPME

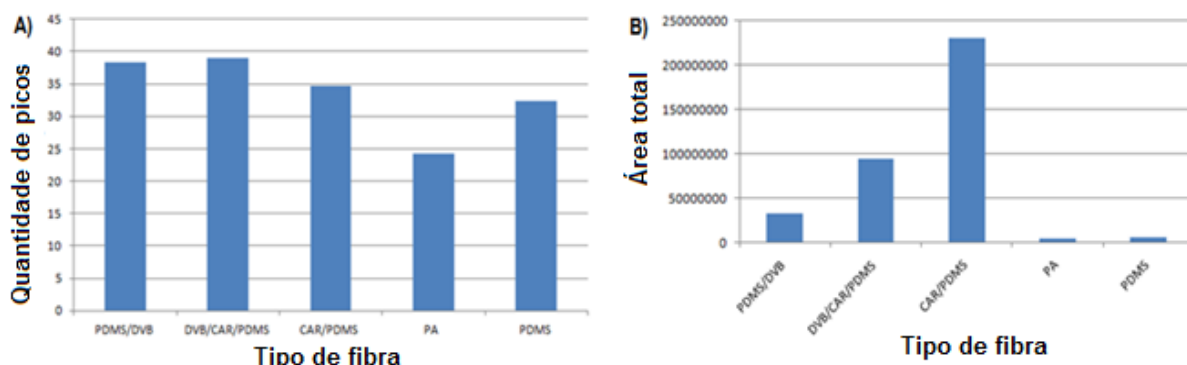
A eficiência do método de microextração em fase sólida no modo *headpace* (HS-SPME) pode ser afetada pelo tipo e a espessura da fase extratora utilizada, o tempo e a temperatura de extração, e a quantidade de amostra (MA, 2013). Estas variáveis de extração podem ser otimizadas a partir de uma abordagem univariada, em que cada fator é modificado separadamente, ou através de desenho experimental multivariado (ARAÚJO, 1996; BRERETON, 2003), na qual é feita a variação simultânea de todos os fatores avaliados, tornando possível distinguir as interações entre fatores, que não poderiam ser detectadas através de um delineamento experimental univariado. Além disso, geralmente, a otimização multivariada requer

menor número de experimentos para se obter a informação completa sobre os fatores e suas interações.

Para otimização do método de extração de compostos voláteis em amostras de folhas de maracujazeiro (*P. edulis*) através do método HS-SPME, primeiramente foi avaliado, de forma univariada, qual o tipo de fibra extratora mais eficiente. Cinco tipos de fase de revestimento da fibra foram expostos ao *headspace* proveniente da mesma quantidade de folhas de *Passiflora edulis* (1,0 g), temperatura (60 °C) e tempo de extração (20 min).

A comparação entre os cinco tipos de revestimentos de fibras foi realizada com base no número de picos detectados e área total dos picos (eficiência de extração), como mostrado na Figura 28. Cada extração foi feita em triplicata e a repetibilidade (RSD%) apresentou valores menores que 20% em todos os casos.

Figura 28. Influência do tipo de revestimento da fibra de SPME na eficiência de extração considerando: (A) número de picos detectados e (B) área total dos picos.



De acordo com os resultados obtidos, a fibra que extraiu a maior quantidade de compostos voláteis foi a do tipo (Figura 28A): DVB/CAR/PDMS (39), seguida pelas fibras PDMS/DVB (38), CAR/PDMS (35), PDMS (32) e PA (24). Enquanto que a eficiência de extração das cinco fibras testadas apresentou a seguinte ordem (Figura 28B): CAR/PDMS > DVB/CAR/PDMS > PDMS/DVB > PDMS > PA.

Note que as fibras de fase mistas são as mais eficientes que as de fase monofásicas. Observa-se também que apesar da fibra CAR/PDMS extrair quatro COVs a menos que a fibra DVB/CAR/PDMS, esta fibra apresenta uma capacidade de extração significativamente maior que todas as outras. Desse modo, a fibra

CAR/PDMS foi selecionada para os ensaios de otimização seguintes e para a determinação do perfil de voláteis em folhas de *Passiflora* spp.

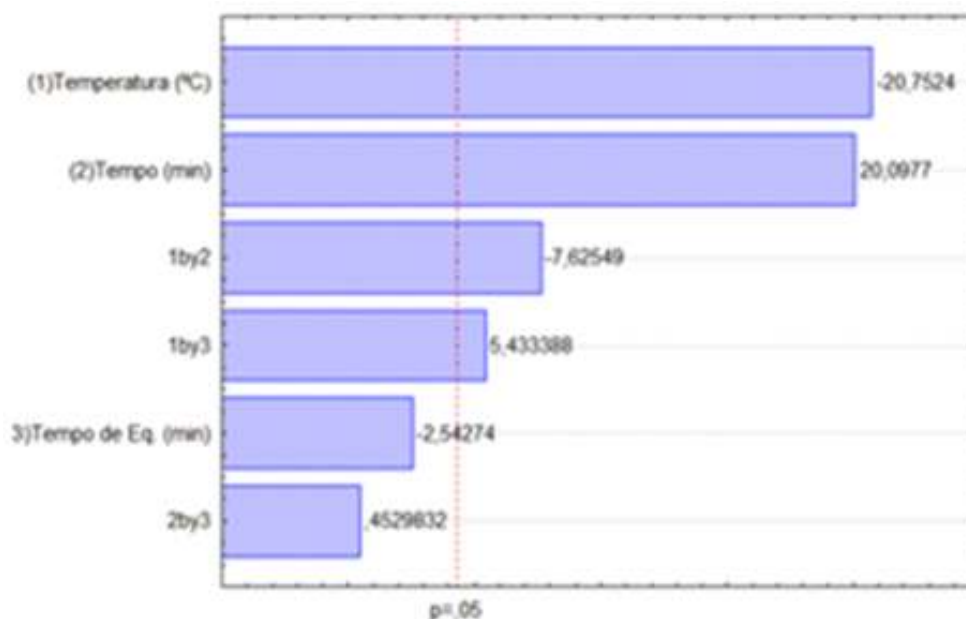
Após a seleção do tipo de revestimento da fibra, a influência dos fatores tempo de equilíbrio, temperatura e tempo na extração por HS-SPME foi avaliada através de um planejamento fatorial completo 2^3 , com 3 réplicas no ponto central e totalizando 11 experimentos, conforme os níveis experimentais mostrados na Tabela 9. Nesse estudo, o emprego da otimização multivariada permitiu avaliar as variáveis e suas interações simultaneamente, com uma quantidade reduzida de experimentos quando comparado à otimização univariada (BEZERRA, 2008). Ressalta-se que o parâmetro tempo de equilíbrio se refere ao tempo que o recipiente contendo a amostra ficou sob aquecimento sem a introdução da fibra extratora. Isto visa aumentar a quantidade de moléculas disponíveis no *headspace* do recipiente, no momento de inserção da fibra extratora.

Tabela 9. Resultados do planejamento fatorial completo 2^3 .

Ensaio	Temperatura (°C)	Tempo de extração (min)	Tempo de equilíbrio (min)	Área total dos picos
1	60	10	0	$3,03 \times 10^8$
2	60	10	20	$2,37 \times 10^8$
3	60	30	0	$4,57 \times 10^8$
4	60	30	20	$4,25 \times 10^8$
5	100	10	0	$1,74 \times 10^8$
6	100	10	20	$2,04 \times 10^8$
7	100	30	0	$2,63 \times 10^8$
8	100	30	20	$2,69 \times 10^8$
9	80	20	10	$3,64 \times 10^8$
10	80	20	10	$3,53 \times 10^8$
11	80	20	10	$3,46 \times 10^8$

Os valores de área total dos picos presentes na Tabela 9 revelam que os melhores resultados foram obtidos com a temperatura mais baixa (60 °C) e maiores tempos de extração (30 min). A influência de cada um dos fatores empregados pode ser melhor visualizada através do diagrama de Pareto da Figura 29.

Figura 29. Gráfico de Pareto para o planejamento fatorial completo 2^3 .



Nota-se que tanto o tempo de extração quanto a temperatura de extração foram significativos ao nível de confiança de 95%. O gráfico de Pareto indica que a temperatura possui um efeito negativo na eficiência de extração, ou seja, que menores níveis deste fator melhoram a capacidade de extração do método. Enquanto que o tempo de extração apresenta um efeito positivo na eficiência do método, ou seja, maiores tempos de extração aumentam a capacidade de extração do mesmo. Além disso, verifica-se que existe uma interação significativa entre os fatores temperatura e tempo de extração (barra 1by2 mostrada no gráfico de Pareto). Isto indica que qualquer mudança em um destes fatores pode alterar o nível de influência do outro fator. Este tipo de relação mostra a necessidade de se utilizar abordagens de otimização multivariada, pois a mesma leva em consideração estas interações entre os fatores, o que não ocorre com a otimização via abordagem univariada.

O gráfico de Pareto também mostra que o fator tempo de equilíbrio não influencia significativamente na eficiência de extração. No entanto, verifica-se que existe uma interação significativa entre este fator e a temperatura (barra 1by3 mostrada no gráfico). Desse modo, a influência do fator tempo de equilíbrio também merece ser melhor investigada.

Em seguida, foi utilizado um planejamento composto central para se determinar os valores ótimos dos fatores tempo de equilíbrio, temperatura e tempo de extração que

permitem a maior eficiência de extração dos COVs por HS-SPME. Para isso foram realizados 17 experimentos, contendo 3 réplicas no ponto central, conforme os níveis experimentais mostrados na Tabela 10. Seguindo a tendência mostrada pelo gráfico de Pareto (Figura 29), no planejamento composto central o domínio experimental do fator temperatura foi reduzido para 43,2-70,0 °C, enquanto o tempo de extração foi elevado para 20,0-70,2 min e o tempo de equilíbrio ficou na faixa de 0-27 min.

Tabela 10. Resultados do planejamento composto central.

Ensaio	Temperatura (°C)	Tempo de extração (min)	Tempo de equilíbrio (min)	Área total dos picos
1	50	30	0	4,40 x10 ⁸
2	50	30	20	6,91 x10 ⁸
3	50	60	0	6,96 x10 ⁸
4	50	60	20	7,90 x10 ⁸
5	70	30	0	4,14 x10 ⁸
6	70	30	20	4,68 x10 ⁸
7	70	60	0	6,79 x10 ⁸
8	70	60	20	6,17 x10 ⁸
9	43,2	45	10	6,61 x10 ⁸
10	76,8	45	10	6,03 x10 ⁸
11	60	20	10	4,41 x10 ⁸
12	60	70,2	10	5,97 x10 ⁸
13	60	45	0	6,10 x10 ⁸
14	60	45	27	5,22 x10 ⁸
15	60	45	10	4,99 x10 ⁸
16	60	45	10	5,18 x10 ⁸
17	60	45	10	5,35 x10 ⁸

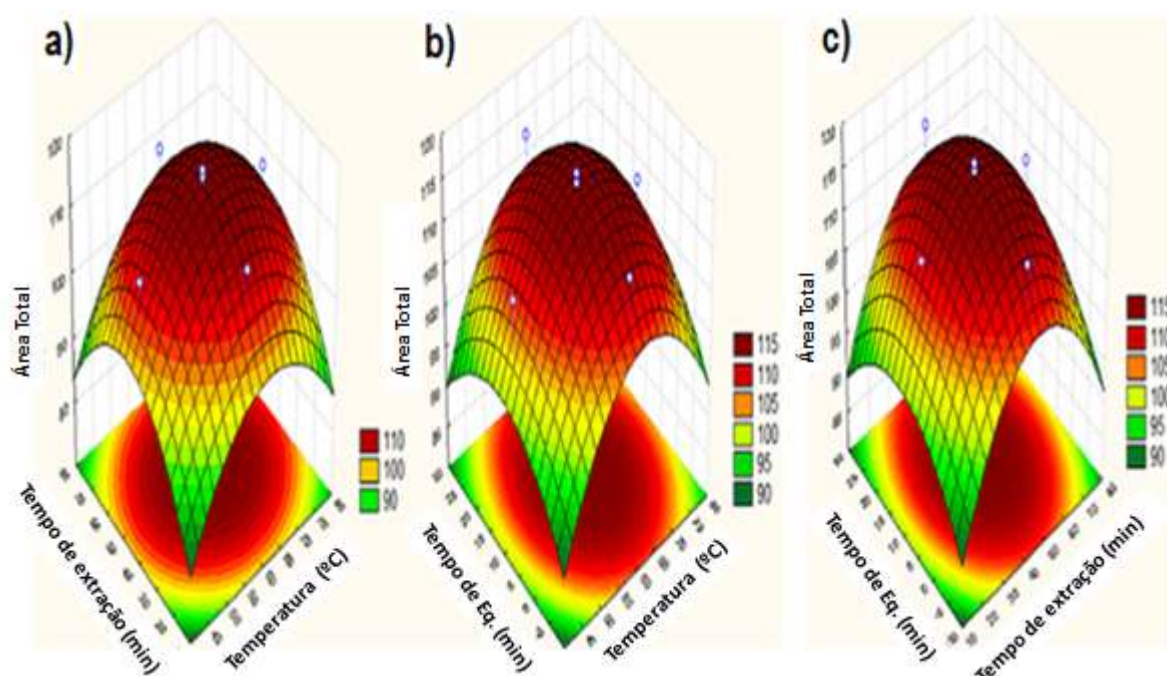
Entre os níveis experimentais mostrados na Tabela 10, o ensaio 4 apresentou a maior eficiência de extração, utilizando as seguintes condições: temperatura de extração (50 °C), tempo de extração (60 min) e tempo de equilíbrio (20 min). Avaliando a influência de cada fator, se observa que o aumento da temperatura diminui a eficiência de extração (comparação entre os ensaios 1 e 5; 2 e 6; 3 e 7; 4 e 8). Enquanto que o aumento do tempo de extração aumenta a eficiência de extração (comparação entre os ensaios 1 e 3; 2 e 4; 5 e 7; 6 e 8).

Também se observa que em determinadas condições de temperatura e tempo de extração, os maiores níveis do fator tempo de equilíbrio fornecem maior eficiência de extração (comparação entre os ensaios 1 e 2; 3 e 4; 5 e 6). No entanto, em maiores

níveis de tempo de extração o fator tempo de equilíbrio influencia negativamente na eficiência de extração (comparação entre os ensaios 7 e 8; 13 e 14). Estes resultados mostram que existe interação significativa entre os fatores tempo de extração e tempo de equilíbrio.

Para determinação das condições ótimas do método de extração foi utilizada a metodologia de superfície de resposta, mostrada na Figura 30.

Figura 30. Superfície de resposta obtida através do planejamento composto central para otimização das condições de extração dos compostos voláteis em folhas de *P. edulis* por HS-SPME.



Os valores ótimos segundo a superfície de resposta foram: 62 °C para a temperatura, 47 min para o tempo de extração e 11 min para o tempo de equilíbrio. Então, com o intuito de avaliar a resposta analítica das condições ótimas estabelecidas pela metodologia de superfície de resposta, experimentos foram realizados nos valores de temperatura, tempo de extração e tempo de equilíbrio mostrados na Tabela 11. Os níveis experimentais de cada fator foram variados em 10 unidades acima e abaixo do valor ótimo estabelecido pela metodologia de superfície de resposta, além de se repetir o experimento da Tabela 10 que gerou a melhor resposta (ensaio 4).

Tabela 11. Avaliação da condição ótima de extração indicada pelo planejamento composto central.

Ensaio	Temperatura (°C)	Tempo de extração (min)	Tempo de equilíbrio (min)	Área total dos picos
1	62	47	11	8,61 x10 ⁸
2	72	57	21	8,40 x10 ⁸
3	72	57	1	7,54 x10 ⁸
4	72	37	21	7,02 x10 ⁸
5	72	37	1	7,20 x10 ⁸
6	52	57	21	7,80 x10 ⁸
7	52	57	1	7,34 x10 ⁸
8	52	37	1	7,19 x10 ⁸
9	52	37	21	7,20 x10 ⁸
10	50	60	20	7,10 x10 ⁸

Os dados da Tabela 11 mostram que os valores ótimos de temperatura, tempo de extração e tempo de equilíbrio obtidos através do planejamento composto central forneceram a melhor resposta analítica quando comparado a valores próximos. Desse modo, foram estabelecidas as condições de temperatura de extração (62 °C), tempo de extração (47 min) e tempo de equilíbrio (11 min) para o método HS-SPME otimizado.

4.4.2 Caracterização dos compostos voláteis de espécies do gênero *Passiflora* spp.

O método HS-SPME otimizado (i.e.: fibra CAR/PDMS, temperatura de extração de 54 °C; tempo de extração de 47 min e tempo de equilíbrio de 11 min) foi aplicado à análise do perfil de compostos voláteis extraídos de folhas de plantas de cinco espécies do gênero *Passiflora* spp.: *P. edulis*, *P. maliformis*, *P. cincinnata*, *P. gibertii* e *P. setacea*. Destas cinco espécies de maracujazeiro, a *P. edulis* é bastante utilizada comercialmente, mas apresenta elevada susceptibilidade ao *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV), causador da doença do endurecimento dos frutos. Enquanto que as outras quatro são espécies silvestres que apresentam diferentes graus de tolerância a este vírus.

O método de extração HS-SPME otimizado foi utilizado para determinação dos COVs presentes em folhas de plantas das cinco espécies de *Passiflora* spp., sob as seguintes condições: sadias e inoculadas com o CABMV. A Figura 31 ilustra os cromatogramas característicos do perfil de voláteis para cada espécie.

A Tabela 12 mostra todos os COVs identificados, seus respectivos índices de retenção na coluna capilar Rxi-1 MS e a média de concentração relativa de cada composto nas amostras de cada tratamento. A identificação dos COVs detectados foi feita tentativamente através da comparação dos espectros de massas experimentais com os espectros de referência da NIST. A confirmação dos COVs foi feita através dos padrões analíticos disponíveis. O índice de retenção de cada composto foi calculado nas mesmas condições cromatográficas utilizadas nas análises das amostras e comparados com a literatura, a fim de confirmar o composto. A composição relativa dos COVs foi calculada através da razão percentual da área do respectivo pico em relação à área total do cromatograma.

Figura 31. Cromatogramas característicos da análise HS-SPME/GC-MS de COVs de folhas das espécies sadias (SAD) e infectadas pelo CABMV (INF) a) *P. edulis* (SAD) b) *P. edulis* (INF) c) *P. cincinnata* (SAD) d) *P. cincinnata* (INF) e) *P. maliformis* (SAD) f) *P. maliformis* (INF) g) *P. gibertii* (SAD) h) *P. gibertii* (INF) i) *P. setacea* (SAD) j) *P. setacea* (INF).

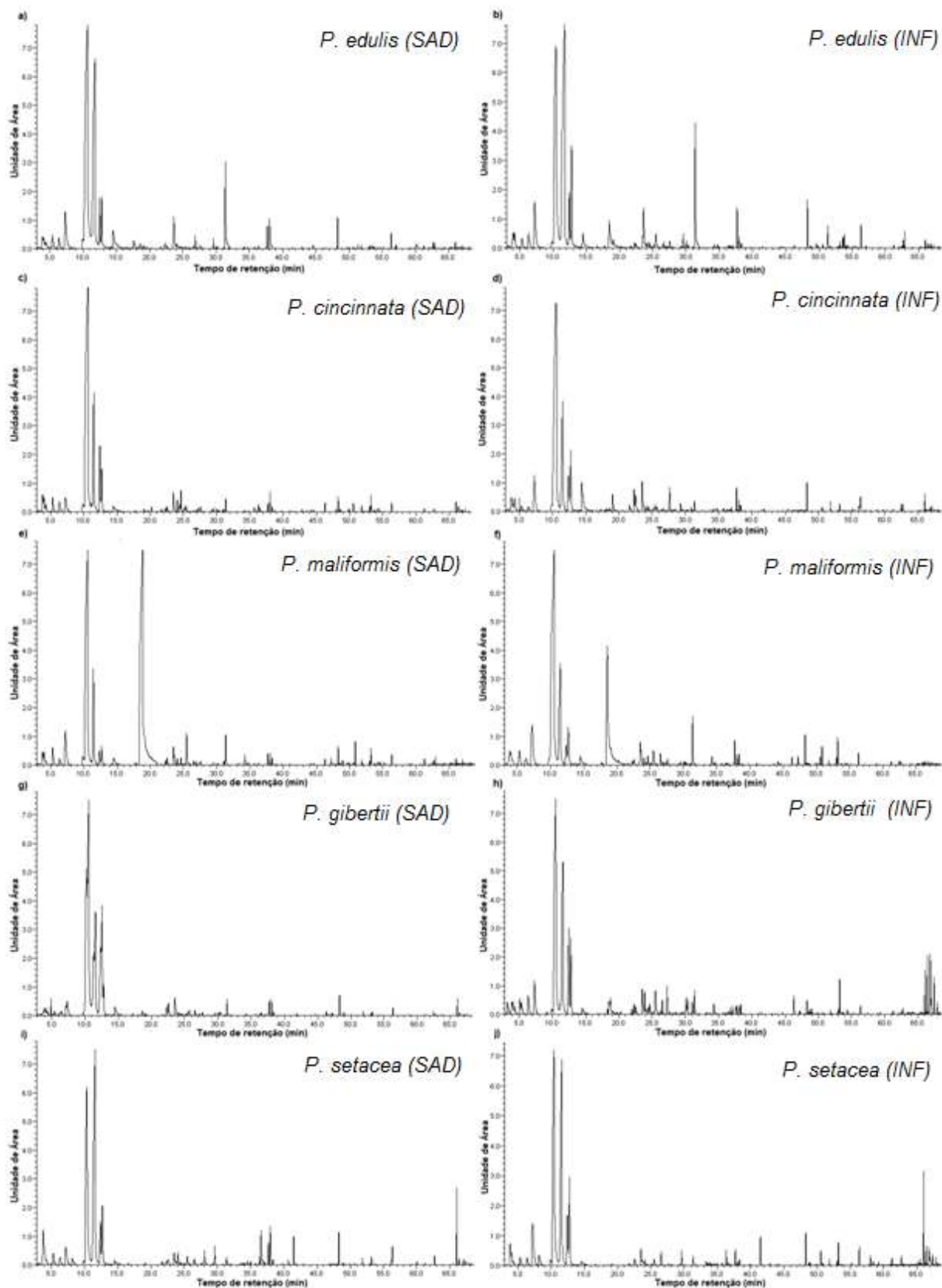


Tabela 12. Composição relativa (%) dos COVs identificados nas espécies de *Passiflora spp.* sadias e infectadas pelo CABMV.

No.	Composto	KI ^b _{EXP}	KI ^c _{LIT}	<i>Passiflora spp.</i>									
				<i>P. edulis</i>		<i>P. maliformis</i>		<i>P. cincinnata</i>		<i>P. gibertii</i>		<i>P. setacea</i>	
				Sadio	(+) CABMV	Sadio	(+) CABMV	Sadio	(+) CABMV	Sadio	(+) CABMV	Sadio	(+) CABMV
1	(E)-2-pental	-	-	1,18	0,75	1,09	1,55	1,43	1,16	0,95	0,94	0,91	1,05
2	(Z)-2-penten-1-ol	-	-	0,92	0,95	0,50	0,83	1,04	1,06	1,15	1,39	0,81	0,50
3	(E)-2-hexenal	834	831	46,97	37,11	35,03	54,10	57,53	57,08	53,36	44,64	32,46	43,27
4	(Z)-3-hexen-1-ol	849	849	25,12	27,50	6,15	11,90	14,66	12,43	14,01	13,64	36,27	23,19
5	(Z)-2-hexen-1-ol	858	856	1,89	3,08	0,73	1,27	6,27	4,66	8,14	8,69	3,33	1,98
6	1-hexanol ^a	862	862	2,29	4,19	0,98	2,64	4,72	5,76	4,23	3,62	4,60	4,74
7	(E,E)-2,4-hexadienal	882	883	1,56	1,08	0,64	0,89	0,46	1,12	0,87	0,83	0,31	0,38
8	Benzaldeído ^a	929	929	2,05	2,05	41,54	6,78	0,02	0,20	0,36	0,91	-	-
9	(Z)-2-heptenal	935	936	0,38	0,56	-	0,37	0,18	0,34	0,13	0,22	0,11	0,14
10	1-heptanol ^a	965	961	0,12	0,14	0,07	0,11	0,18	0,24	0,06	0,07	0,29	0,14
11	6-metil-5-hepten-2-ona	971	972	0,40	0,36	0,22	0,46	0,19	0,40	0,51	0,60	0,30	0,17
12	1-octen-3-ol ^a	974	971	0,25	0,34	0,33	0,76	0,32	0,80	0,69	0,88	0,47	0,60
13	Octanal ^a	984	984	1,65	1,98	0,51	0,51	-	-	-	-	-	-
14	Benzenoacetaldeído	1001	1002	0,21	0,97	1,23	0,73	0,33	0,60	0,44	2,04	0,57	0,44
15	2-etil-1-hexanol	1019	1020	0,08	0,12	0,13	0,37	0,11	0,11	0,40	0,78	0,41	0,34
16	(E)-2-octenal	1034	1035	0,27	0,47	0,20	0,37	0,30	0,43	0,12	0,17	0,16	0,15
17	1-octanol ^a	1062	1060	0,46	0,75	0,09	0,12	0,20	0,13	0,12	0,11	1,27	0,55
18	(E,E)-2,4-octadienal	1081	1086	0,07	0,09	0,17	0,08	0,18	0,11	0,28	0,57	0,03	0,01
19	Nonanal ^a	1084	1084	4,36	5,21	1,29	1,30	0,50	0,51	1,08	0,84	0,54	0,47
20	(E,E)-2,6-nonadienal	1124	1137	0,06	0,12	0,13	0,07	0,06	0,05	0,04	0,04	0,08	0,09
21	(E)-2-nonenal	1134	1134	0,06	0,43	0,10	0,10	0,07	0,08	-	0,01	0,05	0,11
22	Naftaleno	1148	1148	0,05	0,06	0,04	0,09	0,26	0,28	0,13	0,08	0,17	0,13

23	1-nonanol ^a	1158	1158	0,16	0,32	0,07	0,08	0,33	0,16	0,10	0,07	0,68	0,44
24	metil salicilato	1162	1162	0,02	0,17	-	0,14	0,25	0,13	0,20	0,15	2,06	6,68
25	Ácido octanóico ^a	1165	1165	0,04	0,09	-	0,04	0,01	0,03	0,10	0,15	-	0,04
26	Decanal ^a	1184	1184	0,85	0,60	0,68	0,58	0,78	0,43	0,91	0,57	1,85	0,41
27	β -ciclocitral	1187	1187	0,17	0,27	0,30	0,48	0,38	0,32	0,29	0,40	0,34	0,30
28	(E)-2-decenal	1239	1239	0,03	0,14	0,01	0,03	0,02	0,01	0,01	0,06	1,99	2,55
29	Ácido nonanóico ^a	1264	1261	0,04	0,04	-	-	-	-	-	-	-	-
30	Undecanal ^a	1287	1287	0,07	0,07	0,07	0,06	0,09	0,04	0,07	0,04	0,02	0,02
31	(Z)-3-hexenil hexanoato	1365	1364	-	0,06	-	0,02	-	0,02	-	0,06	0,08	0,04
32	β -elemeno	1382	1383	0,01	0,06	0,03	0,09	0,01	0,01	0,02	0,03	-	0,03
33	Dodecanal ^a	1399	1398	0,04	0,18	0,07	0,12	0,89	1,31	0,01	0,06	0,16	0,23
34	Tetradecano ^a	1402	1400	0,04	0,02	0,05	0,04	-	-	0,01	0,04	0,05	0,06
35	α -gurjuneno	1418	1420	0,12	0,29	-	-	0,01	0,01	-	-	-	0,01
36	(E)-geranilacetona	1428	1428	0,12	0,12	0,19	0,28	0,30	0,28	0,19	0,20	0,40	0,30
37	Epóxido de β - ionona	1455	1459	0,05	0,08	0,15	0,28	0,27	0,12	0,09	0,16	0,10	0,12
38	(E)- β -ionona	1459	1462	0,19	0,32	0,58	0,79	0,93	0,76	0,65	1,26	0,55	0,74
39	Alloaromadendreno	1467	1466	0,07	0,18	0,03	0,03	0,08	0,08	0,01	0,07	0,03	0,03
40	α -guaiano	1473	1470	0,10	0,28	0,02	0,03	0,15	0,18	0,03	0,05	0,03	0,03
41	(Z)-3-hexen-1-ol benzoato	1539	1539	-	0,04	0,02	-	0,02	0,03	-	0,01	0,01	-
42	Ácido dodecanóico	1549	1547	0,08	0,04	0,03	0,01	-	0,03	-	-	-	0,04
43	Octil éter	1660	1660	0,08	0,08	0,14	0,13	0,11	0,10	0,03	0,10	0,08	0,17

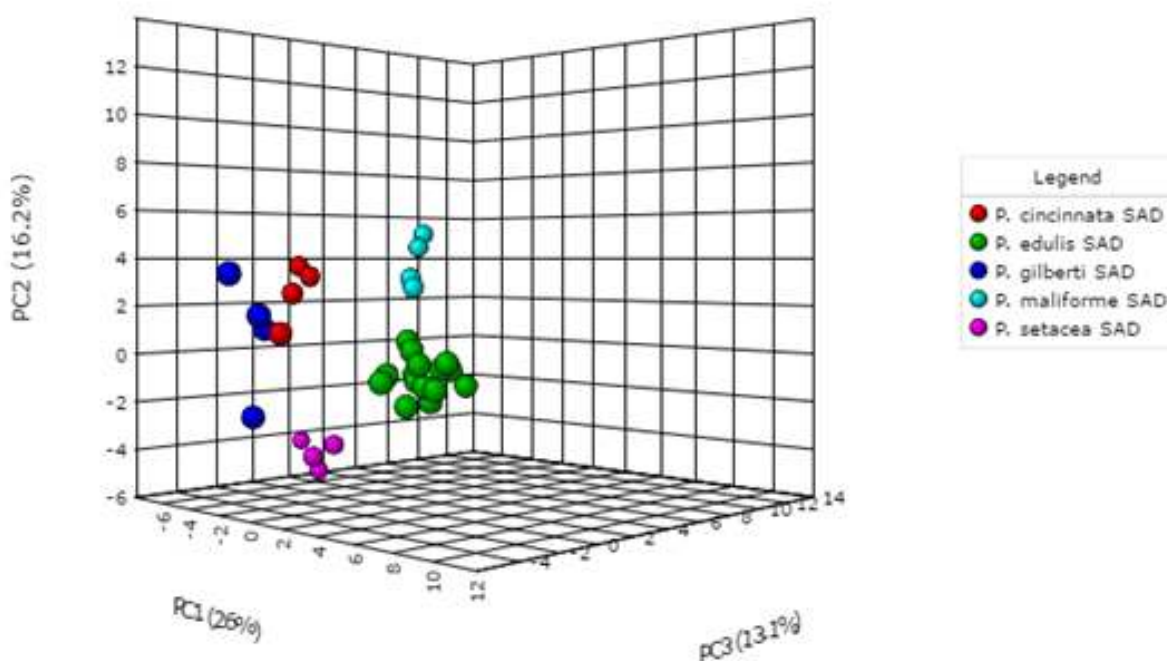
^aIdentificação confirmada por comparação com os espectros de massas e tempos de retenção de padrões analíticos. ^bKI_{CAL} = índice de retenção relativo a n-alcenos (C₈ a C₄₀) obtido em coluna capilar Rxi-1 MS. ^cKI_{LIT} = índice de retenção publicado na literatura.

Foram identificados 43 compostos voláteis nas folhas das diferentes espécies de *Passiflora* spp., sendo que a maioria dos compostos pertenceu às classes dos aldeídos e alcoóis. Em quantidade minoritária, foram encontrados compostos pertencentes às classes de cetonas, ácido carboxílicos, ésteres, éteres, hidrocarbonetos, monoterpenos e sesquiterpenos. Os compostos encontrados em maior abundância relativa nas amostras foram (E)-2-hexenal, (Z)-3-hexen-1-ol, 1-hexanol, (Z)-2-hexen-1-ol, (Z)-2-penten-1-ol e (E)-2-pentenal.

4.4.3 Análise multivariada das amostras de *Passiflora* spp.

Para avaliar diferenças e similaridades no perfil dos compostos voláteis identificados nas amostras de folhas de *Passiflora* spp., foram utilizadas técnicas quimiométricas de análise multivariada. A Figura 32 mostra o gráfico de *scores* 3D, obtido através da técnica análise de componentes principais (PCA), para as amostras das cinco espécies de *Passiflora* spp. sadias.

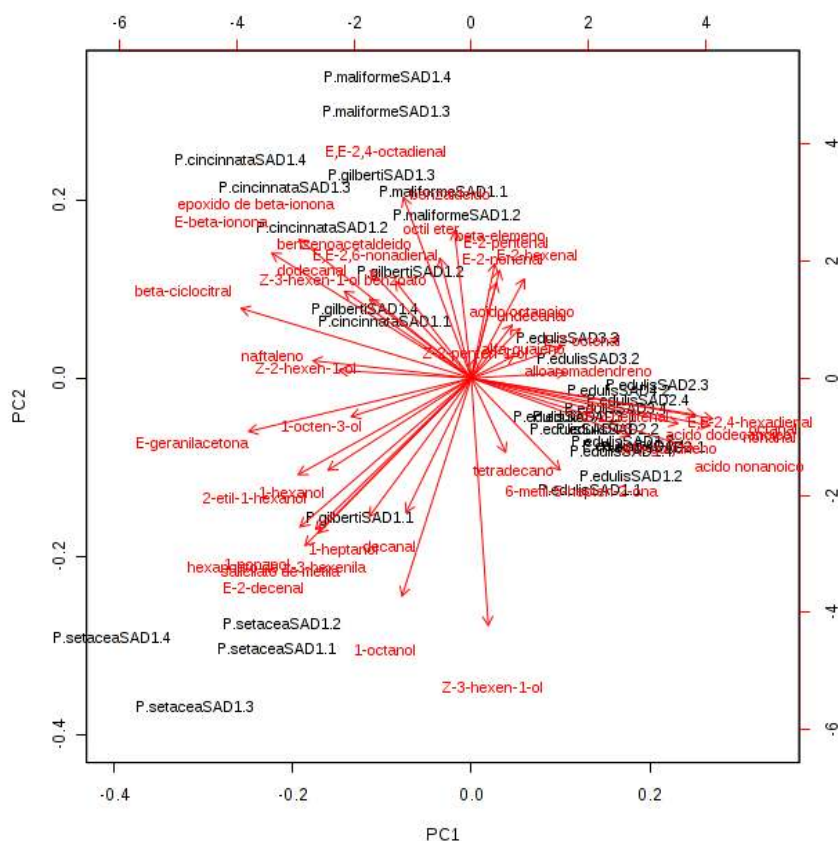
Figura 32. Gráfico de *scores* 3D por PCA obtido através do perfil de COVs das amostras de folhas das cinco espécies de *Passiflora* spp. sadias.



O gráfico de *scores* da Figura 32 mostra que existe uma discriminação no perfil de COVs para as espécies *P. edulis*, *P. maliformis*, *P. cincinnata*, *P. gibertii* e *P. setacea*. Desse modo, é possível observar tendências de agrupamento entre as

amostras de cada espécie. O gráfico de loadings da Figura 33 mostra quais compostos estão relacionados às tendências de agrupamento observadas.

Figura 33. Gráfico de *loadings* 2D por PCA obtido através do perfil de COVs das amostras de folhas das cinco espécies de *Passiflora* spp. sadias.

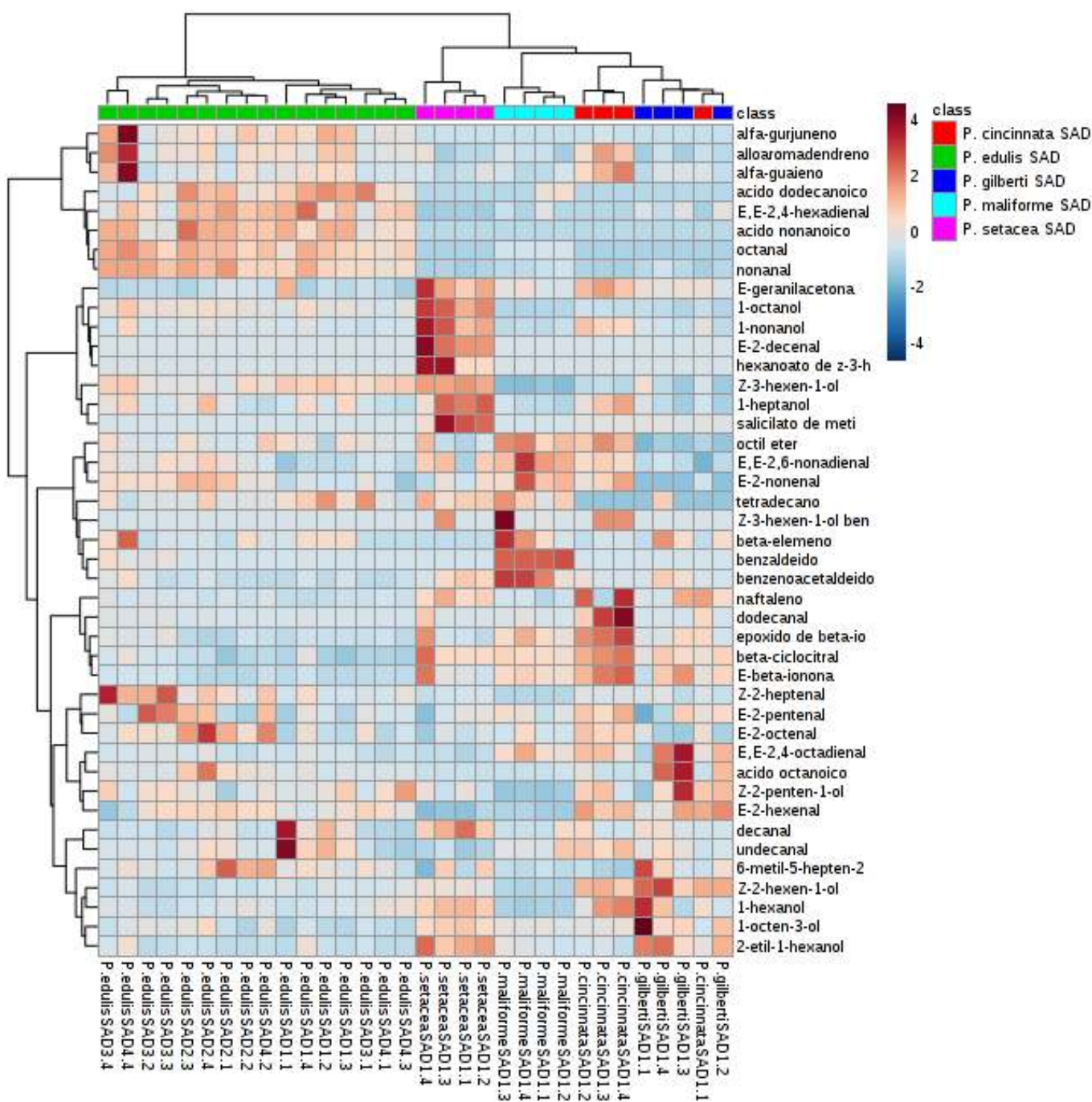


O gráfico de *loadings* 2D da Figura 33 mostra que os compostos (E,E)-2,4-hexadienal (7), ácido nonanóico (29), ácido dodecanóico (42) apresentam valores positivos em PC1 e são os principais responsáveis pela discriminação das amostras de *P. edulis* das outras quatro espécies selvagens. Enquanto que as outras quatro espécies podem ser discriminadas através de distribuição de seus compostos na PC2.

O gráfico de *loadings* mostra que os compostos mais relacionados ao grupo das amostras de *P. setacea* estão projetados em PC2 negativo, tais como (Z)-3-hexen-1-ol (4), 1-octanol (17), 1-nonanol (23), salicilato de metila (24), (E)-2-decenal (28) e hexanoato de (Z)-3-hexenila (31).

Apesar das espécies *P. maliformis*, *P. cincinnata* e *P. gibertii* apresentarem perfil mais semelhante, também podem ser discriminadas através de análise multivariada, como pode ser melhor observado no mapa de calor associado ao dendograma da Figura 34.

Figura 34. Mapa de calor associado ao dendograma PCA obtido através do perfil de COVs das amostras de folhas das cinco espécies de *Passiflora* spp. sadias.



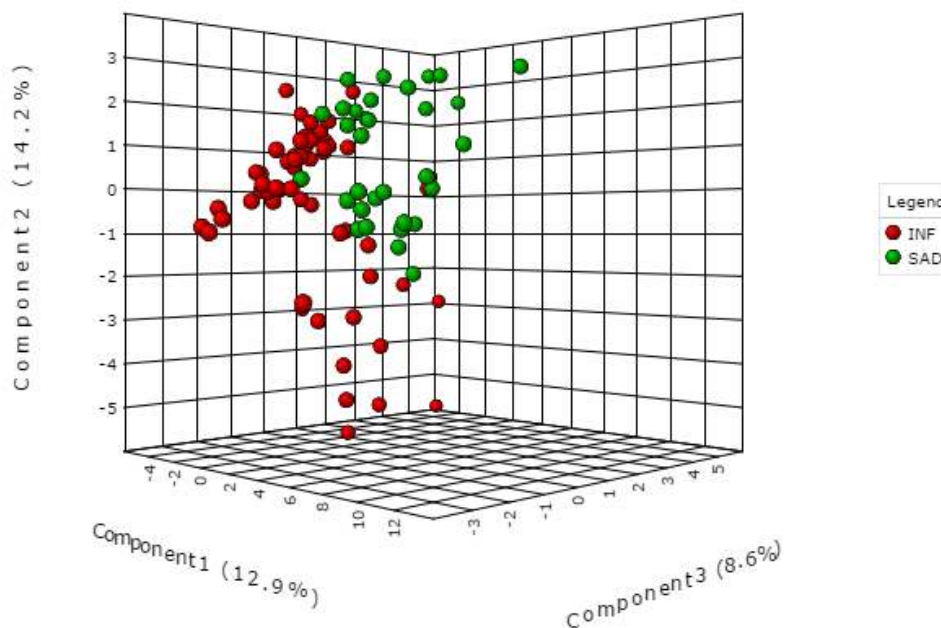
O gráfico da Figura 34 confirma a tendência aparente de separação mostrada no gráfico de scores do PCA 3D, no qual as amostras de *P. edulis* apresentam um perfil bem distinto das outras quatro espécies. O mapa de calor mostra que é possível discriminar as amostras de *P. maliformis* das amostras de *P. gibertii* e *P. cincinnata* devido à maior concentração dos compostos benzaldeído (8), benzenoacetaldéido (14) e β -elemeno (32). Enquanto que as amostras de *P. cincinnata* se diferenciam devido à maior concentração dos compostos naftaleno (22), β -ciclocitral (27), dodecanal (32), epóxido de β -ionona (37) e (E)- β -ionona (38). Já as amostras de *P. gibertii* apresentam uma maior concentração dos compostos (Z)-2-penten-1-ol (2), (E)-2-hexenal (3), (E,E)-2,4-octadienal (18) e ácido octanóico (25).

Desse modo, pode se observar que a técnica analítica HS-SPME/GC-MS associada a análise multivariada permitiu não só caracterizar o perfil de COVs das cinco espécies de *Passiflora* spp., mas também discriminar entre os diferentes perfis apresentados por cada espécie. Ressalta-se que este é o primeiro trabalho a relatar o perfil de compostos voláteis das espécies silvestres *P. maliformis*, *P. cincinnata*, *P. gibertii* e *P. setacea*.

4.4.4 Análise multivariada das amostras de *Passiflora* spp. sadias e infectadas pelo CABMV

Então foram analisadas amostras das cinco espécies de *Passiflora* spp. que foram inoculadas com o *Cowpea aphid-borne mosaic virus* e comparado o perfil dos 43 COVs das amostras sadias e infectadas (Figura 35).

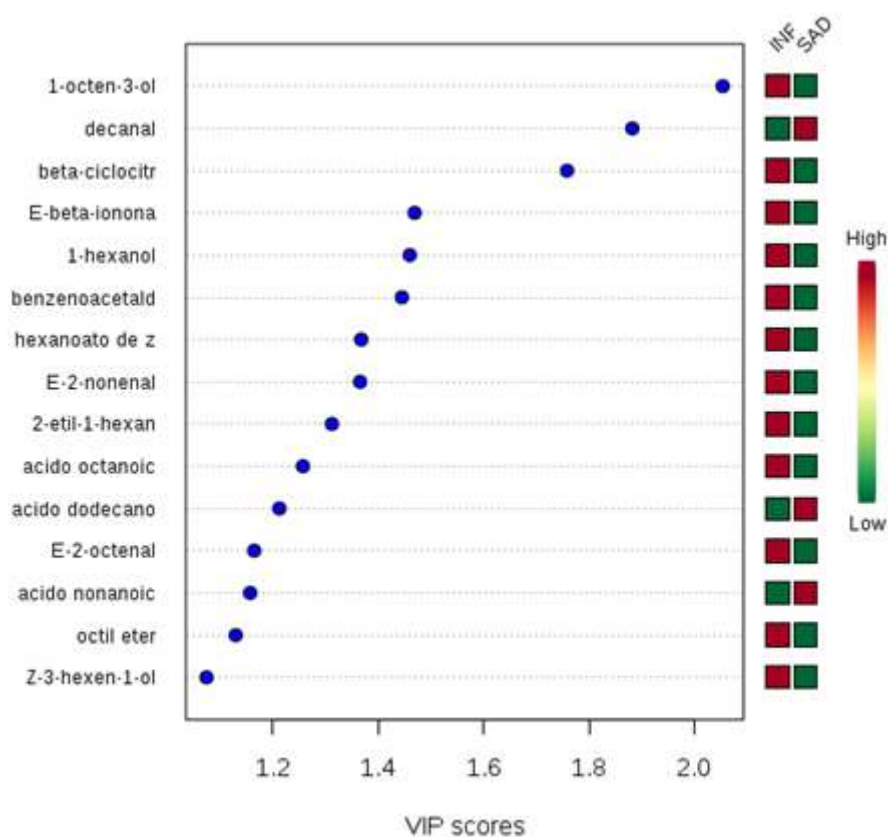
Figura 35. Gráfico de *scores* 3D por PCA obtido através do perfil de COVs das amostras de folhas das cinco espécies de *Passiflora* spp. sadias (SAD) e infectadas (INF) pelo CABMV.



O gráfico de *scores* 3D do PCA da Figura 35 mostra que independente da espécie de *Passiflora* spp. existe uma tendência de discriminação do perfil de COVs entre as amostras de espécies sadias e infectadas. Portanto, existem metabólitos que, independente da espécie de *Passiflora* spp. avaliada, são potenciais biomarcadores de infecção ao CABMV.

O gráfico da Figura 36 mostra os compostos que apresentam maior contribuição para discriminação entre as amostras de *Passiflora* spp. dos grupos sadios e infectados pelo CABMV.

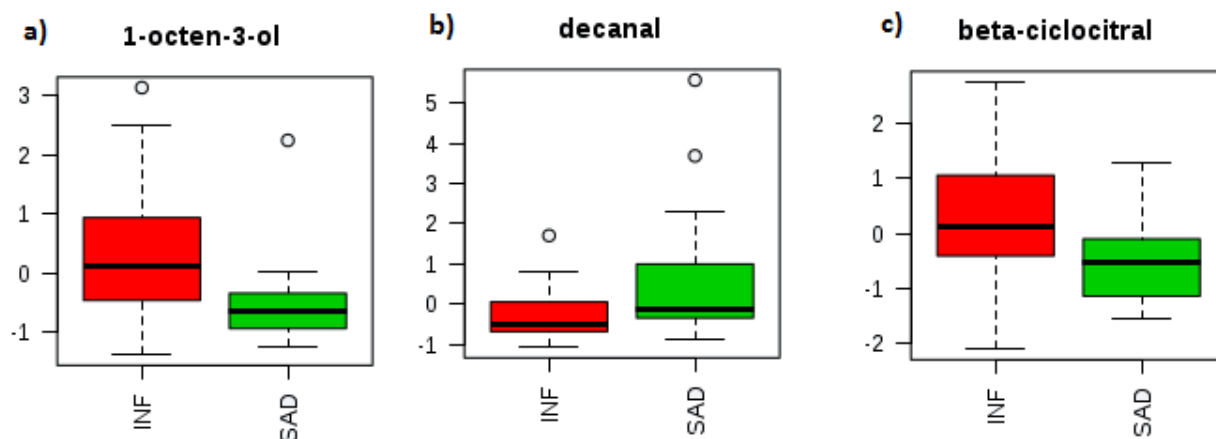
Figura 36. Gráfico de *scores* VIP (*variable importance in projection*) obtido através do perfil de COVs das amostras de folhas das cinco espécies de *Passiflora* spp. sadias e infectadas pelo CABMV.



O gráfico de *scores* VIP mostra que o 1-octen-3-ol é o composto que mais contribui para a discriminação entre as amostras dos grupos, apresentando uma concentração maior no grupo infectado do que no grupo sadio.

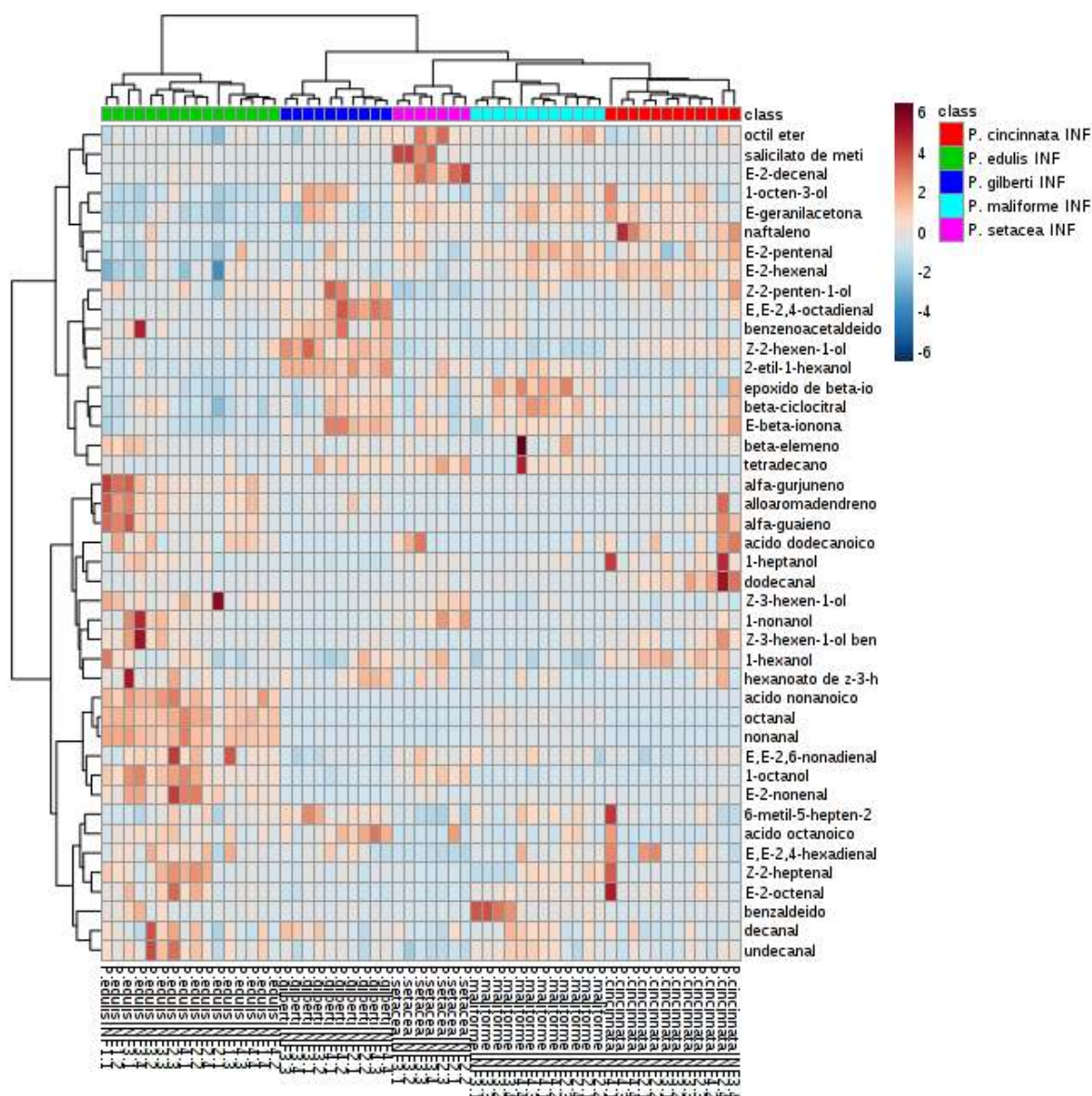
Outro composto que tem bastante significância na discriminação entre as amostras é o decanal, que apresenta uma concentração menor nas amostras do grupo infectado pelo CABMV do que nas amostras do grupo sadio. O terceiro composto com maior influência na discriminação é o β -ciclocitral, que apresenta maior concentração nas amostras do grupo infectado do que no grupo sadio. O Box-plot da Figura 37 mostra como varia a concentração relativa destes três compostos nas amostras dos grupos sadio e infectado pelo CABMV.

Figura 37. Box-plot das amostras de folhas das cinco espécies de *Passiflora* spp. sadias e infectadas pelo CABMV para os compostos a) 1-octen-3-ol b) decanal e c) β -ciclocitral (teste T com $p \leq 0,05$).



Para avaliar se existe diferença no perfil de COVs entre as amostras das diferentes espécies de *Passiflora* spp. infectadas pelo CABMV foi construído um mapa de calor associado ao dendograma, mostrado na Figura 38.

Figura 38. Mapa de calor associado ao dendrograma PCA obtido através do perfil de COVs das amostras de folhas das cinco espécies de *Passiflora* spp. infectadas pelo CABMV.



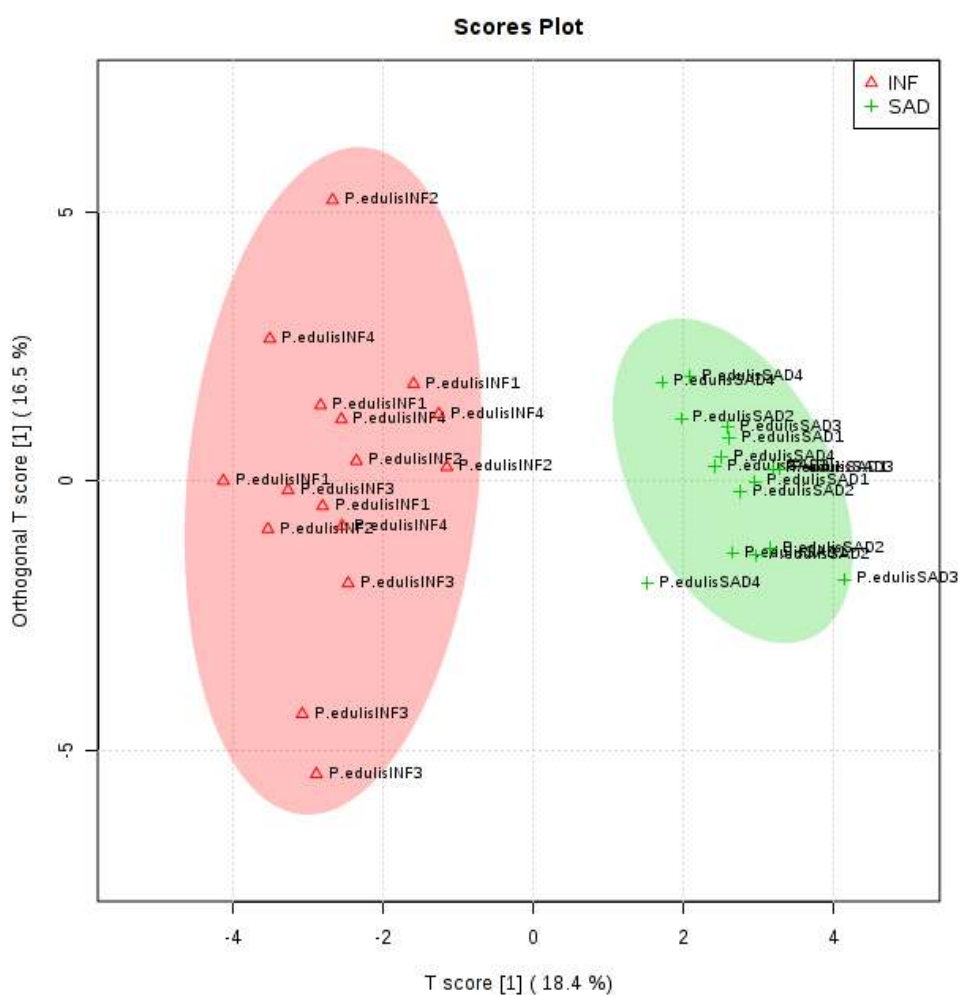
O gráfico da Figura 38 mostra claramente o agrupamento distinto das amostras de cada espécie de *Passiflora* spp. As amostras de *P. edulis* infectadas com CABMV, da mesma forma que no grupo sadio, apresentam um perfil bem distinto das amostras das outras quatro espécies silvestres. As espécies silvestres também apresentam perfis distintos e são discriminadas através da técnica HCA.

Em seguida foram avaliados os compostos que possam atuar como biomarcadores de infecção ao CABMV para cada espécie de *Passiflora* spp.

4.4.4.1 Análise multivariada das amostras de *P. edulis* sadias e infectadas pelo CABMV

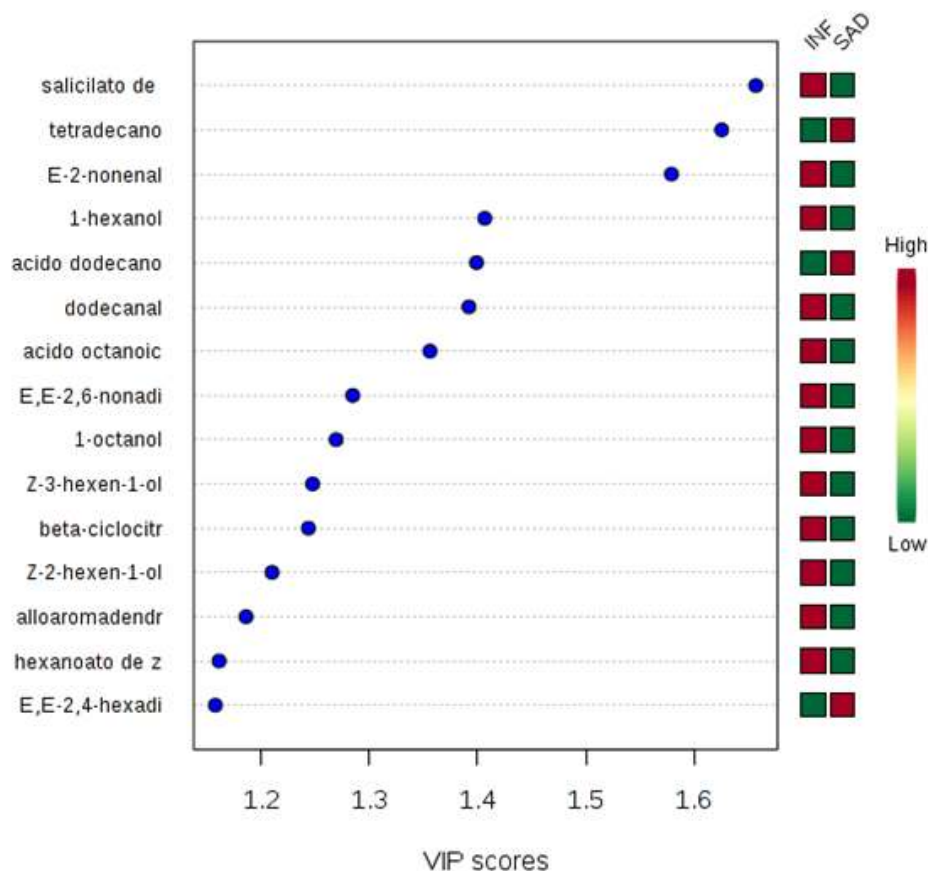
A Figura 39 mostra o gráfico de *scores* do OPLS-DA para as amostras de *P. edulis* sadias e infectadas pelo CABMV.

Figura 39. Gráfico de *scores* por OPLS-DA obtido através do perfil de COVs das amostras de folhas de *P. edulis* sadias e infectadas pelo CABMV.



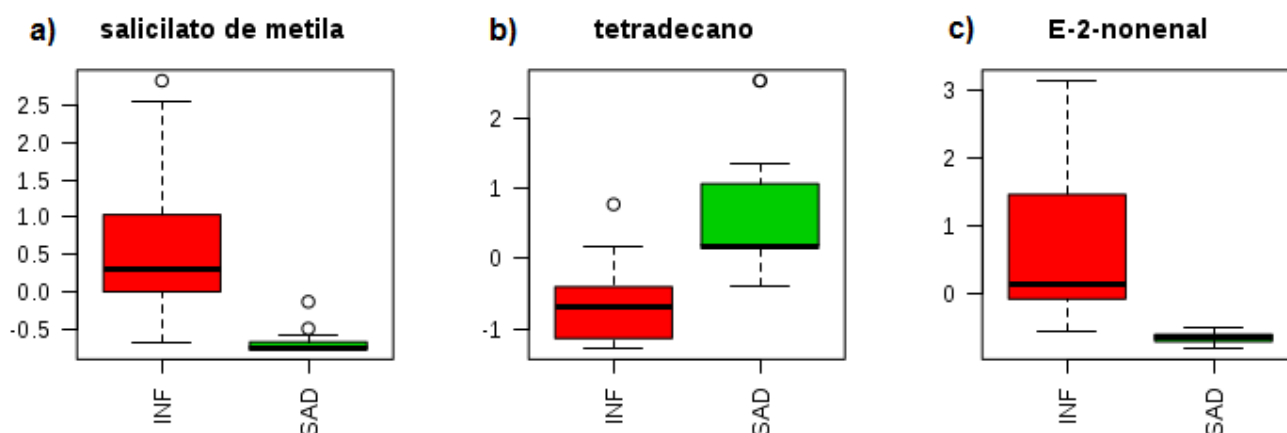
O gráfico de *scores* mostra claramente que existe uma diferença no perfil de COVs entre as amostras dos grupos sadio e infectado pelo CABMV. Os compostos que mais influenciam nesta discriminação estão mostrados no grupo da Figura 40.

Figura 40. Gráfico de scores VIP (*variable importance in projection*) obtido através do perfil de COVs das amostras de *P. edulis* sadias e infectadas pelo CABMV.



O gráfico da Figura 40 mostra que o salicilato de metila é o composto que mais contribui para a discriminação entre as amostras dos grupos sadio e infectado pelo CABMV, apresentando maior concentração no grupo infectado. O segundo composto com maior influência é o tetradecano, porém com comportamento inverso, apresentando menor concentração nas amostras do grupo infectado pelo CABMV. Enquanto que o (E)-2-nonenal é o terceiro composto com maior influência, apresentando maior concentração no grupo infectado. O Box-plot da Figura 41 mostra como varia a concentração relativa destes três compostos nas amostras de *P. edulis* dos grupos sadio e infectado pelo CABMV.

Figura 41. Box-plot das amostras de folhas das cinco espécies de *P. edulis* sadias e infectadas pelo CABMV para os compostos a) salicilato de metila b) tetradecano e c) (E)-2-nonenal (teste T com $p \leq 0,05$).

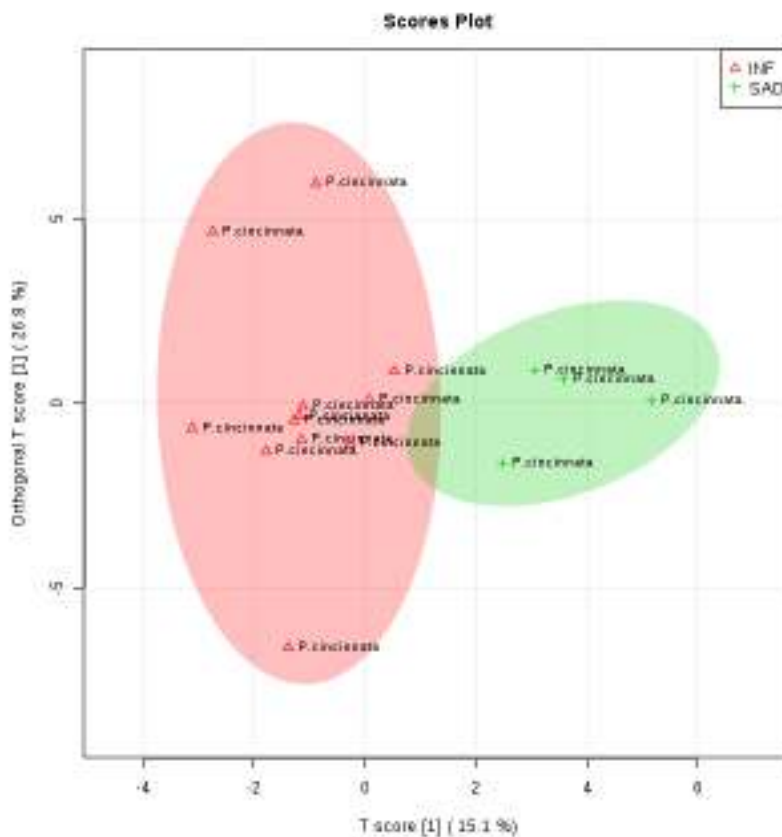


Note que os compostos que mais discriminam as amostras sadias das infectadas para a espécie *P. edulis* são diferentes dos compostos que mais discriminaram quando se compararam todas as espécies juntas (Figura 36). Além disso, o β -ciclocitral, que foi o terceiro composto que mais contribuiu para discriminar as amostras sadias de infectadas considerando todas as espécies, é o 11^o composto que contribui para esta diferenciação nas amostras de *P. edulis*. Enquanto que os compostos 1-octen-3-ol e decenal não estão nem entre os 15 compostos com maior poder de discriminação. Isto mostra que os compostos identificados podem ser biomarcadores específicos de infecção pelo CABMV em plantas da espécie *P. edulis*.

4.4.4.2 Análise multivariada das amostras de *P. cincinnata* sadias e infectadas pelo CABMV

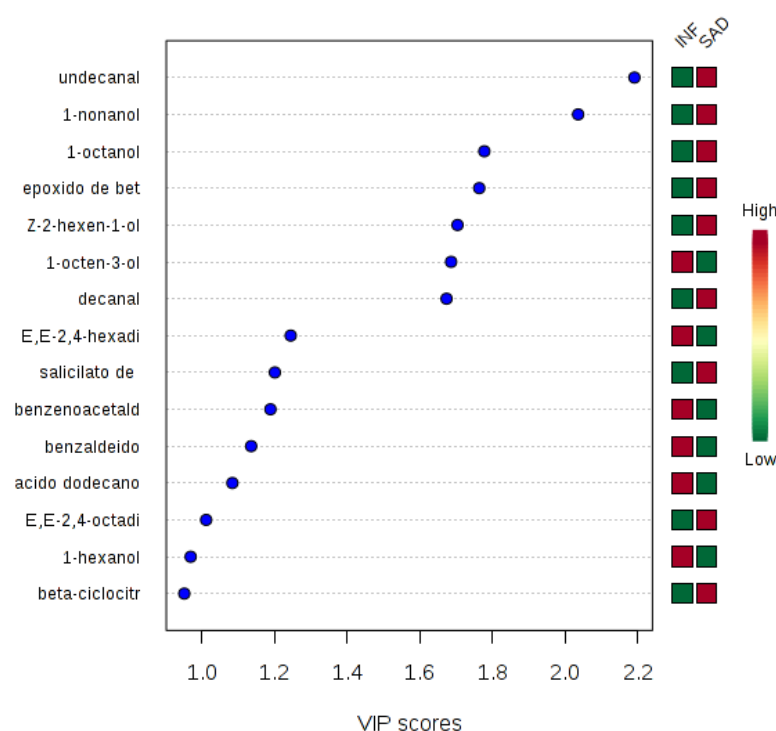
A Figura 42 mostra o gráfico de scores do OPLS-DA para as amostras de *P. cincinnata* sadias e infectadas pelo CABMV.

Figura 42. Gráfico de scores por OPLS-DA obtido através do perfil de COVs das amostras de folhas de *P. cinnamomum* sadias (SAD) e infectadas (INF) pelo CABMV.



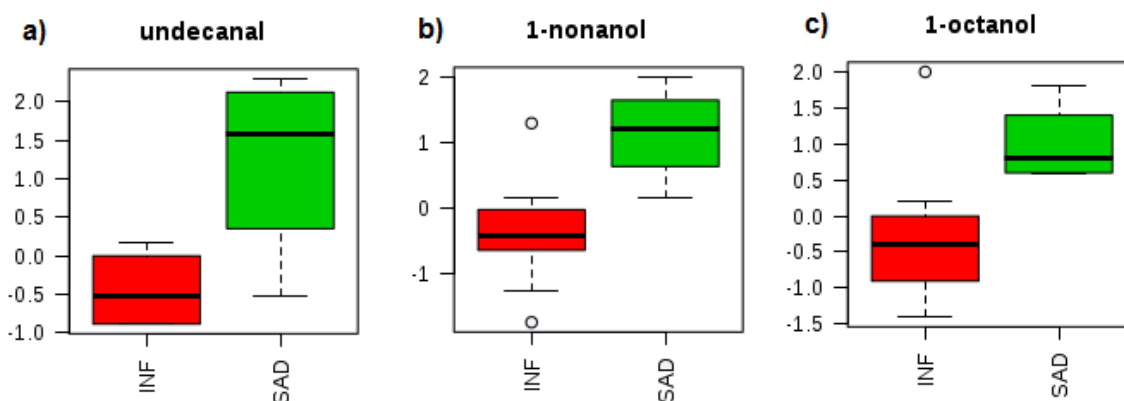
O gráfico de scores mostra uma discriminação entre as amostras dos grupos sadio e infectado pelo CABMV. Os compostos que mais influenciam nesta discriminação estão mostrados no grupo da Figura 43.

Figura 43. Gráfico de scores VIP (*variable importance in projection*) obtido através do perfil de COVs das amostras de *P. cincinnata* sadias e infectadas pelo CABMV.



O gráfico da Figura 43 mostra que os compostos undecanal, 1-nonanol e 1-octanol são, respectivamente, os três compostos que mais contribuem para a discriminação entre as amostras dos grupos sadio e infectado pelo CABMV. Todos os três compostos apresentam menor concentração no grupo infectado quando comparado ao grupo sadio. O Box-plot da Figura 44 mostra como varia a concentração relativa destes três compostos nas amostras de *P. cincinnata* dos grupos sadio e infectado pelo CABMV.

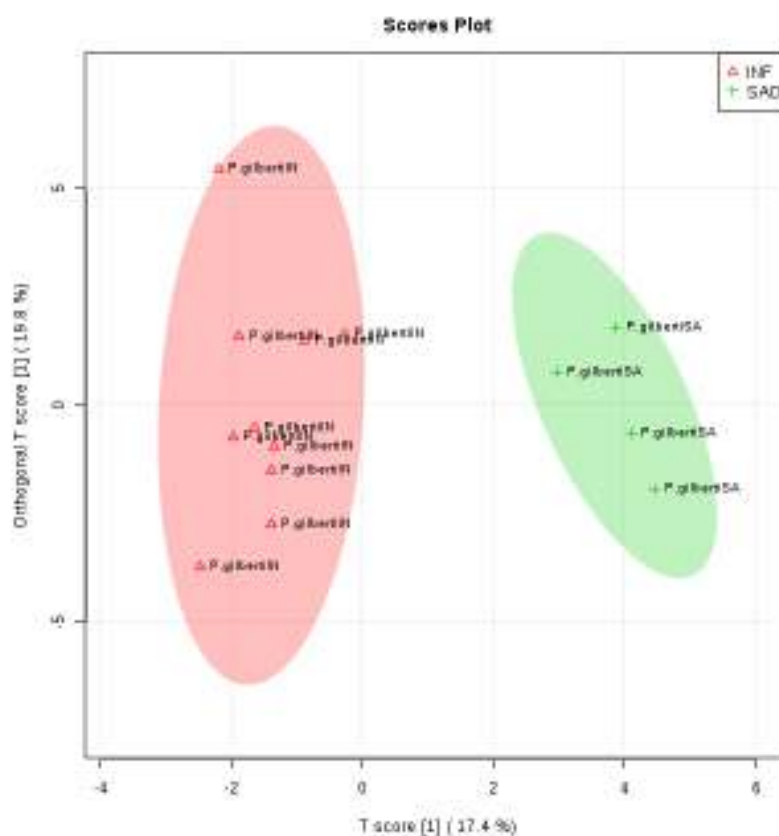
Figura 44. Box-plot das amostras de folhas das cinco espécies de *P. cincinnata* sadias e infectadas pelo CABMV para os compostos a) undecanal b) 1-nonanol e c) 1-octanol (teste T com $p \leq 0,05$).



4.4.4.3 Análise multivariada das amostras de *P. gibertii* sadias e infectadas pelo CABMV

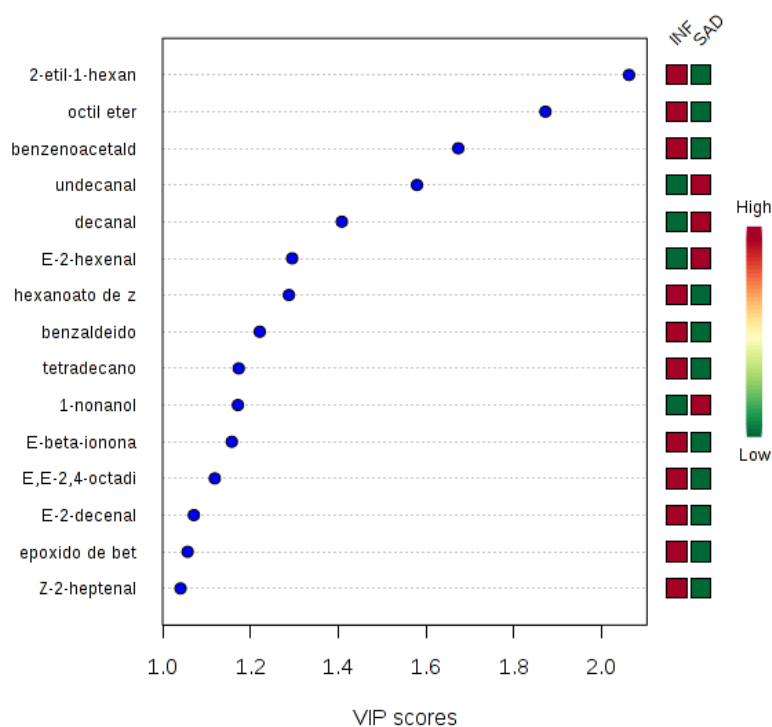
A Figura 45 mostra o gráfico de scores do OPLS-DA para as amostras de *P. gibertii* sadias e infectadas pelo CABMV.

Figura 45. Gráfico de scores por OPLS-DA obtido através do perfil de COVs das amostras de folhas de *P. gibertii* sadias (SAD) e infectadas (INF) pelo CABMV.



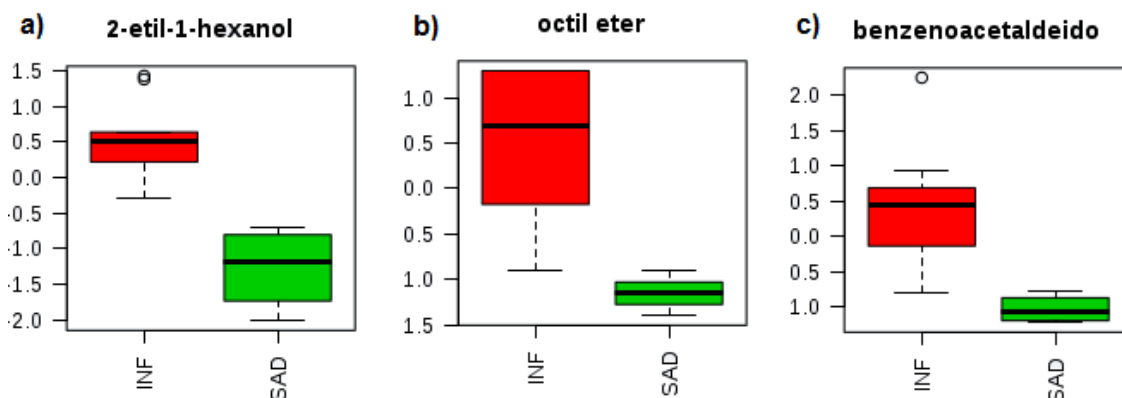
O gráfico de scores mostra uma discriminação entre as amostras dos grupos sadio e infectado pelo CABMV. Os compostos que mais influenciam nesta discriminação estão mostrados no grupo da Figura 46.

Figura 46. Gráfico de scores VIP (*variable importance in projection*) obtido através do perfil de COVs das amostras de *P. gibertii* sadias e infectadas pelo CABMV.



O gráfico da Figura 46 mostra que os compostos 2-etil-1-hexanol, octil éter e benzenoacetaldéido são, respectivamente, os três compostos que mais contribuem para a discriminação entre as amostras dos grupos sadio e infectado pelo CABMV. Todos os três compostos apresentam maior concentração no grupo infectado quando comparado ao grupo sadio. O Box-plot da Figura 47 mostra como varia a concentração relativa destes três compostos nas amostras de *P. gibertii* dos grupos sadio e infectado pelo CABMV.

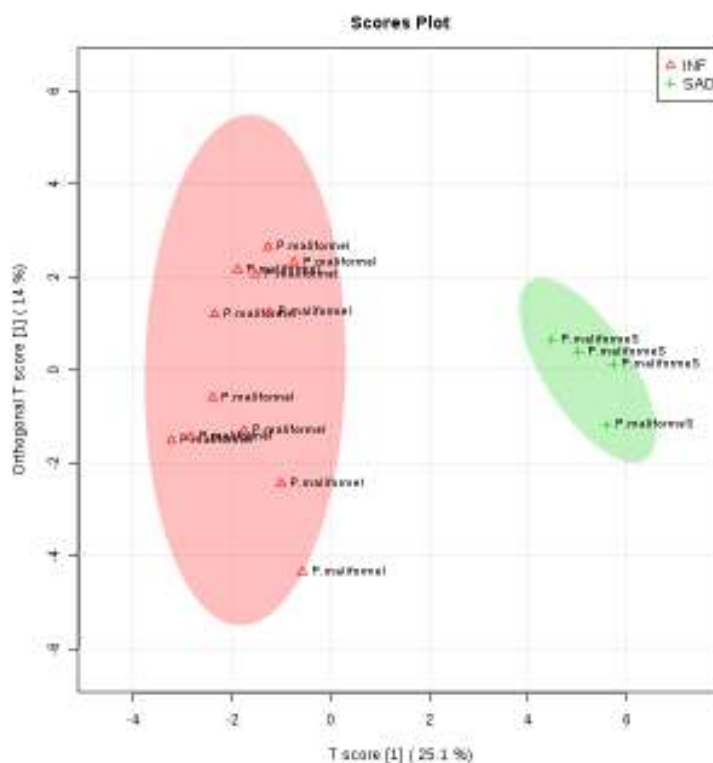
Figura 47. Box-plot das amostras de folhas das cinco espécies de *P. gibertii* sadias e infectadas pelo CABMV para os compostos a) 2-etil-1-hexanol b) octil éter e c) benzenoacetaldeído (teste T com $p \leq 0,05$).



4.4.4.4 Análise multivariada das amostras de *P. maliformis* sadias e infectadas pelo CABMV

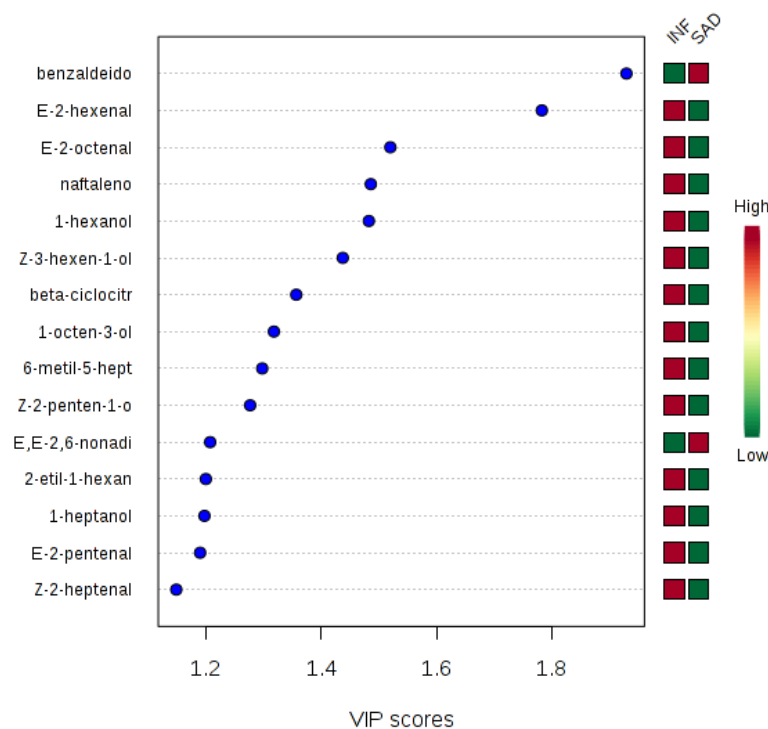
A Figura 48 mostra o gráfico de scores do OPLS-DA para as amostras de *P. maliformis* sadias e infectadas pelo CABMV.

Figura 48. Gráfico de scores por OPLS-DA obtido através do perfil de COVs das amostras de folhas de *P. maliformis* sadias (SAD) e infectadas (INF) pelo CABMV.



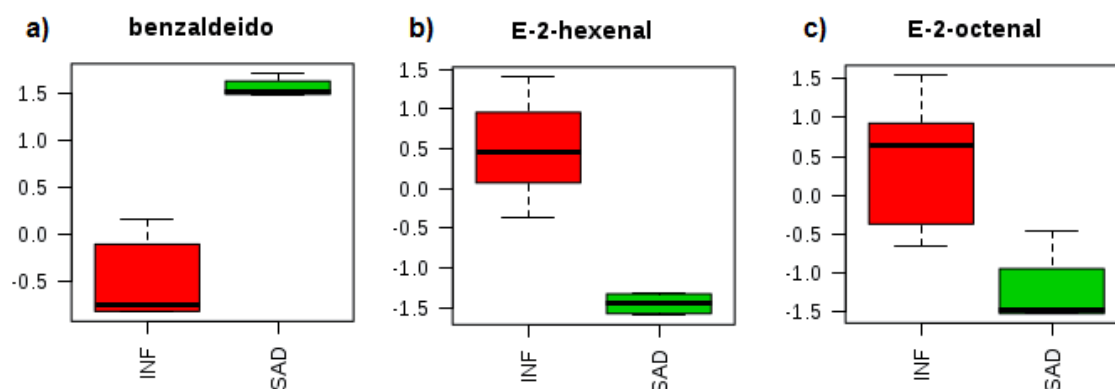
O gráfico de *scores* mostra uma discriminação entre as amostras dos grupos sadio e infectado pelo CABMV. Os compostos que mais influenciam nesta discriminação estão mostrados no grupo da Figura 49.

Figura 49. Gráfico de *scores* VIP (*variable importance in projection*) obtido através do perfil de COVs das amostras de *P. maliformis* sadias e infectadas pelo CABMV.



O gráfico da Figura 49 mostra que o benzaldeído é o composto que mais contribui para a discriminação entre as amostras dos grupos sadio e infectado pelo CABMV, apresentando menor concentração no grupo infectado. Enquanto que os compostos (E)-2-hexenal e (E)-2-octenal são os outros dois compostos que mais contribuem para a discriminação entre os grupos, apresentando maior concentração no grupo infectado. O Box-plot da Figura 50 mostra como varia a concentração relativa destes três compostos nas amostras de *P. maliformis* dos grupos sadio e infectado pelo CABMV.

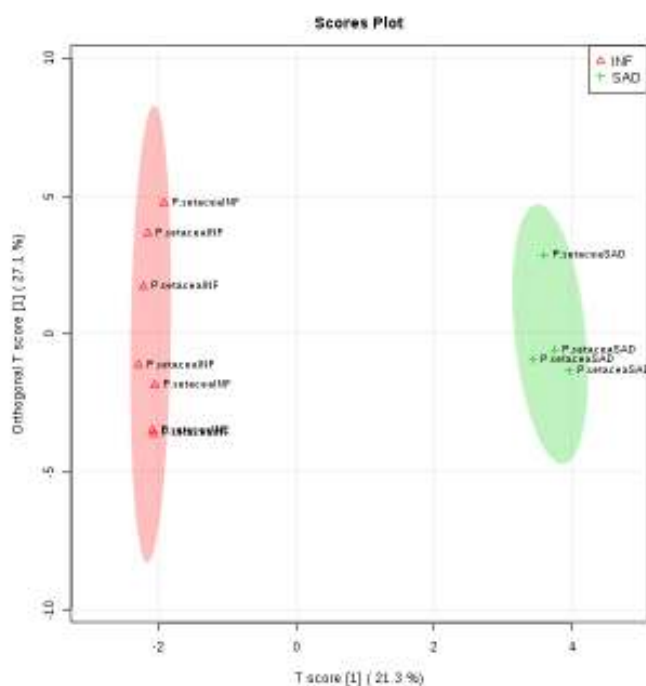
Figura 50. Box-plot das amostras de folhas das cinco espécies de *P. maliformis* sadias e infectadas pelo CABMV para os compostos a) benzaldeído b) (E)-2-hexenal e c) (E)-2-octenal (teste T com $p \leq 0,05$).



4.4.4.5 Análise multivariada das amostras de *P. setacea* sadias e infectadas pelo CABMV

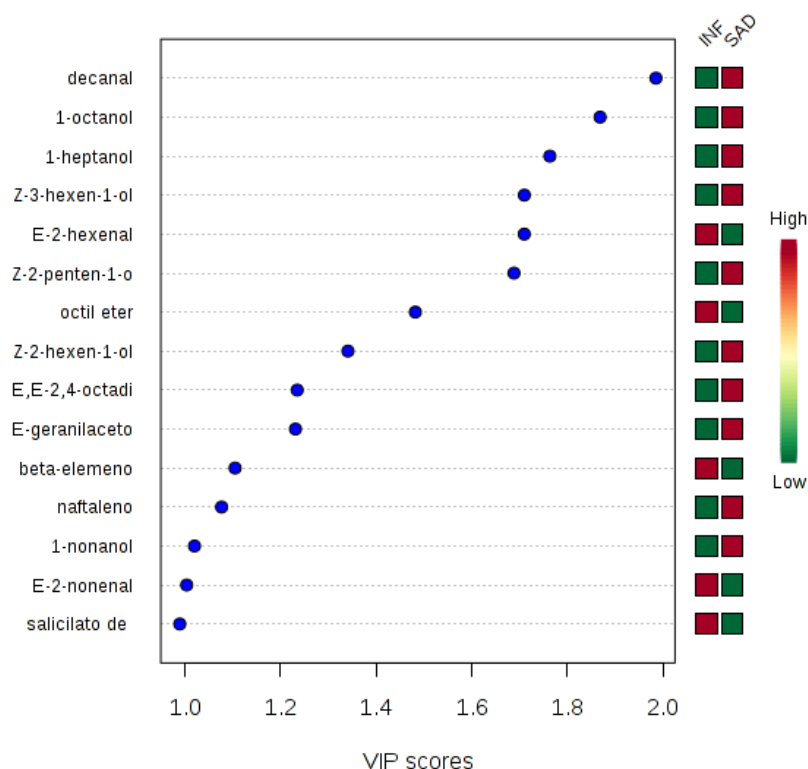
A Figura 51 mostra o gráfico de *scores* do OPLS-DA para as amostras de *P. setacea* sadias e infectadas pelo CABMV.

Figura 51. Gráfico de *scores* por OPLS-DA obtido através do perfil de COVs das amostras de folhas de *P. setacea* sadias (SAD) e infectadas (INF) pelo CABMV.



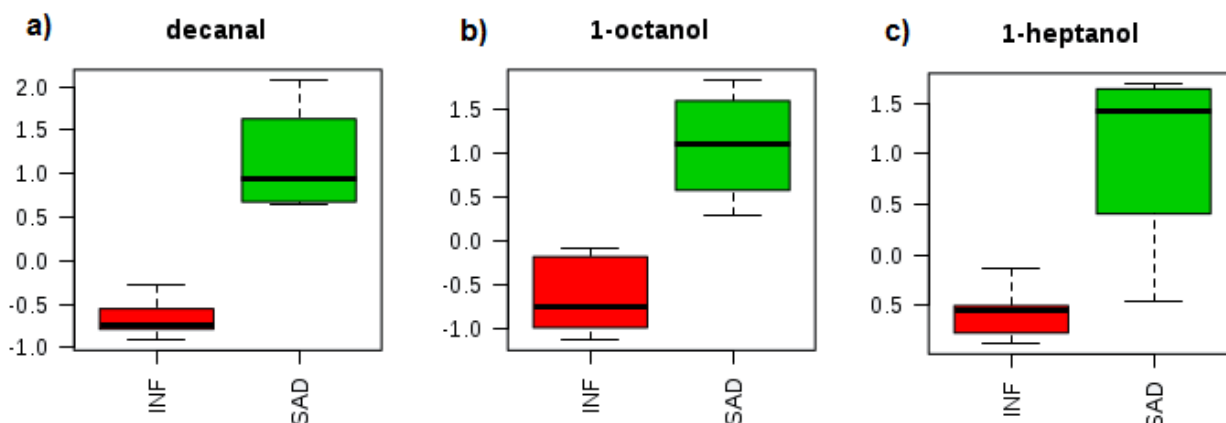
O gráfico de *scores* mostra uma discriminação entre as amostras dos grupos sadio e infectado pelo CABMV. Os compostos que mais influenciam nesta discriminação estão mostrados no gráfico da Figura 52.

Figura 52. Gráfico de *scores* VIP (*variable importance in projection*) obtido através do perfil de COVs das amostras de *P. setacea* sadias e infectadas pelo CABMV.



O gráfico da Figura 52 mostra que os compostos decanal, 1-octanol e 1-heptanol são, respectivamente, os três compostos que mais contribuem para a discriminação entre as amostras dos grupos sadio e infectado pelo CABMV. Todos os três compostos apresentam menor concentração no grupo infectado quando comparado ao grupo sadio. O Box-plot da Figura 53 mostra como varia a concentração relativa destes três compostos nas amostras de *P. setacea* dos grupos sadio e infectado pelo CABMV.

Figura 53. Box-plot das amostras de folhas das cinco espécies de *P. setacea* sadias e infectadas pelo CABMV para os compostos a) decanal b) 1-octanol e c) 1-heptanol (teste T com $p \leq 0,05$).

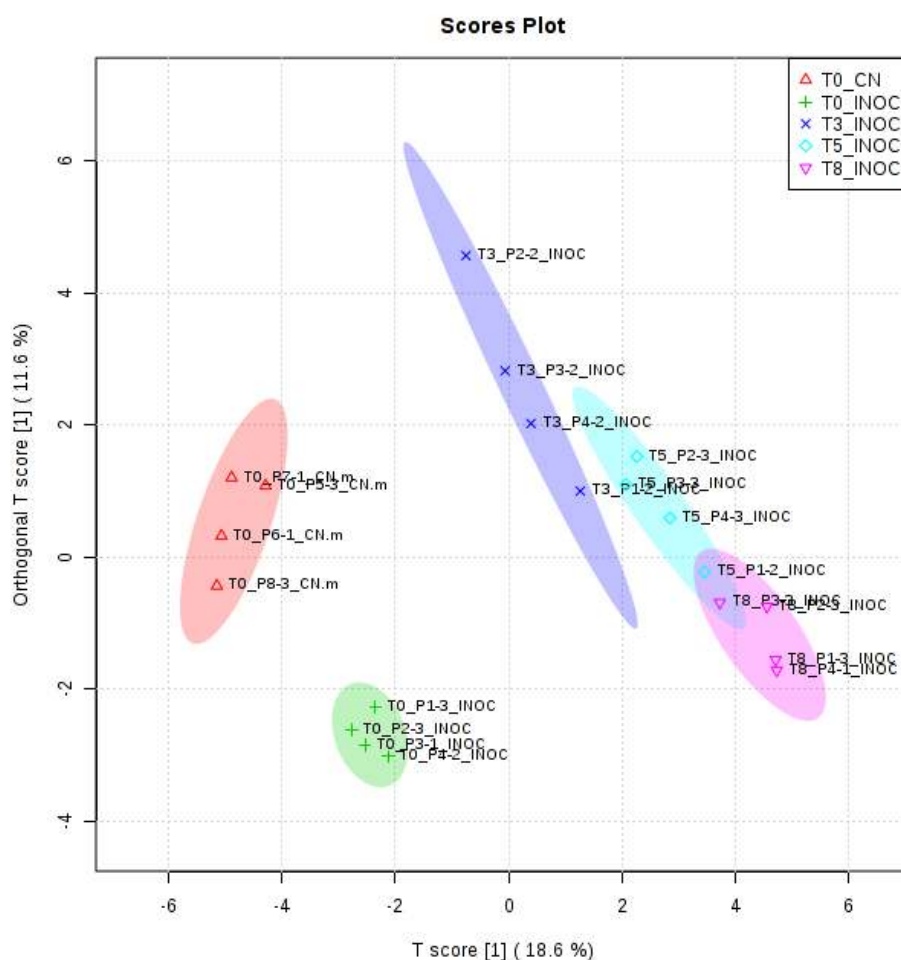


Nota-se que a utilização das técnicas de análise multivariada permitiram identificar compostos voláteis potenciais biomarcadores de infecção pelo CABMV comuns a todas as espécies de *Passiflora* spp., assim como COVs que são biomarcadores específicos de cada espécie.

4.4.5 Avaliação do processo de infecção pelo CABMV em amostras de *P. cincinnata*

Para avaliar como evolui a infecção na planta após o início da infecção pelo CABMV, plantas de *P. cincinnata*, que é uma espécie silvestre considerada tolerante a este vírus, foram inoculadas com este patógeno e avaliadas nos seguintes tempos: 0, 3, 5 e 8 dias. As amostras de folhas das plantas de cada tratamento foram extraídas e o seu metabolismo foi interrompido através da adição de N_2 líquido e maceração das mesmas. Em seguida os compostos foram extraídos com metanol e analisados através da técnica LC-QTOF-MS. A Figura 54 mostra o gráfico de scores do OPLS-DA para o perfil de compostos das amostras de *P. cincinnata*, após inoculação pelo CABMV e monitorada no tempo.

Figura 54. Gráfico de *scores* por OPLS-DA obtido através do perfil de compostos das amostras de folhas de *P. cinninata* inoculadas com CABMV e avaliadas nos tempos de 0, 3, 5 e 8 dias.

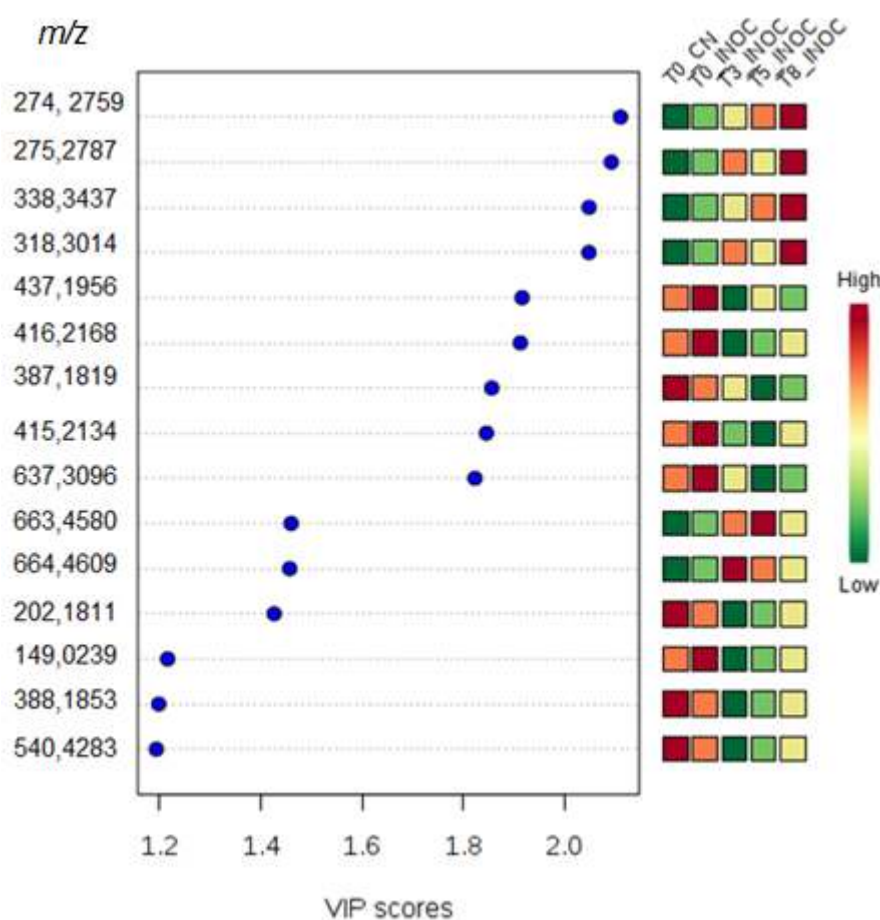


Através da análise do gráfico da Figura 54, se pode observar que existe uma diferença no perfil de compostos das amostras do tempo T0 dias, que foram inoculadas com o CABMV (T0_INOC) e as do grupo controle em que foi adicionado apenas um tampão fosfato (T0_CN). Isto mostra que a planta apresentou uma resposta metabólica específica à entrada do patógeno no seu organismo, e não apenas uma resposta em função da agressão mecânica para inserção do patógeno na planta.

Além disso, o gráfico de *scores* por OPLS-DA mostra que após 3 dias de inoculação o perfil dos compostos se apresenta bastante diferente (T3_INOC) das amostras do grupo controle (T0_CN) e após a inoculação (T0_INOC). Isto indica que o sistema de defesa da planta continuou respondendo à infecção pelo CABMV. A mudança nos perfis de compostos na planta com 5 e 8 dias mostra que esta resposta

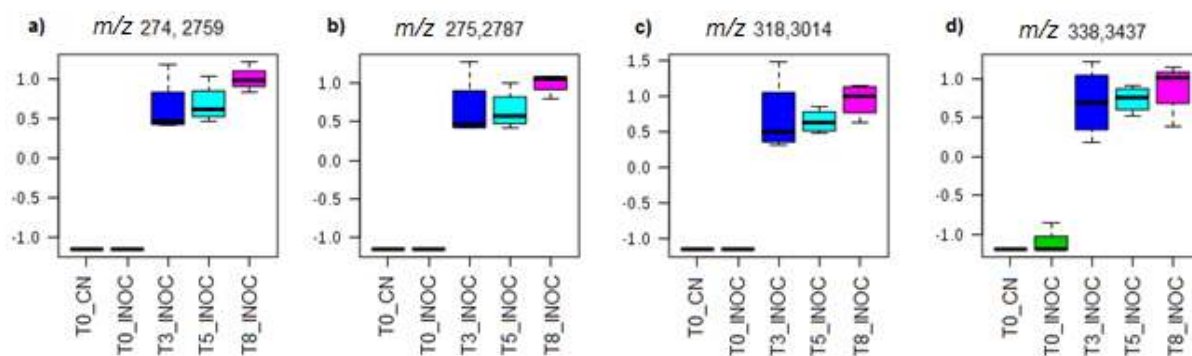
continua evoluindo no tempo. Os compostos que mais influenciam nesta discriminação estão mostrados no gráfico da Figura 55.

Figura 55. Gráfico de scores VIP (*variable importance in projection*) obtido através do perfil de COVs das amostras de *P. setacea* sadias e infectadas pelo CABMV.



O gráfico da Figura 55 mostra que os compostos de m/z 274,2759; 275,2787; 338,3437 e 318,3014 são os que mais contribuem para a discriminação entre as amostras dos diferentes tempos de inoculação. Além disso, pode se observar pelo gráfico que a concentração destes compostos aumenta sucessivamente desde o momento da inoculação até o tempo de 8 dias. O Box-plot da Figura 56 mostra como varia a concentração relativa destes quatro compostos nas amostras de *P. cincinnata* após inoculação do CABMV.

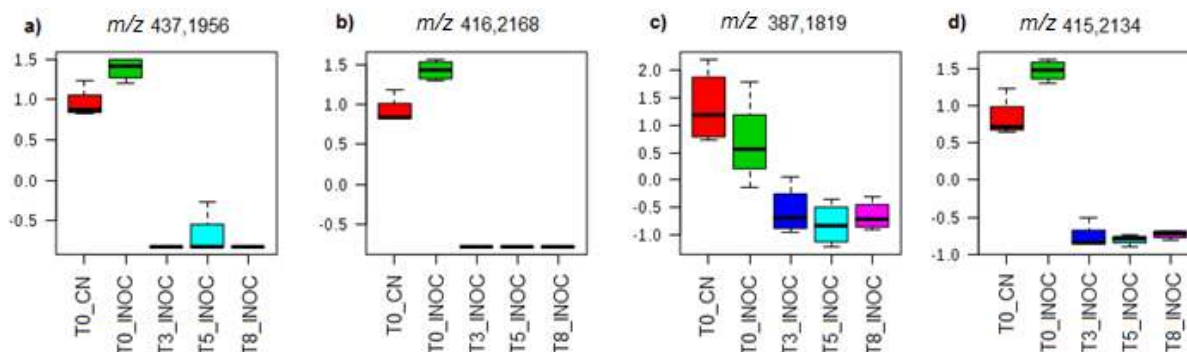
Figura 56. Box-plot das amostras de folhas das de *P. cincinnata* inoculada com CABMV e avaliadas no tempo, para os compostos de *m/z* a) 274,2759 b) 275,2787 c) 318,3014 e d) 338,3437 (ANOVA com $p \leq 0,05$).



Os dados da Figura 56 mostram que os compostos representativos dos íons supracitados apresentam uma concentração baixa até o momento da inoculação pelo CABMV, mas que a partir de três dias de inoculação aumenta significativamente e persiste até o 8^o dia.

O gráfico da Figura 55 também mostra que os compostos de *m/z* 437,1956; 416,2168; 387,1819 e 415,2134 também contribuem significativamente para a discriminação entre as amostras dos diferentes tempos de inoculação. No entanto, pode se observar pelo gráfico que a concentração destes compostos diminuiu sucessivamente desde o momento da inoculação até o tempo de 8 dias. O Box-plot da Figura 57 mostra como varia a concentração relativa destes quatro compostos nas amostras de *P. cincinnata* após inoculação do CABMV.

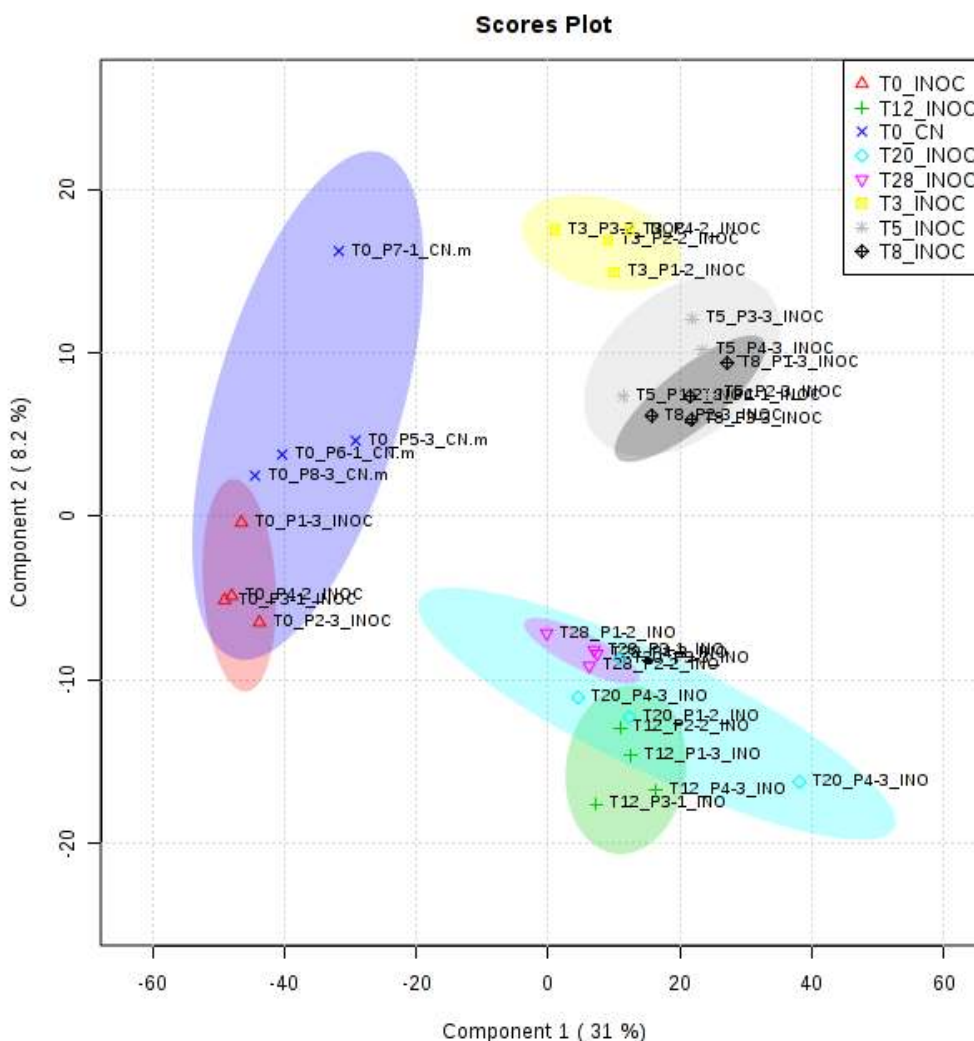
Figura 57. Box-plot das amostras de folhas das de *P. cincinnata* inoculada com CABMV e avaliadas no tempo, para os compostos de *m/z* a) 437,1956 b) 416,2168 c) 387,1819 e d) 415,2134 (ANOVA com $p \leq 0,05$).



Os dados da Figura 57 mostram que os compostos representativos dos íons supracitados apresentam uma concentração relativa alta até o momento da inoculação pelo CABMV, mas que a partir de três dias de inoculação suas concentrações diminuem significativamente até o 8º dia.

Também se analisou amostras de *P. cincinnata* com tempos de inoculação de 12, 20 e 28 dias, para avaliar como a resposta metabólica da planta se mantém com maiores tempos de infecção ao CABMV. A Figura 58 mostra o gráfico de *scores* do OPLS-DA para o perfil de compostos das amostras de *P. cincinnata*, após inoculação pelo CABMV e monitorada nos tempos 0, 3, 5, 8, 12, 20 e 28 dias.

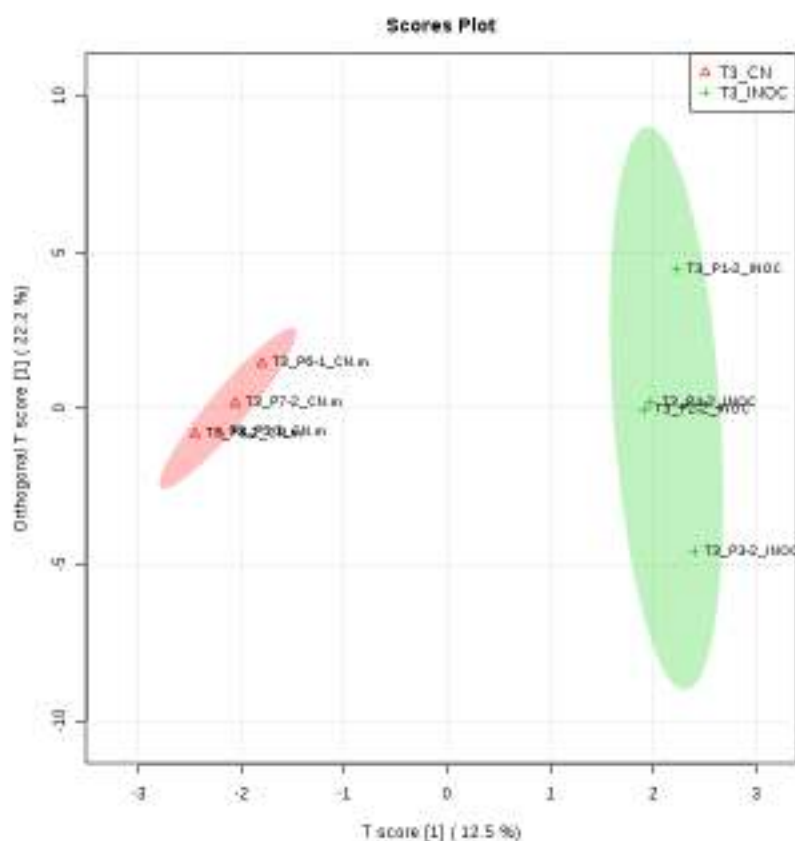
Figura 58. Gráfico de *scores* por OPLS-DA obtido através do perfil de compostos das amostras de folhas de *P. cinnamomum* inoculadas com CABMV e avaliadas nos tempos de 0, 3, 5, 8, 12, 20 e 28 dias.



O gráfico de *scores* da Figura 58 mostra claramente a formação de três perfis de compostos distintos. O primeiro grupo formado pelas amostras que foram analisadas logo após a inoculação do patógeno (T0_INOC), que apresenta um perfil próximo ao das amostras de plantas que foram inoculadas apenas com o tampão fosfato (T0_CN). Um segundo grupo, formado pelas amostras com 3, 5 e 8 dias após inoculação do CABMV, que se distingue do terceiro grupo formado pelas amostras com 12, 20 e 28 dias de inoculação. Desse modo, se pode inferir que existem perfis de metabólitos distintos relacionados a dois estágios de resposta à infecção pelo CABMV: um estágio de resposta aguda à infecção (nos tempos de 3, 5 e 8 dias) e outro em que a resposta metabólica da planta à infecção já é menos acentuada (12, 20 e 28 dias).

Para comprovar que as diferenças observadas nos tratamentos não estão relacionadas a outros fatores, tais como a idade da planta, foi realizada a determinação do perfil de compostos de dois grupos de plantas: i) que foram inoculadas com o CABMV ii) que foram inoculadas com tampão fosfato. A extração dos compostos foi realizada após 3 dias da inoculação. A Figura 59 mostra o gráfico de scores do OPLS-DA para o perfil de compostos das amostras de *P. cincinnata*, após 3 dias de inoculação com CABMV e tampão fosfato.

Figura 59. Gráfico de scores por OPLS-DA obtido através do perfil de compostos das amostras de folhas de *P. cincinnata* após 3 dias de inoculação com CABMV e tampão fosfato.



Os dados da Figura 59 mostram que existem diferenças no perfil de compostos das amostras de *P. cincinnata* inoculadas com o CABMV das amostras que foram apenas inoculadas com tampão fosfato. Isto comprova as observações anteriores que indicaram que a mudança no perfil de compostos se devia a uma resposta da planta à infecção pelo patógeno.

Por fim, os íons que apresentaram maior significância na discriminação entre as amostras dos diferentes tratamentos, através da análise multivariada, foram identificados através da massa exata e comparação do seu espectro de massas com os registros da base de dados de metabolitos METLIN (Tabela 13).

Tabela 13. Compostos identificados que mais discriminam os grupos dos diferentes tempos de inoculação.

M⁺	Fórmula molecular	MSⁿ	Identificação
274,2759	C ₁₆ H ₃₅ NO ₂ ⁺	256, 239, 226	Hexadecasphinganine
275,2787	C ₁₂ H ₉ ClO ₄ ⁺	253, 235, 179	2-Hydroxy-6-oxo-6-(4'-chlorophenyl)-hexa-2,4-dienoate
318,3014	C ₁₈ H ₃₉ NO ₃ ⁺	300, 283, 197	4-hydroxysphinganine
338,3437	C ₂₂ H ₄₄ NO ⁺	213, 228, 250	Docosenamide
387,1819	C ₂₂ H ₂₆ O ₆ ⁺	151, 137, 355	Gingerenone B
415,2134	C ₂₁ H ₁₉ O ₉ ⁻	269, 294, 311	Apigenin-8-C-deoxyhexoside
437,1956	C ₂₆ H ₂₈ O ₆ ⁺	419, 421, 393	Cannflavin A

4.5 DISCUSSÃO

O método HS-SPME/GC-MS desenvolvido se mostrou adequado na determinação dos compostos orgânicos voláteis presentes nas espécies de *Passiflora* spp., possibilitando a identificação de 43 compostos. Das cinco espécies do gênero *Passiflora* estudadas neste trabalho, apenas a espécie *P. edulis* apresenta trabalhos relatados na literatura sobre os metabólitos extraídos de suas folhas. No entanto, a grande maioria dos estudos realizou a identificação de metabólitos não-voláteis, que visam relacionar a presença de flavonoides com propriedades ansiolíticas, anticonvulsionantes e sedativas (XU et al., 2013; DA SILVA et al., 2013; OTIFY et al., 2015).

A técnica HS-SPME/GC-MS, utilizada neste trabalho, já foi utilizada para discriminar entre espécies e variedades do gênero *Passiflora*. Através da determinação do perfil de COVs nos seus frutos, foi possível discriminar entre as espécies *P. edulis*, *Passiflora ligularis* e *Passiflora mollissima*; as variedades *P. edulis* var. *flavicarpa*, *P. edulis* var. *violette* e *P. edulis* var. *panama gold*; e os híbridos obtidos através do

cruzamento entre *P. edulis* var. *flavicarpa* × *P. ligularis* (PORTO-FIGUEIRA et al., 2015).

No entanto, não existem trabalhos relatados na literatura sobre o perfil de COVs das espécies silvestres *P. cincinnata*, *P. maliformis*, *P. gibertii* e *P. setacea*. Isto mostra a necessidade de mais estudos visando a caracterização química destas espécies, que poderão fornecer informações sobre a quimiotaxonomia das mesmas e possíveis alterações no seu metaboloma devido ao ataque de pragas e patógenos.

Em se tratando da relação patógeno-hospedeiro envolvendo o CABMV e as plantas do gênero *Passiflora* estudadas neste trabalho, verificou-se que ocorre uma mudança significativa no perfil de COVs das cinco espécies após a infecção pelo CABMV.

Nas cinco espécies de *Passiflora* spp. foram encontrados metabólitos que são biomarcadores comuns de infecção ao CABMV. Um destes biomarcadores é o 1-octen-3-ol, que já foi relatado na literatura como atrator de diferentes vetores de doenças (MAGALHÃES JUNIOR et al., 2014). Desse modo, o 1-octen-3-ol pode estar envolvido numa estratégia biológica de disseminação do CABMV para outros hospedeiros, o que requer a atração de insetos-vetores, que no caso são diferentes espécies de pulgões tais como *Aphis cracivora* e *Myzus persicae* (MELLETTI et al., 2005). No entanto, esta hipótese ainda não foi testada e relatada na literatura.

Além disso, se observou que a espécie *P. edulis* apresentou um perfil bem distinto de COVs das outras quatro espécies silvestres (*P. cincinnata*, *P. maliformis*, *P. gibertii* e *P. setacea*), após a infecção destas plantas pelo CABMV. Enquanto que as quatro espécies silvestres apresentaram perfil de COVs mais semelhantes entre si. Estas diferenças no perfil de COVs podem ser relacionadas com a susceptibilidade ou resistência ao CABMV.

Avaliações no campo mostraram que a espécie *P. edulis* é altamente susceptível ao vírus, enquanto que as espécies *P. gibertii* e *P. setacea*, além do híbrido de *P. edulis* f. *flavicarpa* e *P. setacea* foram considerados resistentes ao CABMV, com plantas

cujas folhas apresentaram mosaico leve, visível em menos de 50% das folhas (JUNQUEIRA et al., 2005).

Outro estudo avaliou o grau de resistência de 75 acessos de *Passiflora* spp. em condições de campo a diferentes doenças do maracujazeiro, estando o endurecimento dos frutos entre elas. As espécies *P. setacea*, *P. alata* e *P. cincinnata* apresentaram maior resistência, principalmente a *P. setacea* na qual não foram observados sintomas da doença nos frutos, embora tenham sido encontradas folhas com mosaico leve e algumas deformações (OLIVEIRA et al., 2013).

Estudo realizado com 16 espécies de *Passiflora* (inclusive *P. edulis*, *P. cincinnata*, *P. maliformis*, *P. gibertii* e *P. setacea*) mostrou que essas plantas, quando inoculadas mecanicamente com o CABMV, desenvolvem sintomas da doença e o vírus pode ser detectado em seus tecidos por análises sorológicas (MACIEL et al., 2009). Isto mostra que estas espécies silvestres são tolerantes ao vírus, ou seja, este patógeno permanece ativo na planta mas sem prejuízos significativos a suas funções fisiológicas, como, por exemplo, a produção e qualidade dos seus frutos.

Também foi avaliado a evolução da infecção pelo CABMV em plantas da espécie silvestre *P. cincinnata*, que também apresenta um grau de resistência ao vírus. Foi observado que após inoculação do vírus, já se pode verificar claramente, a partir do 3º dia, uma discriminação entre as plantas sadias e inoculadas. E este perfil de compostos vai se modificando significativamente até o 8º dia, persistindo em menor intensidade até o 28º dia.

Este processo de infecção pelo vírus na planta depende de alguns fatores, tais como i) virulência do patógeno (severidade dos sintomas); ii) replicação viral; iii) acúmulo do vírus na planta; iv) movimento célula-a-célula e a longa distância e v) capacidade de driblar o sistema de defesa da planta (CRONIN et al., 1995; JOHANSEN et al., 1996; PRUSS et al., 1997; KASSCHAU; CARRINGTON, 1998).

Após a inoculação o vírus se multiplica nas células onde foram inoculadas e as novas progênes virais se translocam em seguida para as células vizinhas até chegar ao xilema e/ou floema, sendo então rapidamente translocado para outros

órgãos e tecidos da planta. O movimento de uma célula para outra é realizado viaplasmodesma, o que ocorre de forma mais lenta. Desse modo, o estabelecimento de uma infecção sistêmica pelo vírus depende da sua eficiência em se multiplicar e translocar para outros tecidos da planta hospedeira (KASSCHAU; CARRINGTON, 1998).

Em um estudo que avaliou a evolução da infecção por diferentes isolados de CABMV em plantas da espécie *Passiflora edulis Sims f. flavicarpa*, se utilizou a técnica RT-PCR e conseguiu detectar a carga viral em 24h após a inoculação (CERQUEIRA-SILVA et al., 2012). Também ficou demonstrado que a severidade dos sintomas pode variar de um isolado para o outro. Desse modo, o aparecimento de sintomas pode não estar relacionado diretamente com a concentração viral na planta hospedeira.

Um dos problemas destas técnicas moleculares e sorológicas se deve à grande variabilidade das concentrações virais em diferentes folhas da planta, ou até mesmo em diferentes regiões da mesma folha (NOVAES; REZENDE, 2003). A dificuldade em encontrar um padrão nas concentrações do vírus, uma vez que a distribuição dos mesmos na planta depende da sua capacidade de translocação, o que não é homogêneo em todas as partes da planta.

Neste caso, a utilização de metabólitos produzidos pela planta como biomarcadores de infecção pode oferecer possibilidades de métodos alternativos para diagnóstico da presença do CABMV em plantas do gênero *Passiflora*.

Neste trabalho foi possível observar que existem metabólitos que aumentam e outros que diminuem sua concentração após o início da infecção pelo CABMV. Estes dados mostram que através da análise química dos metabólitos da planta é possível diagnosticar precocemente a infecção pelo CABMV em plantas de *P. cincinnata*. Comparado aos métodos por biologia molecular que são utilizados atualmente, este método apresenta um custo de operação muito menor. Isto se constitui numa vantagem de potencial aplicação em culturas comerciais de *Passiflora*.

4.6 CONCLUSÕES

Foi desenvolvido um método por HS-SPME/GC-MS que permitiu a identificação de 43 compostos voláteis em amostras de folhas das espécies *P. edulis*, *P. maliformis*, *P. cincinnata*, *P. gibertii* e *P. setacea*. Este método foi aplicado com sucesso na determinação do perfil de COVs em plantas saudáveis e infectadas pelo *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV).

Através de ferramentas quimiométricas de análise multivariada foi possível identificar compostos que podem ser utilizados como biomarcadores de infecção pelo CABMV. Foram identificados potenciais biomarcadores de infecção comuns às cinco espécies de *Passiflora* spp., assim como biomarcadores específicos para cada espécie estudada.

Utilizando-se a espécie *P. cincinnata* como modelo, foram avaliadas mudanças no perfil de seus compostos nos primeiros dias após infecção da planta pelo CABMV. Isto permitiu a identificação de biomarcadores de infecção ao patógeno, o que abre a possibilidade de desenvolvimento de novos métodos químicos de diagnóstico para monitoramento no campo.

Além disso, este é o primeiro trabalho que relata na literatura o perfil de compostos presentes nas espécies silvestres *P. maliformis*, *P. cincinnata*, *P. gibertii* e *P. setacea*, assim como a mudança deste perfil relacionada à infecção destas espécies pelo CABMV.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante dos temas abordados no presente trabalho, é importante destacar os seguintes aspectos:

A utilização de técnicas quimiométricas de otimização multivariada se mostrou um importante recurso no desenvolvimento de métodos analíticos mais eficientes.

A utilização da técnica de extração SPME no modo “*headspace*” associada à cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas permitiu a identificação e quantificação relativa de diversos metabólitos em diferentes espécies de plantas.

A aplicação de técnicas de análise multivariada permitiu discriminar entre os perfis de compostos dos diferentes grupos estudados e identificar os metabólitos que podem atuar como possíveis biomarcadores na planta.

A utilização de abordagem metabolômica possibilitou identificar diferentes tipos de biomarcadores, tanto de espécie ou prováveis variedades para estudos de quimiotaixonomia, quanto de infecção da planta por um patógeno.

A integração da Química Analítica com as áreas da Biologia e Agronomia em pesquisas de metabolômica tem um potencial enorme de avanço na caracterização dos metabólitos de plantas, identificação de biomarcadores, elucidação de seu papel biológico e desenvolvimento de novas aplicações envolvendo estes compostos.

6. ARTIGOS PUBLICADOS NOS ÚLTIMOS 4 ANOS

1) MESQUITA, PAULO R.R.; NUNES, ESTÉFANE C.; SANTOS, FÁBIO N. DOS; BASTOS, LUCIMÁRIO P.; COSTA, MARIA A.P.C.; DE M. RODRIGUES, FREDERICO; DE ANDRADE, JAILSON B. Discrimination of *Eugenia uniflora* L. Biotypes based on volatile compounds in leaves using HS-SPME/GC-MS and chemometric analysis. **Microchemical Journal**, v. 130, p. 79-87, 2017.

2) SANTOS, FABIO NEVES; SANTOS, JANDYSON MACHADO; MESQUITA, PAULO ROBERTO RIBEIRO; OLIVEIRA, KARLA BRITO; MEDEIROS, FREDERICO; LOPES, WILSON ARAÚJO; EBERLIN, MARCOS N. Immediate Differentiation of Unusual Seed Oils by Easy Ambient Sonic-Spray Ionization Mass Spectrometry and Chemometric Analysis. **Analytical Methods**, v. 8, p. 3681-3690, 2016.

3) MAGALHÃES-JUNIOR, JAIRO TORRES; MESQUITA, PAULO ROBERTO RIBEIRO; OLIVEIRA, WYLLIAN FRANZ DOS SANTOS; OLIVEIRA, FÁBIO SANTOS; FRANKE, CARLOS ROBERTO; RODRIGUES, FREDERICO DE MEDEIROS; DE ANDRADE, JAILSON BITTENCOURT; BARROUIN-MELO, STELLA MARIA. Identification of biomarkers in the hair of dogs: new diagnostic possibilities in the study and control of visceral leishmaniasis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 406, p. 6691-6700, 2014.

4) MESQUITA, PAULO R. R.; ALMEIDA, JORGE S.; TEIXEIRA, LEONARDO S. G.; SILVA, ANTÔNIO F. DA; SILVA, LUCIANA A. A Fast Sonochemical Method to Prepare 1D and 3D Nanostructures of Bismuth Sulfide. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 24, p. 280-284, 2013.

5) PASSINHO-SOARES, HELNA; MEIRA, PALOMA; DAVID, JUCENI; MESQUITA, PAULO; VALE, ADEMIR; DE M. RODRIGUES, FREDERICO; DE P. PEREIRA, PEDRO; DE SANTANA, JOSÉ; DE OLIVEIRA, FABIO; DE ANDRADE, JAILSON; DAVID, JORGE . Volatile Organic Compounds Obtained by in Vitro Callus Cultivation of *Plectranthus ornatus* Codd. (Lamiaceae). **Molecules**, v. 18, p. 10320-10333, 2013.

7. CAPÍTULOS DE LIVROS PUBLICADOS NOS ÚLTIMOS 4 ANOS

DE ANDRADE, JAILSON BITTENCOURT; MAGALHAES JUNIOR, JAIRO TORRES; RIBEIRO MESQUITA, PAULO ROBERTO; SANTOS, FABIO; DE MEDEIROS, FREDERICO; MARIA, STELLA. Perspectives for Diagnosis and Control of Leishmaniasis Based on Volatile Organic Compounds. In: David M. Claborn. (Org.). **Leishmaniasis - Trends in Epidemiology, Diagnosis and Treatment**. 1ed.: InTech, 2014, p. 315.

5º capítulo mais acessado entre os 21 capítulos do livro, com 742 downloads e 5497 visualizações (contabilizados em 11/09/2016).

8. RESUMOS PUBLICADOS EM ANAIS DE CONGRESSO NOS ÚLTIMOS 4 ANOS

1) MESQUITA, P.R.R.; DOS SANTOS, F.N.; EBERLIN, M.N.; RODRIGUES, F.M.; JESUS, O.N.; ABREU, E.F.M.; BARBOSA, C.J. Biomarcadores da infecção de *Passiflora cincinnata* pelo *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV). In: **10ª Jornada Científica da Embrapa Mandioca e Fruticultura**, 2016, Cruz das Almas/BA.

2) MESQUITA, P. R. R.; SANTOS, F. N.; SANTOS, JANDYSON MACHADO; OLIVEIRA, K. B.; RODRIGUES, F. M.; LOPES, W. A.; EBERLIN, MARCOS N. Immediate differentiation of unusual seed oils by easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry. In: **39ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2016, Goiânia. 39ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2016.

3) SANTOS, F. N.; MESQUITA, P. R. R.; MAGALHAES JUNIOR, J. T.; RODRIGUES, F. M.; SOLCA, M. S.; FRAGA, D. B. M.; VERAS, P. S. T.; MELO, S. M. B.; EBERLIN, MARCOS N. MALDI-MS method for detection of canine visceral leishmaniasis through differential expression of metabolites in blood plasma. In: **39ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2016, Goiânia. 39ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2016.

4) FREITAS, J. C. S.; MESQUITA, P. R. R.; SANTOS, F. N.; JACOBINA FILHO, M.; ROSA, M. J. S.; RODRIGUES, F. M. Avaliação do método de produção e perfil químico do alho negro (*Allium sativum* L.). In: **68ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência**, 2016, Porto Seguro. 68ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, 2016.

5) MAGALHAES JUNIOR, J. T.; O. FILHO, A. A.; NOVAIS, H. O.; MESQUITA, P. R. R.; RODRIGUES, F. M.; PINTO, M. C.; BARROUIN-MELO, STELLA MARIA. Atração de flebotomíneos *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) a compostos voláteis exalados do pelo de cães. In: **68ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência**, 2016, Porto Seguro. 68ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, 2016.

6) MESQUITA, P. R. R.; MAGALHAES JUNIOR, J. T.; NOVAIS, H. O.; SANTOS, J. R. J.; NUNES, E. C.; PENA, L. C.; NASCIMENTO, A. S.; BRAVO, I. S. J.; RODRIGUES, F. M.; ANDRADE, JAILSON B. DE. Avaliação da eficácia dos compostos voláteis emitidos pelo extrato de levedura na atração ao inseto-praga da fruticultura, *Anastrepha obliqua*. In: **38ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2015, Águas de Lindóia. 38ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2015.

7) MESQUITA, P. R. R.; MAGALHAES JUNIOR, J. T.; SANTOS, F. N.; NASCIMENTO, A. S.; BARBOSA, C.J.; BRAVO, I. S. J.; RODRIGUES, F. M. Identification of volatile compounds emitted by different mango varieties produced in Bahia with potential attraction to **Anastrepha obliqua**. In: **III Simpósio Internacional de Fruticultura**, 2015, Salvador. III Simpósio Internacional de Fruticultura, 2015.

8) NOVAIS, H. O.; SANTOS, J. R. J.; MAGALHAES JUNIOR, J. T.; NASCIMENTO, A. S.; BARBOSA, C.J.; BRAVO, I. S. J.; RODRIGUES, F. M.; MESQUITA, P. R. R. Bionis YE MF® Yeast extract as food bait for *Anastrepha obliqua* (Diptera: Tephritidae). In: **III Simpósio Internacional de Fruticultura**, 2015, Salvador. III Simpósio Internacional de Fruticultura, 2015.

9) MESQUITA, P. R. R.; NUNES, E. C.; PENA, L. C.; NASCIMENTO, A. S.; RODRIGUES, F. M.; DE ANDRADE, J.B. Análise multivariada do perfil de compostos orgânicos voláteis emitidos por diferentes variedades de manga (*Mangifera indica* L.). In: **37ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2014, Natal. 37ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2014.

10) MESQUITA, P. R. R.; SOUZA, E. S.; NUNES, E. C.; SANTOS, F. N.; BARBOSA, C.J.; RODRIGUES, F. M.; DE ANDRADE, J.B. Desenvolvimento de método por HS-SPME/GC-MS para determinação do perfil de COVs de folhas de maracujá (*Passiflora edulis*). In: **37ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2014, Natal. 37ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2014.

11) MESQUITA, P. R. R.; NUNES, E. C.; SANTOS, F. N.; BASTOS, L. P.; DANTAS, A.C.V.L.; RODRIGUES, F. M.; DE ANDRADE, J.B. Caracterização química por HS-SPME/GC-MS de COVs das folhas de pitanga (*Eugenia uniflora*) com diferentes biotipos de fruto. In: **37ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2014, Natal. 37ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2014.

12) OLIVEIRA, W. F. S.; MESQUITA, P. R. R.; MAGALHAES JUNIOR, J. T.; RODRIGUES, F. M.; DE ANDRADE, J.B. Desenvolvimento de método de extração de COVs exalados do pelo de cães infectados com *Leishmania* sp. por meio da técnica TD-GC-FID. In: **37ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2014, Natal. 37ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2014.

13) SANTOS, G. A.; NOVAIS, H. O.; SANTOS, J. R. J.; MAGALHAES JUNIOR, J. T.; MESQUITA, P. R. R.; BRAVO, I. S. J.; RODRIGUES, F. M. Padronização do uso do túnel de vento para resposta atrativa de *Anastrepha obliqua* (Diptera:Tephritidae). In: **XXV Congresso Brasileiro de Entomologia**, 2014, Goiânia. XXV Congresso Brasileiro de Entomologia, 2014.

14) SANTOS, G. A.; NOVAIS, H. O.; SANTOS, R. C.; MAGALHAES JUNIOR, J. T.; MESQUITA, P. R. R.; RODRIGUES, F. M.; PINTO, M. C.; MELO, S. M. B. Efeito de diferentes variáveis na resposta comportamental de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera:Psychodidae), vetor da leishmaniose visceral, em túnel de vento. In: **XXV**

Congresso Brasileiro de Entomologia, 2014, Goiânia. XXV Congresso Brasileiro de Entomologia, 2014.

15) MAGALHAES JUNIOR, J. T.; OLIVEIRA, W. F. S.; NUNES, E. C.; MESQUITA, P. R. R.; RODRIGUES, F. M.; MELO, S. M. B. Evidências da associação entre apresentação clínica ou subclínica de infecção por *Leishmania* sp. e modificação no perfil de compostos orgânicos voláteis cutâneos em cães. In: **65ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência - SBPC**, 2013, Recife. 65ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência - SBPC, 2013.

16) OLIVEIRA, K. B.; NUNES, E. C.; MESQUITA, P. R. R.; SANTOS, F. N.; BAUTISTA, A.R.P.L.; RODRIGUES, F. M.; LOPES, W. A. Caracterização por GC-MS e quimiometria do óleo de sementes não comestíveis de sete oleaginosas cultivadas no Brasil. In: **17º Encontro Nacional de Química Analítica**, 2013, Belo Horizonte. 17º Encontro Nacional de Química Analítica, 2013.

17) CARVALHO, G.A.; MESQUITA, P. R. R.; Oliveira, F.S.; RODRIGUES, F. M.; LOPES, W. A. Otimização multivariada de método QuEChERS para extração de agrotóxicos em mamão. In: **17º Encontro Nacional de Química Analítica**, 2013, Belo Horizonte. 17º Encontro Nacional de Química Analítica, 2013.

18) MESQUITA, P. R. R.; ALMEIDA, J. S. ; TEIXEIRA, L. S. G. ; SILVA, L.A. . Otimização dos parâmetros de síntese de Bi_2S_3 por rota sonoquímica. In: **35ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2012, Águas de Lindóia. 35ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2012.

19) CARVALHO, G.A. ; GUARIN, R. R. ; ARAÚJO, C.B. ; MESQUITA, P. R. R. ; LOPES, W. A.; RODRIGUES, F. M. Avaliação de diferentes adsorventes na extração de agrotóxicos em mamão utilizando o método QuEChERS. In: **35ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2012, Águas de Lindóia. 35ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2012.

9) PREMIAÇÕES CONQUISTADAS NOS ÚLTIMOS 4 ANOS

1) Trabalho “Biomarcadores de infecção de *Passiflora cincinnata* pelo *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV)” classificado em primeiro lugar na categoria Pós-graduação - Pôster, durante a **10ª Jornada Científica da Embrapa Mandioca e Fruticultura**, realizada de 22 a 26 de agosto de 2016 em Cruz das Almas/BA.

2) Artigo "Immediate differentiation of unusual seed oils by easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry and chemometric analysis" escolhido como capa do periódico **Analytical Methods** (vol. 8, n. 18, 2016).

REFERÊNCIAS

- AHMAD, R.; BAHARUM, S.N.; BUNAWAN, H.; LEE, M.; N.M. NOOR, E.R. ROHANI, N. ILIAS, N.M. ZIN. Volatile profiling of aromatic traditional medicinal plant, *Polygonum minus* in different tissues and its biological activities. **Molecules**, v. 19, p. 19220, 2014.
- ALIFERIS, K. A.; JABAJI, S. FT-ICR/MS and GC-EI/MS metabolomics networking unravels global potatoes' responses to *Rhizoctonia solani* Infection. **Plos One**, v. 7, p. 1, 2012.
- ALLWOOD, J. W.; ELLIS, D. I.; HEALD, J. K.; GOODACRE, R.; MUR L. A. J. Metabolomic approaches reveal that phosphatidic and phosphatidyl glycerol phospholipids are major discriminatory non-polar metabolites in responses by *Brachypodium distachyon* to challenge by *Magnaporthe grisea*. **Plant Journal**, v. 46, p.351, 2006.
- ALMEIDA, C.E.; KARNIKOWSKI, M.G.O.; FOLETO, R.; BALDISSEROTTO, B. Analysis of antidiarrhoeic effect of plants used in popular medicine. **Rev. Saude Publica**, v. 29, p. 428-433, 1995.
- ALMEIDA, D. J.; FARIA, M. V.; SILVA, P. R. Biologia experimental em Pitangueira: uma revisão de cinco décadas de publicações científicas. **Ambiência**, Guarapuava, v. 8, p. 177, 2012.
- ALMSTETTER, M. F.; APPEL, I. J.; GRUBER, M. A.; LOTTAZ, C.; TIMISCHL, B.; SPANG, R.; DETTMER, K.; OEFNER, P. J. Integrative normalization and comparative analysis for metabolic fingerprinting by comprehensive two-dimensional gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 81, p. 5731, 2009.
- ALMSTETTER, M. F.; OEFNER, P. J.; DETTMER, K. Comprehensive two-dimensional gas chromatography in metabolomics. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 402, p. 1993, 2012.
- ÁLVAREZ-SÁNCHEZ, B.; PRIEGO-CAPOTE, F.; LUQUE DE CASTRO, M.D. Metabolomics analysis I. Selection of biological samples and practical aspects preceding sample preparation. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, p. 111, 2010.
- ARAI, J.; AMAGAYA, S.; KOMATSU, Y.; OKUDA, M.; MAYASHI, T.; KASAI, M.; ARISAWA, M.; MOMOSE, Y. Improving effects of the extracts from *Eugenia uniflora* on hyperglycemia and hypertriglyceridemia in mice. **J. Ethnopharmacol.**, v. 68, p. 307, 1999.
- ARAUJO, P.W.; BRERETON, R.G. Experimental design I. Screening. **Trends Anal. Chem.**, v. 15, p. 26, 1996.
- ARTHUR, C.L.; PAWLISZYN, J. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. **Analytical Chemistry**, v. 62, p. 2145, 1990.
- AURICCHIO, M.T.; BACCHI, E.M. Folhas de *Eugenia uniflora* L. (pitanga): propriedades farmacobotânicas, químicas e farmacológicas. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 62, p. 55, 2003.

- AZMIR, J.; ZAIDUL, I.S.M.; RAHMAN, M.M.; SHARIF, K.M.; MOHAMED, A.; SAHENA, F.; JAHURUL, M.H.A.; GHAFOR, K.; NORULAINI, N.A.N.; OMAR, A.K.M. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. **Journal of Food Engineering**, v. 117, p. 426, 2013.
- BAGETTI, M.; FACCO, E.M.P.; PICCOLO, J.; HIRSCH, G.E.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.; KOBORI, C.N.; VIZZOTTO, M.; EMANUELLI, T. Physicochemical characterization and antioxidant capacity of pitanga fruits (*Eugenia uniflora* L.). **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 31, p. 147, 2011.
- BAI, Z.; PILOTE, A.; SARKER, P.K.; VANDENBERG, G.; PAWLISZYN, J. In Vivo solid-phase microextraction with in vitro calibration: determination of off-flavor components in live fish. **Analytical Chemistry**, v. 85, p. 2328, 2013.
- BALDWIN, E.; PLOTTO, A.; MANTHEY, J.; MCCOLLUM, G.; BAI, JINHE; IREY, M.; CAMERON, R.; LUZIO, G. Effect of *Liberibacter* infection (Huanglongbing disease) of citrus on orange fruit physiology and fruit/fruit juice quality: chemical and physical analyses. **J. Agric. Food Chem.**, v. 58, p. 1247, 2010.
- BECKERA, S.; KORTZA, L.; HELMSCHRODTA, C.; THIERYA, J.; CEGLAREK, U. LC-MS-based metabolomics in the clinical laboratory. **Journal of Chromatography B**, v. 883, p. 68, 2012.
- BEETS, C. A.; HUANG, J. C.; MADALA, N. E.; DUBERY I. Activation of camalexin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* in response to perception of bacterial lipopolysaccharides: agene-to-metabolite study. **Planta**, v. 236, p. 261, 2012.
- BERGER, P.H. 2001. Potyviridae. **Encyclopedia of life sciences**, doi: 10.1038/npg.els.0000755.
- BERNACCI, L.C.; MELETTI, L.M.M.; SOARES-SCOTT, M.D. Maracujá-doce: o autor, a obra e a data da publicação de *Passiflora alata* (Passifloraceae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v, 25, p. 355, 2003.
- BEZERRA, J. E. F.; SILVA JÚNIOR, J. F.; LEDERMAN, I. E. **Pitanga (*Eugenia uniflora* L.)**. Jaboticabal: FUNEP, 2000. 30 p.
- BEZERRA, J. E. F.; SILVA JUNIOR, J. F.; LEDERMAN, I. E. **Pitanga (*Eugenia uniflora* L.)**. Jaboticabal: FUNEP, 2002a. 30 p.
- BEZERRA, J. E. F.; LEDERMAN, I. E.; SILVA JUNIOR, J. F. Pitanga Tropicana (*Eugenia uniflora* L.). In: Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária. **Cultivares recomendadas pelo IPA**. Recife, 2002b. p.73 (IPA. Documentos, 27).
- BEZERRA, M.A.; SANTELLI, R.E.; OLIVEIRA, E.P.; VILLARA, L.S.; ESCALEIRA, L.A. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**, v. 76, p. 965, 2008.
- BICCHI, C.; DRIGO, S.; RUBIOLO, P. Influence of fibre coating in headspace solid-phase microextraction-gas chromatographic analysis of aromatic and medicinal plants. **J. Chromatogr. A**, v. 892, p. 469, 2000.
- BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Can. J. Biochem. Physiol.**, v. 37, p. 911, 1959.

BOLLINA, V.; KUSHALAPPA, A. C.; CHOO, T. M.; DION, Y.; RIOUX S. Identification of metabolites related to mechanisms of resistance in barley against *Fusarium graminearum*, based on mass spectrometry. **Plant Molecular Biology**, v. 77, p. 355, 2011.

BOLTEN, C.; WITTMANN, C. Appropriate sampling for intracellular amino acid analysis in five phylogenetically different yeasts. **Biotechnol. Lett.**, v. 30, p. 1993, 2008.

BOTANGA, C. J.; BETHKE, G.; GALLIE, D. R.; FIEHN, O.; GLAZEBROOK J. Metabolite profiling of arabidopsis inoculated with alternaria brassicicola reveals that ascorbate reduces diseases everity. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v. 25, p. 1628, 2012.

BRATTY, M.; HOBANI, Y.; DOW, J.; WATSON, D. Metabolomic profiling of the effects of allopurinol on *Drosophila melanogaster*. **Metabolomics**, v. 7, p. 542, 2011.

BRAZ, A.S.K.; SANTANA, E.N.; ZAMBOLIM, E.M.; COSTA, A.F.; OTONI, W.C.; ZERBINI, F.M. Molecular characterization of two isolates of South African *Passiflora* virus infecting Passion fruit in Brazil. **Virus Reviews and Research**, v. 3, p. 146, 1998.

BRERETON, R.G. **Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant**, Wiley, Chichester, 2003.

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

BROADHURST, D.; KELL, D. Statistical strategies for avoiding false discoveries in metabolomics and related experiments. **Metabolomics**, v. 2, p. 171, 2006.

BYLESJO, M.; RANTALAINEN, M.; NICHOLSON, J. K.; HOLMES, E.; TRYGG, J.; K-OPLS package: Kernel-based or thogonal projections to latent structures for prediction and interpretation in feature space. **BMC Bioinformatics**, v. 9, p. 1, 2008.

CAMANES, G.; SCALSCHI, L.; VICEDO, B.; GONZÁLEZ-BOSCH, C.; GÁRCIA-AGUSTÍN, P. An untargeted global metabolomic analysis reveals the biochemical changes underlying basal resistance and priming in *Solanum lycopersicum*, and identifies 1-methyltryptophan as a metabolite involved in plant responses to *Botrytis cinerea* and *Pseudomonas syringae*. **The Plant Journal**, v. 84, p. 125, 2015.

CANELAS, A. B.; RAS, C.; TEN PIERICK, A.; VAN DAM, J. C.; HEIJNEN, J. J.; VAN GULIK, W.M. Leakage-free rapid quenching technique for yeast metabolomics. **Metabolomics**, v. 4, p. 226, 2008.

CARRARO, S.; REZZI, S.; RENIERO, F.; HÉBERGER, K.; GIORDANO, G.; ZANCONATO, S.; GUILLOU, C.; BARALDI, E. Metabolomics applied to exhaled breath condensate in childhood asthma. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 175, p. 986, 2007.

CARRERA, C.; RUIZ-RODRÍGUEZ, A.; PALMA, M.; BARROSO, C. G. Ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from grapes. **Anal. Chim. Acta**, v.732, p. 100, 2012.

- CARROLA, J.; ROCHA, C. M.; BARROS, A. S.; GIL, A. M.; GOODFELLOW, B. J.; CARREIRA, I. M.; BERNARDO, J.; GOMES, A.; SOUSA, V.; CARVALHO, L.; DUARTE, I. F. Metabolic signatures of lung cancer in biofluids: NMR-based metabonomics of urine. **Journal of Proteome Research**, v. 10, p. 221, 2011.
- CASTRILLO, J. I.; HAYES, A.; MOHAMMED, S.; GASKELL, S. J.; OLIVER, S. G. An opti-mized protocol for metabolome analysis in yeast using direct infusion electrospray mass spectrometry. **Phytochemistry**, v. 62, p. 929, 2003.
- CAVICHIOLO, J.C.; CORREA, L.S.; BOLIANI, A.C.; SANTOS, P.C. Desenvolvimento e produtividade do maracujazeiro-amarelo enxertado em três porta-enxertos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, p. 567, 2011.
- CELLI, G. B.; PEREIRA-NETTO, A. B.; BETA, T. Comparative analysis of total phenolic content, antioxidant activity, and flavonoids profile of fruits from two varieties of Brazilian cherry (*Eugenia uniflora* L.) throughout the fruit developmental stages. **Food Res. Int.**, v. 44, p. 2442, 2011.
- CERQUEIRA-SILVA, C. B. M. ; MELO, J. R. F. ; CORRÊA, R.X. ; OLIVEIRA, A. C. . Selection of pathometric variables to assess resistance and infectivity in the passion fruit woodiness pathosystem. **European Journal of Plant Pathology**, v. 134, p. 489, 2012.
- CERQUIER-SÁNCHEZ, E.; RODRÍGUEZ, C.; RAVELO, A. G.; ZÁRATE, R. Dichloromethane as a solvent for lipid extraction and assessment of lipid classes and fatty acids from samples of different natures. **J. Agric. Food Chem.**, v. 56, p. 4297, 2008.
- CERVI, A. C. O gênero *Passiflora* (Passifloraceae) no Brasil, espécies descritas após o ano de 1950. **Adumbrationes ad Summæ Editionem**, v.16, p. 1, 2006.
- CEVALLOS-CEVALLOS, J. M.; ETXEBERRIA, E.; ROUSEFF, R.; REYES-DE-CORCUERA J. Metabolite profiling of healthy and huanglongbing-infected citrus leaves. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, v. 121, p. 85, 2008.
- CEVALLOS-CEVALLOS, J. M.; ROUSEFF, R.; REYES-DE-CORCUERA, J. I. Untargeted metabolite analysis of healthy and Huanglongbing-infected orange leaves by CE-DAD. **Electrophoresis**, v. 30, p. 1, 2009.
- CEVALLOS-CEVALLOS, J. M.; GARCÍA-TORRES, R.; ETXEBERRIA, E.; REYES-DE-CORCUERA, J. I. GC-MS analysis of headspace and liquid extracts for metabolomic differentiation of citrus huanglongbing and zinc deficiency in leaves of 'valencia' sweet orange from commercial groves. **Phytochem. Anal.**, v. 22, p. 236, 2011.
- CEVALLOS-CEVALLOS, J. M.; FUTCH, D. B.; SHILTS, T.; FOLIMONOVA, S. Y.; REYES DE CORCUERA, J. I. GC-MS metabolomic differentiation of selected citrus varieties with different sensitivity to citrus huanglongbing. **Plant Physiology Biochemistry**, v. 53, p. 69, 2012.
- CHAGAS, C.M.; KITAJIMA, E.W.; LIN, M.T.; GAMA, M.I.C.S.; YAMASHIRO, T. Grave moléstia em maracujá amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) no Estado da

Bahia, causado por um isolado do vírus do “woodiness” do maracujá. **Fitopatologia Brasileira**, v. 6, p. 259, 1981.

CHANDA, B.; XIA, Y.; MANDAL, M. K.; YU, K. S.; SEKINE, K. T.; GAO, Q. M.; SELOTE, D.; HU, Y.; STROMBERG, A.; NAVARRE, D.; KACHROO, A.; KACHROO, P. Glycerol-3-phosphate is a critical mobile inducer of systemic immunity in plants. **Nature Genetics**, v. 43, p. 421, 2011.

CHOI, Y. H.; TAPIAS, E. C.; KIM, H. K.; LEFEBER, A. W. M.; ERKELENS, C.; VERHOEVEN, J. T. J.; BRZIN, J.; ZEL, J.; VERPOORTE, R. Metabolic discrimination of *Catharanthus roseus* leaves infected by phytoplasma using ¹H-NMR spectroscopy and multivariate data analysis. **Plant Physiol**, v. 135, p. 2398, 2004.

CHUA, S. C.; TAN, C. P.; MIRHOSSEINI, H.; LAI, O. M.; LONG, K.; BAHARIN, B. S. Optimization of ultrasound extraction condition of phospholipids from palm-pressed fiber. **J. Food Eng.**, v. 92, p. 403, 2009.

CORDEIRO, P. J. M.; VILEGAS, J. H. Y.; LANÇAS, F. M. HRGC-MS analysis of terpenoids from *Maytenus ilicifolia* and *Maytenus aquifolium* ('Espinheira santa'). **J Braz Chem Soc**, v. 10, p. 523, 1999.

COSTA, A.G.V.; GARCIA-DIAZ, D.F.; JIMENEZ, P.; SILVA, P.I. Bioactive compounds and health benefits of exotic tropical red–black berries. **J. Funct. Foods**, v. 5, p. 539, 2013.

COSTA, D.P.; SANTOS, S.C.; SERAPHIN, J.C.; FERRI, P.H. Seasonal variability of essential oils of *Eugenia uniflora* leaves. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 20, p. 1287, 2009.

COSTA, D.P.; ALVES FILHO, E.G.; SILVA, L.M.A.; SANTOS, S.C.; PASSOS, X.S.; SILVA, M.R.R.; SERAPHINC, J.C.; FERRI, P.H. Influence of fruit biotypes on the chemical composition and antifungal activity of the essential oils of *Eugenia uniflora* leaves. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 21, p. 851, 2010.

CRONIN, S. et al. Long-distance movement factor: a transport function of the potyvirus helper component proteinase. **Plant Cell**, v. 7, p. 549, 1995.

DA PORTO, C.; PORRETTO, E.; DECORTI, D. Comparison of ultrasound-assisted extraction with conventional extraction methods of oil and polyphenols from grape (*Vitis vinifera* L.) seeds. **Ultrason. Sonochem.**, v. 20, p. 1076, 2013.

DANESHVAND, B.; ARA, K. M.; RAOFIE, F. Comparison of supercritical fluid extraction and ultrasound-assisted extraction of fatty acids from quince (*Cydonia oblonga* Miller) seed using response surface methodology and central composite design. **J. Chromatogr. A**, v. 1252, p. 1, 2012.

DA SILVA, J. K.; CAZARIN, C. B. B.; COLOMEU, T. C.; BATISTA, A. G.; MELETTI, L. M. M.; PASCHOAL, J. A. R.; BOGUSZ JÚNIOR, S.; FURLAN, M. F.; REYES, F. G. R.; AUGUSTO, F.; MARÓSTICA JÚNIOR, M. R.; ZOLLNER, R. L. Antioxidant activity of aqueous extract of passion fruit (*Passiflora edulis*) leaves: In vitro and in vivo study. **Food Research International**, v. 53, p. 882, 2013.

DE LAURENTIS, G.; PARIS, D.; MELCK, D.; MANISCALCO, M.; MARSICO, S.; CORSO, G.; MOTTA, A.; SOFIA, M. Metabonomic analysis of exhaled breath

condensate in adults by nuclear magnetic resonance spectroscopy. **European Respiratory Journal**, v. 32, p. 1175, 2008.

DIETER, M. D.; REILY, M. D.; SHIPKOVA, P.A. Advances in mass spectrometry applied to pharmaceutical metabolomics. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, v. 399, p. 2645, 2011.

DI PIERO, R.M.; REZENDE, J.A.M.; YUKI, V.A.; PASCHOLATI, S. F.; DELFINO, M.A. Transmissão do *Passion fruit woodiness virus* por *Aphis gossypii* (Glover) (Hemiptera: Aphididae) e colonização de maracujazeiro pelo vetor. **Neotropical Entomology**, v. 35, p. 139, 2006.

DONADIO, L. C.; MÔRO, F. V.; SERVIDONE, A. A. **Frutas Brasileiras**. Jaboticabal: FUNEP, 2002. 288p.

DU, F.-Y.; XIAO, X.-H.; LUO, X.-J.; LI, G.-K. Application of ionic liquids in the microwave-assisted extraction of polyphenolic compounds from medicinal plants. **Talanta**, v. 78, p. 1177, 2009.

EBBELS, T. M. D.; BUXTON, B. F.; JONES, D. T. SpringScape: Visualisation of microarray and contextual bioinformatic data using spring embedding an 'information landscape'. **Bioinformatics**, v. 22, p. 99, 2006.

EFRON, B. Large-Scale Simultaneous Hypothesis Testing. **Journal of the American Statistical Association**, v. 99, p. 96, 2004.

EL-SAWI, S.A.; MOHAMED, M.A. Cumin herb as a new source of essential oils and its response to foliar spray with some micro-elements. **Food Chem.**, v. 77, p. 75, 2002.

ERBAN, A.; SHAUER, N.; FERNIE, A. L.; KOPKA, J. In: WECKWERTH, W. (Editor), **Metabolomics Methods and Protocols**, Humana Press Inc., Totowa, NJ, USA, p. 19, 2007.

ENOT, D. P.; LIN, W.; BECKMANN, M.; PARKER, D.; OVERY, D. P.; DRAPER, J. Preprocessing, classification modeling and feature selection using flow injection electrospray mass spectrometry metabolite fingerprint data. **Nature Protocols**, v. 3, p. 446, 2008.

ENOT, D. P.; HAAS, B.; WEINBERGER, K. M. Bioinformatics for mass spectrometry-based metabolomics. **Methods in Molecular Biology**, v. 719, p. 351, 2011.

EWALD, J. C.; HEUX, S. P.; ZAMBONI, N. High-throughput quantitative metabolomics: workflow for cultivation, quenching, and analysis of yeast in a multi well format. **Anal Chem**, v. 81, p. 3623, 2009.

FAQUETI, L. G.; PETRY, C. M.; MEYRE-SILVA, C. "Euglobal-like compounds from the genus *Eugenia*. **Natural Product Research**, Stuttgart, v. 27, p. 28, 2013.

FAIJES, M.; MARS, A. E.; SMID, E. J. Comparison of quenching and extraction methodologies for metabolome analysis of *Lactobacillus plantarum*. **Microb. Cell Fact.**, v. 6, p. 27, 2007.

- FERREIRA, F.R. Recursos genéticos de *Passiflora*. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados, p. 41, 2005.
- FERREIRA, M. M. C. **Quimiometria – Conceitos, Métodos e Aplicações**. Campinas, SP: Editora da Unicamp, 2015.
- FERREIRA, S.L.C. **Introdução às técnicas de planejamento de experimentos**, Salvador: Vento Leste, 2015.
- FERRO, E.; SCHININI, A.; MALDONADO, M.; ROSNER, J.; HIRSCHMANN, G.S. *Eugenia uniflora* leaf extract and lipid metabolism in *Cebus apella* monkeys. **J. Ethnopharmacol.**, v. 24, p. 321, 1998.
- FIEHN, O. Metabolomics – the link between genotypes and phenotypes. **Plant Molecular Biology**, v. 48, p. 155, 2002.
- FILHO, R. B. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, v. 33, p. 229, 2010.
- FISCHER, I.H.; KIMATI, H.; REZENDE, J.A.M. Doenças do aracujazeiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN-FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Eds.) **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4ª Ed, v. 2, São Paulo: Ceres, p. 467, 2005.
- FONVILLE, J. M.; BYLESJO, M.; COEN, M.; NICHOLSON, J. K.; HOLMES, E.; LINDON, J. C.; et al. Non-linear modeling of ¹H NMR metabolomic data using kernel-based or orthogonal projections to latent structures optimized by simulated annealing. **Analyt. Chim. Acta.**, v. 705, p. 72, 2011.
- FORCISI, S.; MORITZA, F.; KANAWATIA, B.; TZIOTIS, D.; LEHMANN, R.; SCHMITT-KOPPLINA, P. Liquid chromatography–mass spectrometry in metabolomics research: Mass analyzers in ultra high pressure liquid chromatography coupling. **Journal of Chromatography A**, v. 1292, p. 51, 2013.
- FRACCAROLI, M.; NICOLETTI, S.; MALTESE, F.; CHOI, Y. H.; GUZZO, F.; LEVI, M.; VERPOORTE, R. Pre-analytical method for metabolic profiling of plant cell cultures of *Passiflora garckeii*. **Biotechnol Lett**, v. 30, p. 2031, 2008.
- FRÓES, T.L.; TUMELERO, A.I.; ABREU, E.F.M.; BARBOSA, C.J. 2014. Dinâmica da interação *Cowpea aphid-borne mosaic virus* vs *Passiflora edulis* (maracujá), *Vigna unguiculata* (Feijão-caupi) e *Canavalia ensiformis* (Feijão-de-Porco). **Anais da 8ª Jornada Científica da Embrapa Mandioca e Fruticultura**, Cruz das Almas, Bahia.
- FUKUSHIMA, A.; KUSANO, M. Recent progress in the development of metabolome databases for plant systems biology. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, p. 1, 2013.
- GALHIANE, M.S.; RISSATO, S.R.; CHIERICE, G.O.; ALMEIDA, M.V.; SILVA, L.C. Influence of different extraction methods on the yield and linalool content of the extracts of *Eugenia uniflora* L. **Talanta**, v. 70, p. 286, 2006.
- GALLUCCI, S.; PLACERES NETO, A.; PORTO, C.; BARBIZAN, D.; COSTA, I.; MARQUES, K.; BENEVIDES, P.; FIGUEIREDO, R. Essential oil of *Eugenia uniflora* L.: an industrial perfumery approach. **J. Essent. Oil Res.**, v. 22, p. 176, 2010.

GAMIR, J.; PASTOR, V.; CERREZO, M.; FLORS V. Identification of indole-3-carboxylic acid as mediator of priming against *Plectosphaerella cucumerina*. **Plant Physiology Biochemistry**, v. 61, p. 169, 2012.

GODZIEN, J.; CIBOROWSKI, M.; WHILEY, L.; LEGIDO-QUIGLEY, C.; RUPEREZ, F. J.; BARBAS. In-vial dual extraction liquid chromatography coupled to mass spectrometry applied to streptozotocin-treated diabetic rats. Tips and pitfalls of the method, **J. Chromatogr. A**, v. 1304, p. 52, 2013.

GOMEZ-CASATI, D. F.; ZANOR, M. I.; BUSI M. V. Metabolomics in plants and humans: applications in the prevention and diagnosis of diseases. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1, 2013.

GOODACRE, R. Metabolomics – the way forward. **Metabolomics**, v. 1, p. 1, 2005.

GOODACRE, R.; BROADHURST, D.; SMILDE, A.K. et al. Proposed minimum reporting standards for data analysis in metabolomics. **Metabolomics**, v. 3, p. 231, 2007.

GOULA, A. M. Ultrasound-assisted extraction of pomegranate seed oil – Kinetic modeling. **J. Food Eng.**, v. 117, p. 492, 2013.

GRATA, E.; BOCCARDA, J.; GUILLARMEA, D.; GLAUSER, G.; CARRUPT, P.-A., FARMER, E. E.; WOLFENDER, J.-L. RUDAZ, S. UPLC–TOF-MS for plant metabolomics: A sequential approach for wound marker analysis in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Chromatography B**, v. 871, p. 261, 2008.

GRATACOS-CUBARSI, M.; RIBAS-AGUSTI, A.; GARCIA-REGUEIRO, J. A.; CASTELLARI, M. Simultaneous evaluation of intact glucosinolates and phenolic compounds by UPLC-DAD-MS/MS in *Brassica oleracea* L. var. *botrytis*. **Food Chem**, v. 121, p. 257, 2009.

GRECO, S.M.L. **Caracterização físico-químico e molecular de genótipos de maracujazeiro azedo cultivados no Distrito Federal**. Tese de Doutorado em Agronomia. Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal. 149p, 2014.

GRIESSER, M.; WEINGART, G.; SCHOEDL-HUMMEL, K.; et al. Severe drought stress is affecting selected primary metabolites, polyphenols, and volatile metabolites in grapevine leaves (*Vitis vinifera* cv. Pinot noir). **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 88, p. 17, 2015.

HAJJAJ, H.; BLANC, P. J.; GOMA, G.; FRANÇOIS, J. Sampling techniques and comparative extraction procedures for quantitative determination of intra- and extracellular metabolites in filamentous fungi. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 168, p. 195, 1998.

HALOUSKA, S.; ZHANG, BO; GAUPP, R.; LEI, S.; SNELL, E.; FENTON, R. J.; BARLETTA, R. G.; SOMERVILLE, G. A.; POWERS, R. Revisiting protocols for the NMR analysis of bacterial metabolomes. **Journal of Integrated Omics**, v. 3, p. 120, 2013.

HAMAMAH, S.; SEGUIN, F.; BARTHELEMY, C.; AKOKA, S.; LE PAPE, A.; LANSAC, J.; ROYERE D. ¹H nuclear magnetic resonance studies of seminal plasma

from fertile and infertile men. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 97, p. 51, 1993.

HANTAO, L. W.; ALEMEA, H. G.; PASSADOR, M. M.; FURTADO, E. L.; RIBEIRO, F. A. L.; POPPI, R. J.; AUGUSTO, F. Determination of disease biomarkers in *Eucalyptus* by comprehensive two-dimensional gas chromatography and multivariate data analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1279, p. 86, 2013.

HENRIQUES, A.T.; SOBRAL, M.E.; CAUDURO, A.D.; SCHAPOVAL, E.E.S.; BASSINI, V.L.; LAMATY, G.; MENUT, C.; BESSIÈRE, J.M. Aromatic plants from Brazil. II. The chemical composition of some *Eugenia* essential oils. **J. Essent. Oil Res.**, v. 5, p. 501, 1993.

HILLER, J.; FRANCO-LARA, E.; PAPAIOANNOU, V.; WEUSTER-BOTZ, D. Fast sampling and quenching procedures for microbial metabolic profiling. **Biotechnol. Lett.**, v. 29, p. 1161, 2007.

HOU, C. C.; CHEN, C. H.; YANG, N.S.; CHEN, Y. P.; LO, C. P. WANG, S. Y. Comparative metabolomics approach coupled with cell- and gene-based assays for species classification and anti-inflammatory bioactivity validation of *Echinacea* plants. **J. Nutr. Biochem.**, v. 21, p. 1045, 2010.

HUIE, C. W. A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 373, p. 23, 2002.

HURTADO-FERNÁNDEZ, E.; PACCHIAROTTA, T.; MAYBORODA, O. A.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A.; CARRASCO-PANCORBO, A. Metabolomic analysis of avocado fruits by GC-APCI-TOF MS: effects of ripening degrees and fruit varieties. **Anal Bioanal Chem**, v. 407, p. 547, 2015.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção agrícola municipal**. 2014. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/pesquisas/pam/>. Acesso em 06 de agosto de 2016.

IDBORG-BJORKMAN, H.; EDLUND, P. O.; KVALHEIM, O. M.; SCHUPPE-KOISTINEN, I.; JACOBSSON, S. P. Screening of biomarkers in rat urine using LC/electrospray ionization-MS and two-way data analysis. **Anal Chem**, v. 75, p. 4784, 2003.

IPA - Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária (Recife, PE). **Pitanga cultivar tropicana**. Recife, 2000. 4p.

IVERSON, S. J.; LANG, S. L. C.; COOPER, M. H. Comparison of the Bligh and Dyer and Folch methods for total lipid determination in a broad range of marine tissue. **Lipids**, v. 36, p. 1283, 2001.

IZUMI, Y.; OKAZAWA, A.; BAMBA, T.; KOBAYASHI, A.; FUKUSAKI, E. Development of a method for comprehensive and quantitative analysis of plant hormones by highly sensitive nano-flow liquid chromatography-electrospray ionization-ion trap mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 26, p. 215, 2009.

JAHANGIR, M.; ABDEL-FARID, I. B.; CHOI, Y. H.; VERPOORTE, R. Metal ion-inducing metabolite accumulation in *Brassica rapa*. **J Plant Physiol**, v.165, p. 1429, 2008.

JAPOÁN-LUJÁN, R.; RUIZ-JIMÉNEZ, J.; LUQUE DE CASTRO, M. D. Discrimination and classification of olive tree varieties and cultivation Zones by biophenol contents. **J. Agric. Food Chem.**, v. 54, p. 9706, 2006.

JING, L.; LEI, Z.; ZHANG, G.; PILON, A. C.; HUHMANN, D. V.; XIE, R.; XI, W.; ZHOU, Z.; SUMMER, L. W. Metabolite profiles of essential oils in citrus peels and their taxonomic implications. **Metabolomics**, v. 11, p. 952, 2015.

JOHANSEN, I. E. et al. Multiple viral determinants affect seed transmission of pea seedborne mosaic virus in *Pisum sativum*. **Journal of General Virology**, v. 77, p. 3149, 1996.

JONSSON, P.; GULLBERG, J.; NORDSTROM, A.; KUSANO, M.; KOWALCZYK, M.; SJOSTROM, M.; MORITZ, T. A strategy for identifying differences in large series of metabolomic samples analyzed by GC/MS. **Anal Chem.**, v. 76, p. 1738, 2004.

JUNG, H.W.; TSCHAPLINSKI, T. J.; WANG, L.; GLAZEBROOK, J.; GREENBERG J. T. Priming in systemic plant immunity. **Science**, v. 324, p. 89, 2009.

JUNG, Y.; AHN, Y. G.; KIM, H. K.; MOON, B. C.; LEE, A. Y.; RYU, D. H.; HWANG, G.-S. Characterization of *dandelion* species using ¹H NMR- and GC-MS-based metabolite profiling. **Analyst**, v. 136, p. 4222, 2011.

JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F.; FALEIRO, F.G.; PEIXOTO, J.R.; BERNACCI, L.C. Potencial de espécies silvestres de maracujazeiro como fonte de resistência a doenças. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Embrapa Cerrados, pp. 81, 2005.

JUNQUEIRA, N.T.V.; FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, K.P.; JUNQUEIRA, L.P.; PEIXOTO, J.R. Avanços no manejo integrado de doenças na cultura do maracujazeiro no Brasil. In: **Anais do Congresso Latinoamericano de Passiflora**, Neiva, Colômbia: Cepass Huila, p. 71, 2010.

KASSCHAU, K. D.; CARRINGTON, J. C. A counter defensive strategy of plant viruses: suppression of posttranscriptional gene silencing. **Cell**, v. 95, p. 461, 1998.

KHAKIMOV, B.; BAK, S.; ENGELSEN, S. B. High-throughput cereal metabolomics: Current analytical technologies, challenges and perspectives. **Journal of Cereal Science**, v. 59, p. 393, 2014.

KHAN, M. A.; ABBASI, B. H.; ALI, H.; ALI, M.; ADIL, M.; HUSSAIN, I. Temporal variations in metabolite profiles at different growth phases during somatic embryogenesis of *Silybum marianum* L. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, v. 120, p. 127, 2015.

KIM, K.; TAYLOR, S. L.; GANTI, S.; GUO, L.; OSIER, M. V.; WEISS, R. H. Urine metabolomic analysis identifies potential biomarkers and pathogenic pathways in kidney cancer. **Omics**, v. 15, p. 293, 2011a.

KIM, H. K.; CHOI, Y. H.; VERPOORTE, R. NMR-based plant metabolomics: where do we stand, where do we go? **Trends in Biotechnology**, v. 29, n. 6, p. 267, 2011b.

KIM, S. W.; KIM, H. J.; KIM, J. H.; KWON, Y. K.; AHN, M. S.; JANG, Y. P.; LIU, J. R. A rapid, simple method for the genetic discrimination of intact *Arabidopsis thaliana* mutant seeds using metabolic profiling by direct analysis in real-time mass spectrometry. **Plant Methods**, v. 7, p. 14, 2011c.

KIM, H. K.; VERPOORTE, R. Sample preparation for plant metabolomics. **Phytochem. Anal.**, v. 21, p. 4, 2010.

KIM, H. K.; CHOI, Y. H.; VERPOORTE, R. NMR-based metabolomic analysis of plants. **Nat Protoc**, v.5, p. 536, 2009.

KISHI-KABOSHI, M.; OKADA, K.; KURIMOTO, L.; MURAKAMI, S.; UMEZAWA, T.; SHIBUYA, N.; YAMANE, H.; MIYAO, A.; TAKATSUJI, H.; TAKAHASHI, A.; HIROCHIKA, H. A rice fungal MAMP-responsive MAPK cascade regulates metabolic flow to antimicrobial metabolite synthesis. **Plant Journal**, v. 63, p. 599, 2010.

KITAJIMA, E. W.; ALCÂNTARA, B. K.; MADUREIRA, P. M.; ALFENAS-ZERBINI, P.; REZENDE, J. A.; ZERBINI, F. M. A mosaic of beach bean (*Canavalia rosea*) caused by an isolate of *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) in Brazil. **Archives of Virology**, v. 153, p. 743, 2008.

KOEK, M. M.; MUILWIJK, B.; VAN DER WERF, M. J.; HANKEMEIER, T. Microbial metabolomics with gas chromatography/mass spectrometry. **Anal Chem**, v. 78, p. 1272, 2006.

KOEK, M. M.; MUILWIJK, B.; VAN STEE, L. L.; HANKEMEIER, T. Higher mass load ability in comprehensive two-dimensional gas chromatography-mass spectrometry for improved analytical performance in metabolomics analysis. **Journal Chromatography A**, v. 1186, p. 420, 2008.

KONING, W. D.; DAM, K. V. A method for the determination of changes of glycolytic metabolites in yeast on a subsecond time scale using extraction at neutral pH. **Anal Biochem**, v. 204, p. 118, 1992.

KOVAC, J. R.; PASTUSZAK, A. W.; LAMB, D. J. The use of genomics, proteomics, and metabolomics in identifying biomarkers of male infertility. **Fertility and Sterility**, v. 99, p. 998, 2013.

KUEHNBAUM, N. L.; BRITZ-MCKIBBIN, P. New advances in separation science for metabolomics: resolving chemical diversity in a post-genomic era. **Chemical Reviews**, v. 113, p. 2437, 2013.

LAGO, J.H.; SOUZA, E.D.; MARIANE, B.; PASCON, R.; VALLIM, M.A.; MARTINS, R.C.C.; BAROLI, A.A.; CARVALHO, B.A.; SOARES, M.G.; DOS SANTOS, R.T.; SARTORELLI, P. Chemical and biological evaluation of essential oils from two species of Myrtaceae — *Eugenia uniflora* L. and *Plinia trunciflora* (O. Berg) Kausel. **Molecules**, v. 16, p. 9827, 2011.

LANGENHEIM, J.H. Higher plant terpenoids: A phytocentric overview of their ecological roles. **J. Chem. Ecol.**, v. 20, p. 1223, 1994.

LAURIDSEN, M.; HANSEN, S.H.; JAROSZEWSKI, J.W.; CORNETT, C. **Anal. Chem.**, v. 79, p. 1181, 2007.

LAY, J.O.J.; BORGMANN, S.; LIYANAGE, R. et al. Problems with the “omics”. **Trends Anal. Chem.**, v. 25, p.1046, 2006.

LEÃO, R.M.K.; PEIXOTO, J.R.; JUNQUEIRA, N.T.V.; RESENDE, R.O.; MATTOS, J.K.A.; MELO, B. Reação de progênes de maracujazeiro-azedo ao vírus do endurecimento do fruto (*Cowpea aphid-borne mosaic virus-CABMV*) em casa de vegetação. **Bioscience Journal**, v. 22, p. 87, 2006.

LEE, M.-H.; NISHIMOTO, S.; YANG, L.-L.; YEN, K.-Y.; HATANO, T.; YOSHIDA, T.; OKUDA, T. Two macrocyclic hydrolysable tannin dimers from *Eugenia uniflora*. **Phytochemistry**, v.44, p. 1343, 1997.

LEE, M.-H.; CHIOU, J.-F.; YEN, K.-Y.; YANG, L.-L. DNA polymerase inhibition of tannins from *Eugenia uniflora*. **Cancer Lett.**, v. 154, p. 131, 2000.

LEE, I. S. L.; BOYCE, M. C.; BREADMORE, M. C. A rapid quantitative determination of phenolic acids in *Brassica oleracea* by capillary zone electrophoresis. **Food Chem**, v. 127, p. 797, 2010.

LEE, Y. J.; PERDIAN, D. C.; SONG, Z.; YEUNG, E. S.; NIKOLAU, B. J. Use of mass spectrometry for imaging metabolites in plants. **The Plant Journal**, v. 70, p. 81, 2012.

LEI, Z.; HUHMANN, D. V.; SUMNER, L. W. Mass spectrometry strategies in metabolomics. **J. Biol.Chem.**, v. 286, p. 25435, 2011.

LI, F.; WANG, J.; NIE, L.; ZHANG, W. Computational methods to interpret and integrate metabolomic data. In: ROESSNER, U. **Metabolomics**, Publisher: InTech, 364p., 2012.

LIMA, V.L.A.G.; MELO, E.A.; LIMA, D.E.S. Fenólicos e carotenóides totais em pitanga. **Sci. Agric.**, v. 59, p. 447, 2002.

LIRA JÚNIOR, J. S.; BEZERRA, J. E. F.; LEBERMAN, I. E.; SILVA JUNIOR, J. F. D. **Pitangueira**. Recife: Liceu, 2007. 87p

LORET, M. O.; PEDERSEN, L.; FRANCOIS, J. Revised procedures for yeast metabolites extraction: application to a glucose pulse to carbon-limited yeast cultures, which reveals a transient activation of the purine salvage pathway. **Yeast**, v. 24, p. 47, 2007.

LOPES, A. S.; MATTIETTO, R. A.; MENEZES, H. C.; SILVA, L. H. M.; PENA, C. Rheological behavior of Brazilian Cherry (*Eugenia uniflora* L.) pulp at pasteurization temperatures. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 33, p. 26, 2013.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. São Paulo: Editora Plantarum, 1998, v. 1, 352p.

LOVISOLO, O.; CONTI, M. Identification of an aphid-transmitted *cowpea mosaic virus*. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, v. 72, p. 265, 1966.

LUQUE-GARCÍA, J. L.; LUQUE DE CASTRO, M. D. Focused microwave-assisted Soxhlet extraction: Devices and applications. **Talanta**, v. 64, p. 571, 2004.

LUQUE DE CASTRO, M.D.; DELGADO-POVEDANO, M. M. Ultrasound: A subexploited tool for sample preparation in metabolomics. **Analytica Chimica Acta**, v. 806, p. 74, 2014.

MA, Q.L.; HAMID, N.; BEKHIT, A.E.D.; ROBERTSON, J.; LAW, T.F. Optimization of headspace solid phase microextraction (HS-SPME) for gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) analysis of aroma compounds in cooked beef using response surface methodology. **Microchem. J.**, v. 111, p. 16, 2013.

MACIEL, S.C.; NAKANO, D.H.; REZENDE, J.A.M.; VIEIRA, M.L.C. Screening of *Passiflora* species for reaction to *Cowpea aphid-borne mosaic virus* reveals an immune wild species. **Scientia Agricola**, v. 66, p. 414, 2009.

MADALA, N. E.; STEENKAMP, P. A.; PIATER, L. A.; DUBERY, I. A. Metabolomic analysis of isonitrosoacetophenone-induced perturbations in phenolic metabolism of *Nicotiana tabacum* cells. **Phytochemistry**, v. 94, p. 82, 2013.

MADALA, N. E.; PIATER, L. A.; STEENKAMP, P. A.; DUBERY, I. Multivariate statistical models of metabolomic data reveals different metabolite distribution patterns in isonitrosoacetophenone-elicited *Nicotiana tabacum* and *Sorghum bicolor* cells. **Springer Plus**, v. 3, p. 254, 2014.

MAGALHÃES-JUNIOR, J. T.; MESQUITA, P. R. R.; OLIVEIRA, W. F. S.; OLIVEIRA, F. S.; FRANKE, C. R.; RODRIGUES, F. M.; DE ANDRADE, J. B.; BARROUIN-MELO, S. M. Identification of biomarkers in the hair of dogs: new diagnostic possibilities in the study and control of visceral leishmaniasis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 406, p. 6691, 2014.

MAIA, J.G.S.; ANDRADE, E.H.A.; SILVA, M.H.L.; ZOGHBI, M.G.B. A new chemotype of *Eugenia uniflora* L. from north Brazil. **J. Essent. Oil Res.**, v. 11, p. 727, 1999.

MALTESE, F.; VAN DER KOOY, F.; VERPOORTE, R. Solvent derived artifacts in natural products chemistry. **Nat. Prod. Commun.**, v. 4, p. 447, 2009.

MASHEGO, M.R.; RUMBOLD, K.; DE MEY, M.; VANDAMME, E.; SOETAERT, W.; HEIJNEN, J.J. Microbial metabolomics: past, present and future methodologies. **Biotechnol. Lett.**, v. 29, p. 1, 2007.

MASHEGO, M. R.; VAN GULIK, W. M.; VINKE, J. L.; HEIJNEN, J. J. Critical evaluation of sampling techniques for residual glucose determination in carbon-limited chemostat culture of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechno Bioeng**, v. 83, p. 395, 2003.

MATSUMURA, T.; KASAI, M.; HAYASHI, T.; ARISAWA, M.; MOMOSE, Y.; ARAI, I.; AMAGAYA, S.; OMATSU, Y. α -glucosidase inhibitors from paraguayan natural medicine, Ñangapiry, the leaves of *Eugenia uniflora*. **Pharm. Biol.**, v. 38, p. 302, 2000.

- MATSUZAKI, F.; SHIMIZU, M.; WARIISHI, H. Proteomic and metabolomic analyses of the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* exposed to exogenous benzoic acid. **J Proteome Res**, v. 7, p. 2342, 2008.
- MATYASH, V.; LIEBISCH, G.; KURZCHALIA, T.; SHEVCHENKO, A.; SCHWUDKE, D. Lipid extraction by methyl-tert-butyl ether for high-throughput lipidomics. **J. Lipid Res.**, v. 49, p. 1137, 2008.
- MATROS, A.; AMME, S.; KETTIG, B.; BUCK-SORLIN, G. H.; SONNEWALD, U.; MOCK, H. P. Growth at elevated CO₂ concentrations leads to modified profiles of secondary metabolites in tobacco cv. SamsunNN and to increased resistance against infection with potato virus Y. **Plant Cell e Environment**, v. 29, p. 126, 2006.
- MAZIDA, M.M.; SALLEH, M.M.; OSMAN, H. Analysis of volatile aroma compounds of fresh chilli (*Capsicum annuum*) during stages of maturity using solid phase microextraction (SPME). **J. Food Compos. Anal.**, v. 18, p. 427, 2005.
- MEINERT, S.; RAPP, S.; SCHMITZ, K.; NOACK, S.; KORNFELD, G.; HARDIMAN, T. Quantitative quenching evaluation and direct intracellular metabolite analysis in *Penicillium chrysogenum*. **Analytical Biochemistry**, v. 438, p. 47, 2013.
- MELETTI, L.M.M., SOARES-SCOTT, M.D.; BERNACCI, L.C.; PASSOS, I.R.S. Melhoramento genético do maracujá: passado e futuro. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados, p.55, 2005.
- MELETTI, L.M.M. Avanços na cultura do maracujá no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, p. 083, 2011.
- MELO, R.M.; CORRÊA, V.F.S.; AMORIM, A.C.L.; MIRANDA, A.L.P.; REZENDE, C.M. Identification of impact aroma compounds in *Eugenia uniflora* L. (Brazilian Pitanga) leaf essential oil. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 18, p.179, 2007.
- MINK, G. I.; SILBERNAGEL, M. J. Serological and biological relationships among viruses in the bean common mosaic virus subgroup. **Archives of Virology** (supplement), v. 5, p. 397, 1992.
- MISHINA, T. E.; ZEIER, J. Pathogen-associated molecular pattern recognition rather than development of tissue necrosis contributes to bacterial induction of systemic acquired resistance in *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, v. 50, p. 500, 2007.
- MOCO, S.; BINO, R. J.; DE VOS, R. C. H.; VERVOORT, J. Metabolomics technologies and metabolite identification. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, p. 11, 2007.
- MOCO, S.; BINO, R. J.; VORST, O.; VERHOEVEN, H. A.; DE GROOT, J.; VAN BEEK, T. A.; VERPOORT, J.; DE VOS, C. H. R. A Liquid chromatography-mass spectrometry-based metabolome database for tomato. **Plant Physiol**, v. 141, p. 1205, 2006.
- MONDELLO, L.; TRANCHIDA, P. Q.; DUGO, P.; DUGO, G. Comprehensive two-dimensional gas chromatography-mass spectrometry: a review. **Mass Spectrometry Review**, v. 27, p. 101, 2008.

- MORAIS, S.M.; CRAVEIRO, A.A.; MACHADO, M.I.L.; ALENCAR, J.W.; MATTOS, F.J.A. Volatile constituents of *Eugenia uniflora* leaf oil from Northeastern Brazil. **J. Essent. Oil Res.**, v. 8, p. 449, 1996.
- MORENO, P.R.H.; LIMA, M.E.L.; SOBRAL, M.; CLÁUDIA, M.; YOUNG, M.; CORDEIRO, I.; APEL, M.A.; LIMBERGER, R.P.; HENRIQUE, A.T. Essential oil composition of fruit colour varieties of *Eugenia brasiliensis* Lam. **Sci. Agric.**, v. 64, p. 428, 2007.
- MORIOKA, K.; NOJIMA, H.; KUROSAKI, F.; ARISAWA, M.; KURAISHI, Y.; MOMOSE, Y. Hypotensive action of Nangapiry, a Paraguayan natural medicine, in rodents. **Phytomedicine**, v. 7, p. 99, 2000.
- NAGY, K.; TAKÁTS, Z.; POLLREISZ, F.; SZABÓ, T.; VÉKEY, K. Direct tandem mass spectrometric analysis of amino acids in dried blood spots without chemical derivatization for neonatal screening. **Rapid Commun. Mass Spectrom.**, v. 17, p. 983, 2003.
- NASCIMENTO, A.V.S.; SOUZA, A.R.R.; ALFENAS, P.F.; ANDRADE, G.P.; CARVALHO, M.G.; PIO-RIBEIRO, G.; ZERBINI, F.M. Análise filogenética de potyvírus causando endurecimento dos frutos do maracujazeiro no Nordeste do Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, p. 378, 2004.
- NASCIMENTO, A.V.S., SANTANA, E.N., BRAZ, A.S.K., ALFENAS, P.F., PIO-RIBEIRO, G., ANDRADE, G.P., CARVALHO, M.G.; ZERBINI, F.M. *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) is widespread in Passion fruit in Brazil, and causes Passion fruit woodiness disease. **Archives of Virology**, v. 151, p. 1797, 2006.
- NASUTION, U.; VAN GULIK, W.M.; KLEIJN, R.J.; VAN WINDEN, W. A.; PROELL, A.; HEIJNEN, J. J. Measurement of intracellular metabolites of primary metabolism and adenine nucleotides in chemostat cultivated *Penicillium chrysogenum*. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 94, p. 159, 2006.
- NICOLINI, C.; RABELO FILHO, F. A. C.; RESENDE, R. O.; ANDRADE, G. P.; KITAJIMA, E. W.; PIO-RIBEIRO, G.; NAGATA, T. Possible host adaptation as an evolution factor of *Cowpea aphid-borne mosaic virus* deduced by coat protein gene analysis. **Journal of Phytopathology**, v. 160, p. 82, 2012.
- NOVAES, Q. S.; REZENDE, J. A. M. Possível aplicação do DAS-ELISA indireto na seleção de maracujazeiro tolerante ao "*Passion fruit woodiness vírus*". **Fitopatologia Brasileira**, v. 24, p. 76, 1999.
- NOVAES, Q. S.; REZENDE, J. A. M. Selected mild strains of *Passion fruit woodiness virus* (PWV) fail to protect pre-immunized vines in Brazil. **Scientia Agricola**, v. 60, p. 699, 2003.
- NUNES, T.S. 2002. **A família Passifloraceae no estado da Bahia, Brasil.** Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, Bahia. 190 p.
- O'BRIEN, J. A.; DAUDI, A.; FINCH, P.; BUTT, V. S.; WHITELEGGE, J. P.; SOUDA, P.; AUSUBEL, F. M.; BOLWELL, G. P. A peroxidase-dependent apoplastic oxidative

burst in cultured arabidopsis cells functions in MAMP-elicited defense. **Plant Physiology**, v. 158, p. 2013, 2012.

OLIVEIRA, E.J.; SOARES, T.L.; BARBOSA, C.J.; SANTOS-FILHO, H.P.; JESUS, O.N. Severidade de doenças em maracujazeiro para identificação de fontes de resistência em condições de campo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, p. 485, 2013.

OTIFY, A.; GEORGE, C.; ELSAYED, A.; FARAG, M. A. Mechanistic evidence of *Passiflora edulis* (Passifloraceae) anxiolytic activity in relation to its metabolite fingerprint as revealed via LC-MS and chemometrics. **Food Funct.**, v. 6, p. 3807, 2015.

OUYANG, G.; VUCKOVIC, D.; PAWLISZYN, J. Nondestructive sampling of living systems using in vivo solid-phase microextraction. **Chemical Reviews**, v. 111, p. 2784, 2011.

PALAMA, T. L.; MENARD, P.; FOCK, I.; CHOI, Y. H.; BOURDON, E.; GOVINDEN-SOULANGE, J.; BAHUT, M.; PAYET, B.; VERPOORTE, R.; KODJA, H. Shoot differentiation from protocorm callus cultures of *Vanilla planifolia* (Orchidaceae): proteomic and metabolic responses at early stage. **BMC Plant Biology**, v. 10, p. 1, 2010.

PARK, S. W.; KAIMOYO, E.; KUMAR, D.; MOSHER, S.; KLESSIG, D. F. Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. **Science**, v. 318, p. 113, 2007.

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J. R.; CIA, P. **Interação Planta-Patógeno**, Editora: Fealq, 627p., 2008.

PASSADOR, M. M.; DE LIMA, P. R.; DE PIERI, C.; HARAKAVA, R.; FINKENAUER, E.; FURTADO, E. L. *Teratosphaeria nubilosa* em plantações comerciais de *Eucalyptus globulus* nas regiões Sul e Sudeste do Brasil. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 38, n. 1, p. 11, 2012.

PASSINHO-SOARES, H.C.; MEIRA, P.R.; DAVID, J.P.; MESQUITA, P.R.R.; DO VALE, A.E.; RODRIGUES, F.M.; DE P. PEREIRA, P.A.; DE SANTANA, J.R.F.; DE OLIVEIRA, F.S.; DE ANDRADE, J.B.; DAVID, J.M. Volatile organic compounds obtained by *in vitro* callus cultivation of *Plectranthus ornatus* Codd. (Lamiaceae). **Molecules**, v. 18, p. 10320, 2013.

PATTI, G. J.; YANES, O.; SIUZDAK, G. Innovation: Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.13, p.263, 2012.

PEDERSEN, K. S.; KRISTENSEN, T. N.; LOESCHCKE, V.; PETERSEN, B. O.; DUUS, J. Ø.; NIELSEN, N. C.; MALMENDAL, A. Metabolomic signatures of inbreeding at benign and stressful temperatures in *Drosophila melanogaster*. **Genetics**, v.180, p. 1233, 2008.

PELUFFO, L.; LIA, V.; TROGLIA, C.; MARINGOLO, C.; NORMA, P.; ESCANDE, A.; ESTEBAN, HOPP H.; LYTOVCHENKO, A.; FERNIE, A. R.; HEINZ, R.; CARRARI F. Metabolic profiles of sun flower genotypes with contrasting response to *Sclerotinia sclerotiorum* infection. **Phytochemistry**, v. 71, p. 70, 2010.

- PETRETTO, G. L.; MALDINI, M.; ADDIS, R.; CHESSA, M.; FODDAI, M.; ROURKE, J. P.; PINTORE, G. Variability of chemical composition and antioxidant activity of essential oils between *Myrtus communis* var. *Leucocarpa* DC and var. *Melanocarpa* DC. **Food Chemistry**, v. 197, p. 124, 2016.
- PETROCELLI, S.; TONDO, M. L.; DAURELIO, L. D.; ORELLANO, E. G. Modifications of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* lipopolysaccharide affect the basal response and the virulence process during citrus canker. **Plos One**, v. 7, p. 1, 2012.
- PINTO, P.H.D.; PEIXOTO, J.R.; JUNQUEIRA, N.T.V.; RESENDE, R.O.; MATTOS, J.K.A.; MELO, B. Reação de genótipos de maracujazeiro-azedo ao vírus do endurecimento do fruto (*Cowpea aphid-borne mosaic virus* -CABMV). **Bioscience Journal**, v. 24, p. 19-26, 2008.
- PIO-RIBEIRO, G.; PAPPU, S.S.; PAPPU, H.R.; ANDRADE, G.P.; REDDY, D.V.R. Occurrence of *Cowpea aphid-borne mosaic virus* in peanut in Brazil. **Plant Disease**, v. 84, p. 760, 2000.
- PLUMB, R.; CASTRO-PEREZ, J.; GRANGER, J.; BEATTIE, I.; JONCOUR, K.; WRIGHT, A. Ultra-performance liquid chromatography coupled to quadrupole-orthogonal time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 18, p. 2331, 2004.
- POHJANEN, E.; THYSELL, E.; LINDBERG, J.; SCHUPPE-KOISTINEN, I.; MORITZ, T.; JONSSON, P.; ANTTI, H. Statistical multivariate metabolite profiling for aiding biomarker pattern detection and mechanistic interpretations in GC/MS based metabolomics. **Metabolomics**, v. 2, p. 257, 2006.
- PORTO-FIGUEIRA, P.; FREITAS, A.; CRUZ, C. J.; FIGUEIRA, J.; CÂMARA, J. S.; Profiling of passion fruit volatiles: An effective tool to discriminate between species and varieties. **Food Research International**, v. 77, p. 408, 2015.
- PROESTOS, C.; KOMAITIS, M. Application of microwave-assisted extraction to the fast extraction of plant phenolic compounds. **Food Sci Technol.**, v. 41, p. 652, 2008.
- PROESTOS, C.; SERELI, D.; KOMAITIS, M. Determination of phenolic compounds in aromatic plants by RP-HPLC and GC-MS. **Food Chem**, v. 95, p. 44, 2006.
- PRUSS, G. et al. Plant viral synergism: the potyviral genome encodes a broad-range pathogenicity enhancer of transactivates replication of heterologous viruses. **Plant Cell**, v. 9, p. 859, 1997.
- RAJNIAK, J.; BARCO, B.; CLAY, N. K.; SATTELY, E. S. A new cyanogenic metabolite in *Arabidopsis* required for inducible pathogen defence. **Nature**, v. 525, p. 376, 2015.
- RAMABULANA, T.; MAVUNDA, R. D.; STEENKAMP, P. A.; PIATER, L. A.; DUBERY, I. A.; MADALA, N. E. Secondary metabolite perturbations in *Phaseolus vulgaris* leaves due to gamma radiation. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 97, p. 287, 2015.

- REINER, A.; YEKUTIELI, D.; BENJAMINI, Y. Identifying differentially expressed genes using false discovery rate controlling procedures. **Bioinformatics**, v. 19, p. 368, 2003.
- ROBBINS, R. J.; KECK, A.-S.; BANUELOS, G.; FINLEY, J. W. Cultivation conditions and selenium fertilization alter the phenolic profile, glucosinolate, and sulforaphane content of broccoli. **J Med Food**, v. 8, p. 204, 2005.
- RODRIGUES, K.A.F.; AMORIM, L.V.; OLIVEIRA, J.M.G.; DIAS, C.N.; MORAES, D.F.C.; ANDRADE, E.H.A.; MAIA, J.G.S.; CARNEIRO, S.M.P.; CARVALHO, F.A.A. *Eugenia uniflora* L. essential oil as a potential anti-*Leishmania* agent: effects on *Leishmania amazonensis* and possible mechanisms of action. **Evid. Based. Complement. Alternat. Med.**, v. 2013, p. 279726, 2013.
- RYAN, D.; ROBARDS, K. Metabolomics: The Greatest omics of them all? **Analytical Chemistry**, v. 78, p. 7954, 2006.
- RYAN, D.; ROBARDS, K.; PRENZLER, P. D.; KENDALL, M. **Anal. Chim. Acta**, v. 684, p. 17, 2011.
- SANTOS, F.R.; BRAZ-FILHO, R.; CASTRO, R.N. Influência da idade das folhas de *Eugenia uniflora* L. na composição química do óleo essencial. **Quim. Nova**, v. 38, p. 762, 2015.
- SCHAFER, K. Accelerated solvent extraction of lipids for determining the fatty acid composition of biological material. **Anal. Chim. Acta**, v. 358, p. 69, 1998.
- SCHAPOVAL, E.E.S.; SILVEIRA, S.M.; MIRANDA, M.L.; ALICE, C.B.; HENRIQUES, A.T. Evaluation of some pharmacological activities of *Eugenia uniflora* L. **J. Ethnopharmacol.**, v. 44, p. 137, 1994.
- SCHRIPSEMA, J. Application of NMR in plant metabolomics: techniques, problems and prospects. **Phytochemical Analysis**, v. 21, p. 14, 2010.
- SEN, A.; WANG, Y.; CHIU, K.; WHILEY, L.; COWAN, D.; CHANG, R. C.-C. et al. Metabolic phenotype of the healthy rodent model using in-vial extraction of dried serum, urine, and cerebrospinal fluid spots. **Anal. Chem.**, v. 85, p. 7257, 2013.
- SIMÕES, C. M. O.; SCHENCKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 6ª Edição, ed. Editora UFRGS/Editora UFSC, Porto Alegre/Florianópolis, 1999.
- SILVA, S. M. Pitanga. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 28, p. 1, 2006.
- SILVA, E.A.S.; RISTICEVIC, S.; PAWLISZYN, J. Recent trends in SPME concerning sorbent materials, configurations and in vivo applications. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 43, p. 24, 2013.
- SILVA, C.L.; CÂMARA, J.S. Profiling of volatiles in the leaves of Lamiaceae species based on headspace solid phase microextraction and mass spectrometry. **Food Res. Int.**, v. 51, p. 378, 2013.

SLISZ, A. M.; BREKSA, A. P.; MISHCHUK, D. O.; MCCOLLUM, G.; SLUPSKY, C. M. Metabolomic analysis of citrus infection by '*Candidatus Liberibacter*' reveals insight into pathogenicity. **Journal of Proteome Research**, v. 11, p. 4223, 2012.

SOARES, D. J.; WALKER, J.; PIGNITTER, M.; WALKER, J. M.; IMBOECK, J. M.; EHRNHOFER-RESSLER, M. M.; BRASIL, I. M.; SOMOZA, V. Pitanga (*Eugenia uniflora* L.) fruit juice and two major constituents thereof exhibit anti-inflammatory properties in human gingival and oral gum epithelial cells. **Food & Function**, Australia, v. 5, p. 2981, 2014.

SOUSA, E.T.; RODRIGUES, F.M.; MARTINS, C.C.; OLIVEIRA, F.S.; PEREIRA, P.A. DE P.; DE ANDRADE, J.B. Multivariate optimization and HS-SPME/GC-MS analysis of VOCs in red, yellow and purple varieties of *Capsicum chinense* sp. peppers. **Microchem. J.**, v. 82, p. 142, 2006.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática**: Guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG III, 3 ed., Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2012.

STENTIFORD, G. D.; VIANT, M. R.; WARD, D. G.; JOHNSON, P. J.; MARTIN, A.; WENBIN, W.; COOPER, H. J.; LYONS, B. P.; FEIST, S. W. Liver tumors in wild flat fish: A histopathological, proteomic, and metabolomic study. **OMICS: J Integr Biol**, v. 9, p. 281, 2005.

STOREY, J. D.; TIBSHIRANI, R. Statistical significance for genomewide studies. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, p. 9440, 2003.

SZOPA, J.; WILCZYNSKI, G.; FIEHN, O.; WENCZEL, A.; WILLMITZER, L. Identification and quantification of catecholamines in potato plants (*Solanum tuberosum*) by GC- MS. **Phytochemistry**, v. 58, p. 315, 2001.

SUN, Y.; LIU, Z.; WANG, J. Optimizing the extraction of phenolic antioxidants from kudingcha made from *Ilex kudingcha* C.J. Tseng by using response surface methodology. **Sep. Purif. Technol.**, v. 78, p. 49, 2011.

TATA, A.; PEREZ, C. J.; HAMID, T. S.; BAYFIELD, M. A.; IFA, D. R. Analysis of metabolic changes in plant pathosystems by imprint imaging DESI-MS. **J. Am. Soc. Mass Spectrom.**, v. 26, p. 641, 2015.

TAUTENHAHN, R.; BOTTCHEER, C.; NEUMANN, S. Annotation of LC/ESI-MS mass signals. **Bioinformatics Research and Development**, v. 4414, p. 371, 2007.

THEOBALD, U.; MAILINGER, W.; BALTES, M.; RIZZI, M.; REUSS, M. *In vivo* analysis of metabolic dynamics in *Saccharomyces cerevisiae*: I. Experimental observations. **Biotech Bioeng**, v. 55, p. 305, 1997.

TIZIANI, S.; LODI, A.; KHANIM, F. L.; VIANT, M. R.; BUNCE, C. M.; GUNTHER, U. L. Metabolomic profiling of drug responses in acute myeloid leukaemia cell lines. **Plos One**, v. 4, p. 4251, 2009.

TORRES, M. A.; JONES, J. D. G.; DANGL, J. L. Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. **Plant Physiology**, v. 141, p. 373, 2006.

- TRUMAN, W. M.; BENNETT, M. H.; TURNBULL, C. G. N.; GRANT, M. R. *Arabidopsis* auxin mutants are compromised in systemic acquired resistance and exhibit aberrant accumulation of various indolic compounds. **Plant Physiology**, v. 152, p. 1562, 2010.
- TRUSHINA, E.; DUTTA, T.; PERSSON, X. M.; MIELKE, M. M.; PETERSEN, R. C. Identification of altered metabolic pathways in plasma and CSF in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease using metabolomics. **Plos One**, v. 8, p. 1, 2013.
- TRYGG, J.; HOLMES, E.; LUNDSTEDT, T. Chemometrics in metabonomics. **J Proteom Res.**, v. 6, p. 469, 2007.
- UBIERGO, G.; TAHER, H.A.; TALENTI, E.C. Chemical composition of essential oil of *Eugenia uniflora*. **An. Asoc. Quim. Argent.**, v. 75, p. 377, 1987.
- VIANA, F.M.P.; COSTA, A.F. Doenças do maracujazeiro. In: FREIRE, F.C.O.; CARDOSO, J.E.; VIANA, F.M.P. (Eds.) **Doenças de fruteiras tropicais de interesse agroindustrial**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica. p. 270, 2003.
- VICENTE, M. R. S.; LARIOS-ZARATE, G.; PLASENCIA, J. Disruption of sphingolipid biosynthesis in *Nicotiana benthamiana* activates salicylic acid-dependent responses and compromises resistance to *Alternaria alternata* f. sp *Lycopersici*. **Planta**, v. 237, p. 121, 2013.
- VILLAS-BÔAS, S. G.; BRUHEIM, P. Cold glycerol-saline: the promising quenching solution for accurate intracellular metabolite analysis of microbial cells. **Anal. Biochem.**, v. 370, p. 87, 2007.
- VILLAS-BÔAS, S. G.; HOJER-PEDERSEN, J.; AKESSON, M.; SMEDSGAARD, J.; NIELSEN, J. Global metabolite analysis of yeast: evaluation of sample preparation methods. **Yeast**, v. 22, p. 1155, 2005.
- VOGESER, M.; KIRCHHOFF, F. Progress in automation of LC-MS in laboratory Medicine. **Clin. Biochem.**, v. 44, p. 4, 2011.
- VORST, O.; DE VOS, C.H.R.; LOMMEN, A.; STAPS, R. V.; VISSER, R. G. F.; BINO, R. J.; HALL, R. D. A non-directed approach to the differential analysis of multiple LC-MS-derived metabolic profiles. **Metabolomics**, v. 1, p. 169, 2005.
- WANG, J.; ZHANG, S.; LI, Z.; YANG, J.; HUANG, C.; LIANG, R.; LIU, Z.; ZHOU, R. ¹H-NMR- based metabolomics of tumor tissue for the metabolic characterization of rat hepatocellular carcinoma formation and metastasis. **Tumor Biol**, v. 32, p. 223, 2011.
- WANT, E. J.; O'MAILLE, G.; SMITH, C. A.; BRANDON, T. R.; URITBOONTHAI, W.; QIN, C. et al. Solvent-dependent metabolite distribution, clustering, and protein extraction for serum profiling with mass spectrometry. **Anal. Chem.**, v. 78, p. 743, 2006.
- WARD, J. L.; FORCAT, S.; BECKMANN, M.; BENNETT, M.; MILLER, S. J.; BAKER, J. M.; HAWKINS, N. D.; VERMEER, C. P.; LU, C.; LIN, W.; TRUMAN, W. M.; BEALE, M. H.; DRAPER, J.; MANSFIELD, J. W.; GRANT, M. The metabolic transition

during disease following infection of *Arabidopsis thaliana* by *Pseudomonas syringae* pv. tomato. **The Plant Journal**, v. 63, p. 443, 2010.

WATKINS, S.M.; GERMAN, J.B. Toward the implementation of metabolomic assessments of human health and nutrition. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 13, p. 512, 2002.

WAZLAWIK, E.; SILVA, M.A.; PETERS, R.R.; CORREIA, J.F.G.; FARIAS, M.R.; CALIXTO, J.B.; RIBEIRO DO VALLE, R.M. Analysis of the role of nitric oxide in the relaxant effect of the crude extract and fractions from *Eugenia uniflora* in the rat thoracic aorta. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 49, p. 433, 1997.

WECKWERTH, W.; WENZEL, K.; FIEHN, O. Process for the integrated extraction, identification and quantification of metabolites, proteins and RNA to reveal their co-regulation in biochemical networks. **Proteomics**, v. 4, p. 78, 2004.

WECKWERTH, W. Unpredictability of metabolism – the key role of metabolomics science in combination with next-generation genome sequencing. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 400, p. 1967, 2011.

WEINBERGER, F.; LION, U.; DELAGE, L.; KLOAREG, B.; POTIN, P.; BELTRAN, J.; FLORES, V.; FAUGERON, S.; CORREA, J.; POHNERT, G. Up-regulation of lipoxygenase, phospholipase, and oxylipin-production in the induced chemical defense of the red alga *Gracilaria chilensis* against epiphytes. **Journal Chemical Ecology**, v. 37, p. 677, 2011.

WECKWERTH, W. Metabolomics in systems biology. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v. 54, p. 669, 2003.

WHILEY, L.; GODZIEN, J.; RUPEREZ, F. J.; LEGIDO-QUIGLEY, C.; BARBAS, C. In-vial dual extraction for direct LC-MS analysis of plasma for comprehensive and highly reproducible metabolic fingerprinting. **Anal. Chem.**, v. 84, p. 5992, 2012.

WIENDAHL, C.; BRANDNER, J. J.; KUPPERS, C.; LUO, B.; SCHYGULLA, U.; NOLL, T.; OLDIGES, M. **Chem. Eng. Technol.**, v. 30, p. 322, 2007.

WIKLUND, S.; JOHANSON, E.; SJOSTROM, L.; MELLEROWICZ, E. J.; EDLUND, U.; SHOCKCOR, J. P.; et al. Visualization of GC/TOF-MS-based metabolomics data for identification of biochemically interesting compounds using OPLS class models. **Anal. Chem.**, v. 80, p. 115, 2008.

WILLIAMS, T. C. R.; POOLMAN, M. G.; HOWDEN, A. J. M.; SCHWARZLANDER, M.; FELL, D. A.; RATCLIFFE, R. G.; SWEETLOVE, L. J. A. Genome-scale metabolic model accurately predicts fluxes in central carbon metabolism under stress conditions. **Plant Physiol**, v. 154, p. 311, 2010.

WINDER, C. L.; DUNN, W. B.; SCHULER, S.; BROADHURST, R.; JARVIS, R.; STEPHENS, G. M.; GOODACRE, R. Global Metabolic Profiling of *Escherichia coli* Cultures: an Evaluation of Methods for Quenching and Extraction of Intracellular Metabolites. **Anal. Chem.**, v. 80, p. 2939, 2008.

WITTMANN, C.; KROMER, J.O.; KIEFER, P.; BINZ, T.; HEINZLE, E. Impact of the cold shock phenomenon on quantification of intracellular metabolites in bacteria. **Anal. Biochem.**, v. 327, p.135, 2004.

WOLFENDER, J.-L.; MARTI, G.; THOMAS, A.; BERTRAND, S. Current approaches and challenges for the metabolite profiling of complex natural extracts. **Journal of Chromatography A**, v. 1382, p. 136, 2015.

WOJAKOWSKA, A.; MUTH, D.; NAROZNA, D.; MADRZAK, C.; STOBIECKI, M.; KACHLICKI, P. Changes of phenolic secondary metabolite profiles in the reaction of narrow leaf lupin (*Lupinus angustifolius*) plants to infections with *Colletotrichum lupini* fungus or treatment with its toxin. **Metabolomics**, v. 9, p. 575, 2013.

WORLEY, B.; POWERS, R. Multivariate analysis in metabolomics. **Current Metabolomics**, v. 1, p. 92, 2013.

WU, H.; SOUTHAM, A. D.; HINES, A.; VIANT, M. R. High-throughput tissue extraction protocol for NMR- and MS-based metabolomics. **Anal. Biochem.**, v. 372, p. 204, 2008.

XIA, J.; SINELNIKOV, I.; HAN, B.; WISHART, D.S. MetaboAnalyst 3.0 - making metabolomics more meaningful. **Nucl. Acids Res.**, v. 43, p. W251, 2015.

XIE, Y.; PAN, W.; KHODURSKY, A. B. A note on using permutation-based false discovery rate estimates to compare different analysis methods for microarray data. **Bioinformatics**, v. 21, p. 4280. 2005.

XU, F.; ZOU, L.; ONG, C. N. Experiment-originated variations, and multi-peak and multi-origination phenomena in derivatization-based GC-MS metabolomics. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 3, 2010.

XU, X. H.; HUANG, Y.; WANG, G.; CHEN, S. D. Metabolomics: a novel approach to identify potential diagnostic biomarkers and pathogenesis in Alzheimer's disease. **Neuroscience Bulletin**, v. 28, p. 641, 2012.

XU, F.; WANG, C.; YANG, L.; LUO, H.; FAN, W.; ZI, C.; DONG, F.; HUA, J.; ZHOU, J. C-dideoxyhexosyl flavones from the stems and leaves of *Passiflora edulis* Sims. **Food Chemistry**, v. 136, p. 94, 2013.

YANG, Z. N.; ROGERS, L. M.; SONG, Y. D.; GUO, W. J.; KOLATTUKUDY, P. E. Homoserine and asparagine are host signals that trigger in plant a expression of a pathogenesis gene in *Nectria haematococca*. **PNAS**, v.102, p. 4197, 2005.

YOSHIDA, H.; MIZUKOSHI, T.; et al. Comprehensive analytical method for the determination of hydrophilic metabolites by high performance liquid chromatography and mass spectrometry. **J. Agr. Food Chem.**, v. 55, p. 551, 2007.

YUN, Z.; GAO, et al. Comparative proteomic and metabolomic profiling of citrus fruit with enhancement of disease resistance by postharvest heat treatment. **BMC Plant Biology**, v. 13, p. 1, 2013.

ZHANG, Z.; LI, G. A review of advances and new developments in the analysis of biological volatile organic compounds. **Microchemical Journal**, v. 95, p. 127, 2010.

ZHAO, N.; GUAN, J.; FERRER, J. L.; ENGLE, N.; CHERN, M.; RONALD, P.; TSCHAPLINSKI, T.J.; CHEN, F. Biosynthesis and emission of insect-induced methyl salicylate and methyl benzoate from rice. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, p. 279, 2010.