

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**ESTUDO METABOLÔMICO DOS CONSTITUINTES VOLÁTEIS DE
ALGODOEIRO SUBMETIDO À INTERAÇÕES BIÓTICAS E
ABIÓTICAS E MECANISMOS DE INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA**

Flávia Rego de Aquino*

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRA EM QUÍMICA, área de concentração: QUÍMICA ORGÂNICA.

Orientador: Prof. Dr. Moacir Rossi Forim

*** bolsista CNPq**

São Carlos - SP
2020



Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Flávia Rego de Aquino, realizada em 17/02/2020:

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'M. Rossi Forim', is written above a horizontal line.

Prof. Dr. Moacir Rossi Forim
UFSCar

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Thiago André Moura Veiga', is written above a horizontal line.

Prof. Dr. Thiago André Moura Veiga
UNIFESP

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Renato Lajarim Carneiro', is written above a horizontal line.

Prof. Dr. Renato Lajarim Carneiro
UFSCar

Dedico este trabalho à toda a minha família que sempre me apoiou em todas as minhas decisões e que sempre viu em mim um motivo de orgulho e admiração.

“Seja menos curioso sobre as pessoas e mais curioso sobre as ideias.”

Marie Curie

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina.”

Cora Coralina

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à minha família que sempre me apoiou nas minhas escolhas de vida. Agradeço especialmente aos meus quatro irmãos, Douglas, Larissa, Guilherme e Geovanna, por serem a razão da minha existência, de toda a minha luta e motivo do meu orgulho. Poder compartilhar a minha existência com TODOS eles (Sim, eu sei que são muitos!) é uma verdadeira prova que tenho muito mais a agradecer do que reclamar. Sou muito grata à família que tenho. Do jeito que ela é.

Agradeço a todos os amigos que fiz e mantive durante minha jornada em São Carlos. À minha *roomate* e amiga, Amanda Aline Barboza, que embarcou nessa aventura comigo, por todo apoio, desespero e riso compartilhado. Aos meus colegas e amigos do LQBO por todos os momentos de descontração e comilança.

Meu muito obrigada às minhas colegas de laboratório, Eliane May e Maria Clara Santana Aguiar, por todo o apoio, suporte técnico e conhecimento compartilhado durante todo o meu mestrado. Gostaria também de deixar um agradecimento especial aos professores Dr. Renato Lajarim e Dr. Edenir Rodrigues-Filho por todo o tempo, dedicação e paciência em esclarecer as minhas dúvidas e por terem mantido em mim o gosto pela quimiometria.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Moacir Rossi Forim por ter me recebido em seu grupo de pesquisa e por todo o aprendizado adquirido durante esses anos. Bem como, agradeço aos demais professores do Laboratório de Produtos Naturais: Profa. Dra. Maria Fátima, Prof. Dr. João Batista, Prof. Dr. Felipe Wouters e Profa. Dra. Vania Zuin. Agradeço também ao Prof. Dr. Arlindo Boiça-Jr e sua equipe do Laboratório de Plantas Resistentes à Insetos da Faculdade de Ciência Agrárias e Veterinárias da UNESP-Jaboticabal, em especial ao Dr. Carlos Alessandro de Freitas pela parceria no cultivo das plantas de algodão e realização dos ensaios biológicos desse trabalho. Por fim, agradeço as agências de fomento CNPq e FAPESP, pelos auxílios concedidos. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

O mestrado não foi a melhor época da minha vida, mas, com certeza, foi um período de muito crescimento, pessoal e profissional, em que pude me reconectar comigo mesma. Aproveitei muito a minha jornada e estou muito feliz e satisfeita com o caminho que trilhei até aqui.

LISTA DE ABREVIATURAS

ABA	Ácido abscísico
AOC	Aleno oxido ciclase
AOS	Aleno oxido sintase
AS	Ácido salicílico
BR	Brassinosteróides
CK	Citocininas
DAMP	<i>Damage-associated molecular pattern</i>
ET	Etileno
ETI	<i>Effector triggered immunity</i>
GA	Giberelina
GC-MS	<i>Gas Chromatography – Mass Spectroscopy</i>
LOX	Lipoxigenase
HAMP	<i>Herbivore-associated molecular patterns</i>
HS	<i>Headspace</i>
HS-GC-MS	<i>Headspace - Gas Chromatography - Mass Spectroscopy</i>
HTI	<i>HAMP-induced immunity</i>
JA	Ácido jasmônico
JAIIe	JA conjugado com o aminoácido isoleucina
MAMP	<i>Microbe-associated molecular patterns</i>
MeJA	Metil-jasmonato
MS	Metabólito secundário
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
PCA	<i>Principal Component Analysis</i>
PRR	<i>Pattern recognition receptors</i>
PTI	<i>PAMP-triggered immunity</i>
RDC	Resposta de defesa constitutiva
RDI	Resposta de defesa induzida
RNA	Ácido ribonucleico
WIR	<i>Wound-induced resistance</i>

LISTA DE TABELAS

TABELA 3.1: Codificação do planejamento fatorial composto central para as três variáveis utilizadas no desenvolvimento do método de extração via <i>headspace</i>	42
TABELA 3.2 – <i>Desenvolvimento do método de extração via HS</i> : Codificação dos experimentos do planejamento fatorial composto central realizado	43
TABELA 3.3: Programa de aquecimento do método de GC-MS.....	44
TABELA 3.4 - Genótipos de algodão estudados, origem e histórico de resistência dos genótipos. <i>Adaptado de FREITAS, C. A.⁸⁵</i>	45
TABELA 4.1 – Sinais-resposta obtidos no planejamento fatorial de experimentos composto central	58
TABELA 4.2 - ANOVA do modelo de regressão linear com todas os sinais-resposta maximizados	Erro! Indicador não definido.
TABELA 4.3 - Identificação experimental dos compostos orgânicos voláteis presentes nos genótipos de algodão estudados	62
TABELA 4.4 - Identificação experimental dos compostos presentes nos diferentes genótipos de algodão por HS-GC-MS.....	74
TABELA 4.5 - Identificação experimental dos compostos orgânicos voláteis presentes no genótipo de algodão BRS-286 por HS-GC/MS.....	77
TABELA 4.6 - Identificação experimental dos compostos orgânicos voláteis presentes no genótipo de algodão BRS-293 por HS-GC/MS.....	79
TABELA 4.7 - Identificação experimental dos compostos orgânicos voláteis presentes no genótipo de algodão BRS-335 por HS-GC/MS.....	82
TABELA 4.8 - Identificação experimental dos compostos orgânicos voláteis presentes no genótipo de algodão BRS-336 por HS-GC/MS.....	84
TABELA 4.9 - Identificação experimental dos compostos orgânicos voláteis presentes no genótipo de algodão FMT-709 por HS-GC/MS.....	87
TABELA 4.10 - Identificação experimental dos compostos orgânicos voláteis presentes no genótipo de algodão FM-910 por HS-GC/MS.....	89
TABELA 4.11 - Identificação experimental dos compostos orgânicos voláteis presentes no genótipo de algodão FM-993 por HS-GC/MS.....	92
TABELA 4.12 - Resumo das respostas metabolômicas do perfil químico de compostos voláteis dos genótipos que apresentaram respostas de resistência à <i>S. cosmioides</i> . Resultados das amostras induzidas em relação às plantas controle. ...	94
TABELA 4.13 - Identificação experimental dos compostos orgânicos voláteis presentes no genótipo de algodão Delta Opal por HS-GC/MS.	96
TABELA 4.14 - Identificação experimental dos compostos orgânicos voláteis presentes no genótipo de algodão FMT-701 por HS-GC/MS.....	99
TABELA 4.15 – Identificação experimental dos compostos presentes nos genótipos padrões de algodão por HS-GC-MS	104

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 - Modelo de reconhecimento químico vegetal de patógenos e herbívoros. [1] Padrões moleculares associados a microrganismos, patógenos e danos (PAMPs, MAMPs e DAMPs, respectivamente) detectados por receptores de reconhecimento padrão (PRRs) conduzindo a um processo de imunidade desencadeada PAMPs (PTI); [2] Supressores efetoras do PTI por patógenos; [3] Reconhecimento de efetores levando a imunidade ativada por efetor (ETI); [4] Reconhecimento de elicitores associados a oviposição ativando mecanismos de respostas defensivas; [5] Padrões moleculares associados a herbívoros putativos (HAMPs) que são reconhecidos pelos receptores tipo PRRs desencadeando a imunidade induzida HAMP (HTI); [6] Ferindo resulta na liberação de DAMPs e ativação da resistência induzida a injurias (WIR); [7] Moléculas do tipo efetoras de insetos podem suprimir o HTI e WIR; [8] Reconhecimento de moléculas do tipo efetoras de insetos levando a imunidade ativada por efetor (ETI). Elementos não caracterizados são indicados pelas linhas tracejadas. <i>Adaptado de KLOTH⁴</i>	17
FIGURA 1.2 – Possíveis reações em níveis bioquímicos e moleculares em células vegetais relacionados com mecanismos de resposta de defesa à fatores bióticos e abióticos. <i>Adaptado de CREELMAN⁸ e NAWROCKA¹¹</i>	20
FIGURA 1.3 - Equilíbrio estático no frasco de <i>headspace</i> e amostragem para análise. <i>Adaptado de HARRIES e colaboradores⁴⁸</i>	29
FIGURA 1.4 - Sistema inicial e pós-equilíbrio. <i>Adaptado de HARRIES e colaboradores⁴⁸</i>	31
FIGURA 1.5 – Lagarta de <i>Spodoptera cosmioides</i> . Fonte: Carlos Alessandro de Freitas, FCAV, UNESP-Jaboticabal.	38
FIGURA 3.1 - Esquema do procedimento experimental desenvolvido nesse trabalho.	40
FIGURA 3.2 - Plantas de algodão momentos antes da coleta. Fonte: A autora.....	47
FIGURA 3.3 – Tratamentos do estudo de indução de resistência nos padrões de resistência e suscetibilidade.....	49
FIGURA 3.4 - Plantas controle do genótipo FMT 701, em primeiro plano, e do genótipo Delta Opal ao fundo. Fonte: A autora.	50
FIGURA 3.5 - Aplicação por pulverização, com o auxílio de um borrifador, da solução de MeJA 200 μmolL^{-1} . Fonte: A autora.....	50
FIGURA 3.6 - Aplicação direta no solo, com auxílio de uma pipeta de Pasteur, da solução de MeJA 20 e 200 μmolL^{-1} . Fonte: A autora.....	51
FIGURA 3.7 - a) Genótipos padrão durante a indução por herbivoria de <i>S. cosmioides</i> . b) Lagarta <i>S. cosmioides</i> na folha de algodão durante o processo de indução. Fonte: Carlos Alessandro de Freitas, FCAV, UNESP-Jaboticabal.	52
FIGURA 3.8 - Genótipos padrão após a indução por herbivoria de <i>S. cosmioides</i> . a) FMT 701 b) Delta Opal. Fonte: A autora.	52
FIGURA 3.9 - Plantas submetidas ao estresse hídrico. a) Genótipo FMT 701. b) Genótipo Delta Opal. Fonte: A autora.....	53
FIGURA 3.10 - Placas de Petri [®] durante o teste de consumo da área foliar. Fonte: Carlos Alessandro de Freitas, FCAV, UNESP-Jaboticabal.	54
FIGURA 4.1 - Cromatograma com as condições ótimas de extração.	60
FIGURA 4.2 - Compostos orgânicos voláteis identificados nos 12 genótipos de algodão	63
FIGURA 4.3 – Cromatograma da análise da mistura padrão de n-alcenos de C7 a C40 no método de análise HS-GC-MS desenvolvido.....	64

FIGURA 4.4 – Análise hierárquica dos compostos voláteis <i>versus</i> genótipos estudados.....	65
FIGURA 4.5 - Amostras/Scores para os genótipos no estudo de Resistência Constitutiva.....	66
FIGURA 4.6 - Gráfico de Loadings dos perfis químicos dos genótipos de algodão – Resistência constitutiva.....	67
FIGURA 4.7 - Ensaio de não-preferência. Agrupamento hierárquico baseado na atratividade de lagartas de <i>Spodoptera cosmioides</i> para os genótipos de algodoeiro em testes com e se sem chance de escolha. Fonte: Carlos Alessandro de Freitas, FCAV, UNESP-Jaboticabal.	68
FIGURA 4.8 - Agrupamento hierárquico baseado no perfil químico <i>versus</i> a atratividade de lagartas de <i>Spodoptera cosmioides</i> . Tons mais quentes indicam maior concentração do composto, enquanto tons mais frios indicam menor concentração.....	69
FIGURA 4.9 – Ensaio de não-preferência. Área foliar consumida (cm ²) por lagartas de <i>Spodoptera cosmioides</i> em diferentes genótipos de algodoeiro em teste com e sem chance de escolha. Fonte: Carlos Alessandro de Freitas, FCAV, UNESP-Jaboticabal.	70
FIGURA 4.10 - Compostos orgânicos voláteis identificados nos 12 genótipos de algodão no Experimento II – Resistência Induzida por herbivoria de <i>S. cosmioides</i> .73	
FIGURA 4.11 - Área foliar consumida (AFC, cm ²) por lagartas de 3 ^o ínstar de <i>Spodoptera cosmioides</i> em diferentes cultivares de algodão com indução de resistência através de herbivoria. Letras iguais minúsculas verticalmente e maiúsculas horizontalmente não diferem entre si pelo teste de <i>Tukey</i> ($p < 0,05$). Fonte: Carlos Alessandro de Freitas, FCAV, UNESP-Jaboticabal ¹⁰²	75
FIGURA 4.12 - Cromatogramas da análise por HS-GC/MS das amostras controle de folhas de algodão BRS-286.....	76
FIGURA 4.13 - Cromatogramas da análise por HS-GC/MS das amostras de folhas de algodão do genótipo BRS-286 induzidas por herbivoria.	76
FIGURA 4.14 - Análise de Componente Principal (PCA) das amostras induzidas por herbivoria (1-3) e amostras controle (4-6) do genótipo 1, BRS-286, de algodão. a) Escores; b) Loadings.....	78
FIGURA 4.15 - Cromatogramas da análise por HS-GC/MS das amostras controle de folhas de algodão BRS-293.....	78
FIGURA 4.16 - Cromatogramas da análise por HS-GC/MS das amostras de folhas de algodão do genótipo BRS-293 induzidas por herbivoria.	79
FIGURA 4.17 - Análise de Componente Principal (PCA) das amostras induzidas por herbivoria (1-3) e amostras controle (4-6) do genótipo 2, BRS-293, de algodão. a) Escores; b) Loadings.....	80
FIGURA 4.18 - Cromatogramas da análise por HS-GC/MS das amostras controle de folhas de algodão BRS-335.....	81
FIGURA 4.19 - Cromatogramas da análise por HS-GC/MS das amostras de folhas de algodão do genótipo BRS-335 induzidas por herbivoria.	81
FIGURA 4.20 - Análise de Componente Principal (PCA) das amostras induzidas por herbivoria (1-3) e amostras controle (4-6) do genótipo 3, BRS-335, de algodão. a) Escores; b) Loadings.....	83
FIGURA 4.21 - Cromatogramas da análise por HS-GC/MS das amostras controle de folhas de algodão BRS-336.....	83
FIGURA 4.22 - Cromatogramas da análise por HS-GC/MS das amostras de folhas de algodão do genótipo BRS-336 induzidas por herbivoria.	84

FIGURA 4.23 - Análise de Componente Principal (PCA) das amostras induzidas por herbivoria (1-3) e amostras controle (4-6) do genótipo 4, BRS-336, de algodão. a) Escores; b) Loadings.....	85
FIGURA 4.24 - Cromatogramas da análise por HS-GC/MS das amostras controle de folhas de algodão FMT-709.....	86
FIGURA 4.25 - Cromatogramas da análise por HS-GC/MS das amostras de folhas de algodão do genótipo FMT-709 induzidas por herbivoria de <i>S. cosmioides</i>	86
FIGURA 4.26 - Análise de Componente Principal (PCA) das amostras induzidas por herbivoria (1-3) e amostras controle (4-6) do genótipo 10, FMT-709, de algodão. a) Escores; b) Loadings.....	88
FIGURA 4.27 - Cromatogramas da análise por HS-GC/MS das amostras controle de folhas de algodão FM-910.....	88
FIGURA 4.28 - Cromatogramas da análise por HS-GC/MS das amostras de folhas de algodão do genótipo FM-910 induzidas por herbivoria de <i>S. cosmioides</i>	89
FIGURA 4.29 - Análise de Componente Principal (PCA) das amostras induzidas por herbivoria (1-3) e amostras controle (4-6) do genótipo 11, FM-910, de algodão. a) Escores; b) Loadings.....	90
FIGURA 4.30 - Cromatogramas da análise por HS-GC/MS das amostras controle de folhas de algodão FM-993.....	91
FIGURA 4.31 - Cromatogramas da análise por HS-GC/MS das amostras de folhas de algodão do genótipo FM-993 induzidas por herbivoria de <i>S. cosmioides</i>	91
FIGURA 4.32 - Análise de Componente Principal (PCA) das amostras induzidas por herbivoria (1-3) e amostras controle (4-6) do genótipo 12, FM-993, de algodão. a) Escores; b) Loadings.....	93
FIGURA 4.33 - Cromatogramas da análise por HS-GC/MS das amostras controle de folhas de algodão Delta Opal.	95
FIGURA 4.34 - Cromatogramas da análise por HS-GC/MS das amostras de folhas de algodão do genótipo Delta Opal induzidas por herbivoria de <i>S. cosmioides</i>	96
FIGURA 4.35 - Análise de Componente Principal (PCA) das amostras induzidas por herbivoria (1-3) e amostras controle (4-6) do genótipo 7, Delta Opal, de algodão. a) Escores; b) Loadings.....	97
FIGURA 4.36 - Cromatogramas da análise por HS-GC/MS das amostras controle de folhas de algodão FMT-701.....	98
FIGURA 4.37 - Cromatogramas da análise por HS-GC/MS das amostras de folhas de algodão do genótipo FMT-701 induzidas por herbivoria de <i>S. cosmioides</i>	98
FIGURA 4.38 - Análise de Componente Principal (PCA) das amostras induzidas por herbivoria (1-3) e amostras controle (4-6) do genótipo 8, FMT-701, de algodão. a) Escores; b) Loadings.....	100
FIGURA 4.39 - Perfis químicos das induções no genótipo Delta Opal.....	102
FIGURA 4.40 - Perfis químicos das induções no genótipo FMT 701	103
FIGURA 4.41 – Gráficos de amostras/scores para os seis tratamentos para o genótipo Delta Opal.....	106
FIGURA 4.42 - Gráficos de amostras/scores para os seis tratamentos para o genótipo FMT 701.	107
FIGURA 4.43 - Área foliar consumida (cm ²) por lagartas de 3 ^o ínstar de <i>Spodoptera cosmioides</i> em diferentes tratamentos de indução de resistência em cultivares de algodão. * O tratamento apresenta diferença significativa pelo teste t (P < 0,05). ^{ns} O tratamento não apresenta diferença significativa pelo teste t (P < 0,05).	108
FIGURA 4.44 - Índice de atratividade (IA) por lagartas de 3 ^o ínstar de <i>Spodoptera cosmioides</i> em diferentes tratamentos para indução de resistência em cultivares de	

algodão. $IA \pm E.P. > 1$ repelência pelo tratamento em relação ao controle; $IA \pm E.P. < 1$ preferência pelo tratamento em relação ao controle; $IA \pm E.P. = 1$ neutralidade. 109	
FIGURA 4.45 – Gráfico de Scores/Amostras para o tratamento (I) MeJA 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ pulverizado para o genótipo Delta Opal	110
FIGURA 4.46 - Gráfico de Loadings/Variáveis para o tratamento (I) MeJA 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ pulverizado para o genótipo Delta Opal	111
FIGURA 4.47 - <i>Volcano Plot</i> para as amostras controle <i>versus</i> Tratamento (I) para o genótipo Delta Opal. Compostos em azul indicam menor concentração nas amostras induzidas (<i>down regulation</i>), enquanto compostos em vermelho indicam maior concentração (<i>up regulation</i>).....	112
FIGURA 4.48 - Gráfico de Scores/Amostras para o tratamento (I) MeJA 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ pulverizado para o genótipo FMT 701	113
FIGURA 4.49 - Gráfico de Loadings/Variáveis para o tratamento (I) MeJA 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ pulverizado para o genótipo FMT 701	114
FIGURA 4.50 - <i>Volcano Plot</i> para as amostras controle <i>versus</i> Tratamento (I) para o genótipo FMT 701	114
FIGURA 4.51 - Gráfico de Scores/Amostras para o tratamento (V) Herbivoria de <i>Spodoptera cosmioides</i> para o genótipo FMT 701	115
FIGURA 4.52 - Gráfico de Loadings/Variáveis para o tratamento (V) Herbivoria de <i>Spodoptera cosmioides</i> para o genótipo FMT 701	116
FIGURA 4.53 - <i>Volcano Plot</i> para as amostras controle <i>versus</i> Tratamento (V) Herbivoria de <i>Spodoptera cosmioides</i> para o genótipo FMT 701.....	117
FIGURA 4.54 - Gráfico de Scores/Amostras para o tratamento (IV) Herbivoria combinada com aplicação direta de MeJA 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ no solo para o genótipo FMT 701	118
FIGURA 4.55 - Gráfico de Loadings/Variáveis para o tratamento (IV) Herbivoria combinada com aplicação direta de MeJA 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ no solo para o genótipo FMT 701	118
FIGURA 4.56 - <i>Volcano Plot</i> para as amostras controle <i>versus</i> Tratamento (IV) Herbivoria combinada com aplicação direta de MeJA 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ no solo para o genótipo FMT 701	119
FIGURA 4.57 - Número médio de lagartas de <i>Spodoptera cosmioides</i> ao longo do tempo presente nos discos foliares de genótipos de algodão com pulverização de α -pineno, em testes com e sem chance de escolha.....	121
FIGURA 4.58 - Índice de atratividade de lagartas de <i>Spodoptera cosmioides</i> para genótipos de algodão com pulverização de α -pineno, em testes com e sem chance de escolha.....	122
FIGURA 4.59 - Área foliar consumida (cm^2) por lagartas de <i>Spodoptera cosmioides</i> em genótipos de algodão com pulverização de α -pineno, em testes com e sem chance de escolha.	122

RESUMO

ESTUDO METABOLÔMICO DOS CONSTITUINTES VOLÁTEIS DE ALGODOEIRO SUBMETIDO À INTERAÇÕES BIÓTICAS E ABIÓTICAS E MECANISMOS DE INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA. As plantas desenvolveram várias estratégias de defesa contra a herbivoria sendo, uma delas, respostas de defesas induzidas que representa a biossíntese de moléculas fitotóxicas mediante ataque. Os mecanismos de resistência de uma planta podem ser classificados de acordo com suas interações com o inseto-praga como resistência frente a antibiose e a não-preferência. A emissão de compostos orgânicos voláteis vem sendo estudada como um dos mecanismos de comunicação entre planta-planta e, também, como resposta de defesa à herbivoria. O estudo dos componentes voláteis do algodoeiro (*Gossypium hirsutum*) submetido a interações bióticas (herbivoria por *Spodoptera cosmioides*) e abióticas (metil-jasmonato, α -pineno e estresse hídrico) se apresenta como uma estratégia nesse trabalho de busca do conhecimento dos mecanismos de respostas podendo colaborar com novas propostas e políticas de manejo agrícola sustentável de controle de insetos praga. Para isso, o perfil metabolômico volátil de plantas de algodão submetidas a diferentes estresses bióticos e abióticas foram avaliados por técnicas cromatográficas e espectrométricas (HS-GC-MS) em comparação com dados comportamentais do inseto modelo. Foi observado a produção acentuada dos compostos voláteis Hexanal, 2-Hexenal, α -Pineno, β -Pineno, β -Mirceno, Limoneno e Cariofileno após a indução de resistência, bem como a diminuição da produção de β -Ocimeno. Esses resultados indicam a ativação de duas rotas principais para a indução de resistência: formação de compostos voláteis de folhas frescas a partir a oxidação da membrana vegetal, que geram a biossíntese DE NOVO de compostos orgânicos voláteis, e a rota de biossíntese de heliocides, que atuam na diminuição da palatabilidade das folhas. O perfil químico das plantas com resistência induzida foi capaz de repelir significativamente a ação da lagarta *Spodoptera cosmioides*, indicando que essas estratégias apresentam grande potencial para o manejo agrícola sustentável, além de fornecer informações que contribuem para o conhecimento das interações inseto-planta.

Palavras chaves: *Gossypium hirsutum*, *Spodoptera cosmioides*, Metil-jasmonato, α -pineno, Planejamento fatorial, Análise de Componentes Principais (PCA), HS-GC-MS.

ABSTRACT

METABOLOMIC STUDY OF VOLATILES ORGANIC COMPOUNDS FROM PLANT COTTON SUBMITTED TO BIOTIC AND ABIOTIC INTERACTIONS AND RESISTANCE INDUCTION MECHANISMS. Plants have developed several defense strategies against herbivory, one of which is the response of induced defenses that represents the biosynthesis of phytotoxic molecules through attack. Plant resistance mechanisms can be classified according to its interactions with the insect pest as resistance to antibiosis and non-preference. The emission of volatile organic compounds has been studied as one of the communication mechanisms between plants and plants and, also, as a defense response to herbivory. The study of the volatile components of cotton (*Gossypium hirsutum*) submitted to biotic interactions (herbivory by *Spodoptera cosmioides*) and abiotic interactions (methyl-jasmonate, α -pinene and water stress) is showed as a strategy in this work to search for knowledge of the response mechanisms. It can be able to collaborate with new proposals and policies for sustainable agricultural management of insect pest control. For this, the volatile metabolomic profile of cotton plants submitted to different biotic and abiotic stresses were evaluated by chromatographic and spectrometric techniques (HS-GC-MS) in comparison with behavioral data from the model insect. It was observed the marked production of the volatile compounds Hexanal, 2-Hexenal, α -Pinene, β -Pinene, β -Mircene, Limonene and Caryophyllene after resistance induction, as well as the decrease in the production of β -Ocimene. These results indicate the activation of two main routes for resistance induction: formation of volatile compounds from fresh leaves from the oxidation of the plant membrane, which generate the biosynthesis DE NOVO volatile organic compounds, and the Helicoides biosynthesis route, which act to decrease palatability. of the leaves. The chemical profile of plants with induced resistance was able to significantly repel the action of the *Spodoptera cosmioides* caterpillar. It was showed, then, that these strategies have great potential for sustainable agricultural management, in addition to providing information that contributes to the knowledge of insect-plant interactions.

Key words: *Gossypium hirsutum*, *Spodoptera cosmioides*, Methyl-jasmonate, α -pinene, Principal Component Analysis, HS-GC-MS.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
1.1	MECANISMOS DE DEFESA VEGETAL	16
1.2	RESISTÊNCIA DOS CULTIVARES.....	21
1.3	COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS	24
1.4	MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS.....	33
1.5	PLANTA MODELO: ALGODÃO	36
1.6	INSETO MODELO: <i>Spodoptera cosmioides</i> (Walker)	37
2	OBJETIVOS.....	39
2.1	OBJETIVOS GERAIS	39
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
3	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	40
3.1	DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO HS	42
3.2	EXPERIMENTO I: RESISTÊNCIA CONSTITUTIVA.....	45
3.3	EXPERIMENTO II: RESISTÊNCIA INDUZIDA POR HERBIVORIA	47
3.4	EXPERIMENTO III: RESISTÊNCIA INDUZIDA POR FATORES BIÓTICOS E ABIÓTICOS	49
	I. Tratamento MeJA 200 μmolL^{-1} por pulverização.....	50
	II. Tratamento MeJA 20 μmolL^{-1} solo	51
	III. Tratamento MeJA 200 μmolL^{-1} solo.....	51
	IV. Tratamento Herbivoria + MeJA 200 μmolL^{-1} solo	51
	V. Tratamento Herbivoria	52
	VI. Tratamento Estresse hídrico.....	53
3.5	EXPERIMENTO IV: RESISTÊNCIA INDUZIDA POR α -PINENO.....	55
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
4.1	MÉTODO DE EXTRAÇÃO HS	57
4.2	EXPERIMENTO i: RESISTÊNCIA CONSTITUTIVA.....	62
4.3	EXPERIMENTO II: RESISTÊNCIA INDUZIDA POR HERBIVORIA	72
4.4	EXPERIMENTO III: RESISTÊNCIA INDUZIDA POR FATORES BIÓTICOS E ABIÓTICOS	101

4.5	experimento IV: resistência INDUZIDA POR α -pineno.....	121
5	CONCLUSÕES.....	124
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	126
	APÊNDICE A – Planejamento fatorial	137
	APÊNDICE B – Experimento I: Resistência Constitutiva - Cromatogramas.....	158
	APÊNDICE C – Experimento I: Resistência Constitutiva – Espectros de massas ..	170
	APÊNDICE D – Experimento II: Resistência Induzida - Cromatogramas.....	179
	APÊNDICE E – Experimento III: Resistência Induzida por fatores bióticos e abióticos - PCA.....	185
	APÊNDICE F – Experimento III: Resistência Induzida por fatores bióticos e abióticos – <i>Volcano Plot</i>	197

1 INTRODUÇÃO

1.1 MECANISMOS DE DEFESA VEGETAL

Ao longo do processo evolutivo, os organismos vegetais desenvolveram várias estratégias de defesa contra a herbivoria de insetos em vista de garantirem a sua sobrevivência. Esses mecanismos são principalmente divididos entre respostas de defesa constitutivas (**RDCs**) e respostas de defesas induzidas (**RDIs**)¹. As RDCs incluem mecanismos de defesa sempre presentes, muitas vezes específicos para grupos taxonômicos que podem ocorrer como compostos de estocagem conjugados para reduzir a toxicidade, ou ainda como precursores ativos que podem ser facilmente ativados em caso de injúria. A grande maioria dos metabólitos secundários estão relacionados com as RDCs. Já os mecanismos de RDIs somente iniciam após a ocorrência de danos como, por exemplo, a herbivoria, com a ativação de genes e expressão proteica que irão resultar na produção quase imediata de metabólitos secundários de defesa.^{1; 2; 3}

Por sua vez, os mecanismos de reconhecimento de herbivoria pelas plantas podem ocorrer via sinais mecânicos e químicos. Um reconhecimento inicial é necessário para se obter uma resposta de defesa adequada contra uma ameaça biótica. Os agentes patogênicos são reconhecidos quando padrões conservados de moléculas microbianas chamadas “padrões moleculares associados a microrganismos, ou patógenos” (*microbe- ou pathogen-associated molecular patterns*; **MAMPs** ou **PAMPs**, respectivamente, [1]) são detectados por receptores de reconhecimento padrão (*pattern recognition receptors*; **PRRs**) na superfície da célula da planta, conduzindo a um processo de imunidade desencadeada pelo PAMP (*PAMP-triggered immunity*; **PTI**, [2]) (FIGURA 1.1).²

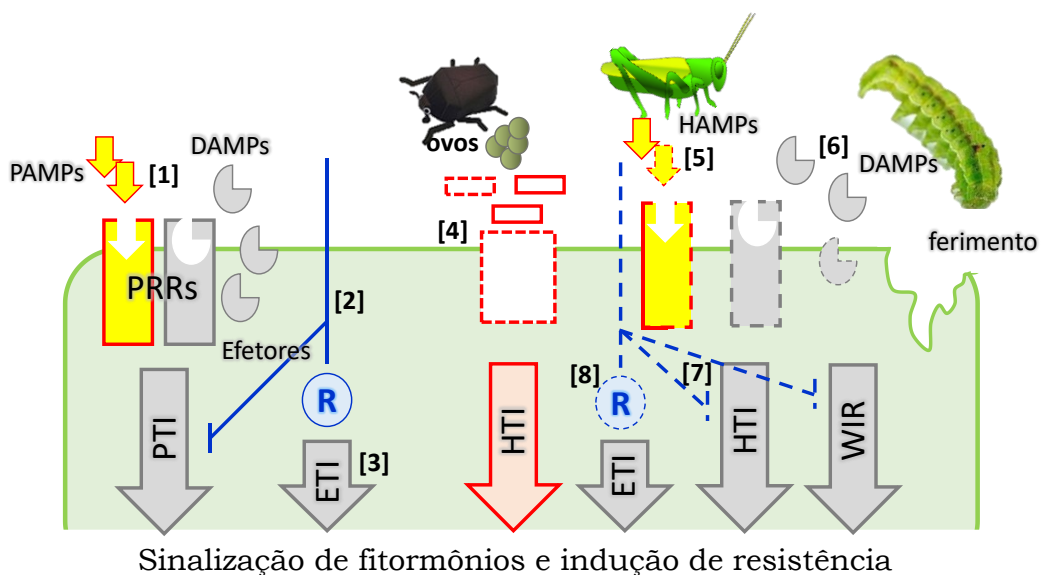


FIGURA 1.1 - Modelo de reconhecimento químico vegetal de patógenos e herbívoros. [1] Padrões moleculares associados a microrganismos, patógenos e danos (PAMPs, MAMPs e DAMPs, respectivamente) detectados por receptores de reconhecimento padrão (PRRs) conduzindo a um processo de imunidade desencadeada PAMPs (PTI); [2] Supressores efetoras do PTI por patógenos; [3] Reconhecimento de efetores levando a imunidade ativada por efector (ETI); [4] Reconhecimento de elicitors associados a oviposição ativando mecanismos de respostas defensivas; [5] Padrões moleculares associados a herbívoros putativos (HAMPs) que são reconhecidos pelos receptores tipo PRRs desencadeando a imunidade induzida HAMP (HTI); [6] Ferimento resulta na liberação de DAMPs e ativação da resistência induzida a injurias (WIR); [7] Moléculas do tipo efetoras de insetos podem suprimir o HTI e WIR; [8] Reconhecimento de moléculas do tipo efetoras de insetos levando a imunidade ativada por efector (ETI). Elementos não caracterizados são indicados pelas linhas tracejadas. *Adaptado de KLOTH⁴*

Os padrões moleculares associados aos danos (*damage-associated molecular patterns*; DAMPs) resultam em moléculas endógenas produzidas pela planta após o dano, através dos mecanismos de RDCs e RDIs, que também são reconhecidas pelos PRRs para desencadear novas reações de defesa. Todavia, patógenos como exemplo, também apresentam mecanismos de contra-defesa ao sistema de resposta da planta, produzindo e liberando, por exemplo, proteínas efetoras dentro da célula vegetal hospedeira suprimindo a PTI.² As proteínas efetoras podem desencadear uma série de processos na célula hospedeira, incluindo interações proteína-proteína, acionamento de proteínas quinases ativadas por mitógenos, metabolismo de RNA, secreção de proteínas, etc., perdendo o hospedeiro a capacidade de se defender.⁵ Por sua vez, alguns genótipos contem proteínas de resistência a doenças (**R**) que reconhecem

especificamente patógenos efetores, resultando na imunidade ativada por efector (*effector triggered immunity*; **ETI**, [3]) (FIGURA 1.1).² Assim, o modelo PTI/ETI permite a identificação molecular de ligantes e receptores envolvidos nos mecanismos específicos de reconhecimento das interações planta-patógeno sendo, em geral, PTI baseado no reconhecimento não específico de moléculas microbianas comuns, enquanto ETI é desencadeado por compostos altamente específicos de agentes patogénicos [8].²

O conhecimento do modelo PTI/ETI pode ser transposto para a investigação destinada a elucidar a especificidade do reconhecimento em interações planta-herbívoros. Em comparação com patógenos, insetos são organismos multicelulares altamente complexos, com vários estilos de vida e padrões de comportamento. Assim, pistas que emanam desses padrões podem ser utilizadas pela planta para reconhecer o perigo de herbívoros e para montar respostas defensivas adequadas.

Geralmente, o primeiro contato da planta com o herbívoro acontece quando inseto pousa/caminha sobre a superfície da folha. Essa caminhada resulta na quebra de tricomas e na liberação de compostos químicos, devido à pressão exercida sobre a superfície celular, ativando assim, quimicamente e/ou mecanicamente, os mecanismos de defesa da planta. Simultaneamente pode ocorrer a ativação da produção de ácido jasmônico (**JA**) que resulta em um mecanismo de defesa similar aos DAMPs.⁶

Outro padrão de reconhecimento da planta quanto a presença de herbívoros é a oviposição. Durante a oviposição compostos são liberados que podem atuar similarmente aos MAMPs e, também produzir necrose/ferimento no tecido vegetal desencadeando os mecanismos de defesa, permitindo a planta se defender do ataque do herbívoro. Similarmente às proteínas efectoras produzidas por patógenos na representação PTI/ETI, [4], efetores de oviposição podem ser liberados pelos herbívoros neutralizando a resposta imunológica da planta.

Por sua vez, a herbivoria resulta na quebra da integridade do tecido vegetal disparando diversos mecanismos de resistência induzida por injúrias (*wound-induced resistance*; **WIR**, [6]). Diversos estudos demonstram que, em resposta a injúrias, as plantas desencadeiam respostas de defesa química com a produção de inseticidas. Esses compostos são reconhecidos pelos PRRs sendo

conceitualmente definidos como DAMPs. Um padrão secundário de reconhecimento de herbivoria por plantas é o reconhecimento de compostos liberados pelos insetos durante a alimentação (elicitores) sendo nomeados como padrões moleculares associados a herbívoros (*herbivore-associated molecular patterns*; HAMPs) que são reconhecidos pelos PRRs desencadeando a imunidade induzida HAMP (HAMP-induced immunity; HTI, [5]).² A FIGURA 1.1 ilustra os principais padrões de reconhecimento molecular vegetal.

Uma vez sob ataque as plantas usam diferentes sinalizadores em cascata para reprogramar seus fenótipos. Embora o modelo de resposta possa ser induzido por interações muito específicas, as plantas geralmente possuem rotas bioquímicas de resposta comuns para a ativação enzimática e produção de metabólitos secundários de defesa⁷. Um dos mecanismos de resposta já bastante estudados e conhecido é o mecanismo de sinalização em cascata de longa distância do JA e derivados como o metil-jasmonato (**MeJA**) e o fitormônio de injúria do JA conjugado com o aminoácido isoleucina (**JA-Ile**) sendo um dos principais reguladores da resistência das plantas contra herbívoros e vários agentes patogênicos^{8; 9}.

A presença de insetos ou patógenos induzem a biossíntese do JA (ativação específica ou não-específica) através da produção de elicitores, como carboidratos e peptídeos, e moléculas de sinalização sistêmica que interagem com receptores específicos da membrana plasmática. Por exemplo, elicitores peptídicos sistêmicos induzem o gene responsivo ao jasmonato, **pinII**, em baixas concentrações. Esse mecanismo, ainda descreve a liberação de ácido linolênico a partir de lipídeos da membrana plasmática por ação de lipase com a conversão subsequente dos ácidos graxos em JA por ação de lipoxigenase (LOX) citosólicas, aleno óxido sintase (AOS), aleno óxido ciclase (AOC) e 12-oxo-PDA redutase. Após a redução, e três outras etapas de β -oxidação o JA é obtido (FIGURA 1.2)^{8; 10}. O JA pode ser catabolizado levando a formação do MeJA e outros compostos, que podem resultar em metabólitos secundários responsáveis por diversas atividades biológicas. Portanto, os aumentos no nível de JA mediados pelos indutores não resulta em acúmulo desse metabólito ou mesmo na liberação do JA-conjugados, mas sim na biossíntese *DE NOVO* de metabólitos secundários (FIGURA 1.2)¹⁰. Alternativamente, ferimentos podem misturar as enzimas hidrolíticas, lípidos, ou

ácidos graxos localizados em vacúolos, plastídios e citoplasma, também resultando na biossíntese do JA⁸.

O JA, não é o único fitormônio envolvido em fatores de transcrição de genes de defesa vegetal. Outros fitormônios como ácido salicílico (**SA**), etileno (**ET**), auxina, ácido abscísico (**ABA**), giberelinas (**GA**), citocininas (**CK**) e brassinosteróides (**BR**) não apenas sinalizam para os mecanismos de resistência e estresses, mas também modulam a rota biossintética do JA e vice-versa. Deste modo, o JA e seus derivados representam uma das vias de sinalização que modula, juntamente com outros fitormônios, a indução de resistência em plantas contra, por exemplo, insetos. Todavia, ainda não é bem claro como as plantas ajustam seus mecanismos de respostas específicas à herbívoro a partir dos fitormônios. Alguns estudos indicam que a especificidade pode ser alcançada através da interferência de um fitormônio na rota biossintética do outro. De fato, as alterações induzidas pelo JA na expressão de genes tipicamente dependem do contexto em que o hormônio é percebido. Por exemplo, os fitormônios SA e ET podem alterar as respostas de defesa mediadas pelo JA e resistência contra herbívoros. O SA antagonista a resistência induzida pelo JA, enquanto, o ET pode apresentar ambos os efeitos, positivo ou negativo².

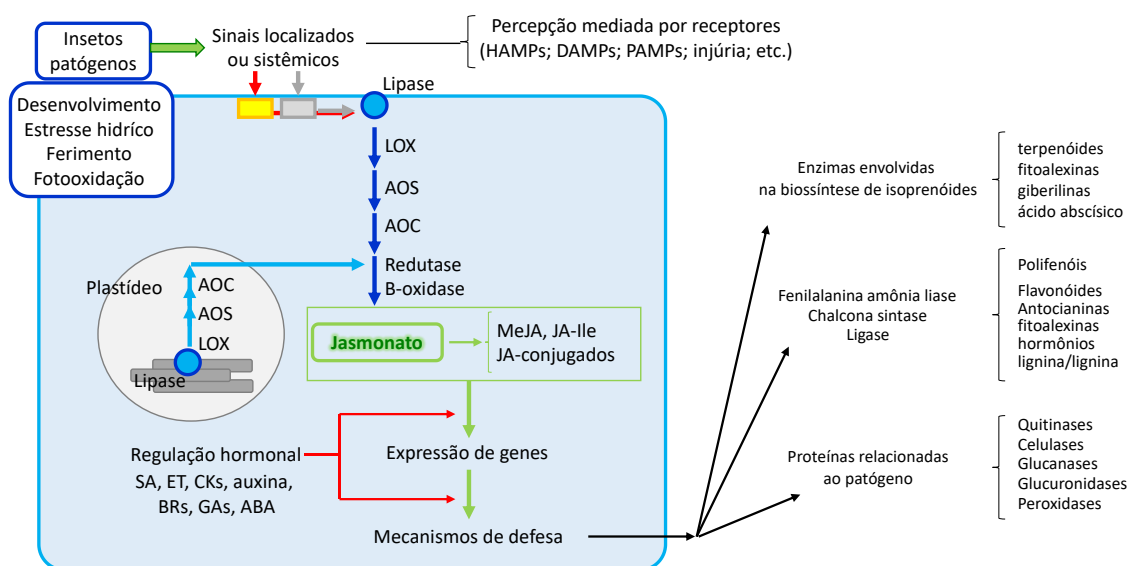


FIGURA 1.2 – Possíveis reações em níveis bioquímicos e moleculares em células vegetais relacionados com mecanismos de resposta de defesa à fatores bióticos e abióticos. *Adaptado de CREELMAN⁸ e NAWROCKA¹¹.*

Entre os fitormônios, diversos trabalhos na literatura demonstram resultados de aplicações exógenas do JA e seus derivados atuando como elicitores no estímulo/indução de respostas em plantas que são normalmente induzidos por insetos ou patógenos¹². Entre as respostas mais comumente observadas há a indução de uma extensa quantidade de metabólitos secundários (MSs) tais como alcaloides, terpenóides, flavonoides, cumarinas, estilbenóides, ácidos hidroxicinâmicos, etc¹³.

1.2 RESISTÊNCIA DOS CULTIVARES

As estratégias de defesa em nível genético, a partir da expressão proteica de genes para a produção de compostos e expressão de características fenotípicas que conferem resistência, se apresentam em nível macro como a resposta entomológica de defesa e, na ausência dessas estratégias, como resposta entomológica de suscetibilidade. É dessa maneira que se denominam os genótipos de cultivares de milho, soja ou algodão, por exemplo, como resistentes e/ou susceptíveis.^{14,14; 15}

Uma espécie de planta é considerada resistente quando sofre menor injúria de um inseto em comparação à outras plantas, consideradas suscetíveis em iguais condições. O grau de resistência de uma espécie ou gênero de planta é expressa em relação a uma espécie de inseto ou a um gênero de insetos, denominadas como resistência específica ou generalista, respectivamente. Para se determinar a resistência ou suscetibilidade de um cultivar são conduzidos estudos que buscam entender dois mecanismos principais: resistência a antibiose e a não-preferência ou antixenose.^{14,16, 17}

O mecanismo de antibiose mostra o quão saudável a planta é para a biologia do inseto, isto é, se o consumo da planta causa danos ou não ao desenvolvimento do inseto ao longo de suas gerações¹⁴. Uma planta resistente a determinado inseto ou grupo de insetos é aquela em que o seu consumo causa danos na geração atual e/ou nas gerações seguintes. Esse tipo de resistência é mensurado a partir da fisiologia do inseto ou sua performance, como a taxa de fertilidade e o tempo de desenvolvimento larval. É baseado em características intrínsecas, físicas e químicas, das espécies de plantas e, também, dos seus genótipos que guiam a

resposta fisiológica do herbívoro¹⁶. Bem como, o perfil químico de voláteis emitido pela espécie vegetal.¹⁸

POTENZA e VIANA¹⁷ identificaram que os genótipos de milho resistentes a lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*), CMS 14C e, em menor intensidade, CMS 24 e CMS 23, apresentaram mecanismos de resistência por antibiose. Os resultados mostraram que o consumo desses genótipos pelas lagartas influenciou negativamente a biologia das gerações subsequentes, especialmente em relação à massa, comprimento e largura da cápsula cefálica das lagartas. NHAMUCHO e colaboradores¹⁹ estudaram os mecanismos de resistência de 17 genótipos de milho contra o gorgulho-do-milho (*Sitophilus zeamais*) e identificaram que os genótipos resistentes, que também apresentam alta concentração proteica, causaram alta taxa de mortalidade dos insetos e menor taxa de reprodução em relação aos genótipos suscetíveis.

O mecanismo de resistência por não-preferência, por sua vez, ocorre quando as características intrínsecas das espécies de planta são determinantes na escolha do inseto para alimentação ou abrigo, por exemplo¹⁴. É o tipo de mecanismo que quantifica os danos sofridos pela planta a partir da herbivoria ou a quantidade de herbívoros que a planta atrai. Dessa forma, a não-preferência é mensurada de acordo com a presença do inseto, por meio do número de ovos, larvas ou adultos, por exemplo, e com o dano causado, por meio da porcentagem de área foliar consumida.¹⁶ A resistência por não-preferência é governada por três características fenotípicas principais: morfológicas, físicas e/ou químicas¹⁴. As características morfológicas do espécime vegetal, tais como espessura da folha e pelos, podem atrair ou repelir os insetos.

Uma planta pode apresentar resistência por não-preferência à algum herbívoro por causas morfológicas quando alguma característica estrutural da espécie vegetal influencia no comportamento do inseto em relação à herbivoria ou oviposição. TOSCANO e colaboradores²⁰, por exemplo, identificaram que a presença de pelos e tricomas em alta densidade nas folhas de tomateiro do genótipo Santa Clara estimularam a oviposição da mosca-branca (*Bemisia tabaci*) biótipo B. A presença ou ausência de elevadas quantidades de cera epicuticular nas folhas também se apresenta como uma característica morfológica muito relevante para determinar a resistência à determinados insetos. EIGENBRODE²¹

verificou que altos níveis de cera dificultam a herbivoria de artrópodes devido à barreira física. Porém, as respostas são diferentes em cada espécie de herbívoro, visto que os resultados encontrados por MORAES²² mostram que a maior taxa de herbivoria de lagartas de *Spodoptera frugiperda* foi observada para os genótipos de couve com maior concentração de cera epicuticular.

A presença de metabólitos secundários nas plantas e a sua liberação ao ambiente, compostos orgânicos voláteis, por exemplo, é um fator químico determinante para a resistência por não-preferência. Assim, quando submetidas ao ataque de herbívoros, as plantas produzem e emitem compostos voláteis que podem repelir o invasor e/ou promover a atração de inimigos naturais, tanto em localidades aéreas, quanto em áreas subterrâneas da planta²³. Nesse sentido, a resistência ou suscetibilidade em relação a não-preferência de determinado genótipo é um fator importante que contribui com a sua sobrevivência, seja para repelir insetos invasores ou para atrair inimigos naturais.

RAGHAVA e colaboradores²⁴ estudaram os mecanismos de resistência mediado por compostos orgânicos voláteis de 5 genótipos de tomate (*Solanum lycopersicum* Mill.) em relação a herbivoria de *Spodoptera litura* Fab.. Os autores identificaram que a herbivoria induziu a produção de compostos voláteis, em sua maioria constituído por monoterpenos (65%), seguido por sesquiterpenos (15%) e aldeídos (10%). Contudo, foram observadas diferenças significativas entre o perfil químico dos compostos voláteis das plantas induzidas em relação à controle: as plantas induzidas apresentaram aumento significativo na emissão das classes de compostos supracitados, o que conferiu maior resistência à quatro dos cinco genótipos ensaiados.

Cada um dos mecanismos de resistência é, portanto, centrado em cada um dos indivíduos da interação inseto-planta. Enquanto, a antibiose busca identificar e mensurar os efeitos da alimentação de determinada espécie de planta no inseto, a não-preferência pretende identificar nas plantas os danos e resultados causados pelo contato com o inseto.

1.3 COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS

Os compostos orgânicos voláteis (COV) são empregados em diversas funcionalidades ecológicas: possibilitam a comunicação entre plantas e o meio ambiente em geral e oferecem às plantas mecanismos de defesa contra agentes de estresse. Os COV protegem a planta contra agentes abióticos, como a oxidação e calor excessivo e protegem as plantas contra agentes bióticos, como ataque de microrganismos e insetos. Eles também auxiliam na reprodução das plantas, tendo em vista que atraem polinizadores e animais disseminadores de sementes²⁵.

As plantas ao serem submetidas ao ataque de herbívoros produzem e emitem COV que podem repelir o invasor e/ou promover a atração de inimigos naturais, tanto em localidades aéreas, quanto em áreas subterrâneas da planta. Além disso, eles auxiliam a interação planta-planta, uma vez que a emissão dos COV na atmosfera, após a herbivoria, por exemplo, auxilia as plantas próximas à planta atacada a se prepararem para um possível ataque. Ou seja, as plantas vizinhas ativam os mecanismos de defesa para responder mais rapidamente e/ou agressivamente em futuros casos de estresse²³.

Portanto, a compreensão dos COV emitidos pelas plantas e seus efeitos sobre os insetos se apresenta como uma ferramenta para o desenvolvimento de estratégias de controle de praga. Este conhecimento pode contribuir para o desenvolvimento de estratégias que visam minimizar problemas com pragas agrícolas de uma maneira não-agressiva ao meio ambiente²⁵.

Os benefícios dos componentes dos óleos essenciais de vários organismos vegetais têm sido amplamente estudados e aplicados. GONZALEZ e colaboradores²⁶, por exemplo, testaram a capacidade inseticida do óleo essencial de *Eugenia sulcata*, constituído majoritariamente de β -cariofileno (24,6%), α -pineno (17,2%) e β -pineno (10,9%), e obtiveram um aumento da mortalidade de *O. fasciatus* e *D. peruvianus* nymphs após 14 e 10 dias da aplicação. Adicionalmente, MATOS e colaboradores²⁷ avaliaram as atividades inseticidas dos óleos essenciais de *Illicium verum* e *Eugenia caryophyllus*, constituídos majoritariamente de E-anetol (88,85 %) e eugenol (74,31 %), contra o *Callosobruchus maculatus*, um dos maiores insetos praga do feijão. Os autores observaram que, mesmo em baixas concentrações, ambos os óleos apresentaram capacidade repelente frente ao *C.*

maculatus com a diminuição do número de ovos ovipositados e baixa emergência dos insetos. Da mesma forma, vários outros pesquisadores estudaram e identificaram as atividades inseticidas, antifúngicas e tóxicas dos óleos essenciais de organismos vegetais e seus constituintes voláteis majoritários^{28; 29; 30; 31; 32}.

Assim, devido à sua importante função biológica, os COV tem sido alvo de estudos que buscam correlacionar quais são os compostos químicos responsáveis pelas interações planta-planta e planta-inseto que expliquem, por exemplo, os mecanismos relacionados à repelência. O ponto de partida usual é estudar os componentes da planta e entender como ela se relaciona com o ambiente em que está inserida²⁵. Diversas estratégias são utilizadas para o estudo de um organismo vegetal como um todo: suas raízes e caule podem ser trituradas para a obtenção de um extrato vegetal, bem como as suas folhas e flores.³³

Os COV, majoritariamente presentes nas folhas e flores de plantas, são obtidos a partir de extratos que constituem o que é chamado de óleo essencial. Ao longo do tempo, a utilização dos óleos essenciais de organismos vegetais aromatizados foi amplamente aplicada à perfumaria e, também, à medicina tradicional. Nesse contexto, foram desenvolvidos diversos modos de obtenção e análise da composição química dos óleos essenciais.^{33; 34}

Entre as técnicas de extração, a hidrodestilação é uma das técnicas mais difundidas para a obtenção de óleos essenciais.³⁵ Por meio do uso do aparelho de *Clevenger*, a matriz vegetal é submetida a aquecimento com água até que todo o conteúdo oleoso seja extraído. É a técnica que fornece óleos essenciais mais puros, livre de graxas, por exemplo, porém geralmente apresenta baixos rendimentos.³⁶ A hidrodestilação, portanto, requer grandes quantidades do material vegetal para obtenção de quantidades significativas de óleo para a condução de estudos de bio-atividade: antimicrobiana ou fúngica para fins farmacêuticos ou manejo de pragas, por exemplo.^{37,38}

Adicionalmente, a extração via *soxhlet*, que apesar de ser uma técnica que faz uso de solventes menos amigáveis para o meio ambiente e temperaturas relativamente altas – 30 a 70°C, ainda é utilizada para a extração de COVs por apresentar alta recuperação.^{39,40,41} Essa técnica consiste na passagem cíclica do volume do solvente de extração através da matriz vegetal, geralmente envolta em

um cartucho de papel de filtro. É conduzida no aparelho de *soxhlet* e permite, inclusive, o uso de diferentes solventes de extração em sequência com o intuito de se obter um perfil de extratos mais amplo: de solventes mais polares aos mais apolares por exemplo.⁴²

Contudo, não é possível definir a melhor técnica de extração de compostos orgânicos voláteis, cada técnica apresenta vantagens e desvantagens que são relevantes de acordo com a aplicação do estudo.⁴³ TAVEIRA e colaboradores⁴⁴, por exemplo, compararam o perfil químico dos compostos voláteis resultantes da extração de folhas de *Rumex induratus* através do uso de quatro técnicas de extração: hidrodestilação, microextração em fase sólida (SPME), *soxhlet* e extração direta com solvente. Os autores concluíram, portanto, que a hidrodestilação se apresentou como o método mais efetivo, devido ao maior número de compostos extraídos, apesar da extração via *soxhlet* ter apresentado o maior rendimento: maior quantidade de extrato em relação a biomassa inicial.

Ambas as técnicas, entretanto, apresentam execuções onerosas, com alto gasto de tempo, energia e solventes.^{36,40,45} Bem como, requerem quantidades significativas do material vegetal em estudo. Desse modo, técnicas de extração em menor escala e que não exigem o uso de grandes volumes de solventes, ou nenhum solvente, tem sido muito aplicada em estudos de perfil de voláteis de plantas e fungos, por exemplo.

Assim, a técnica de extração sólido-gasosa via *headspace* seguida da análise por cromatografia gasosa (HS-GC) se apresenta como uma técnica alternativa que busca unir menor tempo de execução, menor quantidade de matriz vegetal necessária e otimização dos recursos utilizados. A técnica consiste em realizar um pré-tratamento na matriz vegetal, aplicar aquecimento, por exemplo, sob um ambiente confinado, provocando a perturbação do equilíbrio sólido-gasoso, entre a matriz sólida e a parte gasosa (*headspace*). O pré-tratamento tem o objetivo de promover o aumento da concentração dos COV na porção gasosa que tem uma alíquota recolhida para análise, por exemplo.^{46,47}

DELAUNAY-BERTONCINI e colaboradores⁴⁸ demonstraram que o uso da técnica de extração via *headspace*, em comparação com a extração via *soxhlet*, de amostras comerciais de borracha permitiu a obtenção de um perfil mais amplo de

COV com baixo peso molecular. Adicionalmente, ALVARADO e ROSE⁴⁹, analisaram o perfil químico de COV de amostras de solo e organismos vegetais via extração de *headspace* e definiram o procedimento como uma alternativa mais eficiente para a caracterização das amostras que as técnicas mais tradicionais. Os autores obtiveram um método de extração e análise com boa sensibilidade, boa recuperação e *performance*, com o mínimo de rejeitos de análise. Além de serem capazes de identificar baixas e altas concentrações dos COV estudados.

Portanto, a técnica de extração via *headspace* seguida de análise por cromatografia gasosa com detector de massas (GC-MS) se apresenta como um método versátil e fácil para a análise de COV, em que pouco ou nenhum preparo e manipulação de amostra é necessário.

A análise cromatográfica de COV presentes em uma matriz composta majoritariamente de compostos não voláteis, como a estrutura celular de plantas, por exemplo, pode ser feita a partir de um pré-tratamento da amostra em que os compostos voláteis são isolados da matriz ou concentrados. Um dos meios de se realizar esse pré-tratamento é a partir da técnica de extração via *headspace*.^{47,46}

A técnica de extração via *headspace* vem se destacando nos últimos anos nas análises de solventes, bebidas e solventes residuais em excipientes de formulações farmacêuticas, por exemplo. PASTOR-BELDA e colaboradores⁵⁰ utilizaram a técnica de extração via *headspace* para identificar e quantificar os solventes benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (BTEX) em tintas para pintura à dedo. Os autores foram capazes de quantificar baixos níveis de BTEX, sendo possível identificar os riscos inerentes ao material que tem contato direto com a pele. TIAN⁵¹ demonstrou que a técnica de extração via *headspace* seguida da análise é capaz de identificar e quantificar os compostos: diacetil, pentanodiona, 3-hidroxibutanona (acetoína) e o acetadeído, responsáveis pelo aroma em cervejas e que pode, portanto, ser utilizada para acompanhar os processos de fermentação, por exemplo. FLISZAR e colaboradores⁵² também utilizaram a técnica para identificar e quantificar solventes residuais em excipientes, demonstrando que métodos de análise por HS-GC podem ser eficientemente desenvolvidos com segurança e de acordo com normas internacionais.

Devido a sua fácil utilização e versatilidade tem sido aplicada em diversos outros campos, tais como na indústria de consumíveis e de alimentos. DUTRA e colaboradores⁵³, por exemplo, avaliaram a eficiência dos processos de reciclagem de plástico através da análise e extração via headspace de compostos voláteis em polietileno reciclado e polietileno de alta densidade. Na indústria alimentícia são encontradas aplicações em monitoramento de aromas e caracterização dos componentes de vinhos, como estudado por PÉREZ-JIMÉNEZ e POZO-BAYÓN⁵⁴. Em diferenciação de espécies dos tipos de cafés comerciais: *Arabica* e *Robusta*. COLZI e colaboradores⁵⁵ estudaram 7 amostras comerciais de café *Arabica* e 6 de café *Robusta* e demonstraram que o método desenvolvido foi eficientemente capaz de diferenciar os tipos de cafés estudados.

Também é possível aplicar a técnica combinada com tratamentos estatísticos em investigações para garantir a segurança dos consumidores, como foi feito por HU e colaboradores⁵⁶ que conduziram estudos para a caracterização do perfil volátil de quatro tipos de óleos vegetais: óleo de soja, amendoim, canola e girassol. De modo a estabelecer marcadores específicos para cada óleo que podem ser empregados na identificação de óleos adulterados.

Contudo, a técnica de extração via *headspace* seguida de análise por cromatografia gasosa se apresenta como uma metodologia eficiente para o estudo do perfil de COV de organismos vegetais. Vários casos de sucesso do uso da técnica já foram reportados na literatura. STASHENKO e colaboradores³⁸, obtiveram o perfil de metabolitos secundários em frutos de *Xylopiya aromatica* e puderam identificar 50 componentes voláteis nas amostras estudadas. Adicionalmente, quando combinadas com técnicas de tratamento de dados estatísticos, assim como foi feito por ALIFERIS e colaboradores⁵⁷ na análise de mel de diferentes localidades, a técnica pode fornecer informações robustas para identificação e classificação de origem geográfica de amostras de mel a partir do perfil de COV previamente obtido.

A obtenção de perfis de COV representativos aos organismos vegetais estudados a partir da extração via *headspace* seguida de análise por cromatografia gasosa é garantida pelo princípio de equilíbrio químico e coeficiente de partição. De acordo com SORIA⁵⁸, o termo "*headspace*" (HS) se refere a fase gasosa acima da amostra líquida ou sólida. Quando confinada em um frasco selado, por exemplo,

a amostragem da fase gasosa, do *HS* pode ser classificada em *HS* dinâmico (D-HS) ou *HS* estático (S-HS).

A extração via *HS* dinâmico é um método de extração gasosa contínua: os compostos orgânicos voláteis são extraídos e separados da matriz sólida por um fluxo contínuo de gás inerte que é direcionado para o cromatógrafo gasoso.⁴⁶ Já a extração via *HS* estático consiste na vaporização dos COV da matriz sólida através de um período de tempo em que a amostra é submetida a um programa de aquecimento. Os COV são distribuídos entre a fase da amostra e a fase gasosa até o momento, previamente definido, em que o equilíbrio estático é atingido e ocorre a amostragem da fase gasosa que segue para análise em GC-MS, por exemplo, conforme mostrado na FIGURA 1.3.^{46, 47}

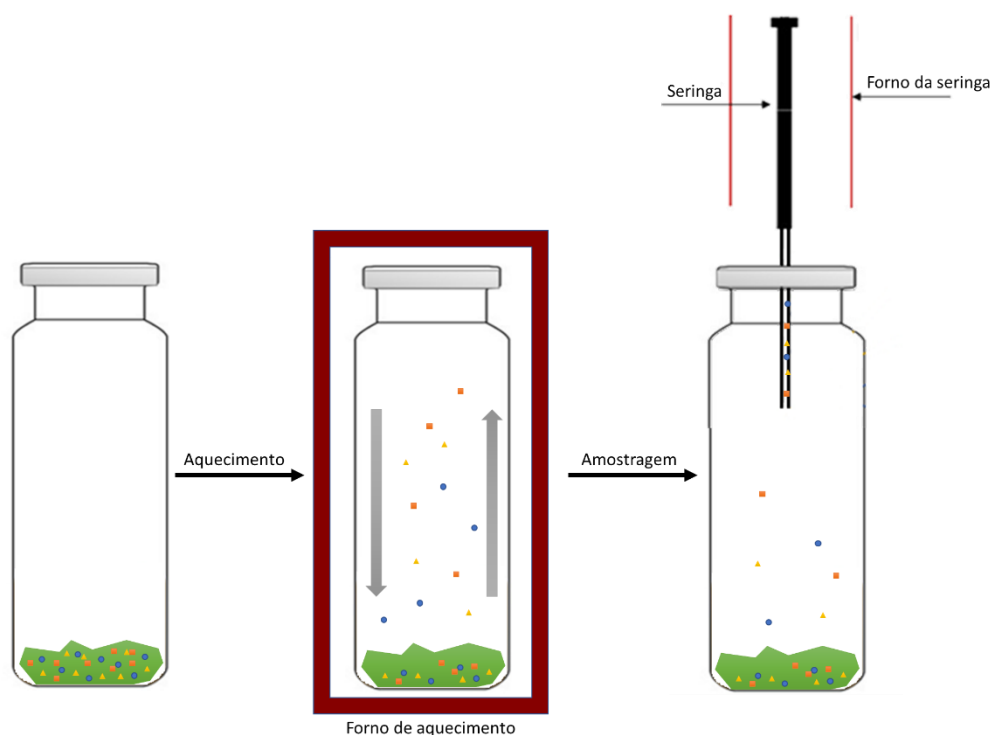


FIGURA 1.3 - Equilíbrio estático no frasco de *headspace* e amostragem para análise. Adaptado de HARRIES e colaboradores⁴⁷

O equilíbrio estático ocorre quando a concentração dos analitos voláteis na fase gasosa permanece constante. Ele é controlado por uma constante de equilíbrio, conhecida como constante de distribuição, coeficiente de partição ou constante da Lei de Henry.⁴⁶

Assumindo que o volume da amostra (V_a) depois do equilíbrio é igual ao volume inicial da amostra (V_i)

$$V_a = V_i$$

e que o volume relativo (β) é:

$$\beta = \frac{V_g}{V_a}$$

Onde V_g é o volume na fase gasosa.

A quantidade original do analito na amostra é Q_i e sua concentração na amostra inicial é C_i . Dessa forma temos:

$$C_i = \frac{Q_i}{V_i} = \frac{Q_i}{V_a}$$

Depois do equilíbrio as respectivas quantidades de analito nas duas fases (amostra e gasosa) são Q_a e Q_g e suas concentrações são C_a e C_g :

$$C_a = \frac{Q_a}{V_a}$$

$$C_g = \frac{Q_g}{V_g}$$

Portanto,

$$Q_i = Q_a + Q_g$$

Sabemos, que a distribuição do analito entre as duas fases no equilíbrio é expressa pela constante de equilíbrio controlada termodinamicamente. Por analogia, o termo sinônimo “coeficiente de partição (K)” é usado:

$$K = \frac{C_a}{C_g} = \frac{Q_a/V_a}{Q_g/V_g} = \frac{Q_a}{V_a} \cdot \frac{V_g}{Q_g} = \frac{Q_a}{Q_g} \cdot \frac{V_g}{V_a}$$

$$K = \frac{Q_a}{Q_g} \beta$$

O coeficiente de partição é um parâmetro fundamental que expressa a distribuição de massa no sistema de duas fases. Ele depende da solubilidade do analito na fase condensada, isto é, na fase da amostra, sólida ou líquida.

Assim, compostos com alta solubilidade terão alta concentração na fase condensada em relação a fase gasosa ($C_a \gg C_g$). Portanto, o valor de K será alto.

De forma similar, os compostos com baixa solubilidade na fase condensada terão concentração na fase condensada igual ou menor que a fase gasosa e, então, K será baixo.

De outra maneira, podemos expressar o sistema inicial e pós-equilíbrio como é mostrado na FIGURA 1.4.

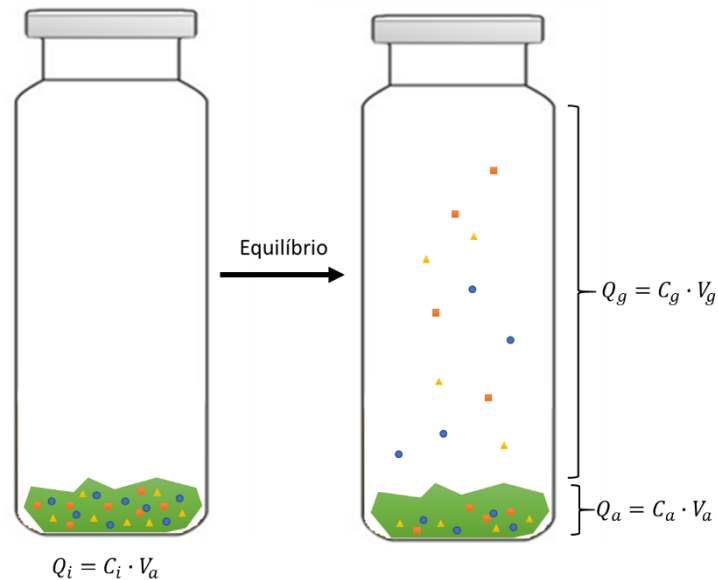


FIGURA 1.4 - Sistema inicial e pós-equilíbrio. Adaptado de HARRIES e colaboradores⁴⁷.

Considerando que a quantidade inicial, se tratando de um frasco selado, é igual a concentração da fase gasosa somada à fase da amostra, temos:

$$Q_i = Q_a + Q_g$$

$$C_i \cdot V_a = (Q_a \cdot V_a) + (Q_g \cdot V_g)$$

$$C_i \cdot V_a = K \cdot C_g \cdot V_a + C_g \cdot V_g$$

$$C_i \cdot V_a = C_g(K \cdot V_a + V_g)$$

Portanto,

$$C_i = C_g \left(\frac{KV_a}{V_a} + \frac{V_g}{V_a} \right) = C_g(K + \beta)$$

E então,

$$C_g = \frac{C_i}{K + \beta}$$

Como K e β são constantes, então $K+\beta$ será também uma constante. Dessa forma a concentração na fase gasosa pode ser expressa como a concentração inicial multiplicado por uma constante B .

$$C_g = B \cdot C_i$$

Portanto, em um dado sistema, a concentração no *headspace* é proporcional a concentração na amostra inicial. Dessa forma, a área do pico obtido para o analito será proporcional a sua concentração na amostra analisada. A constante B também incorpora a influência do número de parâmetros analíticos e o fator resposta do detector. Pode-se concluir, portanto, que se uma alíquota do *headspace* no equilíbrio é analisada por cromatografia gasosa, a área do pico obtido para o analito será diretamente proporcional a sua concentração na amostra inicial.⁴⁶ Sendo essa, a relação fundamental de análises quantitativas por *headspace*-Cromatografia Gasosa (HS-GC).

$$A \propto C_g = \frac{C_i}{K + \beta}$$

Um pré-requisito para reprodutibilidade de análises por HS-GC é a reprodução exata de todas as condições analíticas, visto que a determinação numérica da constante B pode ser difícil. Assim, apenas garantindo a reprodutibilidade das análises por HS-GC que se obterão perfis representativos dos organismos vegetais estudados. Nesse contexto, o uso do planejamento fatorial de experimentos para definir as condições analíticas ótimas para se atingir o equilíbrio estático em uma amostra analisada por HS-GC e garantir a reprodutibilidade se faz necessário.

1.4 MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS

A definição das condições analíticas ótimas para se atingir o equilíbrio estático em uma amostra analisada por HS-GC pode ser realizada a partir do estudo quimiométrico de planejamento fatorial de experimentos. O planejamento fatorial de experimentos é utilizado em química como ferramenta para otimização de condições experimentais de sistemas ou métodos analíticos através da obtenção planejada de resultados e posterior tratamento estatístico dos dados⁵⁹.

A partir de variáveis independentes previamente selecionadas e relevantes para o experimento em questão, tais como temperatura, tempo, concentração, por exemplo, é possível construir modelos de regressão que permitem correlacionar os parâmetros com as respostas obtidas^{59, 60; 61}. As respostas, por sua vez, podem ser de grandeza uni-variada, tal como a formação de um composto químico a partir de um processo sintético, bem como multi-variadas em que para um único experimento se obtém duas ou mais respostas. São exemplos de respostas multi-variadas os sinais obtidos em análises de ressonância magnética nuclear, as bandas de espectros na região do infravermelho, próximo ou médio, assim como os picos cromatográficos resultantes de análises por cromatografia líquida ou gasosa.

SILVA e colaboradores⁶², por exemplo, utilizaram o planejamento fatorial de experimentos 2^3 no estudo de três variáveis independentes para a otimização da fermentação de cana de açúcar. Avaliando a produção do etanol gerado em um número reduzido de experimentos os autores conseguiram definir as melhores condições para a obtenção de etanol.

STOLZBERG⁶³, em contrapartida, fez uso do planejamento fatorial de experimentos para otimizar a separação cromatográfica dos componentes voláteis de Whiskey analisados por cromatografia gasosa. O autor avaliou 5 variáveis, temperatura inicial, taxa de aquecimento, temperatura final, fluxo de gás hélio e tempo de purga. A partir de 16 análises de uma mesma amostra de Whiskey, o autor foi capaz de definir as melhores condições para o método analítico proposto.

Desse modo, o planejamento fatorial de experimentos pode colaborar na definição de condições ótimas para a extração de COV a partir de um número

reduzido de experimentos em que é possível avaliar diversas variáveis, tais como tempo de extração, temperatura e agitação. Assim, definidas as condições ótimas para a extração, o material vegetal em estudo pode ser analisado com segurança de que serão obtidas informações verdadeiras e representativas sobre as amostras.

Contudo, em estudos com um grande número de amostras em que cada uma delas gera mais de uma resposta, tal como um cromatograma com respostas qualitativas e quantitativas, convém se fazer uso de técnicas de análise exploratória dos dados de maneira a otimizar o processamento dos resultados.^{64; 65; 66} Existem dois tipos de reconhecimentos de padrões: o reconhecimento não-supervisionado e a supervisionado. A primeira se refere a estudos em que as amostras e suas respostas não são previamente conhecidas, desse modo, faz-se necessário realizar uma análise exploratória dos dados utilizando ferramentas que buscam entendê-los melhor e ressaltar as diferenças entre eles. Enquanto que a segunda, análise supervisionada, se refere a análise de amostras que já são previamente conhecidas, ou seja, já existe um modelo conhecido, previamente calibrado.^{67; 68; 69;}

70

Dentre as análises não-supervisionadas para o reconhecimento de padrões, temos a análise de componentes principais (PCA – *Principal Component Analysis*) que é utilizada para visualizar a estrutura de um grande conjunto de dados, encontrar similaridade entre amostras, detectar amostras anômalas e reduzir a dimensionalidade de um conjunto de dados tornando mais fácil a interpretação dos mesmos.^{68; 71} MALDINI e colaboradores⁷², por exemplo, utilizaram a análise de componentes principais no estudo do perfil metabolômico e atividade antioxidante de plantas de *Rosmarinus officinalis L.* A aplicação da análise de componentes principais permitiu que os autores diferenciassem a espécie *La Maddalena Rosmarinus* das demais, a partir do uso dos dados quantitativos dos 12 compostos, entre flavonóides e ácidos fenólicos, identificados e quantificados por LC-MS/MS. Foi possível correlacionar maior atividade antioxidante à espécie, além de confirmar a dependência entre quantidade de compostos fenólicos e atividade antioxidante observada.

LI e colaboradores⁷³ fizeram a análise do perfil metabolômico de compostos voláteis do *Tricholoma matsutake* Singer de diversas localidades e, a partir da análise de componentes principais, concluíram que as amostras são

significativamente distinguíveis. Adicionalmente, foi possível identificar também que as diferentes partes do cogumelo emitem perfis químicos diferentes.

Essas técnicas e estratégias, portanto, se apresentam como ferramentas essenciais para o estudo dos organismos vegetais, bem como para o estudo das interações planta-planta e inseto-planta. Por um lado, o planejamento fatorial de experimentos contribui para a determinação assertiva das condições ótimas de análise, garantindo que o perfil metabolômico de voláteis obtido é representativo ao organismo vegetal estudado. Por outro lado, as técnicas quimiométricas de reconhecimento de padrões auxiliam no processamento dos dados gerados permitindo a interpretação mais rápida e eficiente dos resultados. Assim, elas podem ser aplicadas com sucesso na investigação das interações entre insetos e plantas modelo, por exemplo, e no estudo dos mecanismos de resistência que governam essas interações.

1.5 PLANTA MODELO: ALGODÃO

O algodoeiro é uma oleaginosa pertencente ao grupo das plantas dicotiledôneas, a família Malvaceae e ao gênero *Gossypium*. Originário do México e América Central⁷⁴, é uma planta de altura variável, composta por caule herbáceo ou lenhoso dotado de ramos vegetativos e frutíferos, raiz principal cônica e profunda e pequena quantidade de raízes secundárias grossas e superficiais⁷⁵.

A cultura do algodão desempenha um papel de destaque no setor econômico mundial, ocupando lugar entre as principais culturas de interesse para o agronegócio em diversas partes do mundo, uma vez que o algodoeiro produz fibra e óleo, que podem ser utilizados para alimentação, geração de energia e na indústria têxtil⁷⁶, sendo uma das plantas de mais completo aproveitamento.

A espécie *Gossypium hirsutum*, de algodão herbáceo, representa cerca de 90% da produção mundial e sua cultura produz uma das mais importantes fibras têxteis do mundo⁷⁴. O Brasil tem se destacado no mercado mundial como grande produtor, consumidor e exportador de algodão. Por volta de 1890, devido ao crescimento e consolidação da indústria têxtil no Brasil, a produção nacional do algodão tornou-se sólida e crescente, assumindo a condição de principal cultura agrícola dos estados nordestinos⁷⁶. Ao decorrer dos anos houve aumento significativo das áreas de cultivo no país e o aumento da produtividade média do algodão, que saltou de 850 kg.ha⁻¹ em 1970 para 3910 kg.ha⁻¹ em 2016, totalizando neste ano 910.000 hectares em área plantada de algodão no Brasil⁷⁷.

A segunda metade da década de 90 marcou a migração da cultura do algodoeiro do semiárido ao cerrado brasileiro, especialmente por conta da dificuldade em lidar com o inseto-praga *Anthonomus grandis*, Boheman, conhecido como bicudo do algodoeiro⁷⁸. Atualmente, o cerrado corresponde a 99% da produção brasileira de algodão, sendo o Estado de Mato Grosso o maior produtor e essa cultura é umas dez maiores fontes de riqueza do agronegócio do país.^{78; 79}

1.6 INSETO MODELO: *SPODOPTERA COSMIOIDES* (WALKER)

Na última década, a lagarta *Spodoptera cosmioides* (Walker) (FIGURA 1.5), uma espécie polífaga, conhecida como lagarta-preta, vem se destacando no Brasil pela sua ocorrência em lavouras de algodão e soja, causando desfolha e danos significativos.⁸⁰ A sua ocorrência, também como praga, tem sido atribuída ao uso excessivo de defensivos agrícolas de amplo espectro que eliminam os seus inimigos naturais do ambiente.⁸¹

Os danos significativos às lavouras de soja e algodão, por exemplo, no cerrado brasileiro e também no nordeste tem motivado estudos de reconhecimento da biologia do inseto e de mecanismos de interação com os cultivares mais afetados, visto a ausência de inseticidas registrados para o seu controle⁸².

Spodoptera cosmioides é um inseto-praga que causa a desfolha na cultura atingida. Suas mariposas de asas cinza-escuras com branco-acinzentadas, têm cerca de 35 mm de comprimento e possuem longevidade de 10 a 15 dias. A oviposição é feita na forma de massa sob as folhas, seus ovos são esféricos, com coloração que vai do cinza quase preto ao marrom-escuro. O período embrionário tem duração de 3 a 4 dias.⁸³

Já suas lagartas possuem coloração geral que pode variar de amarelo-pálido a preto, com listras corpóreas longitudinais e reticulações com formas variadas; a cabeça é preta, possuem três listras longitudinais alaranjadas, uma dorsal e duas laterais, com pontos brancos (FIGURA 1.5). Acima dos pontos brancos ocorrem triângulos pretos voltados para o dorso. As lagartas desenvolvidas apresentam uma faixa mais escura entre o tórax e o abdome, apresentam seis ou sete ínstar e podem medir até 40 mm.



FIGURA 1.5 – Lagarta de *Spodoptera cosmioides*. Fonte: Carlos Alessandro de Freitas, FCAV, UNESP-Jaboticabal.

Neste contexto, se faz necessário estudar as interações entre as plantas de algodão e o inseto-praga *S. cosmioides*, de modo que mais informações estejam disponíveis para o manejo agrícola de insetos praga. A identificação dos compostos orgânicos voláteis responsáveis pela resposta de resistência nos genótipos de algodão, por exemplo, contribui para o desenvolvimento da cotocultura brasileira. O conhecimento adquirido a partir dos estudos dos voláteis do algodão contribuirá futuramente com novos aspectos a se considerar no melhoramento genético dos cultivares: como na seleção de plantas resistentes e/ou cruzamento de plantas com características favoráveis para cotocultura.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo principal apresentar estudos de ecologia química investigando as relações entre o perfil químico metabolômico de voláteis de plantas de algodão (*Gossypium hirsutum*) submetidas a diferentes estresses bióticos e abióticos, frente à herbivoria de *Spodoptera cosmioides* (Walker) (*Lepidoptera: Noctuidae*) para aumento no conhecimento dos mecanismos de defesa natural no controle de insetos praga.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolvimento de um método por *Headspace*-Cromatografia Gasosa-Espectrometria de Massas para análise de perfil químico qualitativo e quantitativo de compostos voláteis de folhas de diferentes genótipos de algodão;
- Cultivo de diferentes genótipos de algodão sob mesmas condições ambientais para análises químicas, identificando variações no perfil de compostos orgânicos voláteis;
- Cultivo de diferentes genótipos de algodão em diferentes condições de estresses bióticos e abióticos sendo: solo (controle), administração do metil-jasmonato via aplicação foliar (pulverização); administração de metil-jasmonato via aplicação no solo; na presença de *S. cosmioides*; na presença de *S. cosmioides* e administração de metil-jasmonato via aplicação no solo, e sob estresse hídrico (escassez de água);
- Processamento dos dados analíticos para identificar respostas químicas intrínsecas aos diferentes genótipos e/ou tratamentos;
- Comparar os resultados químicos obtidos às respostas de não-preferência observadas para *S. cosmioides*.

3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

O estudo apresentado nesse trabalho foi dividido em quatro experimentos principais:



FIGURA 3.1 - Esquema do procedimento experimental desenvolvido nesse trabalho.

As amostras de folhas de algodão dos experimentos I, II e III foram analisadas no método de HS-GC-MS proposto e os seus resultados foram interpretados com base em análises estatísticas e na resposta comportamental frente a herbivoria da lagarta *S. cosmioides*. As amostras de folhas de algodão do experimento IV foram testadas em relação a resposta comportamental frente a herbivoria da lagarta *S. cosmioides*.

Os constituintes voláteis para os 12 genótipos de algodão, estudados na literatura e/ou disponíveis comercialmente, foram avaliados em relação aos mecanismos de resistência constitutiva e induzida frente à *S. cosmioides*. Para tal, foi desenvolvido um método eficiente de extração e análise por HS-GC-MS dos compostos orgânicos voláteis, capaz de identificar as diferenças entres os genótipos e entre os experimentos de resistência elaborados.

Os perfis químicos dos 12 genótipos foram, então, analisados e caracterizados frente à resistência constitutiva por não-preferência e antibiose de *S. cosmioides* (Experimento I). O perfil químico resultante da indução de resistência por herbivoria de *S. cosmioides* dos 12 genótipos de algodão também foram

analisados e caracterizados em relação a não-preferência e antibiose (Experimento II).

Entre os 12 genótipos iniciais, dois deles foram selecionados para os estudos de indução de resistência por fatores bióticos e abióticos (Experimento III), os quais eram amplamente relatados na literatura como padrões de resistência e suscetibilidade frente a outros insetos pragas. A partir dos resultados obtidos nesses experimentos, foram selecionados potenciais biomarcadores de resistência frente à *S. cosmioides*. A aplicação direta nas plantas de algodão de um dos biomarcadores, conforme melhores condições definidas nos experimentos anteriores, foi realizada com o intuito de verificar a eficácia da proposta desse trabalho (Experimento IV).

3.1 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO HS

O desenvolvimento do método de extração via *HS* foi realizado com o objetivo de estabelecer as condições ótimas para a extração reprodutiva do maior número e maior concentração dos COV das folhas de algodão. No total, foram avaliadas três variáveis independentes sendo: 1) tempo, 2) temperatura e 3) massa de sulfato de sódio em mg (secante), no planejamento fatorial composto central. Neste estudo, foi utilizado como região axial experimentos que variam de -1,68 a 1,68, conforme a TABELA 3.1

TABELA 3.1: Codificação do planejamento fatorial composto central para as três variáveis utilizadas no desenvolvimento do método de extração via *headspace*.

Variáveis	Codificação				
	-1,68	-1	0	1	1,68
Tempo (min)	6,6	10	15	20	23,4
Temperatura (°C)	53,2	60	70	80	86,8
NaSO ₄ (mg)	32	100	200	300	368

As folhas de algodão previamente congeladas em nitrogênio líquido foram moídas em moedor analítico IKA®A11 *basic* com nitrogênio líquido e separadas em porções de 250 mg em frascos de 10 mL próprios para análise em *headspace*. Instantes antes das análises foram adicionados 4 μ L de uma solução padrão de 0,01% de 1,4-cineol (Sigma-Aldrich, Estados Unidos da América) utilizado como padrão interno (PI). Durante todo o processo de preparo de amostras até o momento da análise, as folhas de algodão moídas foram mantidas congeladas em ultrafreezer à -80°C.

Os experimentos foram realizados em deliamento casualizado, conforme a TABELA 3.2.

TABELA 3.2 – *Desenvolvimento do método de extração via HS: Codificação dos experimentos do planejamento fatorial composto central realizado*

Experimentos	Temperatura	Tempo	NaSO₄
14	1,68	0	0
2	-1	-1	1
1	-1	-1	-1
18	0	0	1,68
11	0	0	0
9	0	0	0
17	0	0	-1,68
10	0	0	0
12	0	0	0
15	0	-1,68	0
4	-1	1	1
3	-1	1	-1
13	-1,68	0	0
7	1	1	-1
8	1	1	1
16	0	1,68	0
5	1	-1	-1
6	1	-1	1

A análise dos constituintes voláteis do algodão foi realizada em um cromatógrafo a gás Shimadzu GC 2010AF Plus com injetor *headspace* AOC-5000 acoplado ao espectrômetro de massas sequencial TQ8040. Foi utilizado modo de injeção em *split* no valor de 1:10 com temperatura de injeção de 230°C. A separação cromatográfica foi obtida a partir de uma coluna Rtx-5ms (30 m × 0,25 mm × 0,25 mm) com programa de aquecimento conforme descrito na TABELA 3.3 abaixo. O modo de detecção foi utilizado em Q3 *scan* variando de 40 a 400 *m/z*.

TABELA 3.3: Programa de aquecimento do método de GC-MS

Taxa (°C/min)	Temperatura final (°C)	Tempo de espera (min)
-	35	5
2	62	0
35	185	0
16	280	1

Para verificar e garantir que o método analítico desenvolvido é capaz de mensurar as diferenças obtidas entre as amostras controle e as amostras com diferentes tratamentos, foi aferida a precisão analítica para o mesmo. Foram analisadas amostras em triplicata do *mix* de genótipos (0,5 g de folha de cada genótipo) no *intra-day* (n=3), e para o *inter-day* foram analisadas amostras em triplicata em três dias diferentes (n=9). A variação do desvio padrão entre as amostras durante o *inter-day* e *intra-day* foi avaliada conforme metodologia proposta por SOUZA SILVA⁶⁶.

3.2 EXPERIMENTO I: RESISTÊNCIA CONSTITUTIVA

Neste experimento foram avaliados os parâmetros de resistência a *S. cosmioides*, por não-preferência, para 12 genótipos de algodão que foram estudados na literatura e/ou são utilizados comercialmente na cultura de algodão no Brasil (TABELA 3.4).

TABELA 3.4 - Genótipos de algodão estudados, origem e histórico de resistência dos genótipos. *Adaptado de FREITAS, C. A.*⁸⁴.

#	Genótipo	Origem	Histórico de resistência
1	BRS 286	Embrapa	Não avaliado
2	BRS293	Embrapa	Não avaliado
3	BRS 335	Embrapa	Não avaliado
4	BRS 336	Embrapa	Não avaliado
5	BRS 368 RF	Embrapa	Não avaliado
6	BRS 372	Embrapa	Não avaliado
7	Delta Opal	D&PL Brasil Ltda	Suscetível a <i>Alabama argillacea</i> (Hübner, 1818) (Lepdoptera: Noctuidae) ⁸⁵ e <i>Spodoptera frugiperda</i> (J.E. Smith, 1757) (Lepdoptera: Noctuidade) ⁸⁶
8	FMT 701	Fundação MT	Resistente a não-preferência e/ou antibiose a <i>A. argillacea</i> ⁸⁵ e <i>S. frugiperda</i> ⁸⁶ .
9	FMT 707	Fundação MT	Não avaliado
10	FMT 709	Fundação MT	Não avaliado
11	FM 910	Bayer S.A.	Resistente a antibiose de <i>A. argillacea</i> ⁸⁵
12	FM 993	Bayer S.A.	Suscetível a <i>Chrysodeixis includens</i> (Walker, 1858) (Lepdoptera: Noctuidade) ⁸⁷

De acordo com os resultados biológicos obtidos, os genótipos estudados foram classificados como resistentes, moderadamente resistentes ou suscetíveis à herbivoria de *S. cosmioides*.

O cultivo das plantas de algodão e testes biológicos foram realizados em colaboração com a equipe do Prof. Dr. Arlindo Boiça-Jr, em especial com o doutorando Carlos Alessandro de Freitas, do Laboratório de Resistência de Plantas a Insetos do departamento Fitossanidade da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP-Jaboticabal.

Todas as plantas de algodão utilizadas foram cultivadas em casa de vegetação, sob telado coberto com tela antianfídeo a fim de evitar possíveis infestações de artrópodes. As plantas foram cultivadas em vasos de 0,5 L preenchidos com solo, areia e esterco, na proporção de 3:1:1 previamente esterilizados em autoclave (3 vezes por 20 min). Cinco sementes foram semeadas por vaso. A irrigação foi realizada sempre que necessário e de forma uniforme, tomando-se o cuidado de não serem submetidas a volumes muito altos ou baixos para evitar estresse hídrico.

As plantas foram mantidas em casa de vegetação até serem utilizadas nos ensaios, por 60 dias após a emergência (DAE). O conjunto de amostras foi composto por 12 genótipos cultivados em triplicata, 5 mudas por vaso, em que cada replicata se constituiu em 10 folhas: coletaram-se duas folhas de cada muda, uma na região apical (topo) e uma na porção intermediária.

Para a análise do perfil químico, as folhas foram congeladas em nitrogênio líquido imediatamente depois da coleta e cada replicata foi armazenada em sacos plásticos devidamente identificados. Todos os sacos plásticos com as amostras foram reservados em caixa de isopor com nitrogênio líquido até serem armazenadas em ultrafreezer a temperatura de -80°C até o momento da análise. As replicatas verdadeiras foram analisadas no método cromatográfico descrito anteriormente (item 3.1) com extração via *headspace* a 80°C por 20 min. Em cada análise, 250 mg de folhas de algodão moídas foram utilizadas.

Para os ensaios comportamentais com a lagarta *S. cosmioides*, as folhas foram coletadas e armazenadas em um saco plástico com água destilada. Os ensaios de não-preferência, atratividade e área foliar consumida, foram conduzidos em seguida à coleta pela equipe do Laboratório de Plantas Resistentes a Insetos da FCAV, UNESP-Jaboticabal.

O perfil químico dos constituintes voláteis das amostras de folhas de algodão foi submetido à análise multivariada não-supervisionada de principal componente (*Principal Component Analysis* - PCA). As variáveis foram definidas como os diferentes sinais obtidos a partir do tempo de retenção relativo com uma variação aceitável de 0,1 min. As áreas dos constituintes voláteis do perfil foram padronizadas em relação à área do padrão interno 1,4-cineol (Sigma-Aldrich,

Estados Unidos da América). Para realçar as diferenças entre as amostras, foi realizado autoescalamento em relação às áreas dos compostos identificados.

3.3 EXPERIMENTO II: RESISTÊNCIA INDUZIDA POR HERBIVORIA

Neste experimento foram avaliados os parâmetros de resistência a *S. cosmioides*, por não-preferência, para os 12 genótipos de algodão estudados (conforme mostrado no item 3.2) após a indução de resistência por herbivoria de *S. cosmioides*.

A indução por herbivoria foi realizada ao se introduzir uma lagarta do 5º instar de *S. cosmioides*, envolta em uma gaiola de tecido “voal” (20 x 15 cm), na segunda folha a partir da base de plantas de algodão com 4 folhas completamente expandidas. A lagarta foi mantida na planta por 16 h, período em que ocorreu consumo de aproximadamente 80% da área foliar. Para garantir o consumo antes da infestação as lagartas foram mantidas sem alimentação por 3 h.

Após três dias da remoção das lagartas das plantas, a terceira e a quarta folha, a partir da base da planta, das plantas induzidas e das plantas controles, mantidas em casa de vegetação separadas, foram coletadas para a análise. O conjunto de amostras controle e amostras induzidas foi composto por 12 genótipos cultivados em triplicata, 5 mudas por vaso, em que cada replicata se constituiu em 10 folhas: coletaram-se duas folhas de cada muda, uma na região apical (topo) e uma na porção intermediária.



FIGURA 3.2 - Plantas de algodão momentos antes da coleta. Fonte: A autora.

Para a análise do perfil químico, as folhas foram congeladas em nitrogênio líquido imediatamente depois da coleta e cada replicata foi armazenada em sacos plásticos devidamente identificados. Todos os sacos plásticos com as amostras foram reservados em caixa de isopor com nitrogênio líquido até serem armazenadas em ultrafreezer a temperatura de -80°C até o momento da análise. As replicatas verdadeiras, tanto das plantas induzidas por herbivoria, quanto das plantas controle, foram analisadas no método cromatográfico descrito anteriormente (item 3.1) com extração via *headspace* a 80°C por 20 min. Em cada análise, 250 mg de algodão moídas foram utilizadas.

Para os ensaios comportamentais com a lagarta *S. cosmioides*, as folhas foram coletadas e armazenadas em um saco plástico com água destilada. Os ensaios de área foliar consumida por *S. cosmioides* frente aos 12 genótipos induzidos e controle, foram conduzidos em seguida à coleta pela equipe do Laboratório de Plantas Resistentes a Insetos da FCAV, UNESP-Jaboticabal. O comportamento resultante das lagartas de *S. cosmioides* em relação às amostras controle e às amostras induzidas foi utilizado para identificar a indução de resistência nos genótipos testados.

O perfil químico dos constituintes voláteis das amostras de algodão induzidas e controle foi submetido à análise multivariada não-supervisionada de componentes principais (*Principal Component Analysis* - PCA). As variáveis foram definidas como os diferentes sinais obtidos a partir do tempo de retenção relativo com uma variação aceitável de 0,1 min. As áreas dos constituintes voláteis do perfil foram padronizadas em relação à área do padrão interno 1,4-cineol (Sigma-Aldrich, Estados Unidos da América). Foi realizado autoescalamento e a centragem na média em relação às áreas dos compostos identificados para realçar as diferenças entre as amostras.

3.4 EXPERIMENTO III: RESISTÊNCIA INDUZIDA POR FATORES BIÓTICOS E ABIÓTICOS

Para o estudo da avaliação do comportamento do algodão frente aos diferentes estresses bióticos e abióticos, foram utilizados dois genótipos de algodão: FMT 701 e Delta Opal, já conhecidos na literatura como padrões de suscetibilidade e resistência, respectivamente, frente à diversas espécies de lagartas.^{84,85; 86; 87}

Seis tratamentos diferentes foram realizados para os dois genótipos selecionados (FIGURA 3.3) sendo: (I) aplicação de MeJA $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$ via pulverização, (II) aplicação de MeJA $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$ no solo, (III) aplicação de MeJA $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$ no solo, (IV) aplicação de MeJA $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$ no solo após herbivoria de *S. cosmioides*, (V) herbivoria de *S. cosmioides* e (VI) estresse hídrico.

Os tratamentos foram aplicados em plantas de algodão de 25 Dias Após a Aplicação (DAE), duas unidades por vaso, e foram coletadas 2 folhas de cada planta, uma para a análise do perfil químico de voláteis e outra para a análise comportamental frente a lagartas de *S. cosmioides*. Cada vaso, com dois pés de algodão, constituiu uma replicada e todo o experimento foi realizado com 6 replicatas para cada tratamento de cada genótipo.

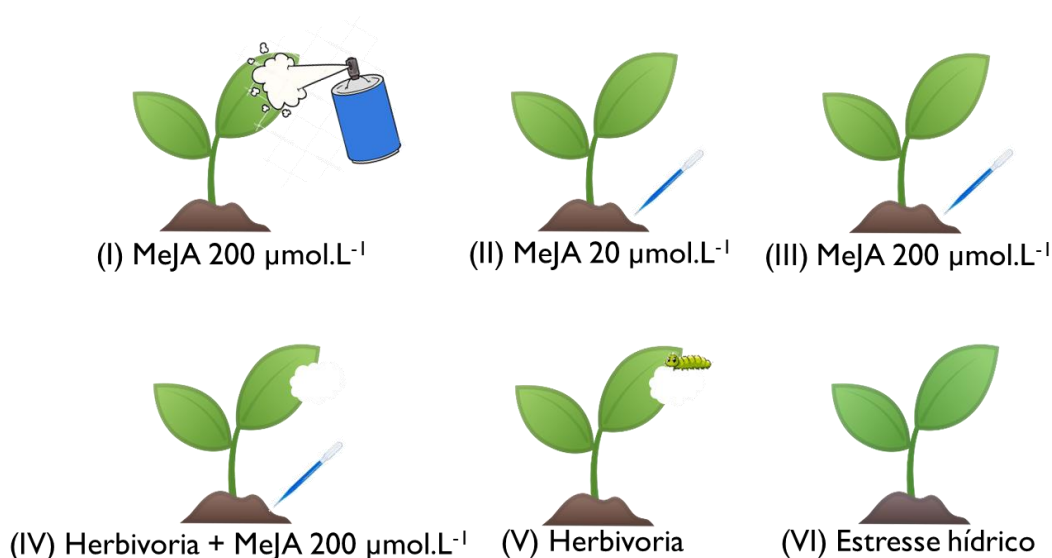


FIGURA 3.3 – Tratamentos do estudo de indução de resistência nos padrões de resistência e suscetibilidade

As plantas controle de ambos os genótipos foram cultivadas no mesmo período que as destinadas aos tratamentos e receberam a mesma quantidade de recursos que as demais.



FIGURA 3.4 - Plantas controle do genótipo FMT 701, em primeiro plano, e do genótipo Delta Opal ao fundo. Fonte: A autora.

I. *Tratamento MeJA 200 μmolL^{-1} por pulverização*

A administração via pulverização foi realizada com o auxílio de um borrifador. Foram borrifados 2 mL da solução de metil-jasmonato (MeJA) 200 μmolL^{-1} (Sigma-Aldrich, Estados Unidos da América) com 0,01% de Tween[®] 80 sob as folhas de cada planta, conforme ilustrado na FIGURA 3.5. A coleta foi realizada 2 dias após a pulverização da solução de metil-jasmonato.



FIGURA 3.5 - Aplicação por pulverização, com o auxílio de um borrifador, da solução de MeJA 200 μmolL^{-1} . Fonte: A autora.

II. *Tratamento MeJA 20 μmolL^{-1} solo*

A aplicação direta de 10 mL no solo foi realizada com o auxílio de uma pipeta de Pasteur[®], conforme mostrado na FIGURA 3.6, de uma solução de metil-jasmonato (MeJA) 20 μmolL^{-1} (v/v) com 0,01% de Tween[®] 80. A coleta foi realizada 2 dias após a adição da solução de metil-jasmonato.



FIGURA 3.6 - Aplicação direta no solo, com auxílio de uma pipeta de Pasteur, da solução de MeJA 20 e 200 μmolL^{-1} . Fonte: A autora.

III. *Tratamento MeJA 200 μmolL^{-1} solo*

As dez replicatas foram adicionados, diretamente no solo com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, 10 mL de uma solução de metil-jasmonato (MeJA) 200 μmolL^{-1} com 0,01% (v/v) de Tween[®] 80, conforme mostrado no item II. A coleta foi realizada 2 dias após a adição da solução de metil-jasmonato.

IV. *Tratamento Herbivoria + MeJA 200 μmolL^{-1} solo*

Foi realizada a indução por herbivoria nas plantas de algodão conforme descrito no item anterior e após um dia da remoção das lagartas foi adicionada diretamente no solo 10 mL de uma solução de metil-jasmonato (MeJA) 200 μmolL^{-1} com 0,01% de Tween[®] 80 em cada uma das plantas. O tratamento foi realizado em 6 replicatas para cada genótipo padrão. A coleta foi realizada 2 dias após a adição da solução de metil-jasmonato.

V. Tratamento Herbivoria

A indução por herbivoria foi realizada ao se introduzir uma lagarta do 5º instar de *S. cosmioides*, envolta em uma gaiola de tecido “voile” (20 x 15 cm), na segunda folha a partir da base da planta. A lagarta foi mantida em cada planta por 16 horas, período em que ocorreu consumo de aproximadamente 50 - 60% da área foliar.

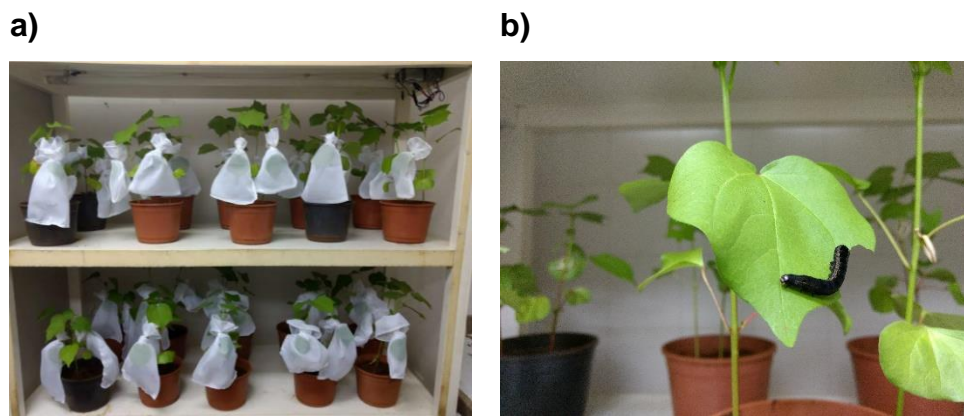


FIGURA 3.7 - a) Genótipos padrão durante a indução por herbivoria de *S. cosmioides*. b) Lagarta *S. cosmioides* na folha de algodão durante o processo de indução. Fonte: Carlos Alessandro de Freitas, FCAV, UNESP-Jaboticabal.

Para garantir o consumo antes da infestação as lagartas foram mantidas sem alimentação por 3 horas. A coleta foi realizada após três dias da remoção das lagartas das plantas.

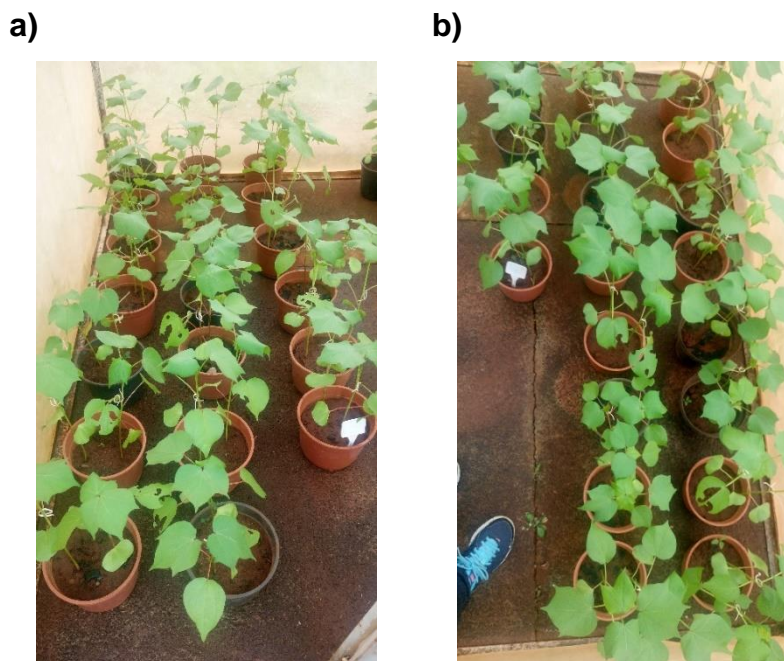


FIGURA 3.8 - Genótipos padrão após a indução por herbivoria de *S. cosmioides*. a) FMT 701 b) Delta Opal. Fonte: A autora.

VI. Tratamento Estresse hídrico

O estresse hídrico foi aplicado em 6 replicatas para cada genótipo padrão, durante os 5 dias antecedentes a coleta a replicatas não receberam irrigação.

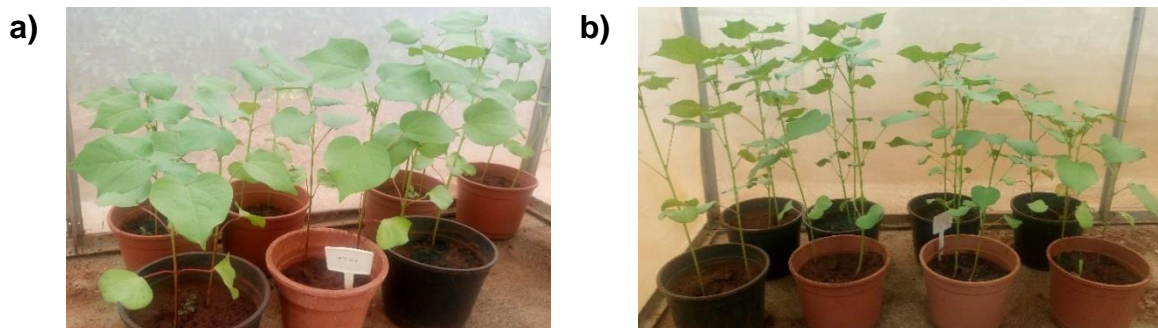


FIGURA 3.9 - Plantas submetidas ao estresse hídrico. a) Genótipo FMT 701. b) Genótipo Delta Opal. Fonte: A autora.

Análise do perfil químico das réplicas verdadeiras dos dois genótipos estudados, em suas amostras controle e induzidas, foi realizada com o método cromatográfico descrito anteriormente com extração via headspace a 80°C por 20 min. 250 mg de folhas de algodão moídas com adição de 200 mg de sulfato de sódio anidro foram utilizados em cada análise.

Dois ensaios biológicos foram realizados: área foliar consumida e índice de atratividade, para verificar o comportamento de lagartas de *S. cosmioides* frente aos diferentes tratamentos realizados. Os ensaios foram realizados em colaboração com a equipe do laboratório de Resistência de Plantas a Insetos da FCAV da UNESP-Jaboticabal. Os ensaios foram feitos em 10 replicatas para cada tratamento de indução em relação ao controle.

Os ensaios foram realizados utilizando-se discos foliares de 3 cm para os 6 tratamentos versus o controle, para cada genótipo padrão (FIGURA 3.10). O ensaio foi realizado com chance de escolha em que dois discos, um do tratamento e outro do controle, foram colocados no interior de placas de Petri® forradas com papel de filtro umedecido. Duas lagartas de *S. cosmioides* no 3° ínstar foram colocados no centro do disco e avaliou-se a atratividade, entre o tratamento e o controle, e a preferência alimentar, medida por área foliar consumida.

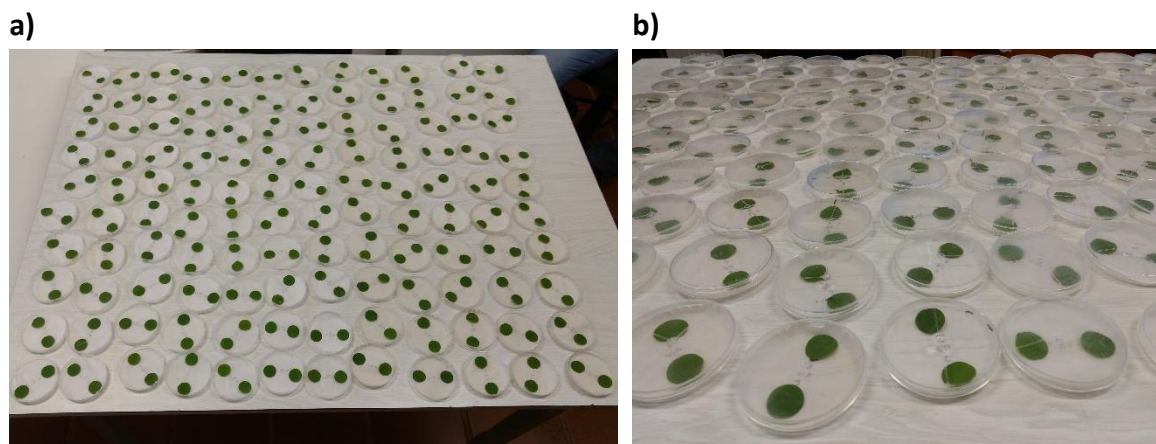


FIGURA 3.10 - Placas de Petri® durante o teste de consumo da área foliar. Fonte: Carlos Alessandro de Freitas, FCAV, UNESP-Jaboticabal.

Ao final dos testes, foi calculado o índice de atratividade (IA) segundo KOGAN ⁸⁸ com a seguinte fórmula: $IA = 2C/(C + S)$, onde C = número de insetos atraídos para o tratamento avaliado e S = número de insetos atraídos para o tratamento controle. O valor de IA pode variar entre zero e dois: $IA \pm E.P. = 1, <1$ e >1 indicam atratividade similar, menor e maior, respectivamente, do tratamento com α -pineno em relação ao controle. A área foliar consumida pelas lagartas foi determinada com auxílio do *software ImageJ*®, através da diferença entre a área foliar inicial e a final.

Os dados de número de lagartas nos discos foliares foram comparadas através do teste Qui-quadrado ($P < 0,05$), enquanto que os dados de área foliar consumida foram submetidos aos testes de homogeneidade de variância (Levene) e normalidade (Kolmogorov-Smirnov) e posteriormente submetidos ao teste t de Student ($P < 0,05$).

3.5 EXPERIMENTO IV: RESISTÊNCIA INDUZIDA POR α -PINENO

Após análise prévia dos constituintes voláteis que se destacaram nos ensaios de resistência constitutivas e induzidas se observou o aumento de alguns constituintes como respostas de resistência. Para avaliar o efeito de um destes sobre a *S. cosmioides* foi realizado um ensaio com a administração do α -pineno nos dois genótipos FMT 701 e Delta Opal.

Similarmente aos ensaios anteriores, as plantas de algodão foram obtidas após a semeadura realizada em vasos plásticos (0.5 L) contendo solo, esterco bovino e areia, na proporção 3:1:1. Os vasos com as plantas foram mantidos em casa de vegetação vedada com tela anti-afídeo e irrigadas sempre que necessário até atingirem o estágio de quarta folha completamente expandida. As plantas destinadas aos tratamentos controle e com aplicação de α -pineno foram colocadas em casas de vegetação momento antes da pulverização. A aplicação do α -pineno, na concentração de $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$, foi realizada utilizando pulverizador manual até próximo ao ponto de escoamento.

Decorridos 40 min após a pulverização foram coletadas a primeira e a segunda folha de cada planta, as quais foram acondicionadas em sacos plásticos e imediatamente levadas para o laboratório visando avaliar a influência do α -pineno na preferência de lagartas de 3^o ínstar de *S. cosmioides* em algodão. Nestes ensaios foram realizados teste com e sem chance de escolha com os dois genótipos avaliados separadamente. Os experimentos foram realizados em condições controladas ($26 \pm 2^\circ \text{C}$, $60 \pm 10\%$ de UR e fotoperíodo de 12L:12E h). O teste foi realizado com placas de Petri[®] (9 cm de diâmetro) forradas com papel filtro umedecido com água deionizada e com auxílio de um vazador metálico (2,5 cm de diâmetro) foram cortados um disco foliar da região central de cada folha.

No ensaio com chance de escolha, discos foliares relativos ao tratamento com aplicação de α -pineno e controle foram colocados em extremidades opostas na placa de Petri[®] e foram liberadas no centro duas lagartas de *S. cosmioides*. Por sua vez nos ensaios sem chance de escolha, os discos foliares relativo a cada tratamento foram colocados individualmente nas placas de Petri[®] e liberada uma lagarta de *S. cosmioides*. Os ensaios foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizados, com 10 repetições. Em ambos os ensaios, o número de

lagartas nos discos foliares de cada tratamento foram contabilizadas aos 30, 60, 180, 360, 720, 1440 e 2160 min após a liberação das lagartas.

Ao final dos testes, foi calculado o índice de atratividade (IA) segundo KOGAN ⁸⁸ com a seguinte fórmula: $IA = 2C/(C + S)$, onde C = número de insetos atraídos para o tratamento avaliado e S = número de insetos atraídos para o tratamento controle. O valor de IA pode variar entre zero e dois: $IA \pm E.P. = 1$, <1 e >1 indicam atratividade similar, menor e maior, respectivamente, do tratamento com α -pineno em relação ao controle. Também foi determinado a área foliar consumida pelas lagartas com auxílio do *software ImageJ*[®], através da diferença entre a área foliar inicial e a final.

Os dados de número de lagartas nos discos foliares foram comparadas através do teste Qui-quadrado ($P < 0,05$), enquanto que os dados de área foliar consumida foram submetidos aos testes de homogeneidade de variância (Levene) e normalidade (Kolmogorov-Smirnov) e posteriormente submetidos ao teste t de Student ($P < 0,05$). Os ensaios de não-preferência, índice de atratividade e área foliar consumida, foram realizados pela equipe do Laboratório de Plantas Resistentes a Insetos da FCAV, UNESP-Jaboticabal.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 MÉTODO DE EXTRAÇÃO HS

O método de extração dos compostos voláteis via *headspace* e análise por cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massa se apresenta como o primeiro passo desse trabalho na investigação dos perfis químicos dos diferentes genótipos de algodão. Para que o método seja suficientemente eficiente para identificar com confiabilidade as diferenças entre os genótipos e entre os experimentos realizados nesse estudo, foi necessário, inicialmente, estabelecer as condições ótimas para a extração.

Esse passo é muito importante para o estudo, pois somente a partir da definição do melhor método de extração e análise foi possível verificar com confiabilidade as relações qualitativas e quantitativas para o estudo metabolômico dos constituintes voláteis do algodão.

Para isso, o planejamento fatorial composto central foi realizado para definir a melhor temperatura, tempo de extração e quantidade de secante (Na_2SO_4) utilizado, de modo a se obter o maior número e maior concentração de compostos extraídos. O modelo composto central foi escolhido para o planejamento fatorial do estudo, pois nesse caso espera-se que todas as variáveis sejam igualmente importantes^{59; 89}. Desse modo, todas as variáveis selecionadas serão validadas na busca pelas condições em que os sinais-resposta foram maximizados, ou seja, para a obtenção de uma condição de extração que forneceu o maior número de picos com maior intensidade.

A partir dos cromatogramas das análises do *mix* de folhas dos 12 genótipos para o planejamento fatorial, foram selecionados 11 picos, 11 compostos, nos cromatogramas. As áreas padronizadas dos compostos selecionados, isto é, área do pico dividida pela área do padrão interno, foram utilizados como sinais-resposta no planejamento fatorial composto central, conforme é mostrado na TABELA 4.1.

TABELA 4.1 – Sinais-resposta obtidos no planejamento fatorial de experimentos composto central para os compostos selecionados

Exp.	Respostas										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
	Hexanal	(Z)-2-Hexenal	(E)-2-Hexenal	α -pineno	β -pineno	β -mirceno	Limoneno	β -ocimeno	Cariofileno	Humuleno	Guaia-1(10),11-diene
14	11,544	0,851	59,311	2,513	0,414	0,522	0,150	0,237	0,775	0,266	0,238
2	14,145	0,652	69,982	2,445	0,596	0,376	0,126	0,117	0,292	0,092	ND
1	17,519	0,671	69,605	3,710	0,751	ND	ND	ND	0,365	0,289	ND
18	17,709	0,788	63,620	2,875	0,711	0,534	0,168	0,266	0,622	0,235	0,170
17	19,770	0,671	60,810	6,321	0,000	1,343	0,478	0,289	0,445	0,219	ND
15	19,687	0,956	87,423	2,819	0,512	0,000	0,198	0,000	0,553	0,247	ND
4	23,091	ND	102,639	4,011	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
3	23,715	0,820	83,388	6,478	1,879	1,216	0,484	0,627	0,817	0,587	ND
13	16,692	ND	62,888	4,829	ND	ND	ND	ND	0,606	ND	ND
7	17,217	0,717	51,417	5,882	1,380	1,502	0,492	0,481	1,283	0,373	0,218
8	18,612	0,559	40,830	3,873	0,786	1,044	0,371	0,421	1,248	0,445	0,371
16	18,089	0,712	58,197	6,391	1,309	1,224	0,478	0,423	1,522	0,483	0,385
5	19,643	1,043	56,651	5,730	1,432	1,471	0,398	0,420	0,929	0,324	0,266
6	17,594	0,657	45,362	5,814	0,951	0,831	0,330	0,441	1,328	0,415	0,288
9*	22,875	ND	89,405	4,274	ND	ND	ND	ND	0,965	1,107	ND
10*	22,699	0,954	81,023	5,498	1,002	1,087	0,401	0,351	0,532	0,436	0,103
12*	19,530	1,070	80,090	4,574	ND	ND	0,238	ND	1,286	0,645	0,475

Exp. = Experimentos. ND = Não detectado. *Replicatas no ponto central

Para os cálculos da tabela Anova e coeficientes de regressão para cada sinal-resposta, foi utilizada a rotina de cálculo *regression 2* no software MatLab® R2016a (*The MathWorks, Natick, MA*), conforme desenvolvida por PEREIRA⁸⁹.

Para cada sinal-resposta, foi feita a avaliação dos coeficientes de correlação, através do Teste F da média quadrática da regressão do modelo ($MQ_{\text{regressão}}$) e da média quadrática dos resíduos ($MQ_{\text{resíduos}}$), conforme EQUAÇÃO 4.1.

$$\text{Teste } F = \frac{MQ_{\text{Regressão}}}{MQ_{\text{resíduo}}}$$

EQUAÇÃO 4.1

Assim, se verificou que quando $F_{\text{tabelado}} < F_{\text{calculado}}$, o modelo pode ser utilizado para efetuar previsões, maior confiabilidade é obtida quando $F_{\text{calculado}}$ é pelo menos 5 vezes maior que o F_{tabelado} . O oposto, entretanto, é verificado quando $F_{\text{tabelado}} > F_{\text{calculado}}$: modelo deve ser avaliado com cautela ou não deve ser utilizado.

Para avaliar os resíduos do modelo, o Teste F é feito com a média quadrática de falta de ajuste ($MQ_{\text{Falta de ajuste}}$) e a média quadrática do erro puro ($MQ_{\text{Erro Puro}}$), conforme EQUAÇÃO 4.2.

$$\text{Teste } F = \frac{MQ_{\text{Falta de ajuste}}}{MQ_{\text{Erro Puro}}}$$

EQUAÇÃO 4.2

Desse modo, quando $F_{\text{tabelado}} > F_{\text{calculado}}$, o modelo é bem ajustado, e que o erro de falta de ajuste se confunde com os erros experimentais (erro puro). Enquanto, quando $F_{\text{tabelado}} < F_{\text{calculado}}$, o modelo apresenta falta de ajuste, ou seja, o erro de falta de ajuste do modelo é muito maior que os erros experimentais.

Os resultados individuais de cada sinal-resposta do cálculo da tabela Anova e coeficientes de regressão estão disponíveis no APÊNDICE A – Planejamento fatorial.

A função de desejabilidade global foi calculada para o modelo em que se objetivou a maximização de todos os sinais-resposta, foi determinado que as três variáveis são não significativas para o processo de extração via *HS*. Portanto, as variáveis podem ser utilizadas em qualquer nível ou no ponto central (0): 70°C, 15 minutos e 200 mg de secante. Dessa maneira, optou-se por utilizar as variáveis 1

e 2 no nível (+1), a 80°C e 20 min, respectivamente, e a variável 3 no ponto central, sendo 200 mg de secante.

A FIGURA 4.1 ilustra um cromatograma obtido com as condições de ótimas de extração definidas para a extração de *HS*.

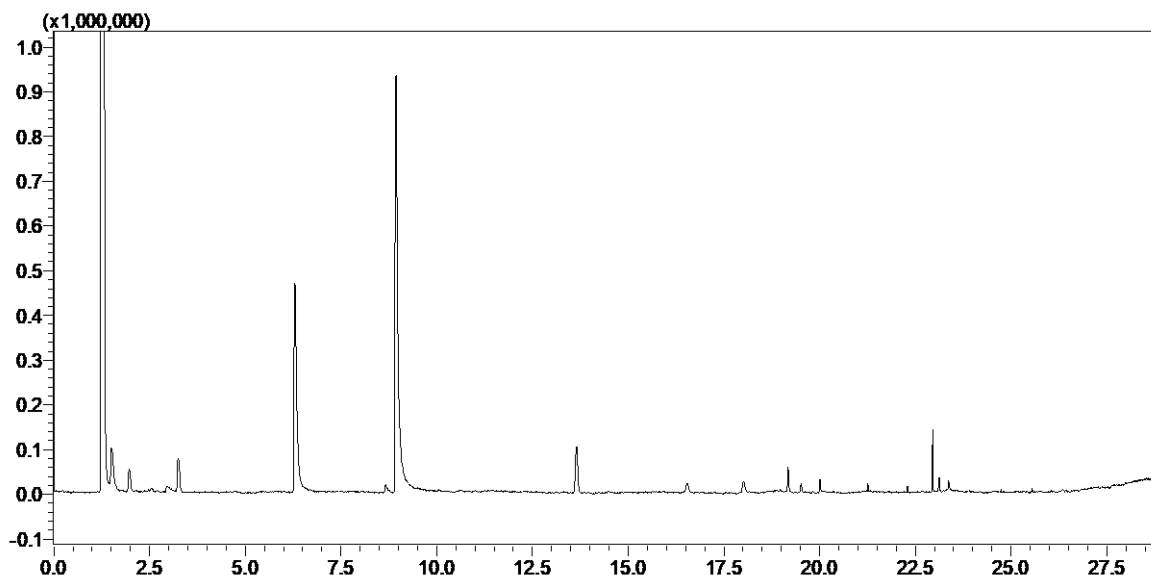


FIGURA 4.1 - Cromatograma com as condições ótimas de extração.

Uma vez definidas as condições de extração, iniciou-se a aferição da precisão analítica para verificar e garantir que o método analítico desenvolvido é capaz de mensurar as diferenças obtidas entre as amostras controle e as amostras com diferentes tratamentos. Assim, a precisão analítica para o método de HS-GC-MS foi realizada para a extração em *HS* a 80°C, por 20 min na ausência e na presença de secante (Na_2SO_4), de acordo com a metodologia descrita por SOUZA SILVA⁶⁶. Para o estudo *intra-day* foram analisadas 3 amostras no mesmo dia (n=3). Para o estudo *inter-day*, foram analisadas 3 amostras em 3 dias diferentes (n=9). Para as extrações com e sem a presença de secante foram analisadas 3 amostras em 2 dias diferentes (n=6).

A variabilidade foi expressa em unidades de desvio padrão relativo (DPR, %) para 10 analitos selecionados e para o 1,4-cineol (PI), nas amostras *intra-day* e *inter-day*. Segundo critério estabelecido pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para a variabilidade analítica para *targeted* bioanálises, a variabilidade aceitável é de 15-20%⁹⁰.

Para a extração realizada na ausência de secante (GRÁFICO 4.1) foram obtidos DPR entre 9 e 21% para as amostras *intra-day* e DPR de 9 a 23% para as amostras *inter-day*. Da mesma forma, as extrações realizadas na presença de secante (GRÁFICO 4.2) estão de acordo com o critério FDA⁹⁰, visto que foram obtidos valores de DPR que variam de 6 a 15%.

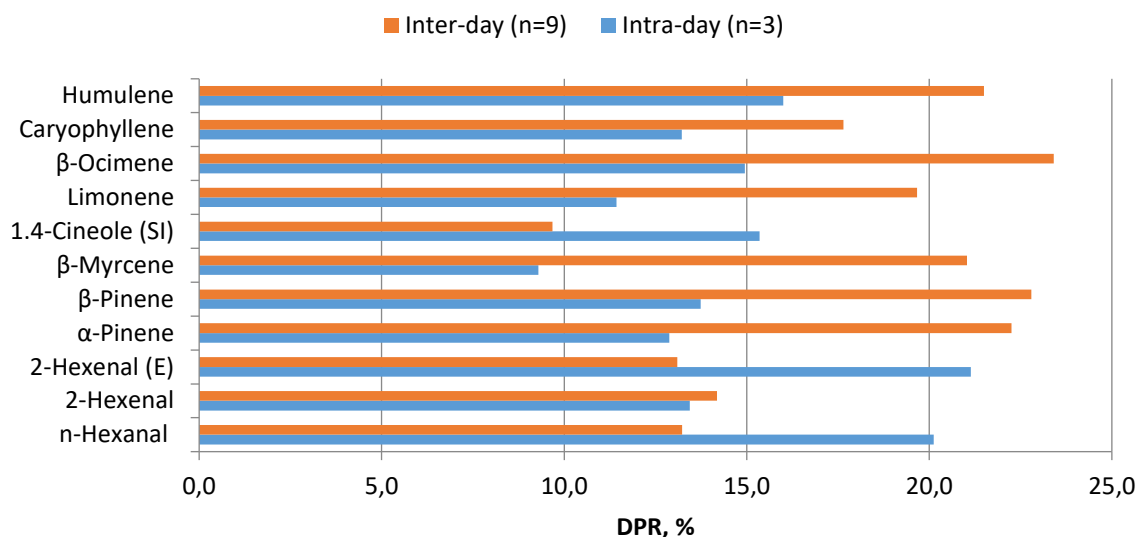


GRÁFICO 4.1 - Precisão analítica em DPR% para os 10 analitos selecionados e para o 1,4-cineol (PI) obtidos através da análise de HS-GC/MS do mix de genótipos de *G. hirsutum*, no método de extração na ausência de Na_2SO_4 .

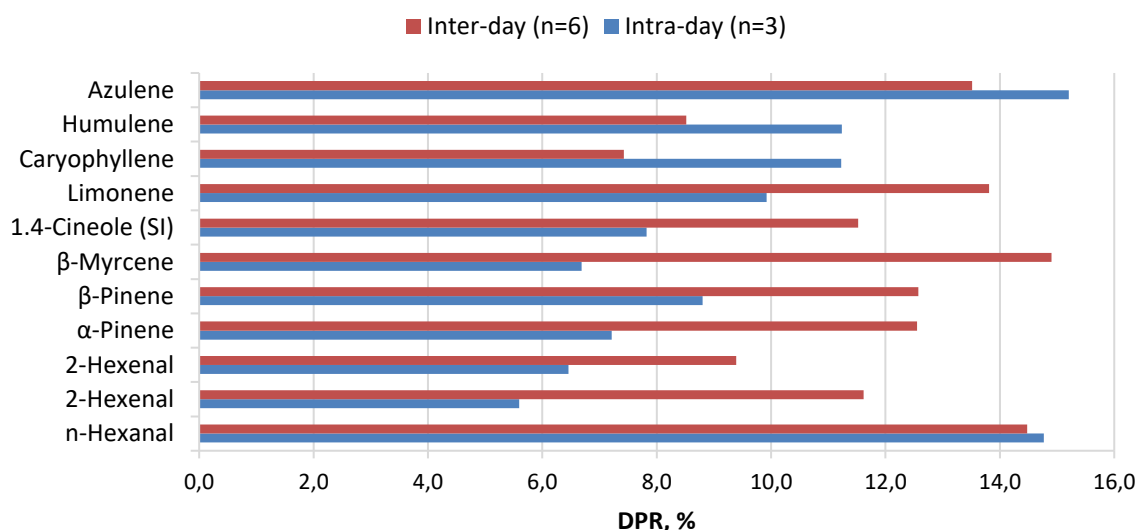


GRÁFICO 4.2 - Precisão analítica em DPR% para os 10 analitos selecionados e para o 1,4-cineol (PI) obtidos através da análise de HS-GC/MS do mix de genótipos de *G. hirsutum*, no método de extração na presença de Na_2SO_4 .

4.2 EXPERIMENTO I: RESISTÊNCIA CONSTITUTIVA

Uma vez definidos os métodos de extração e análise se iniciou a aplicação do método nas amostras vegetais em investigação. As amostras de folhas de algodão dos 12 genótipos foram analisadas no método de HS-GC-MS desenvolvido e descrito anteriormente, conforme procedimento experimental. Os cromatogramas para cada genótipo estão disponíveis no APÊNDICE B – Experimento I: Resistência Constitutiva - Cromatogramas.

Contudo, no estudo de resistência constitutiva dos 12 genótipos, foram identificados experimentalmente 18 compostos orgânicos voláteis (TABELA 4.2).

TABELA 4.2 - Identificação experimental dos compostos orgânicos voláteis presentes nos genótipos de algodão estudados

#	Nome	Nº CAS	TR (min)	IR Experimental	IR Literatura
1	n-Hexanal	66-25-1	6,43	800	800
2	(Z)-2-Hexenal	6728-26-3	8,83	844	814
3	(E)-2-Hexenal	6728-26-3	9,15	850	854
4	α -Thujeno	2867-05-2	13,52	923	902
5	α -Pineno	80-56-8	13,85	928	934
6	Canfeno	79-92-5	14,8	942	947
7	β -Pineno	127-91-3	16,75	970	974
8	β -Mirceno	123-35-3	18,2	991	983
PI	1,4-Cineol	470-67-7	19,28	1035	1008
9	Limoneno	138-86-3	19,58	1056	1027
10	β -Ocimeno	13877-91-3	20,05	1090	1050
11	Cariofileno	87-44-5	22,97	1551	1443
12	α -Guaieno	3691-012-001	23,02	1561	1442
13	Humuleno	6753-98-6	23,15	1588	1449
14	β -Farneseno	18794-84-8	23,25	1609	1440
15	α -Bergamoteno	17699-05-7	23,37	1634	1430
16	β -Bisabolol	15352-77-9	24,18	1749	1619
17	Tetradecanal	124-25-4	24,29	1821	1601
18	δ -Muuroleno	30021-74-0	28,13	2558	1468

Os compostos (FIGURA 4.2) foram experimentalmente identificados através da biblioteca NIST 11, fazendo-se uso também do índice de retenção linear (IR)⁹¹. Os espectros de massas dos compostos identificados no Experimento I estão disponíveis no APÊNDICE C – Experimento I: Resistência Constitutiva – Espectros de massas.

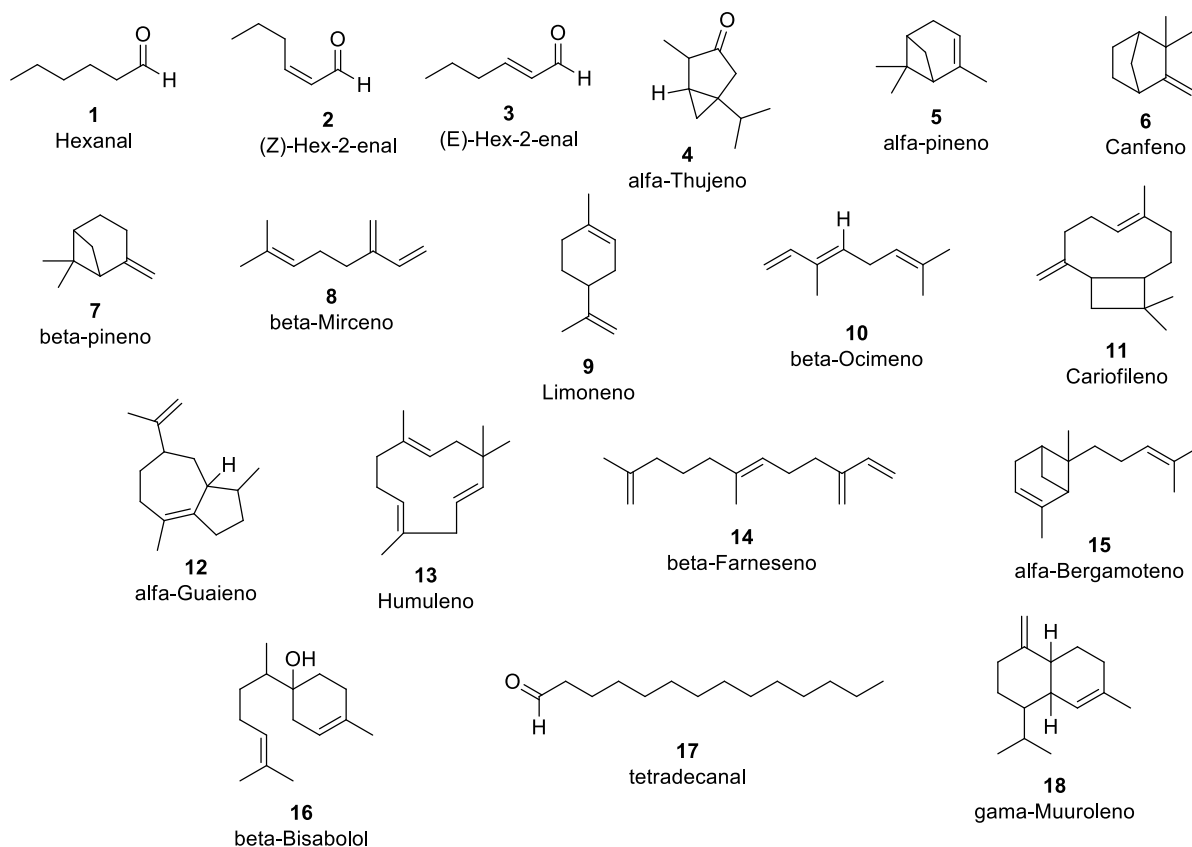


FIGURA 4.2 - Compostos orgânicos voláteis identificados nos 12 genótipos de algodão

O índice de retenção experimental ($IR_{\text{experimental}}$) foi calculado em relação aos tempos de retenção obtidos para uma mistura padrão de n-alcenos de C7 a C40 (Sigma-Aldrich, Estados Unidos da América) no método de análise HS-GC-MS desenvolvido (FIGURA 4.3).

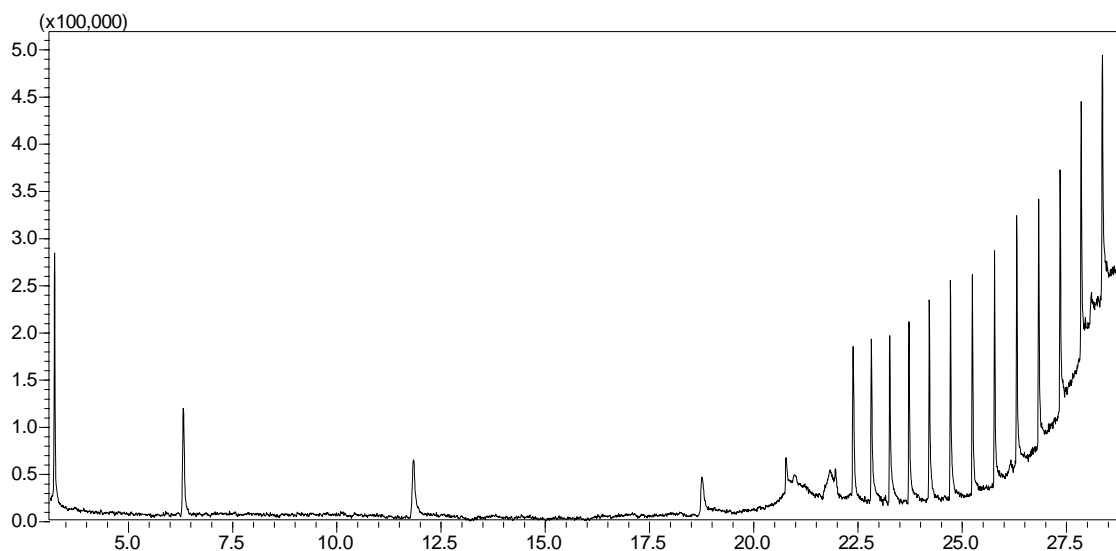


FIGURA 4.3 – Cromatograma da análise da mistura padrão de n-alcenos de C7 a C40 no método de análise HS-GC-MS desenvolvido.

O IR de cada composto foi calculado conforme a EQUAÇÃO 4.3 abaixo:

$$IR = 100 \times \left(\frac{t_c - t_n}{t_{n+1} - t_n} + n \right)$$

EQUAÇÃO 4.3

Onde: IR - índice de retenção linear; t_c - tempo de retenção do composto de interesse; t_{n+1} - tempo de retenção do hidrocarboneto posterior; n - nº de carbonos do hidrocarboneto anterior. Os valores obtidos para o índice de retenção (IR experimental) para cada composto foram comparados com os valores encontrados na literatura, de modo a auxiliar a identificação, conforme apresentado na TABELA 4.2.

As áreas dos sinais obtidos, a partir dos 5 min de análise, para todos os genótipos foram padronizadas em relação à área obtida para o 1,4-cineol (PI). Foi realizada, então, um agrupamento hierárquico dos dados (FIGURA 4.4) no *software Mass Profiler Professional* de acordo com a distância euclidiana. As cores mais quentes indicam maior concentração do composto, enquanto as cores mais frias indicam menor concentração do composto em determinado genótipo.

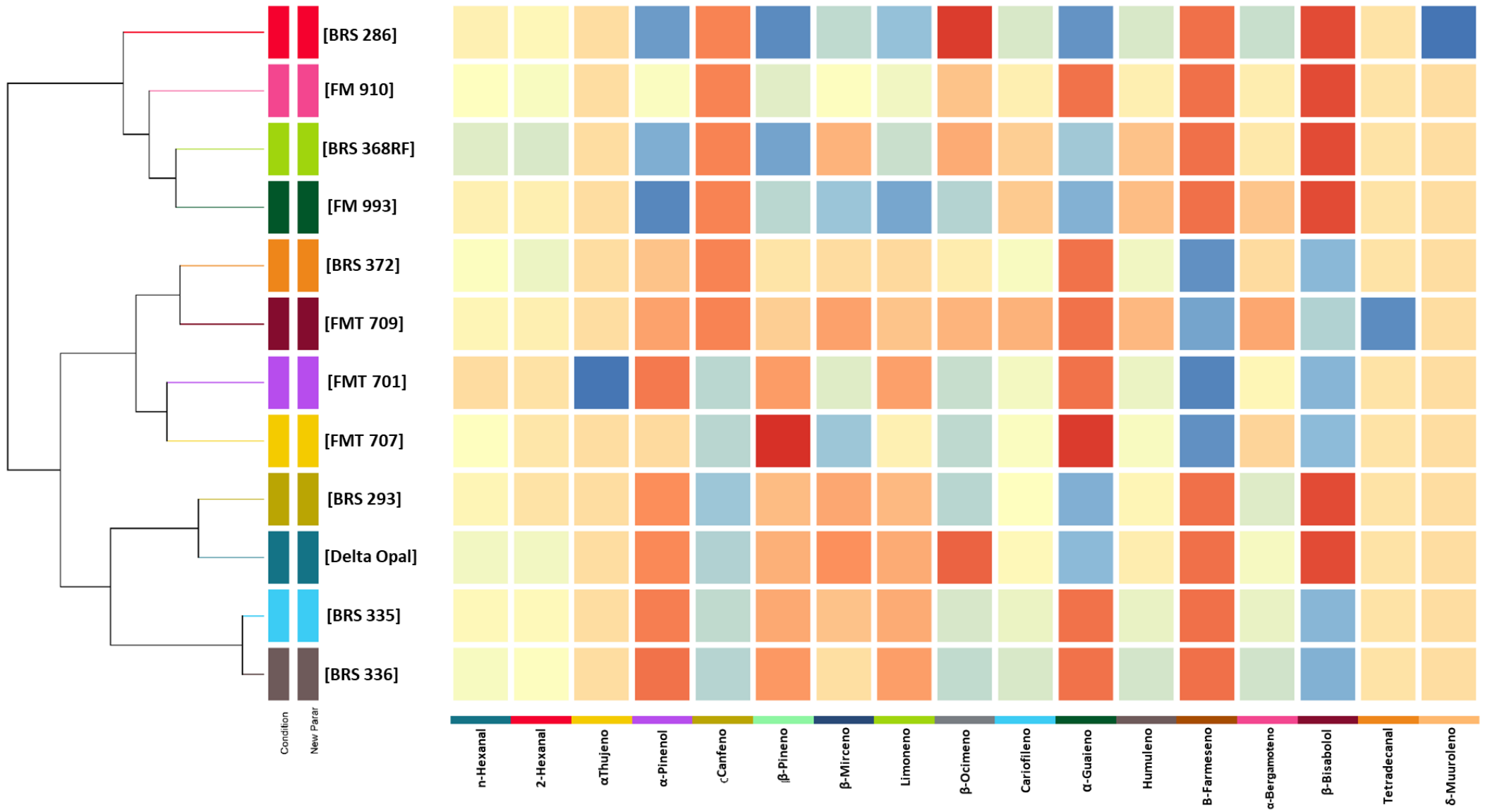


FIGURA 4.4 – Análise hierárquica dos compostos voláteis *versus* genótipos estudados.

Pode-se observar, portanto, que os genótipos se diferenciam entre si principalmente pelos compostos β -bisabolol, β -farneseno, β -ocimeno, α -guaiano, β -pineno e α -pineno. Observa-se também que, a partir do agrupamento dos dados, os genótipos são divididos em três grupos principais que possuem perfis químicos semelhantes. Os genótipos BRS 286, FM 910, BRS 368 RF e FM 993 se mostraram semelhantes entre si e se diferenciam dos demais, que são, por sua vez, se subdividem em outros dois grupos: os genótipos BRS 372, FMT 709, FMT 701 e FMT 707 são semelhantes entre si e se diferenciam dos genótipos BRS 293, Delta Opal, BRS 335 e BRS 336.

A análise de componentes principais (PCA), entretanto, apresenta-se como um pré-tratamento de dados que permite observar mais claramente essas diferenças, além de indicar quais compostos foram mais significativos para diferenciar os perfis químicos dos genótipos. Na FIGURA 4.5, o gráfico de amostras/Scores permitiu agrupar e diferenciar os genótipos entre si. O genótipo FMT 707, por exemplo, se diferencia do genótipo Delta Opal por meio do componente principal 1 (PC1), na vertical. Enquanto que o genótipo FMT 701, se diferencia do genótipo Delta Opal por meio da componente principal 2 (PC2), na horizontal. O genótipo BRS 368RF, por sua vez, se diferencia do genótipo FMT 701 por meio de ambas as componentes principais.

Amostras/Scores plot para os 12 genótipos de algodão - Resistência constitutiva

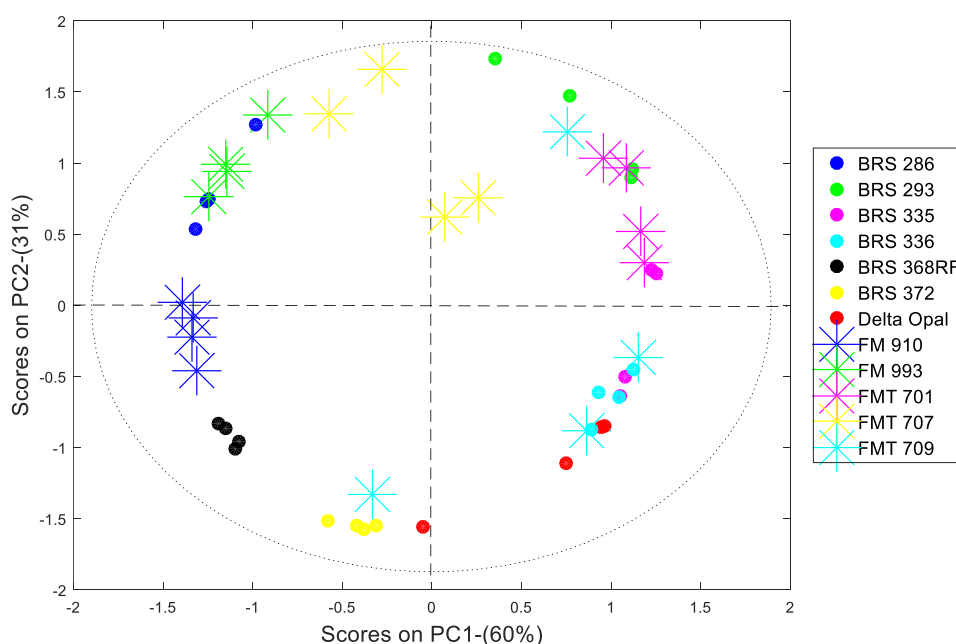


FIGURA 4.5 - Amostras/Scores para os genótipos no estudo de Resistência Constitutiva

A FIGURA 4.6 apresenta o gráfico de variáveis/*loadings* para os 12 genótipos de algodão sendo possível observar que os compostos significativos para a PC1 (60% de variância), em azul, são, em ordem de significância (quanto mais distante do zero, mais significativo), os compostos α -Pineno (5), β -Pineno (7) e 2-Hexenal (3), respectivamente. Já para a PC2 (31 % de variância), em laranja, os compostos significativos foram: 2-Hexenal (3), α -Pineno (5), β -Pineno (7) e β -Mirceno (8).

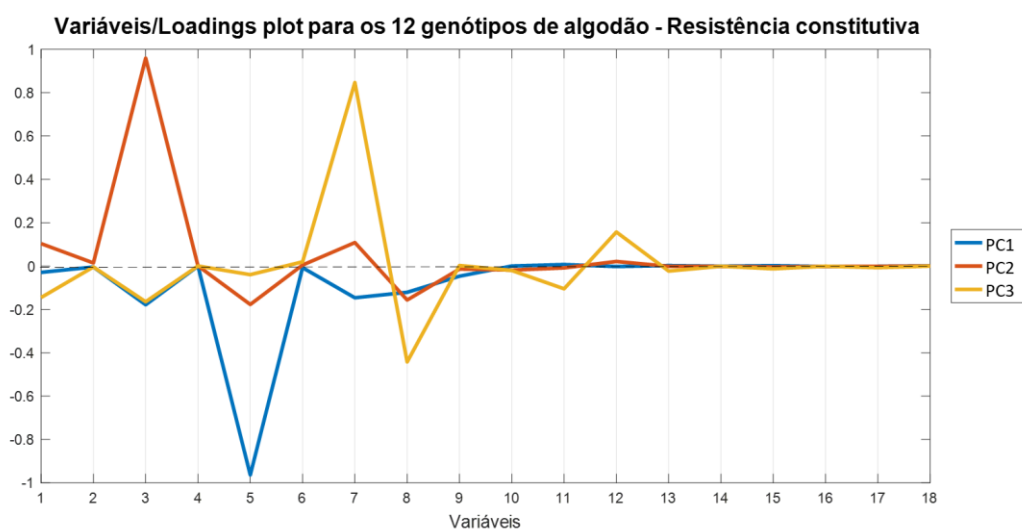


FIGURA 4.6 - Gráfico de Loadings dos perfis químicos dos genótipos de algodão – Resistência constitutiva

Adicionalmente, se observa que os perfis metabólico de compostos orgânicos voláteis dos genótipos de algodão já conhecidos na literatura são significativamente diferentes entre si. Os genótipos FM 993 e Delta Opal e os genótipos FM 910 e FMT 701, classificados como suscetíveis e resistentes à *A. argillacea*, à *S. frugiperda* e à *C. includens*^{86; 87; 92}, respectivamente, estão localizados cada um em um quadrante no gráfico de *scores* (FIGURA 4.5). Assim, as diferenças entre os genótipos Delta Opal, padrão de suscetibilidade, e o genótipo FMT 701, padrão de resistência é explicada pela PC2 do gráfico de *scores* (FIGURA 4.5). Essa diferença está relacionada a maior concentração de α -Pineno (5), β -Ocimeno (10), β -Farneseno (14) e β -Bisabolol (16) no genótipo Delta Opal e menor concentração de β -Farneseno (14) e β -Bisabolol (16) no genótipo FMT 701, conforme FIGURA 4.4.

Nos ensaios biológicos comportamentais da lagarta *S. cosmioides* frente aos diferentes genótipos de algodão foram avaliados os parâmetros de não-preferência de *S. cosmioides*: atratividade e consumo foliar. Em relação a atratividade os genótipos foram classificados em repelentes, atraente e neutros, conforme ilustrado na FIGURA 4.7. Os ensaios biológicos foram realizados em colaboração com o Laboratório de Resistencia de Plantas a Insetos, FCAV, UNESP-Jaboticabal.

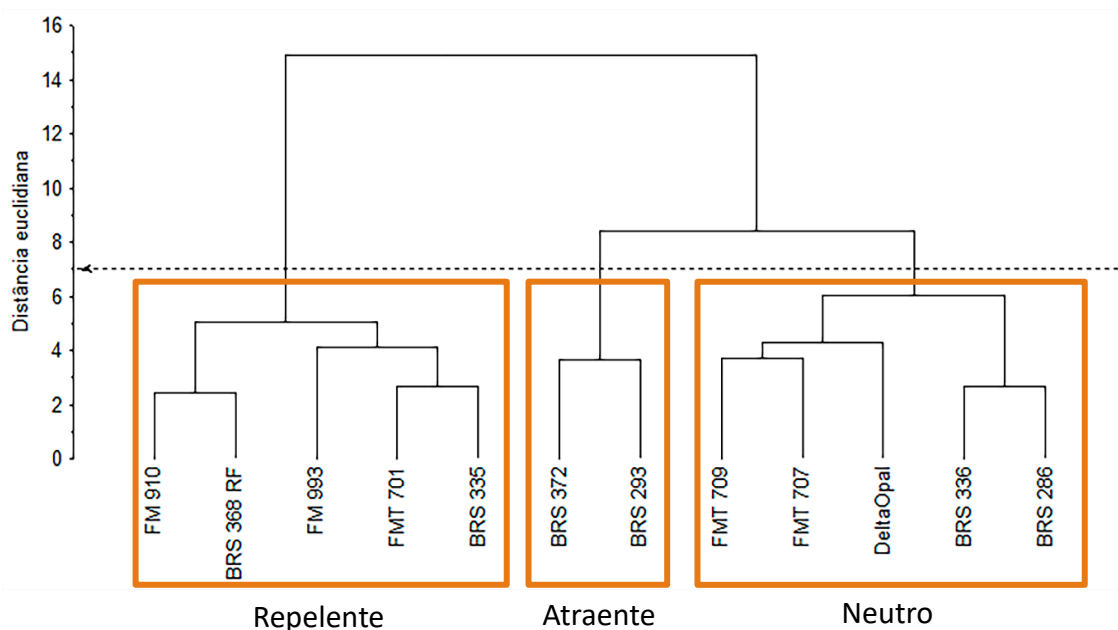


FIGURA 4.7 - Ensaio de não-preferência. Agrupamento hierárquico baseado na atratividade de lagartas de *Spodoptera cosmioides* para os genótipos de algodoeiro em testes com e sem chance de escolha. Fonte: Carlos Alessandro de Freitas, FCAV, UNESP-Jaboticabal.

Como observado na FIGURA 4.7, os genótipos FM 910, BRS 368RF, FM 993, FMT 701 e BRS 335 se apresentaram repelentes a *S. cosmioides*, isto é, o seu perfil químico de compostos voláteis emitidos não se mostra atraente a lagarta. Em outras palavras, também pode significar que o seu perfil químico de compostos voláteis apresenta substâncias ou quantidades de compostos danosos à lagarta, não-atrativos.

Analisando os resultados dos ensaios biológicos de acordo com os resultados obtidos na análise do componente principal, temos que os genótipos classificados como repelentes FM 910, BRS 368RF, FM 993, FMT 701 e BRS 335 se distribuíram nos três primeiros quadrantes do gráfico de scores (FIGURA 4.5). Esse fato pode indicar que não necessariamente temos um perfil químico único de compostos voláteis responsável pela resposta biológica frente a *S. cosmioides* e, também que

outros fatores, como fatores morfológicos podem estar relacionados com a repelência/resistência a lagarta.

Em contrapartida, os genótipos BRS 372 e BRS 293 se apresentaram atrativos à *S. cosmioides*. Este resultado pode indicar um perfil químico de compostos voláteis desses dois genótipos menos prejudiciais a lagarta, ou atrativos nesse primeiro contato. Da mesma forma que foi observado para os genótipos repelentes, os dois genótipos atrativos ficaram localizados em dois quadrantes, diferentes entre si, do gráfico de *escores* (FIGURA 4.5), quadrante I e III, indicando, também que outros fatores somados ao perfil químico de voláteis podem ser responsáveis por essa resposta biológica frente a *S. cosmioides*.

Adicionalmente, foi realizado o agrupamento hierárquico no *software Mass Profiler Professional* de acordo com a distância euclidiana dos grupos de genótipos repelentes, atraentes e neutros, de acordo com os resultados do ensaio de não-preferência à *S. cosmioides* (FIGURA 4.8).

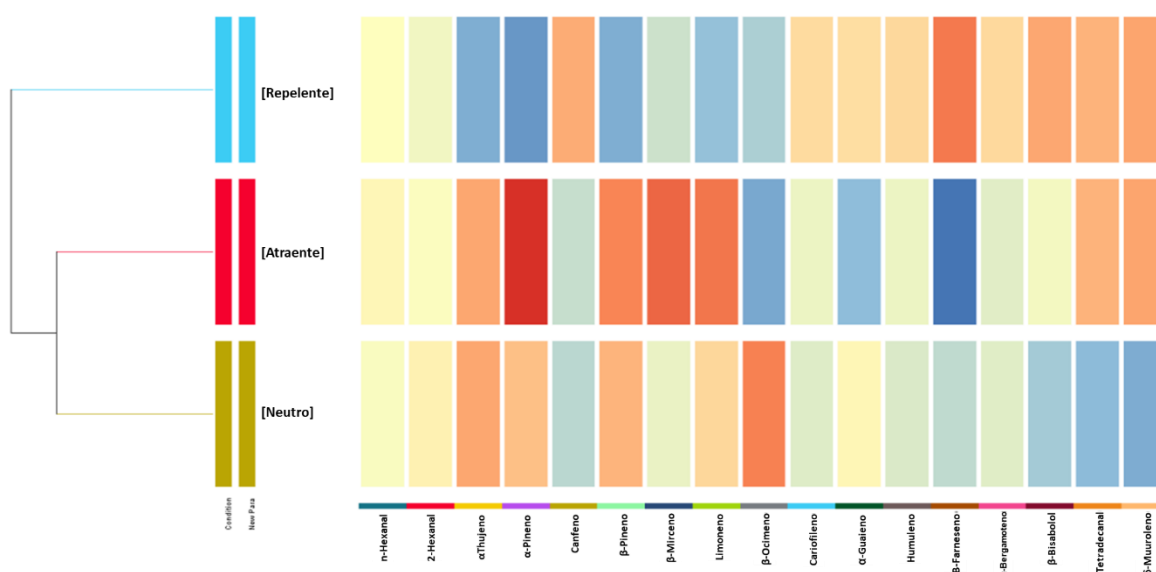


FIGURA 4.8 - Agrupamento hierárquico baseado no perfil químico *versus* a atratividade de lagartas de *Spodoptera cosmioides*. Tons mais quentes indicam maior concentração do composto, enquanto tons mais frios indicam menor concentração.

O agrupamento hierárquico mostrado na FIGURA 4.8 permite concluir que para o grupo de genótipos classificados como repelentes a partir do ensaio biológico de índice de atratividade há a ausência expressiva de α -thujeno, α -pineno,

β -pineno e limoneno, enquanto para os genótipos classificados como atraentes há a presença expressiva de α -pineno, β -pineno, β -mirceno e limoneno.

Avaliando o consumo foliar, foi possível observar na FIGURA 4.9 que a área foliar consumida dos diferentes genótipos pela lagarta de *S. cosmioides* não apresentou diferenças significativas entres os genótipos ensaiados se mantendo constante no teste com chance de escolha. Por outro lado, no teste sem chance de escolha, observamos que o genótipo Delta Opal teve a maior área foliar consumida indicando elevada suscetibilidade frente à lagarta.

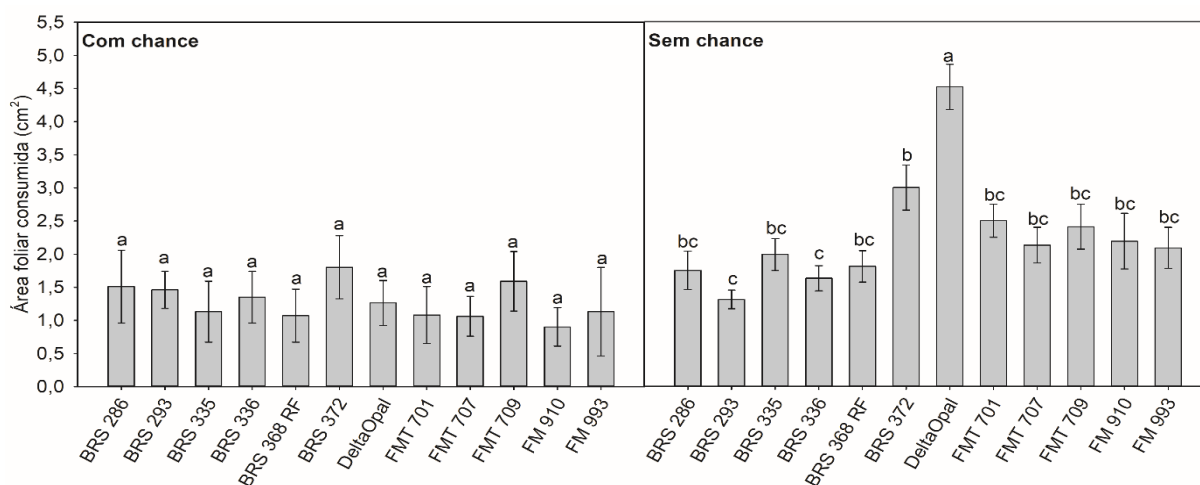


FIGURA 4.9 – Ensaio de não-preferência. Área foliar consumida (cm²) por lagartas de *Spodoptera cosmioides* em diferentes genótipos de algodoeiro em teste com e sem chance de escolha. Fonte: Carlos Alessandro de Freitas, FCAV, UNESP-Jaboticabal.

É importante observar que para os genótipos padrão, Delta Opal e FMT 701 foi possível estabelecer conexões entre a resposta biológica comportamental da lagarta e do perfil químico de compostos voláteis obtido. Os dois genótipos foram classificados em resistente e susceptível de acordo com a não-preferência de *S. cosmioides* e foi possível a diferenciação dos perfis químicos de compostos voláteis no gráfico de scores (FIGURA 4.5), indicando que os perfis são diferentes. Dessa maneira, os resultados dos demais experimentos realizados nesse trabalho não serão prejudicados por outros fatores não contemplados, como a morfologia e os compostos não-voláteis, por exemplo.

Esses resultados estão de acordo com os dados da literatura visto que os compostos β -pineno, α -pineno, mirceno, cariofileno, limoneno, β -ocimeno, β -bisabolol, por exemplo, já foram identificados em folhas de algodão por ELZEN⁹³.

YANG e colaboradores⁹⁴ inclusive já isolaram e caracterizaram as terpenos sintases em plantas de algodão (*G. hirsutum*) para diversos compostos voláteis, mono e sesquiterpenos: α -pineno, β -pineno, β -mirceno, β -ocimeno, β -cariofileno, α -humuleno, β -bisabolol, β -felandreno, α -bergamoteno e β -farneseno, por exemplo, que também foram identificados nesse trabalho.

Adicionalmente, os dados da literatura também associam a resistência de plantas de algodão aos compostos α -Pineno, β -Pineno e β -Mirceno^{95; 96, 94, 97, 98}, bem como aos voláteis de folhas frescas (*green leaf volatiles*- GLV) hexanal e 2-hexenal^{99; 100}.

4.3 EXPERIMENTO II: RESISTÊNCIA INDUZIDA POR HERBIVORIA

Após a identificação do perfil químico dos 12 genótipos de algodão e da classificação dos genótipos frente a resistência constitutiva em relação à não-preferência de *S. cosmioides*, investigou-se as alterações do perfil metabolômico dos compostos voláteis após a indução de resistência por herbivoria de *S. cosmioides*, bem como foi realizada a reclassificação da resistência desses genótipos, em busca de verificar se o comportamento frente a *S. cosmioides* sofreu alteração em relação ao perfil de compostos voláteis após a herbivoria.

No estudo de resistência induzida por herbivoria dos 12 genótipos, foram identificados experimentalmente 26 compostos orgânicos voláteis a partir do método de HS-GC/MS desenvolvido (FIGURA 4.10). Assim como no Experimento I, a identificação dos compostos foi realizada através da biblioteca NIST 11 e do índice de retenção (Índice de Retenção), além de dados da literatura (TABELA 4.3).

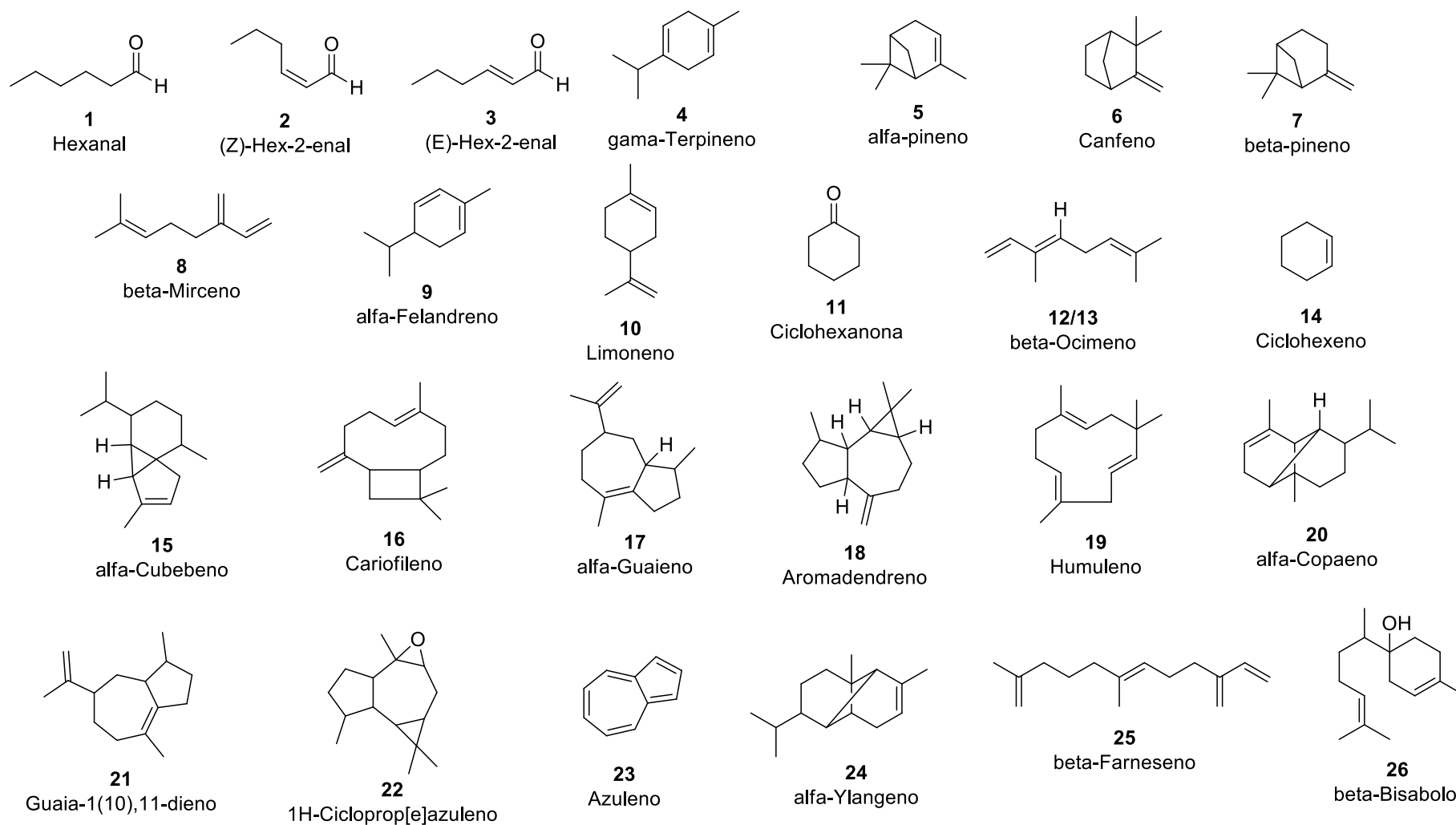


FIGURA 4.10 - Compostos orgânicos voláteis identificados nos 12 genótipos de algodão no Experimento II – Resistência Induzida por herbivoria de *S. cosmioides*.

TABELA 4.3 - Identificação experimental dos compostos presentes nos diferentes genótipos de algodão por HS-GC-MS

#	Nome	Nº CAS	TR (min)	RI Experimental	RI Literatura
1	n-Hexanal	66-25-1	6,40	801	800
2	(Z)-2-Hexenal	6728-26-3	8,80	845	814
3	(E)-2-Hexenal	6728-26-3	9,06	849	854
4	γ -Terpineno	99-85-4	13,45	923	998
5	α -Pinoeno	80-56-8	13,79	928	934
6	Canfeno	79-92-5	14,70	941	947
7	β -Pinoeno	127-91-3	16,70	970	974
8	β -Mirceeno	123-35-3	18,16	991	983
9	α -felandreno	99-83-2	18,76	1000	969
PI	1,4-Cineol (PI)	470-67-7	19,24	1024	1008
10	Limoneno	138-86-3	19,57	1040	1027
11	Ciclohexanona	2408-37-9	19,74	1049	1086
12	trans- β -Ocimeno	3779-61-1	19,86	1054	976
13	β -Ocimeno	13877-91-3	20,05	1064	976
14	Cyclohexeno	586-62-9	20,61	1091	1052
15	α -Cubebeno	17699-14-8	22,72	1377	1344
16	Cariofileno	87-44-5	22,97	1434	1494
17	α -Guaieno	3691-012-001	23,03	1447	1443
18	Aloaromadendreno	25246-27-9	23,07	1456	1386
19	Humuleno	18794-84-8	23,15	1473	1579
20	α -Copaeno	3856-25-5	23,27	1502	1221
21	Guaia-1(10),11-dieno	3691-11-0	23,31	1510	1490
22	1H-Cicloprop[e]azuleno	21747-46-6	23,34	1518	1419
23	Azuleno	3691-11-0	23,39	1527	1490
24	α -Ylangeno	14912-44-8	23,43	1537	1221
25	α -Farneseno	502-61-4	23,61	1576	1458
26	β -Bisabolol	15352-77-9	24,21	1700	1619

Os resultados do ensaio de área foliar consumida por *S. cosmioides* nas amostras controle em relação às amostras induzidas são mostrados na FIGURA 4.11

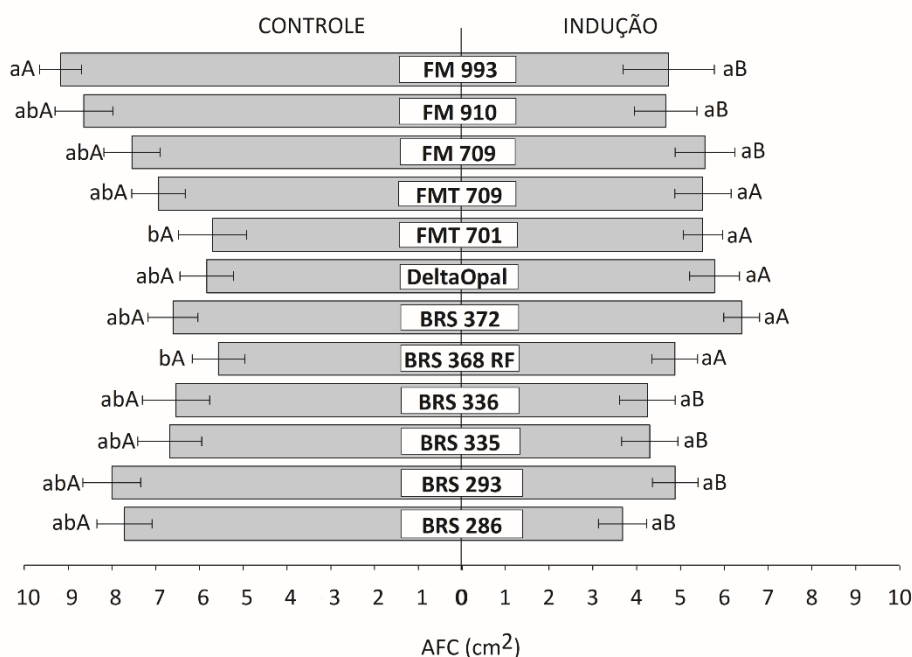


FIGURA 4.11 - Área foliar consumida (AFC, cm²) por lagartas de 3^o ínstar de *Spodoptera cosmioides* em diferentes cultivares de algodão com indução de resistência através de herbivoria. Letras iguais minúsculas verticalmente e maiúsculas horizontalmente não diferem entre si pelo teste de *Tukey* ($p < 0,05$).

Fonte: Carlos Alessandro de Freitas, FCAV, UNESP-Jaboticabal¹⁰¹.

Os resultados evidenciam a indução de resistência por herbivoria de *S. cosmioides* apenas nos genótipos BRS 286, BRS 293, BRS 335, BRS 336, FMT 709, FM 910 e FM 993. Esses genótipos apresentaram área foliar consumida significativamente inferior nas amostras induzidas, indicando que o perfil metabólico, de constituintes voláteis e também não-voláteis, desses genótipos foi significativamente alterado em resposta à herbivoria.

Em relação aos constituintes voláteis, que é o foco desse trabalho, foram observadas diferenças no perfil qualitativo e quantitativa entre as amostras controle e as amostras dos genótipos induzidos por herbivoria analisadas por HS-GC-MS. A análise quimiométrica de componentes principais (PCA) foi realizada para cada genótipo e suas amostras controles e induzidas por herbivoria, conforme mostrado a seguir.

▪ Genótipo 1: BRS-286

Para as amostras do genótipo 1, BRS 286, o qual apresentou resistência à *S. cosmoidoides* a partir do ensaio biológico realizado, se observa que o perfil químico para as amostras controle (FIGURA 4.12) e para as amostras induzidas por herbivoria (FIGURA 4.13) é consideravelmente diferente. Adicionalmente, foram identificados 14 compostos, conforme é mostrado na TABELA 4.4.

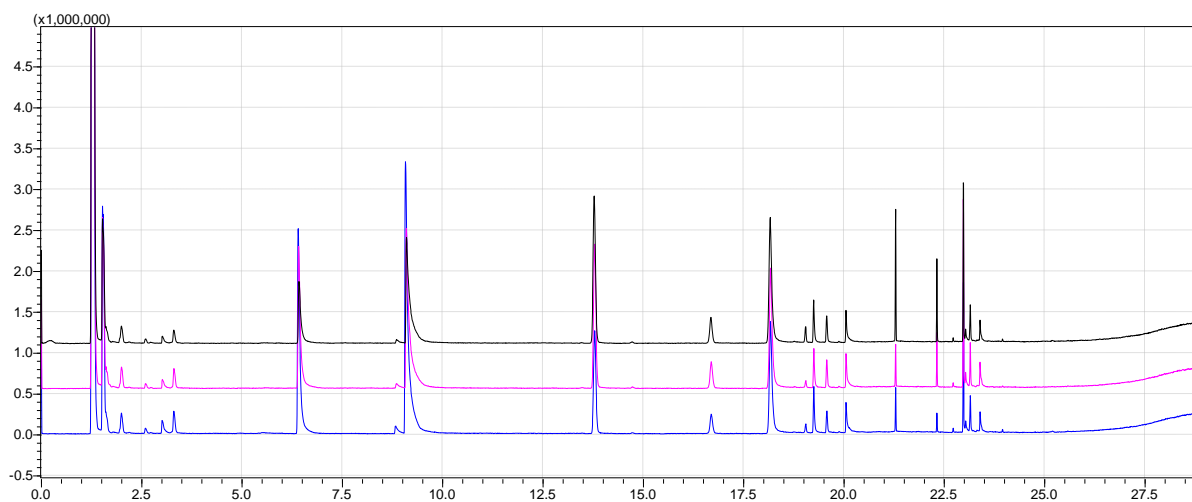


FIGURA 4.12 - Cromatogramas da análise por HS-GC/MS das amostras controle de folhas de algodão BRS-286

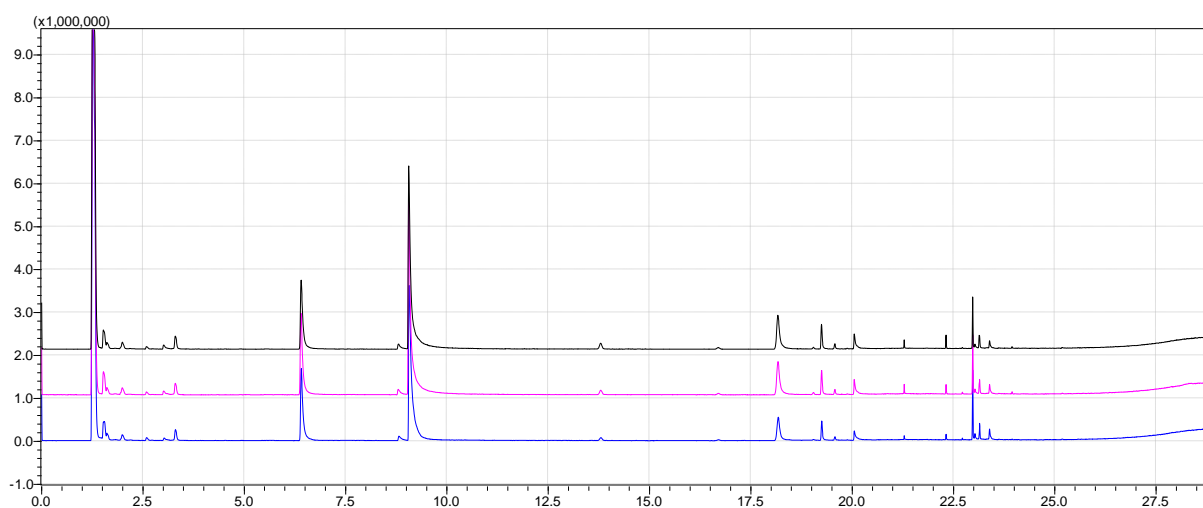


FIGURA 4.13 - Cromatogramas da análise por HS-GC/MS das amostras de folhas de algodão do genótipo BRS-286 induzidas por herbivoria.

TABELA 4.4 - Identificação experimental dos compostos orgânicos voláteis presentes no genótipo de algodão BRS-286 por HS-GC/MS

#	Nome	TR(min)	CONTROLE		HERBIVORIA	
			Área média	DPR,%	Área média	DPR,%
1	n-Hexanal	6.398	6,23	45,90	6,51	13,95
2	(Z)-2-Hexenal	8.829	0,28	37,25	0,47	10,05
3	(E)2-Hexenal	9.071	11,97	30,61	18,96	7,68
5	α -Pinenos	13.787	5,95	26,14	0,34	18,23
6	Canfeno	14.708	0,05	44,42	0	0
7	β -Pinenos	16.691	1,11	24,84	0,11	7,11
8	β -Mirceno	18.166	6,60	14,07	3,30	10,71
PI	1,4-Cineole (PI)	19.245	1,00	0,00	1,00	0,00
10	Limoneno	19.573	0,56	19,82	0,19	8,54
13	β -Ocimeno	20.052	0,93	12,14	0,79	8,02
15	α -Cubebeno	22.721	0,05	15,50	0,03	32,84
16	Cariofileno	22.973	2,04	18,23	1,41	29,40
17	α -Guaieno	23.032	0,27	18,43	0,20	29,11
19	Humuleno	23.147	0,58	14,70	0,50	7,79
23	Azuleno	23.392	0,44	27,36	0,33	31,52

Qualitativamente foi observada apenas a ausência do canfeno (TR = 14,7 min), composto #6, nas amostras induzidas. Quantitativamente, observa-se um aumento de 2-hexenal (**2** e **3**), TR = 8,8 min e 9,1 min, respectivamente, nas amostras induzidas por herbivoria em relação às amostras controle. Enquanto que, para esse genótipo, os compostos: α -Pinenos (**5**), TR = 13,8 min, β -Pinenos (**7**), TR=16,7 min, β -Mirceno (**8**), TR= 18,2min, Limoneno (**10**), TR=19,6 min, β -Ocimeno (**13**), TR = 20,1 min, Cariofileno (**16**), TR = 23,0 min, e azuleno (**23**), TR 23,4 min, se apresentam em menor quantidade nas amostras induzidas.

Através do pré-tratamento para o genótipo 1, BRS-286, é possível observar que as amostras induzidas, amostras de 1 a 3, e as amostras controle, amostras de 4 a 6, são separadas eficientemente pela primeira componente principal (PC1) que é capaz de explicar 74,48% da variância dos dados (FIGURA 4.14).

Isso indica que as amostras induzidas apresentaram grandes diferenças em relação às amostras controle, assim como mostram os dados de área relativa das amostras controle e induzidas na TABELA 4.4 .

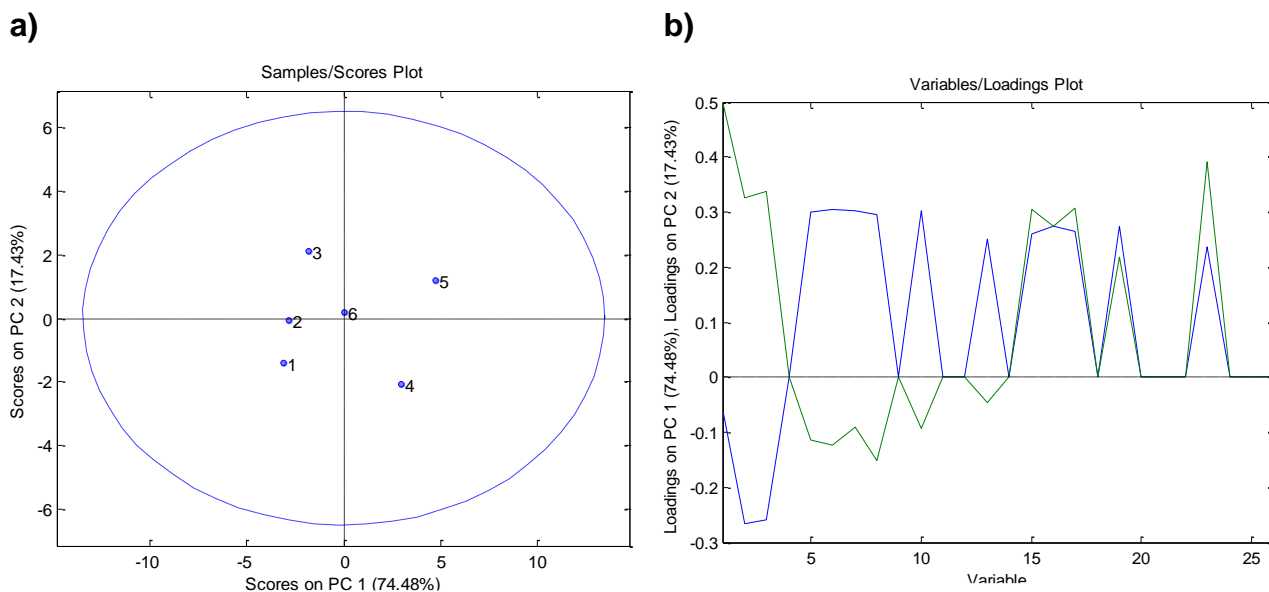


FIGURA 4.14 - Análise de Componente Principal (PCA) das amostras induzidas por herbivoria (1-3) e amostras controle (4-6) do genótipo 1, BRS-286, de algodão. a) Escores; b) Loadings.

▪ Genótipo 2: BRS-293

Para as amostras do genótipo 2, BRS 293, o qual também apresentou resistência à *S. cosmoïdoides* a partir do ensaio biológico realizado, se observa que o perfil químico para as amostras controle (FIGURA 4.15) e para as amostras induzidas por herbivoria (FIGURA 4.16) apresenta perfil semelhante. Foram identificados 19 compostos, conforme é mostrado na TABELA 4.5 - Identificação experimental dos compostos orgânicos voláteis presentes no genótipo de algodão BRS-293 por HS-GC/MS. TABELA 4.5.

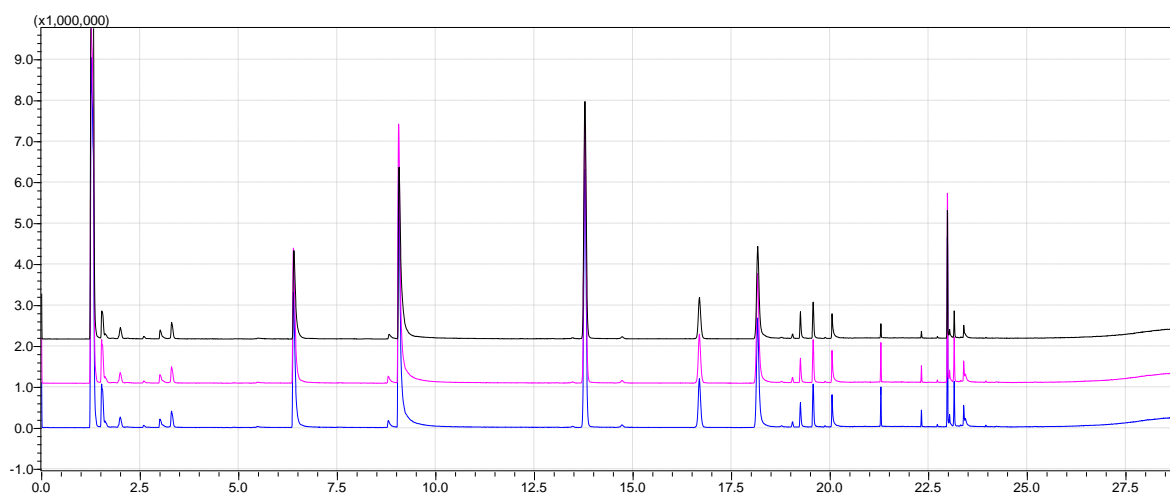


FIGURA 4.15 - Cromatogramas da análise por HS-GC/MS das amostras controle de folhas de algodão BRS-293.

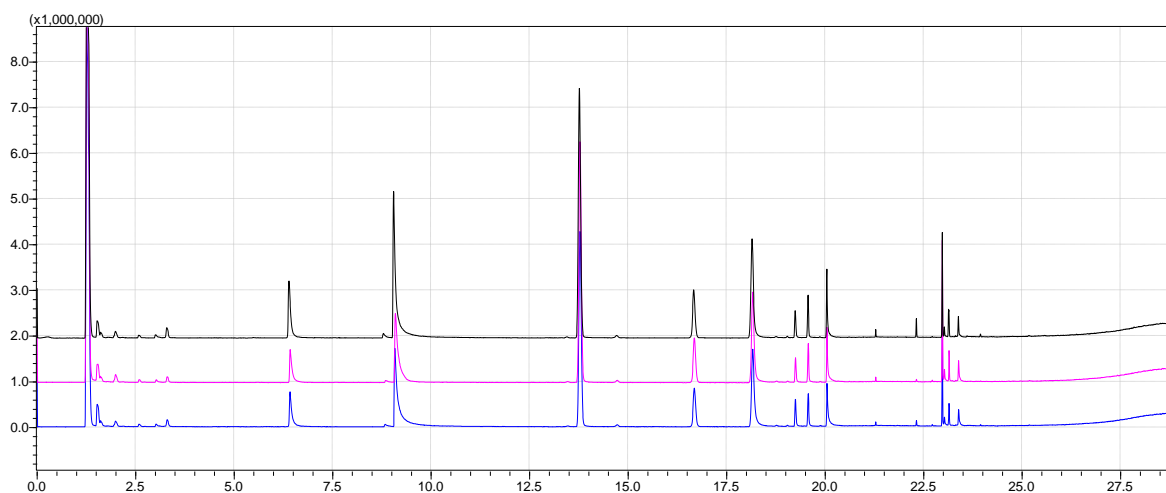


FIGURA 4.16 - Cromatogramas da análise por HS-GC/MS das amostras de folhas de algodão do genótipo BRS-293 induzidas por herbivoria.

TABELA 4.5 - Identificação experimental dos compostos orgânicos voláteis presentes no genótipo de algodão BRS-293 por HS-GC/MS.

#	Nome	TR(min)	CONTROLE		HERBIVORIA	
			Área média	DPR,%	Área média	DPR,%
1	n-Hexanal	6.400	6,61	54,4	3,28	26,33
2	2-Hexenal	8.805	0,37	47,5	0,25	29,98
3	2-Hexenal	9.059	14,85	42,6	10,25	23,54
4	γ -Terpinene	13.454	0,05	54,8	0,07	24,80
5	α -Pinene	13.790	15,25	51,1	17,40	15,13
6	Canfeno	14.702	0,15	53,3	0,17	16,77
7	β -Pinene	16.696	2,88	53,4	3,48	12,13
8	β -Mirceno	18.163	8,63	22,9	7,92	11,02
9	α -Phellandrene	18.756	0,04	57,4	0,05	22,31
PI	1,4-Cineole (PI)	19.241	1,00	0,0	1,00	0,00
10	Limoneno	19.570	1,19	47,3	1,40	10,30
12	Trans- β -Ocimeno	19.862	0,03	42,8	0,03	4,94
13	β -Ocimeno	20.053	1,24	34,5	2,29	11,28
14	Cyclohexene	20.607	0	0	0,01	86,85
15	α -Cubebene	22.719	0,05	22,9	0,03	49,21
16	Caryophyllene	22.971	2,60	25,9	2,27	27,61
17	α -Guaiene	23.030	0,32	15,9	0,30	31,65
19	Humuleno	23.144	0,66	22,8	0,71	24,99
21	Guaia-1(10),11-diene	23.308	0	0	0,02	27,74
23	Azulene	23.389	0,53	37,0	0,54	17,63

Qualitativamente foi observada apenas a presença do Ciclohexeno (**14**), e do Guaia-1(10),11-dieno (**21**), nas amostras induzidas. Quantitativamente, observa-se um aumento de α -pineno (**5**), β -pineno (**7**) e β -Ocimeno (**13**) nas amostras induzidas por herbivoria em relação às amostras controle.

Através da análise de principais componentes para o genótipo 2, BRS-293, é possível observar que as amostras induzidas, amostras de 1 a 3, e as amostras controle, amostras de 4 a 6, são separadas eficientemente pela segunda componente principal (PC2) que é capaz de explicar apenas 26,66% das diferenças dos dados (FIGURA 4.17).

Isso indica que as amostras induzidas apresentaram diferenças significativas em relação às amostras controle, assim como mostram os dados de área relativa das amostras controle e induzidas na TABELA 4.5.

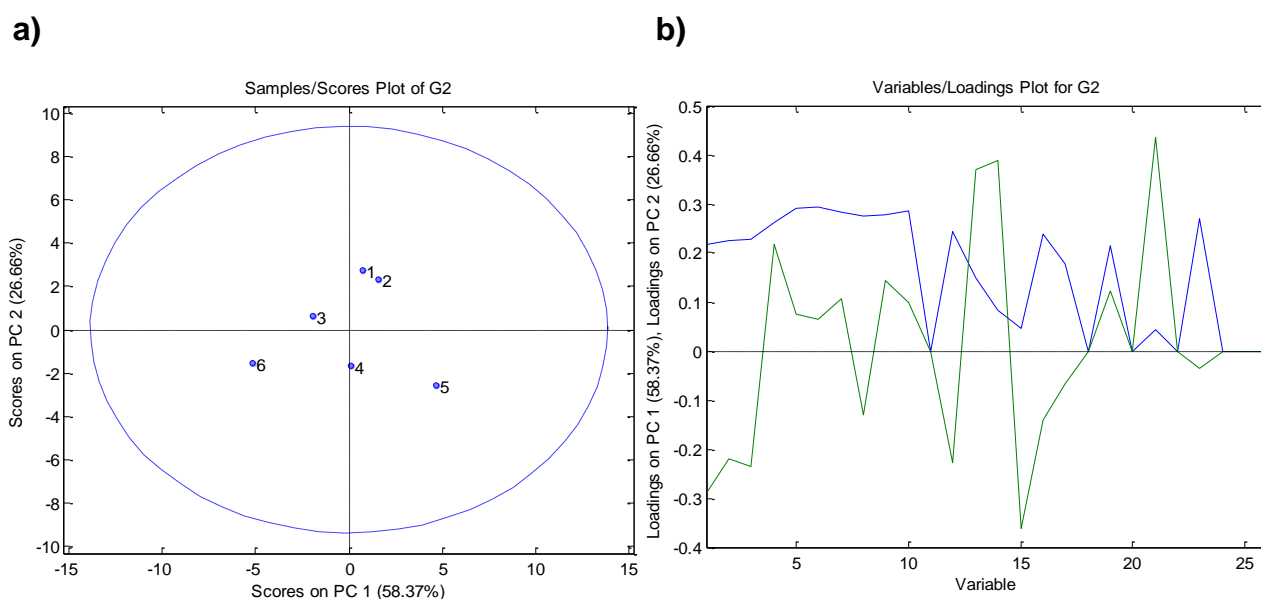


FIGURA 4.17 - Análise de Componente Principal (PCA) das amostras induzidas por herbivoria (1-3) e amostras controle (4-6) do genótipo 2, BRS-293, de algodão. a) Escores; b) Loadings.

▪ **Genótipo 3: BRS-335**

Para as amostras do genótipo 3, BRS 335, o qual também apresentou resistência à *S. cosmoides* a partir do ensaio biológico realizado, se observa que o perfil químico para as amostras controle (FIGURA 4.18) e para as amostras induzidas por herbivoria (FIGURA 4.19) é muito semelhante. Foram identificados 18 compostos, conforme é mostrado na TABELA 4.6.

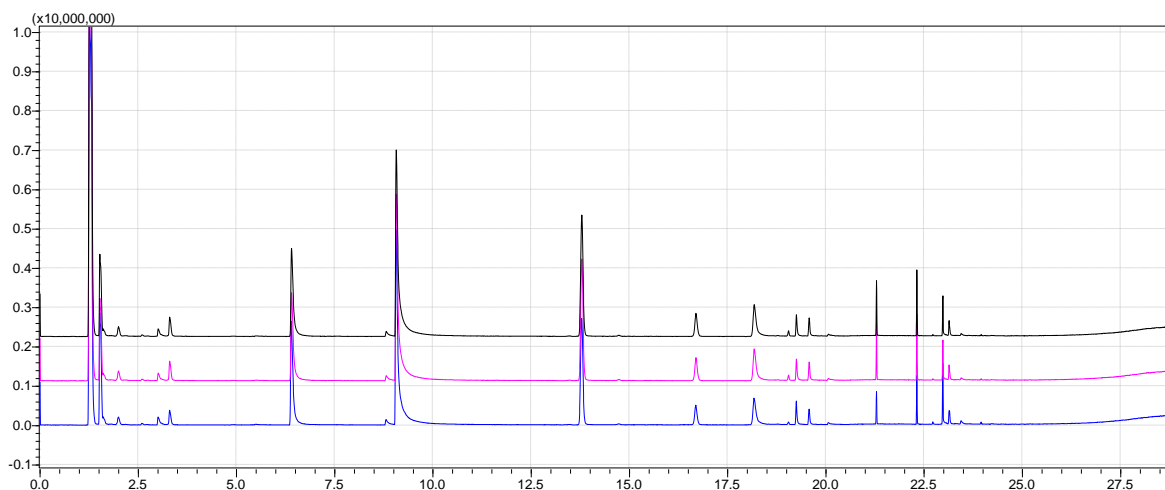


FIGURA 4.18 - Cromatogramas da análise por HS-GC/MS das amostras controle de folhas de algodão BRS-335

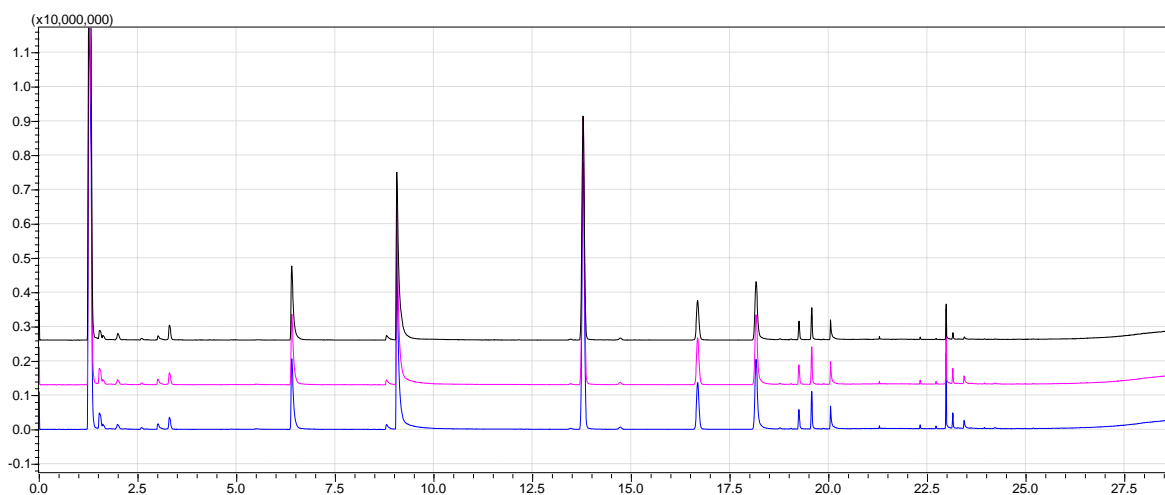


FIGURA 4.19 - Cromatogramas da análise por HS-GC/MS das amostras de folhas de algodão do genótipo BRS-335 induzidas por herbivoria.

TABELA 4.6 - Identificação experimental dos compostos orgânicos voláteis presentes no genótipo de algodão BRS-335 por HS-GC/MS.

#	Nome	TR _(min)	CONTROLE		HERBIVORIA	
			Área média	DPR,%	Área média	DPR,%
1	n-Hexanal	6.395	7,32	21,92	7,58	4,23
2	2-Hexenal	8.798	0,47	7,72	0,52	2,94
3	2-Hexenal	9.057	18,88	8,14	21,10	2,59
4	γ-Terpinene	13.462	0,04	19,44	0,10	22,46
5	α-Pinene	13.779	10,51	15,52	29,13	22,09
6	Canfeno	14.723	0,08	25,36	0,26	29,04
7	β-Pinene	16.681	2,03	18,20	5,47	24,06
8	β-Mirceno	18.157	3,71	16,09	9,17	25,72
9	α-Phellandrene	18.762	0,03	32,82	0,08	22,60
PI	1,4-Cineole (PI)	19.242	1,00	0,00	1,00	0,00
10	Limoneno	19.567	0,78	15,91	2,07	21,33
11	trans-β-Ocimeno	19.867	0	0	0,04	35,06
13	β-Ocimeno	20.047	0,13	43,80	1,67	27,24
15	α-Cubebene	22.720	0,04	25,92	0,05	30,52
16	Caryophyllene	22.971	1,08	39,35	1,57	16,49
19	Humuleno	23.145	0,42	46,10	0,47	23,22
24	α-Ylangene	23.428	0,13	42,94	0,25	18,77
26	β-Bisabolol	24.206	0	0	0,04	28,41

Qualitativamente foi observada a presença dos compostos trans-β-Ocimeno (**11**) e β-Bisabolol (**26**) nas amostras induzidas. Quantitativamente, observa-se um aumento de 2-hexenal (**3**), α-pineno (**5**), canfeno (**6**), β-pineno (**7**), β-mirceno (**8**), limoneno (**10**), e β-Ocimeno (**13**) nas amostras induzidas por herbivoria em relação às amostras controle.

Através da análise do componente principal para o genótipo 3, BRS-335, é possível observar que as amostras induzidas, amostras de 1 a 3, e as amostras controle, amostras de 4 a 6, são separadas eficientemente pela primeira componente principal (PC1) que é capaz de explicar 68,12% das diferenças dos dados (FIGURA 4.20).

Isso indica que as amostras induzidas apresentaram diferenças significativas em relação às amostras controle, assim como mostram os dados de área relativa das amostras controle e induzidas na TABELA 4.6.

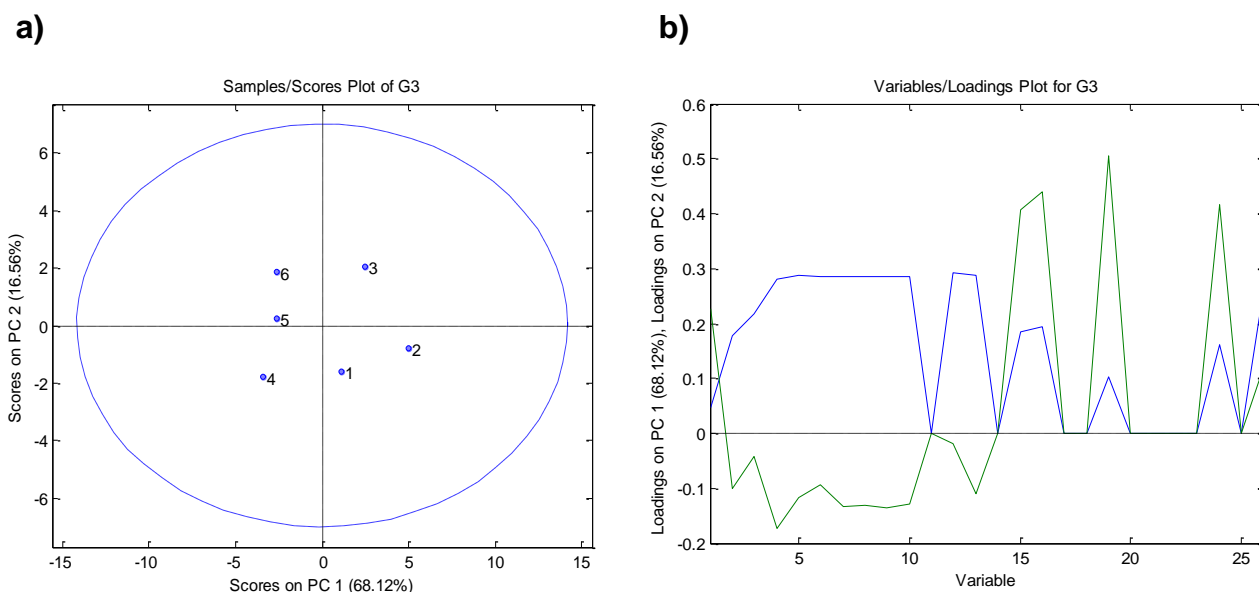


FIGURA 4.20 - Análise de Componente Principal (PCA) das amostras induzidas por herbivoria (1-3) e amostras controle (4-6) do genótipo 3, BRS-335, de algodão. a) Escores; b) Loadings

▪ Genótipo 4: BRS-336

Para as amostras do genótipo 4, BRS 336, o qual também apresentou resistência à *S. cosmoidoides* a partir do ensaio biológico realizado, se observa que o perfil químico para as amostras controle (FIGURA 4.21) e para as amostras induzidas por herbivoria (FIGURA 4.22) é muito semelhante. Foram identificados 20 compostos, conforme é mostrado na TABELA 4.7..

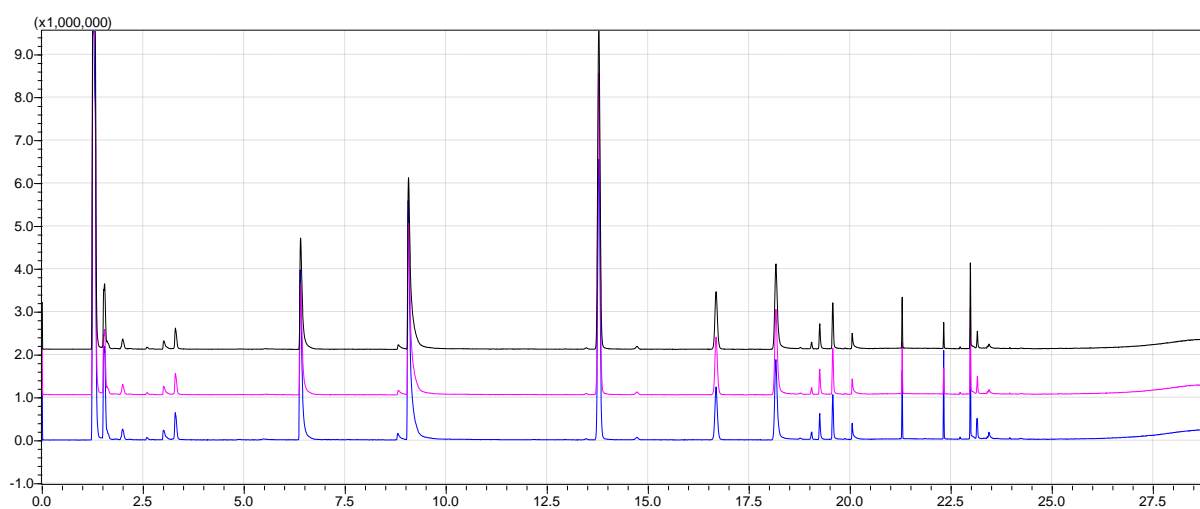


FIGURA 4.21 - Cromatogramas da análise por HS-GC/MS das amostras controle de folhas de algodão BRS-336.

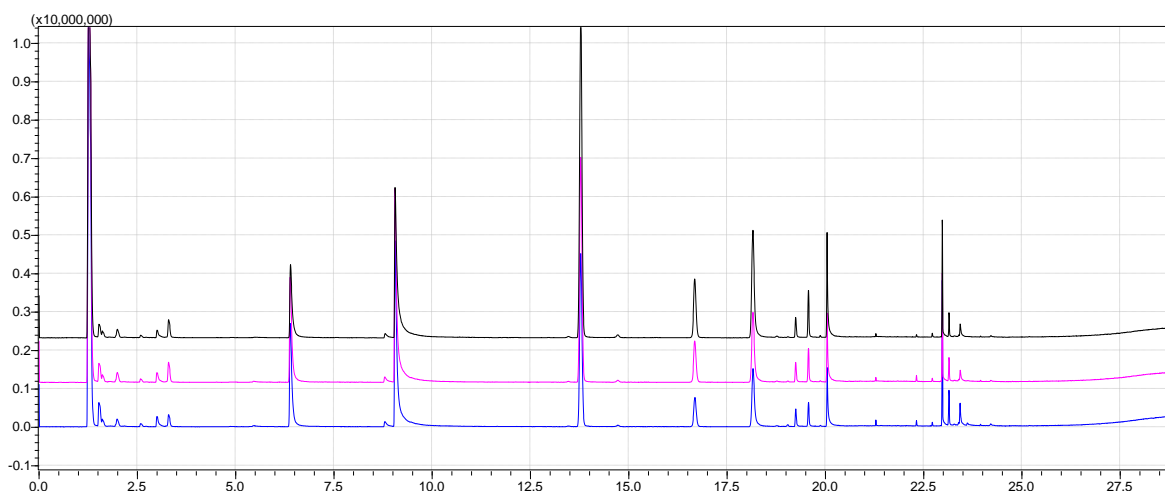


FIGURA 4.22 - Cromatogramas da análise por HS-GC/MS das amostras de folhas de algodão do genótipo BRS-336 induzidas por herbivoria.

TABELA 4.7 - Identificação experimental dos compostos orgânicos voláteis presentes no genótipo de algodão BRS-336 por HS-GC/MS.

#	Nome	TR(min)	CONTROLE		HERBIVORIA	
			Área média	DPR,%	Área média	DPR,%
1	n-Hexanal	6.388	10,30	23,96	9,99	22,70
2	2-Hexenal	8.796	0,48	11,83	0,55	18,12
3	2-Hexenal	9.056	19,19	14,21	22,50	12,22
4	γ -Terpinene	13.462	0,07	8,58	0,09	27,79
5	α -Pinene	13.778	21,99	10,05	24,49	25,96
6	Canfeno	14.715	0,21	8,07	0,23	26,00
7	β -Pinene	16.684	4,31	9,40	4,59	27,16
8	β -Mirceno	18.157	7,04	10,22	9,31	26,48
9	α -Phellandrene	18.761	0,07	15,89	0,07	18,46
PI	1,4-Cineole (PI)	19.244	1,00	0,00	1,00	0,00
10	Limoneno	19.569	1,68	8,60	1,79	24,87
12	trans- β -Ocimeno	19.868	0	0	0,06	22,70
13	β -Ocimeno	20.046	0,72	14,58	4,24	20,49
14	Cyclohexene	20.611	0	0	0,01	46,59
15	α -Cubebene	22.720	0,04	40,10	0,10	6,38
16	Caryophyllene	22.972	1,73	25,71	3,64	23,40
19	Humuleno	23.145	0,53	36,71	1,00	31,65
20	α -Copaene	23.272	0	0	0,04	29,86
24	α -Ylangene	23.424	0,16	33,52	0,34	159,33
25	α -Farnesene	23.611	0	0	0,40	58,41
26	β -Bisabolol	24.202	0	0	0,07	35,01

Qualitativamente foi observada a presença de cinco novos compostos nas amostras induzidas em relação às amostras controle: trans- β -Ocimeno (**12**), Cyclohexene (**14**), α -Copaene (**20**), α -Farnesene (**25**) e β -Bisabolol (**26**). Quantitativamente, observa-se um aumento de 2-hexenal (**3**), α -pineno (**5**), β -mirceno (**8**), β -Ocimeno (**13**) e cariofileno (**16**) nas amostras induzidas por herbivoria em relação às amostras controle.

A partir da análise do componente principal para o genótipo 4, BRS-336, é possível observar que as amostras induzidas, amostras de 1 a 3, e as amostras controle, amostras de 4 a 6, são separadas eficientemente pela primeira componente principal (PC1) que foi capaz de explicar 50,63% das diferenças dos dados (FIGURA 4.23). Isso indica que as amostras induzidas apresentaram diferenças significativas em relação às amostras controle, assim como mostram os dados de área relativa das amostras controle e induzidas na TABELA 4.7.

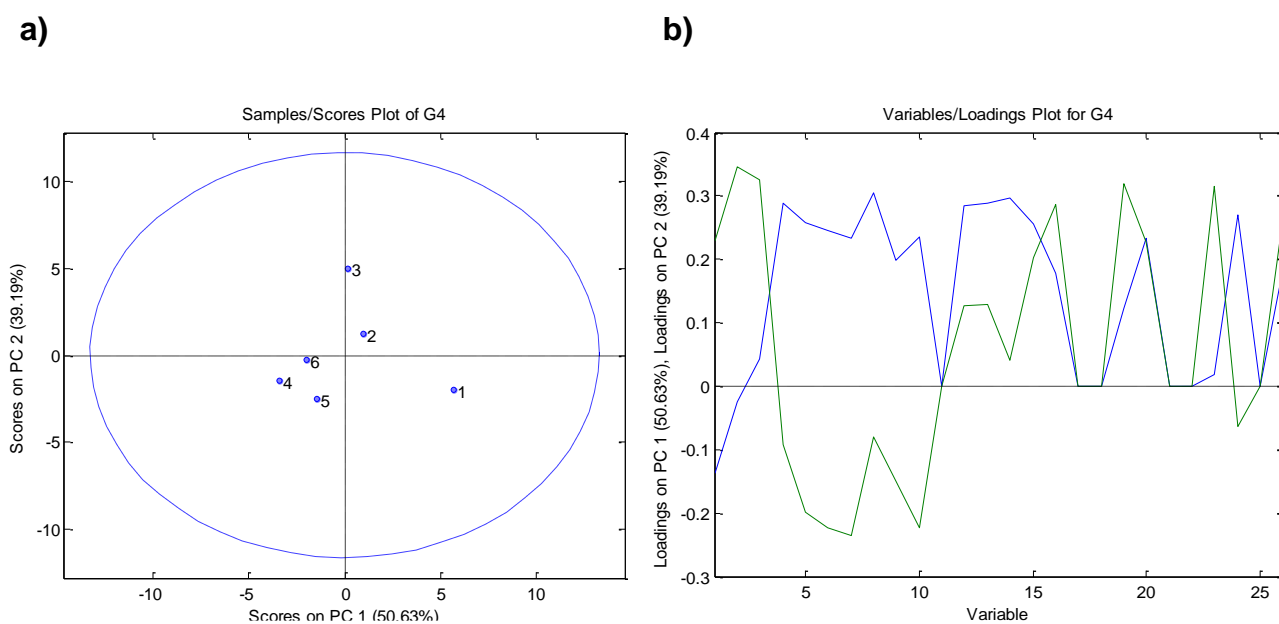


FIGURA 4.23 - Análise de Componente Principal (PCA) das amostras induzidas por herbivoria (1-3) e amostras controle (4-6) do genótipo 4, BRS-336, de algodão. a) Escores; b) Loadings.

▪ Genótipo 10: FMT-709

Para as amostras do genótipo 10, FMT 709, o qual também apresentou resistência à *S. cosmoides* a partir do ensaio biológico realizado, se observa que o perfil químico para as amostras controle (FIGURA 4.24) e para as amostras induzidas por herbivoria (FIGURA 4.25) é qualitativamente semelhante. Foram identificados 17 compostos, conforme é mostrado na TABELA 4.8.

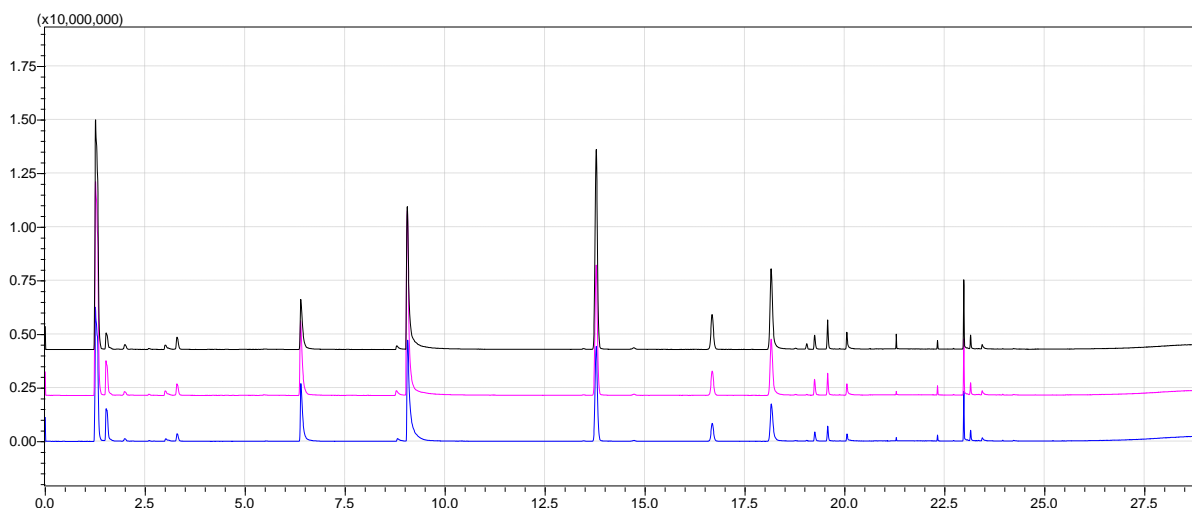


FIGURA 4.24 - Cromatogramas da análise por HS-GC/MS das amostras controle de folhas de algodão FMT-709.

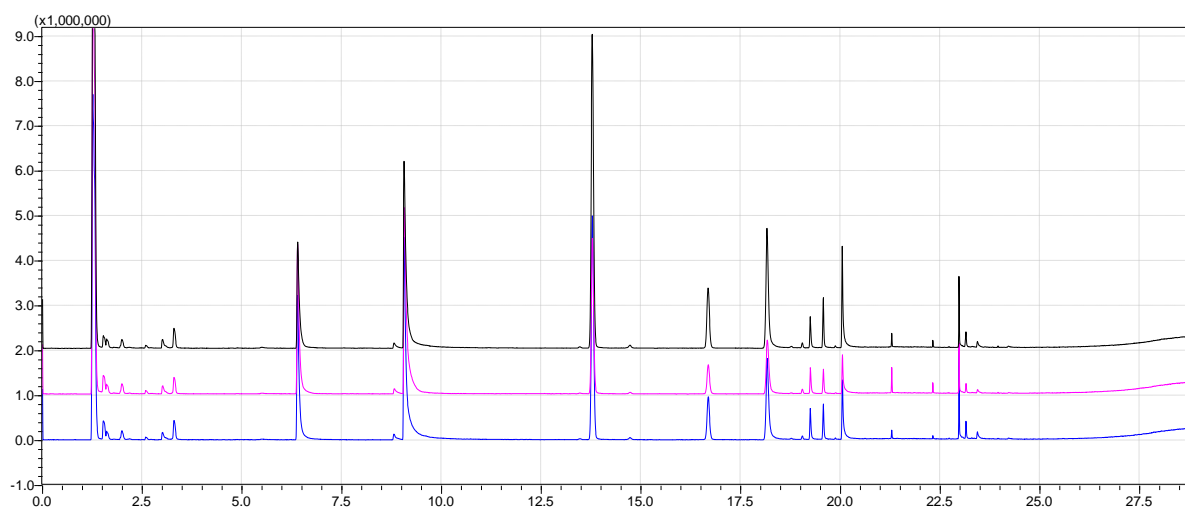


FIGURA 4.25 - Cromatogramas da análise por HS-GC/MS das amostras de folhas de algodão do genótipo FMT-709 induzidas por herbivoria de *S. cosmioides*.

TABELA 4.8 - Identificação experimental dos compostos orgânicos voláteis presentes no genótipo de algodão FMT-709 por HS-GC/MS.

#	Nome	TR(min)	CONTROLE		HERBIVORIA	
			Área média	DPR,%	Área média	DPR,%
1	n-Hexanal	6.393	9,84	27,60	9,05	27,68
2	2-Hexenal	8.813	0,64	9,85	0,40	15,62
3	2-Hexenal	9.062	25,64	11,96	16,17	14,88
4	γ -Terpineno	13.474	0,08	17,26	0,06	15,46
5	α -Pineno	13.779	21,72	26,72	15,09	25,25
6	Canfeno	14.725	0,20	24,81	0,14	25,00
7	β -Pineno	16.681	4,16	23,05	3,01	27,08
8	β -Mirceno	18.159	10,27	23,27	6,45	26,92
9	α -Phellandrene	18.767	0,06	30,11	0,04	22,38
PI	1,4-Cineole (PI)	19.246	1,00	0,00	1,00	0,00
10	Limoneno	19.570	1,66	21,13	1,19	23,79
12	trans- β -Ocimeno	19.873	0,03	29,31	0,03	39,85
13	β -Ocimeno	20.051	0,95	35,15	2,48	29,91
15	α -Cubebene	22.721	0,03	25,94	0,01	23,52
16	Caryophyllene	22.972	2,72	21,03	1,36	12,53
19	Humuleno	23.146	0,71	19,15	0,32	19,02
24	α -Ylangene	23.437	0,36	16,98	0,23	15,42
26	β -Bisabolol	24.223	0,06	41,11	0,03	21,09

Qualitativamente, as amostras induzidas e controle apresentaram o mesmo número de compostos. Quantitativamente, observa-se uma diminuição de 2-hexenal (**3**), α -pineno (**5**), β -pineno (**7**), β -mirceno (**8**) e cariofileno (**16**) e um aumento de β -Ocimeno (**13**) nas amostras induzidas por herbivoria em relação às amostras controle.

A partir da análise do componente principal para o genótipo 10, FMT 709, é possível observar que as amostras induzidas, amostras de 1 a 3, e as amostras controle, amostras de 4 a 6, são separadas eficientemente pela primeira componente principal (PC1) que foi capaz de explicar 66,18% das diferenças dos dados (FIGURA 4.26).

Isso indica que as amostras induzidas apresentaram diferenças significativas em relação às amostras controle, no que diz respeito às quantidades relativas dos componentes voláteis do perfil químico, assim como mostram os dados da TABELA 4.8.

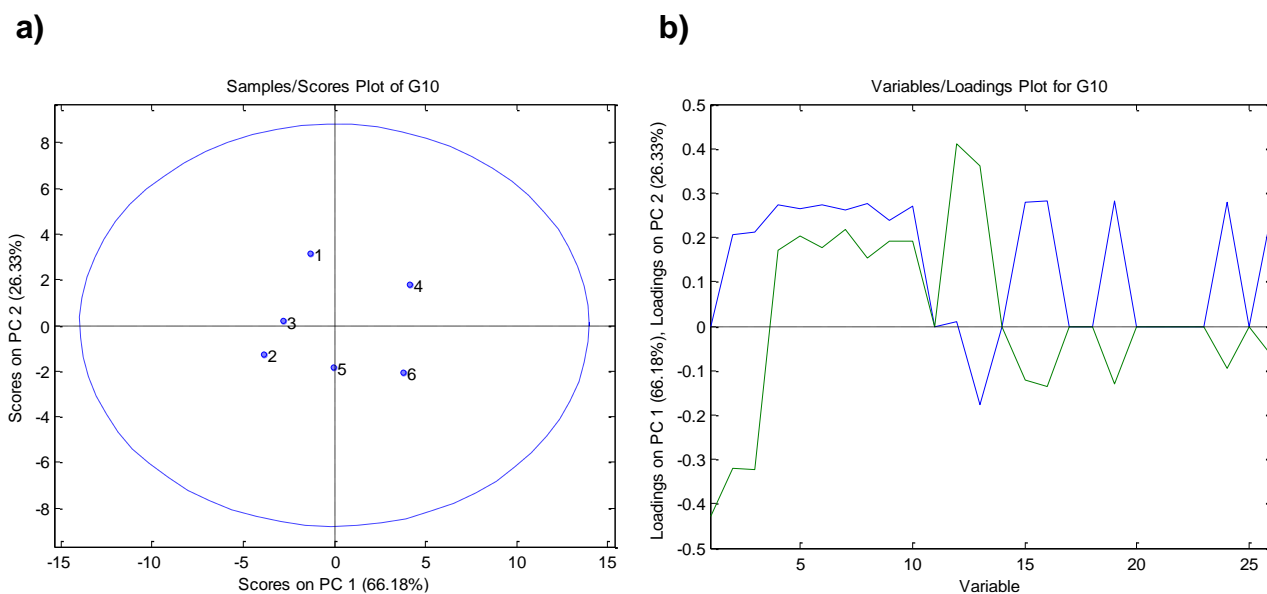


FIGURA 4.26 - Análise de Componente Principal (PCA) das amostras induzidas por herbivoria (1-3) e amostras controle (4-6) do genótipo 10, FMT-709, de algodão. a) Escores; b) Loadings

▪ Genótipo 11: FM-910

Para as amostras do genótipo 11, FM 910, o qual também apresentou resistência à *S. cosmoïdoides* a partir do ensaio biológico realizado, se observa que o perfil químico para as amostras controle (FIGURA 4.27) e para as amostras induzidas por herbivoria (FIGURA 4.28) é diferente. Foram identificados 19 compostos, conforme é mostrado na TABELA 4.9.

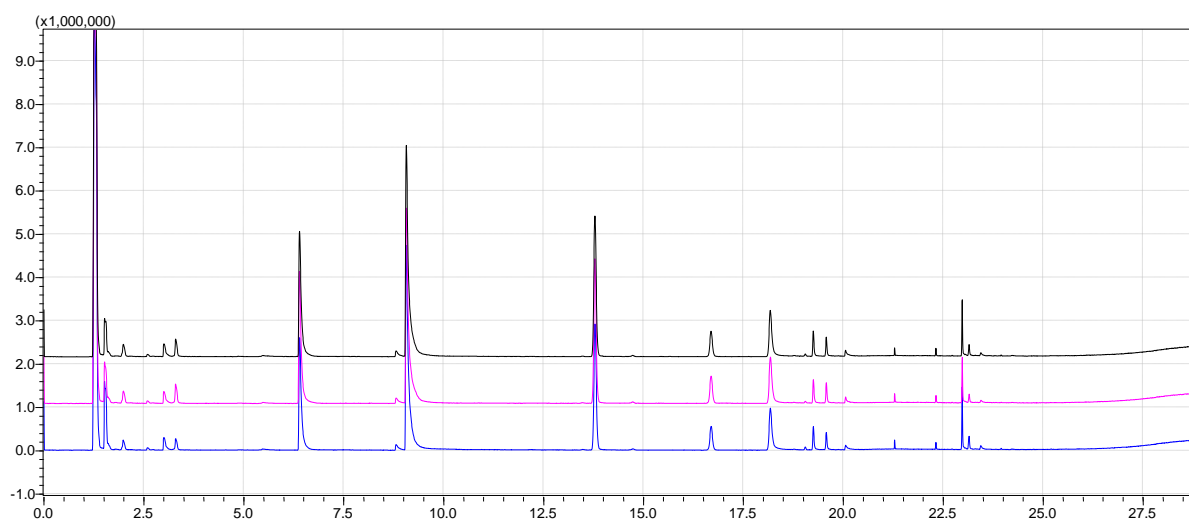


FIGURA 4.27 - Cromatogramas da análise por HS-GC/MS das amostras controle de folhas de algodão FM-910.

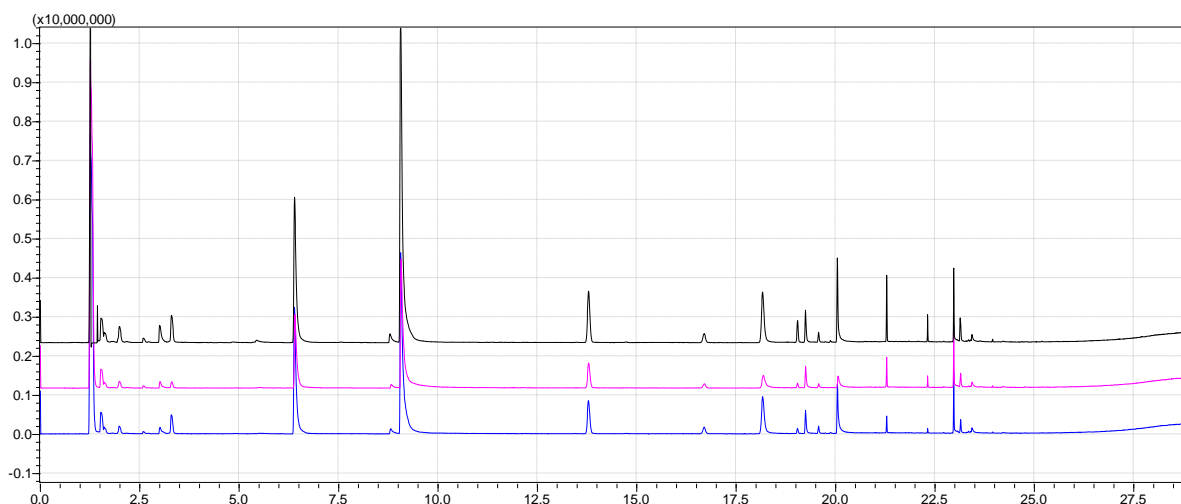


FIGURA 4.28 - Cromatogramas da análise por HS-GC/MS das amostras de folhas de algodão do genótipo FM-910 induzidas por herbivoria de *S. cosmioides*.

TABELA 4.9 - Identificação experimental dos compostos orgânicos voláteis presentes no genótipo de algodão FM-910 por HS-GC/MS.

#	Nome	RT(min)	CONTROLE		HERBIVORIA	
			Áreamédia	DPR,%	Área média	DPR,%
1	n-Hexanal	6.390	10,37	6,97	8,39	23,45
2	2-Hexenal	8.809	0,52	6,02	0,44	31,12
3	2-Hexenal	9.062	21,27	0,99	17,83	23,63
4	γ -Terpinene	13.485	0,04	10,37	0	0
5	α -Pinene	13.785	11,41	5,92	2,57	19,23
6	Canfeno	14.730	0,09	17,52	0	0
7	β -Pinene	16.692	2,20	8,04	0,49	21,66
8	β -Mirceno	18.166	4,55	4,30	2,83	41,47
9	α -Phellandrene	18.773	0,03	8,46	0	0
PI	1,4-Cineole (PI)	19.245	1,00	0,00	1,00	0,00
10	Limoneno	19.573	0,78	6,80	0,25	25,50
12	trans- β -Ocimeno	19.871	0	0	0,03	47,98
13	β -Ocimeno	20.047	0,39	0,64	1,94	45,95
15	α -Cubebene	22.718	0	0	0,46	167,77
16	Caryophyllene	22.972	1,36	21,62	1,23	45,82
19	Humuleno	23.146	0,36	25,72	0,27	79,10
22	1H-Cycloprop[e]azulene	23.346	0	0	0,02	27,60
23	Azulene	23.396	0	0	0,07	137,92
24	α -Ylangene	23.434	0,18	25,15	0,13	73,02
26	β -Bisabolol	24.216	0	0	0,02	24,81

Qualitativamente, se observa que os compostos γ -Terpineno (**4**) e Canfeno (**6**) estão ausentes nas amostras induzidas, enquanto que os compostos trans- β -Ocimeno (**12**), α -Cubebene (**15**), 1H-Cycloprop[e]azulene (**22**), Azulene (**23**) e β -Bisabolol (**26**) estão ausentes nas amostras controle. Quantitativamente, observa-se uma diminuição de 2-hexenal (**3**), α -pineno (**5**), β -pineno (**7**), β -mirceno (**8**) e cariofileno (**16**) e um aumento de β -Ocimeno (**13**) nas amostras induzidas por herbivoria em relação às amostras controle.

A partir da análise do componente principal para o genótipo 11, FM 910, é possível observar que as amostras induzidas, amostras de 1 a 3, e as amostras controle, amostras de 4 a 6, são separadas eficientemente pela primeira componente principal (PC1) que foi capaz de explicar 77,08% das diferenças dos dados (FIGURA 4.29).

Esse fato indica que as amostras induzidas apresentaram diferenças significativas em relação às amostras controle, assim como mostram os dados da TABELA 4.9.

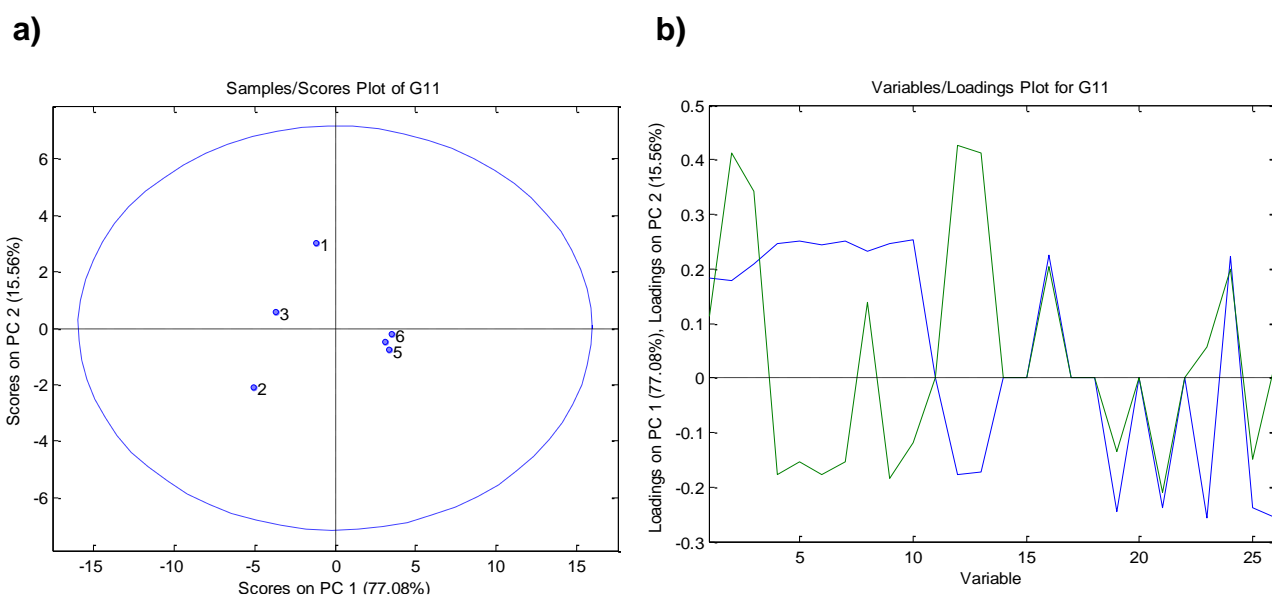


FIGURA 4.29 - Análise de Componente Principal (PCA) das amostras induzidas por herbivoria (1-3) e amostras controle (4-6) do genótipo 11, FM-910, de algodão. a) Escores; b) Loadings

▪ Genótipo 12: FM-993

Para as amostras do genótipo 12, FM 993, o qual também apresentou resistência à *S. cosmoides* a partir do ensaio biológico realizado, se observa que o perfil químico para as amostras controle (FIGURA 4.30) e para as amostras induzidas por herbivoria (FIGURA 4.31) é qualitativamente diferente. Foram identificados 15 compostos, conforme é mostrado na TABELA 4.10.

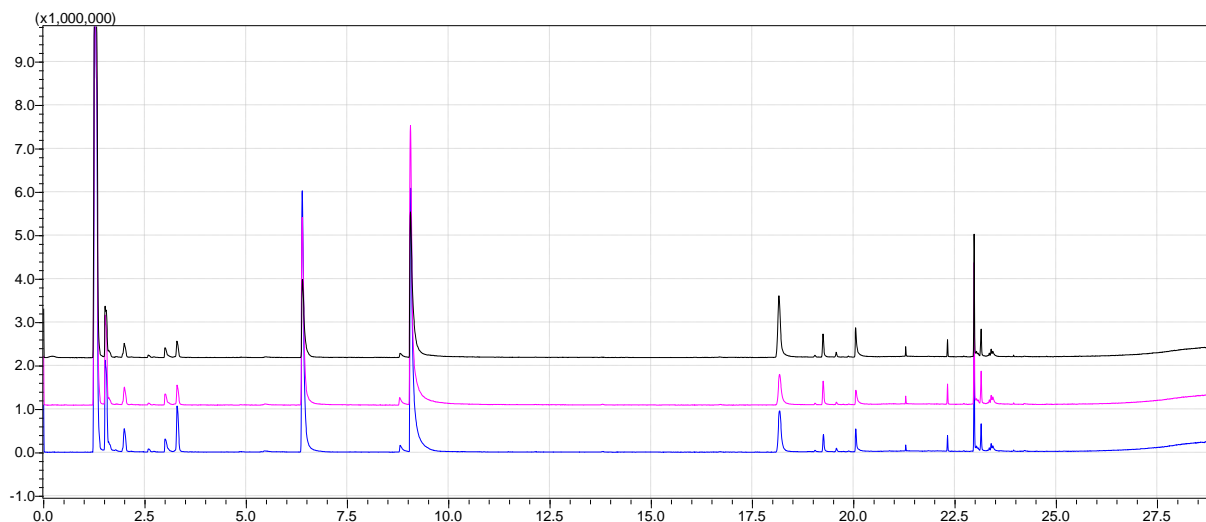


FIGURA 4.30 - Cromatogramas da análise por HS-GC/MS das amostras controle de folhas de algodão FM-993.

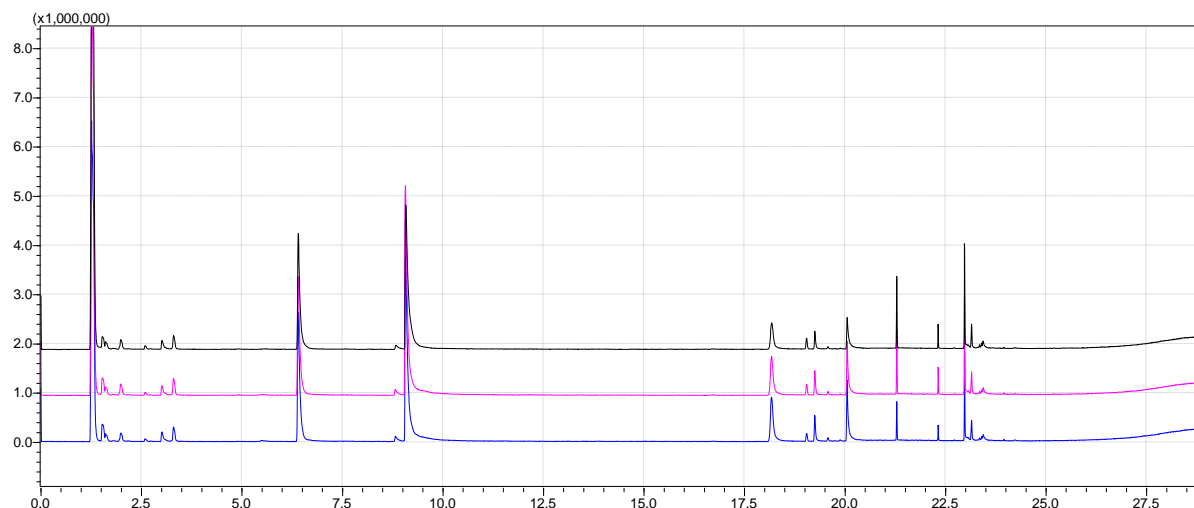


FIGURA 4.31 - Cromatogramas da análise por HS-GC/MS das amostras de folhas de algodão do genótipo FM-993 induzidas por herbivoria de *S. cosmoides*.

TABELA 4.10 - Identificação experimental dos compostos orgânicos voláteis presentes no genótipo de algodão FM-993 por HS-GC/MS.

#	Nome	TR(min)	CONTROLE		HERBIVORIA	
			Áreamédia	DPR,%	Áreamédia	DPR,%
1	n-Hexanal	6.395	16,42	64,99	10,28	20,13
2	2-Hexenal	8.815	0,64	36,08	0,47	17,53
3	2-Hexenal	9.068	25,89	40,30	18,88	13,64
8	β -Mirceno	18.170	5,05	30,90	3,77	4,07
PI	1,4-Cineole (PI)	19.247	1,00	0,00	1,00	0,00
10	Limoneno	19.575	0,17	37,63	0,12	9,54
12	trans- β -Ocimeno	19.875	0,03	37,54	0,04	17,87
13	β -Ocimeno	20.051	1,36	29,33	2,82	1,65
15	α -Cubebene	22.719	0	0	0,02	46,46
16	Caryophyllene	22.972	3,06	14,07	2,24	29,94
17	α -Guaiene	23.030	0,19	17,81	0	0
18	Alloaromadendrene	23.069	0,12	19,60	0	0
19	Humuleno	23.146	0,83	11,46	0,64	26,52
22	1H-Cycloprop[e]azulene	23.346	0,07	21,69	0,05	38,05
23	Azulene	23.395	0,23	19,79	0,11	39,51
24	α -Ylangene	23.437	0,24	25,31	0,24	36,09

Qualitativamente, se observa que os compostos α -Guaiene (**17**) e Alloaromadendrene (**18**) estão ausentes nas amostras induzidas, enquanto que o composto α -Cubebene (**15**) está ausente nas amostras controle. Quantitativamente, observa-se uma diminuição de n-hexanal (**1**), 2-hexenal (**3**), β -mirceno (**8**) e cariofileno (**16**) e um aumento de β -Ocimeno (**13**) nas amostras induzidas por herbivoria em relação às amostras controle.

A partir da análise do componente principal para o genótipo 12, FM 993, é possível observar que as amostras induzidas, amostras de 1 a 3, e as amostras controle, amostras de 4 a 6, são separadas eficientemente pela primeira componente principal (PC1) que foi capaz de explicar 57,62% das diferenças dos dados (FIGURA 4.32).

Isso indica que as amostras induzidas apresentaram diferenças significativas em relação às amostras controle, assim como mostram os dados da TABELA 4.10.

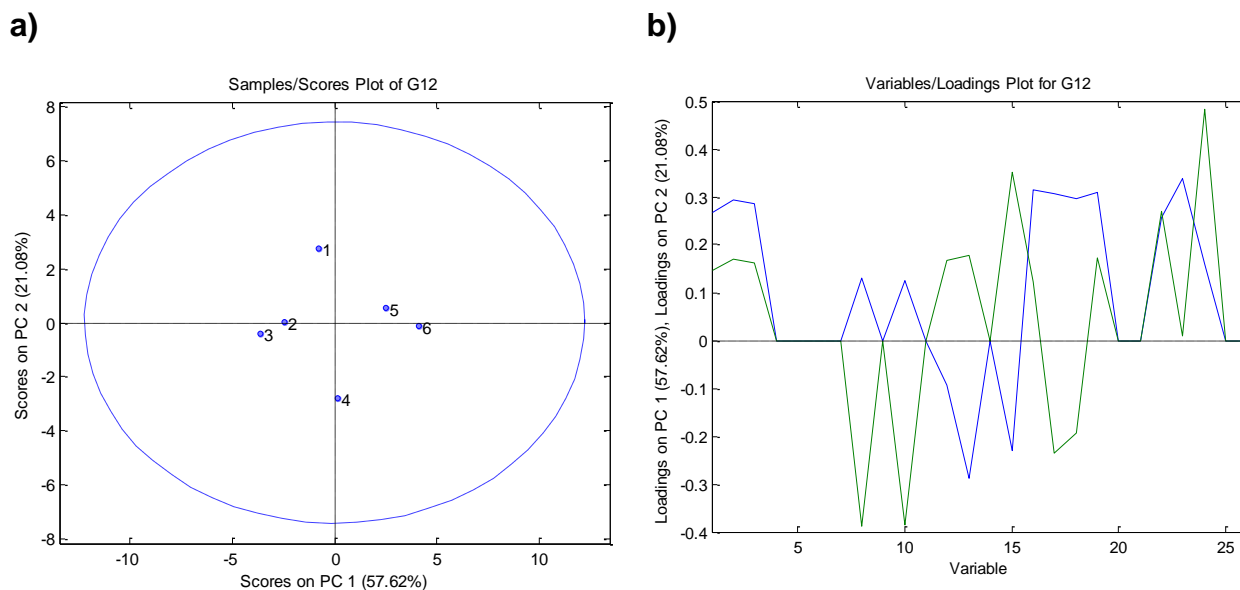


FIGURA 4.32 - Análise de Componente Principal (PCA) das amostras induzidas por herbivoria (1-3) e amostras controle (4-6) do genótipo 12, FM-993, de algodão. a) Escores; b) Loadings

Assim dentre os genótipos que apresentaram resposta biológica de resistência frente a *S. cosmioides* a partir dos ensaios de área foliar consumida, temos novamente a atuação dos mono e sesquiterpenos como o que α -Pineno, β -Pineno, β -Mirceno, Limoneno, β -Ocimeno, cariofileno e β -bisabolol^{95; 96, 94, 97, 98}, bem como os compostos voláteis de folhas frescas (GLV), n-hexanal e 2-hexenal^{99; 100}.

A regulação dos compostos voláteis nas amostras dos genótipos induzidos é mostrada na TABELA 4.11 para os genótipos que apresentaram resposta biológica positiva para a resistência à *S. cosmioides*.

Assim como relatado por YANG e colaboradores⁹⁴, foi observado aumento na biossíntese de α -Pineno, β -Pineno, β -Mirceno, Limoneno, β -Ocimeno e cariofileno na maioria dos genótipos induzidos por herbivoria que apresentaram resposta biológica positiva para a resistência à *S. cosmioides*. HUANG e colaboradores¹⁰²,

TABELA 4.11 - Resumo das respostas metabôlicas do perfil químico de compostos voláteis dos genótipos que apresentaram respostas de resistência à *S. cosmioides*. Resultados das amostras induzidas em relação às plantas controle.

	Genótipo	BRS 286	BRS 293	BRS 335	BRS 336	FMT 709	FM 910	FM 993
Regulação	Presente	NA	Ciclohexeno Guaia- 1(10),11- dieno	trans-β- Ocimene β-Bisabolol	trans-β- Ocimene Cyclohexene α-Copaene α-Farnesene β-Bisabolol	NA	trans-β-Ocimeno α-Cubebene Cycloprop[e]azulene Azulene β-Bisabolol	α-Cubebeno
	Aumento	2-Hexenal	α-Pineno β-Pineno β-Ocimeno	2-Hexenal α-Pineno Canfeno β-Pineno β-Mirceno Limoneno β-Ocimeno	2-Hexenal α-Pineno β-Mirceno β-Ocimeno Cariofileno	β-Ocimeno	β-Ocimeno	β-Ocimeno
	Ausente	Canfeno	NA	NA	NA	NA	γ-Terpineno Canfeno	α-Guaieno Aloaromadendreno
	Diminuição	α-Pineno β-Pineno β-Mirceno Limoneno β-Ocimeno Cariofileno Azuleno	NA	NA	NA	2-Hexenal α-Pineno β-Pineno β-Mirceno Cariofileno	2-Hexenal α-Pineno β-Pineno β-Mirceno Cariofileno	n-Hexanal 2-Hexenal β-Mirceno Cariofileno

NA = Não aplicável.

Contudo, apesar dos demais genótipos não terem apresentado resposta positiva para a resistência à *S. cosmioides* no ensaio de área foliar consumida realizado, foram observadas diferenças nos perfis metabolômicos de emissão de compostos voláteis entre as amostras induzidas e as amostras controle. Os resultados para os demais genótipos estão disponíveis no APÊNDICE D – Experimento II: Resistência Induzida - Cromatogramas. Portanto, pode-se concluir que a herbivoria causou alterações significativas no perfil químico de compostos voláteis e que as respostas biológicas de resistência e/ou suscetibilidade à *S. cosmioides* devem ser avaliadas também por outros ensaios biológicos. Desse modo, se obterá mais informações sobre os mecanismos de resistência para cada genótipo, ao se relacionar as respostas biológicas frente à *S. cosmioides* e as diferenças obtidas no perfil metabolômico de compostos voláteis para esses genótipos.

O genótipo 7, Delta Opal, por exemplo, que é um dos genótipos identificados na literatura como suscetível por antibiose e não-preferência à outros insetos, como a lagarta *S. frugiperda*, apresentou diferenças entre o perfil químico para as amostras controle (FIGURA 4.33) e para as amostras induzidas por herbivoria (FIGURA 4.34). Foram identificados 18 compostos, conforme é mostrado na TABELA 4.12.

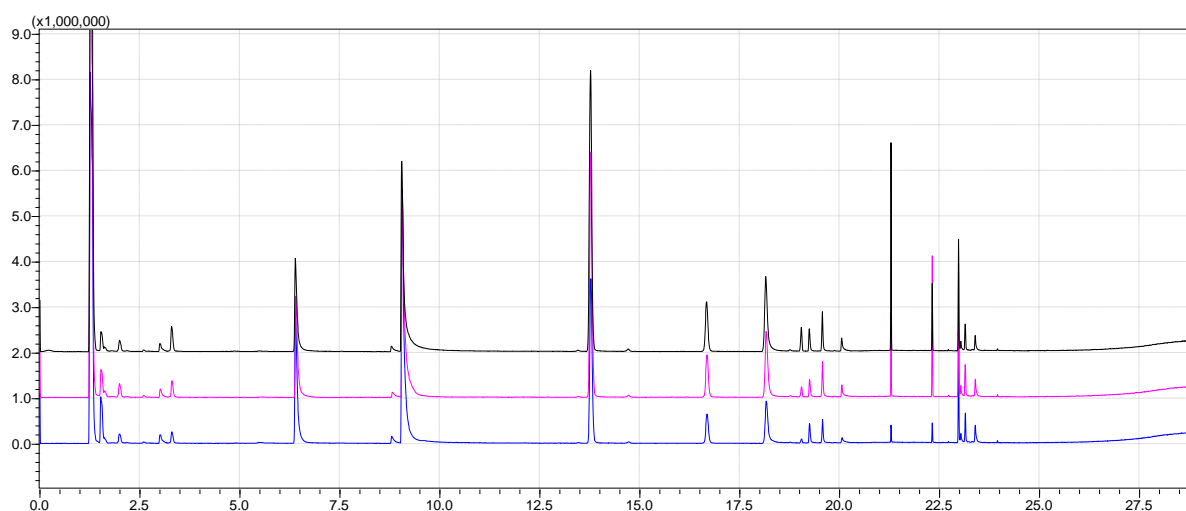


FIGURA 4.33 - Cromatogramas da análise por HS-GC/MS das amostras controle de folhas de algodão Delta Opal.

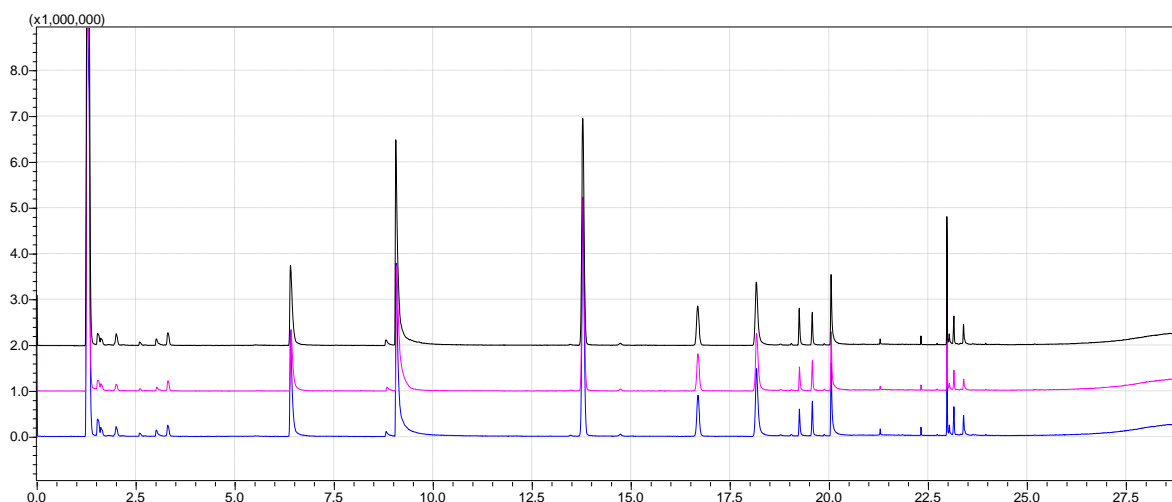


FIGURA 4.34 - Cromatogramas da análise por HS-GC/MS das amostras de folhas de algodão do genótipo Delta Opal induzidas por herbivoria de *S. cosmioides*.

TABELA 4.12 - Identificação experimental dos compostos orgânicos voláteis presentes no genótipo de algodão Delta Opal por HS-GC/MS.

#	Nome	TR(min)	CONTROLE		HERBIVORIA	
			Áreamédia	DPR,%	Áreamédia	DPR,%
1	n-Hexanal	6.396	11,40	23,86	5,92	30,28
2	2-Hexenal	8.810	0,69	13,69	0,34	8,64
3	2-Hexenal	9.065	26,54	18,30	14,42	11,15
4	γ -Terpinene	13.460	0,08	15,87	0,06	27,82
5	α -Pinene	13.780	23,25	25,00	14,83	17,47
6	Canfeno	14.727	0,17	23,64	0,14	19,01
7	β -Pinene	16.683	4,24	24,60	2,83	20,49
8	β -Mirceno	18.163	7,49	25,24	5,21	19,57
9	α -Phellandrene	18.770	0,07	12,72	0,04	4,51
PI	1,4-Cineole (PI)	19.244	1,00	0,00	1,00	0,00
10	Limoneno	19.570	1,68	26,53	1,13	19,66
12	trans- β -Ocimeno	19.871	0	0	0,04	22,12
13	β -Ocimeno	20.047	0,62	34,26	2,74	16,59
15	α -Cubebene	22.721	0,03	19,44	0,03	21,33
16	Caryophyllene	22.972	3,24	22,02	2,02	16,26
17	α -Guaiene	23.030	0,45	19,42	0,27	13,80
19	Humuleno	23.146	1,27	24,74	0,58	19,17
23	Azulene	23.388	0,76	19,90	0,48	26,04
25	α -Farnesene	23.622	0	0	0,02	14,81

Qualitativamente se observa que as amostras induzidas apresentam dois compostos diferentes em relação às amostras controle: trans- β -Ocimeno (12), TR

= 19,9 min, e α -Farnesene (**25**), TR = 23,6 min. Quantitativamente, se observa a diminuição dos compostos n-hexanal (**1**), 2-hexenal (**2**), α -pineno (**5**), β -pineno (**7**), β -mirceno (**8**), cariofileno (**16**) e humuleno (**19**) e um aumento do composto β -ocimeno (**13**), assim como o observado para os genótipos BRS 286, FMT 709, FM 910 e FM 993, mostrados anteriormente.

Adicionalmente, a partir da análise do componente principal para o genótipo 7, Delta Opal, é possível observar que as amostras induzidas, amostras de 1 a 3, e as amostras controle, amostras de 4 a 6, são separadas eficientemente pela primeira componente principal (PC1) que foi capaz de explicar 74,14% das diferenças dos dados (FIGURA 4.35).

Isso indica que as amostras induzidas apresentaram diferenças significativas em relação às amostras controle, assim como mostram os dados de área relativa das amostras controle e induzidas na TABELA 4.12.

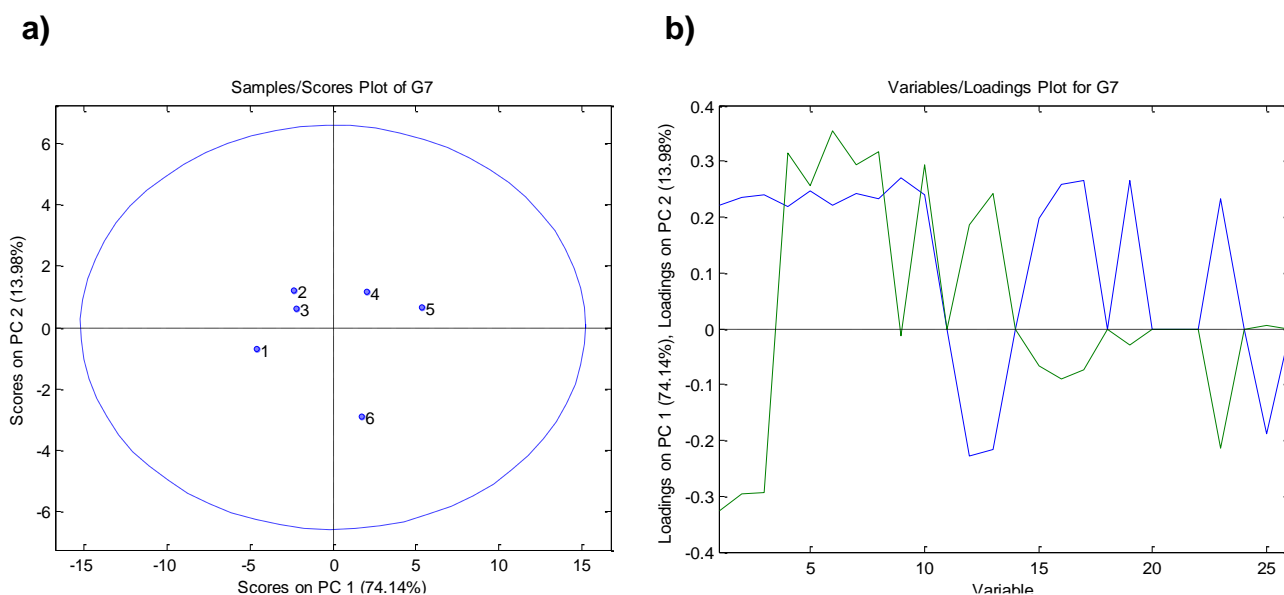


FIGURA 4.35 - Análise de Componente Principal (PCA) das amostras induzidas por herbivoria (1-3) e amostras controle (4-6) do genótipo 7, Delta Opal, de algodão. a) Escores; b) Loadings

Da mesma forma, o genótipo 8, FMT 701, classificado na literatura como resistente por antibiose e não-preferência à outros insetos, como à *S. frugiperda* também apresentou diferenças no perfil de emissão de voláteis para as amostras controle (FIGURA 4.36) e para as amostras induzidas por herbivoria (FIGURA 4.37). Foram identificados 18 compostos, conforme é mostrado na TABELA 4.13.

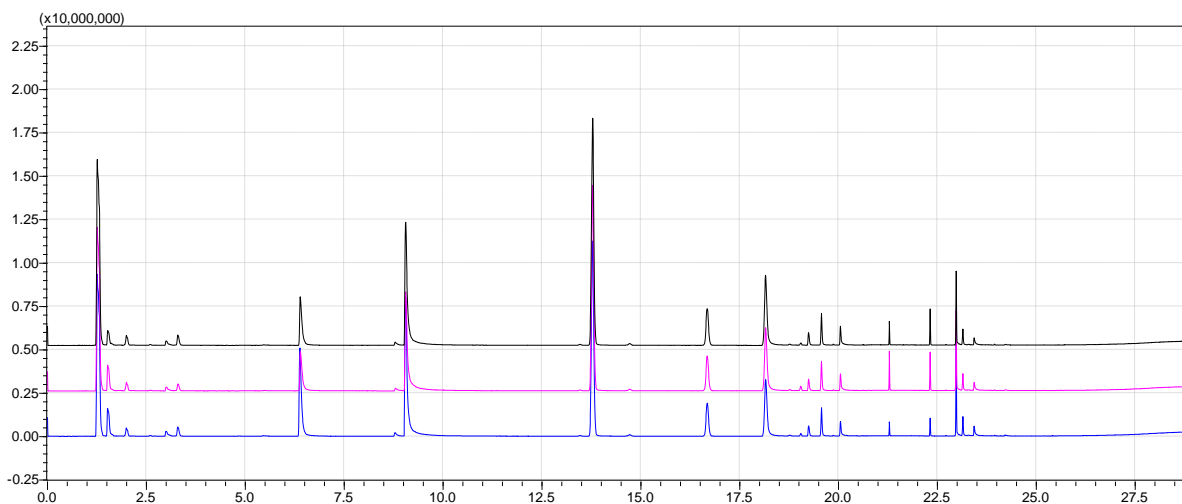


FIGURA 4.36 - Cromatogramas da análise por HS-GC/MS das amostras controle de folhas de algodão FMT-701.

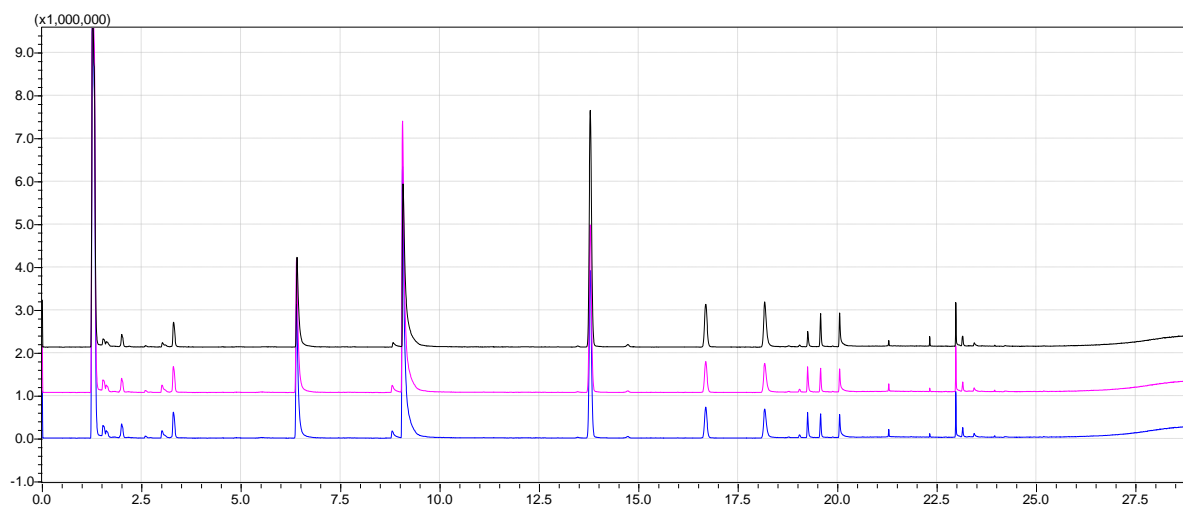


FIGURA 4.37 - Cromatogramas da análise por HS-GC/MS das amostras de folhas de algodão do genótipo FMT-701 induzidas por herbivoria de *S. cosmioides*.

TABELA 4.13 - Identificação experimental dos compostos orgânicos voláteis presentes no genótipo de algodão FMT-701 por HS-GC/MS.

#	Nome	TR _(min)	CONTROLE		HERBIVORIA	
			Área média	DPR,%	Área média	DPR,%
1	n-Hexanal	6.379	10,45	49,57	10,22	17,6
2	2-Hexenal	8.785	0,61	21,94	0,58	16,9
3	2-Hexenal	9.054	23,53	20,33	24,56	15,5
4	γ-Terpinene	13.462	0,13	5,15	0,08	40,6
5	α-Pinene	13.781	36,24	2,33	19,52	47,2
6	Canfeno	14.721	0,31	6,13	0,20	53,6
7	β-Pinene	16.680	6,47	3,23	3,91	45,9
8	β-Mirceno	18.157	12,34	1,22	4,37	50,6
9	α-Phellandrene	18.766	0,10	8,36	0,06	52,7
PI	1,4-Cineole (PI)	19.243	1,00	0,00	1,00	0,0
10	Limoneno	19.569	2,58	3,46	1,43	44,6
12	trans-β-Ocimeno	19.868	0,06	5,18	0,03	45,9
13	β-Ocimeno	20.046	1,47	3,27	1,60	49,2
14	Cyclohexene	20.612	0,02	16,89	0	0
15	α-Cubebene	22.720	0,03	14,14	0	0
16	Caryophyllene	22.972	4,03	18,41	1,35	23,3
19	Humuleno	23.145	1,11	14,37	0,45	49,5
24	α-Ylangene	23.428	0,78	21,26	0,18	13,8
26	β-Bisabolol	24.213	0,09	29,77	0,03	11,7

Qualitativamente, se observa que as amostras induzidas não apresentam dois compostos que estão presentes nas amostras controle: Ciclohexeno (14) e α-Cubebeno (15). Quantitativamente, se observa a diminuição dos compostos α-pineno (5), β-pineno (7), β-mirceno (8), cariofileno (16) e humuleno (19), assim como o observado para os genótipos BRS 286, FMT 709, FM 910 e FM 993, mostrados anteriormente.

A partir da análise do componente principal para o genótipo 8, FMT 701, é possível observar que as amostras induzidas, amostras de 1 a 3, e as amostras controle, amostras de 4 a 6, são separadas eficientemente pela primeira componente principal (PC1) que foi capaz de explicar 70,69% das diferenças dos dados (FIGURA 4.38).

Isso indica que as amostras induzidas apresentaram diferenças significativas em relação às amostras controle, assim como mostram os dados de área relativa das amostras controle e induzidas na TABELA 4.13.

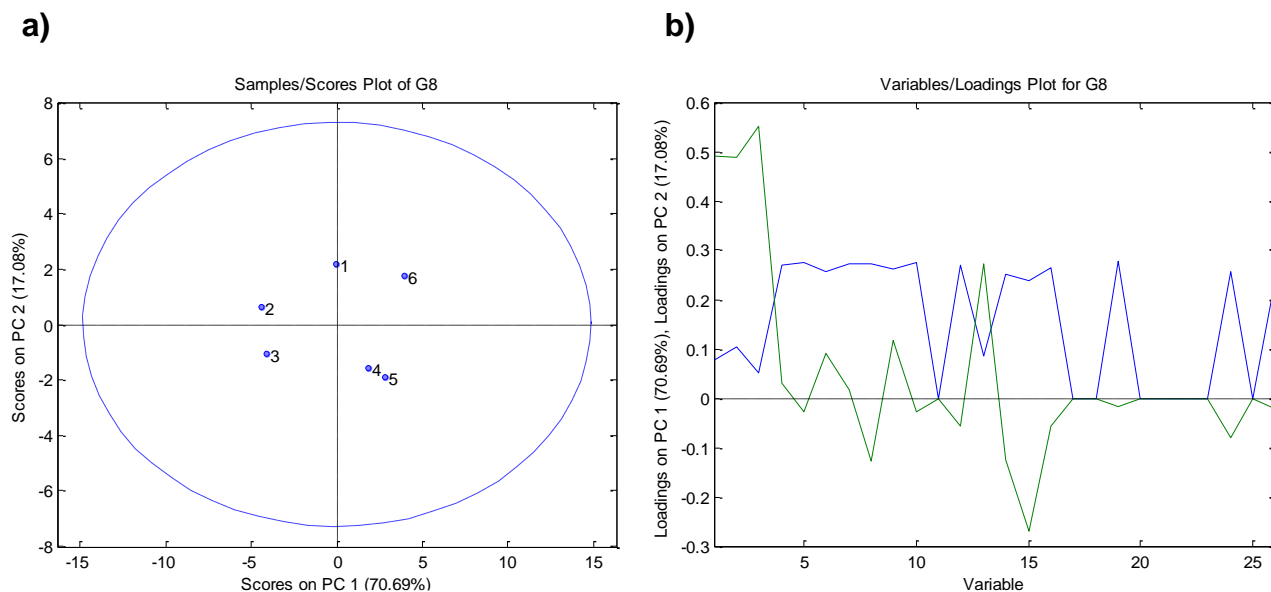


FIGURA 4.38 - Análise de Componente Principal (PCA) das amostras induzidas por herbivoria (1-3) e amostras controle (4-6) do genótipo 8, FMT-701, de algodão. a) Escores; b) Loadings

Desse modo, conclui-se que é mais efetivo avaliar os genótipos isoladamente entre si e também a partir do maior número de ensaios biológicos. Assim, o mapeamento dos mecanismos responsáveis pela resistência e/ou suscetibilidade será melhor identificado, bem como os compostos ou conjuntos de compostos que estão relacionados com a resposta biológica.

4.4 EXPERIMENTO III: RESISTÊNCIA INDUZIDA POR FATORES BIÓTICOS E ABIÓTICOS

No experimento III foram avaliadas 6 condições de indução de resistência nos genótipos Delta Opal e FMT 701: (I) aplicação de MeJA $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$ via pulverização, (II) aplicação de MeJA $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$ no solo, (III) aplicação de MeJA $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$ no solo, (IV) aplicação de MeJA $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$ no solo após herbivoria de *S. cosmioides*, (V) herbivoria de *S. cosmioides* e (VI) estresse hídrico.

A aplicação do fitohormônio metil-jasmonato nos tratamentos foi realizada para investigar a ativação da rota de liberação e biossíntese dos compostos orgânicos voláteis relacionados às respostas de defesa nos genótipos de algodoeiro. Também foram investigados com os tratamentos o melhor meio de aplicação do fitohormônio, bem como a melhor concentração. Esses ensaios foram realizados nesse trabalho com o intuito de gerar conhecimentos sobre a aplicação dos compostos responsáveis por induzir resistência nos genótipos de algodão, que poderão ser utilizados no manejo integrado de pragas das culturas de algodão no Brasil, por exemplo.

Da mesma forma, a herbivoria também foi avaliada com o intuito de se verificar as alterações no perfil metabolômico de compostos voláteis nos dois genótipos de algodão e compará-los com o perfil metabolômico das plantas que sofreram herbivoria e receberam, em seguida, a aplicação de metil-jasmonato. Esses tratamentos foram escolhidos para se avaliar a capacidade de ativação dos mecanismos de defesa das plantas de algodão em caso de infestação, bem como para avaliar a efetividade da aplicação de compostos para induzir resistência na recuperação de culturas que foram atingidas por insetos-praga.

Assim, após os ensaios, as amostras dos genótipos Delta Opal e FMT 701 foram analisadas no método de HS-GC-MS desenvolvido. A FIGURA 4.39 e a FIGURA 4.40 mostram os cromatogramas obtidos para os tratamentos com os genótipos Delta Opal e FMT 701, respectivamente, em que é possível observar diferenças nas intensidades dos sinais nos diferentes tratamentos.

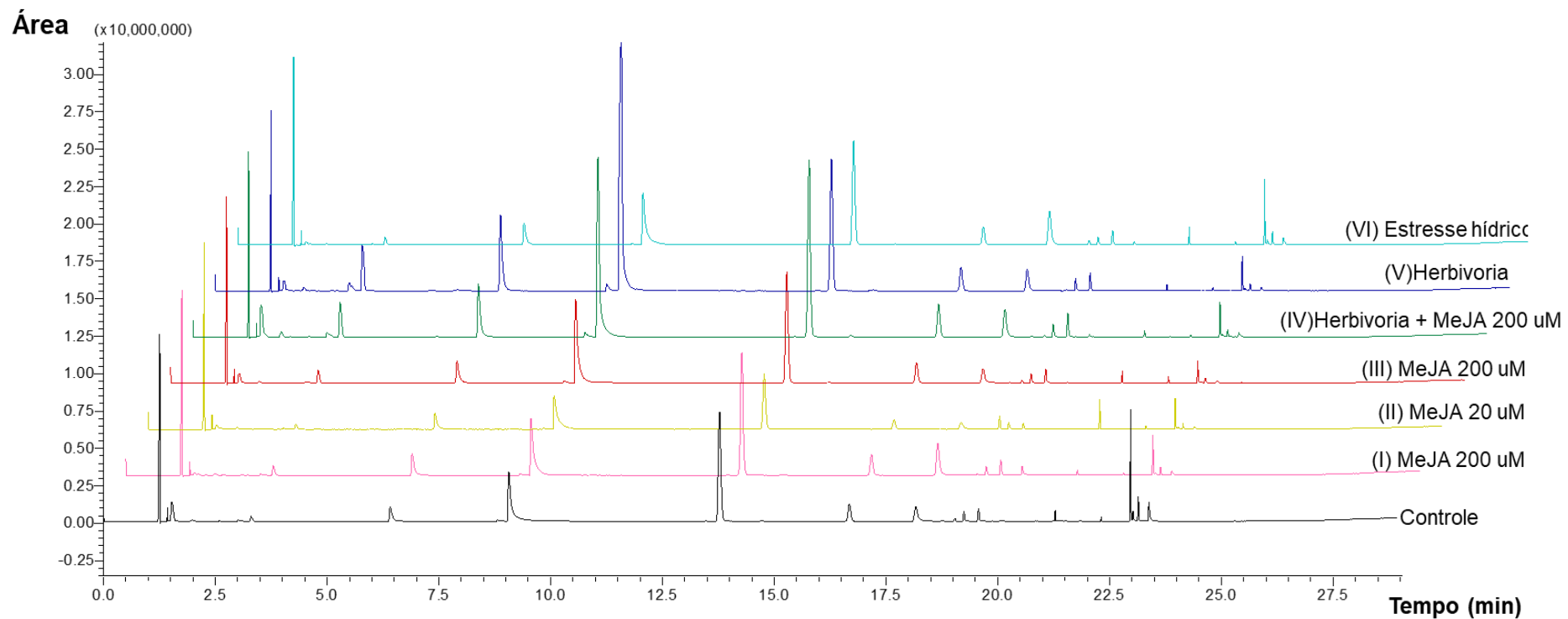


FIGURA 4.39 - Perfis químicos das induções no genótipo Delta Opal

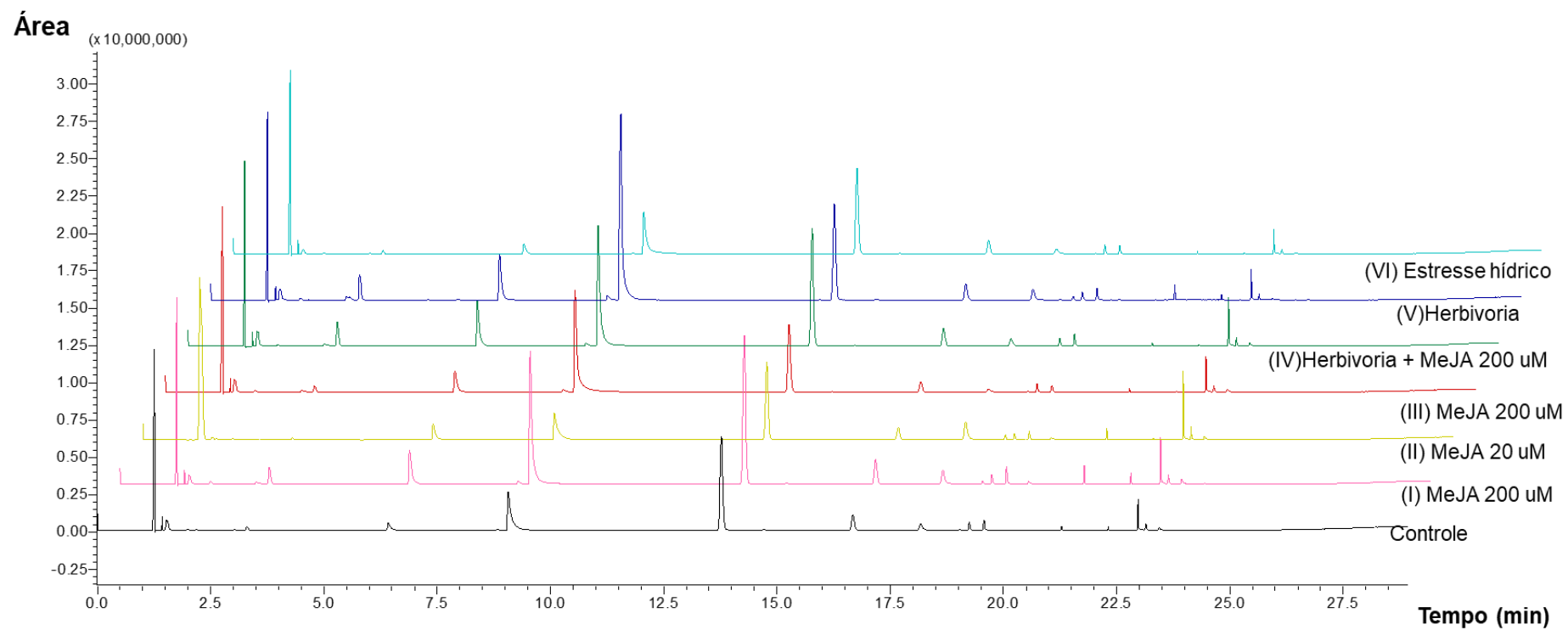


FIGURA 4.40 - Perfis químicos das induções no genótipo FMT 701

Adicionalmente, foram identificados experimentalmente 32 compostos nas amostras induzidas e controle para os dois genótipos padrões, Delta Opal e FMT 701 (FIGURA 4.18).

TABELA 4.14 – Identificação experimental dos compostos presentes nos genótipos padrões de algodão por HS-GC-MS

#	TR (min)	Nome	IR Experimental	IR Literatura
1	1,98	2-Butanona	61	-
2	2,18	Acetato de etila	67	-
3	2,60	Butanal	80	-
4	2,72	2-metil-butanal	84	-
5	3,02	1-Penten-3-ol	94	-
6	3,09	1-Penten-3-ona	95	-
7	3,31	α -etil-furano	695	-
8	4,79	2-Pentenal	751	-
9	5,41	2-Penten-1-ol	771	-
10	6,44	2-Hexanal	802	800
11	8,90	(Z)-2-Hexenal	822	814
12	9,10	(E)-2-Hexenal	850	854
13	13,47	α -Felandreno	924	-
14	13,78	α -Pineno	928	934
15	14,73	Canfeno	942	947
16	16,69	β -Pineno	970	974
17	18,18	β -Mirceno	992	983
18	18,78	α -Felandreno	1001	969
PI	19,25	1,4-Cineol	1024	1008
19	19,57	D-limoneno	1041	1027
20	19,74	Ciclohexanona	1049	1086
21	19,88	trans- β -Ocimeno	1056	976
22	20,06	β -Ocimeno	1065	976
23	20,14	Pentanoato de metila	1069	785
24	22,72	α -Cubebeno	1378	1344
25	22,97	β -Cariofileno	1434	1494
26	23,05	α -Guaiano	1454	1443
27	23,15	Humuleno	1474	1579
28	23,21	Iso-cariofileno	1489	
29	23,30	Guaia-1(10),11-dieno	1509	1490
30	23,38	Azuleno	1538	1490
31	23,44	Ylangeno	-	-
32	24,23	β -bisabolol	1704	1619

Os perfis químicos obtidos para as amostras induzidas nos 6 tratamentos do genótipo Delta Opal, padrão de suscetibilidade à *Spodoptera cosmioides* em relação a não-preferência, e para o genótipo FMT 701, padrão de resistência à S.

cosmioides em relação à não-preferência, foram analisados por meio da análise do componente principal (PCA) em comparação às amostras controle. Os gráficos de amostras/scores para os 6 tratamentos são mostrados na FIGURA 4.41, para o genótipo Delta Opal, e na FIGURA 4.42, para o genótipo FMT 701.

Pode-se observar nas FIGURA 4.41 e FIGURA 4.42 que apenas os tratamentos (I), (III), (IV) e (V) apresentaram separação entre as amostras induzidas e as amostras controle. Isso indica que apenas para esses tratamentos foram obtidas diferenças relevantes entre os perfis metabolômicos de compostos orgânicos voláteis das amostras dos diferentes tratamentos em relação às amostras controle.

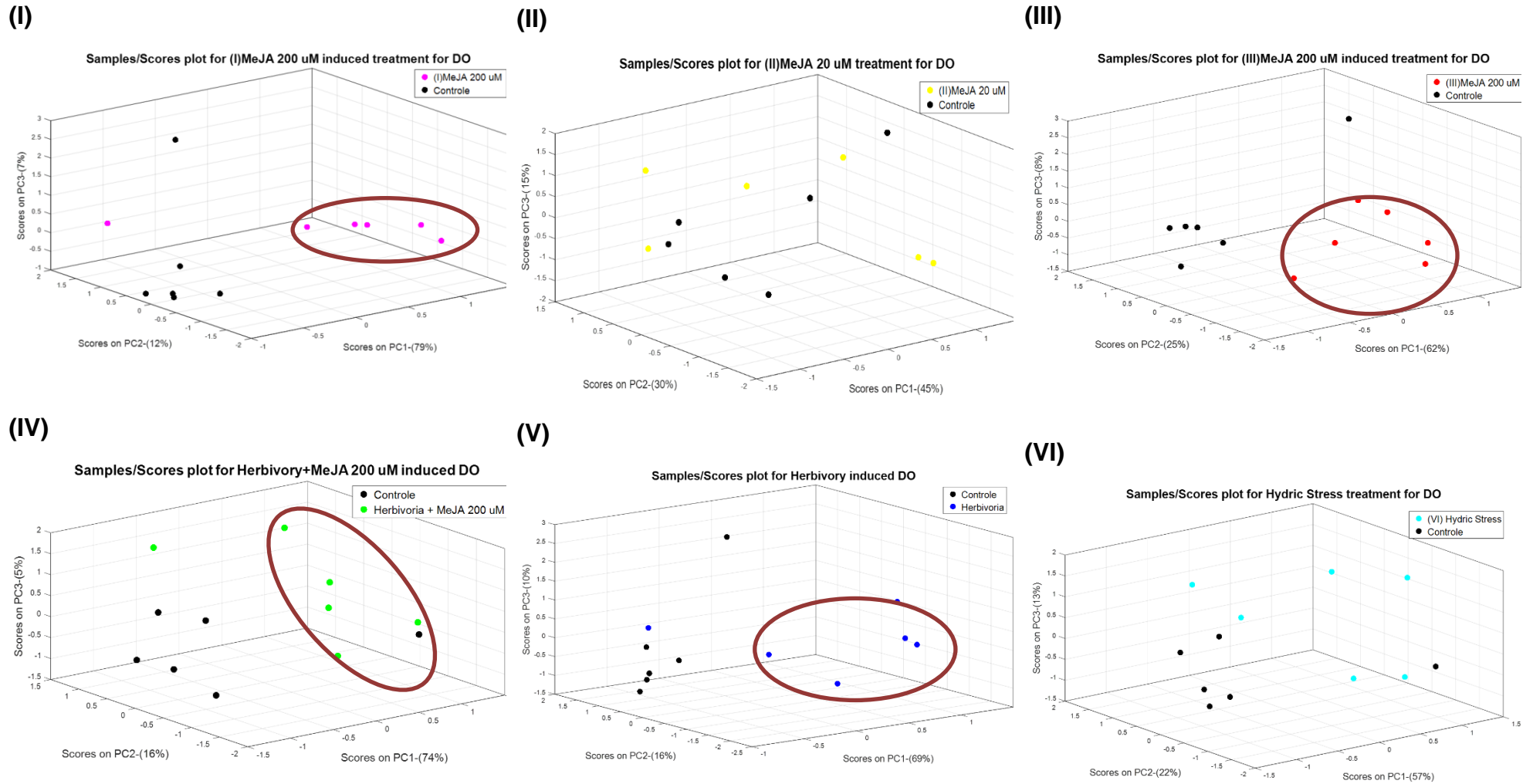


FIGURA 4.41 – Gráficos de amostras/scores para os seis tratamentos para o genótipo Delta Opal.

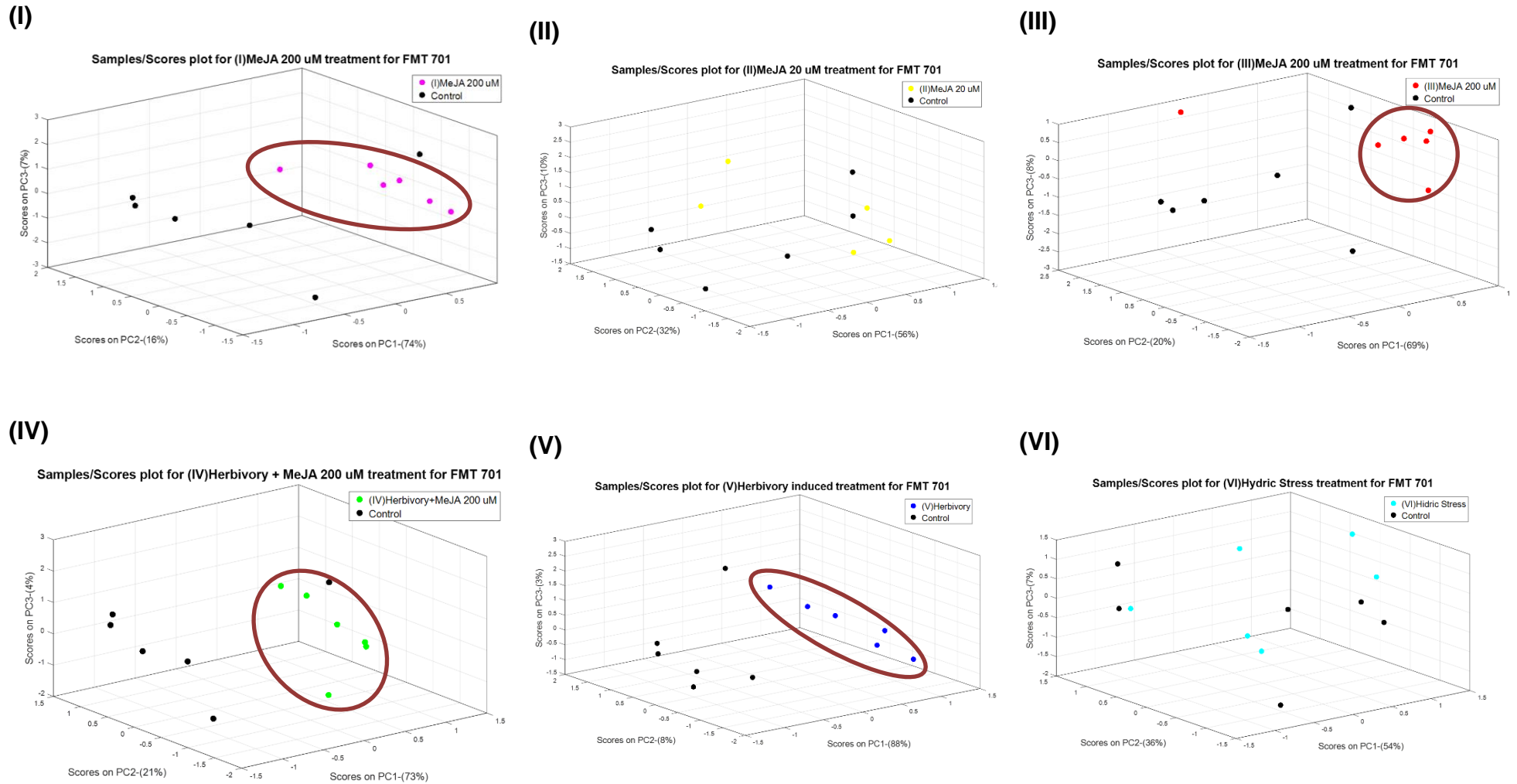


FIGURA 4.42 - Gráficos de amostras/scores para os seis tratamentos para o genótipo FMT 701.

Os dados de atratividade e de consumo foliar frente a *S. cosmioides* foram submetidos à análise de variância. As médias foram comparadas pelo teste *t*, com nível de 5% de confiança. Os resultados de consumo foliar dos seis tratamentos para os dois genótipos estudados são apresentados na FIGURA 4.43.

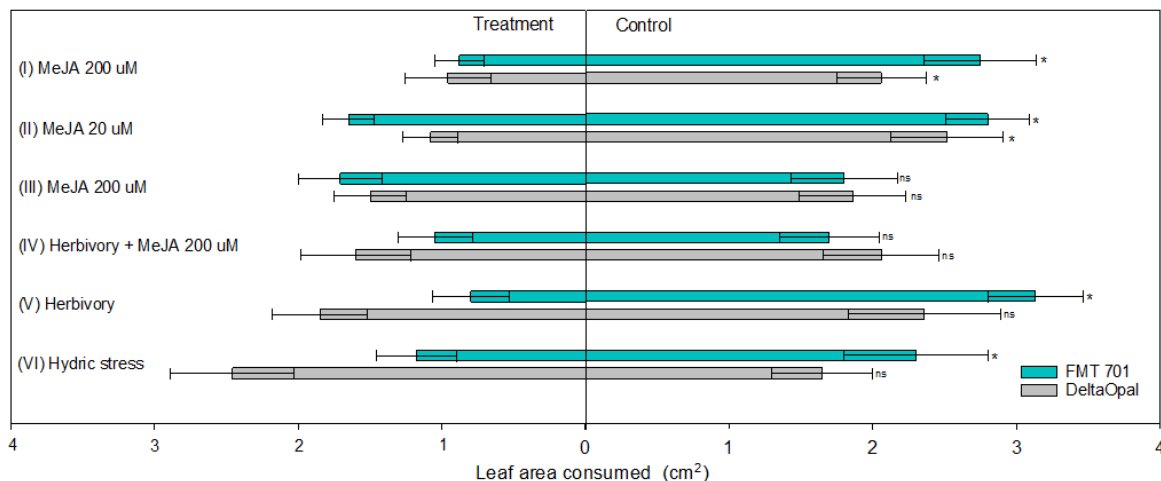


FIGURA 4.43 - Área foliar consumida (cm^2) por lagartas de 3º instar de *Spodoptera cosmioides* em diferentes tratamentos de indução de resistência em cultivares de algodão. * O tratamento apresenta diferença significativa pelo teste *t* ($P < 0,05$). ^{ns} O tratamento não apresenta diferença significativa pelo teste *t* ($P < 0,05$).

Os dados de área foliar consumida indicam que, para o genótipo FMT 701, o consumo foliar dos tratamentos (III) MeJA 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e (IV) Herbivoria + MeJA 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ não apresentaram diferenças significativas em relação ao consumo de folhas controle. Enquanto que nos demais tratamentos, (I) MeJA 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ pulverizado, (II) MeJA 20 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ aplicado no solo, (V) herbivoria e (VI) estresse hídrico, houve a preferência pelo consumo das folhas controle. Isso indica que, provavelmente, houve a indução de resistência através da alteração na composição dos constituintes das folhas de algodão que diminuíram a atratividade das lagartas de *S. cosmioides*. Para o genótipo Delta Opal, entretanto, apenas os tratamentos (I) MeJA 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ pulverizado e (II) MeJA 20 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ no solo apresentaram diferenças significativas, em que houve a preferência pelo consumo das folhas controle.

Os resultados do índice de atratividade dos seis tratamentos em relação ao controle para os dois genótipos estudados são apresentados na FIGURA 4.44.

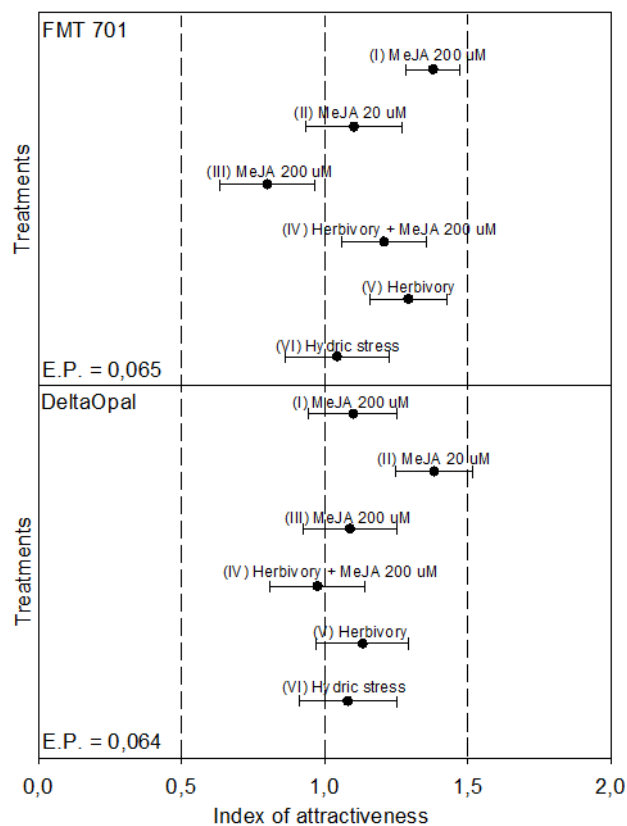


FIGURA 4.44 - Índice de atratividade (IA) por lagartas de 3^o ínstar de *Spodoptera cosmioides* em diferentes tratamentos para indução de resistência em cultivares de algodão. IA \pm E.P. > 1 repelência pelo tratamento em relação ao controle; IA \pm E.P. < 1 preferência pelo tratamento em relação ao controle; IA \pm E.P. = 1 neutralidade.

É possível observar que, para o genótipo FMT 701, as lagartas de *S. cosmioides* se apresentaram repelidas pelos tratamentos com a adição da solução de (I) MeJA 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ pulverizado, (IV) Herbivoria + MeJA 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e (V) Herbivoria. Enquanto que as lagartas apresentaram atratividade, em relação ao controle, ao tratamento (III) com o MeJA 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ aplicado no solo. Em relação aos demais desse genótipo, as lagartas apresentaram neutralidade. Já para o genótipo Delta Opal, apenas o tratamento com MeJA 20 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ no solo (II) apresentou repelência para às lagartas em relação ao controle, enquanto os demais apresentaram-se neutros.

Analisando os resultados dos ensaios biológicos comportamentais frente a *S. cosmioides* versus as diferenças observadas na análise de HS-GC-MS do perfil químico dos tratamentos estudados, temos que para o genótipo Delta Opal apenas o tratamento (I) com MeJA 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ pulverizado apresentou diferenças

significativas no perfil químico e em pelo menos um dos ensaios biológicos ensaiados (consumo foliar).

A FIGURA 4.45 apresenta o gráfico de amostras/scores para o tratamento (I) MeJA 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ pulverizado para o genótipo Delta Opal. É possível observar a separação das amostras induzidas em relação às amostras controle, indicando que o perfil químico dos compostos voláteis das amostras induzidas é significativamente diferente do perfil químico das amostras controle.

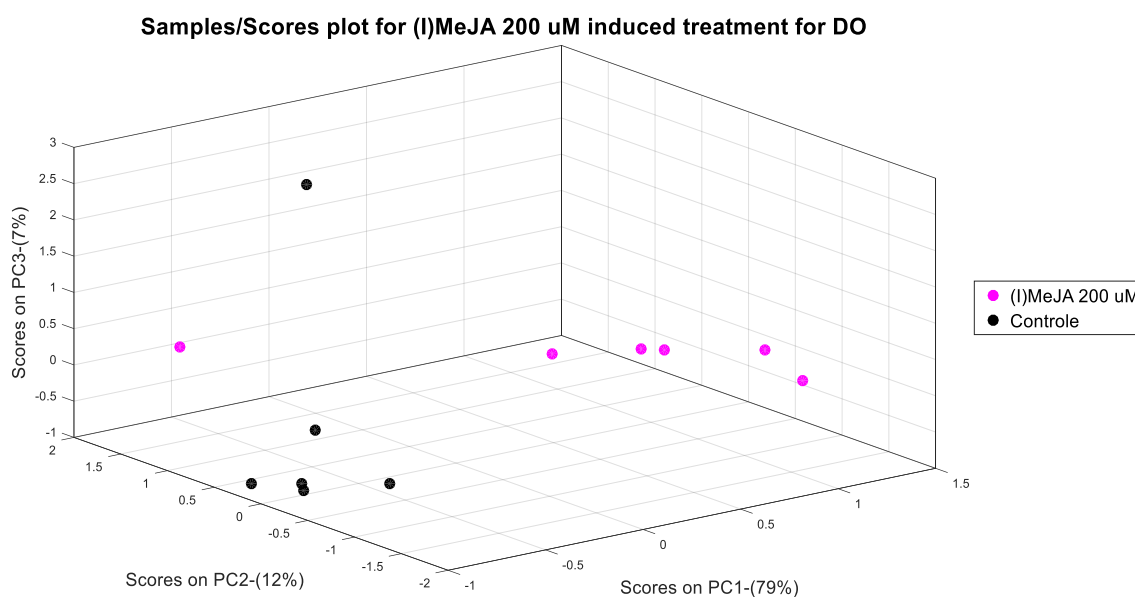


FIGURA 4.45 – Gráfico de Scores/Amostras para o tratamento (I) MeJA 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ pulverizado para o genótipo Delta Opal

O gráfico de variáveis/loadings (FIGURA 4.46) apresenta as variáveis mais significativas para essa separação das amostras, nas três componentes principais apresentadas: PC1, em azul, PC2, em laranja e PC3, em amarelo. Dessa forma, foram observadas diferenças significativas nos compostos: α -etil-furano (7), hexanal (10), (E)-2-Hexenal (12), α -pineno (14), β -mirceno (17), limoneno (19), β -Ocimeno (22) e β -cariofileno (25).

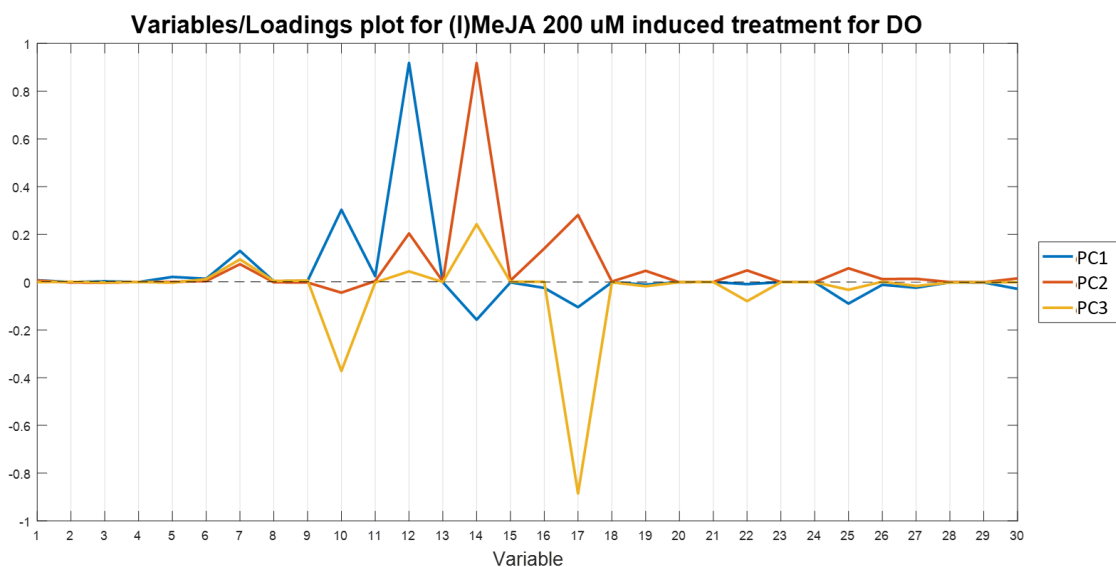


FIGURA 4.46 - Gráfico de Loadings/Variáveis para o tratamento (I) MeJA 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ pulverizado para o genótipo Delta Opal

Esses resultados permitem inferir que a pulverização do MeJA nas folhas de algodão do genótipo Delta Opal induziu a produção dos compostos orgânicos voláteis **7**, **10** e **12** em relação ao perfil químico das plantas controle. Ou seja, a adição de MeJA provavelmente ativou a rota de liberação e biossíntese desses compostos que podem estar relacionados com os mecanismos de defesa desse genótipo da planta do algodoeiro^{94; 103}.

Adicionalmente, foi feita a análise de *Volcano* entre os perfis químicos dos COV do tratamento (I) com MeJA 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ pulverizado e o tratamento controle (FIGURA 4.47).

O gráfico de *Volcano* é um gráfico de dispersão que relaciona os resultados do teste t com os *fold-change* de dois ou mais grupos amostrais: amostras controle e amostras teste¹⁰⁴. Ele tem como objetivo destacar as diferenças entre os grupos amostrais, fornecendo informações sobre o aumento ou redução de compostos, por exemplo, nas amostras teste em relação às amostras controle^{104; 105}. É uma ferramenta gráfica comumente e amplamente utilizada em análises genômicas, proteômicas e metabolômicas.

Os dados dos gráficos de *Volcano* para os genótipos e tratamentos analisados estão disponíveis no APÊNDICE F – Experimento III: Resistência Induzida por fatores bióticos e abióticos – *Volcano Plot*.

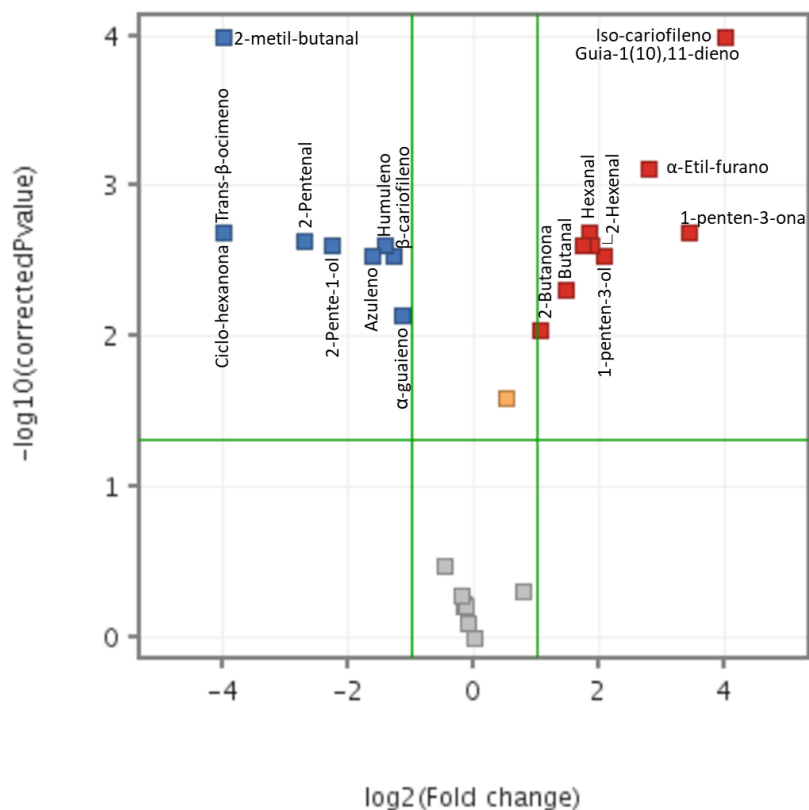


FIGURA 4.47 - *Volcano Plot* para as amostras controle *versus* Tratamento (I) para o genótipo Delta Opal. Compostos em azul indicam menor concentração nas amostras induzidas (*down regulation*), enquanto compostos em vermelho indicam maior concentração (*up regulation*).

A FIGURA 4.47 mostra a regulação metabólica dos compostos voláteis nas amostras induzidas por aplicação de MeJA para o genótipo Delta Opal. Pode-se observar, em azul no lado esquerdo, os compostos trans-β-ocimeno e β-cariofileno que estão presentes em menor concentração nas amostras induzidas. Esses compostos são responsáveis pela *down regulation* do processo de indução de resistência, ou seja, eles se apresentam em menor quantidade em relação às amostras controle em resposta ao tratamento aplicado. O oposto, portanto, é observado para os compostos voláteis de folhas frescas, hexanal e 2-hexenal, por exemplo, que estão do lado direito em vermelho no gráfico: eles estão presentes em maior concentração e são responsáveis pela *up regulation*.

Em contrapartida, para o genótipo FMT 701, três tratamentos apresentaram diferenças significativas no perfil químico por HS-GC-MS e em pelo menos um dos ensaios biológicos ensaiados. São eles: tratamentos (I), (IV) e (V).

O tratamento (I) com MeJA $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$ pulverizado apresentou diferenças tanto no perfil químico, quanto nos dois ensaios biológicos realizados: consumo foliar e atratividade. A FIGURA 4.48 apresenta o gráfico de amostras/scores para o tratamento (I) MeJA $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$ pulverizado para o genótipo FMT 701. É possível observar a separação das amostras induzidas em relação às amostras controle, especialmente em relação a componente principal 1 (PC1). Portanto, observa-se que o perfil químico dos compostos voláteis das amostras induzidas é diferente do perfil químico das amostras controle a partir das variáveis mais significativas na PC1.

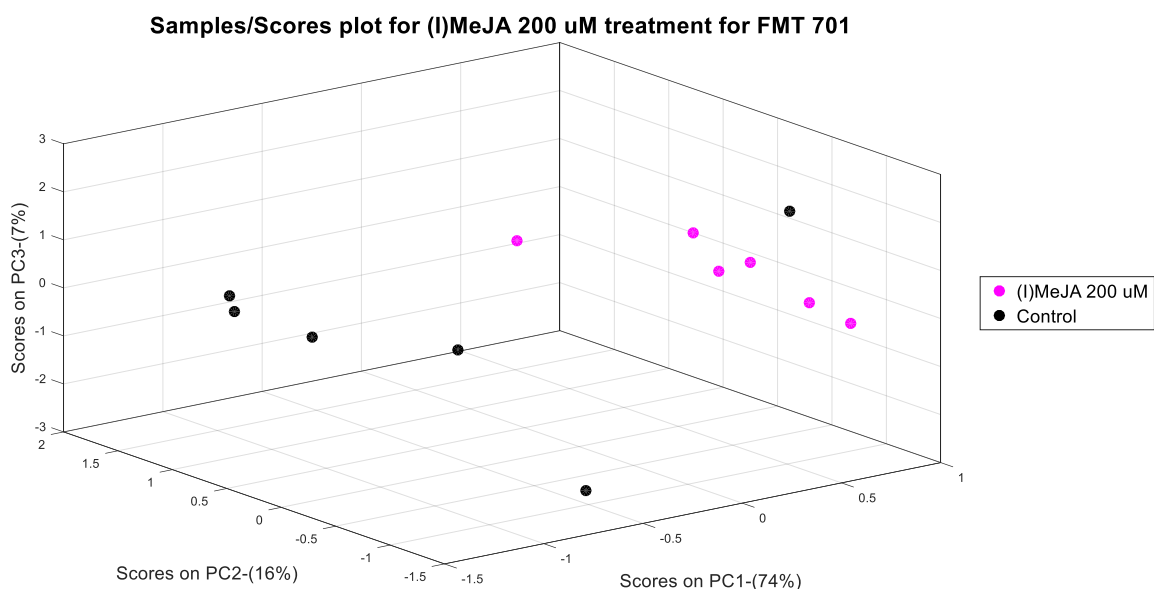


FIGURA 4.48 - Gráfico de Scores/Amostras para o tratamento (I) MeJA $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$ pulverizado para o genótipo FMT 701

O gráfico de variáveis/loadings (FIGURA 4.49) apresenta as variáveis mais significativas para essa separação das amostras, nas três componentes principais apresentadas: PC1, em azul, PC2, em laranja e PC3, em amarelo.

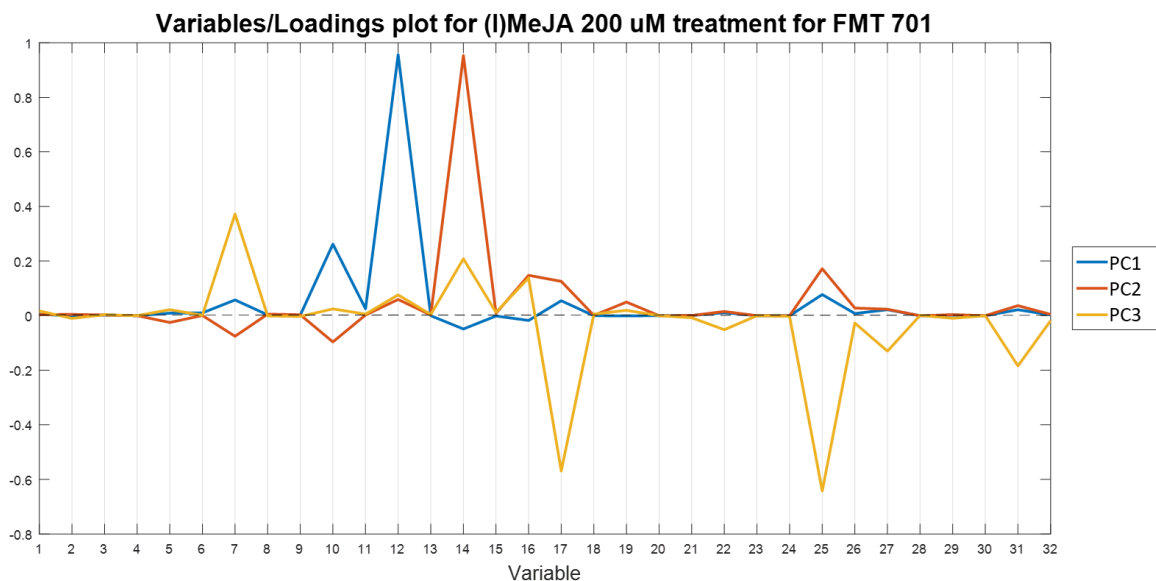


FIGURA 4.49 - Gráfico de Loadings/Variáveis para o tratamento (I) MeJA 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ pulverizado para o genótipo FMT 701

Dessa forma, foram observadas diferenças significativas nos compostos: α -etil-furano (7), hexanal (10), (E)-2-Hexenal (12), α -pineno (14), β -pineno (16), β -mirceno (17), limoneno (19), β -Ocimeno (22), β -cariofileno (25), humuleno (27) e azuleno (30). Em relação a PC1, temos que os compostos mais significativos para a separação são, do mais significativo ao menos: (E)-2-Hexenal (12), hexanal (10), α -pineno (14), β -cariofileno (25), β -mirceno (17), α -etil-furano (7), β -pineno (16), humuleno (27) e ylangene (31).

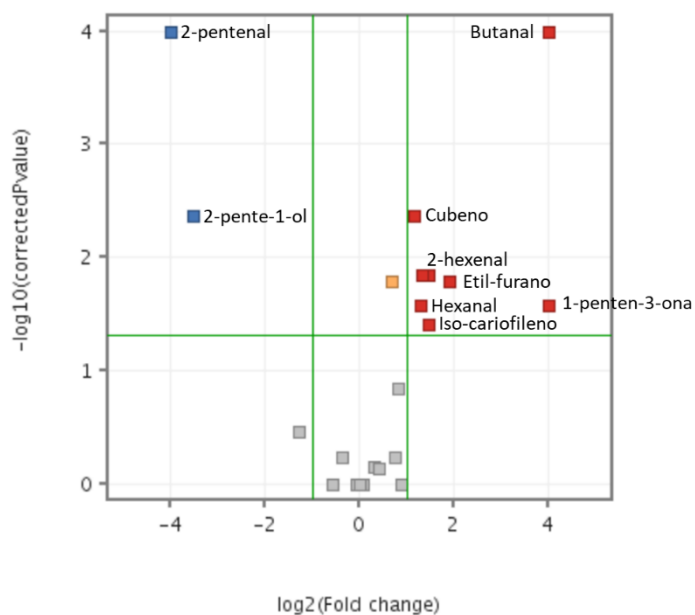


FIGURA 4.50 - Volcano Plot para as amostras controle versus Tratamento (I) para o genótipo FMT 701

A FIGURA 4.50 mostra a regulação metabólica dos compostos voláteis nas amostras induzidas por aplicação de MeJA para o genótipo FMT 701. Pode-se observar, em azul, que os compostos 2-pentenal, 2-penten-1-ol, por exemplo, estão em menor concentração nas amostras induzidas (*down regulation*), enquanto que os compostos voláteis de folhas frescas, hexanal e 2-hexenal e o sesquiterpeno cariofileno, por exemplo, se apresentam em maior concentração (*up regulation*).

Da mesma forma, o tratamento (V) por Herbivoria de *S. cosmioides* também apresentou diferenças significativas no perfil químico e em ambos os ensaios biológicos realizados. A FIGURA 4.51 apresenta o gráfico de amostras/scores para o tratamento (V) Herbivoria de *S. cosmioides* para o genótipo FMT 701. É possível observar a separação das amostras induzidas em relação às amostras controle, especialmente em relação a componente principal 1 (PC1).

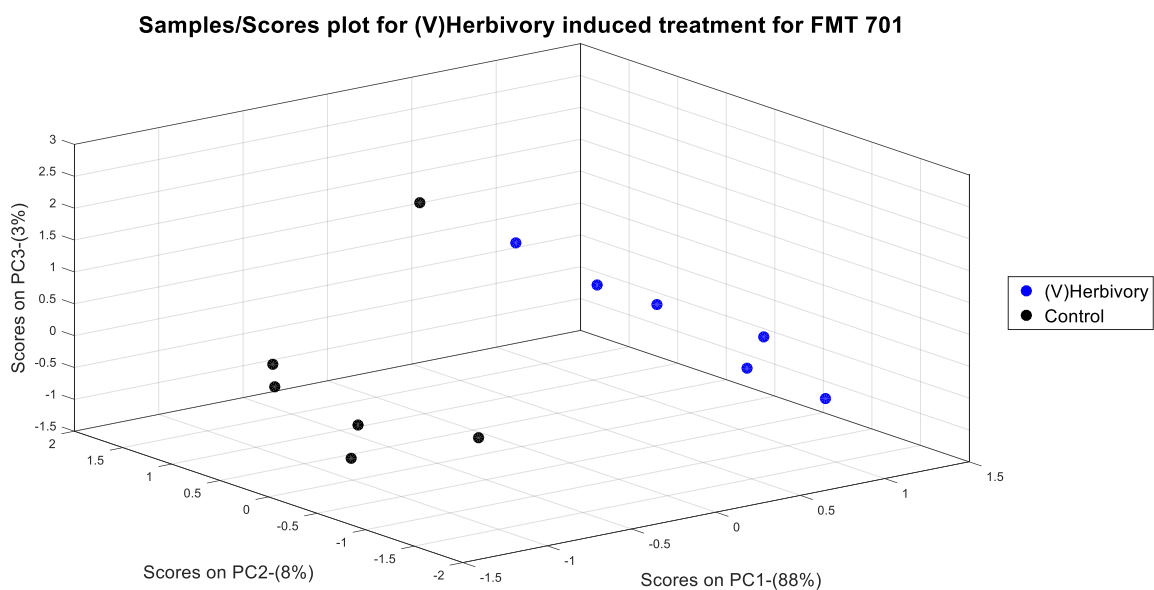


FIGURA 4.51 - Gráfico de Scores/Amostras para o tratamento (V) Herbivoria de *Spodoptera cosmioides* para o genótipo FMT 701

O gráfico de variáveis/loadings (FIGURA 4.52) apresenta as variáveis mais significativas para essa separação das amostras, nas três componentes principais apresentadas: PC1, em azul, PC2, em laranja e PC3, em amarelo.

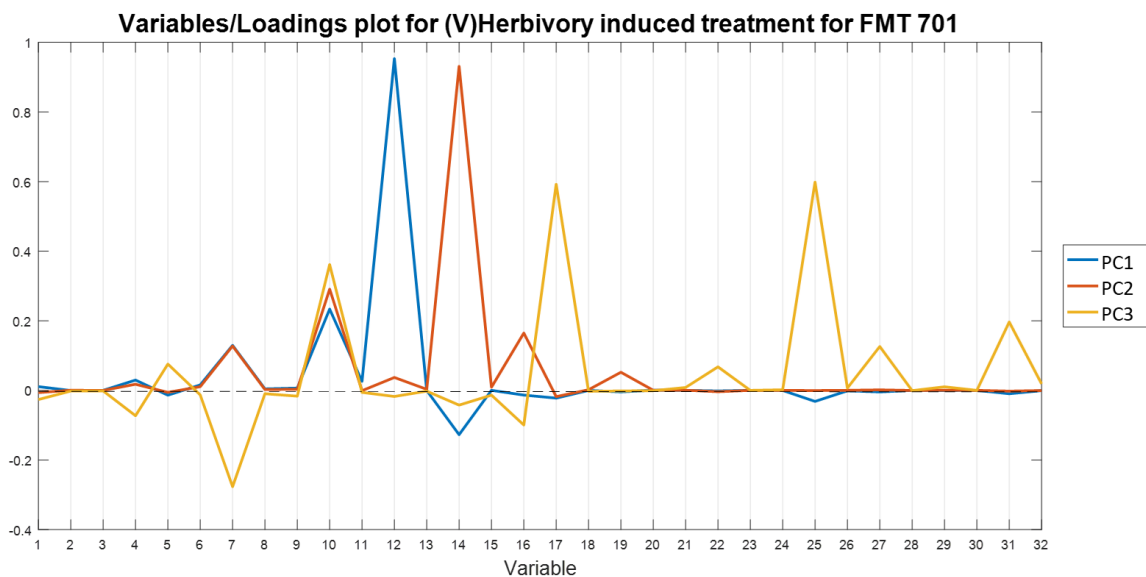


FIGURA 4.52 - Gráfico de Loadings/Variáveis para o tratamento (V) Herbivoria de *Spodoptera cosmioides* para o genótipo FMT 701

Portanto, foram observadas diferenças significativas nos compostos: α -etil-furano (**7**), hexanal (**10**), (E)-2-Hexenal (**12**), α -pineno (**14**), β -pineno (**16**), β -mirceno (**17**), β -cariofileno (**25**) e ylanglene (**31**). Em relação a PC1, temos que os compostos mais significativos para a separação são, do mais significativo ao menos: (E)-2-Hexenal (**12**), α -pineno (**14**) e β -cariofileno (**25**).

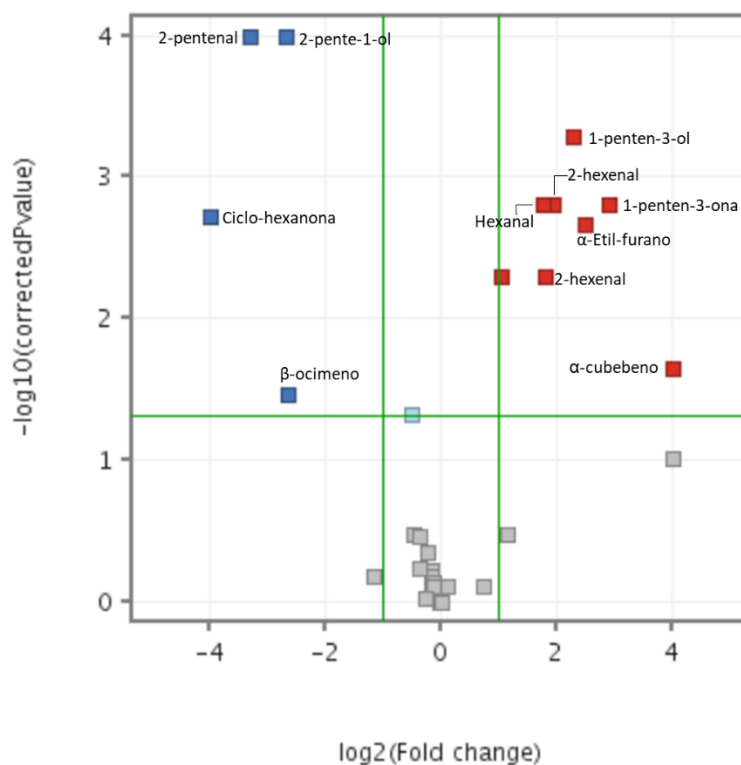


FIGURA 4.53 - *Volcano Plot* para as amostras controle *versus* Tratamento (V) Herbivoria de *Spodoptera cosmioides* para o genótipo FMT 701

A FIGURA 4.53 mostra a regulação metabólica dos compostos voláteis nas amostras induzidas por Herbivoria de *Spodoptera cosmioides* para o genótipo FMT 701. Pode-se observar, em azul, que os compostos 2-pentenal, 2-penten-1-ol, ciclo-hexanona e β-ocimeno estão em menor concentração nas amostras induzidas (*down regulation*), enquanto que os compostos voláteis de folhas frescas, hexanal e 2-hexenal e o sesquiterpeno α-cubebano, por exemplo, se apresentam em maior concentração (*up regulation*).

O tratamento (IV) Herbivoria de *Spodoptera cosmioides* combinada com aplicação direta de MeJA 200 μmol.L⁻¹ no solo para o genótipo FMT 701, entretanto, apresentou diferenças significativas no perfil químico e apenas no ensaio do índice de atratividade. A FIGURA 4.54 apresenta o gráfico de amostras/scores para o tratamento esse tratamento. É possível observar a separação das amostras induzidas em relação às amostras controle, especialmente em relação à componente principal 1 (PC1).

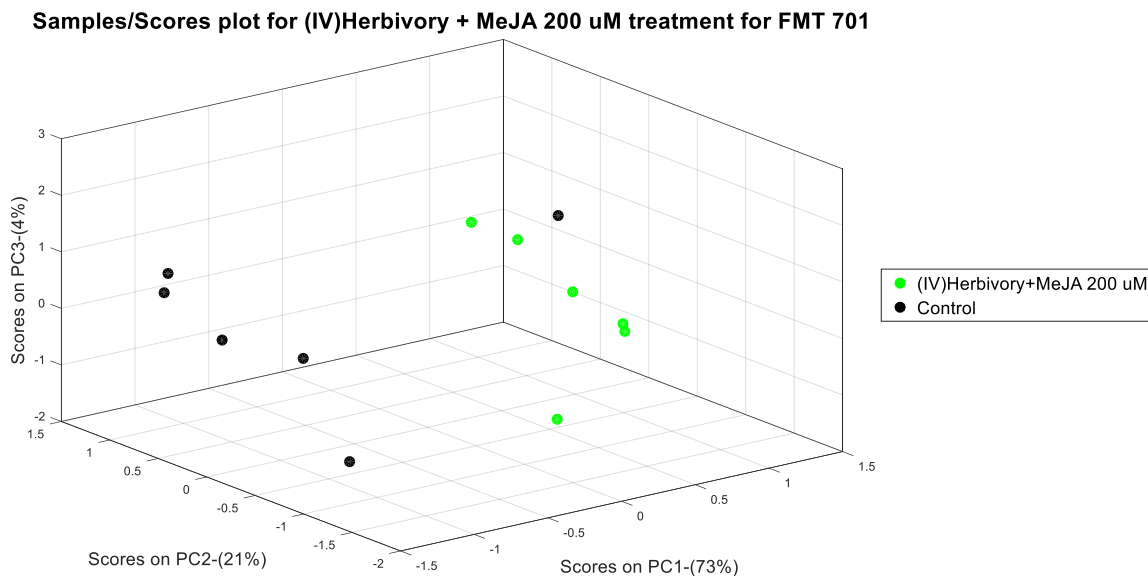


FIGURA 4.54 - Gráfico de Scores/Amostras para o tratamento (IV) Herbivoria combinada com aplicação direta de MeJA 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ no solo para o genótipo FMT 701

O gráfico de variáveis/loadings (FIGURA 4.55) apresenta as variáveis mais significativas para essa separação das amostras, nas três componentes principais apresentadas: PC1, em azul, PC2, em laranja e PC3, em amarelo.

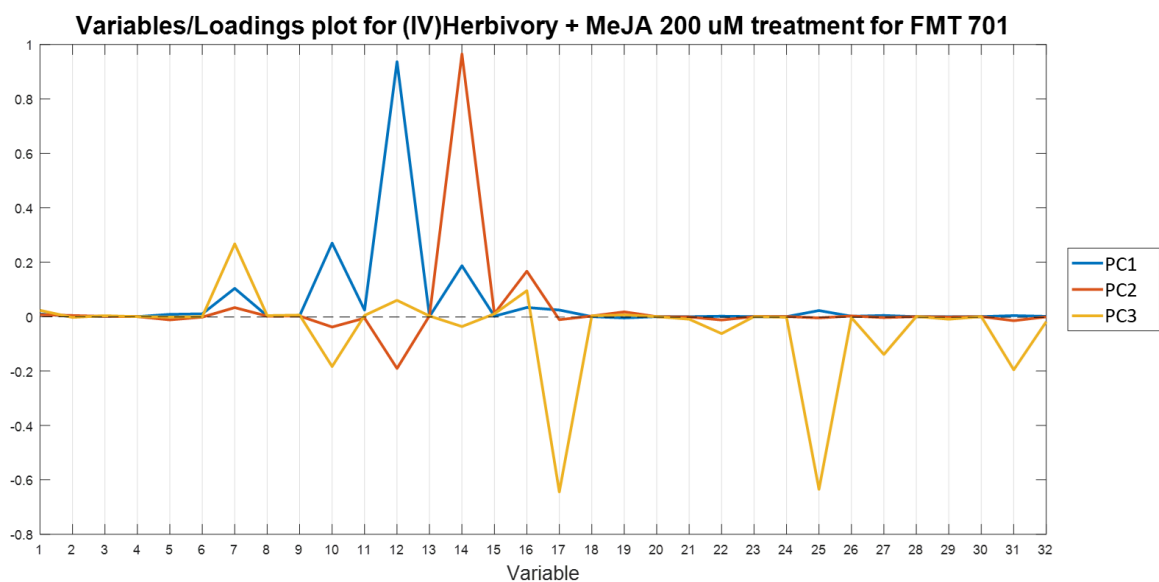


FIGURA 4.55 - Gráfico de Loadings/Variáveis para o tratamento (IV) Herbivoria combinada com aplicação direta de MeJA 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ no solo para o genótipo FMT 701

Dessa forma, foram observadas diferenças significativas nos compostos: α -etil-furano (7), hexanal (10), (E)-2-Hexenal (12), α -pineno (14), β -pineno (16), β -mirceno (17), β -ocimeno (22), β -cariofileno (25), humuleno (27) e ylanglene (31). Em relação a PC1, temos que os compostos mais significativos para a separação são, do mais significativo ao menos: (E)-2-Hexenal (12), hexanal (10), α -pineno (14), β -mirceno (17), α -etil-furano (7), β -cariofileno (25), β -pineno (16), humuleno (27) e ylanglene (31).

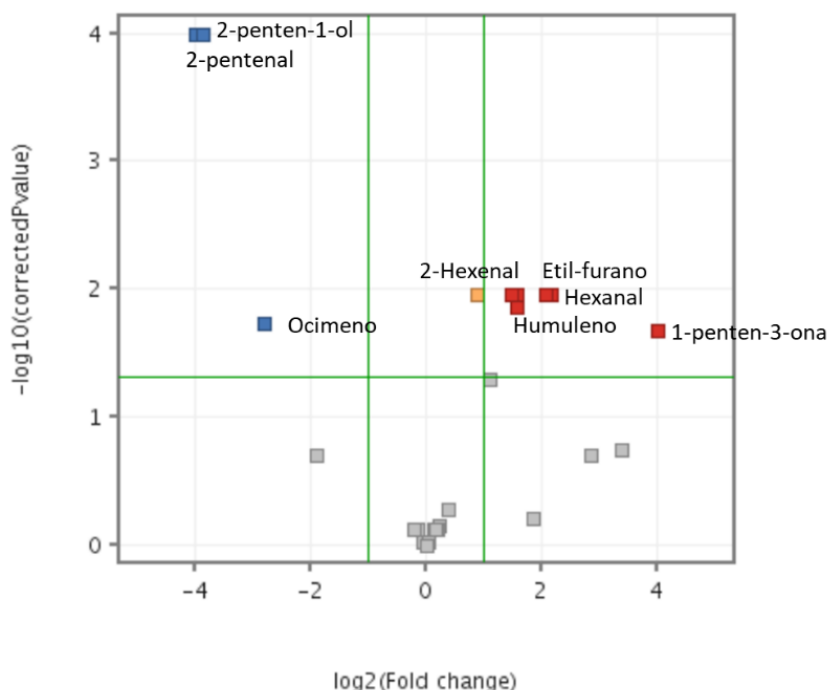


FIGURA 4.56 - *Volcano Plot* para as amostras controle *versus* Tratamento (IV) Herbivoria combinada com aplicação direta de MeJA 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ no solo para o genótipo FMT 701

A FIGURA 4.56 mostra a regulação metabólica dos compostos voláteis nas amostras induzidas por Herbivoria de *Spodoptera cosmioides* para o genótipo FMT 701. Pode-se observar, em azul, que os compostos 2-penten-1-ol, 2-pentenal, e β -ocimeno estão em menor concentração nas amostras induzidas (*down regulation*), enquanto que os compostos voláteis de folhas frescas, hexanal e 2-hexenal e o sesquiterpeno humuleno, por exemplo, se apresentam em maior concentração (*up regulation*).

Os resultados obtidos permitem concluir que para os genótipos Delta Opal, para o tratamento (I), e FMT 701, para os tratamentos (I), (IV) e (V) a resistência adquirida após a indução é principalmente atribuída à emissão dos compostos

voláteis de folhas frescas que iniciam a rota de defesa da planta, assim como descrito anteriormente^{99; 100; 106}. Por esse motivo, portanto, também são expressados compostos orgânicos voláteis mais complexos, como o cariofileno que já teve sua emissão relatada na literatura por HUANG¹⁰³ como resposta de defesa de plantas de algodão à herbivoria. PARÉ e TUMLINSON¹⁰⁷ também identificaram a síntese DE NOVO de diversos terpenóides identificados nesse trabalho, tais como: α -farneseno, β -farneseno e β -ocimeno, como resposta defensiva de plantas de algodão à herbivoria de *Spodoptera exigua* (Hübner).

[conceituar síntese de novo

Adicionalmente, a diminuição da concentração de β -ocimeno observada para o genótipo Delta Opal, no tratamento (I), e para o genótipo FMT 701 nos tratamentos (IV) e (V) pode estar relacionada à utilização desse composto na rota de biossíntese de heliocides, conforme proposto por OPITZ¹⁰⁸. Os heliocides são aldeídos terpenóides que possuem função biológica bem definidas e decisivas na defesa das plantas de algodão, principalmente para os genótipos resistentes. HARRISON e BECKMAN¹⁰⁹, por exemplo, demonstraram que genótipos resistentes à *Verticillium albo-atrum* possuíam em seus tecidos maiores concentrações de aldeídos terpenóides que contribuíram para uma resposta de defesa mais efetiva que os genótipos suscetíveis. Dessa forma, a ativação dessa rota de biossíntese implica diretamente no acúmulo de heliocides nos tecidos das plantas de algodão, tornando-as menos atrativas e mais resistentes a possíveis ataques de herbívoros ou patógenos.

4.5 EXPERIMENTO IV: RESISTÊNCIA INDUZIDA POR α -PINENO

A partir dos resultados obtidos nos experimentos anteriores, foi selecionado um composto, o α -pineno, para realizar a contra prova da proposta desse trabalho.

Os resultados para o índice de atratividade frente à *S. cosmioides* é mostrado na FIGURA 4.57. Observa-se que nos genótipos Delta Opal e FMT 701 não houve diferença quanto ao número médio de lagartas de *S. cosmioides* entre o tratamento com α -pineno e o controle ao longo do período de 30 min, 1, 3, 6, 12, 24 e 36 h após a liberação das lagartas, no ensaio do índice de atratividade.

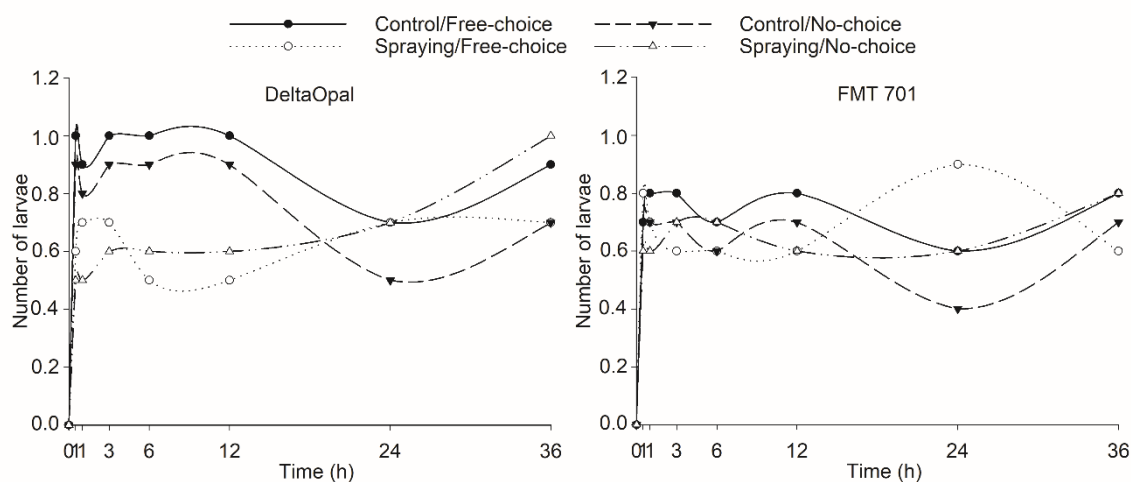


FIGURA 4.57 - Número médio de lagartas de *Spodoptera cosmioides* ao longo do tempo presente nos discos foliares de genótipos de algodão com pulverização de α -pineno, em testes com e sem chance de escolha.

No entanto, pelo índice de atratividade no genótipo Delta Opal com pulverização de α -pineno $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$ teve menor atratividade para as lagartas, tanto em teste com chance de escolha quanto em sem chance de escolha (FIGURA 4.58). Fato que não foi observado para FMT 701, em que o tratamento com α -pineno foi similar quanto a atratividade com o controle.

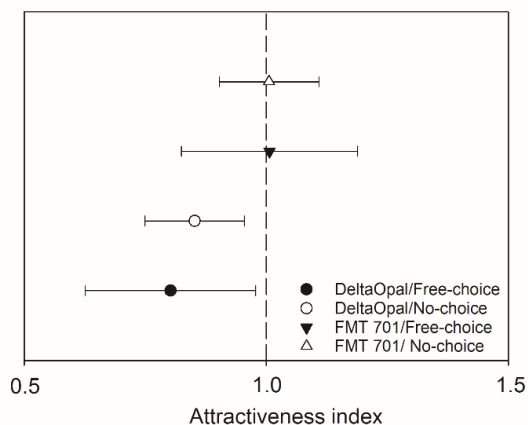


FIGURA 4.58 - Índice de atratividade de lagartas de *Spodoptera cosmioides* para genótipos de algodão com pulverização de α -pineno, em testes com e sem chance de escolha.

Entretanto, a menor atratividade não refletiu em menor área foliar consumida pelas lagartas nos tratamentos com aplicação de α -pineno no genótipo Delta Opal. Já para FMT 701 em teste com chance de escolha a aplicação de α -pineno resultou em redução de cerca 46,03% da área foliar consumida pelas lagartas em relação ao tratamento controle, porém o mesmo não foi observado em teste sem chance de escolha (FIGURA 4.59).

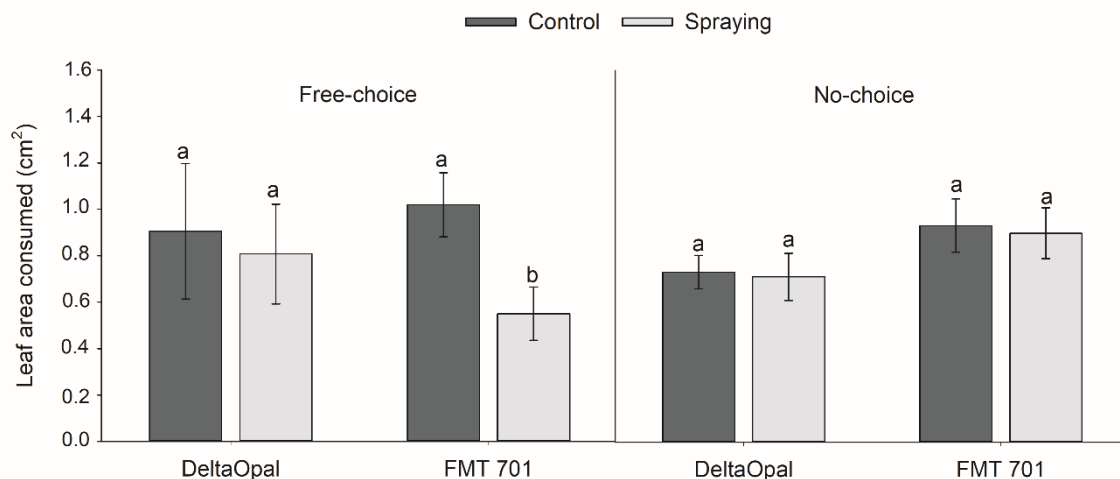


FIGURA 4.59 - Área foliar consumida (cm²) por lagartas de *Spodoptera cosmioides* em genótipos de algodão com pulverização de α -pineno, em testes com e sem chance de escolha.

Diante dos resultados observados verifica-se que a aplicação pode interferir na preferência alimentar de *S. cosmioides*, porém não se mostrou tão eficiente. A aplicação desse composto precisa ser melhor compreendida e estudada em vários aspectos como no que diz respeito ao genótipo de algodão a ser utilizado, a forma

de aplicação e, principalmente, na dose de aplicação. Isso é evidenciado pelo fato de que em Delta Opal a aplicação de α -pineno atuou repelindo as lagartas de *S. cosmioides*, uma vez que foi menos atrativo, porém não ocasiona deterrência, ou seja, não impediu a manutenção da alimentação do inseto. Entretanto, o oposto foi observado no genótipo FMT 701, uma vez que a aplicação não interferiu sobre a atratividade, mas foi verificado redução do consumo pelas lagartas.

5 CONCLUSÕES

Conclui-se que foi desenvolvido um método de extração e análise via HS-GC-MS eficiente para a análise do perfil químico qualitativo e quantitativo dos compostos voláteis de folhas de algodão de diferentes genótipos. Foram observadas diferenças no perfil químico metabolômico de compostos orgânicos voláteis nos experimentos de resistência constitutiva e induzida por fatores bióticos, herbivoria, e abióticos, adição de padrão e estresse hídrico.

As relações entre o perfil químico metabolômico de voláteis de plantas de algodão (*Gossypium hirsutum*) submetidas a diferentes estresses bióticos e abióticos foram investigadas com sucesso frente à herbivoria de *Spodoptera cosmioides* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae). No experimento I, foi possível classificar os genótipos FM 910, BRS 368RF, FM 993, FMT 701 e BRS 335 como resistentes à *S. cosmioides*, enquanto os genótipos BRS 372 e BRS 293 se apresentaram suscetíveis. Verificou-se que os compostos α -pineno, β -pineno, mirceno, cariofileno, limoneno, β -ocimeno e β -bisabolol, por exemplo, estão relacionados com a resposta biológica de *S. cosmioides*, ou seja, a resistências dos genótipos foi atribuída a presença desses compostos.

Em contrapartida, no experimento II, foram observadas diferenças nos perfis metabolômicos de todos os genótipos induzidos por herbivoria, apesar de apenas os genótipos BRS 286, BRS 293, BRS 335, BRS 336, FMT 709, FM 910 e FM 993 apresentarem resposta de repelência à *S. cosmioides* nos ensaios realizados. A indução de resistência nesses genótipos foi atribuída ao aumento da expressão dos compostos α -Pineno, β -Pineno, β -Mirceno, Limoneno, β -Ocimeno e cariofileno.

No experimento III, o cultivo de algodão foi realizado para dois genótipos, Delta Opal e FMT 701, em diferentes condições de estresses bióticos e abióticos sendo: solo (controle), administração do metil-jasmonato via aplicação foliar (pulverização); administração de metil-jasmonato via aplicação no solo; na presença de *S. cosmioides*; na presença de *S. cosmioides* e administração de metil-jasmonato via aplicação no solo, e sob estresse hídrico (escassez de água) em dois genótipos. Os resultados obtidos permitem concluir que para os genótipos Delta Opal, para o tratamento (I), e FMT 701, para os tratamentos (I), (IV) e (V) a resistência adquirida após a indução é principalmente atribuída à emissão dos compostos voláteis de folhas frescas que iniciam a rota de defesa da planta. A

casca de reações resulta na biossíntese DE NOVO de diversos terpenóides identificados nesse trabalho, tais como: α -farneseno, β -farneseno e β -ocimeno. Adicionalmente, diminuição da concentração de β -ocimeno observada para o genótipo Delta Opal, no tratamento (I), e para o genótipo FMT 701 nos tratamentos (IV) e (V) pode estar relacionada a utilização desse composto na rota de biossíntese de heliocides que diminuem a atratividade de *S. cosmioides* às plantas induzidas.

Contudo, o conhecimento dos mecanismos de defesa natural no controle de insetos praga para as plantas de algodão (*Gossypium hirsutum*) frente à herbivoria de *Spodoptera cosmioides* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae) foi consideravelmente ampliado. O presente trabalho traz informações sobre os perfis químicos dos genótipos comerciais e conhecidos na literatura que podem colaborar na definição de melhores estratégias de manejo integrado de pragas.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3ª. Artmed, 2006.

- 2 ERB, M.; MELDAU, S.; HOWE, G. A. Role of phytohormones in insect-specific plant reactions. **Trends Plant Sci**, v. 17, n. 5, p. 250-9, May 2012. ISSN 1878-4372 (Electronic)
1360-1385 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22305233> >.

- 3 AHUJA, I.; KISSEN, R.; BONES, A. M. Phytoalexins in defense against pathogens. **Trends Plant Sci**, v. 17, n. 2, p. 73-90, Feb 2012. ISSN 1878-4372 (Electronic)
1360-1385 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22209038> >.

- 4 KLOTH, K. J. et al. Association mapping of plant resistance to insects. **Trends Plant Sci**, v. 17, n. 5, p. 311-9, May 2012. ISSN 1878-4372 (Electronic)
1360-1385 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22322003> >.

- 5 KAFFARNIK, F. A. R. et al. Effector Proteins of the Bacterial Pathogen *Pseudomonas syringae* Alter the Extracellular Proteome of the Host Plant , *Arabidopsis thaliana**. **Molecular & Cellular Proteomics**, 2009.

- 6 TRETNER, C.; HUTH, U.; HAUSE, B. Mechanostimulation of *Medicago truncatula* leads to enhanced levels of jasmonic acid. **J Exp Bot**, v. 59, n. 10, p. 2847-56, 2008. ISSN 1460-2431 (Electronic)
0022-0957 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18540020> >.

- 7 CATAGIRI, F.; TSUDA, K. Understanding the Plant Immune System. **The Americal Phytopathological Society**, v. 23, n. 12, 2010.

- 8 CREELMAN, R. A.; MULLET, J. E. Jasmonic acid distribution and action in plants regulation during development and response to biotic and abiotic stress. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 92, n. 10, 1995.

- 9 FUJIMOTO, T. et al. Expression profile of jasmonic acid-induced genes and the induced resistance against the root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) in tomato plants (*Solanum lycopersicum*) after foliar treatment with methyl jasmonate. **J Plant Physiol**, v. 168, n. 10, p. 1084-97, Jul 1 2011. ISSN 1618-1328 (Electronic)
0176-1617 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21216026> >.

- 10 CREELMAN, R. A.; MULLET, J. E. Biosynthesis and action of Jasmonates in plants. **Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol**, v. 1, n. 48, 1997.

- 11 NAWROCKA, J.; MAŁOLEPSZA, U. Diversity in plant systemic resistance induced by Trichoderma. **Biological Control**, v. 67, n. 2, p. 149-156, 2013. ISSN 10499644.
- 12 ZENELI, G. et al. Methyl jasmonate treatment of mature Norway spruce (*Picea abies*) trees increases the accumulation of terpenoid resin components and protects against infection by *Ceratocystis polonica*, a bark beetle-associated fungus. **Tree Physiology**, v. 26, n. 8, p. 12, 2006.
- 13 KONAN, Y. K. F. et al. Effect of Methyl Jasmonate on Phytoalexins Biosynthesis and Induced Disease Resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *Vasinfestum* in Cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **International Journal of Agronomy**, v. 2014, p. 1-11, 2014. ISSN 1687-8159
1687-8167.
- 14 BOICA JUNIOR, A. L. et al. **Tópicos em Entomologia Agrícola VIII** Jaboticabal - SP: Maria de Lourdes Brandel ME, 2015.
- 15 **A defesa das plantas ao ataque dos insetos. Tópicos em Entomologia Agrícola VIII.** BUSOLI, A. C.; CASTILHO, R. C., et al. Jaboticabal: Jaboticabal : Maria de Lourdes Brandel - ME 2015.
- 16 STENBERG, J. A.; MUOLA, A. How Should Plant Resistance to Herbivores Be Measured? **Front Plant Sci**, v. 8, p. 663, 2017. ISSN 1664-462X (Print)
1664-462X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28491077> >.
- 17 VIANA, P. A.; POTENZA, M. R. AVALIAÇÃO DE ANTIBIOSE E NÃO-PREFERÊNCIA EM CULTIVARES DE MILHO SELECIONADOS COM RESISTÊNCIA À LAGARTA-DO-CARTUCHO. **Bragantia**, v. 59, n. 1, p. 27-33, 2000.
- 18 SMITH, C. M. **Plant Resistance to Arthropods - Molecular and Conventional Approaches**. Holanda: Springer, 2005.
- 19 NHAMUCHO, E. et al. Resistance of selected Mozambican local and improved maize genotypes to maize weevil, *Sitophilus zeamais* (Motschulsky). **Journal of Stored Products Research**, v. 73, p. 115-124, 2017. ISSN 0022474X.
- 20 TOSCANO, L. C.; BOIÇA-JR, A. L.; MARUYAMA, W. I. NONPREFERENCE OF WHITEFLY FOR OVIPOSITION IN TOMATO GENOTYPES. **Scientia Agricola**, v. 59, n. 4, p. 677-681, 2002.
- 21 EIGENBRODE, S. D. The effects of plant epicuticular waxy blooms on attachment and effectiveness of predatory insects. **Arthropod Structure & Development**, v. 33, n. 1, p. 91-102, 2004. ISSN 14678039.

- ²² MORAES, R. F. O. **Categorias e mecanismos de resistência de genótipos de couve a *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: noctuidae)**. 2014. 114 (Mestrado). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- ²³ CLAVIJO MCCORMICK, A.; UNSICKER, S. B.; GERSHENZON, J. The specificity of herbivore-induced plant volatiles in attracting herbivore enemies. **Trends Plant Sci**, v. 17, n. 5, p. 303-10, May 2012. ISSN 1878-4372 (Electronic)
1360-1385 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22503606> >.
- ²⁴ RAGHAVA, T. et al. Spatial and temporal volatile organic compound response of select tomato cultivars to herbivory and mechanical injury. **Plant Sci**, v. 179, n. 5, p. 520-6, Nov 2010. ISSN 1873-2259 (Electronic)
0168-9452 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21802610> >.
- ²⁵ PINTO-ZEVALLOS, D. M. et al. Compostos orgânicos voláteis na defesa induzida das plantas contra insetos herbívoros. **Química Nova**, v. 36, n. 9, p. 11, 2013.
- ²⁶ GONZALEZ, M. S. et al. Effects of essential oil from leaves of *Eugenia sulcata* on the development of agricultural pest insects. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, n. 4, p. 413-418, 2014. ISSN 0102695X.
- ²⁷ MATOS, L. F. et al. Chemical composition and insecticidal effect of essential oils from *Illicium verum* and *Eugenia caryophyllus* on *Callosobruchus maculatus* in cowpea. **Industrial Crops and Products**, v. 145, p. 112088, 2020. ISSN 09266690.
- ²⁸ MAGALHÃES, C. R. I. et al. Potencial inseticida de óleos essenciais sobre *Tribolium castaneum* em milho armazenado. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v. 17, n. 4, p. 1150-1158, 2015.
- ²⁹ BADREDDINE, B. S. et al. Chemical composition of *Rosmarinus* and *Lavandula* essential oils and their insecticidal effects on *Orgyia trigotephras* (Lepidoptera, Lymantriidae). **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 8, n. 2, p. 98-103, 2015. ISSN 19957645.
- ³⁰ ZABKA, M.; PAVELA, R.; SLEZAKOVA, L. Antifungal effect of *Pimenta dioica* essential oil against dangerous pathogenic and toxinogenic fungi. **Industrial Crops and Products**, v. 30, n. 2, p. 250-253, 2009. ISSN 09266690.
- ³¹ OLIVEIRA DE SOUZA, L. I. et al. The chemical composition and trypanocidal activity of volatile oils from Brazilian Caatinga plants. **Biomed Pharmacother**, v. 96, p. 1055-1064, Dec 2017. ISSN 1950-6007 (Electronic)
0753-3322 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29217159> >.

- 32 FAZOLIN, M. et al. PROPRIEDADE INSETICIDA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE Piper hispidinervum C. DC.; Piper aduncum L. e Tanaecium nocturnum (Barb. Rodr.) Bur. & K. Shum

SOBRE Tenebrio molitor L., 1758(1). **Ciênc. agrotec.**, v. 31, n. 1, p. 113-120, 2007.

- 33 CECHINEL-FILHO, V.; YUNES, R. A. ESTRATÉGIAS PARA A OBTENÇÃO DE COMPOSTOS FARMACOLOGICAMENTE ATIVOS A PARTIR DE PLANTAS MEDICINAIS. CONCEITOS SOBRE MODIFICAÇÃO ESTRUTURAL PARA OTIMIZAÇÃO DA ATIVIDADE. **Quim. Nova**, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.

- 34 DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products - A Biosynthetic Approach**. 3ª. Great Britain: John Wiley & Sons Ltd, 2009.

- 35 MAKSIMOVIC, S. et al. Separation of phytochemicals from Helichrysum italicum: An analysis of different isolation techniques and biological activity of prepared extracts. **Phytochemistry**, v. 138, p. 9-28, Jun 2017. ISSN 1873-3700 (Electronic)

0031-9422 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28336139> >.

- 36 WU, C. et al. A comparison of volatile fractions obtained from Lonicera macranthoides via different extraction processes: ultrasound, microwave, Soxhlet extraction, hydrodistillation, and cold maceration. **Integr Med Res**, v. 4, n. 3, p. 171-177, Sep 2015. ISSN 2213-4220 (Print)

2213-4220 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28664123> >.

- 37 KILLINY, N.; JONES, S. E. Profiling of volatile organic compounds released from individual intact juvenile and mature citrus leaves. **J Plant Physiol**, v. 208, p. 47-51, Jan 2017. ISSN 1618-1328 (Electronic)

0176-1617 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27889520> >.

- 38 STASHENKO, E. E.; JARAMILLO, B. E.; MARTINEZ, J. R. Analysis of volatile secondary metabolites from Colombian Xylopia aromatica (Lamarck) by different extraction and headspace methods and gas chromatography. **J Chromatogr A**, v. 1025, n. 1, p. 105-13, Jan 30 2004. ISSN 0021-9673 (Print)

0021-9673 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14753677> >.

- 39 RODRÍGUEZ-SOLANA, R. et al. Characterization of fennel extracts and quantification of estragole: Optimization and comparison of accelerated solvent extraction and Soxhlet techniques. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 528-536, 2014. ISSN 09266690.

- 40 PERES, V. F. et al. Comparison of soxhlet, ultrasound-assisted and pressurized liquid extraction of terpenes, fatty acids and Vitamin E from Piper gaudichaudianum Kunth. **J Chromatogr A**, v. 1105, n. 1-2, p. 115-8, Feb 10 2006. ISSN 0021-9673 (Print)

0021-9673 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16439256> >.

41 WANG, W. et al. Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine pesticides from soils: a comparison between Soxhlet extraction, microwave-assisted extraction and accelerated solvent extraction techniques. **Anal Chim Acta**, v. 602, n. 2, p. 211-22, Oct 29 2007. ISSN 1873-4324 (Electronic)

0003-2670 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17933606> >.

42 VIEIRA, P. G. et al. Quercus cerris extracts obtained by distinct separation methods and solvents: Total and friedelin extraction yields, and chemical similarity analysis by multidimensional scaling. **Separation and Purification Technology**, v. 232, p. 115924, 2020. ISSN 13835866.

43 VERMA, D. K.; SRIVASTAV, P. P. A paradigm of volatile aroma compounds in rice and their product with extraction and identification methods: A comprehensive review. **Food Research International**, v. 130, p. 108924, 2020. ISSN 09639969.

44 TAVEIRA, M. et al. Determination of eighty-one volatile organic compounds in dietary Rumex induratus leaves by GC/IT-MS, using different extractive techniques. **Microchemical Journal**, v. 93, n. 1, p. 67-72, 2009. ISSN 0026265X.

45 MESQUITA, P. R. R. et al. 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. ISSN 0026265X.

46 KOLB, B.; ETTRE, L. S. **Static Headspace-Gas Chromatography: Teory and Practice**. 2. New Jersey: John Wiley & Sons, INC., 2006. 349 ISBN 0-471-74944-3.

47 HARRIES, M. E.; BRUNO, T. J. **Headspace Analysis: Static** ☆. 2018.

48 DELAUNAY-BERTONCINI, N. et al. Analysis of low-molar-mass materials in commercial rubber samples by Soxhlet and headspace extractions followed by GC-MS analysis. **J Pharm Biomed Anal**, v. 35, n. 5, p. 1059-73, Sep 3 2004. ISSN 0731-7085 (Print)

0731-7085 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15336353> >.

49 ALVARADO, J. S.; ROSE, C. Static headspace analysis of volatile organic compounds in soil and vegetation samples for site characterization. **Talanta**, v. 62, n. 1, p. 17-23, 2004. ISSN 00399140.

50 PASTOR-BELDA, M. et al. Headspace sorptive extraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry for the determination of benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes in finger paints. **Microchemical Journal**, v. 145, p. 406-411, 2019. ISSN 0026265X.

⁵¹ TIAN, J. Determination of several flavours in beer with headspace sampling–gas chromatography. **Food Chemistry**, v. 123, n. 4, p. 1318-1321, 2010. ISSN 03088146.

⁵² FLISZAR, K. et al. Analysis of organic volatile impurities in pharmaceutical excipients by static headspace capillary gas chromatography. **J Chromatogr A**, v. 1027, n. 1-2, p. 83-91, Feb 20 2004. ISSN 0021-9673 (Print)

0021-9673 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14971487> >.

⁵³ DUTRA, C. et al. Determination of volatile organic compounds in recycled polyethylene terephthalate and high-density polyethylene by headspace solid phase microextraction gas chromatography mass spectrometry to evaluate the efficiency of recycling processes. **J Chromatogr A**, v. 1218, n. 10, p. 1319-30, Mar 11 2011. ISSN 1873-3778 (Electronic)

0021-9673 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21292271> >.

⁵⁴ PEREZ-JIMENEZ, M.; POZO-BAYON, M. A. Development of an in-mouth headspace sorptive extraction method (HSSE) for oral aroma monitoring and application to wines of different chemical composition. **Food Res Int**, v. 121, p. 97-107, Jul 2019. ISSN 1873-7145 (Electronic)

0963-9969 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31108831> >.

⁵⁵ COLZI, I. et al. Covering the different steps of the coffee processing: Can headspace VOC emissions be exploited to successfully distinguish between Arabica and Robusta? **Food Chem**, v. 237, p. 257-263, Dec 15 2017. ISSN 1873-7072 (Electronic)

0308-8146 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28763994> >.

⁵⁶ HU, W. et al. Characterization of volatile components in four vegetable oils by headspace two-dimensional comprehensive chromatography time-of-flight mass spectrometry. **Talanta**, v. 129, p. 629-35, Nov 2014. ISSN 1873-3573 (Electronic)

0039-9140 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25127643> >.

⁵⁷ ALIFERIS, K. A. et al. Botanical discrimination and classification of honey samples applying gas chromatography/mass spectrometry fingerprinting of headspace volatile compounds. **Food Chemistry**, v. 121, n. 3, p. 856-862, 2010. ISSN 03088146.

⁵⁸ SORIA, A. C.; GARCÍA-SARRIÓ, M. J.; SANZ, M. L. Volatile sampling by headspace techniques. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 85-99, 2015. ISSN 01659936.

⁵⁹ PEREIRA-FILHO, E. R. **Planejamento fatorial em química: maximizando a obtenção de resultados**. São Carlos, SP: EdUFSCar, 2017. 88 ISBN 978-85-7600-397-7.

- 60 LUNDSTEDT, T. et al. Experimental design and optimization. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems** v. 42 p. 3–40, 1998.
- 61 LEARDI, R. Experimental design in chemistry: A tutorial. **Anal Chim Acta**, v. 652, n. 1-2, p. 161-72, Oct 12 2009. ISSN 1873-4324 (Electronic)
- 0003-2670 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19786177> >.
- 62 SILVA, J. A. et al. APLICAÇÃO DA METODOLOGIA DE PLANEJAMENTO FATORIAL E ANÁLISE DE SUPERFÍCIES DE RESPOSTA PARA OTIMIZAÇÃO DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA. **Quim. Nova**, v. 31, n. 5, p. 1073-1077, 2008.
- 63 STOLZBERG, R. J. Fractional Factorial Design for the Identification of Important Instrumental Factors Affecting the Quality of Gas Chromatographic Separation of Whiskey Volatiles. **Chem. Educator** v. 6, p. 291–294, 2001.
- 64 FERREIRA, S. L. C. et al. Application of Multivariate Techniques in Optimization of Spectroanalytical Methods. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 42, p. 475-491, 2007.
- 65 LYRA, W. S. et al. CLASSIFICAÇÃO PERIÓDICA: UM EXEMPLO DIDÁTICO PARA ENSINAR ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS. **Quim. Nova**, v. 33, n. 7, p. 1594-1597, 2010.
- 66 SOUZA SILVA, E. A. et al. Development of a HS-SPME-GC/MS protocol assisted by chemometric tools to study herbivore-induced volatiles in *Myrcia splendens*. **Talanta**, v. 175, p. 9-20, Dec 1 2017. ISSN 1873-3573 (Electronic)
- 0039-9140 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28842040> >.
- 67 BRERETON, R. G. **Applied Chemometrics for Scientists**. England: John Wiley & Sons Ltd, 2007.
- 68 BEEBE, K. R.; PELL, R. J.; SEASHOLTZ, M. B. **Chemometrics: A Practical Guide**. 1ª ed. New York: Wiley Interscience Publication, 1998.
- 69 BRERETON, R. G. **Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant**. England: John Wiley & Sons, Ltd., 2003.
- 70 BROWN, S. D.; TAULER, R.; WALCZAK, B. **Comprehensive Chemometrics: Chemical and Biochemical Data Analysis**. Elsevier B.V., 2009.
- 71 SOUZA, A. M.; POPPI, R. J. EXPERIMENTO DIDÁTICO DE QUIMIOMETRIA PARA ANÁLISE EXPLORATÓRIA DE ÓLEOS VEGETAIS COMESTÍVEIS POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO MÉDIO E ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS: UM TUTORIAL, PARTE I. **Quim. Nova**, v. 35, n. 1, p. 223-229, 2012.

- 72 MALDINI, M. et al. A new approach to discriminate *Rosmarinus officinalis* L. plants with antioxidant activity, based on HPTLC fingerprint and targeted phenolic analysis combined with PCA. **Industrial Crops and Products**, v. 94, p. 665-672, 2016. ISSN 09266690.
- 73 LI, M. et al. Development of a flavor fingerprint by HS-GC-IMS with PCA for volatile compounds of *Tricholoma matsutake* Singer. **Food Chem**, v. 290, p. 32-39, Aug 30 2019. ISSN 1873-7072 (Electronic)
- 0308-8146 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31000053> >.
- 74 BELTRÃO, N. E. M. et al. Ecofisiologia do Algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L. r. *latifolium* Hutch.). In: (Ed.). **ECOFISIOLOGIA DAS CULTURAS ALGODÃO, AMENDOIM, GERGELIM, MAMONA, PINHÃO-MANSO E SISAL**. 1: Brasília-DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2011. p.65-124.
- 75 BELTRÃO, N. E. D. M.; DE AZEVEDO, D. M. P. **O Agronegócio Do Algodão No Brasil**. 2a. Brasília: 2008.
- 76 COSTA S., B. M. G. **A Saga Do Algodão: Das Primeiras Lavouras À Ação Na OMC**. . Rio de Janeiro: Insight Engenharia, 2004.
- 77 RUBIO, N. **Cotton and Products Update**. (USDA/FAS), U. S. D. O. A. F. A. S. Brasília 2017.
- 78 ARAUJO, A. E. et al. **Cultura do Algodão no Cerrado**. ARAUJO, A. E. e SOFIATTI, V. Embrapa Algodão, Sistema de Produção, 2: Embrapa Algodão: 143 p. 2017.
- 79 BELTRÃO, N. E. M. et al. **Cultura do Algodão Herbáceo na Agricultura Familiar**. SOFIATTI, V. Embrapa Algodão, Sistema de Produção: Embrapa Algodão: 56 p. 2014.
- 80 SILVA, D. M. et al. **Aspectos biológicos de *Spodoptera cosmioides* Walk. (Lepidoptera: Noctuidae) em diferentes plantas hospedeiras**. VI Jornada Acadêmica da Embrapa Soja: Embrapa Soja. Documentos, 328: 42-46 p. 2011.
- 81 BAVARESCO, A. et al. Biologia e Exigências Térmicas de *Spodoptera cosmioides* (Walk.) (Lepidoptera: Noctuidae). **Neotropical Entomology** v. 31, n. 1, p. 6, 2002.
- 82 BOIÇA JÚNIOR, A. L. et al. Determinação dos tipos de resistência a *Spodoptera cosmioides* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae) em genótipos de soja. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 36, n. 2, p. 607, 2015. ISSN 1679-0359

1676-546X.

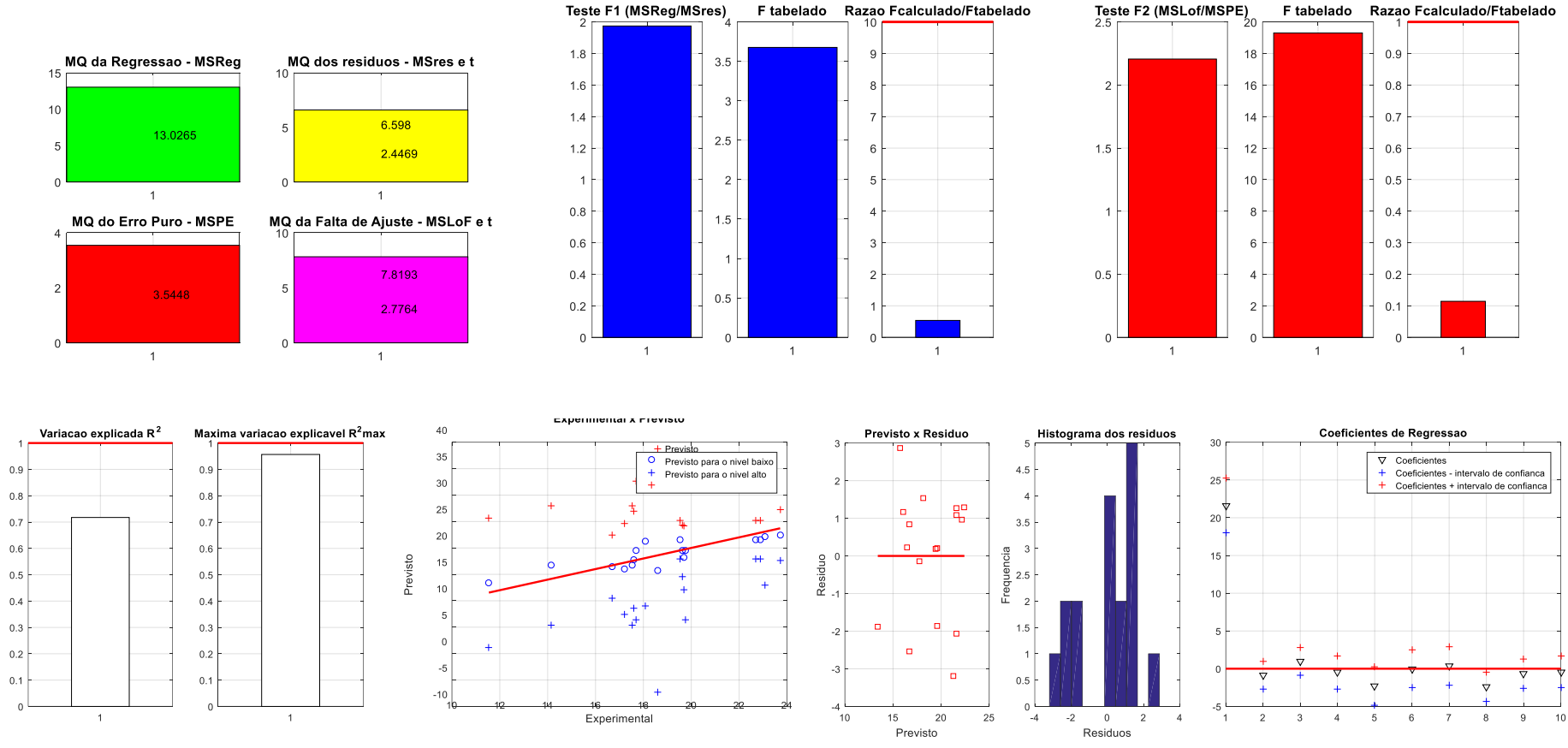
- 83 MIRANDA, J. E. et al. **Guia de Identificação de Pragas do Algodoeiro**. EMBRAPA ALGODÃO, D. Campina Grande, PB: EMBRAPA Algodão 2015.
- 84 DE FREITAS, C. A. **METODOLOGIA DE PESQUISA E RESISTÊNCIA CONSTITUTIVA DE GENÓTIPOS DE ALGODÃO A *Spodoptera cosmioides* (WALKER) E *Chloridea virescens* (FABRICIUS) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)**. 2019. 98 (Doutorado). Departamento de Fitossanidade, FCAV - UNESP, Jaboticabal.
- 85 BOICA JUNIOR, A. L. et al. Resistência de variedades de algodão ao curuquerê do algodoeiro Alabama argillacea Hubner (Lepidoptera: Noctuidae). **Rev. Ceres**, v. 59, n. 1, p. 48-55, 2012.
- 86 JESUS, F. G. et al. Resistance of cotton varieties to *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Revista Colombiana de Entomología**, v. 40, n. 2, p. 158-163, 2014.
- 87 FUNICHELLO, M. et al. Transgenic and non-transgenic cotton cultivars on the development and survival of *Pseudoplusia includens* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae). **Afr. J. Agric. Res.**, v. 8, n. 44, p. 5424-5428, 2013.
- 88 KOGAN, M.; GOEDEN, R. D. The Host-Plant Range of *Lema trilineata daturaphila* (Coleoptera: Chrysomelidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 63, n. 4, p. 6, 1970.
- 89 PEREIRA, F.; PEREIRA-FILHO, E. Aplicação De Programa Computacional Livre Em Planejamento De Experimentos: Um Tutorial. **Química Nova**, v. 2018, 2018. ISSN 01004042.
- 90 **Bioanalytical Method Validation - Guidance for Industry**. ADMINISTRATION, F. A. D.: Food and Drug Administration: 44 p. 2018.
- 91 BABUSHOK, V. I.; LINSTROM, P. J.; ZENKEVICH, I. G. Retention Indices for Frequently Reported Compounds of Plant Essential Oils. **The Journal of Physical Chemistry** v. 40, n. 4, p. 47, 2011.
- 92 BOICA JUNIOR, A. L. et al. Factors Influencing Expression of Antixenosis in Soybean to *Anticarsia gemmatilis* and *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **J Econ Entomol**, v. 108, n. 1, p. 317-25, Feb 2015. ISSN 0022-0493 (Print)
0022-0493 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26470136> >.
- 93 ELZEN, G. W. et al. Quantification of Volatile Terpenes of Glanded and Glandless *Gossypium hirsutum* L. Cultivars and Lines by Gas Chromatography. **J. Agric. Food Chem.**, v. 33, n. 6, p. 1079-1082, 1985.

- ⁹⁴ YANG, C. Q. et al. Isolation and characterization of terpene synthases in cotton (*Gossypium hirsutum*). **Phytochemistry**, v. 96, p. 46-56, Dec 2013. ISSN 1873-3700 (Electronic)
0031-9422 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24074555> >.
- ⁹⁵ RODRIGUEZ-SAONA, C. et al. Exogenous methyl jasmonate induces volatile emissions in cotton plants **Journal of Chemical Ecology**, v. 27, n. 4, 2001.
- ⁹⁶ RODRIGUEZ-SAONA, C.; CRAFTS-BRANDNER, S. J.; CANAS, L. A. Volatile emissions triggered by multiple herbivore damage: beet armyworm and whitefly feeding on cotton plants. **Journal of Chemical Ecology**, v. 29, n. 11, p. 12, 2003.
- ⁹⁷ HAGENBUCHER, S. et al. Constitutive and induced insect resistance in RNAi-mediated ultra-low gossypol cottonseed cotton. **BMC Plant Biol**, v. 19, n. 1, p. 1-10, Jul 18 2019. ISSN 1471-2229 (Electronic)
1471-2229 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31319793> >.
- ⁹⁸ SILVA, J. B. et al. Interaction of *Anthonomus grandis* and cotton genotypes: biological and behavioral responses. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 156, n. 3, p. 238-253, 2015. ISSN 00138703.
- ⁹⁹ SCALA, A. et al. Green leaf volatiles: a plant's multifunctional weapon against herbivores and pathogens. **Int J Mol Sci**, v. 14, n. 9, p. 17781-811, Aug 30 2013. ISSN 1422-0067 (Electronic)
1422-0067 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23999587> >.
- ¹⁰⁰ UL HASSAN, M. N.; ZAINAL, Z.; ISMAIL, I. Green leaf volatiles: biosynthesis, biological functions and their applications in biotechnology. **Plant Biotechnol J**, v. 13, n. 6, p. 727-39, Aug 2015. ISSN 1467-7652 (Electronic)
1467-7644 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25865366> >.
- ¹⁰¹ DE FREITAS, C. A. et al. **Resistência induzida de cultivares de algodão a *Spodoptera cosmioides* (Walker, 1858) (Lepidoptera: Noctuidae)**. XXVII Congresso Brasileiro e X Congresso Latino-Americano de Entomologia - Saúde, Ambiente e Agricultura. Gramado - RS 2018.
- ¹⁰² HUANG, X. Z. et al. Dynamic transcriptome analysis and volatile profiling of *Gossypium hirsutum* in response to the cotton bollworm *Helicoverpa armigera*. **Sci Rep**, v. 5, p. 11867, Jul 7 2015. ISSN 2045-2322 (Electronic)
2045-2322 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26148847> >.

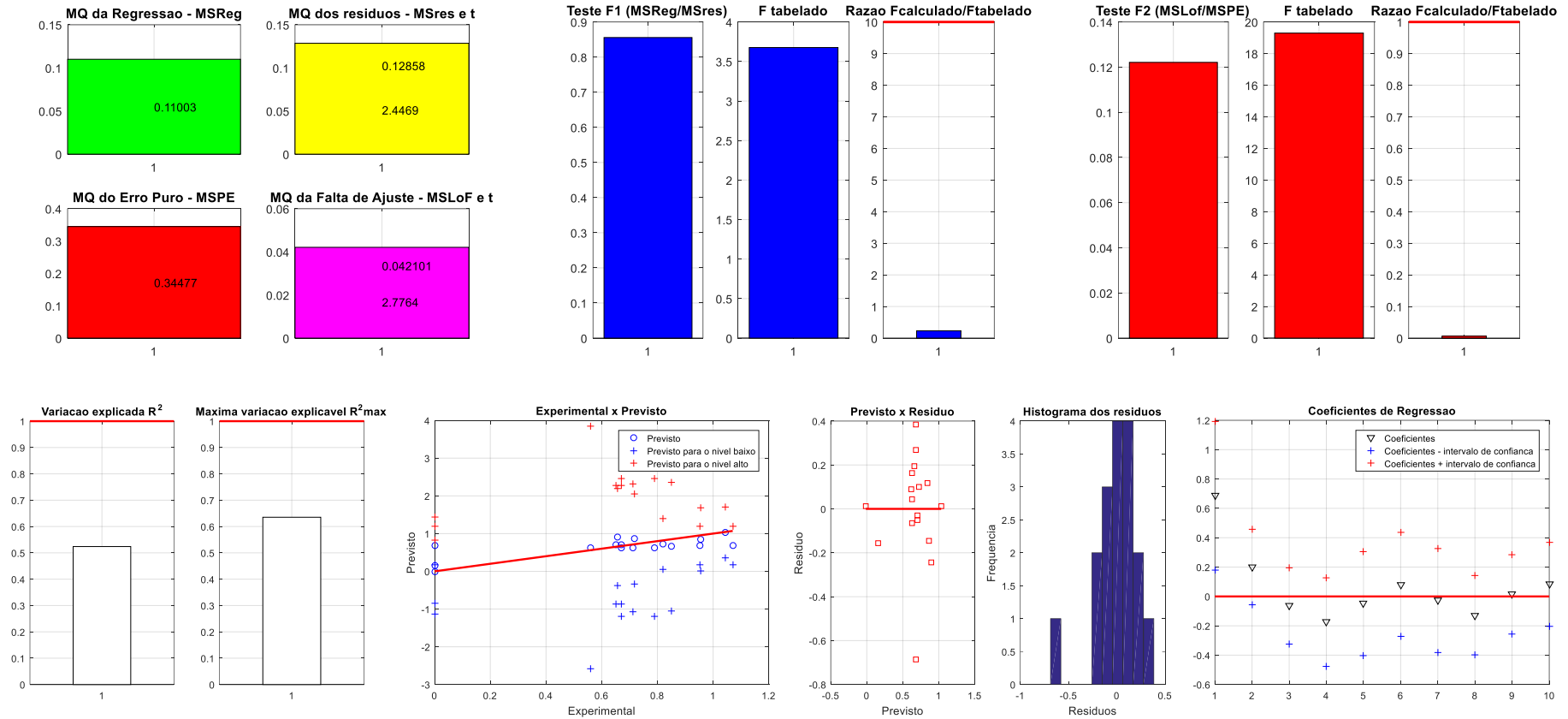
- ¹⁰³ HUANG, X. et al. Identification and characterization of (E)-beta-caryophyllene synthase and alpha/beta-pinene synthase potentially involved in constitutive and herbivore-induced terpene formation in cotton. **Plant Physiol Biochem**, v. 73, p. 302-8, Dec 2013. ISSN 1873-2690 (Electronic)
0981-9428 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24184450> >.
- ¹⁰⁴ LI, W. Volcano plots in analyzing differential expressions with mRNA microarrays. **J Bioinform Comput Biol**, v. 10, n. 6, p. 1231003, Dec 2012. ISSN 1757-6334 (Electronic)
0219-7200 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23075208> >.
- ¹⁰⁵ LI, W. et al. Using volcano plots and regularized-chi statistics in genetic association studies. **Comput Biol Chem**, v. 48, p. 77-83, Feb 2014. ISSN 1476-928X (Electronic)
1476-9271 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23602812> >.
- ¹⁰⁶ COPOLOVICI, L. et al. Volatile organic compound emissions from *Alnus glutinosa* under interacting drought and herbivory stresses. **Environ Exp Bot**, v. 100, p. 55-63, Apr 2014. ISSN 0098-8472 (Print)
0098-8472 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29367790> >.
- ¹⁰⁷ PARÉ, P. W.; TUMLINSON, J. H. De Novo Biosynthesis of Volatiles Induced by Insect Herbivory in Cotton Plants. **Plant Physiology**, v. 114, p. 7, 1997.
- ¹⁰⁸ OPITZ, S.; KUNERT, G.; GERSHENZON, J. Increased Terpenoid Accumulation in Cotton (*Gossypium hirsutum*) Foliage is a General Wound Response. **J Chem Ecol**, v. 34, p. 508-522, 2008.
- ¹⁰⁹ HARRISON, N. A.; BECKMAN, C. H. Time/space relationships of colonization and host response in wilt-resistant and wilt-susceptible cotton (*Gossypium*) cultivars inoculated with *Verticillium dahliae* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. **Physiological Plant Pathology** v. 21, p. 193-207, 1982

Área padronizada dos 11 sinais-respostas selecionados

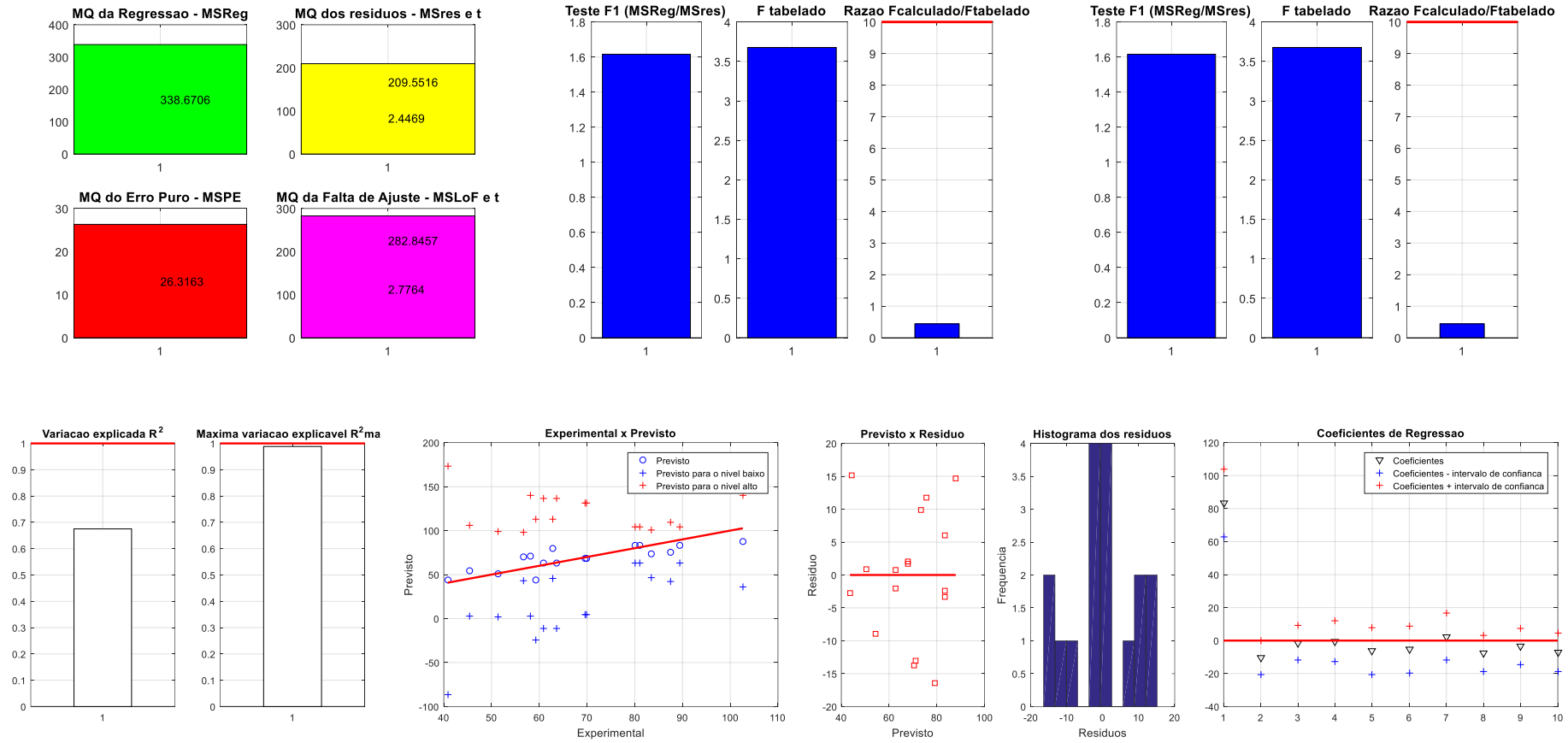
Experimentos	Respostas										
	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	R11
1	11,544	0,851	59,311	2,513	0,414	0,522	0,150	0,237	0,775	0,266	0,238
2	14,145	0,652	69,982	2,445	0,596	0,376	0,126	0,117	0,292	0,092	0,000
3	17,519	0,671	69,605	3,710	0,751	0,000	0,000	0,000	0,365	0,289	0,000
4	17,709	0,788	63,620	2,875	0,711	0,534	0,168	0,266	0,622	0,235	0,170
5	19,770	0,671	60,810	6,321	0,000	1,343	0,478	0,289	0,445	0,219	0,000
6	19,687	0,956	87,423	2,819	0,512	0,000	0,198	0,000	0,553	0,247	0,000
7	23,091	0,000	102,639	4,011	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
8	23,715	0,820	83,388	6,478	1,879	1,216	0,484	0,627	0,817	0,587	0,000
9	16,692	0,000	62,888	4,829	0,000	0,000	0,000	0,000	0,606	0,000	0,000
10	17,217	0,717	51,417	5,882	1,380	1,502	0,492	0,481	1,283	0,373	0,218
11	18,612	0,559	40,830	3,873	0,786	1,044	0,371	0,421	1,248	0,445	0,371
12	18,089	0,712	58,197	6,391	1,309	1,224	0,478	0,423	1,522	0,483	0,385
13	19,643	1,043	56,651	5,730	1,432	1,471	0,398	0,420	0,929	0,324	0,266
14	17,594	0,657	45,362	5,814	0,951	0,831	0,330	0,441	1,328	0,415	0,288
15	22,875	0,000	89,405	4,274	0,000	0,000	0,000	0,000	0,965	1,107	0,000
16	22,699	0,954	81,023	5,498	1,002	1,087	0,401	0,351	0,532	0,436	0,103
17	19,530	1,070	80,090	4,574	0,000	0,000	0,238	0,000	1,286	0,645	0,475



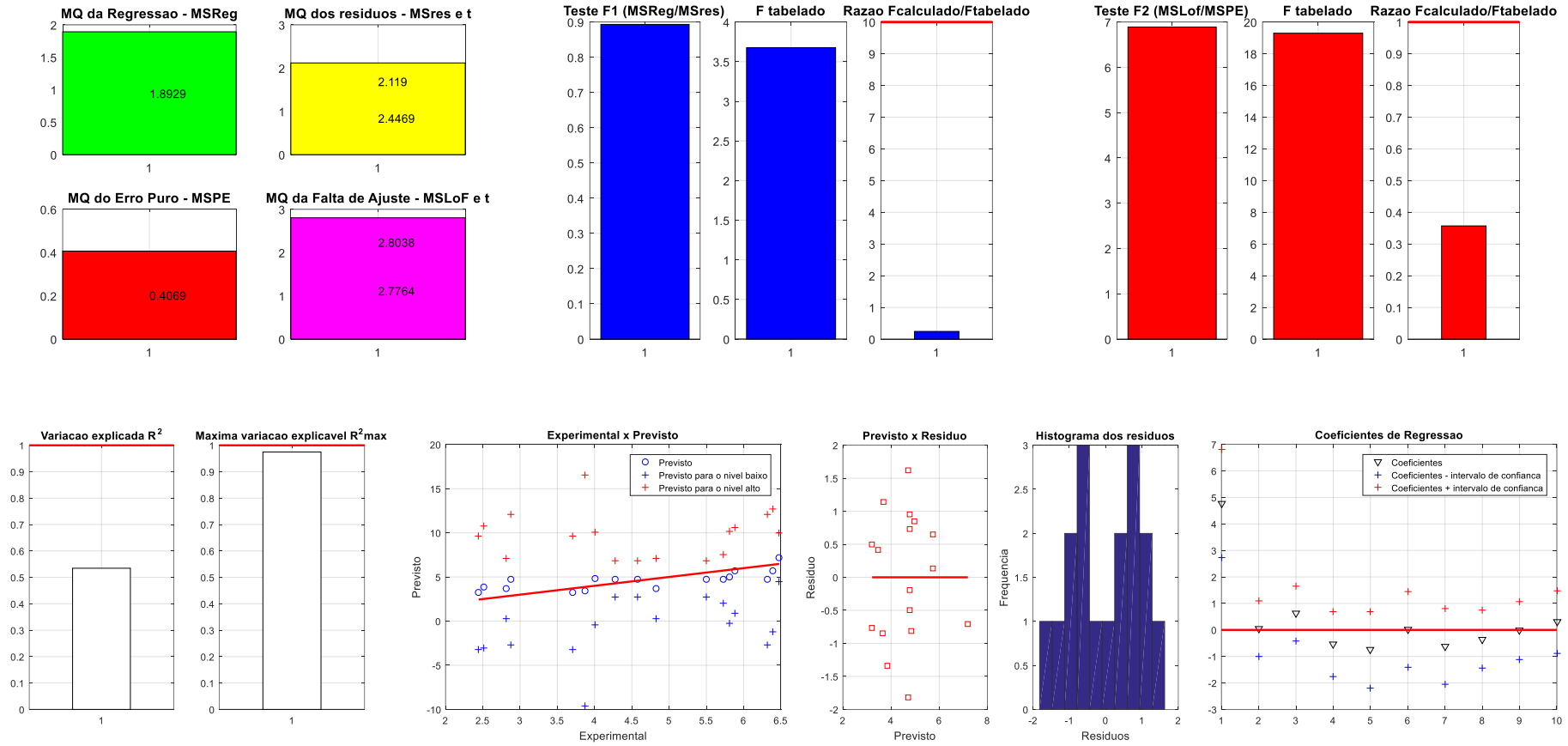
Resultados do planejamento fatorial obtidos através da rotina de cálculo *regression2* para a resposta R1



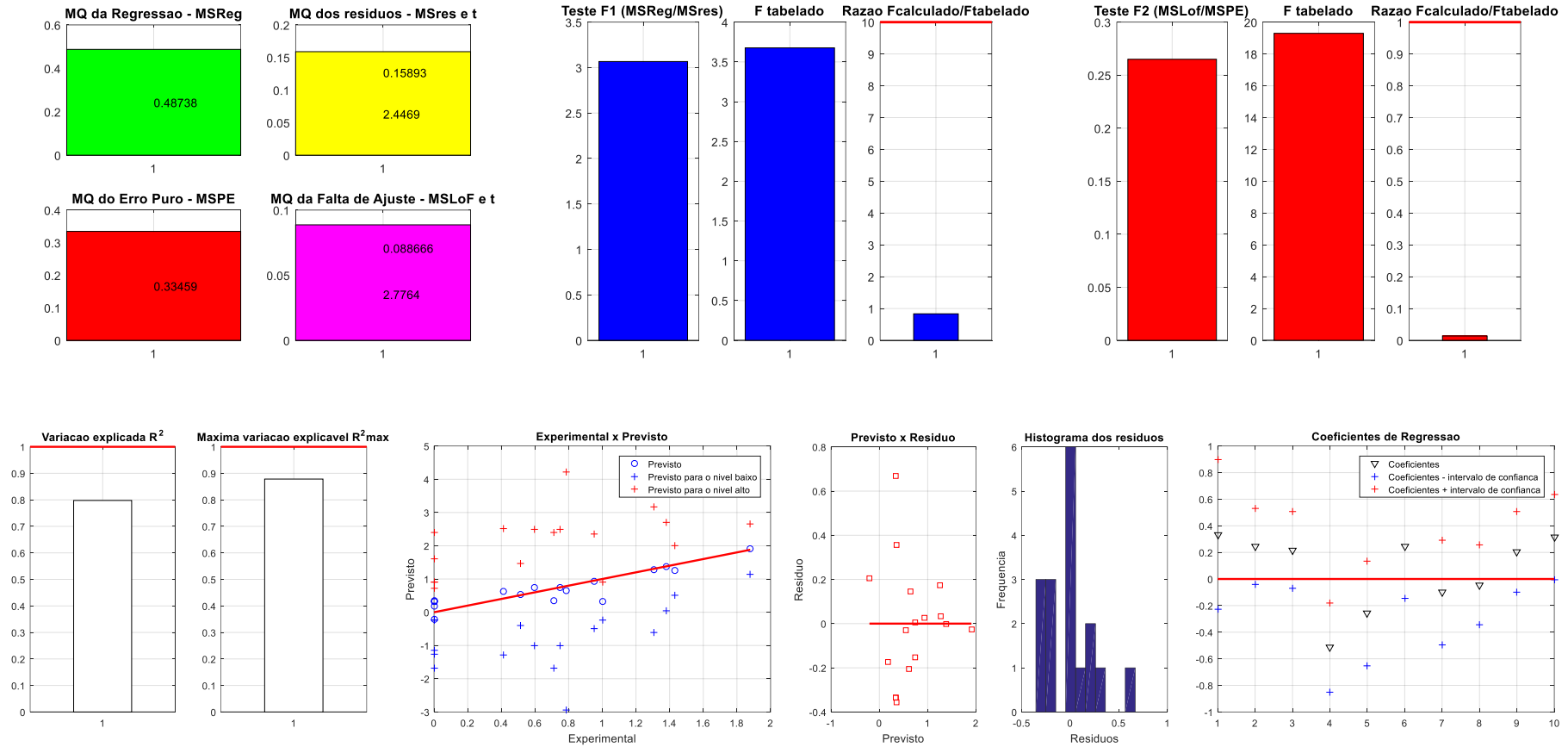
Resultados do planejamento fatorial obtidos através da rotina de cálculo *regression2* para a resposta R2



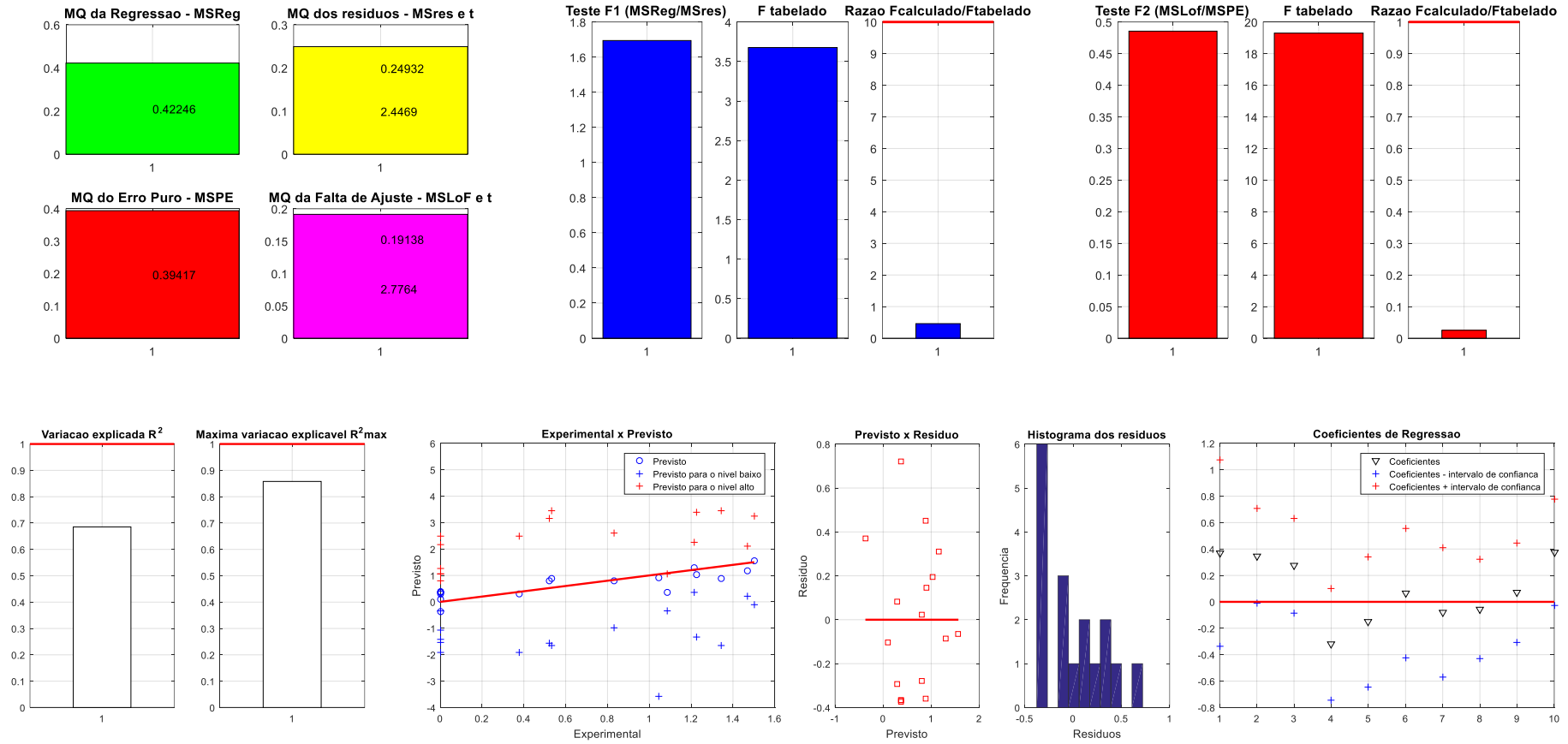
Resultados do planejamento fatorial obtidos através da rotina de cálculo *regression2* para a resposta R3



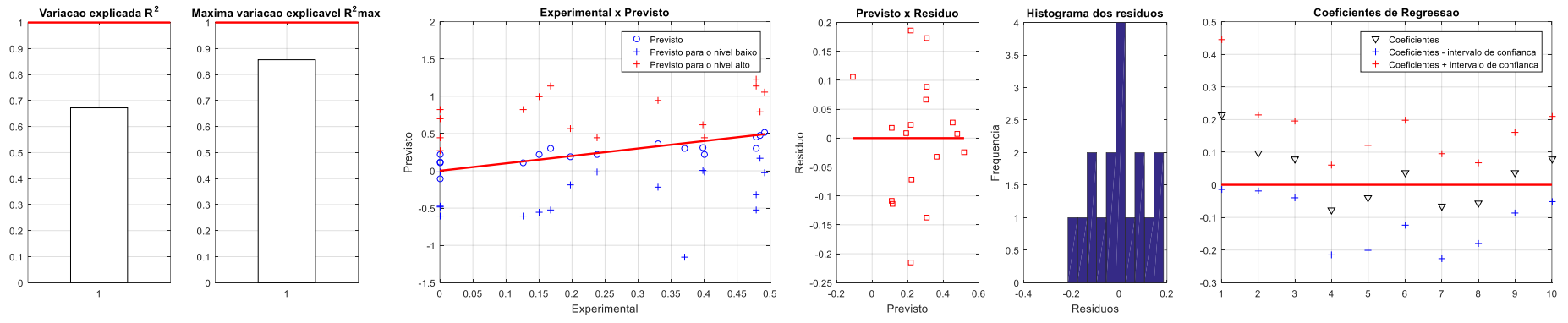
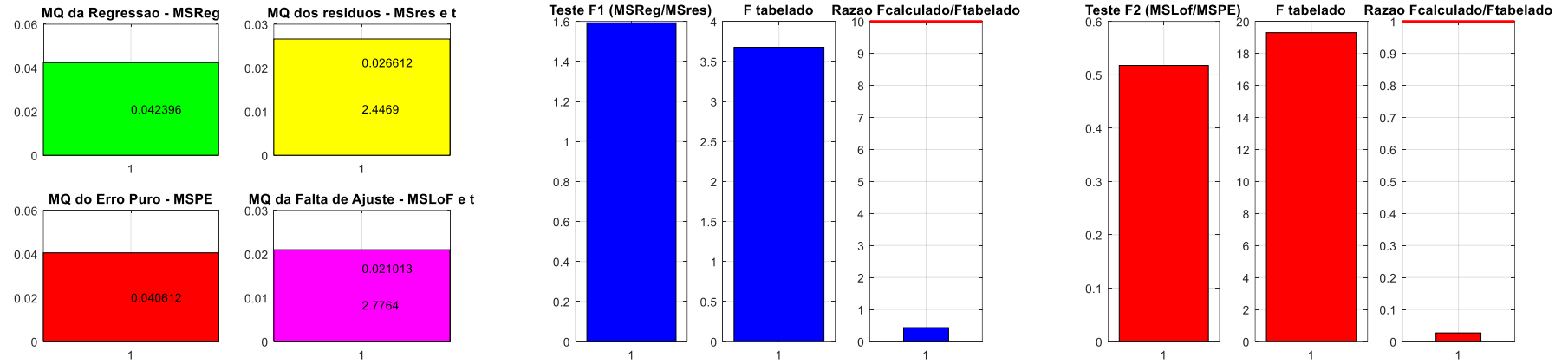
Resultados do planejamento fatorial obtidos através da rotina de cálculo *regression2* para a resposta R4



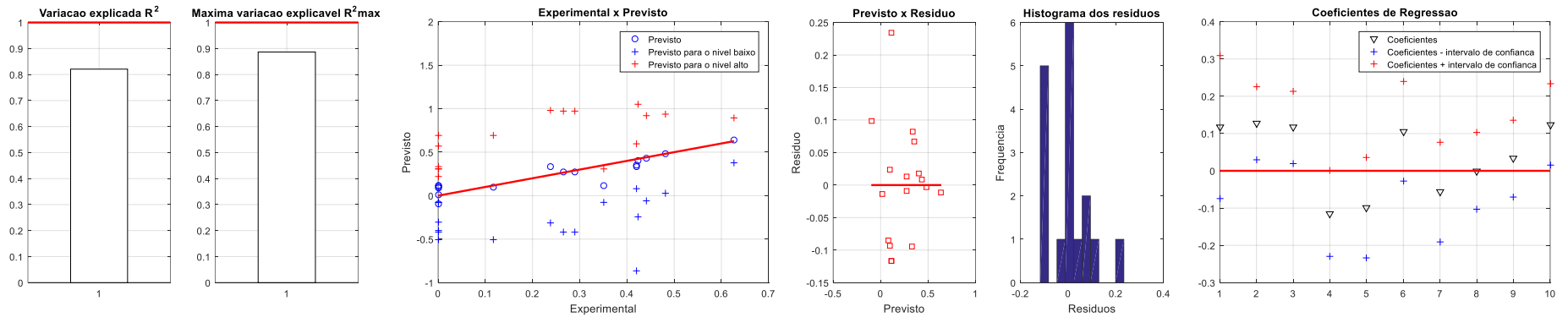
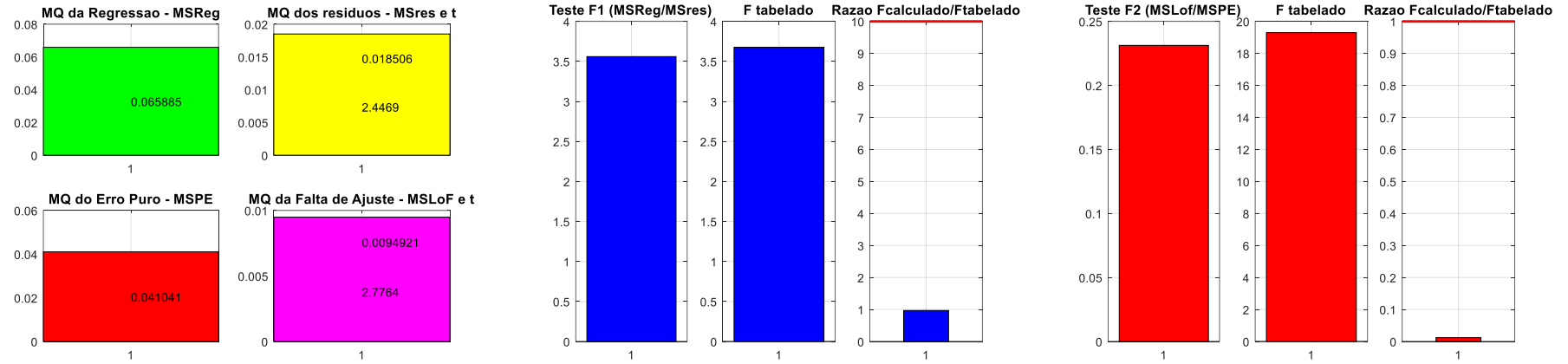
Resultados do planejamento fatorial obtidos através da rotina de cálculo *regression2* para a resposta R5



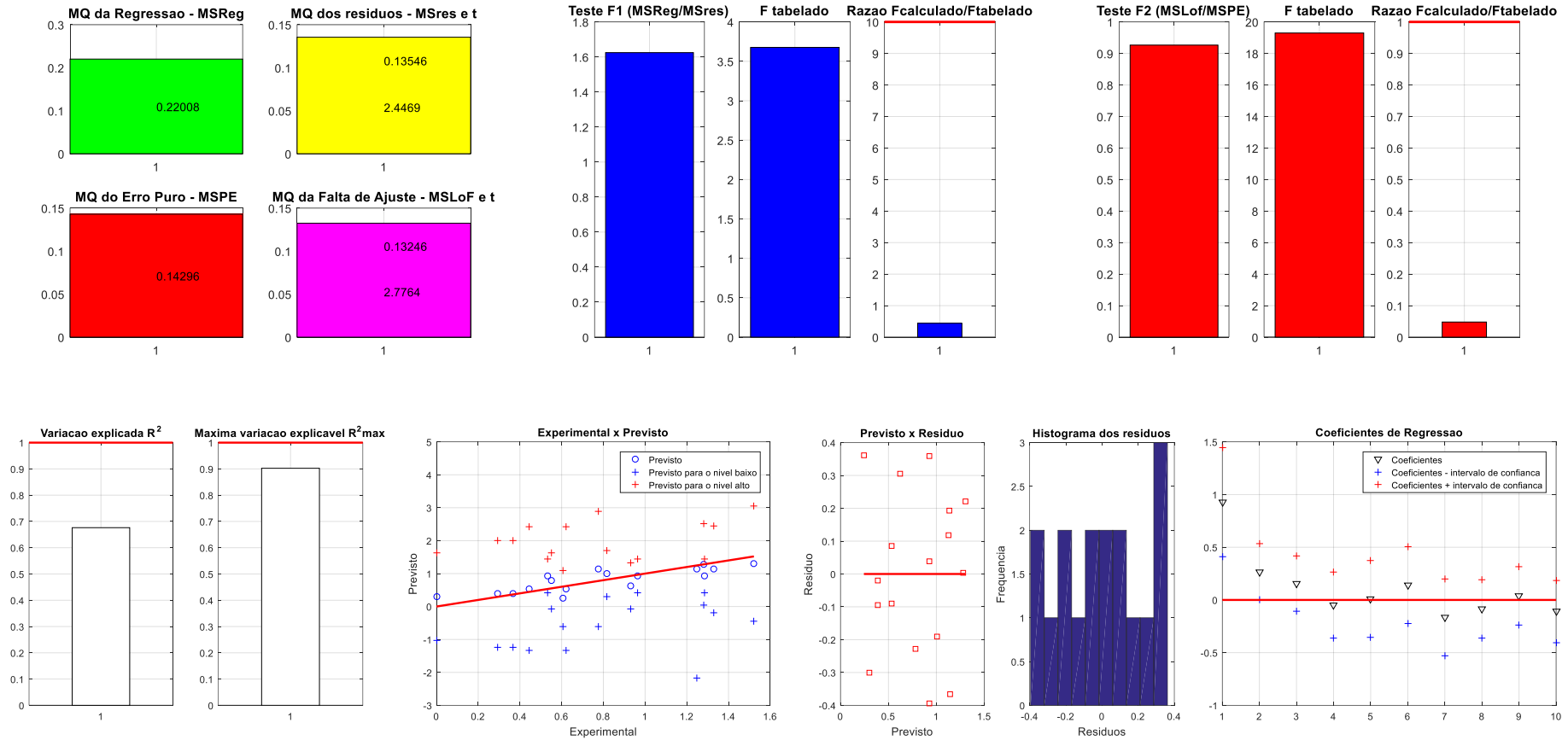
Resultados do planejamento fatorial obtidos através da rotina de cálculo *regression2* para a resposta R6



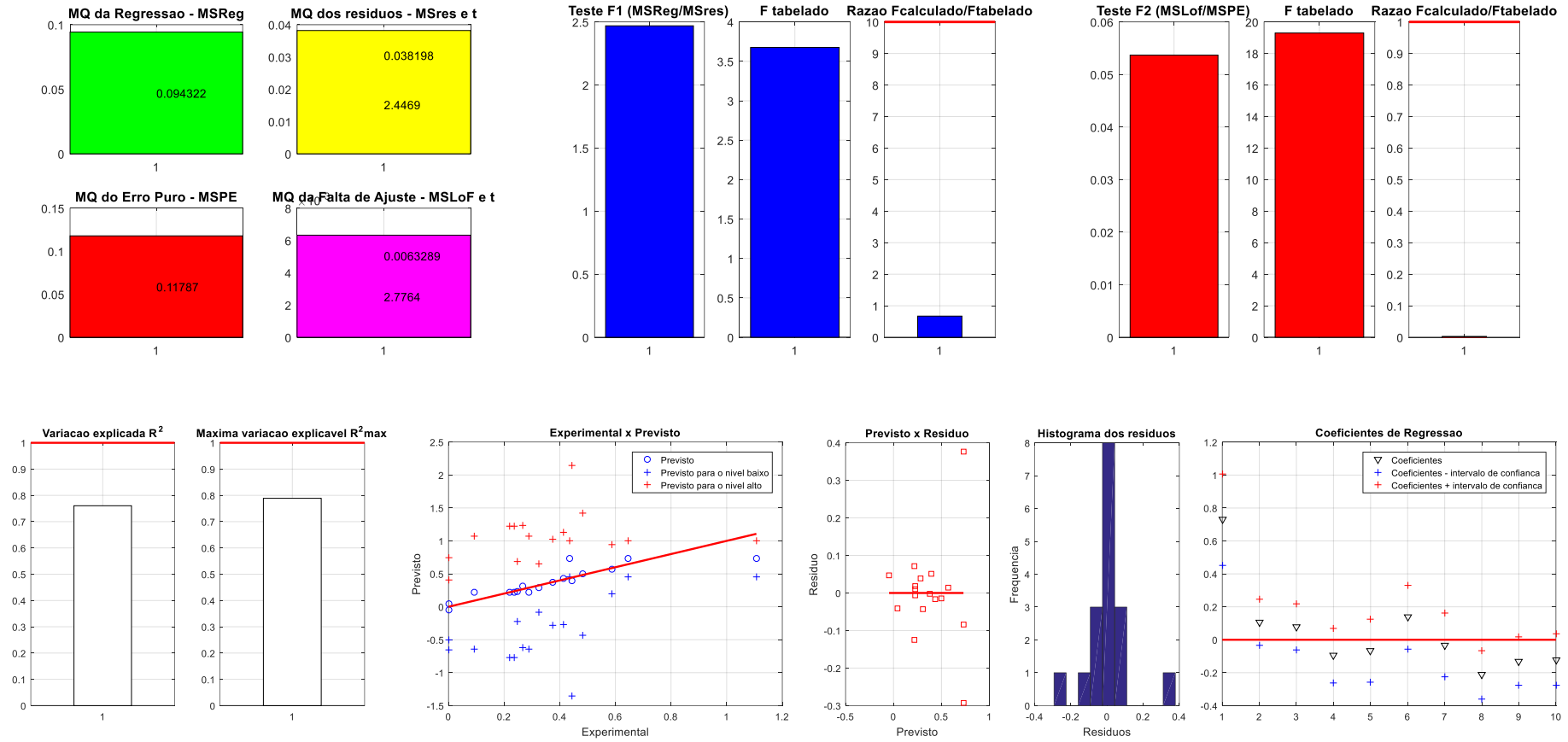
Resultados do planejamento fatorial obtidos através da rotina de cálculo *regression2* para a resposta R7



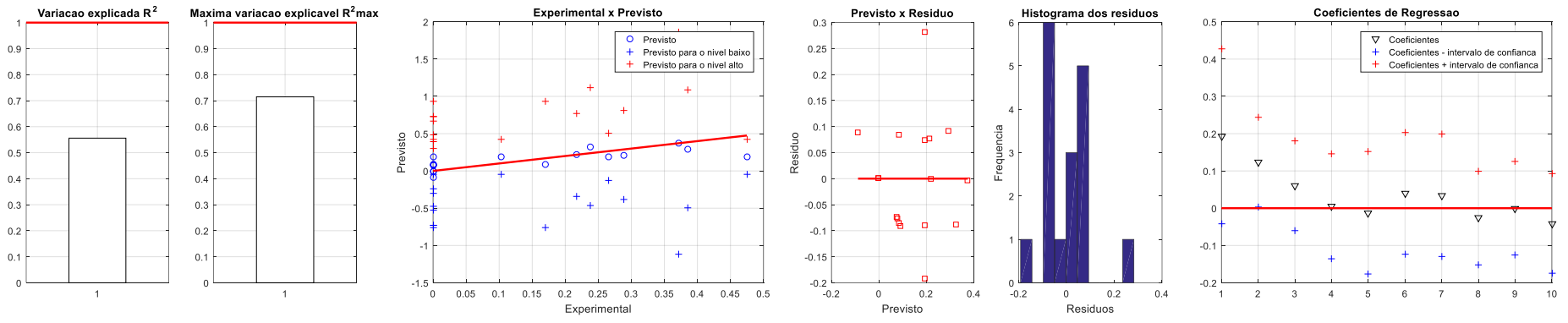
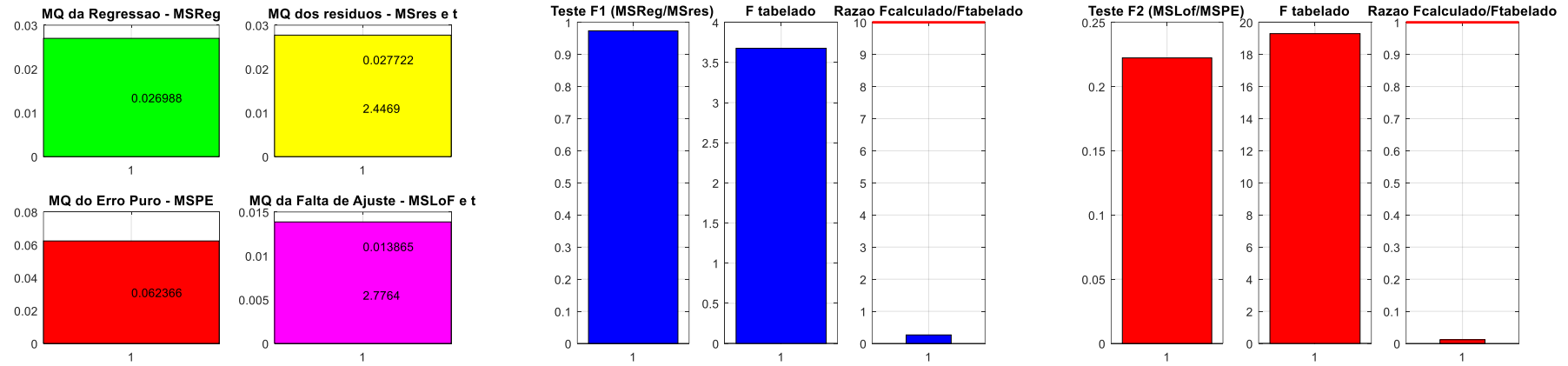
Resultados do planejamento fatorial obtidos através da rotina de cálculo *regression2* para a resposta R8



Resultados do planejamento fatorial obtidos através da rotina de cálculo *regression2* para a resposta R9



Resultados do planejamento fatorial obtidos através da rotina de cálculo *regression2* para a resposta R10



Resultados do planejamento fatorial obtidos através da rotina de cálculo *regression2* para a resposta R11

Tabela anova

R1	SQ	GL	MQ	F calculado	F tabelado	
SQR	0,990	9	0,110	0,856	3,677	Ftab<Fcal
SQres	0,900	7	0,129	0		
SQT	1,890	16	0,118	0		
SQEP	0,690	2	0,345	0,122	19,296	Ftab>Fcal
SQFAJ	0,211	5	0,042	0		
R²	0,524		0,724	0		
R²_{max}	0,635		0,797	0		

R2	SQ	GL	MQ	F calculado	F tabelado	
SQR	117,239	9	13,027	1,974	3,677	Ftab<Fcal
SQres	46,186	7	6,598	0		
SQT	163,425	16	10,214	0		
SQEP	7,090	2	3,545	2,206	19,296	Ftab>Fcal
SQFAJ	39,097	5	7,819	0		
R²	0,717	0,847	0	0		
R²_{max}	0,957	0,978	0	0		

R1	Coef	Int. Inf.	Int. Sup.	Int. Conf.	Conclusão
b0	21,604	17,979	25,228	3,624	significativo
b1	-0,906	-2,751	0,940	1,845	não signif.
b2	0,934	-0,911	2,779	1,845	não signif.
b3	-0,504	-2,677	1,670	2,173	não signif.
b12	-2,281	-4,815	0,253	2,534	não signif.
b13	-0,006	-2,534	2,523	2,529	não signif.
b23	0,351	-2,178	2,879	2,529	não signif.
b11	-2,361	-4,301	-0,420	1,940	significativo
b22	-0,671	-2,611	1,270	1,940	não signif.
b33	-0,423	-2,490	1,643	2,066	não signif.

R2	Coef	Int. Inf.	Int. Sup.	Int. Conf.	Conclusão
b0	0,687	0,181	1,193	0,506	significativo
b1	0,199	-0,058	0,457	0,258	não signif.
b2	-0,064	-0,322	0,193	0,258	não signif.
b3	-0,174	-0,478	0,129	0,303	não signif.
b12	-0,047	-0,401	0,306	0,354	não signif.
b13	0,081	-0,272	0,434	0,353	não signif.
b23	-0,027	-0,380	0,326	0,353	não signif.
b11	-0,129	-0,400	0,142	0,271	não signif.
b22	0,016	-0,255	0,286	0,271	não signif.
b33	0,082	-0,206	0,371	0,288	não signif.

R3	SQ	GL	MQ	F_{calculado}	F_{tabelado}	
SQR	3048,035	9	338,671	1,616	3,677	F _{tab} <F _{cal}
SQres	1466,861	7	209,552	0		
SQT	4514,896	16	282,181	0		
SQEP	52,633	2	26,316	10,748	19,296	F _{tab} >F _{cal}
SQFAJ	1414,228	5	282,846	0		
R²	0,675	0,822	0	0		
R²_{max}	0,988	0,994	0	0		

R3	Coef	Int. Inf.	Int. Sup.	Int. Conf.	Conclusão
b0	83,429	63,004	103,854	20,425	significativo
b1	-10,450	-20,849	-0,051	10,399	quase signif.
b2	-1,293	-11,692	9,106	10,399	não signif.
b3	-0,413	-12,661	11,834	12,248	não signif.
b12	-6,373	-20,654	7,907	14,281	não signif.
b13	-5,329	-19,580	8,922	14,251	não signif.
b23	2,306	-11,945	16,557	14,251	não signif.
b11	-7,681	-18,617	3,255	10,936	não signif.
b22	-3,532	-14,467	7,404	10,936	não signif.
b33	-7,040	-18,683	4,604	11,644	não signif.

R4	SQ	GL	MQ	F_{calculado}	F_{tabelado}	
SQR	17,036	9	1,893	0,893	3,677	F _{tab} <F _{cal}
SQres	14,833	7	2,119	0		
SQT	31,869	16	1,992	0		
SQEP	0,814	2	0,407	6,891	19,296	F _{tab} >F _{cal}
SQFAJ	14,019	5	2,804	0		
R²	0,535	0,731	0	0		
R²_{max}	0,974	0,987	0	0		

R4	Coef	Int. Inf.	Int. Sup.	Int. Conf.	Conclusão
b0	4,770	2,716	6,824	2,054	significativo
b1	0,048	-0,998	1,093	1,046	não signif.
b2	0,618	-0,428	1,664	1,046	não signif.
b3	-0,542	-1,773	0,690	1,232	não signif.
b12	-0,751	-2,187	0,685	1,436	não signif.
b13	0,019	-1,414	1,452	1,433	não signif.
b23	-0,618	-2,051	0,815	1,433	não signif.
b11	-0,355	-1,454	0,745	1,100	não signif.
b22	-0,024	-1,123	1,076	1,100	não signif.
b33	0,296	-0,875	1,467	1,171	não signif.

R5	SQ	GL	MQ	F calculado	F tabelado	
SQR	4,386	9	0,487	3,067	3,677	F _{tab} <F _{cal}
SQres	1,113	7	0,159	0		
SQT	5,499	16	0,344	0		
SQEP	0,669	2	0,335	0,265	19,296	F _{tab} >F _{cal}
SQFAJ	0,443	5	0,089	0		
R²	0,798	0,893	0	0		
R²_{max}	0,878	0,937	0	0		

R6	SQ	GL	MQ	F calculado	F tabelado	
SQR	3,802	9	0,422	1,694	3,677	F _{tab} <F _{cal}
SQres	1,745	7	0,249	0		
SQT	5,547	16	0,347	0		
SQEP	0,788	2	0,394	0,486	19,296	F _{tab} >F _{cal}
SQFAJ	0,957	5	0,191	0		
R²	0,685	0,828	0	0		
R²_{max}	0,858	0,926	0	0		

R5	Coef	Int. Inf.	Int. Sup.	Int. Conf.	Conclusão
b0	0,334	-0,228	0,897	0,562	não signif.
b1	0,245	-0,041	0,531	0,286	não signif.
b2	0,218	-0,068	0,505	0,286	não signif.
b3	-0,516	-0,853	-0,179	0,337	significativo
b12	-0,259	-0,652	0,134	0,393	não signif.
b13	0,248	-0,145	0,640	0,392	não signif.
b23	-0,102	-0,494	0,291	0,392	não signif.
b11	-0,045	-0,347	0,256	0,301	não signif.
b22	0,204	-0,097	0,505	0,301	não signif.
b33	0,314	-0,006	0,635	0,321	não signif.

R6	Coef	Int. Inf.	Int. Sup.	Int. Conf.	Conclusão
b0	0,368	-0,337	1,072	0,705	não signif.
b1	0,348	-0,011	0,706	0,359	não signif.
b2	0,275	-0,084	0,634	0,359	não signif.
b3	-0,320	-0,743	0,102	0,422	não signif.
b12	-0,151	-0,644	0,341	0,493	não signif.
b13	0,065	-0,426	0,557	0,492	não signif.
b23	-0,079	-0,570	0,413	0,492	não signif.
b11	-0,054	-0,431	0,323	0,377	não signif.
b22	0,070	-0,307	0,448	0,377	não signif.
b33	0,377	-0,025	0,778	0,402	não signif.

R7	SQ	GL	MQ	F calculado	F tabelado	
SQR	0,382	9	0,042	1,593	3,677	F _{tab} <F _{cal}
SQres	0,186	7	0,027	0		
SQT	0,568	16	0,035	0		
SQEP	0,081	2	0,041	0,517	19,296	F _{tab} >F _{cal}
SQFAJ	0,105	5	0,021	0		
R²	0,672	0,820	0	0		
R²_{max}	0,857	0,926	0	0		

R7	Coef	Int. Inf.	Int. Sup.	Int. Conf.	Conclusão
b0	0,215	-0,015	0,445	0,230	não signif.
b1	0,098	-0,020	0,215	0,117	não signif.
b2	0,078	-0,039	0,195	0,117	não signif.
b3	-0,078	-0,216	0,060	0,138	não signif.
b12	-0,040	-0,201	0,121	0,161	não signif.
b13	0,038	-0,123	0,198	0,161	não signif.
b23	-0,066	-0,227	0,095	0,161	não signif.
b11	-0,056	-0,179	0,068	0,123	não signif.
b22	0,037	-0,086	0,161	0,123	não signif.
b33	0,078	-0,053	0,210	0,131	não signif.

R8	SQ	GL	MQ	F calculado	F tabelado	
SQR	0,593	9	0,066	3,560	3,677	F _{tab} <F _{cal}
SQres	0,130	7	0,019	0		
SQT	0,723	16	0,045	0		
SQEP	0,082	2	0,041	0,231	19,296	F _{tab} >F _{cal}
SQFAJ	0,047	5	0,009	0		
R²	0,821	0,906	0	0		
R²_{max}	0,886	0,941	0	0		

R8	Coef	Int. Inf.	Int. Sup.	Int. Conf.	Conclusão
b0	0,117	-0,075	0,309	0,192	não signif.
b1	0,128	0,030	0,226	0,098	significativo
b2	0,116	0,019	0,214	0,098	significativo
b3	-0,114	-0,230	0,001	0,115	não signif.
b12	-0,099	-0,234	0,035	0,134	não signif.
b13	0,105	-0,028	0,239	0,134	não signif.
b23	-0,056	-0,190	0,077	0,134	não signif.
b11	0,000	-0,103	0,103	0,103	não signif.
b22	0,033	-0,070	0,135	0,103	não signif.
b33	0,124	0,015	0,234	0,109	significativo

R9	SQ	GL	MQ	F calculado	F tabelado	
SQR	1,981	9	0,220	1,625	3,677	Ftab<Fcal
SQres	0,948	7	0,135	0		
SQT	2,929	16	0,183	0		
SQEP	0,286	2	0,143	0,927	19,296	Ftab>Fcal
SQFAJ	0,662	5	0,132	0		
R ²	0,676	0,822	0	0		
R ² _{max}	0,902	0,950	0	0		

R10	SQ	GL	MQ	F calculado	F tabelado	
SQR	0,849	9	0,094	2,469	3,677	Ftab<Fcal
SQres	0,267	7	0,038	0		
SQT	1,116	16	0,070	0		
SQEP	0,236	2	0,118	0,054	19,296	Ftab>Fcal
SQFAJ	0,032	5	0,006	0		
R ²	0,760	0,872	0	0		
R ² _{max}	0,789	0,888	0	0		

R9	Coef	Int. Inf.	Int. Sup.	Int. Conf.	Conclusão
b0	0,927	0,408	1,447	0,519	não signif.
b1	0,267	0,003	0,532	0,264	não signif.
b2	0,155	-0,110	0,419	0,264	não signif.
b3	-0,050	-0,361	0,262	0,311	não signif.
b12	0,008	-0,355	0,371	0,363	não signif.
b13	0,140	-0,223	0,502	0,362	não signif.
b23	-0,164	-0,527	0,198	0,362	não signif.
b11	-0,083	-0,361	0,195	0,278	não signif.
b22	0,040	-0,238	0,318	0,278	não signif.
b33	-0,109	-0,405	0,187	0,296	não signif.

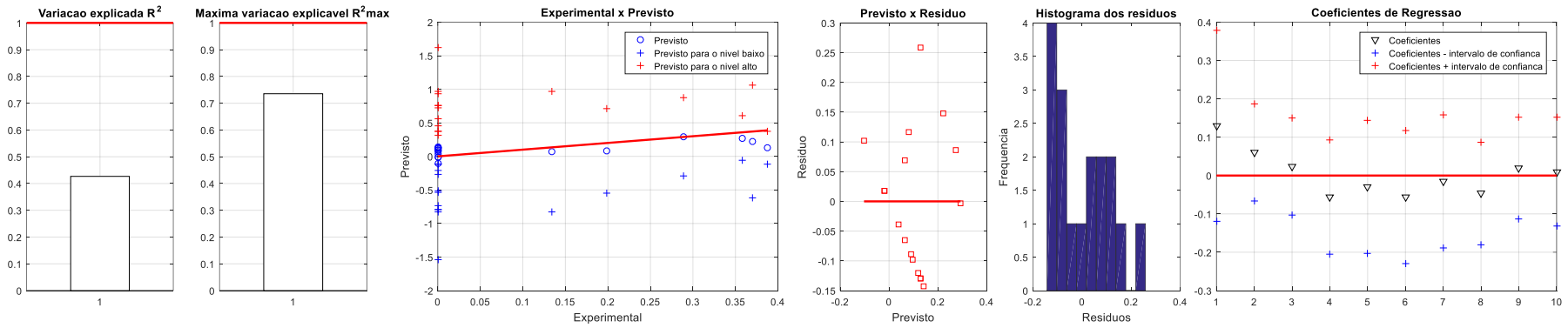
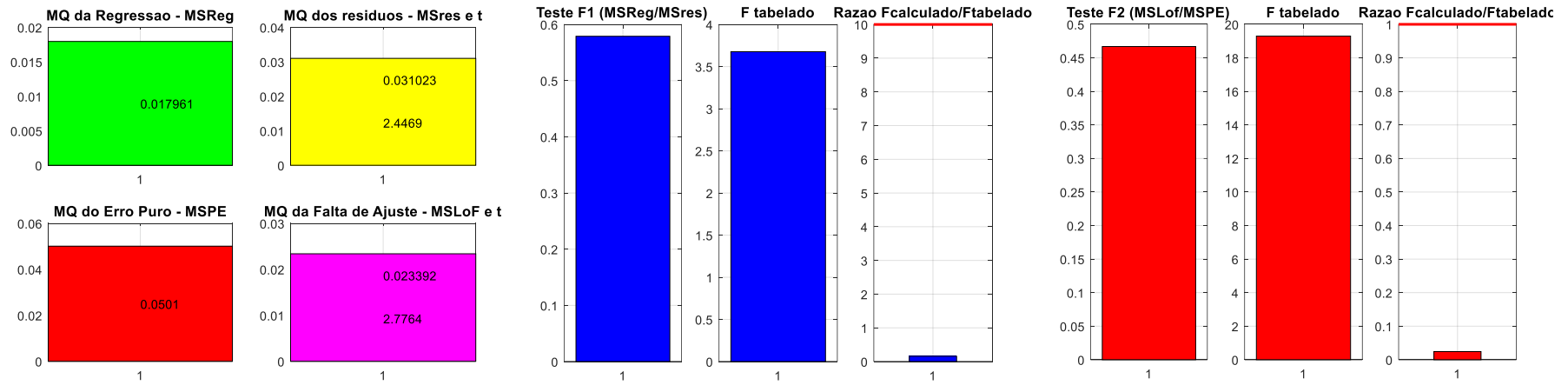
R10	Coef	Int. Inf.	Int. Sup.	Int. Conf.	Conclusão
b0	0,729	0,454	1,005	0,276	não signif.
b1	0,106	-0,035	0,246	0,140	não signif.
b2	0,080	-0,061	0,220	0,140	não signif.
b3	-0,096	-0,262	0,069	0,165	não signif.
b12	-0,066	-0,259	0,126	0,193	não signif.
b13	0,137	-0,055	0,330	0,192	não signif.
b23	-0,032	-0,224	0,160	0,192	não signif.
b11	-0,212	-0,360	-0,064	0,148	significativo
b22	-0,130	-0,277	0,018	0,148	não signif.
b33	-0,121	-0,279	0,036	0,157	não signif.

R11	SQ	GL	MQ	F_{calculado}	F_{tabelado}	
SQR	0,243	9	0,027	0,974	3,677	F _{tab} <F _{cal}
SQres	0,194	7	0,028	0		
SQT	0,437	16	0,027	0		
SQEP	0,125	2	0,062	0,222	19,296	F _{tab} >F _{cal}
SQFAJ	0,069	5	0,014	0		
R²	0,556	0,746	0	0		
R²_{max}	0,715	0,845	0	0		

R11	Coef	Int. Inf.	Int. Sup.	Int. Conf.	Conclusão
b0	0,193	-0,042	0,427	0,235	não signif.
b1	0,123	0,004	0,243	0,120	não signif.
b2	0,060	-0,059	0,180	0,120	não signif.
b3	0,004	-0,136	0,145	0,141	não signif.
b12	-0,013	-0,177	0,151	0,164	não signif.
b13	0,040	-0,124	0,204	0,164	não signif.
b23	0,034	-0,130	0,198	0,164	não signif.
b11	-0,026	-0,152	0,100	0,126	não signif.
b22	0,000	-0,126	0,126	0,126	não signif.
b33	-0,041	-0,175	0,093	0,134	não signif.

Desejabilidade individual para os 11 sinais-respostas selecionados e desejabilidade global

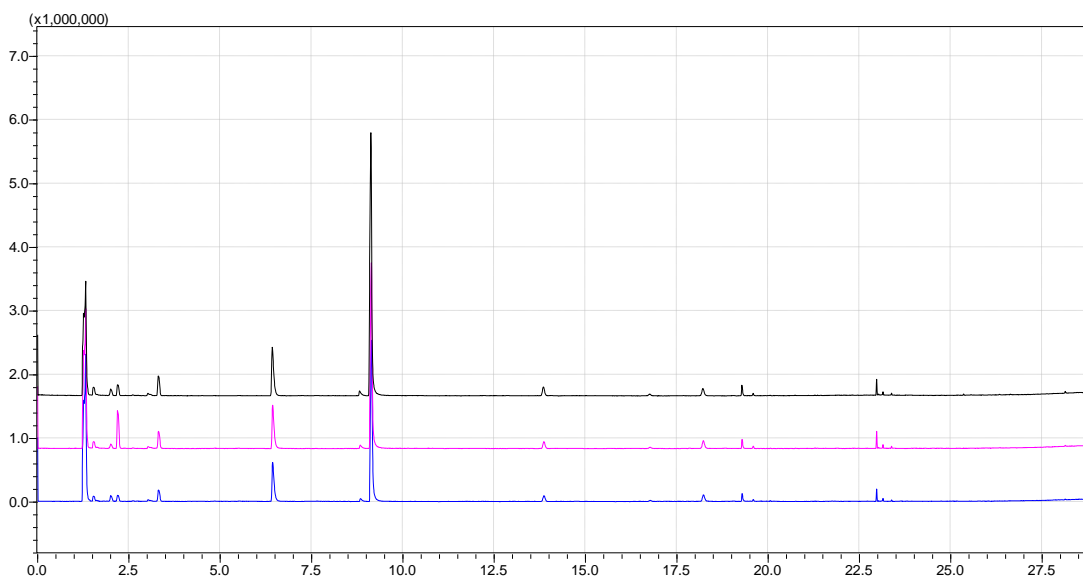
Experimentos	Respostas											
	d1	d2	d3	d4	d5	d6	d7	d8	d9	d10	d11	D _{global}
14	0,00000	0,50277	0,02673	0,00029	0,04851	0,34744	0,30596	0,05419	0,50915	0,05775	0,50209	0,0000
2	0,00976	0,22605	0,10492	0,00000	0,10051	0,25056	0,25672	0,00650	0,19184	0,00684	0,00000	0,0000
1	0,11827	0,24590	0,10089	0,09831	0,15980	0,00000	0,00000	0,00000	0,24009	0,06798	0,00000	0,0000
18	0,12994	0,39974	0,05012	0,01135	0,14302	0,35578	0,34194	0,07638	0,40859	0,04527	0,35750	0,1345
17	0,30870	0,24614	0,03378	0,92404	0,00000	0,89437	0,97232	0,09779	0,29235	0,03901	0,00000	0,0000
15	0,29945	0,71271	0,42834	0,00859	0,07431	0,00000	0,40219	0,00000	0,36311	0,04983	0,00000	0,0000
4	0,85389	0,00000	1,00000	0,15087	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,0000
3	1,00000	0,44905	0,32642	1,00000	1,00000	0,80980	0,98510	1,00000	0,53722	0,28149	0,00000	0,0000
13	0,07566	0,00000	0,04545	0,34939	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,39828	0,00000	0,00000	0,0000
7	0,10124	0,30111	0,00502	0,72632	0,53938	1,00000	1,00000	0,45281	0,84301	0,11382	0,45819	0,2894
8	0,19582	0,14264	0,00000	0,12529	0,17495	0,69533	0,75429	0,30243	0,82020	0,16130	0,78178	0,0000
16	0,15546	0,29389	0,02218	0,95746	0,48501	0,81544	0,97286	0,30752	1,00000	0,19032	0,81122	0,3699
5	0,29456	0,92654	0,01677	0,66364	0,58087	0,97944	0,81011	0,30013	0,61060	0,08594	0,55971	0,3579
6	0,12278	0,23114	0,00039	0,69806	0,25625	0,55319	0,67017	0,34774	0,87248	0,14037	0,60695	0,1988
9	0,80689	0,00000	0,48537	0,20569	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,63401	1,00000	0,00000	0,0000
10	0,76974	0,70752	0,27497	0,57307	0,28432	0,72422	0,81481	0,17551	0,34979	0,15501	0,21667	0,3876
12	0,28240	1,00000	0,25627	0,27859	0,00000	0,00000	0,48415	0,00000	0,84497	0,33971	1,00000	0,0000



Resultados do planejamento fatorial obtidos através da rotina de cálculo *regression2* para a função desejabilidade

APÊNDICE B – Experimento I: Resistência Constitutiva - Cromatogramas

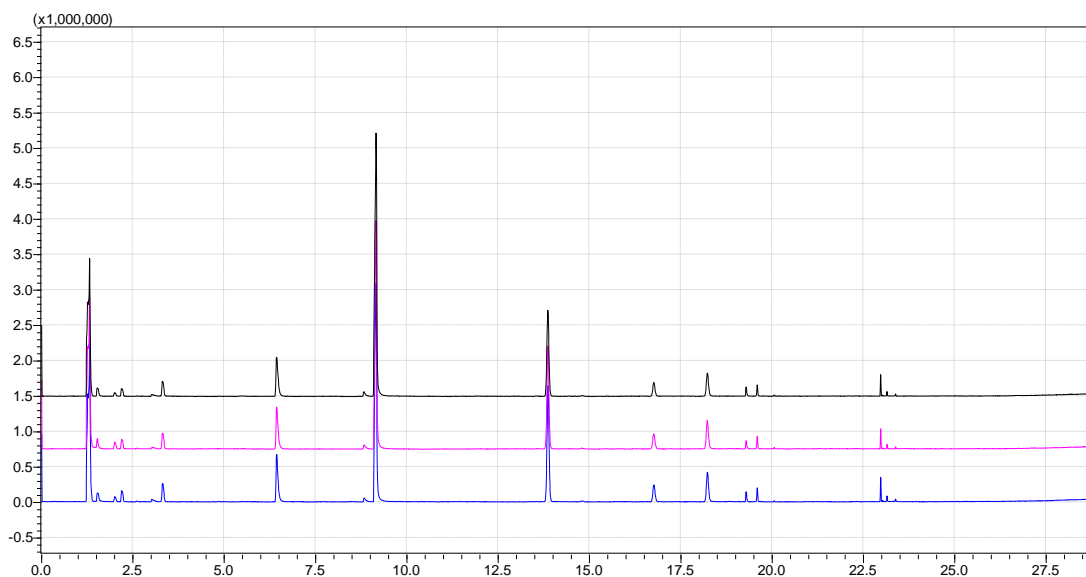
Cromatogramas e tabelas de identificação experimental dos compostos orgânicos voláteis presentes nos genótipos de algodão estudados no Experimento I, para cada genótipo.



Cromatogramas da análise por HS-GC/MS das amostras de folhas de algodão BRS-286

Identificação experimental dos compostos orgânicos voláteis presentes no genótipo de algodão BRS-286 por HS-GC/MS.

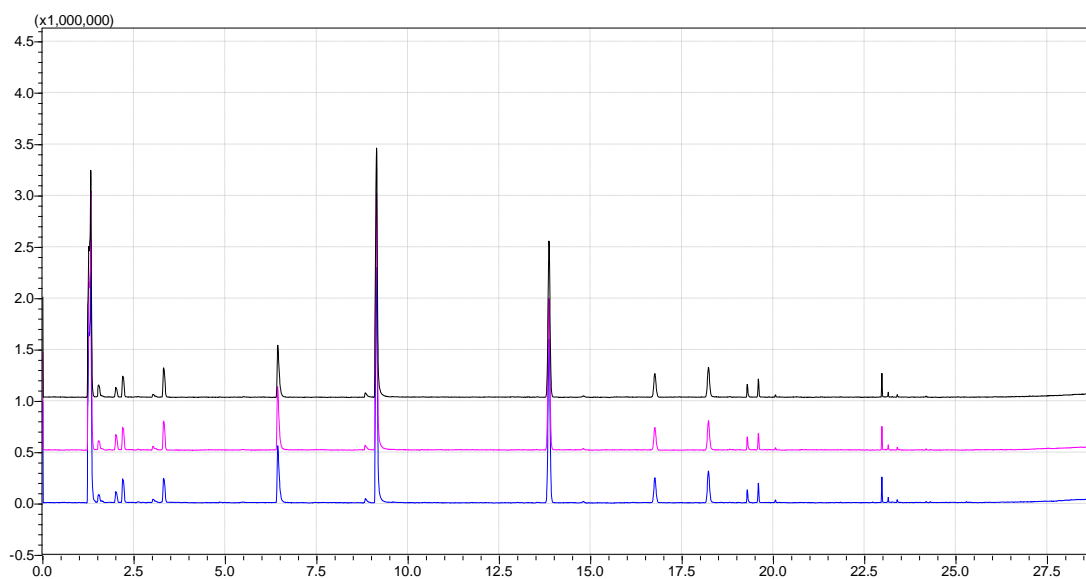
#	Nome	TR (min)	Áreamédia	DPR,%	% Área Relativa
1	n-Hexanal	6.42	9.67	7.0	24,2
2	2-Hexenal	8.81	0.65	17.8	1,6
3	2-Hexenal	9.12	39.96	9.3	100,0
5	α -Pino	13.85	1.45	13.1	3,6
7	β -Pino	16.75	0.24	9.8	0,6
8	β -Mirceno	18.21	1.61	10.8	4,0
PI	1,4-Cineol	19.28	1.00	0.0	2,5
9	Limoneno	19.59	0.22	8.4	0,6
11	Cariofileno	22.97	0.83	10.8	2,1
12	α -Guaieno	23.02	0.05	31.9	0,1
13	Humuleno	23.14	0.18	13.1	0,5
15	α -Bergamoteno	23.38	0.11	12.9	0,3
18	δ -Muuroleno	28.13	0.06	49.0	0,2



Cromatogramas da análise por HS-GC/MS das amostras de folhas de algodão BRS-293

Identificação experimental dos compostos orgânicos voláteis presentes no genótipo de algodão BRS-293 por HS-GC/MS.

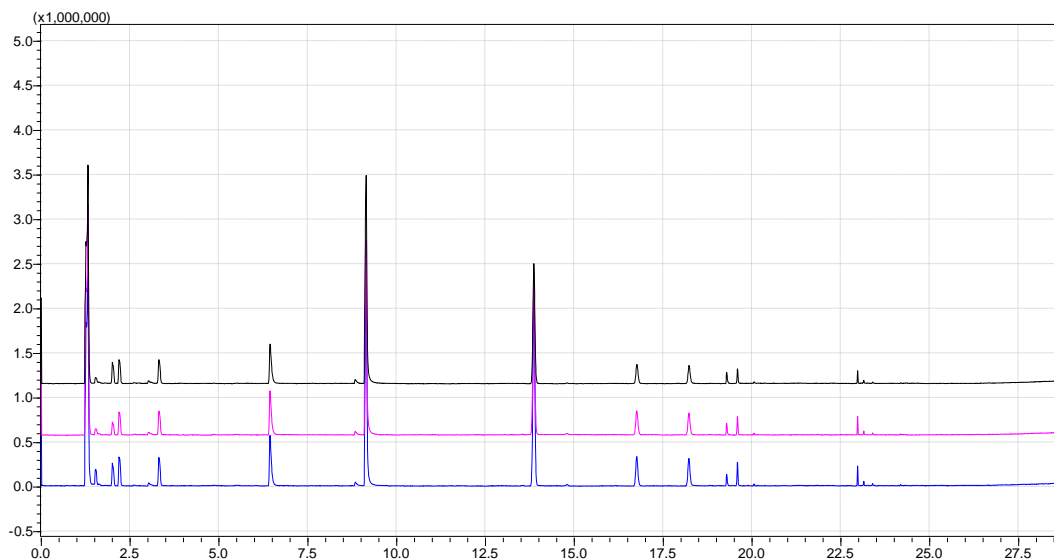
#	Nome	TR (min)	Área _{média}	DPR, %	% Área Relativa
1	n-Hexanal	6.43	9,39	9,0	19,5
2	2-Hexenal	8.82	0,74	11,0	1,5
3	2-Hexenal	9.16	48,16	12,0	100,0
5	α -Pineno	13.86	22,68	13,7	47,1
6	Canfeno	14.80	0,13	25,0	0,3
7	β -Pineno	16.76	3,67	13,5	7,6
8	β -Mirceno	18.23	6,36	15,6	13,2
PI	1,4-Cineol	19.29	1,00	0,0	2,1
9	Limoneno	19.59	1,29	12,9	2,7
10	β -Ocimeno	20.06	0,10	17,5	0,2
11	Cariofileno	22.97	1,32	17,8	2,7
12	α -Guaieno	23.02	0,07	24,1	0,2
13	Humuleno	23.14	0,32	18,7	0,7
15	α -Bergamoteno	23.38	0,14	22,7	0,3



Cromatogramas da análise por HS-GC/MS das amostras de folhas de algodão BRS-335

Identificação experimental dos compostos orgânicos voláteis presentes no genótipo de algodão BRS-335 por HS-GC/MS.

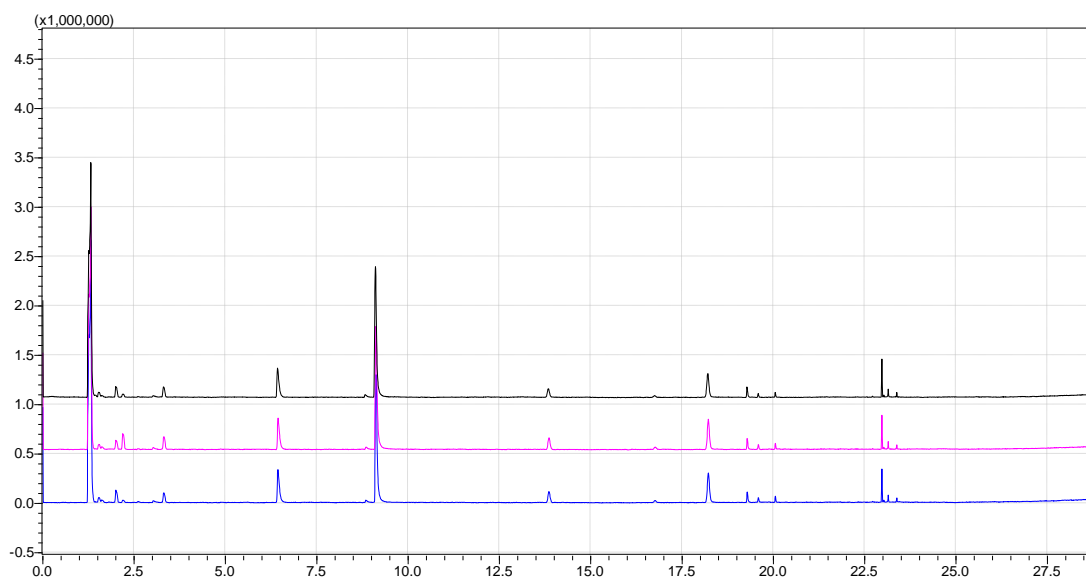
#	Nome	TR (min)	Áreamédia	DPR,%	% Área Relativa
1	n-Hexanal	6.43	9,19	12,3	24,9
2	2-Hexenal	8.83	0,63	5,7	1,7
3	2-Hexenal	9.14	36,84	8,2	100,0
5	α -Pineno	13.86	26,02	14,2	70,6
6	Canfeno	14.80	0,19	9,1	0,5
7	β -Pineno	16.75	4,19	13,4	11,4
8	β -Mirceno	18.22	5,26	13,3	14,3
PI	1,4-Cineol	19.28	1,00	0,0	2,7
9	Limoneno	19.59	1,42	13,8	3,9
10	β -Ocimeno	20.06	0,14	16,0	0,4
11	Cariofileno	22.97	1,05	14,1	2,9
13	Humuleno	23.14	0,23	18,4	0,6
15	α -Bergamoteno	23.39	0,16	18,7	0,4
16	β -Bisabolol	24.18	0,06	23,2	0,2



Cromatogramas da análise por HS-GC/MS das amostras de folhas de algodão
BRS-336

Identificação experimental dos compostos orgânicos voláteis presentes no
genótipo de algodão BRS-336 por HS-GC/MS.

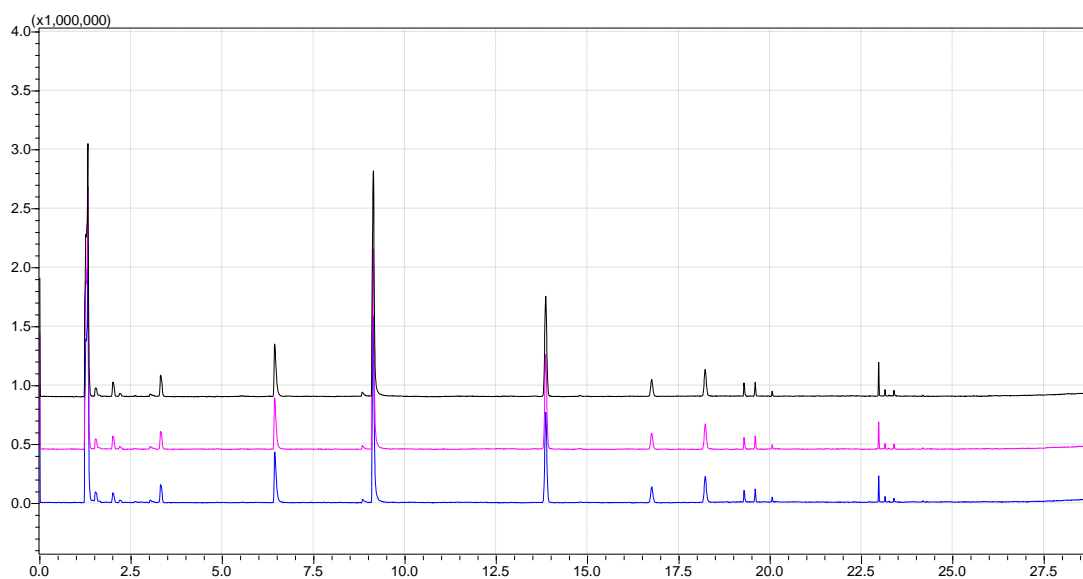
#	Nome	TR (min)	Áreamédia	DPR,%	% Área Relativa
1	n-Hexanal	6.44	8,01	10,0	24,7
2	2-Hexenal	8.83	0,59	5,9	1,8
3	2-Hexenal	9.14	32,48	5,7	100,0
5	α -Pirino	13.86	29,06	19,8	89,5
6	Canfeno	14.80	0,18	34,5	0,6
7	β -Pirino	16.76	4,75	18,3	14,6
8	β -Mirceno	18.23	4,32	19,7	13,3
PI	1,4-Cineol	19.28	1,00	0,0	3,1
9	Limoneno	19.59	1,58	19,2	4,9
10	β -Ocimeno	20.06	0,11	24,8	0,3
11	Cariofileno	22.97	0,84	20,9	2,6
13	Humuleno	23.14	0,18	26,5	0,5
15	α -Bergamoteno	23.39	0,12	18,7	0,4
16	β -Bisabolol	24.18	0,05	21,2	0,2



Cromatogramas da análise por HS-GC/MS das amostras de folhas de algodão BRS-368RF

Identificação experimental dos compostos orgânicos voláteis presentes no genótipo de algodão BRS-368RF por HS-GC/MS.

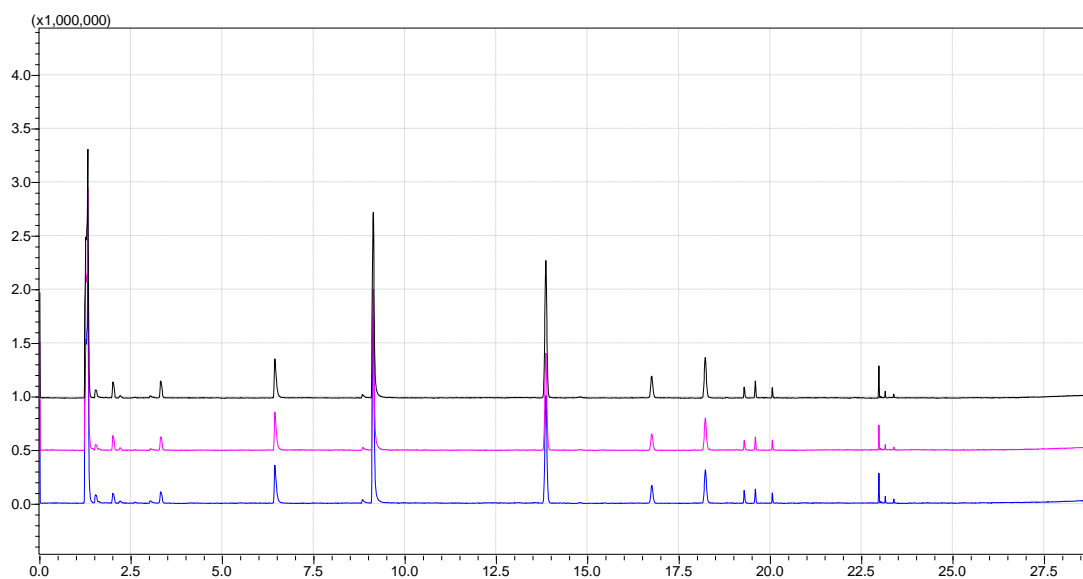
#	Nome	TR (min)	Áreamédia	DPR,%	% Área Relativa
1	n-Hexanal	6.42	6,01	8,3	26,9
2	2-Hexenal	8.82	0,38	2,2	1,7
3	2-Hexenal	9.11	22,29	6,5	100,0
5	α -Pineno	13.84	2,02	13,7	9,1
7	β -Pineno	16.74	0,38	13,9	1,7
8	β -Mirceno	18.20	5,86	16,6	26,3
PI	1,4-Cineol	19.28	1,00	0,0	4,5
9	Limoneno	19.58	0,41	14,2	1,9
10	β -Ocimeno	20.05	0,41	17,4	1,8
11	Cariofileno	22.97	1,88	20,3	8,4
12	α -Guaieno	23.02	0,12	36,8	0,5
13	Humuleno	23.14	0,46	28,8	2,1
15	α -Bergamoteno	23.38	0,25	19,2	1,1



Cromatogramas da análise por HS-GC/MS das amostras de folhas de algodão BRS-372

Identificação experimental dos compostos orgânicos voláteis presentes no genótipo de algodão BRS-372 por HS-GC/MS.

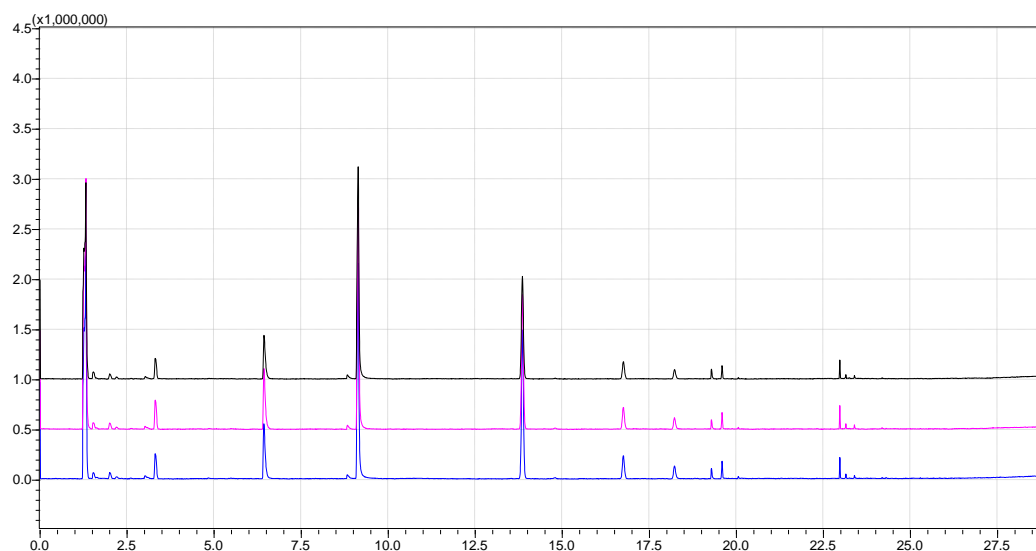
#	Nome	TR (min)	Área _{média}	DPR,%	% Área Relativa
1	n-Hexanal	6.43	8,46	6,4	27,7
2	2-Hexenal	8.83	0,49	12,5	1,6
3	2-Hexenal	9.13	30,54	3,8	100,0
5	α -Pineno	13.85	15,41	3,2	50,5
7	β -Pineno	16.75	2,74	5,4	9,0
8	β -Mirceno	18.22	4,35	7,4	14,3
PI	1,4-Cineol	19.28	1,00	0,0	3,3
9	Limoneno	19.59	1,02	5,9	3,3
10	β -Ocimeno	20.05	0,25	8,0	0,8
11	Cariofileno	22.97	1,21	4,6	4,0
13	Humuleno	23.14	0,25	10,9	0,8
14	β -Fameseno	23.25	0,04	33,8	0,1
15	α -Bergamoteno	23.39	0,27	12,9	0,9
16	β -Bisabolol	24.18	0,06	26,7	0,2



Cromatogramas da análise por HS-GC/MS das amostras de folhas de algodão Delta Opal

Identificação experimental dos compostos orgânicos voláteis presentes no genótipo de algodão Delta Opal por HS-GC/MS.

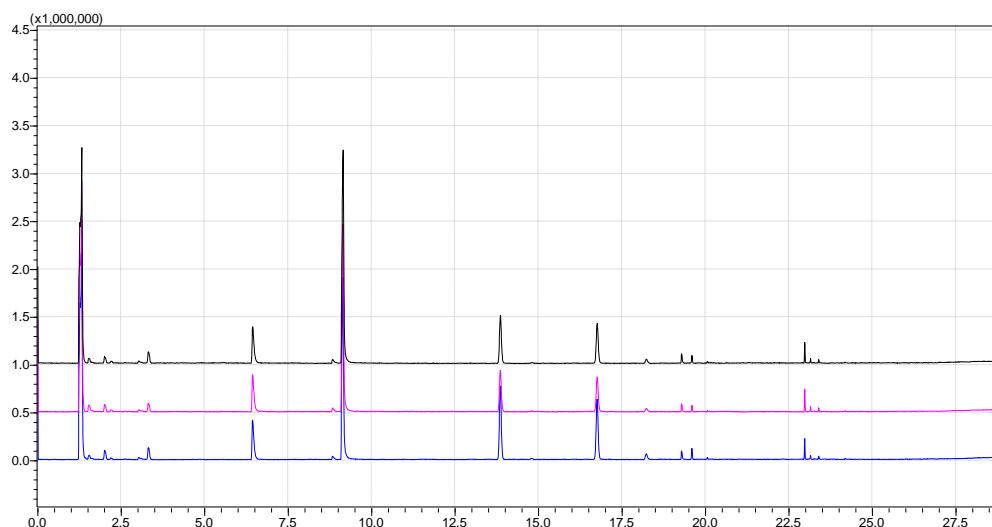
#	Nome	TR (min)	Área _{média}	DPR,%	% Área Relativa
1	n-Hexanal	6,435	15,3	15,3	24,1
2	2-Hexenal	8,832	16,8	16,8	1,7
3	2-Hexenal	9,128	21,1	21,1	100,0
5	α -Pineno	13,85	3,5	3,5	75,3
6	Canfeno	14,78	16,4	16,4	0,5
7	β -Pineno	16,75	2,0	2,0	12,8
8	β -Mirceno	18,22	0,0	0,0	23,9
PI	1,4-Cineol	19,28	23,8	23,8	3,3
9	Limoneno	19,59	0,6	0,6	4,6
10	β -Ocimeno	20,05	10,5	10,5	2,3
11	Cariofileno	22,97	19,4	19,4	4,5
12	α -Guaieno	23,02	29,9	29,9	0,3
13	Humuleno	23,14	25,6	25,6	1,1
15	α -Bergamoteno	23,38	24,3	24,3	0,6



Cromatogramas da análise por HS-GC/MS das amostras de folhas de algodão FMT-701

Identificação experimental dos compostos orgânicos voláteis presentes no genótipo de algodão FMT-701 por HS-GC/MS.

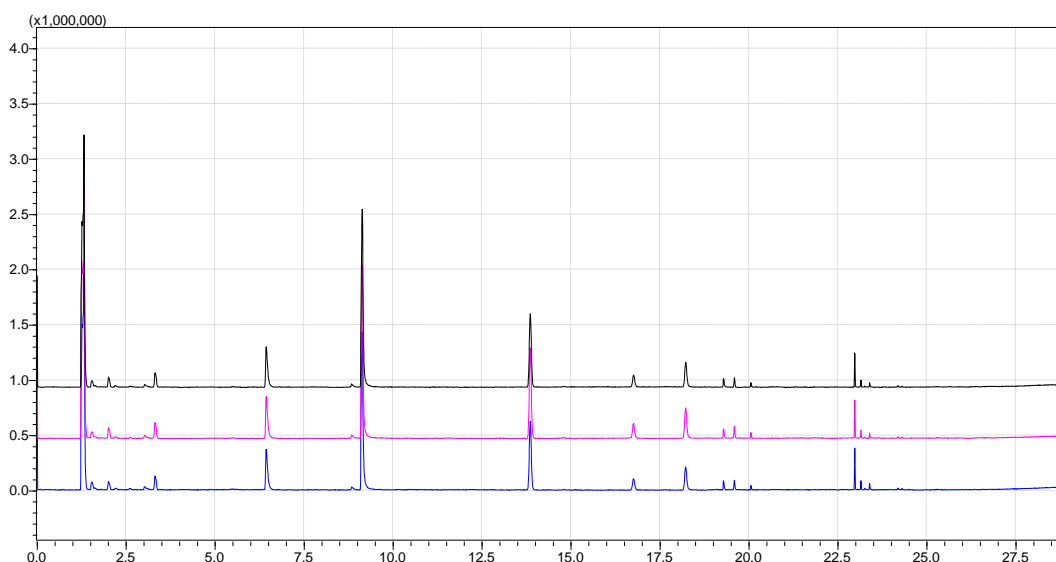
#	Nome	TR (min)	Áreamédia	DPR,%	% Área Relativa
1	n-Hexanal	6.43	11,20	15,5	26,5
2	2-Hexenal	8.82	0,74	13,7	1,8
3	2-Hexenal	9.13	42,21	7,3	100,0
4	α -Tujeno	13.54	0,06	19,7	0,1
5	α -Pineno	13.85	27,15	13,3	64,3
6	Canfeno	14.80	0,19	26,0	0,4
7	β -Pineno	16.75	4,60	10,7	10,9
8	β -Mirceno	18.22	2,37	11,7	5,6
PI	1,4-Cineol	19.28	1,00	0,0	2,4
9	Limoneno	19.59	1,54	9,9	3,6
10	β -Ocimeno	20.06	0,12	22,3	0,3
11	Cariofileno	22.97	1,15	10,9	2,7
13	Humuleno	23.14	0,23	13,7	0,6
14	β -Farneseno	23.25	0,03	17,2	0,1
15	α -Bergamoteno	23.39	0,23	17,6	0,5
16	β -Bisabolol	24.18	0,06	21,2	0,1



Cromatogramas da análise por HS-GC/MS das amostras de folhas de algodão FMT-707

Identificação experimental dos compostos orgânicos voláteis presentes no genótipo de algodão FMT-707 por HS-GC/MS.

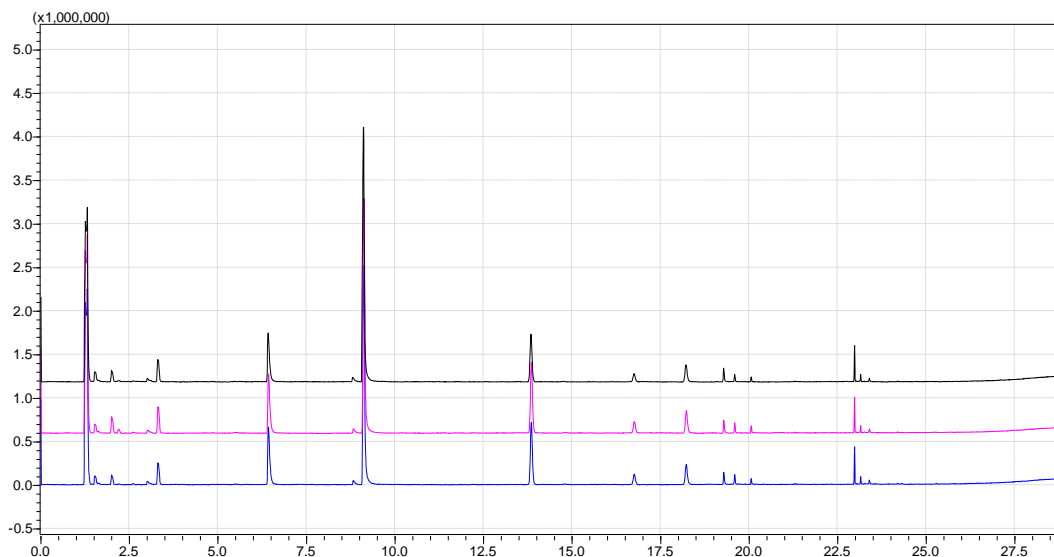
#	Nome	TR (min)	Áreamédia	DPR, %	% Área Relativa
1	n-Hexanal	6.43	8,72	12,1	21,1
2	2-Hexenal	8.83	0,73	19,5	1,8
3	2-Hexenal	9.14	41,37	8,2	100,0
5	α -Pirreno	13.86	13,54	25,8	32,7
6	Canfeno	14.80	0,19	37,5	0,5
7	β -Pirreno	16.76	11,67	25,8	28,2
8	β -Mirceno	18.22	1,08	22,7	2,6
PI	1,4-Cineol	19.28	1,00	0,0	2,4
9	Limoneno	19.59	0,89	25,7	2,1
10	β -Ocimeno	20.06	0,11	22,2	0,3
11	Cariofileno	22.97	1,27	18,6	3,1
13	Humuleno	23.14	0,27	20,5	0,7
14	β -Farneseno	23.25	0,04	9,6	0,1
15	α -Bergamoteno	23.39	0,29	23,4	0,7
16	β -Bisabolol	24.18	0,06	19,7	0,2



Cromatogramas da análise por HS-GC/MS das amostras de folhas de algodão FMT-709

Identificação experimental dos compostos orgânicos voláteis presentes no genótipo de algodão FMT-709 por HS-GC/MS.

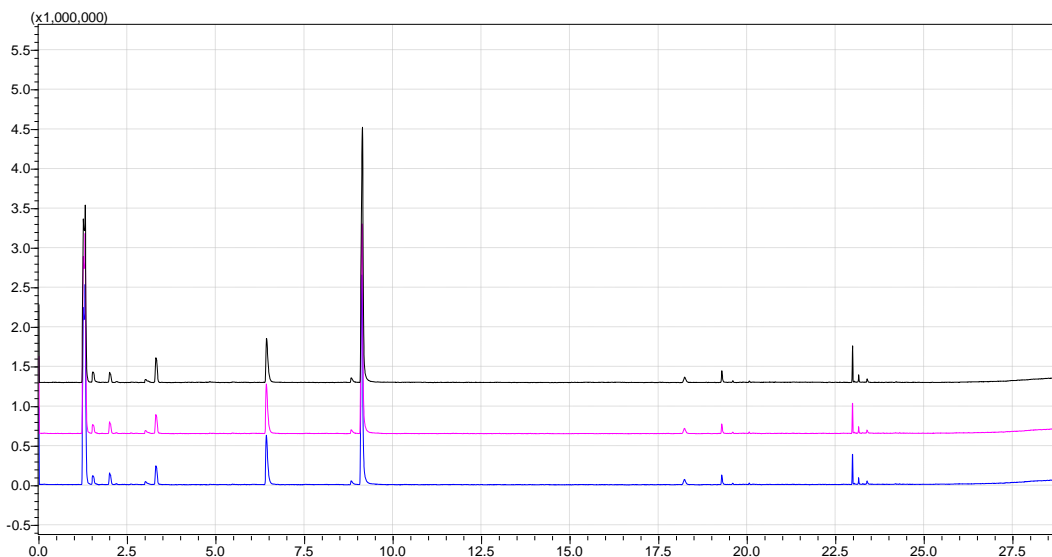
#	Nome	TR (min)	Áreamédia	DPR, %	% Área Relativa
1	n-Hexanal	6.43	9,37	3,7	26,2
2	2-Hexenal	8.83	0,67	2,0	1,9
3	2-Hexenal	9.13	35,83	7,6	100,0
5	α -Pineno	13.85	19,90	22,8	55,5
7	β -Pineno	16.76	3,26	21,1	9,1
8	β -Mirceno	18.22	6,72	22,6	18,8
PI	1,4-Cineol	19.28	1,00	0,0	2,8
9	Limoneno	19.59	1,20	21,3	3,4
10	β -Ocimeno	20.05	0,38	17,4	1,1
11	Cariofileno	22.97	2,26	7,8	6,3
13	Humuleno	23.14	0,48	10,2	1,3
14	β -Farneseno	23.25	0,06	23,5	0,2
15	α -Bergamoteno	23.39	0,40	20,5	1,1
16	β -Bisabolol	24.18	0,10	23,6	0,3
17	Tretadecanal	24.30	0,09	22,9	0,3



Cromatogramas da análise por HS-GC/MS das amostras de folhas de algodão FM-910

Identificação experimental dos compostos orgânicos voláteis presentes no genótipo de algodão FM-910 por HS-GC/MS.

#	Nome	TR (min)	Áreamédia	DPR, %	% Área Relativa
1	n-Hexanal	6.42	8,67	13,0	25,4
2	2-Hexenal	8.81	0,56	10,0	1,7
3	2-Hexenal	9.11	34,12	1,5	100,0
5	α -Pineno	13.84	9,85	18,5	28,9
7	β -Pineno	16.75	1,63	19,5	4,8
8	β -Mirceno	18.21	3,38	16,8	9,9
PI	1,4-Cineol	19.28	1,00	0,0	2,9
9	Limoneno	19.59	0,67	16,9	2,0
10	β -Ocimeno	20.06	0,34	19,0	1,0
11	Cariofileno	22.97	1,47	7,3	4,3
13	Humuleno	23.15	0,33	7,8	1,0
15	α -Bergamoteno	23.39	0,24	11,6	0,7



Cromatogramas da análise por HS-GC/MS das amostras de folhas de algodão FM-993

Identificação experimental dos compostos orgânicos voláteis presentes no genótipo de algodão FM-993 por HS-GC/MS.

#	Nome	TR (min)	Áreamédia	DPR, %	% Área Relativa
1	n-Hexanal	6.43	9,74	17,9	22,8
2	2-Hexenal	8.82	0,67	9,5	1,6
3	2-Hexenal	9.13	42,66	8,7	100,0
8	β -Mirceno	18.23	1,03	13,0	2,4
PI	1,4-Cineol	19.28	1,00	0,0	2,3
9	Limoneno	19.59	0,14	20,2	0,3
10	β -Ocimeno	20.06	0,09	13,4	0,2
11	Cariofileno	22.97	1,94	22,8	4,6
12	α -Guaieno	23.03	0,08	33,8	0,2
13	Humuleno	23.15	0,47	27,6	1,1
15	α -Bergamoteno	23.39	0,32	30,8	0,8

APÊNDICE C – Experimento I: Resistência Constitutiva – Espectros de massas

Espectro de massas e estrutura dos compostos identificados no Experimento I para os 12 genótipos de algodão. Os espectros estão listados em ordem do tempo de retenção.

#1 – Hexanal

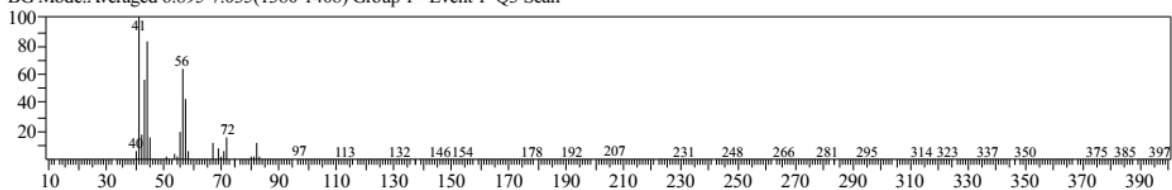
Library Search

<< Target >>

Line#: 1 R.Time:6.425(Scan#:1286) MassPeaks:207

RawMode:Averaged 6.370-6.595(1275-1320) BasePeak:41.05(10000)

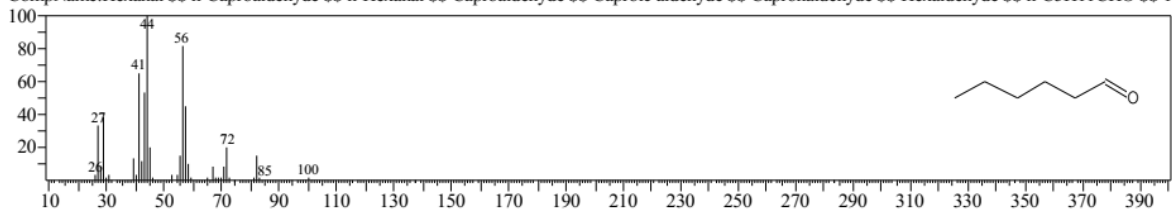
BG Mode:Averaged 6.895-7.035(1380-1408) Group 1 - Event 1 Q3 Scan



Hit#:1 Entry:1832 Library:NIST11s.lib

SI:93 Formula:C6H12O CAS:66-25-1 MolWeight:100 RetIndex:806

CompName:Hexanal \$\$ n-Caproaldehyde \$\$ n-Hexanal \$\$ Caproaldehyde \$\$ Capronaldehyde \$\$ Hexaldehyde \$\$ n-C5H11CHO \$\$ 1



#2 – (Z)-Hex-2-enal

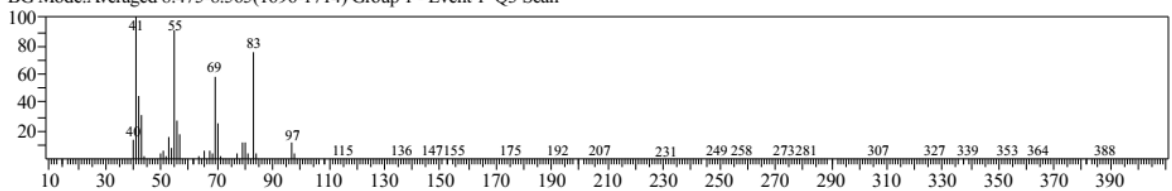
Library Search

<< Target >>

Line#: 1 R.Time:8.810(Scan#:1763) MassPeaks:223

RawMode:Averaged 8.765-8.955(1754-1792) BasePeak:41.05(10000)

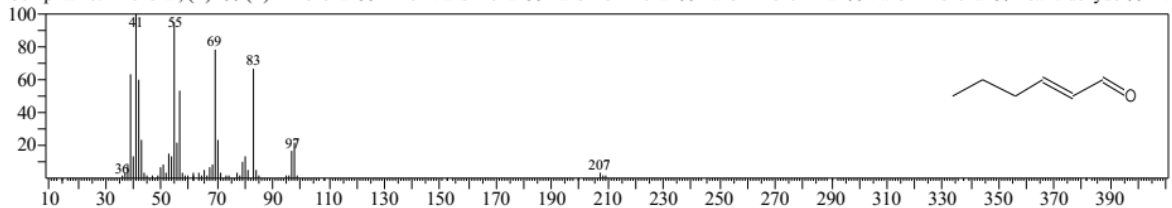
BG Mode:Averaged 8.475-8.565(1696-1714) Group 1 - Event 1 Q3 Scan



Hit#:1 Entry:1539 Library:NIST11s.lib

SI:94 Formula:C6H10O CAS:6728-26-3 MolWeight:98 RetIndex:814

CompName:2-Hexenal, (E)- \$\$ (E)-2-Hexenal \$\$ n-Hex-trans-2-enal \$\$ trans-Hex-2-enal \$\$ trans-2-Hexenal \$\$ Leaf aldehyde \$\$ 2-t



#3- (E)-2-hexenal

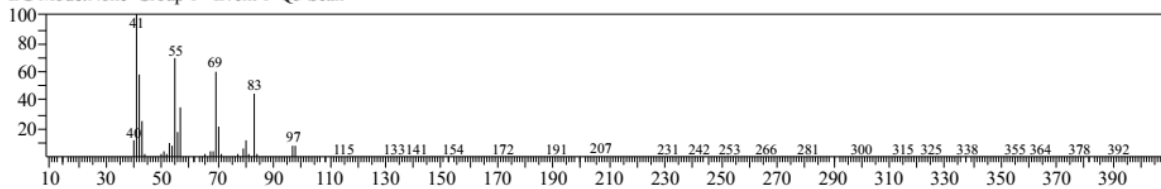
Library Search

<< Target >>

Line#1 R.Time:9.125(Scan#:1826) MassPeaks:361

RawMode:Averaged 9.040-9.340(1809-1869) BasePeak:41.05(10000)

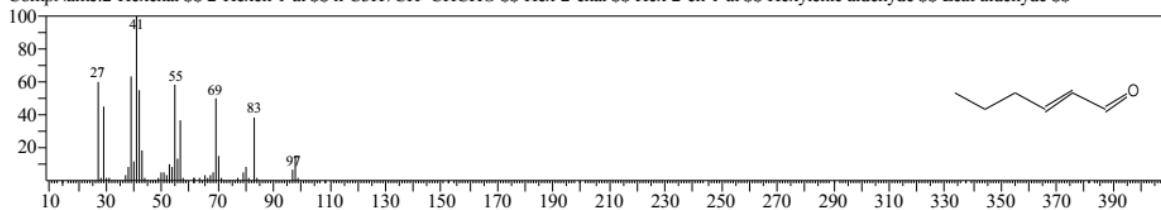
BG Mode:None Group 1 - Event 1 Q3 Scan



Hit#:1 Entry:1615 Library:NIST11.lib

SI:96 Formula:C6H10O CAS:505-57-7 MolWeight:98 RetIndex:814

CompName:2-Hexenal \$\$ 2-Hexen-1-al \$\$ n-C3H7CH=CHCHO \$\$ Hex-2-enal \$\$ Hex-2-en-1-al \$\$ Hexylenic aldehyde \$\$ Leaf aldehyde \$\$



#4 – alfa-Tujeno

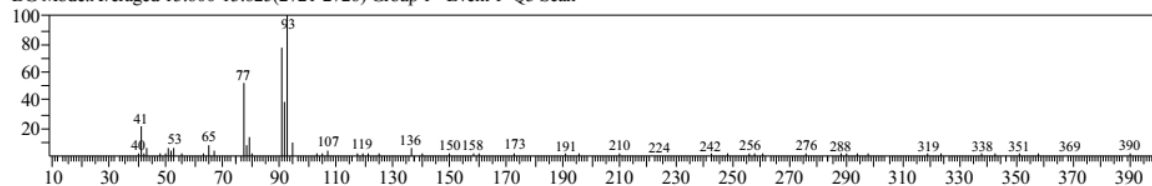
Library Search

<< Target >>

Line#1 R.Time:13.535(Scan#:2708) MassPeaks:141

RawMode:Averaged 13.490-13.565(2699-2714) BasePeak:93.10(10000)

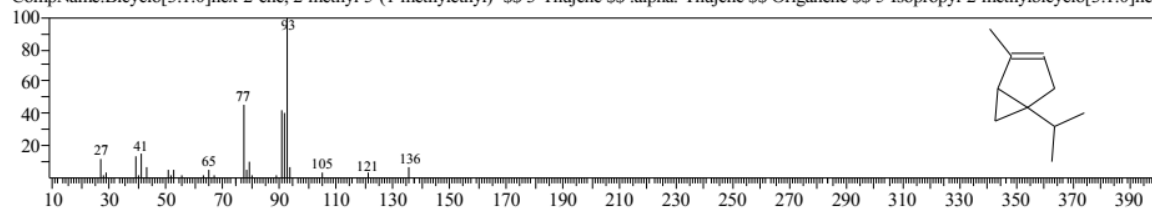
BG Mode:Averaged 13.600-13.625(2721-2726) Group 1 - Event 1 Q3 Scan



Hit#:2 Entry:9791 Library:NIST11.lib

SI:87 Formula:C10H16 CAS:2867-05-2 MolWeight:136 RetIndex:902

CompName:Bicyclo[3.1.0]hex-2-ene, 2-methyl-5-(1-methylethyl)- \$\$ 3-Thujene \$\$.alpha.-Thujene \$\$ Origanene \$\$ 5-Isopropyl-2-methylbicyclo[3.1.0]hex



Hit#:3 Entrv:9789 Librarv:NIST11.lib

#5 – alfa pineno

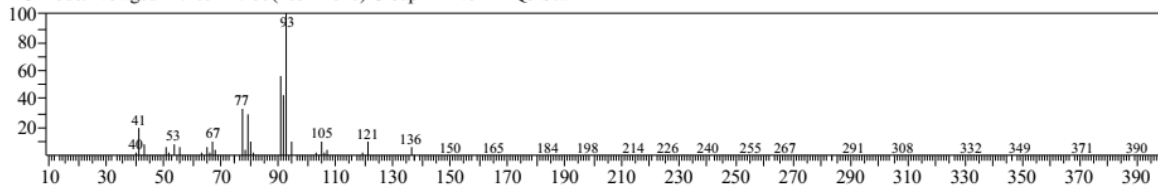
Library Search

<< Target >>

Line#:1 R.Time:13.845(Scan#:2770) MassPeaks:220

RawMode:Averaged 13.770-13.940(2755-2789) BasePeak:93.10(10000)

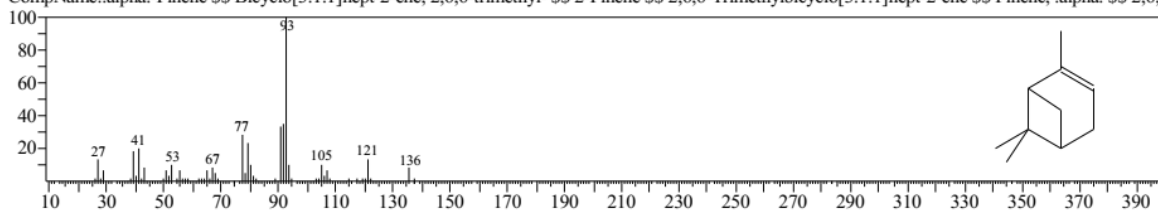
BG Mode:Averaged 14.165-14.235(2834-2848) Group 1 - Event 1 Q3 Scan



Hit#:1 Entry:6669 Library:NIST11s.lib

SI:96 Formula:C10H16 CAS:80-56-8 MolWeight:136 RetIndex:948

CompName:.alpha.-Pinene \$\$ Bicyclo[3.1.1]hept-2-ene, 2,6,6-trimethyl- \$\$ 2-Pinene \$\$ 2,6,6-Trimethylbicyclo[3.1.1]hept-2-ene \$\$ Pinene, .alpha. \$\$ 2,6,6



#6 – Canfeno

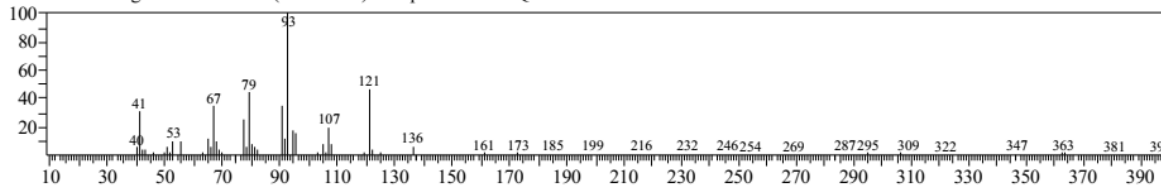
Library Search

<< Target >>

Line#:1 R.Time:14.795(Scan#:2960) MassPeaks:267

RawMode:Averaged 14.765-14.845(2954-2970) BasePeak:93.10(10000)

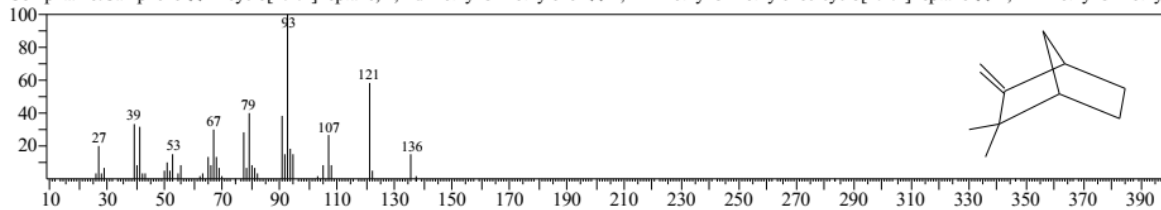
BG Mode:Averaged 14.890-14.940(2979-2989) Group 1 - Event 1 Q3 Scan



Hit#:1 Entry:9817 Library:NIST11.lib

SI:94 Formula:C10H16 CAS:79-92-5 MolWeight:136 RetIndex:943

CompName:Camphene \$\$ Bicyclo[2.2.1]heptane, 2,2-dimethyl-3-methylene- \$\$ 2,2-Dimethyl-3-methylenebicyclo[2.2.1]heptane \$\$ 2,2-Dimethyl-3-methyl



#7 – beta-pineno

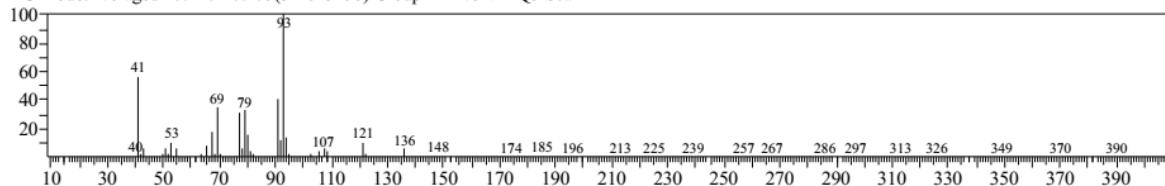
Library Search

<< Target >>

Line#:1 R.Time:16.770(Scan#:3355) MassPeaks:242

RawMode:Averaged 16.715-16.850(3344-3371) BasePeak:93.10(10000)

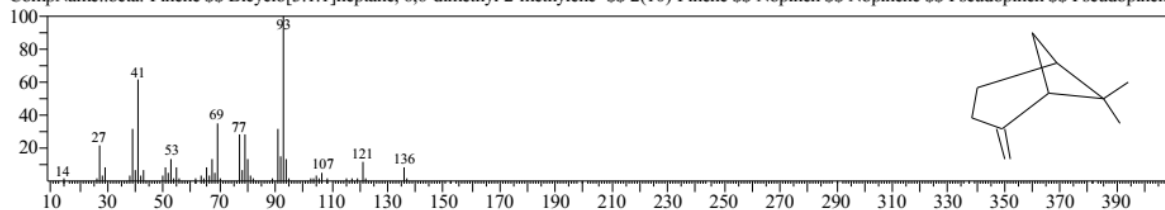
BG Mode:Averaged 17.240-17.275(3449-3456) Group 1 - Event 1 Q3 Scan



Hit#:1 Entry:9777 Library:NIST11.lib

SI:95 Formula:C10H16 CAS:127-91-3 MolWeight:136 RetIndex:943

CompName:.beta.-Pinene \$\$ Bicyclo[3.1.1]heptane, 6,6-dimethyl-2-methylene- \$\$ 2(10)-Pinene \$\$ Nopinene \$\$ Pseudopinene \$\$ Pseudopinene



#8 - mirceno

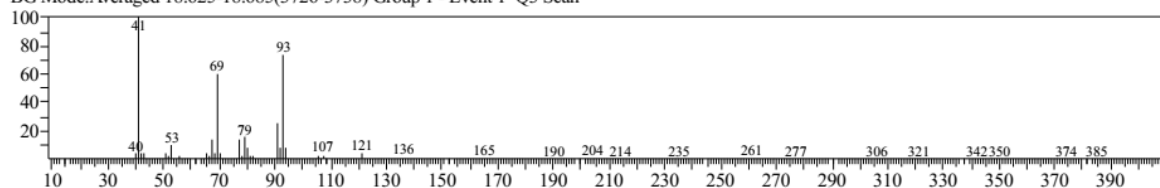
Library Search

<< Target >>

Line#:1 R.Time:18.210(Scan#:3643) MassPeaks:262

RawMode:Averaged 18.150-18.305(3631-3662) BasePeak:41.05(10000)

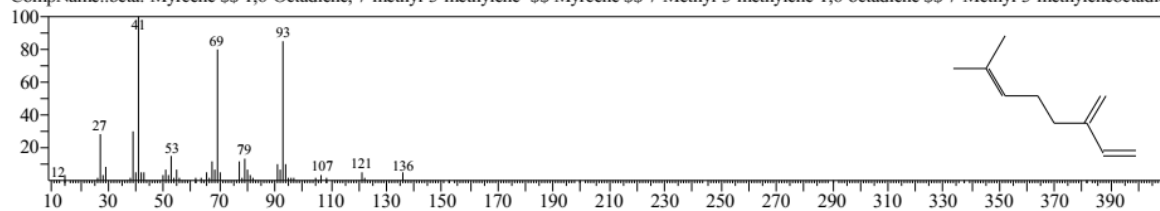
BG Mode:Averaged 18.625-18.685(3726-3738) Group 1 - Event 1 Q3 Scan



Hit#:1 Entry:9719 Library:NIST11.lib

SI:94 Formula:C10H16 CAS:123-35-3 MolWeight:136 RetIndex:958

CompName:.beta.-Myrcene \$\$ 1,6-Octadiene, 7-methyl-3-methylene- \$\$ Myrcene \$\$ 7-Methyl-3-methylene-1,6-octadiene \$\$ 7-Methyl-3-methyleneoctadiene



#9 – limoneno

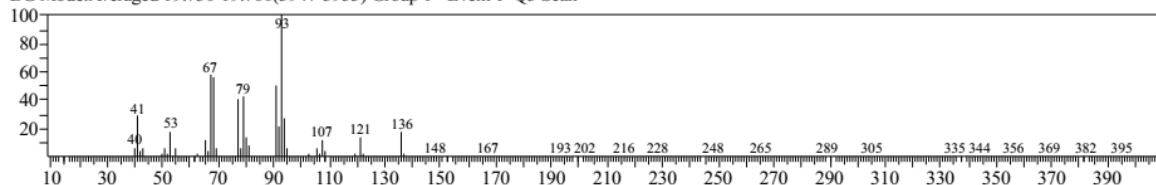
Library Search

<< Target >>

Line#:1 R.Time:19.590(Scan#:3919) MassPeaks:279

RawMode:Averaged 19.560-19.655(3913-3932) BasePeak:93.10(10000)

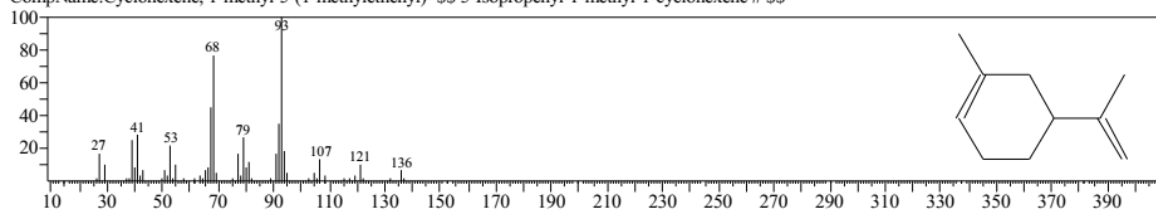
BG Mode:Averaged 19.730-19.760(3947-3953) Group 1 - Event 1 Q3 Scan



Hit#:1 Entry:9786 Library:NIST11.lib

SI:91 Formula:C10H16 CAS:13898-73-2 MolWeight:136 RetIndex:1018

CompName:Cyclohexene, 1-methyl-5-(1-methylethenyl)- \$\$ 5-Isopropenyl-1-methyl-1-cyclohexene # \$\$



#10 – beta-ocimeno

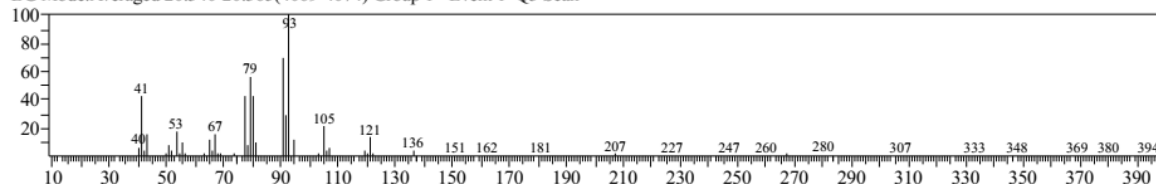
Library Search

<< Target >>

Line#:1 R.Time:20.055(Scan#:4012) MassPeaks:229

RawMode:Averaged 20.025-20.095(4006-4020) BasePeak:93.10(10000)

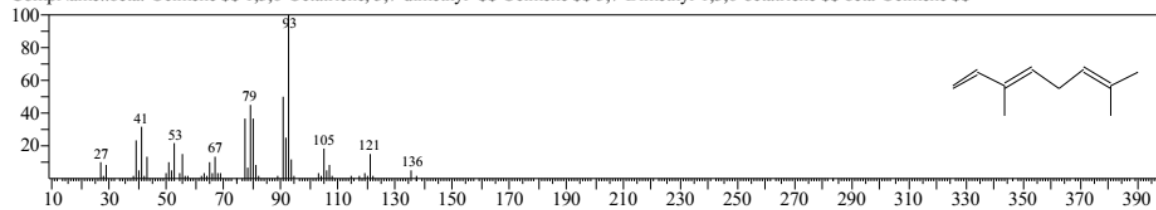
BG Mode:Averaged 20.340-20.365(4069-4074) Group 1 - Event 1 Q3 Scan



Hit#:1 Entry:9806 Library:NIST11.lib

SI:94 Formula:C10H16 CAS:13877-91-3 MolWeight:136 RetIndex:976

CompName:.beta.-Ocimene \$\$ 1,3,6-Octatriene, 3,7-dimethyl- \$\$ Ocimene \$\$ 3,7-Dimethyl-1,3,6-octatriene \$\$ beta-Ocimene \$\$



#11 - cariofileno

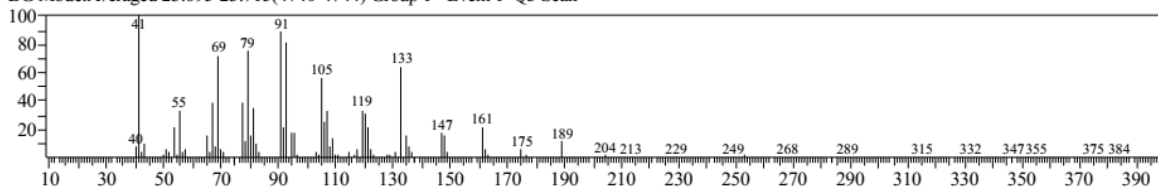
Library Search

<< Target >>

Line#:1 R.Time:22.970(Scan#:4595) MassPeaks:312

RawMode:Averaged 22.940-23.000(4589-4601) BasePeak:41.05(10000)

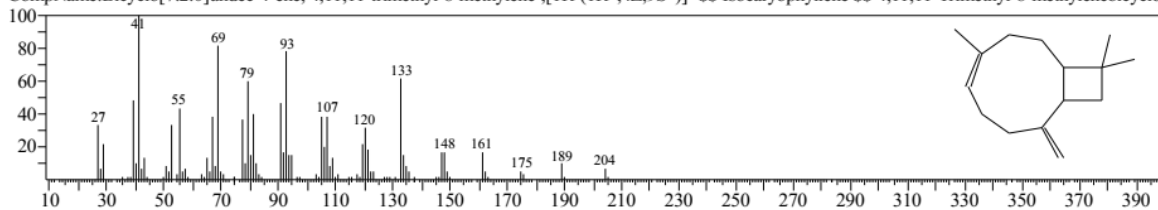
BG Mode:Averaged 23.695-23.715(4740-4744) Group 1 - Event 1 Q3 Scan



Hit#:1 Entry:18022 Library:NIST11s.lib

SI:95 Formula:C15H24 CAS:118-65-0 MolWeight:204 RetIndex:1494

CompName:Bicyclo[7.2.0]undec-4-ene, 4,11,11-trimethyl-8-methylene-, [1R-(1R*,4Z,9S*)]- \$\$ Isocaryophyllene \$\$ 4,11,11-Trimethyl-8-methylenebicyclo[



#12 – alfa Guaieno

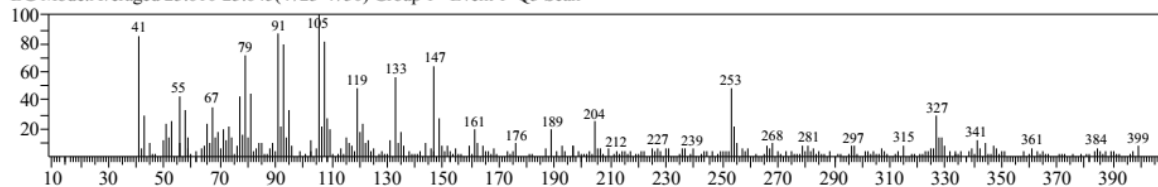
Library Search

<< Target >>

Line#:1 R.Time:23.025(Scan#:4606) MassPeaks:314

RawMode:Averaged 23.005-23.060(4602-4613) BasePeak:105.10(10000)

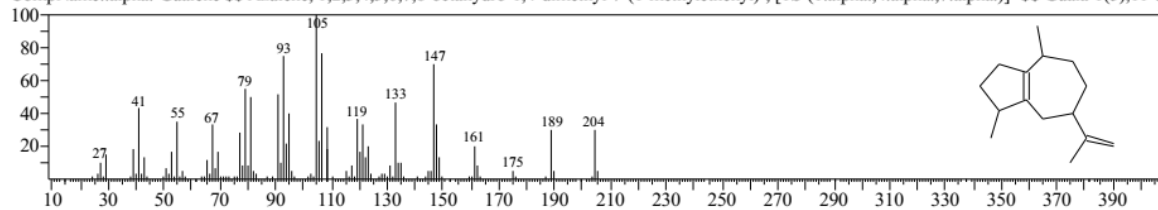
BG Mode:Averaged 23.610-23.645(4723-4730) Group 1 - Event 1 Q3 Scan



Hit#:1 Entry:46652 Library:NIST11.lib

SI:83 Formula:C15H24 CAS:3691-12-1 MolWeight:204 RetIndex:1490

CompName:.alpha.-Guaiene \$\$ Azulene, 1,2,3,4,5,6,7,8-octahydro-1,4-dimethyl-7-(1-methylethenyl)-, [1S-(1.alpha.,4.alpha.,7.alpha.)]- \$\$ Guaia-1(5),11-die



#13 - humuleno

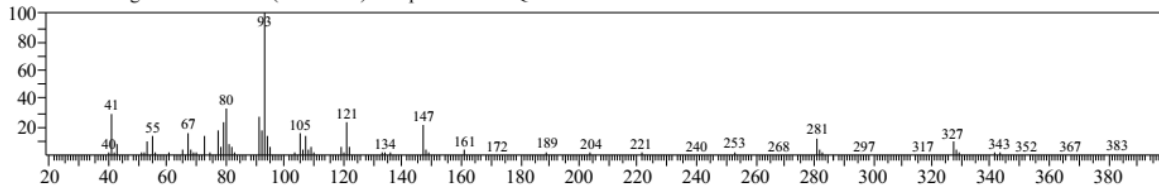
Library Search

<< Target >>

Line#:1 R.Time:23.140(Scan#:4629) MassPeaks:265

RawMode:Averaged 23.110-23.175(4623-4636) BasePeak:93.10(10000)

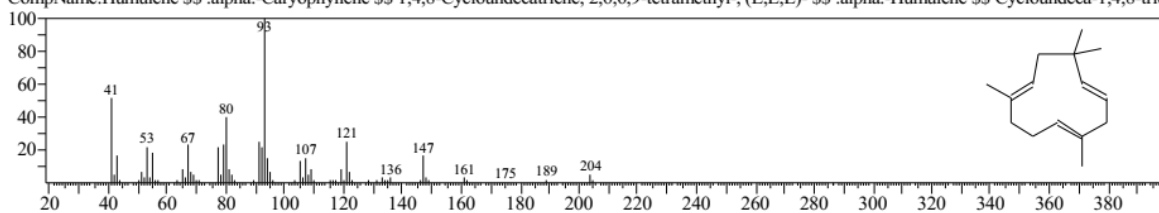
BG Mode:Averaged 23.235-23.270(4648-4655) Group 1 - Event 1 Q3 Scan



Hit#:1 Entry:18066 Library:NIST11s.lib

SI:87 Formula:C15H24 CAS:6753-98-6 MolWeight:204 RetIndex:1579

CompName:Humulene \$\$.alpha.-Caryophyllene \$\$ 1,4,8-Cycloundecatriene, 2,6,6,9-tetramethyl-, (E,E,E)- \$\$.alpha.-Humulene \$\$ Cycloundeca-1,4,8-trien-



#14 - beta-farneseno

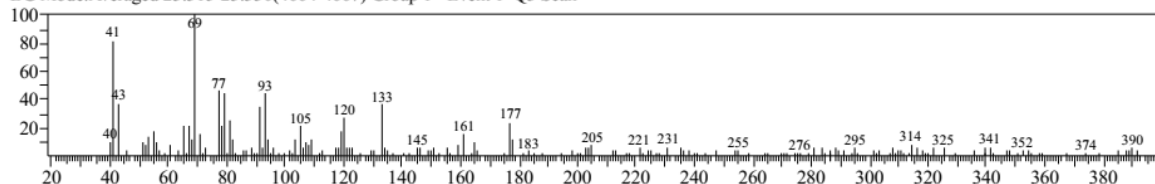
Library Search

<< Target >>

Line#:1 R.Time:23.250(Scan#:4651) MassPeaks:235

RawMode:Averaged 23.225-23.275(4646-4656) BasePeak:69.05(10000)

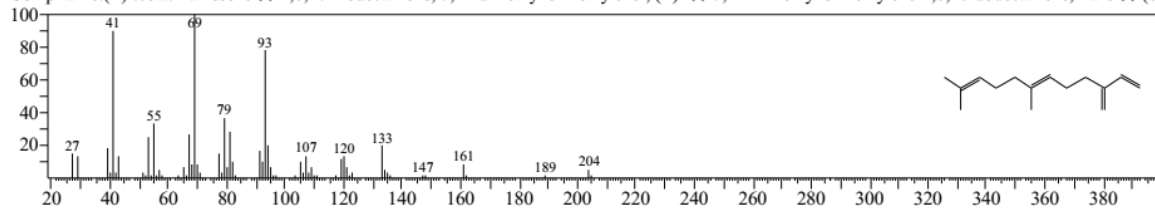
BG Mode:Averaged 23.315-23.330(4664-4667) Group 1 - Event 1 Q3 Scan



Hit#:1 Entry:18051 Library:NIST11s.lib

SI:77 Formula:C15H24 CAS:18794-84-8 MolWeight:204 RetIndex:1440

CompName:(E)-.beta.-Farnesene \$\$ 1,6,10-Dodecatriene, 7,11-dimethyl-3-methylene-, (E)- \$\$ 7,11-Dimethyl-3-methylene-1,6,10-dodecatriene, trans \$\$ (6E)-



#15-bergamoteno

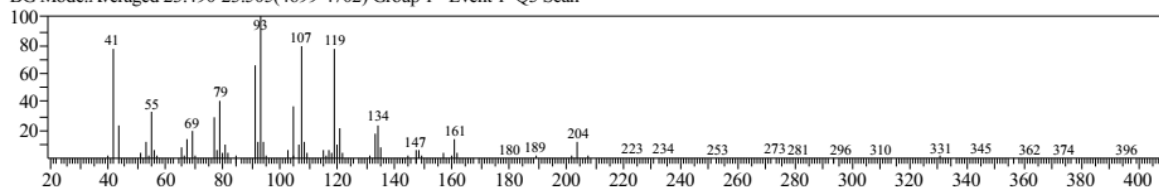
Library Search

<< Target >>

Line#:1 R.Time:23.390(Scan#:4679) MassPeaks:260

RawMode:Averaged 23.360-23.430(4673-4687) BasePeak:93.10(10000)

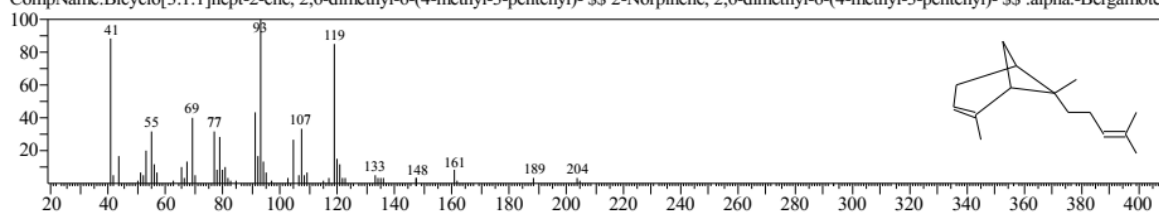
BG Mode:Averaged 23.490-23.505(4699-4702) Group 1 - Event 1 Q3 Scan



Hit#:1 Entry:46623 Library:NIST11.lib

SI:90 Formula:C15H24 CAS:17699-05-7 MolWeight:204 RetIndex:1430

CompName:Bicyclo[3.1.1]hept-2-ene, 2,6-dimethyl-6-(4-methyl-3-pentenyl)- \$\$ 2-Norpinene, 2,6-dimethyl-6-(4-methyl-3-pentenyl)- \$\$.alpha.-Bergamoten



#16 – beta-bisabolol

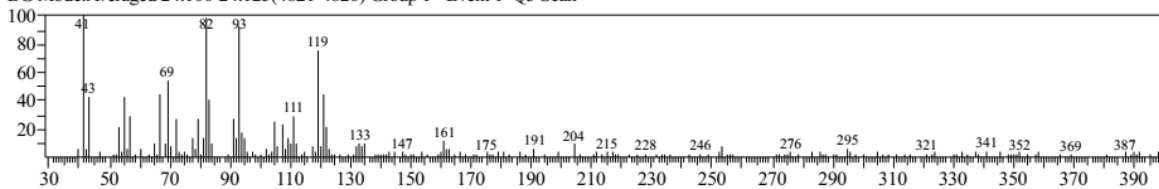
Library Search

<< Target >>

Line#:1 R.Time:24.180(Scan#:4837) MassPeaks:243

RawMode:Averaged 24.155-24.205(4832-4842) BasePeak:41.00(10000)

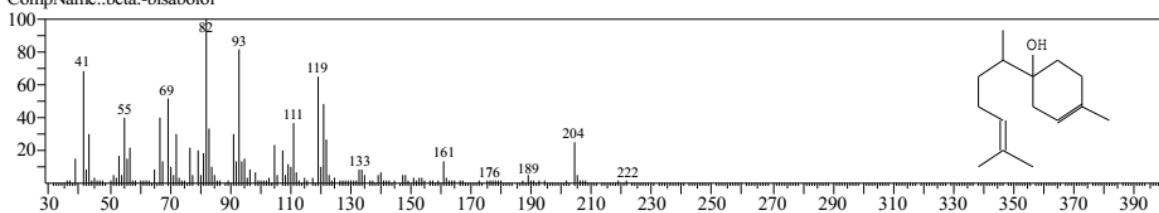
BG Mode:Averaged 24.100-24.125(4821-4826) Group 1 - Event 1 Q3 Scan



Hit#:1 Entry:59405 Library:NIST11.lib

SI:90 Formula:C15H26O CAS:0-00-0 MolWeight:222 RetIndex:1619

CompName:.beta.-bisabolol



#17 – Tretadecanal

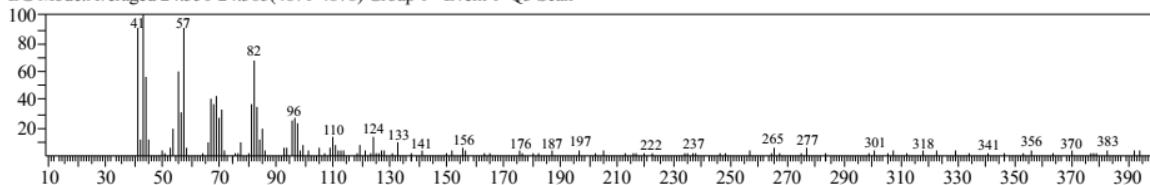
Library Search

<< Target >>

Line#1 R.Time:24.295(Scan#:4860) MassPeaks:174

RawMode:Averaged 24.275-24.325(4856-4866) BasePeak:43.05(10000)

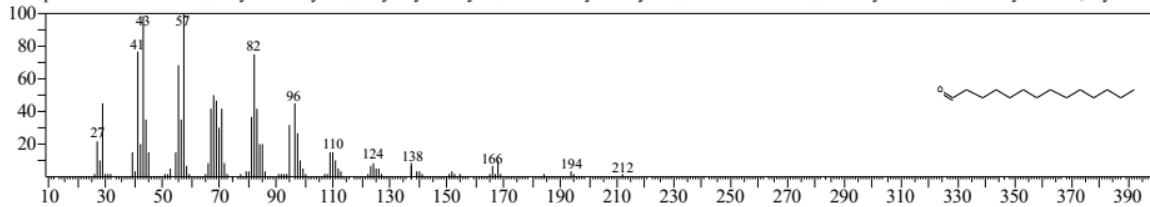
BG Mode:Averaged 24.350-24.385(4871-4878) Group 1 - Event 1 Q3 Scan



Hit#4 Entry:19156 Library:NIST11s.lib

SI:89 Formula:C14H28O CAS:124-25-4 MolWeight:212 RetIndex:1601

CompName:Tetradecanal \$\$ Myristaldehyde \$\$ Myristylaldehyde \$\$ Tetradecylaldehyde \$\$ n-Tetradecanal \$\$ Aldehyde C-14 \$\$ Aldehyde C-14, myristic S



#18- gama-Muuroloeno

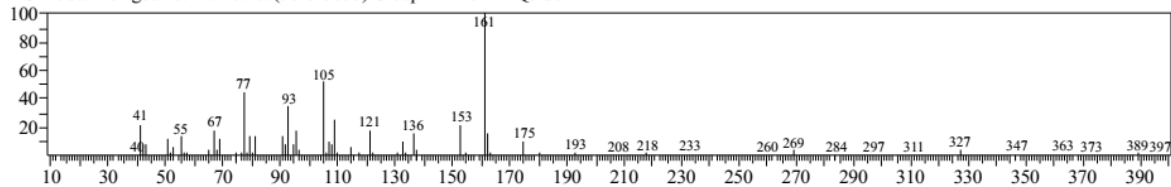
Library Search

<< Target >>

Line#1 R.Time:28.135(Scan#:5628) MassPeaks:145

RawMode:Averaged 28.110-28.155(5623-5632) BasePeak:161.10(10000)

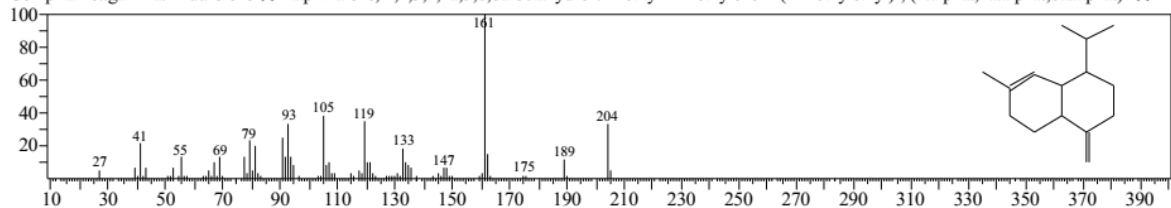
BG Mode:Averaged 28.240-28.260(5649-5653) Group 1 - Event 1 Q3 Scan



Hit#1 Entry:46727 Library:NIST11.lib

SI:75 Formula:C15H24 CAS:30021-74-0 MolWeight:204 RetIndex:1435

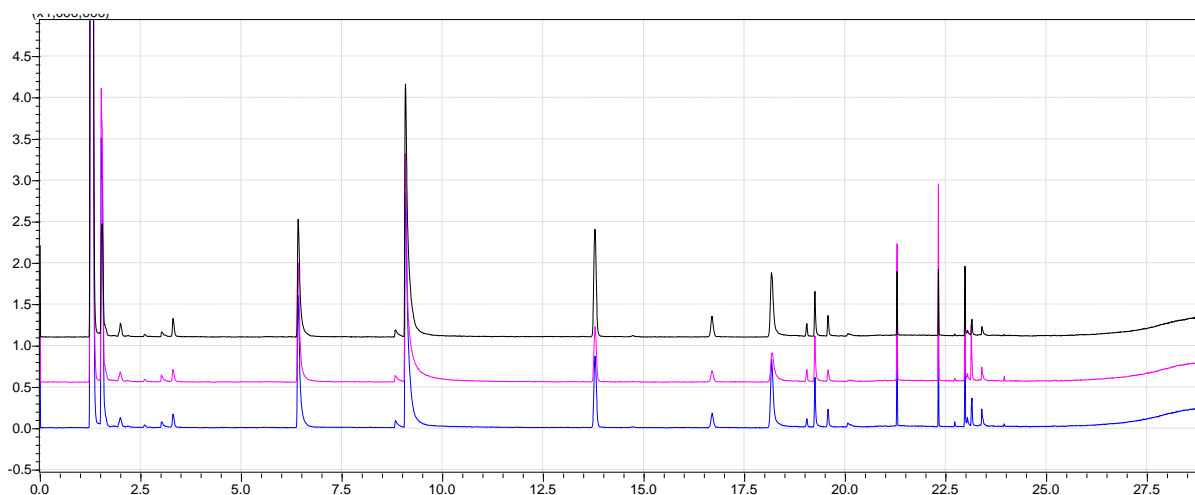
CompName:gamma-Muuroloeno \$\$ Naphthalene, 1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahydro-7-methyl-4-methylene-1-(1-methylethyl)-, (1.alpha.,4a.alpha.,8a.alpha.)- \$\$ 1-



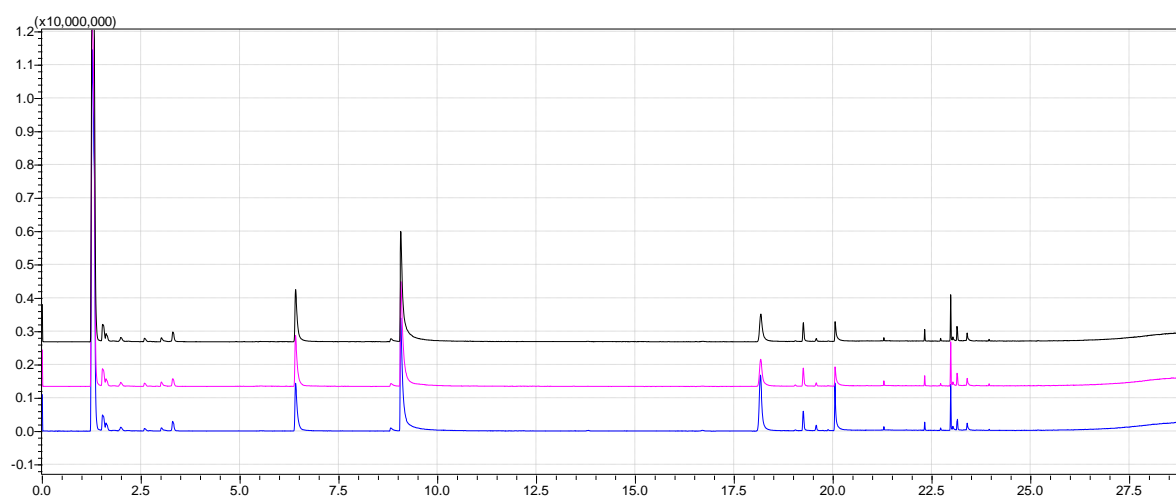
APÊNDICE D – Experimento II: Resistência Induzida - Cromatogramas

Cromatogramas e tabelas de identificação experimental dos compostos orgânicos voláteis presentes nos genótipos de algodão estudados no Experimento II, e não mostrados no texto.

▪ Genótipo 5: BRS-368RF



Cromatogramas da análise por HS-GC/MS das amostras controle de folhas de algodão BRS-368RF.

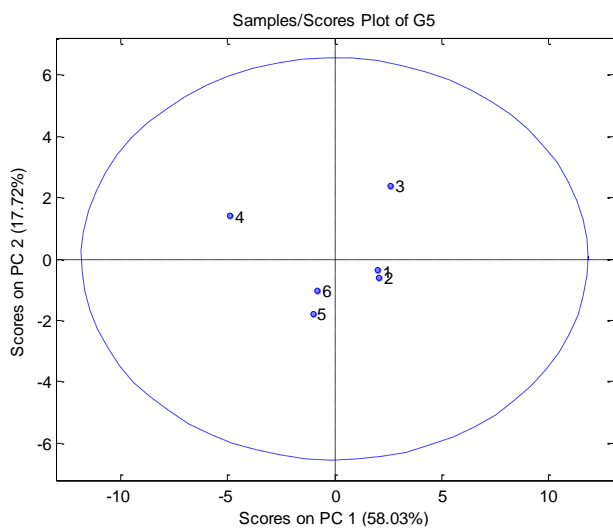


Cromatogramas da análise por HS-GC/MS das amostras de folhas de algodão do genótipo BRS-368RF induzidas por herbivoria.

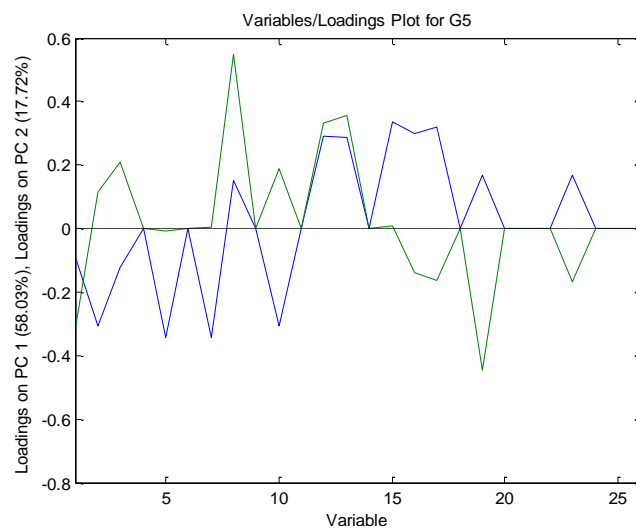
Identificação experimental dos compostos orgânicos voláteis presentes no genótipo de algodão BRS-368RF por HS-GC/MS.

#	Nome	TR (min)	CONTROLE		HERBIVORIA	
			Área média	DPR, %	Área média	DPR, %
1	n-Hexanal	6.402	5,33	4,95	5,21	8,44
2	2-Hexenal	8.811	0,34	5,89	0,32	3,04
3	2-Hexenal	9.065	13,73	8,51	13,96	4,78
5	α -Pinene	13.809	3,26	39,56	0,02	90,26
7	β -Pinene	16.705	0,63	37,55	0,04	42,44
8	β -Mirceno	18.161	3,03	32,16	4,55	34,57
PI	1,4-Cineole (PI)	19.242	1,00	0,00	1,00	0,00
10	Limoneno	19.571	0,35	26,45	0,19	31,25
12	trans- β -Ocimeno	19.869	0	0	0,03	30,77
13	β -Ocimeno	20.047	0	0	1,90	36,78
15	α -Cubebene	22.720	0,04	43,33	0,07	3,46
16	Caryophyllene	22.972	1,02	22,31	1,24	3,02
17	α -Guaieno	23.031	0,14	41,99	0,19	0,62
19	Humuleno	23.144	0,52	48,53	0,56	12,74
23	Azuleno	23.389	0,25	27,98	0,51	72,37

a)

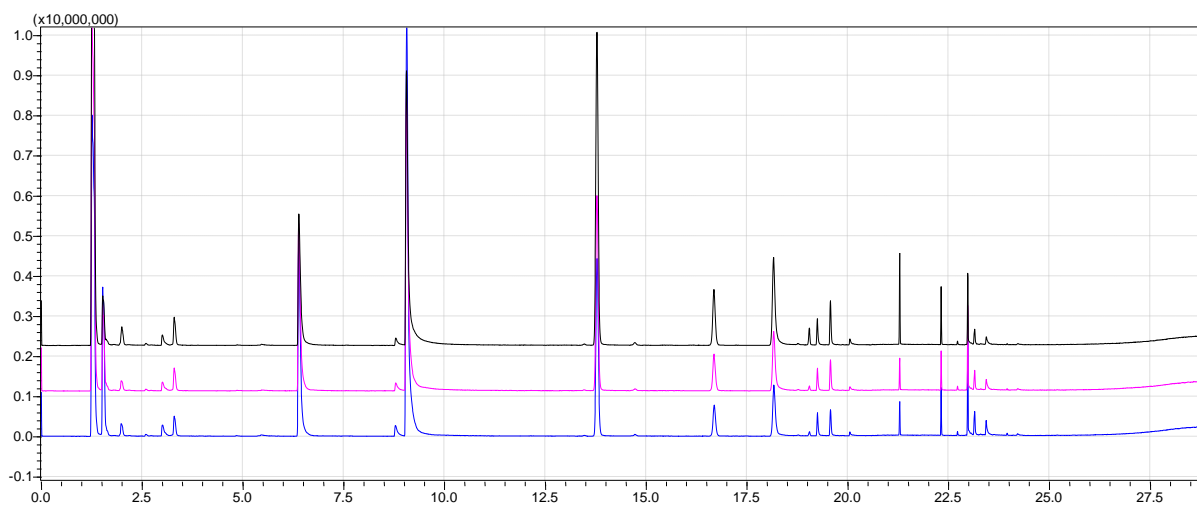


b)

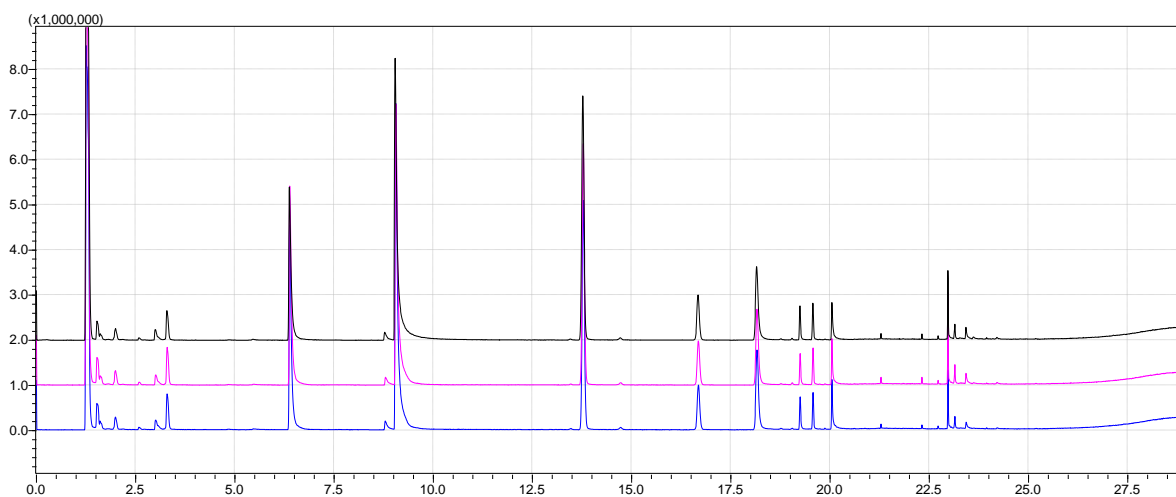


Análise de Componente Principal (PCA) das amostras induzidas por herbivoria (1-3) e amostras controle (4-6) do genótipo 5, BRS-368RF, de algodão. a) Escores; b) Loadings

▪ **Genótipo 6: BRS-372**



Cromatogramas da análise por HS-GC/MS das amostras controle de folhas de algodão BRS-372.

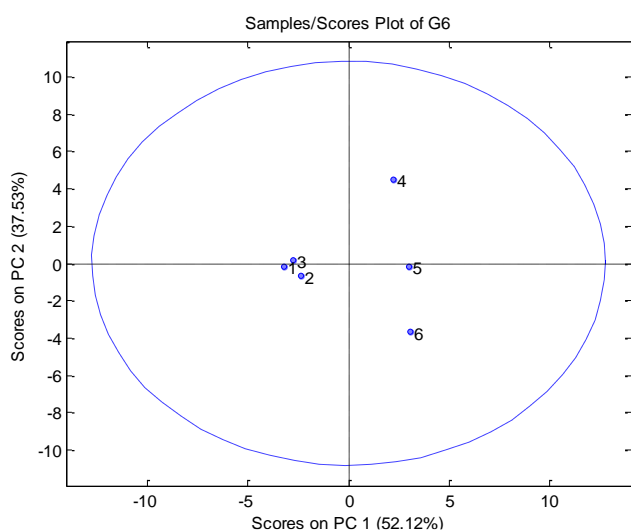


Cromatogramas da análise por HS-GC/MS das amostras de folhas de algodão do genótipo BRS-372 induzidas por herbivoria.

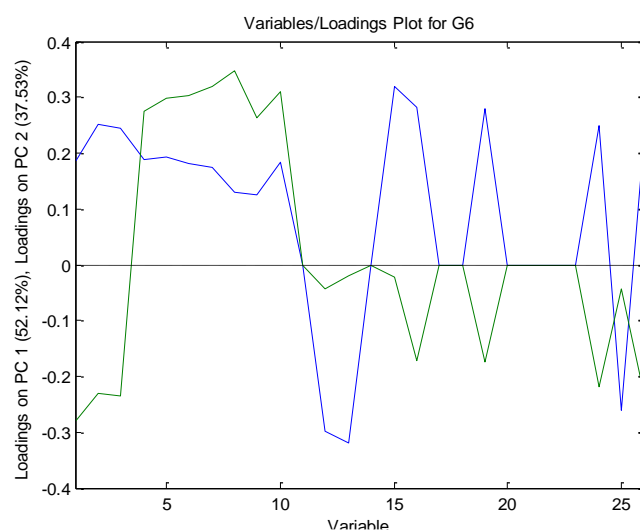
Identificação experimental dos compostos orgânicos voláteis presentes no genótipo de algodão BRS-372 por HS-GC/MS.

#	Nome	TR _(min)	CONTROLE		HERBIVORIA	
			Área média	DPR,%	Área média	DPR,%
1	n-Hexanal	6.383	13,66	25,73	11,24	16,82
2	2-Hexenal	8.790	0,80	28,50	0,52	10,38
3	2-Hexenal	9.057	30,28	26,29	21,19	5,74
4	γ-Terpinene	13.461	0,06	21,61	0,05	6,39
5	α-Pinene	13.780	18,62	22,62	14,34	5,50
6	Canfeno	14.722	0,17	28,59	0,13	8,85
7	β-Pinene	16.684	3,55	22,88	2,84	4,00
8	β-Mirceno	18.159	6,34	25,23	5,36	4,38
9	α-Phellandrene	18.757	0,05	19,26	0,04	20,60
PI	1,4-Cineole (PI)	19.244	1,00	0,00	1,00	0,00
10	Limoneno	19.569	1,33	20,71	1,08	5,06
12	trans-β-Ocimeno	19.869	0	0	0,02	28,02
13	β-Ocimeno	20.046	0,17	26,30	1,43	10,03
15	α-Cubebene	22.720	0,08	7,94	0,05	9,46
16	Caryophyllene	22.972	2,10	21,89	1,24	25,70
19	Humuleno	23.146	0,68	25,71	0,35	29,61
24	α-Ylangene	23.432	0,52	31,28	0,30	31,11
25	α-Farnesene	23.639	0	0	0,04	67,44
26	β-Bisabolol	24.209	0,07	42,40	0,04	12,26

a)

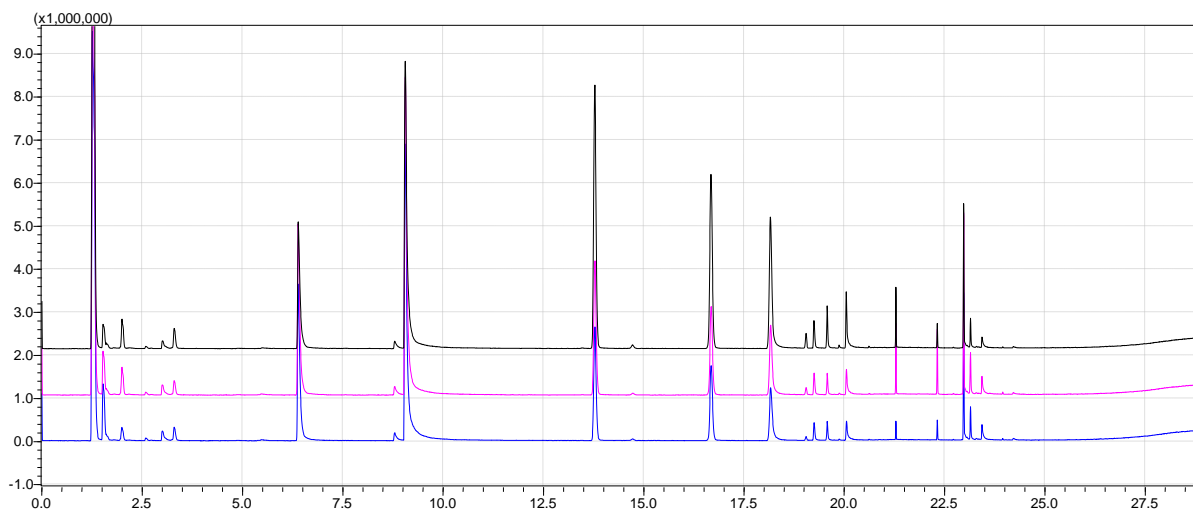


b)

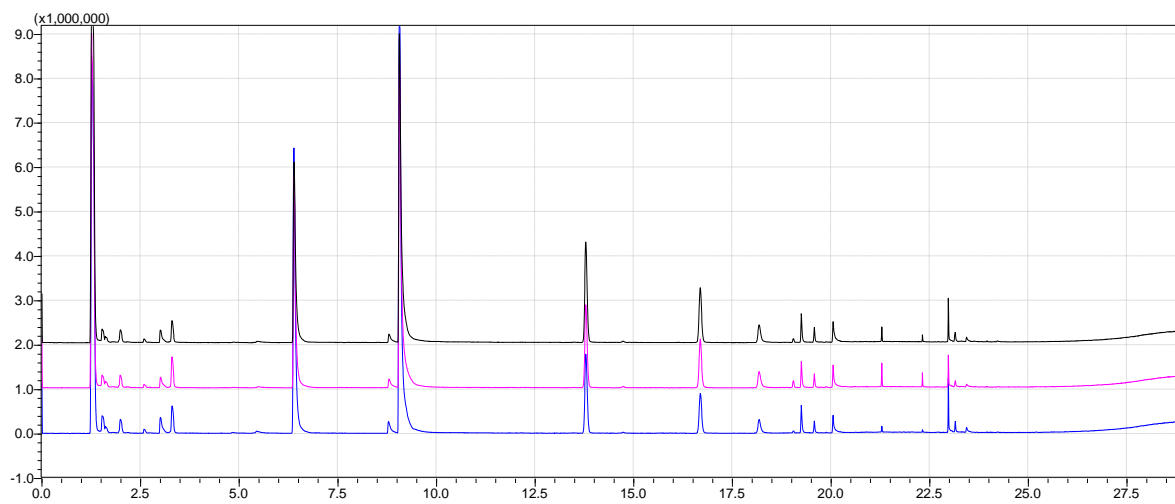


Análise de Componente Principal (PCA) das amostras induzidas por herbivoria (1-3) e amostras controle (4-6) do genótipo 6, BRS-372, de algodão. a) Escores; b) Loadings

▪ **Genótipo 9: FMT-707**



Cromatogramas da análise por HS-GC/MS das amostras controle de folhas de algodão FMT-707.

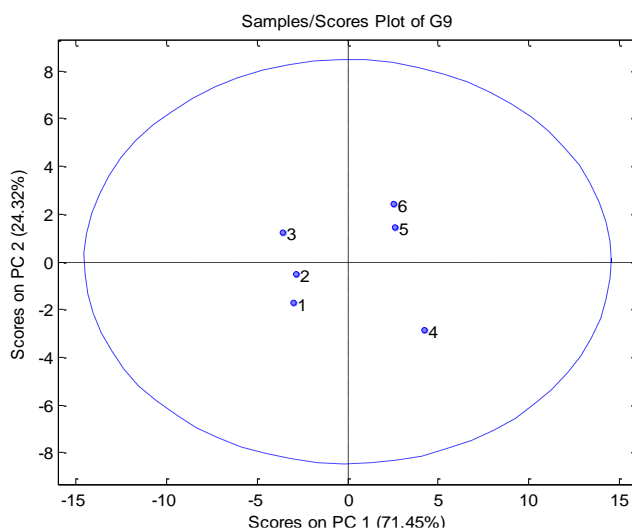


Cromatogramas da análise por HS-GC/MS das amostras de folhas de algodão do genótipo FMT-707 induzidas por herbivoria de *S. cosmioides*.

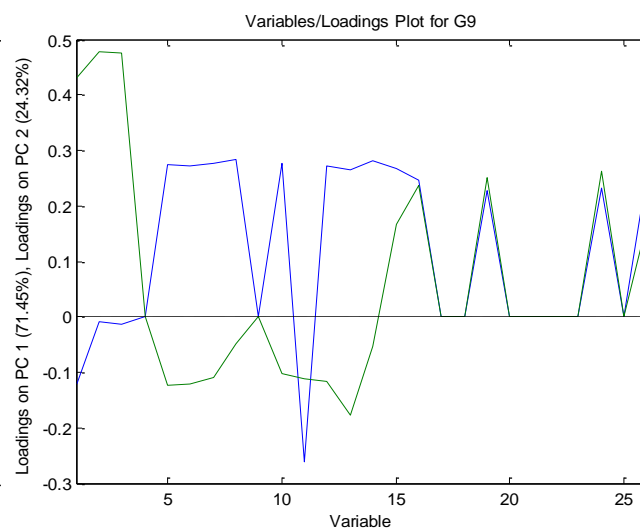
Identificação experimental dos compostos orgânicos voláteis presentes no genótipo de algodão FMT-707 por HS-GC/MS.

#	Nome	RT (min)	CONTROLE		HERBIVORIA	
			Área média	DPR,%	Área média	DPR,%
1	n-Hexanal	6.385	14,17	31,15	16,03	23,10
2	2-Hexenal	8.791	0,79	23,85	0,76	19,56
3	2-Hexenal	9.054	30,99	23,79	29,74	18,76
5	α -Pinene	13.782	14,62	24,57	6,28	9,70
6	Canfeno	14.721	0,21	28,06	0,08	17,51
7	β -Pinene	16.678	10,26	25,59	3,59	14,70
8	β -Mirceno	18.162	8,58	22,54	1,36	15,76
PI	1,4-Cineole (PI)	19.245	1,00	0,00	1,00	0,00
10	Limoneno	19.574	1,10	23,89	0,46	8,67
11	Cyclohexanone	19.747			0,01	35,71
12	trans- β -Ocimeno	19.871	0,06	31,13	0,02	30,66
13	β -Ocimeno	20.051	1,72	22,30	0,96	19,54
14	Cyclohexene	20.615	0,03	30,31		
15	α -Cubebene	22.718	0,02	16,43		
16	Caryophyllene	22.972	4,16	25,14	0,94	16,84
19	Humuleno	23.145	1,10	34,83	0,24	22,97
24	α -Ylangene	23.431	0,74	32,66	0,15	12,45
26	β -Bisabolol	24.211	0,10	18,57		

a)



b)



Análise de Componente Principal (PCA) das amostras induzidas por herbivoria (1-3) e amostras controle (4-6) do genótipo 9, FMT-707, de algodão. a) Escores; b) Loadings

APÊNDICE E – Experimento III: Resistência Induzida por fatores bióticos e abióticos - PCA

Análise do Principal Componente dos tratamentos seis tratamentos do genótipo

Delta Opal

I. MeJA 200 μmolL^{-1} por pulverização

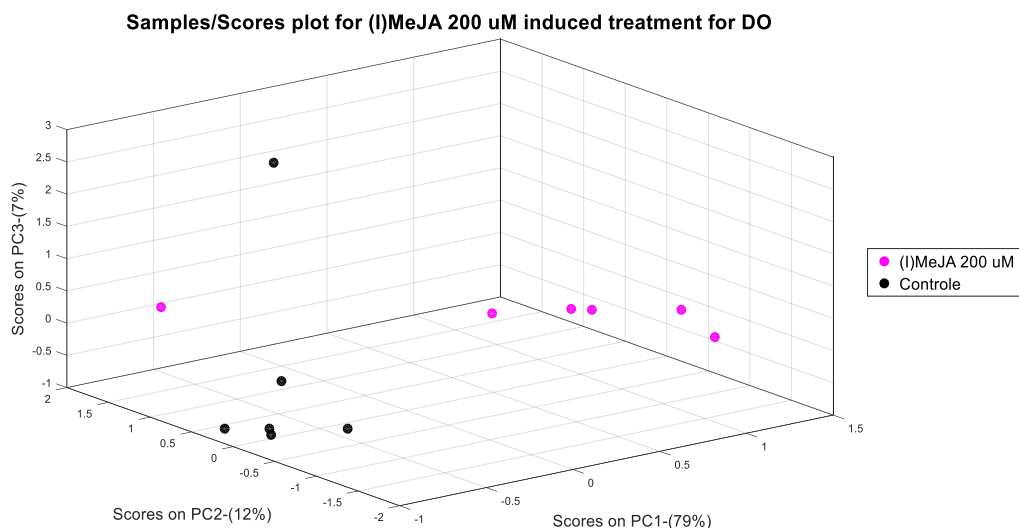


Gráfico de Scores/Amostras para o tratamento (I)MeJA 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ pulverizado para o genótipo Delta Opal

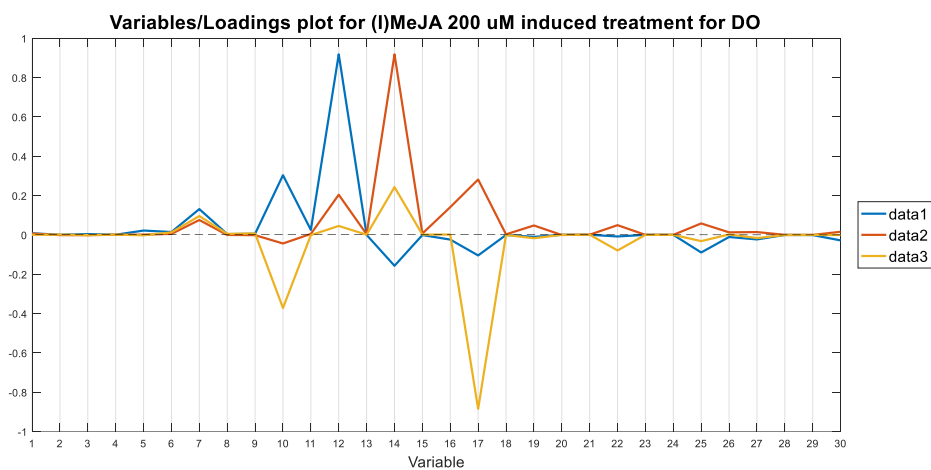


Gráfico de Loadings/Variáveis para o tratamento (I) MeJA 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ pulverizado para o genótipo Delta Opal

II. MeJA 20 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ no solo

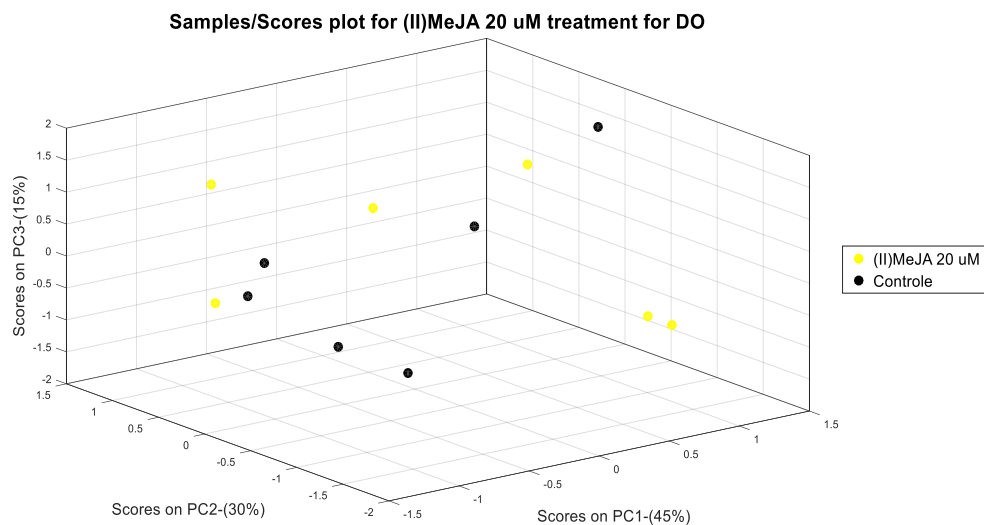


Gráfico de Scores/Amostras para o tratamento (II) MeJA 20 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ no solo para o genótipo Delta Opal

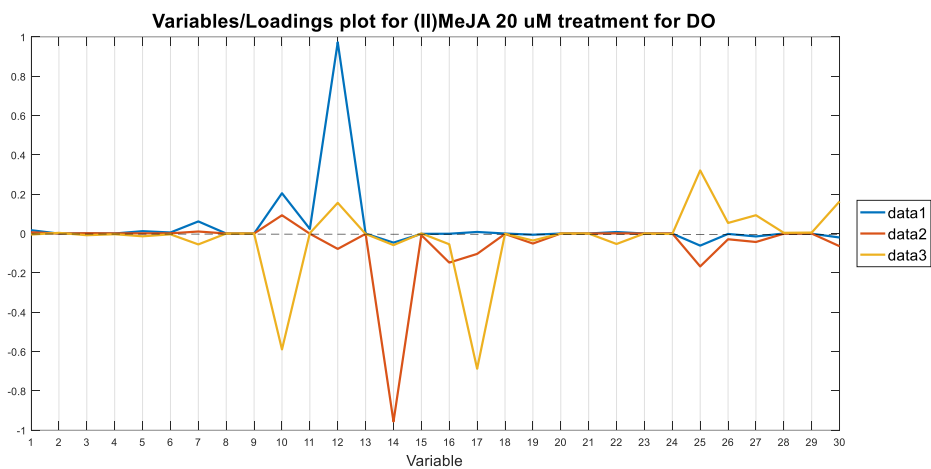


Gráfico de Loadings/Variáveis para o tratamento (II) MeJA 20 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ no solo para o genótipo Delta Opal

III. MeJA 200 μmolL^{-1} no solo

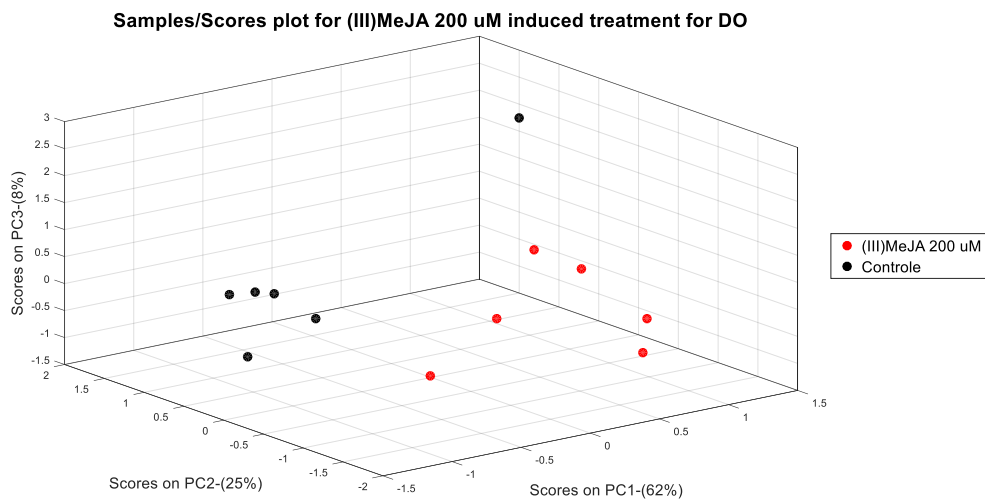


Gráfico de Scores/Amostras para o tratamento (III) MeJA 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ no solo para o genótipo Delta Opal

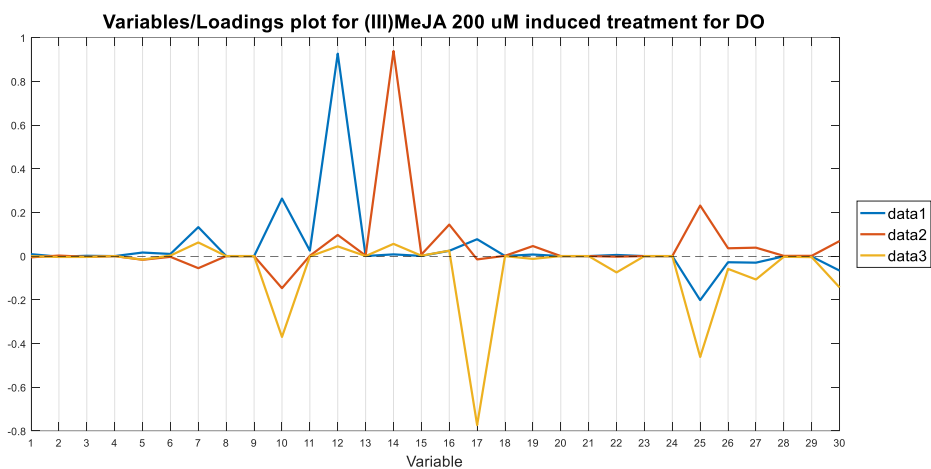


Gráfico de Loadings/Variáveis para o tratamento (III) MeJA 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ no solo pulverizado para o genótipo Delta Opal

IV. Herbivoria + MeJA 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ no solo

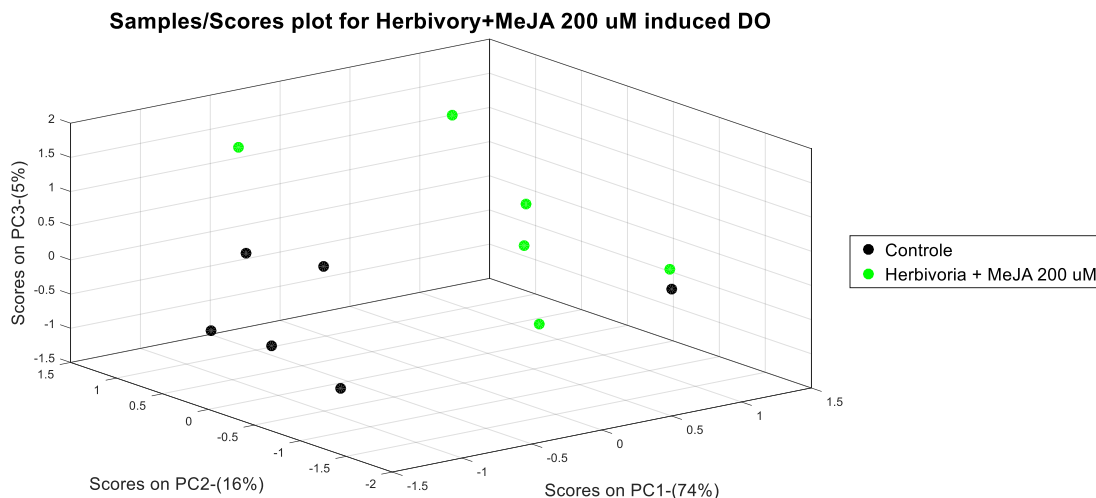


Gráfico de Scores/Amostras para o tratamento (IV) Herbivoria combinada com aplicação direta de MeJA 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ no solo para o genótipo Delta Opal

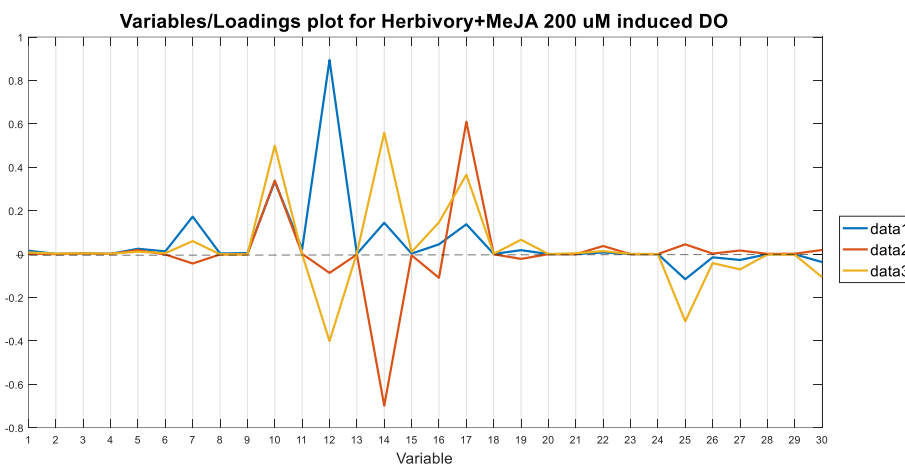


Gráfico de Loadings/Variáveis para o tratamento (IV) Herbivoria combinada com aplicação direta de MeJA 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ no solo para o genótipo Delta Opal

V. Herbivoria de *S. cosmioides*

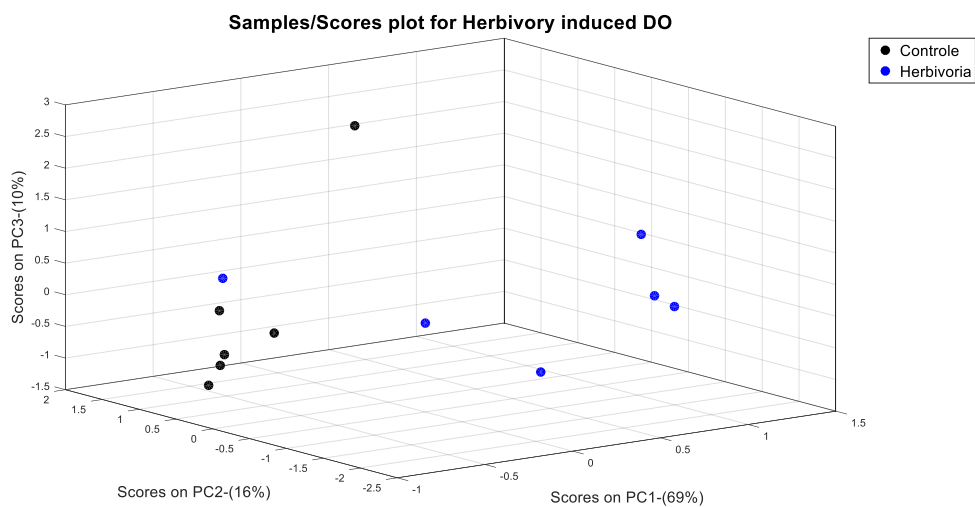


Gráfico de Scores/Amostras para o tratamento (V) Herbivoria de *Spodoptera cosmioides* para o genótipo Delta Opal

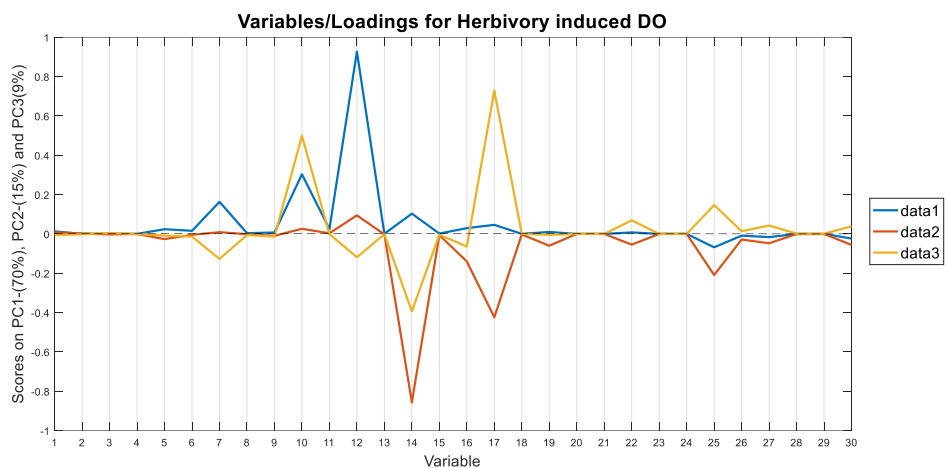


Gráfico de Loadings/Variáveis para o tratamento (V) Herbivoria de *Spodoptera cosmioides* para o genótipo Delta Opal

VI. Estresse hídrico

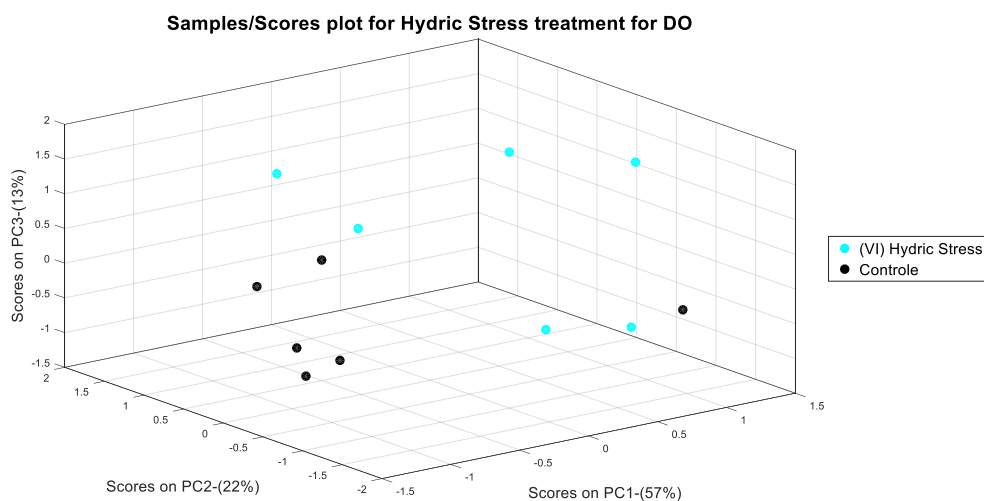


Gráfico de Scores/Amostras para o tratamento (VI) Estresse hídrico para o genótipo Delta Opal

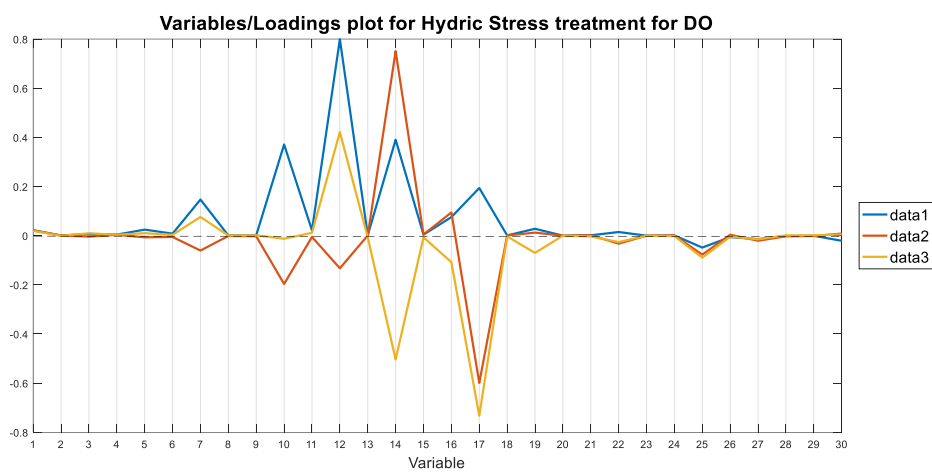


Gráfico de Loadings/Variáveis para o tratamento (VI) Estresse hídrico para o genótipo Delta Opal

Análise do Principal Component dos tratamentos seis tratamentos do genótipo

FMT 701

I. MeJA 200 μmolL^{-1} por pulverização

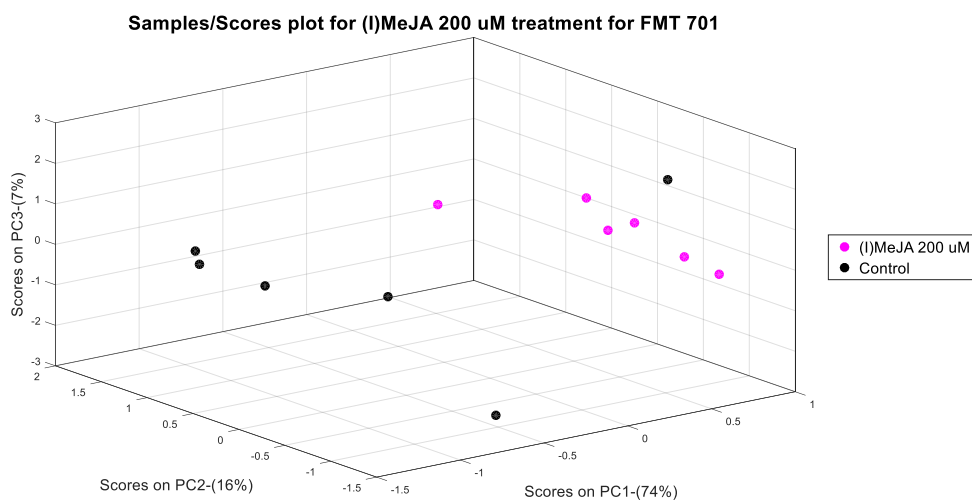


Gráfico de Scores/Amostras para o tratamento (I) MeJA 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ pulverizado para o genótipo FMT 701

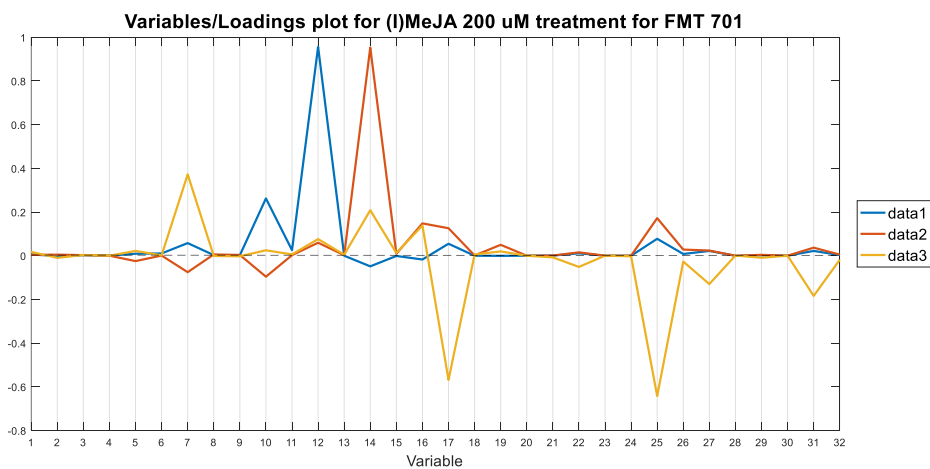


Gráfico de Loadings/Variáveis para o tratamento (I) MeJA 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ pulverizado para o genótipo FMT 701

II. MeJA 20 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ solo

Samples/Scores plot for (II)MeJA 20 μM treatment for FMT 701

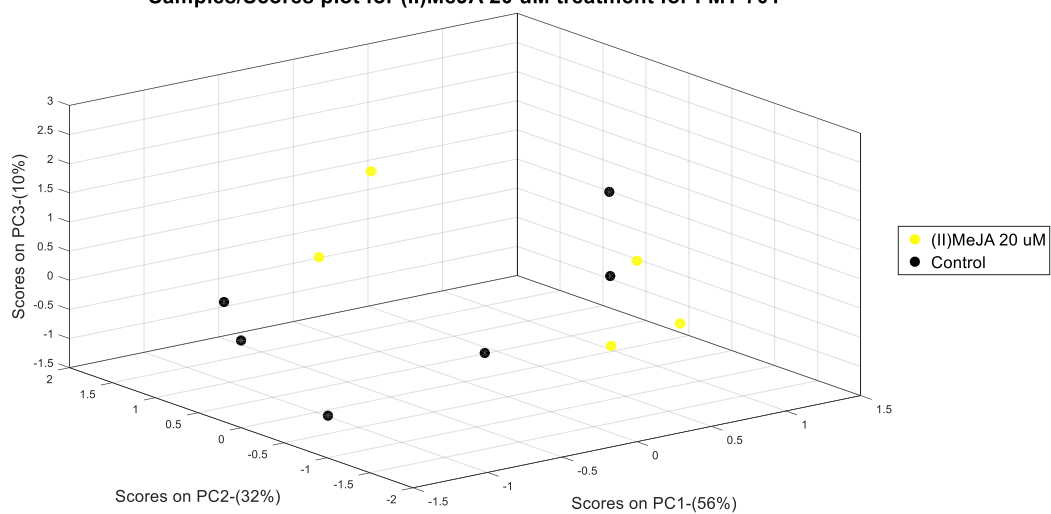


Gráfico de Scores/Amostras para o tratamento (II) MeJA 20 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ no solo para o genótipo FMT 701

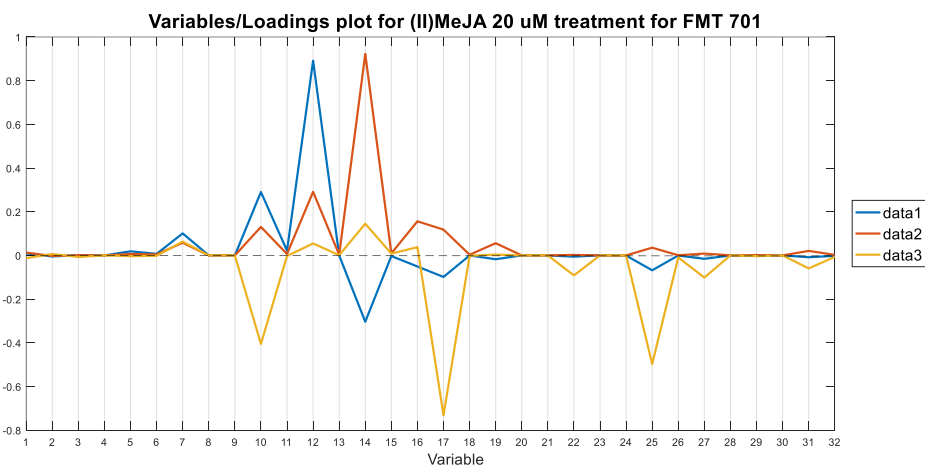


Gráfico de Loadings/Variáveis para o tratamento (II) MeJA 20 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ no solo para o genótipo FMT 701

III. MeJA 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ solo

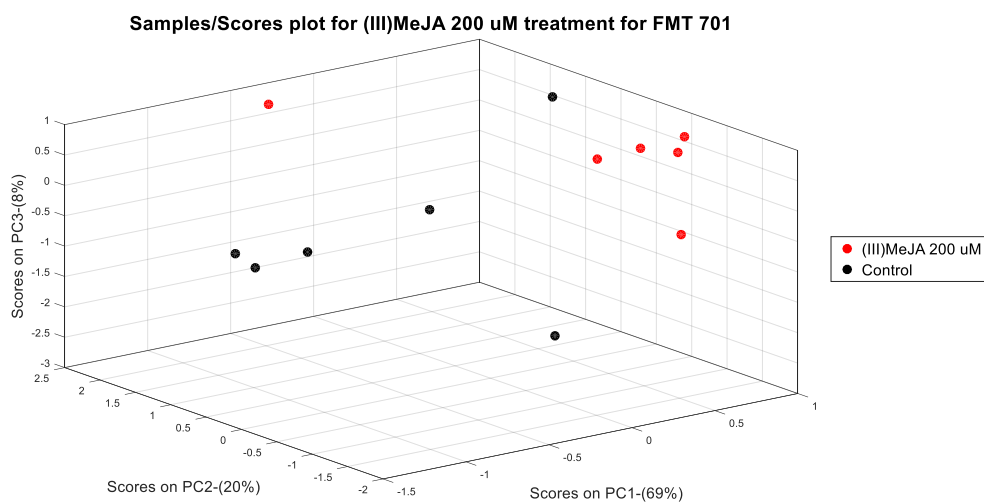


Gráfico de Scores/Amostras para o tratamento (III) MeJA 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ no solo para o genótipo FMT 701

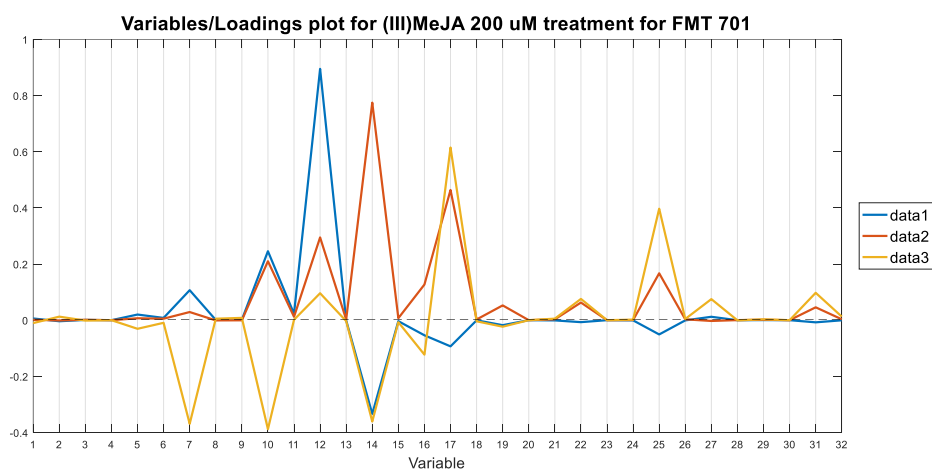


Gráfico de Loadings/Variáveis para o tratamento (III) MeJA 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ no solo pulverizado para o genótipo FMT 701

IV. Herbivoria + MeJA 200 μmolL^{-1}

Samples/Scores plot for (IV)Herbivory + MeJA 200 uM treatment for FMT 701

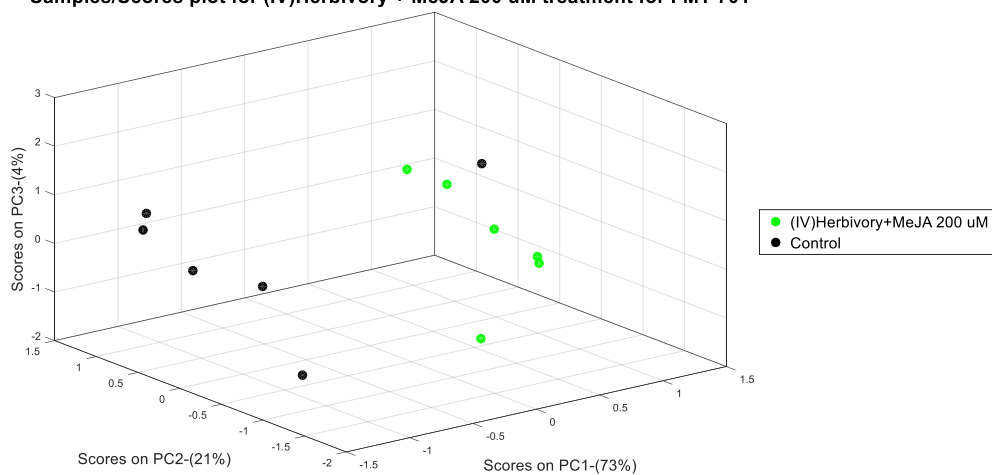


Gráfico de Scores/Amostras para o tratamento (IV) Herbivoria combinada com aplicação direta de MeJA 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ no solo para o genótipo FMT 701

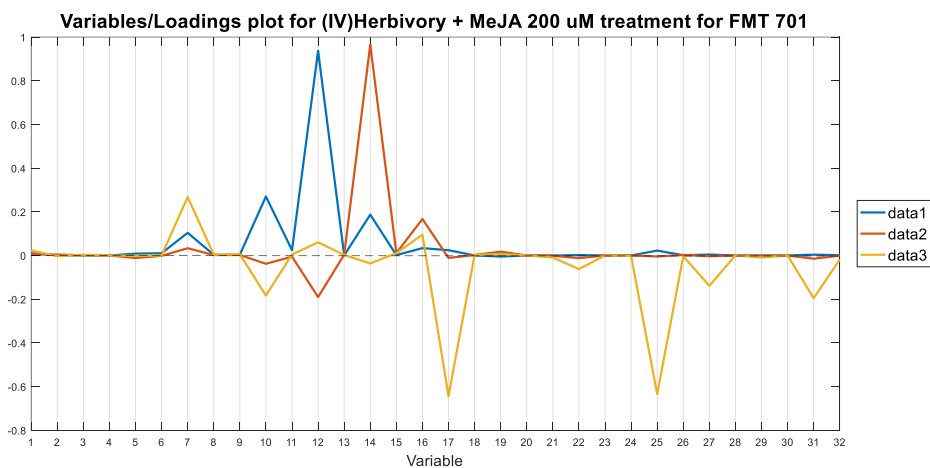


Gráfico de Loadings/Variáveis para o tratamento (IV) Herbivoria combinada com aplicação direta de MeJA 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ no solo para o genótipo FMT 701

V. Herbivoria

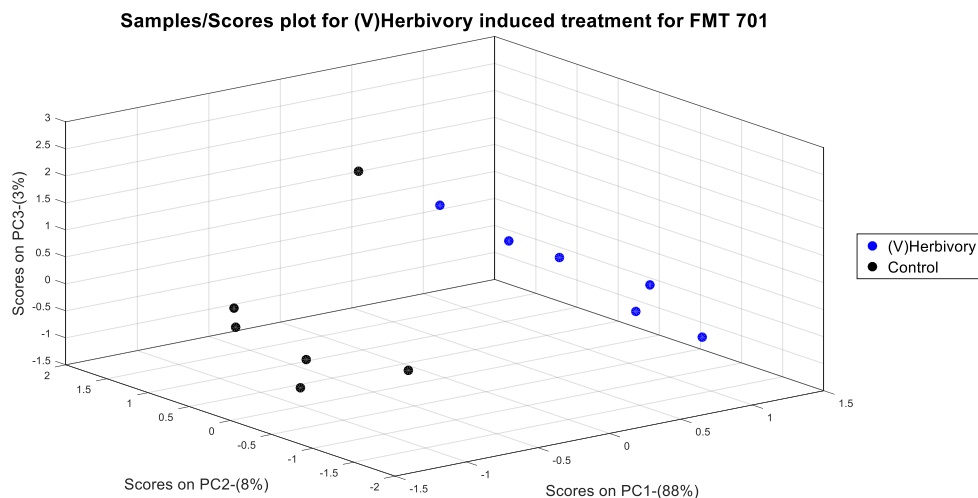


Gráfico de Scores/Amostras para o tratamento (V) Herbivoria de *Spodoptera cosmioides* para o genótipo FMT 701

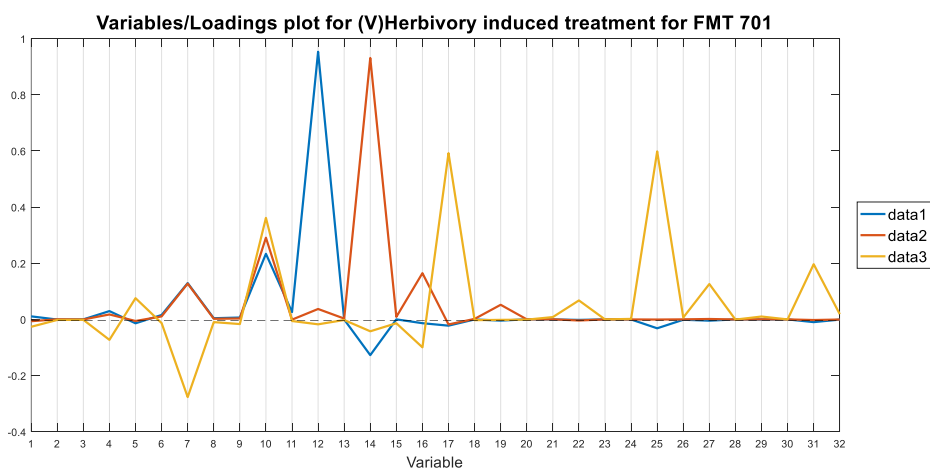


Gráfico de Loadings/Variáveis para o tratamento (V) Herbivoria de *Spodoptera cosmioides* para o genótipo FMT 701

VI. Estresse Hídrico

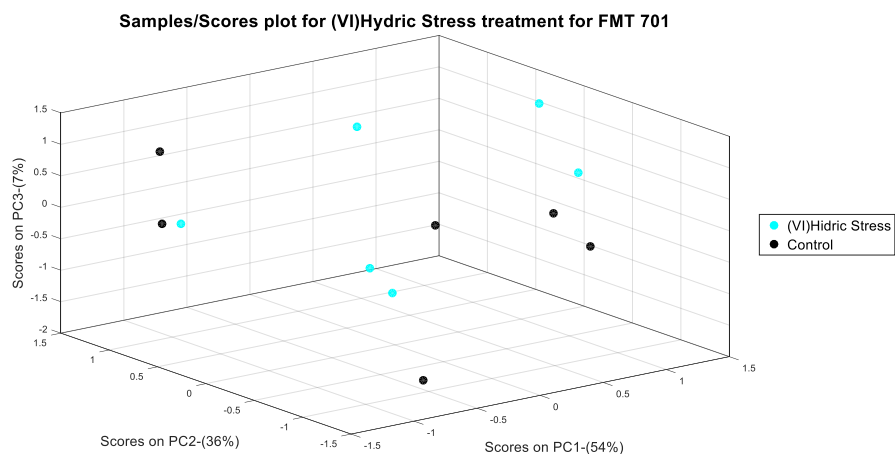


Gráfico de Scores/Amostras para o tratamento (VI) Estresse hídrico para o genótipo FMT 701

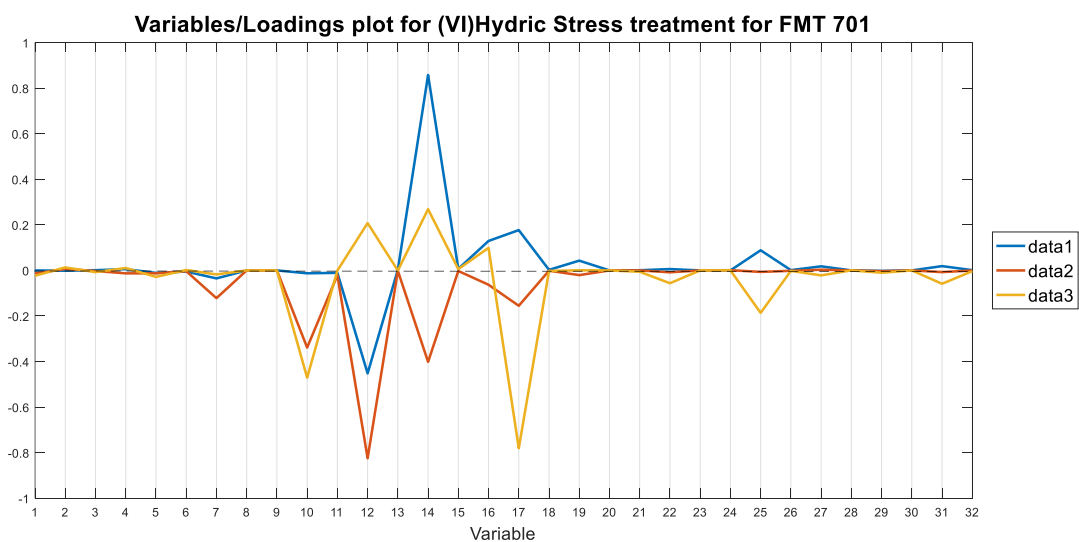


Gráfico de Loadings/Variáveis para o tratamento (VI) Estresse hídrico para o genótipo FMT 701

APÊNDICE F – Experimento III: Resistência Induzida por fatores bióticos e abióticos – *Volcano Plot*

Experiment : Delta Opal (I)

Active entity list : All Entities

Selected pair : [(I) MeJA 200 uM] Vs [Controle]

Color by p-value fold change abundance cut-offs

■ Passed both cut-offs and up-regulate ■ Failed to pass fold change cut-off an ■ Passed both cut-offs and down-regul ■ Failed to pass both cut-offs

Compound	p [(I) MeJA 200 uM] Vs [Controle]	p (Corr) [(I) MeJA 200 uM] Vs [Controle]	FC (abs) [(I) MeJA 200 uM] Vs [Controle]	FC [(I) MeJA 200 uM] Vs [Controle]	Abund Diff (Raw)
2-Butanona	0.005909116	0.009019177	2.0859456	2.0859456	0.22665842
Acetato de etila	0.017832438	0.025857035	1.4268128	1.4268128	0.017137613
Butanal	0.002908906	0.0049622515	2.7241411	2.7241411	0.10405085
2-metil-butanal	2.1772513E-10	6.2298566E-9	40.744358	-40.744358	-0.9754567
1-Penten-3-ol	0.0016089714	0.0029162606	4.196241	4.196241	0.49598494
1-Penten-3-ona	4.1884018E-4	0.0020109012	10.667822	10.667822	0.32108027
-etil-furano	1.0497086E-4	7.6103874E-4	6.938193	6.938193	3.2900693
2-Pental	7.16672E-4	0.0023092765	6.537339	-6.537339	-0.84703255
2-Penten-1-ol	0.001093546	0.0024394488	4.788296	-4.788296	-0.7911575
Hexanal	5.5473135E-4	0.0020109012	3.5953898	3.5953898	7.8369217
2-Hexenal (E)	9.4680925E-4	0.0024394488	3.661682	3.661682	0.6546662
2-Hexenal	0.0010213032	0.0024394488	3.2875478	3.2875478	24.321457
-Felandreno	0.76508427	0.8217572	1.0617765	-1.0617765	-0.0037792549
-Pineno	0.49411738	0.5970585	1.1344881	-1.1344881	-2.529501
Canfeno	0.5457395	0.6308697	1.1321007	-1.1321007	-0.021041349
-Pineno	0.5656073	0.6308697	1.1108444	-1.1108444	-0.3683393
-Mirreno	0.24267377	0.33512092	1.3738856	-1.3738856	-1.3875761
D-limoneno	0.41765782	0.52661204	1.1546571	-1.1546571	-0.17843795
Ciclohexanona	3.8834216E-4	0.0020109012	47.39393	-47.39393	-0.97890025
trans--Ocimeno	5.398245E-4	0.0020109012	33.888462	-33.888462	-0.9704914
-Ocimeno	0.37453327	0.49370295	1.706158	1.706158	0.08018536
Pentanoato de metila	1.0	1.0	1.0	-1.0	0.0
-Cubebeno	1.0	1.0	1.0	-1.0	0.0
-Cariofileno	0.0015217192	0.0029162606	2.467921	-2.467921	-2.550427
-Guaieno	0.0044757887	0.0072109927	2.238556	-2.238556	-0.30244207
Humuleno	9.584781E-4	0.0024394488	2.6990526	-2.6990526	-0.6646167
Iso-cariofileno	4.296453E-10	6.2298566E-9	59.814125	59.814125	0.98328155
Guaia-1(10),11-dieno	2.2929424E-8	2.2165109E-7	33.681934	33.681934	0.9703105
Azuleno	0.0014679533	0.0029162606	3.102418	-3.102418	-0.800459

Abund Diff (Log2)	Log FC ([I] MeJA 200 uM] Vs [Controle])	log2(Fold change)	-log10(correctedPvalue)	Regulation ([I] MeJA 200 uM] Vs [Controle])	p-value fold change abundance cut-offs
-2.1414084	1.0607015	1.0607015	2.044833	up	Passed both cut-offs and u
-5.86669	0.51279604	0.51279604	1.5874213	up	Failed to pass fold change
-3.2646394	1.4458014	1.4458014	2.3043213	up	Passed both cut-offs and u
0.035850238	-5.3485284	-4.0	4.0	down	Passed both cut-offs and d
-1.0116317	2.0690975	2.0690975	2.5351737	up	Passed both cut-offs and u
-1.6389941	3.4151938	3.4151936	2.6966093	up	Passed both cut-offs and u
1.718118	2.79456	2.79456	3.1185932	up	Passed both cut-offs and u
0.23951069	-2.7087035	-2.7087035	2.636524	down	Passed both cut-offs and d
0.3379632	-2.2595124	-2.2595124	2.6127083	down	Passed both cut-offs and d
2.970287	1.8461481	1.8461483	2.6966093	up	Passed both cut-offs and u
-0.6111686	1.8725064	1.8725065	2.6127083	up	Passed both cut-offs and u
4.604158	1.7170118	1.7170118	2.6127083	up	Passed both cut-offs and u
8.047683	-0.08648014	-0.08648016	0.08525649	down	Failed to pass both cut-offs
-1.3388528	-0.18204148	-0.18204147	0.22398312	down	Failed to pass both cut-offs
5.570629	-0.17900229	-0.17900229	0.20006034	down	Failed to pass both cut-offs
1.4408928	-0.15165672	-0.15165672	0.20006034	down	Failed to pass both cut-offs
-0.4725669	-0.4582619	-0.45826197	0.47479847	down	Failed to pass both cut-offs
2.4865057	-0.2074645	-0.20746446	0.2785092	down	Failed to pass both cut-offs
0.030766232	-5.5666304	-4.0	2.6966093	down	Passed both cut-offs and d
0.043212652	-5.082722	-4.0	2.6966093	down	Passed both cut-offs and d
-3.6405172	0.7707513	0.77075124	0.3065343	up	Failed to pass both cut-offs
	-0.0	0.0	-0.0	down	Failed to pass both cut-offs
	-0.0	0.0	-0.0	down	Failed to pass both cut-offs
-1.3507388	-1.3032962	-1.3032962	2.5351737	down	Passed both cut-offs and d
1.7252692	-1.1625683	-1.1625683	2.1420047	down	Passed both cut-offs and d
0.58940554	-1.432453	-1.432453	2.6127083	down	Passed both cut-offs and d
-0.024323517	5.9024143	4.0	4.0	up	Passed both cut-offs and u
-0.043481596	5.073903	4.0	4.0	up	Passed both cut-offs and u
0.32110053	-1.633393	-1.6333932	2.5351737	down	Passed both cut-offs and d

Experiment : FMT (I)
 Active entity list : All Entities
 Selected pair : [(I) MeJA 200 uM] Vs [Controle]

Color by p-value fold change abundance cut-offs

 Failed to pass fold change cut-off an
 Failed to pass both cut-offs
 Passed both cut-offs and up-regulate
 Passed both cut-offs and down-regul

Compound	p ((I) MeJA 200 uM] Vs [Controle])	p (Corr) ((I) MeJA 200 uM] Vs [Controle])	FC (abs) ((I) MeJA 200 uM] Vs [Controle])	FC ((I) MeJA 200 uM] Vs [Controle])	Abund Diff (Raw)	Abund Diff (Log2)	Log FC ((I) MeJA 200 uM] Vs [Controle])	log2(Fold change)	-log10(correctedPvalue)
2-Butanona	0.0038138654	0.016527867	1.5836211	1.5836211	0.13354371	-2.904616	0.6632272	0.6632272	1.7817831
Acetato de etila	0.28744927	0.59406185	1.3007973	-1.3007973	-0.016050264	5.9612594	-0.3793962	-0.37939623	0.22616835
Butanal	4.7557012E-4	0.0043249493	2.2205863	2.2205863	0.052498996	-4.2515664	1.1509407	1.1509407	2.3640192
2-metil-butanal	1.0	1.0	1.0	-1.0	0.0	-0.0	0.0	0.0	-0.0
1-Penten-3-ol	0.056020554	0.14471976	1.7749662	1.7749662	0.15924275	-2.6507003	0.8277916	0.82779163	0.8394722
1-Penten-3-ona	0.0042652558	0.016527867	3.7461436	3.7461436	0.18685782	-2.4199872	1.9054061	1.9054062	1.7817831
-etil-furano	0.014109669	0.039763615	2.7305377	2.7305377	1.4369044	0.5229641	1.449185	1.449185	1.4005141
2-Pentalen	4.7876854E-12	1.4841825E-10	18.354706	-18.354706	-0.9455181	0.08082306	-4.198078	-4.0	4.0
2-Penten-1-ol	5.58058E-4	0.0043249493	11.396842	-11.396842	-0.91225636	0.13248879	-3.5105622	-3.5105622	2.3640192
Hexanal	0.008001277	0.026394755	2.4693997	2.4693997	4.633468	2.2120924	1.3041604	1.3041604	1.5784823
2-Hexenal (E)	0.0027436651	0.014175603	2.7315662	2.7315662	0.48019856	-1.058297	1.4497284	1.4497285	1.8484584
2-Hexenal	0.0026312168	0.014175603	2.478022	2.478022	17.677204	4.1438184	1.3091891	1.3091891	1.8484584
-Felandreno	0.9943646	1.0	1.0008925	1.0008925	6.3337386E-5	-13.946583	0.0012870599	0.0012870597	-0.0
-Pino	0.93553555	1.0	1.0098596	-1.0098596	-0.22402763	2.1582513	-0.014154675	-0.014154676	-0.0
Canfeno	0.96714365	1.0	1.0066085	-1.0066085	-0.0012176782	9.681651	-0.009502665	-0.009502656	-0.0
-Pino	0.9341709	1.0	1.0105945	-1.0105945	-0.039865255	4.648724	-0.015204215	-0.015204248	-0.0
-Mirreno	0.8075036	1.0	1.0493568	-1.0493568	-0.11592674	3.1087146	-0.06950533	-0.06950528	-0.0
D-limoneno	0.86882883	1.0	1.0198549	1.0198549	0.025306463	-5.3043504	0.028363911	0.028363911	-0.0
Ciclohexanona	1.0	1.0	1.0	-1.0	0.0	-0.0	0.0	0.0	-0.0
trans-Ocimeno	0.61813974	1.0	1.8548476	1.8548476	0.061832137	-4.015499	0.8913006	0.8913006	-0.0
-Ocimeno	0.14451495	0.34461257	2.425668	-2.425668	-0.19630612	2.3488228	-1.2783821	-1.2783821	0.46266887
Pentanoato de	1.0	1.0	1.0	-1.0	0.0	-0.0	0.0	0.0	-0.0
-Cubebeno	0.008514437	0.026394755	20.779293	20.779293	0.95187515	-0.071155734	4.3770747	4.0	1.5784823
-Cariofileno	0.36440268	0.7060302	1.2241066	1.2241066	0.49285722	-1.0207584	0.29172912	0.29172915	0.15117674
-Guaieno	0.27897897	0.59406185	1.6736873	1.6736873	0.052090205	-4.262844	0.74303	0.7430301	0.22616835
Humuleno	0.9069238	1.0	1.0584685	1.0584685	0.027020425	-5.209806	0.081978284	0.081978284	-0.0
Iso-cariofileno	9.11775E-11	1.4132513E-9	337.98535	337.98535	0.9970413	-0.0042748507	8.400817	4.0	4.0
Guaia-1(10),11-	0.9587443	1.0	1.0452896	1.0452896	0.001348488	-9.534442	0.06390275	0.06390275	-0.0
Azuleno	1.0	1.0	1.0	-1.0	0.0	-0.0	0.0	0.0	-0.0
Ylangeno	0.40516677	0.73883355	1.3257875	1.3257875	0.123022795	-3.0230024	0.4068496	0.4068496	0.1314534
-bisabolol	0.6365474	1.0	1.5070513	-1.5070513	-0.041987494	4.5738964	-0.59172857	-0.59172857	-0.0

Experiment : FMT (IV)
 Active entity list : All Entities
 Selected pair : [(IV) Herbvorvia + MeJA 200 uM] Vs [Controle]

Color by p-value fold change abundance cut-offs

■ Failed to pass fold change cut-off an
 ■ Failed to pass both cut-offs
 ■ Passed both cut-offs and up-regulate
 ■ Passed both cut-offs and down-regul

Compound	p ((IV) Herbvorvia + MeJA 200 uM] Vs [Controle])	p (Corr) ((IV) Herbvorvia + MeJA 200 uM] Vs [Controle])	FC (abs) ((IV) Herbvorvia + MeJA 200 uM] Vs [Controle])	FC ((IV) Herbvorvia + MeJA 200 uM] Vs [Controle])	Abund Diff (Raw)
2-Butanona	0.0018605582	0.010898842	1.841168	1.841168	0.1924754
Acetato de etila	0.8340246	0.9575838	1.0517546	-1.0517546	-0.0034154877
Butanal	0.25608322	0.52923864	1.2964694	1.2964694	0.0127515495
2-metil-butanal	1.0	1.0	1.0	-1.0	0.0
1-Penten-3-ol	0.018080292	0.050953552	2.1126149	2.1126149	0.22862396
1-Penten-3-ona	0.0021546425	0.010898842	4.418937	4.418937	0.2326372
-etil-furano	0.0024610288	0.010898842	4.15259	4.15259	2.6176662
2-Pental	2.620127E-11	8.122394E-10	19.037064	-19.037064	-0.9474709
2-Penten-1-ol	6.625342E-9	1.026928E-7	14.669347	-14.669347	-0.93183064
Hexanal	0.0035431709	0.013729787	2.9509196	2.9509196	6.151848
2-Hexenal (E)	0.0021033164	0.010898842	2.9589155	2.9589155	0.5432472
2-Hexenal	0.0018458574	0.010898842	2.7309098	2.7309098	20.701744
-Felandreno	0.3871361	0.7059541	1.1512302	1.1512302	0.010734968
-Pino	0.5748867	0.7466514	1.0867373	1.0867373	1.9902248
Canfeno	0.4839559	0.7466514	1.1408547	1.1408547	0.02612549
-Pino	0.4507217	0.7466514	1.1222619	1.1222619	0.4649291
-Mirreno	0.59052193	0.7466514	1.108695	-1.108695	-0.24163318
D-limoneno	0.8217444	0.9575838	1.0271418	1.0271418	0.03459406
Ciclohexanona	1.0	1.0	1.0	-1.0	0.0
trans-Ocimeno	0.08967836	0.19857351	7.105861	7.105861	0.44164404
-Ocimeno	0.005345178	0.018411169	6.94082	-6.94082	-0.28587914
Pentanoato de metila	1.0	1.0	1.0	-1.0	0.0
-Cubebeno	0.07043485	0.18195671	10.348133	10.348133	0.4498774
-Cariofileno	0.5448682	0.7466514	1.1627102	-1.1627102	-0.30775845
-Guaieno	0.4909416	0.7466514	1.1086317	1.1086317	0.008399516
Humuleno	0.51441514	0.7466514	1.1692569	-1.1692569	-0.066897124
Iso-cariofileno	0.0069134613	0.02143173	51.97552	51.97552	0.15082169
Guaia-1(10),11-dieno	0.324662	0.6290326	3.6018925	3.6018925	0.07747114
Azuleno	1.0	1.0	1.0	-1.0	0.0
Ylangeno	0.6021382	0.7466514	1.1748916	-1.1748916	-0.056211114
-bisabolol	0.08384657	0.19857351	3.700904	-3.700904	-0.09107462

Abund Diff (Log2)	Log FC ([[IV] Herbvor a + MeJA 200 uM] Vs [Cont role])	log2(Fold change)	-log10(correctedPvalue)	Regulation ([[IV] Herbvor a + MeJA 200 uM] Vs [Co ntrole])	p-value fold change abun dance cut-offs
-2.377254	0.8806213	0.8806213	1.9626197	up	Failed to pass fold change
8.193693	-0.07279812	-0.072798125	0.018823216	down	Failed to pass both cut-offs
-6.293184	0.3745882	0.37458822	0.27634844	up	Failed to pass both cut-offs
	-0.0	0.0	-0.0	down	Failed to pass both cut-offs
-2.1289515	1.0790298	1.0790298	1.2928255	up	Failed to pass both cut-offs
-2.1038463	2.1436994	2.1436994	1.9626197	up	Passed both cut-offs and u
1.3882811	2.0540113	2.0540113	1.9626197	up	Passed both cut-offs and u
0.07784645	-4.250739	-4.0	4.0	down	Passed both cut-offs and d
0.10186032	-3.8747327	-3.8747327	4.0	down	Passed both cut-offs and d
2.6210198	1.5611646	1.5611646	1.8623362	up	Passed both cut-offs and u
-0.8803192	1.5650685	1.5650685	1.9626197	up	Passed both cut-offs and u
4.3716803	1.4493817	1.4493817	1.9626197	up	Passed both cut-offs and u
-6.5415382	0.20317636	0.20317636	0.15122354	up	Failed to pass both cut-offs
0.9929314	0.1200032	0.12000321	0.1268821	up	Failed to pass both cut-offs
-5.258398	0.19011508	0.19011508	0.1268821	up	Failed to pass both cut-offs
-1.1049174	0.16640937	0.16640937	0.1268821	up	Failed to pass both cut-offs
2.0491095	-0.14886257	-0.14886262	0.1268821	down	Failed to pass both cut-offs
-4.853332	0.038635377	0.038635377	0.018823216	up	Failed to pass both cut-offs
	-0.0	0.0	-0.0	down	Failed to pass both cut-offs
-1.179044	2.8290095	2.8290095	0.70207864	up	Failed to pass both cut-offs
1.8065227	-2.7951062	-2.7951062	1.7349186	down	Passed both cut-offs and d
	-0.0	0.0	-0.0	down	Failed to pass both cut-offs
-1.1523962	3.3712986	3.3712986	0.74003196	up	Failed to pass both cut-offs
1.7001296	-0.21749154	-0.21749152	0.1268821	down	Failed to pass both cut-offs
-6.8954782	0.1487802	0.1487802	0.1268821	up	Failed to pass both cut-offs
3.901912	-0.22559197	-0.22559194	0.1268821	down	Failed to pass both cut-offs
-2.7290843	5.6997604	4.0	1.6689428	up	Passed both cut-offs and u
-3.6901972	1.8487551	1.8487552	0.20132683	up	Failed to pass both cut-offs
	-0.0	0.0	-0.0	down	Failed to pass both cut-offs
4.153001	-0.23252764	-0.23252766	0.1268821	down	Failed to pass both cut-offs
3.4568071	-1.8878777	-1.8878778	0.70207864	down	Failed to pass both cut-offs

Experiment : FMT (V)

Active entity list : All Entities

Selected pair : [(V) Herbivoria] Vs [Controle]

Color by p-value fold change abundance cut-offs

■ Passed both cut-offs and up-regulate |
 ■ Failed to pass both cut-offs |
 ■ Failed to pass fold change cut-off an |
 ■ Passed both cut-offs and down-regul

Compound	p ([(V) Herbivoria] Vs [Controle])	p (Corr) ([(V) Herbivoria] Vs [Controle])	FC (abs) ([(V) Herbivoria] Vs [Controle])	FC ([(V) Herbivoria] Vs [Controle])	Abund Diff (Raw)
2-Butanona	0.0016089496	0.0049877437	2.0758047	2.0758047	0.24616472
Acetato de etila	0.17315654	0.3354908	1.3973157	-1.3973157	-0.019736
Butanal	0.65577465	0.77854097	1.0787224	1.0787224	0.0033859462
2-metil-butanal	0.019828273	0.047282804	1.4242046	-1.4242046	-0.2978537
1-Penten-3-ol	4.999559E-5	5.166211E-4	4.866572	4.866572	0.79451656
1-Penten-3-ona	2.2419961E-4	0.0015535	7.5777154	7.5777154	0.4475722
-etil-furano	5.550409E-4	0.0021507835	5.5934353	5.5934353	3.8140323
2-Pentenal	5.57359E-10	1.727813E-8	9.828624	-9.828624	-0.89825636
2-Penten-1-ol	4.6640185E-8	7.229229E-7	6.405011	-6.405011	-0.84387225
Hexanal	0.0014434571	0.004971908	3.4671223	3.4671223	7.7795944
2-Hexenal (E)	3.006774E-4	0.0015535	3.8639536	3.8639536	0.7942328
2-Hexenal	2.7032822E-4	0.0015535	3.4445503	3.4445503	29.236904
-Felandreno	0.39075392	0.6056686	1.1199572	-1.1199572	-0.007603042
-Pino	0.26565364	0.4575146	1.167243	-1.167243	-3.287651
Canfeno	0.98003775	1.0	1.0038879	-1.0038879	-7.183105E-4
-Pino	0.47729188	0.67254764	1.1023124	-1.1023124	-0.35295463
-Mirreno	0.5444763	0.732407	1.1105015	-1.1105015	-0.24524975
D-limoneno	0.56702477	0.732407	1.0776267	-1.0776267	-0.091813564
Ciclohexanona	4.2473996E-4	0.0018809913	42.151997	-42.151997	-0.97627634
trans--Ocimeno	0.4724453	0.67254764	2.2271607	-2.2271607	-0.03985431
-Ocimeno	0.013341199	0.03446476	6.181179	-6.181179	-0.27996522
Pentanoato de metila	1.0	1.0	1.0	-1.0	0.0
-Cubeveno	0.008055446	0.02270171	20.779293	20.779293	0.95187515
-Cariofileno	0.18807046	0.342952	1.2777715	-1.2777715	-0.47808087
-Guaieno	0.16431503	0.3354908	2.2417157	2.2417157	0.09601072
Humuleno	0.63058656	0.77854097	1.0899454	-1.0899454	-0.0381369
Iso-cariofileno	0.044325214	0.09814869	18.990578	18.990578	0.05322889
Guaia-1(10),11-dieno	0.6780841	0.77854097	1.6676954	1.6676954	0.019880572
Azuleno	1.0	1.0	1.0	-1.0	0.0
Ylangeno	0.36325145	0.5926734	1.29329	-1.29329	-0.085635275
-bisabolol	0.85648906	0.9482558	1.1959504	-1.1959504	-0.020446956

Abund Diff (Log2)	Log FC ([[V Herbivoria] Vs [Controle]])	log2(Fold change)	-log10(correctedPvalue)	Regulation ([[V Herbivoria] Vs [Controle]])	p-value fold change abundance cut-offs
-2.022304	1.0536708	1.0536708	2.302096	up	Passed both cut-offs and u
5.663027	-0.48265806	-0.482658	0.4743194	down	Failed to pass both cut-offs
-8.206225	0.10932359	0.10932359	0.10871853	up	Failed to pass both cut-offs
1.7473242	-0.5101564	-0.51015645	1.3252968	down	Failed to pass fold change
-0.3318508	2.2829058	2.2829058	3.2868278	up	Passed both cut-offs and u
-1.1598077	2.921763	2.921763	2.8086886	up	Passed both cut-offs and u
1.9313171	2.4837346	2.4837346	2.6674032	up	Passed both cut-offs and u
0.15480085	-3.2969894	-3.2969892	4.0	down	Passed both cut-offs and d
0.24490349	-2.6792011	-2.6792011	4.0	down	Passed both cut-offs and d
2.9596949	1.7937387	1.7937388	2.303477	up	Passed both cut-offs and u
-0.33236617	1.9500778	1.9500778	2.8086886	up	Passed both cut-offs and u
4.8697186	1.7843156	1.7843157	2.8086886	up	Passed both cut-offs and u
7.0392075	-0.16344361	-0.16344365	0.21776493	down	Failed to pass both cut-offs
-1.7170572	-0.22310494	-0.22310498	0.33959505	down	Failed to pass both cut-offs
10.443105	-0.0055981665	-0.005598134	-0.0	down	Failed to pass both cut-offs
1.5024453	-0.14053321	-0.14053318	0.17227694	down	Failed to pass both cut-offs
2.0276763	-0.15121138	-0.15121137	0.13524753	down	Failed to pass both cut-offs
3.445149	-0.10785751	-0.10785754	0.13524753	down	Failed to pass both cut-offs
0.03463853	-5.397529	-4.0	2.725613	down	Passed both cut-offs and d
4.6491203	-1.1552056	-1.1552056	0.17227694	down	Failed to pass both cut-offs
1.8366805	-2.627882	-2.627882	1.4626247	down	Passed both cut-offs and d
	-0.0	0.0	-0.0	down	Failed to pass both cut-offs
-0.071155734	4.3770747	4.0	1.6439414	up	Passed both cut-offs and u
1.0646734	-0.35362983	-0.35362983	0.46476665	down	Failed to pass both cut-offs
-3.3806608	1.1646032	1.1646034	0.4743194	up	Failed to pass both cut-offs
4.7126684	-0.12425591	-0.124255896	0.10871853	down	Failed to pass both cut-offs
-4.2316465	4.247212	4.0	1.0081154	up	Failed to pass both cut-offs
-5.652497	0.7378558	0.7378558	0.10871853	up	Failed to pass both cut-offs
	-0.0	0.0	-0.0	down	Failed to pass both cut-offs
3.545651	-0.37104583	-0.37104583	0.22718455	down	Failed to pass both cut-offs
5.61197	-0.25815755	-0.25815758	0.023074502	down	Failed to pass both cut-offs